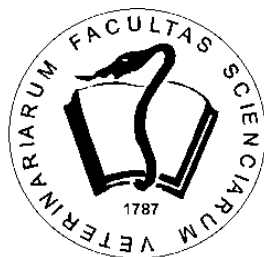


Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

**A biofilmképzés hatása a kemoterápiás szerekkel szembeni *in vitro*
érzékenységre *Pseudomonas aeruginosa* törzseknél**



Készítette: Albrecht Vivien

Témavezető: dr. Jerzsele Ákos, egyetemi adjunktus
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék
Tanszékvezető: Dr. Gálfi Péter

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kórtani szerepe az állatgyógyászatban.....	6
2.1.1. Külső hallójárat-gyulladás.....	6
2.1.2. Gennyves bőrgyulladás	7
2.2. A <i>P. aeruginosa</i> planktonikus formájának érzékenysége antibakteriális szerekre.....	7
2.2.1. Aminoglikozidokkal szembeni érzékenység	9
2.2.2. Fluorokinolonokkal szembeni érzékenység.....	10
2.2.3. Polimixinekkal szembeni érzékenység.....	11
2.3. A biofilmek kialakulása.....	13
2.3.1. A <i>P. aeruginosa</i> által képzett biofilmek.....	13
2.3.2. A <i>P. aeruginosa</i> biofilmek antibakteriális szerekkel szembeni érzékenysége	14
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	15
3.1. Felhasznált baktériumtörzsek és anyagok	15
3.2. A <i>P. aeruginosa</i> baktériumtörzsek biofilmképző tulajdonságának meghatározása	15
3.2.1. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálat.....	15
3.2.2 A <i>pelA</i> , <i>pelC</i> és <i>pelE</i> gének kimutatására irányuló PCR-vizsgálat, DNS-izolálást követően	16
3.3. A MIC-értékek meghatározása a planktonikus <i>P. aeruginosa</i> esetében marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin kombinációk vizsgálatakor	17
3.3.1. Törzsoldatok elkészítése.....	17
3.3.2. A MIC-értékek meghatározása marbofloxacin esetében.....	17
3.3.3. A MIC-értékek meghatározása a marbofloxacin-gentamicin és a marbofloxacin-kolisztin kombináció esetén	19
3.3.4. A MIC-értékek leolvasása	19
3.4. A hatóanyagok EC ₅₀ -értékeinek meghatározása biofilmképzéskor marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin kombinációk esetében	21
3.5. Statisztikai Analízis	23
4. EREDMÉNYEK	24
4.1. <i>P. aeruginosa</i> törzsek biofilmképzésének fenotípusos igazolása scanning elektronmikroszkópos módszerrel.....	24
4.2. <i>P. aeruginosa</i> törzsek biofilmképzésének igazolása PCR-módszerrel, <i>pel</i> -gén analízissel	24

4.3. A minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározása a planktonikus <i>P. aeruginosa</i> törzseknél marbofloxacin, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombináció esetében	25
4.4. A hatékony koncentrációk (EC ₅₀) meghatározása a biofilmképző <i>P. aeruginosa</i> törzseknél marbofloxacin, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombináció esetében	28
5. MEGBESZÉLÉS.....	31
5.1. Konklúzió	33
6. ÖSSZEFOGLALÁS	34
7. SUMMARY	35
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	36
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	39
10. FÜGGELÉK.....	40

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CFU	Colony forming units
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EC	Effective concentration, hatékony koncentráció
MH-leves	Müller-Hinton leves
MIC	Minimal inhibitory concentration
MTS	metil-tetrazolium só
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
pel	„pellicle” gén
sad	„surface attachment defective” gén
TBE	TRIS/borát/EDTA

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

A kórokozó baktériumoknak az antibakteriális szerekkel szembeni növekvő rezisztenciája világszerte az egyik legfőbb probléma az orvoslás és a tudomány területén. A rezisztencia kialakulásának mértéke antibiotikumonként és baktériumfajonként eltérő. Manapság az állatorvosok is nagyban elősegítik a jelenség létrejöttét az indokolatlanul, illetve a nem megfelelően kiválasztott, és nem megfelelő ideig adott antibiotikumok használatával, valamint a rezisztencia-vizsgálatok elhanyagolásával. A klinikai gyakorlatban a legnagyobb nehézséget a staphylococcusok, az enterococcusok és a *Pseudomonas aeruginosa* jelentik rezisztenciájuknak és elterjedtségüknek köszönhetően.

A *P. aeruginosa* által okozott kórképek igen gyakoriak és komoly problémát okoznak a humán- és állatgyógyászatban egyaránt. Ilyen betegségek például a húgyúti fertőzések, illetve a bőrgyógyászat területén a külső hallójárat-gyulladás (*otitis externa*) és a gennyes bőrgyulladás (*pyoderma*). A bántalmak kezelése napjainkban egyre nehezebb. A fent említett kórképek ugyanis gyakran hosszú távú antibakteriális terápiát követelnek, mely során rövidebb-hosszabb időn belül csökken az alkalmazott antibiotikum elleni érzékenység, és nagy eséllyel alakul ki rezisztencia a kórokozókban. A *P. aeruginosa*-ra ugyanis gyakran jellemző a multirezisztencia, illetve a humán gyakorlatban kimutattak ún. pánrezisztens törzseket is, amelyek minden eddig ismert antibiotikummal szemben ellenállóak. Másrészről a baktérium rendelkezik azzal a képességgel, hogy biofilmet képezzen, ami nagymértékben csökkenti az antibiotikumokkal szembeni érzékenységét. Az előbbieken felvetett jelenségeket többek között a megfelelő koncentrációjú és kombinációjú antibiotikumok alkalmazásával csökkenthetjük.

Tanulmányunkban Magyarországon gyűjtött, *otitis externa* klinikai tüneteit mutató kutyákból izolált *P. aeruginosa* baktériumtörzsek biofilmet képző, illetve planktonikus formáinak antibiotikum-érzékenységét vizsgáltuk. A kísérletünk során használt hatóanyagok az aminoglikozidok, a polimixinek és a fluorokinolonok csoportjaiból kerültek ki. Az aminoglikozidok közül a gentamicinnel dolgoztunk, mely a leggyakrabban megtalálható hatóanyag az állatgyógyászati fülcseppekben. A polimixinek csoportjából a kolisztin, a fluorokinolonok közül pedig a marbofloxacin hatását vizsgáltuk. Kutatásunk egyik célja az volt, hogy felmérjük a planktonikus baktériumtörzsek elleni minimális gátló koncentráció- (MIC, MIC₅₀, MIC₉₀) értékeket marbofoxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin kombinációk esetében. Vizsgáltuk továbbá a biofilmképző *P. aeruginosa*

baktériumtörzsek érzékenységét vitális festéssel (MTS-formazán) fotometriás meghatározással. Ezenfelül kétféle módszer segítségével alátámasztottuk a baktériumtörzsek biofilmképző tulajdonságát. Pásztázó (scanning) elektronmikroszkóppal (Zeiss EvoMA10) készült felvételek által morfológiai szempontból figyeltük meg az izolátumok biofilmképzését. Egy molekuláris biológiai technológiát, a kvalitatív polimeráz-láncreakciót (PCR) alkalmazva pedig génszinten (*pelA*, *pelB*, *pelE*) elemeztük a törzsek biofilmképző adottságát.

Tanulmányunk fő célkitűzése a két forma közti eltérő érzékenység vizsgálata volt, amelynek eredménye egy lépéssel közelebb vihet ahhoz, hogy háziállataink külső hallójárat-gyulladásainak kezelésekor a megfelelő koncentrációjú antibiotikumot alkalmazzuk biofilmképzés esetén, elkerülve így a rezisztencia kialakulását.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Pseudomonas aeruginosa* kórtani szerepe az állatgyógyászatban

A *P. aeruginosa* Gram-negatív, obligát aerob, pálcika alakú baktérium. Igénytelenségének köszönhetően széles körben elterjedt. Jelen van a talajban, a természetes vizekben, szennyvizekben, növényzeten, gerinces fajok bélcsatornájában, valamint a bőrön is. Az állatokon felül az embert is megbetegíteni képes fakultatív patogén mikroba (TUBOLY, et al., 1998). A humán gyógyászatban fontos opportunist, nozokómiális kórokozó. Az állatgyógyászatban főként kutyákban okoz gyakran külső hallójárat-gyulladást (*otitis externát*), gennyes bőrgyulladást (*pyodermát*), légúti- és húgyúti fertőzéseket (LIN, et al., 2012).

2.1.1. Külső hallójárat-gyulladás

A külső hallójárat-gyulladás igen gyakori kórforma kutyákban, egyes felmérések szerint az egyik leggyakoribb ok, ami miatt az állattartók az állatorvos útmutatását kéri (SWANTON, et al., 2010). Egy amerikai kutatás szerint az állatorvosok által vizsgált kutyák 10-20%-ánál diagnosztizálhatók fülbetegségek (SCOTT, et al., 2001). Előfordulása nőstény és hím kutyákban nem mutat eltérést, három és hat év közötti egyedekben kissé gyakoribb. Egyes fajták anatómiai adottságai hajlamosíthatnak a külső hallójárat-gyulladás kialakulására, ilyenek például a shar-pei, spániel és a németjuhász (HARVEY, et al., 2005).

A betegség összetett kóroktannal rendelkezik. A háttérben álló okokból egy triád rendszert alkottak. Elsődleges tényezők, úgy mint ektoparaziták, idegen testek, daganat, polip, immunmediált rendellenességek önállóan is képesek kialakítani a betegséget. A hajlamosító tényezők a környezeti paraméterek megváltoztatása révén növelik a kialakulás esélyét (lógó fül, szűkület, szőr, víz a hallójáratban, hőmérséklet, középfül-gyulladás), míg a fenntartó tényezők (baktériumok, középfül-gyulladás, gyógyszerek, hyperplasia) a gyulladást képesek súlyosbítani (AUGUST, 1988).

A külső hallójárat-gyulladás legjellemzőbb tünetei a bőrpír, a duzzanat, a változó fülváladékozás és ezek hatására kialakuló diszkomfort érzet. Az említett tényezők károsítják a hallójárat természetes védekezőrendszerét is (SANDER, et al., 2001). A *P. aeruginosa* nagy mennyiségű gennyes, bűzös váladékkal jellemezhető fájdalmas külső hallójárat-gyulladást, ún. szuppuratív *otitis externát* okoz (KISS, et al., 1997).

A bőrhez hasonlóan a külső hallójárat is rendelkezik normál rezidens flórával, amely főként Gram-pozitív baktériumokból áll (staphylococcusok, streptococcusok). Külső hallójárat-gyulladás esetén azonban minőségi és mennyiségi változások történnek. Többszörösére nő a baktériumok száma, és nagy számban megjelennek a *Proteus* és a *Pseudomonas* nemzetség tagjai (HARVEY, et al., 2005). Egy amerikai kutatás szerint az 1992 és 1997 között vizsgált kutyák fülmintáinak 27,8%-ából izolálható *P. aeruginosa*. Egy későbbi felmérés eredménye alapján alacsonyabb, 11,1%-os arány mutatható ki (LIN, et al., 2012).

2.1.2. Gennyes bőrgyulladás

Kutyák és macskák bőrgyulladása esetén az elsődleges kórokozók (staphylo- és streptococcusok) kívül gyakran egyéb patogének is okoznak megbetegedést. Ezek általában Gram-negatív pálcák, elsősorban *P. aeruginosa* és *E. coli* (LILLENBAUM, et al., 2000). A pyodermában szenvedő kutyák mintáinak 30%-ából mutattak ki Gram-negatív kórokozókat (KROGH és KRISTENSEN, 1981). Egy hat éven át tartó kutatásban kutyák bőréből vett minták 7,5%-ából izoláltak *P. aeruginosát*, de a gyakoriság évről-évre emelkedett a megjelenő multirezisztens baktériumtörzsek következtében (PETERSEN, et al., 2002).

A *P. aeruginosa* által okozott gennyes bőrgyulladás két megjelenési formáját különböztetjük meg. A heveny, mély *pyoderma*, melyre jellemző a hirtelen kialakuló fájdalom és a látható fekélyek, hólyagok, pusztulák jelenléte. A krónikus forma esetében a háttérben bőr, fül és egyéb szisztémás betegség áll, mely a fokozatosan kialakuló bőrsérülések megjelenésével jellemezhető (HILLIER, et al., 2006).

2.2. A *P. aeruginosa* planktonikus formájának érzékenysége antibakteriális szerekre

A *P. aeruginosa* azon kórokozók egyike az állatgyógyászatban, amely számos antibiotikummal szemben rezisztens. Ez olyan egyedi tényezőknek köszönhető, mint például a sejtfal külső membránjának alacsony áteresztőképessége, az efflux pumpák túltermelése, számos β -laktamáz enzim expressziója és mutációk (DNA-giráz, topoisoméráz IV.) a genomban (LIN, et al., 2012).

