Állatorvostudományi Egyetem

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

TDK dolgozat

30 mg/kg dózisban, intramuszkulárisan alkalmazott florfenikol farmakokinetikai tulajdonságai sertés ízületi folyadékban és PK/PD integrációja *Streptococcus suis* ellen

Készítette: Simon Réka

V. évfolyam, állatorvos szak

Témavezető: dr. Somogyi Zoltán, egyetemi tanársegéd

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Budapest

2022.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke ... 3
2. Bevezetés ... 5
3. Célkitűzések ... 6
4. Irodalmi áttekintés ... 7
4.1 Florfenikol ... 7
4.2 Farmakokinetikai/farmakodinámiai elemzés ... 11
4.3 *Streptococcus suis* okozta megbetegedések sertésekben ... 15
5. Anyag és Módszer ... 18
5.1 *In vivo* farmakokinetikai kísérlet ... 18
5.1.1 Kísérletben használt állatok ... 18
5.1.2 Etikai jóváhagyás ... 18
5.1.3 Anesztézia, gyógyszerbeadás, mintavételek ... 18
5.2 A florfenikol koncentrációk meghatározása ... 19
5.3 Farmakokinetikai paraméterek ... 20
5.4 Antibiotikum-érzékenység meghatározása ... 20
5.5 *In vitro* ízületi folyadék modell kialakítása ... 21
5.6 *In vitro* ölési görbe szinóvia, szérum és CA-MHB közegben ... 22
5.7 PK/PD analízis ... 23
5.7.1 PK/PD modell felállítása *in vitro* körülmények között (szinóvia, szérum, CA-MHB) ... 23
5.7.2 PK/PD integráció (AUC_{24hss}/MIC, %T>MIC) ... 23
5.8 Statisztika ... 23
6. Eredmények ... 24
6.1 *In vivo* farmakokinetikai kísérlet ... 24
6.2 Farmakokinetikai paraméterek ... 24
6.3 A *S. suis* izolátumok florfenikollal szembeni érzékenysége ... 25
6.4 *In vitro* ízületi folyadék modell kialakítása ... 26
6.5 *In vitro* ölési görbe szinóvia, szérum és CA-MHB közegben ... 26
6.6 PK/PD analízis ... 27
6.6.1 PK/PD modell *in vitro* körülmények között ... 27
6.6.2 PK/PD integráció (AUC_{24hss}/MIC, %T>MIC) ... 27
7. Megbeszélés/Következtetések ... 28
8. Összefoglaló ... 32
9. Summary ... 33
10. Irodalomjegyzék ... 34
11. Köszönetnyilvánítás ... 44

1. Rövidítések jegyzéke

AMR	antimikrobiális rezisztencia
$AUC_{0\text{-}24h}$	24 órára extrapolált koncentráció-idő görbe alatti terület, [µg*h/ml]
$AUC_{0\text{-}\infty}$ AUC_{24hss}	végtelenre extrapolált koncentráció-idő görbe alatti terület, [µg*h/ml]
AUC/MIC	a koncentráció-idő görbe alatti terület osztva a MIC-értékkel, [h]
BRDC	bovine respiratory disease complex, szarvasmarhák légzőszervi tünetegyüttese
CA-MHB	kationokkal kiegészített Mueller-Hinton leves (Mueller-Hinton Broth 2)
Cl, Cl/F	teljes test clearance, [l/kg/h]
c_{max}	maximális plazmakoncentráció, [µg/ml]
c_{max}/MIC	maximális plazmakoncentráció és minimális gátló koncentráció hányadosa
CSF	cerebrospinális folyadék (cerebrospinal fluid)
$C_{(t)Cflorfenikol}$	adott időpontra vonatkoztatott koncentráció, [µg/ml]
f	szabad hatóanyag
F	biológiai hasznosulás, [%]
floR	rezisztenciát kódoló génszakasz
im.	intramuszkuláris gyógyszerbeadás
ISF	interstíciális folyadék (interstitial fluid)
iv.	intravénás gyógyszerbeadás
EC_{50}	in vitro koncentráció, amely a maximális ölési képesség felét képes kifejteni [mg/ml]
ECDC	Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ
EFSA	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
EMA	Európai Gyógyszerügynökség
E	log10 alapú élősejtszám változás
E_0	kezdeti, log10 alapú baktérium élősejtszám, [log_{10}TFE/ml]
E_{max}	maximális (válasz) ölési képesség [1/h]
Gamma	Hill-koefficiens, a görbe meredeksége (slope)
MBC	minimális baktericid koncentráció (minimum bactericidal concentration), [µg/ml]
MIC	minimális gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration), [µg/ml]

MIC_{50}	a baktériumpopuláció 50%-ra vonatkoztatott minimális gátló koncentráció, [µg/ml]
MIC_{90}	a baktériumpopuláció 90%-ra vonatkoztatott minimális gátló koncentráció, [µg/ml]
MPC	mutációt megelőző koncentráció (mutation prevention concentration), [µg/ml]
MRT	hatóanyag átlagos tartózkodási ideje, [h]
MSW	mutációs szelekciós ablak
PAE	poszt-antibiotikus hatás
PD	farmakodinámia
PK	farmakokinetika
PK/PD	farmakokinetikai/farmakodinámiai analízis
p.o.	szájon át történő gyógyszerbeadás
PRDC	Porcine respiratory disease complex, sertések légzőszervi tünetegyüttese
sc.	szubkután gyógyszerbeadás
SS140	Az általunk kiválasztott S. suis izolátum, amelynek segítségével a dózis-válasz görbét felállítottuk
STSS	Streptococcus okozta toxikus sokk szindróma
Tau	gyógyszeradagolási időintervallum, **[**h**]**
TFE	telepformáló egység
t_{max}	maximális plazmakoncentráció kialakulásához szükséges idő, [h]
$t_{1/2}$	felezési idő, [h]
%T>MIC	két beadás közötti időintervallumnak azon része százalékosan kifejezve, amikor a plazmakoncentráció meghaladja a MIC-értékét, [%]
V_d	megoszlási térfogat, [l/kg]

2. Bevezetés

Az antimikrobiális rezisztencia korunk egyik legmeghatározóbb közegészségügyi problémája, amelynek megoldásához a humán- és állategészségügy összefogására van szükség. Ez magában hordozza az egészségügy egyfajta megújulását, az antibakteriális szerek használatában történő szemléletváltást. Ezt követik és előmozdítják a jogi szabályozásokban bekövetkező változások is, amellyel visszaszorítható a céltalan és indokolatlan antibiotikum felhasználás.

A felelős, körültekintő és bizonyítékokon alapuló (evidence based) antibiotikum használattal visszaszoríthatjuk a rezisztens baktériumok szelekciójának mértékét. Ehhez azonban szükséges ismernünk a hatóanyagok pontos farmakokinetikai tulajdonságait a lehetséges fertőzési helyeken (légutak, ízületi folyadék, liquor), valamint folyamatosan vizsgálnunk kell a kórokozók érzékenységét az adott hatóanyaggal szemben. Az ezen adatok alapján elkészített farmakokinetikai/farmakodinámiai analízis kiváló kiindulási pontot szolgáltat a megfelelő antibakteriális szer és a hatékony dózis megválasztásához, ami nem csupán a rezisztencia megjelenésének esélyét csökkenti, de általa a gyógykezelés is nagyobb eséllyel lesz mikrobiológiailag és klinikailag is hatékony. Ezt kiválóan hasznosíthatjuk mind a társállatok kezelése során, mind a haszonállatokat érintő egyedi- és állománykezelések esetében.

A *Streptococcus suis* jelentős gazdasági károkat okozó baktérium a sertéstenyésztésben. A fertőzés által kialakított ízületgyulladás miatt fellépő sántaság számos telepen okoz problémát. A megbetegedés kezeléséhez, olyan antibakteriális hatóanyagra van szükségünk, amely jó megoszlási tulajdonságokkal rendelkezik, így képes átjutni a speciális barriereken a szervezetben és ott a megfelelő koncentrációt elérni a kívánt hatás kifejtéséhez.

A florfenikol megoszlási tulajdonságai és antibakteriális spektruma miatt jó választás lehet a *S. suis* okozta ízületgyulladások kezelésére. A PK/PD analízis alapján megfelelő, naprakész érzékenységi adatok ismeretében pedig megalkotható a terápiás javaslat, amely tartalmazza a használandó dózist, a kezelés szükséges időtartamát és az újraadagolás gyakoriságát.

3. Célkitűzések

Kutatásomban az intramuszkulárisan, 30 mg/kg dózisban alkalmazott florfenikol farmakokinetikai tulajdonságait kívántam meghatározni sertés vérplazmában és ízületi folyadékban, bővítve ezzel a további kutatásokban és a gyakorlatban is felhasználható információkat a *S. suis* okozta ízületgyulladásokkal kapcsolatban.

Ezzel párhuzamosan célom volt a sertések ízületgyulladásában szerepet játszó Magyarországon izolált *S. suis* baktériumok antibiotikum-érzékenységének fenotípusos felmérése mikrohígításos módszerrel, amelynek eredményeiből a *S. suis* izolátumok florfenikollal szembeni MIC_{50} és MIC_{90} értékét kívántam megállapítani.

Mindemellett egy olyan *in vitro* modell kidolgozása is célom volt, amelyben a fertőzés helyéhez hasonló közegben, jelen kutatásban az ízületi folyadékban tudom vizsgálni a florfenikol hatékonyságát a *S. suis* törzsekkel szemben, ehhez egy darab *S. suis* izolátum ölési-görbéjét kellett megvalósítanom sertés ízületi folyadékban, szérumban és kation adjuvált Mueller-Hinton levesben.

A kapott adatokból egy farmakokinetikai/farmakodinámiai analízis felállításával vizsgálni kívántam az emelt dózisú florfenikol felhasználásának előnyeit a *S. suis* baktériumok okozta ízületgyulladásokban. A kísérlet fő célja, a *S. suis* baktériumok okozta ízületgyulladások kezelésére alkalmazható terápiás javaslat megalkotása, amely tartalmazza a dózist, a kezelések időintervallumát és a terápia hosszát.

4. Irodalmi áttekintés

4.1 Florfenikol

A florfenikol a fenikolok csoportjába tartozó antibakteriális szer. A csoport első tagját, a klóramfenikolt 1947-ben izolálták *Streptomyces venezuelae* baktériumfajból, azonban ma már ennek a szintetikus úton előállított változatát alkalmazzák az állatorvoslásban [1, 2]. A florfenikol szerkezetében ugyancsak a fenikolok csoportjába tartozó tiamfenikolra hasonlít, a molekula 3' szén pozíciójában azonban a hidroxil-csoport helyett egy fluor atom található [3, 4]. Ez csökkenti a bakteriális acetilációhoz szükséges helyek számát, rezisztensebb molekulát hozva létre az inaktivációval szemben [5]. Egyes Gram-negatív kórokozók esetében, mint a *Salmonella Thyphimurium, Escherichia coli* és *Vibrio cholerae* azonban megfigyeltek kromoszómán vagy plazmidon-mediált *floR* génszakaszt, ami képes efflux pumpákat kialakítani a bakteriális membránon, növelve a rezisztencia kialakulását florfenikollal és klóramfenikollal szemben [6–8]. A florfenikol továbbá nem tartalmazza a humán aplasztikus anémiával kapcsolatba hozható, klóramfenikolban található aromás nitro-csoportot, ezáltal élelmiszertermelő állatokban is használható hatóanyag [2, 9]. Az alacsony toxicitása és eddig kialakult rezisztencia alacsonyabb száma miatt kijelenthetjük, hogy a florfenikol hatékonysága eléri, vagy meg is haladja a klóramfenikolét számos fajban [10].

A florfenikol képes a bakteriális riboszóma 50S alegységéhez kötődni, ezáltal meggátolni a fehérjeszintézist [11]. Széles spektrumú, bakteriosztatikus antibakteriális szer. Szarvasmarhában leggyakoribb indikációi közé tartozik a BRDC-t kialakító, Gram-negatív tápigényes kórokozók (*Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, Histophilus somni*) okozta fertőzés kezelése [12]. Alkalmazható még *Fusobacterium necrophorum* által kialakított *interdigitalis necrobacillosis* során is [13]. Sertésben olyan légúti kórképek gyógykezelésében használatos hatóanyag, amelyek az *Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Streptococcus suis,* illetve *Bordetella bronchoseptica* baktériumokkal hozhatók összefüggésbe [3]. Alpakák és lámák esetén foggyökértályogok, *osteomyelitis*, urogenitális fertőzések illetve egyes légúti fertőzések kezelésére használnak florfenikolt [14]. Kutyák és macskák *Staphylococcus pseudintermedius* és *Malessezia pachydermatitis* okozta *otitis externa* kórképében topikálisan, fülcsepp formájában hatékony az érzékeny törzsek ellen [15]. Halakban az *Aeromonas salmonicida* okozta furunkulózis kezelésére alkalmas [2, 6]. Baromfi fajok esetén használható *Riemerella anatipestifer* okozta kacsapestis, illetve a baromfikolera kezelésére [16].

A gyógyszerek, így az antimikrobiális szerek körültekintő és tudatos használatához is szükséges ismernünk azok farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságait [17]. Ezeket az adatokat azonban az eddigi számos publikáció ellenére sem ismerjük még részleteiben. A farmakokinetikai vizsgálatok során a gyógyszer viselkedését kutatjuk a szervezetben, annak felszívódását, megoszlását, metabolizációját és eliminációját alapul véve [18]. A farmakodinámia pedig a hatóanyag szervezetre kifejtett hatását vizsgálja, ami az antibakteriális szerek esetében magába foglalja az adott kórokozók érzékenységi jellemzőit [19].

A florfenikol farmakológiai tulajdonságait számos fajban (alpaka, juh, kecske, teve, szarvasmarha, sertés, csirke, kacsa, különböző halfajok) vizsgálták már [4, 16, 20–26]. A farmakokinetikai tulajdonságokban a különböző fajok esetében eltéréseket tapasztaltak, de ezeket az értékeket befolyásolja még a gyógyszerbeadási mód, valamint az alkalmazott dózis is, ezt szemlélteti az **1. táblázat**. A farmakokinetikai vizsgálatok során több érték alapján határozzuk meg az adott hatóanyag tulajdonságait, ezek a százalékos értékben kifejezett biológiai hasznosulás (F), az adott kompartmentben mérhető maximális koncentráció (c_{max}, [µg/ml]) valamint az a beadástól számított idő, amikor a legmagasabb koncentrációt mérhetjük (t_{max}, [h]) [27]. A hatóanyag megoszlási képességét a megoszlási térfogat (V_d, [l/kg]) értékével tudjuk jellemezni [28]. Ha egy hatóanyag jó megoszlással rendelkezik a szervezetben, nagy V_d értéke van, ez fordított arányosságban áll az átlagos vérplazmakoncentráció értékével ($c_{vérplazma}$ [µg/ml]) [29]. A gyógyszer kiürülésének idejét a felezési idővel ($t_{1/2}$, [h]), a kiürülés mértékét pedig a clearance (Cl, [l/kg/h]) értékkel tudjuk kifejezni [17]. A farmakokinetikai/farmakodinámiai elemzésben a maximális plazmakoncentráció értéke mellett a legfontosabb szerepet a koncentráció-idő görbe alatti terület tölti be, amelyet általában 24 órára vetítve ($AUC_{0\text{-}24h}$) adunk meg, mértékegysége µg*h/ml [27].

