



Luka Jurinović, dipl.ing.biol.¹, dr.sc. Marijana Sokolović², dr.sc. Borka Šimpraga²,
dr.sc. Vladimir Savić², mr.sc. Fani Krstulović², dr.sc. Mirta Balenović²,
Marija Berendika, dipl.ing.preh.teh.²

Značaj galebova, *Laridae*, *Aves*, kao kliconoša određenih bakterijskih i virusnih zoonoza

SAŽETAK

Značaj divljih ptica za javno zdravstvo je u širenju mikroorganizama koji mogu zaraziti ljude. Odlagališta otpada su, zbog nerazvrstavanja, nepresušan izvor hrane za divlje ptice. Organsku komponentu u najvećem broju iskorištavaju galebovi (*Laridae*) i vrane (*Corvidae*). Galebovi su prirodni rezervoari virusa influence i paramiksovirusa. Divlje se ptice često prilikom hranjenja otpadom zaraze i enteropatogenim bakterijama (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. i *E. coli*) te mogu širiti navedene uzročnike tijekom migracije. Na zagrebačkom odlagalištu otpada Prudinec brojnost galebova zimi nerijetko prelazi 10.000 jedinki te su takva okupljanja idealna za širenje mnogih bolesti. U cilju procjene opasnosti širenja zaraznih bolesti provodi se istraživanje pojavnosti uzročnika virusnih i bakterijskih bolesti u galebova koji su lovljeni na navedenom odlagalištu tijekom zime te su im uzimani brisovi kloake i ždrijela te uzorci krvi. Na temelju dosadašnjih rezultata iz brisova kloake galebova izolirano je više podtipova virusa influence ptica, paramiksovirusi podtipa 1 te bakterije rodova *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. i bakterija *E. coli*. Daljnjim istraživanjima utvrdit će se učestalost i patogenost pojedinih uzročnika bolesti. Iz navedenog se može zaključiti da je važno pravovremeno procijeniti značaj divljih ptica, posebice galebova, u širenju patogenih mikroorganizama i to prvenstveno stoga što neki od njih predstavljaju potencijalnu opasnost za ljude s kojima dolaze u kontakt.

KLJUČNE RIJEČI: larus, odlagalište otpada, influenza ptica, ptičji paramiksovirus, salmonella, *E. coli*

Significance of Gulls, *Laridae*, *Aves*, as carriers of some viral and bacterial zoonoses

ABSTRACT

Significance of wild birds for public health reflects in spreading of microorganisms potentially zoonotic for humans. Rubbish dumps are, due to the absence of sorting, endless source of food for wild birds. Organic component is mainly used by gulls (*Laridae*) and crows (*Corvidae*). Gulls are natural reservoirs of avian influenza viruses and paramixoviruses. During feeding on rubbish, wild birds can be infected with enteropathogenic bacteria (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *E. coli*) and can aid in spreading of these pathogens during their movements. At Prudinec landfill in Zagreb, the number of gulls during winter is often more than 10.000 what makes it an ideal place for spreading of many diseases. In order to evaluate the risk of spreading of zoonotic diseases, research on incidence of viral and bacterial pathogens in gulls caught at the tip during winter has been made. According to our results, we have isolated several subtypes of avian influenza virus, paramixovirus subtype 1 as well as bacteria of genera *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and bacteria *E. coli*. Further research is necessary for determination of their prevalence and pathogenicity. It is therefore important to adequately evaluate significance of wild birds, especially gulls, in spreading of pathogenic microorganisms that might be potentially harmful for humans.

KEY WORDS: larus, rubbish tip, avian influenza, avian paramixovirus, salmonella, *E. coli*

¹Hrvatski veterinarski institut, podružnica Centar za peradarstvo, Heinzelova 55, Zagreb, luka.jurinovic@gmail.com



UVOD

Odlagališta otpada su, zbog nerazvrstavanja, nepresušan izvor hrane za divlje ptice. Organsku komponentu u najvećem broju iskorištavaju galebovi (*Laridae*) i vrane (*Corvidae*). Na odlagalištu otpada Prudinec je do sada zabilježeno devet vrsta galebova. Najveću brojnost postižu zimi kad se na odlagalištu hrani i preko 10.000 ptica (Jurinović, 2006.). Nalazi prstenovanih galebova ukazuju da se na odlagalištu Prudinec hrane ptice iz cijele Europe od Engleske do Rusije te od Finske do Tunisa u Africi (Neobjavljeni podaci, Jurinović). Zbog svega navedenog odlagalište Prudinec je odlično mjesto za uzorkovanje galebova, jer se pomoću njih može dobiti uvid u to koje bakterijske i virusne bolesti su rasprostranjene među europskim galebovima.

