

# **DIPLOMAMUNKA**

**Fodor Vivien**

**2024**

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék**



**Szarvasmarhából izolált *Pasteurella multocida* törzsek antibiotikum  
érzékenységi vizsgálata**  
**Antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from  
cattle**

**Készítette: Fodor Vivien**

**Témavezető: Dr. Tóth Gergely, egyetemi tanársegéd**  
**ÁTE, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék**

**Budapest**

**2023**

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                           |        |
|---------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Rövidítések jegyzéke.....                                              | - 3 -  |
| 2. Szakirodalmi áttekintés .....                                          | - 4 -  |
| 2.1. <i>Pasteurella multocida</i> .....                                   | - 4 -  |
| 2.2. <i>Pasteurella multocida</i> okozta betegségek szarvasmarhában ..... | - 5 -  |
| 2.3. Antibiotikum rezisztencia.....                                       | - 6 -  |
| 2.4. Antimikrobiális szerek.....                                          | - 8 -  |
| 2.5. A hazai és külföldi vizsgálatok eredményeinek összegzése .....       | - 13 - |
| 3. Célkitűzések.....                                                      | - 17 - |
| 4. Anyag és módszer.....                                                  | - 18 - |
| 4.1. A felhasznált baktériumtörzsek.....                                  | - 18 - |
| 4.2. A baktériumok izolálása és azonosítása .....                         | - 18 - |
| 4.3. Az antibiotikum- érzékenység vizsgálata.....                         | - 19 - |
| 5. Eredmények .....                                                       | - 22 - |
| 5.1. $\beta$ -laktám antibiotikumok.....                                  | - 22 - |
| 5.2. Spektinomycin.....                                                   | - 24 - |
| 5.3. Oxitetraciklin.....                                                  | - 25 - |
| 5.4. Makrolid antibiotikumok.....                                         | - 25 - |
| 5.5. Florfenikol .....                                                    | - 27 - |
| 5.6. Fluorokinolonok.....                                                 | - 27 - |
| 5.7. Az E-teszt eredményei.....                                           | - 28 - |
| 5.8. A leves mikrohígításos módszer összefoglaló táblázata.....           | - 28 - |
| 6. Megbeszélés és Következtetések.....                                    | - 30 - |
| 7. Összefoglalás .....                                                    | - 34 - |
| 8. Summary .....                                                          | - 35 - |
| 9. Irodalomjegyzék .....                                                  | - 36 - |
| 10. Köszönetnyilvánítás.....                                              | - 40 - |

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|                       |                                                                                   |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| AMR                   | Antimicrobial Resistance                                                          |
| AMX                   | Amoxicillin                                                                       |
| BRDC                  | Szarvasmarhák légzőszervi komplex betegsége<br>Bovine Respiratory Disease Complex |
| CLSI                  | Clinical & Laboratory Standards Institute                                         |
| DAN                   | Danofloxacin                                                                      |
| EFT                   | Ceftiofur                                                                         |
| ENR                   | Enrofloxacin                                                                      |
| FFC                   | Florfenikol                                                                       |
| OTC                   | Oxitetraciklin                                                                    |
| <i>M. haemolytica</i> | <i>Mannheimia haemolytica</i>                                                     |
| MIC                   | Minimális gátló koncentráció<br>Minimum Inhibitory Concentration                  |
| MPC                   | Mutációt megelőző koncentráció<br>Mutant Prevention Concentration                 |
| MRSA                  | Meticillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>                                |
| PEN                   | Penicillin                                                                        |
| <i>P. multocida</i>   | <i>Pasteurella multocida</i>                                                      |
| SPEC                  | Spektinomycin                                                                     |
| TIL                   | Tilmikozin                                                                        |
| TUL                   | Tulatromicin                                                                      |

## 2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. *Pasteurella multocida*

A *Pasteurellaceae* családba tartozó baktériumot Louis Pasteur már 1881-ben izolálta, mint baromfikolerát okozó ágenset.[1] Azóta több más gazdaságilag fontos betegség is hozzákapcsolható, mint például a nyulak pasteurellózisa, sertések torzító orrgyulladása, a szarvasmarhák vérzéses vérfertőzése.

A nyálkahártyák, főleg a felső légút és szájüreg természetes lakói. Fakultatív patogén baktériumként az emlősöket, madarakat és az embert is képes megfertőzni főleg kutya és macskaharapások révén.[5] Vérzéses septikaemiával járó generalizált-, vagy főleg légzőszervet, ritkábban más szerveket érintő megbetegedéseket okoz.[3]

Gram- negatív, kisméretű, 0,3- 1 µm széles, és 1-2 µm hosszú coccoid baktériumok vagy rövid pálcák.[4] Fimbriával és burokkal rendelkeznek, csillóval nem. Gyakran jellemző rájuk a bipoláris festődés.

Areob, fakultatív anaerob baktériumok. Igényesek, tenyésztésükhöz élesztőkivonatot és vérsavót tartalmazó agar, vagy véresagar szükséges. Érzékenyek a táptalaj pH-ja iránt is, az optimális számukra az enyhén lúgos, vagy neutrális táptalaj. [2]

Telepeik 24- 48 óra, és 35°C-os hőmérsékleten nőnek ki, egyes törzsek pedig szén- dioxid alatt jobban fejlődnek. [4]

A *Pasteurella multocida* törzsek sejtfalában lévő antigénjei alapján számos módszerrel szerotipizálhatók. A burkában lévő poliszacharid antigénjei alapján passzív hemagglutinációs próbával Carter és munkatársai 5 félé (A, B, D, E és F) típusba sorolta.[5] Heddleston pedig 16 szerotípust különböztetett meg a sejtfal lipopoliszacharid-antigénjének gélprecipitációs próbája alapján.[6]

A különböző szénhidrátok, mint például a szorbit és dulcitol fermentációs különbsége alapján három alfajt különböztetünk meg: *Pasteurella multocida subsp. multocida*, *subsp. septica* és *subsp. gallicida*. 2002-ben pedig egy negyedik alfajt adtak hozzá, *Pasteurella multocida subsp. tigris*. [7] Ezek megkülönböztetése azonban epidemiológiai vizsgálatok során használatos, nem pedig a rutin diagnosztikában.

A kevésbé ellenálló baktériumok közé tartoznak, 60°C-os hőmérsékleten vagy formalin, vagy a klórlúg 1-3 %-os oldata percek alatt elpusztítja.[2] Saját tenyészetében szobahőn kipusztul 3 nap alatt, hűtőben tárolva is csupán 1 hétig életképes átoltás nélkül. Azonban elhullott állatokban, beteg állatok váladékában és a tavak, itatóvályúk vizében hetekig életképes marad. [3]

## **2.2. *Pasteurella multocida* okozta betegségek szarvasmarhában**

### **2.2.1. A szarvasmarha vérzésses vérfertőzése**

A *Pasteurella multocida* B:2 Délkelet Ázsiában, a *P. multocida* E:2 pedig Afrikában főleg monszunesőzésekhez kapcsolódva okozza a tömeges elhullással járó haemorrhagiás septikaemiát, vagy más néven „bivalyvészt”. [8] 2013-ban Magyarországon is detektáltak *P. multocida* B-t, sertésekben.[9]

Elsősorban a bivaly, a szarvasmarha, ritkábban más vadon élő kérődző és a sertés betegsége a szubtrópusi országokban. A betegség gyakran hirtelen elhullással kezdődik, az elhúzódó esetekben pedig az állatok 1-3 napos lappangási idő után lázasak, étvágytalanok, orrnyílásukból pedig savó, vagy véres savó szivárog. Jellemző tünet a toroktájék és a lebernycs ödémás beszűrődése, a „szakáll”, amely miatt nehéz légzés és következményesen fulladás is bekövetkezhet. [3] A morbiditás, és a mortalitás is magas akár elérheti az 50-100%-ot.[10]

A gyógyítására különféle antibiotikumok használhatóak, azonban ez csak a betegség legelején, az ödémás tünetek megjelenése előtt alkalmazható eredményesen. Nagy hangsúlyt kell fektetni a megelőzésre, az állatok megfelelő szállítására, tartására, esőtől való védelmére, valamint léteznek vakcinák, melyekkel akár 9-12 hónapig tartó védettség elérhető. [3]

### **2.2.2. A szarvasmarha légzőszervi komplex betegsége**

A BRDC egy összetett, multifaktoriális betegség amely főleg a borjakban, ritkábban felnőtt szarvasmarhákban okoz bronchitist, kruppos tüdő- és mellhártyagyulladást. Az egyik legnagyobb gazdasági veszteséget okozó kór a szarvasmarha tenyésztésben.[11] Kialakulásában fontos szerepe van a hajlamosító tényezőknek, mint a zsúfolt tartás, nem megfelelő szállítás, ezért főként az intenzíven tartott húsmarháknál és nagyüzemben tartott tejtermelő állatoknál jelentős morbiditást és mortalitást tud okozni. [12]

A fő kórokozók a *P. multocida* főleg az A, ritkán a D biotípusú törzsei és/ vagy a *Mannheimia haemolytica*, *Bibersteinia trehalosi*, *Histophilus somni* és *Trueperella pyogenes*. [13] Ezek a főként fakultatív patogén kórokozók hajlamosító tényezők hatására önnállóan, vagy a korábbi vírusfertőzések okozta nyálkahártya sérüléseken keresztül szaporodnak el a szövetekben. [3] A legfontosabb virális kórokozók melyek szerepet játszanak a BRDC kialakulásában a BRSV (Bovine Respiratory Syncytial Vírus), a parainfluenza-3, a BHV-1 (Bovine Herpesvirus-1) és a BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus).[14–17]

A pár hetes borjak anyjuktól, idősebb társaiktól általában aerogén úton fertőződnek meg, majd hónapokig is hordozzák és ürítik orrváladékukkal a kórokozókat. A kezdeti enyhe tünetek fokozatosan progrediálnak, későbbiekben gennyes orrfolyás, nehézlégzés, kachexia és néhány hét alatt elhullás következhet be.[3]

Felnőtt szarvasmarhákban általában hosszabb, kimerítő szállítások után jelentkezik a pasteurellák okozta tüdőgyulladás, melyet szállítási betegségnek (shipping fever) is neveznek.[18, 19] Ez a betegség főleg a *M. haemolytica*hoz köthető, de a *P. multocida* *H. somnival* együtt ritkább, de lehetséges kórokozó. Magyarországon először 1970-ben írták le ezt a betegséget, egy Észak- Amerikából importált tenyésztő- állomány megérkezésekor. [20] Már a szállítás alatt, vagy azt követő néhány nap elteltével láz, heveny légúti tünetek, orrfolyás, nehézlégzés és köhögés észlelhető. Gyógykezelés nélkül a beteg egyedek jelentős része elhullhat.[3]

A betegség kezelése hosszú folyamat, a beteg egyedeket el kell különíteni, majd minimum 7 napig tartó antimikrobiális szerrel kell kezelni azokat. Fontos betartani a járványügyi szabályokat, biztosítani kell a megfelelő tartási, takarmányozási és szállítási feltételeket, és megfelelően kell vakcinázni az állományokat a vírusfertőzések ellen, így akár meg is előzhető a fertőzés.[3]

Léteznek megfelelő szerotípusú, elölt *P. multocida* és *M. haemolytica* törzseket tartalmazó kivonatok, melyekből különböző módszerekkel megelőzésre alkalmas vakcina állítható elő.[21] Ez a gyakorlatban nálunk is használatos, a fent említett baktériumtörzseken kívül parainfluenza vírustörzset is tartalmaz ez az alumíniumgélhez adszorbeált vakcina, mellyel a borjakat először 4-6 hetes korban oltják, majd 2 hét múlva ezt ismétlik, így csökkentve a tüdőbetegségben elhullott egyedek számát és a gyógyszerköltséget is. A BRDC ellen való védekezés gazdasági szempontból nézve is igen jelentős. Magyarországon 2012-ben a szarvasmarhák légzőszervi komplex betegsége okozta veszteség a tejlő szarvasmarha állományban meghaladta az 1,7 milliárd forintot.[22]

### **2.3.Antibiotikum rezisztencia**

Napjaink meghatározó problémája az egyre jobban fejlődő antibiotikum rezisztencia, amely az egyik legnagyobb fenyegetést jelenti a közegészségügyre, az állattenyésztésre és a gazdaságos állati termék előállítására. A helytelenül és a túlhasznált antimikrobiális szerek, melynek fő forrása az állattenyésztés és az egészségügy okozzák a problémát. [23]

A baktériumok rövid generációs ideje teszi lehetővé a gyors adaptációt, emiatt az antibakteriális szerek megjelenésétől, tehát az 1940-es évektől kezdve csökkent azok hatásossága, rezisztens mikroorganizmusok alakultak ki. [24]

2010-ben 63200 tonna antibiotikumot használtak világszerte haszonállatok betegségének kezelésére és megelőzésre.[25] 2000 és 2015 között 65%-al nőtt az antibiotikum használat az egész világon. [26] Világszerte körülbelül 700000 emberrel, az Európai Unióban pedig 35000 emberrel végez az antibiotikum rezisztens baktériumtörzsek okozta fertőzés évente. 2050-re pedig úgy vélik, a rákos megbetegedések után az AMR okozza majd a legtöbb halált ha nem teszünk semmit ellene.[25, 27]

Megkülönböztetünk *ab ovo* és szerzett rezisztenciát. Az előző akkor lép fel, amikor egy mikroorganizmus eleve nem érzékeny az adott antibiotikumra vagy antibiotikum csoportra. Erre példa, hogy a  $\beta$ -laktám antibiotikumok *ab ovo* hatástalanok a mycoplasmák ellen, hiszen azoknak nincs sejtfala, így ezek a sejtfal szintézis gátló szerek eleve hatástalanok vele szemben. Szerzett rezisztencia pedig például a baktériumok  $\beta$ -laktamáz enzim termelése. A Beta Lactamase Data Base adatbázisban heti rendszerességgel frissítve számon tartják az eddig felfedezett  $\beta$ -laktamáz enzimeket, amelyeknek száma ma már közel 8000. [28] Az AMR terjedhet az állatok között a rezisztens baktériumok cseréjével, a rezisztencia gének baktériumok közötti cseréjével, ami leggyakrabban plazmidokkal történik, valamint átadhatják a rezisztencia gének genetikai elemek közötti kicserélődésével is. Ezen kívül nem csak állatról állatra terjedhet az AMR, állati eredetű élelmiszer fogyasztásával is okozhat az emberekben nehezen leküzdhető fertőzéseket. [29] Egy 2011-es görög kutatásban 428 húskészítményből származó mintát vizsgáltak, melyben többek között 157 *Escherichia coli* törzset izoláltak, amelyeknek csak 10,5%-a volt érzékeny antibiotikumokra. [30] Az MRSA súlyos betegséget okozó baktérium, egyik felbukkanó altípusa, a CC398 terjedését holland kutatók a sertésekkel való érintkezéshez kapcsolták. [31]

A hatásos lépések, mint például a rezisztencia vizsgálat adott antibiotikumokra kezelés előtt, és az antimikrobiális szerek megfelelő használata, lelassíthatják és mérsékelhetik a rezisztens organizmusok negatív hatását. Erre való útmutatást ad az állatorvosoknak a European Medicine Agency, amely 2018-ban 4 kategóriába osztotta az antibiotikumokat. Ennek megfelelően „A” kategóriába kerültek azok az antibiotikumok, amelyek kerülendőek, élelmiszer termelő állatban tilos őket alkalmazni és nincs állatgyógyászati készítmény belőlük az Európai Unióban. A „B” kategóriába azok a szerek kerültek melyek rezisztencia vizsgálat után használhatóak, kizárólag akkor ha a kór gyógyítására nincs alkalmas hatóanyag a „C” vagy pedig a „D” kategóriából. Az általunk vizsgált antibiotikumok közül



a fluorokinolonok és a 3. generációs cefalosporin, a ceftiofur is a B csoportba tartozik. Az utolsó két kategóriában a körültekintően és megfelelő óvatossággal alkalmazható gyógyszerek listáját láthatjuk. A „C” kategóriában azok a szerek találhatóak, melyek csak akkor alkalmazhatóak, ha a „D” csoportba tartozó antibiotikumok hatástalanok, ebből a csoportból a florfenikol és makrolid antibiotikumokkal szembeni érzékenységet vizsgáltuk. Az általunk vizsgált többi antibiotikum mind az utolsó D csoportba tartozik, ezeket ajánlják mint elsődleges szerek, ha antibiotikumos ellátásra szorulnak a beteg állatok.[32]

2017 júniusában az Európai Bizottság elfogadta az AMR elleni úgynevezett One Health cselekvési tervet, melyben több mint 70 intézkedést vázolnak fel az emberi egészséggel, az állatok egészségével és a környezettel kapcsolatban. Ennek értelmében Magyarországon is számos rendelet van hatályban a felelős gyógyszer használatról.

