

Krętki z rodzaju *Brachyspira* jako czynnik etiologiczny spirochetozy jelitowej ptaków

MAGDALENA KIZERWETTER-ŚWIDA, MAGDALENA RZEWUSKA, MARIAN BINEK

Katedra Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Kizerwetter-Świda M., Rzewuska M., Binek M.

Spirochetes of Brachyspira spp. as an etiological agent of avian intestinal spirochaetosis

Summary

Spirochetes Brachyspira spp. are found in large intestines of humans and animals. The following pathogenic species of *Brachyspira* are involved in avian intestinal spirochaetosis (AIS): *B. alvinipulli*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia* and *B. hyodysenteriae*. There are also unclassified spirochetes isolated from birds, which are known as *B. pulli*. AIS may cause significant economical losses in poultry production. AIS seems to be a fairly widespread problem in laying hens and captive rheas. Chronical infections with a mild course of the disease are difficult to diagnose and only limited data concerning the prevalence, controlling and prevention of AIS are available.

Keywords: *Brachyspira*, poultry, spirochaetosis

Bakterie należące do rodzaju *Brachyspira* bytują w jelitach grubych u ludzi i zwierząt. Mogą występować w jelitach ptaków, w tym głównie u kur niosek, brojlerów kurzych, strusi oraz ptaków wolno żyjących, takich jak: kaczki, bażanty, łabędzie i in. (7-9, 15, 24-26). W ostatnich latach coraz więcej badań poświęconych jest krętkom *Brachyspira* występującym u ptaków, choć mechanizmy ich chorobotwórczości w dalszym ciągu pozostają niewyjaśnione.

Kolonizacja krętków *Brachyspira spp.* w jelitach ślepych oraz w jelicie prostym u ptaków prowadzi do rozwoju spirochetozy jelitowej (avian intestinal spirochaetosis AIS). Jest to podostra lub przewlekła choroba przewodu pokarmowego przebiegająca z biegunką i obniżeniem produktywności. Sporadycznie AIS może mieć ostry przebieg. Rozpoznanie spirochetozy jelitowej ptaków jest trudne, ponieważ krętków nie izoluje się podczas rutynowego badania bakteriologicznego. Bakterie te również słabo wybarwiają się metodą Grama w preparatach bezpośrednich z próbek odchodów czy treści jelitowej. Zakażenia mają najczęściej przebieg przewlekły, a objawy kliniczne są niespecyficzne i słabo wyrażone (13, 24).

Taksonomia krętków *Brachyspira spp.*

Według najnowszej taksonomii rodzaj *Brachyspira* zaliczany jest do typu B XVII, klasy *Spirochaetes*, rzędu *Spirochaetales*, rodziny *Spirochaetaceae* (3). Obecnie do rodzaju *Brachyspira* zaliczanych jest 6 gatunków: *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*,

B. alvinipulli, *B. innocens*, *B. murdochii* oraz *B. aalborgi*. Wielu szczepów wyizolowanych od ptaków nie można zaklasyfikować do istniejących gatunków. Przypuszczalnie mogą one stanowić nowy gatunek lub gatunki. Izolaty te mają zróżnicowane cechy fenotypowe oraz pewne wspólne cechy genotypowe, takie jak sekwencje genów 16S rRNA oraz profil MEE (multi-locus enzyme electrophoresis) (7, 22, 24). Na tej podstawie często zaliczane są do wspólnej grupy *B. pulli*. McLaren i wsp. posługując się techniką MEE wykazali, że spośród 56 szczepów wyizolowanych w Australii, USA, Wielkiej Brytanii i Holandii ponad połowa, bo aż 56,4% należała do grupy *B. pulli* (13).

Morfologia krętków *Brachyspira spp.*

Krętki z rodzaju *Brachyspira* są bakteriami Gram-ujemnymi o cienkich, silnie wydłużonych i skręconych komórkach. Ich długość waha się od 5,2 do 12,9 μm , a średnica od 0,19 do 0,40 μm . W hodowlach po 7 dniach inkubacji można obserwować nietypowe, kuliste formy tych bakterii (7, 24).

W przestrzeni periplazmatycznej znajdują się włókna osiowe ułożone wzdłuż protoplazmatycznego cylindra, w liczbie charakterystycznej dla gatunku (od 8 do 30). Włókna osiowe mają zdolność kurczenia się i rozkurczania, co umożliwia krętkom ruch. Obserwacja morfologii oraz charakterystycznego sposobu poruszania się krętków w preparatach bezpośrednich jest jednym z elementów przyżyciowej diagnostyki chorób wywoływanych przez te bakterie (24).

