

# Kandydiaza u gwarka czczonego

MAGDALENA KIZERWETTER, ANDRZEJ KRUSZEWICZ\*,  
BORYS BŁASZCZAK, MARIAN BINEK

Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej KNP Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,  
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

\*Miejski Ogród Zoologiczny, ul. Ratuszowa 1/3, 03-461 Warszawa

Kizerwetter M., Kruszewicz A., Błaszczak B., Binek M.

## Megabacteriosis in *Gracula religiosa*

### Summary

Megabacteria, recently recognised as avian enteric yeast (AEY), are associated with disease and death in Budgerigars and a range of other birds. The article describes the first confirmed detection of AEY in Poland in droppings of *Gracula religiosa*. Gram stained slides of deep smears revealed many large Gram-positive rods. They grew well on Sabourand agar with chloramphenicol and yeast-like colonies occurring in about 2-3 days. The microscopic substance which flourished on the fixed smears from the colonies had thin-walled, oval, budding cells and the presence of pseudohyphae. API ID 32 C identified the colony as *Candida kruzei*. These so-called Megabacteria seem to be a so-far undescribed yeast.

**Keywords:** megabacteriosis, *Gracula religiosa*, AEY

W patologii przewodu pokarmowego ptaków od niedawna znana jest choroba zwana megabakteriozą, charakterystyczna dla papużek falistych. Czynniki etiologiczne wykryto na początku lat osiemdziesiątych i w nawiązaniu do dużych rozmiarów mikroorganizmów obecnych w preparatach bezpośrednich, nazwano megabakteriami. Trudności w uzyskaniu hodowli tych mikroorganizmów spowodowały wiele wątpliwości odnośnie ich przynależności do bakterii czy grzybów. Dopiero ostatnie badania (1, 3) wskazują na grzybiczą naturę tych mikroorganizmów. Z tego powodu poprawniejsza wydaje się nazwa angielska – avian enteric yeast (AEY).

Morfologicznie AEY mają kształt prostych cylindrycznych komórek o dużych rozmiarach: średnicy 1 do 5  $\mu\text{m}$  i długości 20 do 50  $\mu\text{m}$ . Barwią się Gram-dodatnio. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały obecność jądra komórkowego otoczonego błoną jądrową, a w ścianie komórkowej znaleziono celulozę i chitynę, co jest charakterystyczne dla komórek grzybów. Hodowla AEY jest trudna i wymaga użycia podłoży stosowanych do izolacji grzybów. Niektórzy autorzy zalecają podłoże agarowe z krwią lub podłoże MRS z dodatkiem 5% sacharozy i 100 mg/l enroflokscyny, jednak podłoża i warunki hodowli nie są jeszcze ostatecznie ustalone (8, 9).

AEY są uważane za czynniki etiologiczne syndromu występującego u papużek falistych, przebiegającego z postępującym wyniszczeniem i często kończącego się śmiercią ptaka, tzw. going light syndrome (4). Ostatnie dane potwierdzają zakażenia AEY wielu in-

nych gatunków ptaków np.: kanarków, zięb, strusi (5, 6), kurcząt (7).

Niniejsze opracowanie dotyczy pierwszej w kraju izolacji szczepu mikroorganizmów odpowiedzialnych za megabakteriozę i określenia ich właściwości biochemicznych.

### Materiał i metody

Dorosły gwarek czczony (*Gracula religiosa*) wykazywał objawy przewlekłej biegunki i znacznego wychudzenia. Ptak bez efektu był leczony chinolonami. W preparatach bakterioskopowych przygotowanych z kału stwierdzono liczne mikroorganizmy morfologicznie odpowiadające AEY. Przerwano leczenie gwarka chinolonami i podawano ptakowi w wodzie do picia kwas cytrynowy w celu zakwaszenia treści przewodu pokarmowego oraz preparaty witaminowe. Stan ptaka uległ poprawie, biegunka ustąpiła.