Razrada teme:

Najprikladniji način za dobivanje odgovarajućih uzoraka za izolaciju bakterijskih i virusnih patogena je lov galebova pomoću mreža preklapača te topovskih mreža. Svako ulovljenoj ptici uzima se obrisak kloake, te se nakon prstenovanja ptica pušta neozlijeđena na istom mjestu. Za vrijeme naših istraživanja na zagrebačkom odlagalištu otpada Prudinec u razdoblju od 2006. do 2013. godine ulovljeno je ukupno sedam vrsta galebova i to: riječni galeb, *Larus ridibundus*, galeb klaukavac, *L. michahellis*, pontski galeb, *Larus cachinnans*, srebrnasti galeb, *L. argentatus*, tamnoleđi galeb, *L. fuscus*, burni galeb, *L. canus*, i crnoglavi galeb, *L. melanocephalus*.

Divlje ptice i pojavnost virusni bolesti

Influenca ptica je virusna bolest čiji su glavni prirodni rezervoar ptice koje pripadaju redovima guščarica *Anseriformes* (patke, guske i labudovi) i šljukarica *Charadriiformes* (galebovi, čigre i ćurlini) (Webster i sur., 1992.). Virusi influence ptica su razvrstani u podtipove temeljem posjedovanja jednog od 16 različitih hemaglutininskih antigena (H1 do H16) i jednog od devet neuraminidaznih antigena (N1 do N9) (Capua i Alexander, 2004.). Izolati influence iz galebova najčešće pripadaju podtipovima H13 i H16. Ova dva podtipa čine zasebnu skupinu izolata koji su gotovo isključivo nađeni samo u galebovima (Munster i sur., 2007.).

Paramiksovirusi, također, uzrokuju respiratorne i reproduktivne simptome kod peradi te divljih ptica. Podijeljeni su u devet serotipova imenovanih PMV-1 do PMV-9. Ekonomski je najznačajniji PMV-1, koji uzrokuje newcastlesku bolest (Alexander, 1995.). U literaturi je slabo opisana pojavnost ovih virusa u galebova. Tijekom istraživanja paramiksovirusa na šljukaricama u Americi, Coffee i sur. (2010.) su izdvojili 2 paramiksovirusa iz 996 uzoraka galebova. Oba izolata su bila serotipovi PMV-2.

Za izdvajanje virusa u kokošjim embrijima i serotipizaciju izdvojenih virusa primjenjene su standardne procedure (Anon., 2009.). Za tipiziranje hemaglutinirajućih izolata korišten je komplet monospecifičnih antiseruma koji pokrivaju svih 16 H podtipova virusa influence te monospecifični antiserumi protiv svih paramiksovirusa, osim PMV-5. U našem istraživanju, od sedam vrsta galebova ulovljenih na odlagalištu Prudinec, samo su iz dvije vrste izolirani virusi influence i to iz riječnog galeba i galeba klaukavca. Iz obje vrste su izdvojeni i virusi podtipa H13 i podtipa H16. Iz istih vrsta su izdvojeni i paramiksovirusi podtipa PMV-1. Ostali podtipovi influence i paramiksovirusa nisu zabilježeni.

Virusi podtipa H13 i H16 su potpuno neopasni za ljude. Ova dva podtipa čine zasebnu skupinu izolata koji su gotovo isključivo nađeni samo u galebovima (Munster i sur., 2007.). Međutim, prilikom pretraživanja galebova na Pantani, močvari kraj Trogira 2006. godine izdvojen je visokopatogeni virus influence podtipa H5N1 iz naizgled zdravih riječnih galebova (Savić i sur., 2010.) koji predstavlja izravnu opasnost za ljudsko zdravlje.

Divlje ptice i pojavnost bakterijskih bolesti

Bakterijske zoonoze važan su problem javnog zdravstva zbog opasnosti koje ovi patogeni mikroorganizmi imaju po zdravlje ljudi i životinja. Zbog potencijalnih učinaka na okoliš danas su i važno područje istraživanja u čitavom svijetu. Od ukupnog broja izoliranih bakterija smatra se da više od 60 % bakterija može uzrokovati zoonoze. Od posebne su važnosti pojedini sojevi gram-negativnih bakterija jer mogu uzrokovati infekcije u ljudi i životinja s brojnim zdravstvenim i ekonomskim posljedicama. Osim dobro poznatih patogenih bakterija koje se prenose hranom, bakterija iz rodova *Salmonella* i *Campylobacter*, pojedini sojevi bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) česti su uzročnici oboljenja u ljudi. Tako su u posljednje vrijeme izolirani verotoksin-producirajuće *E. coli* (VTEC) kao i multi-rezistentni



ESBL-producirajući sojevi bakterija *E. coli* i *Klebsiella spp.* koji u ljudi mogu uzrokovati bolesti probavnog, krvožilnog i dišnog sustava, septikemiju a u nekim slučajevima i smrt (OIE, 2007.; FAO, 2008.; Jacoby, 2009.; Allen i sur., 2010.; EFSA, 2013.).

