

TDK DOLGOZAT

Bodnár Barbara

2023

Állatorvostudományi Egyetem

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Antibakteriális és biofilm feltörő szerek hatásának vizsgálata az antimikrobiális rezisztencia terjedésére és biofilm épülésére *Pseudomonas aeruginosa* törzseken

Study of the effects of antibacterial and biofilm disrupting agents on the spread of antimicrobial resistance and biofilm formation on Pseudomonas aeruginosa strains

Készítette: Bodnár Barbara

V. évfolyam, állatorvos szak

Témavezető: Dr. Veres Adrienn Mercédesz

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2023.

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke.....	2
2. Bevezetés.....	3
3. Irodalmi áttekintés.....	4
3.1. Rezisztencia kialakulása és rezisztencia-mechanizmusok a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tekintetében	4
3.2. Külső hallójárat gyulladás kutyákban	5
3.3. A cisztás fibrózis	7
3.4. Biofilmek felépítése és a biofilmpépülés folyamata	8
3.5. Leggyakrabban használt biofilm kimutatási lehetőségek.....	9
3.6. Biofilmek-eradikáció fizikai, kémiai és biológiai lehetőségei	11
3.7. Biofilmellenes és antibakteriális anyagok	12
4. Célkitűzések	14
5. Anyag és módszertan	15
5.1. Alkalmazott baktériumtörzsek	15
5.2. Kísérleteink során használt anyagok	15
5.3. Hígított baktériumszuszpenziók kialakítása.....	16
5.4. A használt hatóanyagok antimikrobiális hatásának és érzékenységének vizsgálata	16
5.5. Efflux-pumpa vizsgálat CCCP-vel.....	19
5.6. Biofilmfeltöréssel kapcsolatos vizsgálatok	20
6. Eredmények.....	22
7. Megbeszélés	28
8. Összefoglaló	31
9. Summary	32
10. Irodalomjegyzék.....	33
11. Köszönetnyilvánítás	39

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMR:	antimikrobiális rezisztencia
ATCC:	American Type Culture Collection
CCCP:	karbonil-cianid-3-klorofenilhidrazin
CF:	cisztás fibrózis
CFU:	colony forming unit, kolónia képző egység
CV:	cristal violet, kristályibolya
DMSO:	dimetil-szulfoxid
EDTA:	etilén-diamin-tetraecetsav
EPI:	efflux pump inhibitor, efflux-pumpa gátló
EPS:	extracellular polimer substance, extracelluláris polimer anyag
FIC:	frakcionate inhibitory concetration, frakcionált gátló koncentráció
MDR:	multi drug resistance, multidrug rezisztencia
MIC:	minimum inhibitory concentration, minimum gátló koncentráció
MHB:	Mueller-Hinton Broth, Mueller-Hinton leves
MTS:	metil-tetrazolium só
PBS:	polibutilén-szukcinát
TSB:	Trypton-Soy Broth, Trypton-Szója leves
Tris:	thrometamin

2. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR, antimicrobial resistance) egyik legkiemelkedőbb baktérium képviselője a *Pseudomonas aeruginosa*. Ez a Gram-negatív, biofilmképző pálcá különböző rezisztencia-mechanizmusait és biofilmpépülési képességét kihasználva tud ellenálló maradni a környezetében és ezáltal a képződött biofilmben, mint egy önálló nicheben képes túlélni és ellenállni a külső behatásoknak, mint az antibiotikumoknak vagy az általa fertőzött szervezet immunrendszerének védekező mechanizmusainak.

A kutyák külső hallójárat gyulladása egy mindennapos kórkép az állatorvosi praxisban. Gyakori okozója a gyakran multirezisztens *P. aeruginosa*, mely másodlagos fertőzés révén okozza a kórképet és biofilmpépülése miatt gyakran terápiarezisztens, krónikus gyulladást alakít ki. Továbbá a *P. aeruginosa* társállatokban sokszor felelős húgyúti- és bőrfertőzések kialakításáért is. Emellett emberekben többek között a légzőszervet érintő cisztás fibrózis magas morbiditásért és mortalitásért felelős.

Kutatómunkánk során olyan hatóanyagok és hatóanyag-kombinációk vizsgálatát végeztük el, melyek korábbi kísérletek alapján önálló szerként alkalmazva igazoltan hatékonyak bizonyultak a *P. aeruginosa* okozta fertőzések elleni védekezésben. Felmértük ezen anyagok egymással való kölcsönhatását. Tanulmányunkban az eddig vizsgált hatóanyagaink közül a marbofloxacin, thrometamin-etilén-diamin-tetraecetsav (Tris-EDTA) és geraniol antibakteriális hatását, illetve ezek kettes vagy hármas kombinációinak hatékonyságát teszteltük, továbbá ezen szerek biofilmellenes hatását vizsgáltuk. Kíváncsiak voltunk ezen felül arra, hogy a *P. aeruginosa* általi rezisztencia hátterében az *ab ovo* efflux-pumpa funkció áll-e a vizsgált törzseinknél.

Tanulmányunk során szeretnénk volna igazolni, hogy az általunk használt három hatóanyag egyidejű alkalmazása szinergista kölcsönhatást eredményez és a *P. aeruginosa* biofilmpépülése ellen hatékonyan képes fellépni, mely új távlatokat nyitna a kutyák külső hallójárat gyulladásának kezelésében.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Rezisztencia kialakulása és rezisztencia-mechanizmusok a *Pseudomonas aeruginosa* tekintetében

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) napjaink kiemelkedő problémái közé tartozik, mert a rezisztens baktérium törzsek elterjedése révén egyre nehezebbnek bizonyul kezelni és gyógyítani az általuk okozott fertőzéseket. Kialakulását számos tényező befolyásolja, ezek között elsődleges a nem adekvát antibakteriális szer választása egy adott fertőzés esetén, illetve a nem megfelelő mennyiségben és ideig való alkalmazása [1]. A *P. aeruginosa* *ab ovo* és szerzett rezisztencia mechanizmusai által számos antimikrobiális szer ellen mutat alacsony érzékenységet. Ezek a mechanizmusok kiemelt szerepet játszanak az általa okozott AMR terjedésében. Az *ab ovo* rezisztencia mechanizmusok közül a genetikailag kódolt efflux-pumpa funkció és a külső membrán alacsony permeabilitása tekinthető a legfontosabbnak [2,3]. A *P. aeruginosa*-ra jellemző lehet a multidrug rezisztencia (MDR, multi drug resistance), amely azt jelenti, hogy egyszerre több antimikrobiális anyaggal szemben mutathatnak rezisztenciát adott baktérium törzsek [4]. Az efflux-pumpák az MDR-pumpák csoportjába tartoznak. Közülük fontos megemlíteni a MexAB-OprM-, MexCD-OprJ -, MexEF-OprN- és a MexXY-OprM - pumpákat. Ezek segítségével az adott antibiotikum a bejutást követően nem képes kifejteni hatását, mert az efflux-pumpa által kipumpálódik a sejtből, így csökkentve az adott hatóanyag hatékonyságát. Ilyen *ab ovo* rezisztencia-mechanizmust mutat a *P. aeruginosa* például a tetraciklinek és fluorokinolonokkal szemben [5,6]. Ezen mechanizmus kivédésére egyre gyakrabban alkalmaznak efflux-pumpa gátlókat (EPI, efflux-pump inhibitor), mert segítik az alkalmazott antimikrobiális hatóanyag hasznosulását annak intracelluláris koncentrációjának emelkedésével és a nagy mértékű efflux-pumpa expresszió okozta minimális gátló koncentráció (MIC, minimal inhibitory concentration) érték növekedésének gátlásával [7]. A gyakorlatban használt fontosabb EPI szerek a verapamil, omeprazol és karbonil-cianid-m-klorofenilhidrazin (CCCP). A CCCP-t főleg a *P. aeruginosa* okozta fertőzésekben alkalmazzák. Azért bizonyul kiemelten hatékony szernek, mert képes az efflux-pumpa energiáját gátolni nem-specifikus módon [8]. A CCCP hatásmechanizmusa révén az adenosin-trifoszfát (ATP) termelését csökkenti az oxidatív foszforiláció folyamatának szétkapcsolásával [7]. A rezisztencia kialakulásánál fontos említést tenni arról, hogy a biofilmképződés folyamata önmagában növeli az adott baktérium ellenálló képességét, rezisztenciát okozva. Ez bővebben a későbbi fejezetekben kerül tárgyalásra.

Ahogy a legtöbb rezisztens baktérium törzs, úgy egyes *P. aeruginosa* törzsek is többféle rezisztencia-mechanizmus révén képesek fenntartani ellenálló képességüket. Az *ab ovo* rezisztencia mellett fontos megemlíteni a szerzett rezisztenciát is. Ilyen rezisztencia-mechanizmus például a β -laktamáz termelés a penicillinekkal, illetve cefalosporinokkal szemben, mint a ceftazidim [9,10]. A különböző rezisztencia-mechanizmusok az esetek többségében kombináltan jelentkeznek, így növelve ellenálló képességüket az antimikrobiális szerekkel szemben. Ezáltal kombinációs terápiában használva az antibakteriális szerek - általában szinergizmus révén- más szerekkel együttesen, hatékonyabban képesek fellépni a *P. aeruginosa* okozta fertőzés ellen [11].

3.2. Külső hallójárat gyulladás kutyákban

A *Pseudomonas aeruginosa*, mint Gram-negatív, obligát aerob baktérium felelős kisállatainkban a külső hallójárat-gyulladásos (*otitis externa*) esetek egy részének másodlagos kialakulásáért. Egy tanulmány alapján hozzávetőlegesen a kutyák 5-20%-a érintett a *P. aeruginosa* általi fertőzés okozta *otitis externa* kialakulásában [12]. Egy másik kutatás által az mondható el, hogy a fülészeti esetek 7,5-16,5%-a külső fülgyulladás eredetű. Általánosságban elmondható, hogy a betegség klinikai megjelenése leggyakrabban bőrgyulladás formájában valósul meg [13]. A külső hallójárat-gyulladást elsődleges tényezők, másodlagos fertőzések együtt alakítják ki.

Az elsődleges tényezőknek kulcsszerepük van a gyulladás kialakulásában. Ilyenek az autoimmun betegségek, allergiák és az endokrin bántalmak. Autoimmun kórképekben a pemphigus foliaceus, az allergiás reakciók közül az atópiás dermatitis, az eleségallergia és a bolhanyál (FAD, flea allergic dermatitis) allergia kiemelendő. Korábbi kutatások alátámasztják, hogy az elsődleges tényezők közül az atópiás dermatitis okozza leggyakrabban a kutyák külső hallójárat gyulladását [14,15]. Fontos primer tényező a külső élősködők jelenléte (szőrtüszőatkák, fülatkák) és az endokrin megbetegedések (pajzsmirigy alulműködés, hiperadrenokorticismus), valamint a reaktív otitis is [15]. Utóbbi a test más pontján keletkezett gyulladás által alakít ki fülgyulladást. Ilyet az analis sacculitis okozhat [16]. Valamint a hámosodási zavarok is hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához, mint a seborrhea sicca [17].

A külső hallójárat gyulladásának másodlagos okai közé tartoznak a bakteriális és gombás eredetű fertőzések. A Gram-pozitív baktériumok közül főleg *Staphylococcus* fajok okozhatják, mint a *Staphylococcus aureus* és a *Staphylococcus pseudointermedius* [18]. Ezen

felül a Gram-negatív baktériumok közül jellemzően a *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* vagy *Klebsiella* fajok lehetnek jelen a kórképben. A külső fülgyulladást előidéző gombás fertőzések kiváltásában az élesztőgombákhoz tartozó *Malassezia pachydermatis* bír kiemelt jelentőséggel [13]. Az előbb említett tényezőket az **1. táblázat** foglalja össze.

<i>Elsődleges okok</i>	Autoimmun kórképek
	Allergia
	Endokrin bántalmak
	Külső élősködő jelenléte
	Reaktív fülgyulladás
<i>Másodlagos okok</i>	Bakteriális vagy gombás fertőzés

1. táblázat Az otitis externa kialakulását befolyásoló elsődleges és másodlagos tényezők [15].