Do badania bakteriologicznego pobrano świeże próbki kału i wykonano bezpośrednie preparaty bakterioskopowe barwione metodą Grama i błękitem metylenowym. Poszukiwano obecności gram-dodatnich prostych, cylindrycznych komórek o dość dużych rozmiarach, wielokrotnie przewyższających typowe wymiary bakterii. Z pobranego materiału wykonano posiewy na standardowe podłoża stałe, jak agar z krwią, podłoże MacConkeya i podłoże płynne z kwaśnym seleninem sodowym oraz na podłoże stałe ATP agar z dodatkiem krwi i 200 mg/l neomycyny, na podłoże Sabourauda z chloramfenikolem, Sabourauda z chloramfenikolem i Tweenem 40 oraz Sabourauda z chloramfenikolem i aktydionem. Posiewy inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych oraz mikroaerofilnych (20% CO<sub>2</sub>). Wyrosłe mikroorganizmy identyfikowano na

podstawie cech wzrostu, badania mikroskopowego i właściwości biochemicznych oznaczanych w teście API 20E, API ID 32C i odczytywanych automatycznie przy pomocy analizatora mini API.

### Wyniki i omówienie

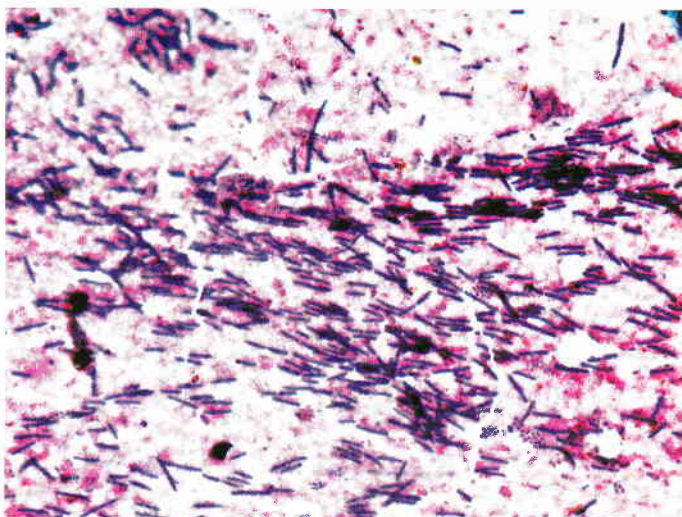
W badaniu mikrobiologicznym preparatów bezpośrednich z kału, stwierdzono obecność licznych dużych cylindrycznych komórek o wymiarach, kształcie i naturalnych układach odpowiadających opisowi megabakterii (ryc. 1, 2).

Z posiewu kału na podłożu agarowym z krwią i podłożu MacConkeya izolowano *E. coli*, *Klebsiella sp.* i *Enterococcus sp.* Nie stwierdzono wzrostu *Salmonella*. Na podłożu Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu inkubowanego w warunkach mikroaerofilnych uzyskano wzrost licznych kolonii przypominających drożdże. Kolonie nr 1 były białe, okrągłe, połyskujące i miały średnicę 2-3 mm. Kolonie nr 2 miały barwę kremowobiałą, były okrągłe i połyskujące, o średnicy

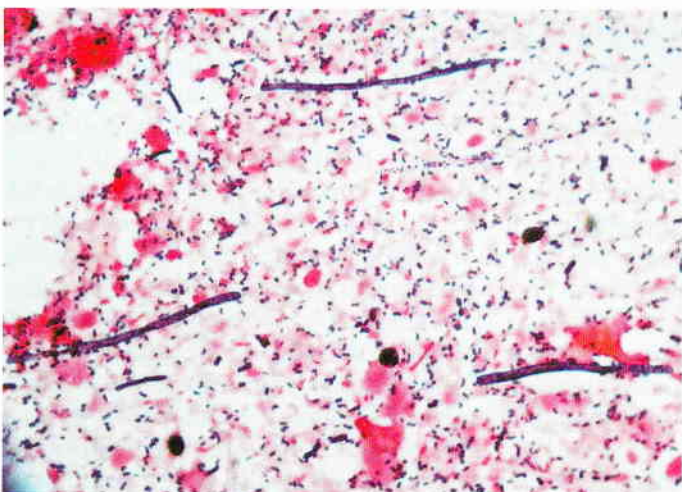
2 mm. W preparacie mikroskopowym sporządzonym z kolonii nr 1 stwierdzono typowe komórki drożdżopodobne z charakterystycznymi wypustkami (ryc. 3). W preparacie mikroskopowym sporządzonym z kolonii nr 2 stwierdzono komórki wykazujące duży pleomorfizm, zróżnicowaną wielkość z tendencją do tworzenia długich filamentów (ryc. 4).