Za izolaciju i identifikaciju bakterijskih patogena primjenjuje se veliki broj različitih mikrobioloških metoda koji u osnovi imaju postupke „obogaćivanja“ ispitivanog uzorka u hranjivom bujonu te rastu na odgovarajućim selektivnim hranjivim podlogama. Bakterije se identificiraju primjenom različitih biokemijskih testova, serološkim tipizacijama i/ili primjenom molekularnih metoda. Za izolaciju bakterija iz roda *Salmonella* najčešće se koristi standardna horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella spp.* (HRN EN ISO 6579:2003/A1:2008). Izolirani sojevi karakterističnog rasta na odabranim selektivnim hranjivim podlogama potvrđuju se biokemijskim testovima i identificiraju postupcima serotipizacije pomoću antigenske formule opisane u Kauffmann-White shemi (Grimont i Weill, 2007.). Za izolaciju bakterija iz roda *Campylobacter* također se primjenjuje standardna horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje *Campylobacter spp.* (HRN EN ISO 10272-1:2008), a koja za potvrdu izoliranih sojeva bakterije koristi karakteristični rast na selektivnim podlogama, bojenje po Gram-u te oksidaza test. Verotoksigeni sojevi bakterije *Escherichia coli* izdvajaju se standardnom horizontalnom metodom za otkrivanje *Escherichia coli* O157 (HRN EN ISO 16654:2003) koja za potvrdu uključuje biokemijske i lateks testove. ESBL-producirajuće bakterije *E. coli* i *Klebsiella spp.* izdvajaju se primjenom različitih mikrobioloških metoda uz upotrebu selektivnih hranjivih podloga. Izolirani sojevi identificiraju se fenotipskim postupcima disk-difuzije i mikrodilucije (CLSI, 2010.).

Iako se smatra da do infekcije u ljudi najčešće dolazi preko domaćih životinja i kućnih ljubimaca, određeni broj bakterija prisutan je u okolišu i divljim životinjama koje se mogu smatrati i njihovim rezervoarom. Budući da se bakterijski uzročnici zoonoza najčešće prenose fekalno-oralnim putem, upravo galebovi mogu biti vektori u širenju ovih uzročnika bolesti. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja iz galebova su izolirane bakterije rodova *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* i *Escherichia coli* (Literak i sur., 2010.; DANMAP, 2012.; EFSA, 2013.; Magwedere i sur., 2013.). Učestalost potencijalnih patogenih bakterija u 15-99 % ispitanih divljih ptica (Reed i sur., 2003.; Dixon, 2007.; Nelson i sur., 2008.; Dolejska i sur., 2009.) i neosjetljivost u 13-30 % izoliranih sojeva na jedan ili više antibiotika (Dolejska i sur., 2007., 2009.; DANMAP, 2012.) ukazuje na nedovoljno istraženu ulogu divljih ptica u nastanku bolesti u ljudi. Razlog navedenom je nedostatak odgovarajućih istraživanja na statistički značajno velikom uzorku kao i „mobilnost“ divljih ptica, posebice galebova.

Prema rezultatima naših preliminarnih istraživanja u galebovima ulovljenih na odlagalištu Prudinec izdvojene su bakterije iz rodova *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, ESBL-producirajući sojevi (*Klebsiella spp.* i *E. coli*) i verotoksigeni sojevi bakterije *E. coli*.

ZAKLJUČAK

Povećana pojavnost pojedinih bolesti u ljudi ukazuje na potrebu neprestane analize mogućih izvora patogenih mikroorganizama za razumijevanje patogeneze infekcija. Divlje ptice važni su čimbenici u prijenosu i širenju nekih virusnih i bakterijskih patogenih mikroorganizama. Zbog navedenog, potrebno je redovito provoditi istraživanja učestalosti patogenih mikroorganizama u okolišu i divljim pticama kako bi se mogao procijeniti stvarni rizik moguće opasnosti po ljude. Poznavanje ovih faktora omogućilo bi precizniju procjenu mogućih pojava određenih bolesti uzrokovanih virusnim i bakterijskim uzročnicima kao i definiranje mjera kojima bi se moglo spriječiti širenje patogenih mikroorganizama.

