

TDK DOLGOZAT

Heim Nóra

2024

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Sertésből izolált baktériumok érzékenysége potenciált szulfonamidokkal szemben

Készítette:

Heim Nóra

IV. évfolyam, állatorvos hallgató

Témavezető:

Dr. Mag Patrik

ÁTE Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	4
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1 Antimikrobiális rezisztencia (AMR)	5
3.2 Szulfonamidok	6
3.3 Diaminopirimidinek	7
3.4 Potenciált szulfonamidok	7
3.5 Szinergizmus vizsgálat	8
3.6 Sertések légzőszervi betegség komplexe (PRDC)	9
3.6.1 Streptococcus suis	10
3.6.2 Pasteurella multocida	11
3.6.3 Actinobacillus pleuropneumoniae	11
3.6.4 Glaesserella parasuis	12
4. Célkitűzések	13
5. Anyag és módszer	14
5.1 A vizsgált baktériumtörzsek	14
5.2 Az érzékenységi vizsgálatokhoz használt táplevesek	14
5.3 A vizsgálatban használt antibiotikumok, a törzsoldatok bekeverése	14
5.4 A potenciált szulfonamidok MIC-értékének meghatározása	15
5.5 A trimetoprim és a három szulfonamid önálló MIC-értékének meghatározása ...	16
5.6 Szinergizmus vizsgálat	16
6. Eredmények	18
6.1 A potenciált szulfonamidok MIC-értéke a hatóanyagok 1:19 aránya esetén.....	18
6.2 A baktériumok MIC-értéke az önálló trimetoprim és szulfonamid hatóanyagokkal szemben.....	21
6.3 A baktériumok MIC-értéke a trimetoprim és a szulfonamid komponensek 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációja esetén.....	24
6.4 Szinergizmus vizsgálat	26
7. Következtetések	34
7.1 A potenciált szulfonamidok MIC-értéke a hatóanyagok 1:19 aránya esetén.....	34
7.2 A baktériumok MIC-értéke az önálló trimetoprim és szulfonamid hatóanyagokkal szemben.....	34
7.3 A baktériumok MIC-értéke a trimetoprim és a szulfonamid komponensek 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációja esetén.....	35
7.4 Szinergizmus vizsgálat	36
7.5 Konklúzió	37
8. Összefoglalás	38
9. Summary	39
10. Irodalomjegyzék	40
11. Köszönetnyilvánítás	43
12. Hallgatói nyilatkozat	44

1. Rövidítések jegyzéke

AMEG = *Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group*

AMR = Antimikrobiális rezisztencia

CFU = *Colony-forming unit* – telepformáló egység

CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EMA = *European Medicine Agency* – Európai Gyógyszerügynökség

EU = Európai Unió

FIC_i = *fractional inhibitory concentration index* – frakcionált gátló koncentráció index

IBD = *inflammatory bowel disease*

MIC = *minimum inhibitory concentration* – minimális gátló koncentráció

MIC₅₀ = az a koncentráció, amely az adott bakteriális populáción belül az izolátumok 50 %-ának a szaporodását gátolja

MIC₉₀ = az a koncentráció, amely az adott bakteriális populáción belül az izolátumok 90%-ának a szaporodását gátolja

PABA = para-amino-benzoészav

PRDC = *Porcine Respiratory Disease Complex* – Sertések légzőszervi betegség komplexé

PSA = potenciált szulfonamid

TRP-SD = trimetoprim-szulfadiazin

TRP-SKP = trimetoprim-szulfaklórpiridazin

TRP-SMX = trimetoprim-szulfametoxazol

UPW = *ultra purified water*

WHO = *World Health Organization* – Egészségügyi Világszervezet

β-NAD = β-nikotinamid-adenin-dinukleotid

2. Bevezetés

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) jelentősége ma már világszerte közismert. Annak érdekében, hogy felvehessük a harcot az AMR terjedésével, a jelenleg rendelkezésre álló antibakteriális szerek prudens felhasználása szükséges. Ennek alappillére, hogy az antibiotikum terápiát érzékenységi vizsgálatok eredményeire alapozva végezzük el és lehetőség szerint a humán egészségügy szempontjából „legértéktelenebb” antibiotikumot válasszuk a kezelés során.

Az Európai Gyógyszerügynökség (*European Medicine Agency*, EMA) szakértői csoportja, az *Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group* (AMEG), humánegészségügyi fontosságuk alapján négy csoportba sorolta be az antibiotikumokat. A potenciált szulfonamidok az AMEG D kategóriába tartoznak, ezért használatuk az érzékeny baktériumokkal szemben megfelel a prudens antibiotikum felhasználás elvének.

A sertések légzőszervi betegség komplexe (PRDC) a sertéságazatban jelentős állategészségügyi és gazdasági kártételt okoz. A PRDC egy összetett oktanú betegség, amely kialakulásában hajlamosító tényezők is szerepet játszanak. A betegségkomplexben részt vevő baktériumok közé tartozik a *Pasteurella multocida*, a *Streptococcus suis*, az *Actinobacillus pleuropneumoniae* és a *Glaesserella parasuis* is. Bár a potenciált szulfonamidokkal szembeni rezisztencia széleskörű, a PRDC kórkép kezelése során még számos esetben sikeresen alkalmazhatjuk ezt az antibiotikum csoportot. A sikeres terápia azonban azon is múlik, hogy a kombinációs készítmény két hatóanyaga között milyen erős szinergista hatás érvényesül. Ez idáig a trimetoprim és a szulfonamid hatóanyagok közötti ideális arálynak az 1:19 arányt tekintették, azonban a hatóanyagok különböző arányai esetén fennálló baktérium érzékenységet csekély számú publikáció taglalja.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Antimikrobiális rezisztencia (AMR)

Az első antibiotikum felfedezése Sir Alexander Fleming nevéhez fűződik, aki 1928-ban egy véletlen folytán fedezte fel a penicillint. Az antibiotikumokat a második világháború alatt kezdték el használni, amely során rengeteg fertőző sebet ennek segítségével tudtak kezelni. Ennek köszönhetően az antibiotikumok világszerte elterjedtek, ám Fleming már ekkor felhívta a figyelmet arra, hogy az antibiotikumok használata a velük szemben rezisztens baktériumok elterjedését fogja eredményezni [1].

Kutatások bizonyítják, hogy a baktériumok már az első antibakteriális csoport megjelenése előtt rendelkeztek rezisztencia génekkel [2]. A rezisztens gének terjedése az antibiotikumok megjelenésével és azok szakszerűtlen és túlzott használata miatt felgyorsult, így jelenleg az AMR terjedésében ezek a szakszerűtlen alkalmazási módok játszik a fő szerepet.

Az antibiotikum rezisztencia évente 33 ezer halálesetet okoz Európában [3] és világszerte évente 4,95 millió ember hal meg jelenleg multirezisztens kórokozók okozta fertőzés következtében. 2050-re az Egészségügyi Világszervezet (*World Health Organization*, WHO) becslései szerint évente körülbelül 10 millió ember fog meghalni antibiotikum rezisztencia következményeként, a kezelésekre fordított összeg pedig meghaladhatja az 1 trillió dollárt [4], így összességében elmondható, hogy az AMR-nak nem csupán közegészségügyi, hanem súlyos gazdasági következményei is vannak.

Az AMR-nak az állategészségügyben is óriási jelentősége van, főleg az élelmiszertermelő haszonállatoknál, ezen állatok ugyanis az élelmiszerláncban keresztül az emberek felé továbbíthatják a különböző rezisztenciagénnel rendelkező baktériumokat, amelyek aztán az emberekben befolyásolják a bélmikrobiom felépítését [5, 6]. Így például a vankomicin-rezisztens *Enterococcus*-ok megjelenését a sertésekben használt avoparcinra eredeztetik, ami az állatokban a növekedést fokozta [7].

Európában jelenleg több szabályozás is azt a célt szolgálja, hogy az AMR terjedése csökkenjen. 2006 óta az EU-ban tilos hozamfokozás céljából antimikrobiális szert használni [8]. Az EMA szakértői csoportja, az *Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group* (AMEG) pedig négy csoportba (A, B, C és D) sorolta be az antibiotikumokat, közegészségügyi jelentőségük alapján [9]. Hazánkban pedig a 128/2009 FVM rendelet értelmében AMEG B kategóriába tartozó hatóanyagokat élelmiszertermelő állatok kezelésére csupán érzékenységi vizsgálatot követően lehet alkalmazni [10].

3.2 Szulfonamidok

A szulfonamidok voltak az első szintetizált antibakteriális szerek, ezért meglehetősen régóta használjuk őket, velük szemben széleskörű rezisztencia figyelhető meg. Fizikai tulajdonságukat tekintve fehér vagy halványsárga színű, szilárd halmazállapotú, gyenge savak, amelyek nem oldódnak vízben [11].

A szulfonamidok bakteriosztatikus vegyületek, amelyek hatásukat úgy fejtik ki, hogy a dihidropteroát-szintetáz enzim és a PABA kapcsolódását gátolják [12]. Az emlősök aktív transzporttal veszik fel a PABA-t, míg a baktériumok szintetizálják azt, így a szulfonamidok egyedi célponton hatnak.

Szájon át történő felszívódásuk jó, amelyet a táplálék sem befolyásol, viszont a szulfaguanidin a bélsárban marad, ezért ezt a hatóanyagot régen bélfertőtlenítőként is alkalmazták. A megoszlásuk is jó, átjutnak a speciális barriereken, de a nagy timidin és PABA koncentráció korlátozhatja a hatékonyságukat, ezért gyulladt és nekrotikus szövetekben hatékonyságuk csökken. Metabolizmusuk glükoronsavas konjugációval zajlik, amely macskafélékben hiányzik, ezért náluk a metabolizmus acetilálódással történik, így szulfa-acetil kristályok keletkeznek, amelyek savas pH-n kicsapódnak, így ebben az állatfajban az egyik legjelentősebb mellékhatás a vérzéses húgyhólyaggyulladás. Kiválasztásuk a vizelettel történik, aktív formában [13].

A szulfonamidok az AMEG D kategóriába tartozó szerek [11]. Bakteriális fertőzések mellett protozoa okozta fertőzések (pl. kokcidiózis) kezelésére is alkalmazták őket a múltban [12]. Önmagában *idiopathicus colitis*, bélfertőtlenítés és *conjunctivitis* esetén is alkalmazható. A baktériumok közül az *Actinobacillus* spp. és a *Glaesserella* spp. érzékeny velük szemben, míg a *Pasteurella* spp. és a *Streptococcus* spp. baktériumok körében rezisztencia figyelhető meg [11].

A szulfonamidok körében teljes keresztrezisztencia figyelhető meg. Önmagukban ma már nem használjuk őket a széleskörű rezisztencia miatt. A rezisztencia kromoszomális vagy plazmidon kódolt is lehet [11]. Kromoszomális rezisztencia mechanizmusok közé tartozik a csökkent penetráció, a PABA-specifikus dihidropteroát-szintetáz termelése vagy a fokozott PABA termelés [12]. A plazmid- és integron-közvetített antimikrobiális rezisztencia jelensége – amelyet gyakran olyan gének kódolnak, mint a *sul1*, a *sul2* vagy a *sul3* – néha más rezisztenciafaktorokhoz kapcsolódik, például azokhoz, amelyek trimetoprim (*dfr*) vagy streptomycin (*strA*, *strB*) rezisztenciát eredményeznek [14].

A kísérletünkben alkalmazott három szulfonamid a szulfametoxazol, a szulfaklórpiridazin és a szulfadiazin volt.

3.3 Diaminopirimidinek

A diaminopirimidinek a szulfonamidokhoz hasonlóan bakteriosztatikus hatóanyagok. Az állatorvosi gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott diaminopirimidin a trimetoprim. A trimetoprim fehér vagy halványsárga színű szilárd anyag, kémhatása alapján gyenge bázis, amely vízben alig oldódik. Hatásmechanizmusa szerint a dihidrofolát-reduktáz enzimet gátolja. Ez az enzim felel a dihidrofolát-tetrahidrofolát átalakulásért, így gátlása révén nem lesz aktív formája a folsavnak. Bár az eukarióta sejtekben is be tud kötődni a célpontjához, prokarióta sejtekhez 50× erősebben kötődik. [11].

Felszívódása jó, szájon át is alkalmazható. Kiváló a megoszlása, a speciális barriereken is átjut, ezért *meningitis* esetén is alkalmazható. A metabolizációt követően a vizelettel ürül aktív formában [11].

A diaminopirimidinek elleni rezisztencia lehet plazmidon, integronon vagy transzpozonon kódolt. Egy specifikus gént, amelyet *dfr9*-nek neveznek, eredetileg a sertések gyomor-bélrendszeréből izolálták, ahol azt *Escherichia coli*-ban mutatták ki és a diaminopirimidinekkel szembeni rezisztenciáért felel [15]. Egy másik folyamat, amely lehetővé teszi a mikroorganizmusnak, hogy ellenálljon ennek az antibakteriális szernek az az, hogy dihidrofolát-reduktáz enzimet termel. A trimetoprim önmagában húgyúti fertőzés kezelésére alkalmazható.

