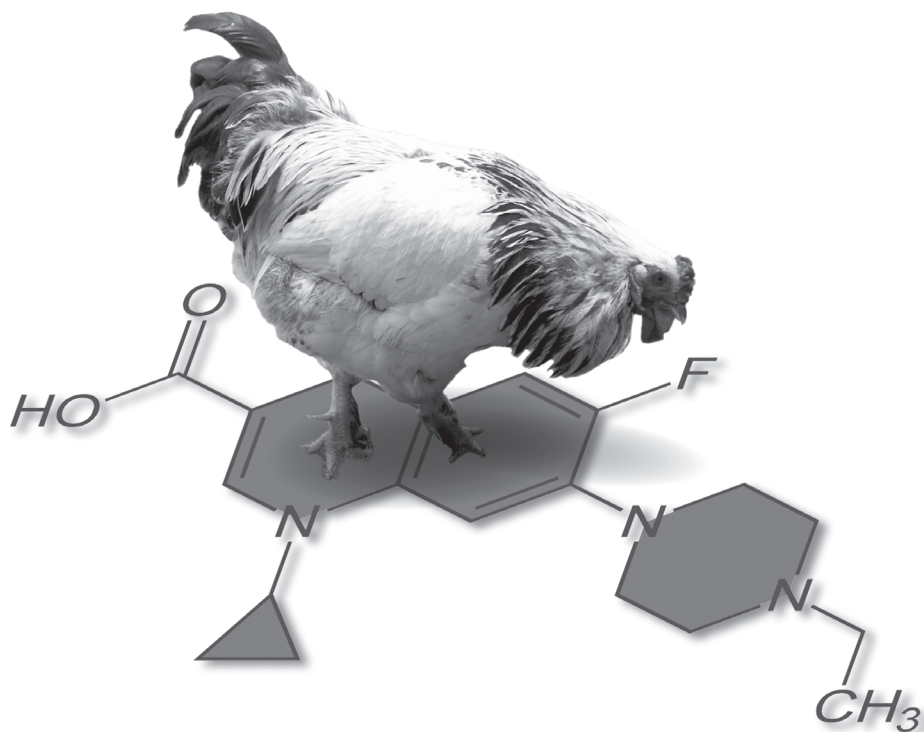


**Aktualne problemy w patologii drobiu
ze szczególnym uwzględnieniem
lekooporności drobnoustrojów**

Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności drobnoustrojów

Pod redakcją prof. dr hab. Aliny Wieliczko



Wrocław, 27–28 czerwca 2013 r.



Pod redakcją
prof. dr hab. Aliny Wieliczko

Opracowanie redakcyjne:
Elżbieta Winiarska-Grabosz
Magdalena Kozińska

Korekta
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Redakcja techniczna i projekt okładki
Paweł Wójcik

Fotografie na okładce
„Chickens on an Indiana farm”, DontBblu, 2006

Materiały w publikacji są chronione prawami autorskimi

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2013

ISBN 978-83-7717-139-4

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU
Redaktor Naczelny – prof. dr hab. inż. Andrzej Kotecki
ul. Sopotka 23, 50–344 Wrocław, tel. 71 328 12 77, e-mail: wyd@up.wroc.pl

Nakład 250 + 16 egz. Ark. wyd. 11,1 Ark. druk. 12,5
Druk: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

Spis treści

| | |
|--|----|
| Organizatorzy | 7 |
| Komitet organizacyjny | 7 |
| Słowo wstępne | 11 |
| <i>Dorota Waliszewska-Dysińska, Dorota Prokopiak</i> Regulacje prawne stosowania leków w wielkotowarowej produkcji drobiu | 13 |
| <i>Marcin Świtala</i> Racjonalne dawkowanie kluczem do skutecznej i bezpiecznej antybiotykoterapii u drobiu | 16 |
| <i>Monika Przeniosło-Siwczyńska, Krzysztof Kwiatek</i> Wybrane aspekty wytwarzania, stosowania i kontroli pasz leczniczych w produkcji drobiarskiej. | 23 |
| <i>Vasil Stanev</i> Kokcydioza u drobiu oraz jej zapobieganie – wrażliwość i oporność. | 30 |
| <i>Kinga Wieczorek, Jacek Osek</i> Występowanie i oporność przeciwdrobnoustrojowa <i>Campylobacter</i> spp. izolowanych ze stad i tusz brojlerów | 34 |
| <i>Anna Woźniak, Maciej Kuczkowski, Marta Krawiec, Alina Wieliczko</i> Kształtowanie się lekowrażliwości szczepów z rodzaju <i>Campylobacter</i> izolowanych od drobiu oraz ptaków wolno żyjących. | 41 |
| <i>Maciej Kuczkowski, Marta Krawiec, Anna Woźniak, Michał Bednarski, Alina Wieliczko</i> Lekooporność <i>Escherichia coli</i> izolowanych od ptaków | 48 |

| | |
|---|-----|
| <i>Rita Weber, Kalen Cookson, Willem Wijnenga</i> Immunizacja żywą modyfikowaną szczepionką przeciwko <i>Escherichia coli</i> skutecznym narzędziem w walce z kolibakteriozą drobiu | 55 |
| <i>Anna Dudzic, Renata Urban-Chmiel</i> Charakterystyka bakteriofagów izolowanych ze środowiska oraz ocena ich właściwości litycznych w stosunku do szczepów <i>Escherichia coli</i> uzyskanych z przewodu pokarmowego drobiu | 57 |
| <i>Dagmara Stępień-Pyśniak, Agnieszka Marek, Ewelina Pyzik</i> Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki. Przykłady wrodzonej i nabytej antybiotykooporności u enterokoków. | 61 |
| <i>Elżbieta Samorek-Salamonowicz</i> Wpływ chemioterapeutyków na replikację wirusa choroby Mareka | 74 |
| <i>Grzegorz Woźniakowski, Elżbieta Samorek-Salamonowicz</i> Ewolucja genów MDV związanych z onkogennością. | 77 |
| <i>Bartłomiej Tykałowski, Tomasz Stenzel, Marcin Śmiałek, Daria Pestka, Andrzej Koncicki</i> Wpływ oksytetracykliny stosowanej <i>per os</i> na wybrane parametry układu odpornościowego indyków | 82 |
| <i>Bartłomiej Tykałowski, Marcin Śmiałek, Tomasz Stenzel, Daria Pestka, Andrzej Koncicki</i> Możliwości zastosowania immunomodulatorów we wspomaganiu terapii chorób bakteryjnych drobiu wywołanych przez szczepy odporne na antybiotyki. | 88 |
| <i>Grzegorz Tomczyk, Olimpia Kursa, Anna Sawicka, Katarzyna Domańska-Blicharz, Zenon Minta</i> Wrażliwość <i>Mycoplasma synoviae</i> na antybiotyki | 97 |
| <i>Grzegorz Tomczyk, Anna Sawicka, Katarzyna Domańska-Blicharz, Olimpia Kursa, Zenon Minta</i> Występowanie zakażenia <i>Mycoplasma spp.</i> u dzikich ptaków | 103 |
| <i>Piotr Szeleszczuk, Artur Żbikowski, Beata Dolka, Izabella Dolka, Jarosław Szubstarski, Wojciech Sikora, Sylwester Barabasz, Ryszard Szewczyk</i> Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego w stadach kurcząt brojlerów – ignorancja czy bezradność?. | 107 |

| | |
|---|-----|
| <i>Jowita Samanta Niczyporuk, Grzegorz Woźniakowski, Elżbieta Samorek-Salamonowicz, Hanna Czekaj</i> | |
| Wpływ adenowirusów na skuteczność szczepień profilaktycznych przeciwko chorobie Mareka | 119 |
| <i>Anna Pikuła, Krzysztof Śmietanka, Katarzyna Domańska-Blicharz, Zenon Minta</i> | |
| Charakterystyka genetyczna oraz zjadliwość dla kurcząt SPF atypowych szczepów wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza. | 123 |
| <i>Krzysztof Śmietanka, Zenon Minta, Monika Olszewska, Anna Pikuła, Krzysztof Wyrostek, Michał Józwiak</i> | |
| Wirus grypy ptaków h9n2 u indyków w Polsce – charakterystyka pierwszych przypadków | 128 |
| <i>Zenon Minta, Krzysztof Wyrostek, Michał Józwiak, Monika Olszewska, Krzysztof Śmietanka</i> | |
| Zastosowanie kart FTA [*] w diagnostyce grypy ptaków i rzekomego pomoru drobiu | 133 |
| <i>Katarzyna Domańska-Blicharz, Anna Jacukowicz, Anna Lisowska, Zenon Minta</i> | |
| Zakażenia rotawirusowe u drobiu w Polsce | 140 |
| <i>Marcin Śmiałek, Bartłomiej Tykałowski, Daria Pestka, Tomasz Stenzel, Andrzej Koncicki</i> | |
| Wykorzystanie sortera komórek oraz techniki elispot do oceny rozwoju pamięci immunologicznej komórek B IGA ⁺ po szczepieniu indyków przeciwko aMPV | 147 |
| <i>Kamila Bobrek, Andrzej Gaweł</i> | |
| Wrażliwość szczepów <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> wyizolowanych z klinicznych przypadków różycy u gęsi na wybrane chemioterapeutyki | 154 |
| <i>Wojciech Kozdruń, Hanna Czekaj, Grzegorz Woźniakowski, Jowita Samanta Niczyporuk, Elżbieta Samorek-Salamonowicz</i> | |
| Zakażenia wirusowe dzikich ptaków wodnych w Polsce | 159 |
| <i>Marta Krawiec, Maciej Kuczkowski, Anna Woźniak, Alina Wieliczko</i> | |
| Wybrane zakażenia bakteryjne ptaków wolno żyjących | 162 |
| <i>Karolina Tarasiuk, Grzegorz Woźniakowski</i> | |
| Wykrywanie szczepów wirusa choroby Derzsy'ego metodą lamp | 166 |

| | |
|---|-----|
| <i>Katarzyna Bobusia, Andrzej Gawęł</i> Histomonozą drobiu – opis przypadku | 170 |
| <i>Tomasz Stenzel, Grażyna Szulia, Justyna Fordońska, Jolanta Górska, Marcin Śmiałek, Bartłomiej Tykałowski, Daria Pestka, Andrzej Koncicki</i> Antybiotykooporność wybranych bakterii izolowanych od gołębi w Polsce na przestrzeni lat 2010–2013 | 174 |
| <i>Grzegorz Woźniakowski, Tomasz Stenzel, Elżbieta Samorek-Salamonowicz, Andrzej Koncicki</i> Otrzymanie rekombinowanego białka C1 cirkowirusa gołębi (PiCoV) . . . | 182 |
| <i>Maria Biernacka, Wojciech Młodawski, Agnieszka Olszyńska, Joanna Szybalska, Joanna Świder, Katarzyna Witt, Sylwia Doner, Piotr Szeleszczuk</i> Ocena parazytofauny jelitowej warszawskich gołębi miejskich (<i>Columba livia f. urbana</i>) w sezonowym cyklu obserwacji | 187 |
| <i>Monika Olszewska, Krzysztof Śmietanka, Katarzyna Domańska-Blicharz, Zenon Minta</i> Eksperymentalne zakażenie gołębi, kurcząt, indyków i gęsi gołębim wariantem wirusa rzekomego pomoru drobiu | 190 |
| <i>Beata Dolka, Piotr Szeleszczuk, Izabella Dolka, Michał Wąsowicz</i> Przypadki <i>omphalitis</i> w stadzie strusiąt – doniesienie wstępne | 195 |
| Firmy sponsorujące konferencję pt. Aktualne problemy w patologii drobiu, ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności drobnoustrojów | 199 |

Organizatorzy

- Sekcja Fizjologii i Patologii Ptaków
Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych
- Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Komitet organizacyjny

Przewodnicząca

- prof. dr hab. Alina Wieliczko

Sekretarz

- dr wet. Maciej Kuczkowski

Członkowie

- lek. wet. Kamila Bobrek
- lek. wet. Katarzyna Bobusia
- lek. wet. Klaudia Chrząstek
- dr hab. Andrzej Gaweł, prof. nadzw.
- lek. wet. Marta Krawiec
- dr wet. Tomasz Piasecki
- dr wet. Anna Woźniak

Szanowni Państwo,

w Imieniu Organizatorów: Sekcji Fizjologii i Patologii Ptaków Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu witam bardzo serdecznie na konferencji naukowej, której obrady odbywają się pod wiodącym tytułem: „Aktualne problemy w patologii drobiu, ze szczególnym uwzględnieniem lekooporności drobnoustrojów”.

Tematyka tegorocznej konferencji została podyktowana potrzebą przekazania lekarzom weterynarii, w szczególności pracującym w sektorze produkcji drobiarskiej, najbardziej aktualnej wiedzy na temat narastającej lekooporności drobnoustrojów. Niewłaściwe stosowanie i nadużywanie preparatów przeciwbakteryjnych w różnych obszarach medycyny, w weterynarii, hodowli, rolnictwie, a także w przemyśle przyczyniło się do pojawiania się i rozprzestrzeniania, na bardzo szeroką skalę, opornych drobnoustrojów dysponujących coraz sprawniejszymi mechanizmami lekooporności.

Problem antybiotykooporności przestał być wyłącznie przedmiotem zainteresowań środowisk naukowych, zyskał wymiar globalny i ze względu na powagę zagrożenia dla zdrowia publicznego w ostatniej dekadzie XX w. stał się przedmiotem coraz większej liczby działań podejmowanych przez Parlament Europejski. Realizowane działania mają na celu opracowanie ogólnounijnego planu na rzecz zwalczania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Z drugiej strony, podkreśla się, jak ważne jest podnoszenie świadomości profesjonalistów, kadry zarządzającej i opinii publicznej nt. konsekwencji i zagrożeń wynikających z niekontrolowanego stosowania leków przeciwbakteryjnych i sposobów zapobiegania lekooporności. Doceniając Państwa profesjonalizm, dedykuję referaty poświęcone tym ważnym zagadnieniom, przygotowane przez specjalistów z MRiRW oraz ośrodki naukowe w kraju i za granicą.

Istotna część obrad konferencji została poświęcona aktualnym problemom w patologii ptaków gospodarskich i dzikich, w tym grypie ptasiej u indyków.

Wszystkim Autorom bardzo dziękuję za przyjęcie zaproszenia do udziału w konferencji, opracowanie materiałów oraz wygłoszenie referatów.

Dziękuję również Firmom, które wzbogaciły nasz program konferencyjny, zorganizowały ekspozycję preparatów oraz udzieliły pomocy w organizacji konferencji.

Słowa serdecznego podziękowania kieruję do wszystkich Uczestników konferencji, reprezentujących placówki naukowe, państwową i prywatną służbę weterynaryjną oraz przemysł paszowy i farmaceutyczny. W naszym gronie są również Goście z Niemiec, Francji, Rosji i Ukrainy.

W imieniu Organizatorów Konferencji Drobiarskiej życzę wszystkim Państwu owocnych obrad oraz jak najlepszych wrażeń z pobytu we Wrocławiu i po raz pierwszy w Ponadregionalnym Rolniczym Centrum Kongresowym Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu – Pawłowicach.

Wyrażam przekonanie, że konferencja inspirować będzie Państwa do dalszych działań na rzecz rozwoju krajowego drobiarstwa, z uwzględnieniem racjonalnego stosowania chemioterapeutyków.

prof. dr hab. Alina Wieliczko

Wrocław, 27–28 czerwca 2013 r.

Regulacje prawne stosowania leków w wielkotowarowej produkcji drobiu

Use of medicines in poultry husbandry system – regulation

W Polsce zasady obrotu produktami leczniczymi weterynaryjnymi wynikają z obowiązującego w Unii Europejskiej prawa i dostosowanych do niego przepisów krajowych. Nadrzędną zasadą wszelkich regulacji dotyczących wytwarzania i dystrybucji produktów leczniczych weterynaryjnych jest ochrona zdrowia publicznego. Zasady te określa dyrektywa 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 6 listopada 2001 r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do weterynaryjnych produktów leczniczych oraz zmieniająca ją dyrektywa 2004/28/WE z dnia 31 marca 2004 r.

Dyrektywy te zostały wdrożone do prawa polskiego ustawą z dnia 6 września 2001 r. – *Prawo farmaceutyczne* (Dz.U. z 2008 r. Nr 45, poz. 271 z późn. zm.).

Ponadto pewne sprawy dotyczące obrotu produktami leczniczymi weterynaryjnymi zostały uregulowane w niżej wymienionych ustawach:

- z dnia 18 grudnia 2003 r. *o zakładach leczniczych dla zwierząt* (Dz.U. z 2004 r. Nr 11, poz. 95, z późn. zm.);
- z dnia 11 marca 2004 r. *o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt* (Dz.U. z 2008 r. Nr 213, poz. 1342, z późn. zm.);
- z dnia 29 stycznia 2004 r. *o Inspekcji Weterynaryjnej* (Dz.U. z 2010 r. Nr 112, poz. 744, z późn. zm.);
- z dnia 21 grudnia 1990 r. *o zawodzie lekarza weterynarii i izbach lekarsko-weterynaryjnych* (Dz.U. z 2009 r. Nr 93, poz. 767, z późn. zm.);
- z dnia 22 lipca 2006 r. *o paszach* (Dz.U. z 2006 r. Nr 144, poz. 1045, z późn. zm.).

Szczegółowe zasady postępowania w zakresie obrotu produktami leczniczymi weterynaryjnymi zawierają rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Prawo UE w zakresie nadzoru nad obrotem i stosowaniem produktów leczniczych weterynaryjnych ujmuje w sposób „ramowy” zasady i dane, jakie powinny być monitorowane. Kraje członkowskie w swoim zakresie wprowadzają rozwiązania i regulacje, w tym również dotyczące nadzoru i kontroli.

Problem oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe znajduje szczególne zainteresowanie organów Unii Europejskiej, czego przejawem jest szereg inicjatyw podejmowanych przez te instytucje.

W ostatnim czasie narastający problem antybiotykooporności i coraz większe trudności w opracowywaniu nowych i skutecznych środków przeciwdrobnoustrojowych skłonił organy Unii Europejskiej do szeregu inicjatyw mających na celu monitorowanie i ograniczanie rozwoju antybiotykooporności. Co prawda, antybiotykooporność jest zjawiskiem naturalnym, ale różnorodne czynniki wpływają na jej wzmocnienie. Nadmierne i niewłaściwe stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie i medycynie weterynaryjnej, stosowanie tych środków do celów nielecniczych, a także zanieczyszczeń nimi środowiska przyspieszają pojawianie się i rozprzestrzenianie opornych mikroorganizmów.

W związku z powyższym, w dniu 12 maja 2011 r. Parlament Europejski przyjął rezolucję o charakterze nieustawodawczym w sprawie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, w której wezwał Komisję Europejską do opracowania ogólnounijnego planu na rzecz zwalczania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

W dniu 24 listopada 2011 r. został opublikowany komunikat Komisji Europejskiej do Parlamentu Europejskiego i Rady pt. „*Plan działania na rzecz zwalczania rosnącego zagrożenia związanego z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe*”.

Kolejnym dokumentem poruszającym zagadnienie antybiotykooporności jest konkluzja Rady z dnia 23 marca 2012 r. w sprawie wpływu antybiotykooporności na sektor medycyny i sektor weterynarii – perspektywa „*Jedno zdrowie*”, w której wzywa państwa członkowskie do opracowania i wdrożenia krajowych strategii i planów na rzecz przeciwdziałania antybiotykooporności.

Ponadto od 2006 r. Komisja Europejska przy współudziale Europejskiej Agencji Leków (EMA – European Medicines Agency) prowadzi projekt zbierania danych dotyczących sprzedaży i stosowania przeciwdrobnoustrojowych produktów leczniczych weterynaryjnych.

Na potrzeby stworzenia systemu zbierania i przetwarzania danych ze sprzedaży i stosowania przeciwdrobnoustrojowych produktów leczniczych weterynaryjnych w Unii Europejskiej został utworzony Europejski Urząd ds. Monitoringu Zużycia Antybiotyków w Weterynarii (ESVAC – European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Agents Consumption).

W Polsce, w 2008 r., rozpoczęto zbieranie danych dotyczących wielkości obrotu produktami leczniczymi weterynaryjnymi. Na podstawie art. 78 ust. 4 ustawy a dnia 6 września 2001 r. – Prawo farmaceutyczne (Dz.U. z 2008 r. Nr 45, poz. 271 z późn. zm.) Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi wydał rozporządzenie, które określa zakres i sposób przekazywania danych dotyczących obrotu produktami leczniczymi weterynaryjnymi przez hurtownie farmaceutyczne produktów leczniczych weterynaryjnych.

Obecnie w ramach programu wieloletniego na lata 2009–2013 pod nazwą „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy realizuje zadanie dotyczące analizy stosowania produktów leczniczych weterynaryjnych z podziałem na grupy produktów leczniczych weterynaryjnych i gatunki docelowe zwierząt.

Działania Polski wpisują się w działania Unii Europejskiej dotyczące monitorowania obrotu produktami leczniczymi weterynaryjnymi oraz zapobiegania antybiotykooporności. Jednakże niezbędne jest podejmowanie dalszych, skoordynowanych działań na rzecz ochrony skuteczności działania przeciwbakteryjnych produktów leczniczych.

Racjonalne dawkowanie kluczem do skutecznej i bezpiecznej antybiotykoterapii u drobiu

Reasonable dosage: the key to an effective and safe antibiotic therapy in poultry

Okolo 90 produktów leczniczych weterynaryjnych (p.l.w.) zawierających 22 chemioterapeutyki przeciwbakteryjne należące do 10 grup farmakologicznych – to dostępny obecnie w Polsce arsenał do leczenia chorób o podłożu bakteryjnym u drobiu. Należą do nich:

- I. Sulfonamidy i ich kombinacja z trymetoprymem (**sulfametoksazol + trymetoprym** oraz **sulfachloropirydazyna** – łącznie 4 p.l.w.)
- II. Fluorochinolony (**enrofloksacyna** i **flumechina** – łącznie 17 p.l.w.)
- III. Penicyliny (**amoksycylina** – 15 p.l.w.)
- IV. Aminoglikozydy i aminocyklitole (**neomycyna** – 2 p.l.w. i **spektynomycyna** – tylko w produktach złożonych)
- V. Polimyksyny (**kolistyna** – 6 p.l.w.)
- VI. Tetracykliny (**doksycyklina**, **oksyetetracyklina**, **tetracyklina**, **chlorotetracyklina** – łącznie 20 p.l.w.)
- VII. Fenikole (**florfenikol** i **tiamfenikol** – łącznie 4 p.l.w.),
- VIII. Makrolidy (**tylozyna**, **tylmikozyna**, **tylwalozyna**, **erytromycyna** – łącznie 8 p.l.w.) i **spiramycyna** (tylko w produktach złożonych)
- IX. Pleuromutyliny (**tiamulina** – 5 p.l.w.),
- X. Linkosamidy (**linkomycyna** – 2 p.l.w.)

oraz preparaty złożone – amoksycylina + kolistyna (2 p.l.w.), neomycyna + oksytetracyklina (1 p.l.w.), spektynomycyna + linkomycyna (1 p.l.w.), kolistyna + spiramycyna (1 p.l.w.),

Wobec stałego narastania oporności na stosowane leki wśród patogennych dla drobiu drobnoustrojów najwięcej dyskusji wzbudza obecnie wybór najbardziej skutecznego środka do planowanej terapii, natomiast rzadziej podejmuje się w tym kontekście problem jego dawkowania. Tymczasem od zarania antybiotykoterapii podkreślano z naciskiem, że jedną z najważniejszych zasad jej prawidłowego prowadzenia u zwierząt jest właściwe dawkowanie wybranego leku. Dawkowanie w chemioterapii przeciwbakteryjnej to najczęściej procedura, na którą składają się: (I) stosowanie leku w odpowiednio wysokiej dawce, (II) w określonych odstępach czasowych oraz (III) przez odpowiednio długi okres czasu. Wskazywano, że prawidłowe dawkowanie jest ściśle związane z utrzymaniem w organizmie tzw. stężenia terapeutycznego antybiotyku. Dawniej stężenia te najczęściej ekstrapolowano z danych uzyskiwanych w medycynie człowieka. Przestrzegano roztropnie, że niepodporządkowanie się rygorom dawkowania leku określonego przez producenta w załączonej doń ulotce to jeden z głównych powodów niepowodzeń w antybiotykoterapii. I chociaż minęło z górą półwiecze, to w przypadku zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi, w tym oczywiście także u drobiu, zasada dawkowania zgodnie z zaleceniami producenta obowiązuje do dzisiaj. Od strony formalnej wiąże się ją dzisiaj nie tyle z gwarancją większej skuteczności terapii, co z warunkiem zachowania wyznaczonego przez producenta okresu karencji. W przypadku chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych okres ten wyznaczany jest zazwyczaj dla najwyższego poziomu dawkowania leku (tzn. najwyższej proponowanej dawki i najdłuższego okresu stosowania), po podaniu zgodnym z proponowaną drogą zastosowania – u drobiu najczęściej z wodą do picia. W skrócie sama procedura zakłada zbadanie stężenia pozostałości leku (czasem też jego metabolitów) w czterech przeznaczonych lub możliwych do skonsumowania tkankach (dla leków przeznaczonych dla niosek także w jajach) i wyznaczenie okresu (w dobach), po którym stężenia te spadną poniżej najwyższego dopuszczalnego stężenia pozostałości (MRL – maximum residue limits) określonego dla krajów Unii Europejskiej przez Europejską Agencję Leków. Zaordynowanie przez lekarza weterynarii dawkowania na wyższym poziomie, niż to które zaproponował jako maksymalne producent i zatwierdził organ rejestrujący lek, oznacza, że przekroczona zostaje granica bezpieczeństwa dla konsumenta, jaką stanowi okres karencji. Udowodnienie przez służby inspekcyjne takiego postępowania wiąże się oczywiście dla lekarza weterynarii z sankcją karną.

Sytuacja z prawnego punktu widzenia – oczywista, niezostawiająca lekarzowi szerszego pola do podejmowania decyzji o zakresie dawkowania leku. Tymczasem nietrudno sobie wyobrazić, że znajduje się on w sytuacji, w której właściciel fermy

drobiu oczekuje leczenia nie tyle bezpiecznego dla konsumenta co skutecznego, które pozwoli uratować założony efekt ekonomiczny. Pokusa, że dalsze podniesienie dawki leku spełni te oczekiwania, nie może nie pojawić się jako rozwiązanie alternatywne tego problemu. Można się spodziewać, że w związku z narastającą opornością drobnoustrojów na stosowane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne, przy dotychczasowych regulacjach, znalezienie się w takiej krytycznej sytuacji było lub będzie doświadczeniem większości lekarzy weterynarii pracujących na fermach drobiu.

Po tej niezbyt optymistycznej konkluzji należy zadać pytanie, na które próbuje odpowiedzieć współczesna farmakologia, czy istnieje możliwość bardziej skutecznego dawkowania używanych obecnie chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. Wydaje się, że tkwi ona w założeniach terapii farmakokinetyczno-dynamicznej (PK-PD) pozwalającej na oszacowanie dawki leku i przyjęcie sposobu dawkowania opartego na właściwościach kinetycznych leku oraz wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC), które stanowi w tych obliczeniach współczynnik farmakodynamiczny. Charakteryzuje ono rzeczywistą wrażliwość patogennego drobnoustroju na wybrany lek, jest nośnikiem informacji liczbowej, którą można przetwarzać i archiwizować. Upowszechnienie takiego sposobu określania wrażliwości bakterii na chemioterapeutyki w fermach drobiu jest bardzo istotne również do poznania jej charakterystyki populacyjnej (MIC_{50} lub MIC_{90}).

Badania nad efektywnością chemioterapii przeciwbakteryjnej typu PK-PD pozwoliły podzielić stosowane w niej leki na 2 grupy, na tzw. chemioterapeutyki stężenozależne i czasozależne. Do pierwszej grupy leków, których efekt terapeutyczny jest ściśle skorelowany z wysokością osiąganego w organizmie stężenia a stosowanych u drobiu, należą: enrofloksacyna i flumechina, neomycyna i kolistyna. Do drugiej grupy, której efekt terapeutyczny zależy od czasu ekspozycji drobnoustrojów patogennych na stężenia wyższe od wartości MIC, należą pozostałe leki, tzn. antybiotyki β -laktamowe (amoksycylina), makrolidy (erytromycyna, tyrozyna, tylmikozyina, tylwalozyna, spiromycyna), linkosamidy (linkomycyna), pleuromutyliny (tiamulina), tetracykliny (doksycyklina, oksytetracyklina, chlorotetracyklina i tetracyklina), fenikole (florfenikol, tiamfenikol) czy sulfonamidy. Planowanie i korekta dawkowania obu tych grup leków opiera się na wykorzystaniu różnego typu wzorów.

Wzór na obliczenie dawki dobowej dla chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych stosowanych systemowo, których skuteczność zależy od stężenia leku, zaproponowany przez Toutain:

$$\text{Dawka dzienna} = \frac{AUC_{24} / MIC_{90} \times MIC \times Cl_{B(24h)}}{f_u \times F \times 24 \text{ h}}$$

gdzie: AUC_{24} to wartość dobową pola pod krzywą, $Cl_{B(24h)}$ – dobowy klirens całkowity leku, f_u – wolna frakcja leku, F – biodostępność MIC – minimalne stężenie hamujące aktualne i populacyjne dla 90 % szczepów (MIC_{90}).

Chemioterapeutyki stężeniozależne najczęściej wykazują szybki efekt bakterio-bójczy, niezależny do fazy podziałowej i wykazują następujące właściwości:

- wzrost stężenia leku prowadzi do wzrostu liczby zabitych bakterii;
- skuteczność działania koreluje z następującymi wskaźnikami farmakokinetyczno-dynamicznymi C_{max}/MIC i AUC/MIC , gdzie C_{max} – to wartość maksymalnego stężenia w osoczu a AUC to wartość pola pod krzywą wyznaczonego przez zmiany stężenia leku w osoczu;
- terapia jest skuteczna, gdy AUC/MIC wynosi 125–250 (fluorochinolony) lub C_{max}/MIC jest równy lub wyższy niż 10 (aminoglikozydy);
- czas ekspozycji na lek jest mniej ważny dla skuteczności;
- wykazują stosunkowo długi (< 6 godz.) efekt postantybiotyczny (PAE – czas po którym populacja bakterii, która przetrwała chemioterapię, zaczyna się dzielić);
- rozwój oporności na lek jest odwrotnie proporcjonalny do C_{max}/MIC .

Z definicji i właściwości chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych stężeniozależnych wynika, że najwyższą ich skuteczność w terapii uzyskać można po podaniu dawki dobowej jednorazowo i w stosunkowo krótkim czasie.

Wzór na obliczenie dawki dobowej dla chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych stosowanych systemowo, których skuteczność zależy od czasu utrzymywania stężenia leku powyżej wartości MIC, zaproponowany przez Landoni:

$$\text{Dawka dzienna} = \frac{Cl_B \times C_{ss}}{F \times V_d} \times \tau$$

gdzie: Cl_B – dobowy klirens całkowity leku, C_{ss} – pożądane stężenie leku w stanie ustalonym przyjmowane najczęściej jako wartość równą $4 \times MIC$, F – biodostępność, V_d – pozorna objętość dystrybucji, τ – planowany interwał w podawaniu leku.

Chemioterapeutyki przeciwbakteryjne, których zdolność bójcza zależy od czasu ekspozycji, mają następujące właściwości:

- skuteczność działania zależy głównie od czasu, w którym lek utrzymuje się powyżej MIC ($T > MIC$);
- wzrost stężenia leku nawet powyżej 3–4 x MIC nie prowadzi do wzrostu liczny zabitych bakterii, a maksymalny efekt występuje powyżej stężenia 4 x MIC;
- utrzymywanie $T > MIC$ powinno wynosić więcej niż 50% długości interwału podawania, a najlepiej obejmować cały interwał;
- wykazują krótki (β -laktamy, makrolidy, linkosamidy) lub długi (tetracykliny, fenikole) efekt postantybiotyczny.

Z definicji i właściwości chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych czasozależnych wynika, że najwyższą skuteczność w terapii gwarantuje podawanie ich dawki dobowej w sposób ciągły lub w na tyle częstych interwałach, aby zapewnić utrzymanie się efektywnego stężenia w osoczu (co najmniej czterokrotnie wyższego od wartości MIC) przez całą dobę lub jak najdłuższą część doby.

Trzeba podkreślić, że większość wprowadzanych obecnie na rynek leków chemioterapeutycznych ma ustalone dawkowanie opierające się na modelach zakażeń, w których wykorzystywano kalkulację zgodną z zasadami PK-PD. Niestety, w skrótovej dokumentacji leku (ulotka) rzadko taki model jest ujawniany, brak jest również danych farmakodynamicznych (MIC), które wprowadzano do stosownych wzorów. Można się tylko domyślać, że przyjmowane są wartości graniczne MIC dla wrażliwych drobnoustrojów, podawane np. międzynarodowe w zaleceniach Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Taki stan rzeczy nie pozwala na korektę dawkowania na podstawie własnych wartości MIC. Jak wiadomo, w przypadku chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych wskaźnik MIC wykazuje duże zróżnicowanie w stosunku do różnych gatunków bakterii patogennych i dlatego lekarz powinien mieć szansę na korektę dawkowania zwłaszcza wtedy, gdy zachodzi możliwość zmniejszenia dawki dobowej leku. Sytuacja taka ma miejsce w razie stwierdzenia dużej wrażliwości patogenu (przy niskiej wartości MIC), co pozwala na znaczne ograniczenie ilości stosowanego leku.

W tym miejscu powstaje także pytanie o programy, które mogą pomóc lekarzowi w przeprowadzeniu takich korekt, szczególnie w warunkach fermowych i przy szacowaniu populacyjnej wrażliwości chorobotwórczych drobnoustrojów.