## **2.4. Antimikrobiális szerek**

A kutatásunk során vizsgált antibiotikumok mindegyike hatásos lehet a tápigényes Gram-negatív baktériumokkal szemben (*P. multocida*, *M. haemolytica*, *B. trehalosi* stb.), így az ezek által okozott BRDC ellen is. Ezért ezen hatóanyagok hatásmódját és rövid ismertetőjét alább taglalom.

### **2.4.1. Penicillin**

1928-ban Sir Alexander Fleming véletlen felfedezése örökre megváltoztatta az orvostudományt, ezzel megindítva az antibakteriális szerek felvirágzását. [33] A penicillinek  $\beta$ -laktámvázas antibiotikumok, a *Penicillium notatum* és *P. chrysogenum* penészgombafajok termelik. [24, 34] A Fleming által felfedezett szűk spektrumú penicillin-G laktámgyűrűjéhez egy tiazolidin gyűrű és egy benzilcsoport csatlakozik.

Hatásmechanizmusa a baktérium sejtfalában lévő peptidoglikán váz szintézis gátlásán alapszik. Így a Gram- pozitív baktériumok sejtfalát viszonylag egyszerűen felbontja. A Gram-negatívok esetében a hatásossága mérsékelt, mivel a peptidoglikán vázat vastag lipopoliszacharid réteg veszi körül, ezért csak a porin csatornákon képes bejutni a hatóanyag. Időfüggő baktericid antibiotikum. Széles terápiás sávval rendelkezik és kevés mellékhatása van.[24]

A penicilinnel szembeni rezisztencia igen gyakori, *ab ovo* rezisztensek a sejtfal nélküli, az intracelluláris, sav és alkoholálló baktériumok valamint azok, amelyeknek sejtfalán kevés a porin csatorna (például *Pseudomonas aeruginosa*), így a szer nem képes áthatolni. A szerzett rezisztencia leggyakoribb oka pedig a baktériumok által termelt  $\beta$ -laktamáz enzim, amelyből ma már közel 8000-et ismerünk. [28]

Tápigényes Gram- negatív baktériumok ellen jó hatásfokkal rendelkezik, ezt bizonyítja egy 2008-as tanulmány is, ahol 368-ból mindegyik *Pasteurella multocida* törzs érzékeny volt penicillinre.[35]

#### 2.4.2. Amoxicillin

A  $\beta$ -laktámokhoz tartozó amoxicillint 1972-ben forgalmazták először, és azóta is az egyik legtöbbet használt gyógyszer a csoportjából, kiváló biológiai hasznosulása és közepesen széles antimikrobiális spektruma miatt.[36]

Az ampicillinből létrehozott félszintetikus aminopenicillin, elődjétől csak a fenol oldallánc hidroxilációjában tér el. [37]

Időfüggő baktericid antibiotikum, a baktérium sejtfalszintézist gátolja. Hatásspektruma a penicillinhez hasonló, azonban a Gram-pozitív baktériumok ellen hatékonysága kisebb.[24] Magyarországon a BRDC kezelésére a második leggyakrabban alkalmazott antibakteriális szer a makrolidok után. [22] Az ellene kialakuló rezisztencia pedig egyre nagyobb mértékű, ezt bizonyítja egy 2009-es tanulmány is ahol sertésekből izolált 233 *P. multocida* törzset vizsgálva 187 törzs, tehát 80,3%-uk rezisztenciát mutatott amoxicillinnel szemben.[38]

Gyakran alkalmazzák klavulánsavval kombinálva, kivédve ezáltal a  $\beta$ - laktamáz enzimeket.

#### 2.4.3. Ceftiofur

A cefalosporinokat 1945-ben kezdték izolálni *Cephalosporium acremonium* gombák tenyészetekből és mára a legtöbb hatóanyagot számláló antibakteriális gyógyszercsoporttá váltak. Humán és állatgyógyászatban is gyakran alkalmazzák kedvező szelektív toxicitásuk és széles antibakteriális spektrumuk miatt.[24, 39, 40] A ceftiofur, egy félszintetikus  $\beta$ -laktámvázas vegyület, hatásmechanizmusa a penicillinnel megegyezik. A cefalosporinok generációkba történő beosztása a hatóanyagok antibakteriális spektruma és laktamáz stabilitása alapján történik. A ceftiofur ennek alapján egy harmadik generációs cefalosporin, kifejezett laktamáz- rezisztenciával, széles körben hatékony Gram-negatív baktériumokkal ellen, azonban Gram-pozitívokkal szemben az első generációs antibiotikumokhoz képest mérsékelt hatású. [24]

Felszívódása a nátrium és hidroklorid sóinak esetében gyors, míg szabad kristályos sav formában lassú, és akár 150 órás depó hatást is biztosít légúti megbetegedésekben, az érzékeny kórokozók ellen. [24]

Már régóta vizsgálják a ceftiofur antibiotikum érzékenységét szarvasmarhából izolált *P. multocida* törzsekben, ahol eddigieken rezisztens törzset ritkán, vagy nem találtak ezzel a szerrel szemben, azonban a folyamatos monitorozás itt is elengedhetetlen.[41–44]

#### 2.4.4. Spektinomycin

A streptomint tartalmazó spektinomycin eltérően az aminoglikozidoktól, nem tartalmaz glikozidos kötést, így ez a legkevésbé hatékony aminociklitól. A *Streptomyces spectabilis* baktériumból először 1961-ben izolálták.[45] Csoportjában egyedülállóan bakteriosztatikus hatású, de ugyanúgy a 30S riboszóma alegységen gátolja a bakteriális fehérjeszintézist a 16 rRNS-hez való irreverzibilis kötésen keresztül. Az aminoglikozidokhoz hasonló hatásspektrummal rendelkezik. Staphylococcusok és Gram-negatív aerob baktériumok ellen hatékony, valamint kiemelkedően hat mycoplasmák ellen. Mivel a vegyület nem tartalmaz glikozidos kötést, így az aminoglikozidokra jellemző nefro-, és ototoxicitás ennél a gyógyszernél elhanyagolható. Per os gyakorlatilag nem szívódik fel, ezért leggyakrabban parenterálisan, légúti kórképek kezelésére alkalmazzák, gyakran linkomicinnel kiegészítve. Nagy hátránya, hogy a rezisztencia ellene gyorsan és gyakran kialakul, nem plazmidon, hanem kromoszómán kódolva, amely így tartósan fennmarad akár egyszeri terápiás alkalmazás után is.[24]

#### 2.4.5. Oxitetraciklin

A haszonállatok részére ma is az egyik legnagyobb mennyiségben forgalmazott antibiotikumot először 1948-ban állították elő *Streptomyces rimosus* fermentlevéből. A tetraciklinek csoportjába tartozó oxitetraciklint először négy gyűrűből álló szerkezetének megfelelően terramycinnek nevezték el. [46] Jellegzetes barnás-sárga színű vegyület, UV-fényben fluoreszkál. Enyhén savas kémhatású, higroszkópos, amfoter jellegű molekula. A fehérjeszintézist gátolja a bakteriális riboszóma 30S alegységen azáltal, hogy megakadályozza az aminoacil-tRNS kapcsolódását az mRNS-riboszóma komplexhez. A bakteriosztatikus, rövid hatású oxitetraciklin spektruma széles, számos baktérium- és protozoonfaj ellen is hat. Felszívódása változó, két- és háromértékű fémionokkal pedig komplexet képez, ezért per os adagolva figyelni kell a takarmány összetevőire, nehogy csökkentsük a szer biológiai hasznosulását.[24]

Nagyon gyakori vele szemben a szerzett rezisztencia, ezért az *Enterobacteriaceae* család tagjai és a Gram-pozitív coccusok ellen az esetek többségében hatástalan. A rezisztencia kialakulásának leggyakoribb oka, a multidrug effluxpumpa-aktivitás fokozódása, valamint a riboszómális kötőhely szerkezetének megváltoztatása. A rezisztenciagének transzpozonok és plazmidok által terjednek. A *P. multocida* esetében megkülönböztetünk exportereket kódoló géneket (tet(H), tet(B), tet(G), tet(L)) és a riboszóma protektív fehérjét kódoló tet(M) rezisztenciagént.[24, 47, 48]

#### 2.4.6. Makrolid antibiotikumok

A makrolidok lipofil vegyületek, gyenge bázisok ennek megfelelően szövetekbe jól penetrálnak, intracelluláris koncentrációjuk magas, kifejezetten a tüdőben, ami igen kedvező légúti fertőzések kezelésekor. Szerkezetüket tekintve közös jellemzőjük, hogy makrociklikus laktongyűrűt tartalmaznak, amelyhez egy vagy több cukorszármazék kapcsolódik. Hatékonyak mycoplasmákkal, Gram-pozitív aerob és anaerob, valamint Gram-negatív tápigényes és anaerob baktériumokkal szemben is. Bakteriosztatikus, a tüdőben ioncsapdába esve baktericid hatásmódúak, az 50S riboszóma alegységhez reverzibilisen kapcsolódva gátolják a bakteriális fehérjeszintézist, a transzlokáció megakadályozásával.[24]

Az *Enterobacteriaceae* család tagjai *ab ovo* rezisztensek makrolidokkal szemben, ezen kívül pedig leggyakrabban egylépcsős kromoszomális mutáció miatti rezisztencia alakul ki ellenük, gyakori a hatóanyagok kipumpálása, a makrolid efflux mechanizmus, amely génen kódolt és genetikailag mobilis elemekkel terjedhet.[24] Ujvári Barbara és Magyar Tibor 2022-es tanulmányában Magyarországon 58 szarvasmarhából izolált *P. multocida* baktériumtörzs közül 58-ban találtak *macAB* efflux pumpát kódoló gént, PCR szekvencia analízissel, amely makrolidokra specifikus. [49] Azonban figyelembe véve azt is, hogy ezek az antibiotikumok a tüdőben magas intracelluláris koncentráció elérése révén baktericidekké válnak, az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat érdemes lehet *in vivo* elvégezni *in vitro* helyett, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy ezek a szerek klinikailag aktívnak és hatékonyak bizonyulnak-e.[50]

##### 2.4.6.1. Tilmikozin

Kizárólag állatgyógyászati célból használt félszintetikus makrolid, mely a tylosinból származtatható. A vegyület 16 tagú makrolid gyűrűből és mikaminózból áll. Csoportjában az egyik legtoxikusabb vegyület, parenterálisan alkalmazva egyes állatoknál kardiogén sokkot okozhat, ezért kizárólag bőr alá adható szarvasmarhának, juhnak és nyúlnak.[24] 1996 és 2004 között egy külföldi kutatás során vizsgált 231 *P. multocida* baktériumtörzs közül csak 16 darab (6,9%) mutatott rezisztenciát.[51] Ehhez képest a fentiekben már említett Ujvári és Magyar által készített disszertációban az 58 *P. multocida* törzs közül 30 érzékeny tilmikozinra, a többi rezisztens (48,3%).[49].

##### 2.4.6.2. Tulatromicin

A tilmikozinhoz hasonlóan szintén kizárólag állatorvosi célból alkalmazható, félszintetikus makrolid. A vegyület két izomerből áll, melyet egy 13 valamint egy 15 tagú laktongyűrű alkot. A triamilidek alcsoportjába sorolják, mivel három poláris amin csoportot

tartalmaz molekulája és általánosságban elmondható a makrolid antibiotikumokról, hogy minél több nitrogénatomot tartalmaz a hatóanyag, annál nagyobb a baktériumba való penetrációs készsége. Mycoplasmák ellen a leghatékonyabb antibiotikum, mellékhatásai ritkák.[24] Kanadában 2015 és 2016 között gyűjtött 135 *P. multocida* izolátumok 79,3%-a rezisztensnek mutatkozott. [52]

#### 2.4.7. Florfenikol

A kloramfenikol félszintetikus fluorinált változata a florfenikol, az egyik leggyakrabban használt antibiotikum szarvasmarhák légzőszervi komplex betegségében és pododermatitisben. A kloramfenikolt már 1948-ban felfedezték, a florfenikol azonban csak 1991-ben jelent meg és 1995-től használatos az Európai Unióban szarvasmarhák kezelésére. [24, 53, 54] A kloramfenikol számos súlyos mellékhatása, mint például az aplasztikus anémia és a Gray szindróma miatt használata ma már humán vonalon és háziállatoknál sem engedélyezett.