A florfenikol kémiai struktúráját tekintve lipofil vegyület [6]. Nem ionizált formában van jelen az oldatokban 3-9 pH között, vizes közegben rosszul oldódik, oldhatósága az 1,3 mg/ml nagyságot közelíti meg [6, 30]. A florfenikol oldhatóságát mikroemulziós vagy nanoemulziós technikákkal lehet növelni, megteremtve ezzel a lehetőséget a megfelelő koncentrációban történő orális beadáshoz, illetve ezzel csökkenteni lehet a parenterális beadáskor fellépő irritációt [30]. Biológiai hasznosulása a legtöbb haszonállat esetében jó vagy kiváló. Sertésben intramuszkuláris beadást követően akár a 96%-ot is elérheti [31, 32], juhokban azonban az intramuszkulárisan beadott hatóanyag mindösszesen 65,82%-a kerül be a szisztémás keringésbe [20]. *Per os* alkalmazás esetén lovakban 83%, 2-5 hetes borjak esetén 89%, ami azonban tejpótló együttes adásával csökken [3]. Nyúlban ez az érték szájon át alkalmazott florfenikol esetén 88,25% [4].

Általánosságban kijelenthető, hogy a gyógyszerek alkalmazása során a megfelelő hatóanyag koncentrációk fenntartása érdekében egyes esetekben gyakori gyógyszer újraadagolásra van szükség [33]. Intramuszkuláris és szubkután alkalmazás, valamint hosszú hatástartamú készítmények esetén az elnyújtott felszívódásból adódó úgynevezett flip-flop hatást használjuk ki [34, 35]. Lipofilitása miatt a florfenikolt nagy megoszlási térfogat jellemzi, kiválóan megoszlik a tüdőben, izomban, epében, valamint a vesékben és a vizeletben [25]. A florfenikol fehérje kötődése a vérplazmában az eddigi publikációk alapján sertésekben kicsi, általában 5% alatti, de egyes publikációkban beszámoltak 10-25% közötti kötődésről is [10, 36]. Regionális perfúziót alkalmazva nagy koncentráció értékeket mérhetünk szarvasmarha ízületi folyadékban [37]. Nyulak esetében a vérplazmában mérhető felezési idő rövidebb (1,54 h), azonban figyelembe kell venni azt is, hogy a szövetekben akkumulálódhat a florfenikol, ezzel egy lassabb teljes test clearance alakulhat ki.[4] Alpakáknál szintén rövidebb a felezési idő, valamint más állatfajokhoz képest kisebb megoszlási térfogatról is számolnak be az eddigi publikációk [38].

A fenikolok metabolizációja a májban történik, florfenikol esetében számos metabolit képződhet a szervezetben, ezek a florfenikol-amin, florfenikol-alkohol, monokloroflorfenikol [4]. A florfenikol-amin rendelkezik ezek közül a leghosszabb felezési idővel, maradékanyag-vizsgálatokban ezt érdemes vizsgálni, emellett leírták, hogy a metabolitoknak nincs antibakteriális hatása, így ezek aktivitásával nem kell számolni a hatékonyság vizsgálatok során [21]. A gyógyszer szervezetből való kiürülése nagy mértékben a vizelettel történik, de kisebb mértékben a bélsárban is megtatálható mind az anyamolekula, mind annak metabolitjai [2].

A florfenikol alkalmazása során a mellékhatások nem gyakoriak, azonban egyes fajoknál, valamint egyes életkorok esetén tapasztalhatunk mellékhatásokat. Szarvasmarhában felléphet hasmenés és anorexia a florfenikol használata során [3]. Malacok esetén megfigyelhetünk csontvelő depléciót és a limfoid szövetek átmeneti károsodását, amely a kezelés megszüntetésével megszűnik [39]. Alpakáknál, szubkután alkalmazott, többszöri gyógyszerbeadás után szignifikáns hematológiai eltérések tapasztalhatóak, amely során csökkent totál protein, globulin, albumin, fehérvérsejt és hematokrit értékekről számoltak be [25, 38]. Halakban szintén hemopoietikus eltéréseket láthatunk elhúzódó *per os* alkalmazás esetén [26], de beszámoltak már florfenikol alkalmazása után fellépő immunszupresszióról is [40].

1. táblázat: Különböző állatfajokban, eltérő dózisokban, intramuszkulárisan (im.), szubkután (sc.), intravénásan (iv.) és szájon át (p.o.) alkalmazott florfenikol farmakokinetikai értékei (átlag ±szórás), az eddig megjelent publikációk alapján. F= biológiai hasznosulás, c_{max}= maximális plazmakoncentráció, t_{max}= c_{max} kialakulásához szükséges idő, $t_{1/2}$= felezési idő, V_d= megoszlási térfogat, Cl= teljes test clearance, MRT=hatóanyag átlagos tartózkodási idő, $AUC_{0-\infty}$= végtelenre exprapolált koncentráció-idő görbe alatti terület.

Állatfaj, kompartment	Beadási mód	Dózis (mg/kg)	F%	c_{max} (µg/ml)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$	V_{dss} (L/kg)	Cl (L/kg/h)	MRT (h)	$AUC_{0-\infty}$ (µg/ml.h^{-1})	Forrás
sertés vérvérplazma	im.	5	-	2,97±1,04	2,17±0,52	5,26±2,61 h	-	-	-	30,3±9,43	[41]
kutya vérvérplazma	im.	10	103,91±11,60	2,86±0,59	2,49±0,61	4,58±1,22 h	-	-	6,59±1,21	21,15±5,25	[42]
sertés vérplazma	im.	15	-	3,58±1,51	1,64±1,74	17,24±9,35 h	-	-	24,0±13,59	87,14±31,50	[43]
sertés ízületfolyadék	im.	15	-	2,73±1,2	3,4±1,67	21,01±13,19 h	-	-	27,39±17,16	54,80±13,35	[43]
sertés vérplazma	im.	20	-	5,93±1,20	2,27±0,55	5,29±2,58 h	-	-	-	60,9±18,9	[41]
sertés tüdő ISF	im.	20	-	4,88±054	3,25±0,32	9,47±6,84 h		-	13,85±7,97	51,18±20,11	[44]
alpaka vérplazma	im.	20	-	4,31±3,03	1,0±0,65	17,59±11,69 h	11,07±8,14	0,40±0,09	21,01±11,70	51,83±11,72	[25]
juh vérplazma	im.	20	65,82±6,71	1,04±0,10	1,44±0,16	137,0±12,16 min	-	-	3,42±0,39	49,56±5,51	[20]
kecske vérvérplazma	im.	20	60,88±5,94	1,21±0,10	1,13±0,13	127,4±11,0 min	-	-	2,98±0,32	58,73±7,51	[20]
teve vérvérplazma	im.	20	69,20±7,75	0,84±0,08	1,51±0,14	151,3±16,33 min	-	-	4,01±0,45	41,93±5,81	[20]
ló vérvérplazma	im.	22	80,99	4,05±1,2	1,29±0,47	-	-	-	-	52,02±0,25	[45]
nyúl vérvérplazma	im.	30	88,25±17,37	21,65±2,5	0,5±0,0	3,01±1,45 h	-	-	4,34±0,38	86,56±11,99	[4]
sertés vérvérplazma	im.	30	99,14	4,44±1,02	4±1,34	14,46±1,84 h	-	0,18±0,02	26,11±3,24	158,56±13,46	[46]
sertés tüdő ISF	im.	50	-	10,36±2,5	3,50±0,27	7,75±3,23 h	-	-	11,42±2,79	88,78±27,58	[44]
alpaka vérvérplazma	sc.	40	-	1,95±0,94	2,5±1,07	99,67±59,89 min	55,74±25,88	0,42±0,15	130,19±80,00	99,78±23,58	[25]
csirke vérvérplazma	iiv.	20	-	-	-	7,90±0,48 h	2,70±0,60	0,46±0,08	6,87±1,08	-	[21]
juh vérvérplazma	iv.	20	-	-	-	78,8±8,3 min	0,69±0,07	0,30±0,03	2,34±0,25	62,45±6,56	[20]
kecske vérvérplazma	iv.	20	-	-	-	71,1±8,9 min	0,57±0,06	0,27±0,03	2,11±0,23	74,07±7,85	[20]
kutya vérvérplazma	iv.	20	-	-	-	1,11±0,94 h	1,45±0,82	1,03±0,49	1,53±0,59	26,76±10,99	[47]
szarvasmarha CSF	iv.	20	-	4,67±1,51	2,1±0,91	2,86±1,90 h	3,80±2,34	0,22±0,06	8,71±2,17	44,35±8,58	[9]
szarvasmarha vérplazma	iv.	20	-	-		3,18±1,01 h	0,95±0,20	0,22±0,05	3,92±1,34	97,52±18,04	[9]
teve vérvérplazma	iv.	20	-	-	-	89,5±9,2 min	0,89±0,09	0,33±0,04	2,71±0,31	60,61±6,98	[20]
ló vérvérplazma	iv.	22	-	-	-	1,83±0,94 h	0,72±0,17	0,35±0,05	2,10±0,64	137,45±59,91	[45]
nyúl vérvérplazma	iv.	30	-	-	-	1,54±0,51 h	0,57±0,85	0,34±0,11	1,69±0,67	98,08±14,33	[4]
sertés vérvérplazma	iv.	30	-	-	-	6,54±0,75 h	-	0,18±0,03	5,85±1,17	159,93±13,28	[46]
csirke vérvérplazma	p.o.	20	87±16	10,23±1,6	0,63±0,07	8,34±0,34 h	3,27±0,75	0,54±0,08	-	-	[21]
kutya vérvérplazma	p.o.	20	95,43±11,60	6,18±1,07	0,94±0,43	1,24±0,64 h	-	-	2,37±1,04	22,36±2,72	[47]
ló vérvérplazma	p.o.	22	83,33	13,80±4,7	1,13±0,54	-	-	-	-	53,45±0,17	[45]
nyúl vérvérplazma	p.o.	30	50,79±14,33	15,14±4,4	0,5±0,0	2,57±1,74 h	-	-	3,70±0,63	49,02±13,13	[4]
sertés vérplazma	p.o.	30	-	9,12±0,78	1,32±0,56	10,58±1,08 h	-	0,50±0,04	-	52,33±4,33	[48]

4.2 Farmakokinetikai/farmakodinámiai elemzés

Napjaink fontos, közegészségügyi jelentőséget is magában hordozó problémája az egyre jobban terjedő antimikrobiális rezisztencia (AMR) [49, 50]. Ennek okai a nem megfelelő hatóanyag kiválasztása a gyógykezeléshez, a rosszul megválasztott, gyakran alul dozírozott adagok, valamint a nem egyedileg végzett, profilaktikus/ metafilaktikus kezelésre alkalmazott antibakteriális szerek [19]. A helyzet súlyosságára hívja fel a figyelmet az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC), az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) és az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) által kiadott jelentés, melyben az állatorvoslásban használt antibakteriális kezelések és ezek humán egészségügyben jelentkező káros következményeit mutatják be [51].

A farmakokinetikai-farmakodinámiai analízis használata egyre inkább előtérbe kerül a különböző hatóanyagok dózisának optimalizálásának folyamatában [46]. A pontos dózis beállításához ugyanis szükséges ismernünk mind a gyógyszer viselkedését a szervezeten belül, valamint a hatóanyag szervezetre gyakorolt hatását. Előbbit a farmakokinetika, utóbbit a farmakodinámia foglalja össze [19]. Az antimikrobiális szerek esetén azonban a farmakodinámia az adott mikroorganizmus érzékenységét jelenti az általunk használt antimikrobiális szerrel szemben [46, 52]. Ezen adatokon alapuló antibakteriális terápia segít csökkenteni az újonnan, nem megfelelő gyógyszerhasználat miatt szelektálódó, antibakteriális szerekkel szemben rezisztens törzsek számát, valamint minimalizálni a toxikus mellékhatások előfordulását a túldozírozás elkerülésével [53].

A farmakokinetika alapvető központi eleme a vérplazma. A PK értékek alapján megtudhatjuk, a különböző beadási módok után mennyi idő (t_{max}) alatt éri el a maximális koncentrációt (c_{max}) az adott hatóanyag a vérben, onnan mennyire képes eljutni egyéb szövetekbe (V_d), milyen mértékben (Cl, Cl/F) és mennyi idő alatt eliminálódik ($t_{1/2}$) onnan [2]. Fontos farmakokinetikai érték még a koncentráció-idő görbe alatti terület (AUC), ami a felszívódás mértékétől függetlenül mutatja meg a szervezetbe bejutott hatóanyag arányát [19]. A vérpályába betörő fertőzések (szeptikémia, bakterémia) kivételével azonban a legtöbb esetben a szervezet azon pontján szeretnénk megvizsgálni a hatóanyag jelenlétét és mennyiségét, ahol a baktériumok a fertőzési gócot képzik [25, 39]. Számos publikációban találhatunk már eredményeket tüdőben, cerebrospinális folyadékban, ízületi folyadékban meghatározott PK-értékekről [9, 43]. Ezek alapján pontosabb képet kaphatunk arról, hogy a hatóanyag az adott helyen, a fertőzés helyén képes-e a megfelelő koncentrációt, a megfelelő ideig elérni a hatékony kezeléshez.

A megfelelő dózis meghatározásához a farmakodinámiai oldalt figyelembe véve szükségünk van az antibakteriális érzékenységi vizsgálat elvégzésére [52]. Az érzékenységi vizsgálat egyik módja a korongdiffúziós módszer, amely során meghatározható ugyan a baktérium rezisztenciája vagy érzékenysége, de nem kapunk kvantitatív adatokat [55]. A mikrohígításos módszer során azonban meghatározható az antibakteriális szerek minimális gátló koncentráció (MIC), minimális baktericid koncentráció (MBC) és mutációt megelőző koncentráció (MPC) értékei, amelyek alapján pontosabb képet kapunk az a baktériumfajok érzékenységről, valamint a kapott számadatokat felhasználhatjuk a PK/PD integráció során [19, 56]. Ezeket kettes alapú hígítási sor alapján vizsgálják, a MIC-érték az a legkisebb koncentráció, amelyben a baktériumok 24 óra inkubációt követően a baktériumok nem képesek szabad szemmel láthatóan szaporodni [55]. Az MBC az a koncentráció érték, amelyben 24 órás inkubáció után a baktériumok mennyisége 99,9%-al, vagyis legalább 3 nagyságrenddel csökken [19]. A MIC és MBC értékek között helyezkedik el az antibakteriális szerek mutációt megelőző koncentráció (MPC) értéke [57].

A MIC és MPC értékek között találhatjuk meg a mutációs szelekciós ablak (MSW) sávját [19, 58]. Ezen koncentrációban a baktérium populáción belül a rezisztenciát nem hordozó, úgynevezett vad-típusú baktériumok szaporodása gátolt, míg a mérsékelten érzékeny törzseket szelekciós nyomás alá helyezve azokban nagy eséllyel mutációk sorozataként mutáns törzsek jelennek meg, amelyek képesek már elszaporodni, ezáltal megnő a rezisztencia megjelenésének veszélye a populáció egészét tekintve [27, 58]. A PK/PD analízis során törekednünk kell arra, hogy az általunk ezalapján választott dózissal elkerüljük ezt a koncentráció-sávot [19]. Egyes antibakteriális szerek esetén, megfelelő adagolás után, ha a koncentrációjuk a MIC-érték alá csökken, képesek egy úgynevezett poszt-antibiotikus hatás (PAE) kifejtésére, amikor még rövid ideig bakteriosztatikus hatás figyelhető meg [59].