Najczęściej wymienianym narzędziem służącym temu celowi jest program symulacyjny Monte Carlo. Na podstawie symulacji danych farmakokinetycznych leku u gatunku, który ma być poddany terapii i po wprowadzeniu aktualnych danych populacyjnych MIC, charakteryzujących wrażliwość patogennego drobnoustroju oraz po zakreśleniu pułapu oczekiwanych wyleczeń (maksymalne do 95%), uzyskuje się po jednym kliknięciu – wartość dobowej dawki leku.

Nie ma jednak wątpliwości, że pełne wykorzystanie tego typu wiedzy, stanowiącej wdrożenie wyników wieloletnich badań farmakologicznych, uwarunkowane jest powstaniem sieci laboratoriów przygotowanych nie tylko do wszechstronnej diagnostyki mikrobiologicznej, ale także do spełniania kluczowej roli doradczej. Głównym celem tej roli byłoby przede wszystkim skuteczne powstrzymanie narastania oporności.

W świetle podjętego tematu powstaje pytanie o perspektywy uzyskania sukcesu w walce z opornością poprzez umiejętne dawkowanie leków przeciwbakteryjnych. Dawniej uważano, że kluczową rolę w tym zakresie powinna odgrywać odpowiednia długość prowadzenia leczenia, aby osiągnąć jak najpełniejszą eradykację, przyjmując, że mutacje związane z powstawaniem oporności mają największą szansę powstać w okresie, w którym stężenie antybiotyku spada poniżej wartości terapeutycznych (poniżej MIC), czyli w momencie zaprzestania podawania leku. Zasadę tę stosuje się często obsesyjnie do dzisiaj w leczeniu człowieka. Tymczasem już ponad 20 lat temu wykazano, że narastanie oporności zachodzi w stężeniach wyższych od MIC dzięki selekcyjnemu działaniu chemioterapeutyku, który w pewnym zakresie stężeń eliminuje

bakterie wrażliwe bez wpływu na tę część populacji, u której doszło już do pierwszych mutacji kodujących spadek wrażliwości na lek. Wykazano zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, że istnieje również tak wysokie stężenie antybiotyku, powyżej którego to działanie selekcyjne nie występuje. Wytworzenie takiego stężenia w hodowli lub w organizmie zapobiega selekcji mutantów, ponieważ je eliminuje. Nazwano je stężeniem zapobiegającym mutacji (mutant prevention concentration, w skrócie MPC). Pozwoliło to na sformułowanie koncepcji tzw. okna mutacyjnego, czyli określenia zakresu stężeń, w którym dochodzi do selekcyjnego działania antybiotyku. Okno to stanowią stężenia pomiędzy wartością MIC a wartością MPC. Obecnie w coraz większej liczbie prac dotyczących patogenów ważnych dla weterynarii oznaczane są oba te wskaźniki i na ich podstawie tworzy się wskaźniki pochodne, badając w warunkach doświadczalnych zakażeń możliwość zmniejszania tej strefy stężeń („przymknięcia” lub „zawężenia” okna mutacyjnego). Niewątpliwie dawkowanie, które zapewnia w początkowym okresie chemioterapii przeciwbakteryjnej utrzymywanie przez dłuższy czas stężenia powyżej wartości MPC, sprzyja zmniejszeniu presji selekcyjnej antybiotyku i zawężeniu tego okna. Nie zawsze są to jednak stężenia bezpieczne dla zwierząt. Trudno na obecnym etapie badań oszacować, w jakim zakresie zastosowanie takiego dawkowania u drobiu wpłynie na przekroczenia zalecanych dawek terapeutycznych.

Jak już wcześniej podkreślano, związane jest to z pogwałceniem wyznaczonego okresu karencji, który w takiej sytuacji musiałby ulec wydłużeniu.

Pytanie, czy i kiedy doczekamy się w Europie sytuacji, w której możliwa będzie zmiana okresu karencji leku na podstawie kompetentnej i opartej na naukowych zasadach opinii serwisanta specjalisty – w sytuacji konieczności skorygowania dawkowania, pozostaje bez odpowiedzi.

Przy obecnych regulacjach prawnych pytanie to ma charakter abstrakcyjny, a być może dla niektórych osób pełniących funkcje urzędowe wręcz obrazoburczy. W tym miejscu trzeba podkreślić, że jest taka część wolnego i wysoce rozwiniętego świata, gdzie odpowiedzi na tego rodzaju pytania są udzielane.

Traktowanie wyznaczonych przez producentów okresów karencji jako norm prawnych doprowadziło do pojawienia się na rynkach europejskich, w tym także w Polsce, całej gamy leków „generycznych” o bardzo różnych okresach karencji. Na przykład wśród produktów leczniczych zawierających amoksycylinę przeznaczonych dla drobiu do użycia z wodą do picia mamy leki z okresem karencji 1, 2, 3, 4 i 5 dni. Trzeba przypomnieć, że w przypadku leków przeznaczonych dla drobiu w formie wodnego roztworu do picia przyjmuje się, przy ich 100% rozpuszczalności zasadę, że są one biorównoważne, tzn. wykazują podobną farmakokinetykę, a tym samym farmakologiczne działanie. Wykazanie pomiędzy produktami o podobnym składzie istotnych różnic w stężeniu leku w tkankach (na czym opiera się różne oszacowanie okresu karencji) wskazuje z punktu widzenia farmakokinetyki na zróżnicowanie ich dystrybucji, co podważa w poważnym stopniu tezę o ich biorównoważności.

Europejski system ustalania okresu karencji wymaga na pewno dużych zmian, w tym także uelastycznienia w taki sposób, by można było na podstawie naukowych przesłanek i opierając się na kompetentnej konsultacji, dokonywać jego korekty – najczęściej wydłużenia w rozsądnym zakresie. Dotyczy to sytuacji, w której konieczne jest użycie wyższej dawki lub wydłużenia terapii w celu uzyskania oczekiwanego efektu terapeutycznego bądź zastosowania takiego protokołu podania, który ogranicza powstanie oporności patogennej bakterii na stosowany lek.

Wybrane aspekty wytwarzania, stosowania i kontroli pasz lecznicznych w produkcji drobiarskiej

Selected aspects of production, use and control medicated feeds in poultry production

Stosowanie antybiotyków jako dodatków paszowych w celu poprawy efektów produkcyjnych zwierząt hodowlanych było dozwolone przez kilkadziesiąt lat. Wprowadzenie antybiotyków do żywienia zwierząt jako tzw. antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) miało miejsce w latach 50. XX w. Największe zastosowanie ASW znalazły w żywieniu trzody chlewnej, drobiu i cieląt. Stosowanie określonych antybiotyków jako dodatków paszowych regulowała Dyrektywa Rady 70/524/EWG z 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych. Do antybiotyków dopuszczonych jako dodatki paszowe u drobiu zaliczały się m.in.: penicylina, tetracykliny, cynk-bacytracyna, spiramycyna, wirginiamicyna, awilamicyna i flawomicyna. Jednakże problemy, które się pojawiły, związane z narastającym zjawiskiem antybiotykooporności bakterii i obawami dotyczącymi możliwości transferu genów oporności ze zwierząt na ludzi, doprowadziły do wprowadzenia zakazu stosowania antybiotyków jako dodatków paszowych [1, 5]. Zakaz ten wprowadziło nowe Rozporządzenie 1831/2003/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt, które zastąpiło Dyrektywę 70/524. Zgodnie z tym rozporządzeniem antybiotyki inne niż kokcydiostatyki i histomonostatyki nie mogą być wprowadzane do obrotu i stosowane jako dodatki paszowe [7].

W związku z zakazem, który obowiązuje od 1 stycznia 2006 r., antybiotyki z paszą mogą być obecnie podawane zwierzętom tylko w postaci pasz leczniczych. Ustawa o paszach z dnia 22 lipca 2006 r. definiuje paszę leczniczą jako mieszaninę jednego lub kilku dopuszczonych do obrotu, na podstawie przepisów prawa farmaceutycznego, premiksów leczniczych z jedną lub kilkoma paszami, przeznaczoną, ze względu na swoje właściwości profilaktyczne lub lecznicze, do podawania zwierzętom w formie niezmienionej [9]. W związku z tym pasze lecznicze stały się jednym z zasadniczych sposobów podawania zwierzętom gospodarskim antybiotyków drogą *per os* w celu leczenia lub profilaktyki określonych jednostek chorobowych. Z paszami leczniczymi podawane zwierzętom mogą być antybiotyki, sulfonamidy, ale także leki przeciwbacze i niesterydowe leki przeciwzapalne (paracetamol). Pasje lecznicze są wytwarzane na bazie zarejestrowanych premiksów leczniczych, które zaliczane są do produktów leczniczych weterynaryjnych (plw) i znajdują się w wykazie produktów leczniczych weterynaryjnych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej.

Szczegółowe wymagania dotyczące wytwarzania, wprowadzania do obrotu i dystrybucji pasz leczniczych przeznaczonych, jak i nieprzeznaczonych do obrotu określone są w artykułach 16–22 ustawy o paszach i regulowane odrębnymi przepisami [2]. Pasza lecznicza lub produkt pośredni mogą być wytworzone wyłącznie na zlecenie lekarza weterynarii prowadzącego praktykę lekarsko-weterynaryjną, w zakładzie zatwierdzonym przez właściwego wojewódzkiego lekarza weterynarii i tylko dla danego stada w odniesieniu do konkretnego przypadku chorobowego.

Ponadto ustawa o paszach nakazuje, aby wytwarzanie pasz leczniczych było prowadzone przy użyciu urządzeń o takich parametrach i konstrukcji, aby było możliwe zachowanie homogeniczności i utrzymanie stałej zawartości substancji czynnej w 1 g paszy leczniczej. Wytwarzanie pasz musi być prowadzone przy użyciu urządzeń, których parametry, konstrukcja i rozmieszczenie umożliwiają ich czyszczenie po zakończeniu produkcji każdego asortymentu oraz uniemożliwiają zanieczyszczenie pasz i zmianę kolejności lub pominięcie określonego etapu cyklu produkcyjnego [8].

Pasje lecznicze w Unii Europejskiej

Skala produkcji i zastosowania pasz leczniczych różni się w krajach Unii Europejskiej. Według opublikowanego w 2010 r. raportu Komisji Europejskiej produkcja pasz leczniczych np. w 2008 r. była największa w Hiszpanii (2–3 mln ton), we Włoszech (1,3 mln ton) i we Francji (1 mln ton). Belgia (300 000 ton) i Czechy (99 000 ton) są również znaczącym producentem pasz leczniczych, natomiast zarówno w Niemczech, jak i w Danii wyprodukowano „tylko” po 12 000 ton. W niektórych krajach UE pasze lecznicze praktycznie nie znalazły zastosowania (Słowenia). Na podstawie danych przedstawionych we wspomnianym raporcie można

stwierdzić, że znaczenie pasz leczniczych jest największe we Włoszech, gdzie pasze lecznicze stanowiły w 2008 r. ponad 9% produkcji wszystkich pasz. W innych krajach wytwarzających pasze lecznicze ich udział w całkowitej puli wyprodukowanych pasz mieścił się w granicach od 3 do 7%. Natomiast w Danii i w Niemczech udział ten był bardzo niski i wynosił odpowiednio: 0,2 i 0,1%.

Wytwarzanie i stosowanie pasz leczniczych jest związane ze strukturą i liczbą gospodarstw rolnych oraz pogłowiem poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich w danym kraju, jak również preferencjami hodowców co do sposobu podawania leków *per os*. W krajach UE stosowanie pasz leczniczych jest najbardziej rozpowszechnione u świń. Ponadto są one dość powszechnie stosowane u kur, indyków i królików. Grupą plw najczęściej stosowaną do wytworzenia pasz leczniczych są tetracykliny, a także sulfonamidy i makrolidy. W zależności od kraju wykorzystywane jest doustne podawanie antybiotyków w postaci pasz leczniczych, podawanie leków z wodą oraz jako tzw. top dressing [6].

Stosowanie pasz leczniczych w Polsce

Według informacji uzyskanych z Głównego Inspektoratu Weterynarii ilość wyprodukowanych pasz leczniczych w Polsce w 2009 r. wyniosła 40 000 ton, w 2010 r. ponad 67 000 ton, w 2011 r. 61 000 ton, natomiast w 2012 r. nieco ponad 62 000 ton. Jak wspomniano wcześniej, pasze lecznicze mogą być wyprodukowane wyłącznie na bazie premiksów leczniczych, które zostały zarejestrowane i dopuszczone do obrotu przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Pasje lecznicze są produkowane na potrzeby danego stada i w danym czasie, na zlecenie lekarza weterynarii, który określa, jaki premiks leczniczy ma być zastosowany do danego gatunku zwierząt przy leczeniu określonej jednostki chorobowej. W zleceniu lekarz podaje skład paszy leczniczej ze szczególnym uwzględnieniem dawkowania premiksu leczniczego i okresu karencji, a jej stosowanie odbywa się pod nadzorem lekarza weterynarii. Wszystkie dopuszczone do obrotu premiksy lecznicze zawarte są w wykazie produktów leczniczych weterynaryjnych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej. W Polsce zarejestrowanych jest średnio ok. 60 premiksów leczniczych do sporządzania pasz leczniczych i zawierają różne substancje lecznicze: głównie substancje przeciwbakteryjne (antybiotyki i sulfonamidy), co stanowi ok. 80–85% wszystkich premiksów, a także leki przeciwczołchywne i niesterydowe leki przeciwzapalne (paracetamol).

Wśród zarejestrowanych premiksów leczniczych znajduje się stosunkowo niewielka liczba premiksów leczniczych do sporządzania pasz leczniczych dla drobiu, jest ich 11, w tym jeden z lekiem przeciwczołchywującym. Dostępne są premiksy z kolistyną, tiamuliną i tylozyną (po 2) oraz po jednym z chlorotetracykliną, linkomycyną, tiamfenikolem, sulfametaksazolem i flubendazolem. Zdecydowaną większość plw

dla drobiu przeznaczonych do antybiotykoterapii doustnej stanowią produkty z antybiotykami w postaci proszków lub roztworów do podawania z wodą do picia. Dominują tu preparaty z doksycykliną, amoksycyliną i fluorochinolonami.

Współczesna opieka lekarska nad fermami drobiu polega głównie na monitorowaniu i zabezpieczaniu przed chorobami. Do najczęściej występujących chorób bakteryjnych wśród drobiu zaliczyć należy salmonellozę, pasterelozę, kolibakteriozę, zapalenia jelit wywoływane przez bakterie beztlenowe oraz mykoplazmozę. Pasze lecznicze zawierają jeden lub kilka premiksów z substancjami przeciwbakteryjnymi w stężeniu terapeutycznym. Oddziaływanie na patogeny bakteryjne zawartymi w paszach leczniczych antybiotykami istotnie przyczynia się do szybszego powrotu do zdrowia lub zapobiegania rozwojowi choroby. Doustna antybiotykoterapia z użyciem pasz leczniczych dla drobiu znalazła zastosowanie w określonych stanach chorobowych, co przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Antybiotyki stosowane w paszach leczniczych dla drobiu i wskazania do ich zastosowania

| Antybiotyk | Wskazania lecznicze |
|-------------------|--|
| Chloroteracyklina | Pierwotne i wtórne zakażenia układu oddechowego, pokarmowego, moczowo-płciowego oraz zakażenia wieloukładowe |
| Kolistyna | Leczenie kolibakteriozy i salmonellozy oraz innych schorzeń układu pokarmowego |
| Linkomycyna | Zapobieganie zakażeniom wywołanym przez mikoplazmy, beztlenowcowym zakażeniom przewodu pokarmowego, martwicowemu zapaleniu jelit |
| Tiamfenikol | Leczenie chorób bakteryjnych układu oddechowego i przewodu pokarmowego |
| Tiamulina | Profilaktyka i leczenie chronicznego zakażenia dróg oddechowych (CRD) |
| Tylozyna | Profilaktyka i leczenie chorób układu oddechowego powodowanego przez mykoplazmy, zapalenia jelit powodowanego przez <i>Clostridium perfringens</i> |
| Sulfametaksazol | Leczenie infekcji wywołanych przez <i>Salmonella</i> spp., <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Haemophilus gallinarum</i> |

Analizując liczbę i rodzaj pasz leczniczych, które są badane w PIWet-PIB w kierunku oznaczania substancji czynnych i homogeniczności, powszechnie stosowanymi w Polsce antybiotykami w paszach leczniczych dla drobiu są: linkomycyna w paszach leczniczych dla brojlerów kurzych i chlorotetracyklina w paszach leczniczych dla indyków i brojlerów.

Urzędowa kontrola pasz leczniczych

Badania pasz leczniczych podczas urzędowej kontroli prowadzone w PIWet-PIB obejmują badanie następujących substancji czynnych: amoksycylina, chlorotetra-

cyklina, doksycyklina, linkomycyna, sulfaguanidyna, tiamulina i tylozyna. Badania polegają na oznaczaniu zawartości substancji czynnej w paszy leczniczej (czy jest zgodna z deklarowaną) i/lub na badaniu homogeniczności paszy leczniczej, które polega na ocenie stopnia wymieszania premiksu leczniczego z paszą, co powinno tworzyć jednolitą i stałą mieszaninę. Kryterium oceny homogeniczności paszy leczniczej jest współczynnik zmienności (CV), którego wartość $\leq 15\%$ świadczy o dobrym wymieszaniu substancji czynnej z paszą. W badaniach wyżej wymienionych antybiotyków stosowane są metody mikrobiologiczne, które są powszechnie wykorzystywane do oceny aktywności przeciwbakteryjnej antybiotyków. Do badań stosowana jest metoda studzienkowo-płytkowa oraz cylinderkowo-płytkowa (do badań z zakresu oznaczania tiamuliny), które pozwalają na oznaczenie stężenia substancji czynnej w paszach leczniczych, produktach pośrednich i premiksach leczniczych. Metoda oparta jest na porównaniu dyfuzji wzorca antybiotyku i próbki badanej do pożywki zakażonej odpowiednim drobnoustrojem, zwanym szczepem testowym. W miejscu działania antybiotyku następuje zahamowanie wzrostu drobnoustroju, co powoduje powstanie stref zahamowania wzrostu, których średnica jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku w roztworze. Dobór rozpuszczalnika oraz szczepu testowego zależy od tego, jaka substancja jest przedmiotem badania [4].

Urzędowa kontrola pasz leczniczych prowadzona jest od 2006 r. W latach 2006–2012 zbadano łącznie 2455 próbek. Liczbę i rodzaj próbek poddanych badaniom przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Liczba próbek z podziałem na rodzaje zbadanych w latach 2006–2012.

| Pasze lecznicze | | Liczba próbek zbadanych w latach 2006–2012 | | | |
|-----------------|------|--|--------------------|-------------------------------------|----------------|
| | | Produkty pośrednie | Premiksy lecznicze | Mieszanki paszowe, w tym czyszczące | |
| 2006 | 265 | 207/0* | 0/0 | 40/0 | 18/6 |
| 2007 | 454 | 372/29 | 5/0 | 59/0 | 18/4 |
| 2008 | 382 | 319/60 | 1/0 | 14/0 | 48/5 |
| 2009 | 353 | 292/27 | 0 | 11/0 | 50/19 |
| 2010 | 435 | 378/35 | 0 | 7/0 | 50/31 |
| 2011 | 325 | 288/14 | 0 | 6/0 | 31/11 |
| 2012 | 241 | 207/17 | 0 | 4/0 | 30/7 |
| Łącznie | 2455 | 2063/182(8,8%) | 6/0 | 141/0 | 245/83 (33,9%) |

* Liczba próbek zbadanych/liczba próbek niespełniających wymagań odnośnie zawartości i/lub homogeniczności oraz pozostałości substancji czynnej

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w większości przypadków zawartość substancji czynnej w paszach leczniczych była zgodna z deklarowaną oraz zachowana była homogeniczność pasz, na co wskazywały wartości współczynnika zmienności (CV) $\leq 15\%$. Biorąc pod uwagę wyniki badań pasz leczniczych, stwierdzono, że w 182 próbkach (8,8%) zawartość antybiotyku nie zgadzała się z deklarowaną lub pasza nie była homogeniczna, tzn. wartość współczynnika zmienności (CV) była większa niż 15%. We wszystkich badanych premiksach leczniczych i produktach pośrednich zawartość substancji aktywnej była zgodna z deklarowaną. Spośród 245 próbek mieszanek czyszczących i mieszanek paszowych wytworzonych po produkcji paszy leczniczej 83 (33,9%) zostały ocenione jako dodatnie, czyli zawierające pozostałość substancji czynnej, którą zawierała wcześniej wytworzona pasza lecznicza. Stwierdzenie lub brak pozostałości substancji czynnej w mieszance czyszczącej świadczy o tym, jak skuteczny był proces czyszczenia linii technologicznej po zakończeniu produkcji paszy leczniczej. Wytwórnice pasz produkują szeroki asortyment mieszanek paszowych, wykorzystując te same linie technologiczne i przygotowując różne pasze w tych samych urządzeniach. Substancje, ze względu na swoje właściwości elektrostatyczne, mogą pozostawać na ściankach mieszalników i przenosić do kolejnych partii pasz. W takiej sytuacji nieuniknione jest „dostawanie się” pewnych ilości substancji czynnej zawartej w paszy leczniczej do kolejnej partii paszy produkowanej w następnej kolejności. Jest to związane z tzw. efektem przeniesienia (carry-over), który jest problemem związanym z produkcją pasz leczniczych. Problem ten dotyczy również pasz zawierających kokcydiostatyki i zanieczyszczeń krzyżowych. W przypadku kokcydiostatyków istnieją jednak regulacje dotyczące maksymalnych akceptowalnych poziomów tych substancji w paszach innych niż docelowe [3]. W przypadku antybiotyków stosowanych w paszach leczniczych brak jest regulacji prawnych dotyczących maksymalnych poziomów tych substancji w paszach, które już nie powinny ich zawierać.

Piśmiennictwo

- [1] Dyrektywa Rady 70/524/EWG z 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych.
- [2] Kwiatek K., Chomiuk A., Przeniosło-Siwczyńska M., 2008. Pasze lecznicze – wybrane aspekty prawne wytwarzania, wprowadzania do obrotu i stosowania. *Życie Wet.*, 83 (3), 230–232.
- [3] Olejnik M., Szprengier-Juszkiewicz T., Jedziniak P., 2013. Wyniki urzędowej kontroli pasz w zakresie oznaczania kokcydiostatyków. *Pasze Przemysłowe, Materiały konferencyjne „Materiały i dodatki paszowe aktualne wymagania”*, Zamość 25–26.04.2013 r.
- [4] Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K., 2011. Urzędowa kontrola jakości pasz leczniczych produkowanych w Polsce. *Med. Wet.*, 67, 770–773.
- [5] Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K., 2013. Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Wet.*, 88, 104–108.

- [6] Raport Komisji Europejskiej „Evaluation of the EU Legislative Framework in the Field of Medicated Feed”, 2010.
- [7] Rozporządzenie (WE) 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
- [8] Stulich R., 2007. Wytwarzanie, przechowywanie, transport i kontrola produkcji pasz leczniczych. Pasze Przemysłowe, 7/8, 2–6.
- [9] Ustawa o paszach z 22 lipca 2006 r. z późn. zm.

Kokcydioza u drobiu oraz jej zapobieganie – wrażliwość i oporność

Coccidiosis in poultry and its prevention – sensitivity and resistance

Kokcydioza drobiu jest pierwotniaczą chorobą wywoływaną przez jednokomórkowe organizmy eukariotyczne z rodzaju *Eimeria*. Do zarażenia dochodzi poprzez przewód pokarmowy. Ptaki zarażają się wysporulowanymi oocystami ze środowiska. *Eimeria* jest pasożytem wewnątrzkomórkowym. Gdy oocysty dostaną się do przewodu pokarmowego, uwalniają się z nich sporozycyty, które wnikają do enterocytów. Tam wzrastają oraz dzielą się, czym zakłócają normalną funkcję komórek gospodarza, prowadząc do ich śmierci. W zależności od intensywności inwazji oraz patogenności szczepów *Eimeria* mogą wywoływać kliniczną lub subkliniczną postać kokcydiozy. Oocysty są bardzo odporne na warunki środowiska oraz środki dezynfekcyjne. Jeżeli u młodych, nieszczepionych ptaków nie stosuje się chemioprophylaktyki, dochodzi u nich do pojawienia się choroby.

Kokcydioza, jeśli nie jest skutecznie kontrolowana, pozostaje jedną z najważniejszych pod względem ekonomicznym chorób w nowoczesnej produkcji kurcząt brojlerów. Najpowszechniej stosowaną metodą zapobiegania kokcydiozie jest chemioprophylaktyka polegająca na podawaniu kokcydiostatyków w paszy. Na terenie krajów Unii Europejskiej (UE) dostępna jest ograniczona liczba kokcydiostatyków: lazalocyd (Avatec®), salinomycyna (Salinomax®, Sacox®, Kokcisan®), monenzyna (Elanco-ban®, Coxidin®), narazyne (Monteban®), maduramycyna (Cygro®), semduramycyna

(Aviatrix[®]), diclazuril (Clinacox[®]), robenidyna (Robenz[®]), nikarbazyna (Nicarbazin[®]) oraz dekokwinat (Deccox[®]). Maxiban[®] jest połączeniem dwóch kokcydiostatyków nikarbazyny i narazyiny. Z racji powszechnego stosowania kokcydiostatyków coraz większego znaczenia nabiera problem pojawiania się lekooporności u terenowych szczepów kokcydiów.

Należy rozróżnić kokcydiostatyki chemiczne (diclazuril, robenidyna, dekokwinat i nikarbazyna) od jonoforowych. Jonofory mogą zostać podzielone na trzy różne klasy, tzn. monowalentne (salinomycyna, monenzyna, narazyina), monowalentne glikozydy (maduramycyna, semduramycyna) oraz dwuwalentne jonofory (lazalocyd). Wszystkie jonofory zaburzają równowagę osmotyczną wewnątrz komórki kokcydiów, prowadząc do ich śmierci, jednak różne klasy jonoforów wykazują odmienne sposoby wywoływania tego zjawiska. Jonofory różnych klas działają selektywnie wobec odmiennych kationów (np. jonofory monowalentne wykazują najwyższą wybiórczość wobec Na^+ i K^+ ; jonofory dwuwartościowe wobec Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} , zatem oporność krzyżowa pomiędzy różnymi klasami jonoforów jest ograniczona. Z drugiej strony, oporność krzyżowa między jonoforami z tej samej klasy została udowodniona badaniami naukowymi i jest regularnie potwierdzana doniesieniami z terenu. Natomiast każdy z dostępnych kokcydiostatyków chemicznych posiada swój odrębny mechanizm działania, więc w ich obrębie nie dochodzi do zjawiska oporności krzyżowej.

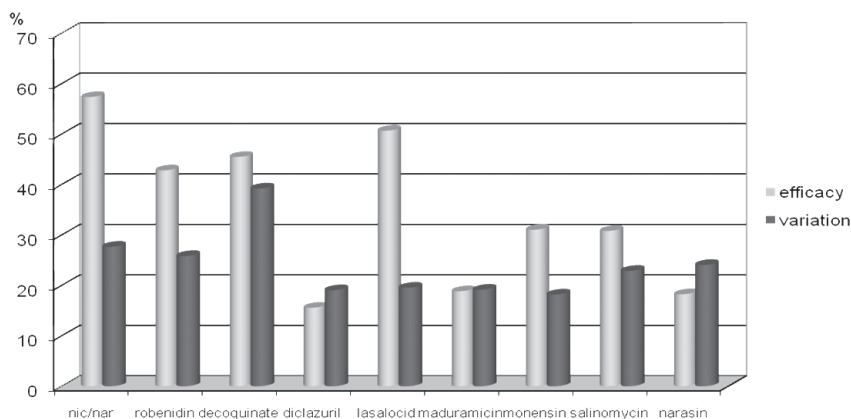
Zatem w odniesieniu do obydwu grup kokcydiostatyków chemicznych oraz jonoforowych logiczną i prostą zasadą w celu zapobiegania zjawisku oporności jest zmiana z jednej klasy kokcydiostatyków na drugą, zanim dojdzie do rozwoju lekooporności. Takie postępowanie zapewni dłuższą skuteczność wszystkich stosowanych kokcydiostatyków.

Cztery najważniejsze zasady zmiany kokcydiostatyków:

1. Nie używać tego samego kokcydiostatyku zbyt długo. W praktyce limit czasowy stosowania kokcydiostatyków jonoforowych wynosi maksymalnie 6 miesięcy, natomiast chemicznych do 3 miesięcy (jeden pełen cykl produkcyjny na poziomie integracji) w pełnym programie lub 4,5 miesiąca (dwa cykle na poziomie integracji) przy zastosowaniu programu wymiennego.
2. Wprowadzać w przypadku używanego kokcydiostatyku odpowiednio długie przerwy przed jego ponownym zastosowaniem. W praktyce, szczególnie gdy stosowany jest jonofor oraz dla każdego następnego jonoforu z tej samej grupy, przerwa powinna wynosić co najmniej 6 miesięcy. Nie używać poszczególnych kokcydiostatyków chemicznych przez okres co najmniej 9 miesięcy od czasu ich ostatniego wykorzystania.
3. Dokonywać zmian pomiędzy różnymi grupami kokcydiostatyków.
4. „Chemical clean-up” – „czyszczenie” fermi za pomocą kokcydiostatyków chemicznych. W praktyce chemiczne kokcydiostatyki mogą być i są często

stosowane w celu zredukowania presji kokcydiozy, w tzw. programie „clean-up”. Programy „clean-up” powodujące zmniejszenie ilości kokcydii w środowisku przyczyniają się z reguły do poprawy uzyskiwanych parametrów produkcyjnych. Żeby to osiągnąć, zaleca się stosowanie chemicznych środków kokcydiobójczych w trakcie całego cyklu produkcyjnego kurcząt rzeźnych (w programie ciągłym). Niektórzy producenci, aby ograniczyć ryzyko nabycia oporności, nie stosują jednego kokcydiostatyku chemicznego w programie ciągłym, lecz posługują się dwoma różnymi kokcydiostatykami chemicznymi, stosując tzw. program wymienny. Ze względu na silny kokcydiobójczy efekt wobec wszystkich wrażliwych szczepów kokcydiostatyki chemiczne redukują znacznie ilość oocyst kokcydii w środowisku. Obserwuje się przy tym zależność, że im silniejszy efekt kokcydiobójczy, tym szybciej narasta lekooporność kokcydii na dany kokcydiostatyk, więc nie należy ich nadużywać.

W celu porównania wrażliwości terenowych szczepów *Eimeria* na działanie różnych kokcydiostatyków zastosowano przyżyciowy test wrażliwości na działanie kokcydiostatyków „in vivo anticoccidial sensitivity test” (AST). Celem opisywanych badań było podsumowanie wyników 136 testów wykonanych na terenowych izolatach *Eimeria* pochodzących z ferm z terenu Europy, bliskiego Wschodu oraz Afryki w okresie od 2000 do 2012 r. Przebadano następujące kokcydiostatyki: jonoforowe (lazalocyd, maduramycyna, salinomycyna, monenzyna, narazyna) oraz syntetyczne (robenidyna, dekokwinat, diclazuril), jak również mieszaninę narazyny z nikarbazyną. Wszystkie substancje zostały przebadane w ich najwyższych dopuszczalnych i zarejestrowanych na terenie UE dawkach. Skuteczność ich działania została określona poprzez redukcję natężenia zmian patologicznych wywoływanych przez *E. acervulina*, *E. maxima* oraz *E. tenella*, jak również poprzez kontrolę przyrostu masy ciała ptaków otrzymujących kokcydiostatyk w porównaniu z kontrolnymi, zarażonymi, nieleczonymi grupami ptaków (IUCGs).



Rys. 1. Skuteczność kokcydiostatyków (średnia poprawa AST I–I34)

Tylko jeden kokcydiostatyk jonoforowy (lazalocyd), dwa preparaty syntetyczne (robenidyna i dekokwinat) oraz połączenie narazyny z nikarbazyną skutkowało wzrostem średnich przyrostów masy ciała o ponad 40%. Najbardziej powtarzalny efekt uzyskano przy stosowaniu lazalocidu (SD 19,6) (rys. 1).

Szczepy *E. acervulina* wykazały najwyższą wrażliwość na działanie dekokwinatu – redukcja zmian w porównaniu z nieleczoną, zainfekowaną grupą kontrolną (IUCGs) wyniosła 42,5%, podczas gdy w stosunku do mieszaniny narazyny z nikarbazyną oraz robenidyny wyniosła odpowiednio 38,8 i 38,1%. Szczepy *E. maxima* wykazały najwyższą wrażliwość na lazalocyd – redukcja zmian anatomopatologicznych wyniosła 45,6%, podczas gdy w odniesieniu do mieszaniny narazyny i nikarbazyny oraz robenidyny odpowiednio o 26,8 i 19,2%. Szczepy *E. tenella* wykazały najwyższą wrażliwość na działanie dekokwinatu – zmniejszenie widocznych zmian o 73,2%, podczas gdy w przypadku zastosowania lazalocytu oraz połączenia narazyny z nikarbazyną odpowiednio o 40,5 oraz 37,3%.

