

EKOLOŠKI ZNAČAJ BAKTERIOLOŠKIH IZOLATA KOD ZAŠTIĆENIH VRSTA DIVLJIH PTICA

Stojanov, I.¹, Kapetanov, M., Živkov Baloš, Milica, Petrović, Jelena, Potkonjak, Dubravka

Sažetak: Sve divlje životinje zahtevaju neprekidni nadzor humane i veterinarske medicine, jer svojim karakteristikama mogu biti indikator međusobne interakcije nedirnuto delu ekosistema i uređenog, kontrolisanog, delu ekosistema kojim čovek aktivno upravlja. Neke od karakteristika divljih životinja koje mogu biti značajne za čovekov ekosistem i prirodu vezane su za bakterijske vrste koje naseljavaju divljač i nadzor bakterijske osetljivosti na antimikrobne lekove. Iz ovih razloga predmet našeg rada je ispitivanje osetljivosti izolovanih bakterijskih vrsta iz uzoraka poreklom od divljih životinja i analiza njihove osetljivosti prema antibioticima. Cilj rad je da se utvrdi da li se kod nekih od izolovanih bakterijskih vrsta pojavila rezistencija na testirane antibiotike. Izolovano je više različitih bakterijskih vrsta. Ispitivanja ukazuju da pojedine bakterijske vrste, izolovane iz uzoraka poreklom od divljih životinja, pokazuju rezistenciju na testirane antimikrobne lekove.

Cljučne reči: divlje životinja, bakterije, rezistencija, ekosistem

Uvod

Međusobne veze između prirode i čoveka su višestruke. Čovekovo interesovanje za prirodu ima ekonomski, društveni, biogeografski, ali i zdravstveni, naučni i ekološki aspekt. Divlje životinje čine možda jedan od najznačajnijih elemenata prirode. Iz tih razloga pravna regulativa se neprekidno dograđuje, kako bi se što sveobuhvatnije zaštitile divlje životinje. Donošenjem Zakona o potvrđivanju Konvencije o očuvanju evropske divlje flore i faune i prirodnih staništa (Bernska konvencija), iz novembra 2007. godine, Republika Srbija je preuzela na sebe obaveze i primenu pravila propisane navedenom konvencijom koja prepoznaje samo dva stepena zaštite divljih životinja i to strogo zaštićene i zaštićene vrste i ne poznaje kategoriju „divljač van režima zaštite“. Da li je dovoljno samo zaštititi divljač ili je potrebno sagledati ugroženost divljači sa aspekta međusobne interakcije čoveka i prirode? Neke od supstanci koje se ispuštaju u prirodu mogu doprineti promeni ekosistema i neophodnu adaptaciju divljih životinja na njih i onda kad za to nema dovoljno vremena [1]. Jedna od supstanci danas široko rasprostranjenih i svakako pod striktnim režimom kontrole, antibiotici, na direktan ili indirektan način dolaze u prirodu i zahtevaju prilagođavanje od strane životinja. Iako se pokušava zaštititi priroda od neželjenog uticaja antimikrobnih lekova oni očigledno ostavljaju traga na bakterijskoj flori divljači [5]. Mogućnost pojave i perzistiranja antimikrobne rezistencije [13] u prirodi, predstavlja opasnost, ne samo za članove ekosistema gde se pojavila, već i za ljude, jer se svakako može u ciklusu kruženja (lov, površinske vode, turizam u prirodi) vratiti čoveku u trenutku i na način kada se to najmanje očekuje. Iz ovih razloga predmet našeg rada je ispitivanje osetljivosti izolovanih bakterijskih vrsta iz uzoraka poreklom od divljih ptica i analiza njihove osetljivosti prema antibioticima. Cilj rad je da se utvrdi da li se kod nekih od izolovanih bakterijskih vrsta pojavila rezistencija na neke od ispitivanih antibiotika. Na ovaj način, mišljenja smo, da se može doći do podataka koji bi ukazali da su priroda i ekosistem divljih životinja, ugroženi od strane čoveka proliferacijom antibiotika.

