



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**

**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

*Депарتمان за ветеринарску медицину*

**ДИПЛОМСКИ РАД**

**ПТИЦЕ ИЗ МИНИ ЗООВРТА КАО ИЗВОР ЦРЕВНИХ  
БАКТЕРИЈА ОТПОРНИХ НА АНТИБИОТИКЕ**

Ментор:

Проф. др Весна Лалошевић

Студент:

Катарина Савовић

Нови Сад, 2022.

# Садржај

1. УВОД .....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ .....	4
2.1. Механизми развоја резистенције .....	5
2.2. Квалитативне методе детекције резистенције на антибиотике .....	5
2.3. Генетика бактерија.....	5
2.4. Антибиотици и резистенција бактерија .....	7
2.5. Трансфер гена и мобилни генетички елементи.....	9
2.6. Механизми резистенције бактерија .....	13
2.6.1. Резистенција на ампицилин .....	14
2.6.2. Резистенција на гентамицин .....	14
2.6.3. Резистенција на сулфонамиде .....	15
2.6.4. Резистенција на триметоприм.....	16
2.7. Преваленција антимицробне резистенције животиња у свету и код нас.....	17
2.8. Потенцијални утицај антимицробне резистенције на дивље животиње, животну средину и здравље људи .....	20
3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	24
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД .....	25
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	27
6. ЗАКЉУЧАК .....	30
7. ЛИТЕРАТУРА .....	31

# КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДИПЛОМСКОГ РАДА

---

**Др Весна Лалошевић, редовни професор, ментор**  
*за ужу научну област Микробиологија и имунологија*  
**Пољопривредни факултет, Нови Сад**  
*Департман за ветеринарску медицину*

---

**Др Вук Врачар, доцент, председник комисије**  
*за ужу научну област Инфективне болести животиња*  
**Пољопривредни факултет, Нови Сад**  
*Департман за ветеринарску медицину*

---

**Др Станислав Симин, доцент, члан**  
*за ужу научну област Паразитологија*  
**Пољопривредни факултет, Нови Сад**  
*Департман за ветеринарску медицину*

## КРАТАК САДРЖАЈ

Антимикробна резистенција је једна од главних претњи јавном здрављу која утиче на људе, животиње и животну средину. Посебно забрињава потенцијални пренос зоонотских патогена отпорних на више лекова са животиња у зоолошком врту на људе. Циљ нашег истраживања био је да се утврде узорци резистенције на антибиотике код ентеричних бактерија изолованих од птица у зоолошким вртovima. Ова студија је обухватила 12 сојева бактерија изолованих од 12 птица из мини зоолошког врта у Србији. За испитивање антимикробне осетљивости бактеријских изолата коришћена је метода диск дифузије према EUCAST смерницама. Највећа резистенција је забележена на ампицилин (50%), док је најмања резистенција на цефуроксим, цiproфлoксацин, цефтриаксон и гентамицин (8,33%), код два соја отпорна на више лекова. Према нашим сазнањима, ова студија је спроведена као прва студија на ову тему у Србији. Појава антимикробне резистенције је занимљива чињеница с обзиром да птице никада нису лечене антибиотцима. Кохабитација међу различитим врстама птица, као и контакт између дивљих животиња и људи који често посећују зоолошки врт, указују на то да контакт између њих може бити важан пут преношења гена отпорности. С обзиром на мали број узорака обухваћених овим истраживањем, неопходна су даља истраживања са већим бројем узорака и других класа антибиотика како би се стекла јаснија слика о распрострањености и преваленци на антибиотике резистентних ентеричних бактерија код птица у Србији.

**Кључне речи:** ентеричне бактерије, птице, резистенција на антибиотике, Србија

## **ABSTRACT**

Antimicrobial resistance is one of the major threats to public health affecting humans, animals, and the environment. Of particular concern is the potential transmission of multidrug-resistant zoonotic pathogens from zoo animals to humans. The aim of our research was to determine the antibiotic resistance patterns in enteric bacteria isolated from zoo birds. This study included 12 bacterial strains isolated from 12 birds from a mini zoo in Serbia. For the antimicrobial susceptibility testing of the bacterial isolates the disc diffusion method was used according to EUCAST guidelines. Highest resistance was observed to ampicillin (50%), while the lowest resistance was observed to cefuroxime, ciprofloxacin, ceftriaxone and gentamicin (8.33%), with two multi drug resistant strains. To our knowledge, this study was conducted as the first study on this topic in Serbia. The occurrence of antimicrobial resistance is an interesting fact given that the birds were never treated with antibiotics. Cohabitation among different bird species and also contact between wildlife and people who often visit the zoo indicate that contact between them can be an important path of transferring genes of resistance. Considering the small number of samples included in this research further studies are needed with a larger number of samples and other classes of antibiotics in order to gain a more clear picture on the abundance and prevalence of antibiotic-resistant enteric bacteria in birds in Serbia.

**Key words:** enteric bacteria, birds, antibiotic resistance, Serbia

## 1. Увод

Један од најважнијих задатака хумане и ветеринарске медицине је очување ефикасности антибиотика код лечења инфекција људи и животиња. Прекомерна, нестручна и несврхисходна примена антибиотика и хемиотерапеутика довела је до масовне појаве резистенције бактерија на антибиотике праћене неефикасном терапијом, тежом клиничком сликом и повећањем смртности оболелих јединки. Бројна научна истраживања указују на континуирано појављивање и проширивање резистенције код бактерија, што оправдава страховања о повратку човечанства у доба преантибиотске ере и појави фаталних инфективних обољења без могућности ефикасне антимикробне терапије. Појава мултирезистентних микроорганизама код животиња има значајне импликације по здравље људи, услед ризика од директног или индиректног преношења резистентних патогених бактерија од животиња на људе, као и од хоризонталног трансфера гена резистенције од бактерија пореклом од животиња у бактерије патогене за људе. Најважнији начини преношења резистентних бактерија на људе су директан контакт са животињама и конзумирање контаминираних намирница. Појава резистенције бактерија на антибиотике, њихово перзистирање и преношење у природи, сматра се једним од највећих проблема савремене медицине. Захваљујући својим механизмима резистенције, мултирезистентне бактерије успевају да задрже своје фенотипске и генотипске особине које условљавају резистенцију кроз дужи временски период и у одсуству антибиотика (*Richardson, 2017*). Самим тим резистентне бактерије које се одржавају и шире са и без присуства антибиотика, имају значајну предност у односу на бактерије које су осетљиве на антибиотике. Сматра се да смањење употребе антибиотика у сточарској индустрији има директне ефекте на смањење резистенције код бактерија у хуманој медицини. Међутим, има доста примера који не подржавају наведену теорију. На пример, у Европи је резистенција *Enterococcus spp.* на ванкомицин настала захваљујући примени промотора раста авопарцина у сточарству. Забраном коришћења авопарцина у сточарству смањена је појава ванкомицин резистених *Enterococcus spp.* код животиња, али нажалост код људи није дошло до значајног смањења резистенције што је последица примене наведеног

антибиотика у хуманој клиничкој пракси (*Chang et al., 2015*). Резистенција на флуорохинолоне код *Salmonella spp.* које потичу од животиња доказана је и код изолата *Salmonella spp.* које потичу од људи, али смањење примене енрофлоксацина у сточарству не утиче безусловно на смањење резистенције на флуорохинолоне код изолата салмонела у хуманој популацији. Захваљујући путовањима људи у земље у којима је резистенција на антибиотике веома раширена, као и захваљујући трговини, резистентне бактерије могу да се пренесу интерконтинентално и да се годинама одрже у заједницама (*Chang et al., 2015*). Према томе резистенција на антибиотике тешко може да се елиминише како у ветеринарској тако и у хуманој медицини. Међутим, уколико се кроз дужи временски период смањи употреба антибиотика или укине примена неких антибиотика у сточарству, смањује се ризик од појаве резистених микроорганизама.

Антибиотици треба да се користе пажљиво и само уколико је неопходно, посебно због тога што бактерије могу да развију резистенцију на практично све класе антибиотика, било да се ради о природним супстанцама, полусинтетичким или синтетичким препаратима. Посебан проблем је примена антибиотика истог хемијског састава и истог механизма деловања у ветеринарској медицини и хуманој медицини. Резистенција на флуорохинолоне, цефалоспорине проширеног спектра деловања и аминогликозиде код Грам негативних бактерија у значајној мери може да отежа терапију код људи, односно услови неопходност примене најсавременијих антибиотика на које бактерије такође последично могу да развију резистенцију.

Најважнији мобилни генетички елементи код бактерија су плазмиди, транспозони и генске касете. Бактерије су развиле способност да уграде, уклоне и/или поделе гене за резистенцију зависно од сопствених потреба и зависно од окружења (*Richardson, 2017*). Самим тим је идентификација мултирезистених бактерија и детерминација мобилних генетичких елемената од великог значаја зато што указује на ризике од појаве резистенције на важне класе антибиотика и указује на могућност преношења резистенције на друге микроорганизме. Интегрони су специфични генетички механизми код бактерија који им омогућавају да уграде једну или више генских касета које кодирају резистенцију на антиботике, дезинфицијенсе или тешке метале и који омогућавају експресију гена за резистенцију. Сходно томе гени за резистенцију на антибиотике су често присутни на интегронима заједно са генима за резистенцију на тешке метале и дезинфицијенсе, што фаворизује ширење

резистенције у природи, чак и на антибиотике и друге агенсе који се више не користе или се никада нису користили у неким деловима света. Коњугабилни плазмиди могу да поседују не само гене за резистенцију него и гене који кодирају факторе вируленције тако да обезбеђују преживљавање бактерија у неповољним условима. Транспозони су такође мобилни генетички елементи и могу да се преносе дуж ДНК ланца истог или различитих врста микроорганизама, што је омогућено захваљујући инсерционим секвенцама које су уметнуте на почетку и на крају ДНК транспозона. *Salmonella enterica* серовар *Kentucky* код пилића, која је од екстраинтестиналне патогене *Escherichia coli* (АРЕС) преузела Col V плазмид са генима који кодирају бројне бактериоцине укључујући и колицин В, што је поред значајне конкуренције са инвазивним салмонелама попут *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* омогућило опстанак *S. Kentucky* на фармама живине (Johnson et al., 2010).

Истраживања из области антимикробне резистенције значајно доприносе разумевању настанка резистенције као и њеног преношења. У новије време ова истраживања попримају мултидисциплинарни карактер увођењем техника целокупног секвенцирања генома, анализе ризика и других математичких модела. Детерминација гена резистенције и мобилних генетичких елемената је веома важан корак у идентификацији резистентних бактерија, а индикаторски микроорганизам *E. coli* служи као важан показатељ резистенције у животној средини (Clermont et al., 2011). Перзистирање мултирезистентних бактерија попут *E. coli* у примарној производњи је велики проблем. Захваљујући томе што се животиње на фармама гаје на малом простору, микроорганизми могу да се преносе путем хране, опреме, возила, ваздуха и људи на велики број животиња у запату. Континуирано праћење и испитивање резистенције на антибиотике коменсалне *E. coli* помаже код утврђивања емпиријске терапије до момента када је доступан антибиограм.

Из наведених разлога у епидемиолошким истраживањима се користи резистотипизација, молекуларна типизација и детерминација гена за резистенцију, што омогућава откривање извора инфекције/контаминације, а такође омогућава да се генетичким методама анализирају изолати резистентних бактерија приликом избијања епидемија („outbreak isolates“) или приликом утврђивања здравствене безбедности хране у ланцу производње „од фарме до трпезе“



## 2. Преглед литературе

Резистенција на антибиотике представља растући проблем за светско здравље људи и животиња. Имајући у виду да микроорганизми играју важну улогу на глобалном нивоу, утичу директно на окружење у коме се цео живот развија. Док микроорганизми утичу на животну средину, животна средина такође има утицај на еволутивне механизме самих микроорганизма (*Reid and Buckley, 2011*). Постојана отпорност бактерија на антибиотике настаје као резултат њихове интензивне употребе. У многим земљама годишња употреба антибиотика у ветеринарској медицини вишеструко премашује употребу антибиотика у хуманој. Као последица метафилактике и профилаксе у ветеринарској медицини, чак и здраве животиње су континуирано изложене великим количинама антибиотика. Антибиотици своје антимикубно дејство испољавају подједнако на патогене бактерије и на сапрофитску микрофлору цревног тракта људи и животиња, а као резултат антибиотског деловања долази до смрти или инактивације једног дела микроорганизма, док други део преживљава. Преживљавају само оне бактерије које су резистентне на антибиотике. (*WHO, 2011*). Преживеле бактерије представљају резервоар гена резистенције за факултативне и патогене бактерије. (*van den Bogaard and Stobberingh, 2000; Guardabassi et al., 2004*).