Egy amerikai felmérésben 106 *P. aeruginosa* törzs érzékenységét vizsgálták, amelyek *otitis externa* és *pyoderma* tüneteit mutató kutyákból kerültek izolálásra 2003 és 2006 között (RUBIN, et al., 2008). A vizsgálatban 32 hatóanyagot vizsgáltak, eredményeik az 1. táblázatban láthatók.

1. táblázat. Rezisztens *P. aeruginosa* törzsek száma (%) a vizsgált hatóanyagokkal szemben (RUBIN, et al., 2008).

β-laktámok	
ampicillin, cefoxitin, cefpodoxim, cefalotin, cefazolin	100
amoxicillin/klavulánsav	99
ceftiofur	97
ceftriaxon	39
cefotaxim	26
cefotaxim/klavulánsav	20
ceftazidim/klavulánsav, ceftazidim, piperacillin/tazobaktam vagy cefepim	<7
karbapemenek	1,9
Kinolonok, fluorokinolonok	
nalidix sav	96
orbifloxacin	52
difloxacin	43
enrofloxacin	31
marbofloxacin	27
gatifloxacin	23
levofloxacin	21
ciprofloxacin	16
Aminoglikozidok	
kanamicin	90
sztreptomicin	69
gentamicin	7
amikacin	3
Klóramfenikol	
	100
Tetraciklinek	
	98
Trimetoprim/szulfametoxazol	
	57

A *P. aeruginosa*ra jellemző multirezisztencia (három vagy több antibiotikumra rezisztens) mellett izoláltak pánrezisztens törzseket is a humán gyógyászatban, amelyek ellen az eddig ismert összes antibakteriális szer hatástalan (SOULI, et al., 2008).

A *P. aeruginosa* által kiváltott fertőzések esetén leggyakrabban használatos hatóanyagok az állatgyógyászatban az aminoglikozidok (tobramicin, amikacin, gentamicin), a fluorokinolonok (ciprofloxacin, marbofloxacin és enrofloxacin), a polimixinek (polimixin-B és a polimixin-E, másnéven kolisztin), továbbá a *Pseudomonas*-ellenes β-laktámok (pl. piperacillin, ceftazidim) (GÁLFI, et al., 2012).

2.2.1. Aminoglikozidokkal szembeni érzékenység

Az aminoglikozidok gyakran használatos baktériumellenes szerek a humán- és állatgyógyászatban egyaránt. Hatásmechanizmusuk alapja a fehérjeszintézis gátlása a 30S riboszóma alegységen. Főként Gram-negatív aerob kórokozók és staphylococcusok ellen hatékonyak. *P. aeruginosa* ellen a tobramicin és az amikacin kifejezetten, a gentamicin mérsékelten hatékony. A szintén hatékony netilmicint az állatorvoslásban nem alkalmazzák. Az egyéb aminoglikozidok (neomicin, spektinomycin, kanamicin stb.) általában hatástalanok (GÁLFI, et al., 2012).

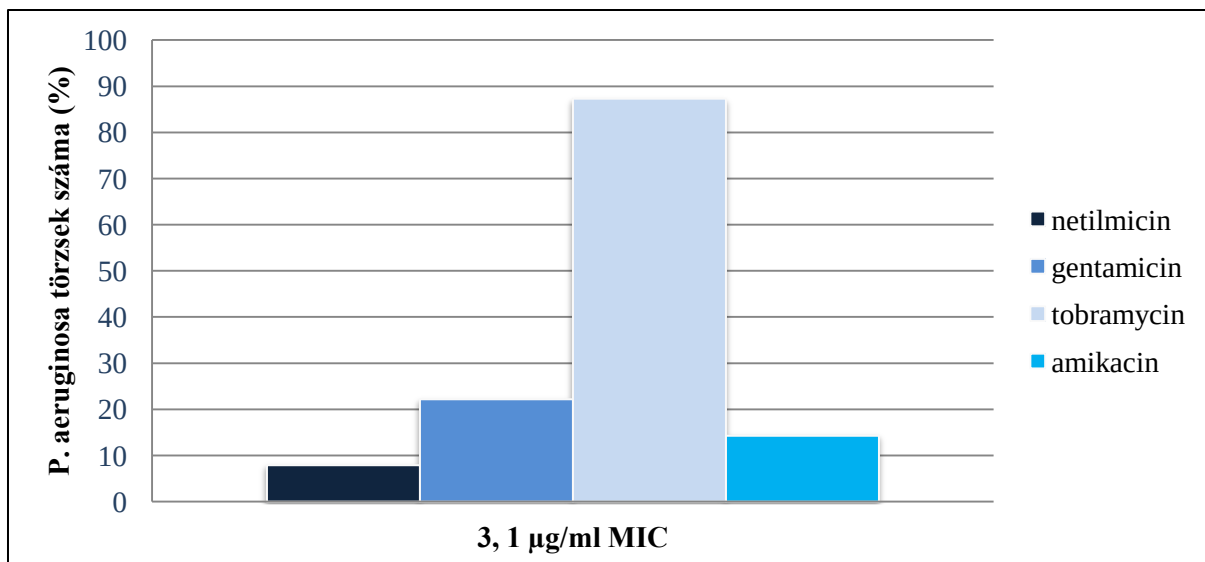
Az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia forrása a bakteriális enzimek működése, például a foszfortranszferáz, acetiltranszferáz, adenil-transzferáz aktivitása. Legalább 11 enzim rendelkezik azzal a képességgel, hogy hatástalanítja a gentamicin hidroxil-, vagy amino csoportját, megakadályozva a riboszómához való kötődését. A riboszóma 30S alegysége is képes mutálódni, de mivel az alegység több kötőhellyel is rendelkezik, ez a mechanizmus elhanyagolható jelentőséggel bír (GIGUERE, et al., 2006).

Egy kutatás során 130 *P. aeruginosa* törzs érzékenységét vizsgálták aminoglikozid ellen (KLUGE, et al., 1974), melynek eredményeit a 2. táblázat foglalja össze. A táblázatból kitűnik, hogy a tobramicin hatékonyabb, mint a gentamicin, míg az amikacin csak nagyobb koncentrációban hatékony a kórokozó ellen (dózisa nagyobb).

2. táblázat. Aminoglikozidok megadott MIC-értékeire (µg/ml) reagáló *P. aeruginosa* törzsek száma (n=130) (KLUGE, et al., 1974).

	≤5 µg/ml	10-40 µg/ml	≥80 µg/ml
gentamicin	97	15	18
tobramicin	116	0	14
amikacin	73	57	0

Egy 1976-ban készült felmérésben 63 *P. aeruginosa* törzs aminoglikozid antibiotikumok elleni érzékenységét tanulmányozták (BRIEDIS, et al., 1976). Az 1. ábra alapján a vizsgált hatóanyagok növekvő hatékonyság szerint a következők: netilmicin, amikacin, gentamicin, tobramicin.



1. ábra. Érzékeny *P. aeruginosa* törzsek száma (%) a hatóanyagok adott MIC (3,1 µg/ml) értékére (BRIEDIS, et al., 1976).

2.2.2. Fluorokinolonokkal szembeni érzékenység

A fluorokinolonok széles hatásspektrummal és kedvező farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkező antibakteriális szerek. Baktériumellenes hatásukat a DNS-giráz enzim gátlásán keresztül fejtik ki. Antibakteriális spektrumuk magába foglalja a legtöbb patogén Gram-negatív és a fő Gram-pozitív baktériumokat, valamint a mycoplasmákat. Kutya- és macskákban *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*, *Pasteurella* és *Staphylococcus* fajok okozta légzőszervi, emésztőszervi, húgyúti fertőzések kezelésére használják ezeket a szereket (MÜLLER és HORN, 2009).

A *P. aeruginosa* ellen a leghatékonyabb vegyület a ciprofloxacin, szorosan ezt követi a marbofloxacin, majd az enrofloxacin. A legkevésbé hatásos a fülcseppek alkotójaként ismert orbifloxacin (GÁLFI, et al., 2012). Egy kutatás során 54 *P. aeruginosa* törzs érzékenységét vizsgálták fluorokinolonok ellen (TEJEDOR, et al., 2003). Eredményeik a 3. táblázatban láthatók.

3. táblázat. Fluorokinolonok MIC₅₀ és MIC₉₀ értékei (µg/ml) 54 *P. aeruginosa* izolátum esetén (TEJEDOR, et al., 2003).

	Ciprofloxacin	Enrofloxacin	Marbofloxacin	Difloxacin	Danofloxacin
MIC ₅₀	0,125	1	0,5	1	0,5
MIC ₉₀	2	8	4	32	4

Egy 2009-ben készült felmérésben 7118, kutyából és macskából izolált baktérium érzékenységi vizsgálatát végezték el enrofloxacinra és marbofloxacinra. Kutyák esetében 288 *P. aeruginosa* törzset mutattak ki, melyek érzékenyebbek voltak marbofloxacinra, mint enrofloxacinra. A mikrobák 43%-a volt érzékeny, 22%-a mérsékelten érzékeny, 34%-a rezisztens enrofloxacinra, míg marbofloxacin esetében 60% volt érzékeny, 15% mérsékelten érzékeny, 25% rezisztens (MÜLLER és HORN, 2009). Eredményeiket a 4. táblázat mutatja be.

4. táblázat. Enrofloxacin és marbofloxacin hatékonysága kutyából származó *P. aeruginosa* törzseken, n=288 (MÜLLER és HORN, 2009).

Enrofloxacin			Marbofloxacin		
Érzékeny (%)	Mérsékelten érzékeny (%)	Rezisztens (%)	Érzékeny (%)	Mérsékelten érzékeny (%)	Rezisztens (%)
43	22	34	60	15	25

2.2.3. Polimixinekkal szembeni érzékenység

A polimixinek a polipeptidek csoportjába tartozó antibiotikumok, melyeket a *Bacillus polymixa* baktériumfaj termel. Kémiaailag két részből állnak, egy ciklikus polipeptid- és egy hidrofób farki részből. Utóbbi felelős az antibakteriális hatásért. A humán- és állatgyógyászat területén kiemelkedő jelentőséggel bír a polimixin-B és a polimixin-E (kolisztin). Károsítják a baktériumok külső lipopoliszacharid-rétegét a foszfolipid elrendeződés megváltoztatása révén, melynek következtében nő a sejtfal áteresztőképessége. Hatásmechanizmusuknak köszönhetően csak a lipopoliszachariddal rendelkező Gram-negatív baktériumok ellen hatásosak. Kiemelkedő szerepük van a *P. aeruginosa*, *E. coli* és salmonellák okozta kórképek gyógykezelésében (GÁLFI, et al., 2012).

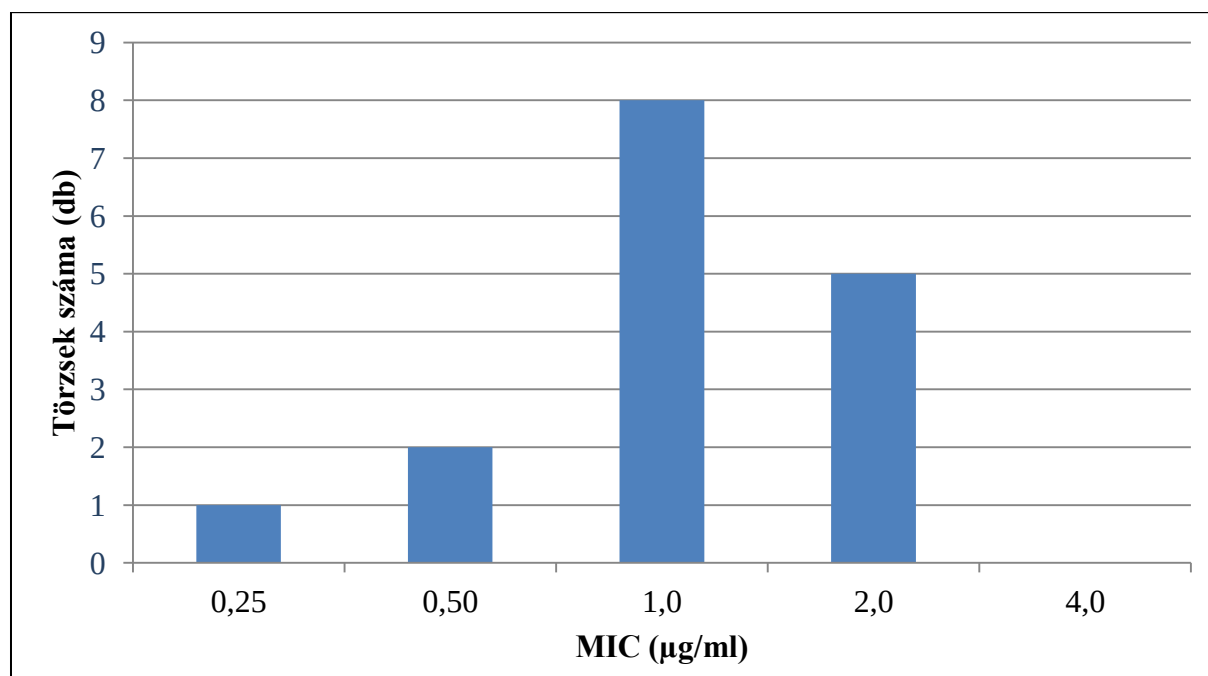
A kolisztin *in vitro* aktivitására irányuló kutatások szerint nagy hatékonysággal rendelkezik a multirezisztens *P. aeruginosa* törzsek ellen. Egy török kutatócsoport számos, nem hagyományos antibakteriális szer hatékonyságát vizsgálta multirezisztens *P. aeruginosa* és *Acinetobacter baumannii* törzsek ellen, előbbi esetében a kolisztinre megállapított érzékenységi arány 89% (TIMURKAYNAK, et al., 2006). Eredményeiket az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat. A kolisztin minimális gátló koncentráció-értékei (MIC) a vizsgált multirezisztens *P. aeruginosa* törzsekből (n=35) véletlenszerűen kiválasztott 5 izolátum esetében (TIMURKAYNAK, et al., 2006).