Materijal i metod rada

Materijal za ispitivanje je poreklom od strogo zaštićenih vrsta divljih ptica (orao 5, roda 2, čaplje 2, patke 3 i labudovi 6), a potiču od uginulih jedinki iz lovišta na vodi i oko vode (močvare, bare, rečni limani). Parenhimatozni organi (jetra, srce, slezina) i delovi intestinalnog trakta su uzimani posle pažljivog otvaranja trupa na način koji je imao za cilj da se izbegne kontaminiranje organa.

Uzorci koji su uzeti za ispitivanje su pre direktnog zasejavanja na hranljive (krvni agar) i selektivne (salmonella differential agar) podloge po površini sterilisane plamenikom, a za ispitivanja na prisustvo anaerobnih bakterija materijal smo zasejavali u tioglikolatni bujon koji je u vodenom kupatilu termički tretiran (800C/10min) kako bi se eventualni kontaminanti neutralisali [10]. Sadržaj podvezanih creva smo zasejavali u puferizovanu peptonsku vodu 370C 24 h, nakon čega smo prebacivali 100μl na polu čvrsti Rappaport Vassiliadis (Medium Semisolid Rappaport Vassiliadis MSRV) podlogu i inkubirali na 41,50C tokom 24 – 48h. Kolonije koje su davale izgled koji odgovara Salmonella vrstama smo presejavali na XLD i Salmonella differential agar i kasnije izvršili identifikaciju serumima za aglutinaciju [12].

¹ Igor Stojanov, dr vet. sci., naučni saradnik, Miloš Kapetanov, dr vet. sci., viši naučni saradnik, Milica Živkov Baloš, dr vet. sci., naučni saradnik, Jelena Petrović, dr vet. sci., naučni saradnik, Dubravka Potkonjak, Ms, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad" Osoba za korespondenciju: Igor Stojanov, Scientific veterinary institute "Novi Sad", Rumenački put 20, 21000 Novi Sad, e-mail: igor@niv.ns.ac.rs, phone: 064 81 85 420

Osetljivost izolovanih sojeva testirana je prema preporukama CLSI (2006) [2]. Koristili smo antibiotske diskove Tetraciklin (30µg), Streptomycin (10µg), Trimetoprim+sulfametaxazol (25µg (trimetoprim1,25µg + sulfametaxazol 23,75µg)), Linkomicin (2µg), Enrofloxacin (5µg), Neomicin (30µg), Floron (30µg), Flumekvin (30µg), Gentamicin (10µg), Kolistin (10µg), Eritromicin (15µg), Amoksicilin (25µg), Doksiciklin (30µg), Nalidiksična kiselina (30µg), Ampicilin (10µg) proizvođača Bioanalyse i Linkospektin (109µg (Linkomicin 9µg + Spektinomycin100µg)) proizvođača Oxoid.

Rezultati istraživanja i diskusija

Naše ispitivanje je bilo ograničeno sa brojem uzoraka, jer su životinje čiji su organi ispitivani na listi strogo zaštićenih životinja, što znači da nije dozvoljen njihov odstrel. Ukupno je pregledano 5 materijala poreklom od orla, 2 materijala poreklom od roda, 2 materijala čaplji, 3 materijala pataka i 6 labudova. U ispitivanim materijalima nađene su sledeće bakterijske vrste: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus beta hem.*, *Streptococcus alfa hem.*

U tabeli 1 se nalaze rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih bakterija na antibiotike. Podaci su prezentovani prema bakterijskim vrstama, a ne prema vrsti životinje iz kojih su izolovane. Svakako, treba istaći da su podaci dati kao prosečne vrednosti za izolate koji su se ponavljali, odnosno za one bakterijske vrste koje su izolovane kod različitih životinja.