Резистенција на антибиотике може бити урођена или стечена. Урођена резистенција представља наследну одлику врсте или рода и нема значајну улогу у дисеминацији резистенције међу популацијама микроорганизма. Стечена резистенција на антибиотике специфична је само за поједине сојеве у оквиру иначе осетљиве врсте или рода и може настати услед мутација на постојећим генима или услед стицања нових гена путем латералног трансфера (*Ammor i sar., 2007*). Урођена резистенција и резистенција на антибиотике која је настала као последица мутација нису од значаја код непатогених врста микроорганизма, јер немају улогу у ширењу резистенције. Резистенција стечена латералним трансфером гена носи највећи ризик за ширење генетских детерминанти резистенције на осетљиве микроорганизме (*Devirgiliis i sar. 2011*).

## 2.1. Механизми развоја резистенције

Резистенција бактерија на антибиотике може бити њихова природна или урођена особина или ту особину бактерије стичу током развоја. Описују се следећи механизми развоја резистенције:

- пролиферација гена резистенције,
- трансмисија генетског материјала
- настанак нових мутација.

Пренос генетског материјала између две бактеријске ћелије може настати вертикалним или хоризонталним преносом гена. Како је фреквенција спонтаних мутација у бактеријској ћелији врло ретка и дешава се у око 10<sup>8</sup> до 10<sup>9</sup> бактеријских ћелија, то значи и да ће се током неке инфекције захваљујући овом процесу развити резистентни типови у свакој 10<sup>8</sup>. или 10<sup>9</sup>. бактеријској ћелији

## 2.2. Квалитативне методе детекције резистенције на антибиотике

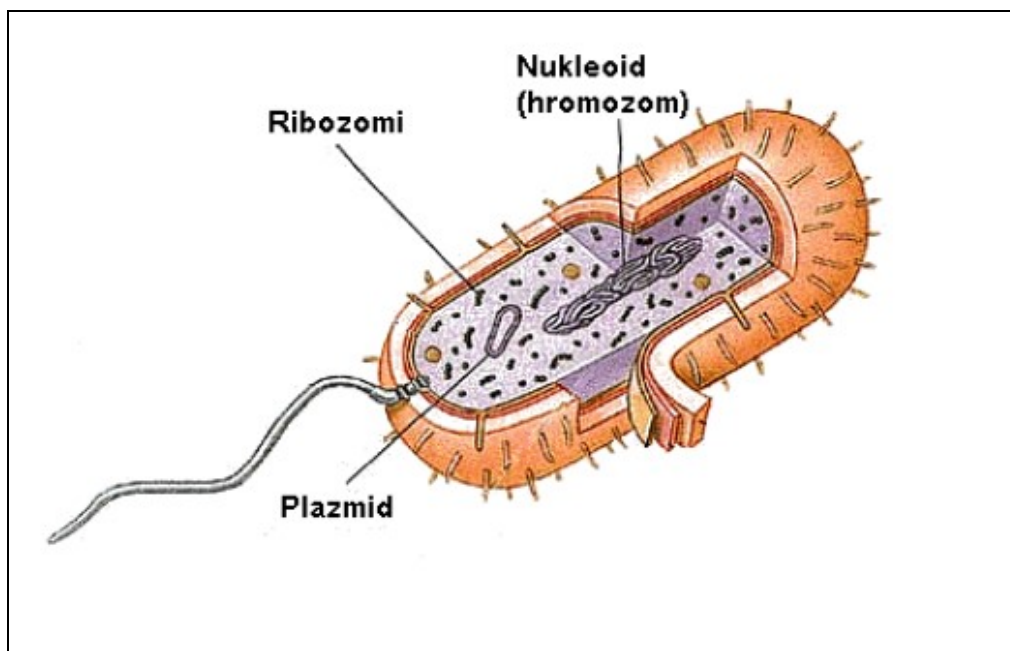
Диск-дифузиона метода представља најчешће коришћену квалитативну методу за одређивање резистенције код микроорганизама. Диск-дифузиона метода за испитивање резистенције на антибиотике изводи се тако што се на површину Петри плоча са одговарајућом хранљивом подлогом наноси инокулум који садржи приближно 1-2×10<sup>8</sup> log CFU/ml испитујућег микроорганизама, а затим се на њу стављају папирни дискови или таблете који су импрегнирани фиксном концентрацијом антибиотика. Резултати се читавају после 16–24 часа, мерењем зоне инхибиције раста испитиваног микроорганизама (*Ferraro and Jorgensen, 2009*). Иако је диск-дифузиона метода најчешће коришћена код клиничких изолата, јер је јефтина, једноставна и добро стандардизована, она није погодна за одређивање резистенције код микроорганизама изолованих из хране, јер не постоји могућност квантификације резултата, већ се изолати на основу величине зона инхибиције могу да класификују само као осетљиви или резистентни (*EFSA, 2012*).

## 2.3. Генетика бактерија

Генетички материјал бактерија није одвојен мембраном од цитоплазме као једро еукариота, већ је смештен у централном делу који се зове нуклеоид (слика 1). Геном бактеријске ћелије је циркуларни хромозом са двоструким ланцем дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК), мада постоје бактерије које имају и два

хромозома (бактерије рода *Brucella*). Све виталне функције и особине бактеријске ћелије, као што су патогеност, вируленција и резистенција на антибиотике, кодиране су генима који се налазе на хромозому (Habrun, 2014).

Поред хромозома, као главног генетичког материјала, у бактеријској ћелији може постојати један или више плаزمида (Слика 1). Плазмиди се репликују независно од бактеријског хромозома иако за репликацију користе механизме ћелије домаћина. Бактеријска ћелија може имати један или више плазмида, на којима се налазе гени за вируленцију, гени који кодирају резистенцију на антибиотике, али и резистенцију на бројне токсичне метале попут живе, кадмијума и сребра (Bennett, 2008).



Слика 1. Геном бактеријске ћелије

Бактерије током свог живота могу да користе и генетски материјал бактериофага (вируси који инфицирају бактерије) (Bennett, 1999). Бактериофаги се састоје само од протеинског омотача који окружује геном вируса, а ови облигатни интрацелуларни паразити нису у стању да се умножавају у одсуству свог бактеријског домаћина. У неким случајевима они могу бити у стању контролисане репликације (лизогенија) унутар бактеријске ћелије. У таквим ситуацијама геном

бактериофага постаје привремени део укупног генетског материјала који стоји на располагању бактеријској ћелији (*Erski-Biljić, Dobrić, 1998; Bennett, 1999*).

#### 2.4. Антибиотици и резистенција бактерија

Антибиотици су супстанце које својим бактерицидним деловањем убијају бактерије, док бактериостатским деловањем заустављају раст и размножавање бактерија, а да при томе не наносе штету домаћину. Природне антибиотике стварају бактерије и гљивице у природним условима. Полусинтетски антибиотици настају када се природни антибиотици хемијским процедурама промене, ради побољшања неких њихових особина. Синтетски антибиотици настају хемијским путем и зато се зову хемиотерапеутици (*Jezdimirović 2005*). Први хемијски синтетисани антибиотици били су сулфонамиди произведени и примењени 1935. године. Иако је на постојање природних антибиотика указао још 1928. године Александар Флеминг, производња и терапијска употреба првог антибиотика пеницилина започела је током Другог светског рата (*Habrun, 2014*).

Према механизму деловања антибиотици се деле на четири групе (*Jezdimirović, 2005*):

1. Антибиотици који инхибирају синтезу ћелијског зида бактерија
2. Антибиотици који инхибирају синтезу протеина бактерија
3. Антибиотици који инхибирају синтезу нуклеинских киселина бактерија
4. Антибиотици који доводе до промене пермеабилности мембране бактеријске ћелије

Да би се супротставиле дејству антибиотика бактерије користе различите механизме резистенције. Неке бактерије су природно отпорне на поједине антибиотике (на пример, микоплазме на бета-лактамске антибиотике јер немају ћелијски зид), док стечена отпорност настаје променом генетичког материјала бактерије (*Habrun, 2014*). Након апликације антибиотика, коменсална флора бива потиснута селекцијским притиском, док резистентна остаје и даље се размножава. Дуготрајна употреба једног антибиотика (више од 10 дана), селектује не само

бактерије резистентне на тај антибиотик већ и на друге. Организам постаје фабрика резистентних бактерија које се брзо појаве у окружењу након примене антибиотика, али се веома споро губе (*Levy i Marshal, 2004*).

Интензиван узгој животиња на фармама захтева примену бројних антибиотика у лечењу различитих бактеријских инфекција. Често антимикробни третман почиње без претходног испитивања осетљивости бактерија на антибиотике, што може да доведе до појаве резистенције код одређених сојева бактерија. Широка употреба антибиотика узроковала је да бактерије користе специфичне механизме резистенције како би преживеле у окружењу (*Hendriksen u cap., 2008*). Поред резистенције код патогених бактерија, прекомерна употреба антибиотика доводи до стварања резервоара гена за резистенцију код коменсала (*Schierack u cap., 2009*). Храна произведена од оваквих животиња је главни резервоар гена за резистенцију код људи. Пренос резистентних сојева бактерија путем хране између животиња и људи представља велику опасност по јавно здравље (*Thorsteinsdottir u cap., 2008*). Сматра се да је ланац производње хране главни извор патогених или непатогених резистентних бактерија које преко мобилних генетичких елемената преносе гене за резистенцију и вируленцију између и унутар врста, што може довести до њиховог интерконтиненталног ширења.

Велики проблем у хуманој и ветеринарској медицини представља резистенција бактерија на најновије класе антибиотика. Стога се испитивање резистенције код одређених врста бактерија спроводи у целом свету у склопу мониторинга који је обавезан (*Hendriksen u cap., 2008*). Од посебног интереса је изучавање механизма резистенције код мултирезистентних бактерија, управо због тога што поседују мобилне генетичке елементе којима могу да преносе гене за резистенцију на сродне и несродне врсте бактерија (*Gillings u cap., 2008*; Велхнер и сар., 2010).

Када се испитује осетљивост бактерија на антибиотике користе се документи Клиничког института за лабораторијске стандарде (CLSI) или Европског комитета за тестирање осетљивости на антибиотике (EUCAST). У CLSI документу дате су вредности минималне инхибиторне концентрације антибиотика (МИК) за изолате бактерија које се класификују као осетљиви, интермедијарни и резистентни. Према томе, метода утврђивања МИК може да послужи за студије испитивања клиничке

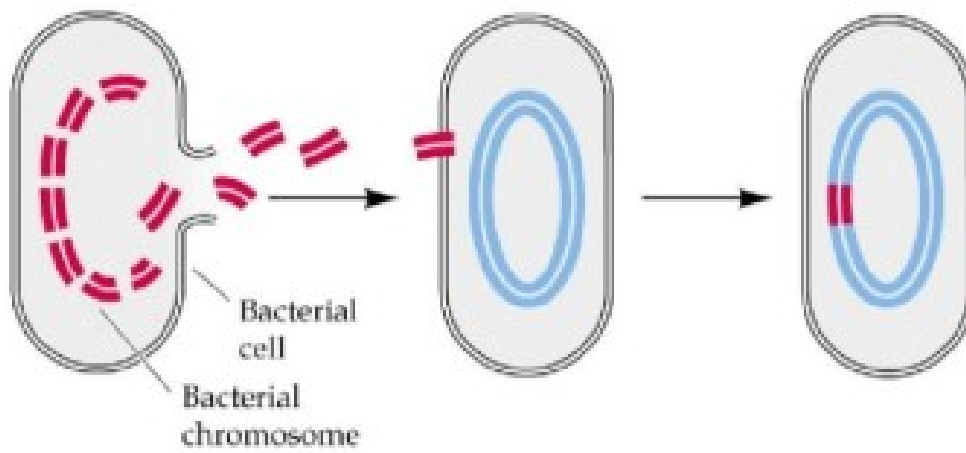
ефикасности лека, евалуацију дозе и начина апликације, као и за утврђивање параметара фармакодинамике и фармакокинетице. За извештавање осетљивости на антибиотике патогених бактерија (*Salmonella*, *Campylobacter* и *Staphylococcus aureus*) или индикаторских микроорганизама (*E. coli* и *Enterococcus*), користи се епидемиолошка гранична вредност (ECOF) за интерпретацију резултата МИК анализе, а бактерије се сврставају у „wild type, дивљи сој “ или „non wild type“ микробиолошка резистенција. У извештајима Европске агенције за безбедност хране (EFSA) осетљивост бактерија на антибиотике интерпретира се преко епидемиолошких граничних вредности (*Schwarz u cap., 2010*).