3.4 Potenciált szulfonamidok

A diaminopirimidineket szulfonamidokkal együtt szokták alkalmazni, ezt a kombinációt hívjuk potenciált szulfonamidnak, amely kombináció a két hatóanyag szinergista hatása miatt már időfüggő baktericid hatásmóddal rendelkezik. A potenciált szulfonamidok az AMEG D kategóriába tartoznak. Ennél a kombinációnál valódi szinergizmus figyelhető meg, így sokkal hatékonyabbak lesznek, mint a szulfonamid és a diaminopirimidin hatóanyagok önmagukban. A szakirodalom szerint az ideális arány 1:19 [11].

Mellékhatásként meg kell említeni a szárazszem betegséget, ami főleg kutyáknál jelentkezik, ha hosszú távon alkalmazzuk a gyógyszert. Emellett allergia és *dysbacteriosis* is előfordulhat [11].

Légúti fertőzéseknél, protozoa fertőzéseknél, *meningitis*, *prostatitis* és *pyothorax* esetén is használhatjuk őket. Neonatális és választáskori malacoknál *salmonellosis*, *colibacillosis*, atrófiás *rhinitis*, és *pneumonia* esetén is sikeresen lehet használni ezt a kombinációt [12].

A trimetoprim-szulfadiazin az állatorvoslásban leggyakrabban használt kombináció, melyet főként légúti- és húgyúti megbetegedéseknél, protozoák okozta fertőzöttségnél, csont-, ízületi- és lágyyszöveti fertőzéseknel lehet alkalmazni. Ezt a hatóanyagot orálisan adják, akár paszta, por vagy tabletta formájában, de az intravénás alkalmazása is lehetséges. Sertésekben 89%-os a szájon át történő biológiai hasznosulása [13].

A trimetoprim-szulfametoxazol a humángyógyászatban leggyakrabban használt potenciált szulfonamid. Nem érhető el belőle állatgyógyászati készítmény, így a humán készítményeket szokták alkalmazni lovak és kutyák kezelésére [13].

A trimetoprim-szulfaklóripiridazint meglehetősen ritkán használják az állatgyógyászatban, leginkább a lópraxisban fordul elő [13], az irodalmi áttekintésem során sertésekkel kapcsolatos releváns szakirodalmat nem találtam a hatóanyag vonatkozásában.

3.5 Szinergizmus vizsgálat

A potenciált szulfonamidok a tetrahidrofolsav szintézisét gátolják a baktériumokban. A kombinációban résztvevő két hatóanyag más támadási ponton avatkozik bele a folsav szintézisébe, ebből adódik a két hatóanyag közötti szinergizmus [11]. Sokáig úgy gondolták, hogy csupán a szulfonamid komponens erősíti a trimetoprim hatását, az által, hogy a diaminopirimidin komponens (többnyire trimetoprim) a dihidrofolát-reduktáz enzimet, a szulfonamid komponens pedig a dihidropteroát-szintetáz enzimet gátolja. Minato és mtsai. azonban bebizonyították, hogy a tetrahidrofolsav szintézisének gátlása révén a trimetoprim is fokozza a szulfonamidok hatását, a tetrahidrofolsav ugyanis egy fontos prekursor a folyamat újraindításakor (metabolikus visszacsatolás) [16].

Két hatóanyag közötti pozitív (szinergista) vagy negatív (antagonista) kölcsönhatást a kombinációs készítmény frakcionált gátló koncentráció indexével (FIC_i) jellemezhetjük. A FIC értéket egy adott hatóanyag kapcsán úgy számolhatjuk ki, ha a baktérium MIC-értékét a kombinációs készítménnyel szemben elosztjuk a baktérium MIC-értékével az önálló hatóanyaggal szemben. A kombinációban résztvevő két hatóanyag FIC-értékének az összege adja meg a FIC indexet [17].

Ha a $FIC_i \leq 1$, akkor a két hatóanyag között pozitív kölcsönhatás feltételezhető, míg, ha a $FIC_i > 1$, akkor negatív kölcsönhatás feltételezhető. Összességében a két hatóanyag között ötféle kölcsönhatást feltételezhetünk [17]: szinergista ($FIC_i \leq 0,5$), parciális szinergista ($0,5 < FIC_i < 1$), additív ($FIC_i = 1$), indifferens ($1 < FIC_i < 4$) vagy antagonista ($FIC_i \geq 4$).

Bár a potenciált szulfonamidok közötti szinergista kapcsolat közismert, a hatóanyagok FIC_i vizsgálatára irányuló kutatásokat, sertésben izolált kórokozóval szemben nem találtunk a szakirodalomban. Ez kutatásunk hiánypótló voltát jelzi.

3.6 Sertések légzőszervi betegség komplexe (PRDC)

A sertések légzőszervi betegség komplexe (*Porcine Respiratory Disease Complex*, PRDC) egy összetett oktanú kórkép, amely a sertéstelepeken gyakori előfordulása miatt jelentős állategészségügyi és gazdasági károkat okoz [18]. A betegség gyors terjedésének az okai közé tartozik a gyorsan növvő hibridek szelektálása, az egyre intenzívebb tartási rendszer, és a nagy tenyész telepek létrehozása [19]. A világ sertéseinek 80%-a, a sertéstelepek 90%-a érintett a betegségben [20]. A PRDC 16-22 hetes sertések körében fordul elő, és a megjelenése igen változatos lehet. Az adott telep általános immunitása és tartástechnológiája nagyban befolyásolja a betegség megjelenését és lefolyását. A betegség ott alakul ki a leglassabban, ahol a szopós malacok, a választott malacok és a hízósertések külön vannak tartva [19].

A legjellemzőbb tünetek közé tartozik a köhögés és a láz, emellett levertség, étvágytalanság is jelentkezik az állatoknál. A PRDC egyértelmű diagnózisához az állatállomány alapos vizsgálata, kórbonctani mintavétel és a fertőző ágensek azonosítása szükséges [21]. Ha az *A. pleuropneumoniae* is jelen van, mint fertőző ágens, akkor számíthatunk a legsúlyosabb kórbonctani elváltozásokra a tüdőben. Számunkra a leginkább célravezető diagnosztikai eljárás az orrból, kolosztrumból, szérumból vagy légsőből vett minta laboratóriumi vizsgálata, amely során szerológiai tesztek futtatnak le, ezzel meg tudják határozni, hogy mik a fertőzésben részt vevő kórokozók [21].

A PRDC által okozott elhullás vágás előtti sertéseknél óriási gazdasági károkat okoz. A betegség megjelenése esetén az egész állomány antibiotikus kezelésben részesül (metafilaxis). Fontos kiemelni, hogy a PRDC kórkép kialakításában számos esetben vírusok is részt vesznek. Az antibiotikum terápia csupán akkor jöhet szóba, ha már bakteriális fertőzés is detektálható az állatoknál. A PRDC kezelése során leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok közé tartoznak a β -laktám vegyületek, a tetraciklinek, a makrolidok, a linkózamidok és a fluorokinolonok, de a potenciált szulfonamidok is számos esetben hatékonyak bizonyultak a PRDC-t kialakító baktériumokkal szemben [21]. A PRDC során nagy hangsúlyt kell fektetnünk a megelőzésre. A prevenció kulcs eszköze az „all-in all-out” rendszer szigorú betartása, valamint a különböző életkorú egyedek különálló elhelyezése [21]. Emellett a levegőben lévő virális aeroszolok folyamatos monitorozása is szükséges a sertéstelepeken, hiszen ezzel meg tudjuk előzni

a patogének aerogén úton való terjedését [22]. A PRDC elsődleges kórokozói közé sorolható a *Mycoplasma hyopneumoniae*, a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa (PRRSV), vagy a sertések circovírusa (PCV-2). A másodlagos kórokozók közé az *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a *Streptococcus suis*, a *Glaesserella parasuis*, a *Pasteurella multocida* és a *Bordetella bronchiseptica* sorolható [19].

3.6.1 *Streptococcus suis*

A *Streptococcus* spp. egy Gram-pozitív baktériumnemzetség, amely világszerte előfordul. A bőrön és a nyálkahártyákon kommenzalista, ezen felül az élelmiszerekben és a tejben is megtalálható. 1 µm átmérőjű coccusok, amelyek láncokat formálnak. Csillója nincsen, így mozgásra nem képes [23]. Tápigényes baktériumok, véresagaron lehet őket tenyésztetni. Fakultatív anaerobok, 5-10%-os szén-dioxid jelenléte gyorsítja a növekedésüket [23]. Kicsi, áttetsző telepeket képeznek. Streptolizint, hyaluronidázt, streptokinázt és egyéb extracelluláris enzimeket, illetve toxinokat termelnek. Nagyon ellenállóak, akár hetekig is életképesek maradnak a környezetben, ám a kiszáradásra érzékenyek. Helyi gennyesedést, méhgyulladást, tőgygyulladást, ízületgyulladást, agyhártyagyulladást, vérfertőzést, tüdőgyulladást és a ló mirigykórját okozzák [24]. A *Streptococcus suis*, önmagában vérfertőzést, ízületgyulladást és agyhártyagyulladást okoz a sertéseknél.

Holmer és mtsai. Dániában figyelték meg a *S. suis*-szal szembeni rezisztencia változását. A MIC₅₀-érték 2008 és 2017 között trimetoprim, szulfametoxazol és trimetoprim-szulfametoxazol esetén nem változott, az értéke ≤0,5 µg/ml, ≤32 µg/ml, valamint ≤0,25 µg/ml volt. Ezzel ellentétben a MIC₉₀ értékben változásokat tapasztaltak. Trimetoprimnál ≤1 µg/ml-ről 8 µg/ml-re, trimetoprim-szulfametoxazalnál ≤0,25 µg/ml-ről 2 µg/ml-re nőtt a 2004 és 2017 közötti időszakban [25]. Romániában 2017-2022 között végzett kutatásban a rezisztencia előfordulását vizsgálták 206 *S. suis* izolátum kapcsán. Az izolátumok 84%-a érzékeny volt a trimetoprim-szulfametoxazollal szemben [26]. Egy másik kutatásban a *S. suis* törzsek MIC₅₀-értéke trimetoprim-szulfametoxazollal szemben 0,12 µg/ml volt, a MIC₉₀-érték pedig 4 µg/ml [27]. Nedbalcova és mtsai. Csehországban vizsgálták sertésből izolált *S. suis* baktériumtörzsek rezisztenciáját különböző antibiotikumokkal szemben. Trimetoprim-szulfametoxazol esetén a 2018-2022 közötti időszakban nem tapasztaltak szignifikáns változást, az érzékenység végig 100%-os volt, a MIC₅₀-érték végig ≤0,06 µg/ml volt, a MIC₉₀-érték pedig 0,25 µg/ml-ről 0,125 µg/ml-re csökkent [28]. Egy Magyarországon végzett kutatás

során, viszont ettől jelentősen eltérő érzékenységet tapasztaltak. Trimetoprim-szulfametoxazol esetében a MIC₅₀ 16 µg/ml, a MIC₉₀ 256 µg/ml volt és az izolátumok 94,3%-át rezisztensnek találták, ami igen magas arány a nemzetközi szakirodalommal összehasonlítva [29].

3.6.2 *Pasteurella multocida*

A *Pasteurella* spp. a nyálkahártyákon fordul elő (légutak, nemi utak és száj). Apró, coccoid alakú baktériumok tartoznak ebbe a nemzetségbe. A *Pasteurella* spp. burokkal rendelkeznek, amely hiarulonsavból és poliszacharidból tevődik össze. Csillójuk nekik sincsen, ám van fimbriájuk. Ők is tápigényes baktériumok, a pH-ra érzékenyek [30]. Aerobok és fakultatív anaerobok is lehetnek. A *Pasteurella multocida*-nak jellegzetes vadgesztenye szaga van. Mindemellett fontos megjegyezni erről a nemzetségről, hogy dermonekrotoxint termelnek, amely az osteoblast sejteket károsítja. Külvilágban nagyon rövid a túlélésük, igen gyenge az ellenállóképességük. Fakultatív patogének, számos állatfajt megbetegítenek. A sertésekben a *Pasteurella multocida* A, D tüdőgyulladást és torzító orrgyulladást is okozhat [31].

Dayao és mtsai. *P. multocida* esetén ≤0,12 µg/ml-es MIC₅₀ és MIC₉₀ értéket határoztak meg trimetoprim-szulfametoxazol hatóanyaggal szemben [32]. Siteavu és mtsai. Romániában végzett kutatása során 118 *P. multocida* izolátumot vizsgáltak, amelynek 93%-át találták érzékenynek trimetoprim-szulfametoxazollal szemben [26]. El Garch és mtsai. felmérésében a sertésekből izolált *P. multocida* törzsek trimetoprim-szulfametoxazollal szembeni MIC₅₀-értéke 0,06 µg/l, míg a MIC₉₀-értéke 0,5 µg/ml volt. A baktériumok 90,1%-a volt érzékeny a hatóanyaggal szemben [27]. Somogyi és mtsai. Magyarországon végzett kutatása során a *P. multocida* baktériumtörzsek trimetoprim-szulfametoxazollal szembeni MIC₅₀-értéke 4 µg/ml, a MIC₉₀-érték 32 µg/ml volt, amely jóval magasabb, mint a többi kutatásban szereplő értékek [29].