<i>P. aeruginosa</i> törzs azonosítószáma	MIC-érték (mg/L)
114	4
144	2
108	4
205	2
166	4

Egy kutatás során 54731 Gram-negatív baktériumot izoláltak világszerte 2001 és 2004 között, melyek érzékenységét vizsgálták polimixin-B-re. A törzsek között 8705 *P. aeruginosa* mikróbát mutattak ki, az ezekre jellemző MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek $\leq 1\mu\text{g/ml}$ és $2\mu\text{g/ml}$ voltak (GALES, et al., 2006).

Egy 2003-ban készült felmérés során multirezisztens *P. aeruginosa* törzsek érzékenységét vizsgálták kolisztinre (LINDEN, et al., 2003). Eredményeiket a 2. ábra foglalja össze.



2. ábra. Kolistin MIC-értékei (µg/ml) *P. aeruginosa* törzsek esetében (LINDEN, et al., 2003).

2.3. A biofilmek kialakulása

A biofilm a mikroorganizmusok felülethez kapcsolódó egyszerű közössége. A biofilm képzésekor a mikrobák jelentős változásokon mennek keresztül, így a planktonikus formától morfológiailag és élettanilag is különböznek (DAVIES, et al., 1998).

Az első feljegyzett megfigyelés a biofilmek létezéséről Henrici nevéhez fűződött 1933-ban. Megállapítása szerint a vízben élő baktériumok többsége nem magányosan úszó szervezet. Habár a biofilmképzés ismert és tudományosan dokumentált közel száz éve, a folyamat megértése molekuláris szinten még csak most kezdődött. A biofilmek tartalmazhatnak egy mikrobiális fajt vagy több fajt egyszerre, és ezek egyaránt kapcsolódhatnak élő vagy élettelen felszínnekhez. A környezetben rendszerint a több faj alkotta biofilmek dominálnak, de az orvosi implantátumok felületén és a különféle fertőzések során az egyetlen fajt tartalmazó biofilmek vannak főként jelen (O'TOOLE, et al., 2000).

Egyes baktériumok rendelkeznek a lokális sűrűség-érzékelés (*quorum sensing*) képességével, ami a populáció-sűrűséggel kapcsolatban lévő inger-válasz rendszer. Egy adott lokális bakteriális küszöbsűrűség (quorum) felett a baktériumok génexpressziója jelentős változásokon megy át, illetve a küszöbsűrűséget meghaladó számú baktériumok biofilmet képezhetnek. A biofilmképzés az antibiotikumokkal szemben akár több ezerszeres hatékonyság-csökkenést eredményezhet (GÁLFI, et al., 2012).

2.3.1. A *P. aeruginosa* által képzett biofilmek

A *P. aeruginosa* a leggyakrabban vizsgált, biofilmet képző Gram-negatív baktérium. Fáziskontraszt mikroszkóp segítségével bebizonyosodott, hogy a *P. aeruginosa* esetében a sejtfelszíni struktúráknak, mint az ostornak és a IV-es típusú csillónak nagyon fontos szerepe van a biofilmképzés korai szakaszában. Emellett nagy jelentőségük van különböző élő és élettelen felületekhez való kötődésében (O'TOOLE, et al., 2000).

A *P. aeruginosa* nagy genommal rendelkező baktérium, amely több, mint 5500 gént tartalmaz. A biofilmképzéssel a gének nagyrésze kapcsolatba hozható. A *sad* (surface attachment defective, felületi kapcsolódásra képtelen) mutánsoknál a *sad* csoportban lévő gének egyike hiányzik. A *sadB* gén kifejeződése fontos szerepet tölt be a biofilmképzés reverzibilis és irreverzibilis fázisa közötti átmenetben. A biofilmképzés kulcsfontosságú lépése a szénhidrát-szintézis, amelyben a *pel* gén funkciója kiemelkedő. A *quorum sensing* rendszerben dokumentáltak még két olyan gént (*lasB*, *rhlA*), amelyek bizonyítottan hozzájárulnak a baktériumok közösségének kialakulásában (PYE, et al., 2013).

Egy 2013-ban készült kutatás során az előbb említett gének jelenlétét vizsgálták külső hallójárat-gyulladásban szenvedő kutyákból izolált 83 *P. aeruginosa* törzs esetében. Az összes izolátum rendelkezett *lasB* és *sadB* génnel, míg *pelA* és *rhlA* gént csak 72 birtokolt. A 83 törzs 40%-a képzett biofilmet a kutatás során, melyek mindegyike tartalmazta a négyféle gént. Ezek alapján megállapították, hogy a genetika kulcsfontosságú szerepet játszik a biofilmképzésben (PYE, et al., 2013).

A PA14 *P. aeruginosa* mutáns analízise során hét szomszédos gént azonosítottak, a *pel* géneket, melyek bizonyítottan fontos szerepet játszanak a *pellicle* extracelluláris mátrix képzésben. A *pellicle* a *P. aeruginosa* által képzett biofilm forma, mely a levegő-folyadék határfelületen képződik (FRIEDMAN és KOLTER, 2004).

2.3.2. A *P. aeruginosa* biofilmek antibakteriális szerekekkel szembeni érzékenysége

A *P. aeruginosa* számos állati szöveten, növényen és belső felületen képes csoportosan megtelepedni, biofilmet képezni, így megnövelve a környezettel szembeni – beleértve az antibiotikumokkal szembeni – ellenállóképességét. Krónikus fertőzéseknel emiatt a biofilmek jelenlétének köszönhetően a beteg gyakran nem reagál az antibakteriális terápiára (BOYEN, et al., 2009). A biofilmet képező baktériumok a planktonikus formánál jóval ellenállóbbak mind az immunrendszerrel, mind az antibakteriális szerekekkel szemben. A legtöbb antibiotikummal szembeni érzékenység 50-2000-szeresével is csökkenhet (BANIN, et al., 2006).

Egy 2013-ban készült felmérés során kutyák füléből izolált biofilmképző *P. aeruginosa* törzsek MIC-értékeit határozták meg bizonyos antibiotikumokra és összehasonlították a planktonikus forma MIC-értékeivel. A biofilmbe ágyazott baktériumok érzékenysége szignifikánsan nagyobb volt a planktonikus formánál az összes vizsgált antibakteriális szerrel szemben (PYE, et al., 2013). A kapott értékeket a 6. táblázat mutatja be.

6. táblázat. A MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek összehasonlítása a vizsgált 33 *P. aeruginosa* planktonikus és a biofilmet képző formájának esetében (PYE, et al., 2013).

Antibiotikum	MIC ₅₀ (µg/ml)		MIC ₉₀ (µg/ml)	
	Planktonikus	Biofilm	Planktonikus	Biofilm
Enrofloxacin	1	8	8	16
Gentamicin	4	16	8	128
Polimixin-B	4	64	64	256
Neomicin	64	128	128	256

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Felhasznált baktériumtörzsek és anyagok

A 24 vizsgált *P. aeruginosa* baktériumtörzs a Duo-Bakt Kft. mikrobiológiai laboratóriumából (Budapest), a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékéről, valamint a Gyógyszertani és Méregtani Tanszékéről származik. A felhasznált törzseket Magyarországon izolálták külső hallójárat-gyulladás klinikai tüneteit mutató kutyákból. A kísérlet megkezdése előtt a baktériumtörzsek rövidtávú tárolása 4 °C-on, Müller-Hinton ferde agaron történt. Ezt követően a baktériumokat folyékony Müller-Hinton levesben felszaporítottuk, 18 órán át tartó 37 °C-on történő inkubálás során. A beoltáshoz 10^5 CFU/ml (colony forming unit) sűrűségű szuszpenziót használtunk. A szuszpenzió baktériumszámát agarra való szélesztéssel és a telepek megszámlálásával ellenőriztük. A felhasznált táptalajok beszerzése a Biolab Zrt.-től (Budapest, Magyarország) történt.

3.2. A *P. aeruginosa* baktériumtörzsek biofilmképző tulajdonságának meghatározása

3.2.1. Scanning elektronmikroszkópos vizsgálat

Első lépésben a biofilmet képző *P. aeruginosa* törzseket előkészítettük a scanning elektronmikroszkópos vizsgálatához. A mintákat alkohollal fixáltuk. A folyamat során a preparátumokat öt percen keresztül áztattuk etil-alkoholban, majd megszárítottuk azokat. Ezt az eljárást ötször megismételtük, mely során lépésenként növeltük az alkohol töménységét (20%, 40%, 50%, 70%, 90%). A preparátumot ezután arannyal vontuk be. Az előkészítés után a vizsgálatokat ZEISS EVO MA10 scanning elektronmikroszkóppal végeztük, a felvételek secunder elektronokkal készültek. Az elkészült fotók közül kettőt az Eredmények c. fejezetben mutatunk be.

3.2.2 A *pelA*, *pelC* és *pelE* gének kimutatására irányuló PCR-vizsgálat, DNS-izolálást követően

A genomi bakteriális DNS-t 12 órás *P. aeruginosa* baktériumtenyészetből vontuk ki, az E.Z.N.A. bacterial DNS kit (OMEGA Bio-Tek, Norcross, USA) segítségével, a centrifugáláson alapuló protokollt alkalmazva, a gyártó utasításainak megfelelően. A kivont DNS koncentrációját a NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) segítségével határoztuk meg. A nukleinsavak elnyelési maximuma 260 nm-en van, a NanoDrop programja az ezen a hullámhosszon mért abszorbancia segítségével számolja ki a DNS mennyiségét, úgy, hogy a kapott abszorbancia értéket 50 µg/ml-rel megszorozza, és így adja meg a DNS koncentrációját µg/ml-ben.

A PCR-t (polimeráz láncreakciót) a MiniOpticon PCR-készülékkel (BioRad, Hercules, CA, USA) végeztük, amelyhez az 5PRIME HotMasterMix-et (5PRIME GmbH, Hamburg, Germany) használtuk, melyet a gyártó előírásai szerint alkalmaztunk. A reakció során használt primerek az 7. táblázatban szerepelnek. A reakció hőprofilja a következő volt: 2 perc 95 °C-on, majd 30 ciklus; 20 másodperc 95 °C-on, 20 másodperc 54 °C-on és 1 perc 65 °C-on. A PCR terméket agaróz gélben megfuttattuk, melyhez 2 %-os agaróz gél használtunk. 1 µl töltőpuffert 5 µl PCR termékkel összekeverve az agaróz gél zsebeibe töltöttük. A gélbe, a minták melletti zsebbe 2 µl molekulasúly markert (O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, Fermentas) töltöttünk. Az elektroforézist 80 V feszültségen végeztük, 25 percig, 1x TBE (TRIS/borát/EDTA) futtató pufferben. A kialakult sávokat az InGenius LHR Gel Documentation and Analysis System segítségével tettük láthatóvá.

7. táblázat. A *pelA*, *pelC* és *pelE* gének meghatározásához használt primerek.

Gén	NCBI azonosító szám	Primer szekvenciák	PCR termék mérete (bp)
<i>pelA</i>	YP_790107.1	F 5'-CAGCAAGAAAGGAATCGCCG-3' R 5'-GACCGACAGATAGGCGAAGG-3'	289
<i>pelC</i>	YP_790109.1	F 5'-GCCGCTGCTCAATTATTCCC-3' R 5'-TCGAGGCCGTTCTTGTACTG-3'	240
<i>pelE</i>	YP_790111.1	F 5'-TGGTACTGGGAAGTGGCCTA-3' R 5'-ACTATCGATTCCCGCCTCCT-3'	210

3.3. A MIC-értékek meghatározása a planktonikus *P. aeruginosa* esetében marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin kombinációk vizsgálatakor

A MIC-értékek *in vitro* meghatározásához mikrodilúciós módszert (microbroth dilution) alkalmaztunk, amely megfelel a CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) M31-A3/2009 és M07-A8 irányelveinek.