Wyniki biochemicznego różnicowania dwóch szczepów grzybów drożdżopodobnych przedstawiono w tab. 1.

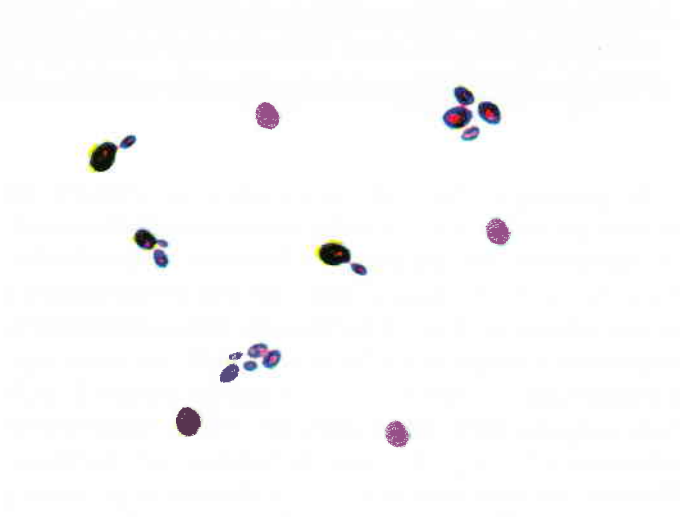
Po 24 godzinach inkubacji szczep o typowych komórkach drożdżopodobnych rozpoznano jako *Candida lusitaniae* (identyfikacja niepewna, % id = 91,5), po 48 godzinach również jako *Candida lusitaniae* (bardzo dobra identyfikacja w odniesieniu do rodzaju, % id = 91,4). Szczep o komórkach pleomorficznych tworzących filamente po 24 i 48 godzinach rozpoznano jako *Candida krusei* (dobra identyfikacja w zakresie rodzaju, % id = 85,9). W obu przypadkach uzyskano dobrą identyfikację rodzaju grzybów. Rozpozna-



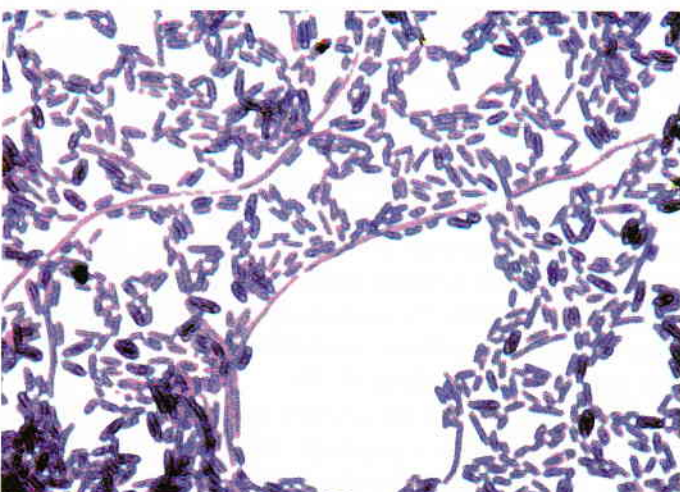
Ryc. 1. Preparat bezpośredni z kału barwiony metodą Grama, powiększenie 1000×



Ryc. 2. Preparat bezpośredni z kału barwiony metodą Grama, powiększenie 1200×



Ryc. 3. Preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama sporządzony z kolonii nr 1. Widoczne charakterystyczne komórki tworzące wypustki. Powiększenie 1200×



Ryc. 4. Preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama sporządzony z kolonii nr 2. Powiększenie 1200×



Tab. 1. Właściwości biochemiczne wyizolowanych szczepów grzybów drożdżopodobnych określone przy użyciu testu ID 32 C