3.6.3 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Az *Actinobacillus* spp. az emésztőcsőben, a légutakban és a nemi utak nyálkahártyáján fordulnak elő. Kutatásunkban az *Actinobacillus pleuropneumoniae* érzékenységét vizsgáltuk, amely sertések mandulájában, a légutakban és a nyálkahártyákon fordul elő. Coccoid, rövid pálca alakú baktériumok és egyes törzseken fimbria is található. Tápigényes baktérium, amely élesztőkivonatos véresagaron és csokoládéagaron tenyésztethető. Kétféle biotípusa van: az I-es biotípus NAD-ot igényel a tenyésztéshez, míg a II-es biotípus ezt nem igényli [33]. Olyan citotoxinokat termel, amelyek a

macrophagokat és az endothelsejteket károsítják. A környezetben gyenge az ellenálló képessége. A sertések vérzéses-elhalásos tüdő- és mellhártyagyulladását okozza és része a PRDC kórképnek [33].

Egy 2007-es svájci felmérésben 83 *A. pleuropneumoniae* baktériumtörzs érzékenységét vizsgálták. Rezisztenciát detektáltak ebben az esetben is szulfametoxazollal és trimetoprim-szulfametoxazollal szemben is. A kutatás során PCR technikával igazolták a *sul2* gén jelenlétét, amely a szulfonamidok elleni rezisztenciának 1/5-ért felel [34]. Holmer és mtsai. felmérésben az *A. pleuropneumoniae* törzsek érzékenyek voltak eritromicinnel szemben [25]. 2014-ben egy Ausztráliában végzett kutatás során Dayao és mtsai. arra jutottak, hogy a trimetoprim-szulfametoxazol esetén a MIC₅₀-érték $\leq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$, akárcsak a MIC₉₀-érték [32]. Siteavu és munkatársai 137 *A. pleuropneumoniae* izolátumot vizsgáltak, amelynek 91%-a érzékeny volt trimetoprim-szulfametoxazollal szemben [26]. El Garch és mtsai. *A. pleuropneumoniae* törzseknél 0,06 $\mu\text{g/ml}$ MIC₅₀-, és 0,12 $\mu\text{g/ml}$ MIC₉₀-értéket detektáltak a trimetoprim-szulfametoxazol vonatkozásában. Ennél a kutatásnál a baktériumtörzsek 96,8%-át találták érzékenynek a hatóanyaggal szemben [27]. Egy másik kutatásban, amelyet Somogyi és munkatársai végeztek Magyarországon, az *A. pleuropneumoniae* törzsek MIC₅₀-értéke 2 $\mu\text{g/ml}$, MIC₉₀-értéke pedig 64 $\mu\text{g/ml}$ volt és a baktériumok 90,8%-át találták rezisztensnek a hatóanyaggal szemben [29].

3.6.4 *Glaesserella parasuis*

A *Glaesserella parasuis* (korábban *Haemophilus parasuis*) a felső légutak és nemiutak nyálkahártyáin fordul elő. Coccoid, pálca alakú baktérium, amely csillóval és fimbriával is rendelkezik. Festése szerint Gram-negatív, tápigényes baktérium, növekedéséhez haemet és NAD-ot igényel [35]. A *Glaesserella parasuis* a sertések savóshártya- és ízületgyulladását okozza, az általa okozott betegséget Glässer-betegségnek nevezzük.

El Garch és mtsai. 2016-ban végzett kutatása során a *G. parasuis* esetében a MIC₅₀-érték trimetoprim-szulfametoxazollal szemben 0,5 $\mu\text{g/ml}$, a MIC₉₀-érték pedig 1 $\mu\text{g/ml}$ volt. Az izolátumok 70,6%-át találták érzékenynek [27].

Az irodalmi áttekintés során nem találtunk elérhető szakirodalmat a trimetoprim-sszulfaklórpiridazin és a trimetoprim-szulfadiazin hatóanyagok érzékenységéről, sertésből izolált baktériumok vonatkozásában. Ugyancsak hiányos a szakirodalom ezen hatóanyagok FIC indexének vizsgálata terén, így kutatásunk újdonság értéke megkérdőjelezhetetlen és fontos adatokat szolgáltathat nem csak a kutató, hanem a gyakorló állatorvosok részére is.

4. Célkitűzések

Kutatásunk során a VetPath európai monitoring program keretében sertésekből izolált *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* és *Glaesserella parasuis* baktériumtörzsek érzékenységet vizsgáltuk három potenciált szulfonamiddal szemben: trimetoprim-szulfametoxazol, trimetoprim-szulfaklórpiridazin és trimetoprim-szulfadiazin.

Első körben meg kívántuk határozni, hogy az érzékenységi vizsgálat során, a vizsgálathoz használt tápleves mennyiben befolyásolja a baktériumok szaporodási potenciálját, ezáltal milyen hatással van a baktériumok minimális gátló koncentrációjára (MIC). Éppen ezért a potenciált szulfonamidok 1:19 aránya esetén négy különböző táplevesben határoztuk meg a törzsek MIC-értékét.

Ezt követően a potenciált szulfonamidok két hatóanyaga közötti szinergizmus mértékét kívántuk meghatározni 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációk esetén, a korábbi vizsgálat alapján legideálisabbnak vélt tápleves felhasználásával. A szinergizmus mértékének meghatározásához kiszámoltuk a frakcionált gátló koncentráció indexet (FIC_i). Ennek meghatározásához szükségünk volt a törzsek MIC-értékére külön a három szulfonamid és a trimetoprim hatóanyagokkal szemben.

5. Anyag és módszer

5.1 A vizsgált baktériumtörzsek

Kutatásunk során a VetPath páneurópai antimikrobiális érzékenységi program során sertésekből izolált baktériumok érzékenységét vizsgáltuk. A vizsgált törzsek nevét és darabszámát az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat: A vizsgált baktérium fajok és a törzsek száma.

Faj	Törzsek száma (db)
<i>Pasteurella multocida</i>	12
<i>Streptococcus suis</i>	14
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	13
<i>Glaesserella parasuis</i>	10

5.2 Az érzékenységi vizsgálatokhoz használt táplevesek

A vizsgálat során először négyféle táplevesben vizsgáltuk a fent megnevezett törzsek érzékenységét a trimetoprim-szulfonamid kombinációk 1:19 aránya esetén. A táplevesek jelölése A, B, C és D volt. A táplevesek tartalmát a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat: A különböző táplevesek tartalma.

Tápleves jelölése	Tápleves tartalma
A	Kation-adjuvált Müller-Hinton leves (CAMHB)
B	Kation-adjuvált Müller-Hinton leves (CAMHB) β -NAD, 10 μ g/ml (NAD)
C	Kation-adjuvált Müller-Hinton leves (CAMHB) β -NAD, 10 μ g/ml (NAD) Fötál borjú savó, 5 V/V% (FBS)
D	Brain-Heart Infusion Leves (BHI) β -NAD, 10 μ g/ml (NAD)

5.3 A vizsgálatban használt antibiotikumok, a törzsoldatok bekeverése

A baktériumtörzsek érzékenységét az alábbi három potenciált szulfonamiddal szemben határoztuk meg: trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD).

A törzsoldatokat a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) VET01S (*Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*) iránymutatása szerint készítettük el [36]. A törzsoldatokat a vizsgálat napján frissen készítettük el.

A potenciált-szulfonamidok esetén a trimetoprim-szulfonamid komponensek aránya 1:19 volt. Az eredmények között csupán a trimetoprimra vonatkoztatott minimális gátló koncentráció érték kerül feltüntetésre.

A szulfonamid komponenst először UPW segítségével elegyítettük, majd a feloldódásig 2,5 mol/l NaOH-ot adagoltunk hozzá. A trimetoprim komponenst külön főzőpohárban szintén először UPW-vel elegyítettük, majd a feloldódásig 1 mol/l koncentrációjú ecetsavat adagoltunk hozzá. Ezt követően a trimetoprim komponenst tartalmazó törzsoldatot hozzáöntöttük a szulfonamid komponenst tartalmazó törzsoldathoz. A hatóanyagok beoldása során használt oldószerek mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy az összeöntést követően a potenciált-szulfonamid törzsoldat koncentrációja 1024 µg/ml legyen a trimetoprimra vonatkoztatva. A MIC-értékek meghatározásánál ezt a törzsoldatot hígítottuk tovább.

5.4 A potenciált szulfonamidok MIC-értékének meghatározása

A -80 °C-on tárolt baktérium törzseket a vizsgálatot megelőző napon kioltottuk 3 ml táplevesbe (A, B, C és D), majd inkubáltuk 18-24 órán keresztül, 37 °C-on. A MIC-értékek meghatározása 96-lyukú microplate-en történt. A munkalemezek első oszlopát kivéve feltöltöttünk minden lyukat 90 µl táplevessel. Ezután elkészítettük az 1024 µg/ml-es potenciált szulfonamid törzsoldatok 32 µg/ml-es hígított törzsoldatát, amelyből 180 µl-t mértünk a lemezek első oszlopába, majd 2-es alapon hígítási sort készítettünk belőle a 96-lyukú lemezekben. A 10. oszlop után a hegyeket a 90 µl felesleg oldattal eldobtuk, így mindegyik oszlop 90 µl oldatot tartalmazott.

Minden baktérium törzs vizsgálatához a munkalemezekben egy-egy sor tartozott. Egy segédlemezen a baktériumok ráoltásához szükséges, 0,5 McFarland értékre hígított baktérium szuszpenziót készítettünk, amely hozzávetőlegesen 10^8 CFU/ml baktériumot tartalmazott. Következő lépésben az izolált baktériumtörzseket ráoltottuk a lemezekre.

A kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. oszlopától kezdve, visszafelé haladva minden lyukba 10 µl baktériumszuszenziót mértünk be. A 11. oszlop pozitív kontrollként (csak baktériumszuszenziót és levest tartalmazott), míg a 12. oszlop negatív kontrollként (csak levest tartalmazott) szolgált.

A munkalemezeket ezt követően 18-24 órán keresztül 37°C-os hőmérsékleten inkubáltuk, majd elbíraltuk a MIC-értékeket szabad szemmel, a pozitív kontrollokhoz viszonyítva. Az adott törzs MIC-értékének azt az antibiotikum koncentrációt tekintettük, amely mellett már a baktérium nem tudott zavarosodást okozni a táplevesben.

5.5 A trimetoprim és a három szulfonamid önálló MIC-értékének meghatározása

Ahhoz, hogy a potenciált szulfonamidok komponensei közötti szinergista hatást meghatározzuk, vagyis ki tudjuk számolni a frakcionált gátló koncentráció indexet (FIC_i), először meg kellett határoznunk a baktériumok MIC-értékét külön a trimetoprim és a három szulfonamid komponenssel szemben. A vizsgálathoz a törzsoldatokat a fentebb leírt módon kevertük be. A vizsgált tartomány trimetoprim esetén 512-1 µg/ml, a szulfonamidok esetén pedig 5120-10 µg/ml volt. Ennél a vizsgálatnál már csak a CAMHB + β-NAD (10 µg/ml) táplevesben vizsgáltuk a baktériumok érzékenységét.

5.6 Szinergizmus vizsgálat

Vizsgálatunk célja az volt, hogy meghatározzuk a szinergizmus mértékét a három potenciált szulfonamid hatóanyagai között, 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú trimetoprim-szulfonamid kombináció esetén.

A különböző arányú trimetoprim-szulfonamid kombinációk MIC-értékét úgy határoztuk meg, mintha standard érzékenységi vizsgálatot végeznénk el. Vagyis a már korábban részletezett módon bekevertük a trimetoprim-szulfonamid törzsoldatok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú keverékét és az összes arány vonatkozásában meghatároztuk a MIC-értékeket (ld. 5.4 alfejezet). Ennél a vizsgálatnál is csupán a β-NAD-dal kiegészített (10 µg/ml) CAMHB levest használtuk.

Ezt követően már meg tudtuk határozni a FIC indexet, az alábbi képlet alkalmazásával:

$$FIC_i = \frac{C_A}{MIC_A} + \frac{C_B}{MIC_B}$$

ahol MIC_A és MIC_B az A és B antibiotikum minimális gátló koncentrációja, C_A és C_B pedig a baktériumok növekedését együttesen gátló koncentráció [37]. Egy kombinációs készítmény két hatóanyaga között az alábbi öt kölcsönhatást feltételezhetjük [17]: szinergista (FIC_i ≤ 0,5), parciális szinergista (0,5 < FIC_i < 1), additív (FIC_i = 1), indifferens (1 < FIC_i < 4) vagy antagonista (FIC_i ≥ 4).