Środki będące monowalentnymi jonoforami (salinomycyna, monenzyna, narazyna), podobnie jak jonofor glikozydowy maduramycyna, wykazały niższą skuteczność kokcydiostatycznego oddziaływania przejawiającą się słabszą wrażliwością różnych gatunków *Eimeria*, wahającą się pomiędzy 7,3 a 33,1%. Najbardziej wrażliwe na ich działanie okazały się szczepy *E. acervulina*, a najbardziej odporne szczepy *E. maxima*. W aspekcie ograniczania zmian anatomopatologicznych monenzyna i salinomycyna okazały się bardziej skuteczne odpowiednio o 31,0 i 30,8% aniżeli maduramycyna i narazyna (odpowiednio o 18,9 i 18,3%). Niższa skuteczność kokcydiostatyków monowalentnych może być związana z ich powszechnym stosowaniem, jak również z istnieniem oporności krzyżowej pomiędzy nimi. Natomiast jonofor dwuwartościowy lazalocyd wykazał znacząco wyższą skuteczność (poprawa o 50,7%), co może wiązać się z jego odmiennym mechanizmem działania. Diclazuril będący kokcydiostatykiem syntetycznym powodował redukcję zmian anatomopatologicznych o 15,6%.

Oceniane kokcydiostatyki cechowały się odmienną skutecznością w przeprowadzonych badaniach z różnymi izolatami kokcydiów zależnie od ich wrażliwości. Kokcydiostatyki jonoforowe, mówiąc ogólnie, były bardziej stałe w ich skuteczności (SD 18,2–24,0), podczas gdy kokcydiostatyki syntetyczne wykazały większe zróżnicowanie (SD 25,8–39,2). Było to prawdopodobnie spowodowane odmiennymi mechanizmami rozwoju oporność w odniesieniu do tych dwóch grup kokcydiostatyków: jonoforowych oraz syntetycznych. Lazalocyd cechował się najbardziej stabilną skutecznością działania.

Występowanie i oporność przeciwdrobnoustrojowa *Campylobacter* spp. izolowanych ze stad i tusz brojlerów

Prevalence and antibiotic resistance *Campylobacter* spp. isolated from broilers flock and carcasses

Zachorowania spowodowane przez bakterie należące do rodzaju *Campylobacter*, głównie *C. jejuni*, są w ostatnich latach najczęściej występującymi w Unii Europejskiej (UE) chorobami odzwierzęcymi, których źródłem jest zanieczyszczona żywność. W latach 2008–2011 obserwowany jest w krajach UE stały wzrost liczby przypadków kamylobakteriozy. W 2011 r. liczba potwierdzonych zachorowań wzrosła w porównaniu z rokiem 2010 i wyniosła łącznie ponad 220 tys. przypadków w krajach UE. Głównym rezerwuarem *Campylobacter* dla ludzi są drób i mięso drobiowe, w których bakterie te utrzymują się stale na wysokim poziomie. Obserwowane są jednak znaczące różnice w występowaniu tych drobnoustrojów pomiędzy poszczególnymi państwami. W 2011 r. odnotowano obecność *Campylobacter* od 12,8 do 80,6% w przypadku stad brojlerów oraz od 3,2 do 84,6% w odniesieniu do tusz brojlerów w zależności od kraju [3].

Oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe wśród bakterii zoonotycznych, do których należy *Campylobacter*, jest obecnie szczególnie intensywnie badana w całym łańcuchu żywnościowym, z uwagi na znaczenie tego zjawiska dla zdrowia publicznego. Wzrastające występowanie szczepów opornych może w znaczący sposób wpłynąć na efektywność terapii u ludzi. W 2010 r. stwierdzono w krajach UE na

bardzo wysokim poziomie oporność *Campylobacter* na fluorochinolony oraz jednocześnie na niskim lub średnim na makrolitdy, wśród izolatów pochodzących od ludzi i zwierząt gospodarskich, w tym brojlerów [2]. Tego typu dane są szczególnie niepokojące w aspekcie przytoczonych wyżej opinii, że głównym źródłem *Campylobacter* dla ludzi jest mięso drobiowe.

Celem badań była ocena występowania *Campylobacter* spp. u drobiu, stanowiącym potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów oraz charakterystyka izolowanych szczepów w aspekcie oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe.

Materiał i metody

W badaniach wykorzystano łącznie 254 izolaty *Campylobacter* wyosobnione z jelit (101 szczepów) i tuszek (153 izolaty), pochodzące z terenu całego kraju. Do izolacji i identyfikacji bakterii rodzaju *Campylobacter* z tuszek drobiowych stosowano normę PN-ISO 10272: „Mikrobiologia żywności i pasz; Horyzontalna metoda wykrywania termotolerancyjnych bakterii z rodzaju *Campylobacter*”. W przypadku jelit, po przewiezieniu do laboratorium, materiał posiewano na selektywną pożywkę stałą – agar Karmali. Próbkę inkubowano w atmosferze mikroaerofilnej, w temperaturze 41,5°C, przez 24 do 48 h. Z uzyskanej hodowli bakteryjnej do dalszych badań pobierano po jednej, morfologicznie typowej dla *Campylobacter* kolonii. Przynależność rodzajową i gatunkową izolatów bakteryjnych potwierdzano następnie testami multipleks PCR [7, 8].

Określanie wrażliwości izolatów *Campylobacter* na wybrane substancje przeciwbakteryjne wykonano przy użyciu techniki minimalnych rozcieńczeń (Microbroth Dilution Method) i określania wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration). W tym celu wykorzystano mikropłytki EUCAMP (Trek Diagnostics, UK), zawierające określone, wzrastające stężenia antybiotyków (tab. 1). Odczytu dokonywano za pomocą czytnika SensiTouch Sensititre®, stosując wartości graniczne podane w tabeli 1.

W celu określenia mechanizmu oporności na fluorochinolony zbadano występowanie mutacji w genie *gyrA*, stosując test MAMA-PCR (Mismatch Amplification Mutation Assay – PCR). Oznaczono również, za pomocą testu PCR, występowanie genu *tet(O)* skorelowanego z opornością na tetracykliny oraz genów *aadE* i klastaru *aadE-sat-aphA-3*, powiązanych z występowaniem oporności na aminoglikozydy. Ponadto określono obecność dwóch najczęściej występujących mutacji: A2075G i A2074C, odpowiedzialnych za oporność na erytromycynę, stosując również test MAMA-PCR [1, 4–6, 9, 10].

Oznaczono także, czy różnice w występowaniu oporności na antybiotyki pomiędzy szczepami *C. jejuni* a *C. coli* są statystycznie istotne, wykorzystując program Statistica 10.0 (StatSoft, Polska) i Tabele 2x2 oraz dokładny test Fischera. Uznawano różnice za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

Tabela 1. Substancje przeciwdrobnoustrojowe, zakres rozcieńczeń oraz wartości graniczne stosowane dla szczepów *Campylobacter*

| Klasa substancji przeciwdrobnoustrojowej | Substancja przeciwdrobnoustrojowa | Zakres rozcieńczeń (mg/l) | Wartości graniczne (mg/l) | |
|--|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| | | | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
| Aminoglikozydy | Gentamycyna (GEN) | 0,12–16 | 1 | 2 |
| | Streptomycyna (STR) | 1–16 | 2 | 4 |
| Makrolidy | Erytromycyna (ERY) | 0,5–32 | 4 | 16 |
| Chinolony i fluorochinolony | Ciprofloksacyna (CIP) | 0,06–4 | 1 | 1 |
| | Kwas nalidiksowy (NAL) | 2–64 | 16 | 32 |
| Tetracykliny | Tetracyklina (TET) | 0,25–16 | 2 | 2 |
| Amfenikole | Chloramfenikol (CHL) | 2–32 | 16 | 16 |

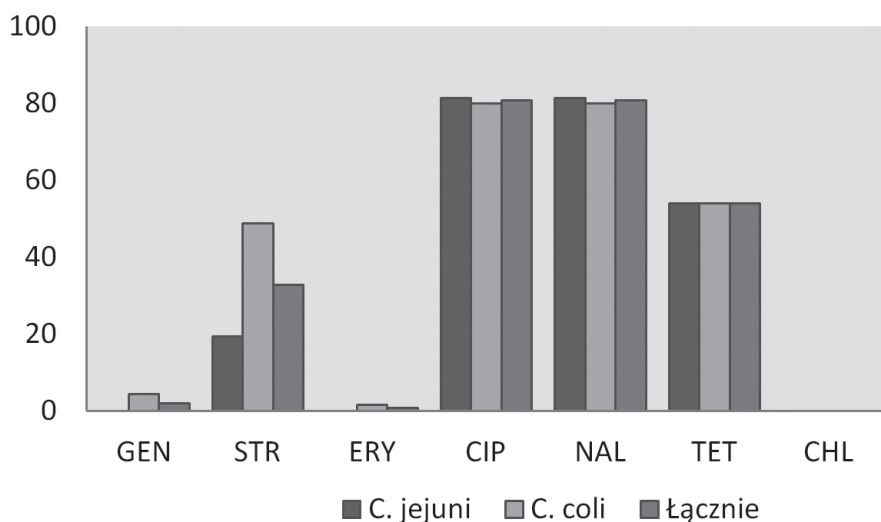
Wyniki i omówienie

W czasie badań z rzeźni zlokalizowanych na terenie całego kraju pobierano jelita i tuszki drobiowe w celu izolacji i zgromadzenia kolekcji szczepów *Campylobacter*. Łącznie uzyskano 254 szczepy, z czego 139 zidentyfikowano jako *C. jejuni*, a 115 jako *C. coli* (tab. 2).

Tabela 2. Szczepy *Campylobacter* wyizolowane z jelit i tuszek drobiowych

| Źródło próbek | Liczba (%) szczepów | Gatunek <i>Campylobacter</i> | |
|---------------|---------------------|------------------------------|----------------|
| | | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
| Jelita | 101 | 55 (54,46) | 46 (45,54) |
| Tuszki | 153 | 84 (54,90) | 69 (45,10) |
| Razem | 254 | 139 (54,72) | 115 (45,28) |

Wyniki oznaczania oporności *C. jejuni* i *C. coli* na substancje przeciwdrobnoustrojowe przedstawiono na rycinie 1. Stwierdzono, że 80,7% szczepów należących do obu gatunków opornych było na kwas nalidiksowy i ciprofloksacynę. Według danych EFSA średni poziom oporności na tę substancję w krajach UE wyniósł od ok. 50 do 70%, odpowiednio dla *C. jejuni* i *C. coli*, a więc był niższy niż odnotowany w obecnej pracy [2]. W trakcie prowadzonych badań stwierdzono także, że po 54% izolatów *C. jejuni* i *C. coli* było opornych na tetracykliny (ryc. 1). W piśmiennictwie obserwowana jest zwykle różnica w poziomie oporności na tę grupę antybiotyków pomiędzy wymienionymi dwoma gatunkami *Campylobacter*. Według danych EFSA średni odsetek szczepów opornych na tetracyklinę w krajach UE wynosił odpowiednio 22% dla *C. jejuni* i 62% dla *C. coli* w przypadku szczepów izolowanych z mięsa drobiowego oraz odpowiednio 32 i 73% dla szczepów pochodzących od drobiu [2].



Ryc. 1. Występowanie (%) oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe wśród szczepów *Campylobacter* spp. (GEN – Gentamycyna, STR – Streptomycyna, ERY – Erytromycyna, CIP – Ciprofloksacyna, NAL – Kwas nalidiksowy, TET – Tetracyklina, CHL – Chloramfenikol)

W odniesieniu do oporności na streptomycynę wykazano, że 48,7% szczepów *C. coli* i 19,4% *C. jejuni* było opornych na ten antybiotyk i różnice te były statystycznie istotne ($p < 0,05$). Oporność na gentamycynę stwierdzono jedynie u 5 szczepów *C. coli* i żadnego *C. jejuni*.

Erytromycyna jest obecnie antybiotykiem z wyboru przy leczeniu poważniejszych przypadków kamylobakteriozy. Stwierdzono, że jedynie 2 spośród 254 (0,8%) szczepów *Campylobacter* było opornych na tę substancję przeciwbakteryjną (ryc. 1). Oba szczepy należały do gatunku *C. coli*, jeden pochodził z jelit, a drugi był wyizolowany z tuszki drobiowej w tym samym czasie i miejscu. Niski poziom oporności na erytromycynę był także notowany w innych krajach UE [2]. Nie stwierdzono żadnego szczepu opornego na chloramfenikol spośród przebadanych 254 izolatów (ryc. 1). Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy opornością przeciwdrobnoustrojową szczepów *Campylobacter* pochodzących z jelit i tuszek drobiowych w odniesieniu do wszystkich badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych ($p \geq 0,05$).

W realizowanych badaniach określano także molekularne mechanizmy oporności przeciwdrobnoustrojowej *Campylobacter*. W pierwszym etapie oznaczono mutacje w genie *gyrA*, których występowanie łączone jest z opornością na fluorochinolony. Wyniki testu PCR wskazują, że wszystkie przebadane szczepy *C. coli* i prawie wszystkie *C. jejuni*, odporne na ciprofloksacynę (i jednocześnie żaden szczep wrażliwy na ten antybiotyk), dawały właściwy dla mutacji w kodonie 86 (zamiana treoniny w izoleucynę) produkt PCR. Dodatkowo, wyniki testu MAMA-PCR zweryfikowano, poddając produkt PCR sekwencjonowaniu w przypadku losowo wybranych

20 szczepów *C. jejuni* i 20 *C. coli*. We wszystkich przypadkach uzyskano potwierdzenie mutacji w genie *gyrA*, czyli zamianę ACA→ATA w przypadku *C. jejuni* oraz ACT→ATT dla *C. coli*.

Wszystkie szczepy *Campylobacter* przebadano także w kierunku obecności genu *tet(O)*, którego występowanie łączone jest z opornością na tetracykliny. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zarówno izolaty *C. jejuni*, jak i *C. coli* (z wyjątkiem dwóch szczepów, po jednym *C. jejuni* i *C. coli*) odporne na wspomnianą wyżej substancję przeciwbakteryjną posiadały ten gen, natomiast u szczepów wrażliwych marker ten nie występował (z wyjątkiem 1 szczepu *C. jejuni* i 1 *C. coli*).

Z opornością na aminoglikozydy, a w szczególności streptomycynę, wiązane jest występowanie dwóch markerów genowych: *aadE* i klasteru *aadE-sat-aphA-3*. W przypadku 171 izolatów *Campylobacter* wrażliwych na streptomycynę oba geny stwierdzono jedynie u 7 *C. jejuni* i 1 *C. coli*. Jednak w odniesieniu do szczepów opornych na tę substancję jedynie u 26 spośród 83 (31,3%) wykryto obecność genu *aadE* i klasteru *aadE-sat-aphA-3*.

Obecność dwóch mutacji w genie 23S *rRNA*: A2075G i A2074C, łączonych z wysokim poziomem oporności na erytromycynę, badano u szczepów opornych na ten antybiotyk, stosując test MAMA-PCR. Mutacje A2075G zidentyfikowano u 2 opornych izolatów *C. coli*. Wyniki testu MAMA-PCR zweryfikowano pozytywnie, poddając odpowiednie fragmenty genu 23S *rRNA* sekwencjonowaniu.

W tabeli 3 przedstawiono profile oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe szczepów *C. jejuni* i *C. coli* pochodzących z jelit i tuszek drobiowych. Analizując uzyskane dane, stwierdzono, że 37 z 254 (14,6%) przebadanych szczepów było wrażliwych na wszystkie oznaczane substancje przeciwbakteryjne. Natomiast 75 (29,5%) szczepów było opornych na jedną klasę substancji przeciwbakteryjnych (aminoglikozydy, tetracykliny lub chinolony) (tab. 3, profile 2, 3 i 4). Oporność na antybiotyki należące do dwóch różnych klas stwierdzono u największej grupy szczepów *Campylobacter* (76 izolatów, 30,0%) (tab. 3, profile 5, 6 i 7). Najczęściej występującym profilem oporności na substancje przeciwbakteryjne w obrębie gatunku *C. jejuni* był profil 6, stwierdzony u 46 ze 139 (33,1%) szczepów. W przypadku *C. coli* najczęściej wykazano jednoczesną oporność na ciprofloksacynę, kwas nalidiksowy, tetracyklinę i streptomycynę (profil 8, tab. 3). Wielooporność, definiowaną jako oporność na więcej niż dwie substancje przeciwbakteryjne należące do różnych klas, stwierdzono łącznie u 66 (26,0%) szczepów *Campylobacter*, w tym 25 ze 139 (18,0%) *C. jejuni* i 41 ze 115 (35,7%) *C. coli*. Tego typu sytuacja, czyli wyższy poziom oporności w obrębie *C. coli* niż *C. jejuni*, była często obserwowana także w innych badaniach [2].

Tabela 3. Profile oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe *Campylobacter* spp.

| Numer profilu | Profil oporności | Liczba szczepów | | | |
|---------------|---|----------------------------|--------|--------------------------|--------|
| | | <i>C. jejuni</i> (n = 139) | | <i>C. coli</i> (n = 115) | |
| | | Jelita | Tuszki | Jelita | Tuszki |
| 1 | Wrażliwe na wszystkie używane substancje przeciwdrobnoustrojowe | 10 | 11 | 5 | 11 |
| 2 | STR* | – | 1 | 1 | 1 |
| 3 | TET | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | CIP, NAL | 18 | 23 | 10 | 13 |
| 5 | TET, STR | – | – | – | 1 |
| 6 | CIP, NAL, TET | 15 | 31 | 5 | 11 |
| 7 | CIP, NAL, STR | 1 | – | 5 | 7 |
| 8 | CIP, NAL, TET, STR | 9 | 16 | 15 | 19 |
| 9 | CIP, NAL, ERY, TET, STR | – | – | 1 | 1 |
| 10 | CIP, NAL, TET, STR, GEN | – | – | 2 | 3 |

* Stosowane skróty: GEN – Gentamycyna, STR – Streptomycyna, ERY – Erytromycyna, CIP – Ciprofloksacyna, NAL – Kwas nalidiksowy, TET – Tetracyklina, CHL – Chloramfenikol

Chociaż dostępne dane dotyczące oporności przeciwdrobnoustrojowej *Campylobacter* różnią się między sobą, w ostatnich latach obserwowany był jednak wzrost liczby szczepów opornych szczególnie na makrolidy i chinolony. Jest to szczególnie niepokojące w kontekście faktu, że antybiotyki z tych grup są lekami z wyboru w leczeniu kamylobakteriozy u ludzi. Wielu autorów sugeruje, że używanie zbyt dużej ilości antybiotyków w medycynie weterynaryjnej wpływa znacząco na wzrost liczby szczepów opornych, w tym izolowanych od ludzi. Jednak wiele innych czynników ekologicznych i molekularnych może oddziaływać na zwiększenie się oporności szczepów. Dlatego też niezbędne jest monitorowanie oporności na najważniejsze z punktu widzenia medycyny ludzkiej substancje przeciwdrobnoustrojowe w całym łańcuchu żywnościowym.

Badania finansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki nr N N 308 237636.

Piśmiennictwo

- [1] Alonso R., Mateo E., Churrua E., Martinez I., Girbau C., Fernandez-Astorga A., 2005. MAMA-PCR assay for the detection of point mutations associated with high-level erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *J. Microbiol. Meth.*, 63, 99–103.
- [2] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 2012, 2598.
- [3] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 2013, 3129.
- [4] Gibreel A., Skold O., Taylor D.E., 2004. Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, 10, 98–105.
- [5] Gibreel A., Tracz D.M., Nonaka L., Ngo T.M., Connell S.R., Taylor D.E., 2004. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 48, 3442–3450.
- [6] Pinto-Alphandary H., Mabilat C., Courvalin P., 1990. Emergence of aminoglycoside resistance genes *aada* and *aade* in the genus *Campylobacter*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 34, 1294–1296.
- [7] Wang G.H., Clark C.G., Taylor T.M., Pucknell C., Barton C., Price L., Woodward D.L., Rodgers F.G., 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 4744–4747.
- [8] Wiczorek M., Osek J., 2005. Multiplex PCR assays for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Med. Wet.*, 61, 797–799.
- [9] Zirnstein G., Helsel L., Li Y., Swaminathan B., Besser J., 2000. Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 1–7.
- [10] Zirnstein G., Li Y., Swaminathan B., Angulo F., 1999. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: Detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3276–3280.

Kształtowanie się lekowrażliwości szczepów z rodzaju *Campylobacter* izolowanych od drobiu oraz ptaków wolno żyjących

Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* strains isolated from poultry and wild birds

Narastanie oporności szczepów zoonotycznych (*Campylobacter* spp.) na stosowane w produkcji zwierzęcej chemioterapeutyki stanowi aktualny problem w patologii drobiu. Według danych z raportu EFSA (European Food Safety Authority) kamylobakterioza zajmuje czołowe miejsce pod kątem liczby potwierdzonych przypadków u ludzi. W 2011 r. odnotowano w Europie aż 220 209 potwierdzonych przypadków kamylobakteriozy, salmonellozy zaś 95 548 przypadków [3]. Z analizy danych zamieszczonych w raportach EFSA w ostatnich latach wynika, że najczęściej występującą chorobą zoonotyczną u ludzi w Europie jest kamylobakterioza. W 2010 r. liczba potwierdzonych przypadków tej choroby w Europie wynosiła łącznie ponad 212,000, zaś salmonellozy 99,020. W Polsce natomiast obserwuje się tendencję odwrotną, liczba stwierdzanych rocznie przypadków zakażeń pokarmowych na tle *Campylobacter* spp. utrzymuje się na niskim poziomie, od 257 w 2008 r., do 354 w 2011 r. w przeciwieństwie do zakażeń powodowanych przez *Salmonella* sp. Rocznie klinicznie potwierdzonych przypadków salmonellozy u ludzi odnotowuje się blisko 25 razy więcej niż przypadków kamylobakteriozy. Prawdopodobnie związane jest to z trudnościami diagnostycznymi w labora-

toriach oraz dużą wrażliwością bakterii na czynniki środowiska pozaustrojowego (wysychanie, światło, tlen).

Pałeczki z rodzaju *Campylobacter* rzadko wywołują u drobiu objawy kliniczne choroby, natomiast u ludzi mogą powodować zaburzenia żołądkowo-jelitowe, silne, krwawe biegunki, wymioty, bóle głowy. U drobiu kamylobakterioza przebiega z zaburzeniami jelitowymi charakteryzującymi się wodnistą biegunką z domieszką śluzu lub krwi, odwodnieniem, obniżeniem przyrostów masy ciała, gorszymi wskaźnikami wykorzystania paszy. W stadach kur niosek zakażonych *Campylobacter* spp. obserwuje się obniżoną nieśność i wylęgowość.

Do najczęściej izolowanych od drobiu i ludzi gatunków *Campylobacter* należą *C. jejuni* i *C. coli*. Źródłem zakażenia dla ludzi mogą być zwierzęta – nosiciele pałeczek *Campylobacter*, skażona woda czy produkty pochodzenia zwierzęcego, głównie surowe, niedogotowane mięso drobiowe [3] lub skontaminowana żywność mająca kontakt ze skażonym bakteriami sokiem mięsnym. Na świecie pojawia się coraz więcej doniesień na temat potencjalnego udziału ptaków wolno żyjących w rozprzestrzenianiu zakażeń powodowanych przez te drobnoustroje. Kamylobakterioza u ludzi najczęściej ma charakter przemijający i rzadko wymaga interwencji lekarza. Jednak w przypadku infekcji wywołanej przez wysoce zjadliwe lub odporne szczepy *Campylobacter* spp. może dochodzić do powikłań w postaci zapalenia stawów czy zaburzeń neurologicznych (zespół Guillain-Barre).

Wieloletnie stosowanie chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych w przemyśle drobiarskim wywarło duży wpływ na kształtowanie się lekowrażliwości różnych szczepów bakterii, w tym *Campylobacter* spp. Sytuacja ta może stwarzać problem w doborze efektywnej terapii antybakteryjnej zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Szczepy odporne mogą być transmitowane poprzez żywność pochodzenia zwierzęcego na ludzi, a następnie wywoływać trudno leczące się biegunki. Warto podkreślić, że w produkcji drobiarskiej oraz medycynie ludzkiej wykorzystywane są te same grupy chemioterapeutyków (fluorochinolony, tetracykliny, aminoglikozydy), co dodatkowo stwarza zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Oporność na fluorochinolony jest wynikiem mutacji punktowych w regionie QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region) w genie *gyrA*, kodującym podjednostkę enzymu gyrazy DNA – podtyp II topoizomazy. Najczęściej spotykaną mutacją warunkującą oporność na fluorochinolony jest substytucja nukleotydów w kodonie 86 (Thr-86→Ile), czego wynikiem jest zamiana treoniny w izoleucynę w powstającym białku. Równie istotną rolę w kształtowaniu się opornych na fluorochinolony szczepów odgrywają pompy usuwające chemioterapeutyk z wnętrza komórki – efflux pumps. Efflux pumps to system pomp zlokalizowanych w błonie komórkowej *Campylobacter* spp. i umożliwiający wyrzucanie niekorzystnych dla bakterii substancji na zewnątrz komórki. System pomp odpowiedzialnych za oporność na wiele chemioterapeutyków nosi nazwę CmeABC i jest kodowany w chromosomalnym DNA [8].

Szczepy *C. jejuni* wykazują obecność dodatkowego systemu pomp o nazwie CmeDEF. Badania przeprowadzone przez Akiba i wsp. [1] dowiodły równorzędnej roli Cme-ABC i Cme DEF w procesie usuwania chemioterapeutyków z wnętrza komórki.

Gen *tetO*, odpowiedzialny za narastanie oporności *Campylobacter spp.* na tetracykliny zlokalizowany jest w plazmidowym (plazmidy koniugacyjne) lub chromosomalnym DNA bakterii [5]. Produkt tego genu – białko TetO powoduje obniżenie zdolności wiązania się tetracyklin z podjednostką 30S rybosomu, czego wynikiem jest brak inhibicji syntezy łańcucha polipeptydowego w komórce bakteryjnej.

Oporność szczepów *Campylobacter spp.* na makrolidy jest efektem mutacji w domenie V, w genie 23S rRNA, w pozycji 2075 (A→G) oraz 2074 (A→C) (homologiczne miejsca znajdują się w przypadku *E. coli* w pozycji 2058 i 2059). W pozycji 2074 dochodzi do transwersji adeniny cytozyną, natomiast w pozycji 2075 do tranzycji adeniny w guaninę. Mutacje te powodują zmianę strukturalną bakteryjnego rybosomu, przez co nie jest on w stanie wiązać się z antybiotykiem [4].

Celem pracy była analiza lekowrażliwości szczepów *Campylobacter spp.* izolowanych od drobiu oraz ptaków dzikich, a także ocena korelacji między występowaniem mutacji/genów warunkujących oporność szczepów *Campylobacter spp.*, izolowanych od drobiu, na chemioterapeutyki a ich opornością stwierdzoną przy użyciu wskaźnika MIC (Minimal Inhibitory Concentration).

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły 73 szczepy *Campylobacter spp.* wyizolowane od drobiu (kurczęta rzeźne, nioski towarowe) w latach 1994–1996 oraz 314 szczepów *Campylobacter spp.* wyizolowanych od drobiu (kurcząt rzeźnych, indyków rzeźnych oraz niosek towarowych) w latach 2005–2008. Łączna liczba szczepów wynosiła 387 izolatów, z czego 57,1% stanowił *C. jejuni*, a 42,9% *C. coli*.

W przypadku ptaków wolno żyjących materiał stanowiły 32 szczepy *Campylobacter spp.* pozyskane z trzech gatunków ptaków żerujących w środowisku wodnym: kaczki krzyżówki (23 szczepy), kormorana czarnego (5 szczepów) oraz uhli (4 szczepy *Campylobacter*).

Wrażliwość szczepów *Campylobacter spp.* wyizolowanych od drobiu określano za pomocą wskaźnika MIC, zgodnie z zaleceniami CLSI [2], natomiast od ptaków wolno żyjących – za pomocą pasków Etest® (Bio Merieux, Francja) dla wybranych chemioterapeutyków.

Przy użyciu metody PCR – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA), z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych *RsaI* i *AlwII* poszukiwano mutacji w genomie *Campylobacter spp.* odpowiedzialnych za występowanie oporności, odpowiednio na fluorochinolony i makrolidy.

Natomiast wykorzystując reakcję PCR i odpowiednie pary primerów, wykrywano obecność genu *tetO* warunkującego oporność badanych bakterii na tetracyklinę.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań dotyczące wrażliwości szczepów *Campylobacter* spp. na wybrane chemioterapeutyki, oznaczonej za pomocą wskaźnika MIC u drobiu, zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba (%) szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od drobiu w latach 2005–2008 oraz zgromadzonych w latach 1994–1996 wykazujących średnią wrażliwość i oporność na wybrane chemioterapeutyki przeciwbakteryjne

| Okres pozyskania szczepów | Liczba szczepów | Grupa technologiczna drobiu | Liczba (%) szczepów opornych | | | |
|---------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------|------------|---------|
| | | | CIP | ENR | TET | ERY |
| 2005–2008 | 192 | kurczęta rzeźne | 164 (85,4) | 168 (87,5) | 36 (17,7) | 3 (1,6) |
| | 99 | indyki | 97 (98,0) | 99 (100,0) | 86 (86,9) | 0 |
| | 23 | nioski towarowe | 22 (95,7) | 23 (100,0) | 22 (95,7) | 0 |
| Razem | | | 283 (90,2) | 290 (92,3) | 144 (45,9) | 3 (0,9) |
| 1994–1996 | 55 | kurczęta rzeźne | 24 (43,6) | 27 (43,6) | 0 | 0 |
| | 18 | nioski towarowe | 11 (61,1) | 11 (61,1) | 0 | 0 |
| Razem | | | 35 (47,9) | 38 (52,1) | 0 | 0 |

Tabela 2. Liczba (%) szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od drobiu w latach 2005–2008 oraz zgromadzonych w latach 1994–1996 (szczepy muzealne) zawierających mutacje/geny warunkujące oporność na fluorochinolony, tetracykliny oraz makrolidy

| Szczepy | Szczepy pozyskane w latach 1994–1996 | | Szczepy izolowane w latach 2005–2008 | | |
|---|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------|
| | Kurczęta rzeźne (n=55) | Nioski towarowe (n=18) | Kurczęta rzeźne (n=192) | Nioski towarowe (n=23) | Indyki (n=99) |
| Liczba (%) szczepów posiadających mutację w genie <i>gyrA</i> | 14 (25,5) | 8 (44,4) | 151 (78,6) | 15 (65,2) | 84 (84,8) |
| Liczba (%) szczepów posiadających gen <i>tetO</i> | 6 (10,9) | 3 (16,7) | 73 (38,0) | 22 (95,7) | 86 (86,9) |
| Liczba (%) szczepów posiadających mutację w genie 23S RNA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych stwierdzono, że najwyższy odsetek szczepów posiadających mutację w genie *gyrA* (84,8%), warunkującą oporność na fluorochinolony, występował w grupie szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od indyków w latach 2005–2008 (tab. 2). W pozostałych grupach technologicznych ptaków: kurcząt brojlerów, niosek towarowych odsetek szczepów wykazujących mutację w genie *gyrA* wynosił odpowiednio 78,6, 65,2%. Wśród szczepów pozyskanych w latach 1994–1996, w grupie izolatów od kurcząt rzeźnych oraz niosek towarowych, odsetek szczepów posiadających mutację w genie *gyrA* był niższy i wynosił odpowiednio 25,5 oraz 44,4%.

Porównując wyniki otrzymane w zakresie oporności *Campylobacter* spp. na fluorochinolony (ciprofloksycyna i enrofloksacyna), oznaczonej za pomocą wskaźnika MIC z metodami molekularnymi, stwierdzono wyższy odsetek szczepów opornych w grupie poddanej badaniu z wykorzystaniem wskaźnika MIC. Odsetek izolatów zgromadzonych w latach 1994–1996 opornych na fluorochinolony wynosił w zakresie od 47,9 do 52,1%, podczas gdy odsetek szczepów posiadających mutację w genie *gyrA* wynosił 30,1%. Podobną zależność stwierdzono, analizując szczepy pozyskane w latach 2005–2008, gdzie odsetek opornych na fluorochinolony szczepów mieścił się w zakresie od 90,2 do 92,3%, podczas gdy odsetek szczepów posiadających mutację w genie *gyrA* wynosił 79,6%. Różnica między odsetkiem szczepów opornych a posiadających mutację w genie *gyrA* może wynikać z innych mechanizmów warunkujących oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony, a których nie objęto badaniem, np. obecność systemu pomp (efflux pump) zlokalizowanych w błonie komórkowej *Campylobacter* spp., obecność mutacji w genie *gyrB* lub *parC*, *parH* [6]. Pompy błonowe stanowią dodatkowy mechanizm obronny bakterii przed niekorzystnymi substancjami i razem z mutacją w genie *gyrA* przyczyniają się do zwiększenia wartości MIC dla poszczególnych szczepów *Campylobacter* spp. Dodatkowo, *Campylobacter* spp. wykazuje dużą podatność na mutację w genie *gyrA*, do której dochodzi już w trakcie stosowania chemioterapii [9, 10].

Na równie wysokim poziomie kształtował się odsetek szczepów izolowanych w latach 2005–2008, posiadających gen *tetO*, warunkujący oporność na tetracykliny (tab. 2). Wśród izolatów pozyskanych ze stad kurcząt rzeźnych odsetek szczepów posiadających ten gen wynosił 38%, w stadach indyków 86,9% a wśród szczepów izolowanych ze stad niosek 95,7%. Najniższy odsetek szczepów wykazujących obecność genu *tetO* stwierdzono wśród szczepów muzealnych, w grupie kurcząt rzeźnych – 10,9%, natomiast w grupie niosek towarowych – 16,7%.

Porównując wyniki badań własnych dotyczące oporności szczepów *Campylobacter* spp. na tetracyklinę, oznaczoną za pomocą wskaźnika MIC, oraz wyniki dotyczące obecności genu *tetO*, stwierdzono, że są one identyczne i wynoszą odpowiednio 95,7% dla izolatów od kur niosek i 86,9% dla izolatów od indyków

rzeźnych. Wśród szczepów izolowanych od kurcząt rzeźnych w latach 2005–2008 oporność na tetracyklinę wykazywało 17,7% izolatów (wskaźnik MIC), zaś u 38% stwierdzono obecność genu *tetO*. Natomiast wszystkie (100%) szczepy pozyskane w latach 1994–1996 wykazywały pełną wrażliwość na tetracyklinę (wskaźnik MIC), zaś badaniem PCR stwierdzono u 12,3% szczepów obecność genu *tetO*. Wyższy odsetek szczepów posiadających gen *tetO* w odniesieniu do odsetka szczepów opornych, oznaczonych za pomocą wskaźnika MIC, świadczyć może o braku ekspresji lub aktywności genu *tetO*.

