Antimikrobna osjetljivost bakterija roda Enterococcus spp. izdvojenih iz ptica kućnih ljubimaca

Marciuš, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:166312

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Petra Marciuš

ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST BAKTERIJA RODA *ENTEROCOCCUS SPP*. IZDVOJENIH IZ PTICA KUĆNIH LJUBIMACA

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Zavod za bolesti peradi s klinikom
Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: doc. dr. sc. Željko Gottstein

Mentor: izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Željko Gottstein
2. doc. dr. sc. Maja Lukač
3. izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
4. izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš, zamjena

ZAHVALE

Posebno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Horvatek Tomić na stručnom vodstvu i uloženom trudu i vremenu pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za bolesti peradi s klinikom na uloženom trudu i radu prilikom provedbe istraživanja.

I na kraju, najveće zahvale mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na neizmjernoj podršci i razumijevanju tijekom svih ovih godina.

Popis slika:

Slika 1. Mikroskopski prikaz E. faecalis

(Izvor: https://microbecanvas.com/Bacteria.php?p=1241)

Slika 2. Disk difuzijska metoda (Izvor: https://i1.wp.com/microbeonline.com/wp-content/uploads/2013/08/Kirby-Bauer-Disc-Diffusion-Method.png?ssl=1)

Slika 3. Bakterije vrste E. faecalis na Brilliance UTi Clarity agar

Slika 4. Disk difuzijski postupak, E. faecalis (izolat br. 2.)

Popis tablica:

Tablica 1. Mehanizmi rezistencije bakterija na najčešće upotrebljavane antibiotike (OPAL i sur., 2000.).

Tablica 2. Porijeklo bakterija roda *Enterococcus* i vrste enterokoka korištene u istraživanju (MOHENSKI, 2020.).

Tablica 3. Popis korištenih antimikrobnih tvari u disk difuzijskom postupku (prema SOODMAND i sur., 2018.).

Tablica 4. Zone inhibicije za korištene antimikrobne tvari.

Tablica 5. Osjetljivost izolata enterokoka na 12 antimikrobnih tvari disk difuzijskim postupkom (n=5).

Tablica 6. Skupni prikaz osjetljivosti i rezistencije enterokoka (n=5).

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 2
2.1. Bakterije roda *Enterococcus* 2
2.2. Antimikrobna osjetljivost bakterija 4
2.3. Metode određivanja osjetljivosti 6
2.3.1. Kvalitativne metode 6
2.3.2. Kvantitativne metode 7
2.4. Rezistencija bakterija roda *Enterococcus* 8
3. MATERIJALI I METODE 12
3.1. Bakterije roda *Enterococcus* spp. 12
3.2. Određivanje antimikrobne osjetljivosti bakterija roda *Enterococcus* 13
4. REZULTATI 15
5. RASPRAVA 18
6. ZAKLJUČCI 20
7. LITERATURA 21
8. SAŽETAK 27
9. SUMMARY 28
10. ŽIVOTOPIS 29

1. UVOD

Ljudska i životinjska populacija, kao i okoliš, međusobno su povezani te može doći do prekida prethodno povučene linije koja je razlikovala ljudske bolesti od životinjskih (CHOMEL, 1998.). Pojava emergentnih i reemergentnih patogena je u porastu kao i pojava multirezistentnih bakterija, tj. onih bakterija otpornih na više lijekova (WOOLHOUSE, 2002.; BENGIS i sur., 2004.). Razvoj antimikrobne rezistencije je pitanje koje zabrinjava u humanoj, ali i u veterinarskoj medicini. Brojni su čimbenici koji su povezani s povećanim razvojem antimikrobne rezistencije među bakterijama. Povećana patogenost i otpornost na antibiotike može proizaći iz genetske promjene među sojevima bakterija (O'BRIEN, 2002.). Promjene domaćina, zdravlja populacije i ekologije također utječu na interakcije s potencijalnim patogenima (WOOLHOUSE, 2002.). Česta empirijska antibiotska terapija ljudi, dodavanje antibiotika kao promotora rasta u stočnoj hrani i općenita zlouporaba antibiotika uključeni su u selektivnu proliferaciju rezistentnih sojeva (PANTOSTI i sur., 1999.; DEL GROSSO i sur., 2000.; MATEU i MARTIN, 2001.; O'BRIEN, 2002.; HERSHBERGER i sur., 2005.)

Bakterije roda *Enterococcus* spp. pripadnici su gastrointestinalne mikroflore ljudi i životinja, a smatraju se oportunističkim patogenima koji su uglavnom odgovorni za bolničke infekcije kod ljudi i mnoge vrste infekcija kod životinja, poput mastitisa kod goveda, proljeva kod svinja i goveda i septikemije kod peradi (FRYE i sur., 2006.; JACKSON i sur., 2011.; LARSSON i sur., 2014.; NOWAKIEWICZ i sur., 2016.; WU i sur., 2016.). Te su bakterije posebno zabrinjavajuće u humanoj i veterinarskoj medicini jer neki sojevi imaju osobine konstitutivne antimikrobne rezistencije, a drugi nose osobine inducibilne otpornosti (EISNER i sur., 2005.). Također, enterokoki mogu prenijeti gene antimikrobne rezistencije drugim bakterijskim vrstama, uključujući patogene (MOUBARECK i sur., 2003.; LESTER i sur., 2006.).

Istraživanja osjetljivosti na antimikrobne pripravke bakterija roda *Enterococcus* rijetko se provode u Republici Hrvatskoj te je cilj ovog istraživanja odrediti u kojoj mjeri su bakterije *Enterococcus* spp., izdvojene iz ptica kućnih ljubimaca, osjetljive na antimikrobne tvari.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Bakterije roda *Enterococcus*

Bakterije iz roda *Enterococcus* (*E.*) su nepokretni, Gram pozitivni, katalaza negativni mikroorganizmi kokoidnoga oblika (MORISHITA, 2019.) (Slika 1.). Enterokoki se ne smatraju izrazito virulentnim bakterijama. Poznato je, da su otporni na niz faktora iz okoline. Preživljavaju u mediju s visokom koncentracijom soli i pH, otporni su na žučne soli, detergente, etanol i teške metale. Termorezistentni su, preživljavaju temperature od 60 °C čak 30 minuta, a rastu u temperaturnom rasponu od 10 do 45 °C. Navedene činjenice, uz nekoliko značajnih enzima i polisaharidnu kapsulu, omogućavaju enterokokima preživljavanje u nepovoljnom okolišu, izvan organizma domaćina, kao i u njemu, te pridonose otpornosti prema imunološkom odgovoru (BILLSTRÖM, 2008.; FISHER i PHILLIPS, 2009.).

Za dokaz bakterija iz roda *Enterococcus* potrebno je uzeti uzorke za bakteriološku pretragu. Mogu se uzeti obrisci kljuna, ždrijela, voljke, oka, uha, kože i kloake ili se uzima uzorak izmeta. Uzeti uzorci nanose se na hranjive podloge i inkubiraju 24 – 48h na temperaturi od 37°C. Uzorci se mogu nacijepiti na krvni agar, Mueller Hinton agar, Mac Conkey i Sabouraud agar (DEVRIESE i sur. 2007.; MLADENOV i POPOVA, 2020.). Selektivna izolacija bakterija roda *Enterococcus* moguća je na Slanetz & Bartley agaru (DEVRIESE i sur., 2007.).

Enterokoki (rod *Enterococcus*) pripadaju gastrointestinalnoj flori i široko su rasprostranjeni u okolišu, poput kopnenih i vodenih staništa. Enterokoki se najčešće koriste kao indikatorske fekalne bakterije (FIB) ili opći pokazatelji fekalne kontaminacije. Pojava gena površinskih proteina enterokoka u okolišu nepouzdan je pokazatelj ljudske fekalne kontaminacije. Kao stanovnici probavnog trakta, enterokoki donose brojne koristi, poput probiotičke aktivnosti i stvaranja bakteriocina (BYAPPANAHALLI i sur., 2012.).