Az egyes baktériumoknál meghatározott FIC indexek között volt néhány kiugró érték, amelyek a baktériumok átlagos FIC indexét nagymértékben befolyásolták. Ezért a pontosabb és árnyaltabb eredményközlés céljából az egyes baktériumfajok összesített

FIC indexét három különböző módszerrel számoltuk ki: medián, átlag és korrigált átlag számításával. Korrigált átlag alatt azt értettük, hogy a kiugró felső értékeket nem vettük figyelembe az átlag számítása során. Ebben az esetben egy baktériumfaj esetén a vizsgált izolátumok maximum 10%-át zártuk ki a számításainkból (egy vagy két törzs), kivéve, ha volt két olyan törzs, aminek megegyezett a FIC indexe (ebben az esetben maximálisan három törzset zártunk ki).

6. Eredmények

6.1 A potenciált szulfonamidok MIC-értéke a hatóanyagok 1:19 aránya esetén

A *Pasteurella multocida* törzsek esetén a tápleves jellege érdemben nem befolyásolta az eredményeket.

Ezeknél a törzseknél detektáltuk a legnagyobb MIC-értékeket a kapott minták közül. A három hatóanyagot figyelembe véve a leghatékonyabbnak a TMP-SKP kombináció mutatkozott. A TMP-SD kombináció néhány izolátumnál hatékonyabbnak bizonyult, mint a TMP-SMX kombináció.

A *Streptococcus suis* törzsek esetén a tápleves jellege már némileg befolyásolta a kapott eredményeket, azonban az egyes izolátumok között változatos képet mutat, hogy az adott tápleves éppen segíti-e vagy inkább gátolja a baktérium szaporodását.

Ezen izolátumok kapcsán is a TMP-SKP kombináció mutatkozott a leghatékonyabbnak, itt viszont bizonyos izolátumok esetén a TMP-SMX kombináció hatékonyabbnak bizonyult, mint a TMP-SKP kombináció.

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek esetén a tápleves jellege már egyértelműen befolyásolta a kapott eredményeket. Az A-levesben a baktériumok szaporodása mérsékeltebb volt, így a MIC-értékek is ebben a táplevesben lettek rendre a legkisebbek. Ez nem meglepő, hiszen ezen baktérium I-es biotípusa a növekedéshez V-faktort (vagyis NAD-ot) igényel [35]. Sok esetben a további FBS biztosítása növelte a baktérium szaporodási potenciálját, így a C-táplevesben tapasztaltuk a legnagyobb MIC-értékeket. Érdekes módon, a BHI leves látszólag nem biztosított előnyösebb közeget, a D-táplevesben ugyanis többnyire kisebbek voltak a MIC értékek, mint a B- és C-levesekben, bár némileg nagyobbak, mint az A-levesben.

A különböző potenciált-szulfonamidok hatékonyságában ez esetben nem volt detektálható egyértelmű különbség.

A *Glaesserella parasuis* törzsek esetén szintén rendre az A-levesben mértük a legkisebb MIC-értékeket és minél több tápanyagot tartalmazott a leves, annál magasabb MIC-értékeket tapasztaltunk.

A különböző potenciált-szulfonamidok hatékonyságában ez esetben sem volt detektálható egyértelmű különbség.

Az eredményeket a **3-6. táblázatok** foglalják össze.

3. táblázat: A *Pasteurella multocida* törzsek érzékenysége trimetoprim-szulfametoxazol (TMP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TMP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TMP-SD) hatóanyagok 1:19 arányú kombinációja esetén, a négy különböző táplevesben. A MIC-értékek (µg/ml) a TMP komponensre vonatkoztatva értendők.

Sorszám	TMP-SMX				TMP-SKP				TMP-SD			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1.	>32	32	>32	32	8	16	8	16	>32	>32	>32	>32
2.	>32	>32	>32	32	16	8	32	8	>32	>32	>32	16
3.	32	32	>32	32	16	16	32	16	>32	>32	>32	>32
4.	32	32	>32	32	16	16	32	8	>32	>32	>32	32
5.	>32	>32	>32	>32	16	16	32	16	>32	>32	>32	>32
6.	>32	>32	>32	32	16	32	32	8	>32	>32	>32	16
7.	>32	>32	>32	32	8	16	8	4	>32	>32	>32	8
8.	>32	>32	>32	>32	8	8	8	32	>32	>32	>32	>32
9.	>32	>32	>32	32	4	8	8	8	>32	>32	>32	32
10.	32	32	>32	32	8	8	16	8	>32	>32	>32	16
11.	>32	>32	>32	32	8	16	32	8	>32	>32	>32	32
12.	>32	>32	>32	16	8	16	32	4	>32	>32	>32	16

4. táblázat: A *Streptococcus suis* törzsek érzékenysége trimetoprim-szulfametoxazol (TMP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TMP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TMP-SD) hatóanyagok 1:19 arányú kombinációja esetén, a négy különböző táplevesben. A MIC-értékek (µg/ml) a TMP komponensre vonatkoztatva értendők.

Sorszám	TMP-SMX				TMP-SKP				TMP-SD			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
13.	8	4	16	8	8	16	8	8	8	8	16	8
14.	8	4	>32	4	4	8	32	1	>32	16	>32	16
15.	4	4	4	16	2	2	4	4	8	8	16	8
16.	>32	32	>32	32	32	>32	16	32	>32	32	>32	32
17.	>32	32	>32	>32	16	16	>32	>32	>32	>32	>32	>32
18.	16	16	32	32	16	8	>32	16	32	16	16	16
19.	16	32	32	16	16	16	>32	16	32	16	>32	32
20.	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	32	>32	>32	>32
21.	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	>32	>32	>32	>32
22.	32	32	32	32	16	32	>32	16	32	32	32	32
23.	32	32	32	32	16	32	32	16	32	32	32	32
24.	4	1	2	4	2	1	4	2	16	2	8	4
25.	4	1	4	8	4	1	4	4	4	4	8	4
26.	16	16	4	32	16	16	>32	16	32	32	16	32

5. táblázat: Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* törzsek érzékenysége trimetoprim-szulfametoxazol (TMP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TMP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TMP-SD) hatóanyagok 1:19 arányú kombinációja esetén, a négy különböző táplevesben. A MIC-értékek (µg/ml) a TMP komponensre vonatkoztatva értendők.

Sorszám	TMP-SMX				TMP-SKP				TMP-SD			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
27.	0,5	1	2	1	1	2	16	1	0,5	4	4	2
28.	0,25	2	2	1	0,5	2	16	0,5	0,25	4	8	1
29.	0,25	2	4	1	0,25	2	16	1	0,25	4	8	2
30.	0,25	1	2	0,25	0,25	1	4	0,125	0,25	2	4	0,25
31.	0,125	0,5	1	1	0,25	0,5	2	0,5	0,5	2	4	1
32.	0,125	2	1	0,125	0,25	2	2	<0,06	0,5	4	4	4
33.	0,125	1	1	1	0,125	0,5	8	0,25	0,25	2	4	0,5
34.	16	4	4	8	4	4	16	4	16	8	8	4
35.	0,5	2	2	0,5	0,25	1	4	0,25	0,25	2	2	0,5
36.	0,125	0,125	2	<0,06	0,125	<0,06	4	<0,06	0,25	0,25	4	<0,06
37.	1	1	4	1	1	2	16	0,5	2	4	8	2
38.	4	4	8	4	2	2	16	0,5	2	8	16	2
39.	0,25	1	4	1	0,25	2	8	0,5	0,5	2	8	1

6. táblázat: A *Glaesserella parasuis* törzsek érzékenysége trimetoprim-szulfametoxazol (TMP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TMP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TMP-SD) hatóanyagok 1:19 arányú kombinációja esetén, a négy különböző táplevesben. A MIC-értékek (µg/ml) a TMP komponensre vonatkoztatva értendők.

Sorszám	TMP-SMX				TMP-SKP				TMP-SD			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
40.	0,5	4	2	2	2	4	8	8	8	16	8	8
41.	16	8	8	16	8	32	32	4	16	>32	>32	16
42.	1	2	4	1	2	4	8	0,5	1	4	4	0,5
43.	8	32	32	8	16	16	>32	4	16	32	32	4
44.	2	1	4	>32	4	2	8	8	4	2	8	8
45.	0,125	2	4	4	0,25	1	8	8	0,5	2	4	8
46.	1	4	16	4	2	4	32	1	2	16	32	4
47.	0,5	2	8	4	1	4	8	4	1	4	8	4
48.	2	1	>32	2	2	2	16	1	4	2	32	1
49.	0,25	2	8	8	1	2	8	8	2	4	4	4

6.2 A baktériumok MIC-értéke az önálló trimetoprim és szulfonamid hatóanyagokkal szemben

A **trimetoprim** hatóanyag *P. multocida* és *S. suis* törzsekkel szemben nem bizonyult önállóan hatékonynak (MIC₉₀ 256 µg/ml). Az *A. pleuropneumoniae* törzsek MIC₅₀-értéke 8 µg/ml, MIC₉₀-értéke pedig 16 µg/ml volt trimetoprimmal szemben, míg a *G. parasuis* törzsek MIC₅₀-értéke 64 µg/ml, MIC₉₀-értéke pedig 128 µg/ml volt.

Szulfametoxazol hatóanyag esetén a *P. multocida*, az *A. pleuropneumoniae* és a *G. parasuis* törzsek MIC₉₀-értéke is egyaránt 5120 µg/ml volt, és csupán *S. suis* törzseknél tapasztaltunk ennél kisebb értéket (MIC₉₀ 640 µg/ml). A törzsek MIC₅₀-értékei között azonban jelentős eltéréseket tapasztaltunk. *P. multocida* esetén 5120 µg/ml, *S. suis* esetén 640 µg/ml, *A. pleuropneumoniae* esetén 80 µg/ml, míg *G. parasuis* esetén 1280 µg/ml volt a MIC₅₀-érték.

A legkisebb MIC-értékeket **szulfaklórpiridazin** hatóanyaggal szemben mutatták a baktériumok. *P. multocida* esetén a MIC₅₀-érték 640 µg/ml, a MIC₉₀-érték 1280 µg/ml, *S. suis* esetén a MIC₅₀-érték 160 µg/ml, a MIC₉₀-érték 1280 µg/ml, *A. pleuropneumoniae* esetén a MIC₅₀-érték 40 µg/ml, a MIC₉₀-érték 80 µg/ml, *G. parasuis* esetén pedig a MIC₅₀-érték 80 µg/ml, a MIC₉₀-érték pedig 320 µg/ml volt.

Szulfadiazin hatóanyag esetén a *S. suis* és a *G. parasuis* törzsek MIC₅₀-értéke egyaránt 1280 µg/ml volt, míg *A. pleuropneumoniae* esetén 2560 µg/ml, *P. multocida* esetén pedig 5120 µg/ml volt a MIC₅₀-érték. A MIC₉₀-érték *G. parasuis* törzsek esetén volt a legkisebb (2560 µg/ml), míg ugyanez az érték *A. pleuropneumoniae* törzsek esetén 5120 µg/ml, *P. multocida* és *S. suis* törzsek esetén pedig >5120 µg/ml volt.

Az eredményeket a **7-10. táblázatok** foglalják össze.

7. táblázat: A *P. multocida* törzsek MIC-értékei (µg/ml) trimetoprim (TRP), szulfametoxazol (SMX), szulfaklórpiridazin (SKP) és szulfadiazin (SD) hatóanyagokkal szemben.

Sorszám	TRP	SMX	SKP	SD
1.	256	5120	160	>5120
2.	256	5120	1280	>5120
3.	128	5120	640	5120
4.	256	5120	640	5120
5.	256	5120	1280	5120
6.	256	5120	640	5120
7.	256	5120	640	5120
8.	256	5120	640	5120
9.	256	5120	80	>5120
10.	256	5120	80	>5120
11.	256	5120	160	5120
12.	256	5120	320	2560

8. táblázat: A *S. suis* törzsek MIC-értékei (µg/ml) trimetoprim (TRP), szulfametoxazol (SMX), szulfaklórpiridazin (SKP) és szulfadiazin (SD) hatóanyagokkal szemben.

Sorszám	TRP	SMX	SKP	SD
13.	64	2560	2560	5120
14.	256	640	1280	160
15.	256	160	80	1280
16.	256	640	320	640
17.	256	160	80	320
18.	256	640	320	2560
19.	256	160	<10	160
20.	256	160	320	2560
21.	256	640	320	2560
22.	256	640	160	2560
23.	256	640	160	640
24.	64	160	80	160
25.	64	320	160	>5120
26.	256	640	160	>5120

9. táblázat: Az *A. pleuropneumoniae* törzsek MIC-értékei (µg/ml) trimetoprim (TRP), szulfametoxazol (SMX), szulfaklórpiridazin (SKP) és szulfadiazin (SD) hatóanyagokkal szemben.

Sorszám	TRP	SMX	SKP	SD
27.	8	80	40	160
28.	8	80	40	80
29.	16	5120	80	2560
30.	0,5	5120	80	5120
31.	4	80	20	160
32.	0,5	5120	80	2560
33.	8	160	40	2560
34.	128	80	160	5120
35.	0,5	5120	80	5120
36.	8	80	40	160
37.	8	80	20	640
38.	2	5120	40	2560
39.	8	40	80	320

10. táblázat: A *G. parasuis* törzsek MIC-értékei (µg/ml) trimetoprim (TRP), szulfametoxazol (SMX), szulfaklórpiridazin (SKP) és szulfadiazin (SD) hatóanyagokkal szemben.