Spirochetoza jelitowa ptaków (AIS)

Gatunkami krętków chorobotwórczymi dla ptaków są *B. alvinipulli*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia* oraz *B. hyodysenteriae*. Trzy pierwsze wymienione gatunki oraz grupa szczepów, które do tej pory nie zostały dokładnie zidentyfikowane, określane mianem *B. pulli*, wywołują spirochetozę jelitową ptaków o łagodnym przebiegu u niosek oraz brojlerów kurzych (7, 21, 24). Do charakterystycznych objawów AIS należą: zwiększona zawartość wody w kałomoczu, opóźnienie wzrostu, zabrudzenie okolicy kloaki oraz skorup znoszonych jaj odchodami, znoszenie jaj o zmniejszonej masie i o obniżonej zawartości karotenoidów w żółtku, a także zwiększenie wykorzystania paszy podczas chowu oraz obniżenie nieśności. Objawy te nie zawsze są charakterystyczne i np. biegunka może wystąpić tylko u 25% ptaków w stadzie. Padnięcia u drobiu występują rzadko. Nasilenie objawów jest obserwowane w okresach zwiększonego stresu ptaków, np. podczas pierzenia lub transportu ptaków (23, 24).

W obrazie sekcyjnym widoczne jest wypełnienie jelit ślepych pianistą, żółtą lub brązowo-żółtą treścią. Mikroskopowo stwierdza się łagodne limfocytarne zapalenie jelit ślepych i okrężnicy. Przy zakażeniu *B. pilosicoli* charakterystyczny jest obraz krętków przyczepionych jednym biegunem do komórek błony śluzowej jelit (7, 13, 24).

Spirochetoza jelitowa o ciężkim przebiegu występuje zwykle u młodych strusi, w wieku poniżej 6 miesięcy. Czynnikiem etiologicznym jest *B. hyodysenteriae*. W wyniku zakażenia dochodzi do martwicowego zapalenia jelit ślepych i okrężnicy. Choroba przebiega z dużą śmiertelnością. Nasilenie objawów obserwowane jest w okresie późnego lata lub wczesnej jesieni (9, 20, 24).

Rozpoznawanie AIS

Diagnostyka kliniczna spirochetozy jelitowej ptaków jest trudna, ponieważ objawy kliniczne nie zawsze są charakterystyczne. Równie trudna jest diagnostyka laboratoryjna tej choroby. Krętki należą do bakterii ściśle beztlenowych o wysokich wymaganiach

wzrostowych, *in vitro* nie tworzą typowych kolonii, co powoduje, że uzyskanie czystej kultury jest trudne, a identyfikacja bakterii jest skomplikowana.

Materiałem do badania są próbki odchodów, wymazy z kloaki oraz fragmenty jelit ślepych. Pobrany materiał należy transportować w temperaturze 4°C, czas transportu powinien być ograniczony do minimum. Korzystne jest również przesyłanie próbek w szczelnych pojemnikach i w beztlenowej atmosferze, ponieważ krętki *Brachyspira* są bakteriami bardzo wrażliwymi na działanie czynników środowiskowych (7, 18, 24).

Cecha krętków często wykorzystywaną we wstępnym rozpoznawaniu AIS jest ich zdolność do ruchu. W preparatach przyżyciowych w mikroskopie kontrastowo-fazowym obserwuje się charakterystyczny sposób poruszania się tych bakterii (obkurczanie, wyciąganie komórki, obrót zgodnie z układem zwojów i ruch gibki). Krętki *Brachyspira* słabo wiążą barwniki anilinowe i słabo barwią się w metodzie Grama. Lepszy wynik barwienia można uzyskać stosując barwienie błękitem Wiktorii R lub solami srebra (7, 24).

Krętki *Brachyspira* spp. *in vitro* namnażają się na stałych podłożach wzbogaconych, do których należy np. agar tryptozowo-sojowy (TSA) z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej. Do izolacji krętków stosowane są podłoża wybiórcze ze spektinomycyną, wankomycyną, kolistyną lub rifampicyną. Inkubację posiewów przeprowadza się w atmosferze ściśle beztlenowej. Optymalna temperatura do wzrostu nie jest ustalona, stosowane są temperatury od 37°C do 42°C. Podczas izolacji zalecana jest temperatura 42°C, ponieważ hamuje wzrost wielu towarzyszących bakterii jelitowych (24).