Za čovjeka su najznačajnije dvije vrste, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* koji čine dio fiziološke mikrobiote crijeva, usne šupljine i ženskog spolovila. Prepoznati su kao oportunistički patogeni, mogući uzročnici endokarditisa, septikemije, infekcija povezanih s intravaskularnim kateterima, abdominalnih infekcija te infekcija mokraćnog sustava (IMS). Vrste *E. faecalis* i *E. faecium* smatraju se sekundarnim uropatogenima koji rijetko uzrokuju nekomplicirane, ali su čest uzrok kompliciranih IMS-a stečenih za vrijeme zdravstvene skrbi (BILLSTRÖM, 2008.; FISHER i PHILLIPS, 2009.).

Najčešće patogene vrste iz roda *Enterococcus* koje možemo izdvojiti iz ptica kućnih ljubimaca su *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. faecium* i *E. durans* (GERLACH, 1994.; MORISHITA, 2019.), dok se kod peradi još mogu izolirati i *E. cecorum* i *E. hirae*.

Patogenost ovih bakterija je niska za ptice te su za nastanak infekcije ključni predisponirajući faktori. Prirodna infekcija nastaje oralnim putem i najčešća je u tek izleženih i mladih jedinki (GERLACH, 1994.).

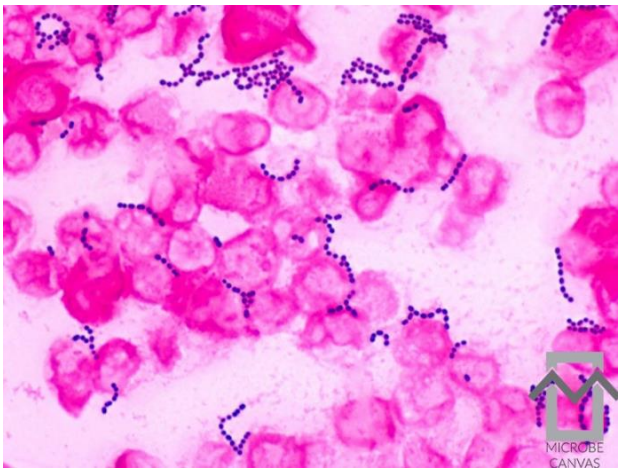
Ove bakterije u ptica mogu uzrokovati akutnu septikemijsku ili subakutnu do kroničnu bolest. Akutni oblik češće se javlja u mladih ptica, a kao posljedica se često razvija endokarditis. S obzirom da je moguć prijenos jajima, povezuje se s pojavom septikemije koja se javlja nakon valenja. Bolest se također može očitovati pojavom subakutnog do kroničnog traheitisa, dispnejom i hropcima. U kanarinaca se ne smatra autohtonom mikroflorom, stoga kod njih može uzrokovati primarnu respiratornu bolest te će se u tim slučajevima razviti traheitis i promjene u glasanju, a može doći i do gubitka glasa (GERLACH, 1994.).

Vrsta *E. cecorum* uglavnom je povezana s artritisom, spondilitisom, osteomijelitisom, spondilolistezom i nekrozom glave femura u jatima tovnih pilića (DEVRIESE i sur., 2002.; DE HERDT i sur., 2008.; STALKER i sur., 2010.; MAKRAI i sur., 2011; SZELESZCZUK i sur., 2013.).

Vrsta *E. faecalis* povezana je s endokarditisom kod pilića, jetrenim granulomima kod purana, ascitesom kod kokoši, te plućnom hipertenzijom (TANKSON i sur., 2001.) i amiloidnom artropatijom sa sistemskom amiloidozom u tovnih pilića (STEENTJES i sur., 2002.).

Vrsta *E. durans* pronađena je u mladih pilića s bakterijemijom i encefalomalacijom (ABE i sur., 2006.).

Vrsta *E. hirae* zabilježena je u slučajevima fokalne nekroze mozga kod mladih pilića i kod tovnih pilića s osteomijelitisom i endokarditisom (KOLBJØRNSEN i sur., 2011.; VELKERS i sur., 2011.).



Slika 1. Mikroskopski prikaz *E. faecalis* (Izvor: https://microbecanvas.com/Bacteria.php?p=1241)

2.2. Antimikrobna osjetljivost bakterija

Početak antibiotske ere 1940- ih označio je pravu revoluciju u medicini, zahvaljujući kojoj su, do tada smrtonosne bakterijske infekcije, postale izlječive. Ubrzo nakon početka liječenja antibioticima pojavili su se i prvi mikroorganizmi koji su postali rezistentni na njih. Danas, rezistencija na antibiotike predstavlja jedan od najvećih problema čovječanstva (WHO, 2011.).

U mnogim zemljama godišnja upotreba antibiotika u veterinarskoj medicini višestruko premašuje upotrebu antibiotika u humanoj medicini. Kao posljedica metafilakse i profilakse u veterinarskoj medicini, čak i zdrave životinje kontinuirano su izložene velikim količinama antibiotika. Mikroorganizmi koji su porijeklom od životinja na taj su način izloženi selektivnom pritisku koji dovodi do preživljavanja samo onih bakterija koje su rezistentne na antibiotike (WHO, 2011.).

Rezistencija na antibiotike može biti urođena ili stečena. Urođena rezistencija predstavlja nasljednu odliku vrste ili roda i nema značajnu ulogu u diseminaciji rezistencije među populacijama mikroorganizama. Stečena rezistencija na antibiotike specifična je samo za pojedine sojeve u okviru inače osjetljive vrste ili roda i može nastati uslijed mutacija na postojećim genima ili uslijed stjecanja novih gena putem lateralnog transfera (AMMOR i sur., 2007.).

Rezistencija bakterija na antibiotike nastaje na nekoliko načina: malim promjenama u genomu, tzv. točkastim mutacijama - promjenama na jednom paru baza u DNK (tako npr. nastaju geni za β-laktamaze proširenog spektra u genima za "stare" β-laktamaze); velikim promjenama u genomu, odnosno preinakama velikih dijelova genoma - najčešće umetanjem ili

gubitkom transpozona ili insercijskih sljedova kao jednim događajem; te unosom izvanjske DNK (procesima konjugacije, transformacije, transdukcije ili transpozicije). Prva dva mehanizma su ograničena na jednu bakterijsku stanicu, ali nakon nastanka gena rezistencije može se širiti vertikalno - dijeljenjem bakterija (klonalno širenje) ili horizontalno - od jedne bakterije na drugu, na način prijenosa izvanjske DNK. Takvo horizontalno širenje gena rezistencije moguće je ne samo unutar iste bakterijske vrste nego i istoga roda, ali i sasvim različitih rodova. Rezistencija bakterija na antibiotike važna je evolucijska prednost za bakteriju, te se tako dalje u prirodi šire rezistentni klonovi (OPAL i sur., 2000.; MARTINEZ i BAQUERO, 2000.) (Tablica 1.).

Tablica 1. Mehanizmi rezistencije bakterija na najčešće upotrebljavane antibiotike (OPAL i sur., 2000.).

Mehanizam rezistencije	**Antibiotik**								
	β-lak	AG	klo	mak	link	kotr	tet	kin	van
Enzimi koji razaraju ili modificiraju antibiotik	O	O	P	P	-	-	-	-	-
Nepropusnost membrane	K	K	P	-	-	K	O	-	K
Efluks	-	-	-	K	K	-	O	K	-
Promjena ciljnog mjesta na ribosomu	-	K	K	O	O	-	O	-	-
Promjena prekursora stanične stijenke	-	-	-	-	-	-	-	-	O
Promjena ciljnog enzima	K	-	-	-	-	O	-	K	-
Hiperprodukcija ciljnog enzima	-	-	-	-	-	K	-	-	-
Auksotrofi koji preskaču inhibirani korak u metabolizmu	-	-	-	-	-	O	-	-	-

β-lak = beta-laktamski antibiotik; AG = aminoglikozid; klo = kloramfenikol; mak = makrolid; link = linkozadim; kotr = sulfametoksazol -trimetoprim; tet = tetraciklin; kin = kinolon; van = vankomicin;
O = gen rezistencije smješten na kromosomu i plazmidu; P = gen rezistencije smješten na plazmidu; K = gen rezistencije smješten na kromosomu