Az antibakteriális szereket hatásmódjukat tekintve két nagy csoportba oszthatjuk [56]. Ha egy hatóanyag a terápiás sávban maradva a szervezetben képes elérni a MIC-értéket, azonban az MBC értéket nem, bakteriosztatikus hatású lesz [60]. Ilyenkor képes a MIC feletti koncentrációban megakadályozni a baktériumok további szaporodását, a baktériumok eliminálását viszont az immunrendszer végzi el. A baktericid hatású hatóanyagok képesek a terápiás sávjukban elérni a baktériumok elpusztításához szükséges MBC-értékeket [61]. A két csoport elkülönítésének klinikai jelentősége, hogy ha az állat immunszupresszált állapotban van, a bakteriosztatikus szer koncentrációjának csökkenését követően a baktériumok újra felszaporodnak a szervezetben [53]. Ilyen állapotú egyedekben a baktericid hatású szerek alkalmazása indokolt. A baktericid hatású antibakteriális szereket az időfüggő és koncentrációfüggő baktericidek csoportjaiba sorolhatjuk [56]. A koncentráció függő csoport esetén, mint a fluorokinolonok csoportja, minél nagyobb koncentrációk elérésére törekszünk a szervezetben, míg az időfüggő baktericidek, így a béta-laktámok csoportja esetén a MIC érték feletti koncentrációt minél hosszabb ideig próbáljuk fenntartani [62]. A PK/PD analízisekben fellelhetünk eradikációhoz szükséges célérték meghatározást is, mely során a baktériumok 4 nagyságrenddel történő csökkenését figyelhetjük meg [46]. Egyes bakteriosztatikus hatású hatóanyagok a szervezet adott részein felhalmozódhatnak, így ott a nagyobb koncentráció következtében baktericid hatást képesek kifejteni [43]. Ezt figyelhetjük meg a makrolid csoportba tartozó hatóanyagok esetében az alveoláris makrofágokban [63].

A farmakokinetikai/farmakodinámiai analízis során három mutató alapján értékelhetjük az antibakteriális szereket. Ezek a c_{max}/MIC, mely során a hatóanyag maximális koncentrációjának és a vizsgált baktérium MIC értékének arányát adjuk meg [64]. A %T>MIC és AUC/MIC jellemzők során azt vizsgáljuk, hogy a szervezetben vizsgált hatóanyag mennyi ideig fordul elő nagyobb koncentrációban, mint a szaporodás megakadályozásához szükséges koncentráció (MIC) [27]. Ezt a %T>MIC esetén a vizsgált időtartamra vonatkoztatott százalékos értékben, az AUC/MIC esetén pedig órában kifejezve adjuk meg [53].

A florfenikolt hatásmódját tekintve az időfüggő antibakteriális szerek közé sorolják, ezért a megfelelő PK/PD mutatója a %T>MIC, de a klinikai hatékonyságot jobban kifejezi az AUC/MIC index érték, ami különösen igaz a florfenikol hosszú hatástartamú (Long Acting) készítményeire [36, 52]. A korábbi publikációkban megjelent, florfenikolra vonatkoztatott PK/PD elemzések eredményeit a **2. táblázat** tartalmazza.

A hatóanyag baktériumra kifejtett hatását kvantitatív értékkel is ábrázolhatjuk egy úgynevezett ölési görbe alapján [65]. Ezt elvégezhetjük *in vitro* vagy *ex vivo* körülmények között. *In vitro* esetben az egyik lehetőségünk, hogy egy hígítási sort állítunk fel a hatóanyag különböző koncentrációiból [46]. Másik esetben készíthető egy olyan modell, melyben képesek vagyunk a szervezetben lejátszódó folyamatokat szimulálni, így nem egy fixált koncentráció van jelen a rendszerben, hanem folyamatosan, a felezési időnek megfelelően szűrjük ki az adott mennyiségű hatóanyagot a rendszerből [66]. *Ex vivo* ölési görbe esetén a farmakokinetikai kísérletekből származó, ismert hatóanyag koncentrációjú közegben, például vérplazma, interstíciális folyadék, inkubáljuk a baktériumokat. Az inkubációs idő leteltével összehasonlítjuk a kezdeti baktérium koncentrációt (TFE/ml) a végleges baktérium koncentrációval [48]. Bakteriosztatikus hatású lesz az a koncentráció, amiben a kezdeti baktérium koncentráció megegyezik a kísérlet végén mért mennyiséggel, baktericid hatás esetén a telepformáló egységek száma milliliterenként 3 nagyságrendű csökkenést, eradikáció esetén legalább 4 nagyságrendű csökkenést eredményez [48].

A kísérletben kapott információkból megalkothatjuk az általunk vizsgált hatóanyag adott dózisában, a vizsgált baktérium populáció ellen használt valós dózis-válasz görbéjét [67]. Ennek megalkotásakor az ölési-görbe és az $AUC_{0\text{-}24h}$/MIC közötti összefüggéseket tudjuk kimutatni [46]. Ezt a Hill-egyenlet alapján végezhetjük el, amelyben az *in vivo* farmakokinetikai kísérlet során kapott értékeket és az *in vitro* vagy *ex vivo* ölési görbe alapján kapott baktériumszám csökkenést integráljuk [53]. Ennek alapján pedig meghatározhatjuk azt az AUC/MIC célértéket, amit az állat szervezetében elérni szeretnénk a bakteiosztatikus, baktericid vagy eradikációs hatás eléréséhez [43].

2. táblázat: Intramuszkuláris (im.) és szájon át(p.o.), különböző állatfajokban és dózisokban alkalmazott florfenikollal eddig végzett, *Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica Escherichia coli Streptococcus suis, Streptococcus iniae* és *Piscirickettsia salmonis* baktériumok ellen integrált PK/PD analízisek [a]: átlag±szórás, [b]: átlag (standard hiba) , [c]: átlag

Állatfaj	Dózis (mg/kg)	Beadási mód	Vizsgálat helye	Baktérium	PK/PD index	Hatásmód	Mérték-egység	Célérték	Forrás
sertés	15	im.	*leves*	*A. Pleuro-pneumoniae*	T>MIC	n.a.	%	37,3±19,6[a]	[67]
sertés	15	im.	*szérum*	*A. Pleuro-pneumoniae*	T>MIC	n.a	%	37,1±19,2 [a]	[67]
sertés	15	im.	*leves*	*P. multocida*	T>MIC	n.a.	%	35,6±18,3 [a]	[67]
sertés	15	im.	*szérum*	*P. multocida*	T>MIC	n.a.	%	41,4±22,5 [a]	[67]
sertés	30	im.	*ileum*	*E.coli*	T>MIC	n.a.	%	15,23±2,10 [a]	[48]
szarvas-marha	40	sc.	*szérum*	*P. multocida*	T>MIC	n.a.	%	78,4 (0,81)[b]	[36]
szarvas-marha	40	sc.	*szérum*	*M. haemolytica*	T>MIC	n.a	%	76,3 (1,20)[b]	[36]
sertés	30	im.	*vérplazma*	*S. suis*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	bakterio-sztatikus	h	37,89[a]	[46]
sertés	30	im.	*vérplazma*	*S. suis*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	baktericid	h	44,02[a]	[46]
sertés	30	im.	*vérplazma*	*S. suis*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	eradikáció	h	46,42[a]	[46]
sertés	30	im.	*ileum*	*E.coli*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	67,31±7,12[a]	[48]
szarvas-marha	40	sc.	*szérum*	*P. multocida*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	183,4 (5,44)[b]	[36]
szarvas-marha	40	sc.	*szérum*	*M. haemolytica*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	151,8 (5,44)[b]	[36]
lazac	10	p.o.	*vérplazma*	*P. salmonis*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	141±45[a]	[68]
lazac	15	p.o.	*vérplazma*	*P. salmonis*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	166±34[a]	[68]
pisztráng	15	p.o.	*vérplazma*	*L. garvieae*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	34,2[c]	[69]
pisztráng	15	p.o.	*vérplazma*	*S. iniae*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	8,2[c]	[69]
lazac	20	p.o.	*vérplazma*	*P. salmonis*	$AUC_{0\text{-}24h}$/ MIC	n.a.	h	520±50[a]	[68]
szarvas-marha	40	sc.	*szérum*	*P. multocida*	$AUC_{0\text{-}\infty}$/ MIC	n.a.	h	364,7 (16,97)[b]	[36]
szarvas-marha	40	sc.	*szérum*	*M. haemolytica*	$AUC_{0\text{-}\infty}$/ MIC	n.a.	h	303,9 (16,97)[b]	[36]

4.3 *Streptococcus suis* okozta megbetegedések sertésekben

A sertések manduláiban, bélrendszerében és genitáliáiban is számos *Streptococcus* faj található meg [70]. Ezen kokkoid alakú baktériumok átmérője kb. 1 µm. Fakultatív anaerob, obligát fermentatív, kataláz negatív fakultatív patogén baktériumfaj [71, 72]. Fiatal alakjai Gram-pozitív festődésüek, később viszont inkább Gram-negatív festődés jellemző rájuk, mert az autolizinek elkezdik felbontani a sejtfalukat [71].

Növekedésükhöz CO_2 szükséges. Tenyésztésükhöz vér vagy szérum kiegészítést igényelnek, a legoptimálisabb 37 ^{o}C-on, 24-48 órán keresztül, véresagaron vagy szelektív véresagaron, aerob körülmények között inkubálni őket [72], amin α vagy β hemolízisre képesek [70].

A sertéstartásban nagyon gyakran fordul elő a *Streptococcus suis*, súlyos egészségügyi és gazdasági károkat okozva [70, 73]. A kórokozó első leírására 1963-ban került sor, amikor de Moor egy új, sertésekben klinikai tüneteket okozó, eddig ismeretlen, alfa-hemolízisre képes *Streptococcus* fajról számolt be tudományos cikkében [74]. Napjainkig összesen 35 szerotípust azonosítottak, amelyek legtöbbjét tüneteket produkáló sertésekből mutattak ki, azonban találhatóak közöttük szarvasmarha, bárány és humán izolátumok, illetve tünetmentes hordozókból származók is[73, 75]. A szerotípusok elkülönítése a poliszacharid burok antigénjei alapján történik [70, 76]. A diagnózis, valamint a betegség kezelése során figyelembe kell venni, hogy az eltérő szerotípusok sok szempontból különböznek egymástól, azonban csak a klinikai kép alapján nem tudjuk ezeket megkülönböztetni, laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatokra van szükség az elkülönítésükhöz [77]. Leggyakrabban a 2-es szerotípus hozható összefüggésbe a sertésekben kialakuló tünetekkel, azonban ez földrajzi területenként eltérő lehet, egyes országokban a 9-es és 14-es szerotípusok prevalenciája nagyobb [78–80]. Egy egyedben akár több szerotípus is jelen lehet egyszerre, valamint azonos szerotípusokon belül is eltérő törzsek lehetnek jelen egy állományon belül, azonban ezek közül általában egy okozza a tényleges megbetegedést [81].

A *S. suis* természetes körülmények között a sertések felső légutaiban él, de megtalálhatjuk őket a nemi szervek és bélrendszer egyes részein is [70, 81], valamint széles körben fertőzhetik az emlős állatokat, madarakat és zoonotikus kórokozó lévén az embereket is [82, 83]. A fertőzés forrása lehet a tünetmentes hordozók nem fertőzött egyedekkel történő találkozása, de a malacok vertikális úton, a kocától is fertőződhetnek a fiaztatóban [84]. Kimutatták, hogy ugyan a legtöbb választáskori malac hordoz *S. suis* törzseket, azonban csak egy kisebb részük képes hordozóként tovább adni a baktériumokat a választás utáni időszakban. [70, 85] A terjedés leginkább kontaktus útján megy végbe, azonban 2-es szerotípus esetén kimutattak aeroszolos terjedést is [86]. A környezeti hatásokkal szemben is viszonylag ellenálló kórokozók, a sertéstartási körülményekre jellemző hőmérsékleten (22-25 ^{o}C) akár 8 napig életképesek maradnak a bélsárban, 12 napig az elhullott állatokban, 24 órán keresztül a porban, 4 ^{o}C hőmérsékletű vízben pedig akár 1-2 hétig is [70, 87]. Ezen adatok felhívják a figyelmünket a ragályfogó tárgyak általi behurcolás veszélyére, de akár a takarmánnyal, ízeltlábú vektorok közvetítésével is fertőződhet egy állomány [88].

A klinikai tünetek életkor szerint leginkább 5-10 hetes malacokat érintik, de ennél fiatalabb és idősebb korosztályokban is találkozhatunk a szeptikémia, bakterémia, meningitisz, endokarditisz, poliszerozitisz és poliartritisz kialakulásával [85, 89]. Sertésekben az első jel a fertőzésre a rektális hőmérséklet megemelkedése, akár 42,5 ^{o}C-ig is [87]. Perakut lefolyás esetén az állat bármilyen előzetes tünet nélkül elhullik [70]. Az elhúzódó kórfolyamatok esetén kialakulhat *meningitis, poliarthritis* miatti sántaság valamint szeptikémia [86]. Az eltérő szerotípusok csupán a klinikai kép alapján nem különíthetőek el, egyik sem okoz patognomisztikus tünetet [90]. Emberekben, Kína területén több járványkitörés is előfordult, ami a 2-es szerotípussal hozható összefüggésbe [73]. A humán tünetek között szintén megtalálhatjuk a meningitiszt, artritiszt, szeptikémiát [73, 91–93]. Kialakulhat *Streptococcus* okozta toxikus sokk szindróma is (STSS) [94], amelynek során a baktérium endotoxinjai kontrollálatlan T-sejt aktivációt okoznak antigén prezentáció nélkül, minek hatására kialakulhatnak petechiális vérzések, magas láz, de akár többszervi elégtelenség is [95].

A diagnózis megállapítása a klinikai tünetek, az állatok életkora és a kialakult makroszkópos elváltozások alapján történik, majd ezt a kórokozó laboratóriumi kimutatásával igazolják [70]. A *Streptococcus suis* képes önállóan is megbetegedéseket okozni, azonban légúti fertőzésben (PRDC) előfordulhat, hogy egyéb baktériumokat is azonosítanak mellettük, mint a *Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae, Trueperella pyogenes* [79].

A vakcinák használata jó megoldás lehet a kialakulás megelőzésében, számos kutatás és fejlesztés zajlik, hogy ezeket használni lehessen a sertéstartásban [77, 96, 97]. Léteznek ugyan lehetőségek a telepspecifikus vakcinák előállítására, ezek azonban csak az állományban jelen lévő törzsek ellen hatékonyak, ahonnan a vakcina előállításának alapjául szolgáló törzseket izolálták [98, 99]. A kialakult fertőzések kezelésére azonban még szükségünk van antibakteriális szerek alkalmazására, más, átfogó megoldás sajnos még nem áll az sertésegészségügy rendelkezésére [100]. Ezek használatához viszont szükséges, hogy a kórokozók érzékenyek legyenek az adott antibakteriális szerrel szemben. Ennek fenntartásához nagyobb hangsúlyt kell fektetnünk a körültekintő, tudatos antibiotikum használatra, aminek egyik alapköve a farmakokinetikai/farmakodinámiai analízis.