3.3.1. Törzsoldatok elkészítése

A marbofloxacin 1600 µg/ml-es koncentrációjú törzsoldatát 16,1 mg marbofloxacin (Menovo Pharmaceutical Co. Ltd., Zhejiang, China; hatóanyagtartalom 99,3%) 10 ml steril desztillált vízben való feloldásával készítettük el. Az 1600 µg/ml-es koncentrációjú gentamicin törzsoldat elkészítéséhez 17,9 mg gentamicin-szulfátot (Menovo Pharmaceutical Co. Ltd., Zhejiang, China; hatóanyagtartalom 89,5%) használtunk fel 10 ml steril desztillált vízhez. A kolisztin törzsoldat szintén 1600 µg/ml-es koncentrációjú volt, ebben az esetben 18,5 mg kolisztint (Menovo Pharmaceutical Co. Ltd., Zhejiang, China; hatóanyagtartalom 86,4%) oldottunk fel 10 ml steril desztillált vízben. Az elkészítések után a törzsoldatokat 0,22 µm membránszűrőn szűrtük át.

3.3.2. A MIC-értékek meghatározása marbofloxacin esetében

A MIC-értékek meghatározásához a hígítási sorokat 96 lyukú tenyésztőedényekben készítettük el. Ehhez először a törzsoldatokból munkaoldatokat állítottunk elő a kettes hígítás szabályai szerint. Az elkészített koncentrációjú oldatokból ezután már csak azonos mennyiséget kellett bemérnünk a kísérleti oldatokba, amelyekben tanulmányozhattuk a baktériumok növekedését. A baktérium-szuszpenziókból minden esetben azonos mennyiséget (l. később) pipettáztunk a kísérleti oldatokba. Minden vizsgált antibiotikum, illetve kombináció esetében ez alapján jártunk el.

Ahhoz, hogy megkapjuk a munkaoldatokat, hígítási sort készítettünk a törzsoldatból egy 96 lyukú tenyésztőedényben. Az első oszlopba 40 µl törzsoldatot (1600 µg/ml) pipettáztunk, ehhez 160 µl Müller Hinton levest mértünk be, így 320 µg/ml-es koncentrációt kaptunk. Ebből az oszlopból azután 100 µl-t pipettáztunk a következő oszlopba 100 µl MH-leveshez, a kettes hígítás szabályainak megfelelően. A hígítást a többi oszlopban hasonlóan folytattuk így 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg/ml-es koncentrációkat kaptunk az első tíz oszlopban. A hígítási sort a 8. táblázat szemlélteti.

8. táblázat. A marbofloxacin koncentrációja (µg/ml) a munkaoldatok esetében a 96 lyukú tenyésztőedényben *P. aeruginosa* vizsgálatakor.

320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			1.
320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			2.
320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			3.
320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			4.
320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			5.
320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			6.
320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			7.
320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625			8.
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	

Ezt a munkaoldatot használtuk fel, és készítettük el a kísérleti oldatokat. Oszlopról oszlopra haladva 15 µl-et mértünk át a munkaoldatokból a következő tenyésztőedénybe, majd hozzáadtunk 120 µl Müller Hinton levest. Ezután egységesen 15 µl-t adtunk hozzá az elegyhez a baktérium szuszpenziókból, egy sorban egy törzset felhasználva. Így a kísérleti oldatok esetében a következő koncentrációkat kaptuk: 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 µg/ml az első tíz oszlopban. A 11. oszlopban a pozitív kontrollt készítettük el, MH-leves és az adott baktériumtörzs bemérésével, de antibiotikum bemérése nélkül. A 12. oszlop szolgált negatív kontrollként, ezek a lyukak antibiotikum- és baktérium-mentes MH-levest tartalmaztak. A kísérleti oldatok koncentrációit a 9. táblázatban tüntettük fel. Az elkészült 96 lyukú tenyésztőedényeket 16 órára 37°C-os termosztátba helyeztük.

9. táblázat. A marbofloxacin koncentrációja (µg/ml) a kísérleti oldatok esetében a 96 lyukú tenyésztőedényben *P. aeruginosa* vizsgálatakor. A 11. illetve 12. oszlopban a pozitív és negatív kontroll látható.

32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	1.
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	2.
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	3.
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	4.
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	5.
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	6.
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	7.
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-	8.
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	

3.3.3. A MIC-értékek meghatározása a marbofloxacin-gentamicin és a marbofloxacin-kolisztin kombináció esetén

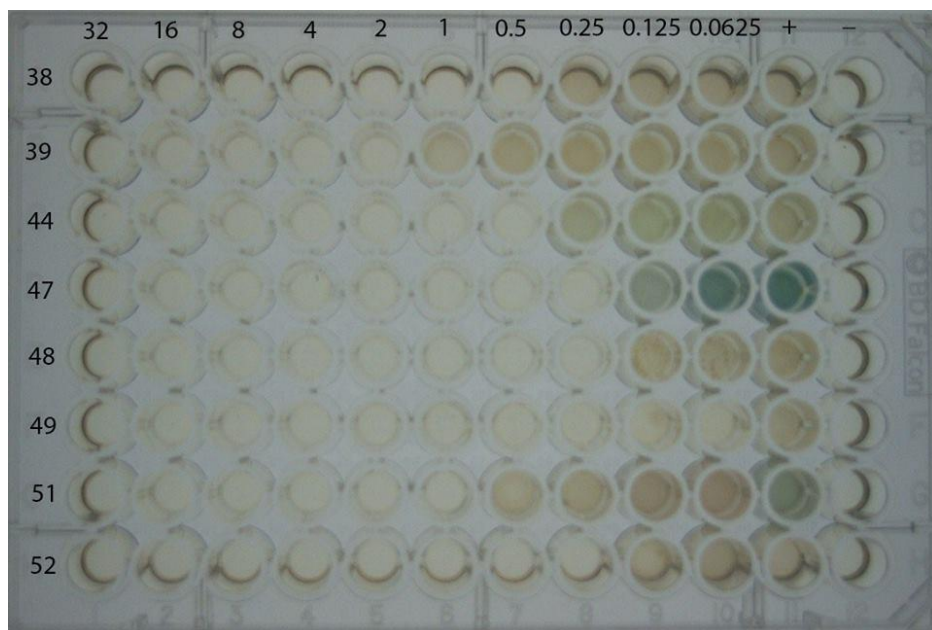
A kombinációk esetében is 96 lyukú tenyésztőedényeket használtunk. A munkaoldatokat tartalmazó tenyésztőedényben marbofloxacin-gentamicin kombináció vizsgálatakor mind marbofloxacinból és gentamicinből, marbofloxacin-kolisztin kombináció használatakor mind marbofloxacinból és kolisztinből 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 és 0,625 µg/ml voltak a beállított koncentrációk. A munkaoldatok elkészítésénél a törzsoldatokból (mindkettő 1600 µg/ml) 40-40 µl-t mértünk be, és ezt 160 µl MH-levelessel hígítottuk. Egy lyukban tehát mind a két hatóanyag szerepelt, ugyanabban a koncentrációban. A munkaoldatok felhasználásával a korábbiakhoz hasonlóan 10-es alapú hígítással készítettük el a kísérleti oldatokat 15µl munkaoldat, 15 µl baktérium-szuszpenzió és 120 µl MH-leves összemérésével. A kísérleti oldatokat tartalmazó tenyésztőedényben található gentamicin, kolisztin és marbofloxacin koncentrációkat a 10. táblázat szemlélteti. A 11. és 12. oszlop a korábbiakhoz hasonlóan a pozitív és a negatív kontroll szerepét töltötte be.

10. táblázat. A gentamicin és marbofloxacin, illetve a kolisztin és marbofloxacin 1:1 arányú kombinációját tartalmazó tenyésztőedényben a két hatóanyag koncentrációi µg/ml-ben. Egy sor egy baktériumtörzs vizsgálatára alkalmas.

32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	1.
32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	2.
32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	3.
32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	4.
32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	5.
32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	6.
32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	7.
32+32	16+16	8+8	4+4	2+2	1+1	0,5+0,5	0,25+0,25	0,125+0,125	0,0625+0,0625	+	-	8.
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	

3.3.4. A MIC-értékek leolvasása

A tenyésztőedényekben 37 °C-on, 24 órás inkubációt követően szabad szemmel vizsgáltuk a baktériumok szaporodását. Amennyiben az adott antibiotikum-koncentrációnál nem szaporodott a baktérium, abban a lyukban a kísérleti oldat víztiszta maradt, míg növekedés esetén zavarossá vált (l. 3. ábra). A zavarosság foka arányos volt a mikroorganizmus szaporodásának mértékével.



3. ábra. A kísérlet során készített saját kép, mely a *P. aeruginosa* törzsek (38-52) növekedési intenzitását mutatja be egy tenyésztőedényben, különböző marbofloxacin koncentráción (µg/ml), melyet a felső vízszintes sor jelöl, az utolsó oszlopokban pedig a pozitív (+), illetve a negatív (-) kontroll látható.

A leolvasott eredményekből táblázatokat szerkesztettünk (l. Függelék 21., 22., 23. táblázat), melyekből példát az alábbiakban mutatunk be (l. 11., 12., 13. táblázat). Az eredmények értékelésénél a kifejezett (+++), mérsékelt (++) és enyhe (+) zavarosodást, vagy pedig a zavarosodás hiányát (-) jegyeztük le, és ez alapján határoztuk meg a MIC-értékeket. A **minimális gátló koncentráció** (MIC) az a legkisebb vizsgált antibiotikum koncentráció, mely az adott kórokozó már nem képes szaporodni. A **MIC₅₀** az az antibiotikum koncentráció, mely az adott kórokozó törzsek 50%-át gátolja a növekedésben, a **MIC₉₀** pedig a törzsek 90%-át.

11. táblázat. *P. aeruginosa* növekedési intenzitása különböző marbofloxacin koncentrációk (µg/ml) esetén. Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve negatív kontroll látható.

<i>P.aeruginosa</i> törzsek	Marbofloxacin koncentrációk (µg/ml)										+	-
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625		
29	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
30	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
31	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
32	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
33	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
34	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
35	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	-

12. táblázat. *P. aeruginosa* növekedési intenzitása marbofloxacin:gentamicin 1:1 arányú kombinációjának különböző koncentrációi (µg/ml) esetén. Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve negatív kontroll látható.

<i>P.aeruginosa</i> törzsek	Marbofloxacin:gentamicin koncentrációk (µg/ml)											+	-
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625			
29	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
32	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
33	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
34	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-
35	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-
37	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	-

13. táblázat. *P. aeruginosa* növekedési intenzitása marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációjának különböző koncentrációi (µg/ml) esetén. Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve negatív kontroll látható.

<i>P.aeruginosa</i> törzsek	Marbofloxacin:kolisztin koncentrációk (µg/ml)											+	-
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625			
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++	-
33	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+++	+++	-
34	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	++	-
35	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	+++	+++	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-

3.4. A hatóanyagok EC₅₀-értékeinek meghatározása biofilmképzéskor marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin kombinációk esetében

Ebben a vizsgálatban az irodalmi adatok alapján jóval nagyobb gátló-koncentrációkra számítottunk, ezért töményebb törzsoldatokat készítettünk. A marbofloxacin 4096 µg/ml-es koncentrációjú törzsoldatát 206,2 mg marbofloxacin (Menovo Pharmaceutical Co. Ltd., Zhejiang, China; hatóanyagtartalom 99.3%) 50 ml steril desztillált vízben való feloldásával készítettük el. Az 4096 µg/ml-es koncentrációjú gentamicin törzsoldat elkészítéséhez 228,8 mg gentamicin-szulfátot (Menovo Pharmaceutical Co. Ltd., Zhejiang, China; hatóanyagtartalom 89,5%) használtunk fel 50 ml steril desztillált vízhez. A kolisztin

törzsoldat szintén 4096 µg/ml-es koncentrációjú volt, ebben az esetben 237 mg kolisztint (Menovo Pharmaceutical Co. Ltd., Zhejiang, China; hatóanyagtartalom 86.4%) 50 ml steril desztillált vízben oldottunk fel. Az elkészítések után a sterilizálás érdekében a törzsoldatokat 0,22 µm membránszűrőn szűrtük át.

A vizsgálat során első lépésként felszaporítottuk az izolátumokat folyékony Müller-Hinton levesben, 18 órán át tartó, 37 °C-os inkubálás során. A beoltáshoz 10⁵ CFU/ml-es szuszpenziót használtunk. A 96 lyukú tenyésztőedényekbe az említett baktérium-szuszpenzióból 10 µl-t mértünk be 90 µl Müller-Hinton levesbe, amit 8 órán keresztül inkubáltunk a termosztátban a biofilmképzés elősegítése céljából. Ezt követően az inkubációs tápoldatot elöntöttük, és új, antibiotikum-tartalmú oldatokkal helyettesítettük. Az első oszlopokba 200 µl törzsoldatot (4096 µg/ml) pipettáztunk. Ebből az oszlopból azután 100 µl-t pipettáztunk a következő oszlopba 100 µl MH-leveshez, a kettes hígítás szabályainak megfelelően. A hígítást hasonlóan folytattuk a többi oszlopban, így 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8-as koncentrációkat kaptunk az első 10 oszlopban. A hígítási sort a 14. táblázat illusztrálja. A 11. és 12. oszlop a korábbiakhoz hasonlóan pozitív és negatív kontrollként szolgált. Az elkészült 96 lyukú tenyésztőedényeket 37 °C-os termosztátba helyeztük 18 órás inkubációra.