## 2.5. Трансфер гена и мобилни генетички елементи

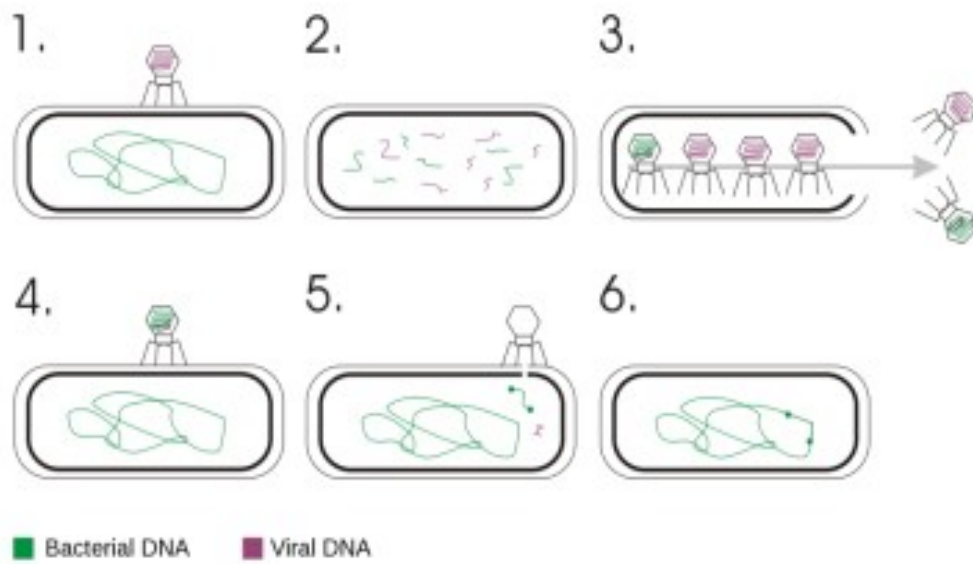
Постоје три механизма преко којих се обавља хоризонтални трансфер генетичког материјала:

1. Трансформација
2. Трансдукција
3. Коњугација (*Bennett,, 1999*).

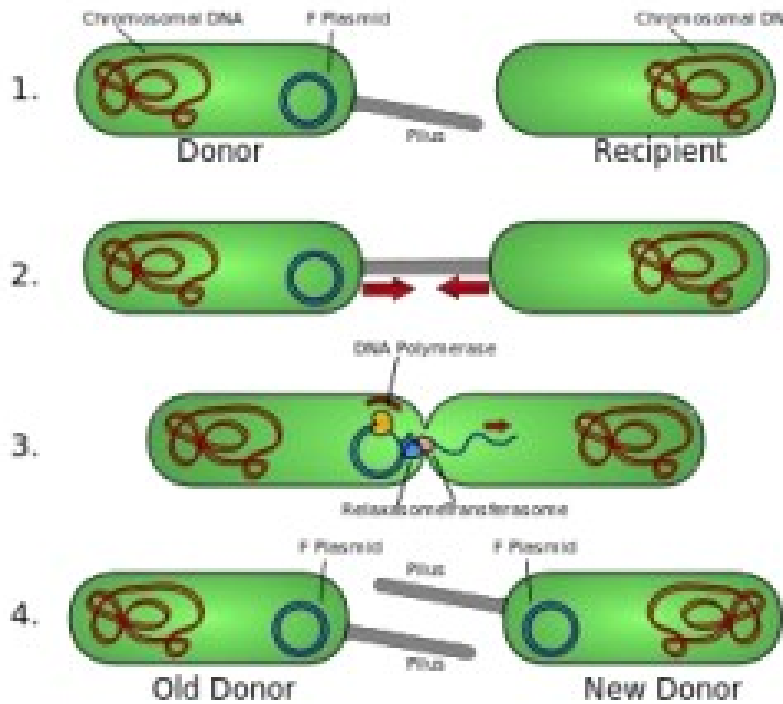
Током процеса трансформације (*Слика 2*), огољена ДНК из животне средине се уграђује у хромозом преко специфичних секвенци за препознавање. Трансдукцијом (*Слика 3*) се генетички материјал преноси у другу бактеријску ћелију преко бактериофага. Код процеса коњугације (*Слика 4*) две бактеријске ћелије се споје и размене плазмиде. Размена генетичког материјала се одиграва преко коњугабилних плазида који су у саставу ћелије као слободни елементи или су уграђени у хромозом. Размена генетичког материјала се може обавити и преко коњугабилних транспозона који поседују инсерционе секвенце које омогућавају њихову уградњу или исецање и премештање унутар хромозома истих или различитих бактеријских ћелија (*Bennett, 2008*).



Слика 2. Схематски приказ механизма трансформације



Слика 3. Схематски приказ механизма трансдукције помоћу бактериофага



Слика 4. Схематски приказ механизма конјугације између донора и реципијенте

Пренос ДНК секвенци са једне бактеријске ћелије на другу, са једног ДНК молекула на други, са једног плазида на други, или са плазида на хромозом, одвија се помоћу специфичних секвенци које омогућавају уградњу или исецање мобилних генетичких елемената бактерије. (Bennett, 1999).

Мобилни генетички елементи су:

1. транспозони
2. генске касете
3. интегрони

Транспозони су очигледан пример мобилних генетичких елемената чија је мобилност омогућена захваљујући инсерционим секвенцама. Инсерционе секвенце (ИС) се састоје од директних или обрнутих поновака који омогућавају мобилност и уградњу генетичког материјала, као и његову стабилност. У центру транспозона налазе се гени за резистенцију. Постоје две класе транспозона. У класу 1 спадају



транспозони који се транскрибују са ДНК у РНК и потом се путем реверзне транскрипције преводе у ДНК молекулу који може да се угради у хромозом бактеријске ћелије. Класа 2 транспозона користи ензиме транспозазе како би могла да премешта ДНА транспозона дуж хромозома, или са једне ћелије на другу, механизмом рекомбинације. Самим тим, транспозони могу да се пренесе са једног места на ДНК молекулу на друго или са једне ДНК на другу (*Bennett, 2008*). Ако специфични гени у оквиру транспозона кодирају резистенцију на више антибиотика настаје мултирезистентни фенотип. Бактерије са плазмидима који кодирају мултирезистенцију узрокују велике проблеме у хуманој медицини, изазивајући бројне болничке инфекције које се тешко лече антибиотикима (*Bennett, 2008*). Познато је да су неке мултирезистентне бактерије, интерконтинентално раширене и нађене у разним еколошким нишама у ланцу производње хране за животиње и људе (*Velhner u cap., 2014*).

Генске касете су мобилни генетички елементи које могу да функционишу као слободне, циркуларне и не репликујуће ДНК. Генска касета најчешће има само један ген и додатну кратку секвенцу од 59 база која представља специфично место за рекомбинацију. У веома ретким случајевима једна касета може да носи два гена. Овакве касете настале су спајањем две касете услед делеције. Гени на касетама су најчешће експримирани преко промотора интегрона зато што генске касете немају свој промотор (*Bennett, 1999*).

Интегрони су мобилни генетички елементи интегрисани у хромозоме, транспозоне или плазмиде. Могу да уграде у себе, једну или више генских касета, које су носиоци гена за резистенцију. Гени за резистенцију се уграђују у бактеријски геном механизмом рекомбинације. Рекомбинација се обавља помоћу ензима интегразе коју кодирају *int1* гени. Интегрони поседују рецептор *attI* за везивање и уградњу генских касета. Секвенца од 59 база на генској касети препознаје рецептор *attI* и има улогу у процесу рекомбинације (*Bennett, 1999*). Да ли ће резистенција на антибиотике бити преносива и да ли ће се фенотипски манифестовати као резистенција на једну или више класа антибиотика, зависи од врсте и броја генских касета које су уграђене у интегроне. Мобилни генетички елементи су нађени код великог броја клиничких изолата Грам негативних бактерија, али и коменсала изолованих из животиња које се узгајају на фармама (*Bennett, 1999*).

## 2.6. Механизми резистенције бактерија

Мултирезистентне бактерије су постале глобални здравствени проблем у клиничкој пракси јер доводе до самњења ефикасности антибиотика како у хуманој тако и у ветеринарској медицини (Уе и сар., 2008). Бактерије користе бројне механизме како би инхибирале деловање антибиотика (Табела 1).

Најчешћи механизми резистенције су (Habrun, 2014):

1. Инактивација антибиотика ензимима бактерије
2. Смањење пропустљивости ћелијског зида бактерије
3. Генетичка промена (мутација) циљног места на бактеријској ћелији или његова заштита
4. Заобилажење метаболичких просеса
5. Смањење унутарћелијског нагомилавања и задржавања антибиотика

Антибиотик	Механизам дејства	Гени који кодирају резистенцију	Функција гена за резистенцију
$\beta$ - лактами	Инхибиција синтезе пептидогликана	bla	Кодирају $\beta$ -лактамазе, ензиме који отварају $\beta$ -лактамски прстен и инактивишу антибиотик
Аминогликозиди	Везују се за аминоксил на А месту 16S rRNA на 30S субјединици рибозома и инхибирају синтезу протеина	aac	Ензимска модификација антибиотика
Сулфонамиди	Инхибирају ензим ДХПС и синтезу фолне киселине	sul	Кодира ДХПС са ниским афинитетом на сулфонамиде
Триметоприм	Редукују дихидрофолну киселину (Б9 витамин) у тетраидрофолну киселину	dhfr	Кодирају варијантне ензиме дихидрофолат редуктазе

Табела 1. Механизми деловања антибиотика и функције гена резистенције

### 2.6.1. Резистенција на ампицилин

Ампицилин је  $\beta$ -лактамски антибиотик средње-широког спектра дејства (*Mandel, 2000.*). Стабилан је у киселој средини, поред парентералне примене може се и перорално апликовати. Као и сви  $\beta$ -лактамски антибиотици, делује тако што инхибира синтезу пептидогликана који су саставни део зида бактеријске ћелије. Бактерије на ампицилин као и све друге антибиотике из ове велике групе (пеницилин, цефалоспорини, монобактамини и карбапени). развијају резистенцију тако што продукују ензиме  $\beta$ -лактамазе, који уништавају бета лактамски прстен пеницилина и треће генерације цефалоспорина. Како би се спречило деловање наведених ензима,  $\beta$ -лактамски антибиотици се комбинују са инхибиторима  $\beta$ -лактамаза, најчешће клавуланском киселином.