5. Anyag és Módszer

5.1 *In vivo* farmakokinetikai kísérlet

5.1.1 Kísérletben használt állatok

A kísérletben a kutatócsoport által végzett korábbi kísérlet alatt gyűjtött tapasztalatokat vettem alapul [43]. Nyolc darab, 28,93±3,64 kg testtömegű, Danbred genetikával rendelkező ártány sertés érkezett a kísérlet kezdete előtt az Állatorvostudományi Egyetem Üllői Tangazdaságába. A sertések minden szükséges vakcinázáson átestek az állattartó telepen, a kísérletet megelőző vizsgálat során klinikai tüneteket nem tapasztaltam, fertőző betegségben nem szenvedtek. Az állatokat fertőtlenített, száraz padozatú, ideális hőmérsékletű (21 ± 1 °C) és páratartalmú terembe fogadtuk, odafigyelve, hogy mind a szállítás, mind az elhelyezés során minél kevesebb stresszhatás érje őket. Az esetleges korábbi gyógyszerbeadásokból származó maradékanyagok kiürülése érdekében és az állatjóléti szabályoknak megfelelően két hét akklimatizációs idő került beiktatásra, amely során az állatok *ad libitum* jutottak hozzá antibakteriális szerektől mentes takarmányhoz és ivóvízhez. A kísérlet előtti 12 órában a sertések már nem részesültek sem takarmányban, sem ivóvíz ellátásban, hogy elkerülhetőek legyenek a kísérletben használt anesztézia során lehetséges komplikációk. A nyomon követhetőség érdekében egyedi jelöléseket alkalmaztam, ezt a sertéstenyésztésben gyakran használt jelölőkrétával végeztem el. A kísérlet lezárását követően az állatok az Üllői Tangazdaságban maradtak.

5.1.2 Etikai jóváhagyás

A kísérlet során betartottam a laborállatokra vonatkozó jogszabályokat és az állatok jólétét mindig szem előtt tartottam. A tanulmányt a PE/EA/00367-6/2022 ügyiratszámú határozatban engedélyezték.

5.1.3 Anesztézia, gyógyszerbeadás, mintavételek

A gyógyszerbeadást megelőzően testtömegmérést végeztem a beadni kívánt gyógyszermennyiségek pontos meghatározásához, amelynek értékeit a **3. táblázat** tartalmazza. Az intravénás gyógyszerbeadáshoz az állatok mindkét fülében, a *vena auricularis lateralis*-ban 24 G méretű vénakanült helyeztem el, annak érdekében, hogy ha éber állapotban nem lehet elvégezni az ízületi punkciót a mintavétel megfelelő időpontjában akkor tiletamin (1,25 mg/ttkg) és zolazepam (1,25 mg/ttkg) kombináció (Zoletil 100 (50 mg/ml tiletamin és 50 mg/ml zolazepam) liofilizátum és oldószer oldatos injekcióhoz A.U.V., Virbac, Carros, Franciaország) alkalmazásával bódítottam volna a sertéseket, azonban erre nem volt szükség a kísérlet ideje alatt.

A vakpróbák (vér és ízületi folyadék) levétele után az állatok nyakának bal oldalán, intramuszkulárisan adtam be florfenikol (Nuflor injekció A.U.V., Intervet International B.V., Boxmeer, Hollandia) injekciót, 30 mg/ttkg dózisban (**3. táblázat**). Ehhez 20G x 1” nagyságú tűt és megfelelő nagyságú fecskendőt használtam. A mintavételi területeket szőrtelenítettem, minden alkalommal klórhexidines szappannal letisztítottam, majd alkohollal fertőtlenítettem. A vérminták vételéhez az állatok *vena cava caudalis*-ából 21G x 2” méretű tűt, valamint lítium-heparinos vércsövet használtam. A *szinóvia* kinyeréséhez ízületi punkciót végeztem a *carpalis, tarsalis* ízületekben, folyamatos rotációban. A folyamathoz 22 G x 1 ½” méretű tűt és 1 ml-es fecskendőt használtam. A vérvételeket 10, 20, 30, 40, 50 perccel, valamint 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48 és 72 órával, az ízületi folyadék mintavételeket pedig 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72 órával a gyógyszerbeadás után végeztem. A 1482 g-n, 10 percig tartó centrifugálás után leválasztott vérvérplazmát és az ízületmintákat -80 ^{o}C-on, „low bind” eppendorf csövekben tároltam.

3. táblázat: A kísérlet során alkalmazott gyógyszermennyiségek.

	Testtömeg	**Zoletil (tiletamin 1,25 mg/kg, zolazepam 1,25 mg/kg)**	**Florfenikol (30 mg/ttkg)**	
			Nuflor (0,1 ml/ttkg)	**Aktív hatóanyag**
A-sertés	24,6 kg	1,23 ml	2,46 ml	738 mg
B-sertés	31,2 kg	1,56 ml	3,12 ml	936 mg
C-sertés	26,6 kg	1,33 ml	2,66 ml	798 mg
D-sertés	28,0 kg	1,40 ml	2,80 ml	840 mg
E-sertés	27,8 kg	1,39 ml	2,78 ml	834 mg
F-sertés	36,4 kg	1,82 ml	3,64 ml	1092 mg
G-sertés	30,0 kg	1,50 ml	3,00 ml	900 mg
H-sertés	26,8 kg	1,34 ml	2,68 ml	804 mg

5.2 A florfenikol koncentrációk meghatározása

A florfenikol mennyiségi meghatározása Agilent 1100 HPLC rendszerrel összekapcsolt Sciex 6500 QTrap tandem tömegspektrométerrel történt. A minták előkészítést követően kerültek mérésre. A mintákat mérés során Phenomenex Kinetex XB C18 (50 x 2,1 mm, 2,6µm) HPLC oszlopon választottuk el a mátrix komponenseitől. Eluensként 0,1% hangyasavat tartalmazó vizet (eluens A) és 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitrilt (eluens B) alkalmaztunk gradiens elúciós módban.

A kiindulási 10%-os szerves összetételt 0,5 percig tartottuk, majd 2,5 perc alatt megemeltük 90%-ra, ahol újabb 0,5 percig tartottuk. Onnan 0,3 perc alatt hoztuk vissza a kiindulási összetételt, amit 2,2 percig tartottunk. A teljes futási idő így 6 perc volt. Az eluens áramlási sebessége 0,5 ml/perc volt.

Ez a folyadékáram került bevezetésre a tömegspektrométer elektroporlasztásos ionforrásába, ahol 5000V spray feszültség, 40 készülékegység porlasztó és 35 készülékegység 450°C-os szárító gázt alkalmazva MRM módban történt a mennyiségi meghatározás. A florfenikol mérése során a 358,2/241 és a 358,1/170 átmeneteket használtuk. Az ütközési energia 35eV volt. 5 pontos kalibrációs oldatsort használtunk a koncentrációk meghatározásához. A mérés során alkalmazott QC minták 96-102%-nak adódtak. A mérés során Analyst 1.6.3 szoftvert használtunk a vezérléshez és a kiértékeléshez is.

5.3 Farmakokinetikai paraméterek

Nem rekeszes farmakokinetikai elemzést végeztem a vérplazmában és ízületi folyadékban mért koncentráció értékek alapján, amely során meghatároztam a két közeg farmakokinetikai paramétereit a Microsoft Excel programban futtatható, ingyenes, menü vezérelt bővítmény segítségével (pK Solver). Meghatároztam a maximális hatóanyag-koncentrációt (c_{max}), valamint a maximális gyógyszer-koncentráció kialakulásának időpontját (t_{max}). A 24 órára vetített koncentráció-idő görbe alatti terület (AUC_{24h}), a végtelenre extrapolált görbe alatti terület ($AUC_{0-\infty}$) értékeit lineáris trapezoid-módszerrel számoltam ki. Az $AUC_{0-\infty}$ megegyeztethető az állandósult plazmakoncentráció mellett kialakult koncentráció-idő görbe alatti területével (AUC_{24hss}). Meghatároztam a felezési időt ($t_{1/2}$), a teljes test *clearance* (Cl/F) értékét, valamint az átlagos hatóanyag tartózkodási időt (MRT). A florfenikol esetében a plazmafehérjékhez való kötődés sertések esetében 5% alatti [10, 36], mivel ez elhanyagolható, így a plazmafehérjékkel történő kötődéssel nem számoltam.

5.4 Antibiotikum-érzékenység meghatározása

A farmakodinámiai elemzéshez 73 db magyarországi sertés eredetű, klinikai mintákból származó *Streptococcus suis* izolátum MIC-értékét határoztam meg *in vitro* mikrohígításos módszerrel, 96 lyukú microplate segítségével.

A korábban -80°C-on, krioprotektív módon tárolt izolátumokat felolvasztását és megfelelő homogenizálását követően folyékony CA-MHB (Mueller-Hinton Broth 2, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) táplevesbe oltottam. Az inkubációt az ajánlásoknak megfelelően, 5% CO_2 jelenlétében végeztem 37 °C-on, 24 órán keresztül. Szilárd táptalajra, véresagarra (Bak-Teszt Kft., Budapest, Magyarország) három párhuzamos hígítási sor kioltásával határoztam meg a tömény baktériumszuszpenziók koncentrációját, amely 10^8 TFE/ml volt a legtöbb izolátum esetében.

A 96 lyukú mikroplatek minden sorának első 10 lyukában 2-es alapú florfenikol hígítási sort készítettem, amely során 32 µg/ml koncentrációtól kezdve 0,063 µg/ml hígításig jutottam el. Ehhez az első oszlop kivételével 90 µl CA-MHB-levest helyeztem a mikroplate soraiba, az első oszlopba a 32 µg/ml koncentrációjú florfenikol oldatból 180 µl került. Az első oszlopból automata nyolccsatornás pipetta segítségével 90-90 µl folyadékot mértem át a következő oszlopba, elfelezve így a koncentrációkat, majd ezt a folyamatot a 10. oszlopig ismételtem. A 10. oszlopból, amely a kísérletben használt legkisebb koncentrációt tartalmazta, 90-90 µl oldatot eltávolítottam. Az első 10 oszlop területén található oldatok mindegyikébe a tömény baktériumszuszpenziók 24-szers hígítását követően 10 µl baktériumszuszpenziót juttattam, így a kiindulás során minden oldatban nagyjából 10^5 TFE/ml volt a kezdeti baktérium koncentráció. Az utolsó két oszlopot negatív és pozitív kontrollként használtam. A negatív kontroll oszlopba csupán 90 µl CA-MHB leves került, az esetleges bakteriális befertőződés detektálására, míg a pozitív kontrollba oltott baktériumszuszpenzió alapján meghatározhattam, hogy az általam vizsgált baktérium ténylegesen felszaporodott-e a vizsgálat során.

Az elkészült mikroplate-eket 5% CO_2 jelenlétében, 37 °C-on, 24 órán keresztül inkubáltam, majd az inkubációs idő leteltével szabad szemmel olvastam le a MIC-értékeket. Ehhez azt a legkisebb florfenikol koncentrációt választottam ki, amelyben nem detektáltunk jól látható zavarosodást. A 73 izolátum összesített eredményeiből meghatároztam a MIC_{50}, valamint MIC_{90} értékeket.

5.5 *In vitro* ízületi folyadék modell kialakítása

A florfenikol hatékonyságának vizsgálatához egy *in vitro* ízületi folyadék modellt hoztam létre, amelyet a következőképpen építettem fel. A baktériumok szaporításához szükséges ízületi folyadék mintákat a kísérleteket megelőző 24 órán belül vettem le, klinikailag egészséges és kezeletlen sertésekből, amelyektől diagnosztikai célból is vettek ízületi folyadék mintákat. A mintavételek során az ízületek bőrfelszínét megfelelően előkészítettem, vagyis a szőr leborotválását követően fertőtlenítettem majd steril tű és 1 ml-es fecskendő alkalmazásával nyertem ki a szinoviális folyadékot. A fecskendőket ezt követően 4 °C-on hűtve szállítottam, majd labor körülmények között lamináris boksz alatt távolítottam el a tűket a fecskendőkről, ezzel is elkerülve a minták kontaminálódását. Ezt követően minden mintából 10 µl-t véresagaron szélesztettem és 18 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam, hogy az ízületi folyadékok sterilitását ellenőrizzem. A lamináris boksz alatt a mintákat külön-külön steril eppendorf csövekbe helyeztem és hűtőben 4 °C-on tároltam a kísérlet kezdetéig. Abban az esetben, ha fagyasztottam a mintákat, akkor erős gélesedést tapasztaltam, így az ízületi folyadékok alkalmatlanná váltak a további munkafolyamatokhoz.

A kísérlet kezdete előtt ellenőriztem a véresagarok eredményeit és csak azon ízületi folyadék mintákat vontam be a kísérletbe, amelyek sterilek voltak, majd ezen mintákat 9:1 arányban elegyítettem steril fiziológiás sóoldattal (Salsol oldatos infúzió, TEVA Gyógyszergyár Zrt., Debrecen, Magyarország), amellyel a kontroll (0 µg/ml florfenikol) minta kivételével bevittem a megfelelő florfenikol mennyiséget a 2-es alapú hígítási sor kialakításához (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 µg/ml), illetve a szinóviális folyadék könnyebb kezelhetőségének érdekében. Ezen oldatokat alkalmaztam az ölési görbe felállításához.

5.6 *In vitro* ölési görbe szinóvia, szérum és CA-MHB közegben

Az ölési görbe felállításához egy CA-MHB levesben 2 µg/ml-es MIC-értékűre meghatározott *S. suis* izolátumot választottam ki, amelyet a következőkben SS140-nek jelölök. Ennek az izolátumnak később újra meghatároztam a MIC-értékét mind a három közegben, vagyis külön szinóviában, szérumban és CA-MHB levesben. Ezt követően CA-MHB levesben, sertés eredetű szérumban és az előző fejezetben leírt módon előállított sertés eredetű ízületi folyadékban kettes alapú florfenikol hígítási sort készítettem, amely során a 0,125-16 µg/ml-es koncentrációjú oldatokat kaptam. Az SS140 gátlás nélküli szaporodási képességének vizsgálatát mindhárom közegben, florfenikol mentesen végeztem el, amelyeket kontroll görbéknek vettem. Az SS140-es izolátumot egy napig az ölési görbe felállítása előtt egységesen CA-MHB levesben, 18 órán keresztül, 37 ^{o}C-on inkubáltam, hogy a megfelelő baktérium koncentrációt elérjem. A kiindulási koncentráció meghatározásához a tömény baktériumszuszpenzióból 10-es alapú hígítási sort készítettem és minden hígításból 3 párhuzamos véresagarra történő szélesztésével élő baktérium sejtszám meghatározást végeztem az inkubációs idő letelte után, majd az előzőleg elkészített florfenikol-oldatok mindegyikébe tömény baktériumszuszpenziót mértem be úgy, hogy a kiindulási baktérium koncentráció minden esetben $6{,}5*10^4$ volt. Az oldatokat 5% CO_2 jelenlétében, 37^{o}C-on, 24 óráig inkubáltam. A kezdeti koncentráció értékeként $6{,}5*10^4$ TFE/ml értéket kaptam, azonban a számításokhoz ennek a 10-es alapú logaritmikus értékét, 4,81 $\log_{10}$TFE/ml-t használtam. A baktérium beoltástól számított 24 óra leteltével a 3 különböző közeg, minden különböző florfenikol koncentrációjú mintájából 10-es alapú hígítási sort készítettem és minden mintából 3 párhuzamos szélesztést végeztem el véresagaron az élő baktérium sejtszám meghatározáshoz, majd ezt követően újabb 24 órán keresztül, 37 ^{o}C-on inkubáltam a kioltott mintákat. Majd ezt követően a szérumban, a szinóviában és a CA-MHB levesben is meghatároztam a 24 órás élő baktérium sejtszámot a kontrollban és a különböző florfenikol koncentrációkban.