Sorszám	TRP	SMX	SKP	SD
40.	64	2560	40	1280
41.	128	640	320	1280
42.	2	1280	160	2560
43.	64	5120	320	2560
44.	128	1280	160	2560
45.	128	20	80	160
46.	64	10	10	10
47.	64	1280	40	80
48.	16	5120	80	5120
49.	128	1280	160	2560

6.3 A baktériumok MIC-értéke a trimetoprim és a szulfonamid komponensek 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációja esetén

A *P. multocida* törzsek vonatkozásában kizárólag a TRP-SKP kombináció esetén csökkentek a MIC-értékek a szulfonamid arányának növekedésével. TRP-SMX esetén csupán az 1:40 arányú kombinációnál láttunk egy MIC-értéknyi csökkenést, a TRP-SD kombinációnál pedig nem befolyásolta az eredményeket a két hatóanyag aránya.

A *S. suis* törzseknél is a TRP-SKP kombinációknál csökkentek a MIC-értékek a szulfonamid arányának növekedésével, de itt már a TRP-SMX kombinációknál is láttunk csökkenést a MIC-értékekben a törzsek felénél, míg a TRP-SD hatóanyag különböző arányai esetén csupán a törzsek harmadánál csökkent a MIC-érték.

Az *A. pleuropneumoniae* és a *G. parasuis* törzsek esetén a törzsek kb. 60-80%-ánál láttunk csökkenést a MIC-értékben a szulfonamid arányának növekedésével, mindhárom hatóanyag vonatkozásában.

A MIC-értékeket a három potenciált szulfonamid különböző arányai esetén, a négy baktériumfajjal szemben a **10-13. táblázatok** foglalják össze.

11. táblázat: A *P. multocida* törzsek MIC-értékei (µg/ml) trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidokkal szemben, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú keverékei esetén.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
1.	256	256	128	128	128	64	16	4	256	256	256	256
2.	256	256	256	128	64	64	16	4	256	256	256	256
3.	128	256	64	128	64	32	16	16	256	256	256	128
4.	128	256	128	128	32	32	16	4	256	256	256	256
5.	256	256	256	128	32	32	32	32	256	256	256	256
6.	256	256	256	256	32	32	32	32	256	256	256	256
7.	256	256	256	256	64	64	32	16	256	256	256	256
8.	256	256	256	256	32	32	16	16	256	256	256	256
9.	256	256	256	128	64	64	16	16	256	256	256	256
10.	256	256	128	128	32	32	16	16	256	256	256	256
11.	256	256	256	128	64	64	32	32	256	256	256	256
12.	256	256	256	128	64	128	128	128	256	256	256	256

12. táblázat: A *S. suis* törzsek MIC-értékei (µg/ml) trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidokkal szemben, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú keverékei esetén.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
13.	8	4	4	4	4	2	4	2	4	4	4	4
14.	32	32	8	8	16	16	4	2	32	32	32	32
15.	32	16	4	4	8	2	2	2	8	8	4	4
16.	64	32	32	32	32	16	32	16	16	16	16	16
17.	128	64	32	8	256	64	64	8	256	128	32	16
18.	8	16	16	16	16	16	16	8	16	16	8	8
19.	32	32	16	8	32	32	16	8	64	32	16	16
20.	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
21.	256	256	256	256	256	256	256	128	256	256	256	256
22.	16	32	16	16	32	32	32	16	16	16	16	32
23.	32	32	16	16	32	32	32	16	16	16	16	32
24.	2	2	2	2	4	2	2	2	4	4	2	2
25.	8	4	2	2	4	2	2	2	4	4	4	4
26.	16	16	16	16	32	16	16	8	32	16	16	16

13. táblázat: Az *A. pleuropneumoniae* törzsek MIC-értékei (µg/ml) trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidokkal szemben, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú keverékei esetén.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
27.	2	2	1	2	2	4	2	1	2	2	2	2
28.	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
29.	1	1	1	1	4	2	2	0,5	2	1	0,5	1
30.	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1
31.	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25	1	1	0,5	0,5
32.	2	2	2	2	2	2	1	0,5	2	2	2	2
33.	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1
34.	4	4	2	2	8	8	8	2	8	4	8	2
35.	2	2	2	2	2	2	1	0,5	2	4	2	1
36.	2	1	1	1	2	2	2	0,5	2	2	2	1
37.	1	1	0,5	0,5	2	2	2	0,5	4	2	2	1
38.	4	4	4	2	4	2	2	0,5	4	2	4	4
39.	2	2	2	0,25	2	2	2	0,5	2	2	2	2

14. táblázat: A *G. parasuis* törzsek MIC-értékei ($\mu\text{g/ml}$) trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidokkal szemben, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú keverékei esetén.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
40.	8	8	8	2	8	8	4	0,5	16	8	8	8
41.	64	32	16	16	32	64	32	8	64	64	32	32
42.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
43.	32	32	32	32	32	16	16	8	32	64	32	32
44.	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
45.	2	2	1	1	1	1	1	0,5	2	2	1	1
46.	2	2	2	2	4	4	2	2	4	4	4	4
47.	2	2	2	2	2	4	4	2	4	4	2	2
48.	1	1	1	0,5	1	2	1	1	2	2	1	1
49.	4	2	2	2	4	8	8	2	8	8	4	4

6.4 Szinergizmus vizsgálat

A 12 *P. multocida* törzssel szemben egyértelmű szinergizmust ($\text{FIC}_i \leq 0,5$) csupán a TRP-SKP kombinációk esetén figyeltünk meg. Ennél a potenciált szulfonamidnál a hatóanyagok 1:5 arányú kombinációja esetén tapasztaltuk a legnagyobb arányban a szinergizmust a törzsekkel szemben (41,7%). A TRP és az SMX 1:19 arányú kombinációja a törzsek harmadánál (33,3%) bírt parciális szinergista kölcsönhatással ($0,5 < \text{FIC}_i < 1$), míg az 1:5, 1:10 és 1:40 arányok esetén a törzsek >95%-nál indifferens hatást láttunk ($1 < \text{FIC}_i < 4$) a két hatóanyag között. A TRP és az SD hatóanyagok 1:5, 1:10 és 1:19 arányú kombinációinál az összes törzsnél indifferens hatást láttunk (100%), míg az 1:40 arányú kombinációnál egy törzs vonatkozásában már antagonista kölcsönhatás látható a két hatóanyag között. Az is megállapítható, hogy a szulfonamid arányának a növelésével többnyire a FIC_i is növekedett. Összességében egyik származtatott érték (medián, átlag, korrigált átlag) alapján sem jelenthető ki, hogy a vizsgált potenciált szulfonamidok két komponense között szinergista, parciális szinergista, vagy additív kölcsönhatás lépne fel a *P. multocida* törzsekkel szemben, kivéve a TRP-SKP FIC indexének mediánja a hatóanyagok 1:5 (parciális szinergista) és 1:10 (additív) arány esetén. Ezt a tényt a két hatóanyag arányának változása sem befolyásolta. A származtatott értékek döntő többsége az indifferens tartományba esett.

A 14 *S. suis* törzsnél már mindhárom potenciált szulfonamid hatóanyagai között megfigyelhettünk szinergista kölcsönhatást egyes törzsekkel szemben, az összes arány esetén. Mindhárom potenciált szulfonamidnál a hatóanyagok 1:5 aránya esetén volt megfigyelhető a legnagyobb arányban a szinergizmus a törzsekkel szemben (a törzsek 57,1%, 35,7% és 71,4% esetén). TRP-SMX és TRP-SKP kombinációknál parciális szinergizmust is láthatunk a törzsek egy részénél, míg ugyanezen kombinációk a törzsek kb. felénél indifferens kölcsönhatást mutattak. A TRP-SD kombináció csak 1:19 és 1:40 arányban bírt parciális szinergista hatással, viszont összességében ennél a potenciált szulfonamidnál volt a legalacsonyabb az antagonizmus mértéke. A TRP-SMX és TRP-SKP kombinációk hatóanyagai a törzsek kb. 20%-a esetén antagonista hatással voltak egymásra. A szulfonamid arányának a növelésével a FIC_i ebben az esetben is növekedett. A származtatott értékeknél csak a medián (és egy esetben a korrigált átlag) vonatkozásában tapasztaltunk a *S. suis*-szal szemben szinergizmust a TRP-SMX esetén 1:5, TRP-SD esetén pedig 1:5, 1:10 és 1:19 arányú kombinációk esetén. TRP-SKP kombináció esetén, ha csak normál átlagot számoltunk, akkor az összes arány vonatkozásában antagonista hatás feltételezhető a két hatóanyag között, a nagyon kiugró értékek miatt. A medián és a korrigált átlag alapján azonban már indifferens kölcsönhatás feltételezhető. Összességében itt is elmondható, hogy a szulfonamid arányának növelése a potenciált szulfonamidoknál inkább negatívan hatott a kombináció FIC_i-ére.

A 13 *A. pleuropneumoniae* törzsnél mind a három potenciált szulfonamid hatóanyagainak 1:5 arányú kombinációjánál szinergista hatást láttunk a törzsek több mint felével szemben (TRP-SMX 69,2%, TRP-SKP 61,5%, TRP-SD 61,5%). Antagonista hatást maximum a törzsek 15,4%-a esetén tapasztaltunk a hatóanyagok között, míg a többi esetben a trimetoprim és a szulfonamid komponensek között zömében indifferens kölcsönhatás lépett fel. Parciális szinergizmust főleg a TRP-SKP kombináció esetén tapasztaltunk, a törzsek kevesebb, mint harmadánál. A hatóanyagok FIC indexének normál átlagánál ezúttal sem állapítható meg szinergista hatás, míg a korrigált átlagnál a TRP-SD 1:10 aránya esetén látható szinergizmus. A FIC_i mediánjai a TRP-SMX 1:5 és 1:19 arányánál, a TRP-SKP 1:5 arányánál és a TRP-SD összes arányánál szinergizmust mutatnak. A többi esetben a hatóanyagok között indifferens kölcsönhatás detektálható.

A 10 *G. parasuis* törzsnél tapasztaltunk a legalacsonyabb arányban antagonista hatást a potenciált szulfonamidok hatóanyagai között (maximum a törzsek 10%-ánál). Fontos kiemelni, hogy a hatóanyagok 1:5 arányú kombinációja esetén egy törzs vonatkozásában sem tapasztaltunk antagonizmust. Ebben az arányban mindhárom hatóanyag esetén a

törzsek legalább felénél láttunk szinergizmust, 20%-ban parciális szinergizmust, 10%-ban pedig additív hatást igazoltunk a hatóanyagok között. A törzsek másik felénél pedig többnyire indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk. A FIC_i mediánja, átlaga és korrigált átlaga is szinergista hatást igazolt a TRP-SMX 1:5 arányú kombinációja esetén. A TRP-SKP ugyanezen aránya esetén a három származtatott érték parciális szinergizmust mutatott, míg TRP-SD esetén a medián szinergista, az átlag és a korrigált átlag pedig parciális szinergista hatást igazolt a hatóanyagok között. Fontos kiemelni, hogy *G. parasuis* törzsekkel szemben egyik hatóanyag egyik aránya sem mutatott antagonizmust, egyik származtatott érték esetén sem. Viszont itt is megfigyelhető volt az a tendencia, hogy a szulfonamid arányának növekedésével többnyire a FIC_i is növekedett.

Az eredményeket a **15-19. táblázatok** foglalják össze.