Класификација ензима  $\beta$ -лактамаза по Амблеру извршена је на основу молекуларних карактеристика односно сличности у саставу аминокиселина. Ензими бета-лактамазе који хидролизују  $\beta$ -лактамски прстен преко серина сврстани су у следеће групе: TEM, SHV, CTX-M, VEB, GES (молекуларна класа А), OXA (молекуларна класа D) AmpC (молекуларна класа C) и многе друге који се ређе идентификују код изолата бактерија, а кодирани су са плазмидом. У групи Б су метало-бета-лактамазе којима је за активацију потребан молекул, Zn. Метало-бета-лактамазе су веома значајни ензими зато што катализују хидролизу свих  $\beta$ -лактамских антибиотика, осим монобактама. (*Palzkill, 2013.*)

### 2.6.2. Резистенција на гентамицин

Гентамицин је антибиотик из породице аминогликозида и делује на велики број бактеријских инфекција (*Evan u cap. 2008.*), нарочито на инфекције изазване Грам негативним бактеријама (*Thomas, 2002.*). Као и сви антибиотици из породице аминогликозида, (*David, 2005.*) гентамицин не улази, тј. не пролази кроз мембране које би га довеле у танко и дебело црево, тако да се може дати пацијенту само путем инфузије, односно интравенски, или топикално. Антибиотици из групе аминогликозида делују тако што ометају синтезу протеина у бактеријској ћелији. Механизам деловања заснива се на њиховом везивању за аминокиселин на А месту 16S rRNK на 30S субјединици рибозома. Самим тим мутације на генима rRNK које би онемогућиле везивање антибиотика нису могуће зато што код свих организама постоји више од једне копије гена који кодирају rRNK. Мутације би према томе требале да настану симултано на више гена рибозома, а то се не дешава у

природи. Бактерије су нашле друге начине да инактивишу аминокликозиде и то углавном путем ензимске модификације антибиотика. Три групе ензима које врше инактивацију деле се углавном према томе на који супстрат делују односно где врше модификацију. Следеће три класе ензима активно доприносе развоју резистенције на аминокликозиде код бактерија:

1. аминокликозид ацетилтрансферазе (AAC),
2. аминокликозид нуклеотидилтрансферазе (ANT)
3. аминокликозид фосфотрасферазе (APH).

У оквиру наведених група ензима налазе се подгрупе ензима које модификују различита места у молекулу аминокликозида и то:

1. четири ацетилаттрансфераза AAC(2'), AAC(6'), AAC(1) и AAC(3),
2. четири нуклеотидилтрансфераза ANT(6), ANT(4'), ANT(3'') и ANT(2'')
3. фосфотрансфераза има седам и то APH(3'), APH(2'), APH(3''), APH(6), APH(9), APH(4) и APH(7'') (Kotra и сар., 2000).

Веома распрострањен механизам резистенције на стрептомицин је инактивација антибиотика преко ензима аминокликозид 3' фосфотрансферазе и аминокликозид 6' фосфотрансферазе и преко генских касета *aadA* које кодирају аминокликозид аденилтрансферазе и инактивирају стрептомицин и спектиномицин, а често се налазе на коњугабилним плазмидима (*Sunde u Norström, 2005*).

Други механизми резистенције на аминокликозиде које користе бактерије су промена пермеабилности мембране, ефлукс механизам и сасвим ретко супституција нуклеотида на циљном молекулу. Године 2002. је у банку гена послата секвенца гена који кодира 16S RNK метилазу (ArmA). Ген је нађен на плазмиду *Citrobacter freundii* у Пољској. Године 2003. у Јапану је секвенциран ген који кодира ензим RmtA код клиничког изолата *Pseudomonas aeruginosa*. Оба гена (armA и rmtA) врше метилацију 16S rRNK, немају високу сличност аминокиселинских секвенци, али се налазе на транспозонима, а пренесени су хоризонталним трансфером, највероватније од непатогених бактерија из животне средине (*Doi u Arakawa, 2007*).

### 2.6.3. Резистенција на сулфонамиде

Сулфонамиди су синтетички антибиотици који су почели да се користе у клиничкој пракси непосредно после њиховог открића 1935. године (*Habrun, 2014*). Данас се ретко користе у медицини, али се још увек гени за резистенцију налазе код

многобројних врста бактерија. Сулфонамиди делују тако што инхибирају синтезу дихидроптероат синтетазе (DPHS) захваљујући структурној хомологији са пара-амино-бензоичном киселином (РАВА). Самим тим омета се синтеза фолне киселине која је неопходна за многоброје функције бактеријске ћелије. Обзиром да фолна киселина не може да прође кроз ћелијски зид бактерија, оне морају да је синтетишу саме за своје потребе (*Sköld, 2000*).

Клиничка резистенција на сулфонамиде код Грам негативних бактерија настаје када бактерије почну да синтетишу алтернативни DPHS за своје потребе. Три до данас позната гена *sul1*, *sul2* и *sul3* која су лоцирана на плазмидима и/или транспозонима омогућавају синтезу алтернативног молекула DPHS код бактерија. Постоје два важна разлога због којих је резистенција на сулфонамиде толико распрострањена. Гени за резистенцију се налазе на мобилним генетичким елементима и продукти гена могу да савладају високе концентрације сулфонамида (*Sköld, 2000*).

#### 2.6.4. Резистенција на триметоприм

Триметоприм је синтетички антибиотик који у својству структурног аналога фолне киселине компетитивно инхибира редукцију дихидрофолне киселине (Б9 витамин) у тетраhydroфолну киселину преко ензима дихидрофолат редуктазе (DHFR). Тетраhydroфолна киселина је неопходна за синтезу тимина, односно синтезу бактеријске ДНК. Тиметоприм се везује на место дихидрофолат редуктаза и тако инхибира његово деловање. Сулфонамиди и триметоприм врше своје функције селективно, односно не ометајући функције других ћелија сисара, али зато веома ефикасно ометају метаболичке процесе код бактерија (*Sköld, 2001*).

Гени за резистенцију на триметоприм се обично налазе на плазмидима или другим мобилним генетичким елементима, а бактерије их наслеђују од микроорганизама из окружења, који до сада нису идентификовани. Гени *dfp* кодирају варијантне ензиме дихидрофолат редуктазе, који су резистентни на антибиотике и веома су распрострањени у животној средини (*Sköld, 2001*).

## 2.7. Преваленција антимикуробне резистенције животиња у свету и код нас

У циљу очувања ефикасности антимикуробне терапије широм света се спроводе интензивна систематска, континуирана и мултидисциплинарна научна испитивања резистенције бактерија према антибиотицима и хемиотерапеутицима. Свеобухватна истраживања усмерена су на детаљније упознавање механизма резистенције бактерија обухватајући утврђивање резистотипа, утврђивање минималне инхибиторне концентрације (МИК) за циљне антибиотике, детекцију гена који су одговорни за настајање резистенције, утврђивање тачкастих мутација на генима који узрокују резистенцију на одређене класе антибиотике, као и идентификацију локализације гена резистенције на плазмидима.

Резултати истраживања Јанга и сарадника из 2004. године показују веома високу преваленцију резистенције *E. coli* код свиња у Кини. Код испитаних изолата утврђена је највећа резистенција на налидиксинску киселину 100%, тетрациклин 98%, сулфаметоксазол 84%, ампицилин 79%, стрептомицин 77% и триметоприм-сулфаметоксазол 76%, од укупног броја тестираних изолата. Забрињавајућа је висока резистенција на флуорохинолоне, левофлоксацин 64%, ципрофлоксацин 79% и дифлоксацин 95%. Секвенцирањем су детектоване тачкасте мутације на *gyrA* и *parC* генима. Интегрони класе 1 детектовани су код 19% изолата свиња. Већина интегрона носила је гене који кодирају резистенцију на стрептомицин и триметоприм (*Yang и сар., 2004*).

Према резултатима истраживања које је објавио Јапански ветеринарски систем за надзор антимикуробне резистенције (JBARM) 2003. године, преваленција антимикуробне резистенције *E. coli* пореклом од свиња, говеда и бројлера је висока на сулфадиметоксин, окситетрациклин и дихидрострептомицин, ампицилин и канамицин. Утврђена је повећана резистенција на флуорохинолоне (енрофлоксацин) код бројлера, са вредностима МИК 100mg/l, са тенденцијом опадања, док код свиња и говеда није била откривена резистенција на флуорохинолоне (*Kijima-Tanaka и сар., 2003*).

Шредер и сарадници су 2002. године објавили резултате својих истраживања о преваленцији резистенције *E. coli* O157 код говеда, свиња и људи у држави Мериленд, САД. Резистенција на тетрациклин је утврђена код 27%, на

сулфаметоксазол 26%, на цефалотин 17% и на ампицилин 13% испитаних изолата *E. coli*. Овакви резултати указују на повећано коришћење ових антибиотика сточарској производњи државе Мериленд (*Schroeder, u cap., 2002*).

Према препорукама Европске агенције за безбедност хране (EFSA), земље чланице Европске Уније су у обавези да испитују осетљивост бактерија на антибиотике код 170 изолата на годишњем нивоу. Осетљивост на антибиотике се испитује микродилуционом методом (референтна метода ISO 20776-1:2006 (E), под насловом: Клиничко лабораторијско тестирање и *in vitro* дијгностика осетљивости инфективних агенаса и евалуација перформанси метода за праћење осетљивости бактерија на антибиотике код индикаторских бактерија (*E. coli* и *Enterococcus faecalis/faecium*) и патогених бактерија (*Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni/coli* и *Staphylococcus aureus*) од животиња које се користе за производњу хране за људе. Узорковање се врши у кланицама, малопродаји и популацији животиња слободних од болести (EFSA, 2012).

Према EFSA извештајима из 2015. године испитује се резистенција на цефалоспорине треће генерације и карбапенеме код репрезентативног броја изолата *E. coli* пореклом од свиња, говеда и говеда млађих од годину дана у земљама чланицама ЕУ. Други панел се односи на детекцију индикаторске *E. coli* која продукује ESBL коришћењем селективних подлога са 1mg/l СТН. У анализе су укључени изолати из меса и цекума животиња на кланици и меса у малопродаји. Број изолата *E. coli* резистентних на цефалоспорине треће генерације није висок у земљама чланицама ЕУ, а у десет држава није утврђена резистенција на цефотаксим и цефтазидим код изолата *E. coli* од свиња у тову, као и на меропенем и ертапенем. Из узорака свежег свињског меса из малопродаје тестирано је укупно 5350 узорака у 22 државе. Од тога је 7% узорака имало ESBL фенотип, 2,3% AmpC фенотип, а комбинацију фенотипа ESBL / AmpC 0,4% изолата. Двадесетседам држава чланица ЕУ испитало је 6167 узорака цекума на присуство *E. coli* која продукује ESBL (користећи селективне подлоге). Од тога 31,9% узорака је било позитивно на *E. coli* која продукује ESBL фенотип, а код 9,7% изолата утврђен је AmpC фенотип. Само 1,5% изолата имало је комбинацију ESBL / AmpC (EFSA, 2017).

У периоду од 2002-2004. године Хендриксен и сарадници су спровели студију која је имала за циљ континуирано праћење резистенције патогених бактерија и

коменсалне *E. coli*, у којој је учествовало 12 држава чланица ЕУ. Шпанија је имала највећу преваленцију резистенције на ампицилин, стрептомицин, сулфонамиде, тетрациклин и налидиксинску киселину. Највећа установљена преваленција резистенције на флуорохинолоне је била у Португалији (просечно 48% за период 2002-2004. године), док су сви тестирани изолати у Данској били сензитивни. Резистенција *E. coli* пореклом од болесних свиња на цефалоспорине IV генерације (цефтиофур) нађена је у Белгији (просечно 1,5% за период 2002-2004. године), док је највећа резистенција на триметоприм-сулфаметоксазол детектована у Холандији и Белгији (преко 70% за период 2002-2004. године). Највећу преваленцију резистенције на гентамицин и хлорамфеникол имала је Португалија (48%), а на неомицин Данска (*Hendriksen и сар.*, 2008).

У једној студији из 2008. године публиковани су резултати испитивања осетљивости изолата *E. coli*, пореклом од здравих свиња и бројлера, меса свиња и бројлера, као и особља запосленог на кланицама и болничких пацијената на Исланду. Резултати показују високу преваленцију антимикуробне резистенције код свиња 54% и бројлера 52%, као и радника у кланицама 39%, док је преваленција резистенције код болничких пацијената била 23,1%. Највише заступљена резистенција код свиња била је на тетрациклин 36%, сулфаметоксазол 31%, и стрептомицин 25%, код бројлера на сулфаметоксазол 21%, ципрофлоксацин 20% и налидиксинску киселину 20%, док је код радника у кланицама и болничких пацијената на ампицилин 6-8% (*Thorsteinsdottir и сар.*, 2008).