W badaniach własnych w grupie szczepów izolowanych w latach 2005–2008 stwierdzono bardzo niski odsetek izolatów wrażliwych na erytromycynę, zaledwie 14,3%. Najwięcej szczepów izolowanych w latach 2005–2008 wykazywało średnią wrażliwość na erytromycynę. Wśród izolatów pozyskanych ze stad indyków i kurcząt rzeźnych odsetek szczepów średnio wrażliwych i opornych na erytromycynę wynosił odpowiednio 100 i 86,9%. Nie wykazano natomiast wśród szczepów *Campylobacter* spp. wyizolowanych od drobiu w latach 2005–2008 oraz zgromadzonych w latach 1994–1996 szczepów posiadających mutację w genie 23S rRNA, warunkującą oporność na makrolidy, co może być związane z obecnością dodatkowych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie opornych szczepów – efflux pumps. Jest to system pomp błonowych, którego celem jest aktywne wypompowywanie z wnętrza komórki niekorzystnych dla niej substancji. Badania Lin i wsp. [7] dowodzą, że inaktywacja podjednostki CmeB wchodzącej w skład wymienionych pomp obniża w znacznym stopniu wartość MIC dla poszczególnych szczepów.

W przypadku 32 szczepów pochodzących od ptaków wolno żyjących 15,63% wykazywało oporność na działanie ciprofloksacyny, natomiast 6,25% na działanie tetracykliny. W odniesieniu do erytromycyny żaden z badanych szczepów nie wykazał pełnej oporności, natomiast szczepy średnio wrażliwe stanowiły 15,63%. Wśród izolatów *Campylobacter* spp. pozyskanych od ptaków wolno żyjących nie wykryto szczepów o średniej wrażliwości na działanie ciprofloksacyny oraz tetracykliny. Pozostałe szczepy, tj. odpowiednio aż 84,37% w przypadku ciprofloksacyny i erytromycyny oraz 93,75% w odniesieniu do tetracykliny, okazały się szczepami wrażliwymi na działanie powyższych chemioterapeutyków.

Podsumowując, wyniki badań własnych wskazują, że w Polsce mamy do czynienia ze zjawiskiem narastania oporności na fluorochinolony, tetracykliny czy makrolidy szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od drobiu, co może wynikać ze zbyt powszechnego, niekontrolowanego użycia tych chemioterapeutyków w celach leczniczych. W konsekwencji stwarza to zagrożenie dla konsumentów, dla których zanieczyszczone drobnoustrojami *Campylobacter* spp. mięso drobiowe może być źródłem opornych bakterii.

Pojawienie się szczepów lekoopornych w populacji ptaków wolno żyjących wskazuje na wagę rozwijającego się zjawiska narastającej oporności wobec powszechnie stosowanych chemioterapeutyków oraz podkreśla rolę dzikich ptaków jako potencjalnego transmittera lekoopornych szczepów *Campylobacter* spp. z ptaków do środowiska.

Piśmiennictwo

- [1] Akiba M., Lin J., Barton Yi-Wen, Zhang Q., 2006. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. J. Antimicrob. Chemother., 57, 52–60.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Disk Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition, Vol. 28 No. 8 (M31-A3).
- [3] EFSA Annual Report 2011 (<http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/doc/ar11en.pdf>).
- [4] Gibreel A., Kos V.N., Keelan M., Trieber C.A., Levesque S., Michaud S., Taylor D.E., 2005. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. Antimicrob. Agents Chemother., 49, 2753–2759.
- [5] Gibreel A., Tracz D.M., Nonaka L., Ngo T.M., Connell S.R., Taylor D.E., 2004. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 3442–3450.
- [6] Guevremont E., Nadeau E., Sirois M., Quessy S., 2006. Antimicrobial susceptibilities of thermophilic *Campylobacter* from humans, swine and chicken broilers. Can. J. Vet. Res., 70, 81–86.
- [7] Lin J., Yan M., Sahin O., Pereira S., Chang Y-J., Zhang Q., 2007. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. Antimicrob. Agents Chemother., 51, 1678–1686.
- [8] Lin J., Overbye Michel L., Zhang Q., 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 2124–2131.
- [9] Luo N., Pereira S., Sahin O., Lin J., Huang S., Michel L., Zhang Q., 2005. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 102, 541–546.
- [10] McDermott P.F., Bodeis S.M., English L.L., White D.G., Walker R.D., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D., 2002. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* involves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. J. Infect. Dis., 185, 837–840.

Lekooporność *Escherichia coli* izolowanych od ptaków

Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from birds

Escherichia coli jest jedną z najistotniejszych przyczyn strat ekonomicznych w produkcji drobiarskiej. Liczne, pierwotne i wtórne infekcje układu oddechowego i pokarmowego, uogólnione posocznice oraz zakażenia miejscowe, jak na przykład *cellulitis* lub zapalenie pępka i woreczka żółtkowego, powodują wysoką zachorowalność i śmiertelność u drobiu. Zakażenia te są tradycyjnie leczone antybiotykami lub fluorochinolonami. Chemioterapeutyki pierwotnie bardzo skuteczne w kontrolowaniu zakażenia *E. coli* po pewnym okresie ich stosowania, z powodu nabywanej przez bakterie oporności na te związki, stają się nieskuteczne. Coraz częściej notowana jest wielooporność (multiple drug resistance (MDR)), to znaczy dany szczep bakterii oporny jest na kilka grup antybiotyków jednocześnie [17, 18]. Lekooporność jest naturalnym procesem obronnym drobnoustroju, niezbędnym do przetrwania w obecności bakteriostatycznego lub bakteriobójczego leku. W obecności antybiotyku między komórkami bakteryjnymi może dochodzić do przekazania materiału genetycznego determinującego lekooporność na drodze kilku złożonych procesów: transdukcji – przeniesienia materiału genetycznego przez bakteriofaga, koniugacji – przeniesienia materiału genetycznego na plazmidach lub transpozonach między komórkami tego samego gatunku lub różnych gatunków i w końcu transformacji – umieszczeniu w genomie wolnego DNA zawierającego geny oporności. Innymi istotnymi mechanizmami uzyskiwania oporności przez bakterie mogą być „pompy białkowe” (tzw. efflux pump), które usuwają chemioterapeutyk z komórki, oraz umiejętność syntezy enzymów rozkładających lub dezaktywują-

cych leki. Czasem usunięcie presji selekcyjnej, jaką jest obecność danego chemioterapeutyku, powoduje powrót pełnej wrażliwości na ten lek, niemniej częściej dany typ oporności może utrzymywać się długo po zaprzestaniu stosowania chemioterapeutyku [3]. Dominującymi grupami leków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych w Polsce u drobiu są fluorochinolony, antybiotyki β -laktamowe i tetracykliny – ogółem ponad 90% [6].

Wybór chemioterapeutyku stosowanego do leczenia kolibakteriozy jest często ograniczony z jednej strony kosztem leku a z drugiej nasileniem choroby w stadzie. Wybór leków stosowanych w leczeniu kolibakteriozy jest ograniczony i obejmuje najczęściej fluorochinolony, rzadziej sulfonamidy, polimyksyny i tetracykliny oraz ostatnio fenikole. Uważa się, że ograniczona możliwość wyboru chemioterapeutyków w terapii zakażeń drobiu powodowanych przez *E. coli* stosowana przez lata spowodowała presję selekcyjną i fakt dominacji szczepów *E. coli* opornych na fluorochinolony, tetracykliny, sulfonamidy i antybiotyki β -laktamowe.

Fluorochinolony – enrofloksacyna i flumechina ze względu na ich dostępność i relatywnie niską cenę są powszechnie stosowane w zwalczaniu kolibakteriozy u drobiu. Mechanizm działania fluorochinolonów polega na szybkim i nieodwracalnym hamowaniu replikacji DNA bakteryjnego. Przyłączają się one do podjednostki *GyrA* gyrazy oraz ich odpowiednika *ParC* w topoizomerazie IV, po czym następuje przecięcie obu nici DNA przez gyrazę lub topoizomerazę IV. Doprowadza to do śmierci komórki bakteryjnej w wyniku obecności przerw w DNA i uniemożliwienia przemieszczania się polimerazy wzdłuż nici kwasu nukleinowego. Oporność bakterii na fluorochinolony jest wynikiem punktowych mutacji chromosomowych, które najczęściej występują w obrębie genów kodujących miejsca docelowe tych chemioterapeutyków, czyli gyrazę oraz topoizomerazę IV. W obrębie genów kodujących te podjednostki może być wiele różnych mutacji punktowych, przy czym najczęściej obserwuje się substytucje na obszarze genu *gyrA* kodującym aminokwasy 67–106, który nazywany jest obszarem warunkującym oporność na chinoliny (QRDR – ang. Quinolone Resistance Determining Region). Substytucje te w pierwszej kolejności dotyczą seryny⁸³, a następnie asparaginy⁸⁷, natomiast w genie *parC*, seryny⁸⁰ i glutaminy⁸⁴. Wynikiem mutacji jest modyfikacja miejsc docelowych fluorochinolonów, co utrudnia aktywność tych chemioterapeutyków lub niemal całkowicie ją uniemożliwia [4, 12]. Powszechny u *Enterobacteriaceae* jest plazmid PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance, który pierwotnie wykryto u *Klebsiella pneumoniae*. Zawarty w nim między innymi gen *qnrA* koduje 218 aminokwasową proteinę chroniącą DNA przed przyłączeniem fluorochinolonu do gyrazy i topoizomerazy IV [2].

Tetracykliny to antybiotyki o szerokim spektrum działania oraz niskiej toksyczności. Ze względu na te cechy oraz niskie koszty terapii są one często stosowane zarówno w terapii ludzi, jak i zwierząt. Z tej grupy antybiotyków „popularna” wśród

lekarzy jest doksycyklina i oksytetracyklina. Mechanizm ich działania polega na hamowaniu syntezy białka poprzez wiązanie się do podjednostki 30S rybosomu. Oporność na tetracykliny najczęściej wynika ze zdolności szczepów do syntezy pomp efflux typu MFS, która aktywnie usuwa antybiotyki z komórki. Pompa ta kodowana jest przez geny *tet*, które mogą znajdować się zarówno na plazmidzie, jak i w chromosomie. Do rzadziej występujących mechanizmów oporności na te antybiotyki należy ochrona rybosomów przed związaniem tetracyklin, enzymatyczna inaktywacja leku, mutacja 16S rRNA oraz zmniejszenie przepuszczalności ścian bakteryjnych. Geny oporności *tet* kodują nie tylko pompę efflux, ale także białka chroniące rybosom [12, 14].

Antybiotyki β -laktamowe to szeroko stosowana grupa antybiotyków bakteriobójczych. Do tej grupy antybiotyków zaliczamy: penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy. Mechanizm działania penicylin jako antybiotyków polega na blokowaniu aktywności enzymów bakteryjnych – transpeptydaz (PBP) biorących udział w ostatnim etapie syntezy peptydoglikanu ściany komórki bakteryjnej. Antybiotyki te mają wiązanie beta-laktamowe, które ulega rozerwaniu pod wpływem określonych enzymów, tzw. β -laktamaz produkowanych przez liczne Gram-ujemne i Gram-dodatnie bakterie. Niektóre *E. coli* wytwarzają ten enzym konstytutywnie, to znaczy niezależnie od tego, czy w środowisku znajduje się antybiotyk β -laktamowy, czy nie. Jednym z najczęściej występujących plazmidowych enzymów o aktywności β -laktamazy u *Enterobacteriaceae* jest TEM-1 kodowany przez gen *blaTEM-1* [11]. Z antybiotyków β -laktamowych (z grupy aminopenicylin) u drobiu często stosowana jest amoksycylina, zwłaszcza do zwalczania tzw. dysbakteriozy przewodu pokarmowego.

Celem pracy było określenie minimalnych stężeń hamujących (MIC – Minimal Inhibitory Concentration) dla wybranych chemioterapeutyków oraz prewalencji genów warunkujących lekooporność u szczepów *E. coli* wyizolowanych z przypadków klinicznej kolibakteriozy od kurcząt brojlerów, indyków rzeźnych, gęsi, kaczek i kur niosek oraz porównania ich z lekoopornością szczepów izolowanych od zdrowego drobiu i ptaków wolno żyjących.

Materiał i metody

Szczepy *E. coli* izolowano w latach 2011/2012 (n=200) oraz w 2001 (n=65). W grupie izolatów z lat 2011/2012 od kurcząt brojlerów pochodziło 50 szczepów, od indyków rzeźnych 61, od kur niosek 38, od drobiu wodnego 28, oraz 23 szczepy od ptaków dzikich. Z kolei w grupie izolatów z 2001 r. 33 pochodziły od kurcząt rzeźnych, 15 od indyków i 17 od drobiu wodnego. Szczepy izolowano z narządów wewnętrznych (wątroba, płuca, serce), które posiewano na podłoże McConkey'a, (Merck, Niemcy) i inkubowano 18 godzin w temp. 37°C. Pojedyncze charakterystyczne, laktozodatnie

kolonie reizolowano na podłoże agar odżywczy (Merck, Niemcy), a następnie zabezpieczano do dalszych badań w Microbanku (Pro-lab, Kanada) w temp. -70°C . Dla wyizolowanych szczepów określono MIC dla amoksycyliny (zakres 0,016–256 $\mu\text{g/ml}$), tetracykliny (zakres 0,016–256 $\mu\text{g/ml}$) oraz enrofloksacyny (zakres 0,002–32 $\mu\text{g/ml}$) metodą Etest (BioMerieux, Francja) na podłożu Mueller-Hintona (bioMeriuex, Francja) zgodnie z instrukcją producenta. Jako szczep referencyjny zastosowano *E. coli* ATCC 25922. Dla poszczególnych grup szczepów izolowanych od różnych gatunków ptaków wyznaczono MIC50 (minimalne stężenie hamujące 50% badanej populacji bakterii) oraz MIC90 (minimalne stężenie hamujące 90% badanej populacji).

U wyizolowanych szczepów *E. coli* przy użyciu reakcji PCR określono również prewalencję genów warunkujących oporności na wybrane chemioterapeutyki: geny pompy efflux *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* [13], odpowiedzialne za oporność względem tetracyklin, geny *blaTEM*, *blaCMY*, *blaCTX* i *blaSHV* [13], kodujące cztery różne β -laktamazy, warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe oraz kodowanego plazmidowo, warunkującego oporność na fluorochinolony genu *qnr* [9].

Wyniki i dyskusja

Wartość MIC dla enrofloksacyny u badanych szczepów *E. coli* była zawarta w przedziale od 0,047 do 32 $\mu\text{g/ml}$. Najwyższą lekoopornością na enrofloksacynę, na poziomie 63% szczepów opornych (wartość MIC powyżej 2 $\mu\text{g/ml}$), wykazywały szczepy pochodzące od gęsi i kaczek hodowlach z 2011/2012 r. U ponad 40% szczepów z tej grupy MIC był równy lub wyższy od 32 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast wśród izolatów *E. coli* z 2001 r. odsetek szczepów opornych wynosił 41%. W ciągu 10 lat MIC50 dla szczepów pochodzących od tej grupy ptaków wzrósł z 0,064 do 6 $\mu\text{g/ml}$ enrofloksacyny. Podobną tendencję zaobserwowano również w grupie szczepów *E. coli* izolowanych od indyków. Szczepy z roku 2001 były oporne jedynie w 16,7% a szczepy z lat 2011/2012 aż w 27,3%. Dla porównania, badania przeprowadzone w południowych Chinach na szczepach *E. coli* izolowanych od drobiu wykazały oporność na enrofloksacynę na poziomie 38,3% [19]. Co niepokojące, zaobserwowano również szczepy oporne na enrofloksacynę wśród izolatów od ptaków dzikich (ponad 10%). Informacje o genetycznym podłożu odporności na enrofloksacynę u ptasich szczepów *E. coli* zostały opisane w kilku badaniach. Badania Giraud'a i wsp. [7], podobnie jak Yang'a i wsp. [9] wykazały u szczepów ze zwiększoną wartością MIC dla enrofloksacyny obecność pojedynczej lub podwójnej mutacji w genie *gyrA* i mutację w genie *parC*. Doniesienia literaturowe wspominają również o obecności plazmidowego genu *qnr* [2, 16]. W badaniach własnych w polskich szczepach stwierdzono go u ponad 40% izolatów.

Wartość MIC dla tetracykliny oznaczono na poziomie między 0,75 a 256 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie jak w przypadku enrofloksacyny najwyższą oporność wykazały szczepy

E. coli pochodzące od drobiu wodnego – ponad 85% szczepów opornych (MIC ponad 16 µg/ml). W grupie szczepów izolowanych od kurcząt brojlerów z lat 2011/2012 przeważały szczepy odporne na te antybiotyki (71,8% w porównaniu z 45,5% szczepów opornych w grupie izolowanych od indyków i zaledwie 27% izolowanych od kur niosek). W podobnych badaniach przeprowadzanych w Irlandii w 2000 r. 62,5% izolatów pochodzące od indyków wykazywało oporność na tetracykliny [5]. Dodatkowo stwierdzono różnice w wartościach MIC₅₀ dla szczepów *E. coli* pochodzących od różnych grup wiekowych indyków. MIC₅₀ dla tetracykliny – dla szczepów pozyskanych od piskląt indyckich wynosił 8 µg/ml a dla szczepów izolowanych od ptaków starszych aż 96 µg/ml. Z badanych czterech genów *tet* kodujących pompy efflux, a odpowiedzialnych za oporność na tetracykliny, najczęściej notowano obecność genu *tetA* (około 70% izolatów). Podobnie wysoki odsetek obecności tego genu stwierdzano u szczepów pochodzących od kur niosek w Szwajcarii [11]. Pozostałe geny *tetB*, *tetC* i *tetD* stwierdzano u mniej niż kilkunastu procent badanych szczepów.

Wartość MIC dla amoksycyliny u badanych *E. coli* wynosiła między 0,125 a 256 µg/ml. Ponad 85% szczepów od kaczek i gęsi hodowlanych było opornych na amoksycylinę. Oporność na poziomie 50,0% stwierdzono również w grupie szczepów zgromadzonych od ptaków wolno żyjących. Podobnie, w grupie szczepów izolowanych od kurcząt brojlerów z lat 2011/12 przeważały szczepy odporne na ten antybiotyk – 71,8%. Stwierdzono również znaczne różnice w wartościach MIC₅₀ dla szczepów *E. coli* pochodzących od różnych grup wiekowych indyków. Dla szczepów izolowanych od piskląt MIC₅₀ dla amoksycyliny wynosił 3 µg/ml, a dla ptaków starszych aż 256 µg/ml. Ponadto w genomach badanych szczepów stwierdzono obecność genów kodujących β-laktamazy. U ponad 60% badanych szczepów stwierdzono gen *bla*_{TEM}, a gen *bla*_{CMY} u zaledwie kilkunastu procent. Podobne wyniki badań uzyskano u izolatów od drobiu w Australii [15].

Problem kliniczny, jakim jest kolibakterioza drobiu, może być kontrolowany przez antybiotykoterapię, która niesie ze sobą ryzyko pozostałości leków w mięsie i jajach oraz narastanie lekooporności bakterii. Niepokojący jest również, obserwowany od kilkunastu lat, wyraźny wzrost zużycia antybiotyków w przeliczeniu miligramów na kilogram masy ciała zwierząt. Przykładowo w Holandii w ciągu kilku ostatnich lat podwoiła się liczba stosowanych antybiotyków oceniana w mg/kg m.c. [1]. W związku z tym ogłoszono tam program redukcji stosowania chemioterapeutyków w produkcji zwierzęcej w latach 2009–2013.

Wyselekcjonowane, odporne szczepy bakteryjne mogą być źródłem genów oporności dla innych szczepów, co stanowi zagrożenie również dla człowieka. Wynika to ze wspomnianej wcześniej możliwości rozprzestrzeniania się genów oporności na ruchomych elementach genetycznych takich jak plazmidy, transpozony czy integrony. Transfer determinantów oporności może zachodzić zarówno pomiędzy róż-

nymi gatunkami jak i rodzajami bakterii, co oznacza, że możliwe jest przeniesienie oporności ze szczepów chorobotwórczych dla zwierząt do patogenów ludzkich [8]. Oporne szczepy pochodzące od drobiu mogą zakażać ludzi bezpośrednio lub poprzez żywność, o czym świadczy wysoka prewalencja opornych szczepów *E. coli* w produktach drobiowych oraz ich podobieństwo molekularne do opornych izolatów pochodzących od ludzi [10].

Poniższe informacje w zakresie nabywania oporności przez drobnoustroje na chemioterapeutyki powinny służyć lekarzom weterynarii, aby chemioterapeutyki mogły być jak najdłużej skutecznym narzędziem do zwalczania groźnych infekcji.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr N N308 569239 MNiSW.

Piśmiennictwo

- [1] 17. MARAN, 2007. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2006/2007.
- [2] Carattoli A., 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 2227–2238.
- [3] Chaslus-Dancla E., Gerbaud G., LaGorce M., LaFont J., Courvalin P., 1987. Persistence of an antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of selective pressure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 784–788.
- [4] Chen F-J., Lo H-J., 2003. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection.*, 36, 1–9.
- [5] Cormican M., Buckley V., Corbett-Feeney G., Sheridan F., 2001. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from turkeys and hens in Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 587–588.
- [6] Dzierżawski A., Cybulski W., 2012. Potrzeba racjonalnego stosowania antybiotyków w praktyce weterynaryjnej. *Życie Wet.*, 4, 316–321.
- [7] Giraud E., Leroy-Setrin S., Flaujac G., Cloeckart A., DhoMoulin M., Chaslus-Dancla E., 2001. Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78: K80 isolated from turkeys. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47, 341–343.
- [8] Islam M.J., Sultana S., Das K.K., Sharmin N., Hasan M.N., 2008. Isolation of plasmid-mediated multidrug resistant *Escherichia coli* from poultry. *International Journal of Sustainable Crop Production.*, 3, 46–50.
- [9] Jacoby G.A., Chow N., Waites K.B., 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 559–562.
- [10] Johnson J.R., Sannes M.R., Croy C., Johnston B., Clabots C., Kuskowski M.A., 2007. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 838–846.
- [11] Lanz R., Kuhnert P., Boerlin P., 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 91, 73–84.

- [12] Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A., 2006. Bakterie antybiotyki lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [13] Maynard C., Bekal S., Sanschagrín F., Levesque R.C., Brousseau R., Masson L., Larivière S., Harel J., 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5444–5452.
- [14] Michalova E., Novotna P., Schlegelova J., 2004. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinarni Medicina*, 49, 79–100.
- [15] Obeng A.S., Rickard H., Ndi O., Sexton M., Barton M., 2012. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Veterinary Microbiology*, 154(3–4), 305–315.
- [16] Petersen A., Christensen J.P., Kuhnert P., Bisgaard M., Olsen J.E., 2006. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. *Veterinary Microbiology*, 116(1–3), 120–128.
- [17] Schroeder C.M., White D.G., MengaRetail J., 2004. Meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 21, 249–255.
- [18] Truszczyński M., Pejsak Z., 2011. Przyczyny szczególnie szybko narastającej antybiotykkooporności bakterii oraz przeciwdziałanie zagrożeniu dla zdrowia ludzi ze strony bakterii zoonotycznych. *Medycyna Wet.*, 67 (2), 75–78.
- [19] Yang H., Chen S., White D.G., Zhao S., McDermott P., Walker R., Meng J., 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3483–3489.

RITA WEBER
Zoetis Germany GmbH Berlin, Niemcy
KALEN COOKSON
Zoetis Global Poultry, Durham USA
WILLEM WIJMENGA
Zoetis International Operations, Paryż, Francja

Immunizacja żywą modyfikowaną szczepionką przeciwko *Escherichia coli* skutecznym narzędziem w walce z kolibakteriozą drobiu

Immunisation with a live modified *Escherichia coli* vaccine reduces mortality and lesions due to colibacillosis in poultry

Problemy zdrowotne na tle *Escherichia (E.) coli* stanowią główne źródło niepokoju wszystkich segmentów produkcji drobiarskiej. Zakażenia *E. coli* u drobiu wywołują kolibakteriozę, chorobę charakteryzującą się wielonarządowymi zmianami oraz stanowią ważną przyczynę konfiskat w procesie obróbki poubojowej, co skutkuje stratami ekonomicznymi [1]. Celem prowadzonych badań była ocena skuteczności zastosowanej żywej modyfikowanej szczepionki przeciw *E. coli* u kurcząt i indyków. Szczepionka zawiera szczep *E. coli* pozbawiony genu *aroA*. Utrata funkcji genu *aroA* skutkuje zahamowaniem wzrostu *in vivo* poprzez zwiększenie zapotrzebowania na metabolity aromatyczne. Szczep szczepionkowy jest niezdolny do namnażania oraz przetrwania w środowisku i może wzrastać wyłącznie na podłożu TSA, natomiast

nie wzrasta na podłożach podstawowych, niewzbogaconych. Skuteczność szczepienia była badana na kurczętach SPF, kurczętach komercyjnych (hodowlanych) oraz na indykach. Zastosowano różne programy szczepień, przez co ptaki utrzymywane w warunkach laboratoryjnych zostały poddane zakażeniom w różnych przedziałach czasowych. Stopień śmiertelności oraz wystąpienie zmian w postaci zapalenia osierdzia, zapalenia torebki wątroby, zapalenie worków powietrznych i *cellulitis* zostały porównane z grupą kontrolną ptaków nie szczepionych.

W celu oceny skuteczności żywej szczepionki *E. coli* w warunkach terenowych – podjęte zostały badania prowadzone na dużą skalę. Porównanie otrzymanych wyników w zakresie śmiertelności, przeprowadzonych konfiskat oraz parametrów produkcji, podobnie jak odsetka stad wymagających leczenia antybiotykami, zostanie przedstawione w trakcie wykładu na konferencji.

Piśmiennictwo

- [1] Barnes H.J., Gross W.B., 1997. Colibacillosis [in:] B.W. Calnek, (Ed.), Diseases of Poultry 10th edn (pp. 131141). Ames: Iowa State University Press.

Charakterystyka bakteriofagów izolowanych ze środowiska oraz ocena ich właściwości litycznych w stosunku do szczepów *Escherichia coli* uzyskanych z przewodu pokarmowego drobiu

Characterization of bacteriophages isolated from the environment and evaluation of their lytic properties against *Escherichia coli* strains obtained from the gastrointestinal tract of poultry

Drobnoustroje wywołujące zakażenia przewodu pokarmowego u drobiu stanowią jedną z głównych przyczyn strat ekonomicznych w wielkostadnej produkcji drobiu. Stosowana dotychczas antybiotykoterapia niesie za sobą ryzyko w postaci pozostałości leków w mięsie i jajach, a także nabywania oporności drobnoustrojów na stosowane chemioterapeutyki. Opublikowany w 2012 r. raport Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) dokumentuje fakt izolacji od kurcząt brojlerów 30% szczepów *E. coli*, opornych na ciprofloksacynę, ampicylinę, tetracyklinę oraz sulfonamidy [1]. Jedną z proponowanych metod alternatywnych

jest wykorzystanie bakteriofagów jako naturalnych wirusów swoistych dla określonych grup bakterii. Wykorzystanie bakteriofagów izolowanych ze środowisk bytowania zwierząt przyczynia się do ograniczenia występowania drobnoustrojów patogennych. Terapię fagową, w której wykorzystywane są wirusy mające zdolność niszczenia bakterii, wymienia się najczęściej jako alternatywną i efektywną metodę zwalczania zakażeń patogenami, które cechują się opornością na antybiotyki [2, 5].

Wykorzystanie fagów w przemyśle drobiarskim może nie tylko wykluczyć znaczne straty ekonomiczne będące wynikiem zakażeń drobnoustrojami patogennymi, ale także zmniejszyć koszty leczenia oraz ograniczyć ryzyko zakażeń drobnoustrojami zoonotycznymi u ludzi.

Z uwagi na szeroko rozpowszechnione zakażenia *E. coli* u drobiu przeznaczonego do konsumpcji oraz narastającą lekooporność na antybiotyki celem pracy była izolacja oraz charakterystyka morfologiczna bakteriofagów swoistych dla *E. coli* izolowanych od drobiu, ze zróżnicowanych środowisk hodowlanych oraz analiza właściwości litycznych fagów w stosunku do pozyskanych szczepów bakteryjnych.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły terenowe izolaty *Escherichia coli* uzyskane z przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów po uboju, pochodzące ze zróżnicowanych środowisk hodowlanych z obszaru południowo-wschodniej Polski. Izolację szczepów prowadzono na podłożu wybiórczo-różnicującym MacConkey. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez 24 godz. Celem potwierdzenia przynależności gatunkowej kolonie bakteryjne przesiewano na podłoże chromogenne – TBX i inkubowano w warunkach tlenowych w temp. 44°C przez 24 godz. Profile antybiotykowe wykonano, opierając się na określeniu MIC zgodnie z zaleceniami CLSI. W ocenie wykorzystano ciprofloksacynę (0,125–64 mg/l), enrofloksacynę (0,5–256 mg/l), amoksycylinę (1–512 mg/l), ampicylinę (0,5–256 mg/l), gentamycynę (0,25–128 mg/l), tetracyklinę (0,25–128 mg/l) oraz chloramfenikol (0,5–256 mg/l). Test wykonano na 96-dółkowej płaskodennej mikroplątce (NUNC). Odczyt wykonywano po 24 godz. w czytniku do ELISA (BioRad) przy długości fali 660 nm.

Bakteriofagi izolowano z kału pochodzącego od drobiu grzebiącego. Do ich izolacji wykorzystano szczep referencyjny *E. coli* (ATCC 8739) oraz uzyskane izolaty terenowe. W celu izolacji bakteriofagów, 1 g kału dodawano do 10 ml PBS o pH 7,4 zawierającego 0,5 ml 18-godzinnej bulionowej hodowli szczepu *E. coli*. Próbkę inkubowaną na wytrząsarce (120 rpm/30 min) odwirowano (12 000 x g/30min). Supernatant wraz z 3-godzinną hodowlą bakteryjną inkubowano na wytrząsarce (120 rpm), w temp. 37°C przez całą noc, a po odwirowaniu (12 000 x g/30 min) filtrowano przez filtry strzykawkowe o średnicy 0,45 i 0,22 μm (Millipore).

Ocenę właściwości litycznych bakteriofagów przeprowadzono testem lysinkowym z wykorzystaniem płytek dwuwarstwowych według Huff i wsp. [4]. Miano fagów określono metodą rozcieńczeń w buforze TM o pH 7,4 [3]. Analizę morfologiczną uzyskanych bakteriofagów wykonano w mikroskopie elektronowym, analizując preparaty barwione negatywowo 2% octanem uranylu [6]. Kolejny etap badań obejmował określenie zakresu gospodarza wszystkich wyizolowanych bakteriofagów w stosunku do wyizolowanych szczepów *E. coli*.

Wyniki

W efekcie przeprowadzonych badań wyizolowano 96 szczepów *E. coli*, wśród których większość stanowiły szczepy fagowrażliwe, odporne względem amoksycyliny, ampicyliny, ciprofloksacyny, enrofoksacyny i tetracykliny. Ogółem uzyskano 33 lizaty fagowe, których gospodarzami były szczepy terenowe oraz referencyjny szczep *E. coli* (ATCC 8739).

Analiza morfologiczna uzyskanych bakteriofagów przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazała, że wiriony fagów mają strukturę typową dla rzędu *Caudovirales*. Cztery spośród badanych fagów zakwalifikowano do rodziny *Myoviridae*, natomiast pozostałe zaliczono do rodziny *Siphoviridae*.

Uzyskane bakteriofagi wykazywały aktywność lityczną w stosunku do 87 badanych izolatów *E. coli*, co stanowiło 91% wszystkich badanych drobnoustrojów. Miano infekcyjności wyizolowanych bakteriofagów wynosiło od $1,2 \times 10^5$ do $2,8 \times 10^{11}$ pfu/ml. Najszerszym działaniem litycznym (40% izolatów *E. coli*) cechowało się 10 bakteriofagów: 3 fagi (ϕ ba1, ϕ 100, ϕ 106) należące do rodziny *Myoviridae*, uzyskane ze szczepu referencyjnego *E. coli* (ATCC 8739) oraz szczepów terenowych (e19, e28), a także 7 fagów z rodziny *Siphoviridae*, w tym cztery (ϕ ba3, ϕ ba4, ϕ ba5, ϕ ba6) indukowane na szczepie referencyjnym oraz 3 uzyskane na szczepach terenowych e147, e294 i e296.

Na podstawie uzyskanych wyników można przyjąć, że obecne w środowisku przebywania zwierząt bakteriofagi wykazują działanie bakteriobójcze w stosunku do lekoopornych szczepów *E. coli* izolowanych od drobiu, co potwierdza wcześniejsze wyniki innych autorów o możliwości wykorzystania fagów w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez *E. coli*.

Piśmiennictwo

- [1] <http://www.efsa.europa.eu>, The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA Journal, 2012, 10, 2598.
- [2] Garcia P., Martinez B., Obeso J.M., Rodriguez A., 2008. Bacteriophages and their application in food safety. Lett. Appl. Microbiol., 47, 479–485.

