

Dr Michał Bednarski
Dr Tomasz Piasecki
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych

***OCENA WYSTĘPOWANIA ENDOPASOŻOTÓW I WYBRANYCH
PATOGENNYCH DROBNOUSTROJÓW U KURAKÓW
LEŚNYCH Z TERENU TPN***



**Badania sfinansowane ze środków funduszu leśnego Państwowego Gospodarstwa Leśnego
Lasy Państwowe przekazanych Tatrzańskiemu Parkowi Narodowemu w roku 2017.**

OPIS UZYSKANYCH WYNIKÓW

W okresie od stycznia 2017 do października 2017 badaniami objęto 127 próbek kału kuraków pochodzących z terenu Tatrzańskiego Parku Narodowego. Łącznie przebadano próbek 26 kału od jarzábka (*Tetrastes bonasia*), 44 od cietrzewia (*Lyrurus tetrix*) i 57 od głuszca (*Tetrao urogallus*).

Wyniki badań parazytologicznych

Badania parazytologiczne kału wykonano dwoma metodami: metodą flotacji przy zastosowaniu komory McMastera (ocena ilości jaj oraz oocyst) oraz metodą sedimentacji (dekantacji). Uzyskane wyniki były interpretowane w oparciu o klucze parazytologiczne z uwzględnieniem specyficznych dla danego gatunku pasożytów. Wyniki badań parazytologicznych zestawiono w tabelach 1-3.

Tab. 1 Wyniki badań parazytologicznych próbek kału jarzábka (*Tetrastes bonasia*) n=26

Pasożyt	Liczba zakażonych (%)	Średnia liczba jaj/oocyst u osobników zarażonych w gramie kału	Uwagi
<i>Eimeria sp.</i>	1 (3,84)	100,0	
<i>Hymenolepis spp.</i>	2 (7,69)	3,5	
<i>Capillaria sp.</i>	8 (30,77)	53,5	
<i>Heterakis spp.</i>	0	0	
<i>Ascaridia sp.</i>	0 (0)	0	
<i>Syngamu trachea</i>	2 (7,69)	14,5	

Tab. 2 Wyniki badań parazytologicznych próbek kału cietrzewia (*Tetrao tetrix*) n=44

Pasożyt	Liczba zakażonych (%)	Średnia liczba jaj/oocyst u osobników zarażonych w gramie kału	Uwagi
<i>Eimeria lyruri</i>	6 (13,64)	24,67	
<i>Hymenolepis spp.</i>	0 (0)	0	
<i>Capillaria sp.</i>	9 (20,45)	45,78	
<i>Heterakis spp.</i>	1 (2,27)	5	
<i>Ascaridia sp.</i>	0 (0)	0	
<i>Syngamu trachea</i>	0 (0)	0	

Tab. 3 Wyniki badań parazytologicznych próbek kału głąszca (*Tetrao urogallus*) n=57

Pasożyt	Liczba zakażonych (%)	Średnia liczba jaj/oocyst u osobników zarażonych w gramie kału	Uwagi
<i>Eimeria sp.</i>	5 (8,77)	1048	Silna inwazja u jednego osobnika 4100 oocyst/g
<i>Hymenolepis spp.</i>	0 (0)	0	
<i>Capillaria sp.</i>	9 (15,79)	38,2	
<i>Heterakis spp.</i>	1 (1,75)	4	
<i>Ascaridia sp.</i>	0 (0)	0	
<i>Syngamu trachea</i>	0 (0)	0	

W badanym materiale najczęściej stwierdzano jaja nicieni z rodzaju *Capillaria* spp., której obecność stwierdzono w 30,77% odchodów jarząbka, w 20,45% odchodów cietrzewia oraz 15,79% odchodów głąszca. Infestacja nie była wysoka i wahała się w granicach od 38,2 jaj/g u głąszca do 53,5 jaj/g u jarząbka. Stosunkowo często stwierdzano oocysty kokcydii. Odsetek zakażonych zwierząt wynosił 3,84%, 13,64% i 8,77% odpowiednio dla jarząbka, cietrzewia i głąszca. Średnia liczba oocyt była niska. Wyjątek stanowił samica głąszca z rejonu Hali Gąsienicowej, w której kale stwierdzono aż 4100 oocyst/g.