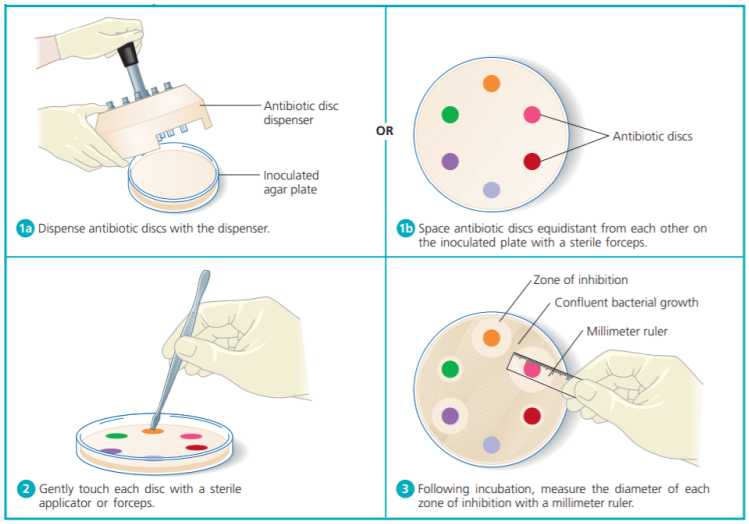
2.3. Metode određivanja osjetljivosti

Laboratorijske metode kao disk difuzijski postupak, mikrodilucija, metoda dilucije agara i Epsilometer-test (E-test) zadužene su za otkrivanje osjetljivosti bakterija na niz antibiotika (GAUDREAU i GILBERT, 1997.; ENGBERG i sur., 1999.; GE i sur., 2002.; LUBER i sur., 2003.; ONCUL i sur., 2003.).

2.3.1. Kvalitativne metode

Najčešće korištena kvalitativna metodu za određivanje rezistencije kod mikroorganizama je disk difuzijska metoda (Slika 2.). Disk difuzijska metoda je postupak kojim se određuje osjetljivost bakterija prema antibioticima i kemoterapeuticimaa, a na temelju dobivenih rezultata odabire se najdjelotvorniji antimikrobni pripravak za liječenje bakterijske infekcije (NAGLIĆ i sur., 1992.).

Disk difuzijska metoda izvodi se tako što se na odgovarajuću hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici nanosi inokulum koji sadrži približno 1-2×10^8 log CFU/mL ispitujućeg mikroorganizma, a zatim se na nju stavljaju papirni diskovi koji su impregnirani fiksnom koncentracijom antibiotika. Rezultati se očitavaju poslije 16–24h, mjerenjem zone inhibicije rasta ispitivanog mikroorganizma (FERRARO i JORGENSEN , 2009.).



Slika 2. Disk difuzijska metoda (Izvor: https://i1.wp.com/microbeonline.com/wp-content/uploads/2013/08/Kirby-Bauer-Disc-Diffusion-Method.png?ssl=1)

2.3.2. Kvantitativne metode

Kvantitativne metode se baziraju na određivanju minimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika (Minimal Inhibitory Concentration – MIC) (EFSA, 2007.; EFSA, 2008.; EFSA, 2012.). Minimalna inhibitorna koncentracija predstavlja najnižu koncentraciju antibiotika koja ima mogućnost inhibiranja rasta mikroorganizma pri točno definiranim uvjetima (WIEGAND i sur., 2008.). Postoji više metoda za određivanje MIC vrijednosti, poput metoda dilucije agara, metoda dilucije u bujonu, upotreba E-testova i u novije vrijeme automatiziranih instrumentalnih sistema (FERRARO i JORGENSEN, 2009.).

Kod metode dilucije agara, određena koncentracija antibiotika dodaje se direktno u agar, a zatim se na njegovu površinu nasadi ispitivani mikroorganizam. Rezultati se očitavaju na osnovu prisustva ili odsustva rasta mikroorganizma na površini agara poslije završene inkubacije (WIEGAND i sur., 2008.).

Kod metoda dilucije u bujonu koriste se tekuće podloge s dodatkom antibiotika u točno određenoj koncentraciji za određivanje prisustva rezistencije.

Metoda makrodilucije se izvodi u epruvetama, a zapremnina bujona u kojeg su dodani ispitujući mikroorganizam i antibiotik treba biti veća od 2 mL. Makrodilucijska metoda prva je metoda koja je razvijena za određivanje MIC vrijednosti, ali se danas rijetko koristi jer je zahtjevnija i skuplja od mikrodilucijske metode (FERRARO i JORGENSEN, 2009.).

Mikrodilucijska metoda za određivanje MIC vrijednosti podrazumijeva upotrebu mikrotitracijskih pločica, pri čemu ukupna zapremina u jažici pločice ne prelazi zapreminu od 500 µL (WIEGAND i sur., 2008.). Standardne mikrotitracijske pločice imaju veličinu 8×12 jažica, pa se na jednoj pločici može ispitivati 8 antibiotika u 12 koncentracija ili 12 antibiotika u 8 koncentracija. Koncentracije antibiotika koje se nalaze u epruveti ili mikrotitracijskoj pločici su obično u nizu dvostrukih razrjeđenja (npr. 1, 2, 4, 8 µg antibiotika/mL podloge). Koncentracije antibiotika koje se unose u jažice mikrotitracijskih pločica propisane su standardom ili odgovarajućim vodičem (FERRARO i JORGENSEN, 2009.).

Rezultati kod makrodilucijske metode se tumače na osnovu zamućenja bujona, a kod mikrodilucijske na osnovu prisustva ili odsustva sedimenta u mikrotitracijskoj ploči. Najmanja koncentracija antibiotika pri kojoj nema vidljivog zamućenja, odnosno stvaranja taloga, predstavlja MIC vrijednost za ispitivani izolat (FERRARO i JORGENSEN, 2009.).

E-testovi predstavljaju tanke plastične trake na čijoj je poleđini antibiotik nanesen u rastućim koncentracijama. Na gornjem djelu trake nalazi se skala s brojevima koji označavaju koncentracije antibiotika. E-testovi stavljaju se na površinu odgovarajućeg agara koji je

prethodno inokuliran ispitujućim mikroorganizmom. MIC vrijednosti s E-testa očitavaju se na mjestu presjeka trake sa zonom inhibicije rasta (FERRARO i JORGENSEN, 2009.).

U novije vrijeme razvijene su poluautomatizirane i automatizirane metode za određivanje MIC vrijednosti, poput MicroScan WalkAway (Siemens Healthcare Diagnostics), BD Phoenix Automated Microbiology Diagnostics (BD Diagnostics), Vitek 2 System (bioMerieux) i Sensititre Aris 2X (Trek Diagnostic Systems). Automatizirane metode omogućuju brzo dobivanje i očitavanje rezultata (FERRARO i JORGENSEN, 2009.).

2.4. Rezistencija bakterija roda *Enterococcus*

Enterokoki su, kao dio fiziološke mikroflore probavnog sustava, često izloženi djelovanju različitih antibiotika koji se koriste za liječenje infekcija prouzročenih nekim drugim bakterijama. Takvo nenamjerno izlaganje enterokoka antibioticima rezultira selekcijom sojeva otpornih na pojedine antibiotike. Stečena rezistencija kod enterokoka može biti posljedica mutacija već postojećih gena ili stjecanja novog genetskog materijala. Horizontalni prijenos gena između enterokoka, ali i drugih bakterijskih vrsta, posredovan je plazmidima i transposonima (KRISTICH i sur., 2014.).

Rezistencija enterokoka na antimikrobne lijekove može biti urođena i stečena (HOLLENBECK i RICE, 2012.).

Urođena otpornost na antimikrobne lijekove karakteristika je pojedine vrste i prisutna je u svih ili većine sojeva te vrste, a temelji se na specifičnim osobinama same vrste (ŠEOL i sur., 2010.). Geni odgovorni za urođenu rezistenciju smješteni su na bakterijskom kromosomu.

Stečena otpornost specifična je karakteristika pojedinog soja, a posljedica je mutacija postojećih gena ili stjecanja novih gena odgovornih za rezistenciju (MURRAY, 1990.). Za razliku od urođene, stečena rezistencija se pojavljuje samo u nekih sojeva unutar vrste.

Enterokoki su urođeno rezistentni na cefalosporine, klindamicin i kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola, a smanjene su osjetljivosti (nizak stupanj rezistencije) na penicilin i ampicilin te aminoglikozide (KRISTICH i sur., 2014.).