- [3] Golec P., Wiczak A., Łoś J.M., Konopa G., Węgrzyn G., Łoś M., 2011. Persistence of bacteriophage T4 in a starved *Escherichia coli* culture: evidence for the presence of phage subpopulations. *J. Gen. Virol.*, 92, 997–1003.
- [4] Huff W.E., Huff G.R., Rath N.C., Balog J.M., Donoghue A.M., 2002. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poultry Sci.*, 81, 1486–91.
- [5] Strauch E., Hammerl J.A., Hertwig S., 2007. Bacteriophages: New tools for safer food? *J. Verbr. Lebensm.*, 2, 138–143.
- [6] Xie H., Zhuang Z., Kong C., Ma G., Zhang H., 2005. Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 51, 159–163.

Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki. Przykłady wrodzonej i nabytej antybiotykooporności u enterokoków

Mechanisms of bacteria resistance to antibiotics. Types of intrinsic and acquired antibiotics resistance in enterococcus

Od czasów odkrycia przez Fleminga penicyliny G i wprowadzenia jej do praktyki klinicznej przez Floreya i Chaina wykryto tysiące substancji antybiotycznych, z których wiele wykorzystuje się w leczeniu. Lawinowe pojawianie się nowych leków przeciwdrobnoustrojowych i bardzo szybki rozwój antybiotykoterapii przyczyniły się do znacznych zmian lekowrażliwości bakterii. Bakterie przeciwstawiają się działaniu antybiotyków, wykorzystując do tego celu wiele mechanizmów.

Najprostszym typem oporności jest niewrażliwość naturalna, zwana także opornością wrodzoną. Jest to cecha stała gatunku, szczepu lub całej grupy bakterii. Dany drobnoustrój jest niewrażliwy na antybiotyk, ponieważ posiada „wrodzoną” oporność na niektóre grupy antybiotyków. Może być ona związana z brakiem receptora dla antybiotyku, ze zbyt niskim powinowactwem, z nieprzepuszczalnością ściany komórkowej czy z powodu wytwarzania enzymów [24].

Zmiany we wrażliwości drobnoustrojów mają charakter pierwotny bądź wtórny. Oporność pierwotna powstaje wskutek spontanicznej mutacji i może pojawiać się

bez kontaktu z lekiem. Ten typ oporności jest kodowany chromosomalnie i nie jest przekazywany innym gatunkom bakterii. Częstość pojawiania się zmutowanych bakterii jest niewielka, jednakże w obecności antybiotyku mutanty mają przewagę w stosunku do reszty populacji, przeżywają i przewyższają ilością populacje wrażliwe. Mogą one rozprzestrzeniać się do innych nisz ekologicznych u tego samego osobnika lub też mogą być przeniesione na inne makroorganizmy.

Mechanizmy prowadzące do powstania oporności wtórnej rozwijają się w warunkach kontaktu drobnoustroju z lekiem przeciwbakteryjnym i są znacznie bardziej złożone. Mechanizm oporności wtórnej ma charakter pozachromosomalny. Odpowiedzialne za występowanie tego zjawiska są geny zlokalizowane w kolistych fragmentach DNA, leżących w cytoplazmie i nazywanych plazmidami. Jeden plazmid może zawierać geny oporności na kilka różnych chemioterapeutyków. Plazmidy mogą przenosić geny kodujące oporność z jednej komórki bakteryjnej na inną. Przekazywanie plazmidów odbywa się głównie na drodze koniugacji i transdukcji. Podczas koniugacji do przekazywania plazmidów dochodzi przez bezpośredni kontakt dwóch lub więcej komórek bakteryjnych, za pomocą wytwarzanych przez nie nici białkowych. W procesie koniugacji mogą brać udział bakterie różnych gatunków i rodzajów, często bardzo odległych filogenetycznie. Szczególnie niekorzystne jest przekazywanie w ten sposób oporności z bakterii saprofitycznych na bakterie chorobotwórcze. Transdukcja jest procesem przekazywania plazmidów z komórki dawcy na komórkę biorcy za pośrednictwem bakteriofagów (wirusów bakteryjnych). Po przyłączeniu bakteriofaga do receptora, będącego na powierzchni komórki, następuje wprowadzenie DNA do wnętrza bakterii. Bakteriofag wykorzystuje procesy metaboliczne tej komórki do replikacji wirusowego DNA i produkcji białek wirusowych. Po złożeniu nowych bakteriofagów komórka ulega lizie – cykl lityczny. Fagowy DNA może także włączyć się do chromosomu bakteryjnego (postać profaga), co nazywamy lizogenią [4, 50, 51].

Wśród elementów transpozycyjnych, zdolnych do zmiany miejsca w genomie, wyróżnia się sekwencje insercyjne (IS, ang. insertion sequences) i transpozony (Tn). Sekwencje insercyjne (IS) są odcinkami DNA, które zawierają gen kodujący transpozazę, otoczony z obu stron odwróconymi sekwencjami powtórzonymi. Enzym ten umożliwia elementom insercyjnym przenoszenie w dowolne miejsce DNA. Geny oporności mogą znajdować się również na transpozonach. Transpozony (Tn) zwane są potocznie „skaczącymi genami”. Wyróżniamy transpozony złożone, które składają się z dwóch sekwencji insercyjnych znajdujących się po obu stronach genów kodujących oporność na antybiotyki lub innych genów nie związanych z ruchem transpozonu (np. Tn10). W transpozonach niezłożonych (typ Tn3) geny kodujące dodatkowe cechy są otoczone krótkimi odwróconymi sekwencjami, a transpozycja jest replikatywna i wymaga produktów dwóch genów. Transpozony koniugacyjne różnią się od klasycznych transpozonów tym, że mogą być przekazywane nie tylko

w obrębie DNA jednej komórki, ale też pomiędzy komórkami. Występują w formie zintegrowanej z plazmidem lub chromosomem bakteryjnym. W odpowiedzi na niektóre sygnały transpozony te wycinają się, tworząc formy koliste niezdolne do replikacji. Przekazywanie zachodzi podobnie jak w przypadku plazmidów koniugacyjnych. W komórce biorcy transpozon włącza się do genomu [4, 50].

W ewolucji wielolekooporności u bakterii istotne znaczenie przypisuje się również integronom, które mogą być zlokalizowane zarówno w bakteryjnych chromosomach, jak i plazmidach. Jest to specyficzny samotranslokacyjny rodzaj wyspecjalizowanych nośników informacji genetycznej, których szczególną właściwością jest zdolność do łączenia genów oporności w zespoły (kasety) i blokowego ich przeniesienia do komórki biorcy [20].

W efekcie nabycia genów oporności bakterie stają się częściowo lub całkowicie odporne na dany antybiotyk w wyniku rozwinięcia się u nich różnych mechanizmów efektorowych [2].

Na podstawie licznych badań naukowych prowadzonych od połowy XX w. zaproponowano szereg mechanizmów wyjaśniających oporność bakterii na antybiotyki. Obecnie uważa się, że bakterie uzyskują antybiotykooporność przez: aktywne usuwanie antybiotyku z komórki, modyfikacje enzymatyczne antybiotyku, modyfikacje składników komórki będących celem antybiotyku, nadekspresję enzymu inaktywowanego przez antybiotyk, zmianę przepuszczalności osłon komórkowych bakterii, wytworzenie alternatywnego szlaku metabolicznego, zwiększenie stężenia metabolitu będącego antagonistą antybiotyku, obniżenie ilości bądź aktywności enzymu aktywującego prekursor antybiotyku, modyfikacje w systemach regulacyjnych nie dotyczących bezpośredniego mechanizmu działania antybiotyku, obniżenie zapotrzebowania na produkt hamowanego szlaku metabolicznego [20, 50].

Przykłady oporności wrodzonej i nabytej wśród bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* charakteryzują się naturalną opornością na szereg antybiotyków, które są często wykorzystywane w terapii. Należą do nich antybiotyki β -laktamowe, wszystkie generacje cefalosporyn i sulfonamidy. Niższą oporność wykazują w stosunku do aminoglikozydów, linkozamidów i chinologów [30].

Oporność na inhibitory syntezy mureiny

Oporność na antybiotyki β -laktamowe

Celem antybiotyków β -laktamowych są białka wiążące penicylinę – PBP (ang. Penicillin Binding Protein). Enterokoki posiadają naturalną, wrodzoną oporność na antybiotyki β -laktamowe, która związana jest z ich niskim powinowactwem do białek

wiązących penicyliny – PBP5 u *E. faecium*, PBP4 u *E. faecalis* [47]. Ta wrodzona oporność różni się w zależności od rodzaju β -laktamów. Penicyliny mają największą aktywność w stosunku do enterokoków, nieco mniejszą aktywnością cechują się karbapenemy, natomiast najmniejszą cefalosporyny.

Inny mechanizm oporności związany z białkami wiążącymi penicylinę obserwowany jest czasem w przypadku bakterii nabywających, w porównaniu ze szczepami dzikimi, bardzo wysoki poziom oporności na antybiotyki β -laktamowe. U niektórych bakterii oporność na antybiotyki β -laktamowe jest związana z nadprodukcją białek powierzchniowych PBP5. Przykładem tego typu oporności jest nadprodukcja PBP5 przez niektóre penicylinooporne szczepy *E. hirae*. Gen *pbp5* *E. hirae* znajduje się pod kontrolą genu *psr* [32]. Inaktywacja *psr* wskutek delecji lub mutacji prowadzi do zwiększenia liczby kopii PBP5, a zatem do wysycenia wszystkich cząsteczek tego białka niezbędne jest większe stężenie antybiotyku.

Niektóre enterokoki posiadają zupełnie inny, występujący zdecydowanie rzadziej, mechanizm oporności na β -laktamy. Polega on na syntezie przez drobnoustroje β -laktamaz – enzymów hydrolizujących pierścień β -laktamowy w cząsteczce antybiotyku. Zhydrolizowany w ten sposób antybiotyk zostaje unieczynniony i nie wpływa hamująco na funkcje enzymatyczne powierzchniowych białek PBP. Bakterie zatem mogą swobodnie syntetyzować peptydoglikan. Gen warunkujący ekspresję β -laktamaz ulokowany jest na plazmidzie i występuje zazwyczaj z genem kodującym oporność na gentamycynę. β -laktamazy wytwarzane są najczęściej w niewielkiej ilości. Zatem przy niskiej liczebności bakterii – wartości MIC dla penicyliny i ampicyliny mogą plasować się na poziomie odpowiadającym bakteriom wrażliwym na działanie tych antybiotyków [36, 37, 38].

Oporność na inhibitory III etapu syntezy mureiny – oporność na glikopeptydy

Najważniejszym procesem zapewniającym bakteriom oporność na glikopeptydy jest osłabienie wiązań cząsteczki antybiotyku z receptorami zlokalizowanymi w ścianie komórkowej. Enterokoki zarówno podatne, jak i odporne na działanie wankomycyny posiadają na zewnątrz błony komórkowej specyficzne kompleksy składające się z mureiny i pentapeptydów. Stanowią one docelowe struktury, z którymi wiążą się antybiotyki glikopeptydowe. Wspomniane wcześniej pentapeptydy składają się z tripeptydowych prekursorów, do których dołączane są dipeptydy. W przypadku szczepów wrażliwych na wankomycynę jest to D-alanylo-D-alanina (D-Ala-D-Ala). Natomiast u bakterii opornych na wankomycynę (VRE) następuje zamiana końcowego aminokwasu D-alaniny na D-serynę (D-ser) lub D-mleczan (D-lac). Substytucja D-alaniny na D-serynę skutkuje zmianami w konformacji wiązań z cząsteczkami antybiotyku, co znacznie je osłabia. Jeśli natomiast w miejsce D-alaniny przyłączy się D-mleczan, dochodzi do redukcji liczby wiązań z wankomycyną. Dowiedziono, że szczepy zawierające dipeptydy D-Ala-D-Ser są wrażliwe na teikopla-

ninę i wykazują oporność na niskie stężenie wankomycyny. Natomiast w przypadku gdy prekursor peptydoglikanu zawierają dipeptydy D-Ala-D-Lac, charakteryzują się wysoką opornością na działanie wankomycyny [42]. W ten sposób zorganizowane struktury biorą udział w procesie syntezy ściany komórkowej. W wyniku związania się wankomycyny z cząsteczką pentapeptydu dochodzi do jego zablokowania, co w konsekwencji prowadzi do zatrzymania syntezy ściany komórkowej. W drugim przypadku wiązanie się antybiotyku do prekursora peptydoglikanu jest ograniczone, w efekcie czego może dochodzić do syntezy ściany komórkowej pomimo obecności wankomycyny.

Nabywanie przez drobnoustroje oporności na antybiotyki jest procesem złożonym i długotrwałym. Wytworzenie oporności na wankomycynę również powstało w wyniku stopniowego nabywania od różnych gatunków bakterii odpowiednich genów. W przypadku oporności na glikopeptydy najważniejszą rolę pełni kompleks genów, które zorganizowane są w tzw. operon oporności na wysokie stężenia wankomycyny. W wyniku ekspresji tych genów powstają białka, które są zdolne do syntezy D-mleczanu. Powstają również proteiny mogące rozcinać dipeptydy D-Ala-D-Ala, przez co umożliwiają dołączenie się D-seryny lub D-mleczanu [42].

Pod względem oporności na wankomycynę enterokoki nie są jednorodnie fenotypowo ani genotypowo. Na podstawie poziomu oporności na wankomycynę, możliwości jej indukowania oraz oporności krzyżowej na wankomycynę i teikoplaninę wyróżnia się wśród enterokoków VRE siedem klas fenotypowych, nazywanych: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG [14] i VanL [10]. W obrębie typów VanB i VanC wyodrębniono jeszcze po trzy podtypy. Są to odpowiednio: VanB1, VanB2 i VanB3, a także VanC1, VanC2 i VanC3. W praktyce klinicznej największe znaczenie mają fenotypy VanA oraz VanB.

Oporność typu A (VanA). Ta nabyta indukcyjna oporność na wysokie stężenia wankomycyny (MIC 64–100 µg/ml) i teikoplaniny (MIC 16–512 µg/ml) występuje najczęściej u gatunków *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, ale także *E. gallinarum* [13, 27]. Końcowy fragment D-Ala-D-Ala jest zamieniony na dipeptyd D-Ala-D-Lac, co uniemożliwia wiązanie antybiotyku, nawet przy jego bardzo wysokich stężeniach. Przenoszenie genów odbywa się poprzez transpozon *Tn1546* obecny na plazmidzie lub chromosomie [14].

Oporność typu B (VanB). Fenotyp VanB cechuje się indukowalną opornością na wankomycynę na różnym poziomie (MIC 4–1024 µg/ml) przy zachowanej wrażliwości *in vitro* na teikoplaninę (MIC 0,5–1 µg/ml). Dipeptyd D-Ala-D-Ala zostaje zamieniony na D-Ala-D-Lac, podobnie jak w fenotypie VanA. Występuje u gatunków *E. faecium*, *E. faecalis* oraz *E. durans* i *E. gallinarum* [29, 52]. Na podstawie różnic w sekwencji DNA genów kodujących ligazę VanB wyróżniono w obrębie tego fenotypu 3 podtypy: VanB1, VanB2, VanB3 [13, 15]. Nie wykazano natomiast związku

pomiędzy występowaniem danego podtypu a poziomem oporności na wankomycynę i teikoplaninę.

Oporność typu C (VanC). To naturalna oporność występująca u ruchliwych gatunków enterokoków: *Enterococcus gallinarum* (vanC1) [29], *E. casseliflavus* (vanC2) i *E. flavescens* (vanC3) [39], która jest regulowana zarówno indukcyjnie, jak i konstytutywnie. Obok fragmentów D-Ala-D-Ala pojawiają się peptydy D-Ala-D-Ser, w ilości 1:3. Ten fenotyp charakteryzuje się opornością na niskie stężenia wankomycyny (MIC 4–32 mg/l) oraz wrażliwością na teikoplaninę (MIC <1 mg/l).

Oporność typu D (VanD). Oporność ta jest wynikiem wytwarzania prekursorów mureiny zakończonych D-alanylo-D-mleczanem, lecz różne jest tło genetyczne opisanych dotychczas szczepów [17]. W przypadku *Enterococcus faecium* BM439 stwierdzono insercję pięciu par zasad w genie strukturalnym ligazy, natomiast w *E. faecium* BM4416 mutacja była wynikiem insercji IS19 w genie *ddl*. Enterokoki VanD charakteryzują się konstytutywną opornością na stosunkowo duże stężenia wankomycyny (MIC 64 µg/ml) oraz na małe stężenia teikoplaniny (MIC 4 µg/ml).

Oporność typu E, G i L (VanE, VanG i Van L). VanE to nabyty typ oporności stwierdzony u szczepu BM4405 *Enterococcus faecalis*, wykazujący niski stopień oporności na wankomycynę (MIC 16 µg/ml) i wrażliwość na teikoplaninę. Szczep ten wytwarza prekursor mureiny zakończone D-Alanylo-D-Seryną [1]. Nabyty fenotyp VanG charakteryzuje się opornością na niski poziom wankomycyny (MIC 16 mg/ml) ale wrażliwością na teikoplaninę (MIC 0,5 mg/ml). Oporność ta jest wynikiem wytwarzania prekursorów mureiny zakończonych D-ala-D-ser [34]. Fenotyp VanL stwierdzono u szczepu *Enterococcus faecalis* N06–0364, który cechuje się opornością na wankomycynę na poziomie MIC 8 µg/ml. Oporność ta jest wynikiem wytwarzania prekursorów mureiny zakończonych D-Ala-D-Ser. Gen *vanL* jest podobny w strukturze do operonu *vanC*, jednakże racemaza serynowa VanT kodowana jest przez dwa oddzielne geny: *vanTmL* (membrane binding) i *vanTrL* (racemase) [10]. Fenotypy VanD, VanE, VanG oraz VanL występują niezmiernie rzadko. W Polsce dotychczas nie odnotowano szczepów klinicznych o tych fenotypach oporności.

Oporność na antybiotyki hamujące syntezę białek

Oporność na aminoglikozydy

Oporność bakterii na antybiotyki aminoglikozydowe jest związana z działaniem enzymów inaktywujących antybiotyki, enzymatyczną modyfikacją 16S rRNA, zmianą w przepuszczalności osłon bakteryjnych dla leku bądź enzymatyczną modyfikacją antybiotyku.

Naturalny mechanizm oporności na niskie stężenia aminoglikozydów występujący u enterokoków związany jest ze słabą przepuszczalnością bakteryjnych osłon komórkowych dla cząsteczek antybiotyku i uniemożliwia stosowanie tych leków

w monoterapii. Skuteczne w leczeniu jest natomiast zastosowanie terapii skojarzonej aminoglikozydu z penicylinami lub glikopeptydami, pod warunkiem wrażliwości *in vitro* na te grupy antybiotyków. Połączenie wykazuje działanie synergistyczne i umożliwia osiągnięcie efektu bakteriobójczego. Badanie lekowrażliwości enterokoków powinno uwzględniać oznaczenie poziomu oporności na antybiotyki aminoglikozydowe, bowiem wystąpienie wysokiego poziomu oporności na aminoglikozydy oznacza nabycie oporności (fenotyp HLAR) i wyklucza zastosowanie terapii skojarzonej aminoglikozydu z penicylinami lub glikopeptydami [29].

Oporność na wysokie stężenie aminoglikozydów – fenotyp HLAR (ang. high-level aminoglycoside resistance) ma charakter nabyty. W takich przypadkach bakterie posiadają zdolność do syntezy specyficznych enzymów AME (ang. aminoglycoside-modifying enzymes), do których należą fosfotransferazy (APHs), acetylotransferazy (AACs) oraz nukleotydylotransferazy (ANTs). Enzymy te w procesach acylacji i fosforylacji modyfikują cząsteczki antybiotyku, nadając mu inną konformację. Cząsteczka leku nie może w takiej sytuacji związać się z jego docelowym miejscem działania (podjednostka 30S rybosomu bakterii), przez co antybiotyk staje się nieaktywny funkcjonalnie. Ekspresja enzymów AME jest zależna od genów zlokalizowanych na ruchomych elementach genetycznych – plazmidach, które mogą łatwo rozprzestrzeniać się pośród różnych szczepów [44]. Do dnia dzisiejszego zidentyfikowano ponad siedemdziesiąt enzymów mających zdolność do modyfikacji cząsteczek aminoglikozydów. Istnieją jednak szczepy *Enterococcus* odporne na działanie aminoglikozydów, które dodatkowo wytwarzają tzw. enzym bifunkcyjny [AAC(6')-APH(2'')], kodowany przez gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Białko to charakteryzuje się szerokim spektrum działania, ponieważ może modyfikować wiele antybiotyków aminoglikozydowych z wyjątkiem streptomycyny. *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* pośredniczy w oporności zwłaszcza na gentamycynę, tobramycynę, amikacynę, kanamycynę, netilmycynę i dibekacynę. Wykazano, że ponad 90% szczepów enterokoków izolowanych z przypadków klinicznych charakteryzuje się wysokim poziomem oporności na gentamycynę (MIC zazwyczaj ≥ 2000 $\mu\text{g/ml}$), w wyniku obecności genu *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, natomiast mniej niż 10% posiada *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* i *aph(2'')-Ib* [12].

Fenotyp HLSR (high level streptomycin resistance) oznacza wysoki poziom oporności na streptomycynę (MIC > 1024 $\mu\text{g/ml}$ według EUCAST [19]). Oporność ta jest wynikiem działania enzymu o aktywności nukleotydylotransferazy ANT(6') lub ANT(3''), modyfikującego streptomycynę bądź mutacjami w obrębie genów kodujących składniki podjednostki 30S rybosomu bakteryjnego. W wyniku mutacji genów w chromosomie, które odpowiadają za ekspresję białek rybosomalnych, dochodzi do wytworzenia nowego białka rybosomalnego. Zmutowana proteina S12, która stanowi receptor dla aminoglikozydów, wykazuje bardzo małe powinowactwo do tej klasy antybiotyków. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* posiadające zmutowane, rybosomalne białko S12, uzyskują w efekcie oporność na streptomycynę.

Oporność na antybiotyki tetracyklinowe

Tetracykliny hamują syntezę białek (poprzez blokowanie podjednostki 30S rybosomów bakteryjnych) i zaburzają procesy energetyczne w komórkach bakteryjnych. Wyróżnia się dwa główne mechanizmy oporności na tetracykliny u bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Antybiotyki te są aktywnie usuwane z cytoplazmy komórki za pomocą specjalnych pomp błonowych (efflux), które powstają m.in. w wyniku ekspresji genów *tet(K)* i *tet(L)* oraz na skutek konformacji rybosomu [9]. Geny *tet(M)*, *tet(O)* i *tet(S)* kodują białka, które wpływają na oporność przez protekcję rybosomu. Obejmuje to wiązanie białek oporności do rybosomu, a następnie zmianę konformacji rybosomu, co ogranicza wiązanie tetracyklin. Najczęściej występującym genem oporności na tetracykliny enterokoków jest *tet(M)*. Gen ten znajduje się na chromosomie i zazwyczaj przenoszony jest na transpozonie *Tn916* lub podobnych transpozonach koniugujących, ale także spotykany jest na plazmidach koniugujących [48].

Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy

Pierwszy opisany mechanizm oporności na makrolidy polegał na potranskrypcyjnej modyfikacji 23S rRNA w wyniku aktywności adenino-N⁶-metylotransferazy. Enzymy tej grupy przenoszą jedną lub dwie reszty metylowe na jedną cząsteczkę adeniny w 23S rRNA, prowadząc do powstania N⁶-metyloadeniny lub N⁶,N⁶-dimetyloadeniny. W wyniku tego obniżone jest w rybosomie wiązanie nie tylko erytromycyny, ale także innych makrolidów, jak azytromycyny i klarytromycyny, a ponadto linkozamidów oraz streptogramin B. Mechanizm ten kodowany jest przez gen *erm(B)*, rzadziej natomiast przez gen *erm(A)*, a fenotyp taki nazywany jest „MLS_B” (macrolide-lincosamide-streptogramin B) [45]. Oporność na makrolidy i linkozamidy może być również uwarunkowana od zdolności mikroorganizmów do wytwarzania specyficznych enzymów inaktywujących antybiotyki. Inaktywacja ta może być wynikiem rozszczepienia pierścienia laktonowego makrolidu przez esterazę lub modyfikacji jego struktury przez enzymy o aktywności transferaz (acetylotransferazy, nukleotydylotransferazy, fosfotransferazy), fosforylasy lub hydrolazy. Mechanizmy te zwykle nadają komórce bakteryjnej oporność tylko na jedną z trzech klas antybiotyków należących do tej grupy (makrolity, linkozamidy, streptograminy) bądź tylko na jeden ich rodzaj (np. streptograminy B, ale nie streptograminy A). Wśród bakterii z rodzaju *Enterococcus* występuje gen *sat* kodujący acetylotransferazy, które unieczynniają streptograminy grupy A. *E. faecalis* jest naturalnie odporny na klindamycynę (linkozamidy), quinupristin (streptograminy B) i dalfoprystin (streptograminy A), na skutek ekspresji genu *lsa*. Gen ten jest zbliżony strukturalnie do kasety wiążącej ATP (ABC – ATP-binding cassette) – efluksu jako prawdopodobny mechanizm oporności, który stwierdzono u 180/180 szczepów *E. faecalis* oraz u żadnego ze 189 innych enterokoków, sugerując tym samym, że gen jest wrodzony u *E. faecalis* [48].

Oporność na antymetaboly – sulfonamidy i trimetoprim

Sulfonamidy hamują syntezę kwasu dwuhydrofoliowego, działając jako kompetytywne inhibitory syntetazy dwuhydropterynianowej (DHPS). W wyniku wytworzenia przez bakterie zmodyfikowanego enzymu syntetazy dwuhydropterynianowej następuje obniżenie powinowactwa enzymu do leku. Dodatkowo nadprodukcja kwasu p-aminobenzoowego powoduje jego bezpośrednie współzawodnictwo o dostęp do centrum aktywnego DHPS. W wyniku działania substancji antybiotycznej niektóre bakterie wytwarzają alternatywnych szlak metaboliczny, który zastępuje szlak zablokowany (przez antybiotyk). Zjawisko to określane jest mechanizmem „by pass” i znane jest jako sposób uzyskiwania oporności na sulfonamidy i trimetoprim.

Większość bakterii nie posiada zdolności absorbowania folacyny ze środowiska, tak więc wymagają jej syntezę do produkcji kwasów nukleinowych. Kombinacja trimetoprimu i sulfaletoksazolu hamuje dwa kolejne kroki w ścieżce syntezy tetrahydrofolianu, przez co blokuje syntezę kwasu foliowego i synergistycznie niszczy szerokie spektrum bakterii. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* wyjątkowo mogą absorbować kwas foliowy ze środowiska, omijając tym samym wpływ połączenia trimetoprimu z sulfametoksazolem. Dlatego też badanie *in vitro* wrażliwości enterokoków na sulfonamidy z trimetoprimem na podłożach pozbawionych kwasu foliowego przynosić będzie oczekiwany rezultat. Pomimo widocznej *in vitro* wrażliwości połączenie tych substancji jest nieskuteczne w terapii poważnych infekcji na tle enterokoków [11, 21].

Oporność na antybiotyki hamujące syntezę i funkcje kwasów nukleinowych

Oporność na fluorochinolony

Chinolony hamują bakterie przez interakcję z typem II topoizomerazy, DNA gyrazy oraz topoizomerazy IV, które są niezbędne do replikacji bakteryjnego DNA. DNA gyraza składa się z dwóch podjednostek A i B, nazywanych *gyrA* oraz *gyrB*. Topoizomeraza IV jest głównym celem chinolonów u bakterii Gram-dodatnich i składa się z dwóch podjednostek nazywanych *parC* i *parE*, które są homologiczne odpowiednio do *gyrA* i *gyrB*. Oporność enterokoków na fluorochinolony uwarunkowana jest występowaniem mutacji punktowych na chromosomach. W związku z tym, geny oporności na fluorochinolony nie mogą zostać przekazane innym mikroorganizmom na zasadzie transferu materiału genetycznego. Częstość występowania tego rodzaju mutacji w genomie bakterii uwarunkowana jest od intensywności stosowania antybiotykoterapii z zastosowaniem leków z tej grupy. Najczęściej identyfikowanymi mutacjami są modyfikacje genów kodujących topoizomerazę II (tzw. gyrazę) oraz topoizomerazę IV. Wykazano, że *E. faecalis* z mutacją w genie *parC*, ale nie

w obrębie genu *gyrA*, posiada średnią oporność na chinolony. Minimalne stężenie hamujące (MIC) chinolonów dla tego izolatu było wyższe niż MIC dla *E. faecalis* bez mutacji w genach *parC* czy *gyrA*, ale niższe niż MIC dla *E. faecalis* z mutacjami zarówno w genie *parC*, jak i *gyrA* [23, 25, 26].

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* stanowią naturalną florę przewodu pokarmowego u ludzi i zwierząt. Pomimo nieznacznego udziału we florze saprofitycznej makroorganizmu wciąż obserwuje się wzrost znaczenia klinicznego tych oportunistycznych patogenów zarówno u ludzi, jak i zwierząt. W ostatniej dekadzie coraz częściej pojawiają się doniesienia o udziale bakterii z rodzaju *Enterococcus* w patologii chorób ptaków. Nieracjonalne stosowanie antybiotyków i chemioterapeutyków doprowadziło do powiększania się populacji wieloopornych szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Nabywanie przez drobnoustroje oporności na antybiotyki stanowi jeden z głównych problemów współczesnej medycyny. W związku z powyższym, istnieje konieczność monitoringu oporności tych drobnoustrojów u ptaków.

Piśmiennictwo

- [1] Abadia Patino L., Courvalin P., Perichon B., 2002. *vanE* gene cluster of vancomycin – resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. J. Bacteriol., 184, 6457–6464.
- [2] Acar J., Röstel B., 2001. Antimicrobial resistance: an overview. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20, 797–810.
- [3] Anon., 2009. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. EFSA Journal, 7, 1372.
- [4] Bennett P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria, Br. J. Pharmacol., Suppl. 1, 347–357.
- [5] Bentorcha F., De Cespédès G., Horaud T., 1991. Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother., 35 (5), 808–812.
- [6] Boyd D.A., Willey B.M., Fawcett D., Gillani N., Mulvey M.R., 2008. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06–0364 with low-level ancomycin resistance harboring a novel DAla-D-Ser gene cluster, vanL. Antimicrob Agents Chemother., 52, 2667–2672.
- [7] Chenoweth C.E., Robinson K.A., Schaberg D.R., 1990. Efficacy of ampicillin versus trimethoprim-sulfamethoxazole in a mouse model of lethal enterococcal peritonitis. Antimicrob Agents Chemother., 34, 1800–1802.
- [8] Chow J.W., 2000. Aminoglycoside resistance in enterococci. Clin Infect Dis., 31, 586–589.
- [9] Courvalin P., 2005. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. Int. J. Med. Microbiol., 294, 479–486.
- [10] Courvalin P., 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin. Infect. Dis., 42, Suppl. 1, 25–34.
- [11] Dahl K.H., Skov Simonsen G., Olsvik R., Sundsfjord A., 1999. Heterogeneity in *vanB* gene cluster of genetically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob. Agents Chemother., 43, 1105–1110.

- [12] de Jong A., Bywater R., Butty P., Deroover E., Godinho K., Klein U., Marion H., Simjee S., Smets K., Thomas V., Valle M., Wheadon A., 2009. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63, 733–744.
- [13] Depardieu F., Reynolds P.E., Courvalin P., 2003. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 7–18.
- [14] DuPont H.L., 2007. The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clin. Infect. Dis.*, 45, 1353–1361.
- [15] EUCAST: www.escmid.org/research_projects/eucast/.
- [16] Giedraitienė A., Vitkauskienė A., Naginienė R., Pavilionis A., 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 47 (3), 137–146.
- [17] Grayson M.L., Thauvin-Eliopoulos C., Eliopoulos G.M., Yao J.D., DeAngelis D.V., Walton L., Woolley J.L., Moellering R.C. Jr., 1990. Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 1792–1794.
- [18] Guardabassi L., Jensen L.B., Kruse H. Ed., 2008. *Guide to Antimicrobial use in Animals*. Blackwell Publishing, 1–223.
- [19] Hooper D.C., 2000. Mechanisms of action and resistance of old and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 31, 24–28.
- [20] Irving W., Boswell T., Ala'Aldeen D., 2008. *Mikrobiologia medyczna*. Red. Szewczyk E.M., PWN, Warszawa, 285–287.
- [21] Jacoby G.A., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 41, 120–126.
- [22] Kanematsu E., Deguchi T., Yasuda M., Kawamura T., Nishino Y., Kawada Y., 1998. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 433–435.
- [23] Kawalec M., Kędzierska J., Gajda A., Sadowy E., Węgrzyn J., Naser S., Skotnicki A.B., Gniadkowski M., Hryniewicz W., 2007. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.*, 13, 893–901.
- [24] Khachatourians G.G., 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ*, 159, 1129–1136.
- [25] Leclercq R., Dutka-Malen S., Brisson-Noël A., Molinas C., Derlot E., Arthur M., Duval J., Courvalin P., 1992. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin. Infect. Dis.*, 15, 495–501.
- [26] Leclercq R., 1997: Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.*, Suppl. 1, 80–84.
- [27] Lester C.H., Fridodt-Møller N., Sørensen T.L., Monnet D.L., Hammerum A.M., 2006. In vivo transfer of the vanA resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50, 596–599.