A florfenikol antimikroba ellenes hatása kedvezőbb elődjénél, aromás, lipofil molekula, tehát felszívódása és szöveti megoszlása is nagyon hatékony. Bakteriosztatikus fehérjeszintézist gátló antibiotikum, magas koncentrációban pedig baktericid tulajdonsággal rendelkezik. Mind Gram- pozitív és Gram- negatív baktériumok ellen is hatásos.[24]

A régóta ismert *florR* gén, egy efflux pumpát kódol az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok nagy részében, és képes a florfenikolt is eltávolítani a sejtfalon keresztül. Egy 2005-ös tanulmány kimutatta egy *Pasteurella multocida* törzsben is ezt a rezisztencia gént.[54]

#### 2.4.8. Fluorokinolonok

A nalidixsav az első kinolon- származék, amelyet 1962-ben használtak először a klinikumban húgyúti fertőzések kezelésére, mára elavult szernek számít. Helyette az 1970-es évektől kezdve a fluor atomot is tartalmazó fluorokinolonokat alkalmazzák, kiváló farmakokinetikai tulajdonságaik és alacsony toxicitásuk miatt. [55]

Ezek a hatóanyagok szintetikusan előállított mikrobaellenes szerek. Kémiaiilag hasonlóak, kettős gyűrűt tartalmazó kinolinból állnak, amelyben az antibakteriális hatás kialakulásához alapvető, hogy a 3. szénatomon karboxil-, a 4. szénatomon keto- csoport, a 6. szénatomhoz pedig fluor atom kapcsolódik.[24]

Koncentrációfüggő, baktericid antibiotikumok, célpontjuk a DNS- topoizomeráz komplex, melyhez reverzibilisen kapcsolódva meggátolják a DNS- szál újraegyesítését, így akadályozzák az összekapcsolt kromoszomális struktúra fenntartását. A fluorokinolonok affinitása nagyobb a baktériumok topoizomeráz enzimeihez, mint a gazdaszervezet

sejtjeiben lévőkhöz, mérsékelten toxikus vegyületeknek számítanak. A Gram- negatív baktériumok ellen a DNS-giráz (II. típusu topoizomeráz) enzim gátlásán, a Gram-pozitívakkal szemben pedig a IV. típusu topoizomeráz gátlásán keresztül hat. [24]

A velük szembeni rezisztencia leggyakrabban a *gyrA* és a *parC* gének mutációja révén alakul ki, ezeknek hatására a bakteriális topoizomeráz enzim kötőhelye megváltozik, így a kinolon molekulák képtelenek hozzákötődni. [24]

#### 2.4.8.1.Enrofloxacin

Az első fluorokinolon melyet állatgyógyászatban alkalmaztak, 1984-ben szabadalmaztattak, széles hatásspektrumának köszönhetően rengeteg fertőzés kezelésére alkalmas szer. [56]

Ez a második generációs fluorokinolon kifejezetten hatásos Gram- negatív baktériumokkal szemben, intracelluláris kórokozókkal szemben jó, Gram- pozitívak ellen pedig mérsékelt a hatása.[24]

#### 2.4.8.2.Danofloxacin

Húsmarhák BRDC betegségének kezelésére alkalmas szintetikus 2. generációs fluorokinolon, kizárólag állatgyógyászati célra használható készítmények érhetőek el. [57] Hatásmechanizmusa és spektruma is megegyezik az enrofloxacinnal. Kanadában és az Egyesült Államokban 2004 és 2014 között gyűjtött 4054 darab *P. multocida* izolátum 12,1%-a az érzékeny határ fölött volt, tehát mérsékelt érzékenységet vagy rezisztenciát mutatott ez ellen a gyógyszerhatóanyaggal szemben.[58]

### 2.5. A hazai és külföldi vizsgálatok eredményeinek összegzése

Mivel a *Pasteurellaceae* család tagjai jelentős károkat okozhatnak az állattenyésztésben, ezért külföldi és hazai szinten is jól ismert és kutatott baktériumok, és nem kivétel ez alól az antibiotikum érzékenységük sem.

Magstadt és munkatársai 2013 és 2015 a szarvasmarhák légzőszervi komplex betegség bakteriális patogénjeinek antibiotikum érzékenységét kutattatta. Ez a vizsgálat, a fő hangsúlyt a kezelések utáni rezisztencia kialakulására fordította, eredményeiknél jól látható, hogy az általuk vizsgált 8 antibiotikum közül 7-nél minden egyes kezelés után nőtt az adott antibakteriális szerrel szembeni rezisztencia. [59] Tehát ez a kutatás is jól bizonyítja, hogy a nem megfelelően dozírozott és/vagy olyan antibiotikum használata, amely ellen eleve rezisztens a baktériumtörzs csak jobban növeli a rezisztenciát. Ezért is fontosak az antibiotikum érzékenységi tesztek folyamatos mérése a mindennapi kezelések során is.

Watts és munkatársai 1988-tól 1992-ig évenkénti lebontásban vizsgálta BRDC betegségben szenvedő szarvasmarhák *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* és *Histophilus somni* törzsek érzékenységét 7 antimikrobiális szerrel (ampicillin, ceftiofur, eritromicin, tilmikozin, tetraciklin, spektinomycin és szulfametazin) szemben, Észak-Amerikában. Ennek során csak a ceftiofurra voltak érzékenyek 100%-ban a *P. multocida* törzsek. Ezt követte a sorban az ampicillin 88,1% és a spektinomycin 76,4% érzékenységi értékkel. A legnagyobb rezisztenciát eritromicinnél találták, a vizsgált izolátumoknak csupán 16%-a mutatkozott érzékenynek.[42]

2000-től 2009-ig szintén Észak- Amerikában Portis és munkatársai minden évben több száz szarvasmarhából izolált *P. multocida* törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatát végezték el, 8 antimikrobiális szerrel (ceftiofur, penicillin, danofloxacin, enrofloxacin, florfenikol, tetraciklin, tilmikozin és tulatromicin), leves mikrohígítási módszert alkalmazva. Az egyetlen antibiotikum, amelyre 100% érzékenységet találtak a 10 év alatt, ugyancsak a ceftiofur, ahogy az előző kutatásban is. Az első vizsgált év során 100%-ban érzékenyek voltak a törzsek ezen kívül enrofloxacinra és florfenikolra azonban 2009-re előbbi esetében ez lecsökkent 91,2%-ra, utóbbi pedig 88,1%-ra. A kutatott izolátumok a legnagyobb rezisztenciát tetraciklinnel szemben mutatták; az első vizsgálat során is csak 67,8%-a, az utolsónál pedig 57,3%-a volt csak érzékeny a törzseknek erre a gyógyszerhatóanyagra. Penicillin és danofloxacin esetében az érzékenység nőtt, előbbinél 91,8%-ról 94,2%-ra, utóbbinál pedig 88,2%-ról 90,2%-ra, habár danofloxacinnál az első vizsgált év 2004 volt. A makrolid antibiotikumok közül tulatromicinnél az értékek stagnáltak, 2004-ben 93,8%, 2009-ben 93,2% volt érzékeny. Tilmikozinnál is látszik, hogy az antibiotikum rezisztencia súlyosbodott az évek során; 2000-ben a MIC<sub>50</sub> 4µg/ml, MIC<sub>90</sub> érték 16µg/ml volt, 2009-ben MIC<sub>50</sub> 8µg/ml-re, MIC<sub>90</sub> pedig >64µg/ml értékre nőtt.[43]

A VetPath egész Európát átölelő folyamatos antibiotikum érzékenység monitorozási program, melynek során 2002-től 2006-ig és 2009-től 2012-ig légzőszervi tüneteket mutató, de nem kezelt szarvasmarhából izolált *Pasteurella multocida* vizsgálatát is elvégezték leves mikrohígítási módszerrel számos antibiotikumra. Ezeket az adatokat áttekintve az újabb vizsgálat sokkal nagyobb mértékű rezisztenciát mutat makrolid antibiotikumokkal és tetraciklinnel szemben mint a korábbi. [60, 61]

Yoshimura és társai 1994 és 1998 között szarvasmarhából gyűjtött 72 darab *P. multocida* izolátumok antibiotikum érzékenységét vizsgálták agar mikrohígítási módszerrel Japánban. Ennek eredményeképpen a legnagyobb MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékkel a dihidrosztreptomycin rendelkezett, ezt követte a sorban a kanamicin, mindkettő hatóanyag

az aminoglikozidok csoportjába tartozó antimikrobiális szer. A törzsek enrofloxacinra és ceftiofurra bizonyultak a legérzékenyebbeknek.[62]

Szintén egy Japán kutatásban Katsuda és társai 2009-től 2012-ig, borjakból gyűjtött, 378 *P. multocida* törzs antibiotikum érzékenységét vizsgálták, ugyancsak agar hígítási módszerrel 9 antimikrobiális szerre. A legtöbb rezisztens törzs, 82 darab, oxitetraciklinnel szemben volt, ezt követve a sorban a tiamfenikol 50 rezisztens baktériumtörzzsel. Az összes izolátum érzékenynek bizonyult a vizsgált cefalosporinokkal (cefazolin, cefkvinom, ceftiofur) és enrofloxacinnal szemben. [63]

Egy 2020-as spanyol kutatásban *P. multocida* B buroktípusú törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálata során a következőket találták. A 76 mintát szarvasmarhából (18 darab) és sertésből (58 darab) izolálták és 10 gyógyszerhatóanyagra nézték őket mikrohígítási módszerrel. Szarvasmarhában csak linkomicinre (94,4%) és penicillinre (5,6%) találtak rezisztens törzset, valamint mérsékelt érzékenységet mutatott a törzsek 22,2%-a szintén penicillinre, valamint 5,6%-a a törzseknek enrofloxacinra és tetraciklinre. A sertés izolátumokban azonban nagymértékű rezisztencia mutatkozott linkomicin (100%), tetraciklin (29,3%), penicillin (27,6%), oxitetraciklin (20,7%), kloramfenikol (17,3%), gentamicin (15,5%) és enrofloxacin (6,9%) esetében is. Az egyetlen antibiotikum itt is a ceftiofur, amire a törzsek 100%-a érzékeny volt.[44]

Korong diffúziós tesztek alapján, egy pakisztáni 2013-as tanulmány során a *P. multocida* törzsek érzékenységet mutattak gentamicin, trimetoprim, ceftiofur, ofloxacin és norfloxacin hatóanyagokra és rezisztensnek minősültek aztreonam és amoxicillin-klavulánsavval szemben.[64]

Hazai viszonylatban a már korábban említett Ujvári és Magyar kutatása foglalkozott szarvasmarhából (58 darab) és kiskérődzőből (42) izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatával, ahol makrolid antibiotikumok ellen fellépő rezisztencia eredményeit hasonlították össze 2011 előtti és 2012 után gyűjtött mintákból. Eritromicin esetében a 2011 előtti szarvasmarhából izolált minták MIC<sub>50</sub> értéke 4µg/ml volt MIC<sub>90</sub> 16µg/ml, előbbi 2012 utáni mintáknál 8µg/ml-re utóbbi pedig 256µg/ml-re nőtt. Tilmikozinnál hasonló eredmények lettek, ennek MIC<sub>50</sub> értéke 4-ről 32µg/ml-re, MIC<sub>90</sub> pedig 16-ról 32µg/ml-re emelkedett.[49]

2009-ben Selleyei és munkatársai baromfiban és sertésben korong diffúziós módszerrel vizsgálta a *P. multocida* törzsek érzékenységét. Sertésben az 56 vizsgált izolátum 30,5%-a rezisztens volt apramycin, 17%-a szulfonamidok, 6%-a tetraciklin és 3%-a pedig kloramfenikol, doxiciklin, eritromicin, florfenikol, flumekvin és potenciált szulfonamid



antibiotikumokkal szemben. Nagyfokú rezisztencia mutatkozott a baromfi izolátumok vizsgálata során is számos gyógyszerhatóanyagra.[65]

2018-tól 2021-ig sertések légzőszervi komplex betegségét okozó bakteriális patogének érzékenységi kutatásában a *P. multocida* izolátumok 100%-ban érzékenyek voltak amoxicillin, tulatromicin, florfenicol és enrofloxacin antibiotikumra, 100%-ban pedig rezisztensek szulfametoxazol/trimetoprim kombinációra. Magas rezisztenciát mutattak még doxiciklinnel szemben is, 30,8%-ot. [66]

A fentiekből tehát jól látható, hogy az antibiotikum rezisztencia egyre jobban súlyosbodik és monitorozása elengedhetetlen az ellene való küzdelemben.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Az embereket és az állatokat egyre nagyobb mértékben fenyegető antibiotikum rezisztencia miatt kutatásunk célja az volt, hogy átfogó képet kapjunk Magyarország szarvasmarha állományában mely antimikrobiális gyógyszerek minősülnek még hatékonyak *Pasteurella multocida* okozta légzőszervi bántalmak esetén. Ennek megfelelően 50 különböző településről származó *P. multocida* baktérium törzs antibiotikum érzékenységét vizsgáltuk 10 gyógyszerhatóanyaggal szemben, leves mikrohígításos módszerrel és korongdiffúziós tesztel.

Célunk volt ezen kívül az is, hogy a két különböző módszer eredményei alapján összehasonlítsuk ezek megbízhatóságát, valamint összevessük az eredményeket a nemzetközi és a hazai trendekkel egyaránt. Így megtudhatjuk ezáltal, hogyan alakul hazánkban az antibiotikum rezisztencia.

#### 4.1.A felhasznált baktériumtörzsek

The map displays the following municipalities (from west to east, north to south):

- Levél
- Kapuvár
- Mihályi
- Nemesszalók
- Marcaltó
- Nóráp
- Városlőd
- Hosztót
- Szeged
- Somogyuszob
- Hódoshát
- Hács
- Somogytúr
- Ozora
- Lajoskomárom
- Magyaralmás
- Felsővány
- Bugyi
- Dabas
- Lajosmizse
- Kunszentmiklós
- Miske
- Hajós
- Nemesnadudvar
- Jánoshalma
- Magyarhertelend
- Jászókszállás
- Jászdósa
- Mezőtárány
- Sarud
- Besenyőtelek
- Tápiószentmárton
- Besenyszög
- Törökszentmiklós
- Jászkarajenő
- Csolyospálos
- Újszentiván
- Zalkod
- Hortobágy
- Debrecen
- Nagyhegyes
- Hajdúszoboszló
- Komádi
- Zsádány
- Békés

## 4.2. A baktériumok izolálása és azonosítása

- 18 -

ureáz, laktóz és maltóz teszt negatívnak bizonyult törzseket Gram szerint megfestve negatív, coccoid pálcákat láttunk, a törzseket mint *Pasteurella multocida* bevettük a vizsgálatunkba. Saját 25 darab orrtampon minta gyűjtésből végül 3 törzset sikerült izolálnunk.