5.7 PK/PD analízis

5.7.1 PK/PD modell felállítása *in vitro* körülmények között (szinóvia, szérum, CA-MHB)

Az SS140-es izolátum ölési görbéiből származó AUC_{24}/MIC adatok modellezésére a szigmodiális E_{max} gátlási egyenletet (1. **egyenlet**, Hill-egyenlet)[53] alkalmaztam a Phoenix WinNonLin 8.1 nem lineáris regressziós szoftver (Certara, Princeton, USA) segítségével az élő baktérium sejtszám log_{10} alapú változásának (log_{10} TFE/ml) és az AUC_{24}/MIC-nek a grafikonjainak előrejelzésére. Ebben az esetben az *in vitro* AUC_{24} értékét az ölési görbék felállítása során alkalmazott florfenikol koncentrációkból számítottam ki 24 órára vetítve, illetve az SS140-es izolátum különböző közegekben (szinóvia, szérum, CA-MHB) meghatározott MIC-értékeit vettem alapul, amelyet az **5. táblázat** mutat be. Ez alapján, ha például a szinóviában a 0,125 µg/ml-es koncentráción, 24 órán keresztül inkubáltam az 1 µg/ml-es MIC-értékű SS140-es izolátumot, akkor AUC_{24} értékét 3 µg/ml*h-nak vettem, illetve az AUC_{24}/MIC értékét 3 órának. A PK/PD (AUC_{24}/MIC) határértékeket a 24 órás inkubációt követően a baktériumok szaporodás gátlásának 2 szintjére határoztam meg: E = 0, vagyis az élősejtszám (TFE/ml) 0 log_{10} csökkenése, amely bakteriosztatikus hatásnak felel meg, az E = -1, vagyis az élősejtszám (TFE/ml) 1 log_{10} csökkenése, amely baktericid hatásnak felel meg Toutain és mtsai. alapján [53].

$$E = E_0 - \frac{E_{max} * C_{(t)}^{Gamma}}{EC_{50}^{Gamma} + C_{(t)}^{Gamma}}$$

1**. egyenlet:** Hill-egyenlet. E= log_{10} alapú élősejtszám változás, E_0=kezdeti, log_{10} alapú baktérium élősejtszám, E_{max}=maximális (válasz) ölési képesség, $C_{(t)}$=AUC_{24}/MIC, EC_{50}= florfenikol in vitro koncentráció, amely a maximális ölési képesség felét képes kifejteni Gamma= Hill-koefficiens (a görbe meredeksége) [53].

5.7.2 PK/PD integráció (AUC_{24hss}/MIC, %T>MIC)

Az *in vivo* kísérletben kapott farmakokinetikai értékek alapján, valamint az *in vitro* antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok eredményeiből kiszámoltam a florfenikol esetében alkalmazott PK/PD indexeket, vagyis meghatároztam az AUC_{24hss}/MIC_{50} és AUC_{24hss}/MIC_{90} értékeket, illetve a %T>MIC_{50} és %T>MIC_{90} értékeket az 2. **egyenlet** alapján.

$$\%T > MIC = LN\left(\frac{Cmax}{MIC}\right) * MRT * \frac{100}{Tau}$$

2**. egyenlet**: %T>MIC kiszámítása. %T>MIC= időtartam, amíg a szabad hatóanyag koncentrációja a MIC érték felett van, MIC= minimális gátló koncentráció, c_{max}= maximális gyógyszer-koncentráció, MRT=hatóanyag átlagos tartózkodási idő, Tau= gyógyszeradagolási intervallum [53].

5.8 Statisztika

A kutatás adatain a Microsoft Excel, illetve a WinNonLin szoftver segítségével végeztem statisztikai elemzéseket, amelyekben átlagot, szórást és standard hibát határoztam meg.

6. Eredmények

6.1 *In vivo* farmakokinetikai kísérlet

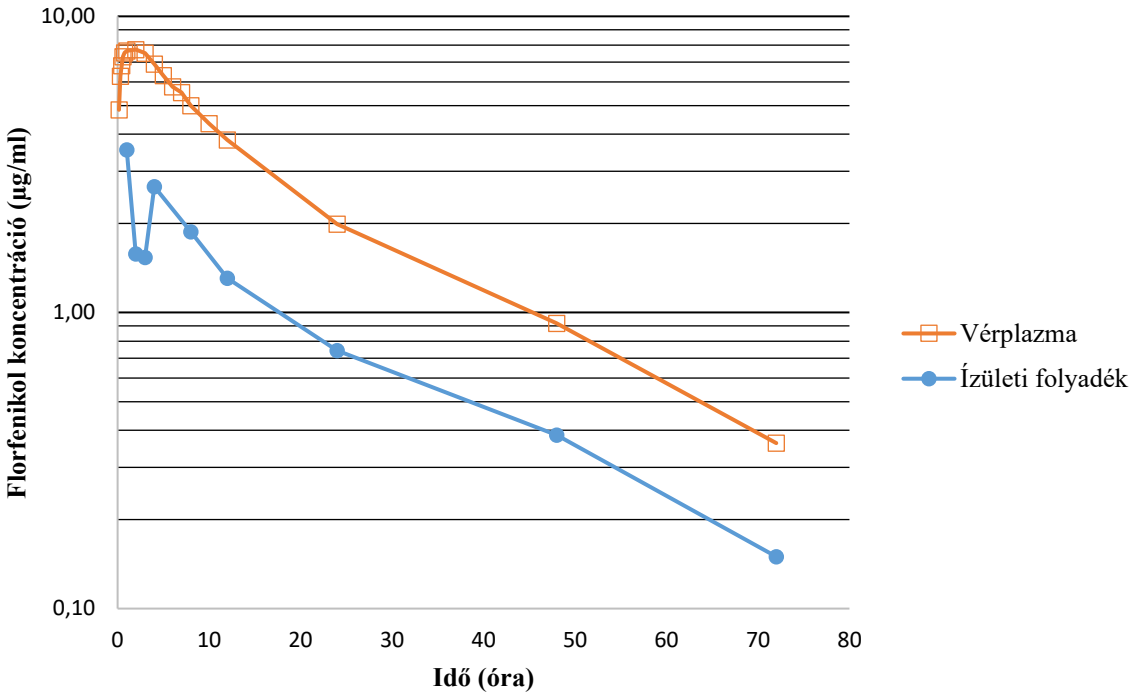
A kísérlet során minden sertés klinikailag egészséges maradt, a tervezett vér- és ízületi folyadék mintavételek sikerrel zárultak.

6.2 Farmakokinetikai paraméterek

A 30 mg/kg dózisban egyszeri alkalommal, intramuszkulárisan beadott florfenikol legfontosabb, sertés vérplazmára és ízületi folyadékra jellemző farmakokinetikai paramétereit (c_{max}, t_{max}, $t_{1/2}$, AUC_{24h}, AUC_{24hss}, $AUC_{0-\infty}$, Cl, $MRT_{0-\infty}$) az **4. táblázat** foglalja össze. Az általam végzett *in vivo* kísérletben a florfenikol a maximális hatóanyag-koncentrációt (c_{max}=8,15 µg/ml) 1,4 óra alatt érte el, az ízületi folyadékban 1,75 óra időpontban mértem a legmagasabb, 4,51 µg/ml florfenikol-koncentrációt. A vérplazmában a felezési idő 17,93 óra, a teljes test *clearance* 0,18 (mg/kg)/(µg/ml) volt, az ízületi folyadékban ezen paramétereket 12,27 órában és 15,80 (mg/kg)/(µg/ml)-ben határoztam meg. Az AUC_{24h} és $AUC_{0-\infty}$ számított értékei a vérplazmában következetesen 104,77 µg/ml*h és 170,34 µg/ml*h, illetve az ízületi folyadékban 44,12 µg/ml*h és 68,14 µg/ml*h voltak. A hatóanyag átlagosan a vérplazmában 25 óráig, az ízületi folyadékban 19,74 óráig tartózkodott. Az **1. ábra** mutatja be a 30 mg/kg dózisban alkalmazott florfenikol koncentráció-idő görbéjét az intramuszkuláris beadást követően, amelyen az ízületi folyadék esetében jól tükröződik a flip-flop kinetika.

4. táblázat: 30 mg/kg dózisban, intramuszkulárisan alkalmazott florfenikol farmakokinetikai paraméterei egyszeri beadást követően sertés vérvérplazmában és ízületi folyadékban. c_{max}= maximális plazmakoncentráció, t_{max}= c_{max} kialakulásához szükséges idő, $t_{1/2}$= felezési idő, AUC_{24h}= 24 órára exprapolált koncentráció-idő görbe alatti terület, $AUC_{0-\infty}$= végtelenre exprapolált koncentráció-idő görbe alatti terület Cl/F= teljes test clearance, MRT=hatóanyag átlagos tartózkodási idő.

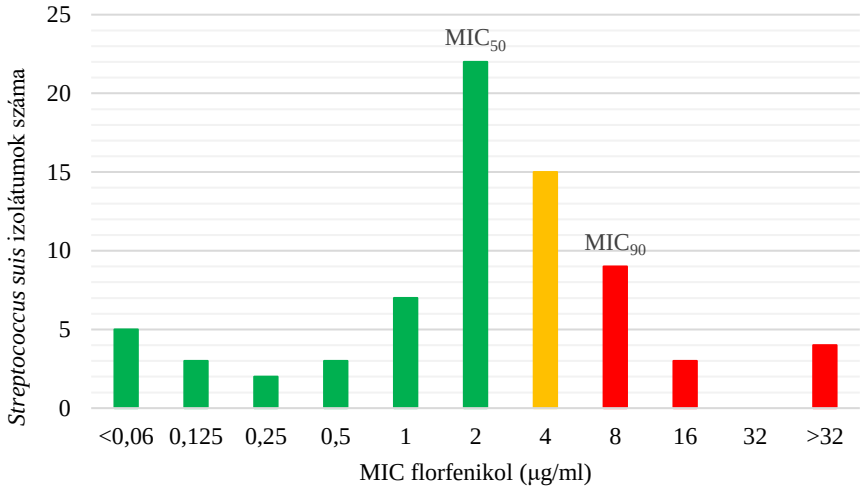
PK értékek	Mértékegység	Vérplazma	Ízületi folyadék
c_{max}	µg/ml	8,15±3,11	4,51±1,16
t_{max}	h	1,40±0,66	1,75±1,16
$t_{1/2}$	h	17,93±11,68	12,27±7,45
AUC_{24h}	µg/ml*h	104,77±21,65	44,12±17,23
$AUC_{0-\infty}$ =AUC_{24hss}	µg/ml*h^2	170,34±31,03	68,14±31,33
Cl/F	(mg/kg)/(µg/ml)	0,18±0,03	15,80±7,88
$MRT_{0-\infty}$	h	25,00±15,18	19,74±12,04



1. ábra: A 30 mg/kg dózisban, egyszeri intramuszkuláris beadással alkalmazott florfenikol koncentráció-idő görbéje sertés vérplazmában és ízületi folyadékban, szemi-logaritmikus skálán ábrázolva.

6.3 A *S. suis* izolátumok florfenikollal szembeni érzékenysége

A 73 darab, sertésekből származó *S. suis* izolátum florfenikol-érzékenységét a **2. ábra** foglalja össze. A vizsgált törzsekből 42 darab, tehát a törzsek 57,5%-a bizonyult érzékenynek 20,5%, azaz 15 darab mutatott mérsékelt érzékenységet, míg 16 törzs, összesen 21,9% mutatott rezisztenciát a florfenikollal szemben a CLSI határértékei alapján [101]. Az izolátumok MIC_{50} és MIC_{90} értéke 2 µg/ml, illetve 8 µg/ml volt.



2. ábra Magyarországi, sertés eredetű *S. suis* izolátumok minimális gátló koncentráció (MIC) értékei a MIC_{50} és MIC_{90} értékekkel megjelölve.

6.4 *In vitro* ízületi folyadék modell kialakítása

Az ölési görbék eredményeit összehasonlítva sikeresen alakítottam ki *in vitro* körülmények között sertés ízületi folyadék modellt, amelyet aztán sikeresen alkalmaztam *S. suis* tenyésztésre, illetve különböző florfenikol koncentrációkon történő dózis-válasz görbe kialakítására és annak elemzésére.

6.5 *In vitro* ölési görbe szinóvia, szérum és CA-MHB közegben

Az *in vitro* ölési görbékben alkalmazott SS140-es izolátum sertés eredetű szinóviában mért MIC-értéke 1 µg/ml, míg a sertés eredetű szérumban, illetve a CA-MHB levesben mért MIC-értéke egységesen 2 µg/ml volt. Az ölési görbék eredményeit az **5. táblázat** mutatja be, amelyben látható, hogy a 3 különböző közegben történő inkubálást követően az SS140-es izolátum $\log_{10}$ alapú élősejtszám változásában (E) sem a kontroll (0 µg/ml florfenikol), sem a florfenikolt különböző koncentrációkon tartalmazó közegekben nem volt szignifikáns eltérés.

5. táblázat: A kísérlet során elvégzett ölési görbe eredményei sertés ízületi folyadék, vérplazma és CH-MHB levesben történő inkubálást követően. $c_{florfenikol}$= florfenikol koncentráció, AUC_{24}= *in vitro* koncentráció-idő görbe alatti terület , MIC= minimális gátló koncentráció, t_0= kiindulási $\log_{10}$ alapú baktérium élősejtszám, t_{24}= 24 óra elteltével mért $\log_{10}$ alapú baktérium élősejtszám.

Közeg	$C_{florfenikol}$	AUC_{24}	AUC_{24}/MIC	t_0	t_{24}	E
	µg/ml	µg/ml*h	h	$\log_{10}$ TFE/ml	$\log_{10}$ TFE/ml	$\log_{10}$ TFE/ml
Szinóvia MIC_{SS140}= 1 µg/ml	0	0	0	4.81	10.49	5.68
	0.125	3	3	4.81	10.45	5.63
	0.25	6	6	4.81	10.29	5.47
	0.5	12	12	4.81	9.55	4.73
	1	24	24	4.81	5.11	0.3
	2	48	48	4.81	4.25	-0.56
	4	96	96	4.81	3.86	-0.96
	8	192	192	4.81	3.46	-1.35
	16	384	384	4.81	2.6	-2.21
Szérum MIC_{SS140}= 2 µg/ml	0	0	0	4.81	9.4	4.59
	0.125	3	1.5	4.81	9.05	4.24
	0.25	6	3	4.81	8.3	3.48
	0.5	12	6	4.81	8.24	3.43
	1	24	12	4.81	7.05	2.24
	2	48	24	4.81	4.31	-0.51
	4	96	48	4.81	4.3	-0.51
	8	192	96	4.81	3.83	-0.99
	16	384	192	4.81	3.08	-1.73
CA-MHB MIC_{SS140}= 2 µg/ml	0	0	0	4.81	9.25	4.44
	0.125	3	1.5	4.81	10.12	5.31
	0.25	6	3	4.81	9.32	4.51
	0.5	12	6	4.81	8.1	3.28
	1	24	12	4.81	6.31	1.49
	2	48	24	4.81	4.09	-0.73
	4	96	48	4.81	3.99	-0.82
	8	192	96	4.81	3.78	-1.03
	16	384	192	4.81	3.51	-1.31

6.6 PK/PD analízis

6.6.1 PK/PD modell *in vitro* körülmények között

A szigmodális E_{max} gátlási egyenlet (1. **egyenlet**) alapján meghatároztam a különböző közegekben PK/PD határértékeket, vagyis azokat az AUC_{24}/MIC határértékeket, ahol a florfenikol a fertőzés helyén feltételezhetően bakteriosztatikus hatást ér el (E = 0), illetve ahol nem immunszupresszált egyedekben baktericid hatást ér el (E = -1). Az egyenlet eredményeit a **6. táblázat** mutatja be.