A) Beta-laktamski antibiotici

U β-laktamske antibiotike ubrajamo peniciline i cefalosporine, a njihovo djelovanje temelji se na inhibiciji sinteze stanične stjenke tako što se vežu, pa time i koče djelovanje enzima koji sudjeluju u završnoj fazi sinteze stanične stjenke. Ti enzimi poznati su kao proteini

koji vežu peniciline (engl. *Penicillin Binding Proteins*, PBP). Za enterokoke je specifično da sintetiziraju molekule PBP5 niskog afiniteta za β-laktamske antibiotike te zbog slabe prijemljivosti na njih bakterija može preživjeti primjenu antibiotika (MILLER i sur., 2014.). Iz tog su razloga, doze β-laktamskih antibiotika za liječenje infekcija prouzročenih enterokokima značajno više od doza istih antibiotika koji se koriste za liječenje streptokoknih i drugih infekcija prouzročenim srodnim Gram-pozitivnim bakterijama (MURRAY, 1990.; HOLLENBECK i RICE, 2012.).

Svi enterokoki urođeno imaju niski stupanj rezistencije na penicilin i ampicilin, ali su rezistentni na djelovanje gotovo svih polusintetskih penicilina i cefalosporina (KRISTICH i sur., 2014.). Niski stupanj rezistencije na penicilin i ampicilin iskazuje se kao tolerancija na baktericidno djelovanje penicilina. Tolerancija znači da uobičajenim dozama penicilina nećemo postići baktericidni učinak nego samo inhibicijski. Baktericidni učinak postiže se znatno višim dozama od propisanih za većinu bakterija osjetljivih na β-laktame (HOLLENBECK i RICE, 2012.). Spomenutu toleranciju enterokoka možemo uspješno zaobići primjenom kombinacije penicilina i aminoglikozida. Penicilin će kao β-laktamski antibiotik dovoljno naštetiti sintezi stanične stjenke da omogući ulazak aminoglikozida u bakterijsku stanicu koji će potom inhibirati sintezu proteina i tako prouzročiti smrt bakterijske stanice (ZIMMERMANN i sur., 1971.).

B) Glikopeptidi

Glikopeptidni antibiotici (vankomicin, teikoplanin) su antibiotici baktericidnog djelovanja na većinu Gram-pozitivnih bakterija. Njihovo djelovanje temelji se na inhibiciji sinteze peptidoglikana, a najčešće se upotrebljavaju u liječenju bolničkih infekcija prouzročenih rezistentnim i multirezistentnim Gram-pozitivnim bakterijama (ŠEOL i sur., 2010.; KRISTICH i sur., 2014.). Sve češća uporaba vankomicina rezultirala je rezistencijom koja je kod enterokoka prvi put opisana 1988. godine i od tada je broj vankomicin-rezistentnih izolata enterokoka (VRE) u porastu. Pojava je zabrinjavajuća jer je izbor antibiotika za liječenje infekcija prouzročenih VRE-izolatima vrlo malen, a dokazan je i prijenos rezistencije s VRE-izolata na druge bakterijske vrste, kao što je primjerice MRSA. Antibiotici novijih generacija, kvinupristin/dalfopristin, linezolid, daptomicin, tigeciklin, koji djeluju na većinu VRE-izolata, malo su poboljšali situaciju, ali rezistencija na svaki od spomenutih antibiotika sve je češća. Rezistencija na vankomicin pojavljuje se većinom kod vrste *E. faecium*, ali opisana je i u vrste *E. faecalis* (HOLLENBECK i RICE, 2012.).

Mehanizam rezistencije na vankomicin temelji se na promjenama ciljnog mjesta vezanja ovog antibiotika, a dosad je kod enterokoka opisano devet skupina gena odgovornih za rezistenciju na vankomicin: vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM i vanN (MILLER i sur., 2014.).

C) Aminoglikozidi

Aminoglikozidi su antibiotici koji remete sintezu bakterijskih proteina djelujući na bakterijske ribosome, a da bi iskazali svoje djelovanje moraju prodrijeti u bakterijsku stanicu (ŠEOL i sur., 2010.). Enterokoki urođeno očituju niski stupanj rezistencije na sve aminoglikozide, tj. otporni su na koncentracije aminoglikozida koje je moguće postići u tkivu (KRISTICH i sur., 2014.). Ova je pojava posljedica smanjenog unosa antibiotika u bakterijsku stanicu što je vjerojatno rezultat fakultativno anaerobnog metabolizma enterokoka. Vrsta *E. faecium* posjeduje još jedan mehanizam urođene rezistencije temeljen na enzimskoj modifikaciji aminoglikozida. Na kromosomu vrste *E. faecium* nalazi se gen odgovoran za sintezu enzima acetiltransferaze (AAC(6′)-Ii) koji može inaktivirati tobramicin, sisomicin, kanamicin i netilmicin (Costa i sur., 1993.). Također, *E. faecium* ima sposobnost promjene ciljnog mjesta na ribosomu pomoću rRNA metiltransferaze što ga čini otpornim na kanamicin i tobramicin (GALIMAND i sur., 2011.).

Na enterokoke mogu djelovati samo dva aminoglikozida, gentamicin i streptomicin (MILLER i sur., 2014.), ali potrebno ih je primijeniti zajedno s antibioticima koji remete sintezu stanične stjenke kao što su β-laktamski antibiotici.

D) Makrolidi, linkozamidi i streptogramini

Makrolidi, linkozamidi i streptogramini imaju sličan mehanizam djelovanja na osjetljive bakterije remeteći funkciju ribosoma čime inhibiraju sintezu bakterijskih proteina (ŠEOL i sur., 2010.).

Vrsta *E. faecalis* urođeno je rezistentna na streptogramin A pa time i na kombinaciju kvinupristin/ dalfopristin (SINGH i sur., 2002.).

Također, *E. faecium* je osjetljiv na kombinaciju antibiotika kvinupristin/dalfopristin, ali je smanjene osjetljivosti na makrolide. Slabije djelovanje makrolida na vrstu *E. faecium* posljedica je djelovanja efluks pumpe koju kodira u te vrste urođeno prisutan gen msrC (PORTILLO i sur., 2000.). Osim toga, u većine sojeva vrste *E. faecium* prisutan je gen *erm*B pa se cijela vrsta

smatra rezistentnom na makrolide i linkozamide. Taj gen kodira enzim eritromicin metilazu koji prouzroči promjenu ciljnog mjesta na ribosomu. To ciljno mjesto zajedničko je za makrolide, linkozamide i streptogramin B pa je posljedica djelovanja ovog enzima križna rezistencija na navedene antibiotike poznata pod nazivom MLS_B fenotip. Ovakav fenotip javlja se u dva oblika. Prva je inducibilna rezistencija, što znači da je eritromicin metilaza aktivna tek u prisutnosti induktora, a to su makrolidi (ponajprije eritromicin). Drugi oblik je konstitutivna rezistencija koja je znatno višeg stupnja i prisutna je bez djelovanja induktora. Rezistencija posredovana genom *erm*B kod enterokoka uglavnom je inducibilna što znači da su sojevi koji posjeduju ovaj gen rezistentni na makrolide *in vitro*, a vrlo često osjetljivi na linkozamide. Nakon izlaganja makrolidima, koji su snažni induktori sinteze i aktivacije eritromicin metilaze, enterokoki postaju rezistentni i na linkozamide te na streptogramin B. Osim toga, ni uporaba linkozamida u liječenju infekcija prouzročenih sojevima enterokoka osjetljivim *in vitro*, nije preporučljiva zbog velikog rizika selekcije sojeva s konstitutivnim mehanizmom rezistencije zbog čega će liječenje biti neučinkovito (LECLERCQ i COURVALIN, 2002.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterije roda *Enterococcus* spp.

U razdoblju od veljače do listopada 2020. godine u Klinici Zavoda za bolesti peradi pregledane su ukupno 392 ptice različitih vrsta, spola i dobi, prilikom čega su, ovisno o kliničkim znakovima, uzeti uzorci za bakteriološku pretragu (ukupno 184 različitih uzoraka).