Wzrost na podłożu z	Badany szczep			
	1		2	
	Wynik reakcji po godz.			
	24	48	24	48
Galaktozą	?	+	-	-
Aktydionem	-	-	-	-
Sacharozą	+	+	-	-
N-acetylo-glukozaminą	?	+	+	+
Mleczanem	-	-	+	+
Arabinozą	-	-	-	-
Celobiozą	+	+	-	-
Rafinozą	-	?	-	-
Maltozą	+	+	-	-
Trehalozą	+	+	-	-
2-keto-glukonianem	+	+	-	-
$\alpha$ -metylo-glukozydazą	-	+	-	-
Sorbitolem	+	+	-	-
Ksylozą	-	+	-	-
Rybozą	-	-	-	-
Glicerolem	+	+	-	-
Ramnozą	+	+	-	-
Palatynozą	+	+	-	-
Erytrytolem	-	-	-	-
Melibiozą	-	-	-	-
Glukuronianem	-	-	-	-
Melezytozą	+	+	-	-
Glikonianem	-	+	-	-
Lewulinianem	-	-	-	-
Mannitolem	+	+	-	-
Laktozą	-	-	-	-
Inozytolem	-	-	-	-
Glukozą	+	+	+	+
Sorbozą	+	+	-	-
Glukozaminą	+	+	-	-
Identyfikacja	<i>Candida lusitanae</i>		<i>Candida krusei</i>	

Objaśnienia: ? – wynik reakcji niepewny

nie gatunku pozostaje niepewne i nie jest wykluczone, że są to drożdżaki należące do nieznanymi jeszcze gatunków.

W piśmiennictwie krajowym brak jest danych na temat występowania megabakteriozy u ptaków. Opisywany przypadek dotyczy pierwszej izolacji mikroorganizmów odpowiedzialnych za przewlekłą biegunkę

u ptaka nie poddającą się leczeniu antybiotykami. Ustne informacje lekarzy weterynarii wskazują na występowanie tego schorzenia u wielu gatunków ptaków ozdobnych.

Czynnik etiologiczny megabakteriozy przez wielu badaczy był zaliczany do bakterii i wśród lekarzy weterynarii i hodowców ptaków przyjęła się nazwa megabakterie. Jak wykazały ostatnie badania (1, 3) taksonomicznie mikroorganizmy te należą do grzybów. Wyizolowane od gwarka dwa gatunki mikroorganizmów z całą pewnością należą do grzybów, o czym świadczy przeprowadzone badanie mikrobiologiczne. W preparacie bezpośrednim wykonanym z kału, prawdopodobnie występowała mycelialna forma grzybów. Inni autorzy (6, 8) również zaobserwowali duży pleomorfizm komórek oraz tendencję do zmniejszania się ich rozmiarów przy porównaniu w preparatach bezpośrednich i preparatach z hodowli *in vitro*. Identyfikacja biochemiczna pozwoliła na zaliczenie wyizolowanych mikroorganizmów do rodzaju *Candida*, natomiast przynależność do gatunku pozostaje niepewna.

Objawy drożdżycy nie są specyficzne. W chronicznym przebiegu choroby obserwuje się postępujący spadek masy ciała w przebiegu 8 do 12 miesięcy. Apetyt jest pozornie zachowany, ale w rzeczywistości karma jest tylko rozkruszana i rozrzucana po klatce (9). Inne objawy to: depresja, biegunka, obecność niestrawionej karmy w kale. W przebiegu ostrym występują wymioty z dodatkiem krwi, ślady krwi w kale. W ciągu 24-48 godzin może dojść do śmierci ptaka na skutek krwotoku z żołądka gruczołowego (2). W opisanym przypadku przewlekła biegunka spowodowała krańcowe wychudzenie ptaka. Oddawany kał miał barwę jasnobrązową.

AEY znaleziono również w wypluczynach dróg oddechowych u młodego kota i dwuletniego psa z przewlekłymi chorobami układu oddechowego (3). Możliwe, że u tych ssaków występuje chemiczne podobieństwo śluzu w drogach oddechowych do warstwy zrogowaciałej w żołądku ptaków (5). Eksperymentalne zakażenie myszy szczepem AEY izolowanym od kurcząt, spowodowało typowe objawy ze strony układu pokarmowego. Spośród 15 myszy 4 padły z powodu ciężkiego zapalenia płuc. W badaniu histopatologicznym płuc i drzewa oskrzelowego stwierdzono duże ilości drożdżaków (7).