Najważniejsze cechy fenotypowe, które są brane pod uwagę przy identyfikacji *Brachyspira* spp. to: typ hemolizy, zdolność do produkcji indolu oraz hydrolizowania hipuranu sodu. Pozostałe cechy biochemiczne można badać przy pomocy testu API ZYM, który służy do określania aktywności enzymatycznej bakterii (tab. 1). Krętki występujące w jelitach ptaków należą głównie do tak zwanych krętków słabo β -hemolitycznych (weakly β -haemolytic intestinal spirochetes –

WBHIS). Większość szczepów *Brachyspira* spp. wyizolowanych od ptaków nie wytwarza indolu, produkuje fosfatazę alkaliczną, esterazę, lipazę oraz β -galaktozydazę. Pozostałe cechy biochemiczne są zróżnicowane. Tak duża zmienność cech fenotypowych powoduje, że identyfikacja izolatów krętków wyhodowanych od ptaków ogranicza się często jedynie do określenia rodzaju. Dalsze różnicowanie do po-

Tab. 1. Wybrane cechy fenotypowe różnych gatunków *Brachyspira* spp.

Gatunek	Typ β -hemolizy	Wytwarzanie indolu	Hydroliza hipuranu	α -gal.	α -gluk.	β -gluk.
<i>B. hyodysenteriae</i>	silna	+	-	-	+/-	+
<i>B. pilosicoli</i>	słaba	-	+	+/-	+/-	-
<i>B. intermedia</i>	słaba	+*	-	-	+	+
<i>B. innocens</i>	słaba	-	-	-	+/-	+
<i>B. murdochii</i>	słaba	-	-	-	-	+
<i>B. alvinipulli</i>	słaba	-	+	-	-	+

Objaśnienia: α -gal. – aktywność α -galaktozydazy; α -gluk. – aktywność α -glukozydazy; β -gluk. – aktywność β -glukozydazy; * – szczepy *B. intermedia* wyizolowane od ptaków mogą nie wytwarzać indolu

ziomu gatunku wymaga zwykle zastosowania metod biologii molekularnej, które rzadko są używane w rutynowej diagnostyce (7, 13, 24).

Metody biologii molekularnej umożliwiają precyzyjną identyfikację izolatów oraz określenie stopnia pokrewieństwa poszczególnych szczepów *Brachyspira* spp. Są szczególnie przydatne do identyfikacji krętków słabo β -hemolitycznych. Niektóre z nich, jak np. PCR mogą służyć do wykrywania krętków bezpośrednio w materiale klinicznym (6, 19). Jednak odchody ptaków zawierają moczniki i wiele innych inhibitorów amplifikacji DNA oraz mają niskie pH. Phillips i wsp. (16) zaproponowali procedurę przemywania próbek odchodów ptaków przed izolacją DNA matrycowego, dzięki której znacznie zwiększyła się czułość reakcji, potęgowana dodatkowo przez zastosowanie techniki nested duplex PCR. W pierwszym etapie tej reakcji amplifikowany jest odcinek DNA specyficzny dla rodzaju *Brachyspira*, w drugim etapie stosowane są dwie pary starterów umożliwiające rozpoznanie *B. pilosicoli* oraz *B. intermedia*.

Opracowano wiele reakcji PCR dla poszczególnych gatunków *Brachyspira* spp. Startery dla określonego gatunku mogą być homologiczne do fragmentów różnych genów (12, 13). Nie opracowano jednak do tej pory starterów pozwalających na skuteczną identyfikację *B. alvinipulli*. Inne metody stosowane w różnicowaniu krętków to: elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), sekwencjonowanie genów 16S rRNA, hybrydyzacja DNA, w tym hybrydyzacja *in situ* z użyciem sond znakowanych fluorescencyjnie (FISH), elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym i immunobloting oraz „multilocus enzyme electrophoresis” (MEE).

Niewątpliwą zaletą stosowania techniki PCR jest możliwość szybkiego uzyskania wyniku, ponadto pozytywny wynik PCR pozwala także w wielu przypadkach na precyzyjną identyfikację danego gatunku, a rozpoznanie gatunków słabo β -hemolitycznych jedynie na podstawie cech biochemicznych może być nieprecyzyjne. Zakażenie gospodarza przez dwa gatunki krętków szybciej i skuteczniej wykrywa się przy pomocy metod biologii molekularnej. Często flora bakteryjna obecna w kaale ptaków jest oporna na działanie antybiotyków dodawanych do podłoża selektywnych, co utrudnia izolację krętków. Jak podają Phillips i wsp. (17), spośród 43 próbek, w których przy pomocy PCR potwierdzono obecność *B. intermedia*, w czystej kulturze udało się wyizolować jedynie 24 szczepy. Z kolei tylko tradycyjne metody hodowlane pozwalają na wykrywanie nietypowych wariantów krętków występujących u ptaków oraz na określenie lekowrażliwości wyizolowanych szczepów (1, 19). Stephens i wsp. (22), podobnie jak McLaren i wsp. (13) doszli do wniosku, że szczepy *B. intermedia* izolowane od ptaków często nie wytwarzają indolu, co jest uważane za cechę charakterystyczną dla tego gatunku u szczepów pochodzących od świń.