Веома опсежна истраживања осетљивости сојева изолата *E. coli* у Србији објавио је Крњаић са сарадницима. Оглед је урађен на 42 фарме широм Србије и утврђено је присуство резистенције према свим антибиотицима, изузев према цефалоспоринима III генерације и колистину. Установљена преваленција резистентних сојева *E. coli* према одређеним антибиотицима и хемиотерапеутицима била је значајно различита у зависности од старости и врсте животиња. Виши проценат резистентних сојева присутан је код сојева *E. coli* изолованих од болесних у односу на здраве, као и од младих у односу на старије животиње. Изузетно висок проценат резистенције утврђен је код сојева *E. coli* изолованих од телади са проливом, прасади и од живине. Преваленција мултирезистентних сојева *E. coli* значајно се разликовала унутар изолованих сојева *E. coli* у зависности од различитих



категорија и врста животиња и износила је код говеда од 15% до 80%, свиња од 40% до 95% и живине од 45% до 95% (Крњић и сар., 2005).

Испитивање преваленције антимикробне резистенције код коменсалне *E. coli*, од домаћих животиња које се узгајају за исхрану људи у Војводини, публиковано је 2008. године. Углавном је установљена резистенција на старије класе антибиотика, а мултирезистенција (на > 2 антибиотика) је нађена код свих изолата пореклом од свиња, код 63,2% изолата од живине и 37,5% изолата од говеда. Најзаступљенија је била резистенција на тетрациклин, а потом у мањој мери на стрептомицин, ампицилин, цефалотин и налидиксинску киселину (Кнежевић и Петровић, 2008).

## **2.8. Потенцијални утицај антимикробне резистенције на дивље животиње, животну средину и здравље људи**

У природним условима дивље животиње нису изложене клиничким антимикробним агенсима, али могу бити заражене са бактеријама које су отпорне на антимикробне лекове кроз контакт са људима, домаћим животињама и животном средином. Вода и земљиште контаминирани фекалијама су најзначајнији вектор бактерија. Може се очекивати да учесталост комензалних и патогених бактерија у фекалној контаминацији буде веза између околине и окружења са редовним или чак константним антимикробним притиском (аквакултура, сточарство, људска и ветеринарска клиничка окружења), што резултира сталним ослобађањем антимикробних средстава (Martinez, 2009). Поред тога, откривање бактерија отпорних на антимикробне лекове у воденим срединама на које утичу људске и животињске отпадне воде и земљиште пружа доказе за ову хипотезу (Kummerer and Henninger, 2003). У овом контексту, уобичајена употреба антимикробних средстава у аквакултури је такође од највеће важности због могућих директних утицаја на дивље животиње (Smith, 2008). Како се цревне бактерије попут *E. coli* и ентерокок лако могу ширити у различитим екосистемима кроз воду, оне се интензивно користе као индикаторске врсте за фекално загађење (Guenther et al., 2011). У том смислу, неопходно је тумачити еволуционе и еколошке силе које утичу на структуру популације комензалних сојева да би се у потпуности разумела антимикробна резистенција и вирулентност патогених сојева. Свакако, селективни притисци у

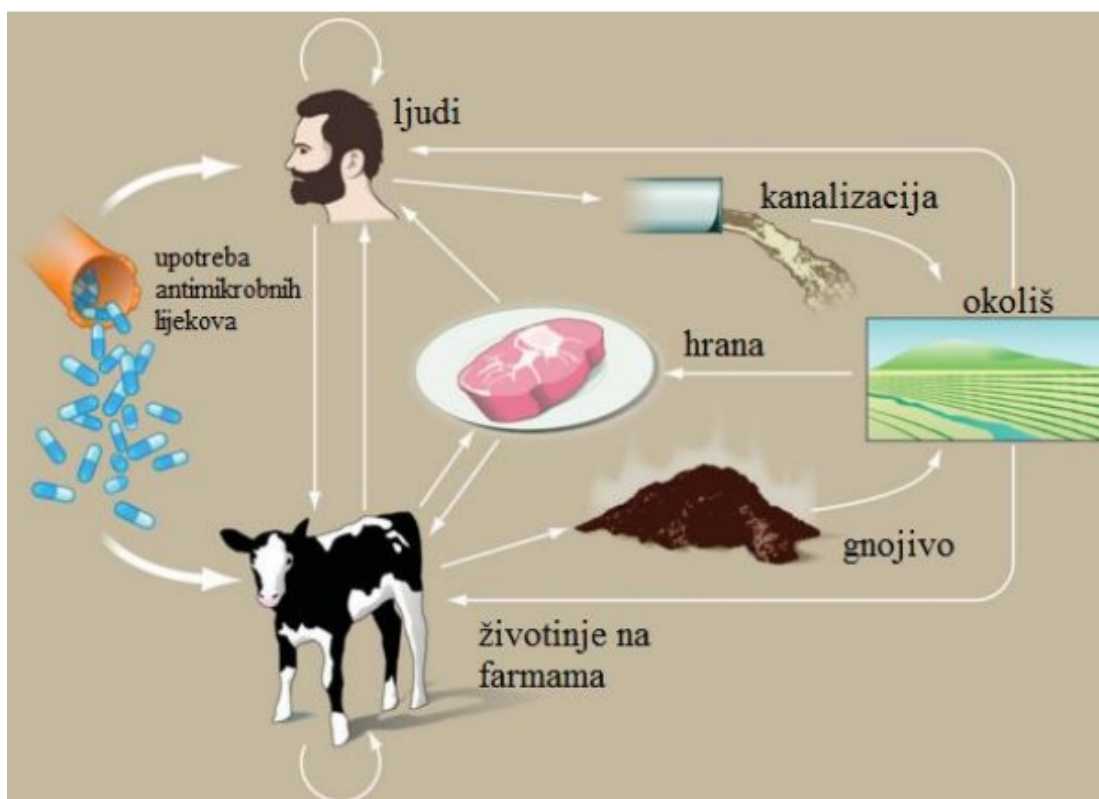
стаништима комензалних сојева могу случајно да промовишу појаву антимикуробне резистенције и фактора вируленције, чинећи комензалне сојеве резервоарима вирулентних и резистентних сојева (*Tenaillon et al., 2010*).

Упркос коменсалном карактеру *E. coli* и ентерокока, доказано је да су они укључени и у инфекције животиња тј. људи које имплицирају употребу антимикуробних средстава, што повећава бригу јавног здравства због могућности ширења мултирезистентних ESBL-*E. coli* и VRE код дивљих животиња. Иако дивље птице, као што су птице грабљивице, имају ретко контакт са антимикуробним агенсима, оне могу бити контаминирани или колонизовани отпорним бактеријама. Чини се да су контакт са водом и храном главни аспекти преношења резистентних бактерија људског или ветеринарског порекла на дивље животиње (*Cole et al., 2005*). С друге стране, дивље птице као што су галебови често су опортунистички морски хранитељи дуж обале или на мору, али такође једу изворе хране које обезбеђују људи, путем отпадака хране. Такође, птице селице које лете на велике удаљености могу имати улогу преносиоца као резервоари резистентних бактерија те на тај начин имати значајну епидемиолошку улогу у ширењу резистенције, и бити огледало спектра патогених микроорганизама присутних код људи (*Radhouani et al., 2010c; Silva et al., 2011a*). Бактериолошке анализе код орада (морских риба) су показале присуство ESBL-*E. coli* (*Sousa et al., 2011*) и VRE (*Barros et al., 2012*), што указује на ширење ESBL-*E. coli* и VRE у водама Атлантског океана. Још раније је бактериолошким анализом доказано да су галебови делили сојеве са изолатима узгајаним из постројења за пречишћавање и прераду отпадних вода и са депонија (*Nelson et al., 2008*). Ово наглашава могућност размене бактерија између људске канализације и птица.

Сем дивљих птица глодари су још један веома важан домаћин ових бактерија у природи. Иако су раније дивљи глодари на различитим континентима били обухваћени у истраживањима о ESBL -у ипак код њих нису откривени (*Gilliver et al., 1999; Kozak et al., 2009; Guenther et al., 2010b; Literak et al., 2010b; Allen et al., 2011*), откривени су само код пацова у урбаним срединама (*Guenther et al., 2010a; Ho et al., 2011*). С друге стране, VRE су описане код дивљих глодара у неким ранијим студијама (*Mallon et al., 2002*). Ова синантропска врста може лако покупити људски отпад и често ступа у интеракцију са људским изметом у канализационом систему у урбаним срединама и стога лако могу да стекну мултирезистентне бактерије. Такође,

дивље свиње у Европи су описане као домаћини ових бактерија, што оправдава ову студију с обзиром да су оне омнивори (*Poeta et al., 2007b, 2009; Literak, et al., 2010b*). Недавне студије су откриле присуство ESBL-*E. coli* (*Gonçalves et al., 2012b*) и VRE изолата (*Gonçalves et al., 2011*) код иберијског вука и иберијског риса. Инциденција ESBL-*E. coli* (*Radhouani et al., 2012a*) и VRE (*Radhouani et al., 2011a*) код црвених лисица може бити последица њихове исхране пошто ове дивље животиње обично лове дивље зечеве, мале глодаре и птице. Важно је истаћи да су неке студије пријавиле присуство изолата отпорних на антимикуробне лекове код дивљих зечева (*Figueiredo et al., 2009; Silva et al., 2010*) и дивљих глодара (*Kozak et al., 2009; Guenther et al., 2010b*). Лисице су можда на врху ланца исхране и акумулирајући мултирезистентне бактерије из свог плена (*Grobbel et al., 2012*). Сви ови докази могу допринети стицању и ширење бактерија отпорних на антимикуробне лекове чак и у одсуству директног антимикуробног третмана.

Из горе наведеног, можемо видети да дивље животиње представљају „банку“ гена резистентних бактерија, које се могу несметано ширити у пророди и утицати на антимикуробну резистенцију микробиалне популације домаћих животиња и људи. Ниво резистентних бактерија изолован код дивљих животиња у тесној је вези са степеном људске активности и рада тј. лечења људи и животиња (*Skurnik et al., 2006*). Другим речима, густина насељености, еколошко очување животне средине неке државе, контролисано и стручно лечење домаћих животиња или животиња у резервату неког подручја, могу бити значајни критеријум за ширење бактерија резистентних на антимикуробне лекове (*Allen et al., 2010*). Ипак, неколико студија извештава да је очувана појава резистентних бактерија на различите врсте антибиотика у удаљеним и неприступачним местима или областима. Ова открића указују на сложеност ширења антимикуробне резистенције код дивљих животиња, а у вези је са утицајем миграторног понашања дивљих животиња и птица у удаљена подручја, а с друге стране, свеprisутност људског утицаја у различитим еко системима планете (путем фецеса) (*Guenther et al., 2011*). Различити извештаји показују да подручја у близини великих фарми где је присуство људи повећано, те улазак птица и других животиња на те фарме ради хране или склоништа (депоније, канализациони системи или постројења за пречишћавање отпадних вода, силоси са храном) резултирају већим ризиком размене микробиома, а тиме и резистентне микробне флоре (*Allen et al., 2010*).



Слика 5. Пuteви ширења антимикробне резистенције

Снага трилиона и трилиона микроорганизама, комбинована са древном силом еволуције, сталним упорним варијацијама, неизбежно ће надјачати лекове. Суштина природног принципа је селекција између патогених бактерија и антимикробних лекова, а резултат те селекције је перманентни одабир природно резистентних бактерија из окружења. Како бактерије брзо еволуирају и да не би стекле отпорност на доступне антимикробне лекове, потребно је спроводити непрекидна истраживања с циљем да се развије ефикасна стратегија за борбу против инфекције, те открију нови терапеутски циљеви и поступци (Davies and Davies, 2010). Термин “коллатерална штета” описује нежељени утицај на бактерије који настаје као резултат терапије антибиотцима. Обухвата развој резистенције на одабрани антибиотик, отпорност на друге антибиотике из исте класе и отпорност и/или на друге неповезане антибиотске класе. Ризик од такве “штете” може се проценити за различите класе антибиотика у различитим епидемиолошким студијама (American Academy of Microbiology, 2009).