14. táblázat. A hatóanyagok (marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin, marbofloxacin-kolisztin) koncentrációja (µg/ml) a 96 lyukú tenyésztőedényben a biofilmképző *P. aeruginosa* vizsgálatakor.

4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	1.
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	2.
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	3.
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	4.
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	5.
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	6.
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	7.
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-	8.
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	

A biofilmek vizsgálatakor már nagyszámú baktérium van jelen, ezért gátló-koncentrációkat nem tudunk meghatározni. A nemzetközi szakirodalom ezekben az esetekben az ún. EC₅₀-értékeket írja le, amely egy adott törzs maximális növekedését (pozitív kontrollhoz viszonyítva) felére csökkentő hatóanyag-koncentráció. Az EC₅₀-értékek meghatározásához a tenyésztőedényeket 18 órás inkubáció után egy vitális festékkel, az ún. Celltiter 96 Aqueous One reagenssel kezeltük, amelyet a gyártó előírásainak megfelelően 1 órán át inkubáltunk. Amennyiben az adott antibiotikum-koncentrációnál jelen voltak élő baktériumok, a reagens metil-tetrazolium tartalma átalakult formazánná. A lezajló reakciót pirosasbarna színreakció követte. A szín intenzitása egy bizonyos lineáris tartományban pozitív korrelációt mutatott az életképes baktériumok számával. A mintákat 490 nm-es hullámhosszon fotometrálnak vetettük alá. A növekedési intenzitásokat a pozitív kontrollhoz hasonlítottuk, amit a maximális extinkcióval jellemeztünk. Amikor a maximális extinkció felét mértük, akkor kaptuk meg az ún. EC₅₀ értéket. A leolvasott eredményeket táblázatba foglaltuk (l. Függelék 24., 25., 26. táblázat), egy hatóanyag esetében ezt a 15. táblázatban mutatjuk be.

15. táblázat. A marbofloxacin adott koncentrációi (µg/ml) esetében a vizsgált *P. aeruginosa* törzsek EC₅₀ értékei.

marbofloxacin koncentráció/ <i>P. aeruginosa</i> törzs	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-
18	0,367	0,401	0,857	0,712	0,990	0,770	0,672	1,319	1,329	1,712	2,612	0,124
20	0,309	0,588	0,961	1,042	1,060	1,039	0,806	1,158	1,181	1,784	1,823	0,169
21	0,282	0,726	1,471	1,870	1,810	1,810	1,494	1,148	1,492	1,646	2,305	0,201
22	0,282	1,111	1,243	1,360	1,711	1,782	1,297	1,300	1,292	1,504	2,142	0,180
24	0,172	0,764	0,971	0,967	1,099	0,968	1,242	1,216	1,172	1,384	1,838	0,231
25	0,219	0,883	1,054	1,269	1,391	1,054	0,916	1,304	1,036	1,321	2,004	0,186
26	0,479	1,177	1,522	1,684	1,964	1,735	2,124	2,012	2,119	1,957	2,832	0,186
28	0,294	0,824	1,477	1,534	1,685	1,548	1,409	1,755	1,586	1,330	2,474	0,151

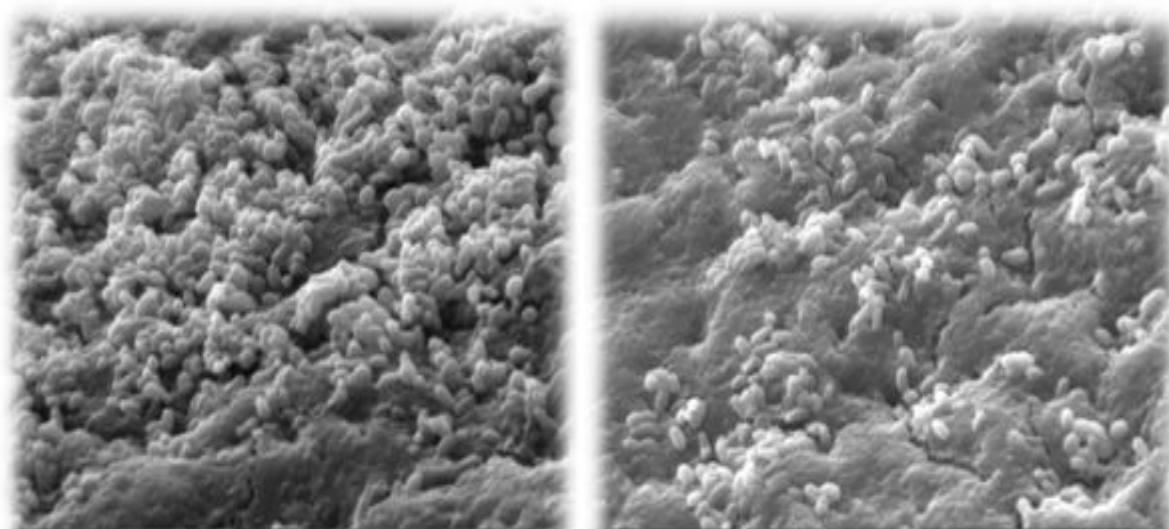
3.5. Statisztikai Analízis

A MIC-értékeket adott törzsön belül, továbbá egy adott törzsre jellemző MIC- és EC₅₀-értékeket Student-féle párosított t-próbával hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a p<0,05 értékeket.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *P. aeruginosa* törzsek biofilmképzésének fenotípusos igazolása scanning elektronmikroszkópos módszerrel

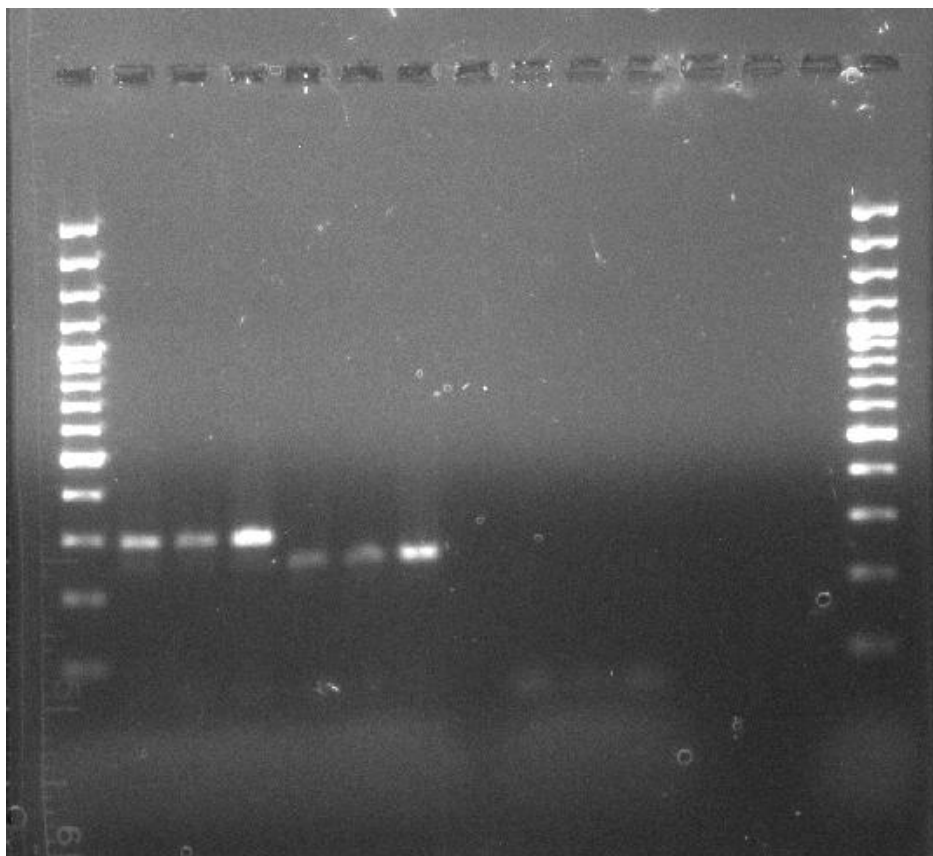
A scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok során kapott felvételek bizonyították a *P. aeruginosa* biofilmképző képességét. A 4. ábra mutatja a biofilmbe ágyazott baktériumok közösségét.



4. ábra. A kísérlet során készített saját kép, melyen a biofilmbe ágyazott *P. aeruginosa* baktériumok láthatók.

4.2. *P. aeruginosa* törzsek biofilmképzésének igazolása PCR-módszerrel, *pel*-gén analízissel

Az általunk vizsgált *P. aeruginosa* törzs genomjában PCR módszerrel kimutattuk a három, általunk választott biofilmképzés háttérében álló gént (*pelA*, *pelC* és *pelE*), melyeket a 5. ábrán szemléltetünk. Így genetikailag is igazoltuk, hogy a vizsgált baktériumtörzsek biofilmképző tulajdonsággal rendelkeznek.



5. ábra. A *pelA*, *pelC* és *pelE* (balról jobbra) kimutatása PCR módszerrel kutyából izolált *P. aeruginosa* törzsön (3 párhuzamosban).

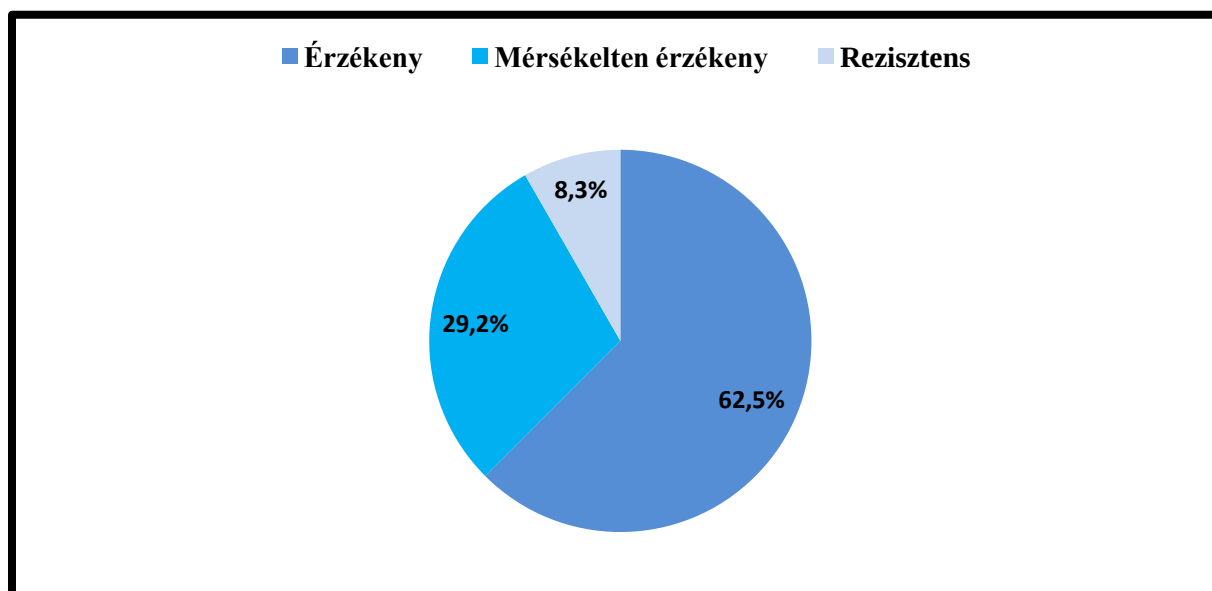
4.3. A minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározása a planktonikus *P. aeruginosa* törzseknél marbofloxacin, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombináció esetében

A kapott MIC-értékek alapján határoztuk meg az érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens törzsek arányát, melynek során a CLSI által megadott határértékeket, az ún. „breakpoint” értékeket vettük alapul. A kísérletben vizsgált törzsek érzékenységeinek értékelésekor marbofloxacin esetében 1 µg/ml MIC-értéken vagy az alatt érzékenynek, 2 µg/ml MIC-érték esetén mérsékelten érzékenynek, 4 µg/ml-os minimális gátló koncentrációnál, illetve efelett rezisztensnek számít az adott baktériumtörzs. Gentamicin és kolisztin esetében ezek a MIC-határértékek a következőképpen alakulnak: ha a MIC-érték legfeljebb 2 µg/ml, az adott baktérium érzékenynek minősül, 4 µg/ml esetén mérsékelten érzékeny, 8 µg/ml vagy afelett pedig rezisztens besorolást kap (CLSI M31-S1). A kombinációk értékelésénél a szigorúbb, marbofloxacinnál ismertetett értékeket vettük alapul. A fenti határértékek összefoglalását a lenti, 16. táblázat mutatja be.

16. táblázat. A CLSI „breakpont” határértékek marbofloxacin, gentamicin, kolisztin, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációjának esetén.