Występowanie *Brachyspira* spp. u ptaków, rezerwuuar, źródła zakażenia

Kolonizację jelit przez krętki *Brachyspira* spp. opisano u różnych gatunków ptaków udomowionych, klinicznie zdrowych, a także wykazujących objawy biegunki o różnym nasileniu. Krętki izolowano również od wolno żyjących ptaków wodnych, hodowlanych kaczek i bażantów oraz ptaków utrzymywanych w ogrodach zoologicznych. Niektóre gatunki *Brachyspira* spp. mogą także należeć do autochtonicznej mikroflory przewodu pokarmowego ptaków.

Nemes i wsp. (14) wyizolowali *B. alvinipulli* z dwóch stad rodzicielskich gęsi na Węgrzech, u których w okresie pierzenia wystąpiła zwiększona śmiertelność. Pośmiertnie widoczne było krwotoczno-martwicowe i włóknikowo-martwicowe zapalenie błony śluzowej jelit ślepych oraz jelita prostego. Obecność krętków z rodzaju *Brachyspira* na błonie śluzowej zmienionych odcinków jelit potwierdzono w badaniu histopatologicznym oraz immunohistochemicznym.

Krętki *Brachyspira* spp. były również izolowane w Polsce (11). Bakterie te stwierdzono w 6 próbkach kałomoczu pobranego od kur utrzymywanych w chowie przydomowym. Stosując tradycyjne metody hodowli oraz technikę PCR, stwierdzono w jednej próbce obecność dwóch gatunków *B. intermedia* i *B. innocens*. W przypadku innej próbki wykryto tylko *B. intermedia*. Nie zidentyfikowano szczepów wyizolowanych z pozostałych próbek, przy czym profile aktywności biochemicznej uzyskane przy pomocy testów API ZYM były podobne do ustalonych przez McLaren i wsp. dla szczepów *B. pulli* (11, 13).

Lekowrażliwość krętków izolowanych od ptaków oraz leczenie AIS

Izolaty pochodzące od ptaków są zwykle wrażliwe na tiamulinę, bacytracynę, carbadox oraz linkomycynę. Wrażliwość na inne chemioterapeutyki jest różnicowana (7). Niepokojący jest fakt, że część izolatów ma podwyższony MIC, a niektóre szczepy wykazują już oporność na takie chemioterapeutyki, jak: tiamulina, linkomycyna oraz tetracyklina. Można przypuszczać, że mamy do czynienia z procesem narastania oporności podobnym to tego, który miał miejsce w przypadku *Brachyspira* spp. pochodzących od świń. W ostatnich latach odnotowano wyraźny wzrost oporności *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* oraz *B. intermedia* wyizolowanych od świń na tylozynę, tiamulinę, erytromycynę oraz klindamycynę (10). Narastanie lekooporności jest wynikiem niekontrolowanego użycia chemioterapeutyków w leczeniu dyzenterii świń oraz stosowania do niedawna niektórych z tych preparatów jako stymulatorów wzrostu.

W piśmiennictwie dostępne są jedynie pojedyncze doniesienia dotyczące leczenia AIS. Do zwalczania zakażeń wywoływanych przez krętki u ptaków stosowane są takie same leki, jak w leczeniu dyzenterii świń

(5). W przypadku naturalnego zakażenia kur nosek przez *B. pilosicoli* skuteczne okazało się leczenie tiamuliną (2). Hampson i wsp. (4) wykazali skuteczność leczenia kur zakażonych doświadczalnie *B. intermedia* bacytracyną podawaną z paszą przez okres 10 tygodni. Podczas podawania leku nie obserwowano u ptaków niekorzystnych objawów klinicznych ze strony układu pokarmowego, natomiast po zakończeniu leczenia od 18 spośród 30 ptaków wyhodowano krętki *B. intermedia*.