#### 4.3. Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata

##### 4.3.1. Antibiotikum-érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel

Az összes törzset a CLSI által kiadott ajánlásoknak megfelelően vizsgáltam korongdiffúziós módszerrel.[67]

A baktériumtörzseket -80°C-on történő tárolás után véresagarra kioltva 24 órán keresztül inkubáltam 10% CO<sub>2</sub>-dal dúsított atmoszférájú 37°C-os termosztátban. A friss tenyészetekből 1 ml fiziológiás sóoldatba 0.5 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk. Steril vatta-tampon segítségével Müller Hinton táptalajra oltottuk a kész szuszpenziót melyre az antibiotikummal impregnált korongok kerültek. Összesen 9 antibiotikummal szemben vizsgáltuk a törzsek érzékenységet ezzel a módszerrel, melyek a következők voltak: penicillin, amoxicillin, ceftiofur, spektinomycin, oxitetraciklin, tilmikozin, tulatromicin, florfenikol, és enrofloxacin. A gyógyszerhatóanyagokkal átitatott korongok egy része a Biolab Zrt. termékei, másik része pedig Oxoid márkájú. Danofloxacin korongokat készlethiány miatt nem tudtunk beszerezni kutatásunkhoz, így ezzel az antibiotikummal csak a leveshígításos mikromódszer vizsgálatot végeztük el.

Ezután 24 órás 37°C-os inkubáció következett. Végezetül a korongok körülötti gátlási zónákat olvastam le egy vonalzó segítségével, majd a kapott értékeket milliméterben feljegyeztem. A kapott eredményeket a CLSI által megszabott határértékek alapján bíráltam el, amit az 1. táblázatban foglaltam össze. [67] Az 1. és a 2. táblázatban az antibiotikumok rövidítésének feloldása a rövidítések jegyzékében olvasható.

|             | CLSI határértékek   |       |     |                      |        |      |
|-------------|---------------------|-------|-----|----------------------|--------|------|
|             | korongdiffúzió (mm) |       |     | leveshígítás (µg/ml) |        |      |
|             | S                   | I     | R   | S                    | I      | R    |
| <b>AMX</b>  | >17                 | 17    | <17 | <1                   | 1      | >1   |
| <b>EFT</b>  | ≥21                 | 18-20 | ≤17 | ≤2                   | 4      | ≥8   |
| <b>DAN</b>  | ≥22                 | 18-21 | ≤17 | ≤0,25                | 0,5    | ≥1   |
| <b>ENRO</b> | ≥21                 | 17-20 | ≤16 | ≤0,25                | 0,5- 1 | ≥2   |
| <b>FLOR</b> | ≥19                 | 15-18 | ≤14 | ≤2                   | 4      | ≥8   |
| <b>OXT</b>  | ≥24                 |       | ≤23 | ≤2                   | 4      | ≥8   |
| <b>PEN</b>  | >17                 | 17    | <17 | ≤0,25                | 0,5    | ≥1   |
| <b>SPEC</b> | ≥14                 | 11-13 | ≤10 | ≤32                  | 64     | ≥128 |
| <b>TIL</b>  | ≥14                 | 11-13 | ≤10 | ≤8                   | 16     | ≥32  |
| <b>TUL</b>  | ≥18                 | 15-17 | ≤14 | ≤16                  | 32     | ≥64  |

1. táblázat A CLSI által kiadott határértékek az általunk vizsgált antibiotikumokra

S: Susceptible- Érzékeny, I: Intermediate-mérsékelten érzékeny, R: Resistant- rezisztens

#### 4.3.2. Antibiotikum érzékenység vizsgálata E- teszttel

Ez az eljárás a korong diffúziós módszerrel megegyező, azonban a végén a korongok helyett az antibiotikummal átitatott tesztcsik került a baktériumszuszpenzióval beoltott Müller Hinton agarra. Ezt a módszert szűrőpróbaszerűen egy-egy törzsre és spektinomycin esetében végeztük csak el, ahol eltéréseket tapasztaltunk a leveshígításos mikromódszer és a korongdiffúziós teszt között. A használt tesztcsikok Liofilchem termékek voltak.

#### 4.3.3. Minimális gátló koncentráció meghatározása

Ehhez a teszthez a leves mikrohígításos módszert alkalmaztuk szintén a CLSI által kiadott szabványok szerint. [67] A reakcióelegyhez szükségem volt táptalajra, az antibiotikumokra munkahígításban és a baktérium szuszpenziókra.

A táptalaj kation kiegészített Müller Hinton leves, melynek előállításához 100 ml Müller Hinton leves, 190  $\mu$ l  $\text{Ca}^{2+}$  és 81  $\mu$ l  $\text{Mg}^{2+}$  törzsoldat került. A  $\text{Ca}^{2+}$  törzsoldat előállításához 3,68 g kalcium-klorid dihidrátot kell feloldani 100 ml deionizált vízben,  $\text{Mg}^{2+}$  törzsoldathoz pedig szintén 100ml deionizált vízben 8,36g magnézium-klorid hexahidrátot.

A baktérium szuszpenzió készítéséhez friss, 24 órás *Pasteurella multocida* tenyészeteket használtunk véresagaron. Ez után a tenyészetből 2 telep *Pasteurella multocida* baktériumot 4 ml fiziológiás sóoldatba helyeztem, és vortex segítségével homogenizáltam a baktérium szuszpenziót.

Az antibiotikum oldathoz pedig a megfelelő mennyiségű törzsoldatból és táptalajból készítettem el az oldatokat.

A bemérésnél a 96 lyukú lemez minden csövébe 50  $\mu$ l táptalajt mértem, minden sor 1. csövébe pedig 50  $\mu$ l antibiotikum oldatot. Az 1-től a 11-es csőig elkészítettem a kettes alapú hígítási sort, melyet az 2. táblázatban részletezek az egyes antibiotikumokra lebontva. A 12. csőbe nem került antibiotikum, ez szolgált kontrollként az eredményeimnél, milyen zavarosságot képesek okozni a szuszpenzióban gátlás nélkül. Utolsó lépésként pedig minden csőhöz 50  $\mu$ l baktérium szuszpenziót mértem, majd pedig lefedve 24 órán keresztül 37 °C-os termosztátban inkubáltam a lemezeket. A 24 óra elteltével az eredményeket jelentő zavarosság értékeket ELISA olvasóval 450nm hullámhosszon állapítottam meg. Utolsó lépésként az eredményeket a CLSI által megszabott határértékek alapján soroltam be, melyek értékei az 1. táblázatban olvashatóak. [67]

| Hatóanyag<br>koncentráció | 1   | 2   | 3  | 4  | 5   | 6    | 7     | 8    | 9     | 10    | 11     |
|---------------------------|-----|-----|----|----|-----|------|-------|------|-------|-------|--------|
| SPEC, TIL                 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16  | 8    | 4     | 2    | 1     | 0,5   | 0,25   |
| TUL                       | 128 | 64  | 32 | 16 | 8   | 4    | 2     | 1    | 0,5   | 0,25  | 0,125  |
| FFC,AMX,<br>OTC           | 64  | 32  | 16 | 8  | 4   | 2    | 1     | 0,5  | 0,25  | 0,125 | 0,06   |
| EFT, PEN                  | 32  | 16  | 8  | 4  | 2   | 1    | 0,5   | 0,25 | 0,125 | 0,06  | 0,03   |
| ENRO,<br>DANO             | 8   | 4   | 2  | 1  | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,06 | 0,03  | 0,015 | 0,0075 |

2. táblázat: A használt antimikrobiális szerek kiindulási koncentrációi és a belőlük készített kettes alapú hígítási sor  $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezve

#### 4.3.4. Csíraszámlálás

Csíraszámlálás által bizonyosodhatunk meg arról, hogy vizsgálatunk során felhasznált baktérium szuszpenziók megfelelő számú baktériumot tartalmaztak-e. A leveshígításos mikromódszerhez használt baktérium szuszpenziókból 10-es alapú hígítási sort készítettem. Minden hígításból 50  $\mu\text{l}$  szuszpenziót mértem ki egy pipetta segítségével, majd véresagar táptalajra oltottam. A szuszpenziót egy alkoholba mártott és leégetett majd visszahűtött üvegbottal szélesztettem az agar teljes területén. A táptalajokat 37 °C-on 24 óráig inkubáltam és utána ahhoz a hígításhoz tartozó táptalajon lévő telep számát számoltam meg, ahol a telepformáló egységek száma 30 és 300 között volt. Az így kapott számot visszaszoroztam a hígítással. A leves mikrohígításos módszerhez használt *Pasteurella multocida* szuszpenziók átlagos csíraszám 5,3 $\times 10^7$  volt.

#### 4.3.5. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményeinek ellenőrzése

A vizsgálatokat minden antibiotikum esetében, mindkét módszerrel ismert érzékenységű *Staphylococcus aureus* (ATCC –29213) és *Escherichia coli* (ATCC –25922) kontroll törzsekkel is elvégeztük. Azért ezekre a kontroll törzsekre esett a választás, mert az általunk használt antibiotikumok esetében ezekre a törzsekre szerepelt a legtöbb adat a CLSI standard táblázatokban. [67]A leves mikrohígításos módszerhez használt *Staphylococcus aureus* szuszpenzió átlagos csíraszám 2,6 $\times 10^7$ , míg az *Escherichia coli* szuszpenzió átlagos csíraszám pedig 9 $\times 10^7$  volt. Ezt a gyakorlatban 1 telep 24 órás tenyészetből származó, véresagaron tenyésztett *Staphylococcus aureus* vagy *Escherichia coli* 8 ml fiziológiás sóoldatban való elkeverésével értük el. A kontroll törzsek eredményei minden esetben az adott törzsre a CLSI standard szerint megállapított határértékeken belül volt.

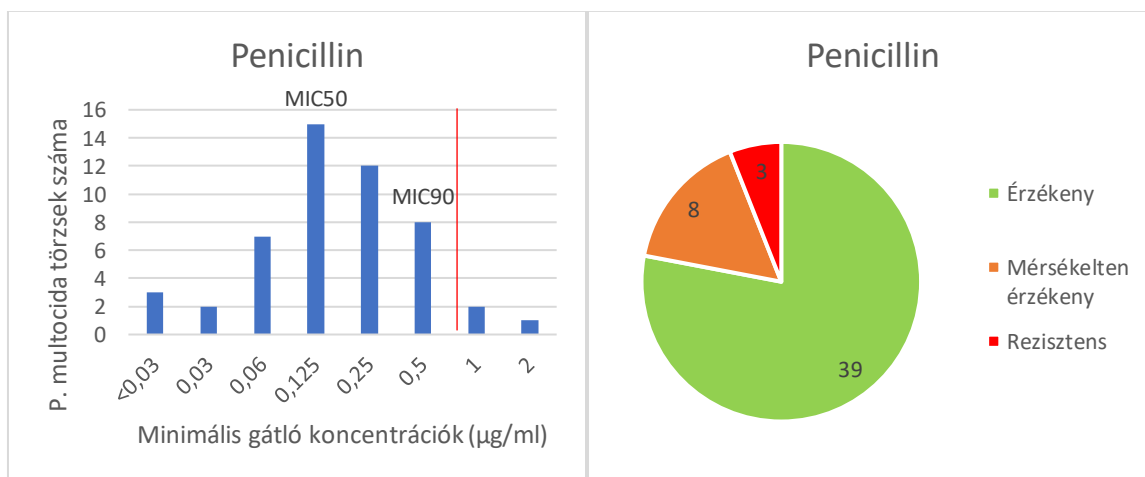
## 5. EREDMÉNYEK

Az 50 darab *Pasteurella multocida* törzsből készült korongdiffúziós vizsgálat eredményét és a minimális gátló koncentrációinak megoszlását valamint az ebből számított MIC<sub>50</sub> (a törzsek 50%-át elpusztító koncentráció) és MIC<sub>90</sub> (a baktériumtörzsek 90%-át elpusztító koncentráció) értékeket az antibiotikumok szerinti lebontásban mutatom be. A MIC értékeinek eloszlását az egyes antibiotikumoknál külön ábrán jeleztem, melyeken piros vonallal jeleztem a CLSI által megszabott rezisztencia határértéket. [67]

### 5.1. $\beta$ -laktám antibiotikumok

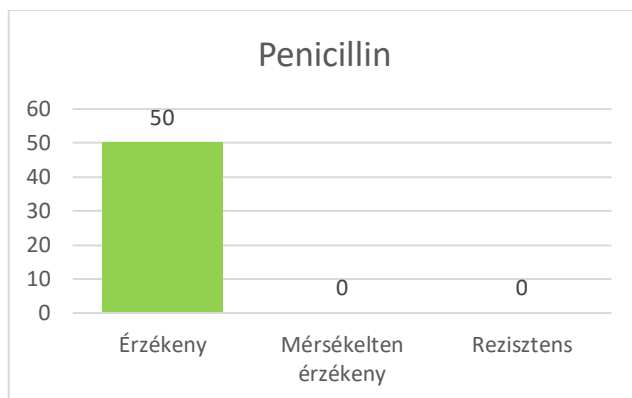
Az általunk vizsgált baktériumok közül a penicillin, az amoxicillin és a ceftiofur tartozik ebbe a csoportba. A törzsek az amoxicillinnel szemben mutatták a legtöbb rezisztenciát. A korongdiffúziós tesztnél az összes törzs érzékenynek bizonyult mindhárom antibiotikumra.