15. táblázat: A trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidok FIC_i-értékei, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, a *P. multocida* törzsek vonatkozásában. Pirossal azokat a FIC_i-értékeket jelöltük, amelyeket a korrigált átlag számításakor figyelmen kívül hagytunk.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
1.	1,25	1,50	0,98	1,50	4,50	4,25	1,96	1,02	1,13	1,25	1,48	2,00
2.	1,25	1,50	1,95	1,50	0,50	0,75	0,30	0,14	1,13	1,25	1,48	2,00
3.	1,13	2,50	0,74	2,00	1,00	0,75	0,60	1,13	2,25	2,50	2,95	2,00
4.	0,63	1,50	0,98	1,50	0,38	0,63	0,54	0,27	1,25	1,50	1,95	3,00
5.	1,25	1,50	1,95	1,50	0,25	0,38	0,60	1,13	1,25	1,50	1,95	3,00
6.	1,25	1,50	1,95	3,00	0,38	0,63	1,08	2,13	1,25	1,50	1,95	3,00
7.	1,25	1,50	1,95	3,00	0,75	1,25	1,08	1,06	1,25	1,50	1,95	3,00
8.	1,25	1,50	1,95	3,00	0,38	0,63	0,54	1,06	1,25	1,50	1,95	3,00
9.	1,25	1,50	1,95	1,50	4,25	8,25	3,86	8,06	1,13	1,25	1,48	2,00
10.	1,25	1,50	0,98	1,50	2,13	4,13	3,86	8,06	1,13	1,25	1,48	2,00
11.	1,25	1,50	1,95	1,50	2,25	4,25	3,93	8,13	1,25	1,50	1,95	3,00
12.	1,25	1,50	1,95	1,50	1,25	4,50	8,10	16,50	1,50	2,00	2,90	5,00
Medián	1,25	1,50	1,95	1,50	0,88	1,00	1,08	1,13	1,25	1,50	1,95	3,00
Átlag	1,19	1,58	1,61	1,92	1,50	2,53	2,20	4,06	1,31	1,54	1,95	2,75
Korrigált átlag	1,19	1,58	1,61	1,92	0,93	2,01	1,67	2,92	1,31	1,54	1,95	2,75

16. táblázat: A trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidok FIC_i-értékei, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, a *S. suis* törzsek vonatkozásában. Pirossal azokat a FIC_i-értékeket jelöltük, amelyeket a korrigált átlag számításakor figyelmen kívül hagytunk.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
13.	0,14	0,08	0,09	0,13	0,07	0,04	0,09	0,06	0,07	0,07	0,08	0,09
14.	0,38	0,63	0,27	0,53	0,13	0,19	0,08	0,07	1,13	2,13	3,93	8,13
15.	1,13	1,06	0,49	1,02	0,53	0,26	0,48	1,01	0,06	0,09	0,08	0,14
16.	0,75	0,63	1,08	2,13	0,63	0,56	2,03	2,06	0,19	0,31	0,54	1,06
17.	4,50	4,25	3,93	2,03	17,00	8,25	15,45	4,03	5,00	4,50	2,03	2,06
18.	0,09	0,31	0,54	1,06	0,31	0,56	1,01	1,03	0,09	0,13	0,09	0,16
19.	1,13	2,13	1,96	2,03	32,13	64,13	60,86	64,03	2,25	2,13	1,96	4,06
20.	2,25	4,25	7,85	16,25	1,25	2,25	4,05	8,25	0,38	0,50	0,73	1,25
21.	3,00	5,00	8,60	17,00	5,00	9,00	16,20	16,50	1,50	2,00	2,90	5,00
22.	0,19	0,63	0,54	1,06	1,13	2,13	3,93	4,06	0,09	0,13	0,18	0,63
23.	0,38	0,63	0,54	1,06	1,13	2,13	3,93	4,06	0,19	0,31	0,54	2,13
24.	0,09	0,16	0,27	0,53	0,31	0,28	0,51	1,03	0,19	0,31	0,27	0,53
25.	0,25	0,19	0,15	0,28	0,19	0,16	0,27	0,53	0,06	0,07	0,07	0,08
26.	0,19	0,31	0,54	1,06	1,13	1,06	1,96	2,03	0,14	0,08	0,09	0,13
Medián	0,38	0,63	0,54	1,06	0,88	0,81	1,99	2,05	0,19	0,31	0,40	0,84
Átlag	1,03	1,45	1,92	3,30	4,35	6,50	7,92	7,77	0,81	0,91	0,96	1,82
Korrigált átlag	0,77	0,61	0,87	1,08	0,98	2,07	2,81	2,35	0,49	0,63	0,73	1,33

17. táblázat: A trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidok FIC_i-értékei, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, az *A. pleuropneumoniae* törzsek vonatkozásában. Pirossal azokat a FIC_i-értékeket jelöltük, amelyeket a korrigált átlag számításakor figyelmen kívül hagytunk.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
27.	0,38	0,50	0,36	1,25	0,50	1,50	1,20	1,13	0,31	0,38	0,49	0,75
28.	0,38	1,00	0,73	1,25	0,50	0,75	1,20	2,25	0,38	0,50	0,73	1,25
29.	0,06	0,06	0,07	0,07	0,50	0,38	0,60	0,28	0,13	0,07	0,03	0,08
30.	2,00	1,00	1,00	1,00	1,03	1,06	1,12	1,25	1,00	2,00	1,00	2,01
31.	0,16	0,19	0,24	0,19	0,25	0,38	0,30	0,56	0,28	0,31	0,18	0,25
32.	4,00	4,00	4,01	4,02	4,13	4,25	2,24	1,25	4,00	4,01	4,01	4,03
33.	0,16	0,19	0,24	0,38	0,50	0,75	1,20	2,25	0,25	0,13	0,13	0,14
34.	0,28	0,53	0,49	1,02	0,31	0,56	1,01	0,52	0,07	0,04	0,09	0,03
35.	4,00	4,00	4,01	4,02	4,13	4,25	2,24	1,25	4,00	8,01	4,01	2,01
36.	0,38	0,25	0,36	0,63	0,50	0,75	1,20	0,56	0,31	0,38	0,49	0,38
37.	0,19	0,25	0,18	0,31	0,75	1,25	2,15	1,06	0,53	0,28	0,31	0,19
38.	2,00	2,01	2,01	1,02	2,50	1,50	1,95	0,75	2,01	1,01	2,03	2,06
39.	0,50	0,75	1,20	0,28	0,38	0,50	0,73	0,31	0,28	0,31	0,37	0,50
Medián	0,38	0,53	0,49	1,00	0,50	0,75	1,20	1,06	0,31	0,38	0,49	0,50
Átlag	1,11	1,13	1,15	1,19	1,23	1,38	1,32	1,03	1,04	1,34	1,07	1,05
Korrigált átlag	0,59	0,61	0,63	0,67	0,70	0,85	1,32	1,03	0,51	0,49	0,53	0,80

18. táblázat: A trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) potenciált szulfonamidok FIC_i-értékei, a hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, a *G. parasuis* törzsek vonatkozásában. Pirossal azokat a FIC_i-értékeket jelöltük, amelyeket a korrigált átlag számításakor figyelmen kívül hagytunk.

Sorszám	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
40.	0,14	0,16	0,18	0,06	1,13	2,13	1,96	0,51	0,31	0,19	0,24	0,38
41.	1,00	0,75	0,60	1,13	0,75	2,50	2,15	1,06	0,75	1,00	0,73	1,25
42.	1,01	1,02	1,03	1,06	1,06	1,13	1,24	1,50	1,00	1,01	1,01	0,52
43.	0,53	0,56	0,62	0,75	1,00	0,75	1,20	1,13	0,56	1,25	0,74	1,00
44.	0,02	0,03	0,02	0,04	0,08	0,14	0,25	0,52	0,02	0,02	0,03	0,02
45.	0,52	1,02	0,96	2,01	0,07	0,13	0,25	0,25	0,08	0,14	0,13	0,26
46.	1,03	2,03	3,83	8,03	2,06	4,06	3,83	8,03	2,06	4,06	7,66	16,06
47.	0,04	0,05	0,06	0,09	0,28	1,06	1,96	2,03	0,31	0,56	0,51	1,03
48.	0,06	0,06	0,07	0,04	0,13	0,38	0,30	0,56	0,13	0,13	0,07	0,07
49.	0,05	0,03	0,05	0,08	0,16	0,56	1,01	0,52	0,08	0,09	0,06	0,09
Medián	0,33	0,36	0,39	0,42	0,52	0,91	1,22	0,81	0,31	0,38	0,38	0,45
Átlag	0,44	0,57	0,74	1,33	0,67	1,28	1,42	1,61	0,53	0,85	1,12	2,07
Korrigált átlag	0,44	0,57	0,40	0,58	0,67	0,97	1,15	0,90	0,53	0,49	0,39	0,51

19. táblázat: A szinergista (S), parciális szinergista (PS), additív (Ad) indifferens (I) és antagonista (An) kölcsönhatások megoszlása a trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, darabszám (db) és százalék (%) szerint, a **12 db *P. multocida*** törzsszel szemben.

Kölcsönhatás	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
S (db)	0	0	0	0	5	1	1	2	0	0	0	0
S (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	41,7	8,3	8,3	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0
PS (db)	1	0	4	0	1	5	4	0	0	0	0	0
PS (%)	8,3	0,0	33,3	0,0	8,3	41,7	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ad (db)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ad (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
I (db)	11	12	8	12	3	1	6	6	12	12	12	11
I (%)	91,7	100,0	66,7	100,0	25,0	8,3	50,0	50,0	100,0	100,0	100,0	91,7
An (db)	0	0	0	0	2	5	1	4	0	0	0	1
An (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	41,7	8,3	33,3	0,0	0,0	0,0	8,3

20. táblázat: A szinergista (S), parciális szinergista (PS), additív (Ad) indifferent (I) és antagonista (An) kölcsönhatások megoszlása a trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, darabszám (db) és százalék (%) szerint, a **14 db S. suis** törzzsel szemben.

Kölcsönhatás	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
S (db)	8	5	5	2	5	5	4	2	10	10	7	5
S (%)	57,1	35,7	35,7	14,3	35,7	35,7	28,6	14,3	71,4	71,4	50,0	35,7
PS (db)	1	4	4	2	2	2	1	1	0	0	3	2
PS (%)	7,1	28,6	28,6	14,3	14,3	14,3	7,1	7,1	0,0	0,0	21,4	14,3
Ad (db)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ad (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
I (db)	5	6	7	10	6	6	6	6	3	3	7	6
I (%)	35,7	42,9	50,0	71,4	42,9	42,9	42,9	42,9	21,4	21,4	50,0	42,9
An (db)	1	3	2	2	3	3	4	6	1	1	0	3
An (%)	7,1	21,4	14,3	14,3	21,4	21,4	28,6	42,9	7,1	7,1	0,0	21,4

21. táblázat: A szinergista (S), parciális szinergista (PS), additív (Ad) indifferent (I) és antagonista (An) kölcsönhatások megoszlása a trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, darabszám (db) és százalék (%) szerint, a **13 db A. pleuropneumoniae** törzzsel szemben.

Kölcsönhatás	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
S (db)	9	6	7	5	8	3	1	2	8	9	8	7
S (%)	69,2	46,2	53,8	38,5	61,5	23,1	7,7	15,4	61,5	69,2	61,5	53,8
PS (db)	0	2	1	1	1	4	2	4	1	0	1	1
PS (%)	0,0	15,4	7,7	7,7	7,7	30,8	15,4	30,8	7,7	0,0	7,7	7,7
Ad (db)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ad (%)	0,0	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
I (db)	2	5	4	6	3	8	12	11	3	2	3	5
I (%)	15,4	38,5	30,8	46,2	23,1	61,5	92,3	84,6	23,1	15,4	23,1	38,5
An (db)	2	2	2	2	2	2	0	0	2	2	2	1
An (%)	15,4	15,4	15,4	15,4	15,4	15,4	0,0	0,0	15,4	15,4	15,4	7,7

22. táblázat: A szinergista (S), parciális szinergista (PS), additív (Ad) indifferent (I) és antagonista (An) kölcsönhatások megoszlása a trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SMX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) hatóanyagok 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációi esetén, darabszám (db) és százalék (%) szerint, a **10 db *G. parasuis*** törzzsel szemben.

Kölcsönhatás	TRP-SMX				TRP-SKP				TRP-SD			
	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40	1:5	1:10	1:19	1:40
S (db)	5	5	5	5	5	3	3	1	6	5	5	5
S (%)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	30,0	30,0	10,0	60,0	50,0	50,0	50,0
PS (db)	2	2	3	1	1	2	0	4	2	1	3	1
PS (%)	20,0	20,0	30,0	10,0	10,0	20,0	0,0	40,0	20,0	10,0	30,0	10,0
Ad (db)	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
Ad (%)	10,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	10,0
I (db)	5	5	5	4	5	6	7	8	4	4	4	4
I (%)	50,0	50,0	50,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	40,0	40,0	40,0	40,0
An (db)	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
An (%)	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	10,0	0,0	10,0	0,0	10,0	10,0	10,0

7. Következtetések

7.1 A potenciált szulfonamidok MIC-értéke a hatóanyagok 1:19 aránya esetén

A vizsgált baktériumtörzsek közül a *Pasteurella multocida* bizonyult a legkevésbé tápigényesnek. *Actinobacillus pleuropneumoniae* és *Glaesserella parasuis* esetén egyértelműen különböző MIC-értékeket kaptunk a különféle táplevesekben, így a β -NAD kiegészítés ez esetben mindenképpen szükséges. Az FBS a legtöbb esetben tovább növelte ezen baktériumok szaporodási potenciálját, míg a BHI levesben történő inkubáció nem rendelkezett ilyen hatással. A szakirodalomban nem találtunk olyan vizsgálatot, amely különböző táplevesekben hasonlítaná össze a potenciált szulfonamidok MIC-értékét. Az viszont régóta ismert, hogy a táplevesben a timin és timidin fokozott jelenléte gátolni képes a trimetoprim működését [38]. Az általunk használt CAMHB és BHI levesek ezekben az aminosavakban szegények voltak.