A külső hallójárat gyulladása a hallójárat külső részétől a dobhártyáig terjedő gyulladással járó folyamat, azonban ez a dobhártya sérülése, perforációja miatt gyakran áttér a középfül és belsőfül területeire. A külső fülgyulladásra prediszponált kutya fajták közül kiemelendő a Cocker Spaniel, Golden Retriever, Németjuhász, Boxer, Jura des Alpes, illetve a különböző terrier fajták, mint a Foxterrier és Skóttterrier [13,16]. A betegség klinikai megjelenése elsődlegesen az állat nyugtalanságával, az érintett terület érzékenysége és fájdalmával, a fej és a fülek gyakori rázásával, vakaródzással, szőrhullással és a diffúz bőrpír képében mutatkozik meg az érintett fülek területén [13].

Diagnosztikai lépésként a hatékony szervválasztáshoz elengedhetetlen az otoszkópos és a citológiai vizsgálat elvégzése. Előbbi segítségével a hallójárat és a dobhártya állapotát szükséges vizsgálnunk, a citológiai mintavétel segítségével nyújt a fülben fellelhető, jellemzően nagyobb számban jelen levő mikroorganizmusok azonosításában, így hozzásegít az antimikrobiális szer empirikus választásához [19,20]. A megfelelő diagnosztikai módszerek használatával az elsődleges kórkép(ek) meghatározása a cél, hiszen ezen ok(ok) kezelése esszenciális tényező a külső hallójárat gyulladása hosszútávú és sikeres terápiájában. A kezelés első lépése a fülek alapos kitisztítása, hiszen a hallójáratban jelen levő sejtörmelék és váladék

nagyban csökkentheti a későbbiekben az antimikrobiális szer hatékonyságát. Ehhez fülmosó típusú folyadékok nagy térfogatainak alkalmazása javasolt. A fülmosó oldatoknak két nagy csoportját különböztetjük meg, az antiszeptikus és a cerumenolitikus hatású készítményeket [21]. A *P. aeruginosa* jellemzően purulens váladékképződéssel járó, ulceratív, fájdalmas gyulladást idéz elő, ezért esetében előnyben részesítjük az antiszeptikus fülmosó folyadékok használatát. Ilyen a praxisban gyakran alkalmazott klórhexidin, mely Tris-EDTA-val kiváló szinergista hatást mutat és előszeretettel alkalmazzák a *P. aeruginosa* okozta külső hallójárat-gyulladás kezelésében [22]. Ugyanakkor előfordulhat erythroceruminózis megjelenése is. Utóbbi oldására emulgeáló szereket használhatunk, mint a propilénglikol, szkvalén vagy a dioktil-szulfo-szukcinát-nátrium (dokuzát) [22,23]. A tisztítás után általában topikálisan alkalmazott, a citológiai és otoszkópos vizsgálat eredménye által indokolt, empirikusan választott antimikrobiális szert használnak. Ez *P. aeruginosa* esetében legtöbbször ciprofloxacín, marbofloxacín, polimixin-B vagy gentamicin tartalmú fülcsepp lehet [13,24]. A topikális kezelés elsődleges a külső hallójárat gyulladás terápiája során, szisztémás antibakteriális kezelés általában nem indokolt [25]. A gyulladás csökkentésére glükokortikoidot topikálisan, alkalmanként szisztémásan használnak a praxisban, mint a prednizolon vagy dexametazon [13].

3.3. A cisztás fibrózis

A *Pseudomonas aeruginosa* emberek esetében képes komoly tünetekkel és kórképekkel járó fertőzések létrehozására [26]. Ez a kórokozó tekinthető az egyik legkritikusabbnak a nozokomiális, azaz kórházi fertőzéseket illetően [27]. Kiemelt jelentőséggel bír a cisztás fibrózis (CF, cystic fibrosis) fenntartásában, amely egy olyan embereket érintő légzőszervi betegség, melyben egy kromoszómán kódolt cisztás fibrózis transzmembrán regulátor (CFTR) gén mutációja jön létre. A mutáció a légúti hámsejtek kloridion- és bikarbonát-csatornáinak diszfunkciójához vezet [28]. A CF súlyosbító tényezői közé tartoznak a másodlagos bakteriális fertőzések, amelyet a *P. aeruginosa* is okoz. Ebben az esetben a baktérium életben maradási stratégiaként biofilmképzése a légutakat bélelő nyálkahártyán jelentős. Ezen mechanizmus révén nagyobb rezisztencia kialakítására képes, illetve helyeződésének köszönhetően megnehezíti a biofilmfeltörést is [29].

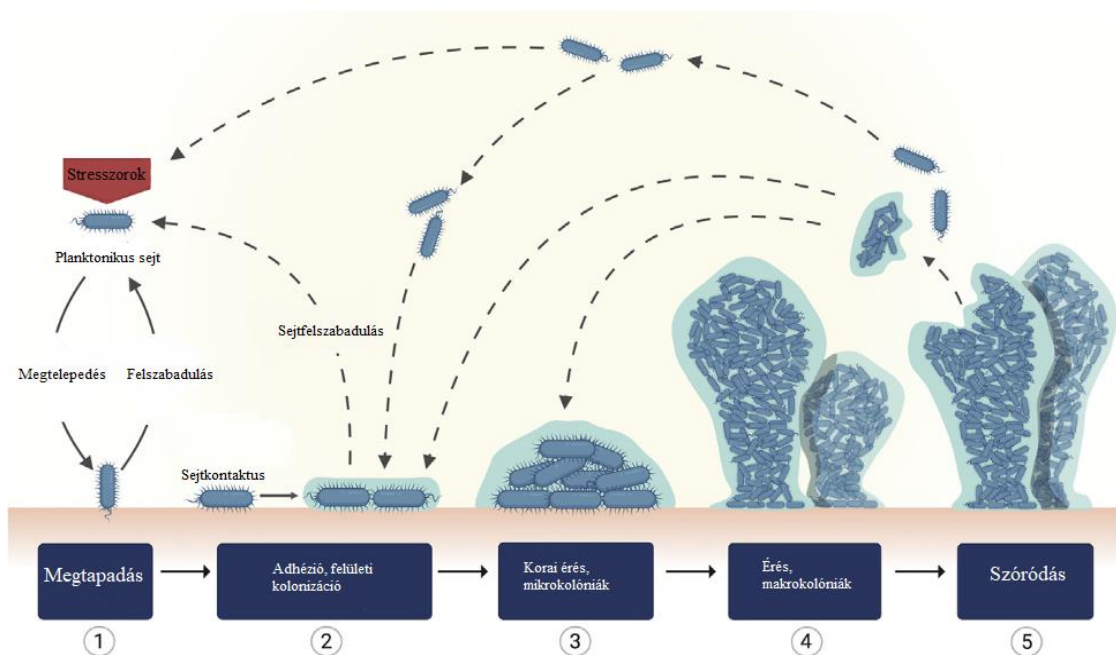
A *P. aeruginosa* okozta humán fertőzéseknél fontos említést tenni annak zoonotikus és zooanthroponotikus jelentőségéről. Több tanulmány is alátámasztotta, hogy a különböző

Pseudomonas fajok okozta rezisztencia képes terjedni állatról emberre. A rezisztencia terjedése mellett maga a bakteriális fertőzés terjedése állatról emberre is valós, mert leírták, hogy madarak közül főleg baromfi-félékben képes áterjedni a baktérium emberre [30]. Továbbá egy brazil kutatás során az is bebizonyosodott, hogy a *P. aeruginosa* fordított módon, tehát emberről kutyára is tud terjedni. Ilyen esetben zooanthroponosisról beszélhetünk [31].

3.4. Biofilmek felépítése és a biofilmpépülés folyamata

A biofilm lényegében mikroorganizmusok halmaza, melyet magában foglal az általuk kiválasztott extracelluláris polimer anyag (EPS), az extracelluláris mátrix [32]. Az EPS-t számos anyag alkotja, szerkezete függ a környezeti behatástól. Ezek közül kiemelten fontosak a fehérjék, extracelluláris DNS és különféle polyszacharidok. Ezek segítségével egy egységes, kompakt szerkezetet kölcsönöznek a mátrixnak [33]. A polyszacharidok közül az alginát, Pel és Psl a legfontosabbak funkcionális szempontból. Ezeknek az exopolyszacharidoknak szerepük van a sejt-sejt kapcsolatok kialakításában, valamint a *P. aeruginosa* által kialakított biofilm védelmében, stabilitásának fenntartásában [34]. Az extracelluláris DNS (eDNS) a polyszacharidok mellett elengedhetetlen a biofilm felépítésében. Elsődlegesen tápanyagforrást képes biztosítani a baktérium számára, továbbá negatív töltése révén kelátorként a Mg^{2+} és a Ca^{2+} , kétértékű kationok megkötésére képes, valamint aktiválni tudja a gazdaszervezetben a virulencia faktorokat. Ezen felül az eDNS részt vesz a sejtek szerveződésében is [35].

A biofilm fejlődés egy összetett folyamat. Általánosságban elmondható, hogy a biofilm fejlődés hipoxiás környezetben zajlik, melyet összesen öt nagy stádiumra oszthatunk fel [33]. Az első stádiumban a baktérium sejtek valamilyen, jellemzően biotikus vagy abiotikus felülethez tapadnak. Ez a folyamat reverzibilis. Az első szakasszal ellentétben a második stádiumban a folyamat irreverzibilissé válik, amikor megkezdődik a felületi kolonizáció. Ezek után a harmadik stádiumban kerül sor a mikrokolóniák kialakítására. Majd ezek a kialakult struktúrák tovább növekedve egy gombára emlékeztető, háromdimenziós szerkezetet vesznek fel. Fontos megemlíteni, hogy a gomba alakú biofilmek általában alacsonyabb motilitású sejteket képesek generálni, mint a lapos biofilmek, melyek mozgékonyabb sejtek hoznak létre. Végül az ötödik - egyben utolsó - stádiumban a mátrix által kialakított üreg megszakad, így a sejtek autolízise, tehát önmérsztése következik be. Az utolsó stádiumot követően a folyamat előlről indul [33,36]. A biofilmpépülés folyamatát és annak stádiumait az **1. ábra** szemlélteti.



1. ábra A biofilmek képződésének ciklusa[36]

3.5. Leggyakrabban használt biofilm kimutatási lehetőségek

A biofilmek kimutatása és modellezése többféle módon történhet meg. Megkülönböztetünk *in vitro* és *in vivo* kimutatási módszereket. Mivel a kutatói munka során *in vitro* módszerrel vizsgáltuk a *P. aeruginosa* baktérium törzseket, ezért ezeket a metódusokat szeretném dolgozatomban részletesebben kifejtteni.

Az *in vitro* módszerek közül az egyik legelterjedtebb és legnépszerűbb módszer a 96-lyukú mikrotiter lemez alapú modell. Az eljárás lényege, hogy a 96-lyukú lemezen tenyésztjük és növesztjük az adott baktérium törzsek biofilmjeit. Fő előnye, hogy amellett, hogy képesek vagyunk vele a biofilmképző és a nem biofilmképző törzseket, izolátumokat megkülönböztetni, vizsgálni tudjuk a biofilmképződés stádiumait. Zárt rendszerként nem történik áramlás a rendszer és a külső környezete között a kísérlet során. Emellett fontos, hogy a kísérletet végző személyek képesek befolyásolni a környezeti tényezőket, mint az inkubációs hőmérséklet, páratartalom vagy a táptalaj összetétele [37]. A mikrotiter lemezekben táplevesben fejlődött biofilm, a lyukak alján vagy az oldalfalhoz kötve szemlélhető.