	Breakpont-értékek (CLSI)		
Antibakteriális szer	Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens
Marbofloxacin	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$	$2 \mu\text{g/ml}$	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$
Gentamicin	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$	$4 \mu\text{g/ml}$	$\geq 8 \mu\text{g/ml}$
Kolisztin	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$	$4 \mu\text{g/ml}$	$\geq 8 \mu\text{g/ml}$
Marbofloxacin:gentamicin	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$	$2 \mu\text{g/ml}$	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$
Marbofloxacin:kolisztin	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$	$2 \mu\text{g/ml}$	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$

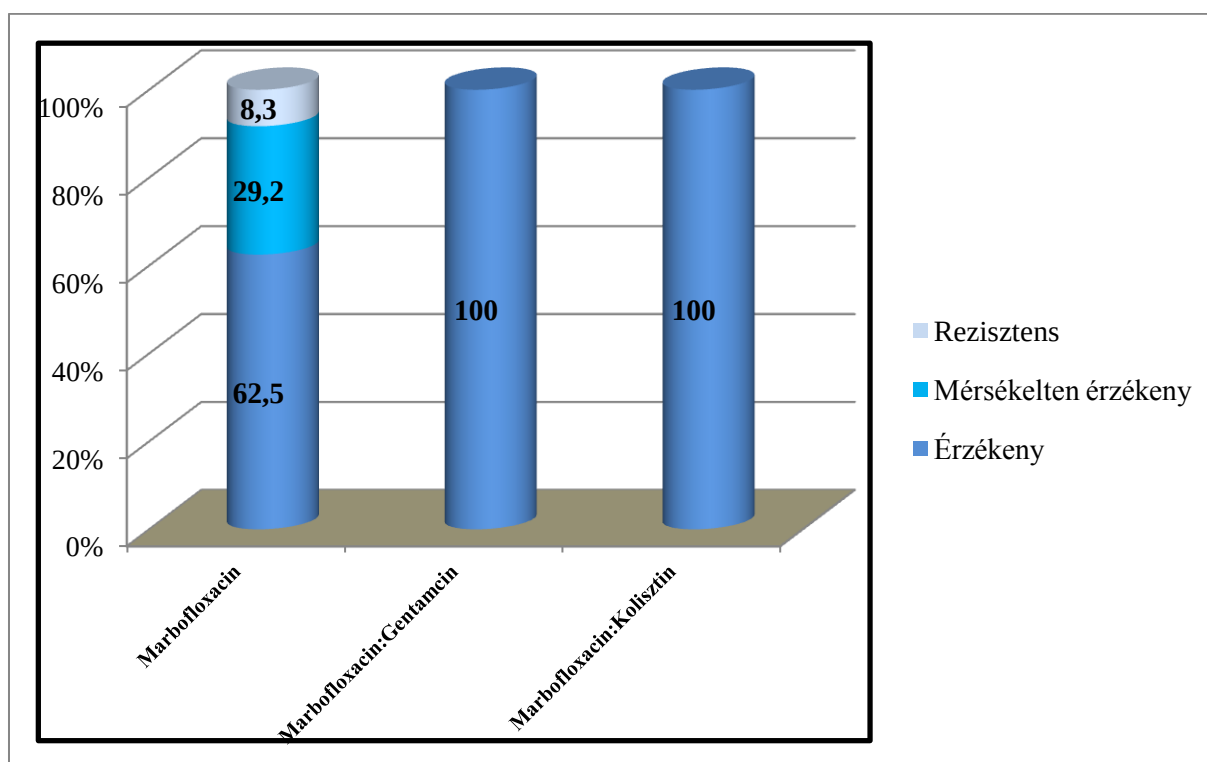
Marbofloxacin esetében a MIC-értékek $0,25 \mu\text{g/ml}$ -től $4 \mu\text{g/ml}$ -ig terjedtek. A CLSI határértékek alapján tizenöt törzs (62,5%) bizonyult érzékenynek, hét törzs (29,2%) mérsékelten érzékenynek, két törzs (8,3%) pedig rezisztensnek a fluorokinolonnal szemben. A törzsek érzékenységeinek százalékos megoszlását az 6. ábra szemlélteti. A MIC₅₀- és MIC₉₀-értékek meghatározásánál $1 \mu\text{g/ml}$ -t illetve $2 \mu\text{g/ml}$ -t kaptunk eredményül.



6. ábra. A vizsgált *P. aeruginosa* törzsek érzékenységeinek százalékos megoszlása marbofloxacin esetében.

A marbofloxacin:gentamicin 1:1 arányú kombinációjának vizsgálatakor jóval alacsonyabb MIC-eket kaptunk, az értékek 0,0625 µg/ml és 1 µg/ml között változtak. A kombináció tehát igen hatékornak bizonyult a kórokozó planktonikus formái ellen. A CLSI határértékek figyelembe vételével a *P. aeruginosa* törzsek mindegyike érzékeny volt a két szer kombinációjára, nem találtunk rezisztens izolátumot a vizsgált huszonnégy törzs között. A kombináció esetében a MIC₅₀- és MIC₉₀-értékek rendre 0,5 µg/ml, illetve 1 µg/ml voltak.

A marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációjának alkalmazásakor szintén 0,0625 és 1 µg/ml között mozogtak a MIC-értékek. A határértékek alapján a vizsgált huszonnégy izolátum mindegyike kifejezetten érzékeny volt a kombinációra. A MIC₅₀ 0,0625 µg/ml-nek, a MIC₉₀ 0,5 µg/ml-nek adódott. A 100%-os érzékenységet a két kombináció esetén jól szemlélteti az 7. ábra.



7. ábra. A vizsgált *P. aeruginosa* törzsek érzékenységeinek százalékos megoszlása marbofloxacin, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációja esetében.

4.4. A hatékony koncentrációk (EC₅₀) meghatározása a biofilmképző *P. aeruginosa* törzseknél marbofloxacin, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombináció esetében

Eredményeink birtokában kijelenthetjük, hogy a 8 órán át tartó inkubáció eredményeképpen kialakult biofilmben a baktériumtörzsek érzékenysége jelentősen csökkent a vizsgált hatóanyagokra és kombinációikra. A kapott EC₅₀-értékek nagyságrendekkel nagyobbak voltak, mint az ugyanezeknél a törzseknél tapasztalt planktonikus MIC-értékek ($p < 0,05$).

Kijelenthető továbbá, hogy a marbofloxacin-kombinációk esetében kapott EC₅₀-értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint az önálló kinolonra kapott értékek ($p < 0,05$). A marbofloxacin-gentamicin és a marbofloxacin-kolisztin kombinációk EC₅₀ értékei között nem volt szignifikáns különbség ($p < 0,05$).

Marbofloxacin esetében széles intervallumban, 64 és 4096 µg/ml között változtak az EC₅₀-értékek.

A marbofloxacin:gentamicin 1:1 arányú kombinációjának alkalmazásakor 8 µg/ml és 2048 µg/ml közé, a marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú elegyének vizsgálatakor egy szűkebb intervallumban, 8 és 128 µg/ml között mozogtak az EC₅₀-értékek.

Eredményeink a kolisztin kimagasló hatékonyságát támasztják alá biofilmek jelenléte esetén is. A vizsgálatban kapott, és a 17. táblázatban felsorolt értékek kifejezett szórásának oka a biofilmek érzékenységének nagy változékonysága.

A vizsgálatban tapasztalt MIC-értékek és EC₅₀-értékek felsorolását az adott törzsekre jellemzően a 17. táblázat mutatja be.

17. táblázat. A biofilmképző *P. aeruginosa* törzsek MIC és EC₅₀-értékei (µg/ml) marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin kombinációk esetében

Törzs száma	Marbofloxacin		Marbofloxacin:gentamicin		Marbofloxacin:kolisztin	
	MIC (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	MIC (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	MIC (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)
18	0,5	64	0,5	16	0,125	64
20	1	2048	0,5	64	0,5	128
21	2	2048	0,5	64	0,5	64
22	2	4096	0,5	64	0,5	128
24	1	2048	1	8	0,5	64
25	2	2048	1	64	1	64
26	1	4096	1	16	0,5	128
28	0,5	2048	0,5	64	0,25	128
29	4	512	0,25	128	0,0625	8
30	4	4096	0,25	8	0,0625	8
31	2	4096	0,25	64	0,0625	128
32	2	2048	0,5	6	0,25	32
33	1	1024	0,5	512	0,5	64
34	1	4096	1	8	0,5	64
35	2	4096	1	64	0,5	8
37	0,25	2048	0,5	8	0,0625	8
38	0,5	512	0,5	64	0,0625	16
39	2	2048	0,5	2048	0,5	16
44	0,5	1024	0,5	8	0,0625	16
47	0,25	1024	0,5	8	0,0625	16
48	0,25	1024	0,25	64	0,0625	8
49	0,25	1024	0,0625	128	0,0625	32
51	1	2048	0,25	128	0,25	32
52	0,25	1024	0,25	128	0,0625	128
Átlag±SD	1,3±1,1	2093,3±1319,8	0,52±0,28	155,6±415,9	0,29±0,26	56,3±47,2

Marbofloxacin esetében a biofilmképző *P. aeruginosa* törzsek mindegyikénél jelentős érzékenység-csökkenés volt tapasztalható. Kilenc izolátum (37,5%) érzékenységét a biofilm 10-1000-szeresével, hét (29,2%) esetén 2000-szeresével, nyolc törzsnél (33,3%) pedig 4000-8000-szeresével csökkentette.

A marbofloxacin-gentamicin kombináció vizsgálatakor huszonkettő (91,7%) izolátum ellenállóképessége 10-1000-szeresével növekedett, míg egy-egy (4,15%-4,15%) *P. aeruginosa* 2000-szeres, illetve 4000-8000-szeres emelkedést mutatott. A marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációjának használatakor huszonkettő (91,7%) törzs esetében kaptunk 10-1000-szeres rezisztencia-fokozódást, míg kettő (8,3%) izolátumnál 2000-szeres változást tapasztaltunk.

A biofilmeknél kapott EC₅₀-értékek kivétel nélkül szignifikánsan nagyobbak voltak, mint az ugyanezeknél a törzseknél tapasztalt planktonikus MIC-értékek ($p < 0,05$).

Az alábbi, 18. táblázatban látható a vizsgált *P. aeruginosa* baktériumtörzsekre jellemző érzékenység csökkenés.

18. táblázat. A biofilmet képző *P. aeruginosa* törzsek planktonikus formáihoz viszonyított érzékenység-csökkenés mértéke

A biofilmképző formák érzékenységének csökkenése (n-szeres) a planktonikus formákhoz képest (n=24)										
8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
Marbofloxacin esetében a törzsek száma (db)										
0	0	0	0	2	0	0	7	7	7	1
Marbofloxacin:gentamicin kombináció esetében a törzsek száma (db)										
2	5	2	2	5	2	3	1	1	1	0
Marbofloxacin:kolisztin kombináció esetében a törzsek száma (db)										
0	0	1	0	12	6	2	0	2	0	0

5. MEGBESZÉLÉS

Eredményeink alapján elmondható, hogy a *P. aeruginosa* általunk vizsgált törzsei rendelkeznek biofilmképző tulajdonsággal. PCR módszerrel kimutattuk a *pelA*, *pelC*, *pelE* géneket, melyek szakirodalmi adatok (FRIEDMAN és KOLTER, 2004) szerint a biofilmképzés hátterében állnak. Pásztázó elektronmikroszkóppal készült felvételeink igazolták, hogy biofilmképzéskor a mikrobák jelentős morfológiai változáson mennek keresztül (DAVIES, et al., 1998).

Az eredményekből jól kitűnik, hogy a *P. aeruginosa* általunk vizsgált planktonikus formái általában érzékenyek marbofloxacinra, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációira egyaránt. Az irodalmi adatoknak megfelelően (GÁLFI, et al., 2012) az általunk vizsgált hatóanyagok alkalmasak *P. aeruginosa* okozta fertőzések kezelésében.

A kapott értékek alapján azonban az is kitűnik, hogy a fluorokinolon esetében a különböző rezisztencia mechanizmusok révén (RUBIN, et al., 2008) kialakult rezisztens törzsek vizsgálatunkban is jelen voltak. Külföldi felmérésekkel ellentétben, az általunk vizsgált, Magyarországon izolált *P. aeruginosa* törzsek esetében kisebb arányban találtunk rezisztenciát. Marbofloxacinnal szemben a vizsgált 24 izolátum mindössze 8,3%-a volt rezisztens. Korábbi vizsgálatokban ennél nagyobb, 25%-os (MÜLLER és HORN, 2009), illetve 27%-os (RUBIN, et al., 2008) rezisztencia-arányt írtak le. Kísérletünkben marbofloxacin esetében a MIC₅₀- és MIC₉₀-értékek rendre 1 µg/ml, illetve 2 µg/ml voltak. Szakirodalmi adatok alapján a MIC₅₀- és MIC₉₀ értékekre 0,5 és 4 µg/ml koncentrációkat tüntettek fel (TEJEDOR, et al., 2003), amelyek igen hasonlóak az általunk tapasztaltakhoz.