Obecność drożdżaków można wykazać wykonując preparat bezpośredni barwiony metodą Grama z kału lub zeszkrobiny z błony śluzowej żołądka gruczołowego (1, 9). U niewielkiego odsetka badanych ptaków nie udaje się jednak wykryć tych mikroorganizmów w kale, co prawdopodobnie związane jest z okresowym ich wydalaniem. W celu uniknięcia fałszywie ujemnego wyniku należy zbadać kilka próbek kału pobranych w krótkim odstępie czasu (1, 4). Z kolei u innych ptaków stwierdza się obecność drożdżaków w kale, mimo braku widocznych objawów chorobowych (2, 8-10).

W patomechanizmie choroby istotny jest wzrost pH soku żołądkowego z poniżej 2 do 7-8, co powoduje zmniejszenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za utwardzanie warstwy zrogowaciałej w żołądku mięśniowym. Normalnie twarda warstwa staje się miękka i cienka, dzięki czemu nie jest możliwe prawidłowe rozcieranie pokarmu.

Badanie krwi ujawnia niespecyficzne zmiany, jak obniżenie liczby czerwonych krwinek, leukocytozę, monocytozę, bazofilie, obniżenie poziomu białka i elektrolitów. Diagnozę można potwierdzić badaniem radiologicznym przewodu pokarmowego ze środkiem kontrastującym, które uwidacznia rozszerzenie żołądka gruczołowego. Ostateczne rozpoznanie może być potwierdzone badaniem sekcyjnym i histopatologicznym.

Badaniem sekcyjnym stwierdza się wychudzenie, wole i żołądek gruczołowy są zwykle puste. Żołądek gruczołowy jest ponadto powiększony 1 do 3 razy, a jego błona śluzowa wykazuje zmiany zapalne, jest pokryta cienką warstwą białego śluzu, charakterystyczne są owrzodzenia, szczególnie w okolicy przejścia do żołądka mięśniowego. W ostrym przebiegu choroby po wystąpieniu krwawienia obserwuje się krew w treści przewodu pokarmowego (4).

W preparatach histopatologicznych charakterystyczne są skupiska dużych komórek drożdżaków ułożonych równolegle do błony śluzowej. Najwięcej jest ich w miejscach owrzodzeń lub martwicy w żołądku gruczołowym i przejściu w żołądek mięśniowy. W błonie śluzowej żołądka gruczołowego obserwuje się zmiany charakterystyczne dla procesu zapalnego, nacieki komórek monojądrzastych, owrzodzenia i martwicę błony śluzowej, niekiedy niewielkie cysty (1, 4).

Opisany przypadek zakończył się ustąpieniem objawów klinicznych, więc ocena zmian sekcyjnych i histopatologicznych nie była możliwa.

Leczenie drożdżyc antybiotykami przeciwbakteryjnymi jest nieskuteczne. Lekiem z wyboru jest amfoterycyna B w dawce 100 mg/kg podawana doustnie dwa razy dziennie przez okres 10 dni do 4 tygodni. Jak wiadomo bakterie są niewrażliwe na amfoterycynę B działającą na sterole w ścianie komórkowej grzybów. Potwierdza to pośrednio przynależność AEY do grzybów. Z innych leków polecana jest nystatyna i ketokonazol. Leczenie wspomagające obejmuje zakwaszanie treści przewodu pokarmowego przez podawanie wody z dodatkiem kwasu cytrynowego, octu lub preparatów zawierających *Lactobacillus sp.* W nielicznych przypadkach nieskuteczne jest również leczenie amfoterycyną B. Wykazano bowiem przypadki oporności szczepów AEY na ten lek (10). Wygodną metodą podawania ptakom leków jest podawanie ich w wodzie do picia. Amfoterycyna B jest jednak słabo rozpuszczalna w wodzie, co utrudnia uzyskanie stężenia terapeutycznego (4). Leczenia środkami przeciwgrzybiczymi nie powinno się stosować u ptaków nie wykazujących objawów chorobowych, u których stwierdzono jedynie obecność drożdżaków w kale.