A mikrotiter lemezen különböző festési eljárásokat alkalmazva tudjuk számszerűsíteni a képzett biofilm mennyiségét, ezáltal alkalmasak a biofilm-eradikáció tesztelésére is. Ilyen eljárás a kristályibolya (CV, crystal violet) vagy az MTS formazán (3-5-2-2H-Tetrazolium só)

típusú festések alkalmazása. Ezeket az eljárásokat általában mikrotiter lemezekon végzik. A kristályibolya festés révén az egész biofilm mátrix megfestése történik [38,39]. Az MTS egyike a négy gyakorlatban is használt tetrazolium-sónak. A tetrazolium-só a mitokondriális dehidrogenáz enzim szubsztrátja. Az MTS esetében egy vitális festésről beszélünk, mert csak az - jelen esetben biofilmbe foglalt - élő sejteket festi meg. Ezen eljárás segítségével a festés során az élő sejtszám függvényében az MTS-ből átalakult formázán mennyiségével arányos abszorbanciát vetik össze a biofilmet alkotó sejtek számával. Ezek a biofilm kimutatási eljárások segítséget nyújtanak a biofilm-eradikáció mértékének és hatékonyságának detektálásában azután, hogy az adott biofilmet potenciális biofilmfeltörő szerrel vagy módszerrel kezeltük volna [40].

Másik fontos *in vitro* módszer a flow displacement biofilm model system. Ebben az esetben egy nyílt rendszerről beszélünk, melynek fő jellemzője a tápközeg állandó szinten tartása, mely a már bakteriális aktivitás révén elhasználódott táptalaj feleslegének kiürítésével és pótlásával történik [37]. Napjainkban egyre többet használják a microfluidic készüléket különböző biofilmek detektálására. Azért részesítik előnyben ezt a módszert, mert a készüléket alkotó kis kamrákban a biofilmek számára természetes környezet reprodukálható. Képesek vele beállítani az adekvát áramlási sebességet és a kamrák segítségével a biofilmek sejtszintű elemzésének elvégzését is lehetővé teszi. Lényegében háromdimenziós teret alkotnak meg [41].

Fontos megemlíteni a kolónia formáló egység (CFU, Colony Forming Unit) - számlálást is, mely a sejtszámláló vizsgálatok esetében gold standard eljárásnak tekinthető. Ez azért kiemelkedően fontos, mert általa képesek vagyunk meghatározni a baktériumszámot és utána ezt referenciának használni biofilm kimutatási módszerekénél. Az eljárás lényege, hogy a biofilmből kialakított baktériumszuszpenzióban vagy annak felülúszóján történő többszörös hígítást elvégezve egy táptalajra szélesztjük a baktériumszuszpenziót, majd a baktériumfajnak adekvát hőmérsékleten és ideig inkubáljuk azt. Az inkubációs idő lejártával a petri csészéken megszámláljuk a kinőtt telepek mennyiségét és a hígítási fok segítségével következtetünk az eredeti baktérium szuszpenzió CFU számára. A CFU-számlálás során kizárólag az élő sejtek mennyiségére következtethetünk, a különféle szerves törmelék és elhalt sejteket nem számolhatjuk, a számlálás által megállapítható, hogy történt-e baktériumsejt pusztulás egy adott kezelés hatására [42].

Az egyik leggyakrabban elterjedt *in vivo* biofilm kimutatási módszer a bőr alá beültetett idegen test, ahol hagyják, hogy a szövet körül biofilm növekedhessen a beültetett szerkezeten. Másik *in vivo* módszer a centrális véna katéter (CVC). Ezt előszeretettel alkalmazzák, mert az adott élő kísérleti állaton végezve nem csak egy szerv, hanem a biofilmek egész szervezetet érintő hatását, változásait tudják vele vizsgálni [37].

3.6. Biofilmek-eradikáció fizikai, kémiai és biológiai lehetőségei

A biofilm-eradikáció egyik fő célja, hogy az adott baktérium ellenálló képességét csökkentsük, ezáltal pedig az adekvát antimikrobiális szer alkalmazása előnyösebb. A lehetőségeknél fontos szem előtt tartani, hogy amint a biofilm fejlődés folyamat végbement, már nehezebb véghez vinni annak eltávolítását. Általában azok a szerek bizonyulnak a leghatékonyabbnak e tekintetben, melyek már a biofilm kialakulását, majd fejlődését is megakadályozzák. Továbbá a *P. aeruginosa* esetében gyakran alkalmazott és hatékony olyan szerek használata, melyek a bakteriális sejteket a biofilmből való kiválásra kényszerítik, ezáltal könnyebben, gyorsabban és hatékonyabban lehet őket elpusztítani, mint biofilmet alkotó formában [33].

Fontos *in vitro* biofilm-eradikációs módszerek tekinthetők az alábbiak. Egy 2021-es kísérlet során dózis-dependens antibiofilm aktivitást mutattak az ezüst nanorészecskék, mert ezek alkalmazásával a bakteriális membrán permeabilitása növekedett, melyet úgy ért el, hogy a baktérium DNS-ének foszfátjaival kapcsolódott és a reaktív oxigén gyökök (ROS, reactive oxygen species) általi oxidatív stresszt növelte [43]. Egy másik 2022-es kutatásban argon plazmát használtak a *P. aeruginosa* ATCC törzs biofilmjének eradikációjára. A technológia lényege az volt, hogy egy hosszabb csőbe érkező energia révén érintkezik a levegő az argon plazmával, így az általuk keletkező szabadgyökök a biofilmre irányítva eradikálják azt [44]. Fogászati területről származó kutatás során nisin-biogél biofilmellenes hatását vizsgálták 2020-ban. Maga a nisin egy antimikrobiális enzim. Hatása oly módon valósul meg, hogy kötődni képes az adott baktérium citoplazma membránjában található lipid II-vel, így gátolva annak sejtfal szintézisét [45]. Egy 2019-es kutatásban *P. aeruginosa* törzseken végeztek biofilm-eradikációs vizsgálatokat, melyekhez antimikrobiális ágensként ionofór antibiotikumként narasint és monenzint használtak, adjuvánsként pedig N-acetil ciszteint (NAC), disodium-etilén-diamin-tetraecetsavat (disodium-EDTA) és trometamin-hidrokloridot (Tris-HCl). A kísérlet során ezek antibiofilm hatása igazolódott [46].

3.7. Biofilmellenes és antibakteriális anyagok

A marbofloxacin a második generációs fluorokinolonok csoportjához tartozó antibakteriális szer, melyet kizárólag az állatorvosi praxisban alkalmazunk. A marbofloxacin bizonyítottan hatékonyabb a *Pseudomonas aeruginosa* okozta fertőzések kezelésére, mint a - szintén ebbe a csoportba tartozó - enrofloxacin [47]. Ez azért van, mert az enrofloxacin túlhasználatából kifolyólag és a rezisztencia terjedése miatt egyre több enrofloxacinra rezisztens törzs alakult ki. Ezt támasztja alá Park Youjin és munkatársai által végzett kísérlet, mely alapján a marbofloxacinnal szemben jóval alacsonyabb a rezisztencia kialakulása, mint az enrofloxacinnal szemben. Hatásmódja szerint baktericid, hatásmechanizmusát illetően a topoizomeráz enzimek gátlása révén fejti ki hatását. Két fontos enzimre hat, ez a topoizomeráz-II vagy DNS-giráz és a topoizomeráz-IV [48]. Ezen kívül postantibiotikus hatással (PAE, post antibiotic effect) rendelkezik. A PAE azt jelenti, hogy a használatot követő 2-4 vagy akár 12 órán keresztül az adott szer képes gátolni a baktériumok szaporodását [49]. A marbofloxacin kiemelkedően hatékony a Gram-pozitív baktériumok közül a *Staphylococcus aureus* ellen. Gram-negatív baktériumfajok közül az *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Salmonella* fajokkal, valamint anaerob baktériumok közül hatékonyan képes fellépni a *Bacteroides*- és *Clostridium* fajokkal szemben [50]. Az előbb felsoroltak alapján elmondható, hogy széles spektrummal rendelkező antibakteriális szer. Egy 2015-ös tanulmány során 93%-os érzékenységet találtak a kutatók a marbofloxacinra kutyák külső hallójáratából kinyert 183 *Pseudomonas* törzs esetében [47].

A geraniol egy olyan fitoaktív illóolaj, mely a monoterpének csoportjába tartozik. Szerkezetéről elmondható, hogy két cisz-transz izomerből épül fel [51,52]. Természetes vegyület, mely számos növényből kivonható. Ilyen például a pálmárózsza (*Cymbopogon martinii*), orvosi macskagyökér (*Valeriana officinalis*) vagy a damaszkuszi rózsa (*Rosa damascena*) [52]. A geraniolt számos hasznos tulajdonsága miatt széleskörűen használják mind a humán mind az állatorvosi praxisban. Az antibakteriális tulajdonsága mellett fő előnyeikhez tartozik még, hogy van antidepresszáns tulajdonsága, szív-, ideg- és májvédő hatással rendelkezik, emellett pedig antioxidáns és gyulladáscsökkentő is. Antibakteriális tulajdonsága abban rejlik, hogy képes kölcsönhatásba lépni a sejtmembrán alkotórészeivel [51]. Fontos kiemelni továbbá az antifungális tulajdonságát, melyet főleg a *Candida* fajok ellen alkalmaznak [53]. Az elmúlt években több kutatás is alátámasztotta, hogy az előbb felsorolt tulajdonságai mellett citotoxikus, daganatellenes hatással is rendelkezik [54]. Főleg vastagbélrák és

karcinómáknál írták le jótékony hatását, bár ezen tulajdonsága miatt nagy mennyiségben való alkalmazásakor a használt mennyiség koncentrációjára nagy figyelmet szükséges fordítani potenciális toxicitása miatt [52,55].

Az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) egy olyan fém kelátor, mely kifejezett antimikrobiális hatással bír [56]. Előszeretettel alkalmazzák kombinációs terápiában antibiotikumokkal, mert azok hatását potenciózni képes. Ezt a tulajdonságát a Gram-negatív baktériumokat alkotó lipopoliszacharid (LPS) réteg károsításával éri el. Egy 2010-ben írt tanulmányban azt közölték, hogy az EDTA képes a *Pseudomonas aeruginosa* tekintetében csökkenteni a baktérium patogenitását. A hatékonysága ellenére az EDTA-t toxicitása révén gyakrabban alkalmazzák kombinációban. Kombinációs partnere lehet például kalcium. Ez egy injektábilis formát tesz lehetővé, mely segítségével az EDTA csökkent toxicitásáról beszélhetünk [57]. Másik fontos kombinációja a Tris-EDTA. A thrometamin vagy Tris az EDTA kombinációs partnereként kétértékű kationokat - kalcium (Ca^{2+}) és magnézium (Mg^{2+}) - von el a Gram-negatív bakteriális membránból, tehát fokozni képes az EDTA kelátképző hatását [58]. A kétértékű kationok elszakítása a biofilmtől azért bizonyul hatékony stratégiának, mert ezen ionok stabilizáló funkcióval rendelkeznek a mátrixban[59].

4. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk elsődleges célja egy olyan állatgyógyászati készítmény megalkotása volt, melyet a mindennapi állatorvosi praxisban hatékonyan alkalmazhatunk kutyák esetében a *Pseudomonas aeruginosa* okozta külső fülgyulladás kezelésére. Annak tudatában, hogy adott *P. aeruginosa* törzseket különösen nehéz eradikálni biofilmképzési képességük, illetve a különféle rezisztencia mechanizmusaik miatt, ezért munkánk során törekedtünk olyan hatóanyag és hatóanyag-kombinációk vizsgálatára és használatára, melyek már korábbi kutatások által igazoltan *P. aeruginosa* ellen önállóan hatékonyaknak bizonyultak. Elsődlegesen marbofloxacint kombináltunk más szerekkel, melyek biofilmellenesnek és antibakteriálisnak bizonyultak. Ezek az EDTA és a geraniol voltak. Továbbá szeretnénk volna kimutatni, hogy a marbofloxacint az előbb felsorolt hatóanyagok kettes és hármas kombinációival alkalmazva alacsonyabb minimális gátló koncentráció (MIC, minimal inhibitory concentration) értéket mérhetünk, mint önálló hatóanyagként való alkalmazásukkor *P. aeruginosa* fertőzés esetén. Feltételezésünk szerint hatékonyabbak ily módon alkalmazva, illetve a kettes és hármas kombinációja ezen szereknek a rezisztencia terjedését gátolhatja, illetve tudottan rezisztens törzs esetében a kettes vagy hármas kombináció hatékonyabb ölést tud eredményezni, mint a szimpla marbofloxacin használat. Ezek mellett kíváncsiak voltunk arra, hogy a marbofloxacinra való rezisztencia terjedésének hátterében sorozatpasszálás során a *P. aeruginosa* efflux-pumpa funkciója áll-e. Továbbá láttatni szeretnénk volna az említett szerek önálló és kombinációban kifejtett antibiofilm hatását biofilmtermelő *P. aeruginosa* törzsön.

5. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

5.1. Alkalmazott baktériumtörzsek

A kutatásunk során olyan kutya külső hallójárat és bőrgyulladás eredetű *P. aeruginosa* klinikai izolátumokat használtunk, melyek erős biofilmtermelő törzsnek bizonyultak korábbi vizsgálataink során, a velük egyidejűleg tesztelt *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ (American Type Culture Collection® 27853™, Manassas, USA) biofilmtermelő referencia törzshöz képest. A kísérletek megkezdése előtt az előbb említett baktériumtörzseket Microbank™ rendszerben (Microbank™, Pro-lab Diagnostics, Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) tároltuk -80 °C-on. A klinikai izolátumok identifikálását a Duo-Bakt Kft. mikrobiológiai laboratórium végezte. Az izolált törzsek azonosítása pigmenttermelés, telepmorfológia, ceftrimid tartalmú szelektív táptalaj alkalmazásával történt.

5.2. Kísérleteink során használt anyagok

A kísérleteink során használt hatóanyagokat, mint a geraniol olajat, az EDTA-t, a Tris-hidrokloridot, marbofloxacint por formában a Sigma Aldrich International GmbH (St. Louis, USA) vállalatától szereztük be. A 8-as pH-ra pufferelt Tris-EDTA oldatot komponenseiből egyetemünk Kémiai Tanszéke állította elő.

Segédanyagaink közül a karbonil-cianid-3-klorofenilhidrazint (CCCP) por formában, valamint a geraniol olaj oldatba viteléhez és a CCCP oldat előállításához dimetil-szulfoxidot (DMSO) (Sigma Aldrich International GmbH, St. Louis, USA) használtunk. A CCCP oldatának előállításához szükségünk volt még az ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszéke által előállított ultra tisztított vízre (UPV, ultra purified water), melynek segítségével oldatba vittük a CCCP-t, ezután DMSO-val elegyítve kaptuk meg a végső, 10,4 mg/100 ml koncentrációt. Továbbá a hígítási soraink elkészítéséhez, a baktériumtörzsek tárolásához és felszaporításához tripton-szója levest (TSB, Tryptone-Soye Broth) (Bio-lab Zrt., Budapest) és Mueller-Hinton levest (MHB, Mueller-Hinton Broth) (Bio-lab Zrt., Budapest) alkalmaztunk. A biofilmfeltörési kísérlet során a spektrofotometriás mérésekhez használt festékek közül a kristályibolya 1%-os vizes oldatát a Sigma Aldrich International GmbH (St. Louis, USA) vállalatától, a MTS-t tartalmazó CellTiter 96®Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay-t a Promega Corporation (Madison, USA) vállalatától rendeltük.

A kutatásunkhoz szükséges egyéb eszközök közül hatóanyagaink törzsoldatának elkészítése során felhasznált talpas centrifugacsöveket, a 96 lyukú mikrotiter lemezeket, a steril nejlon-szűrőket a VWR International Kft.-től (Debrecen, Magyarország), az egyszer használatos petri csészéket, szélesztő pálcákat és kacsokat a Bio-lab Zrt.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be.

5.3. Hígított baktériumszuszpenziók kialakítása

A rendelkezésünkre álló *P. aeruginosa* kontroll törzsből és a klinikai izolátumokból az antimikrobiális érzékenység vizsgálata során 3 ml TSB levesben, míg az efflux-pumpa és antibiofilm kísérletben 3 ml MHB levesben szaporítottuk fel steril bakteriológiai kacs segítségével a baktériumot 37°C-os inkubáció alatt és 24 órán át. Miután az inkubációs idő letelt, akkor 240 µl, az adott kísérlettől függően TSB vagy MHB levest helyeztünk steril pipettahegy segítségével a polisztirol mikrotiter lemezek lyukaiba, majd ezekhez 10-10 µl vortexelt baktériumszuszpenzióit adagoltunk, majd átkevertünk. Így 0,5-ös McFarland standardig hígítottuk a kívánt baktériumkoncentráció elérésének érdekében. Ezután a többcsatornás pipetta 10 µl-ével oltottuk be a hígított baktériumszuszpenziót a hatóanyagok meghatározott koncentrációit tartalmazó munkalemezekhez. Így a munkalemezeken körülbelül 10^5 CFU/ml-es baktérium koncentrációt állítottunk be.

5.4. A használt hatóanyagok antimikrobiális hatásának és érzékenységének vizsgálata

Hatóanyagainkat a minimum gátló koncentráció (MIC) mérésén keresztül vizsgáltuk az antimikrobiális hatásuk meglétének és mértékének elemzésére a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ajánlásainak megfelelően, amelyet kétszer megismételtünk. Ezzel a kísérlettel arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyes hatóanyagokra kapott egyedi MIC értékei hogyan változnak a kombinációs partnerek jelenlétében, milyen kölcsönhatás alakul ki a hatóanyagok között a baktériumszaporodás mértékére való tekintettel. Maga a MIC érték azt mutatja meg, hogy mi az a legkisebb *in vitro* koncentrációja az adott hatóanyagnak, amely mellett már nincs szabad szemmel látható baktérium növekedés. A MIC mérés mellett érzékenységvizsgálatot is végeztünk sorozatpasszálassal azokon a hatóanyagot és baktériumszuszpenziót egyidejűleg tartalmazó lyukakból származó izolátumokon, amelyek a hatóanyagok olyan koncentrációival voltak kezelve, amelyek szabad szemmel láthatóan nem befolyásolták a baktériumszaporodást a pozitív kontrollhoz – a kezeletlen, egyidejűleg inkubált baktériumszuszpenzióhoz – képest.

Elsődlegesen azt szeretnénk volna igazolni a kísérlettel, hogy a használt hatóanyagaink kombinációival az *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ referencia törzs marbofloxacin antibakteriális szerre való rezisztenciájának emelkedését a 10 napos sorozatpasszálás során a kombinációs partnerek késleltetni tudják-e. A használt hatóanyagaink törzsoldatának koncentrációja a marbofloxacin esetében 1024 µg/ml, melyet meleg TSB segítségével oldottunk be, a Tris-EDTA esetében ez 32 mg/ml és végül a geraniolé 6,4 mg/ml volt. Az egész kísérleti munkafolyamat során törzsoldatainkat hűtőszekrényben tároltuk.

A MIC-ek méréséhez összesen 10 darab 96-lyukú polisztirol, mikrotiter lemezt használtunk, melyeknél az oszlopokat 1-12.-ig számoztuk be. Az 1. oszlopba a már elkészített hatóanyagaink törzsoldatai kerültek hígított formában, korábbi kísérleteink és szakirodalmi adatok alapján optimalizált kezdőkoncentrációval 180 µl végtérfogattal, amelyet utána kettes alapú hígítási sorban hígítottunk a 10. oszlopig a lyukakba megelőzően pipettázott 90 µl táplevessel. Az 1. oszlop sorainak tekintetében az 1. sorba a marbofloxacin (M), majd a 2.-ba geraniol (G), a 3.-ba Tris-EDTA (E), 4.-be marbofloxacin és Tris-EDTA (ME), 5.-be geraniol és Tris-EDTA (GE), 6.-ba marbofloxacin és geraniol (MG), legvégül pedig a 7. sorba a három hatóanyag kombinációja került (MGE). A 11. pozitív kontrollként először és a 12. oszlop negatív kontrollként csupán TSB-t tartalmazott 90 és 100 µl végtérfogattal. Ezt követően a 11-es - pozitív kontroll - oszloptól kezdve 10-10 µl hígított baktérium szuszpenziót adagoltunk a lemez lyukaiba az 1. oszloppal bezárólag. Az adott napi munkafolyamatot követően a lemezt 37°C-on 24 órán keresztül inkubáltuk, majd a rákövetkező napon elbíráltuk a MIC értékeket. A MIC munkalemezek elrendezését és a használt hatóanyagaink kezdőkoncentrációit az **2. táblázat** szemlélteti.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
M: 16 µg/ml										+	-
G: 6,4 mg/ml											
E: 25,6 mg/ml											
ME: 8 µg/ml+ 16 mg/ml											
GE: 3,2mg/ml+ 3,2 mg/ml											
MG: 4µg/ml+ 4 mg/ml											
MGE: 2µg/ml+ 2,3mg/ml+ 4,6 mg/ml											
	M	G	E	ME	GE	MG	MGE				

2. táblázat Egy napi 96-lyukú MIC lemez elrendezése, melyen egy darab *P. aeruginosa* törzs ATCC® 27853TM kezelését végeztük, a kezdőkoncentrációkkal feltüntetve az első oszlopban. Ezekből végeztünk felező hígítást a 10. oszlopig. Jelölések: M= marbofloxacin, G= geraniol, E= Tris-EDTA, ME= marbofloxacin + Tris-EDTA, GE= geraniol + Tris-EDTA, MG= marbofloxacin +geraniol, MGE= marbofloxacin + geraniol + Tris-EDTA

A 96-lyukú munkalemezek összes lyukát a **3. táblázatban** összefoglaltak alapján bíraltuk el.

-	nincs baktérium-növekedés	negatívként elbírálható eredmények
±	nem biztos baktérium-növekedés, mérsékelt zavarosság	
+	a vizsgált baktériumtörzs enyhe növekedése	pozitívként elbírálható eredmények
++	a vizsgált baktériumtörzs mérsékelt növekedése	
+++	a vizsgált baktériumtörzs jelentős mértékű elszaporodása	

3. táblázat A baktérium-növekedés mértékének meghatározása

Az előző napi MIC munkalemez elbírálása után, azokból a lyukakból, amelyeknél még erős baktérium-növekedés volt látható, átoltottuk a következő napi 96-lyukú polisztirol lemezre.

5.5. Efflux-pumpa vizsgálat CCCP-vel

Felvetésünk a kísérlet során az volt, hogy a *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ + törzs és a klinikai izolátumok marbofloxacin elleni ellenállóképességének növekedését a másik két használt hatóanyag lassítani vagy gátolni képes. Vizsgáltuk, hogy a kialakuló rezisztencia mögött a *P. aeruginosa* baktériumra alapvetően jellemző efflux-pumpa mechanizmus áll-e. Azt vártuk, hogy hatóanyagaink önálló vagy kombinációs MIC értéke összesen 4 hígításnyit csökken CCCP, mint efflux-pumpa gátló használata mellett, alátámasztva az efflux-pumpa működését a kapott, emelkedő MIC értékek mögött [60]. Az efflux-pumpa mechanizmusra irányuló MIC vizsgálatainkat az 5.4-es fejezettel megegyező módon CLSI-standardnak megfelelően végeztük. Az ATCC® 27853™ kontroll törzs és további 22 klinikai izolátum kioltására került sor a kísérlet első napján. Törzsenként 3 ml kalcium-ion adjusztált MHB-be történt meg a kioltás steril bakteriológiai kacsok segítségével. Az 5.4-es fejezetnek megfelelő hatóanyagokkal, hatóanyag-kombinációkkal és azok különböző koncentrációival kezeltük a kontroll törzset és az izolátumokat CCCP jelenlétében és anélkül. Azoknál a lemezeknél, ahol CCCP jelenlétében kezeltük az adott izolátumokat, ott + jelzést írtunk az adott munkalemezre, míg a CCCP nélküli lemezek esetében – jelzést írtunk. Továbbá a baktériumszuspenziók kialakításához ebben az esetben MHB levest használtunk a CCCP kompatibilitása miatt.