A kutatásban vizsgált izolátumok marbofloxacinnál 91,7%-os, a kombinációinál azonban 100%-os érzékenységet mutattak. Ezen felül a kombinációk használatakor a MIC-értékek jelentős csökkenését is tapasztaltuk, melyeket a 19. és 20. táblázatban összefoglaltunk. A kapott eredményekből arra következtethetünk, hogy *P. aeruginosa* okozta fertőzések kezelésére jó választás lehet a marbofloxacin kombinációban történő alkalmazása.

19. táblázat. A kapott MIC-értékek ($\mu\text{g/ml}$) összegzése a vizsgált *P. aeruginosa* törzsek esetében marbofloxacinra, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációjára, illetve az érzékeny törzsek száma (%)

Hatóanyagok	Érzékeny <i>P. aeruginosa</i> törzsek aránya (%)	MIC-értékek ($\mu\text{g/ml}$)
Marbofloxacin	91,7	0,25-4
Marbofloxacin:gentamicin	100	0,0625-1
Marbofloxacin:kolisztin	100	0,0625-1

20. táblázat. A kapott MIC₅₀ és MIC₉₀-értékek ($\mu\text{g/ml}$) összegzése a vizsgált *P. aeruginosa* törzsek esetében marbofloxacinra, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú kombinációjára

Hatóanyagok	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Marbofloxacin	1	2
Marbofloxacin:gentamicin	0,5	1
Marbofloxacin:kolisztin	0,0625	0,5

Kísérletünkben megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált *P. aeruginosa* törzsek rendelkeznek biofilmképző tulajdonsággal, aminek következtében az izolátumok ellenállóképessége jelentősen megnövekedett, amely megfelel az irodalomban leírtaknak (BOYEN, et al., 2009).

Egy vizsgálat (PYE, et al., 2013) humángyógyászati vonalon kapott eredményei megegyeztek az általunk megállapított ténnyel, miszerint a biofilmbe ágyazott baktériumok érzékenysége szignifikánsan az összes vizsgált antibakteriális szerrel szemben kisebb a planktonikus formánál. Megjegyezzük azonban, hogy a kutatásunkban a biofilmet képző forma esetében az EC₅₀-értékeket vizsgáltuk, míg a külföldi felmérésben a planktonikus formához hasonlóan a MIC-értékeket vették alapul.

A kapott érzékenység csökkenés az általunk vizsgált izolátumok esetében 10-8000-szeres, ezáltal tapasztalataink hasonlóan bizonyultak a külföldi vizsgálatokkal, miszerint a legtöbb antibiotikummal szembeni érzékenység 50-2000-szeresével csökkenhet (BANIN, et al., 2006).

5.1. Konklúzió

Kutatásunkban hazai, kutyából izolált, fülfertőzéseket okozó *P. aeruginosa* törzsek planktonikus formájának érzékenységét határoztuk meg marbofloxacinra, marbofloxacin:gentamicin és marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú elegyének kombinációjára. Továbbá vizsgáltuk a biofilmképző törzsek érzékenység változását az említett antibakteriális szerek és kombinációik esetében.

Megállapítottuk, hogy a planktonikus és a biofilmképző *P. aeruginosa* okozta külső hallójárat-gyulladás kezelésére az 1:1 arányú kombinációk használata kedvezőbb. A vizsgálat alapján elmondható, hogy indokolt a biofilmképző *P. aeruginosa* törzsek jelenlétekor a hatóanyagokat magasabb koncentrációban alkalmazni.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Pseudomonas aeruginosa* által okozott kórképek – mint az *otitis externa* és a *pyoderma* – komoly problémát okoznak az állatgyógyászatban. A bántalmak kezelése napjainkban egyre nehezebb, ugyanis a *P. aeruginosa* törzsek nagy része multirezisztens. Másrészt a baktérium képes biofilmet képezni, ami nagymértékben csökkenti az érzékenységet. Tanulmányunkban összehasonlítottuk a *P. aeruginosa* törzsek biofilmjeinek, illetve planktonikus formáinak érzékenységét gentamicinre, kolisztinre és a marbofloxacinra. Meghatároztuk a planktonikus baktériumtörzsek érzékenységét marbofoxacinra, a marbofloxacin-gentamicin és a marbofloxacin-kolisztin kombinációkra. Az érzékenységet a MIC (minimális gátló koncentráció) értékek leolvasásával állapítottuk meg, kutatásunkat a CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) irányelvei alapján végeztük. Második lépésben a törzseket antibiotikum jelenléte nélkül inkubáltuk, melynek következtében a baktériumok biofilmet képeztek. A biofilmben található *P. aeruginosa* baktériumtörzsek érzékenységét vitális festéssel (MTS-formazán) vizsgáltuk fotometriás meghatározással. A planktonikus *P. aeruginosa* törzsek 91,7%-a volt érzékeny marbofloxacinra, míg a hatóanyagok 1:1 arányú kombinációja esetében az összes baktérium érzékenynek bizonyult. A MIC-értékek marbofloxacin használatakor 0,25 és 4 µg/ml, az antibiotikumok 1:1 arányú elegyként történő alkalmazásakor 0,0625 és 1 µg/ml között mozogtak. Marbofloxacin esetében a MIC₅₀ érték 1 µg/ml, a MIC₉₀ 2 µg/ml, marbofloxacin:gentamicin kombinációnál 0,5 µg/ml, illetve 1 µg/ml, míg marbofloxacin:kolisztin 1:1 arányú elegyénél 0,0625 µg/ml és 0,5 µg/ml volt. A biofilmet képző törzsek esetében az EC₅₀ (hatékony koncentráció) értékeket vizsgáltuk. Marbofloxacin használatakor ezen értékek 64 és 4096 µg/ml, marbofloxacin:gentamicin kombinációban 8 és 2048 µg/ml, míg marbofloxacin:kolisztin elegyénél 8 és 128 µg/ml között változtak. Eredményeink alapján elmondható, hogy a biofilmképzés jelentős mértékben csökkentette a vizsgált *P. aeruginosa* törzsek érzékenységét bizonyos antibakteriális szerekre. A kísérletünkben használt hatóanyagok kombinációban történő használata hatásosabbnak bizonyult az önálló alkalmazáshoz képest.

7. SUMMARY

The effects of biofilm production on the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*

Diseases caused by *Pseudomonas aeruginosa*, like *external otitis* and *pyoderma* are serious challenges in the veterinary medicine. Treatments are even more difficult nowadays, as *P. aeruginosa* strains are frequently multiresistant. On the other hand the bacteria are able to form biofilms, which decrease the antimicrobial susceptibility of these strains. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of marbofloxacin, gentamicin, colistin and their combinations. We compared the sensitivity of planktonic cells with bacteria in biofilms. The susceptibility of the planktonic cells was determined to marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin and marbofloxacin-colistin combination with the microdilution method by determining MIC values according to CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) guidelines. In the second part of the study the bacterial strains were incubated without antimicrobials in microplate wells for 12 hours to form biofilms. To determine the sensitivity of biofilm-grown cells a photometric method utilizing MTS-formazan formation was performed. Among the examined planktonic *P. aeruginosa* strains, 91.7% was sensitive to marbofloxacin and all of the strains were susceptible to the 1:1 combination of the antimicrobials. In case of marbofloxacin, MICs ranged from 0.25 to 4 µg/ml, in case of the marbofloxacin: gentamicin and marbofloxacin:colistin combinations these were between 0.0625 and 1 µg/ml. The MIC₅₀ and MIC₉₀ values of marbofloxacin were 1 µg/ml and 2 µg/ml, respectively. These values for the marbofloxacin:gentamicin combination were 0.5 µg/ml and 1 µg/ml, respectively, while the marbofloxacin:colistin combination these proved to be 0.0625 µg/ml and 0,5 µg/ml, respectively. To examine the susceptibility of biofilm-grown strains EC₅₀ (effective concentraion 50%) was used. Concerning marbofloxacin these values ranged from 64 to 4096 µg/ml. In case of marbofoxacin-gentamicin combination the EC₅₀ was found between 8-2048 µg/ml, while the 1:1 combination of marbofloxacin-colistin showed EC₅₀ values between 8-128 µg/ml. Based on our results, the susceptibility of the examined strains was significantly decreased by biofilms compared to planktonic cells, and the antimicrobial combinations increased the sensitivity of these strains.

8. IRODALOMJEGYZÉK

AUGUST, J. R. 1988: Otitis externa: a disease of multifactorial etiology. *Veterinary Clinics of North America*, 38. p. 731-742.

BANIN, E., BRADY, K. M., GREENBERG, E. P. 2006: Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72. vol. 3. no. p. 2064-2069.

BOYEN, F., EEECKHAUT, V., IMMERSEEL, F. V., PASMANS, F., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. 2009: Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*, 135. p. 187-195.

BRIEDIS, J. D., ROBSON, H. G. 1976: Comparative activity of netilmicin, gentamicin, amikacin, and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10. vol. 4. no. p. 592-597.

CLSI-guideline M07-A8 2009 - Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically

CLSI-guideline M31-S1 2009 - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Informational Supplement

DAVIES, D.G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W., GREENBERG, E. P. 1998: The involvement of cell-to cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280. vol. 5361. no. p. 295-298.

FRIEDMAN, L., KOLTER, R. 2004: Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51. vol. 3. no. p. 675-690.

GALES, A. C., JONES, R. N., SADER, H. S. 2006: Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clinical Microbiology and Infection*, 12. vol. 4. no. p. 315-321.

GÁLFI P., CSIKÓ GY., JERZSELE Á. 2012: Állatorvosi gyógyszerteran III. Budapest: Robbie-Vet Kft.. 81-83, 206-208, 134-138 p.

HARVEY, G. R., HARARI, J., DELAUCHE, J. A. 2005: Ear diseases of the dog and cat. Barcelona: Manson Publishing. 161-212 p.

HILLIER, A., ALCORN, J. R., COLE, L. K., KOWALSKI, J. J. 2006: Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. *Veterinary Dermatology*, 17. vol. 6. no. p. 432-439.

KISS G., RADVÁNYI SZ., SZIGETI G. 1997: New combination for therapy of canine otitis externa / Microbiology of otitis externa. *Journal of Small Animal Practice*, 38. vol. 2. no. p. 51-56.

KLUGE, R. M., STANDIFORD, H. C., TATEM, B., YOUNG, V. M., GREENE, W. H., SCHIMPF, S. C., CALIA, F.M., HORNICK, R. B. 1974: Comparative Activity of Tobramycin, Amikacin, and Gentamicin Alone and with Carbenicillin Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6. vol. 4. no. p. 442-446.

KROGH, H. V., KRISTENSEN, S. 1981: A study of skin diseases in dogs and cats. *Nordisk Veterinærmedicin*, 33. vol. 1. no. p. 17-22.

LILLENBAUM, W., VERAS M., BLUM, E., SOUZA, G.N. 2000: Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Letters in Applied Microbiology*, 31. vol. 1. no. p. 42-45.

LINDEN, P. K., KUSNE, S., COLEY, K., FONTES, P., KRAMER, D. J., PATERSON, D. 2003: Use of Parenteral Kolisztin for the Treatment of Serious Infection Due to Antimicrobial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 37. vol. 11. no. p. 154-160.

LIN, D., FOLEY, S. L., QI, Y., HAN, J., JI, C., LI, R., WU, C., SHEN, J., WANG, Y. 2012: Characterization of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Journal of Applied Microbiology*, 113. vol. 1. no. p. 16-23.

MÜLLER E., HORN, S. 2009: Efficacy of enrofloxacin and marbofloxacin against bacterial isolates from dogs and cats - in vitro resistance study. *Praktischer Tierarzt*, 90. vol. 6. no. p. 512-521.

O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. 2000: Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54. vol. p. 49-79.

PETERSEN, A. D., WALKER, R. D., BOWMAN, M. M., SCHOTT, H. C., ROSSER, E. J. 2002: Frequency of Isolation and Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Canine Skin and Ear Samples Over a 6-Year Period (1992-1997). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38. vol. 5. no. p. 407-413.

PYE, C. 2013: *Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilms. Doctoral Thesis. University of Guelph, Ontario, Canada

RUBIN, J., WALKER, R.D, BLICKENSTAFF, K.S., BODEIS-JONES, ZHAO, S. 2008: Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology*, 131. vol. p. 164–172.

SANDER, R. M. D. 2001: Otitis externa: A practical guide to treatment and prevention. *American Family Physician*, 63. vol. 5. no. p. 927-936.

SCOTT, D. W., MILLER, W. H. & GRIFFIN, C. E. 2001: Diseases of the eyelids, claws, anal sacs and ears. In: MULLER, G. H., KIRK, R. W., MILLER, W. H., GRIFFIN, C. E.: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology. Philadelphia: Elsevier Health Sciences. p. 1185-1236.