A leveshígítási módszerrel nézve a ceftiofurra 3 törzs kivételével mindegyik érzékenynek bizonyul, penicillinnél 39 darab, amoxicillinnél pedig csak 28. A penicillin MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értéke a legalacsonyabb ebben a csoportban, előbbi 0,125  $\mu\text{g/ml}$  utóbbi pedig 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Ezt követi a ceftiofur 0,25  $\mu\text{g/ml}$  MIC<sub>50</sub> és 1  $\mu\text{g/ml}$  MIC<sub>90</sub> értékekkel. Az amoxicillin MIC<sub>90</sub> értéke 64  $\mu\text{g/ml}$  kimagasló a többi  $\beta$ -laktámhoz képest, MIC<sub>50</sub> értéke pedig 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

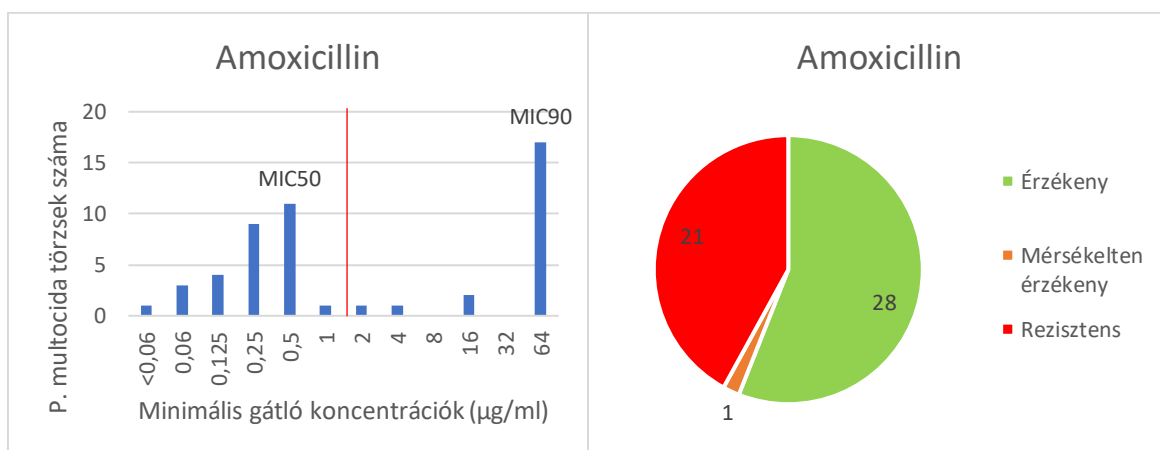


2. ábra A penicillin MIC értékeinek eloszlása

3. ábra A törzsek penicillin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel

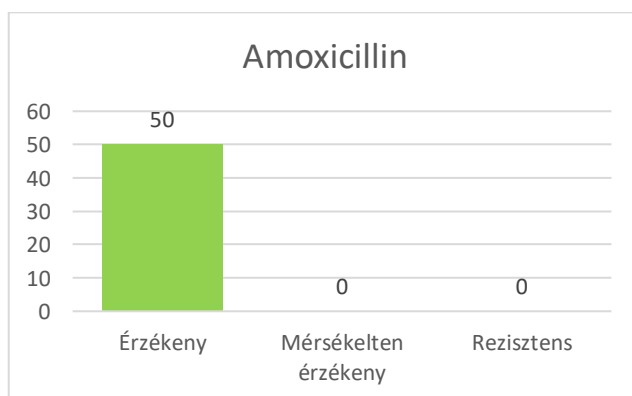


4. ábra A törzsek penicillin érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel



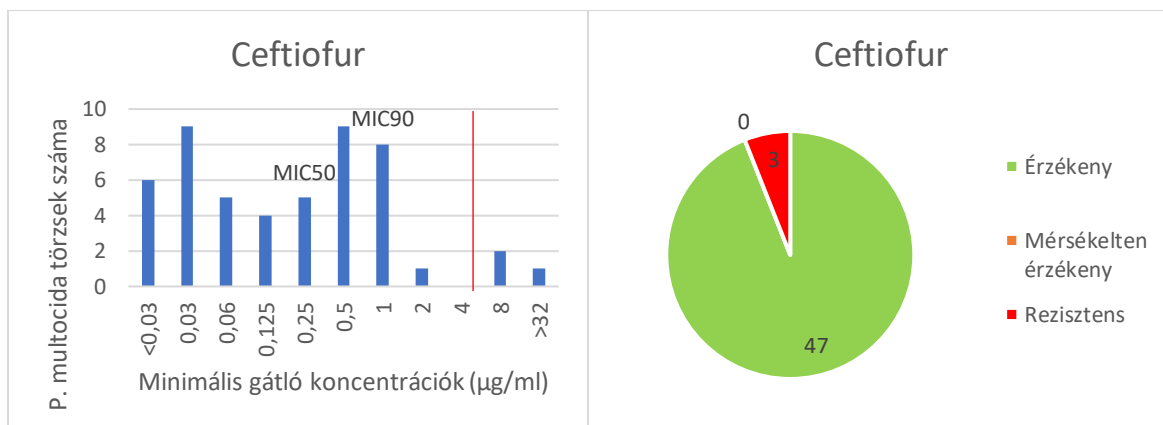
5. ábra Az amoxicillin MIC értékeinek eloszlása

6. ábra A törzsek amoxicillin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel



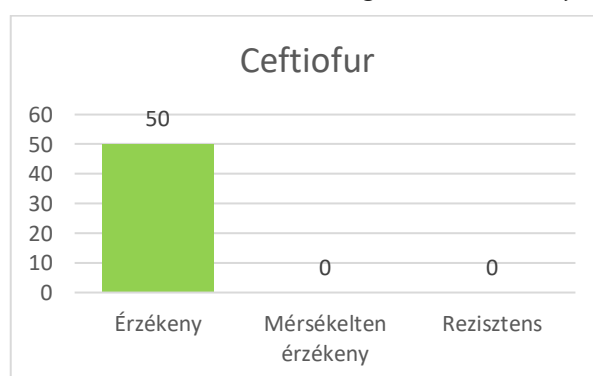
7. ábra A törzsek amoxicillin érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel





8. ábra A ceftiofur MIC értékeinek eloszlása

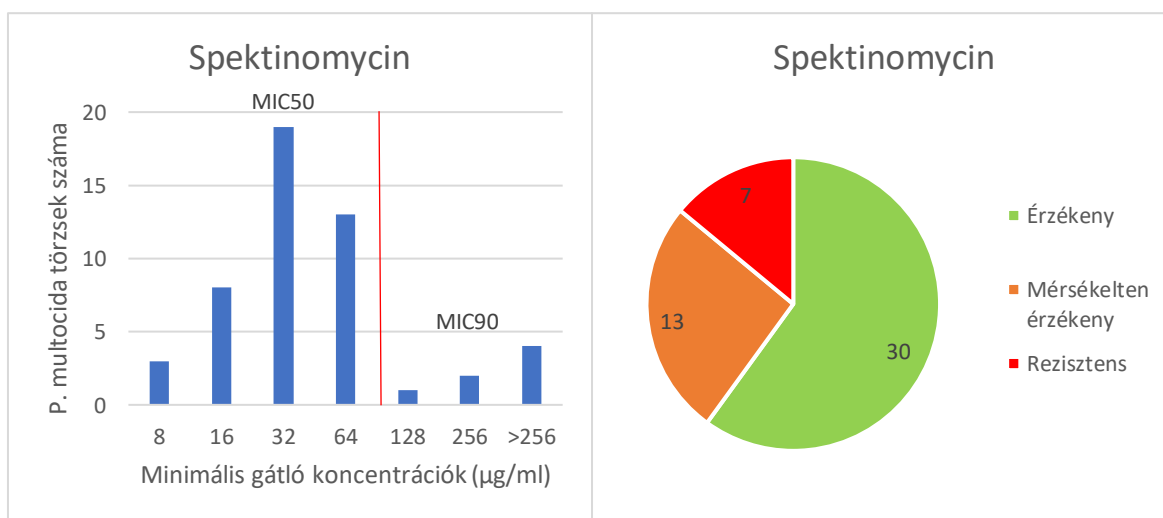
9. ábra A törzsek ceftiofur érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel



10. ábra A törzsek ceftiofur érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel

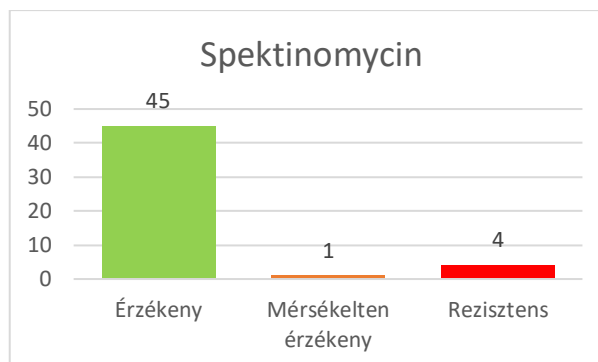
## 5.2. Spektinomycin

A spektinomycin esetében a leveshígítási módszerrel 30 törzs mutatkozott érzékenynek, 13 mérsékelten érzékenynek, 7 pedig rezisztensnek. A MIC<sub>50</sub> értéke 32 µg/ml, MIC<sub>90</sub> 256 µg/ml. A korongdiffúziós módszerrel 4 törzs bizonyult csak rezisztensnek, 1 pedig mérsékelten érzékenynek, többi érzékenynek.



11. ábra A spektinomycin MIC értékeinek eloszlása

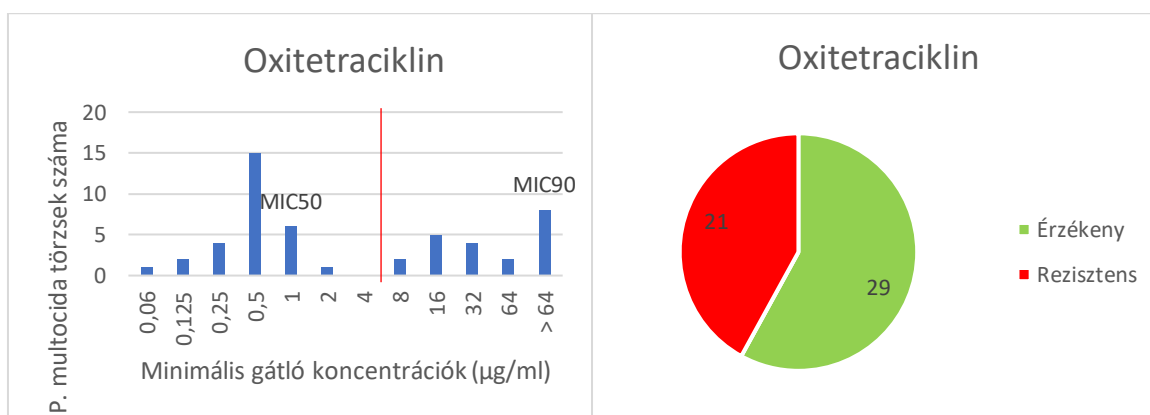
12. ábra A törzsek spektinomycin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel



13. ábra A törzsek spektinomycin érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel

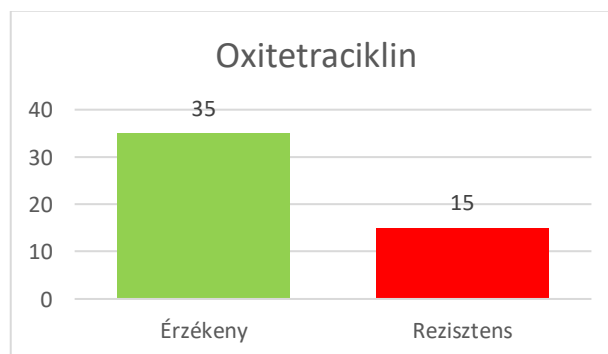
### 5.3. Oxitetraciklin

Az oxitetraciklin esetében korongdiffúzióval 15, mikrohigítással 21 törzs bizonyult rezisztensnek. MIC<sub>50</sub> értéke 1 µg/ml, MIC<sub>90</sub> pedig több mint 64 µg/ml.



14. ábra Az oxitetraciklin MIC értékeinek eloszlása

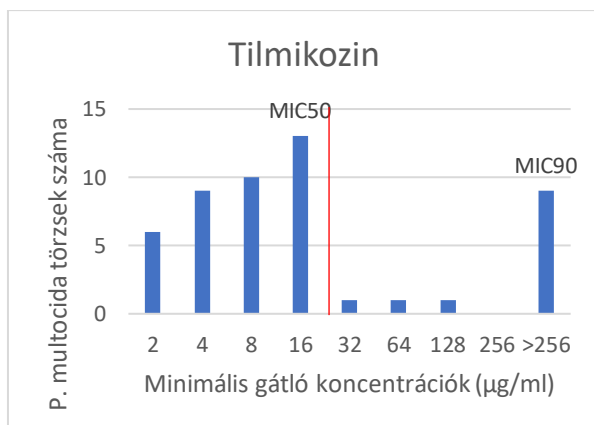
15. ábra A törzsek oxitetraciklin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel



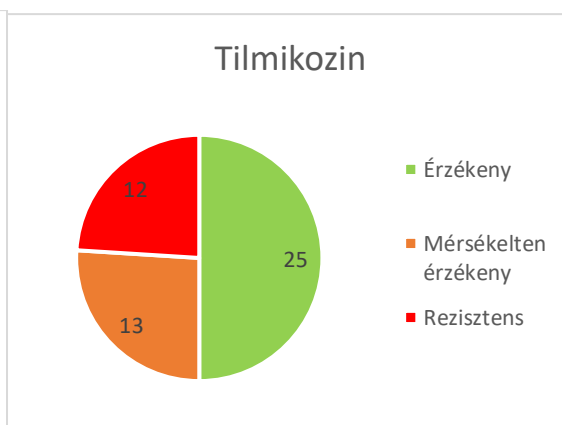
16. ábra A törzsek oxitetraciklin érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel

### 5.4. Makrolid antibiotikumok

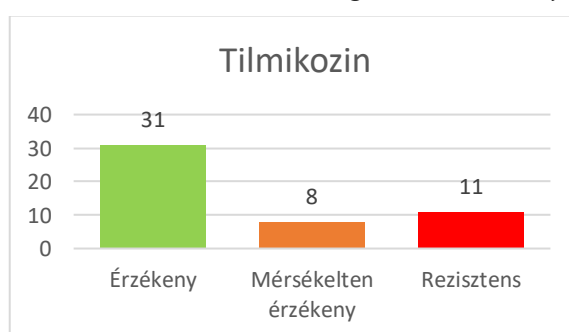
A makrolid antibiotikumok közül vizsgálataink során kettőt vizsgáltunk, a tilmikozint és a tulatromicint. Korongdiffúziós módszerrel, tilmikozin esetében 11 rezisztensnek, 8 mérsékeltén érzékenynek, tulatromicinnél 9 darab törzs bizonyult rezisztensnek, 2 pedig mérsékeltén érzékenynek. Leveshígítási módszerrel vizsgálva tilmikozinnál 12 rezisztens, 13 mérsékeltén érzékeny, tulatromicinnél pedig 11 rezisztens és 1 mérsékeltén érzékeny törzset találtunk. A MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értéke is tilmikozinnak nagyobb, előbbi 16 µg/ml, utóbbi pedig nagyobb mint 256 µg/ml, ezek az értékek tulatromicinnél 4 µg/ml és 256 µg/ml.