Egy hatóanyag vagy hatóanyag-kombináció vizsgálatához a 22 izolátumon és 1 kontroll törzsön összesen 3 darab mikrotiter lemezre volt szükségünk, így 1 lemezen összesen 8 izolátum fért el. Tehát a 7 db kezelés (M, G, E, MG, ME, GE, MGE) és a CCCP-vel való kezelés megléte vagy hiánya alapján efflux-pumpa vizsgálatunkhoz összesen 43 darab 96-lyukú mikrotiter lemezt használtunk, melyből a 43. a hígítási lemezt adta a kutatás során. A CCCP-t is tartalmazó lemez sorozatnál koncentráció beállított CCCP-oldatot használtunk -melynek végkoncentrációja 10,4 mg/100 ml a kezelt lyukakban - az MHB helyett.

Statisztikai elemzésünk szerint az egyes kezeléseink MIC-re gyakorolt hatását általános lineáris modellel teszteltük, ahol a MIC volt a függő változó, míg a kezelés (faktor három szinttel: M, G, E) a CCCP (faktor két szinttel: igen, nem) voltak a tesztelni kívánt magyarázóváltozók. Az elemzéseket R 4.3.1-ben végeztük (R core team, 2023). Statisztikai elemzéseinkben nagy segítséget nyújtottak a Biostatistika Tanszék munkatársai.

5.6. Biofilmfeltöréssel kapcsolatos vizsgálatok

Kísérleteink ezen fázisában azt vizsgáltuk, hogy az egyes hatóanyagok, illetve azok kombinációi képesek-e károsítani a *P. aeruginosa* alkotta biofilmet. A kísérlet első napján a biofilmtermelő *P. aeruginosa* ATCC® 27583™ Microbank™ rendszerből először 3 ml MHB levesben szaporítottuk fel, 37 °C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk, aerob körülmények között. A baktériumszuszpenzió hígítást az 5.3. fejezetben leírtak alapján végeztük. Ezután összesen 8 darab 96-lyukú mikrotiter munkalemezen növesztettünk *P. aeruginosa* ATCC® 27583™ biofilmet úgy, hogy 1-3. és a 6-8. sorokban a 11-es oszlopig 90 µl MHB levest és 10 µl hígított baktériumszuszpenziót elegyítettünk. A 12-es oszlop negatív kontrollként 100 µl MHB levest tartalmazott. Az inkubációs idő lejártá után a felülúszó eltávolítását többcsatornás pipettával végeztük el óvatos és azonos mozdulatokkal, hogy a növesztett biofilm lehetőleg a legkevésbé sérüljön. A lyukakon kitapadt biofilmekre ezt követően rápipettáztuk az 5.4-es fejezetben említett önálló hatóanyagok vagy azok kettes, hármas kombinációinak beállított koncentrációit tartalmazó oldatokat, melyeket az átpipettázáshoz párhuzamos segédlemezekben alakítottunk ki. A hatóanyag oldatok kezdőkoncentrációinak kettes alapú hígítási sorát elvégeztük a lemezek 10-es oszlopáig. Így egy törzsön a hét különböző hatóanyagot vagy kombinációit összesen 4 lemezen tudtuk vizsgálni kimutatási eljárásonként. A munkalemezeket ezután újabb 24 órás és 37 °C-os inkubációnak vetettük alá. Az inkubációs idő lejártá után, a hatóanyagokkal inkubált felülúszó óvatos eltávolítása után kristályibolya (CV) festékkel és MTS-formazánnal festettük meg a lemezekben lévő biofilmeket.

A CV festés esetében az inkubálást követően a felülúszót 120 µl-es pipettaúrtartalommal szívtuk le a mikrotiter lemezek lyukaiból. Ezt egy 10 percn át tartó levegőn való szárítás követte, hogy ne legyen benne a folyamat során nem kívánt plusz nedvesség. Ezután 120 µl 0,1%-os CV-oldatot (CV 1%-os vizes oldatát tízszeresére hígítottuk fiziológias sóoldattal) a munkalemezek adekvát lyukaiba applikáltuk, majd 20 percig keverőtálcára helyeztük a színyanyag jobb penetrációjának elérése érdekében. A folyamat következő lépéseként 120 µl-re állított pipettaúrtartalommal leszívtuk a felülúszót 20 perc elteltével és ezután egy bemerítéses mosás következett. Ezt követően újból 10 percig levegőn szárítottuk a lemezeket. A folyamat utolsó előtti momentumaként a kivonáshoz 20 percre egy keverőtálcára raktuk a lemezeket és 120 µl 3:1-hez arányú etanol és acetone oldatát helyeztük a munkalemezek színezett lyukaiba. A színioldást követően a színintenzitás változását, amely a

teljes biofilmtömeg mennyiségével korrelál, abszorbanciaméréssel vizsgáltuk spektrofotometriás eljárással 595 nm-en.

Az MTS-formazán, vitális festékként csak az élő sejteket festi meg, ezért az egyik fő különbséget az adja a CV-vel való festéstől, hogy az inkubálást követő részfolyamatoknak, mint a felülúszó eltávolításának, sterilen kell megtörténnie. Ezután 6:1-hez arányú MHB leves és MTS-formazán elegyét adtuk a munkalemezek oszlopaihoz adni váltott, steril pipettahegy segítségével. Ezt követően egy 90 perces 37 °C-on történő inkubáció követte a folyamatot, majd utolsó lépésként az abszorbanciamérést 492 nm-en végeztük a kapott színintenzitás változás mérésére, amely a biofilmben lévő élő sejtszámmal korrelál.

A biofilmfeltörés mértékét az EC₅₀ érték meghatározásával határoztuk meg a kapott abszorbanciaértékek figyelembevételével. Egy biofilmellenes hatóanyag azon koncentrációja az EC₅₀ érték, amely a pozitív kontroll biofilm spektrofotometriás méréssel megállapított abszorbancia értékét legalább a felére, tehát 50%-kal csökkenti. A biofilmfeltörő képesség százalékos értékét az alábbi képlettel számoltuk ki:

$$\text{Biofilmfeltörés \%} = \frac{\text{az adott lyuk abszorbanciája} - \text{negatív kontroll abszorbanciája}}{\text{pozitív kontroll abszorbanciája} - \text{negatív kontroll abszorbanciája}} \times 100.$$

6. EREDMÉNYEK

Antimikrobiális hatás vizsgálatának eredményei

Hatóanyagaink antimikrobiális hatásának tesztelése során azt vizsgáltuk, hogy a marbofloxacin, a geraniol és a Tris-EDTA önálló hatóanyagként, valamint kettes vagy hármas kombinációiban alkalmazva az önálló hatóanyag MIC értékéhez képest hogyan változik a kombinációban lévő ugyanezen hatóanyag MIC értéke. Ezen gátló koncentrációs adatok összehasonlításával vizsgáltuk a hatóanyagok közötti kölcsönhatásokat. Feltevésünk az volt, hogy a geraniol és/vagy a Tris-EDTA jelenléte megakadályozza, vagy lassítja a MIC emelkedés ütemét a baktériumtörzs esetén sorozatpasszáls során marbofloxacinra tekintettel. A 10 napos kísérleti eredmények összesített MIC értékeit hatóanyagokra és kombinációikra lebontva a 4. táblázat foglalja össze.

	MIC 1. nap	MIC 2. nap	MIC 3. nap	MIC 4. nap	MIC 5. nap	MIC 6.nap	MIC 7.nap	MIC 8. nap	MIC 9. nap	MIC 10. nap
M ($\mu\text{g/ml}$)	2	2	4	4	4	4	8	16	16	16
G (mg/ml)	1,6	1,6	1,6	1,6	3,2	1,6	3,2	1,6	1,6	1,6
E (mg/ml)	0,8	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
ME ($\mu\text{g/ml} + \text{mg/ml}$)	0,25+ 0,5	0,25+ 0,5	0,5+ 1	0,5+ 1	0,5+ 1	0,25+ 0,5	0,25+ 0,5	0,25+ 0,5	0,25+ 0,5	0,5+ 1
GE (mg/ml+ mg/ml)	0,4+ 0,4	0,4+ 0,4	0,8+ 0,8	0,2+ 0,2	0,8+ 0,8	0,8+ 0,8	0,8+ 0,8	0,8+ 0,8	0,8+ 0,8	0,8+ 0,8
MG ($\mu\text{g/ml} + \text{mg/ml}$)	1+1	1+1	2+2	1+1	2+2	2+2	2+2	4+4	4+4	2+2
MGE ($\mu\text{g/ml} + \text{mg/ml} + \text{mg/ml}$)	0,25+ 0,287+ 0,325	0,125+ 0,123+ 0,1625	0,125+ 0,123+ 0,1625	0,25+ 0,287+ 0,325	0,125+ 0,123+ 0,1625	0,125+ 0,123+ 0,1625	0,25+ 0,287+ 0,325	0,125+ 0,123+ 0,1625	0,25+ 0,287+ 0,325	0,25+ 0,287+ 0,325

4. táblázat MIC értékek változása az egyes hatóanyagok és azok kombinációinak tekintetében a 10 napos passzáls során *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ törzsön. Jelölések: M: marbofloxacin, G: geraniol, E: Tris-EDTA, ME: marbofloxacin+ Tris-EDTA, GE: geraniol+ Tris-EDTA, MG: marbofloxacin+ geraniol, MGE: marbofloxacin+ geraniol + Tris-EDTA.

A 4. táblázatban összefoglalt MIC értékek alapján elmondható, hogy a marbofloxacin MIC értéke folyamatosan emelkedő tendenciát mutatott a 10 napos passzáls alatt, mert 2 $\mu\text{g/ml}$ -ről

16 µg/ml-re növekedett és a 8. naptól a 10. napig konstans 16 µg/ml maradt. Ezzel szemben az önálló geraniol és Tris-EDTA kezelések a passzálás 10 napja során közel azonos, a hatóanyagra jellemző MIC értékeket eredményeztek. A geraniol esetében a 4., 5. nap és a 6. és 7. nap között történt gátló koncentráció emelkedés 1,6 mg/ml-ről 3,2 mg/ml-re. A Tris-EDTA-nál az 1. napi 0,8 mg/ml-ről történt változás 1,6 mg/ml-re, mely érték a 2.-10.nap között konstansan megmaradt. A marbofloxacin és Tris-EDTA (ME) kombinációjának MIC értékeire is a konstans jelleg mondható el. A geraniol és Tris-EDTA (GE), valamint a marbofloxacin és a geraniol (MG) kombinációs MIC értékei a minimális emelkedés ellenére sem mondható számottevő változásnak. Annak ellenére, hogy hatóanyagaink hármas kombinációjának (MGE) MIC értékei nem mutattak számottevő növekedést, a kapott eredmények alapján az látható, hogy a marbofloxacin önálló MIC értéke nem növekedett a kombináción belül, mely partnereinek - geraniol és Tris-EDTA -védőfunkciójára utalhat, tehát késleltetik a marbofloxacin MIC emelkedését.

A három hatóanyag egymással való kölcsönhatását a FIC_{index} számításával állapíthatjuk meg. A FIC_{index} az egyes hatóanyagok frakcionált gátló koncentrációs (FIC, fractional inhibitory concentration) értékeinek összege. Ezen FIC érték kiszámítását az adott hatóanyag-kombinációs MIC értékének és az önálló hatóanyag MIC értékének hányadosaként kapjuk meg. Ennek módszerét a marbofloxacin és geraniol kombinációs példáján szeretném szemléltetni:

$$\frac{\text{MIC kombinációs geraniol}}{\text{MIC önálló geraniol}} = FIC_{\text{geraniol}}$$

$$\frac{\text{MIC kombinációs marbofloxacin}}{\text{MIC önálló marbofloxacin}} = FIC_{\text{marbofloxacin}}$$

$$FIC_{\text{geraniol}} + FIC_{\text{marbofloxacin}} = FIC_{\text{index}}$$

Az egyenletek alapján kapott indexeket a CLSI standardnak megfelelően meghatározott határértékek és intervallumok szerint tudjuk összesen négy csoportba sorolni a kölcsönhatás módja szerint. Az értékek elbírálását az **5. táblázat** szemlélteti.