6. táblázat: A szigmoidális E_{max} gátlási egyenlet alapján meghatározott PK/PD határértékek sertés ízületi folyadékban, szérumban illetve CA-MHB levesben. E_{max}=maximális (válasz) ölési képesség, EC_{50}= florfenikol in vitro koncentráció, amely a maximális ölési képesség felét képes kifejteni E_0=kezdeti baktérium élősejtszám, Gamma= Hill-koefficiens (a görbe meredeksége).

Paraméter	Mérték-egység	Ízületi folyadék		Szérum		CA-MHB	
		Átlag	Standard hiba	Átlag	Standard hiba	Átlag	Standard hiba
Emax	1/h	6,98	0,43	5,69	0,58	6,03	0,38
EC50	mg/l	18,44	1,75	14,03	2,53	10,18	1,09
E0	-	5,65	0,32	4,28	0,35	4,85	0,26
Gamma	-	4,05	1,10	1,93	0,61	2,33	0,51
AUC_{24}/MIC bakteriosztatikus hatás (E = 0)	h	26,42	-	25,02	-	18,81	-
AUC24/MIC baktericid hatás (E = -1)	h	38,83	-	53,05	-	46,24	-

6.6.2 PK/PD integráció (AUC_{24hss}/MIC, %T>MIC)

A PK/PD integrációval meghatároztam a 30 mg/kg dózisban, intramuszkulárisan alkalmazott florfenikol, 24 órára kivetített állandósult gyógyszer-koncentrációja mellett a sertés vérplazmában és ízületi folyadékban az AUC_{24hss}/MIC_{50} és AUC_{24hss}/MIC_{90} indexek, illetve a %T>MIC_{50} és %T>MIC_{90} indexek értékeit, amely eredményeket a **7. táblázat** mutatja be.

7. táblázat*:* 73 *S. suis* izolátum MIC_{50} (2 µg/ml) és MIC_{90} (8 µg/ml) értékeire integrált PK/PD indexek a florfenikol állandósult gyógyszer-koncentrációjára nézve, 24 órára, sertés vérplazmában és ízületi folyadékban, 30 mg/kg dózisban, egyszeri intramuszkuláris beadást követően.

	PK/PD index	Mértékegység	Eredmény
Vérplazma	%T>MIC_{50}	-	117,04 ± 43,60
	%T>MIC_{90}	-	-27,34±54,96
	AUC_{24hss}/MIC_{50}	h	85,17±15,52
	AUC_{24hss}/MIC_{90}	h	21,29±3,88
Ízületi folyadék	%T>MIC_{50}	-	59,45±37,49
	%T>MIC_{90}	-	-54,56±50,18
	AUC_{24hss}/MIC_{50}	h	34,07±15,67
	AUC_{24hss}/MIC_{90}	h	8,52±3,92

7. Megbeszélés/Következtetések

Kutatásomban, 30 mg/kg dózisban, intramuszkulárisan, egyszer alkalmazott florfenikol farmakokinetikai tulajdonságait vizsgáltam sertés vérplazmában és ízületi folyadékban. Elsőként a hatóanyag farmakokinetikai paramétereit határoztam meg *in vivo* kísérlet során, mely adatok nem mutatnak jelentős eltérést a nemzetközi szakirodalomban található adatoktól. A vérplazmában mért c_{max} 8,15 ± 3,11 µg/ml volt, ezt 1,40 ± 0,66 óra alatt érte el. Ez az érték nagyobb, mint a korábbi, ugyanezen adagolás alapján alkalmazott florfenikolról szóló, Lei és mtsai. által publikált értéknél, ahol a c_{max} 4,44 ± 1,02 µg/ml volt és ezt 4 ± 1,34 óra alatt érte el (t_{max}) [46]. A felezési idő az ugyanezen publikációban meghatározott értékhez ($t_{1/2}$=14,46 ± 1,84 h) [46] hasonló volt, mivel a kutatásomban 17,93 ± 11,68 óra értéket határoztam meg. A koncentráció-idő görbe alatti területek vonatkozásában is a korábban leírt adatokhoz hasonló értékeket kaptam a kísérlet során, Lei és mtsai 88,85 ± 6,72 µg/ml*h AUC_{24h} és 158,56 ± 13,46 µg/ml*h értékekről számoltak be [46], a kísérletemben ugyanezen paraméterekre 104,77 ± 21,65, illetve 170,34 ± 31,01 µg/ml*h értékeket számítottam ki. A hatóanyag átlagos tartózkodási idejében (MRT=26,11 ± 3,24 h) [46] sem kaptam szignifikánsan eltérő adatokat, a florfenikol átlagosan 25,00 ± 15,18 órát tartózkodott a vizsgált sertések vérplazmájában.

Sertés ízületi folyadékban vizsgált farmakokinetikai adatokat eddig még csak 15 mg/kg dózisban, intramuszkulárisan alkalmazott florfenikol esetén publikáltak [43]. Ebben az alkalmazási módban a 2,73 ± 1,2 µg/ml maximális gyógyszer-koncentráció 3,4 ± 1,67 óra alatt alakult ki [43]. 30 mg/kg dózis esetén 4,51 ± 1,16 µg/ml maximális gyógyszer-koncentráció (c_{max}) értéket határoztam meg, amelynek kialakulásához (t_{max}) 1,75 ± 1,16 órára volt szükség. A korábban publikált kisebb dózisú alkalmazási módban a felezési idő ($t_{1/2}$) 21,01 ± 13,19 óra volt, és a florfenikol átlagosan 27,39 ± 17,16 órát (MRT) tartózkodott a sertés ízületi folyadékban [43]. A kutatásom során ezen paraméterek értékei 12,27 ± 7,45 óra felezési idő ($t_{1/2}$), illetve 19,74 ± 12,04 átlagos hatóanyag tartózkodási idő (MRT) volt.

A florfenikol 15 mg/kg dózisban, intramuszkuláris alkalmazásban történő használatáról szóló korábbi publikációban [43] feltételezték, hogy az állandósult plazmakoncentráció melletti AUC_{24hss} érték akkor valósulhat meg a sertések szervezetében, ha 30 mg/kg feltőtő dózis után alkalmazzák a hosszú hatástartamú florfenikol készítményeket, majd 24 óránként 15 mg/kg fenntartó dózisban. Ez a kísérletemben számított AUC_{24hss} vérplazában (170,34 ± 31,03 µg/ml*h) és ízületi folyadékban mért (68,14 ± 31,33 µg/ml*h) értékek alapján továbbra is feltételezhető.

Egy másik korábbi publikációban, egészséges és klinikai *arthritis* tüneteit mutató lovakban, amoxicillinnel történő kutatás során az ízületi folyadékban nagyobb és tovább tartó hatóanyag koncentrációkat mértek az ízületgyulladásban szenvedő egyedek esetén, mint az egészséges ló ízületi folyadékban [102]. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a florfenikol is képes hosszabb ideig és nagyobb gyógyszer-koncentráció értékeket elérni klinikai *acut arthritis* esetén, ami még hatékonyabbá teheti a florfenikollal történő kezelést.

A 73 db, magyarországi, sertés eredetű, klinikai elváltozásokat okozó *S. suis* izolátum MIC értékei az eddigi publikációkban megjelentekhez hasonló eloszlást mutatnak. Eszerint az általam vizsgált hazai izolátumok 6,8%-a, 5 db rendelkezett <0,06 µg/ml MIC-értékkel, 4,1%-a, azaz 3 db MIC-értéke 0,125 µg/ml volt. Kettő db, vagyis a vizsgált izolátumok 2,7%-a esetén a MIC-érték 0,25 µg/ml volt, míg 4,1%, azaz 3 db esetén volt 0,5 µg/ml .1 µg/ml MIC-értékű volt az izolátumok 9,6%-a (7 db), míg 30,1%, azaz 22 izolátum szaporodásának gátlásához 2 µg/ml minimális florfenikol koncentráció volt szükséges. A CLSI [101] határértékei alapján mérsékelt érzékenységet jelentő, 4 µg/ml MIC-értéket határoztam meg az izolátumok 20,5%-ánál (15 db). Rezisztensnek bizonyult florfenikollal szemben 16 izolátum, amelyek közül 9 db, azaz a vizsgálatban szereplő összes baktérium 12,3%-a esetén a MIC-érték 8 µg/ml, 4,1%-a (3 db) esetén 16 µg/ml, valamint 5,5%-ban 32 µg/ml értéknél nagyobb MIC-értéket határoztam meg. Így összesen a vizsgált baktériumok több, mint fele, vagyis 57,5%-a érzékenységet, 20,5%-a mérsékelt érzékenységet, valamint 21,9% rezisztenciát mutatott a florfenikollal szemben. Az Amerikai Egyesült Államokban végzett kutatásban az izolátumok 2 és 4 µg/ml MIC értékeket mutattak [63]. Thaiföld területén 2018-2020 között végeztek nagyszabású felmérést, 246 db *S. suis* törzs érzékenységét vizsgálva különböző antibakteriális hatóanyagokra. Ebben a kutatásban a MIC-értékek 1 µg/ml és 16 µg/ml közöttiek voltak, a minták több, mint 50%-a rezisztensnek bizonyult florfenikollal szemben a CLSI iránymutatása alapján [101, 103]. Az U.S.A. területén a MIC_{50} és a MIC_{90} értékek is a mérsékelten érzékeny kategóriába tartozó 4 µg/ml értékűek voltak [63]. A Thaiföldön vizsgált baktérium-populációknak 4 µg/ml volt a MIC_{50} és 8 µg/ml a MIC_{90} értéke [103]. A kutatási eredményeink és a felsorolt publikációk alapján is kijelenthető, hogy a *S. suis* okozta fertőzések kezelését nem ajánlott megfelelő, mikrohígításos módszeren alapuló antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok folyamatos monitoringszerű elvégzése nélkül alkalmazni.

A florfenikol hatékonyságát *S. suis* baktériummal szemben egy *in vitro* modell segítségével végeztem, egy úgynevezett ölési görbe felállításával sertés ízületi folyadék, sertés szérum és CA-MHB közegekben. Ehhez az SS140 jelölésű *S. suis* izolátumot választottam ki referencia baktériumtörzsként. Toutain és mtsai. [53] publikációja alapján az eltérő közegek befolyásolhatják a baktérium minimális gátló koncentráció értékét az antibakteriális szerekkel szemben, így mindhárom folyékony „táptalajban" külön-külön meghatároztam az SS140 izolátum MIC-értékét. A szinóviában ennek eredménye 1 μg/ml, szérum és CA-MHB leves esetén pedig 2 μg/ml volt, ezek nem számítanak szignifikáns eltérésnek. A kiindulási baktérium élősejtszám meghatározást szélesztéssel végeztem, ennek $\log_{10}$ értékét (4,81 $\log_{10}$ TFE/ml), valamint a korábbi, *in vitro* kísérletben meghatározott farmakokinetikai értékeket használtam fel a bakteriosztatikus valamint baktericid hatáshoz szükséges AUC_{24}/MIC határértékek meghatározására a Hill-egyenlet alapján. A kísérletben kapott adatok alapján Lei és mtsai publikációjával [46] ellentétben a florfenikolra vetítve nem tudtuk meghatározni a 3 nagyságrendű baktériumszám csökkenést jelentő baktericid hatáshoz, illetve 4 nagyságrendű csökkenésben meghatározott eradikációs képességhez szükséges AUC_{24}/MIC értéket. Toutain és mtsai. [53] publikációjukban azonban kimondják, hogy immunszupresszió jelenléte nélkül a humángyógyászathoz hasonlóan az állatorvoslásban is alkalmazható a PK/PD számításokban az E= -1 érték használata a baktericid hatás előrejelzéséhez. Ennek eredményeképp a baktérium szaporodás megakadályozásához (E = 0) szükséges 26,42 óra nagyságú AUC_{24}/MIC határértéket, míg a baktérium élősejtszám 1 $\log_{10}$ mennyiségű csökkenését jelentő (E = -1), megfelelő immunstátuszú állatokban baktericid hatás kifejtéséhez 38,83 óra AUC_{24}/MIC határértéket határoztam meg a szinóviában, míg a vérplazmában ugyan ezen értékek 25,02 óra (E = 0) és 53,05 óra (E = -1) volt. Sertések esetében a megfelelő immunstátusz alatt a nagy gazdasági kártételeket okozó fertőző megbetegedésektől mentes állományokat értjük, illetve egyedszinten értelmezve a azon *S. suis* okozta megbetegedéseket, ahol más fertőző ágens jelenléte nem feltételezhető, illetve a tartás- és takarmányozás technológiája sem kifogásolható.

A kísérletemben, a hazai *S. suis* izolátumok esetén meghatározott 2 μg/ml-es MIC_{50} érték integrálásával a PK/PD analízis alapján kijelenthetjük, hogy a florfenikol 30 mg/kg dózisban, intramuszkulárisan alkalmazva, a vérplazmában elért 85,17 ± 15,52 óra AUC_{24hss}/MIC_{50} érték megvalósulásával feltételezhetjük a baktericid hatást a sertések szervezetében, míg sertés izületi folyadékban, 34,07 ± 15,67 AUC_{24hss}/MIC_{50} értékkel csak a bakteroisztatikus hatás várható el a fertőzés helyén. A 8 μg/ml-es MIC_{90} érték integrálása esetén sem a vérplazmában (AUC_{24hss}/MIC_{90}= 21,29 ± 3,88 h), sem az ízületi folyadékban (AUC_{24hss}/MIC_{90}= 8,52 ± 3,92 h) nem tudjuk elérni a bakteriosztatikus hatáshoz szükséges PK/PD határértéket, ami felhívja a figyelmet az antibakteriális szerek használata előtti antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok szükségszerűségére.

A florfenikol tartalmú engedélyezett állatgyógyászati készítmények ajánlott dózisa 15 mg/kg, im., 48 óránként, vagyis a kísérletemben alkalmazott 30 mg/kg dózis eltér az engedélyezett adagolástól, így ebben az alkalmazási módban már az állatorvos felelősége meghatározni az élelmezés-egészségügyi várakozási időt. A kísérletben alkalmazott készítmény a florfenikol tartalmú készítmények közül az eredeti, így a kapott információk alkalmazhatóak a florfenikol tartalmú generikum készítményekre is *S. suis* okozta szeptikémia és ízületgyulladás kezelése esetén, amellyel kapcsolatban összeségében az jelenthető ki az eddigi szakirodalmi adatok és kutatásom eredményei alapján, hogy a *S. suis* okozta fertőzések kezelésében a florfenikol alkalmazása csak pontos, mikrohígításos módszerrel történő antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokra (MIC-érték meghatározás) alapozhatóak, mivel a *S. suis* törzsek érzékenysége a florfenikollal szemben nagyon szűk határok között mozog. A mikrohígításos módszerekre a PK/PD határértékek alkalmazhatóságához van szükség, mivel ez alapján lehet felhasználni az ízületi fertőzésekből és szeptikémiákból izolált *S. suis* törzsek okozta megbetegedések kezeléséhez, amelyre a hosszan fenntartható antibakteriális terápiák miatt van szükség, illetve ezzel csökkenthető a florfenikollal szemben rezisztens *S. suis* baktériumtörzsek szelekciójának esélye a sertések esetében, melynek köz- és állategészségügyi jelentősége kiemelkedő.