### **3.ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА**

Циљ истраживања је

1. Извршити изолацију и идентификацију сојева цревних бактерија из фецеса дивљих птица у мини зоолошком врту,
2. Утврди присуство резистентних сојева цревних бактерија на одабране антибиотике.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

За потребе овог истраживања узети су узорци измета 12 различитих врста птица (Табела 2.). Узорци су прикупљени у мини зоолошком врту „Мики“ у Колуту, у Западној Бачкој, у близини природних водотокова (Дунав, Велики Бачки Канал). Сви узорци су сакупљени у стерилне пластичне посуде и у року од четири сата достављени у Лабораторију за паразитологију Департмана за ветеринарску медицину Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду на даљу обраду. Сви узорци су инокулисани на Ендо агар (Biolife Italiana, Milan, Italy) и остављени за инкубацију на 37° Ц током 24 сата. Након култивације, идентификација бактерија је заснована на стандардом биохемијском тестирању које је укључивало IMViC тест производње индола, метил-црвено (MR), Вогес-Проскауер test (VP), тест коришћења цитрата на Симонсовом цитратном агару (HiMedia, Mumbai, India), тест покретљивости и производње H<sub>2</sub>S на SIM медијуму (HiMedia, Mumbai, India), и двоструки тест ферментације шећера, лактозе и глукозе у з продукцију гаса H<sub>2</sub>S на двоструком Клиглер агару са гвожђем (Biolife Italiana, Milan, Italy). Сви медијуми су припремљени према упутствима произвођача.

За испитивање антимикуробне резистенције бактеријских изолата коришћена је метода диск дифузије (*Kirby-Bauer* метод) у складу са смерницама Европског комитета за испитивање осетљивости на антимикуробне лекове (EUCAST, 2017). За припрему инокулума коришћене су колоније фенотипски сумњивљ колонијњ са Ендо агра, не старије од 24 сата, од којих је прављена суспензија у стерилном физиолошком раствору, густине 0,5 Mc Farland стандарда замућености, што приближно одговара 1-2x10<sup>8</sup> CFU/ml. За испитивање је коришћен Милер-Хинтон (*Müller-Hinton*) агар (HiMedia, Mumbai, India) припремљен је према упутствима произвођача и чуван у Петријевим посудама у фрижидеру. Милер-Хинтон је неселективна подлога што значи да скоро сви микроорганизми засејани на њему могу да расту. Поред тога, садржи скроб који апсорбује токсине ослобођене из бактерија, тако да не могу да ометају антибиотике. Ово је тзв. „меки“ агар, јер садржи малу количину додатог агара, око 0,5% што омогућава бољу дифузију антибиотика. Боља дифузија доводи до исправније зоне инхибиције.

Редни број	Врста	Врста птице
1	<i>Pipile cumanensis</i>	Белокрилни гуан
2	<i>Corvus albus</i>	Гробаста врана
3	<i>Guttera pucherani</i>	Гребенаста птица
4	<i>Bycanistes brevix</i>	Сребрно образни рог
5	<i>Crax rubra</i>	Велики курасо
6	<i>Psittacus erithacus</i>	Сиви папагај
7	<i>Anas platyrhynchos dom.</i>	Домаћа патка
8	<i>Balearica regulorum</i>	Сиви круни ждрал
9	<i>Phoenicopterus roseus</i>	Фламинго
10	<i>Phoenicopterus roseus</i>	Фламинго
11	<i>Anser canagicus</i>	Царска гуска
12	<i>Branta ruficollis</i>	Гуска црвеновољка

Табела 2. Број узорака, врсте птица (латински и колоквијални назив)

Пре инокулације, агар плоче су држане на собној температури. Суспензија инокулума је засејавана у року од 15 минута од припреме потапањем стерилног памучног штапића у суспензију. Да би се избегла прекомерна инокулација грам негативних бактерија, вишак течности је уклоњен притиском и окретањем штапића на унутрашњој страни епрувете. Инокулум је равномерно распоређен по целој површини агара обезбеђујући да нема празнина између пруга. Антимикробни дискови (Bioanalyse, Ankara, Turkey) су примењени у року од 15 минута од инокулације, након чега су агар плоче инкубирани 16-20 часова на 35±1°C у аеробним условима. Антимикробна осетљивост бактеријских изолата испитивана је за следеће класе антибиотика: из групе пеницилина (ампицилин 10 µg, амоксицилин са клавуланском киселином 20+10 µg), цефалоспорина (цефуроксим 30 µg, цефтриаксон 1µg), сулфаметоксазол са триметопримом 1,25+23,75 µg) и од хинолона -ципрофлоксацин 5 µg). После инкубације мерене су зоне инхибиције раста бактерија око примењених дискова и интерпретиране према EUCAST смерницама (EUCAST, 2017).

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Истраживање је показало да је из 12 узорака фецеса изоловано 12 врста ентеробактерија, код 9 птица утврђено је присуство *Escherichia coli*, а по један узорак фецеса имао је *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* и *Enterobacter spp.*

Редни број	Врста	Врста изоловане бактерије
1	<i>Pipile cumanensis</i>	<i>Proteus spp.</i>
2	<i>Corvus albus</i>	<i>Escherichia coli</i>
3	<i>Guttera pucherani</i>	<i>Escherichia coli</i>
4	<i>Bycanistes brevix</i>	<i>Escherichia coli</i>
5	<i>Crax rubra</i>	<i>Escherichia coli</i>
6	<i>Psittacus erithacus</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
7	<i>Anas platyrhynchos dom.</i>	<i>Escherichia coli</i>
8	<i>Balearica regulorum</i>	<i>Escherichia coli</i>
9	<i>Phoenicopterus roseus</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
10	<i>Phoenicopterus roseus</i>	<i>Escherichia coli</i>
11	<i>Anser canagicus</i>	<i>Escherichia coli</i>
12	<i>Branta ruficollis</i>	<i>Escherichia coli</i>

Табела 3. Изолати цревних бактерија код птица из зооврта „Мику“

У овој студији забележена је антимикуробна резистенција за сваки тестирани антибиотик, али четири изолата (33,33%) из узорака бр. 1, 3, 5 и 10 су показали осетљивост на све коришћене антибиотике.

Највећа резистенција је забележена на ампицилин (50%), затим амоксицилин са додатком клавуланске киселине (33,33%), сулфаметоксазол са триметопримом (16,66%), а најмања отпорност на цефуроксим, ципрофлоксацин, цефтриаксон и гентамицин (8,33%).



Мултипла резистенција на лекове (МДР), дефинисана као резистенција на најмање један антибиотик у најмање три класе антибиотика, пронађена је код два (16,66%) изолата *E. coli*, односно у узорцима 7 и 11.

$\beta$ -лактамазе проширеног спектра (ЕСБЛ) су констатоване у два узорка (16,66%), односно у узорку 7 (отпорни на ампицилин и цефуроксим) и 9 (отпорни на ампицилин, амоксицилин са додатком клавуланске киселине и цефтриаксона) и отпорни на представнике пеницилина и цефалоспоринску групу антибиотика.

Број узорка	AMP	AMC	CXM	CRO	CN	SXT	CIP
1	S	S	S	S	S	S	S
2	R	R	S	S	S	R	S
3	S	S	S	S	S	S	S
4	R	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S
6	S	R	S	S	S	S	S
7	R	S	R	S	I	S	S
8	R	S	S	S	S	S	S
9	R	R	S	I	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S
11	R	R	S	S	S	R	R
12	S	S	S	S	S	S	S

Табели 4: Резултати антибиограма су приказани у

Легенда AMP – ампицилин, AMC – амоксицилин са клавулинском киселином, CXM – цефуроксим, CRO – цефтриаксон, CN – гентамицин, SXT – сулфаметоксазол са триметопримом, CIP – ципрофлоксацин, S – сензитивно, R – резистентно, I – интермедијарно

Антимикробна резистенција је једна од најозбиљнијих здравствених претњи у настајању и због своје природе и обима се интензивно проучава и код људи и животиња (*Sala et al., 2016*).

Тешко је упоредити стопе преваленције резистенције на антибиотике добијене из овог истраживања са резултатима других аутора из наше земље, јер јер је мало података о резистенцији на антимикробне лекове код дивљих птица у Србији (*Kozoderovic et al., 2021*) Четири изолата *E. coli* (33,33%) коришћена у овој студији показала су осетљивост на све антибиотике, док је 50% изолата показало резистенцију на ампицилин. У студији из Португала, 97,22% изолата *E. coli* показало је отпорност на један или више антибиотика. Више од 60% изолата било је резистентно на ампицилин, слично резултатима наше студије. (*Radhouani et al, 2012*).

У нашој студији, ESBL су забележене у два узорка (16,66%), што је већа стопа преваленције од 1,7% коју су пријавили *Zurfluch* и сарадници у студији спроведеној на различитим врстама дивљих птица у Швајцарској (*Zurfluch et al., 2019*). За разлику од резултата наше студије, Боргес и сарадници нису изоловали *E. coli* која производи ESBL од дивљих птица у ветеринарској болници у Сао Паулу у Бразилу, међутим резистенција на више лекова је повезана са 47,4% ових изолата, за разлику од преваленција од 16,66% у нашој студији. Занимљиво је да је у истој студији из Бразила примећена већа преваленција резистенције на ципрофлоксацин (36,8%) и гентамицин (21%), али и нижа на ампицилин (21%) и амоксицилин са клавуланском киселином (15,8%), што је такође у супротности са преваленцијом добијена у нашем истраживању (*Borges et al., 2017*). У другој студији о *E.coli* код птица у заточеништву у Сао Паулу од стране Понтес и сарадници., највећа резистенција је примећена код амоксицилина са клавуланском киселином и ампицилина, а мултипла резистенција је верификована у 59% изолата, што је у складу са нашим резултатима. (*Pontes et al., 2018*).

Друга по заступљености је резистенција на амоксицилин са клавуланском киселином, са преваленцијом од 33,33%, затим следи са 16,66% резистенција на сулфаметоксазол са триметопримом, док је у студији из Истанбула, већи проценат резистенције на сулфаметоксазол са триметопримом (46,66%) него амоксицилин. са клавуланском киселином (13%) (*Sigirci et al., 2019*).

У овој студији смо пронашли један изолат (8,33%) отпоран на ципрофлоксацин, док су у студији из Бразила сви тестирани сојеви *E. coli* показали осетљивост на овај антибиотик (*Machado et al, 2018*).

## 6. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата може се констатовати присуство антимикуробне резистенције цревних бактерија изолованих код птица у мини зоолошком врту „Мики“ у Колуту.