Hatás	Számolt FIC index
Antagonizmus	4<
Indifferens, semleges	1-4
Additív vagy parciális szinergizmus	0,5-1
Szinergizmus	<0,5

5. táblázat FIC index elbírálása a határértékek alapján.

A kettes és hármas kombinációk MIC értékei szerint kiszámolt FIC index eredmények alapján elmondható, hogy egyik kombinációban sem volt antagonista kölcsönhatás. A kettes kombinációk közül a marbofloxacin és geraniol (MG) esetében a 10 nap alatt számolt napi FIC indexek közül a 4. és 7. napi FIC index kivételével – amelyek parciális szinergista kölcsönhatást mutattak - mindegyik indifferens eredményt adott.

A marbofloxacin és Tris-EDTA (ME) kombinációja a 10 napos passzálás során jellemzően 0,5 alatti FIC indexet mutatott, ezzel szinergista kölcsönhatást bizonyítva.

A geraniol és a Tris-EDTA (GE) szinergizmusvizsgálata során a napi FIC indexek alapján parciális szinergizmust állapítottunk meg a két hatóanyag között, mert a 4. napi FIC index kivételével - ahol szinergizmus volt számolható - a FIC index minden esetben 0,5 és 1 közé esett.

A hármas kombináció (MGE) esetében az 1., 4. és 10. napok parciális szinergista kölcsönhatásaitól eltekintve, szinergizmus mondható a három hatóanyag egyidejű használatakor, melyet a **6. táblázat** szemléltet.

Napok száma	FIC index MGE	Kölcsönhatás
1.	0,71	parciális szinergista
2.	0,24	szinergista
3.	0,21	szinergista
4.	0,89	parciális szinergista
5.	0,17	szinergista
6.	0,21	szinergista
7.	0,32	szinergista
8.	0,19	szinergista
9.	0,40	szinergista
10.	0,80	parciális szinergista

6. táblázat Marbofloxacin, geraniol és Tris-EDTA hármas kombinációjának (MGE) antimikrobiális kölcsönhatásai a 10 napos passzálás során *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ törzsön

CCCP vizsgálati eredmények

Az efflux-pumpa kísérlet során arra voltunk kíváncsiak, hogy az általunk vizsgált 22 darab *Pseudomonas aeruginosa* klinikai izolátumon és az 1 darab kontroll *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ törzsön alkalmazott hatóanyagaink (marbofloxacin, geraniol és Tris-EDTA), illetve azok kettes és hármas kombinációival kapott MIC értékek csökkenek-e CCCP jelenlétében az efflux-pumpa mechanizmus gátlásának köszönhetően. Az önálló hatóanyagaink CCCP-vel való kezelésekor a marbofloxacin esetében az 5., 15., 20. és 21. izolátumoknál tapasztaltunk gátló koncentráció csökkenést. Az 5. izolátumnál a MIC változása 4 µg/ml helyett 2 µg/ml, míg a 15. és 21. izolátumok esetében 2 µg/ml helyett 1 µg/ml, végül a 20. izolátum MIC értéke 8 µg/ml-ről 4 µg/ml-re változott CCCP jelenlétében. Ezek az eltérések mind a négy esetben csupán 1 hígításnyiak voltak. A geraniol esetében egyáltalán nem tapasztaltunk változást. CCCP jelenlétében és anélkül is 1,6 mg/ml volt a MIC. A Tris-EDTA-nál pedig mind a 23 izolátumnál 1,6 mg/ml-ről 0,8 mg/ml-re csökkent a MIC, mely szintén csak 1 hígításnyi változás az összes izolátum esetében.

A kettes kombinációknál már több izolátum mutatott eltérést a MIC-ben CCCP-vel kezelve. A geraniol és Tris-EDTA (GE) esetében az 1., 3.-8. izolátumoknál volt eltérés, ahol 0,8 mg/ml + 0,8 mg/ml helyett 0,4 mg/ml + 0,4 mg/ml MIC-et mértünk CCCP hozzáadása után. A marbofloxacin és geraniol (MG) kombinációjánál csak a 14. izolátum esetében csökkent 1 µg/ml + 1 mg/ml-ről 0,5 µg/ml + 0,5 mg/ml-re, valamint a 16. és 18. izolátumoknál 2 µg/ml + 2 mg/ml-ről változott 1 µg/ml + 1 mg/ml-re a MIC érték CCCP jelenlétében. Marbofloxacin és

Tris-EDTA (ME) esetében pedig csak a 22. és 23.-nál tapasztaltunk változást, ahol mind a két esetben 0,5 µg/ml + 1 mg/ml-ről 0,25 µg/ml + 0,25 mg/ml-re csökkentek a gátló koncentráció értékei. A kettes kombinációknál (GE, MG és ME) kapott eredményeket és azok változását az efflux-pumpa gátló anyag használatával (+) és anélkül (-) a **7. táblázat** szemlélteti, melyben azok a MIC értékek vannak sötét narancssárgával jelölve, ahol és amely izolátumnál a MIC csökkenését tapasztaltuk. A **7. táblázatban** az 1. sorszám a *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ kontroll törzset jelöli.

Hatóanyag-kombinációk (M: µg/ml, G: mg/ml, E: mg/ml)							
Izolátumok sorszáma		GE+	GE-	MG+	MG-	ME+	ME-
	1.	0,4+0,4	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	2.	0,8+0,8	0,8+0,8	2+2	2+2	0,5+1	0,5+1
	3.	0,4+0,4	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	4.	0,4+0,4	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	5.	0,4+0,4	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	6.	0,4+0,4	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	7.	0,4+0,4	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	8.	0,4+0,4	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	9.	0,8+0,8	0,8+0,8	2+2	2+2	0,5+1	0,5+1
	10.	0,8+0,8	0,8+0,8	1+1	1+1	0,5+1	0,5+1
	11.	0,8+0,8	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	12.	0,8+0,8	0,8+0,8	2+2	2+2	0,25+0,5	0,25+0,5
	13.	0,8+0,8	0,8+0,8	2+2	2+2	0,5+1	0,5+1
	14.	0,8+0,8	0,8+0,8	0,5+0,5	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	15.	0,8+0,8	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	16.	0,8+0,8	0,8+0,8	1+1	2+2	0,25+0,5	0,25+0,5
	17.	0,8+0,8	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	18.	0,8+0,8	0,8+0,8	1+1	2+2	0,5+1	0,5+1
	19.	0,8+0,8	0,8+0,8	2+2	2+2	0,25+0,5	0,25+0,5
	20.	0,8+0,8	0,8+0,8	2+2	2+2	0,25+0,5	0,25+0,5
	21.	0,8+0,8	0,8+0,8	1+1	1+1	0,25+0,5	0,25+0,5
	22.	0,8+0,8	0,8+0,8	4+4	4+4	0,25+0,5	0,5+1
	23.	0,8+0,8	0,8+0,8	4+4	4+4	0,25+0,5	0,5+1

7. táblázat A kettes kombinációk MIC értékének változása CCCP jelenlétében és anélkül. Jelölések: GE: geraniol + marbofloxacin, MG: marbofloxacin + geraniol, ME: marbofloxacin + Tris-EDTA, „+”: CCCP-vel kezelve, „-”: CCCP-vel nem volt kezelve.

A hármas kombináció (MGE) tekintetében az mondható el, hogy egyedül a 16. izolátum mutatott MIC érték változást a CCCP-vel kezelt kombinációnál, mely esetben 0,125 µg/ml + 0,1237 mg/ml + 0,1625 mg/ml helyett 0,25 µg/ml + 0,2875 mg/ml + 0,325 mg/ml volt a MIC hígítási értéke.

A statisztikai modellben a CCCP változó nem bír nagy szignifikanciával ($p = 0,0458$) a MIC értékre nézve, tehát nincs jelentős hatása a gátló koncentrációra.

Biofilm-eradikáció vizsgálati eredményei

A kísérleteink során vizsgált hatóanyagok és kombinációinak a korábban megadott kezdőkoncentrációk kettes alapú hígítási sorának biofilmellenes hatását a kristály ibolya festési eljárással három párhuzamos vizsgálatban értékelve elmondhatjuk, hogy az egyes hatóanyagok vagy kombinációinak biofilmfeltörő koncentrációja olyan magas szórást mutat, hogy a festési eljárást az általunk használt módon *P. aeruginosa* ATCC® 27583™ törzs esetében biofilmfeltörő képesség megállapítására megbízhatatlannak tekintettük az eredmények alacsony reprodukálhatósága miatt.

A biofilmfeltörést a vitális MTS-formazán festékekkel vizsgálva elmondhatjuk, hogy a hatóanyagok önálló alkalmazása esetén kapott EC_{50} értékek a következők voltak: marbofloxacin esetén: 2 $\mu\text{g/ml}$, geraniol esetén: 1,6 mg/ml, tris-EDTA esetén: 0,8 mg/ml voltak, amely értékek megegyeznek a MIC vizsgálatban kapott értékeknek. Kettes kombinációk esetében a biofilmfeltörő koncentrációk a következők voltak: geraniol 0,4 mg/ml + Tris-EDTA 0,4 mg/ml, Marbofloxacin 1 $\mu\text{g/ml}$ + geraniol 1 mg/ml, marbofloxacin 0,25 + Tris-EDTA 0,5 mg/ml. A hármas kombináció esetében szintén a MIC vizsgálatnak megfelelő koncentráció (marbofloxacin: 0,25 $\mu\text{g/ml}$ + geraniol: 0,287 mg/ml + Tris-EDTA: 0,325 mg/ml) bizonyult ekvivalensnek a biofilmfeltörő koncentrációval.

7. MEGBESZÉLÉS

Antimikrobiális hatás vizsgálata

A *Pseudomonas aeruginosa* rezisztencia vizsgálata során mindhárom hatóanyagunk mutatott antimikrobiális hatást. A Tris-EDTA önálló alkalmazása által a 10 napos passzálás alatt mért MIC értékek intervalluma 0,8-tól 1,6 mg/ml-ig terjedt. Egy 2013-as kutatás során több különböző baktériumra és törzsekre végeztek MIC vizsgálatokat Tris-EDTA-val önállóan és kombinációban, melynek során a *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ törzs esetében a Tris-EDTA önálló alkalmazásával a kapott MIC-intervallum 2,2 és 8,9 mg/ml közé esett [2]. Ezt összevetve a saját kísérlet során kapott MIC-intervallummal, elmondható, hogy esetünkben alacsonyabb MIC-intervallumról beszélhetünk, amelynek oka a kísérleti elrendezésbeli vagy a Tris és EDTA kombináció formulálása és pufferelése során megjelenő különbség lehet.

Egy 2014-es tanulmányban a geraniol MIC értéke a rezisztencia vizsgálat során 1,4 mg/ml és 2,8 mg/ml között változott, ezért azt vártuk, hogy a saját kísérletünkben hasonló vagy ennél kedvezőbb MIC-intervallumot kapunk [61]. A mi esetünkben a geraniol önállóan kapott MIC értéke 1,6 mg/ml és 3,2 mg/ml között volt, mely hasonló eredményt hozott az előbb említett kutatással.