Zapobieganie chorobie obejmuje rozpoznanie ptaków chorych lub nosicieli przez okresowe badanie próbek kału i odizolowanie ich z hodowli. Badania wykazały, że z jaj zakażonych par można uzyskać zdrowe potomstwo, po szybkim umieszczeniu jaj w inkubatorze (4).

Konieczne jest dalsze badanie tych mikroorganizmów i dokładne określenie ich właściwości, roli w patologii tego schorzenia i wrażliwości na leki. Istotne jest informowanie lekarzy weterynarii o nowych czynnikach zakaźnych występujących u ptaków, tym bardziej że opisano przypadki zachorowań wywołanych przez AEY u drobiu (7) i strusi hodowlanych (5, 6).

## Piśmiennictwo

1. Baker J. R.: Megabacteriosis in exhibition budgerigars. Vet. Rec. 1992, 131, 12-14.
2. Baker J. R.: Megabacteria in diseased and healthy budgerigars. Vet. Rec. 1997, 140, 627.
3. Cooke S. W.: Role of megabacteria in mammals. Vet. Rec. 2000, 146, 444.
4. Filippich L. J., Hendrikz J. K.: Prevalence of megabacteria in budgerigar colonies. Aust. Vet. J. 1998, 76, 92-95.
5. Huchzermeyer F. W., Henton M. M.: Megabacteria in mammals. Vet. Rec. 2000, 146, 768.
6. Huchzermeyer F. W., Henton M. M., Keffer R. H.: High mortality associated with megabacteriosis of proventriculus and gizzard in ostrich chicks. Vet. Rec. 1993, 133, 143-144.
7. Rossi G.: Possibility of infecting mammals with megabacteria isolated from birds. Vet. Rec. 2000, 147, 371-372.
8. Scalan C. M., Graham D. L.: Characterization of a gram-positive bacterium from the proventriculus of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Avian Dis. 1990, 34, 779-786.
9. Simpson V. R.: Megabacteriosis in exhibition budgerigars. Vet. Rec. 1992, 131, 203-204.
10. Tonelli A.: Megabacteriosis in exhibition budgerigars. Vet. Rec. 1993, 132, 492.

Adres autora: lek. wet. Magdalena Kizerwetter, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: magdakiz@wp.pl

**VAN DE ZANDE S., NAUWYNCK H., PENSART M.: Skuteczność szczepionek pneumowirusowych przeciwko łącznemu zakażeniu indyków pneumowirusem ptasim/*Escherichia coli* O2:K1. (Efficacy of avian pneumovirus vaccines against an avian pneumovirus/*Escherichia coli* O2:K1 dual infection in turkeys). Vet. Rec. 150, 340-343, 2002 (11)**

Przeprowadzono badania kliniczne, sekcyjne i mikrobiologiczne indyków szczepionych atenuowaną szczepionką przeciwko pneumowirusowi ptaków (APV) po zakażeniu zjadliwym szczepem (A/T6/96, podtyp A) APV i *Escherichia coli* O2:K1. Badania przeprowadzono na indyczątkach w wieku 2 tyg., z których 60 nie posiadało przeciwciał dla APV, a 60 posiadało przeciwciała dla tego wirusa. Szczepionkę zawierającą podtyp A lub B wirusa zastosowano do spojówkowo – donosowo w ilości 3,2 log<sub>10</sub> CD<sub>50</sub> (250 µl/ptak). Po 11 tygodniach ptaki szczepione oraz nieszczepione (kontrola) zakażono donosowo albo zjadliwym szczepem *E. coli* O2:K1 lub APV, bądź APV i po 3 dniach *E. coli* O2:K1. Po zakażeniu APV i *E. coli* u ptaków szczepionych APV podtypem A lub B, niezależnie od obecności lub braku swoistych przeciwciał w momencie szczepienia, objawy kliniczne były słabiej zaznaczone aniżeli u ptaków nieszczepionych. U szczepionych osobników replikacja wirusa po zakażeniu była wybitnie ograniczona i nie izolowano *E. coli*. Wyjątek stanowiły indyczątki szczepione podtypem B APV.