A különböző potenciált-szulfonamidok hatékonysága kapcsán csak a *Pasteurella multocida* és a *Streptococcus suis* törzsek között mutatkozik egyértelmű különbség, ezeknél a baktériumoknál a három kombináció közül a trimetoprim-szulfaklórpiridazin kombináció mutatkozik a leghatékonyabbnak. A nemzetközi szakirodalomban a baktériumok érzékenységét csupán a trimetoprim-szulfametoxazol 1:19 arányú kombinációjával szemben vizsgálják, szinte minden esetben. Viláró és mtsai. [39] felmérésében az ezen kombinációval szembeni MIC₉₀-érték *A. pleuropneumoniae* esetén 2 µg/ml volt, amely megegyezik a mi eredményeinkkel, míg *P. multocida* esetén 4 µg/ml volt, amely jóval alacsonyabb, mint az általunk tapasztalt 64 µg/ml. Holmer és mtsai. [40] *S. suis* kapcsán ≤0,25 µg/ml-es MIC₉₀-értéket tapasztaltak, míg a mi vizsgálatunkban ez az érték 64 µg/ml volt. Dayao és mtsai. [41] *G. parasuis* törzsek esetén 2 µg/ml-es MIC₉₀-értéket tapasztaltak, míg nálunk ez az érték 16 µg/ml volt.

7.2 A baktériumok MIC-értéke az önálló trimetoprim és szulfonamid hatóanyagokkal szemben

A trimetoprim hatóanyag kapcsán elmondható, hogy csupán az *A. pleuropneumoniae* törzsek bizonyultak érzékenyek ezzel a hatóanyaggal szemben (MIC₉₀ 16 µg/ml), míg a vizsgált *G. parasuis* törzsek közül csupán néhány bizonyult érzékenynek, míg a *P. multocida* és a *S. suis* törzsek rezisztensnek bizonyultak a trimetoprimmal szemben (MIC₉₀ 256 µg/ml). Prescott és mtsai. [11] leírása alapján a trimetoprim MIC₉₀-értéke *P. multocida* törzsekkel szemben 4 µg/ml volt, míg Holmer és mtsai. [40] 8 µg/ml-es értéket mértek, amely jóval alacsonyabb az általunk detektáltnál (256 µg/ml).

A szulfonamidok kapcsán elmondható, hogy mind a négy vizsgált baktériumfaj esetén a szulfaklórpiridazin bizonyult a leghatékonyabbnak. Az *A. pleuropneumoniae* törzsek MIC-értékei ezen hatóanyag esetén $\leq 160 \mu\text{g/ml}$ voltak és *G. parasuis* esetén a törzsek 80%-a is ilyen kicsi MIC-értékkel rendelkezett, viszont *P. multocida* esetén a MIC₉₀ $1280 \mu\text{g/ml}$ volt, amely megegyezik Lizarazo és mtsai. felmérésével (MIC₉₀ $>256 \mu\text{g/ml}$) [42]. Szulfametoxazollal szemben a *P. multocida* törzsek mind rezisztensek voltak (MIC₉₀ $5120 \mu\text{g/ml}$), ami megegyezik a Holmer és mtsai. által tapasztaltakkal [40], míg a többi baktériumnál a törzsek egyik felénél nagy ($\geq 640 \mu\text{g/ml}$), másik felénél pedig kicsi ($\leq 320 \mu\text{g/ml}$) MIC-értékeket találtunk. A vizsgált törzsekkel szemben minden esetben a szulfadiazin hatóanyag bizonyult a legkevésbé hatékonynak, ami megegyezik a szakirodalomban fellelhető adatokkal [42].

Összességében elmondható, hogy a trimetoprim és a szulfaklórpiridazin hatóanyagok önmagukban is képesek lehetnek alacsony koncentrációban gátolni az *A. pleuropneumoniae* törzsek szaporodását. A *G. parasuis* törzsek egy részével szemben ugyancsak ez a két hatóanyag bizonyult hatékonynak. A *P. multocida* és a *S. suis* törzsek egyaránt rezisztensek bizonyultak a vizsgált hatóanyagokkal szemben.

7.3 A baktériumok MIC-értéke a trimetoprim és a szulfonamid komponensek 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányú kombinációja esetén

A szakirodalomban ilyen jellegű vizsgálat nem elérhető sem sertés, sem más állatfaj eredetű baktérium izolátumokkal szemben, így az alábbiakban csupán saját eredményeinket tudjuk összegezni és levonni a következtetéseket.

A MIC-értékek alapján kijelenthető, hogy a TRP-SKP hatékonyabb volt a *P. multocida* törzsekkel szemben, a másik két potenciált szulfonamidhoz viszonyítva. A másik három baktérium esetén nem tapasztaltunk lényegi különbséget a potenciált szulfonamidok hatékonysága között. A legtöbb esetben a TRP-SKP kombinációnál csökkentek a MIC-értékek, ha a szulfonamid arányát növeltük, TRP-SMX esetén ez némileg ritkábban fordult elő, a legritkábban pedig a TRP-SD kombinációnál tapasztaltuk ezt. A MIC-értékek alapján a *P. multocida* törzsek csupán a TRP-SKP kombinációval szemben mutattak érzékenységet, a *S. suis* törzsek változatos érzékenységet mutattak mindhárom hatóanyaggal szemben, míg az *A. pleuropneumoniae* és a *G. parasuis* törzsek többnyire érzékenyek voltak a három hatóanyaggal szemben.

A MIC-értékek alapján arra következtethetünk, hogy a TRP-SKP kombináció az egyedüli, amely mind a négy baktériummal szemben képes hatékony lenni. Látható az is, hogy a *P. multocida* törzseknél széleskörű a rezisztencia a potenciált szulfonamidokkal

szemben, a *S. suis* törzsek változatos érzékenységet mutatnak, az *A. pleuropneumoniae* és a *G. parasuis* törzsek pedig többnyire érzékenyek bizonyulnak mindhárom kombinációval szemben.

7.4 Szinergizmus vizsgálat

A hatóanyagok különböző arányainak FIC indexét figyelembe véve elmondható, hogy a szulfonamid arányának növelése nem növelte a hatékonyságot, sőt, többnyire fordított arányosságot tapasztaltunk. Mindhárom potenciált szulfonamidnál a hatóanyagok 1:5 arányú kombinációja esetén láttunk leggyakrabban szinergista hatást. A *P. multocida* törzseknél egyedül a TRP-SKP kombinációnál láttunk szinergista hatást, a másik két kombináció között csupán indifferens hatás volt igazolható, viszont érdekes módon a TRP-SKP kombinációnál fordult elő legnagyobb arányban az antagonista kölcsönhatás is. Ez egybevág Mengelers és mtsai. eredményeivel ($FIC_i > 0,5$) [43]. *S. suis* törzseknél az 1:5 arányú TRP-SD hatóanyagok között volt a leggyakoribb a szinergizmus, ezt követte a TRP-SMX, majd végül a TRP-SKP. Antagonista hatást itt is a TRP-SKP kombinációknál figyeltünk meg. Az *A. pleuropneumoniae* törzsekkel szemben mindhárom potenciált szulfonamid azonos arányban mutatott szinergizmust és antagonizmust (a törzsek 15%-a esetén), amely elmarad a Mengelers és mtsai. által tapasztaltaktól ($FIC_i \leq 0,2$) [43]. A hatóanyagok közötti antagonizmus a legkevésbé a *G. parasuis* törzsekkel szemben érvényesült, a hatóanyagok 1:5 aránya esetén egy törzzsel szemben sem tapasztaltunk antagonizmust, és a törzsek felénél ebben az arányban pozitív kölcsönhatás volt a hatóanyagok között (szinergista, parciális szinergista, vagy additív), a törzsek másik felénél pedig indifferens kölcsönhatást láttunk.

A származtatott értékek közül a normál átlag nem minden esetben tükrözte hűen a hatóanyagok közötti kölcsönhatást a kiugró szélső értékek miatt. A medián és a korrigált átlag véleményünk szerint pontosabban leírja a hatóanyagok közötti kölcsönhatást. A két származtatott érték közül a medián minden esetben némileg alacsonyabb volt. Ha a potenciált szulfonamidok 1:5 arányú kombinációit vizsgáljuk, akkor a normál átlag alapján csupán a TRP-SMX kombináció viselkedik szinergistaként és csakis a *G. parasuis* törzsekkel szemben, míg a TRP-SKP és a TRP-SD kombinációk egyik baktériummal szemben sem bírtak szinergista hatással. A hatóanyagok ugyanezen aránya esetén a korrigált átlag alapján a TRP-SMX és a TRP-SD hatóanyagai között van szinergizmus, de itt is csak a *G. parasuis* törzsekkel szemben. A medián alapján már szinergizmus volt a TRP-SMX és a TRP-SKP kombinációk hatóanyagai között *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* és *G. parasuis* törzsekkel szemben is, míg a TRP-SKP 1:5 arányú

kombinációja csupán az *A. pleuropneumoniae* törzsekkel szemben volt szinergista. Ha azonban azt vizsgáljuk, hogy a potenciált szulfonamidok 1:5 aránya esetén mely baktériumokkal szemben fordul elő pozitív kölcsönhatás a két hatóanyag között ($FIC_i < 1$), akkor ettől árnyaltabb képet kapunk. A normál átlagot figyelembe véve a TRP-SMX és a TRP-SKP kombinációk hatóanyagai között csupán *G. parasuis* esetén látunk pozitív kölcsönhatást, míg a TRP-SD kombináció hatóanyagai között *S. suis* és *G. parasuis* törzsek esetén is pozitív kölcsönhatást tapasztaltunk. A korrigált átlagot és a mediánt figyelembe véve már mindhárom potenciált szulfonamid komponensei között pozitív kölcsönhatást láttunk *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* és *G. parasuis* törzsek esetén is, sőt, a TRP-SKP FIC indexeinek a mediánja alapján a *P. multocida* törzsek esetén is pozitív kölcsönhatás feltételezhető.

Fontos kiemelni, hogy bár a szulfonamid arányának a növekedésével a MIC-értékek számos esetben csökkentek, azonban, ha a kombinációk közötti kapcsolatot vizsgáljuk, akkor látható, hogy a FIC_i viszont már többnyire fordítottan arányos a trimetoprim és a szulfonamid arányával. Vizsgálatunk alapján a törzseknél a leggyakrabban a hatóanyagok 1:5 aránya esetén tapasztaltunk szinergizmust ($FIC_i \leq 0,5$), vagy legalább pozitív kölcsönhatást ($FIC_i < 1$), így ezen vizsgálat alapján ez az arány tekinthető a legideálisabbnak.

7.5 Konklúzió

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a tápigényes baktériumok MIC-értékét nem csupán az adott antibiotikum, hanem a tápközeg is befolyásolja. Mi a MIC-értékek meghatározásához a β -NAD-dal kiegészített (10 μ g/ml) kation-adjuvált Müller-Hinton levest javasoljuk.

A vizsgált trimetoprim-szulfametoxazol, trimetoprim-szulfaklórpiridazin és trimetoprim-szulfadiazin hatóanyagok hatékonyságában csak a *P. multocida* törzseknél láttunk jelentős különbséget, ahol a TRP-SKP bizonyult a leghatékonyabbnak.

A szulfonamid arányának növekedése a FIC indexet növelte, így a leghatékonyabbnak az 1:5 arányú kombinációk tekinthetőek. A FIC_i -ek korrigált átlaga és mediánja alapján mindhárom kombináció hatóanyagai között pozitív kölcsönhatás feltételezhető *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* és *G. parasuis* törzsekkel szemben.

A kis mintaszám miatt, eredményeink további megerősítése céljából a vizsgálat megismétlése lenne szükséges, nagyobb mintaelemszámmal.

8. Összefoglalás

A potenciált szulfonamidok (PSA) az AMEG D kategóriába tartozó antibakteriális szerek. Kutatásunk során sertések légzőszervi betegség komplexében (PRDC) résztvevő baktériumok érzékenységét vizsgáltuk három potenciált szulfonamiddal szemben, valamint vizsgáltuk a szinergizmus mértékét a kombinációk két hatóanyaga között.

Kutatásunk első lépéseként meghatároztuk a VetPath program keretében sertésekből izolált 12 *Pasteurella multocida*, 14 *Streptococcus suis*, 13 *Actinobacillus pleuropneumoniae* és 10 *Glaesserella parasuis* törzs minimális gátló koncentrációját (MIC) trimetoprim-szulfametoxazol (TRP-SX), trimetoprim-szulfaklórpiridazin (TRP-SKP) és trimetoprim-szulfadiazin (TRP-SD) hatóanyagok 1:19 arányú kombinációjával szemben, négy különböző táplevesben. Ezt követően NAD-dal kiegészített kation-adjuvált Müller-Hinton levesben (CAMHB) ismételten meghatároztuk a potenciált szulfonamidok MIC-értékét, ezúttal 1:5, 1:10, 1:19 és 1:40 arányban is. Végül vizsgáltuk a törzsek érzékenységét külön a három szulfonamid komponenssel és trimetoprimmal szemben is, hogy ki tudjuk számítani a frakcionált gátló koncentráció indexet (FIC_i), ami a szulfonamid és a trimetoprim hatóanyagok közötti szinergizmusról ad tájékoztatást.