Ponadto stwierdzono pojedyncze przypadki zakażeń *Heterakis spp.* oraz co istotne u w odchodach jarząbków wykazano obecność jaj *Syngamus trachea*. Pasożyt ten bytuje w tchawicy lub dużych oskrzelach i może być przyczyną poważnych zaburzeń ze strony układu oddechowego oraz osłabienia zarażonych osobników.

Badania mikrobiologiczne

Badania molekularne wyizolowanych szczepów

Badanie antybiotykooporności metodą MIC

Określenie częstości występowanie zakażeń pałeczkami *Salmonella*

W badanym materiale nie stwierdzono obecności pałeczek *Salmonella*.

Określenie częstości występowanie zakażeń pałeczkami *E. coli*

Badania odnośnie wykrywania i charakterystyki szczepów *E. coli* były prowadzone przy wykorzystaniu reakcji multiplex-PCR w kierunku wykrywania charakterystycznych dla APEC genów zjadliwości. W ramach badań sprawdzono następujące geny zgodnie z metodyką opracowaną przez Ewers i wsp. (2004 and 2005) oraz Vidal i wsp. (2004): gen ciepłostalącej enterotoksyny - a heat-stable enterotoxin (*astA*), *iss* - increased serum survival protein (białko zwiększające przeżywalność w surowicy), geny czynników odpowiadające za pozyskiwanie żelaza: *iucD* (iron acquisition-related factors aerobactin) oraz *irp2* (iron-repressible protein); czynniki odpowiadające za kolonizację: *papC* (pyelonephritis-associated pili) i termostabilna hemaglutynina (*tsh*); oraz opisane w ostatnim czasie geny *vat* (vacuolating autotransporter toxin - toksyna autotransportera wakuolowego) oraz geny z plazmidu colicin V (ColV) - (*cva* i *cvi*). Dodatkowo badano obecność specyficznej dla ptaków shiga toksyny - *stx2f* oraz genu *bfp* specyficznego dla szczepów *E. coli* izolowanych i patogennych dla człowieka (typowe enteropatogenne *E. coli* - EPEC).

Tab. 4 Częstość występowania poszczególnych genów zjadliwości APEC u jarzábka, cietrzewia i głuszca.

Gen	Jarzábek	Cietrzew	Głuszec	Łącznie
	(<i>Tetrastes bonasia</i>)	(<i>Tetrao tetrix</i>)	(<i>Tetrao urogallus</i>)	
	n=26	n=44	n=57	n=127
	Liczba (%)	Liczba (%)	Liczba (%)	Liczba (%)
astA	3 (11,53)	2 (4,54)	3 (5,26)	8 (6,29)
iss	2 (7,69)	0 (0,00)	1 (1,75)	3 (2,36)
iucD	1 (3,85)	1 (2,27)	0 (0,0)	2 (1,57)
irp2	4 (15,38)	1 (2,27)	2 (3,51)	7 (5,51)
papC	0 (0,0)	1 (2,27)	0 (0,0)	1 (0,79)
tsh	1 (3,85)	0 (0,00)	1 (1,75)	2 (1,57)
vat	1 (3,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,79)
cvaA/B	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
cvi/ cvaC	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
stx2f	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
bfp	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

Gany wiruencji takie jak *astA*, *iss*, *iucD*, *irp2*, *tsh*, *vat*, czy *cvi/cva*, oraz *papC*, są charakterystyczne dla szczepów *E. coli* izolowanych od kuraków udomowionych z przypadków kolibakteriozy (Maynard i wsp.. 2004). Jednym z najważniejszych czynników zjadliwości APEC jest plazmid ColV. Są na nim liczne geny odpowiadające za wirulencje szczepów. Co więcej częstość jego występowania jest bardzo wysoka wśród izolatów *E. coli* z przypadków kolibakteriozy u drobiu, głównie kurcząt (Johnson i wsp.. 2006, Ewers i ws. 2004). W przypadku żadnego badanego szczepu *E. coli* nie stwierdzono obecności omawianego plazmidu - nie wykazano obecności genów plazmidowych *cvi/cva*. Jednak w przypadku badanych próbek stwierdzono występowania z różną częstością innych genów wirulencji o mniejszym znaczeniu jak: *iss*, *tsh*, i *iucD*. Do najczęściej notowanych genów należą: *iss* oraz *irp2*. Co ciekawe najwięcej genów zjadliwości występowało w kale jarzábków.