Nakon nacjepljivanja uzoraka na Brilliance UTi Clarity agar (Oxoid, Velika Britanija), porasle bakterije su identificirane metodom MALDI TOF MS kako bi se enterokoki identificirali do razine vrste (Tablica 2.).

Tablica 2. Porijeklo bakterija roda *Enterococcus* i vrste enterokoka korištene u istraživanju (MOHENSKI, 2020.).

Broj izolata	Vrsta ptice	Vrsta uzorka	Nalaz bakterija roda *Enterococcus*
1	Edel (*E. roratus*), mužjak, dob 9 godina	Skupni uzorak izmeta	*E. faecium* / *E. hirae*
2	Afrička siva papiga (*P. erithacus erithacus*), nepoznatog spola, dobi 2 godine	Obrisak kloake	*E. faecalis*
3	Australska papigica tigrica (*M. undulatus*), nepoznatog spola, dobi 6 tjedana	Obrisak kloake	*E. faecalis*
4	Afrička siva papiga (*P. erithacus erithacus)*, nepoznatog spola, dobi 5 mjeseci	Obrisak ždrijela	*E. faecalis*
5	Modrožuta ara (*A. ararauna*), nepoznatog spola, dobi 5 mjeseci	Skupni uzorak izmeta	*E. faecalis*



Slika 3. Bakterije vrste *E. faecalis* na Brilliance UTi Clarity agar

3.2. Određivanje antimikrobne osjetljivosti bakterija roda *Enterococcus*

Iz kulture bakterijskih stanica napravljena je suspenzija enterokoka u 5 ml fiziološke otopine NaCl-a sa gustoćom od 0.5 McFarland-a. Suspenzija je potom sterilnim štapićem, povlačeći zavojitim potezima u tri različita smjera, nacijepljena na Mueller-Hinton agar (Oxoid, Velika Britanija). Nakon sušenja na površinu agara dodani su diskovi s antimikrobnim tvarima (Tablica 3.). Petrijeve zdjelice su inkubirane pri 37° C kroz 24 sata, nakon čega su očitane zone inhibicije rasta u mm (Tablica 4.).

Tablica 3. Popis korištenih antimikrobnih tvari u disk difuzijskom postupku (prema SOODMAND i sur., 2018.).

Antimikrobna tvar	**Koncentracija**	**Proizvođač**
Amoksicilin	10 µg	Oxoid
Cefaleksin	30 µg	MAST
Doksiciklin	30 µg	Oxoid
Enrofloksacin	5 µg	Oxoid
Flumekvin	30 µg	Oxoid
Gentamicin	10 µg	MAST
Marbofloksacin	5 µg	MAST
Oksitetraciklin	30 µg	Oxoid
Penicilin G	1 i.j.	MAST
Streptomicin	30 µg	MAST
Tilozin	30 µg	MAST
Trimetoprim/sulfametoksazol	25 µg	Oxoid

Tablica 4. Zone inhibicije za korištene antimikrobne tvari.

Antimikrobna tvar	**Zona inhibicije (u mm)**		
	Osjetljiv	**Umjereno osjetljiv**	**Neosjetljiv (rezistentan)**
Amoksicilin*	≥ 18	13-18	≤ 13
Cefaleksin *	≥ 23	18-23	≤ 19
Doksiciklin *	≥ 16	13-15	≤ 12
Enrofloksacin**	≥ 23	17-22	≤ 18
Flumekvin**	≥ 20	17-19	≤ 16
Gentamicin*	≥ 15	13-14	≤ 12
Marbofloksacin**	≥ 20	15-19	≤ 11
Penicilin G*	≥ 15	-	≤ 14
Streptomicin*	≥ 15	12-14	≤ 11
Oksitetraciklin *	≥ 19	15-18	≤ 14
Tilozin**	≥ 26	23-25	≤ 22
Trimetoprim/sulfametoksazol*	≥ 16	11-15	≤ 10

(* prema uputama proizvođača za *Enterobacteriaceae*; ** prema CLSI, 2013.)

4. REZULTATI

Istraživanje osjetljivosti bakterija roda *Enterococcus* spp. na različite antimikrobne tvari provedeno je na 5 izolata koji su pripadali vrstama *E. faecium/hirae* (1 izolat) i *E. facealis* (4 izolata) (Tablica 2.).

Najčešće se rezistencija očitovala na tilozin (svi pretraženi izolati) dok se na streptomicin i trimetoprim/sulfametoksazol (po jedan izolat bio je rezistentan) rezistencija najrjeđe očitovala.

Izolat *E. faecium/hirae* očitovao je rezistenciju na cefaleksin, gentamicin, flumekvin i tilozin (Tablica 5. i 6.). Izolati *E. faecalis* očitovali su rezistenciju, u određenom broju, na sve ispitujuće antimikrobne tvari (Tablica 5. i 6.). Jedan izolat bio je rezistentan na 3 ispitivane antimikrobne tvari, jedan na četiri, dok su preostala tri izolata bila višestruko rezistentna (multirezistentna) na 7 i više istraživana antibiotika. Izolat *E. faecalis* (br. 2), izdvojen iz afričke sive papige bio je rezistentan na svih 12 ispitivanih antibiotika (Tablica 5.).

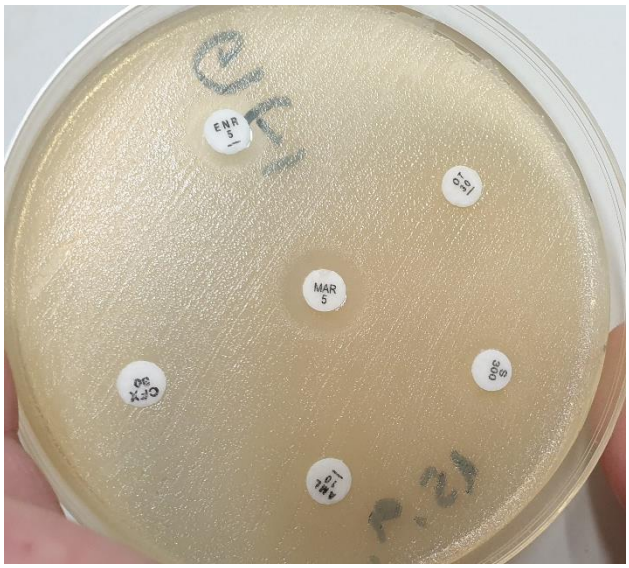
Od ukupno istraživanih izolata, najveći broj bio je osjetljiv na streptomicin i trimetoprim/sulfametoksazol (Tablica 5. i 6.).

Tablica 5. Osjetljivost izolata enterokoka na 12 antimikrobnih tvari disk difuzijskim postupkom (n=5).

BROJ UZORKA	ATB	NALAZ U MM	OSJETLJIVOST
1	AML	23	S
	CFX	15	R
	ENR	25	S
	DO	23	S
	PG	19	S
	GM	12	R
	MAR	25	S
	OT	17	I
	S	16	S
	SXT	28	S
	UB	0	R
	TY	18	R
2	AML	0	R
	CFX	0	R
	ENR	6	R
	DO	0	R
	PG	0	R
	GM	11	R
	MAR	8	R
	OT	0	R
	S	0	R
	SXT	0	R
	UB	0	R
	TY	0	R
3	AML	0	R
	CFX	0	R
	ENR	23	S
	DO	12	R
	PG	0	R
	GM	12	R
	MAR	24	S
	OT	0	R
	S	16	S
	SXT	32	S
	UB	0	R
	TY	0	R
4	AML	0	R
	CFX	21	I
	ENR	25	S
	DO	15	I
	PG	0	R
	GM	18	S
	MAR	29	S
	OT	19	S
	S	21	S
	SXT	25	S
	UB	25	S
	TY	0	R
5	AML	0	R
	CFX	0	R
	ENR	19	I
	DO	16	S
	PG	0	R
	GM	0	R
	MAR	18	I
	OT	0	R
	S	16	S
	SXT	31	S
	UB	0	R
	TY	0	R

Tablica 6. Skupni prikaz osjetljivosti i rezistencije enterokoka (n=5).