Egy 2022-es kísérlet során Febler és munkatársai 56 kutya és macska füléből vett *P. aeruginosa* izolátumon végeztek MIC mérést különböző antibiotikumokkal, köztük marbofloxaccinnal. Esetükben 4 olyan izolátumot találtak, ahol a MIC meghaladta a 32 µg/ml-t [62]. Egy másik tanulmány során a marbofloxacin önálló alkalmazásával *P. aeruginosa* baktérium 11 izolátumán vizsgált rezisztencia által kapott MIC intervallum 39,1 µg/ml és 312,5 µg/ml volt [2]. Mindeközben a marbofloxacin MIC értéke az általunk vizsgált 10 napos kísérlet során 2-16 µg/ml között változott, tehát jóval alacsonyabb MIC értékek születtek, hiszen a passzálást nem egy tudottan rezisztens törzsön, hanem egy marbofloxacinra érzékeny kontroll törzsön (ATCC® 27853™) végeztük.

A kettes és hármas kombinációk MIC értékei alapján kiszámolt FIC_{index} és a kölcsönhatási küszöbértékek összevetése szerint, megállapításra került a marbofloxacin, geraniol és Tris-EDTA kettes és hármas kombinációinak szinergizmusa, parciális szinergizmusa vagy indifferenciája. Antagonizmust egyik kombináció esetében sem tapasztaltunk. Egy 2013-as kísérlet során *P. aeruginosa* törzseken vizsgálták a Tris-EDTA és a

marbofloxacin (ME) kölcsönhatását, melyben összehasonlították az önálló hatóanyagok MIC értékeit a kombinációban kapott MIC értékekkel, melyek jóval alacsonyabbak voltak kombinációban, ahogy azt a saját kísérletünk során is vártuk [2].

Egy másik, korábbi tanulmányban a geraniolt hasonlították össze egy másik fluorokinolon antibiotikummal, a ciprofloxacinnal. Ebben a kísérletben a ciprofloxacin és geraniol FIC_{index} eredménye 2,13 lett, mely szintén indifferens eredményt adott [63]. Ezért nem volt meglepő számunkra, hogy az általunk vizsgált marbofloxacin és geraniol (MG) kombinációja szintén indifferens eredményt hozott.

A geraniol és Tris-EDTA (GE) FIC_{indexe} a 10 napos passzálás alatt 5 napon semleges, 4 napon parciális szinergizmust, 1 napon pedig szinergizmust mutatott. Caballero Gomez és munkatársai 2022-es kutatásuk során különféle esszenciális olajok és az EDTA szinergizmusát vizsgálták különböző baktériumokon és azok törzsein. *P. aeruginosa* esetében a geraniol és az EDTA kombinációja csupán 3 törzs esetében mutatott szinergizmust [64]. A fő különbséget a két kutatás között az adja, hogy míg Caballero és munkatársai több *P. aeruginosa* törzs vizsgálatát nézték, addig a mi kutatásunk esetében 1 *P. aeruginosa* törzsre néztünk szinergizmusvizsgálatot.

A hármas kombináció, tehát a marbofloxacin, Tris-EDTA és geraniol (MGE) egyidejű használata a passzálás során többségében szinergizmust mutatott a vizsgált törzsön. Ezen szerek hármas kombinációját eddig csak a ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vizsgálta. Más források nem említik ennek a hármas-szerkombinációnak a kutatását, emiatt a hatóanyagok különböző koncentráció intervallumainak további hatékonyság tesztelésével és statisztikailag releváns számú klinikai izolátum vizsgálatának bevonásával hozzásegíthet egy új állatgyógyászati fülcsepp készítmény megalkotásához.

Efflux-pumpa vizsgálat

A kísérleti eredményeink alapján az önálló hatóanyagok, valamint a kettes és hármas kombinációk azt mutatták, hogy az általunk vizsgált *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ kontroll törzs, illetve kutyafülből izolált 22 darab klinikai izolátumnál nem a baktérium efflux-pumpa funkciója felel az alkalmazott szerek elleni rezisztenciáért, mert a CCCP-vel nem kezelt és kezelt izolátumok MIC értékei között a minimum 4 hígítási egységnyi csökkenés helyett csupán 1 egységnyi eltérés vagy egyáltalán nem volt látható. Elmondható, hogy nem érik el azt a

küszöbértéket, amely alapján megállapítható lenne a *Pseudomonas aeruginosa* efflux-pumpa funkciója a szerek használata során. Ehhez nagyon hasonló kutatást végeztek 2021-ben, ahol *Acinetobacter baumannii* törzsek cefepime és imipenem iránti érzékenységvizsgálatát végezték el CCCP jelenlétében és anélkül. Esetükben a MIC CCCP jelenlétében a vizsgált törzsek 2,1%-ban imipenemre, 8,5%-ban cefepimere nézve a hatóanyagok 4 vagy több hígítási fokával csökkent, tehát az *A. baumannii* elleni védekezésben a CCCP segítheti az előbb említett hatóanyagokat [60].

Biofilmfeltörés

A biofilmfeltörés vizsgálatára széles körben alkalmazott kristály ibolya festési eljárás kísérletünkben nem reprodukálható eredményeket hozott a hatékony biofilmfeltörő koncentráció megállapítása tekintetében. Ez összhangban áll azzal a publikációval, melyben alátámasztják, hogy az eljárás felhasználhatósága limitált, kifejezetten *P. aeruginosa* biofilmjei esetén esetleges a vizsgálatok reprodukálhatósága [65].

A biofilmfeltörő képesség vizsgálatának eredményeként az említett szerekkel és kombinációikkal kapott EC₅₀ értékek megegyeztek a planktonikus baktériumokon történő minimális gátló koncentráció értékeivel, amely azt sugallhatja, hogy a kialakult *P. aeruginosa* biofilm nem biztosított megnövekedett ellenállóképességet a vizsgált szerekkel szemben a baktériumok számára a rendelkezésre álló egy éjszakán át tartó inkubáció alatt. Ennek értelmében a szerek biofilmfeltörő képességét egyéb kísérleti elrendezésben, hosszabb inkubációs időt követően lenne érdemes vizsgálni a későbbiekben.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

A kutyák kimagasló arányban érkeznek fülészeti panaszokkal az állatorvosi rendelőbe. Ennek egyik leggyakoribb oka a külső hallójárat gyulladás, amelyet másodlagosan, a nagyszámban multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* baktérium okozhat, melyet rezisztencia mechanizmusai és biofilmpülési képessége miatt nehéz kezelni. Kutatásunk fő célja egy állatgyógyászati fülészetben használható potenciális szerkombináció vizsgálata volt, ahol a komponensek hatékony antibakteriális és potenciális biofilmfeltörő tulajdonsággal rendelkeznek és kombinációban való alkalmazásuk révén egymás hatékonyságát növelik. A marbofloxacin második generációs fluorokinolonként az egyik leghatékonyabb antibiotikum a *P. aeruginosa* elleni védekezésben. A geraniol egy monoterpén alkohol, mely kiváló biofilmellenes hatással bír. Az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) fém kelátorként a marbofloxacin hatását potenciózni képes. A három hatóanyag, illetve ezek kettes, hármas kombinációinak antibakteriális és biofilmellenes hatását vizsgáltuk kutya külső hallójárat gyulladásából vett és biofilmtermelő kontroll *P. aeruginosa* törzseken. A minimum gátló koncentráció (MIC) vizsgálatával sorozatpasszálást végeztünk a biofilmtermelő *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ törzsön. Megfigyeltük, hogy a biofilmellenes anyagokkal való kombinálás gátolja-e a rezisztencia terjedését marbofloxacinra nézve. Emellett kíváncsiak voltunk, hogy a *P. aeruginosa* antimikrobiális rezisztenciája összefüggésbe hozható-e a baktérium efflux-pumpa funkciójával. Ehhez huszonkettő *P. aeruginosa* klinikai izolátumot és egy kontroll törzset (ATCC® 27853™) vizsgáltunk a hatóanyagokkal és kombinációikkal egy efflux-pumpa gátló (EPI) hatóanyag karbonil-cianid-3-klorofenilhidrazin (CCCP) jelenlétében és anélkül. Továbbá a hatóanyagok és kombinációik biofilmfeltörő tulajdonságát vizsgáltuk a *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ törzs biofilmjén kristályibolya és MTS-formazán festési eljárásokkal. Kutatási eredményeink a hatóanyagok bizonyos kombinációi között szinergizmust, részleges szinergizmust vagy indifferens hatást tártak fel. A CCCP-vel végzett rezisztencia vizsgálati eredményeink alapján az antibakteriális ellenállóképesség hátterében nem efflux-pumpa funkciója áll a vizsgált izolátumok esetében az adott szerek jelenléte mellett. A biofilmfeltörést vizsgáló kísérletünk eredményei által arra következtettünk, hogy a vizsgált hatóanyagok és kombinációinak biofilmfeltörő hatása nem volt számottevően nagyobb a kombinációban való alkalmazáskor, mint önálló marbofloxacin használatakor.

9. SUMMARY

A high proportion of dogs come to the veterinary practice with ear complaints. One of the most common causes is external ear canal inflammation, which can be caused secondarily by the highly multiresistant bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which is difficult to treat due to its resistance mechanisms and biofilm formation. The main objective of our research was to investigate a potential combination of agents for use in veterinary otolaryngology, where the components have potent antibacterial and potential biofilm-disrupting properties and when used in combination, enhance each other's efficacy. As a second-generation fluoroquinolone, marbofloxacin is one of the most effective antibiotics for the control of *P. aeruginosa*. Geraniol is a monoterpene alcohol with excellent anti-biofilm activity. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) can potentiate the action of marbofloxacin as a metal chelator. We investigated the antibacterial and anti-biofilm effects of the three drugs and their two- and three-drug combinations on biofilm-producing control *P. aeruginosa* strains and *P. aeruginosa* from canine *otitis externa*. A serial passaging of the biofilm-producing *P. aeruginosa* strain ATCC® 27853™ was performed by testing the minimum inhibitory concentration (MIC). We observed whether the combination with anti-biofilm agents inhibited the spread of resistance to marbofloxacin. In addition, we wondered whether the antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* could be related to the efflux pump function of the bacterium. To this end, we tested twenty-two *P. aeruginosa* clinical isolates and one control strain (ATCC® 27853™) with and without the active substances and their combinations in the presence and absence of an efflux pump inhibitor (EPI), the active substance carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazine (CCCP). In addition, the biofilm disruption properties of the active substances and their combinations were investigated on the biofilm of *P. aeruginosa* strain ATCC® 27853™ using crystal violet and MTS-formosan staining procedures. Our research has revealed synergism, partial synergism or indifferent effects between certain combinations of active substances. Our resistance test results with CCCP suggest that the antibacterial resistance is not due to an efflux-pump function of the tested isolates in the presence of the respective agents. From the results of our biofilm disruption experiment, we concluded that the biofilm disruptive effect of the tested agents and their combinations was not significantly greater when used in combination than when used alone with marbofloxacin.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Zowalaty MEE, Thani AAA, Webster TJ, Zowalaty AEE, Schweizer HP, Nasrallah GK, Marei HE, Ashour HM (2015) *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. In: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.48>. <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.15.48>. Accessed 6 Mar 2023
2. Buckley LM, McEwan NA, Nuttall T (2013) Tris–EDTA significantly enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Veterinary Dermatology* 24:519–e122. <https://doi.org/10.1111/vde.12071>
3. Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock REW, Martínez JL (2011) The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactams. *Virulence* 2:144–146. <https://doi.org/10.4161/viru.2.2.15014>
4. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
5. Adabi M, Talebi-Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, Moghadam-Maragheh N, Majidpour A (2015) Spread of Efflux Pump Overexpressing-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an Efflux Pump Inhibitor. *Infect Chemother* 47:98–104. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.98>
6. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ (2001) Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* : Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45:105–116. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.105-116.2001>
7. Al Rashed N, Joji R, Saeed N, Bindayna K (2020) Detection of overexpression of efflux pump expression in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Int J App Basic Med Res* 10:37. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_90_19
8. Baron SA, Rolain J-M (2018) Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73:1862–1871. <https://doi.org/10.1093/jac/dky134>
9. Gomis-Font MA, Pitart C, Del Barrio-Tofiño E, Zboromyrska Y, Cortes-Lara S, Mulet X, Marco F, Vila J, López-Causapé C, Oliver A (2021) Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin- β -Lactamase Inhibitor Combinations through the Modification of the *Pseudomonas aeruginosa* MexCD-OprJ Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e0008921. <https://doi.org/10.1128/AAC.00089-21>