POPIS LITERATURE

- ALEXANDER, D. J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *Journal of Comparative Pathology* 112: 105–126.
- ALLEN, H. K., J. DONATO, H. H. WANG, K. A. CLOUD-HANSEN, J. DAVIES, J., J. HANDELSMAN. 2010. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(4):251–259.
- ANONYMOUS. 2009: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Office Internationale des Epizooties, Paris.



- CAPUA, I, D. ALEXANDER. 2004. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology* 33: 393-404.
- COFFEE, L.L., B.A. HANSON, M. PAGE LUTTRELL, D.E. SWAYNE, D.A. SENNE, V.H. GOEKJIAN, L.J. NILES, D.E. STALLKNECHT. 2010. Avian paramyxoviruses in shorebirds and gulls. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 481–487.
- CLSI. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21th informational supplement. Wayne, PA: CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute.
- DANMAP. 2012. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. ISSN 1600-2032.
- DIXON, B. 2007. Disseminators aloft? *Microbe* 2:416-417.
- DOLEJSKA, M., A. CIZEK, I. LITERAK. 2007. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology*. 103:11-19.
- DOLEJSKA, M., B. BIEROŠKOVA, L. KOHOUTOVA, I. LITERAK., A. ČIŽEK. 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *Journal of Applied Microbiology*. 106:1941-1950.
- EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2013. Scientific Report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks I 2011. *EFSA Journal* 11(4):3129.
- FAO/WHO/OIE 2008. Joint FAO/WHO/OIE Expert meeting on critically Important Antimicrobials. Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26-30 November 2007; third revision. 2009.
- GRIMONT, A. D. P. i F. X. Weill. 2007. Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars. 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Dostupno na: <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre-cnr/salmoms-index.html>.
- HRN EN ISO 10272-1:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje *Campylobacter* spp. -- 1. dio: Metoda dokazivanja (ISO 10272-1:2006; EN ISO 10272-1:2006).
- HRN EN ISO 16654:2003. Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za otkrivanje *Escherichia coli* O157 (ISO 16654:2001; EN ISO 16654:2001).
- HRN EN ISO 6579:2003/A1:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. -- Amandman 1: Dodatak D: Otkrivanje *Salmonella* spp. u životinjskom izmetu i u uzorcima okoliša primarne proizvodnje (ISO 6579:2002/Amd 1:2007; EN ISO 6579:2002/A1:2007).
- JACOBY, G. A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(1):161-182.
- JURINOVIĆ, L. 2006. Galebovi (Laridae, Aves) na odlagalištu otpada Jakuševac. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, diplomski rad.
- LITERAK, I., M. DOLEJSKA, D. JANOSZOWSKA, J. HRUSAKOVA, W. MEISSNER, H. RZYSKA, S. BZOMA, A. CIZEK. 2010. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Bacteria, Including strains with Genes Encoding the Extended-Spectrum Beta-lactamase and QnrS, in Waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(24):8126-8134.
- MAGWEDERE K., H. A. DANG, E. W. MILLS, C. N. CUTTER, E. L. ROBERTS, C. DEBROY. 2013. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 25(2):254-258.
- MUNSTER V.J., C. BAAS, P. LEXMOND, J. WALDENSTROM, A. WALLENSTEN, T. FRANSSON, G.F. RIMMELZWAAN, W.E.P. BEYER, M. SCHUTTEN, B. OLSEN, A.D.M.E. OSTERHAUS, R.A.M. FOUCHIER. 2007. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog* 3(5).
- NELSON, M. S. H. JONES., C. EDWARDS. J. C. ELLIS. 2008. Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping. *Diseases of Aquatic Organisms*. 81:53-63.
- OIE list of antimicrobials of veterinary importance. Resolution No. XXVIII, 75th General Session in May 2007.
- REED, K. D., J. K. MEECE, J. S. HENKEL, S. K. SHUKLA. 2003. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, Influenza A and enteropathogens. *Clinical Medical Research* 1:5-12.
- SAVIĆ V, A. LABROVIĆ, T. AMŠEL ZELENKA, M. BALENOVIĆ, S. ŠEPAROVIĆ, L. JURINOVIĆ. 2010. Multiple



introduction of Asian H5N1 avian influenza virus in Croatia by wild birds during 2005-2006 and isolation of the virus from apparently healthy black headed gulls (*Larus ridibundus*). Vector-borne and zoonotic diseases 10(9): 915-920.

- WEBSTER R.G., W.J. BEAN, O.T. GORMAN, T.M. CHAMBERS, Y. KAWAOKA. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 56: 152–179.