Antimikrobna tvar	**Izolati *Enterococcus* spp.**		
	Osjetljiv	**Umjereno osjetljiv**	**Rezistentan**
Amoksicilin	1	-	4
Cefaleksin	-	1	4
Doksiciklin	2	1	2
Enrofloksacin	3	1	1
Flumekvin	1	-	4
Gentamicin	1	-	4
Marbofloksacin	3	1	1
Penicilin G	1	-	4
Streptomicin	4	-	1
Oksitetraciklin	1	1	3
Tilozin	-	-	5
Trimetoprim/sulfametoksazol	4	-	1



Slika 4. Disk difuzijski postupak, *E. faecalis* (izolat br. 2.)

5. RASPRAVA

Povezanošću ljudi, životinja i okoliša sve češće dolazi i do pojave emergentnih i re-emergentnih bolesti, kao i multirezistentnih bakterija, tj. onih bakterija otpornih na više antimikrobnih tvari u isto vrijeme (WOOLHOUSE, 2002.; BENGIS i sur., 2004.). Stoga je razvoj antimikrobne rezistencije problem o kojem se sve više raspravlja u humanoj, ali i u veterinarskoj medicini (WHO, 2011.). Nažalost, ovoj pojavi često pridonosi preventivna ili neprikladna primjena antibiotika u svih vrsta životinja, pa tako i u ptica kućnih ljubimaca (O'BRIEN, 2002.; HERSHBERGER i sur., 2005.).

Bakterije roda *Enterococcus* spp. pripadnici su gastrointestinalne mikroflore ljudi i životinja, a smatraju se i oportunističkim patogenima koji su uglavnom odgovorni za bolničke infekcije kod ljudi i različite infekcija kod životinja (FRYE i sur., 2006.; JACKSON i sur., 2011.; LARSSON i sur., 2014.; NOWAKIEWICZ i sur., 2016.; WU i sur., 2016.). Vrste enterokoka koje se najčešće izdvajaju iz ptica kućnih ljubimaca su *E. faecalis* i *E. faecium.* Tako su CABRAL i sur. (2020.) dokazali prisutnost *Enterococcus* spp. u 26,9% pregledanih papiga vrste amazona, i to vrsta *E. faecalis, E. faecium, E. hirae, E. phoeniculicola, E. gallinarum* i *E. casseliflavus.* U posljednjem istraživanju provedenom u Hrvatskoj, dokazana je prisutnost bakterija roda *Enterococcus* u 3,87% pretraženih uzoraka porijeklom od različitih vrsta ptica kućnih ljubimaca, te su identificirane vrste *E. faecalis* i *E. faecium*/*E. hirae* (MOHENSKI, 2020.).

Diljem svijeta sve više zabrinjava pojava multirezistentnih sojeva enterokoka koji mogu prenijeti gene antimikrobne rezistencije drugim bakterijskim vrstama (MOUBARECK i sur., 2003.; LESTER i sur., 2006.). Također, istraživanjem koji su proveli FREITAS i sur. (2017.) dokazano je kako su slobodno živuće divlje ptice moguć rezervoar enterokoka rezistentnih na vankomicin i gentamicin, ali i da ptice držane u zatočeništvu mogu biti potencijalni izvor multirezistentnih izolata (CABRAL i sur., 2020.).

Istraživanja osjetljivosti na antimikrobne pripravke bakterija roda *Enterococcus* rijetko se provode u Republici Hrvatskoj, te je cilj ovog istraživanja bio odrediti u kojoj mjeri su bakterije *Enterococcus* spp., izdvojene iz ptica kućnih ljubimaca, osjetljive na određene antimikrobne tvari.

Istraživanje je provedeno na 5 izolata koji su pripadali vrstama *E. faecium/hirae* (1 izolat) i *E. facealis* (4 izolata), a ispitivana je njihova osjetljivost na 12 različitih antimikrobnih tvari. Rezistencija se najčešće očitovala na amoksicilin, cefaleksin, gentamicin, flumekvin, penicilin i tilozin, dok se na enrofloksacin, marbofloksacin, streptomicin i trimetoprim/sulfametoksazol

rezistencija očitovala najrjeđe. Dobiveni rezultati podudaraju se s onima koje su opisali SOODMAND i sur. (2018.). koji su također dokazali kako je većina ispitivanih izolata *E. faecalis* i *E. faecium* bilo rezistentno na spomenute antibiotike. Nalaz čak četiri izolata rezistentnih na gentamicin (od pet ispitivanih) podudara se s onim koji su opisali CABRAL i sur. (2020.). Vezano za pojavu multirezistentnih enterokoka, u ovom istraživanju jedan izolat bio je rezistentan na tri ispitivane antimikrobne tvari, jedan na četiri, dok su preostala tri izolata bila višestruko rezistentna na 7 i više istraživana antibiotika. Zabrinjava i nalaz koji govori kako je izolat *E. faecalis* (br. 2), izdvojen iz afričke sive papige, bio rezistentan na svih 12 ispitivanih antibiotika. I ovi se rezultati podudaraju s onima drugih istraživača koji također pokazuju kako je pojava multirezistentnih enterokoka izdvojenih iz ptica kućnih ljubimaca vrlo česta (FREITAS i sur., 2017.; SOODMAND i sur., 2018.).

Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem može se zaključiti kako ptice kućni ljubimci predstavljaju mogući izvor rezistentnih enterokoka za druge životinje, ali i ljude. Stoga je neophodna potreba za dodatnim istraživanjima na većem broju uzoraka, uz korištenje modernih molekularnih metoda kako bi se ovi rezultati potvrdili i omogućilo razumijevanje strukture populacije rezistentnih enterokoka i dinamike mogućeg prijenosa ovih bakterija među životinje, ljude i okoliš.

6. ZAKLJUČCI

1. Pojava multirezistentnih sojeva bakterija, pa tako i onih roda *Enterococcus,* česta je u humanoj i veterinarskoj medicini.

2. Bakterije roda *Enterococcus* prisutne su u uzorcima porijeklom od ptica kućnih ljubimaca, posebice vrste *E. faecalis* i *E. faecium*.

3. U pet ispitivanih izolata enterokoka dokazana je osjetljivost na enrofloksacin, marbofloksacin, streptomicin i trimetoprim/sulfametoksazol, a rezistencija na amoksicilin, cefaleksin, gentamicin, flumekvin, penicilin i tilozin.

4. Ispitivani izolati bili su istovremeno rezistentni na tri, četiri, sedam ili svih 12 ispitivanih antimikrobnih tvari.

5. Iako se i na ovako malom broju ispitivanih uzoraka može zaključiti kako ptice kućni ljubimci predstavljaju mogući izvor rezistentnih enterokoka za druge životinje ili ljude, potrebna su daljnja istraživanja na većem broju uzoraka radi potvrde ovih nalaza.

7. LITERATURA

1. ABE, Y., K. NAKAMURA, M. YAMADA, Y. YAMAMOTO (2006.): Encephalomalacia with *Enterococcus durans* infection in the brain stem and cerebral hemisphere in chicks in Japan. Avian Dis. 50, 139–141.
2. AMMOR, M. S., A. B. FLÓREZ, A. H. A. M. VAN HOEK, C. G. DE LOS REYES-GAVILÁN, H. J. M. AARTS, A. MARGOLLES, B. MAYO (2007.): Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. J. Mol. Microbiol. Biotech. 14 (1–3), 6–15.
3. BENGIS, R. G., F. A. LEIGHTON, J. R. FISCHER, M. ARTOIS, T. MÖRNER, C. M. TATE (2004.): The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. Revue Scientifique et Technique 23, 497–511.
4. BILLSTRÖM, H., B. LUND, A. SULLIVAN, C. E. NORD (2008.): Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. Int. J. Antimicrob. Agents 32, 374-377.
5. BYAPPANAHALLI, M. N., M. B. NEVERS, A. KORAJKIC, Z. R. STALEY, V. J. HARWOOD (2012.): Enterococci in the environment. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 4, 685–706.
6. CABRAL, B. G., Y. M. DAVIES, M. C. MENÃO, A. B. S. SAIDENBERG, V. T. M. GOMES, L. Z. MORENO, M. I. Z. SATO, A. M. MORENO, T. KNÖBL (2020.): Companion psittacine birds as reservoir of gentamicin and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Pesquisa Veterinária Brasileira 40, 129-133.
7. CHOMEL, B. B. (1998.): New emerging zoonoses: A challenge and an opportunity for the veterinary profession. Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis. 21, 1–14.
8. DE HERDT, P., P. DEFOORT, J. VAN STEELANT, H. SWAM, L. TANGHE, S. VAN GOETHEM, M. VANROBAEYS (2008.): *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. Vlaams Diergen. Tijds. 78, 44–48.
9. DEL GROSSO, M., A. CAPRIOLI, P. CHINZARI, M. C. FONTANA, G. PEZZOTTI, A. MANFRIN, E. D. GIANNATALE, E. GOFFREDO, A. PANTOSI. (2000.): Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. Microbial. Drug Resistance 6, 313–318.