Појава антимикуробне резистенције је занимљива чињеница с обзиром да испитиване птице никада нису лечене антибиотицима. Кохабитација међу различитим врстама птица, као и контакт између дивљих животиња и људи који често посећују зоолошки врт, указују на то да контакт између њих може бити важан пут преношења гена отпорности. С обзиром на мали број узорака обухваћених овим истраживањем, неопходна су даља истраживања са већим бројем узорака и других класа антибиотика како би се стекла јаснија слика о распрострањености и преваленци на антибиотике резистентних цревних бактерија код дивљих птица у Србији.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., And Handelsman, J. (2010). Call Of The Wild: Antibiotic Resistance Genes In Natural Environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251–259. Doi: 10.1038/Nrmicro2312
2. American Academy Of Microbiology. (2009). *Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective On An Old Problem*. Washington, Dc: American Academy Of Microbiology
3. Ammor M. S., Flórez A. B., Van Hoek A. H. A. M., De Los Reyes-Gavilán C. G., Aarts H. J. M., Margolles A., Mayo B. (2007). Molecular Characterization Of Intrinsic And Acquired Antibiotic Resistance In Lactic Acid Bacteria And Bifidobacteria. *Journal Of Molecular Microbiology And Biotechnology*, 14(1–3), 6–15.
4. Barros, J., Andrade, M., Radhouani, H., Lopez, M., Igrejas, G., Poeta, P., Et Al. (2012). Detection Of Vana-Containing Enterococcus Species In Faecal Microbiota Of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*). *Microbes Environ.* 27, 509–511. Doi: 10.1264/Jsme2.Me11346
5. Bennett, P.M. (1999), “Integrans And Gene Cassettes: A Genetic Construction Kit For Bacteria”, *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 43 No. 1, Pp. 1–4.
6. Bennett, P.M. (2008), “Plasmid Encoded Antibiotic Resistance: Acquisition And Transfer Of Antibiotic Resistance Genes In Bacteria”, *British Journal Of Pharmacology*, Vol. 153, Pp. 347–357.
7. Bender, J. B., And S. A. Shulman. (2004): Reports Of Zoonotic Disease Outbreaks Associated With Animal Exhibits And Availability Of Recommendations For Preventing Zoonotic Disease Transmission From Animals To People In Such Settings. *J Am Vet Med Assoc.*, 224:1105–1109.
8. Borges, C.A., Beraldo, L.G., Maluta, R.P., Cardozo, M.V., Barboza, K.B., Guastalli, E.A.L., Kariyawasam, S., Debroy, C. And Ávila, F.A. (2017): Multidrug-Resistant Pathogenic *Escherichia Coli* Isolated From Wild Birds In A Veterinary Hospital. *Avian Pathol.*, 46(1), Pp.76-83.
9. Caprioli A. , Busani L. , Martel J. L. , Helmuth R. (2000): Monitoring Of Antibiotic Resistance In Bacteria Of Animal Origin: Epidemiological And Microbiological Methodologies. *Int J Antimicrob Agents.*, 14:, 295—301
10. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., Hanage, W.P. (2015), “Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be?”, *Evolutionary Applications*, Vol. 8 No. 3, pp. 240–247.
11. Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., Denamur E. (2011), “Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds”, *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 11 No. 3, pp. 654–662.

12. Cole, D., Drum, D. J., Stalknecht, D. E., White, D. G., Lee, M. D., Ayers, S., Et Al. (2005). Free-Living Canada Geese And Antimicrobial Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 935–938. Doi: 10.3201/Eid1106.040717
13. David L. Nelson, Michael M. Cox (2005). *Principles Of Biochemistry* (4th Izd.). New York: W. H. Freeman. Isbn 0-7167-4339-6.
14. Davies, J., And Davies, D. (2010). Origins And Evolution Of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. Doi: 10.1128/Mmbr.00016-10
15. Devirgiliis C., Barile S., Perozzi G. (2011). Antibiotic Resistance Determinants In The Interplay Between Food And Gut Microbiota. *Genes And Nutrition*, 6(3), 275–284.
16. Doi, Y., Arakawa, Y. (2007), “16s Ribosomal Rna Methylation: Emerging Resistance Mechanism Against Aminoglycosides”, *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 45 No. 1, Pp. 88– 94.
17. Erski-Biljić M., Dobrić Đ. (1998), *Bakteriologija Veterinarske Medicine*, Naučni Institut Za Veterinarstvo Srbije, Beograd.
18. Evan E. Bolton, Yanli Wang, Paul A. Thiessen, Stephen H. Bryant (2008). „Chapter 12 Pubchem: Integrated Platform Of Small Molecules And Biological Activities”. *Annual Reports In Computational Chemistry* 4: 217-241. Doi:10.1016/S1574-1400(08)00012-1.
19. European Food Safety Authority. (2012). Guidance On The Assessment Of Bacterial Susceptibility To Antimicrobials Of Human And Veterinary Importance. *Efsa Journal*, 10(6), 1–10.
20. Euroepan Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing Eucast (2017) [Http://Www.Eucast.Org/Fileadmin/Src/Media/Pdfs/Eucast\\_Files/Breakpoint\\_Tables/V\\_7.0\\_Breakpoint\\_Tables.Pdf](http://www.Eucast.Org/Fileadmin/Src/Media/Pdfs/Eucast_Files/Breakpoint_Tables/V_7.0_Breakpoint_Tables.Pdf)
21. European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast). (2017): Antimicrobial Susceptibility Testing Eucast Disk Diffusionmethod. [Http://Www.Eucast.Org/Fileadmin/Src/Media/Pdfs/Eucast\\_Files/Disk\\_Test\\_Documents/Version\\_5/Manual\\_V\\_6.0\\_Eucast\\_Disk\\_Test\\_Final.Pdf](http://www.Eucast.Org/Fileadmin/Src/Media/Pdfs/Eucast_Files/Disk_Test_Documents/Version_5/Manual_V_6.0_Eucast_Disk_Test_Final.Pdf)
22. Figueiredo, N., Radhouani, H., Goncalves, A., Rodrigues, J., Carvalho, C., Igrejas, G., Et Al. (2009). Genetic Characterization Of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolates From Wild Rabbits. *J. Basic Microbiol.* 49, 491–494. Doi: 10.1002/Jobm.200800387
23. Ferraro J. H. J., Jorgensen M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review Of General Principles And Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 7750, 1749–1755.
24. Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H.W. (2008), “The Evolution Of Class 1 Integrons And The Rise Of Antibiotic Resistance”, *Journal Of Bacteriology*, Vol. 190, No. 14, Pp. 5095–5100

25. Gilliver, M. A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S. M., And Hart, C. A. (1999). Antibiotic Resistance Found In Wild Rodents. *Nature* 401, 233–234. Doi: 10.1038/45724
26. Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., Estepa, V., Pacheco, R., Monteiro, R., Et Al. (2012b). Iberian Wolf As A Reservoir Of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia Coli* Of The Tem, Shv, And Ctx-M Groups. *Microb. Drug Resist.* 18, 215–219. Doi: 10.1089/Mdr.2011.0145
27. Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., Lopez, M., Guerra, A., Petrucci-Fonseca, F., Et Al. (2011). Detection Of Vancomycin-Resistant Enterococci From Faecal Samples Of Iberian Wolf And Iberian Lynx, Including Enterococcus Faecium Strains Of Cc17 And The New Singleton St573. *Sci. Total Environ.* 410–411, 266–268. Doi: 10.1016/J.Scitotenv.2011.09.074
28. Grobbel, M., Wittstatt, U., Guenther, S., And Ewers, C. (2012). Urban Red Foxes (*Vulpes Vulpes*) And Their Possible Role In The Transmission Of 3rd Generation Beta-Lactam Resistant *E. Coli* To The Environment,” In Proceedings Of 3rd Asm Con-Ference On Antimicrobial Resistance In Zoonotic Bacteria And Foodborne Pathogens In Animals, Humans, And The Environment, Aix-En-Provence, France.
29. Guardabassi, L., Schwarz, S., Lloyd, D.H., 2004. Pet Animals As Reservoirs Of Antimicrobial-Resistant Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 321–332.
30. Guenther, S., Ewers, C., And Wieler, L. H. (2011). Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. Coli* In Wildlife, Yet Another Form Of Environmental Pollution? *Front. Microbiol.* 2:246. Doi: 10.3389/Fmicb.2011.00246
31. Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., Guerra, B., Ulrich, R. G., Wieler, L. H., Et Al. (2010a). Detection Of Pandemic B2-O25-St131 *Escherichia Coli* Har-Bouring The Ctx-M-9 Extended-Spectrum Beta-Lactamase Type In A Feral Urban Brown Rat (*Rattus Norvegicus*). *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 582–584. Doi: 10.1093/Jac/Dkp496
32. Guenther, S., Grobbel, M., Heidemanns, K., Schlegel, M., Ulrich, R. G., Ewers, C., Et Al. (2010b). First Insights Into Antimicrobial Resistance Among Faecal *Escherichia Coli* Isolates From Small Wild Mammals In Rural Areas. *Sci. Total Environ.* 408, 3519–3522. Doi: 10.1016/J.Scitotenv.2010.05.005
33. Habrun Boris. (2014), *Klinička Veterinarska Bakteriologija, Medicinska Naklada I Veterinarski Institut, Zagreb*
34. Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Jouy, E., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greco, K., Stark, K., Berghold C., Myllyniemi, A., Hoszowski, A., Sunde, M., Aarestrup F.M. (2008), “Occurrence Of Antimicrobial Resistance Among Bacterial Pathogens And Indicator Bacteria In Pigs In Different European Countries From Year 2002 - 2004: The Arbao-Ii Study”, *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 50, No. 19.
35. Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Jouy, E., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greco, K., Stark, K., Berghold

- C., Myllyniemi, A., Hoszowski, A., Sunde, M., Aarestrup F.M. (2008), "Occurrence Of Antimicrobial Resistance Among Bacterial Pathogens And Indicator Bacteria In Pigs In Different European Countries From Year 2002 - 2004: The Arbao-Ii Study", *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 50, No. 19.
36. Ho, P. L., Chow, K. H., Lai, E. L., Lo, W. U., Yeung, M. K., Chan, J., Et Al. (2011). Extensive Dissemination Of Ctx-M-Producing Escherichia Coli With Multidrug Resistance To "Critically Important" Antibiotics Among Food Animals In Hong Kong, 2008-10. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 765–768. Doi: 10.1093/Jac/Dkq539
37. Jezdimirović B. Milanka. (2005), *Veterinarska Farmakologija*, Univerzitet U Beogradu, Fakultet Veterinarske Medicine, Beograd
38. Johnson, T.J., Thorsness, J.L., Anderson, C.P., Lynne, A.M., Foley, S.L., Han, J., Fricke, W.F., McDermott, F.P., White, G.D., Khatri, M., Stell, L.A., Flores, C., Singer, S.R. (2010), "Horizontal gene transfer of a colV plasmid has resulted in a dominant avian clonal type of Salmonella enterica serovar Kentucky", *PLoS ONE*, Vol. 5, No. 12.
39. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Morioka, A., Kojima, A., Ohzono, T., Ogikubo, K., Takahashi, T., Tamura, Y. (2003), "A National Surveillance Of Antimicrobial Resistance In Escherichia Coli Isolated From Food-Producing Animals In Japan.", *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 51, No. 2, Pp. 447–451.
40. Knezevic, P., Petrovic, O. (2008), "Antibiotic Resistance Of Commensal Escherichia Coli Of Food-Producing Animals From Three Vojvodinian Farms, Serbia", *International Journal Of Antimicrobial Agents*, Vol. 31, No. 4, Pp. 360–363.
41. Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S. (2000), "Aminoglycosides: Perspectives On Mechanisms Of Action And Resistance And Strategies To Counter Resistance", *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Vol. 44, No. 12, Pp. 3249-3256.
42. Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., And Jardine, C. (2009). Antimicrobial Resistance In Escherichia Coli Isolates From Swine And Wild Small Mammals In The Proximity Of Swine Farms And In Natural Envi-Ronments In Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 559–566. Doi: 10.1128/Aem.01821-08
43. Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., And Jardine, C. (2009). Antimicrobial Resistance In Escherichia Coli Isolates From Swine And Wild Small Mammals In The Proximity Of Swine Farms And In Natural Envi-Ronments In Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 559–566. Doi: 10.1128/Aem.01821-08
44. Kozoderovic G, Todoprovic D, Velhner M, Djilas M, Kartalovic B. (2021) White-tailed eagles (*Haliaeetus albicilla*) in protected Danube wetlands as carriers of *Escherichia coli* with resistance and virulence genes *European Journal of Wildlife Research* 67:103