- [28] Ligozzi M., Pittaluga F., Fontana R., 1993. Identification of a genetic element (psr) which negatively controls expression of *Enterococcus hirae* penicillin-binding protein 5. *J. Bacteriol.*, 175, 2046–2051.
- [29] Madigan M.T., Martinko J.M., 2006. *Biology of microorganism*. Pearson Prentice Hall.
- [30] McKessar S.J., Berry A.M., Bell J.M., Turnidge J.D., Paton J.C., 2000. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 3224–3228.
- [31] Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607–625.
- [32] Murray B.E., 1992. Beta-lactamase producing enterococci, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 2355–2359.
- [33] Murray B.E., 1990. The life and Times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 46–65.
- [34] Murray B.E., 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.*, 342, 710–721.
- [35] Navarro F., Courvalin P., 1994. Analysis of genes encoding d-alanine-d-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 1788–1793.
- [36] Pacanowski J., Lalande V., Lacombe K., Boudraa C., Lesprit P., Legrand P., Trystram D., Kassis N., Arlet G., Mainardi J.L., Doucet-Populaire F., Girard P.M., Meynard J.L., 2008. *Campylobacter* bacteremia: clinical features and factors associated with fatal outcome. *Clin. Infect. Dis.*, 47, 790–796.
- [37] Piddock L.J.V., 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19(2), 382–402.
- [38] Przybylski M., 2007. Enterokoki odporne na wankomycynę. II. Mechanizmy oporności, epidemiologia. *Postępy mikrobiologii*, 46, 4, 317–334.
- [39] Purdom G., 2007. Antibiotic Resistance of Bacteria: An example of Evolution in Action? *Answers*, 2:3, 74–76.
- [40] Ramirez M.S., Tolmansky M.E., 2010. Aminoglycosidemodifying enzymes. *Drug Resist Updat.*, 13, 151–171.
- [41] Roberts M.C., 2008. Update on macrolide-lincosamide – streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 282, 147–159.
- [42] Rzewuska M., 2009. Antybiotykooporność Gram-ujemnych pałeczek wytwarzających β -laktamazy. *Życie wet.*, 84, 199–205.
- [43] Sifaoui F., Arthur M., Rice L., Gutmann L., 2001. Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 2594–2597.
- [44] Singh K.V., Weinstock G.M., Murray B.E., 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.
- [45] Su Y.A., He P., Clewell D.B., 1992. Characterization of the tet(M) determinant of Tn916: evidence for regulation by transcription attenuation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36(4), 769–778.

- [46] van Hoek A.H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.*, 2, 203.
- [47] Węgleński P., 2008. Podstawowe koncepcje genetyczne i wybrane metody analizy genetycznej u różnych grup organizmów [w:] *Genetyka molekularna*, PWN, Warszawa.
- [48] Werner G., Coque T.M., Hammerum A.M., Hope R., Hryniewicz W., Johnson A., Klare I., Kristinsson K.G., Leclercq R., Lester C.H., Lillie M., Novais C., Olsson-Liljequist B., Peixe L.V., Sadowy E., Simonsen G.S., Top J., Vuopio-Varkila J., Willems R.J., Witte W., Woodford N., 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.*, 20, 13, pii: 19046.

Wpływ chemioterapeutyków na replikację wirusa choroby Mareka

Antimicrobials influence on the Marek's disease virus replication

Pomimo wielu intensywnych badań choroba Mareka (Marek's disease – MD) stanowi istotny problem w produkcji drobiarskiej. W Polsce po raz pierwszy zanotowano jej obecność na początku lat siedemdziesiątych ub. wieku. Po wprowadzeniu szczepień profilaktycznych nie stanowiła przez pewien czas dużego zagrożenia, jednakże obecnie nastąpił wzrost liczby zachorowań. Stosowane w immunoprofilaktyce są mono- lub biwalentne żywe szczepionki oparte na heterologicznym szczepie herpeswirusa indyjskiego HVT bądź na atenuowanym szczepie herpeswirusa MDV, które w przypadku zakażenia szczepem terenowym zabezpieczają przed jego wczesną replikacją w tkankach limfatycznych i obniżają poziom latentnej infekcji.

Mechanizm działania ochronnego szczepionek jest następujący: trzy dni po szczepieniu komórki NK ulegają aktywacji, wytwarzają interferon IFN γ oraz niszczą komórki B zakażone zjadliwym wirusem. IFN γ stymuluje makrofagi do wytwarzania iNOS, enzymu niezbędnego do produkcji NO, i w ten sposób namnażanie terenowego wirusa jest znacznie ograniczone. Antygenowo specyficzne, cytotoksyczne T limfocyty pojawiają się 7. dnia po szczepieniu i także eliminują komórki zakażone terenowym wirusem. Część zakażonych komórek nie ulega zniszczeniu, a wirus przechodzi w stan latencji. Jeżeli takie latentnie zakażone komórki ulegną ponownej aktywacji, zostają szybko wyeliminowane przez komórki pamięci CTL. Możliwy jest też inny przebieg reakcji immunologicznych. Wirus MD może ograniczać ekspresję MHC na komórkach docelowych, redukując skuteczność CTL lub też może wytwarzać cząsteczki podobne do MHC, które nie dopuszczają sygnałów litycznych

do komórek NK. Możliwa jest także interferencja z przetwarzaniem i z prezentacją antygenów.

Wirus choroby Mareka jest silnym immunosupresorem. Rozległość i zakres zmian w układzie odpornościowym zależą od genetycznej wrażliwości kurcząt, onkogenności szczepu oraz dodatkowych czynników zewnętrznych, jak stres czy inne infekcje. U ptaków zakażonych wirusem MD upośledzeniu ulegają zarówno immunitet humoralny, jak i komórkowy. Osłabienie reakcji immunologicznych może wynikać z bezpośredniego działania wirusa MD, powodującego lityczną infekcję limfocytów. Permanentna immunosupresja zbiega się z drugą fazą cytolitycznej infekcji i jest prawdopodobnie związana z pojawieniem się powstających na skutek reaktywacji litycznej infekcji limfoblastów, które uległy transformacji. To jest przyczyną utraty dodatkowych B i T komórek oraz powoduje atrofię bursy Fabrycjusza i grasicy u zakażonych kurcząt.

Jak wiadomo, antybiotyki nie mają bezpośredniego wpływu na wirusy. Jednakże stosowanie antybiotyków, oprócz działań korzystnych, takich jak eliminacja patogenów bakteryjnych, może być przyczyną obniżenia zdolności organizmu gospodarza do wytwarzania mechanizmów obronnych, osłabienia immunitetu i zwiększenia zdolności do ulegania innym zakażeniom.

Skuteczność szczepień przeciwko chorobie Mareka jest ściśle związana z liczbą cząstek wirusa zawartej w podanej dawce szczepionki. Dlatego należy rozważyć każdą sytuację, która może spowodować obniżenie liczby cząstek wirusa szczepionkowego, a co za tym idzie, obniżyć skuteczność szczepień. W praktyce terenowej jednodniowym pisklętom podawane są preparaty antybakteryjne o szerokim spektrum działania jako postępowanie zapobiegawcze przed wczesną śmiertelnością powodowaną infekcjami bakteryjnymi. Profilaktyczne podawanie antybiotyków jednodniowym pisklętom przeprowadzane jest również przez dodawanie ich do szczepionki przeciwko chorobie Mareka.

Ceftiofur jest to cefalosporyna III generacji o szerokim spektrum działania obejmującym bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne i beztlenowce. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu syntezy ściany bakteryjnej. Niekorzystne działanie tego antybiotyku na przeżywalność szczepów szczepionkowych wirusa choroby Mareka wykazało kilku autorów. Nervi i wsp. [2] stwierdzili, że dodatek ceftiofuru do rozcieńczonej szczepionki obniżał miano wirusa szczepionkowego Rispens od 16 do 33,9%, a szczepu HVT nawet do 61,8%. Przeprowadzone badania własne oraz innych autorów potwierdziły te wyniki. Ponadto rozpuszczona szczepionka zawierająca ten antybiotyk po 2 godz. inkubacji wykazywała znaczną redukcję miana, a skuteczność jej po szczepieniu piskląt jest o 25% niższa [3, 4].

Gentamycyna, czyli antybiotyk aminoglikozydowy działający na bakterie Gram-ujemne i niektóre Gram-dodatnie hamuje syntezę białek poprzez nieodwracalne związanie się z frakcją 3ps rybosomu komórki bakteryjnej. Dodana do rozcieńcza-

nika szczepionki przeciwko chorobie Mareka powoduje spadek miana wirusa szczepionkowego nawet do 45%.

Chlorotetracyklina, erytromycyna, oksytetracyklina, penicylina również mają szkodliwy wpływ na miana wirusów szczepionkowych. Jednakże działanie to jest zależne zarówno od dawki antybiotyku, okresu jego działania, jak też od jego postaci.

Podsumowując, antybiotyki nie mając działania przeciwwirusowego, dodane do rozcieńczalnika szczepionki, mogą powodować obniżenie miana infekcyjnego wirusów szczepionkowych. Wykazano, że zmieniają one odczyn pH rozcieńczonych szczepionek oraz działają cytotoksycznie na komórki, z którymi związane są wirusy szczepionkowe. Ponadto Panigrahy i wsp. [3] wykazali, że podanie pisklętom w pierwszych trzech dniach życia antybiotyków może spowodować immunosupresję.

Należy podkreślić raz jeszcze, że dodatek antybiotyków do szczepionek przeciwko chorobie Mareka jest szkodliwe, ponieważ może spowodować zmniejszenie skuteczności szczepień.

Piśmiennictwo

- [1] Busgalia C., 2013. Influence of the addition of antibiotics on survival of herpesvirus of turkeys, *Avian Dis.* (in press).
- [2] Nervi P. i wsp., 2000. Effects of mixing antibiotics with MD vaccines on number of PFU and viremia. *Proc. 6th Inter. Symposium on MD.* Montreal, Canada, 44.
- [3] Panigrahy i wsp., 1979. Antibiotics induced immunosuppression in turkey, *Avian Dis.*, 23, 401–408.
- [4] Samorek-Salamonowicz E. i wsp., 2003. Wpływ wybranych czynników na przeżywalność szczepionkowych wirusów choroby Mareka. *Med. Wet.*, 59, 421–425.

Ewolucja genów MDV związanych z onkogennością

Evolution of MDV genes associated with oncogenicity

Choroba Mareka (MD) jest nowotworową i wirusową chorobą drobiu grzebiącego. Jej czynnikiem etiologicznym jest wirus choroby Mareka (MDV). Wyróżniane są trzy serotypy MDV tego wirusa, ale tylko serotyp 1 jest onkogeny dla kurcząt. W obrębie tego serotypu występują patotypy: o umiarkowanej zjadliwości (mMDV), zjadliwe (vMDV), bardzo zjadliwe (vvMDV) oraz coraz częściej występujący patotyp bardzo zjadliwy plus (vvMDV+). Jediną skuteczną metodą zapobiegania MD są szczepienia ochronne, prowadzone regularnie od około 40 lat. Powszechne stosowanie profilaktyki MD w sposób pośredni doprowadziło do wzrostu patogenności szczepów terenowych MDV. W ostatnich latach w Polsce i na całym świecie obserwuje się wzrost częstości występowania szczepów wirusa choroby Mareka o podwyższonej patogenności, a także przypadki przełamania protekcji poszczepiennej. Ze względu na swoją wielkość – 185 kbp wykazano, że genom MDV jest podatny na mutacje genetyczne, szczególnie w regionach odwróconych i powtórzonych sekwencji (TR i ITR). Mutacje w obrębie ramek odczytu kodujących główne białka regulatorowe biorące udział w replikacji wirusa, jak również w jego onkogenności mogą mieć bezpośredni wpływ na jego patogenność, zdolność do szybkiego namnażania się czy wreszcie właściwości antygenowe. O ciągłej ewolucji szczepów terenowych MDV świadczy występowanie na terenie kraju szczepów MDV o podwyższonej patogenności.

Prowadzone dotychczas badania w kraju i za granicą wykazały występowanie wielu mutacji w sekwencji genu MDV076 kodującego onkoproteinę Meq. Położone w jego bezpośrednim sąsiedztwie dwa regiony: MDV077 kodujący białko

o masie 23 kDa oraz gen MDV077,5 o nieznannej funkcji prawdopodobnie biorą udział w przebiegu procesu onkogenezy i podlegają mutacjom genetycznym mającym związek z patotypem szczepów MDV. Zmiany genetyczne w obrębie tych trzech genów mogą być traktowane jako specyficzne markery dla szczepów MDV o podwyższonej patogenności występujących aktualnie na terenie kraju.

Celem podjętych badań była próba określenia ewolucji szczepów terenowych MDV na podstawie zmian w sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej genów MDV076, MDV077 i MDV077,5.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na szczepach wirusa choroby Mareka wyizolowanych z przypadków terenowych MD w kraju od wprowadzenia szczepień aż po lata współczesne. Szczepy te namnożono w hodowli fibroblastów zarodków kurzych SPF (CEF SPF). Dla każdego ze szczepów sporządzono pulę materiału wirusowego, a następnie izolowano całkowity DNA. W celu amplifikacji badanych 3 genów zaprojektowano startery komplementarne do genów: MDV076, MDV077 i MDV77,5. Otrzymane produkty amplifikacji sekwencjonowano w firmie Genomed S.A w Warszawie, a następnie porównano je przy wykorzystaniu oprogramowania komputerowego z ogólnodostępną bazą danych Genbank. Na podstawie porównań sekwencji wykreślono drzewo filogenetyczne pozwalające na określenie prawdopodobnego patotypu i ewolucji badanych szczepów izolowanych w Polsce. W przedstawionych badaniach określano różnice występujące w genie MDV076 pośród szczepów izolowanych w kraju w latach 2009–2011.

Wyniki

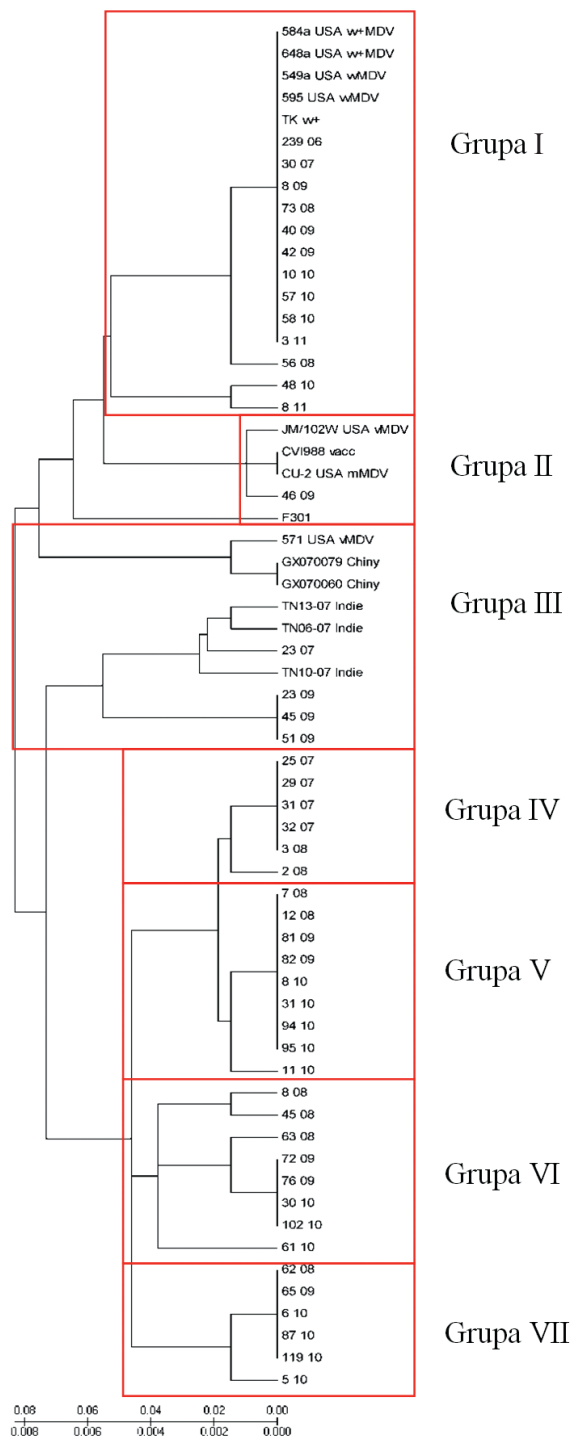
Przeanalizowano 48 sekwencji genu *meq* (MDV076) pochodzących ze szczepów terenowych MDV. W celu porównania do sekwencji 48 badanych szczepów dołączono również sekwencje 13 szczepów standardowych o określonym patotypie. W obrębie sekwencji nukleotydowych uzyskanych dla genu *meq* obserwowano liczne zmiany typu insercji mono- lub polinukleotydowej, bądź delecji, tranzycji (puryna w purynę lub pirymidyna w pirymidynę) oraz transwersji (puryna w pirymidynę lub pirymidyna w purynę). Zestawienie najważniejszych mutacji w genie *meq* przedstawiono w tabeli 1. Najbardziej charakterystycznymi mutacjami dla szczepów vv/vv+MDV były: tranzycja adeniny w guaninę, którą obserwowano w pozycji 39 u 29 szczepów własnych MDV, insercja tyminy w pozycji 77 delecja tyminy w pozycji 78, insercja tyminy w pozycji 92 i tranzycja tyminy w cytozynę w pozycji 95.

Tabela I. Najważniejsze mutacje w sekwencji nukleotydowej genu *meq* badanych szczepów nt-pozycja nukleotydowa w sekwencji nukleotydowej genu *meq*

| Obserwowana mutacja | Pozycja (nt) | Szczepy posiadające mutację |
|--|--------------|--|
| Grupa filogenetyczna (vvMDV/vv+MDV) | | |
| Delecja tyminy | 110 | 584A, 648A, 595, 549A, TK, 239/06, 30/07, 8/09, 56/08, 73/08, 40/09, 42/09, 10/10, 57/10, 58/10, 3/11 |
| Insercja tyminy | 107 | |
| Insercja guaniny i adeniny | 129 i 130 | |
| Insercja guaniny | 142 | |
| Tranzycja guaniny w adeninę | 144 | |
| Delecja adeniny | 147 | |
| Tranzycja guaniny w adeninę | 206 | 584A, 648A, 595, 549A, TK, 239/06, 30/07, 8/09, 56/08, 63/08, 73/08, 40/09, 42/09, 46/09, 10/10, 48/10, 57/10, 61/10 58/10, 3/11, 8/11 |
| Transwersja tyminy w guaninę | 220 | 584A, 648A, 595, 549A, TK, 239/06, 30/07, 8/09, 56/08, 73/08, 40/09, 42/09, 10/10, 11/10, 48/10, 57/10, 58/10, 3/11, 8/11 |
| Tranzycja tyminy w cytozynę | 354 | 584A, 648A, 595, 549A, TK, 239/06, 30/07, 8/09, 56/08, 73/08, 40/09, 42/09, 10/10, 57/10, 58/10, 3/11 |
| Transwersja cytozyny w adeninę | 526 | 584A, 648A, 595, 549A, TK, 239/06, 30/07, 8/09, 56/08, 73/08, 40/09, 42/09, 10/10, 57/10, 58/10, 3/11 |
| Występowanie guaniny | 731 | 584A, 648A, 595, 549A, TK, 239/06, 30/07, 8/09, 56/08, 73/08, 40/09, 42/09, 10/10, 48/10, 57/10, 58/10, 3/11, 8/11 |
| Tranzycja adeniny w guaninę | 751 | |

Równie charakterystyczna była tranzycja guaniny w adeninę w pozycji 206 genu *meq* oraz transwersja tyminy w guaninę w pozycji 220 w szczepach: 239/06, 30/07, 8/09, 56/08, 73/08, 40/09, 42/09, 10/10, 48/10, 57/10, 58/10, 61/10, 3/11 i 8/11 oraz w pięciu szczepach standardowych o patotypie vvMDV oraz vv+MDV. Specyficzną tranzycję tyminy w cytozynę w pozycji 354 wykryto w 14 szczepach własnych MDV oraz w szczepach standardowych o patotypie vvMDV i vv+MDV. Ponadto w sekwencji genu *meq* stwierdzono wiele pojedynczych delecji i inercji, które nie były charakterystyczne i nie miały wpływu na sekwencję aminokwasową.

Na podstawie porównań sekwencji nukleotydowych onkogenu *meq* wszystkich badanych szczepów ze szczepami standardowymi stwierdzono od 81,4 do 100% homologii. Najbardziej zróżnicowaną sekwencję posiadał szczep 40/09, który wykazał 81,4% podobieństwa sekwencji ze szczepami standardowymi o umiarkowanej patogenności, takimi jak: CVI988, JM/102W i CU-2. Na podstawie sekwencji nukleotydowej wykreślono drzewo filogenetyczne, a badane szczepy MDV zaklasyfikowano do 7 grup (ryc. 1). Do pierwszej grupy zaliczono szczepy: 239/06, 30/07, 8/09, 73/08, 40/09, 42/09, 10/10, 57/10, 58/10 i 3/11, do której należą szczepy



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji genu *meq* krajowych szczepów MDV. Czerwonymi ramkami zaznaczono oddzielne grupy

standardowe o patotypach vvMDV i vv+MDV. Drugą grupę obok szczepów standardowych o umiarkowanej patogenności i niepatogennych, tj.: JM102/W, CVI988/Rispens i CU-2 utworzyły dwa badane szczepy: 46/09 oraz F301. Trzecią grupę tworzyły szczepy: 23/07, 23/09, 45/09 i 51/09 oraz szczepy standardowe pochodzące z USA, Indii i Chin. Do grupy czwartej zaliczono wyłącznie polskie szczepy MDV: 25/07, 29/07, 31/07, 32/07, 3/08 i 2/08. Sekwencja nukleotydowa tych szczepów posiadała 99,8–100% homologii. Z kolei grupę piątą tworzyło 9 szczepów: 7/08, 12/08, 81/09, 82/09, 8/10, 31/10, 94/10, 95/10 i 11/10, a homologia między ich sekwencjami wynosiła od 99,5–100%. Mniej jednorodną grupę szóstą tworzyło 8 szczepów własnych. Szczepy 8/08 i 45/08 utworzyły wspólną podgrupę, natomiast drugą podgrupę tworzyły szczepy 72/09, 76/09, 30/10, 102/10 mające 100% identyczności sekwencji nukleotydowej genu *meq*, natomiast szczepy 63/08 oraz 61/10 utworzyły oddzielne podgrupy. Homologia sekwencji szczepów w grupie szóstej wynosiła od 98% – 100%. Ostatnią grupę siódmą utworzyło 5 szczepów o 100% identyczności sekwencji: 62/08, 65/09, 6/10, 87/10 i 119/10, natomiast szczep 5/10 utworzył własną podgrupę, pomimo że różnica w homologii jego sekwencji do innych szczepów była niska i wynosiła 0,5%.

Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że punktowe zmiany nukleotydowe w obrębie genu *meq* kodowanego przez region MDV076 w regionie od 107–751 nt mogą być markerem patogenności izolowanych szczepów terenowych MDV. Obecnie prowadzone są badania nad zmiennością w obrębie genów MDV077 i MDV077,5 co powinno dostarczyć dodatkowych informacji na temat ewolucji szczepów terenowych MDV.

Przedstawione badania prowadzone są w ramach projektu badawczego własnego nr. 2011/01/B/NZ7/01561 pt. „Ewolucja genów wirusa choroby Mareka związanych z onkogennością.”

Wpływ oksytetracykliny stosowanej *per os* na wybrane parametry układu odpornościowego indyków

Influence of oral administration of oxytetracycline on the selected parameters of turkeys immune system

Pomimo że u bakterii stosunkowo szybko i łatwo narasta oporność na tetracykliny, to jednak są one antybiotykiem znajdującym szerokie zastosowanie w produkcji drobiarskiej. Wynika to z faktu, że tetracykliny charakteryzują się szerokim spektrum działania w odniesieniu zarówno do bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich [2, 3, 5–8, 10, 11, 13, 18]. Ponadto, po wprowadzeniu zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu często u ptaków oksytetracyklina podawana z paszą lub wodą pełni rolę takiego stymulatora [1, 10].

Z przeglądu literatury [4, 8, 9, 16] oraz własnych obserwacji klinicznych wynika, że niekorzystnym zjawiskiem w odniesieniu do tetracyklin jest także oddziaływanie immunosupresyjne u leczonych tym antybiotykiem ptaków [13, 17]. Dowodem na to jest zmniejszenie liczby leukocytów, obniżenie wielkości torby Fabrycjusza i grasicy oraz redukcja aktywności fagocytarnej makrofagów [1]. Warto także dodać, że działanie immunosupresyjne tetracykliny znajduje zastosowanie w terapii niektórych stanów patologicznych wynikających z nadczynności układu odpornościowego u ludzi, zwłaszcza w kontekście chorób o etiologii niezakaźnej, np. cukrzyca czy hamowanie sekrecji cytokin w alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry [12, 15]. Nowym trendem w terapii chorób zakaźnych jest

także wykorzystywanie możliwości interakcji między lekiem a układem odpornościowym pacjenta [12, 15].

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że większość badań nad wpływem antybiotyków, w tym tetracyklin na układ odpornościowy prowadzono metodami *in vitro* i dotyczyły one przede wszystkim aktywności fagocytarnej i chemotaksji granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów [6, 7, 12, 17] oraz transformacji blastycznej limfocytów stymulowanych mitogenami [13].

Celem prezentowanych badań jest określenie z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych wpływu oksytetracykliny stosowanej *per os* na wybrane parametry odporności komórkowej u indyków.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w dwóch grupach (po 20 ptaków) klinicznie zdrowych 5-tygodniowych indyków typu Big 7 obu płci. Indyki odchowywano od pierwszego dnia życia zgodnie z obowiązującą technologią w izolowanych wiwariach Katedry Chorób Ptaków. Ptaki z grupy I stanowiły kontrolę, a z grupy II przez 5 dni otrzymywały z wodą do picia oksytetracyklinę w dawce 0,5 g czystej substancji na 1 litr wody. Bezpośrednio po 5 dobach podawania i następnie po 6 dobach od zakończenia podawania wymienionego antybiotyku pobierano krew od 7 ptaków z każdej grupy w ilości po 2 ml z żyły odłokciowej do jałowych probówek z EDTA K 1,6 mg/ml (Sarstedt, Niemcy) i dokładnie mieszano za pomocą rolkowego mieszadła hematologicznego w temp. pokojowej przez 5 minut.

Z pobranej krwi obwodowej izolowano komórki monoklonalne. W tym celu, po odpowiednim rozcieńczeniu pobranej krwi w PBS z dodatkiem 1% FCS (Sigma-Aldrich, Niemcy), nawarstwiano ją na 3 ml gradientu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Niemcy) i wirowano przy 400 g w temp. pokojowej przez 30 minut z wyłączoną funkcją hamowania. Powstały kożuszek komórek mononuklearnych delikatnie zbierano do jałowych probówek i po odpowiednim płukaniu w buforze PBS z dodatkiem 1% FCS przeznaczano do kolejnych badań celem oznaczenia odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+CD4+ i CD3+CD8+ oraz β IgM+. Odsetek wymienionych limfocytów oznaczano także w komórkach mononuklearnych izolowanych ze śledziony. W tym celu pobrane jałowo od badanych indyków (po uprzedniej eutanazji) wycinki śledziony o masie po ok. 0,4 g poddawano indywidualnej homogenizacji za pomocą automatycznego homogenizatora do tkanek (TissueLyser II, Qiagen, Niemcy) w obecności 1 ml medium RPMI-16040 (Sigma-Aldrich, Niemcy) z dodatkiem 5% FCS. Po przesączeniu otrzymanej zawiesiny przez jałowy filtr komórkowy o średnicy oczek 70 μ m (BD Falcon, USA) wyizolowane komórki zawieszano w medium RPMI-1640 z dodatkiem 5% FCS, a liczba komórek w zawiesinie wynosiła 2×10^7 /ml. Następnie 3 ml takiej zawiesiny nawarstwiano

na 3 ml jałowego gradientu Histopaque-1077 o temp. 25°C, używając 15 ml probówek wirowniczych ze stożkowym dnem (BD Falcon, USA), po czym próbki wirowano przy 400 g w temp. pokojowej przez 30 min z wyłączoną funkcją hamowania. Po zakończonym wirowaniu – delikatnie zbierano powstały kożuszek komórek mononuklearnych do jałowych probówek, płukano w PBS z dodatkiem 5% FCS, a następnie zawieszano w 1 ml PBS. Wyizolowane komórki liczone za pomocą automatycznego licznika komórek Vi-Cell (Beckman Coulter, USA) i przeznaczano do kolejnych badań.

W celu oznaczenia odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+CD4+ i CD3+CD8+ z zawiesiny wyizolowanych komórek mononuklearnych krwi i śledziona pobierano 1×10^6 i przenoszono indywidualnie do komórek cytometrycznych (BD, USA), po czym do każdej z nich dodawano zalecaną przez producenta (AbD Serortec, Anglia) objętość przeciwciał monoklonalnych skierowanych na odpowiednie epitopy domen powierzchniowych receptorów CD4 (Mouse Anti Chicken CD4-FITC, klon 2–35) i CD8 (Mouse Anti Chicken CD8A-PE, klon 11–39) limfocytów T. Po inkubacji, płukaniu w PBS i wirowaniu powstałe pelety traktowano 100 μ l medium utrwalającego (Reagent A, Leucoperm, AbD Serotec, Anglia). Następnie po inkubacji, płukaniu i wirowaniu zlewano supernatant, a komórki zawieszano w 100 μ l medium do permeabilizacji (Reagent B, Leucoperm, AbD Serotec, Anglia) i dodawano po 10 μ l przeciwciał monoklonalnych skierowanych na wewnętrzplazmatyczny fragment łańcucha epsilon receptora CD3 (Rot Anti Human CD3-APC, klon CD3-12). Po dokładnym mieszaniu próbek na vortexie, inkubowaniu, wirowaniu i zlanie supernatantu komórki zawieszono w 400 μ l PBS i badano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II (BD, USA).

W celu oznaczenia odsetka subpopulacji limfocytów B IgM⁺ w krwi i w śledzionie wyizolowane komórki mononuklearne przenoszono indywidualnie do probówek cytometrycznych (BD, USA), po czym do każdej z probówek dodawano zalecaną przez producenta (AbD Serortec, Anglia) objętość przeciwciał poliklonalnych (Goat Anti Chicken IgM-FITC). Po inkubacji, płukaniu i wirowaniu powstałe pellety zawieszano w 400 μ l PBS i badano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II (BD, USA).

Wyniki doświadczeń opracowano statystycznie w programie Statistica PC, stosując metody opisowe oraz test nieparametryczny dla prób niezależnych U Manna-Whitneya. Za statystycznie istotne uznano różnice na poziomie $p \leq 0,1$ a za wysoce istotne przy poziomie $p \leq 0,05$.

Wyniki i ich omówienie

Procentowy udział subpopulacji limfocytów T CD3+CD4+ i CD3CD8+ oraz B IgM⁺ we krwi obwodowej indyków i w śledzionie przedstawiono odpowiednio

Tabela 1. Procentowy udział limfocytów T i B w krwi indyków po podaniu oksytetracykliny (oksy)(n=7)

| Badane limfocyty | Po 5 dniach podawania oksy | | Po 6 dniach od zakończenia podawania oksy | | Analiza statystyczna między grupami doświadczalnymi |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| | Grupa kontrolna* | Grupa doświadczalna | Grupa kontrolna | Grupa doświadczalna | |
| T CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 19,34 7,26, 37,56 | 16,05 5,28 32,88 | 13,97 4,59 32,84 | 15,44 3,09 19,98 | U=31; p<0,9581 |
| | U=22; p=0,3184 | | U=23; p=0,3720 | | |
| T CD3 ⁺ CD8 ⁺ | 2,54 0,94 37,06 | 2,26 1,19 52,56 | 1,69 0,41 24,11 | 1,38 0,47 34,18 | U=15; p<0,1** |
| | U=22; p=0,3184 | | U=16; p=0,1000** | | |
| B IgM ⁺ | 6,39 0,57 8,87 | 6,37 2,27 35,64 | 5,55 1,56 28,13 | 4,68 1,05 22,34 | U=15; p<0,1** |
| | U=27; p=0,6365 | | U=19; p=0,1893 | | |

Objaśnienia: * Dane liczbowe w kolejności: [X] – średnia; [s] – odchylenie standardowe; [V] – współczynnik zmienności (%); U, p – wyniki testowania; ** różnica statystycznie istotna

Tabela 2. Procentowy udział limfocytów T i B w śledzionie indyków po podaniu oksytetracykliny (oksy)(n=7)

| Badane limfocyty | Po 5 dniach podawania oksy | | Po 6 dniach od zakończenia podawania oksy | | Analiza statystyczna między grupami doświadczalnymi |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| | Grupa kontrolna* | Grupa doświadczalna | Grupa kontrolna | Grupa doświadczalna | |
| T CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 42,14 6,56 15,57 | 41,29 8,57 20,75 | 28,83 3,54 12,29 | 31,19 4,61 14,78 | U=10; p<0,05** |
| | U=32; p=1,0000 | | U=20; p=0,3720 | | |
| T CD3 ⁺ CD8 ⁺ | 30,87 7,98 25,84 | 27,36 5,96 21,79 | 35,67 3,59 10,07 | 24,94 7,28 29,20 | U=25; p=0,4948 |
| | U=22; p=0,3184 | | U=8; p<0,05** | | |
| B IgM ⁺ | 20,95 3,75 17,91 | 19,60 5,55 28,29 | 29,39 5,77 19,63 | 32,75 3,04 9,28 | U=0; p<0,05** |
| | U=26; p=0,5796 | | U=18; p=0,1562 | | |

Objaśnienia: * jak w tabeli 1.

w tabelach 1 i 2. Z danych tych tabel wynika, że oksytetracyklina stosowana u indyków w dawce 0,5 g na 1 litr wody przez 5 dni nie miała istotnego wpływu na odsetek subpopulacji limfocytów T CD3+CD4+. Natomiast wykazano, że po 6 dniach od zakończenia podawania oksytetracykliny zarówno we krwi, jak i w śledzionie indyków następuje spadek odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+CD8+. Świadczy to niewątpliwie o upośledzeniu zjawisk odpornościowych, gdyż główną funkcją tych limfocytów cytotoksycznych jest zabijanie komórek zakażonych mikroorganizmami oraz nowotworowych [14]. Wzrost odsetka subpopulacji limfocytów B IgM⁺ w śledzionie w grupie indyków otrzymujących oksytetracyklinę po 6 dniach od zakończenia jej podawania przy jednoczesnym spadku odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+CD4+ dowodzi, że oksytetracyklina stosowana *per os* w dawce 0,5 g na 1 litr wody przez 5 dni powoduje poważne zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego u indyków.