10. DEVRIESE, L. A., K. CAUWERTS, K. HERMANS, A. M. WOOD (2002.): *Enterococcus cecorum* septicemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens. Vlaams Diergen. Tijds. 71, 219–221.
11. DEVRIESE, L. A., K. CHIERS, P. D. HERDT, D. VANROMPAY, M. DESMIT, R. DUCATELLE, F. HAESEBROUCK (2007.): *Enterococcus hirae* infections in psittacine birds: Epidemiological, pathological and bacteriological observations. Avian Path. 24, 523-531.
12. EISNER, A., G. FEIERL, G. GORIEWICZ, F. DIEBER, H. KESSLER, E. MARTH, J. KOFER. (2005.): High prevalence of VanA-type vancomycin-resistance enterococci in Austrian poultry. App. Environ. Microbiol. 71, 6407–6409.
13. ENGBERG, J., S. ANDERSEN, R. SKOV, F. M. AARESTRUP, P. GERNER-SMIDT (1999.): Comparison of two agar dilution methods and three agar diffusion methods, including the Etest, for antibiotic susceptibility testing of thermophilic *Campylobacter* species. Clin. Microbiol. Infect. 5, 580–584.
14. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2007.): Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in Salmonella in fowl (*Gallus gallus*), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. EFSA Journal 96, 1–46.
15. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2008): Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The EFSA Journal 732, 1–15.
16. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2012.): Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal 10 (6), 1–10.
17. FERRARO, J. H. J., M. J. JORGENSEN (2009.): Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin. Inf. Dis. 7750, 1749–1755.
18. FISHER, K., C. PHILLIPS (2009.): The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 155, 1749-1757.
19. FREITAS, A. A. R., A. R. FARIA, T. C. A. PINTO, V. L. C. MERQUIOR, D. M. NEVES, R. C. COSTA, L. M. TEIXEIRA (2017.): Distribution of species and antimicrobial resistance among *Enterococci* isolated from the fecal microbiota of captive blue-fronted parrot (*Amazona aestiva*) in Rio de Janeiro, Brazil. Sci Tot Environ 615, 1428–1437.

20. FRYE, J. G., T. JESSE, F. LONG, G. RONDEAU, S. PORWOLLIK, M. MCCLELLAND, C. R. JACKSON, M. ENGLEN, P. J. FEDORKA-CRAY (2006.): DNA microarray detection of antimicrobial resistance genes in diverse bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents 27, 138–151.
21. GALIMAND, M., E. SCHMITT, M. PANVERT, B. DESMOLAIZE, S. DOUTHWAITE, Y. MECHULAM, P. COURVALIN (2011.): Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. RNA 17, 251-262.
22. GAUDREAU, C., H. GILBERT (1997.): Comparison of disk diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campilobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Antimicrob. Chemother. 39, 707-712.
23. GE, B., S. BODIES, R. WALKER, D. WHITE, S. ZHAO, P. MCDERMOTT, J. MENG (2002.): Comparison of E-test and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptability testing of *Campylobacter*. J. Antimicrob. Chemother. 50, 487-494.
24. GERLACH, H. (1994.): Avian Medicine: Principles and Application. Winger Publishing, Inc., Lake Worth, Florida, 949-983.
25. HERSHBERGER, E., S. F. OPREA, S. M. DONABEDIAN, M. PERRI, P. BOZIGAR, P. BARTLETT, M. J. ZERVOS. (2005.): Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. J. Antimic. Chem. 55, 127–130.
26. HOLLENBECK, B. L., L. B. RICE (2012.): Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. Virulence 3, 421-433.
27. JACKSON, C. R., J. E. LOMBARD, D. A. DARGATZ, P. J. FEDORKA-CRAY (2011.): Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. Lett. Appl. Microbiol. 52, 41–48.
28. KOLBJØRNSEN, R., B. DAVID, M. GILHUUS, (2011.): Bacterial osteomyelitis in a 3-week-old broiler chicken associated with *Enterococcus hirae*. Vet. Pathol. 48, 1134–1137.
29. KRISTICH, C. J., L. B. RICE, C. A. ARIAS (2014.): Enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance. In: Gilmore, M. S., D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar: Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, SAD.
30. LARSSON, J., R. LINDBERG, A. ASPÁN, R. GRANDON, E. WESTERGREN, M. JACOBSON (2014.): Neonatal piglet diarrhoea associated with enteroadherent *Enterococcus hirae*. J. Comp. Pathol. 151, 137–147.

31. LECLERCQ, R., P. COURVALIN (2002.): Resistance to macrolides and related antibiotics in S*treptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents. Chemother. 46, 2727-2734.
32. LESTER, C., N. FRIMODT-MØLLER, T. SØRENSEN, D. MONNET, A. HAMMERUM (2006.): In vivo transfer of the vanA resistance gene from and *Enterococcus faecium* isolate of animals origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. Antimicrob. Agents Chemoth. 50, 596–599.
33. LUBER, P., E. BARTELT, E. GENSCHOW, J. WAGNER, H. HAHN (2003.): Comparison of broth microdilution, Etest and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Clin. Microbiol. 41, 1062-1068.
34. MAKRAI, L., C. NEMES, A. SIMON, É. IVANICS, Z. DUDÁS, L. FODOR, R. GLÁVITS (2011.): Association of *Enterococcus cecorum* with vertebral osteomyelitis and spondylolisthesis in broiler parent chicks. Acta Vet. Hung. 59, 11–21.
35. MARTINEZ, J., L. F. BAQUERO (2000.): Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemoth 44, 1771-1777.
36. MATEU, E., M. MARTIN (2001.): Why is antimicrobial resistance a veterinary problem as well? J. Vet. Med. Series B 48, 569–581.
37. MILLER, W. R., J. M. MUNITA, C. A. ARIAS (2014.): Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. 12, 1221- 1236.
38. MLADENOV, G., T. P. POPOVA (2020.): Problematic infections in parrots-*Streptococcal* and *Enterococcal* infections, diagnostics ans control. Tradition and Moder. Vet. Med. 5, 65-72.
39. MOHENSKI, M. (2020.): Pojavnost bakterija roda *Enterococcus* spp. u ptica kućnih ljubimaca. Zagreb. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet.
40. MORISHITA, T. Y. (2019.): *Enterococcosis* in Poultry. Merck Sharp & Dohme Corp., Kenllworth, NJ, USA.
41. MOUBARECK, C., N. BOURGEOIS, P. COURVALIN, F. DOUCET-POPULAIRE (2003.): Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. Antimicrob. Agents Chemoth. 47, 2993–2996.
42. MURRAY, E. (1990.): The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3, 46-65.
43. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (1992.): Praktikum opće mikrobiologije i imunologije. Školska knjiga, Zagreb. str. 33-37.