45. Krnjaić, D., Mišić, D., Ašanin, R. (2005), “Investigation Of Sensitivity And Resistance To Antibiotics And Chemotherapeutics In E. Coli Strains Isolated From Animals Bred In Intensive Farming Conditions”, *Acta Veterinaria*, Vol. 55, No. 5–6, Pp. 501–509.
46. Kummerer, K., And Henninger, A. (2003). Promoting Resistance By The Emission Of Antibiotics From Hospitals And Households Into Effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 1203–1214. Doi: 10.1111/J.1469-0691.2003.00739.X
47. Levy, S.B., Marshal, B. (2004), “Antibacterial Resistance Worldwide: Causes, Challenges And Responses”, *Nature Medicine*, Vol. 10, No. 12, Pp. 122-129
48. Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F. M., Et Al. (2010b). Antimicrobial-Resistant Faecal Escherichia Coli In Wild Mammals In Central Europe: Multiresistant Escherichia Coli Producing Extendedspectrum Beta-Lactamases In Wild Boars. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1702–1711. Doi: 10.1111/J.1365-2672.2009.04572.X
49. Machado, D.N., Lopes, E.S., Albuquerque, A.H., Horn, R.V., Bezerra, W.G.A., Siqueira, R.A.S., Lopes, I.T., Nunes, F.P., Teixeira, R.S.C. And Cardoso, W.M. (2018): Isolation And Antimicrobial Resistance Profiles Of Enterobacteria From Nestling Grey-Breasted Parakeets (*Pyrrhura Griseipectus*). *Braz J Poult Sci.*, 20(1): 103-110.
50. Mallon, D. J. P., Corkill, J. E., Hazel, S. M., Wilson, J. S., French, N. P., Bennett, M., Et Al. (2002). Excretion Of Vancomycin-Resistant Enterococci By Wild Mammals. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 636–638. Doi: 10.3201/Eid0806.010247
51. Mandel GJ, Bannett Je, Dolin R, Ur. (2000). Principles And Practise Of Infectious Diseases (5 Izd.). Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone. Doi:10.1016/S1473-3099(10)70089-X. Isbn 0-443-07593-X.
52. Martinez, J. L. (2009). The Role Of Natural Environments In The Evolution Of Resistance Traits In Pathogenic Bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2521–2530. Doi: 10.1098/Rspb.2009.0320
53. Nelson, M., Jones, S. H., Edwards, C., And Ellis, J. C. (2008). Characterization Of Escherichia Coli Populations From Gulls, Landfill Trash, And Wastewater Using Ribotyping. *Dis. Aquat. Organ.* 81, 53–63. Doi: 10.3354/Dao01937
54. Palzkill, T. (2013), “Metallo-B-Lactamase Structure And Function”, *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, Vol. 1277, No. 1, Pp. 91–104.
55. Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Rodrigues, J., And Torres, C. (2007B). Phenotypic And Genotypic Characterization Of Antimicrobial Resistance In Faecal Enterococci From Wild Boars (*Sus Scrofa*). *Vet. Microbiol.* 125, 368–374. Doi: 10.1016/J.Vetmic.2007.06.003
56. Poeta, P., Radhouani, H., Pinto, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., Et Al. (2009). Wild Boars As Reservoirs Of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (Esbl) Producing Escherichia Coli Of Different Phylogenetic Groups. *J. Basic Microbiol.* 49, 584–588. Doi: 10.1002/Jobm.200900066



57. Pontes, P.S.D., Coutinho, S.D.A., Iovine, R.D.O., Cunha, M.P.V., Knöbl, T. And Carvalho, V.M.D. (2018): Survey On Pathogenic Escherichia Coli And Salmonella Spp. In Captive Cockatiels (*Nymphicus Hollandicus*). *Braz J Microbiol.*,49: 76-82
58. Radhouani, H., Igrejas, G., Carvalho, C., Pinto, L., Goncalves, A., Lopez, M., Et Al. (2011a). Clonal Lineages, Antibiotic Resistance And Virulence Factors In Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated From Fecal Samples Of Red Foxes (*Vulpes Vulpes*). *J. Wildl. Dis.* 47, 769–773. Doi: 10.7589/0090-3558-47.3.769
59. Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Estepa, V., Sargo, R., Torres, C., Et Al. (2012a). Molecular Characterization Of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-producing Escherichia Coli Isolates From Red Foxes In Portugal. *Arch. Microbiol.* 195, 141–144. Doi: 10.1007/S00203-012-0853-7
60. Radhouani, H., Poeta, P., Pinto, L., Miranda, J., Coelho, C., Carvalho, C., Et Al. (2010c). Proteomic Characterization Of Vana-Containing Enterococcus Recovered From Seagulls At The Berlengas Natural Reserve, W Portugal. *Proteome Sci.* 8, 48. Doi: 10.1186/1477-5956-8-48
61. Radhouani, H., Poeta, P., Gonçalves, A., Pacheco, R., Sargo, R. And Igrejas, G. (2012): Wild Birds As Biological Indicators Of Environmental Pollution: Antimicrobial Resistance Patterns Of Escherichia Coli And Enterococci Isolated From Common Buzzards (*Buteo Buteo*). *J Med Microbiol.*, 61(6): 837-843.
62. Reid, A., And Buckley, M. (2011). *Microbial Evolution*. Washington, Dc: American Academy Of Microbiology
63. Richardson, L.A. (2017), “Understanding and overcoming antibiotic resistance”, *PLoS Biology*, Vol. 18, No. 8.
64. Sala, A., Taddei, S., Santospirito, D., Sandri, C., Magnone, W. And Cabassi, C.S. (2016): Antibiotic Resistance In Conjunctival And Enteric Bacterial Flora In Raptors Housed In A Zoological Garden. *Vet Med Sci.*, 2(4): 239-245.
65. Schierack, P., Kadlec, K., Guenther, S., Filter, M., Schwarz, S., Ewers, C., Wieler, L.H. (2009), “Antimicrobial Resistances Do Not Affect Colonization Parameters Of Intestinal E. Coli In A Small Piglet Group.”, *Gut Pathogens*, Vol. 1, No. 1, P. 18
66. Schroeder, C.M., Zhao, C., Debroy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D.D., Mcdermott, P.F., Walker, R.D., Meng, J. (2002), “Antimicrobial Resistance Of Escherichia Coli O157 Isolated From Humans, Cattle, Swine, And Food”, *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 2, Pp. 576–581.
67. Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W. (2010), “Editorial: Assessing The Antimicrobial Susceptibility Of Bacteria Obtained From Animals”, *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 65, No. 4, Pp. 601–604.
68. Sigirci, B.D., Celik, B., Halac, B., Adiguzel, M.C., Kekec, I., Metiner, K., Ikiz, S., Bagcigil, A.F., Ozgur, N.Y., Ak, S. And Kahraman, B.B. (2019): Antimicrobial Resistance Profiles Of Escherichia Coli Isolated From Companion Birds. *J King Saud Univ Sci.*, Article In Press.

69. Silva, N., Igrejas, G., Figueiredo, N., Goncalves, A., Radhouani, H., Rodrigues, J., Et Al. (2010). Molecular Characterization Of Antimicrobial Resistance In Enterococci And Escherichia Coli Isolates From European Wild Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*). *Sci. Total Environ.* 408, 4871–4876. Doi: 10.1016/J.Scitotenv.2010.06.046
70. Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Rodrigues, T., Goncalves, A., Felgar, A. C., Et Al. (2011a). Molecular Characterization Of Vancomycin-Resistant Enterococci And Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Containing Escherichia Coli Isolates In Wild Birds From The Azores Archipelago. *Avian Pathol.* 40, 473–479. Doi: 10.1080/03079457.2011.599061
71. Sköld, O. (2000), “Sulfonamide Resistance: Mechanisms And Trends”, *Drug Resistance Updates*, Vol. 3, No. 3, Pp. 155-160.
72. Sköld, O. (2001), “Resistance To Trimethoprim And Sulfonamides”, *Veterinary Research*, Vol. 32, Pp. 261–273.
73. Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Et Al. (2006). Effect Of Human Vicinity On Antimicrobial Resistance And Integrons In Animal Faecal Escherichia Coli. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1215–1219. Doi: 10.1093/Jac/Dkl122
74. Smith, P. (2008). Antimicrobial Resistance In Aquaculture. *Rev. Sci. Tech.* 27, 243–264.
75. Sousa, M., Torres, C., Barros, J., Somalo, S., Igrejas, G., And Poeta, P. (2011). Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) As Carriers Of Shv-12 And Tem-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Containing Escherichia Coli Isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 1139–1141. Doi: 10.1089/Fpd.2011.0866
76. Sunde, M., Norström, M. (2005), “The Genetic Background For Streptomycin Resistance In Escherichia Coli Influences The Distribution Of Mics”, *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 56, No. 1, Pp. 87–90.
77. Thaller, M. C., Migliore, L., Marquez, C., Tapia, W., Cedeno, V., Rossolini, G. M., Et Al. (2010). Tracking Acquired Antibiotic Resistance In Commensal Bacteria Of Galapagos Land Iguanas: No Man, No Resistance. *Plos One* 5:E8989. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0008989
78. Thomas L. Lemke, David A. Williams, Ur. (2002). *Foye's Principles Of Medicinal Chemistry* (5 Izd.). Baltimore: Lippincott Willams & Wilkins. Str. 852-3. Isbn 0-7817-4443-1.
79. Thorsteinsdottir, T.R., Haraldsson, G., Fridriksdottir, V., Kristinsson, K.G., Gunnarsson, E. (2008), “Prevalence And Genetic Relatedness Of Antimicrobial-Resistant Escherichia Coli Isolated From Animals, Foods And Humans In Iceland”, *Zoonoses And Public Health*, Vol.57, No. 3, Pp. 189–196.
80. Thorsteinsdottir, T.R., Haraldsson, G., Fridriksdottir, V., Kristinsson, K.G., Gunnarsson, E. (2008), “Prevalence And Genetic Relatedness Of Antimicrobial-

Resistant *Escherichia Coli* Isolated From Animals, Foods And Humans In Iceland”, *Zoonoses And Public Health*, Vol. 57, No. 3, Pp. 189–196.

81. Van Den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology Of Resistance To Antibiotics. Links Between Animals And Humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 327–335
82. Velhner Maja, Jelena, P., Igor, S., Radomir, R., Dragica, S. (2010), “Mehanizmi Prenošenja Rezistencije Kod Bakterija”, *Arhiv Veterinarske Medicine*, Vol. 3, No. 1, Pp. 85–92.
83. Velhner, M., Kozoderović, G., Milanov, D., Todorović, D., Suvajdžić, Lj. (2014), “World Wide Spread Of *Salmonella Enterica* Serotypes, Harboring Different Mechanisms Of Resistance”, *Proceedings, Ii International Congress Food Technology, Quality And Safety, Xvi International Symposium Feed Technology*, Novi Sad, 18-20.10.2014, Editors Tea Brlek, Milica, Pojić, Novi Sad, Institute Of Food Technology, Pp. 593–597
84. World Health Organisation. (2011). *Tackling Antibiotic Resistance From A Food Safety Perspective In Europe*. World Health Organisation, 1–88.
85. World Health Organization (Who). (2014). *Global Report On Surveillance*. Geneva, Switzerland: Who Press. Retrieved From [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf;jsessionid=E748f6cb85fb55891f79fa5aab5e7296?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=E748f6cb85fb55891f79fa5aab5e7296?sequence=1)
86. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. E. W. (2008). Agar And Broth Dilution Methods To Determine The Minimal Inhibitory Concentration (Mic) Of Antimicrobial Substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–75.
87. Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., Mcdermott, P., Walker, R., Meng, J. (2004), “Characterization Of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia Coli* Isolates From Diseased Chickens And Swine In China”, *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 8, Pp. 3483–3489.
88. Yue, L., Jiang, H.X., Liao, X.P., Liu, J.H., Li, S.J., Chen, X.Y., Chen, C.X., Lu, D.H., Liu, Y.H. (2008), “Prevalence Of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance *Qnr* Genes In Poultry And Swine Clinical Isolates Of *Escherichia Coli*”, *Veterinary Microbiology*, Vol. 132, No. 3–4, Pp. 414–420.
89. Zhang, H., Zhou, Y., Guo, S., And Chang, W. (2015): Multidrug Resistance Found In Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* From Rural Water Reservoirs In Guantao, China. *Front Microbiol.*, 6: 267.
90. Zurfluh, K., Albin, S., Mattmann, P., Kindle, P., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R. And Vogler, B.R. (2019): Antimicrobial Resistant And Extended-Spectrum B-Lactamase Producing *Escherichia Coli* In Common Wild Bird Species In Switzerland. *Microbiology Open*, E845.