SOULI, M., GALANIL, I., GIANARELLOU H. 2008: Emergence of extensively drug-resistant and Pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*, 13. vol. 47. no. p. 19045-19056.

SWANTON, A.-K., CIKOTA R., GUARDABASSI L. 2010: Kutyák otitis externájának antimikrobiális kezelése kizárólag Tris-Edtát és 0,15% klórhexidint tartalmazó készítménnyel. *KisállatPraxis*, XI. évf. 5. sz. p. 234-240.

TEJEDOR, M. T., MARTÍN, J. L., NAVIA, M., FREIXES, J., VILA, J. 2003: Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Veterinary Microbiology*, 94. vol. p. 295–301.

TIMURKAYNAK, F., FUSUN, C., AZAP, Ö. K., DEMIRBILEK, M., ARSLAN, H., KAMARAN, S. Ö. 2006: In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27. vol. p. 224–228.

TUBOLY S. 1998: Részletes bakteriológia. In: TUBOLY S.: Állatorvosi járványtan I. (Állatorvosi mikrobiológia). Budapest: Mezőgazda Kiadó. p. 104-209.

WALKER, R. D., DOWLING, P. M. 2006: Aminoglycosides. In: GIGUERE, S., PRESCOTT, J. F., BAGGOT, J. D., WALKER, R. D., DOWLING, P. M.: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Ames: Blackwell Publishing. p. 207-229.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Jerzsele Ákosnak a segítőkész támogatásáért és hasznos, szakmai tanácsaiért, Dr. Gálfi Péternek, hogy lehetővé tette a dolgozat elkészítését, valamint Palócz Orsolyának és Kovács Árpádnak a sok segítségért.

A kutatás részben a TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0011 *„A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen”* c. pályázat támogatásával valósult meg.

10. FÜGGELÉK

21. táblázat. Planktonikus *P. aeruginosa* növekedési intenzitása különböző marbofloxacin koncentrációk ($\mu\text{g/ml}$) esetén. Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve a negatív kontroll látható, a No. az adott *P. aeruginosa* törzs számát jelenti.

No.	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-
18	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-
20	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
21	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-
22	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-
24	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
25	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	-
26	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
28	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-
29	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
30	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
31	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
32	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
33	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
34	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
35	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	-
38	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
39	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	+++	-
44	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-
51	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	-

22. táblázat. Planktonikus *P. aeruginosa* növekedési intenzitása marbofloxacin-gentamicin 1:1arányú kombináció különböző koncentrációin (µg/ml). Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve a negatív kontroll látható, a No. az adott *P. aeruginosa* törzs számát jelenti.

No.	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-
18	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	-
20	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	-
22	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	-
24	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-
25	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
26	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
28	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-
32	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
33	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-
34	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
35	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
37	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	-
38	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
39	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-
44	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	+++	-
47	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	-

23. táblázat. Planktonikus *P. aeruginosa* növekedési intenzitása marbofloxacin-kolisztin 1:1arányú kombináció különböző koncentrációin ($\mu\text{g/ml}$). Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve a negatív kontroll látható, a No. az adott *P. aeruginosa* törzs számát jelenti.

No.	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	+	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
20	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	-
22	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-
24	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	-
25	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++	+++	-
26	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	-
33	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+++	-
34	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	-
35	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	+++	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
39	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	+++	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+++	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-

24. táblázat. Biofilmet képző *P. aeruginosa* növekedési intenzitása fotometriásan mérve különböző marbofloxacin koncentrációk (µg/ml) esetén. Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve a negatív kontroll látható, a No. az adott *P. aeruginosa* törzs számát jelenti.

No.	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-
18	0,367	0,401	0,857	0,712	0,990	0,770	0,672	1,319	1,329	1,712	2,612	0,124
20	0,309	0,588	0,961	1,042	1,060	1,039	0,806	1,158	1,181	1,784	1,823	0,169
21	0,282	0,726	1,471	1,870	1,810	1,810	1,494	1,148	1,492	1,646	2,305	0,201
22	0,282	1,111	1,243	1,360	1,711	1,782	1,297	1,300	1,292	1,504	2,142	0,180
24	0,172	0,764	0,971	0,967	1,099	0,968	1,242	1,216	1,172	1,384	1,838	0,231
25	0,219	0,883	1,054	1,269	1,391	1,054	0,916	1,304	1,036	1,321	2,004	0,186
26	0,479	1,177	1,522	1,684	1,964	1,735	2,124	2,012	2,119	1,957	2,832	0,186
28	0,294	0,824	1,477	1,534	1,685	1,548	1,409	1,755	1,586	1,330	2,474	0,151
29	0,878	0,837	1,051	1,045	1,536	1,788	1,521	2,083	1,475	1,496	2,310	0,109
30	0,138	0,831	1,620	1,172	0,952	1,345	1,002	0,975	1,327	0,917	1,610	0,191
31	0,562	1,195	1,319	1,714	1,391	1,718	1,771	1,585	1,280	1,401	2,097	0,201
32	0,343	1,045	1,247	1,209	1,346	1,006	1,309	1,509	1,666	1,772	2,290	0,123
33	0,535	0,832	0,873	1,485	1,435	1,546	1,361	1,471	1,455	1,397	2,699	0,103
34	0,371	1,218	1,245	1,353	1,697	2,051	1,559	1,861	1,739	1,575	2,310	0,143
35	0,487	0,948	1,065	1,195	1,731	1,712	1,899	1,813	1,780	1,112	2,002	0,175
37	0,284	0,558	0,763	0,760	0,908	0,864	0,741	0,853	0,684	0,848	1,334	0,167
38	0,203	0,453	0,546	0,745	1,517	1,605	1,466	1,306	1,586	1,503	2,247	0,145
39	0,562	1,118	1,865	1,482	1,392	2,156	1,534	1,309	1,515	1,638	2,608	0,187
44	0,441	0,763	0,800	1,059	1,239	1,235	1,065	1,262	1,058	1,249	1,997	0,194
47	0,237	0,857	0,718	1,433	1,464	1,551	1,544	1,517	1,948	1,888	2,827	0,190
48	0,310	0,525	0,741	1,126	1,132	1,084	1,038	1,192	1,066	1,079	2,084	0,183
49	0,188	0,907	0,732	1,749	1,966	1,151	1,515	1,889	1,960	1,692	2,197	0,179
51	0,121	1,147	1,490	1,502	1,566	1,675	1,713	1,550	1,601	1,698	2,646	0,158
52	0,300	0,917	0,756	1,344	1,595	1,642	1,563	2,082	1,879	1,324	2,326	0,101

25. táblázat. Biofilmet képző *P. aeruginosa* növekedési intenzitása fotometriásan mérve marbofloxacin-gentamicin 1:1 arányú kombináció különböző koncentrációin (µg/ml). Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve a negatív kontroll látható, a No. az adott *P. aeruginosa* törzs számát jelenti.

No.	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-
18	0,153	0,179	0,216	0,213	0,185	0,193	0,175	0,177	0,155	0,392	0,685	0,036
20	0,152	0,167	0,156	0,143	0,161	0,169	0,176	0,512	0,582	0,536	0,835	0,035
21	0,265	0,342	0,344	0,327	0,351	0,336	0,337	0,402	0,425	0,419	0,801	0,035
22	0,262	0,338	0,363	0,371	0,381	0,380	0,374	0,413	0,441	0,459	0,808	0,037
24	0,150	0,165	0,160	0,144	0,152	0,142	0,148	0,171	0,155	0,174	0,884	0,038
25	0,168	0,170	0,202	0,227	0,237	0,241	0,287	0,400	0,393	0,392	0,683	0,033
26	0,219	0,214	0,206	0,250	0,248	0,247	0,296	0,287	0,278	0,532	1,027	0,035
28	0,269	0,255	0,258	0,235	0,237	0,247	0,235	0,356	0,379	0,370	0,687	0,029
29	0,183	0,216	0,230	0,221	0,219	0,242	0,386	0,377	0,395	0,408	0,672	0,032
30	0,091	0,102	0,102	0,105	0,117	0,123	0,117	0,129	0,158	0,155	0,560	0,029
31	0,136	0,207	0,202	0,208	0,211	0,230	0,244	0,555	0,567	0,506	1,001	0,032
32	0,138	0,208	0,218	0,174	0,168	0,183	0,177	0,194	0,194	0,192	0,844	0,028
33	0,229	0,211	0,271	0,277	0,445	0,434	0,492	0,447	0,440	0,408	0,814	0,032
34	0,128	0,166	0,210	0,169	0,146	0,148	0,209	0,177	0,184	0,195	0,871	0,028
35	0,125	0,147	0,168	0,147	0,127	0,164	0,137	0,679	0,687	0,607	1,140	0,029
37	0,106	0,096	0,112	0,100	0,105	0,110	0,117	0,125	0,140	0,156	0,801	0,029
38	0,169	0,197	0,203	0,225	0,247	0,245	0,191	0,497	0,447	0,543	0,884	0,035
39	0,240	0,219	0,390	0,385	0,357	0,326	0,361	0,391	0,446	0,416	0,606	0,034
44	0,122	0,123	0,133	0,142	0,119	0,120	0,133	0,160	0,180	0,184	0,844	0,035
47	0,113	0,100	0,090	0,102	0,094	0,100	0,107	0,261	0,132	0,138	0,741	0,032
48	0,098	0,093	0,094	0,097	0,104	0,094	0,112	0,422	0,424	0,438	0,668	0,033
49	0,220	0,234	0,208	0,200	0,219	0,203	0,337	0,344	0,366	0,359	0,667	0,032
51	0,369	0,377	0,352	0,386	0,357	0,307	0,459	0,470	0,480	0,487	0,873	0,034
52	0,349	0,321	0,210	0,304	0,381	0,322	0,482	0,409	0,488	0,434	0,744	0,031

26. táblázat. Biofilmet képző *P. aeruginosa* növekedési intenzitása fotometriásan mérve marbofloxacin-kolisztin 1:1arányú kombináció különböző koncentrációin (µg/ml). Az utolsó két oszlopban a pozitív, illetve a negatív kontroll látható, a No. az adott *P. aeruginosa* törzs számát jelenti.

No.	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	+	-
18	0,157	0,143	0,159	0,140	0,184	0,193	0,174	0,462	0,399	0,397	0,699	0,050
20	0,131	0,143	0,135	0,132	0,162	0,161	0,485	0,486	0,417	0,436	0,817	0,043
21	0,195	0,180	0,195	0,213	0,280	0,344	0,345	0,587	0,544	0,755	1,006	0,044
22	0,197	0,202	0,216	0,245	0,313	0,375	0,538	0,576	0,600	0,623	0,985	0,044
24	0,128	0,114	0,110	0,129	0,153	0,150	0,183	0,461	0,479	0,495	0,842	0,039
25	0,152	0,110	0,115	0,131	0,160	0,157	0,181	0,508	0,520	0,536	0,876	0,041
26	0,197	0,196	0,227	0,258	0,266	0,267	0,506	0,515	0,534	0,573	0,935	0,040
28	0,192	0,194	0,329	0,339	0,318	0,319	0,467	0,454	0,482	0,495	0,763	0,041
29	0,203	0,174	0,196	0,227	0,200	0,265	0,225	0,261	0,291	0,287	1,074	0,144
30	0,088	0,082	0,094	0,101	0,099	0,133	0,128	0,149	0,150	0,161	0,934	0,124
31	0,166	0,183	0,228	0,269	0,228	0,291	0,418	0,472	0,404	0,462	0,800	0,136
32	0,152	0,142	0,137	0,146	0,132	0,182	0,214	0,257	0,535	0,614	1,094	0,128
33	0,128	0,121	0,150	0,172	0,198	0,293	0,241	0,383	0,390	0,333	0,532	0,121
34	0,198	0,169	0,222	0,182	0,142	0,176	0,201	0,331	0,373	0,377	0,621	0,155
35	0,163	0,208	0,162	0,184	0,175	0,180	0,194	0,223	0,223	0,198	0,607	0,120
37	0,093	0,087	0,086	0,091	0,098	0,106	0,127	0,136	0,144	0,152	0,779	0,159
38	0,175	0,190	0,194	0,214	0,251	0,238	0,215	0,228	0,168	0,526	1,036	0,037
39	0,269	0,241	0,275	0,279	0,317	0,318	0,294	0,328	0,247	0,523	1,054	0,036
44	0,144	0,143	0,139	0,192	0,175	0,256	0,204	0,229	0,189	0,554	0,883	0,035
47	0,131	0,127	0,177	0,186	0,143	0,181	0,215	0,223	0,303	0,620	1,060	0,035
48	0,111	0,110	0,115	0,199	0,130	0,168	0,182	0,172	0,142	0,183	0,953	0,034
49	0,169	0,179	0,243	0,291	0,280	0,307	0,320	0,319	0,463	0,460	0,809	0,041
51	0,197	0,177	0,235	0,270	0,309	0,359	0,351	0,396	0,512	0,507	1,001	0,034
52	0,279	0,279	0,344	0,390	0,393	0,471	0,625	0,665	0,623	0,675	1,217	0,037