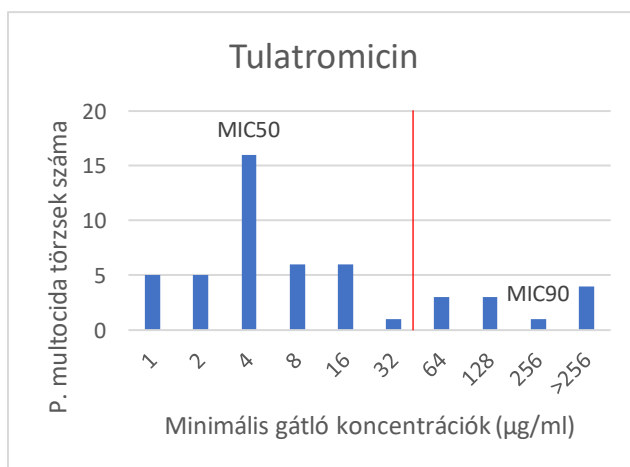
17. ábra A tilmikozin MIC értékeinek eloszlása



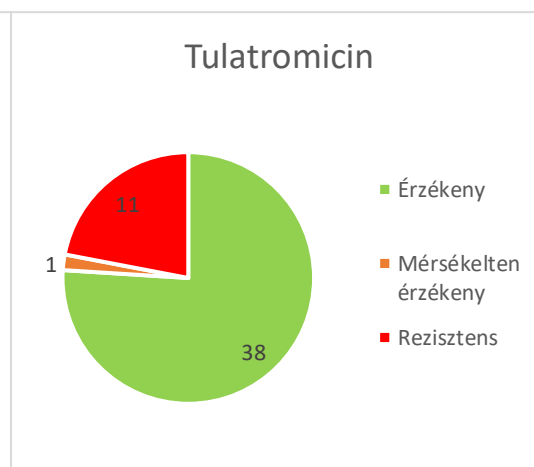
18. ábra A törzsek tilmikozin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel



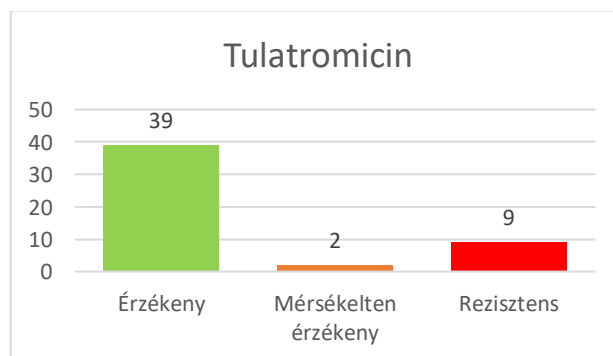
19. ábra A törzsek tilmikozin érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel



20. ábra A tulatromicin MIC értékeinek eloszlása



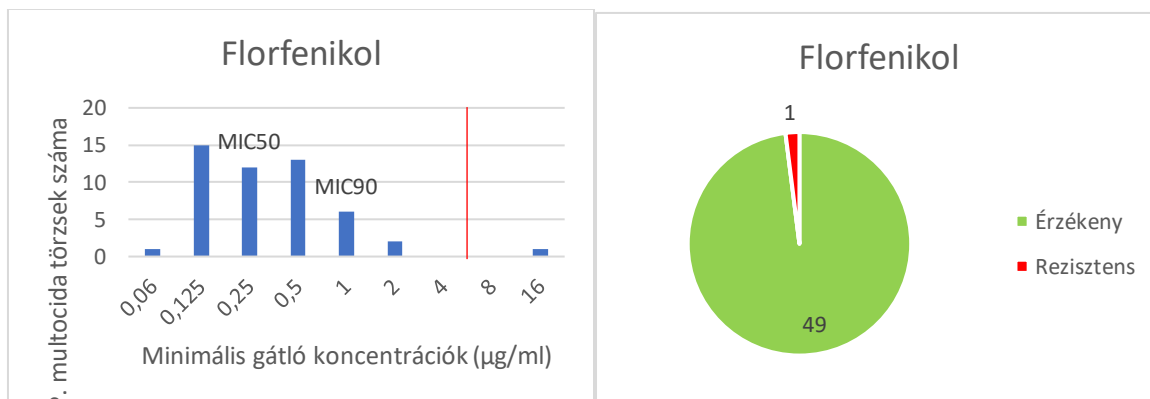
21. ábra A törzsek tulatromicin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel



22. ábra A törzsek tulatromicin érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel

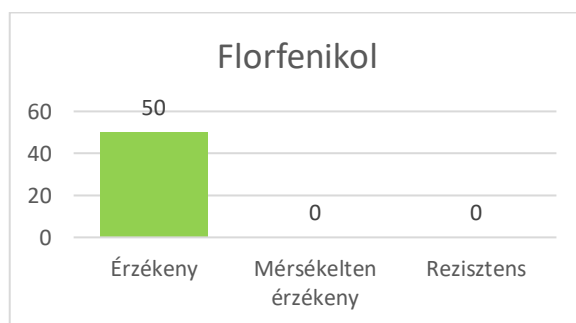
## 5.5. Florfenikol

A korongdiffúziós teszttel 50 érzékeny törzset, a leves mikrohígítási módszerrel 49 érzékeny és 1 rezisztens törzset találtunk. MIC<sub>50</sub> értéke 0,25 µg/ml, MIC<sub>90</sub> értéke pedig 1 µg/ml.



23. ábra A florfenikol MIC értékeinek eloszlása

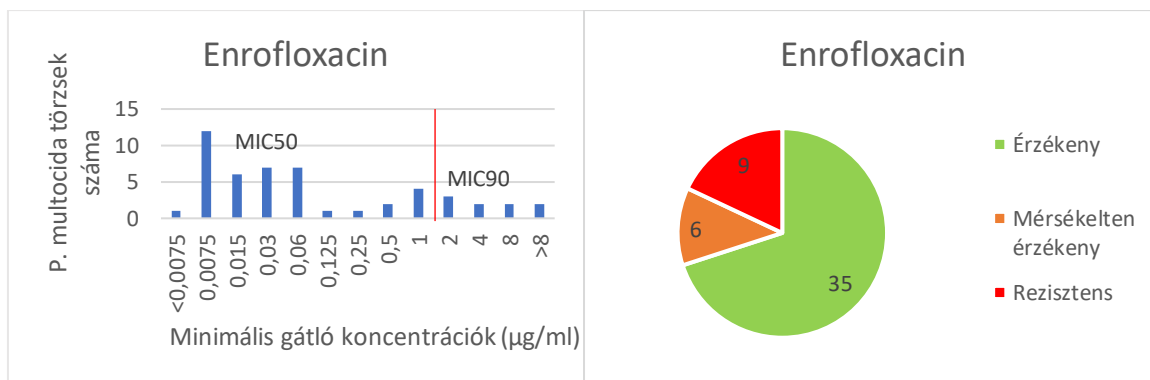
24. ábra A törzsek florfenikol érzékenységi vizsgálatának eredménye levesthígítási módszerrel



25. ábra A törzsek florfenikol érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel

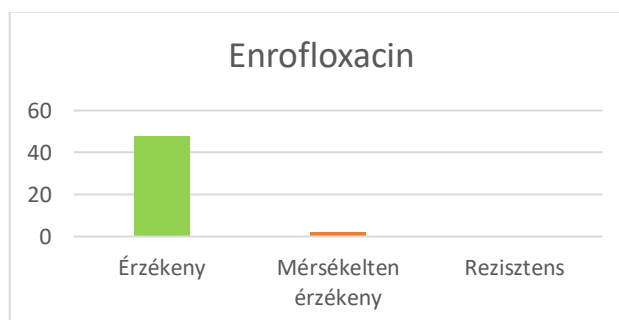
## 5.6. Fluorokinolonok

Az utolsó vizsgált antibiotikum csoportunk a fluorokinolonoké volt. Leves mikrohígítási módszerrel nézve 9 törzs rezisztens 6 pedig mérsékelten érzékeny enrofloxacinnal szemben, danofloxacinál pedig 13 rezisztenciát és 4 mérsékelt érzékenységet mutatott. A MIC<sub>50</sub> érték enrofloxacinál 0,03 µg/ml, danofloxacinál 0,125 µg/ml, a MIC<sub>90</sub> értékek pedig 4 µg/ml enrofloxacin esetében, danofloxacinál pedig több mint 8 µg/ml. Korongdiffúziós vizsgálattal enrofloxacinál 1 mérsékelten érzékeny törzset találtunk, a többi érzékenynek bizonyult. Danofloxacin esetében korongdiffúziós módszerrel a törzseket nem vizsgáltuk a korongok készlethiánya miatt.

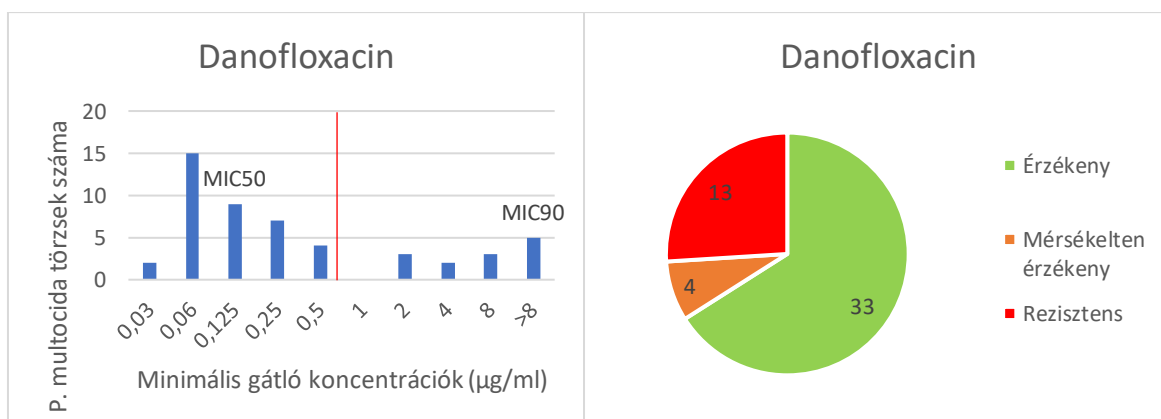


26. ábra Az enrofloxacin MIC értékeinek eloszlása

27. ábra A törzsek enrofloxacin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel



28. ábra A törzsek enrofloxacin érzékenységi vizsgálata korongdiffúziós módszerrel



29. ábra A danofloxacin MIC értékeinek eloszlása

30. ábra A törzsek danofloxacin érzékenységi vizsgálatának eredménye leveshígítási módszerrel

### 5.7. Az E-teszt eredményei

Az E-tesztet szűrőpróbaszerűen végeztük el összesen 7 darab baktériumtörzsnél spektinomycinre vizsgálva. Ebből 4 darab kérdéses törzs volt, ahol a leveshígítási mikromódszer és a korongdiffúziós teszt nagymértékben eltért egymástól. 2 darab törzsnél sikerült kimutatni a leveshígítással is mért rezisztenciát, 2-nél pedig nem. 3 darab törzset kontrollként vizsgáltunk, ezek értéke mindhárom módszerrel egyeztek.

### 5.8. A leves mikrohígítási módszer összefoglaló táblázata

A 3. táblázatban a leveshígítás eredményeit és egyes értékeit foglaltam össze. A MIC<sub>50</sub> érték azt az antibiotikum koncentrációt jelöli µg/ml-ben, ami a törzsek 50%-át gátolta, a

MIC<sub>90</sub> pedig ami a baktériumtörzsek 90%-át. A módusz a leggyakrabban előforduló értéket jelöli, a tartományban pedig az általunk mért legkisebb és legnagyobb értékeket tüntettem fel.

| Antibiotikumok        | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> | Módusz | Érzékeny | Mérsékelten érzékeny | Reziszens | Tartomány      |                |
|-----------------------|-------------------|-------------------|--------|----------|----------------------|-----------|----------------|----------------|
|                       | µg/ml             |                   |        | %        |                      |           | minimum(µg/ml) | maximum(µg/ml) |
| <b>Amoxicillin</b>    | 0,5               | 64                | 64     | 56       | 2                    | 42        | <0,06          | 64             |
| <b>Penicillin</b>     | 0,125             | 0,5               | 0,125  | 78       | 16                   | 6         | <0,03          | 2              |
| <b>Ceftiofur</b>      | 0,25              | 1                 | 0,03   | 94       |                      | 6         | <0,03          | >32            |
| <b>Spektinomycin</b>  | 32                | 256               | 32     | 60       | 26                   | 14        | 8              | >256           |
| <b>Oxitetraciklin</b> | 1                 | >64               | 0,5    | 58       |                      | 42        | 0,06           | >64            |
| <b>Tilmikozin</b>     | 16                | >256              | 16     | 50       | 26                   | 24        | 2              | >256           |
| <b>Tulatromicin</b>   | 4                 | 256               | 4      | 76       | 2                    | 22        | 1              | >256           |
| <b>Florfenikol</b>    | 0,25              | 1                 | 0,125  | 98       |                      | 2         | 0,06           | 16             |
| <b>Enrofloxacin</b>   | 0,03              | 4                 | 0,0075 | 70       | 12                   | 18        | <0,0075        | >8             |
| <b>Danofloxacin</b>   | 0,125             | >8                | 0,06   | 66       | 8                    | 26        | 0,03           | >8             |

3. táblázat A leves mikrohigítási módszer eredményeinek összefoglalása

## 6. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A szarvasmarhák légzőszervi komplex megbetegedésének tüneteit mutató borjakból és felnőtt egyedekből származó *Pasteurella multocida* izolátumok és az ebből készült leves mikrohígítási módszerrel és korongdiffúziós teszttel alkotott eredmények jól mutatják a jelenlegi hazai antibiotikum rezisztencia mértékét. Jelen vizsgálatban a BRDC ellen Magyarországon a leggyakrabban használt antimikrobiális szerek érzékenységi tesztje a folyamatosan változó rezisztencia értékek miatt nélkülözhetetlen.