W świetle powyższego należy stwierdzić, że oksytetracyklina stosowana u indyków w dawce leczniczej ma istotny wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego, czego dowodem jest wykazany odsetek subpopulacji limfocytów T i B IgM⁺ w krwi i w śledzionie wskazujący na immunosupresyjne oddziaływanie tego antybiotyku na komórkowe mechanizmy układu odpornościowego. Konsekwencją immunosupresji po podaniu oksytetracykliny może być wystąpienie chorób na tle zakażeń drobnoustrojami oportunistycznymi, jak np. pałeczkami *E. coli* czy gorsza odporność poszczepienna.

Piśmiennictwo

- [1] Al-Ankari A.S., Homeida A.M., 1996. Effect of antibacterial growth promoters on the immune system of broiler chicks. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 53, 277–283.
- [2] Arstila T.P., Vainio O., Lassila O., 1994. Central role of CD4⁺ T cells in avian immune response. *Poult. Sci.*, 73, 1019–1026.
- [3] Balakrishnan G., Mini M., 2001. Plasmid profile and antibiotic resistance pattern of *Pasteurella multocida* of avian origin. *Indian Vet. J.*, 78, 783–786.
- [4] Chopra I., Howe T.G.B., 1978. Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microb. Rev.*, 42, 707–724.
- [5] Degen W.G., Daal N., Rothwell L., Kaiser P., Schijns V.E., 2005. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet. Microbiol.*, 105, 163–167.
- [6] Elferink J.G.R., Deierkauf M., 1984. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte functions by chlortetracycline. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 3667–3673.
- [7] Grondel J.L., Angenent G.C., Egberts E., 1985. The influence of antibiotics on the immune system. III. Investigations on the cellular functions of chicken leukocytes in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 10, 307–16.
- [8] Hryniewicz W., Meszaros J., 2001. *Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń*. PZWL, Warszawa.

- [9] Hui A.K., Das R., 2001. Studies on isolation, serotyping and antibiotic sensitivity of *Salmonella* isolated from ducks. *Indian Vet. J.*, 78, 1058–1059.
- [10] Ibrahim R.S., Ibtihal M.M., Soliman A.M., 2001. Clostridial infection in chickens “studying the pathogenicity” and evaluation of the effect of some growth promotors on broiler performance. *Aust. Vet. Med. J.*, 45, 252–267.
- [11] Kelly B.J., Ghazikhanian G.Y., Mayeda B., 1986. Clinical outbreak of *Bordetella avium* infection in two turkey breeder flocks. *Avian Dis.*, 30, 234–237.
- [12] Labro M.T., 1998. Antibacterial agents-phagocytes: new concepts for old in immunomodulation. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 10, 11–21.
- [13] Panigrahy B., Grumbles L.C., Millar D., Naqi S.A., Hall C.F., 1979. Antibiotic-induced immunosuppression and levamisole-induced immunopotentiality in turkeys. *Avian Dis.*, 23, 401–408.
- [14] Schultz U., Magor K.E., 2008. Comparative immunology of agricultural birds [in:] Davison F., Kaspers B., Schat K.A. (red.): *Avian Immunology*. Academic Press (imprint of Elsevier), UK, 395–420.
- [15] Shapira L., Soskolne W.A., Houry Y., Barak V., Halabi A., Stabholz A., 1996. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infect. Immun.*, 64, 825–828.
- [16] Sugimoto A., Nakagava H., 2001. Characteristics of *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen isolated from wild pigeons. *J. Vet. Med., Japan*, 54, 22–26.
- [17] Świtała M., 1993. Wpływ antybiotyków na odporność. *Materiały VII Symp. Drob., Polanica Zdrój 29.09.–1.10.1993*, 144–148.
- [18] Wang J.M., Dan G.Q., Cao T.X., 1994. Drug sensitivity test of *Mycoplasma synoviae* from chickens. *Chinese J. Vet. Sci. Tech.*, 24, 24, 1–25.

Możliwości zastosowania immunomodulatorów we wspomaganiu terapii chorób bakteryjnych drobiu wywołanych przez szczepy odporne na antybiotyki

The possibilities of immunomodulators application in supporting treatment of bacterial diseases caused by antibiotic resistant germs

Wprowadzenie do leczenia antybiotyków i chemioterapeutyków oraz kolejne lata powszechnego ich stosowania spowodowało powstanie zjawiska oporności drobnoustrojów na te leki. Przyczyny narastania lekooporności bakterii są wielorakie. Przez wiele lat nadużywano antybiotyków w terapii i profilaktyce, stosowano je, a w wielu krajach nadal się stosuje w chowie zwierząt jako stymulatory wzrostu dodawane do paszy i środki ochrony roślin w rolnictwie, a w przemyśle spożywczym jako czynniki konserwujące. W stadach ptaków utrzymywanych systemem wielkotowarowym lekarze weterynarii coraz rzadziej spotykają klasyczne jednostki chorobowe wywołane przez jeden gatunek bakterii, a najczęściej obserwowane są tzw. zespoły chorobowe

powodowane kilkoma współdziałającymi ze sobą patogenami (np. wirusy + bakterie) i oddziałującymi niekorzystnie na organizm czynnikami niezakaźnymi (warunki środowiskowe, żywienie, stres). Zakażenia tego typu mają ciężki przebieg, trudno się je leczy i powodują poważne straty ekonomiczne dla hodowcy drobiu. Leczenie zespołów chorobowych polega zazwyczaj na stosowaniu chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych przez 5–7 dni, których efektem działania jest zahamowanie wzrostu i namnażania lub zabicie czynnika patogennego. Leki przeciwbakteryjne redukują obciążenie infekcyjne, co ogranicza możliwość i częstość wystąpienia groźnych dla życia powikłań oraz przynosi doraźną poprawę w terapii chorób zakaźnych. Szerokie i czasami nieracjonalne stosowanie antybiotyków, bez wcześniejszego wykrycia czynnika etiologicznego i sprawdzenia jego wrażliwości na chemioterapeutyki, wywiera niekorzystny wpływ na układ immunologiczny, prowadzi także do eliminacji flory fizjologicznej i często kończy się niepowodzeniem terapii. Endogenna mikroflora bakteryjna przewodu pokarmowego stanowi bowiem czynnik ograniczający kolonizację szczepami bakterii chorobotwórczych lub względnie chorobotwórczych. Jest ona również źródłem endogennych substancji wpływających na wzrost i rozwój tkanki limfatycznej jelit (GALT) oraz całego układu immunologicznego gospodarza. Z najnowszych badań wynika, że obecne w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt beztlenowe gatunki bakterii (*Clostridium sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Propionibacterium sp.*) syntetyzują i uwalniają niskocząsteczkowe substancje o charakterze peptydowym oraz polisacharydowym. Ze względu na niski ciężar cząsteczkowy te endogenne peptydy mogą przechodzić przez barierę śluzówkową jelita i po dostaniu się do krwi kontaktują się z komórkami immunokompetentnymi, np. limfocytami T w narządach limfatycznych, indukując procesy ich różnicowania, dojrzewania i proliferacji [8, 12].

Wyzdrowienie ptaków zależy jednak w dużej mierze od sprawności układu immunologicznego w trakcie leczenia, którego mechanizmy są często upośledzone w wyniku poprzedniego bądź trwającego zakażenia patogenami immunosupresyjnymi (np. wirusami choroby Gumboro, krwotocznego zapalenia jelit) i/lub błędami w technologii chowu [10, 19]. Z prawidłową funkcją tego układu związana jest bowiem ostateczna eliminacja drobnoustrojów chorobotwórczych i wytworzonych przez nie toksyn, stymulacja procesów naprawczych w uszkodzonych tkankach, a także ochrona przed ponownym zakażeniem. Dlatego też skutecznie działający lek przeciwbakteryjny powinien być sprzymierzeńcem dla układu odpornościowego w walce z intensywnie namnażającą się populacją bakterii chorobotwórczych i/lub względnie chorobotwórczych. Przewlekłe i nawracające zakażenia bakteryjne u drobiu, np. ornitobakterioza, stanowią dziś poważny problem terapeutyczny, a możliwości opanowania tych infekcji za pomocą antybiotyków i chemioterapeutyków wobec narastającej oporności drobnoustrojów są niewystarczające. W przypadku takich infekcji spowodowanych przez szczepy bakterii

oporne na chemioterapeutyki immunomodulacja może być skuteczną metodą wspomagania leczenia zasadniczego.

Obecny stan wiedzy wskazuje, że również niektóre grupy leków przeciwbakteryjnych mogą w sposób istotny hamować kluczowe mechanizmy obronne organizmu, powodując, że powtarzająca się antybiotykoterapia przyczynia się do wystąpienia wtórnych niedoborów immunologicznych, następstwem czego jest zwiększenie podatności organizmu na kolejne infekcje [14]. Leki te modulują aktywność leukocytów i makrofagów przez zmianę ich funkcji w procesach migracji, fagocytozy, zabijania drobnoustrojów oraz wytwarzania wolnych rodników i wydzielania cytokin [6]. Ponadto potrafią one istotnie wpłynąć na biologię patogenów na skutek modyfikacji ich metabolizmu, morfologii oraz represji lub indukcji syntezy czynników wirulencji. Wiadomym jest, że przewlekłe, nawracające czy też oportunistyczne zakażenia bakteryjne należą do zespołu klinicznych przypadków obniżonej sprawności układu immunologicznego organizmu wobec czynnika infekcyjnego. Zarówno badania doświadczalne, jak i kliniczne wykazały, że istnieje związek przyczynowy pomiędzy rozwijającą się niewydolnością układu immunologicznego a stosowaniem niektórych chemioterapeutyków i antybiotyków, zwłaszcza z grupy aminoglikozydów, tetracyklin czy też sulfonamidów. Liczne badania z jednej strony potwierdziły niekorzystny wpływ niektórych grup antybiotyków na układ immunologiczny gospodarza, chociaż udokumentowano również, że stosowanie antybiotyków z grupy makrolidów, linkosamidów i chinolonów w dawkach terapeutycznych prowadzi do wystąpienia efektu synergizmu z systemem immunologicznym gospodarza, co manifestuje się nasileniem aktywności bakteriobójczej komórek fagocytarnych lub też uwrażliwieniem czynnika infekcyjnego na działanie antybiotyku. Immunotropowe działanie niektórych grup chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych wynika przede wszystkim z ich zdolności do przenikania do wnętrza komórek immunokompetentnych lub też łączenia się z receptorami obecnymi na błonie danej komórki, w efekcie czego dochodzić może do zmiany ich aktywności. Antybiotyki z grupy aminoglikozydów i tetracyklin wywierają bezpośredni wpływ na aktywność neutrofilów, obniżając ich zdolności fagocytarne, bójcze i chemotaktyczne. Obie grupy antybiotyków hamują również aktywność proliferacyjną limfocytów T oraz zmniejszają zdolność tych komórek do syntezy i uwalniania niektórych cytokin (IL-2 i IFN- γ). Obecnie wiadomo, że antybiotyki mogą też w sposób pośredni wpływać na funkcję komórek immunokompetentnych poprzez niszczenie mikroflory bakteryjnej przewodu pokarmowego. Ponadto, patogenne dla człowieka i zwierząt drobnoustroje wykazują zdolność hamowania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez uwalnianie lub indukowanie w jego komórkach czynników wykazujących bezpośrednie działanie immunosupresyjne, co może prowadzić do nasilenia immunosupresji wywołanej podaniem chemioterapeutyku hamującego aktywność

populacji komórek biorących udział w likwidacji zakażenia. Dlatego też korzystne efekty w terapii infekcji bakteryjnych uzyskuje się, stosując immunomodulatory jednocześnie z chemioterapeutykami przeciwbakteryjnymi. Należy oczekiwać, że po podaniu immunomodulatora ograniczenie lub wyeliminowanie niedomogi układu odpornościowego, będącej skutkiem nawet najbardziej efektywnej chemioterapii przeciwbakteryjnej, przyspieszy proces zdrowienia oraz zminimalizuje niebezpieczeństwo wystąpienia zakażeń wtórnych. Lek immunomodulujący podany łącznie z chemioterapeutyką przeciwbakteryjną prowadzi w sposób istotny do poprawy efektywności leczenia schorzeń bakteryjnych oraz przeciwdziała jednemu z niepożądanych skutków chemioterapii, którym może być upośledzenie sprawności układu immunologicznego.

Pomimo intensywnych badań nad nowymi chemioterapeutykami skutecznymi w leczeniu infekcji wprowadzenie do lecznictwa każdego nowego leku przeciwbakteryjnego powoduje natychmiast wytworzenie przez drobnoustroje mechanizmów oporności na ten lek. Zjawisko to dotyczy w większej mierze bakterii tlenowych, ponieważ wrażliwość na antybiotyki bakterii beztlenowych jest bardziej stabilna, a liczba preparatów aktywnych wobec tych drobnoustrojów jest nadal dość wysoka. Dotychczas największą przeszkodą w stosowaniu przeciwbakteryjnej immunoterapii był brak precyzyjnych wiadomości na temat mechanizmów odpowiedzi immunologicznej w przypadku stosowania tych preparatów. Wobec nowatorskich badań nad wykorzystaniem immunomodulacji w leczeniu zakażeń oportunistycznych wydaje się, że po wieku XX, który w medycynie był niewątpliwie erą antybiotyków, wiek XXI może stać się erą immunoterapii i immunomodulacji, a stosowane dotychczas jako tarcza szczepionki mogą stać się mieczem w walce z infekcjami bakteryjnymi.

Immunomodulatory nie są jeszcze powszechnie stosowane w medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza w awiopatologii, gdyż ich stosowanie niesie za sobą szereg problemów. Używanie immunomodulatorów musi pociągać za sobą konieczność ustalenia metod standaryzacyjnych oraz odpowiedzi na pytania dotyczące ich skuteczności i bezpieczeństwa. Związana z tym problematyka dotyczy określenia leczniczych modyfikacji wprowadzanych do układu immunologicznego zarówno na poziomie całego organizmu, jak i na poziomie komórkowym w przebiegu choroby. Ważna jest świadomość niebezpieczeństw związanych z nadmierną stymulacją lub supresją, czy też pojawianiem się odczynów alergicznych. Wciąż do końca nie są znane skutki profilaktycznego stosowania tej grupy leków, a mechanizm ich działania nie jest do końca wyjaśniony i niezbadany w warunkach klinicznych. Na ogół działanie immunostymulujące jest jedynie fragmentem ich działania biologicznego. Niektóre z czynników działają zarówno stymulująco, jak i hamująco na odpowiedź immunologiczną, co zależy między innymi od wielkości dawki, schematu stosowania, drogi podania, układu badawczego (*in vitro*, *in vivo*), statusu od-

pornościowego organizmu czy gatunku ptaka [16, 20]. Z tego też względu niektóre z immunomodulatorów nie będą *sensu stricto* stymulowały mechanizmów immunologicznych, lecz przywracały ich osłabioną reaktywność do normy. Środki immunostymulujące są stosowane zarówno wtedy, gdy układ odpornościowy działa normalnie, np. w immunoprofilaktyce swoistej jako adiuwanty w celu wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej na podany antygen szczepionkowy, jak i w stanach osłabienia określonej jego funkcji, np. w okresie rekonwalescencji. W różnych stanach chorobowych podaje się preparaty lecznicze albo hamujące reaktywność immunologiczną, czyli immunosupresyjne, albo stymulujące tę reaktywność. Leki immunosupresyjne stosuje się najczęściej u biorców przeszczepów allogenicznym i są powszechnie stosowane w medycynie ludzkiej, natomiast w terapii chorób ptaków są używane bardzo rzadko i właściwie tylko u towarzyszących ptaków ozdobnych. Pewnym paradoksem jest fakt, że mimo częstego używania ptaków w badaniach nad oddziaływaniem immunomodulatorów na organizm i szerokim stosowaniem tych preparatów w różnych gałęziach produkcji zwierzęcej, u drobiu ich zastosowanie jest minimalne lub znikome. Należy jednak podkreślić, że immunomodulacja nie znajduje powszechnego wykorzystania w wielkotowarowym chowie drobiu z kilku istotnych powodów. Po pierwsze, immunomodulatory stosowane w warunkach chowu wielkotowarowego nie zawsze dają pozytywne efekty, ponieważ mogą prowadzić do zwiększenia lub zmniejszenia aktywności układu odpornościowego. Efekt ich działania zależy bowiem od wielu różnych czynników. Należy zatem podchodzić indywidualnie do każdego stada ptaków, uwzględniając jego aktualny stan fizjologiczny, warunki chowu, żywienia oraz status immunologiczny. Po drugie, większość immunomodulatorów należy stosować w formie iniekcji, co jest bardzo kłopotliwe w masowym chowie drobiu. Po trzecie, indyki, kury i inne gatunki drobiu żyją bardzo krótko w porównaniu np. z psami czy kotami. I po czwarte, brak jest jednoznacznych danych wskazujących na najbardziej skuteczne, a jednocześnie tanie i bezpieczne immunomodulatory, które mogłyby być stosowane u drobiu. Stanowi to niewątpliwie dość poważną barierę do wprowadzania tych preparatów na szeroką skalę.

Wiele substancji pochodzenia naturalnego, jak i tych syntetycznych, charakteryzuje się pozytywnym oddziaływaniem na układ immunologiczny. W chwili obecnej sporym zainteresowaniem cieszą się preparaty immunostymulujące pochodzenia roślinnego, ze względu na coraz częstsze odchodzenie od antybiotykoterapii i poszukiwanie przez konsumentów produktów ekologicznych. Z powodzeniem stosuje się je w profilaktyce i terapii różnych chorób u ludzi oraz zwierząt [18]. Stwierdzono, że poszczególne zioła wykazują wyraźną swoistość w oddziaływaniu na układ immunologiczny a aktywność immunologiczna preparatów roślinnych lub wyizolowanych z nich substancji wyraża się różnymi efektami, np.: wzmożoną aktywnością fagocytarną makrofagów (*Arnica montana*, *Echinacea spp.*), zwiększeniem liczby

pobudzonych limfocytów T i B (*Echinacea spp.*), zahamowaniem wzrostu implantowanych komórek nowotworowych (*Calandula officinalis*), a niekiedy nawet przeżyciem zwierząt z wszczepionym nowotworem (*Solidago virga-aurea*). Często obserwuje się również indukcję syntezy interferonów (*Plantago lanceolata*, *Echinacea spp.*, *Taraxacum officinale*). Niektóre biologicznie czynne składniki ziół mogą również podnosić aktywność lizozymu we krwi. Do najbardziej znanych i najczęściej stosowanych preparatów roślinnych należą soki i wyciągi wodne z aloesu drzewiastego (*Aloe arborescens*) i różnych gatunków jeżówki (*Echinacea spp.*). Zazwyczaj produkowane są one w postaci preparatów do stosowania *per os*. Ponadto spotyka się postaci do stosowania podskórnego, domięśniowego i zewnętrznego a większość z nich oddziałuje na granulocyty i makrofagi, wzmacniając fagocytozę. Niewiele natomiast wywiera wpływ na różne populacje limfocytów [4].

Spśród immunomodulatorów naturalnych na szczególną uwagę zasługują β -glukany ekstrahowane ze ściany komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i innych gatunków [2, 7]. Są to polisacharydy złożone z licznych cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β -1,3 i 1,6 (z dominującym udziałem wiązań β -1,3). Z tą specyficzną budową, odmienną od β -glukanów występujących w zbożach, wiąże się jego aktywność, przy czym za działanie immunomodulujące odpowiada obecność wiązań typu β -1,3. Pobudzają one w organizmie makrofagi obecne w śluzówce jelit, poprzez łączenie się m.in. z receptorami typu CR3 na ich powierzchni [2, 4]. Jednak najważniejszymi receptorami wydają się być dektyna-1 oraz TLR 2 i TLR 4 [1, 2, 13]. Aktywacja ta, oprócz wzmacniania działania toksycznego makrofagów względem patogenów (fagocytoza, produkcja bakteriocyn, NO), stymuluje je do wytwarzania zwiększonych ilości prozapalnych cytokin i eikozanoidów, takich jak IL-1, TNF- α oraz PGE2, które pobudzają proliferację i aktywność limfocytów T CD4+ i CD8+. Wydzielane następnie przez limfocyty CD4+ interleukiny aktywują komórki NK oraz limfocyty B, zwiększając produkcję przeciwciał, zwłaszcza klasy IgA w jelitach. Powyższe dowodzi, że β -glukany (1,3/1,6) oddziałują na wszystkie, zarówno swoiste, jak i nieswoiste, mechanizmy odpornościowe gospodarza, a stymulowanie komórek APCs do wzmożonego wytwarzania interleukin wskazuje na ich pośrednie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, a nawet przeciwnowotworowe działanie [1, 5, 9, 13]. Na rynku są dostępne gotowe preparaty zawierające β -glukany przeznaczone do stosowania w paszy u drobiu, np. Alphamune G (Alpharma Animal Health) czy przeznaczony dla gołębi Dolfos DG ImmunoDol.

Naturalnym stymulatorem odporności używanym z powodzeniem w terapii zwierząt jest również dimer lizozymu (pozyskany z jaja kurzego i poddany dimeryzacji). Działa on stymulująco u wszystkich kręgowców poprzez pobudzanie fagocytozy, aktywację limfocytów T i B, wzmacnianie syntezy immunoglobulin i wydzielanie cytokin [11, 16]. Badania przeprowadzone na zarodkach kurzych, którym w 10. dobie embriogenezy aplikowano różne dawki preparatu KLP-602

(dimer lizozymu), wykazały pozytywny wpływ tego immunomodulatora na rozwój ich narządów immunokompetentnych i wybrane parametry odporności nieswoistej [11].

W medycynie weterynaryjnej znalazły zastosowanie również immunomodulatory syntetyczne, używane od lat w medycynie ludzkiej.

Lewamizol – lewoizomer tetramizolu jest od dawna znany jako środek przeciwbaczy. Wykorzystany jednak w odpowiedniej dawce wykazuje właściwości immunomodulacyjne, polegające m.in. na: przyspieszaniu dojrzewania limfocytów T z komórek prekursorowych w wyniku podwyższenia w nich poziomu cGMP, wzmaganiu odporności komórkowej poprzez pobudzanie różnicowania się limfocytów T w odpowiedzi na wprowadzony antygen lub mitogen, a także potęgowaniu cytotoksyczności limfocytów T i NK. Ponadto lewamizol normalizuje stosunek limfocytów Th do Treg oraz potęguje produkcję limfokin i IFN, jednocześnie hamując wydzielanie cytokiny supresyjnej SIRS [21]. Niskie dawki lewamizolu (1,5–3,0 mg/kg m.c.) działają immunostymulująco, z kolei wyższe (w tym przeciwbacze) mogą mieć działanie immunosupresyjne, a dawki bardzo wysokie (50 mg/kg kurczę) są bardzo toksyczne i w przypadku zarodków kurzych powodują 100% śmiertelność w 18. dobie inkubacji [17]. Lewamizol nie podnosi wydolności organizmu ponad stan fizjologiczny, lecz normalizuje jego siły obronne w stanie immunosupresji. Przy prawidłowo funkcjonującym układzie immunologicznym wykazuje działanie adiuwancyjne, zwiększając efekt odpowiedzi na antygen [15, 21].

Methizoprinol (izoprynozyna) jest stosowany w medycynie człowieka, w terapii zakażeń wywołanych przez wirusy opryszczki, ospy wietrznej, grypy, świnki, odry, HIV, a także w półpaścu oraz w innych zakażeniach wirusowych o powikłanym przebiegu, zwłaszcza u chorych z obniżoną odpornością. Oprócz tego methizoprinol posiada także właściwości modulujące naturalną odporność organizmu, co nasila jej efekt przeciwwirusowy. Działanie jego polega na potęgowaniu oddziaływania mitogenów w stosunku do limfocytów T i B. Jest on również odpowiedzialny za wzrost liczby komórek T CD4+ oraz podwyższoną syntezę i aktywność IFN- γ [3].

Podsumowując, należy stwierdzić, że immunomodulacja może stanowić nowe, skuteczne narzędzie w łagodzeniu skutków immunosupresji różnego tła u drobiu. Znane immunomodulatory naturalne i syntetyczne takie jak β -glukany, dimer lizozymu, lewamizol czy methizoprinol są skuteczne w stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej u ludzi oraz różnych gatunków zwierząt. Ich wykorzystanie, niezależnie od drogi podania, otwiera nowe możliwości w praktyce weterynaryjnej, zwłaszcza w stadach drobiu utrzymywanych systemem wielkotowarowym i stwarza nadzieję na ograniczenie stosowania chemioterapeutyków i ich racjonalne wykorzystanie oraz przedłużenie ich skutecznego działania w stosunku do chorobotwórczych bakterii, a tym samym na poprawę jakości pozyskiwanych produktów drobiarskich. Na razie jednak naukowcy

i lekarze weterynarii muszą polegać na tym, co jest używane na co dzień, zmagając się z wyważaniem korzyści i działań niepożądanych.

Piśmiennictwo

- [1] Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E., 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina*, 43, 597–606.8
- [2] Chen J., Seviour R., 2007. Medicinal importance of fungal beta-(1->3), (1->6)-glucans. *Mycol. Res.*, 111, 635–652.
- [3] Cillari E., Dieli M., Lo Campo P., Sireci G., Caffarelli A., Maltese E., Millott S., Milano S., Liew F.Y., 1991. Protective effect of isoprinosine in genetically susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Immunology*, 74, 25–30.
- [4] Grela E.R., Sembratowicz I., Czech A., 1998. Immunostymulacyjne działanie ziół. *Med. Wet.*, 54, 152–158.
- [5] Guo Y., Ali R.A., Qureshi M.A., 2003. The influence of beta-glucan on immune responses in broiler chicks. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 25, 461–472.
- [6] Guz K., Bugala-Płoskońska G., 2007. Immunomodulacyjne i przeciwzapalne właściwości wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 61, 828–837.
- [7] Harada T., Miura N., Adachi Y., Nakajima M., Yadomae T., Ohn N., 2002. Effect of SCG, 1,3-beta-D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 931–939.
- [8] Hooper L.V., 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.*, 12, 129–134.
- [9] Jung K., Ha Y., Ha S.K., Han D.U., Kim D.W., Moon W.K., Chae C., 2004. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 51, 72–76.
- [10] Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Śmiałek M., Pestka D., 2012. Effect of infection of turkeys with haemorrhagic enteritis adenovirus isolate on cellular immunity and the course of colibacillosis. *Pol. J. Vet. Sci.*, 15, 215–220.
- [11] Małaczewska J., Rotkiewicz Z., Siwicki A.K., 2003. Effect of Methisoprinol and KLP-602 on the development of immunocompetent organs and selected biochemical indices of the allantoic fluid of chicken embryos. *Pol. J. Vet. Sci.*, 6 (3 Suppl.), 21–24.
- [12] Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L., 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, 107–118.
- [13] Mueller A., Raptis J., Rice P.J., Kalbfleisch J.H., Stout R.D., Ensley H.E., Browder W., Williams D.L., 2000. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology*, 10, 339–346.

- [14] Obmińska-Mrukowicz B., 2007. Znaczenie immunomodulacji w terapii zakażeń bakteryjnych, http://ekspercjweterynaryjni.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=86&Itemid=7
- [15] Singh K.C., Dhawedkar R.G., 1993. Immunomodulating effects of levamisole in chicks immunocompromised by infectious bursal disease virus. *Trop Anim Health Prod.* 25, 11–14.
- [16] Stenzel T., Tykałowski B., Śmiałek M., Kwiatkowska-Stenzel A., Koncicki A., 2011. Effect of different immunomodulators on the percentage of the CD4+ and CD8+ T lymphocytes and the antibody titres in pigeons immunised against PPMV-1. *Med. Wet.*, 67, 254–257.
- [17] Szeleszczuk P., Karpińska E., Bielecki W., Borzemska W., Kosowska G., 2003. Evaluation of chosen immunomodulators toxicity for chicken embryos and one-day-old chicks. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 47, 411–417.
- [18] Świątkiewicz S., Koreleski J., 2007. Dodatki paszowe o działaniu immunomodulacyjnym w żywieniu drobiu. *Med. Wet.*, 63, 1291–1295.
- [19] Tykałowski B., Stenzel T., Mazur-Lech B., Koncicki A., 2010. Niski poziom dobrostanu jako główna przyczyna występowania problemów zdrowotnych na fermach drobiu. *Polskie Drobiarstwo, Suplement Zdrowie*, 32–36.
- [20] Tykałowski B., 2012. Wpływ methizoprinolu i β -glukanów na wybrane parametry odporności nieswoistej oraz na przebieg zakażenia adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV) u indyków. Praca doktorska, UWM Olsztyn.
- [21] Wójcik R., Świącicka-Grabowska G., 2003. Parametry biochemiczne oraz odporności nieswoistej u indyków uodpornionych szczepem Roakin wirusa NDV po podaniu lewamizolu lub izoprynozyiny. *Med. Wet.*, 59, 713–717.

Wrażliwość *Mycoplasma synoviae* na antybiotyki

Sensitivity of *Mycoplasma synoviae* on antibiotics

Analiza częstości występowania zakażeń *Mycoplasma synoviae* (MS) oparta jest głównie na monitoringu serologicznym wskazującym na wzrastającą rolę tej mykoplazmy w patologii drobiu, głównie u kur ras mięsnych, ale ostatnio u niosek ras lekkich (towarowych). W częstych przypadkach MS jest jedynym czynnikiem etiologicznym zakażenia i skutkuje zwykle chronicznym zapaleniem błony śluzowej stawów i pochewek ścięgniowych, szczególnie po dostopowym zakażeniu [1, 6]. Niezwykle ważnym aspektem w świetle literatury i ostatnich badań wykonanych w kraju może być ewolucja w patogenezie MS do układu rozrodczego kury, w tym do środkowego i końcowego odcinka jajowodu. Najczęściej zakażenia MS mają charakter utajonych, a objawy kliniczne zwykle obserwowane są po osiągnięciu przez ptaki dojrzałości płciowej. Swoiste dla MS zmiany patologiczne błony śluzowej jajowodu prowadzą prawdopodobnie do jej dysfunkcji, utrudniając proces migracji plemników do miejsca zapłodnienia i formułowanie poszczególnych frakcji jaja (w tym skorupy). Defekty w budowie skorupy stożka jaja przy komorze powietrznej, określone jako zespół anomalii wierzchołka skorupy jaja (ang. Egg Apical Abnormality-EAA), były w ostatnim czasie opisywane przez niektórych autorów [4, 5, 8]. Dotychczas w wielu krajach mimo obecności zarazka w organizmie ptaków czy też wskazań na kontakt z zakażeniem przez dodatnie wyniki badań serologicznych zakażenia MS uważano za marginalne i nie wprowadzano konieczności monitorowania tych zakażeń u drobiu jako niemających wpływu na ich zdrowotność. W badaniach własnych zarówno od kur niosek z problemami

w reprodukcji i budowie jaj, ale także ze stad klinicznie zdrowych wykazano wzrastającą tendencję zakażeń MS szczególnie w latach 2011–2012 i utrzymującą się w pierwszych miesiącach 2013 r. [7].

Mykoplazmy należą do klasy Mollicutes (łac. mollis – miękki, cutis – skóra); charakteryzuje je brak typowej dla bakterii ściany komórkowej (posiadają jedynie trójwarstwową błonę protoplazmatyczną), co sprawia, że są odporne na działanie niektórych antybiotyków, np. penicyliny, a równocześnie cechuje je wrażliwość na niezbyt liczną grupę antybiotyków stosowanych w terapii drobiu.

Celem podjętych prac było określenie *in vitro* wrażliwości/oporności wyizolowanych i zidentyfikowanych gatunkowo szczepów MS od kur niosek zarówno z problemami zdrowotnymi ze strony układu rozrodczego, jak i ze stad klinicznie zdrowych.