U našim ispitivanjima izolovana bakterijska flora je u delu (*Salmonella* i *Clostridium* vrsta) bila slična sa ispitivanjima drugih istraživača [3]. Svakako, jedna od najvažnijih bakterijskih vrsta, *Salmonella*, nalazi se kao izolat u radovima koji su ispitivali značaj ne samo bakterijske već i virusološke i parazitološke flore [6], [11]. Njihova važnost dobija na značaju ako se radi o pticama koje migriranjem mogu preneti ove uzročnike praktično sa kontinenta na kontinent. O značaju ptica koje migriraju i njihovoj ulozi rezervoara rezistentnih sojeva ispitivanja su saopštili i istraživači iz Belgije [7]. U našim ispitivanjima prezentovali smo podatke i o prisustvu drugih bakterijskih vrsta, koje pripadaju grupi saprofitnih ili uslovno patogenih bakterija, jer nam je cilj bio da sagledamo i njihovu osetljivost na antimikrobne lekove.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja osetljivosti bakterijskih izolata prema antibioticima

	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Proteus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Staphylo. sp.</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Sc. beta hem.</i>	<i>Sc. alfa hem.</i>
1. Tetraciklin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2. Streptomycin	R	I	I	R	R	I	S	S	R	R
3. Neomicin	R	I	I	I	R	S	I	I	R	I
4. Floron	I	I	I	I	I	S	S	S	S	S
5. Flumekvin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6. Gentamicin	R	R	S	I	I	I	S	S	R	I
7. Linko-spektin	R	R	R	I	S	S	S	S	R	I
8. Enrofloxacin	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S
9. Kolistin	R	R	I	I	R	I	I	I	R	R
10. Doksiciklin	R	R	S	I	S	S	S	S	I	I
11. Amoksicilin	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S
12. Nalidiksična kiselina	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
13. Eritromicin	R	R	S	I	S	I	S	S	R	I
14. Ampicilin	I	I	R	I	S	S	S	S	S	S
15. Linkomicin	R	R	R	R	S	I	I	I	R	R
16. Trimetoprim+sulfame.	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

(R – rezistentno, I – intermediarno, S – osetljivo)

Ispitivanja rezistencije *E. coli* izolovane iz materijala poreklom od divljih ptica koje žive pored vodenih površina [9] u Poljskoj pokazala su da oko jedne trećine izolovanih sojeva nose rezistenciju na neki od ispitivanih antibiotika (cefotaksim, ciprofloksacin i nalidiksična kiselina). U našem istraživanju bakterije iz grupe Gram negativnih potpunu ili delimičnu rezistenciju su pokazali prema lekovima iz grupe aminoglikozida (streptomycin, neomicin,

gentamicin), makrolida (linkomicin, eritromicin), linko-spektinu i kolistinu. Vrste *E. coli* i *Salmonella* su pokazali osetljivost na lekove iz grupe flour hinolona a na tetraciklin i trimetoprim + sulfametaksazol, a osetljivost su pored spomenutih izolata pokazali i ostali Gram negativni mikroorganizmi. Ispitivanja osetljivosti izolovanih *Enterococcus sp.* iz uzoraka otpadnih voda stočarskih farmi i uzoraka divljih životinja [8] pokazala su da se antimikrobna rezistencija širi izvan farmi i prelazi u prirodu čime je zapravo potvrđeno da upotreba lekova u veterinarskoj praksi teško može da se zadrži samo u željenim okvirima.

Značaj izučavanja divljih ptica koje migriraju i njihov potencijal da predstavljaju značajnu kariku u kruženju i širenju patogenih mikroorganizama izučavano je u radu istraživača iz Italije [4]. Rezultati ukazuju na prisustvo različitih bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* koje su pokazale u visokom procentu osetljivost na sulphamethoxazole/trimethoprim, cefotaxime, nalidixic acid, chloramphenicol i tetracycline, ali je sa druge strane skoro 50% izolata pokazalo rezistenciju na ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid i streptomycin. U našem ispitivanju izolati su pokazali osetljivost na tetraciklin i trimetoprim+sulfametakszol i flour hinolonske preparate, dok rezistencija bila prisutna kod lekova iz grupe aminoglikozida i makrolida.