A  $\beta$ -laktám antibiotikumok régóta és gyakorta használt gyógyszerkészítmények az állatorvoslásban és humán vonalon is. Jelen kutatásban az amoxicillin MIC értékei alapján a *P. multocida* baktériumtörzsek 42%-a rezisztenciát, 2% pedig mérsékelt érzékenységet és 56%-a érzékenységet mutatott levesthígítással. A korongdiffúziós teszt során az összes törzs érzékenynek bizonyult. A két vizsgálati mód közötti különbség magyarázata lehet a részleges rezisztencia, mely során a levesthígítási mikromódszerrel nézve az antibiotikum a baktériumokat gátolja, de éppen csak a CLSI által megadott határérték fölött. [67] Tehát gátlás történik, de nem megfelelő minőségben és szinten, amit a korongdiffúziós teszt nem tud kimutatni. MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékei; 0,5  $\mu$ g/ml és 64  $\mu$ g/ml. Kínai kutatás során 2007-től 2009-ig vizsgált 233 darab sertésből izolált *P. multocida* törzsek levesthígítási módszerrel tekintve a törzsek 80,3%-a rezisztenciát mutatott, MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékei a következők voltak; 64  $\mu$ g/ml és 128  $\mu$ g/ml, tehát jóval nagyobb mértékű mint az általunk mért értékek. [38] Ezzel ellentétben a VetPath európai országokban mért antimikrobiális érzékenységi vizsgálatok összefoglaló eredményei szerint 2009 és 2012 között csak két törzs mutatott rezisztenciát levesthígítási módszerrel tekintve, és MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékei is alacsonyok voltak (0,25 és 0,5  $\mu$ g/ml). [61] Az előző eredményekkel szinte egyező magyarországi vizsgálatok során sertésből izolált törzseknél a MIC<sub>50</sub> 0,25  $\mu$ g/ml, MIC<sub>90</sub> pedig 1  $\mu$ g/ml AMX-re nézve. [66]

Penicillin és ceftiofur esetében is 3 darab (6%) rezisztens törzset találtunk, ezenkívül penicillinre 8 darab (16%) törzs csak mérsékelt érzékeny. Mindkét antibiotikumnál 100%-os érzékenységet mutatott az összes törzs korongdiffúziós tesztnél. Ceftiofur esetében hasonló értéket találtak csirkéből izolált *P. multocida* érzékenységi vizsgálata során, ahol a törzsek 95%-át találták érzékenynek levesthígítási módszerrel. [68] Ugyanebben a kutatásban a penicillin értékei a következők: 54% érzékeny, 30% mérsékelt érzékeny és 16% rezisztens, tehát az eredményeinkhez képest nagyobb mértékű rezisztenciát találtak. A többi külföldi eredményt áttekintve, 1988-tól 2012-ig sem Európában, Ázsiában és az Amerikai Egyesült Államokban nem találtak rezisztens törzset szarvasmarhából izolált *P.*

*multocida* törzseket vizsgálva ceftiofurra. [42–44, 61, 63] Cseh 2012-es kutatásban sertésből izolált 233 *P. multocida* törzs közül is csak 2 mutatott rezisztenciát erre a gyógyszerhatóanyagra. [69] Hazai kutatásban szintén sertésből izolált 63 baktériumtörzs közül csak 1 darab mutatott rezisztenciát ceftiofurral szemben és a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek; 0,015 és 0,125 µg/ml, is alacsonyabbak, mint az általunk megállapított 0,25 és 1 µg/ml. [66] Nemzetközi eredményekben korongdiffúziós teszttel, penicillint vizsgálva 80 darab borjúból izolált *P. multocida* törzs 71,25%-a érzékenynek, 16,25%-a mérsékelten érzékenynek, 12,50%-a pedig rezisztensnek mutatkozott. Ugyanebben a kutatásban ceftiofurt nem, de egy első generációs cefalosporint, a cefalotint elemezve a törzsek 100%-a érzékenynek bizonyult.[70]

Összegezve tehát a  $\beta$ -laktám antibiotikumok esetében kapott eredményeket, a ceftiofur eddig 100%-os megbízhatóságú volt *P. multocida* ellen, azonban ahogy a jelen kutatás is mutatja, lassan kezd ellene is fellépni a rezisztencia. A penicillinek és szintetikus származékai pedig sokkal kevésbé hatékonyak, mint a cefalosporinok, azonban még mindig alkalmazhatóak, ha az érzékenységi vizsgálaton is megfelelőnek bizonyulnak.

A következő vizsgált antimikrobiális szerünk, az aminociklitolok közé tartozó spektinomycin. Saját eredményeinkben leveshígítással több baktériumtörzs mutatkozott rezisztensnek 14%, és mérsékelten érzékenynek 26%, mint korongdiffúziós teszttel; rezisztens 8%, mérsékelten érzékeny 2%. Leveshígítási módszerrel az is látszódik, hogy 4 baktériumtörzs esetén extra magas >256 µg/ml MIC értéket kaptunk, és a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> adatai is kiugróan magasak a többi gyógyszerhatóanyaghoz képest, számszerűen 32 és 256 µg/ml. Már Watts és munkatársai is hasonló eredményeket tapasztaltak 1988 és 1992 közötti kutatásukban, ahol a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek a következők voltak: 32 és >128 µg/ml. [42] A VetPath 2002-2006-os kutatásában a spektinomycinnél mért MIC értékek a következőre változtak a 2009-2012-es vizsgálat során: MIC<sub>50</sub> 16-ról 32 µg/ml-re nőtt, MIC<sub>90</sub> pedig maradt ugyanúgy 32 µg/ml az évek során. [60, 61] Az előbbiekből és saját vizsgálatunk eredményeiből is jól látható, hogy a spektinomycin hatásossága BRDC ellen már régóta megkérdőjelezhető, mivel az ellene fellépő rezisztencia gyakori.

Az oxitettraciklin régóta, széles körben és gyakran alkalmazott antimikrobiális szer haszonállatok gyógyítására. Ez is lehet annak az oka, hogy a rezisztencia ezzel a gyógyszerhatóanyaggal szemben igen magas. Ezt bizonyítják az eredményeink is; leveshígítási módszerrel a baktérium izolátumok 42%-a, korongdiffúziós teszttel pedig 30%-a mutatott rezisztenciát. A MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek 1 és >64 µg/ml. Már 1992-ben jelentős érzékenység csökkenést tapasztaltak az USA-ban tetraciklin vizsgálatokor. Ennek



során a baktériumtörzsek 69,9%-a mutatott érzékenységet, MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek a következőképpen alakultak: 0,5 és 32µg/ml. [42] Ezzel ellentétben Európában a legutóbbi VetPath kísérletben (2009-2012) az izolátumok 88,1%-a érzékenynek bizonyult tetraciklinnel szemben és a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek is alacsonyabbak; 0,5 és 8µg/ml. [61] Japánban pedig agar hígítási vizsgálattal még a mi eredményeinkhez képest is magasabb MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> adatokat kaptak; 2 és 128µg/ml. [63] Korongdiffúziós teszttel vizsgálva, Egyiptomban borjúból származó 74 darab *P. multocida* izolátumot vizsgálva oxitettraciklinre 90%-a mutat rezisztenciát. [71] Tehát európai viszonylathoz képest, ezek az eredmények kiugróak, azonban világszinten átlagosnak mondható az oxitettraciklinnel szemben mért nagymértékű rezisztencia.

A makrolid antibiotikumok légzőszervi betegségek során, így BRDC-ben is egy igen gyakorta alkalmazott hatóanyagcsoport, a kedvező baktericid hatása végett melyet a tüdőben fejt ki. Azonban az általunk vizsgált tilmikozin és tulatromicin *in vitro* kevésbé bizonyulnak hatásos szereknek *Pasteurella multocida* ellen. Leves mikrohígítási módszerrel tekintve a tilmikozinra 24%-a a baktériumtörzseknek rezisztens, 26%-a mérsékelten érzékeny, tulatromicinre kedvezőbb értékeket kaptunk 22% rezisztens, 2% mérsékelten érzékeny. Tilmikozin MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékei; 16 és >256µg/ml tulatromiciné 4 és 256µg/ml. 1992-es Amerikai Egyesült Államokban mért kutatásban tilmikozinra a törzsek 71,8%-a volt érzékeny, azonban a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek jóval alacsonyabbak az általunk mért adatokhoz képest.[42] Szintén kisebbek az adatok a VetPath által összegzett kutatásban is, tulatromicinre és tilmikozinra is, ahol a MIC<sub>50</sub> érték TUL esetén 2µg/ml, TIL-nél pedig 4µg/ml, a MIC<sub>90</sub> TUL:4µg/ml, TIL 8µg/ml. Hazai kutatásban viszont, melyben 2012 után is vizsgálták szarvasmarhákból izolált törzsek érzékenységét tilmikozinra, a MIC<sub>50</sub> érték egyezik az általunk is mért 16µg/ml-rel, de a MIC<sub>90</sub> jóval alacsonyabb, 32µg/ml, mint az általunk mért >256µg/ml. [49] Ugyanebben a kutatásban leírják, hogy a *macAB* (makrolid antibiotikum efflux pumpa) gén lehet az oka a szarvasmarhákból izolált *Pasteurella multocida* baktériumtörzsek növekvő rezisztenciájának a makrolid antibiotikumokkal szemben. Ugyanez lehet a mi felmérésünk, európai adatokhoz képest kiugró összegeinek oka. Korong diffúziós teszttel hasonló tendencia figyelhető meg mint levesthígítási módszerrel és a legtöbb rezisztens törzset így is sikerült kimutatnunk. Ezzel a vizsgálati módszerrel a baktériumtörzsek 22%-a rezisztens, 16%-a mérsékelten érzékeny tilmikozinra, tulatromicinre pedig 18% rezisztens, 4% mérsékelten érzékeny.

A florfenikol humán orvoslásban nem használt szer, ellene a rezisztencia még ritka és ma is hatásos antibiotikum *P. multocida* okozta betegségekben. Ezt támasztja alá a saját

kutatásunk is, korongdiffúziós teszttel 100%-a a törzseknek érzékeny, leveshígítási módszerrel pedig csupán 1 darab baktériumtörzs (2%) mutatott rezisztenciát. A MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek is alacsonyak, előbbi 0,25µg/ml, utóbbi pedig 1µg/ml. A VetPath féle kutatásban hasonló eredmények születtek, a vizsgált baktériumtörzsek 100%-a érzékeny volt florfenikolra és a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékei, 0,5µg/ml, közel a mi adatainkhoz.[61]

Az utolsó gyógyszerhatóanyag csoport az elemzésünk során a fluorokinolonoké volt. A kizárólag állatgyógyászatban alkalmazott enrofloxacin és danofloxacin széles körben alkalmazott antibakteriális gyógyszerek, azonban a túlzott használatuk végett az ellenük kialakuló rezisztencia egyre nagyobb mértékű. Ezt támasztják alá az eredményeink is, leveshígítási módszerrel tekintve az adatokat enrofloxacin esetében a baktériumtörzsek 18%-a rezisztens, 12%-a mérsékelten érzékeny; danofloxacinnál 26% rezisztens, 8% csak mérsékelten érzékeny. A MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek; enrofloxacin: 0,03µg/ml és 4µg/ml; danofloxacin: 0,125µg/ml és >8µg/ml, az eddigi európai adatokhoz képest kiugróan magas. [61] Azonban a fluorokinolonok ellen fellépő rezisztencia régóta tudott és kutatott. Vallé és munkatársai a 2011-es kutatásukban bizonyították, hogy a marbofloxacin egyszerre beadott emelt dózissal (10mg/testtömegkg) adagja az MPC (mutant prevention concentration) fölé emelkedett, így elpusztítva a BRDC-t okozó patogéneket és megelőzve a mutáns baktériumtörzsek kialakulását. [72] Korongdiffúziós teszttel itt sem tudtuk kimutatni a nagymértékű rezisztenciát, enrofloxacint vizsgálva 1 törzsnél mutatkozott méréselt érzékenység ezzel a módszerrel.

Mindent egybevetve Magyarországon a szarvasmarhából izolált *Pasteurella multocida* baktériumtörzsek a legnagyobb mértékű rezisztenciát oxitetraciklin és amoxicillin gyógyszerhatóanyagszerekkel szemben mutatták leveshígítási módszerrel. A leghatékonyabbnak pedig a ceftiofur és a florfenikol antibiotikumok mutatkoztak vizsgálatunkban. A korongdiffúziós teszt és az E- teszt csekély mértékben mutatta meg a leveshígítással egyértelműen detektált rezisztens törzseket, így ezeknek a vizsgálati módszereknek a megbízhatósága megkérdőjelezhető. Kutatásunk jó iránymutatást ad a BRDC kezelésére hazai tekintetben, azonban nem helyettesíti az egyedi antibiotikum érzékenységi vizsgálatok elvégzését, amelyeknél a többi patogénnel szembeni hatásosságot (pl. *Mannheimia haemolytica*) ugyanúgy figyelembe kell venni.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A nyálkahártyák természetes lakója, a *Pasteurella multocida*, fakultatív patogén baktériumként világszerte számos megbetegedést okozhat emlősállatokban. A szarvasmarhák légzőszervi komplex megbetegedésének (BRDC) egyik fő bakteriális kórokozója, amely a többi patogén és hajlamosító tényezők hatására komoly károkat okozhat az intenzíven tartott tejelő és húsmarha- állományokban egyaránt. A borjakban, ritkábban felnőtt állatokban kruppos tüdő- és mellhártyagyulladást, bronchitist idézhet elő. E betegség elleni küzdelemben nagy szerepe van az antimikrobiális szereknek, azonban ezeknek a hatóanyagoknak a nem megfelelő használata az emberiséget fenyegető antibiotikum rezisztenciát előremozdította. Ezért is fontos számunkra az antibiotikum- érzékenységek folyamatos monitorozása, hogy a megfelelő gyógyszerválasztással és azok szakszerű felhasználásával lassítsuk, megállítsuk az egyre jobban súlyosbodó rezisztencia terjedését.

Vizsgálatunk célja 50 különböző magyarországi településről származó, szarvasmarhából izolált *Pasteurella multocida* baktériumtörzs antibiotikum- érzékenységének megállapítása volt, különböző módszerekkel. A minimális gátló koncentrációt 10 különböző antibiotikumra (penicillin, amoxicillin, ceftiofur, florfenikol, spektinomycin, oxitettraciklin, tulatromicin, tilmikozin, enrofloxacin és danofloxacin) határoztuk meg leves mikrohígítási módszerrel a CLSI előírásai alapján. Ennek eredményeképpen az 50 különböző baktériumtörzs florfenikolra és ceftiofurra a legérzékenyebb, előbbi esetben csupán 1, utóbbinál pedig 3 törzs mutatott rezisztenciát. Mérsékelt érzékenységet és rezisztenciát mutatott számos törzs a többi antibiotikummal szemben. A legtöbb rezisztenciát mutató törzset (42%) amoxicillin és oxitettraciklin vizsgálatokkor találtuk. A határértékekhez képest legmagasabb MIC értéket, több mint 256 µg/ml értéket kaptunk spektinomycin, tulatromicin és tilmikozin esetében. Kiugróan magas MIC értéket tapasztaltunk amoxicillinnél is (64 µg/ml). A kapott eredményekből ezután meghatároztuk a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékeket, valamint a nemzetközi trendekkel is összevetettük a végeredményeket.

A másik módszerünk a korongdiffúziós teszt volt, melynek során a törzseket érzékenynek találtuk florfenikolra, ceftiofurra, amoxicillinre és penicillinre. Ezzel a módszerrel vizsgálva a legtöbb rezisztens törzset oxitettraciklinnél (30%) és a makrolid antibiotikumoknál (18% tulatromicin és 22% tilmikozin) figyeltük meg. Mivel a két módszernél egyes hatóanyagoknál a kapott eredmények nem teljesen korreláltak, számos kérdéses törzset egy harmadik fajta módszerrel, E-tesztel is megvizsgáltuk. Az amoxicillin értékeinek eltérését pedig a levesthígítási eredmények alapján részleges rezisztencia magyarázhatja, mely korongdiffúziós tesztel nem látható.