8. Összefoglaló

A florfenikol a fenikolok csoportjába tartozó, széles antibakteriális spektrummal rendelkező hatóanyag, amely a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumokkal szemben is bakteriosztatikus hatásmóddal rendelkezik. Kiváló felszívódása mellett kiválóan megoszlik a szervezetben, így a speciális membránokon is képes átlépni. Kutatásom elsődleges célja, hogy a nagy dózisban (30 mg/kg), intramuszkulárisan alkalmazott florfenikol farmakokinetikai tulajdonságait meghatározzam sertés ízületi folyadékban, illetve ennek az alkalmazási módnak a jelentőségét vizsgáljam a *Streptococcus suis* okozta ízületgyulladások kezelésében.

A vizsgálatokat 8 db, 28,93±3,64 kg testtömegű Danbred ártány sertéssel végeztem el, amelyben a florfenikol dózisát az engedélyezett készítmények használati leírásától eltérően 15 mg/kg helyett 30 mg/kg dózisban határoztam meg, egyszeri, intramuszkuláris beadási móddal. A kísérlet állat fázisában vérplazma és ízületi folyadék mintákat gyűjtöttem egy alkalommal a gyógyszerbeadást megelőzően, illetve azt követően a farmakokinetikai görbe elkészítéséhez szükséges időpontokban. A mintákban a florfenikol koncentrációját folyadékkromatográfia-tömegspektrometria segítségével határoztam meg, többszörös reakciókövetési módban, amely a módszer megfelelő érzékenységét és szelektivitását biztosította.

A florfenikol a beadást követően 1,40±0,66 órával (t_{max}) érte el a maximális plazmakoncentrációt (C_{max}=8,15±3,11 µg/ml), míg az ízületi folyadékban 1,75±1,16 óra (t_{max}) elteltével (C_{max}=4,51±1,16 µg/ml). A vérvérplazmában a felezési idő ($t_{1/2}$) 17,93±11,68 óra, míg az ízületi folyadékban 12,27±7,45 óra. A görbe alatti terület értéke 24 órára kivetítve (AUC_{24h}) a vérvérplazmában 104,77±21,56 µg/ml*h, míg az ízületi folyadékban 44,12±17,23 µg/ml*h.

A farmakokinetikai vizsgálatokat követően 73 db, sertés eredetű *Streptococcus suis* izolátumnak határoztam meg a minimális gátló koncentráció értékét (MIC) florfenikollal szemben mikrohígításos módszert alkalmazva. A MIC-értékek alapján kiszámoltam a MIC_{50} (2 µg/ml) és MIC_{90} (8 µg/ml) értékét. A farmakokinetikai és farmakodinámiai adatok felhasználásával elvégeztem a %T>MIC és az AUC_{24h}/MIC meghatározását, amelyek alapján a florfenikolra nézve 2 µg/ml-es vagy annál kisebb MIC-értékű *S. suis* törzsekkel szemben a florfenikol 30 mg/kg dózisban, intramuszkulárisan alkalmazva baktericid hatást is képes kifejteni szeptikémia esetén, míg ízületigyulladás esetén csak bakteriosztatikus hatást képes kifejteni.

9. Summary

Florfenicol is a low molecular weight drug from the phenicol group with a wide antibacterial spectrum, which has a bacteriostatic mode of action against both Gram-positiv and Gram-negative bacteria. It is excellently absorbed after intramuscular, subcutaneous and oral administration and similarly, it is excellently distributed throughout the body, so it can also cross special membranes. The primary goal of my research is to determine the pharmakokinetic properties of florfenicol administered intramuscularly in high doses (30 mg/kg) in pig synovial fluid and to investigate the importance of this method of application in the treatment of arthritis caused by *Streptococcus suis*.

The studeis were carried out with 8 Danbred pigs weighing 28.93 ± 3.64 kg, in with the dose of florfenicol was determined at 30 mg/kg instead of 15 mg/kg, using the intramuscular route of administration once, contrary to the description of the use of the approved preparations. In the animal phase of the experiment, plasma and synovial fluid samples were collected once before and at the following times after drug administration: 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes and 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48, 72 hours for the plasma and 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72 hours for the synovial fluid respectively. The concentration in the plasma and the synovial fluid was determined usin liquid chromatography-mass spectometry (LC-MS/MS) in multiple reaction tracking mode (MRM), which ensured sufficient sensitivity and selectivity of the method.

Florfenicol reached its maximum concentration in plasma at 1.75± 0.66 hours (t_{max}) after administration (c_{max}= 8.15±3.11 μg/ml) while in the synovial fluid the t_{max} was 1.75±1.16 hours (c_{max}=4.51 ±1.16 μg/ml). In the plasma the half-life ($t_{1/2}$) was 17.93±11.68 hours, while in the synovial fluid it wqas 12.27±7.45 hours. The area under the curve projected over 24 hours (AUC_{24h}) is 104.77±21.56 μg/ml*h in the plasma and 44.12±17.23 μg/ml*h in the synovial fluid.

Following the pharmacokinetic studies, the sensitivity of 73 *Streptococcus suis* isolates of porcine origin to florfenicol was determined using a microdilution method, resulting in minimum inhibitory concentration (MIC) values. Based on the MIC values, I calculated the values of MIC_{50} (2 μg/ml) and MIC_{90} (8 μg/ml). Using pharmacokinetic and pharmacodynamic data, %T>MIC and AUC_{24h}/MIC were performed from the PK/PD integrations according to which, compared to *S. suis* strains with a MIC of 2 μg/ml or less for florfenicol, it can also exert a bactericidal effect at the dose of 30 mg/kg administerred intramuscularly in the case of septicaemia, while in arthritis it can only have a bacteriostatic effect against strains of *S. suis* below the MIC value 2 μg/ml.

10. Irodalomjegyzék

1. Ehrlich J, Bartz QR, Smith RM, Joslyn DA, Burkholder PR (1947) Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. Science 106:417. https://doi.org/10.1126/science.106.2757.417
2. Riviere JE, Papich MG (2017) Veterinary pharmacology and therapeutics, Tenth edition. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ
3. Dowling PM (2013) Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM (eds) Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 1st ed. Wiley, pp 269–277
4. Abd El-Aty AM, Goudah A, Abo El-Sooud K, El-Zorba HY, Shimoda M, Zhou HH (2004) Pharmacokinetics and bioavailability of florfenicol following intravenous, intramuscular and oral administrations in rabbits. Vet Res Commun 28:515–524. https://doi.org/10.1023/b:verc.0000040241.06642.49
5. Varma KJ, Adams PE, Powers TE, Powers JD, Lamendola JF (1986) Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. J Vet Pharmacol Ther 9:412–425. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1986.tb00062.x
6. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev 28:519–542. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001
7. Cloeckaert A, Baucheron S, Flaujac G, Schwarz S, Kehrenberg C, Martel JL, Chaslus-Dancla E (2000) Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the floR gene in Escherichia coli isolated from cattle. Antimicrob Agents Chemother 44:2858–2860. https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2858-2860.2000
8. Doublet B, Schwarz S, Kehrenberg C, Cloeckaert A (2005) Florfenicol resistance gene floR is part of a novel transposon. Antimicrob Agents Chemother 49:2106–2108. https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2106-2108.2005
9. de Craene BA, Deprez P, D'Haese E, Nelis HJ, Van den Bossche W, De Leenheer P (1997) Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves. Antimicrob Agents Chemother 41:1991–1995. https://doi.org/10.1128/AAC.41.9.1991
10. Lobell RD, Varma KJ, Johnson JC, Sams RA, Gerken DF, Ashcraft SM (1994) Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. J Vet Pharmacol Ther 17:253–258. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1994.tb00241.x

11. Singer RS, Patterson SK, Meier AE, Gibson JK, Lee HL, Maddox CW (2004) Relationship between Phenotypic and Genotypic Florfenicol Resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 48:4047–4049. https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.4047-4049.2004
12. Foster DM, Martin LG, Papich MG (2016) Comparison of Active Drug Concentrations in the Pulmonary Epithelial Lining Fluid and Interstitial Fluid of Calves Injected with Enrofloxacin, Florfenicol, Ceftiofur, or Tulathromycin. PLoS One 11:e0149100. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149100
13. Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM (2005) A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. J Dairy Sci 88:2991–2999. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72979-9
14. Pentecost RL, Niehaus AJ, Werle NA, Lakritz J (2013) Pharmacokinetics of florfenicol after intravenous and intramuscular dosing in llamas. Res Vet Sci 95:594–599. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.009
15. King SB, Doucette KP, Seewald W, Forster SL (2018) A randomized, controlled, single-blinded, multicenter evaluation of the efficacy and safety of a once weekly two dose otic gel containing florfenicol, terbinafine and betamethasone administered for the treatment of canine otitis externa. BMC Vet Res 14:307. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1627-5
16. Xiao X, Lan W, Zhao Y, Li R, Liu Y, Liu J, Wang Z (2020) In vivo Pharmacokinetic and Pharmacodynamic (PK/PD) Modeling and Establishment of the PK/PD Cutoff of Florfenicol Against Pasteurella multocida in Ducks. Front Microbiol 11:616685. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616685
17. van den Anker J, Reed MD, Allegaert K, Kearns GL (2018) Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. The Journal of Clinical Pharmacology 58:S10–S25. https://doi.org/10.1002/jcph.1284
18. Patel K, M.J. Kirkpatrick C (2011) Pharmacokinetic Concepts Revisited - Basic and Applied. CPB 12:1983–1990. https://doi.org/10.2174/138920111798808400
19. Somogyi Z, Karancsi Z, Jerzsele Á (2018) Farmakokinetika/farmakodinámia (PK/PD) megközelítés az állatgyógyászatban. Magyar Állatorvosok Lapja 140:37–46
20. Ali BH, Al-Qarawi AA, Hashaad M (2003) Comparative plasma pharmacokinetics and tolerance of florfenicol following intramuscular and intravenous administration to camels, sheep and goats. Vet Res Commun 27:475–483. https://doi.org/10.1023/a:1025741724701
21. Anadón A, Martínez MA, Martínez M, Ríos A, Caballero V, Ares I, Martínez-Larrañaga MR (2008) Plasma and Tissue Depletion of Florfenicol and Florfenicol-amine in Chickens. J Agric Food Chem 56:11049–11056. https://doi.org/10.1021/jf802138y

22. Atef M, el-Gendi AY, Aziza MM, Abd El-Aty AM (2000) Pharmacokinetic properties of florfenicol in Egyptian goats. Dtsch Tierarztl Wochenschr 107:147–150
23. Balcomb CC, Angelos JA, Chigerwe M, Byrne BA, Lane VM, Wetzlich SE, Sahin O, Holler L, Zhang S, Tell LA (2018) Comparative pharmacokinetics of two florfenicol formulations following intramuscular and subcutaneous administration to sheep. Am J Vet Res 79:107–114. https://doi.org/10.2460/ajvr.79.1.107
24. Cook AL, St Claire M, Sams R (2004) Use of florfenicol in non-human primates. J Med Primatol 33:127–133. https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2004.00063.x
25. Holmes K, Bedenice D, Papich MG (2012) Florfenicol pharmacokinetics in healthy adult alpacas after subcutaneous and intramuscular injection. J Vet Pharmacol Ther 35:382–388. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01323.x
26. Gaikowski MP, Wolf JC, Endris RG, Gingerich WH (2003) Safety of Aquaflor (florfenicol, 50% type A medicated article), administered in feed to channel catfish, Ictalurus punctatus. Toxicol Pathol 31:689–697. https://doi.org/10.1080/01926230390241828
27. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL (2005) Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 55:601–607. https://doi.org/10.1093/jac/dki079
28. Currie GM (2018) Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. J Nucl Med Technol 46:221–230. https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199638
29. Brock-Utne JG, Kingston HG (1980) Basic pharmacokinetics. S Afr Med J 58:361–365
30. Zhang Q, Tang S-S, Qian M-Y, Wei L, Zhou D, Zhang Z-J, He J-K, Zhang Q-J, Zhu P, Xiao X-L (2016) Nanoemulsion formulation of florfenicol improves bioavailability in pigs. J Vet Pharmacol Ther 39:84–89. https://doi.org/10.1111/jvp.12230
31. Jiang H-X, Zeng Z-L, Chen Z-L, Liu JJ, Fung K-F (2006) Pharmacokinetics of florfenicol in pigs following intravenous, intramuscular or oral administration and the effects of feed intake on oral dosing. J Vet Pharmacol Ther 29:153–156. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2006.00727.x
32. Liu J, Fung K-F, Chen Z, Zeng Z, Zhang J (2003) Pharmacokinetics of florfenicol in healthy pigs and in pigs experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 47:820–823. https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.820-823.2003
33. Toutain PL, Bousquet-Mélou A (2004) Plasma terminal half-life. J Vet Pharmacol Ther 27:427–439. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x

34. Sekkin S, Gokbulut C, Kum C, Karademir U (2012) Plasma disposition of enrofloxacin following intravenous and intramuscular administration in donkeys. Vet Rec 171:447. https://doi.org/10.1136/vr.100653
35. Halleran JL, Minch R, Slyvester HJ, Jacob ME, Prange T, Baynes R, Foster DM (2021) Comparison of the Intestinal Pharmacokinetics of Two Different Florfenicol Dosing Regimens and Its Impact on the Prevalence and Phenotypic Resistance of E. coli and Enterococcus over Time. Microorganisms 9:1835. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091835
36. Sidhu P, Rassouli A, Illambas J, Potter T, Pelligand L, Rycroft A, Lees P (2014) Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration and modelling of florfenicol in calves. J Vet Pharmacol Ther 37:231–242. https://doi.org/10.1111/jvp.12093
37. Gilliam JN, Streeter RN, Papich MG, Washburn KE, Payton ME (2008) Pharmacokinetics of florfenicol in serum and synovial fluid after regional intravenous perfusion in the distal portion of the hind limb of adult cows. ajvr 69:997–1004. https://doi.org/10.2460/ajvr.69.8.997
38. Pentecost RL, Niehaus AJ, Werle N, Lakritz J (2015) Absorption and disposition of florfenicol after intravenous, intramuscular and subcutaneous dosing in alpacas. Res Vet Sci 99:199–203. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.02.006
39. Hu D, Zhang T, Zhang Z, Wang G, Wang F, Qu Y, Niu Y, Liu S (2014) Toxicity to the hematopoietic and lymphoid organs of piglets treated with a therapeutic dose of florfenicol. Veterinary Immunology and Immunopathology 162:122–131. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.10.014
40. Sieroslawska. A, Studnicka M, Siwicki AK, Bownik A, Rymuszka A, Słonka J (1998) Antibiotics and Cell - Mediated Immunity in Fish - in Vitro Study. Acta Vet Brno 67:329–334. https://doi.org/10.2754/avb199867040329
41. Kim M-H, Gebru E, Chang Z-Q, Choi J-Y, Hwang M-H, Kang E-H, Lim J-H, Yun H-I, Park S-C (2008) Comparative Pharmacokinetics of Tylosin or Florfenicol after a Single Intramuscular Administration at Two Different Doses of Tylosin-Florfenicol Combination in Pigs. J Vet Med Sci 70:99–102. https://doi.org/10.1292/jvms.70.99
42. Kim E-Y, Gebru E, Lee J-S, Kim J-C, Park S-C (2011) Pharmacokinetics of a Florfenicol-Tylosin Combination after Intravenous and Intramuscular Administration to Beagle Dogs. J Vet Med Sci 73:463–466. https://doi.org/10.1292/jvms.10-0243
43. Somogyi Z, Mag P, Kovács D, Kerek Á, Szabó P, Makrai L, Jerzsele Á (2022) Synovial and Systemic Pharmacokinetics of Florfenicol and PK/PD Integration against