P. multocida esetén a TRP-SMX és a TRP-SD kombinációk MIC-értékei egyaránt ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ voltak, tekintet nélkül a két hatóanyag arányára. A TRP-SKP kombináció MIC₅₀-értéke 32 $\mu\text{g/ml}$ volt az összes vizsgált aránynál. *S. suis* törzseknél a MIC₅₀-érték TRP-SMX esetén 32 $\mu\text{g/ml}$ -ről 8 $\mu\text{g/ml}$ -re, TRP-SKP esetén pedig 16 $\mu\text{g/ml}$ -ről 2 $\mu\text{g/ml}$ -re csökkent a szulfonamid arányának növekedésével, míg a TRP-SD kombináció MIC₅₀-értéke mindegyik vizsgált aránynál 32 $\mu\text{g/ml}$ volt. *A. pleuropneumoniae* törzseknél a MIC₅₀-érték TRP-SMX és TRP-SD esetén 2 $\mu\text{g/ml}$ -ről 1 $\mu\text{g/ml}$ -re, TRP-SKP esetén pedig 2 $\mu\text{g/ml}$ -ről 0,5 $\mu\text{g/ml}$ -re csökkent a szulfonamid arányának növekedésével. *G. parasuis* törzseknél a MIC₅₀-érték TRP-SMX és TRP-SKP esetén 2 $\mu\text{g/ml}$ volt, tekintet nélkül a trimetoprim és a szulfonamid komponensek arányára, míg TRP-SD esetén a MIC₅₀-érték 4 $\mu\text{g/ml}$ -ről 2 $\mu\text{g/ml}$ -re csökkent a szulfonamid arányának növekedésével.

A FIC_i-ről elmondható, hogy ahogyan a trimetoprim és a szulfonamid közötti arány növekedett, a FIC_i-érték az összes vizsgált baktérium esetén egyre nagyobb volt. A vizsgált *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* és *G. parasuis* törzsek felénél határoztunk meg egyértelműen szinergista hatást (FIC $\leq 0,5$), mindhárom PSA esetén, míg a *P. multocida* törzsek esetén csupán a TRP-SKP hatóanyagnál tapasztaltunk egyértelmű szinergizmust.

9. Summary

Potentiated sulfonamides (PSA) are antibacterial agents belonging to the AMEG D category. In our study, we investigated the susceptibility of bacteria involved in Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) to three potentiated sulfonamides and the degree of synergism between the two active substances in the combinations.

As the first step of our study, we determined the minimum inhibitory concentrations (MIC) of 12 *Pasteurella multocida*, 14 *Streptococcus suis*, 13 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and 10 *Glaesserella parasuis* strains, isolated from pigs under the VetPath program, against the combinations of trimethoprim-sulfamethoxazole (TRP-SMX), trimethoprim-sulfacloxyridazine (TRP-SKP), and trimethoprim-sulfadiazine (TRP-SD) in four different broth media (ratio of 1:19). Subsequently, we reassessed the MIC values of the potentiated sulfonamides in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) supplemented with NAD, this time in 1:5, 1:10, 1:19, and 1:40 ratios. Finally, we examined the strains' sensitivity to the three sulfonamide components and trimethoprim individually, enabling the calculation of the fractional inhibitory concentration index (FIC_i), which provides insight into the synergy between the sulfonamide and trimethoprim agents.

In the case of *P. multocida*, the MIC values for the TRP-SMX and TRP-SD combinations were consistently ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, regardless of the ratio between the two agents. The MIC₅₀ for the TRP-SKP combination was 32 $\mu\text{g/ml}$ across all examined ratios. For *S. suis* strains, the MIC₅₀ value for TRP-SMX decreased from 32 $\mu\text{g/ml}$ to 8 $\mu\text{g/ml}$, and for TRP-SKP from 16 $\mu\text{g/ml}$ to 2 $\mu\text{g/ml}$ as the ratio of sulfonamide increased, while the MIC₅₀ for the TRP-SD combination remained at 32 $\mu\text{g/ml}$ across all ratios. For *A. pleuropneumoniae*, the MIC₅₀ values for TRP-SMX and TRP-SD decreased from 2 $\mu\text{g/ml}$ to 1 $\mu\text{g/ml}$, and for TRP-SKP from 2 $\mu\text{g/ml}$ to 0.5 $\mu\text{g/ml}$ as the sulfonamide ratio increased. In *G. parasuis* strains, the MIC₅₀ value for TRP-SMX and TRP-SKP was 2 $\mu\text{g/ml}$, regardless of the trimethoprim-to-sulfonamide ratio, while for TRP-SD, the MIC₅₀ decreased from 4 $\mu\text{g/ml}$ to 2 $\mu\text{g/ml}$ with an increase in the sulfonamide ratio.

Regarding the FIC_i values, as the ratio between trimethoprim and sulfonamide increased, the FIC_i value for all bacteria tested increased. For half of the *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* and *G. parasuis* strains tested, a clear synergistic effect (FIC_i ≤ 0.5) was determined for all three PSAs, whereas for *P. multocida* strains, only the TRP-SKP active substance showed a clear synergistic effect.

10. Irodalomjegyzék

1. Fleming A (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10:226–236
2. Aminov RI, Mackie RI (2007) Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 271:147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x>
3. (2024) EU Action on Antimicrobial Resistance - European Commission. https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_en. Accessed 28 Aug 2024
4. Dadgostar P (2019) Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance* 12:3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
5. McKellar QA (1998) Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. *BMJ* 317:610–611. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7159.610>
6. Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, De Schaetzen M-A, Van Huffel X, Imberechts H, Dierick K, Daube G, Saegerman C, De Block J, Dewulf J, Herman L (2013) Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10:2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
7. Coglian C, Goossens H, Greko C (2011) Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe: Banning nonessential antibiotic uses in food animals is intended to reduce pools of resistance genes. *Microbe Magazine* 6:274–279. <https://doi.org/10.1128/microbe.6.274.1>
8. (2003) Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance)
9. (2020) Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-and-animal-health>. Accessed 14 Oct 2024
10. Regulation - 2019/6 - EN - EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>. Accessed 14 Oct 2024
11. Prescott JF (2013) Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 279–294
12. Campbell KL (1999) Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. *Veterinary Dermatology* 10:205–215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1999.00181.x>
13. Papich MG, J.E. R (2018) Sulfonamides and potentiated sulfonamides. In: *Veterinary pharmacology and therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, New Jersey, USA, pp 796–825.
14. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB (2010) Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52:47. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>
15. Sköld O (2001) Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research* 32:261–273. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001123>
16. Minato Y, Dawadi S, Kordus SL, Sivanandam A, Aldrich CC, Baughn AD (2018) Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. *Nat Commun* 9:1003. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03447-x>
17. Wang Y, Li X, Wang D, Sun S, Lu C (2020) In vitro interactions of amroxol hydrochloride or amlodipine in combination with antibacterial agents against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Letters in Applied Microbiology* 70:189–195. <https://doi.org/10.1111/lam.13259>
18. Ramirez CR, Harding AL, Forteguerra EBR, Aldridge BM, Lowe JF (2015) Limited efficacy of antimicrobial metaphylaxis in finishing pigs: A randomized clinical trial. *Preventive Veterinary Medicine* 121:176–178. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.002>
19. Bochev I Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC): A Review. I. Etiology, Epidemiology, Clinical Forms And Pathoanatomical Features
20. Fano E, Pijoan C, Dee S (2005) Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can J Vet Res* 69:223–228
21. Bochev I Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC): A review. II. Diagnostics, Treatment And Prevention
22. Hu Z, Tian X, Lai R, Ji C, Li X (2023) Airborne transmission of common swine viruses. *Porcine Health Management* 9:50. <https://doi.org/10.1186/s40813-023-00346-6>

23. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM (1997) *Streptococcus Suis*: Past and Present. *Vet Res Commun* 21:381–407. <https://doi.org/10.1023/A:1005870317757>
24. Segura M (2020) *Streptococcus suis* Research: Progress and Challenges. *Pathogens* 9:707. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090707>
25. Holmer I, Salomonsen CM, Jorsal SE, Astrup LB, Jensen VF, Høg BB, Pedersen K (2019) Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Veterinary Research* 15:449. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2162-8>
26. Siteavu MI, Dugea RI, Pitoiu E, Ciobotaru-Pirvu E (2023) Antimicrobial Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, and *Pasteurella multocida* Isolated from Romanian Swine Farms. *Microorganisms* 11:2410. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102410>
27. 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. *Veterinary Microbiology* 194:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.009>
28. Nedbalcova K, Kucharovicova I, Zouharova M, Matiaskova K, Kralova N, Brychta M, Simek B, Pecha T, Plodkova H, Matiasovic J (2022) Resistance of *Streptococcus suis* Isolates from the Czech Republic during 2018–2022. *Antibiotics* 11:1214. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091214>
29. 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. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081298>
30. Wilkie IW, Harper M, Boyce JD, Adler B (2012) *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis. In: Aktories K, Orth JHC, Adler B (eds) *Pasteurella multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–22
31. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia | Animal Health Research Reviews | Cambridge Core. <https://www.cambridge.org/core/journals/animal-health-research-reviews/article/abs/pasteurella-multocida-and-its-role-in-porcine-pneumonia/743A0F91ECD2142FE6322F8B213C5654>. Accessed 14 Oct 2024
32. Dayao DAE, Gibson JS, Blackall PJ, Turni C (2014) Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. *Veterinary Microbiology* 171:232–235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.014>
33. Chiers K, Waele TD, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F (2010) Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Veterinary Research* 41:. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010037>
34. Matter D, Rossano A, Limat S, Vorlet-Fawer L, Brodard I, Perreten V (2007) Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitonisillarum*. *Veterinary Microbiology* 122:146–156. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.009>
35. Río ML del, Gutiérrez B, Gutiérrez CB, Monter JL, Ferri EFR (2003) Evaluation of survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* in four liquid media and two swab specimen transport systems. *American Journal of Veterinary Research* 64:1176–1180. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.1176>
36. (2020) Performance standards for antimicrobial disk dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 5th ed. VET01S
37. Fatsis-Kavalopoulos N, Sánchez-Hevia DL, Andersson DI (2024) Beyond the FIC index: the extended information from fractional inhibitory concentrations (FICs). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 79:2394–2396. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac233>
38. Sangurdekar DP, Zhang Z, Khodursky AB (2011) The association of DNA damage response and nucleotide level modulation with the antibacterial mechanism of the anti-folate drug Trimethoprim. *BMC Genomics* 12:583. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-583>
39. Vilaró A, Novell E, Enrique-Tarancón V, Balielles J, Vilalta C, Martínez S, Fraile Sauce LJ (2020) Antimicrobial Susceptibility Pattern of Porcine Respiratory Bacteria in Spain. *Antibiotics* 9:402. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070402>
40. Holmer I, Salomonsen CM, Jorsal SE, Astrup LB, Jensen VF, Høg BB, Pedersen K (2019) Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Vet Res* 15:449. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2162-8>
41. Dayao DAE, Kienzle M, Gibson JS, Blackall PJ, Turni C (2014) Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology* 172:586–589. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.010>

42. Lizarazo YAV, Ferri EFR, Fuente AJM de la, Martín CBG (2006) Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolates from pigs in Spain in 1987–1988 and 2003–2004. *American Journal of Veterinary Research* 67:663–668. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.4.663>
43. Mengelers MJB, Klinger B van, Miert ASJPAM van (1990) In vitro susceptibility of some porcine respiratory tract pathogens to aditoprim, trimethoprim, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, and combinations of these agents. *American Journal of Veterinary Research* 51:1860–1864. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1990.51.11.1860>

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet Dr. Mag Patrik témavezetőmnek a szakmai iránymutatásáért, türelméért és lelkiismeretes támogatásáért, amely nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Dr. Jerzsele Ákos Tanszékvezető Úrnak, aki támogató hozzáállásával és a kutatás feltételeinek megteremtésével hozzájárult ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen. Köszönöm a bizalmát és az általa nyújtott lehetőségeket.

Kutatásomat az Egyetemi Kutatói Ösztöndíj Program (EKÖP) keretein belül valósítottam meg.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm a családomnak és barátaimnak a támogatást, hogy mindig tartották bennem a lelket és bíztak bennem.

12. Hallgatói nyilatkozat

Én, Heim Nóra, negyedik évfolyamos állatorvostan hallgató nyilatkozom, hogy a 2024. évi Tudományos Diákköri Konferenciára szánt dolgozatom elkészítésében az alábbi módon vettem részt.

A kísérlet *in vitro* fázisa során segédkeztem az antibiotikum törzsoldatok bekeverésében, valamint az általunk vizsgált baktériumok érzékenységének meghatározásában, a teljes kísérlet során. Részt vettem az eredmények leolvasásában és az adatok rögzítésében, valamint azok kiértékelésében és táblázat-szerű ábrázolásában.

A TDK dolgozatom irodalmi áttekintését a témavezetőm iránymutatása alapján önállóan írtam meg. Az anyag és módszer részt a vizsgálatok során elvégzett munka alapján önállóan írtam meg. A rendszerezett adatok alapján témavezetőm segítségével vettem részt az eredmények és a következtetések fejezetek kidolgozásában.

Budapest, 2024. október 15.

Heim Nóra S.K.