## 8. SUMMARY

*Pasteurella multocida*, a facultative pathogenic bacterium, which is a natural inhabitant of mucous membranes, can cause many diseases worldwide in mammals. It is one of the main bacterial pathogens of bovine respiratory disease complex (BRDC), and with other pathogens and predisposing factors, can cause severe lesions both in intensively kept dairy and beef herds. Its main effects are fibrinous pleuropneumonia and bronchitis in calves, and more rarely in adult cattle. Antimicrobial agents play a major role in the fight against this disease; however, the inappropriate use of these medicines have increased the antibiotic resistance that threatens humanity. Therefore, it is important to monitor continuously antibiotic sensitivities, in order to slow and reduce the ever-increasing resistance using appropriate treatments.

The aim of our study was to determine the antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* bacterial strains isolated from cattle in 50 different Hungarian settlements using different methods. The minimum inhibitory concentration was determined for 10 different antibiotics (penicillin, amoxicillin, ceftiofur, florfenicol, spectinomycin, oxytetracycline, tulathromycin, tilmicosin, enrofloxacin and danofloxacin) using broth microdilution method based on CLSI regulations. As a result, the bacterial strains were the most sensitive to florfenicol and ceftiofur, only 3 strains showed resistance to ceftiofur and 1 to florfenicol. Several strains were moderately susceptible and resistant to other antibiotics. The highest rate of resistance (42%) was found to amoxicillin and oxytetracycline. The highest MIC values, which was more than 256 µg/ml, were obtained for spectinomycin, tulathromycin and tilmicosin. An outlier MIC value was also observed for amoxicillin, at 64 µg/ml. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were then determined from the obtained results, and we also compared them with the international trends.

Our other method was the disk diffusion test, in which all the strains were found susceptible to florfenicol, ceftiofur, amoxicillin and penicillin. Using this method, we found the highest resistance to oxytetracycline (30%) and to macrolide antibiotics (tulathromycin 18% and tilmicosin 22%). Since the results obtained from the two methods in the case of certain antibiotics did not show complete correlation, we further examined some of the strains using a third method, the E-test. The difference in amoxicillin values based on the MIC results may explained by partial resistance, which is not visible with the disk diffusion test.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Harper M, Boyce JD, Adler B (2006) *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters* 265:1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00442.x>
2. Tuboly S, Rusvai M, Medveczky I, Varga J (1998) Állatorvosi járványtan I. Mezőgazda, Budapest
3. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Budapest
4. Markey BK (2013) *Clinical veterinary microbiology*, 2nd ed. Elsevier Edinburgh, Edinburgh
5. Carter GR (1955) Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am J Vet Res* 16:481–484
6. Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA (1972) Fowl Cholera: Gel Diffusion Precipitin Test for Serotyping *Pasteurella multocida* from Avian Species. *Avian Diseases* 16:925–936. <https://doi.org/10.2307/1588773>
7. Capitini CM, Herrero IA, Patel R, Ishitani MB, Boyce TG (2002) Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clin Infect Dis* 34:E74–76. <https://doi.org/10.1086/340712>
8. Shivachandra SB, Viswas KN, Kumar AA (2011) A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. *Anim Health Res Rev* 12:67–82. <https://doi.org/10.1017/S146625231100003X>
9. Ujvari B, Szeredi L, Pertl L, Tóth G, Erdélyi K, Jánosi S, Molnár T, Magyar T (2015) First detection of *Pasteurella multocida* type B: 2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. *Acta Veterinaria Hungarica* 63:141–156
10. De Alwis MCL (1992) Haemorrhagic septicaemia—A general review. *British Veterinary Journal* 148:99–112. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90101-6](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90101-6)
11. Ellis JA (2001) The Immunology of the Bovine Respiratory Disease Complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 17:535–550. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30005-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30005-0)
12. Urban-Chmiel R, Grooms DL (2012) Prevention and control of bovine respiratory disease. *J Livest Sci* 3:27–36
13. Fodor L, Amtsberg G, Varga J (1988) [Serotyping of *Pasteurella haemolytica* strains using indirect hemagglutination, double diffusion and countercurrent immunoelectrophoresis]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 95:14–15
14. Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL (2006) Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *Journal of animal science* 84:1999–2008
15. Valarcher J-F, Taylor G (2007) Bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinary research* 38:153–180
16. Jones C, Chowdhury S (2007) A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews* 8:187–205
17. Ellis JA (2009) Update on viral pathogenesis in BRD. *Animal Health Research Reviews* 10:149–153
18. Jensen R, Pierson RE, Braddy PM, Saari DA, Lauerman LH, England JJ, Keyvanfar H, Collier JR, Horton DP, McChesney AE, Benitez A, Christie RM (1976) Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 169:500–506
19. Thomson RG (1980) The pathogenesis of shipping fever in cattle. In: *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings*. pp 103–112
20. Kégl T (1976) Szállítási betegség (shipping fever) egy importált holstein- friz üszőállományban. *MÁL* 31. évfolyam:767–772
21. Dabo SM, Confer A, Montelongo M, York P, Wyckoff JH (2008) Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. *Vaccine* 26:4345–4351. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.029>

22. Ózsvári L, Búza L (2015) A szarvasmarhák légzőszervi betegsége (BRDC) elleni vakcinázás és gyógykezelés hazai nagy létszámú szarvasmarha-állományokban–2. rész. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 203
23. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES (2011) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2nd ed. Wiley-Blackwell
24. Gálfi P, Csikó G, Jerzsele Á (2015) *Állatorvosi gyógyszerteran III*. Robbie- Vet Kft., Budapest
25. Dadgostar P (2019) Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *IDR* Volume 12:3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
26. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, Goossens H, Laxminarayan R (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
27. European Centre for Disease Prevention and Control. (2022) Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016–2020. Publications Office, LU
28. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, Retailleau P, Iorga BI (2017) Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32:917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
29. Witte W (2000) Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16:19–24. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00301-0)
30. Gousia P, Economou V, Sakkas H, Leveidiotou S, Papadopoulou C (2011) Antimicrobial Resistance of Major Foodborne Pathogens from Major Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:27–38. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0577>
31. Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sørum M, Skov RL (2008) Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 14:1383–1389. <https://doi.org/10.3201/eid1409.071576>
32. Schmerold I, van Geijlswijk I, Gehring R (2023) European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 189:106473. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106473>
33. Gaynes R (2017) The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis* 23:849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
34. Ratnam J, Syed JI, Singh SK (2014) Comparative study on production of penicillin by *Penicillium notatum* and *Penicillium chrysogenum* & its antimicrobial property. *Int J of Bio Trends and Techno* 6:28–30
35. Freshwater A (2008) Why Your Housecat’s Trite Little Bite Could Cause You Quite a Fright: A Study of Domestic Felines on the Occurrence and Antibiotic Susceptibility of *Pasteurella multocida*. *Zoonoses and Public Health* 55:507–513. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01152.x>
36. Salvo F, Sarro A, Caputi A, Polimeni G (2009) Amoxicillin and amoxicillin plus clavulanate: A safety review. *Expert opinion on drug safety* 8:111–8. <https://doi.org/10.1517/14740330802527984>
37. Kaur SP, Rao R, Nanda S (2011) Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic. *Int J Pharm Pharm Sci* 3:30–7
38. Tang X, Zhao Z, Hu J, Wu B, Cai X, He Q, Chen H (2009) Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. *Journal of Clinical Microbiology* 47:951–958. <https://doi.org/10.1128/jcm.02029-08>
39. Nash CH, Huber FM (1971) Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Applied microbiology* 22:6–10
40. Ramalingam AJ (2015) History of antibiotics and evolution of resistance. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 8:1719–1724
41. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Pasteurella Haemolytica* and *Pasteurella Multocida* Recovered from Cattle with Bovine Respiratory Disease Complex. <https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/104063879100300203>. Accessed 30 Aug 2023
42. Watts JL, Yancey Jr RJ, Salmon SA, Case CA (1994) A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *Journal of Clinical Microbiology* 32:725–731

43. Portis E, Lindeman C, Johansen L, Stoltman G (2012) A ten-year (2000–2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex—*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni*—in the United States and Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24:932–944
44. Cuevas I, Carbonero A, Cano D, García-Bocanegra I, Amaro MÁ, Borge C (2020) Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* type B isolates associated with acute septicemia in pigs and cattle in Spain. *BMC Vet Res* 16:222. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02442-z>
45. Kanchugal P S, Selmer M (2020) Structural Recognition of Spectinomycin by Resistance Enzyme ANT(9) from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64:10.1128/aac.00371-20. <https://doi.org/10.1128/aac.00371-20>
46. Pickens LB, Tang Y (2010) Oxytetracycline Biosynthesis \*. *Journal of Biological Chemistry* 285:27509–27515. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.130419>
47. Gualerzi CO, Brandi L, Fabbretti A, Pon CL (2013) Antibiotics: targets, mechanisms and resistance. John Wiley & Sons
48. Del Castillo JR (2013) Tetracyclines. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* 257–268
49. Ujvári B, Magyar T (2022) Investigation of Macrolide Resistance Genotypes of *Pasteurella multocida* Isolates from Cattle and Small Ruminants. *Microbial Drug Resistance* 28:941–947. <https://doi.org/10.1089/mdr.2022.0010>
50. Amsden GW (1999) Pneumococcal macrolide resistance—myth or reality? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:1–6. <https://doi.org/10.1093/jac/44.1.1>
51. McClary DG, Loneragan GH, Shryock TR, Carter BL, Guthrie CA, Corbin MJ, Mechor GD (2011) Relationship of in vitro minimum inhibitory concentrations of tilmicosin against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* and in vivo tilmicosin treatment outcome among calves with signs of bovine respiratory disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 239:129–135. <https://doi.org/10.2460/javma.239.1.129>
52. Timsit E, Hallewell J, Booker C, Tison N, Amat S, Alexander TW (2017) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. *Veterinary Microbiology* 208:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.013>
53. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS microbiology reviews* 28:519–542
54. Kehrenberg C, Schwarz S (2005) Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 55:773–775
55. Wolfson JS, Hooper DC (1989) Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 2:378–424. <https://doi.org/10.1128/cmr.2.4.378>
56. Troughon T, Lefebvre S (2016) A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open Journal of Veterinary Medicine* 6:40–58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>
57. Plumb DC (2018) Veterinary Drug Handbook. Pharma Vet Inc., Stockholm, Wisconsin
58. Sweeney MT, Papich MG, Watts JL (2017) New interpretive criteria for danofloxacin antibacterial susceptibility testing against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with bovine respiratory disease. *J VET Diagn Invest* 29:224–227. <https://doi.org/10.1177/1040638716683212>
59. Magstadt DR, Schuler AM, Coetzee JF, Krull AC, O'Connor AM, Cooper VL, Engelken TJ (2018) Treatment history and antimicrobial susceptibility results for *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* isolates from bovine respiratory disease cases submitted to the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory from 2013 to 2015. *J VET Diagn Invest* 30:99–104. <https://doi.org/10.1177/1040638717737589>
60. de Jong A, Thomas V, Simjee S, Moyaert H, El Garch F, Maher K, Morrissey I, Butty P, Klein U, Marion H (2014) Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. *Veterinary microbiology* 172:202–215
61. El Garch F, de Jong A, Simjee S, Moyaert H, Klein U, Ludwig C, Marion H, Haag-Diergarten S, Richard-Mazet A, Thomas V, Siegwart E (2016) Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract

- pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. *Vet Microbiol* 194:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.009>
62. Yoshimura H, Ishimaru M, Endoh YS, Kojima A (2001) Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 48:555–560
  63. Katsuda K, Hoshinoo K, Ueno Y, Kohmoto M, Mikami O (2013) Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Veterinary microbiology* 167:737–741
  64. Jabeen A, Khattak M, Munir S, Jamal Q, Hussain M (2013) Antibiotic susceptibility and molecular analysis of bacterial pathogen *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Journal of applied pharmaceutical science* 3:106–110
  65. Sellyei B, Varga Z, Szentesi-Samu K, Kaszanyitzky E, Magyar T (2009) Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. *Acta Vet Hung* 57:357–367. <https://doi.org/10.1556/AVet.57.2009.3.2>
  66. Somogyi Z, Mag P, Simon R, Kerek Á, Makrai L, Biksi I, Jerzsele Á (2023) Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* Isolated from Pigs in Hungary between 2018 and 2021. *Antibiotics* 12:1298
  67. (2018) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
  68. Jones KH, Thornton JK, Zhang Y, Mauel MJ (2013) A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. *Poultry Science* 92:3166–3171
  69. Nedbalcová K, Kučerová Z (2013) Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. *Acta Veterinaria Brno* 82:3–7
  70. Mohammadi GR, GHAZVINI K (2006) Antimicrobial susceptibility testing of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolation from dairy calves with pneumonia. In: 10th international congress of the European Association for veterinary pharmacology and toxicology
  71. F.R. E-S, A.H. A, H.M H, A.M. N, E. K, S.E. S (2019) Antimicrobial and immunological studies on *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* recovered from calves affected with respiratory manifestations. *Journal of Veterinary Medical Research* 26:55–63. <https://doi.org/10.21608/jvmr.2019.43335>
  72. Vallé M, Schneider M, Galland D, Giboin H, Woehrlé F (2012) Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 35:519–528



## **10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönettel tartozom a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, Dr. Tenk Miklós, egyetemi docens úrnak a kutatás feltételeinek megteremtéséért és Dr. Fodor László egyetemi tanárnak a dolgozatomban nyújtott segítségéért és támogatásáért.

Köszönöm mentoromnak, Dr. Tóth Gergelynek, hogy a dolgozat létrejöttét lehetővé tette és ennek minden lépésében támogatott, valamint azt, hogy segített elsajátítani minden szükséges vizsgálati módszert a kutatáshoz.

Köszönöm a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék összes munkatársának, hogy segítették munkámat, Dr. Makrai László docens úrnak, hogy az innen származó törzseim nagy részét izolálta, Tóth Réka tanszéki mérnöknek, Jutasi Alexandra és Góbi Jessica asszisztenseknek, hogy a táptalajokat és egyéb eszközöket biztosították számomra a munkámhoz. Köszönöm az Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Bakteriológiai Osztályának és az Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszéknek, hogy a tanulmány alapjául szolgáló mintákat biztosították számomra. Köszönöm Dr. Jurkovich Viktornak, Dr. Kovács Péternek, Dr. Tibold Jánosnak és Dr. Tóth Csongornak, hogy a saját mintagyűjtésemet segítették.

Utoljára, de nem utolsó sorban pedig köszönöm páromnak, családomnak és barátaimnak az odaadó támogatásukat és hogy a nehéz pillanatokban mindig lelkesítettek, nélkülük ez a dolgozat nem születhetett volna meg.