Streptococcus suis in Pigs. Pharmaceutics 14:109. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010109

44. Yang B, Gao JD, Cao XY, Wang QY, Sun GZ, Yang JJ (2017) Lung microdialysis study of florfenicol in pigs after single intramuscular administration. J Vet Pharmacol Ther 40:530–538. https://doi.org/10.1111/jvp.12387
45. McKellar QA, Varma KJ (1996) Pharmacokinetics and tolerance of florfenicol in Equidae. Equine Vet J 28:209–213. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb03774.x
46. Lei Z, Liu Q, Yang S, Yang B, Khaliq H, Li K, Ahmed S, Sajid A, Zhang B, Chen P, Qiu Y, Cao J, He Q (2018) PK-PD Integration Modeling and Cutoff Value of Florfenicol against Streptococcus suis in Pigs. Frontiers in Pharmacology 9:
47. Park B-K, Lim J-H, Kim M-S, Hwang Y-H, Yun H-I (2008) Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. Res Vet Sci 84:85–89. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.001
48. Lei Z, Liu Q, Khaliq H, Cao J, He Q (2019) Resistant cutoff values and optimal scheme establishments for florfenicol against Escherichia coli with PK-PD modeling analysis in pigs. J Vet Pharmacol Ther 42:324–335. https://doi.org/10.1111/jvp.12754
49. Clancy CJ, Nguyen MH (2020) Buying Time: The AMR Action Fund and the State of Antibiotic Development in the United States 2020. Open Forum Infect Dis 7:ofaa464. https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa464
50. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathog Glob Health 109:309–318. https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030
51. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA), European Medicines Agency (EMA) (2017) ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. EFS2 15:. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4872
52. Toutain P-L, Sidhu PK, Lees P, Rassouli A, Pelligand L (2019) VetCAST Method for Determination of the Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Cut-Off Values of a Long-Acting Formulation of Florfenicol to Support Clinical Breakpoints for Florfenicol Antimicrobial Susceptibility Testing in Cattle. Front Microbiol 10:1310. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01310
53. Toutain P, Pelligand L, Lees P, Bousquet-Mélou A, Ferran AA, Turnidge JD (2021) The pharmacokinetic/pharmacodynamic paradigm for antimicrobial drugs in veterinary

medicine: Recent advances and critical appraisal. J vet Pharmacol Therap 44:172–200. https://doi.org/10.1111/jvp.12917

54. Jones ML, Washburn KE, Fajt VR, Rice S, Coetzee JF (2015) Synovial fluid pharmacokinetics of tulathromycin, gamithromycin and florfenicol after a single subcutaneous dose in cattle. BMC Vet Res 11:26. https://doi.org/10.1186/s12917-015-0346-4
55. Garner C, Rosner B, Finland M (1975) Disk diffusion and serial dilution tests of susceptibility of some pathogenic gram-negative bacilli and enterococci to carbenicillin and ampicillin. Antimicrob Agents Chemother 8:172–186. https://doi.org/10.1128/AAC.8.2.172
56. Gálfi Péter, Csikó György, Jerzsele Ákos (2012) Állatorvosi gyógyszertan. 3. [köt.].
57. Hovde LB, Rotschafer SE, Ibrahim KH, Gunderson B, Hermsen ED, Rotschafer JC (2003) Mutation prevention concentration of ceftriaxone, meropenem, imipenem, and ertapenem against three strains of Streptococcus pneumoniae. Diagn Microbiol Infect Dis 45:265–267. https://doi.org/10.1016/s0732-8893(02)00546-1
58. Drlica K (2003) The mutant selection window and antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 52:11–17. https://doi.org/10.1093/jac/dkg269
59. MacKenzie FM, Gould IM (1993) The post-antibiotic effect. J Antimicrob Chemother 32:519–537. https://doi.org/10.1093/jac/32.4.519
60. Heizmann P, Heizmann WR (2007) [Bacteriostatic - bactericidal]. Med Klin (Munich) 102:720–726. https://doi.org/10.1007/s00063-007-1090-8
61. Ahmad I, Huang L, Hao H, Sanders P, Yuan Z (2016) Application of PK/PD Modeling in Veterinary Field: Dose Optimization and Drug Resistance Prediction. Biomed Res Int 2016:5465678. https://doi.org/10.1155/2016/5465678
62. Craig WA (1998) Choosing an antibiotic on the basis of pharmacodynamics. Ear Nose Throat J 77:7–11; discussion 11-12
63. Blondeau JM, Fitch SD (2019) Mutant prevention and minimum inhibitory concentration drug values for enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin tested against swine pathogens Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida and Streptococcus suis. PLoS ONE 14:e0210154. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210154
64. Meibohm B, Derendorf H (1997) Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. Int J Clin Pharmacol Ther 35:401–413

65. Pelligand L, Lees P, Sidhu PK, Toutain P-L (2019) Semi-Mechanistic Modeling of Florfenicol Time-Kill Curves and in silico Dose Fractionation for Calf Respiratory Pathogens. Front Microbiol 10:1237. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01237
66. Zhang H, Huang Y, Yu J, Liu X, Ding H (2022) PK/PD integration of florfenicol alone and in combination with doxycycline against Riemerella anatipestifer. Front Vet Sci 9:975673. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.975673
67. Dorey L, Pelligand L, Cheng Z, Lees P (2017) Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modelling of florfenicol for the pig pneumonia pathogens Actinobacillus pleuropneumoniae and Pasteurella multocida. PLoS One 12:e0177568. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177568
68. San Martín B, Fresno M, Cornejo J, Godoy M, Ibarra R, Vidal R, Araneda M, Anadón A, Lapierre L (2019) Optimization of florfenicol dose against Piscirickettsia salmonis in Salmo salar through PK/PD studies. PLoS One 14:e0215174. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215174
69. Shiry N, Shomali T, Soltanian S, Akhlaghi M (2019) Comparative single-dose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) at health and experimental infection with Streptococcus iniae or Lactococcus garvieae. J Vet Pharmacol Ther 42:214–221. https://doi.org/10.1111/jvp.12736
70. Straw BE (2006) Diseases of swine, 9th ed. Blackwell Pub, Ames, Iowa
71. McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM (2013) Veterinary microbiology, 3rd ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa
72. Quinn PJ, Quinn PJ (2011) Veterinary microbiology and microbial disease, 2. ed. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex
73. Tan C, Zhang A, Chen H, Zhou R (2019) Recent Proceedings on Prevalence and Pathogenesis of *Streptococcus suis*. Current Issues in Molecular Biology 473–520. https://doi.org/10.21775/cimb.032.473
74. Demoor CE (1963) SEPTICAEMIC INFECTIONS IN PIGS, CAUSED BY HAEMOLYTIC STREPTOCOCCI OF NEW LANCEFIELD GROUPS DESIGNATED R, S, AND T. Antonie Van Leeuwenhoek 29:272–280. https://doi.org/10.1007/BF02046069
75. Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D (2013) Characterization of Streptococcus suis isolates recovered between 2008 and 2011 from

diseased pigs in Québec, Canada. Veterinary Microbiology 162:819–825. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.028

76. Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J (1983) Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of Streptococcus suis. J Clin Microbiol 17:993–996. https://doi.org/10.1128/jcm.17.6.993-996.1983
77. Yao X, Li M, Wang J, Wang C, Hu D, Zheng F, Pan X, Tan Y, Zhao Y, Hu L, Tang J, Hu F (2015) Isolation and characterization of a native avirulent strain of Streptococcus suis serotype 2: a perspective for vaccine development. Sci Rep 5:9835. https://doi.org/10.1038/srep09835
78. Messier S, Lacouture S, Gottschalk M, Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du, Porc (GREMIP), Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) (2008) Distribution of Streptococcus suis capsular types from 2001 to 2007. Can Vet J 49:461–462
79. Higgins R, Gottschalk M (2001) Distribution of Streptococcus suis capsular types in 2000. Can Vet J 42:223
80. Wei Z, Li R, Zhang A, He H, Hua Y, Xia J, Cai X, Chen H, Jin M (2009) Characterization of Streptococcus suis isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. Veterinary Microbiology 137:196–201. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.015
81. Hogg A, Amass S, Hoffman L, Wu C, Clark L (1996) A survey of Streptococcus suis isolations by serotype and tissue of origin. Proc Am Assos Swine Pract pp. 79-81.:
82. Devriese LA, Ceyssens K, Hommez J, Kilpper-Bälz R, Schleifer KH (1991) Characteristics of different Streptococcus suis ecovars and description of a simplified identification method. Vet Microbiol 26:141–150. https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90050-p
83. Kerdsin A, Hatrongjit R, Gottschalk M, Takeuchi D, Hamada S, Akeda Y, Oishi K (2017) Emergence of Streptococcus suis serotype 9 infection in humans. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 50:545–546. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.06.011
84. Zhang C, Ning Y, Zhang Z, Song L, Qiu H, Gao H (2008) In vitro antimicrobial susceptibility of Streptococcus suis strains isolated from clinically healthy sows in China. Veterinary Microbiology 131:386–392. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.005
85. Cloutier G, D'Allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, Gottschalk M (2003) Epidemiology of Streptococcus suis serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. Vet Microbiol 97:135–151. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.09.018

86. Berthelot-Hérault F, Gottschalk M, Labbé A, Cariolet R, Kobisch M (2001) Experimental airborne transmission of Streptococcus suis capsular type 2 in pigs. Vet Microbiol 82:69–80. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00376-5
87. Clifton-Hadley FA (1984) Studies of Streptococcus suis type 2 infection in pigs. Vet Res Commun 8:217–227. https://doi.org/10.1007/BF02214715
88. Robertson ID, Blackmore DK, Hampson DJ, Fu ZF (1991) A longitudinal study of natural infection of piglets with Streptococcus suis types 1 and 2. Epidemiol Infect 107:119–126
89. Lapointe L, D'Allaire S, Lebrun A, Lacouture S, Gottschalk M (2002) Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for Streptococcus suis capsular type 1/2. Can J Vet Res 66:8–14
90. Reams RY, Harrington DD, Glickman LT, Thacker HL, Bowersock TL (1996) Multiple serotypes and strains of Streptococcus suis in naturally infected swine herds. J Vet Diagn Invest 8:119–121. https://doi.org/10.1177/104063879600800121
91. Dong X, Chao Y, Zhou Y, Zhou R, Zhang W, Fischetti VA, Wang X, Feng Y, Li J (2021) The global emergence of a novel *Streptococcus suis* clade associated with human infections. EMBO Mol Med 13:. https://doi.org/10.15252/emmm.202013810
92. Nicholson TL, Waack U, Anderson TK, Bayles DO, Zaia SR, Goertz I, Eppinger M, Hau SJ, Brockmeier SL, Shore SM (2021) Comparative Virulence and Genomic Analysis of Streptococcus suis Isolates. Front Microbiol 11:620843. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.620843
93. Prados de la Torre E, Rodríguez-Franco A, Rodríguez-Ortega MJ (2020) Proteomic and Bioinformatic Analysis of Streptococcus suis Human Isolates: Combined Prediction of Potential Vaccine Candidates. Vaccines 8:188. https://doi.org/10.3390/vaccines8020188
94. Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H, Wu B, Wang H, Zhao H, Lin Y, Yue J, Wu Z, He X, Gao F, Khan AH, Wang J, Zhao G-P, Wang Y, Wang X, Chen Z, Gao GF (2006) Streptococcal Toxic Shock Syndrome Caused by Streptococcus suis Serotype 2. PLoS Med 3:e151. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030151
95. Feng Y, Zhang H, Ma Y, Gao GF (2010) Uncovering newly emerging variants of Streptococcus suis, an important zoonotic agent. Trends in Microbiology 18:124–131. https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.003
96. Fittipaldi N, Harel J, D'Amours B, Lacouture S, Kobisch M, Gottschalk M (2007) Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic Streptococcus suis mutant

as a live attenuated vaccine in swine. Vaccine 25:3524–3535. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.084

97. Wang Y, Wang Y, Sun L, Grenier D, Yi L (2018) Streptococcus suis biofilm: regulation, drug-resistance mechanisms, and disinfection strategies. Appl Microbiol Biotechnol 102:9121–9129. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9356-z
98. Hopkins D, Poljak Z, Farzan A, Friendship R (2019) Field studies evaluating the direct, indirect, total, and overall efficacy of Streptococcus suis autogenous vaccine in nursery pigs. Can Vet J 60:386–390
99. Saini S (2020) Efficacy of Streptococcus suis autogenous vaccine in nursery pigs. Can Vet J 61:113
100. van Hout J, Heuvelink A, Gonggrijp M (2016) Monitoring of antimicrobial susceptibility of Streptococcus suis in the Netherlands, 2013–2015. Veterinary Microbiology 194:5–10. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.03.014
101. Lubbers BV, Diaz-Campos DV, Schwarz S, Bowden R, Burbick CR, Fajt VR, Fielder M, Gunnett L, Holliday NM, Kerdraon C, Langston C, Lawhon SD, Li X-Z, Martinez MN, Miller RA, Morrisey I, Papich MG, Simjee S, Sinnott-Stutzman V, Sweeney MT, Traczewski MM, Trott D, Yan SS (2020) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. 5th ed.
102. Errecalde JO, Carmely D, Marino EL, Mestorino N (2001) Pharmacokinetics of amoxycillin in normal horses and horses with experimental arthritis. J Vet Pharmacol Ther 24:1–6. https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2001.00290.x
103. Lunha K, Chumpol W, Samngamnim S, Jiemsup S, Assavacheep P, Yongkiettrakul S (2022) Antimicrobial Susceptibility of Streptococcus suis Isolated from Diseased Pigs in Thailand, 2018-2020. Antibiotics (Basel) 11:410. https://doi.org/10.3390/antibiotics11030410

11. Köszönetnyilvánítás

Tisztelettel szeretnék köszönetet mondani a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének Dr. Jerzsele Ákos, egyetemi docens, kutatási és innovációs rektorhelyettes úrnak a kísérlet feltételeinek megteremtésében nyújtott segítségéért és támogatásáért.

Hálás vagyok témavezetőmnek, dr. Somogyi Zoltánnak, hogy a dolgozat megszületését lehetővé tette, illetve mentorként és barátként segített a felmerülő problémák megoldásában.

Köszönöm Dr. Szabó Pál munkáját, aki nélkül a minták mérése nem valósulhatott volna meg, Dr. Makrai László és Dr. Biksi Imre docens uraknak, hogy a kísérletben felhasznált baktérium izolátumokat rendelkezésünkre bocsátották. Dr. Mag Patriknak pedig köszönöm mind a gyakorlati munka, mind a dolgozat megírása során tőle kapott sok segítséget.

A dolgozatom nem készülhetett volna el a családom és a barátaim odaadó támogatása nélkül, amit ezúton szeretnék megköszönni mindannyiuknak.