Piśmiennictwo

1. Aspán A., Gunnarsson A.: The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. Anim. Health Res. Rev. 2001, 2, 37-43.
2. Burch D. G., Harding C., Alvarez R., Valks M.: Treatment of a field case of avian intestinal spirochaetosis caused by *B. pilosicoli* with tiamulin. Avian Pathol. 2006, 35, 211-216.
3. Garrity G. M., Winters M., Searles D. B.: Taxonomic Outline of the Procyarotic Genera, [w:] Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, release 1.0, Springer-Verlag, New York 2001.
4. Hampson D. J., Oxberry S. L., Stephens C. P.: Influence of feed zinc bacitracin and tiamulin treatment on experimental avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira intermedia*. Avian Pathol. 2002, 31, 285-291.
5. Hampson D. J., Stephens C. P., Oxberry S. L.: Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens. Avian Pathol. 2006, 35, 2-6.
6. Jakubowski T., Pławińska J., Rzewuska M., Kizerwetter M., Binek M.: Występowanie *Lawsonia intracellularis* i *Brachyspira* sp. u świń w Polsce. Medycyna Wet. 2003, 59, 406-409.
7. Jansson D. S., Brojer C., Gavner-Widen D., Gunnarsson A., Fellstrom C.: *Brachyspira* sp. (*Serpulina* sp.) in birds. Anim. Health Res. Dis. 2001, 2, 93-100.
8. Jansson D. S., Johansson K. E., Olofsson T., Rasback T., Vagsholm I., Petterson B., Gunnarsson A., Fellstrom C.: *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly β -haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). J. Med. Microbiol. 2004, 53, 293-300.
9. Jensen N. S., Stanton T. B., Swayne D. E.: Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea americana*). Vet. Microbiol. 1996, 52, 259-269.
10. Karlsson M., Fellstrom C., Gunnarsson A., Landen A., Franklin A.: Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 2596-2604.
11. Kizerwetter-Świda M., Rzewuska M., Binek M.: Characterization of *Brachyspira* sp. strains isolated from flock of hens with diarrhoea. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2005, 49, 169-173.
12. La T., Phillips N. D., Hampson D. J.: Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 3372-3375.
13. McLaren A. J., Trott D. J., Swayne D. E., Oxberry S. L., Hampson D. J.: Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. J. Clin. Microbiol. 1997, 35, 412-417.
14. Nemes C. S., Glavits R., Dobos-Kovacs M., Ivanics E., Kaszanyitzky E., Beregszaszi A., Szeredi L., Dencso L.: Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks. Avian Pathol. 2006, 35, 4-11.
15. Oxberry S. L., Trott D. J., Hampson D. J.: 1998 *Serpulina pilosicoli* water birds and water: potential sources of infection for humans and other animals. Epidemiol. Infect. 1998, 121, 219-225.
16. Phillips N. D., La T., Hampson D. J.: A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. Vet. Microbiol. 2005, 105, 189-198.
17. Phillips N. D., La T., Hampson D. J.: Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. Vet. Microbiol. 2006, 116, 239-245.
18. Phillips N. D., La T., Hampson D. J.: Survival of intestinal spirochaete strains from chickens in the presence of disinfectants and in faeces held at different temperatures. Avian Pathol. 2003, 32, 639-643.
19. Rzewuska M.: Różnicowanie szczepów *Serpulina* sp. izolowanych od świń na podstawie cech fenotypowych i genotypowych. Praca doktorska, SGGW Warszawa 1999.
20. Sagartz J. E., Swayne D. E., Eaton K. A., Hayes J. R., Amass K. D., Wack R., Kramer L.: Necrotizing typhlocolitis associated with spirochetes in rheas (*Rhea americana*). Avian Dis. 1992, 36, 282-289.
21. Stanton T. B., Postic D., Jensen N. S.: *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 1998, 48, 669-676.
22. Stephens C. P., Oxberry S. L., Phillips N. D., La T., Hampson D. J.: The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) colonising hens in commercial flocks. Vet. Microbiol. 2005, 107, 149-157.
23. Swayne D. E., Bermudez A. J., Sagartz J. E., Eaton K. A., Monford J. D., Stoutenberg J. W., Hayes J. R.: Association of cecal spirochaetes with pasty vents and dirty eggshells in layers. Avian Dis. 1992, 36, 776-781.
24. Swayne D. E., McLaren A. J.: Avian intestinal spirochaetes and avian intestinal spirochaetosis, [w:] Hampson D. J.: Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans, CAB International, Wallingford, UK 1997, 267-335.
25. Trampel D. W., Jensen N. S., Hoffman L. J.: Cecal spirochetosis in commercial laying hens. Avian Dis. 1994, 38, 895-898.
26. Webb D. M., Duhamel G. E., Mattiesen M. R., Muniappa N., White A. K.: Cecal spirochetosis associated with *Serpulina pilosicoli* in captive juvenile red-necked pheasants. Avian Dis. 1997, 41, 997-1002.

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