10. BĂLĂȘOIU M, BĂLĂȘOIU AT, MĂNESCU R, AVRAMESCU C, IONETE O (2014) *Pseudomonas Aeruginosa* Resistance Phenotypes and Phenotypic Highlighting Methods. *Curr Health Sci J* 40:85–92. <https://doi.org/10.12865/CHSJ.40.02.01>
11. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection* 13:560–578. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x>
12. Penna B, Thomé S, Martins R, Martins G, Lilenbaum W (2011) In vitro antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in Rio de Janeiro , Brazil. *Braz J Microbiol* 42:1434–1436. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400027>
13. Pye C (2018) *Pseudomonas* otitis externa in dogs. *Can Vet J* 59:1231–1234
14. Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS (2019) Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Veterinary Dermatology* 30:228-e70. <https://doi.org/10.1111/vde.12734>
15. Paterson S (2016) Discovering the causes of otitis externa. *In pract* 38:7–11. <https://doi.org/10.1136/inp.i470>
16. Rutherford L, Lee K (2015) Anal sac disease in dogs. *In Practice* 37:435–444. <https://doi.org/10.1136/inp.h4891>
17. Hedlund C, DeYoung D (1977) Otitis Externa and Surgery. Iowa State University Veterinarian
18. Bourély C, Cazeau G, Jarrige N, Leblond A, Madec JY, Haenni M, Gay E (2019) Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiol Infect* 147:e121. <https://doi.org/10.1017/S0950268818003278>
19. Cole LK (2004) Otoscopic evaluation of the ear canal. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34:397–410. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.10.004>
20. Lehner G, Sauter Louis C, Mueller RS (2010) Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. *Veterinary Record* 167:23–26. <https://doi.org/10.1136/vr.c3523>
21. Marignac G, Petit JY, Jamet JF, Desquilbet L, Petit JL, Woehrlé F, Troughon T, Fantini O, Perrot S (2019) Double Blinded, Randomized and Controlled Comparative Study Evaluating the Cleaning Activity of Two Ear Cleaners in Client-Owned Dogs with Spontaneous Otitis Externa. *OJVM* 09:67–78. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2019.96006>
22. Guardabassi L, Ghibaud G, Damborg P (2010) In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Veterinary dermatology* 21:282–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00812.x>

23. Paterson S (2016) Topical ear treatment – options, indications and limitations of current therapy. *Journal of Small Animal Practice* 57:668–678. <https://doi.org/10.1111/jsap.12583>
24. Morris DO (2004) Medical therapy of otitis externa and otitis media. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34:541–555, vii–viii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.10.009>
25. Bajwa J (2019) Canine otitis externa — Treatment and complications. *Can Vet J* 60:97–99
26. Liu Z, Lin Y, Lu Q, Li F, Yu J, Wang Z, He Y, Song C (2017) In vitro and in vivo activity of EDTA and antibacterial agents against the biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection* 45:23–31. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0905-z>
27. de Bentzmann S, Plésiat P (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections: *Pseudomonas aeruginosa* and human infections. *Environmental Microbiology* 13:1655–1665. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x>
28. Elborn S, Vallieres E (2014) Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity. *AGG* 161. <https://doi.org/10.2147/AGG.S53768>
29. Agarwal G, Kapil A, Kabra SK, Das BK, Dwivedi SN (2005) In vitro efficacy of ciprofloxacin and gentamicin against a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and its free-living forms. *THE NATIONAL MEDICAL JOURNAL OF INDIA* 18:
30. Abd El-Ghany WA (2021) *Pseudomonas aeruginosa* infection of avian origin: Zoonosis and one health implications. *Vet World* 2155–2159. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2155-2159>
31. Fernandes MR, Sellera FP, Moura Q, Carvalho MPN, Rosato PN, Cerdeira L, Lincopan N (2018) Zooanthroponotic Transmission of Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* , Brazil. *Emerg Infect Dis* 24:1160–1162. <https://doi.org/10.3201/eid2406.180335>
32. Rollet C, Gal L, Guzzo J (2008) Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*: Physiology of biofilm-detached cells and recolonization. *FEMS Microbiology Letters* 290:135–142. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x>
33. Wei Q, Ma L (2013) Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *IJMS* 14:20983–21005. <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>
34. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA (2011) Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture ▽. *Appl Environ Microbiol* 77:5238–5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
35. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA (2020) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* 21:8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

36. Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, Ross A, Gupta K, Suuronen EJ, Mah T-F, Griffith M, Alarcon EI (2021) Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience* 24:102443. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443>
37. Coenye T, Nelis HJ (2010) In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 83:89–105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>
38. O'Toole GA (2011) Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp* 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
39. Shukla SK, Rao TS (2017) An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. *Microbiology*
40. Lin S, Yang L, Chen G, Li B, Chen D, Li L, Xu Z (2017) Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix. *Microbial Pathogenesis* 111:285–291. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.005>
41. Pérez-Rodríguez S, García-Aznar JM, Gonzalo-Asensio J (2022) Microfluidic devices for studying bacterial taxis, drug testing and biofilm formation. *Microbial Biotechnology* 15:395–414. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13775>
42. Hazan R, Que Y-A, Maura D, Rahme LG (2012) A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiology* 12:259. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-259>
43. Seo M, Oh T, Bae S (2021) Antibiofilm activity of silver nanoparticles against biofilm forming *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs with otitis externa. *Veterinary Medicine and Science* 7:1551–1557. <https://doi.org/10.1002/vms3.554>
44. Kim E-J, Hyun J-E, Kang Y-H, Baek S-J, Hwang C-Y (2022) In vitro antibacterial and antibiofilm effects of cold atmospheric microwave plasma against *Pseudomonas aeruginosa* causing canine skin and ear infections. *Veterinary Dermatology* 33:29-e10. <https://doi.org/10.1111/vde.13030>
45. Cunha E, Rebelo S, Carneiro C, Tavares L, Carreira LM, Oliveira M (2020) A polymicrobial biofilm model for testing the antimicrobial potential of a nisin-biogel for canine periodontal disease control. *BMC Vet Res* 16:469. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02646-3>
46. Chan WY, Hickey EE, Page SW, Trott DJ, Hill PB (2019) Biofilm production by pathogens associated with canine otitis externa, and the antibiofilm activity of ionophores and antimicrobial adjuvants. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 42:682–692. <https://doi.org/10.1111/jvp.12811>
47. Jerzsele Á, Pásztiné-Gere E (2015) Evaluating synergy between marbofloxacin and gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs with otitis externa. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62:45–55. <https://doi.org/10.1556/amicr.62.2015.1.4>

48. Park Y, Oh J, Park S, Sum S, Song W, Chae J, Park H (2020) Antimicrobial resistance and novel mutations detected in the *gyrA* and *parC* genes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from companion dogs. *BMC Vet Res* 16:111. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02328-0>
49. Nedbalcova K, Zouharova M, Sperling D (2019) Post-antibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin and amoxicillin against selected respiratory pathogens of pigs. *Vet Med* 64:67–77. <https://doi.org/10.17221/123/2018-VETMED>
50. Corum O, Terzi E, Durna Corum D, Kenanoglu ON, Bilen S, Uney K (2020) Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin after oral and intravenous administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 514:734510. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734510>
51. Chen W, Viljoen AM (2010) Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany* 76:643–651. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
52. Lei Y, Fu P, Jun X, Cheng P (2019) Pharmacological Properties of Geraniol – A Review. *Planta Med* 85:48–55. <https://doi.org/10.1055/a-0750-6907>
53. Gupta P, Gupta H, Poluri KM (2021) Geraniol eradicates *Candida glabrata* biofilm by targeting multiple cellular pathways. *Appl Microbiol Biotechnol* 105:5589–5605. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11397-6>
54. Fatima K, Wani ZA, Meena A, Luqman S (2021) Geraniol exerts its antiproliferative action by modulating molecular targets in lung and skin carcinoma cells. *Phyther Res* 35:3861–3874. <https://doi.org/10.1002/ptr.7094>
55. Gerasimova T, Jovtchev G, Gateva S, Topashka-Ancheva M, Stankov A, Angelova T, Dobрева A, Mileva M (2022) Study on Cytotoxic and Genotoxic Potential of Bulgarian *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L. Hydrosols—In Vivo and In Vitro. *Life* 12:1452. <https://doi.org/10.3390/life12091452>
56. Boyd M, Santoro D, Gram D (2019) In vitro antimicrobial activity of topical otological antimicrobials and Tris-EDTA against resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs. *Vet Dermatol* 30:139-e40. <https://doi.org/10.1111/vde.12717>
57. Aoki N, Ishii Y, Tateda K, Saga T, Kimura S, Kikuchi Y, Kobayashi T, Tanabe Y, Tsukada H, Gejyo F, Yamaguchi K (2010) Efficacy of Calcium-EDTA as an Inhibitor for Metallo- β -Lactamase in a Mouse Model of *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4582–4588. <https://doi.org/10.1128/AAC.00511-10>
58. Cole LK, Luu DH, Rajala-Schultz PJ, Meadows C, Torres AH (2006) In vitro activity of an ear rinse containing tromethamine, EDTA, and benzyl alcohol on bacterial pathogens from dogs with otitis. *American Journal of Veterinary Research* 67:1040–1044. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.6.1040>

59. Banin E, Brady KM, Greenberg EP (2006) Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl Environ Microbiol* 72:2064–2069. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2064-2069.2006>
60. Sanchez-Carbonel A, Mondragón B, López-Chegne N, Peña-Tuesta I, Huayan-Dávila G, Blitchtein D, Carrillo-Ng H, Silva-Caso W, Aguilar-Luis MA, del Valle-Mendoza J (2021) The effect of the efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 16:e0259915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259915>
61. Miladinović DL, Ilić BS, Kocić BD, Miladinović MD (2014) An in vitro Antibacterial Study of Savory Essential Oil and Geraniol in Combination with Standard Antimicrobials. *Natural Product Communications* 9:1934578X1400901125. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400901125>
62. Feßler AT, Scholtzek AD, Schug AR, Kohn B, Weingart C, Hanke D, Schink A-K, Bethe A, Lübke-Becker A, Schwarz S (2022) Antimicrobial and Biocide Resistance among Canine and Feline *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Isolates from Diagnostic Submissions. *Antibiotics* 11:152. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020152>
63. Lira M, Moraes G, Santos G, Andrade Júnior FPD, Pereira F, Oliveira Lima I (2020) Synergistic antibacterial activity of monoterpenes in combination with conventional antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 19:258. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v19i2.33665>
64. Caballero Gómez N, Manetsberger J, Benomar N, Castillo Gutiérrez S, Abriouel H (2022) Antibacterial and antibiofilm effects of essential oil components, EDTA and HLE disinfectant solution on *Enterococcus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* sp. multiresistant strains isolated along the meat production chain. *Frontiers in Microbiology* 13:
65. Kragh KN, Alhede M, Kvich L, Bjarnsholt T (2019) Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm* 1:100006. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100006>

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Veres Adrienn Mercédesznek, aki nélkül ez a kutatás nem jöhetett volna létre és akitől mind szakmailag, mind emberileg rengeteg dolgot tanulhattam a közösen töltött két éves munka során, amiért nagyon hálás vagyok. Emellett szeretnék köszönetet mondani a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék valamennyi oktatójának és munkatársának, akik végig segítettek munkámat témavezetőm mellett.

Külön köszönet illeti a Biostatisztika Tanszék dolgozóit, Elek Zoltánt és Fehérvári Pétert, akik a statisztikai számításoknál nyújtottak segítséget a kutatás során.

Szeretném továbbá megköszönni a családom-, barátaim- és a páromnak, akik végig támogattak és bíztattak a kutatómunka és dolgozatom elkészítése során és akik mindig szívesen hallgatták kísérleteink elvégzési módjait és eredményeit.