44. NOWAKIEWICZ, A., G. ZIÓLKOWSKA, A. TROŚCIAŃCZYK, P. ZIEBA, S. GNAT (2016.): Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. Poult. Sci. 96, 986–996.
45. O'BRIEN, T. F. (2002.): Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: How use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. Clin. Inf. Dis. 34 (3 Suppl), S78–S84.
46. ONCUL, O., P. ZARAKOLU, D. GUR (2003): Antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni:* a comparison between Etest and agar dilution method. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 45 (1), 69–71.
47. OPAL, S. M., K. H. MAYER, A. A.MEDEIROS (2000.): Mechanisms of bacterial antibiotic resistance. U: Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandel, G. L., ur.). 5. izd., Churchill Livingstone, Philadelphia, 236-252.
48. PANTOSTI, A., M. DEL GROSSO, S. TAGLIABUE, A. MACRI, A. CAPRIOLI. (1999.): Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban. The Lancet 354, 741–742.
49. PORTILLO, A., F. RUIZ-LARREA, M. ZARAZAGA, A. ALONSO, J. L. MARTINEZ, C. TORRES (2000.): Macrolide resistance genes in *Enterococcus spp*. Antimicrob. Agents. Chemother. 44, 967-971.
50. SINGH, K. V., G. M. WEINSTOCK, B. E. MURRAY (2002.): An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. Antimicrob. Agents. Chemother. 46, 1845-1850.
51. SOODMAND, J., T. ZEINALI, G. KALIDARI, G. HASHEMITABAR, J. RAZMYAR (2018.): Antimicrobial Susceptibility Profile of *Enterococcus* Species Isolated from Companion Birds and Poultry in the Northeast of Iran. Archives of Razi Institute, 73 (3), 207-213.
52. STALKER, M. J., M. L. BRASH, A. WEISZ, R. M. OUCKAMA, D. SLAVIC (2010.): Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. J. Vet. Diagn. Invest. 22, 643–645.
53. STEENTJES, A., K. T. VELDMAN, D. J. MEVIUS, W. J. LANDMAN (2002.): Molecular epidemiology of unilateral amyloid arthropathy in broiler breeders associated with *Enterococcus faecalis*. Avian Pathol. 31, 31–39.

54. SZELESZCZUK, P., B. DOLKA, A. ŻBIKOWSKI, I. DOLKA, M. PERYGA (2013.): First case of enterococcal spondylitis in broiler chickens in Poland [in Polish]. Med. Weter. 9, 298–303.
55. ŠEOL, B., K. MATANOVIĆ, S. TERZIĆ (2010.): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Medicinska naklada, Zagreb.
56. TANKSON, J. D., J. P. THAXTON, Y. VIZZIER-THAXTON (2001.): Pulmonary hypertension syndrome in broilers caused by *Enterococcus faecalis*. Infect. Immun. 69, 6318–6322.
57. VELKERS, F. C., L. VAN DE GRAAF-BLOOIS, J. A. WAGENAAR, S. T. WESTENDORP, M. A. VAN BERGEN, R. M. DWARS, W. J. LANDMAN (2011.): *Enterococcus hirae*-associated endocarditis outbreaks in broiler flocks: clinical and pathological characteristics and molecular epidemiology. Vet. Q. 31, 3–17.
58. WIEGAND I., K. HILPERT, R. E. W. HANCOCK (2008.): Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3 (2), 163–75.
59. WOOLHOUSE, M. E. J. (2002.): Population biology of emerging and re-emerging pathogens. Trends Microbiol. 10, S3–S7.
60. WORLD HEALTH ORGANISATION (2011.): Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. World Health Organisation, 1–88.
61. WU, X., S. HOU, Q. ZHANG, Y. MA, Y. ZHANG, W. KAN, X. ZHAO (2016.): Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. J. Vet. Med. Sci. 78, 1663–1668.
62. ZIMMERMANN, R. A., R. C. JR. MOELLERING, A. N. WEINBERG (1971.): Mechanism of resistance to antibiotic synergism in *Enterococci*. J. Bacteriol. 105, 873-879.

8. SAŽETAK

Bakterije roda *Enterococcus* spp. sastavni su dio gastrointestinalne mikroflore ljudi i životinja, a smatraju se i oportunističkim patogenima. Vrste enterokoka koje se najčešće izdvajaju iz ptica kućnih ljubimaca su *E. faecalis* i *E. faecium.* Razvoj antimikrobne rezistencije sve češći je problem u humanoj, ali i u veterinarskoj medicini, čemu posebno pridonosi neprikladna primjena antibiotika u svih vrsta životinja, pa tako i u ptica kućnih ljubimaca. Diljem svijeta sve više zabrinjava pojava multirezistentnih sojeva enterokoka, a dokazano je i kako su slobodno živuće divlje ptice moguć rezervoar enterokoka rezistentnih na vankomicin i gentamicin, ali i da ptice držane u zatočeništvu mogu biti potencijalni izvor multirezistentnih izolata.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti u kojoj mjeri su bakterije *Enterococcus* spp., izdvojene iz ptica kućnih ljubimaca, osjetljive na antimikrobne tvari. Istraživanje je provedeno na 5 izolata koji su pripadali vrstama *E. faecium/hirae* (1 izolat) i *E. facealis* (4 izolata), a ispitivana je njihova osjetljivost na 12 različitih antimikrobnih tvari disk difuzijskom metodom.

Rezistencija se najčešće očitovala na amoksicilin, cefaleksin, gentamicin, flumekvin, penicilin i tilozin, dok se na enrofloksacin, marbofloksacin, streptomicin i trimetoprim/sulfametoksazol rezistencija najrjeđe očitovala. Jedan izolat bio je rezistentan na tri ispitivane antimikrobne tvari, jedan na četiri, dok su preostala tri izolata bila višestruko rezistentna na 7 i više istraživana antibiotika. Izolat *E. faecalis*, izdvojen iz afričke sive papige, bio je rezistentan na svih 12 ispitivanih antibiotika.

Dobiveni rezultati potvrđuju kako ptice kućni ljubimci mogu predstavljati izvor rezistentnih enterokoka za životinje ili ljude. Neophodna su dodatna istraživanja na većem broju uzoraka kako bi se ovi rezultati potvrdili, uz moguće korištenje modernih molekularnih metoda radi dokaza gena odgovornih za rezistenciju.

Ključne riječi: antibiotik, antimikrobna rezistencija, disk difuzijska metoda, enterokoki, ptice

9. SUMMARY

Antimicrobial susceptibility of bacteria of the genus *Enterococcus* spp. isolated from pet birds

Bacteria of the genus *Enterococcus* spp. are an integral part of the gastrointestinal microflora of humans and animals, and are also considered opportunistic pathogens. The species of enterococci that are most commonly isolated from pet birds are *E. faecalis* and *E. faecium*. The development of antimicrobial resistance is an increasingly common problem in human and veterinary medicine, especially due to the inappropriate use of antibiotics in all types of animals, including pet birds. The emergence of multidrug-resistant strains of enterococci is of increasing concern around the world, and it has been proven that free-living wild birds are a possible reservoir of enterococci resistant to vancomycin and gentamicin, but that captive birds can be a potential source of multidrug-resistant isolates, too.

The aim of this study was to determine the extent to which bacteria *Enterococcus* spp., isolated from pet birds, are susceptible to antimicrobial substances. The study was performed on 5 isolates belonging to the species *E. faecium*/*hirae* (1 isolate) and *E. facealis* (4 isolates), and their sensitivity to 12 different antimicrobial substances by disk diffusion method was examined.

Resistance to amoxicillin, cephalexin, gentamicin, flumequine, penicillin, and tylosin was most common, whereas resistance to enrofloxacin, marbofloxacin, streptomycin, and trimethoprim / sulfamethoxazole was low. One isolate was resistant to three tested antimicrobials, one to four, while the remaining three isolates were multiple resistant to 7 or more investigated antibiotics. The isolate of *E. faecalis*, isolated from the African gray parrot, was resistant to all 12 tested antibiotics.

The results obtained confirm that pet birds can be a source of resistant enterococci for animals or humans. Further research on a larger number of samples is needed to confirm these results, with the possible use of modern molecular methods to prove the genes responsible for resistance.

Key words: antibiotic, antimicrobial resistance, disk diffusion method, enterococci, birds

10.ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25.5.1995. godine u Čakovcu. Pohađala sam Osnovnu školu Strahoninec od 2002. do 2010. godine. Nakon završene osnovne škole upisujem opću gimnaziju u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec koju sam pohađala do 2014. godine. Iste godine upisujem prvu godinu integriranog studija veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zgrebu. Tijekom studija izabrana sam za demonstratora na kolegiju „Anatomija s organogenezom domaćih životinja 3“ na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju. Bila sam aktivna članica studentske udruge IVSA te sam prisustvovala 5. Hrvatskom kongresu veterinara male prakse 2019. godine u Zagrebu. Volontirala sam u Ambulanti za kućne ljubimce Bioinstituta u Čakovcu. Od 2015. godine sam stipendist grada Čakovca.