Badania wrażliwości wyizolowanych szczepów *E. coli* na wybrane chemioterapeutyki metodą MIC

Najmniejsze stężenia hamujące (MIC) oznaczono metodą rozcieńczeń w podłożu płynnym zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS), uznającymi tę metodą za referencyjną dla *E. coli*. Badania zostały wykonane na podłożu płynnym Mueller-Hintona (Mueller Hinton Agar II, Oxoid) z dodatkiem chemioterapeutyków w odpowiednich stężeniach. Badania wykonano dla następujących chemioterapeutyków: ampicylina, cafatoksymina, caftazidim, getnamycyna, streptomycyna, ciprofloksacyna, tetracyklina, chloramfenikol, florfenikol, kolistyna, trimetoprim i sulfametaksazol (Sigma-Aldrich). Jako kontroli użyto szczep referencyjny *E. coli* ATCC 25922. Na potrzeby badań wykorzystano wartości graniczne określające wrażliwość szczepów opracowane przez European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing oraz Andersa 2001.

Tab. 5. Zakres wartości granicznych wykorzystanych w interpretacji badań metodą MIC

Chemioterapeutyki	Wrażliwy (mg/L)	Średnio wrażliwy (mg/L)	Oporny (mg/L)
Ampicylina	≤8	-	8<
Cafatoksymina	≤1	2	2<
Getnamycyna	≤8	-	8<
Streptomycyna	≤16	-	16<
Ciprofloksacyna	1≤	2	2<
Tetracyklina	≤4	8	8<
Chloramfenikol	≤8	16	<16
Florfenikol	≤4	8	<8
Kolistyna	≤2		<2
Trimetoprim	≤2	4	<4
Sulfametaksazol	≤256	-	<256

Na podstawie przeprowadzonych badań wrażliwości poszczególnych szczepów metodą M.I.C. stwierdzono, że szczepy wyizolowane od kuraków z terenu lasów Tatrzańskiego Parku Narodowego charakteryzują się bardzo niską opornością na badane chemioterapeutyki. Wszystkie badane szczepy wykazały oporność względem ampicyliny oraz

streptomycyny. Niewielki odsetek szczepów opornych stwierdzono jedynie względem ampicyliny (7,88%), ciprofloksacyny (6,29%) i tetracykliny (5,51%). Nie stwierdzono natomiast szczepów opornych względem pozostałych antybiotyków.

Ptaki dzikie nie mają w sposób naturalnych kontaktu z antybiotykami, jednak mogą one ulegać zakażeniu szczepami posiadającymi geny oporności. Źródłem zakażenia mogą być: ludzie, zwierzęta hodowlane i ich kał a także skontaminowane środowisko. Zjawisko występowania antybiotykooporności u ptaków dzikich zostało opisane już stosunkowo dawno bo w pod koniec lat 70 i na początku 80 ubiegłego wieku (Sato i wsp. 1978, i wsp. 1981). Obecnie występowanie tego zjawisko to jest już stosunkowo dobrze opisane.

Podsumowanie

Wyniki badań wskazują na wysoką zdrowotność populacji kuraków tatrzańskich. Uzyskane wyniki badań parazytologicznych wskazują, że najczęściej notowanymi pasożytami były *Capilaria* sp. oraz *Eimeria* sp.. *Capilaria* sp. jest uznawana u ptaków za mało patogenego pasożyta, natomiast poszczególne gatunki *Eimeria* sp.. mogą różnić się względem patogenności i zwykle stanowią problem u młodych osobników. Należy podkreślić, że tylko w jednym przypadku ze względu na bardzo wysoką liczbę oocyst mogła *Eimeria* być przyczyną choroby. W zakresie badań mikrobiologicznych natomiast stwierdzono bardzo niską prewalencją genów zjadliwości typowych dla szczepów patogennych dla ptaków, a z drugiej bardzo niską antybiotykooporność wyizolowanych szczepów. Na podkreślenie zasługuje fakt nie stwierdzenia pałeczek *Salmonella*.