Zaključak

Kontrola divljih ptica na prisustvo i raširenost pojedinih bakterijskih vrsta nema samo značaj koji je vezan za dobijanje epizootioloških podataka i mogućnosti kontrole patogena. Dobljeni podaci nisu samo od važnosti za sprečavanje pojave infektivnih bolesti koji mogu ugroziti zdravlje domaćih i divljih životinja, pa i ljudi, već njihov značaj je i sa aspekta kontrole eventualne prisutnosti bakterijskih sojeva koji mogu nositi gene rezistencije. Ove bakterije mogu se proširiti veoma brzo i prostorno veoma široko gde mogu dovesti do neželjenog transfera svojih negativnih karakteristika i ugroziti mogućnost upotrebe antimikrobnih lekova onda kada je to neophodno. Ovakva istraživanja skreću pažnju na činjenicu da kontrolisana upotreba lekova nema alternativu, ali da se i pažnja oko primene antibiotika neprestano mora unapređivati.

Zahvalnost

Rad je realizovan po projektu TR 31084 koji se finansira od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Literatura

[1] Bonneaud Camille, Susan L. Balenger, Andrew F. Russell, Jiangwen Zhang, Geoffrey E. Hill, and Scott V. Edwards; *PNAS*, 7866–7871, vol. 108, no. 19, 2011. [2] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9 ISBN 1-56238-586-0. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA. [3] Craven SE, Stern NJ, Line E, Bailey JS, Cox NA, Fedorka-Cray P; *Avian Dis.*;44(3):715-20, Jul-Sep 2000. [4] Foti Maria, Donatella Rinaldo, Annalisa Guercio, Cristina Giacopello, Aurora Aleo, Filomena De Leo, Vittorio Fisichella, Caterina Mammina; *Avian Pathology*, Volume 40, Issue 4, pg. 405-409, 2011. [5] Guenther Sebastian, Mirjam Grobbel, Antina Lübke-Becker, Andreas Goedecke, Nicole D. Friedrich, Lothar H. Wieler, Christa Ewers; *Veterinary Microbiology*, Volume 144, Issues 1-2, Pages 219-225, 2010. [6] Hubalek Zdenek; *Journal of Wildlife Diseases*, 40(4), pp. 639–659, 2004. [7] Garmyn An, Freddy Haesebrouck, Tom Hellebuyck, Annemieke Smet, Frank Pasmans, Patrick Butaye, An Martel; *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (7): 1643-1644, 2011. [8] Lanthier Martin, Andrew Scott, David R. Lapen, Yun Zhang, Edward Topp; *Canadian Journal of Microbiology*, 56(9): 715-729, 2010. [9] Literak Ivan, Monika Dolejska, Dagmar Janoszowska, Jolana Hrusakova, Wlodzimierz Meissner, Hanna Rzyaska, Szymon Bzoma, and Alois Cizek; *Applied and environmental microbiology*, p. 8126–8134, Dec. 2010. [10] Quinn J. P., Markey, B., Cartter, E. M., Donnelly J.W., Leonard C.F.: *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*; Mosby, London, Philadelphia, St. Luis, Sydney, Tokyo, 2002. [11] Reed D.Kurt, Jennifer K. Meece, James S. Henkel, Sanjay K. Shukla; *Clinical Medicine & Research*, Volume 1, Number 1: 5 – 12, 2003. [12] SRPS EN ISO 6579/2008, 2008. [13] Velhner Maja, Jelena Petrović, Stojanov Igor, Ratajac Radomir, Stojanović Dragica *Arhiv veterinarske medicine*, vol.3, br.1, str. 85-93, 2010.