Materiał i metody

Do badań wstępnych wybrano szczepy MS: F203/13 ze stada z problemami w budowie skorupy jaj oraz F197/12 ze stada bez objawów klinicznych, a także szczep referencyjny MS. Szczepy terenowe uzyskano, badając wymazy pobrane ze szczeliny podniebiennej ptaków, jaja lub zamarłe zarodki (po 60 próbek każdego rodzaju ze stada) metodami: mikrobiologiczną (uzyskanie wzrostu mykoplazm niezbędnych do określenia antybiotykogramu) i real time PCR (identyfikacja gatunku *Mycoplasma synoviae*) [2]. Użyto płynnych podłoży PPLO i podłoża agarowego PPLO według Freya [3]. Skład podłoża modyfikowano według wymagań wzrostowych charakterystycznych dla MS (podłoża zawierającego surowicę świńską i glukozę). Podłoże płynne zawierało w swoim składzie dodatkowo roztwór wskaźnika barwnego (czerwień fenolowa), którego zmiana wskazywała na wzrost MS w podłożu – szczepy MS w czasie wzrostu zmieniały zabarwienie podłoża z czerwonego na żółte (spadek pH), a namnażając się, powodowały równocześnie wzrost gęstości posianych podłoży (wyższą wartość ekstynkcji) OD. Posiane kultury bulionowe inkubowano w 37°C przez 7 dni, codziennie obserwując zmianę wskaźnika barwnego. Po uzyskaniu wzrostu mykoplazm na podłożu płynnym określano w hodowli ich koncentrację (CFU), w tym celu wykonano szereg rozcieńczeń hodowli obydwu szczepów od 10¹ do 10⁸, posiewano na podłoże agarowe metodą kropli spływającej, po czym inkubowano w warunkach mikroaerofilnych (dodatek 5% CO₂) w zamkniętym naczyniu w temperaturze 37°C przez kolejne 7 dni, codziennie oglądając pod mikroskopem celem potwierdzenia obecności kolonii mykoplazm. Do oznaczeń antybiotykogramowych wybrano rozcieńczenie o mianie 10⁴ CFU/ml. Minimalną koncentrację hamującą wzrost MS wykonano metodą Metabolic Inhibition Test (MIT) według metodyki Bebear i wsp. [3]. Badania te wykonano na płytkach firmy Statens Veterinarmedicinska Anstalt opłaszczonych antybiotykami w róż-

nej koncentracji, w tym: tiamuliną – koncentracja od 0,063–8 µg/ml, valnemuliną – odpowiednio 0,125–4 µg/ml, doxycykliną – 0,125–16 µg/ml, linkomycyną – 0,5–64 µg/ml, tylozyną – 2–128 µg/ml i ampicyliną – 0,5–32 µg/ml. Do baseników opłaszczonych poszczególnymi koncentracjami antybiotyków наносono po 0,5 ml bulionu PPLO MS i 0,01 ml hodowli badanego szczepu. Kontrolę ujemną stanowił bulion PPLO, a dodatnią hodowla bulionowa szczepu referencyjnego MS – naniezione do baseników nieopłaszczonych żadnym antybiotykiem. Płytki inkubowano w termostacie (temperatura 37°C) przez 72 godz. i obserwowano zmianę zabarwienia podłoża. Po tym czasie dokonywano odczytu wizualnego (tab. 1 i 2), a dodatkowo z każdego basenika pobierano po 0,2 ml hodowli, przenoszono do baseników czystej mikropłytki w analogicznym układzie jak na płycie z antybiotykami i dokonywano odczytu ekstynkcji przy użyciu czytnika przy długości fali 405 nm (tab. 3 i 4).

Tabela 1. Wyniki antybiotykoqramu szczepu 197/12 *Mycoplasma synoviae* wyrażone w ug/ml* podłoża płynnego

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|----------------|----|----|-----|------|-------|-------|-------|
| A | Tiamulin 8* | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,063 |
| B | Valnemulin 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,063 | 0,031 |
| C | Doxycykline 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 |
| D | Lincomycin 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 |
| E | Tylosin 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | K+ |
| F | Ampicillin 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | K- |

Tabela 2. Wyniki antybiotykoqramu szczepu 203/13 *Mycoplasma synoviae* wyrażone w ug/ml* podłoża płynnego

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|----------------|----|----|-----|------|-------|-------|-------|
| A | Tiamulin 8* | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,063 |
| B | Valnemulin 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,063 | 0,031 |
| C | Doxycykline 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 |
| D | Lincomycin 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 |
| E | Tylosin 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | K+ |
| F | Ampicillin 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | K- |

Tabela 3. Wartości OD* hodowli bulionowej i wyniki antybiotykoqramu szczepu 197/12 *Mycoplasma synoviae* wyrażone w ug/ml podłoża płynnego**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|----------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|----------------|----------------|----------------------|
| A | Tiamulin 0,321* 8** | 0,303 4 | 0,306 2 | 0,322 1 | 0,404 0,5 | 0,518 0,25 | 0,607 0,125 | 0,427 0,063 |
| B | Valnemulin 0,304 4 | 0,293 2 | 0,292 1 | 0,347 0,5 | 0,389 0,25 | 0,415 0,125 | 0,463 0,063 | 0,436 0,031 |
| C | Doxycykline 0,351 16 | 0,306 8 | 0,296 4 | 0,305 2 | 0,380 1 | 0,374 0,5 | 0,418 0,25 | 0,458 0,125 |
| D | Lincomycin 0,306 64 | 0,299 32 | 0,333 16 | 0,352 8 | 0,337 4 | 0,370 2 | 0,413 1 | 0,462 0,5 |
| E | Tylosin 0,313 128 | 0,305 64 | 0,306 32 | 0,305 16 | 0,311 8 | 0,302 4 | 0,309 2 | K+ 0,420 0,426 |
| F | Ampicillin 0,585 32 | 0,413 16 | 0,412 8 | 0,410 4 | 0,415 2 | 0,394 1 | 0,395 0,5 | K- 0,330 0,327 |

Tabela 4. Wartości OD* hodowli bulionowej i wyniki antybiotykoqramu szczepu 203/13 *Mycoplasma synoviae* wyrażone w ug/ml podłoża płynnego**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|----------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|----------------|----------------|----------------------|
| A | Tiamulin 0,393* 8** | 0,380 4 | 0,374 2 | 0,358 1 | 0,359 0,5 | 0,412 0,25 | 0,521 0,125 | 0,495 0,063 |
| B | Valnemulin 0,331 4 | 0,332 2 | 0,325 1 | 0,506 0,5 | 0,549 0,25 | 0,518 0,125 | 0,561 0,063 | 0,539 0,031 |
| C | Doxycykline 0,385 16 | 0,362 8 | 0,444 4 | 0,477 2 | 0,523 1 | 0,637 0,5 | 0,564 0,25 | 0,488 0,125 |
| D | Lincomycin 0,376 64 | 0,376 32 | 0,427 16 | 0,443 8 | 0,466 4 | 0,485 2 | 0,527 1 | 0,467 0,5 |
| E | Tylosin 0,371 128 | 0,359 64 | 0,379 32 | 0,413 16 | 0,402 8 | 0,389 4 | 0,379 2 | K+ 0,703 0,423 |

| | | | | | | | | |
|---|---------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|--------------|----------------------|
| F | Ampicillin 0,481 32 | 0,463 16 | 0,511 8 | 0,415 4 | 0,441 2 | 0,437 1 | 0,487 0,5 | K- 0,387 0,375 |
|---|---------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|--------------|----------------------|

Wyniki i omówienie

Analizując zmianę wskaźnika barwnego hodowli (barwa od czerwonej – brak wzrostu szczepu, poprzez różową – słaby wzrost, do żółtej – oznaczającej brak hamowania i potencjalny wzrost mykoplazm) badanych szczepów w poszczególnych koncentracjach antybiotyków, wykazano, że obydwa badane szczepy były w pełni wrażliwe na tylozynę we wszystkich koncentracjach i zupełnie niewrażliwe na ampicillinę, co wynika z ogólnej cechy mykoplazm w odniesieniu do tej ostatniej. Natomiast na tiamulinę obydwa szczepy wykazały identyczną wrażliwość, tj. pełną wrażliwość w koncentracji 1 µg/ml i powyżej oraz wynik wątpliwy w koncentracji 0,25 µg/ml. Z kolei w odniesieniu do doksycykliny szczep F203/13 różnił się nieznacznie o jedną koncentrację tego leku w stosunku do szczepu F197/12, która wynosiła odpowiednio: 2 i 4 µg/ml (pełna wrażliwość) i 2 µg/ml jako wątpliwy dla szczepu F197/12. Podobnie w stosunku do valnemuliny wzrost szczepu F203/13 był w pełni hamowany przy koncentracji 1 µg/ml, podczas gdy zahamowanie wzrostu szczepu F197/12 następowało już przy 0,25 µg/ml, a wynik wątpliwy uzyskano przy 0,5 µg/ml. Największą różnicę w wrażliwości szczepów stwierdzono w odniesieniu do linkomycyny, gdzie hamowanie wzrostu szczepu F203/13 wymagało wysokiej koncentracji 32 µg/ml, podczas gdy szczep F197/12 był już wrażliwy na koncentrację tego leku wynoszącą tylko 4 µg/ml (tab. 1 i 2). Potwierdzeniem wyników uzyskanych w teście MIT (metoda barwna wizualizacji wzrostu mykoplazm w podłożu) był pomiar ekstynkcji, który wykonano z użyciem czytnika przy długości fali 405 nm. Wykazano, że zahamowanie metabolizmu (wzrostu szczepu) przekładało się na niższe wartości OD i były one skolerowane z odpowiednią koncentracją leku w danym baseniku płytek antybiotykogramowych. Najwyższe wartości OD (0,420) stwierdzono w kontroli dodatniej (wzrost szczepu referencyjnego), natomiast odpowiednio niższe w kontroli ujemnej (0,330) i w basenikach gdzie nastąpiło zahamowanie wzrostu badanych szczepów przez odpowiednie koncentracje antybiotyków (tab. 3 i 4).

Podsumowanie

Wstępne wyniki badań wrażliwości na antybiotyki szczepów MS podjętych po raz pierwszy w kraju wskazują, że mykoplazmy tego gatunku izolowane od kur z problemami w reprodukcji i zaburzeń w budowie skorupy jaj mogą być znacznie odporniejsze na niektóre antybiotyki niż izolaty pochodzące ze stad klinicznie zdrowych

kur. Wyniki powyższych badań wskazują, że tylozyna jako klasyczny lek stosowany w leczeniu zakażeń mykoplazmami ciągle pozostaje lekiem skutecznym, bowiem nie stwierdzono różnicy pomiędzy obydwooma szczepami, które były wrażliwe na najniższe koncentracje leku. Znaczącą różnicę wykazano we wrażliwości szczepów w stosunku do linkomycyny, co sugeruje, że na ten antybiotyk bardziej patogenne szczepy MS mogą wykazywać oporność. Badania powyższe wskazują, że takie leki jak doksycyklina i tiamulina, podobnie jak tylozyna, pozostają w arsenale leków możliwych do użycia w zwalczaniu zakażeń mykoplazmami.

Piśmiennictwo

- [1] Bradbury J.M., 2001. Avian mycoplasmas [in:] Poultry Diseases, Fifth Edition, 178–193.
- [2] Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Minta Z., 2009. Comparison of different molecular methods for detection of *Mycoplasma synoviae*. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 53, 357–360.
- [3] Kleven S.H., 1989. Mycoplasmosis [in:] A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Eds: Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M. American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, Pennsylvania, 74–80.
- [4] Szeptycki J., 2013. MS-przyczyną zespołu anomalii wierzchołka skorupy. Materiały firmy Biopropeties Pty LTD, Polskie Drobiarstwo, 1, 46–47.
- [5] Szeleszczuk P., Kaczmarek Sz., Dolka B., Nerc J., 2013. Klinika pierwszego przypadku zespołu anomalii wierzchołka skorupy jaja (Egg Apical Abnormality –EAA) rozpoznanego w Polsce. Polskie Drobiarstwo, 3, 44–49.
- [6] Tomczyk G., Wieliczko A., 2011. Mykoplazmoza drobiu [w:] Choroby drobiu. Wyd. II, 229–261.
- [7] Tomczyk G., 2013. Mykoplazmoza kur w Polsce – aktualne zagrożenia, Vet. Forum, II Kongres Praktyki Weterynaryjnej, Materiały, Łódź, 20–21.04.2013, 129–131.
- [8] Tomczyk G., 2013. Patogeneza zakażeń mykoplazmami u drobiu, Magazyn Wet. Suplement – Choroby Ptaków, 4–7.

Występowanie zakażenia *Mycoplasma spp.* u dzikich ptaków

The occurrence of *Mycoplasma spp.* infection in wild birds

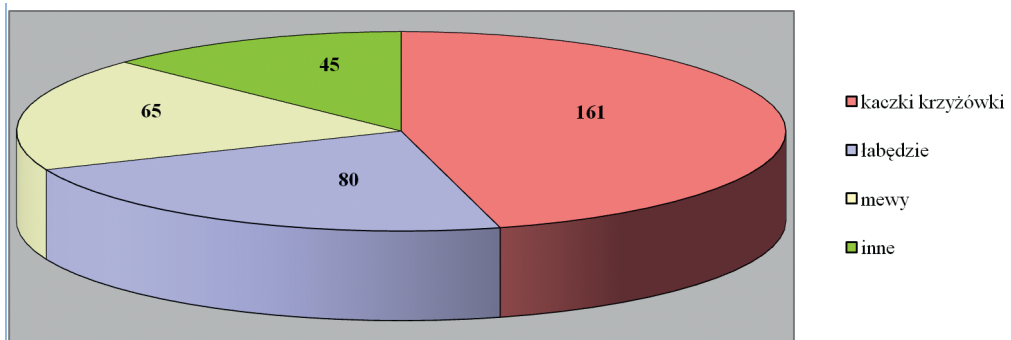
Ptaki dzikie są wektorem i rezerwuarem wielu patogenów, w tym także *Mycoplasma spp.*, których rola w dalszym ciągu nie jest jeszcze do końca poznana. Zakażenie mykoplazmami u ptaków dzikich może przebiegać subklinicznie lub w połączeniu z innymi patogenami być czynnikiem wpływającym na przełamanie odporności gospodarza. Spośród 23 gatunków mykoplazm występujących u różnych gatunków ptaków 17 zidentyfikowano u ptaków wolno żyjących, a 5 jest charakterystycznych wyłącznie dla ptaków dzikich [1].

Mykoplasmy należą do klasy Mollicutes (łac. *mollis* – miękki, *cutis* – skóra); charakteryzuje je brak typowej dla bakterii ściany komórkowej, co sprawia, że są odporne na działanie niektórych antybiotyków, np. penicyliny. Są to jedne z najmniejszych organizmów priokariotycznych zdolne do replikacji na sztucznym podłożu [3]. Mykoplasmy ze względu na obecność aparatu czepnego mają zdolność przylegania do nabłonków, powodując ciliostazę. Mikroorganizmy wykształciły zdolność wytwarzania nadtlenu wodoru, co ułatwia im wnikanie do komórki, a zmienność antygenowa na powierzchni zarazka zwiększa ich odporność na mechanizmy obronne systemu immunologicznego gospodarza [4].

Celem podjętych prac jest określenie występowania *Mycoplasma spp.* (*M. spp.*) w populacji ptaków wolno żyjących, a także identyfikacja gatunkowa mykoplazm.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wymazy z jamy ustno-gardłowej. Zostały pozyskane od ptaków dzikich na terenie 8 województw: pomorskiego, wielkopolskiego, mazowieckiego, zachodniopomorskiego, łódzkiego, kujawsko-pomorskiego, śląskiego i warmińsko-mazurskiego. Łącznie zgromadzono 351 próbek, w tym 120 próbek w 2011 r. i 231 próbek w 2012 r. Pochodziły one głównie od trzech gatunków ptaków: najliczniej przebadaną grupę stanowiły kaczki krzyżówki – 161 próbek (46%), następnie łabędzie – 80 próbek (22,7%) i mewy – 65 próbek (18,5%). Pozostałe 45 próbek (12,8%) pochodziło od takich gatunków jak np.: sikory, trznadłe, kosy, zięby, dzwońce, czaple i inne (ryc. 1).



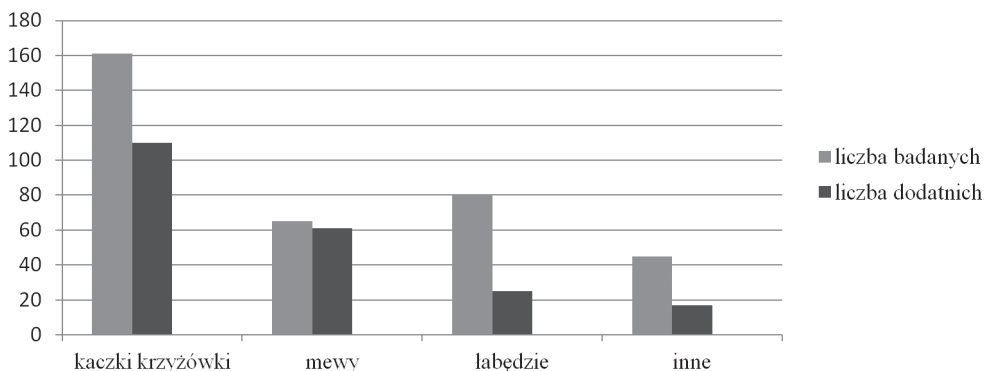
Ryc. 1. Wykaz liczby próbek z uwzględnieniem gatunku ptaków

Dostarczone wymazy z jamy ustno-gardłowej były badane metodą biologii molekularnej. Wyizolowane z wymazów DNA było badane konwencjonalną metodą PCR umożliwiającą stwierdzenie obecności materiału genetycznego *Mycoplasma spp.* (amplifikacja konserwatywnego fragmentu genu 16S rRNA). Do określenia występowania *Mycoplasma spp.* użyto starterów MGS0 i GPF oraz profili temperaturowych dostępnych w piśmiennictwie [2].

Wyniki i omówienie

Prządek o wielkości ok. 1013 par zasad (pz) świadczący o obecności materiału genetycznego *Mycoplasma spp.* stwierdzono u 213 ptaków (60,6%), w wymazach pochodzących głównie od kaczek krzyżówek (110 szt.) i mew (61 szt.), rzadziej od łabędzi niemych (25 szt.) oraz innych gatunków ptaków (17 szt.) (ryc. 2).

Mimo mniejszej liczby próbek od mew można wykazać, że jest to gatunek, u którego najczęściej stwierdzano obecność *Mycoplasma spp.*, gdyż wyniki dodatnie stanowiły 93% przebadanych próbek. Równie wysoki odsetek próbek dodatnich w stosunku do przebadanych stanowiły wymazy od kaczki krzyżówki (68,3%), natomiast odsetek próbek pobranych od łabędzi i innych gatunków ptaków był wyraźnie niższy i wynosił odpowiednio: 31,25 i 37,77% (tab. 1).



Ryc. 2. Występowanie zakażeń *Mycoplasma spp.* u różnych gatunków ptaków

Tabela I. Wyniki badania ptaków dzikich w kierunku obecności *Mycoplasma spp.*

| | Kaczka krzyżówka | | Mewy | | Łabędzie | | Inne gatunki | | Łącznie | |
|------|------------------|--------------|--------|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|---------|--------------|
| | Badane | Dodatnie (%) | Badane | Dodatnie (%) | Badane | Dodatnie (%) | Badane | Dodatnie (%) | Badane | Dodatnie (%) |
| 2011 | 61 | 36 (59) | 36 | 32 (88,8) | 10 | 6 (60) | 13 | 4 (30,7) | 120 | 78 (65%) |
| 2012 | 100 | 74(74) | 29 | 29 (100) | 70 | 19 (27,1) | 32 | 13 (40,6) | 231 | 135 (58,4%) |
| suma | 161 | 110 (68,3) | 65 | 61 (93,8) | 80 | 25 (31,2) | 45 | 17 (37,7) | 351 | 213 (60,6%) |

Podsumowanie

Wstępne wyniki badań podjętych po raz pierwszy w kraju wskazują, że znaczny odsetek przebadanych ptaków wolno żyjących był pozytywny (stwierdzono obecność materiału genetycznego mykoplazm). Może to sugerować, że ptaki wolno żyjące mogą być istotnym rezerwuarem patogenów z rodzaju *Mycoplasma* i stanowić potencjalne źródło zakażeń drobiu, szczególnie utrzymywanego na wolnym wybiegu i/lub o niskim statusie bioasekuracji (kontakty z ptakami wolno żyjącymi). W kolejnych etapach pracy próbki dodatnie zostaną zweryfikowane przy użyciu alternatywnych metod identyfikacyjnych, w tym sekwencjonowanie. Pierwsze wyniki sekwencjonowania produktu PCR kilku próbek dodatnich wykazały, że tylko część z nich można było zaliczyć do rodzaju *Mycoplasma*. Może to wskazywać na małą specyficzność użytych starterów w metodzie PCR, dlatego podjęte będą próby poprawienia tego parametru.

Praca realizowana w ramach projektu rozwojowego NCBiR Nr 12–0126–10/2011.

Piśmiennictwo

- [1] Bradbury J.M., 2001. Avian mycoplasmas [in:] Poultry Diseases, Fifth Edition, 2001, 178–193.
- [2] Lierz M., Hagen N., Harcourt-Brown N., Hernandez-Divers S.J, Lüscho D., Hafez H.M., 2007. Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 36, 145–150.
- [3] Luttrell P. Fischer J.R., 2007. Mycoplasmosis [in:] *Infectious Diseases of Wild Birds*, 317–331.
- [4] Tomczyk G., Wieliczko A., 2011. Mykoplazmoza drobiu [w:] *Choroby drobiu*. Wyd. II, 229–261.

PIOTR SZELESZCZUK, ARTUR ŻBIKOWSKI, BEATA DOLKA, IZABELLA DOLKA
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
JAROSŁAW SZUBSTARSKI
SLW Biolab, Ostróda
WOJCIECH SIKORA
Animal Pharma, Mazowsze
SYLWESTER BARABASZ
Prywatna praktyka weterynaryjna
RYSZARD SZEWCZYK
Animal Pharma, Mazowsze

Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego w stadach kurcząt brojlerów – ignorancja czy bezradność?

Avian Encephalomyelitis (AE) in broiler flocks – ignorance or helplessness?

W ostatnich kilku latach obserwuje się w Polsce wzrost liczby przypadków zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (Avian Encephalomyelitis – AE) w stadach kurcząt rzeźnych [7, 37, 48]. Można sądzić, że są one z reguły wynikiem błędów w immunoprofilaktyce stad rodzicielskich brojlerów i obecności zjadliwego wirusa w środowisku [6, 39]. W warunkach krajowych pionowa droga zakażenia wydaje się być mniej częsta.

Należy przypomnieć, że w rozprzestrzenianiu się hepatowirusa zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego główną rolę odgrywa droga wertykalna [2, 3, 26]. Zakażone nioski przez kilka tygodni po infekcji przekazują wirus do jaj, zaś zakażone transowarialnie pisklęta po wykluciu sięją do środowiska wirus zakaźny dla zdrowych piskląt już w inkubatorze [16, 18, 19, 24, 43, 44]. Wówczas ptaki chorują

w pierwszych 5–14 dniach po wylęgu. Jeśli do zakażenia doszło po wykluciu, to objawy chorobowe pojawiają się zwykle po 10 dniach [17].

Straty w wyniku zakażeń wirusem AE u brojlerów kurzych mogą być bezpośrednie jak i pośrednie (tab. 1). Szczególnie ważne są także zakażenia podkliniczne, u kur niosek w okresie produkcji prowadzą do istotnego spadku nieśności [21, 27]. Wystąpienie choroby w stadach brojlerów kurzych skutkuje z reguły likwidacją stada rodzicielskiego, co jest zawsze bardzo dużą stratą ekonomiczną [41].

Tabela 1. Wyniki produkcyjne w stadzie kurcząt zdrowych i chorych na zakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego [7]

| Parametr | Stado zdrowe | Stado chore |
|--|--------------|-------------|
| Długość odchowu (dni) | 42 | 46 |
| Padnięcia i brakowania (%) | 3,2 | 7,65 |
| Masa ciała (kg) | 2,4 | 2,04 |
| Współczynnik wykorzystania paszy (kg/kg) | 1,70 | 2,11 |
| EWW | 325,38 | 193,68 |

Pierwsze przypadki AE na świecie rozpoznano już w roku 1930 u 2-tygodniowych kurcząt [40], zaś w Polsce 35 lat później. W 1966 r. Marek i Roszkowski [25] jako pierwsi opisali w kraju zakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego typu „Avian Encephalomyelitis”. Wykonane kilka lat później przez Karczewskiego i Weisbach [20] badania wykazały, że pod koniec lat sześćdziesiątych zakażenia tym zarazkiem były szeroko rozprzestrzenione w krajowych stadach kur. Cytowani autorzy stwierdzili, że ponad 93% badanych stad było seropozytywnych. W tym czasie nie prowadzono jeszcze w Polsce szczepień przeciwko tej chorobie. Na początku lat siedemdziesiątych opisano pierwsze przypadki AE na terenie województwa opolskiego [23]. Występowanie wirusa w środowisku potwierdzały także badania Houszki i wsp. [12], którzy opisali zaćmę torebkowo-soczewkową po przebytych zakażeniu wirusem AE. Koncicki [1992] zdiagnozował występowanie zakażeń tym wirusem u kurcząt w rejonie olsztyńskim [22]. Karpińska i wsp. [21] opisali natomiast zakażenie wirusem AE jako przyczynę spadków nieśności w stadach towarowych kur.

Do roku 2003 pojawienie się AE u brojlerów w kraju odnotowywano niezmiernie rzadko i zawsze jako następstwo zaniechania profilaktyki w stadzie rodzicielskim. Kilka takich przypadków było przedmiotem spektakularnych rozpraw sądowych. W ostatnich latach obserwuje się jednak wzrost częstości występowania problemów z AE w stadach kurcząt brojlerów [38]. Między innymi Dymacz i wsp. [7] opisali przypadki wystąpienia choroby w stadach kurcząt rzeźnych po zakażeniu wirusem terenowym. Ptaki w tych stadach pochodziły po rodzicach nieskutecznie zaszczepionych przeciwko AE. Cytowani autorzy formułują pogląd, że aktualnie w środowisku ferm drobiu w kraju krąży wirus AE, który w sprzyjających warunkach (błędy

w technice szczepienia, brak odpowiednio wysokiego poziomu przeciwciał matczy-nych, immunosupresja, stres środowiskowy) prowadzi do uaktywnienia zakażenia i wystąpienia objawów chorobowych. W okresie 2009–2012 w Zakładzie Chorób Ptaków SGGW zdiagnozowano kilka przypadków AE u kurcząt brojlerów [38]. W tym okresie obok klasycznych metod diagnostycznych wykorzystano także metodę PCR do potwierdzania obecności materiału genetycznego tego zarazka [48]. Prowadzone od kilku lat przez Żbikowskiego i wsp. [46, 47] badania nad występowaniem zakażeń tym zarazkiem w stadach kur ozdobnych wykazują, że 100% badanych stad miało kontakt z tym wirusem. Średnie miano geometryczne było stosunkowo wysokie i wynosiło 2048,8 a w niektórych surowicach miano przekraczało nawet 10 000 – najwyższe stwierdzone miano wynosiło, aż 11 113. Ze 188 próbek zbadanych testem ELISA (Idexx) 151 było pozytywnych, co stanowi około 80,3%. Stwierdzone poziomy specyficznych przeciwciał są porównywalne z osiąganymi w okresie produkcji u ptaków stad rodzicielskich brojlerów szczepionych przeciwko tej chorobie.

Jednym z podstawowych zaleceń w profilaktyce AE jest zakaz szczepienia w okresie nieśności. Potwierdzeniem, że takie postępowanie prowadzi do transmisji wirusa szczepionkowego i obniżenia wylęgu oraz wystąpienia choroby u kurcząt brojlerów, jest przypadek zdiagnozowany w Ambulatorium Zakładu Chorób Ptaków SGGW w drugiej połowie 2012 r. W stadach piskląt brojlerów pochodzących po nioskach szczepionych w okresie produkcji chorujących z typowymi zmianami klinicznymi i histopatologicznymi wykazano metodami biologii molekularnej obecność wirusa AE. Analiza sekwencji genu białka VP2 izolatu ZCHP2/0912 (GenBank: KC912695.1) potwierdziła, że jest to szczep szczepionkowy [48].

W badaniach epidemiologicznych nad zakażeniami wirusem AE od wielu lat stosuje się metody serologiczne [1, 4, 11, 13, 14, 15, 30, 39]. Serologia jest także bardzo przydatna do rozpoznawania zakażeń oraz do oceny efektywności szczepień [34]. Udowodniono ścisłą korelację między poziomem przeciwciał a stopniem zabezpieczenia przed zakażeniem [9, 42]. Dotyczy to zwłaszcza testu immunoenzymatycznego [8, 31, 32, 35, 36, 37, 45].

Wyniki badań nad seroprewalencją zakażeń wirusem AE na podstawie badań wykonanych w latach 2011–2013 przez ZCHP SGGW w stadach rodzicielskich brojlerów zestawiono w tabeli 2.

Potwierdzają one bardzo duże zróżnicowanie poszczepiennej odpowiedzi serologicznej. W stadach tych wykorzystywano różne programy szczepień, a najczęściej stosowano jednokrotne podanie szczepionki w okresie wychowu.

Używane obecnie do uodporniania niosek stad towarowych i hodowlanych szczepionki żywe, z założenia, chronią ptaki przed wystąpieniem objawów klinicznych i przy odpowiednio wysokim poziomie przeciwciał przed transmisją pionową zarazka [5, 28, 29, 33]. Jak do tej pory nie opracowano skutecznej szczepionki dla kurcząt brojlerów.

Tabela 2. Wyniki ELISA w kierunku AE – Stada rodzicielskie brojlerów kurzych (dane z bazy danych ZCHP SGGW, badania wykonane w okresie 2011–2013)

| Nr bad. | Wiek ptaków | Liczba zbad. stad | Wyniki ELISA | | | | | | | Min. (zakres) | Max (zakres) |
|---------|-------------|-------------------|--------------|-----|------|---------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|--------------|
| | | | Count | Pos | %pos | GMean (zakres mian) | CV (zakres) | | | | |
| 1 | 2 dni | 1 | X | 19 | 19 | 100 | 7510,2 | 31,6 | 4040 | 13 009 | |
| 2 | 16 tyg. | 1 | X | 22 | 13 | 59,1 | 528,7 | 54 | 279 | 1464 | |
| 3 | 20–23 tyg. | 5 | X | 114 | 82 | 71,9 (4,5–95,6) | 1571,2 (111,8–2576,4) | 86,3 (53,1–141,7) | 116,4 (18–313) | 6281,4 (1301–9718) | |
| | | | SD | | | | 906,1 | 33,2 | 114,8 | 3145,6 | |
| 4 | 26–28 tyg. | 4 | X | 89 | 73 | 82 (69,6–95,6) | 1931,2 (1039,4–2207,8) | 84,8 (98,6–63,2) | 183 (61–366) | 7990,7 (6456–10 458) | |
| | | | SD | | | | 1145,7 | 17,1 | 149,4 | 1928,8 | |
| 5 | 31–39 tyg. | 10 | X | 215 | 184 | 85,6 (77,8–100) | 2077,04 (526,6–3421,5) | 71,1 (51,4–89,7) | 143,7 (1–442) | 8589,7 (5087–10 886) | |
| | | | SD | | | | 1248,8 | 16,1 | 149,5 | 1568,1 | |
| 6 | 43–46 tyg. | 9 | X | 345 | 309 | 89,6 (65,2–100) | 2701,4 (409,1–5051,4) | 66,7 (37,4–108,5) | 157,4 (1–565) | 8309,4 (6420–10 034) | |
| | | | SD | | | | 1649,45 | 25,7 | 235,6 | 1221,1 | |
| 7 | 58–67 tyg. | 2 | X | 43 | 43 | 100 (100) | 6056,1 (3058,6–9053,7) | 43,6 (25,1–62,1) | 1309 (407–2211) | 11 303,5 (9286–13 321) | |
| | | | SD | | | | 4239,1 | 26,2 | 1275,6 | 2853,2 | |

Immunoprofilaktyka AE w Polsce prowadzona jest od lat 80. Program profilaktyczny w zakresie szczepień ustalony dla kur czystych linii kierunku mięsnego i stad prarodzicielskich (Instrukcja nr 6 Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Departament Weterynarii z dnia 14 X 1980) zalecał szczepienie przeciwko tej chorobie w 16. tygodniu życia. W tym czasie dostępne były szczepionki TAD AE Vac firmy TAD (opakowanie 500 dawek) – oraz Poulvac AE firmy Duphar (Opakowanie 1000 dawek). W 1989 r. zarejestrowano preparat Myelovax firmy Merieux, a dwa lata później szczepionki AE Vaccine Nobilis i AE Pox Vaccine Nobilis firmy Intervet.

Zestawienie aktualnie zarejestrowanych w kraju szczepionek przeciwko AE podano w tabeli 3. Jak wspomniano, ze względu na możliwe powikłania kategorycznie nie należy podawać żywych szczepionek przeciwko AE ptakom stad reprodukcyjnych na 4 tyg. przed rozpoczęciem nieśności lub w trakcie jej trwania. W takim przypadku wirus szczepionkowy przekazywany jest do jaj i wydalany z kałem przez 4 tyg. po immunizacji. W wyniku pionowego zakażenia dochodzić może do wybuchu klinicznej postaci AE u potomstwa. Nie należy także narażać ptaków młodszych niż 8–10-tygodniowe na kontakt z wirusem szczepionkowym, może to bowiem prowadzić do wybuchu zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego w stadzie. Opisano również przypadki wystąpienia klinicznej postaci choroby po zastosowaniu szczepionki podanej metodą wing-web [10].

W piśmiennictwie można spotkać dane, że przeciwciała matczyne u kurcząt pochodzących po prawidłowo szczepionych nioskach zachowują się do 6.–8. tygodnia. W badaniach własnych wykonanych w 20 stadach kurcząt brojlerów za pomocą testu ELISA (Idexx) nie potwierdzono tak długiego utrzymywania się przeciwciał matczynek (ryc. 1). Jak wynika z zestawienia na rycinie 2, tylko 4 z 435 badanych surowic (0,9%) było bardzo słabo dodatnich. Obecność wirusa mało zjadliwego w środowisku może potwierdzać wynik badania sześciotygodniowych kurcząt (ryc. 3). W dziewięciu z 457 zbadanych surowic wykazano bardzo niskie miana przeciwciał (Tmax – 565).

Wszyscy producenci szczepionek podkreślają, iż podczas szczepienia przeciwko AE bezwzględnie należy zachować dużą ostrożność, aby nie przenieść wirusa szczepionkowego do innych nieuodpornionych stad. Po szczepieniu należy umyć i zdezynfekować ręce oraz używany sprzęt. Niewykorzystana szczepionka powinna być zniszczona przez spalenie lub gotowanie.

Tabela 3. Szczepionki przeciwko AE zarejestrowane w Polsce (stan 05.2013)

| L.p. | Nazwa produktu leczniczego | Skład | Postać farmaceutyczna | Dawka | Wielkość opakowania | Kat. dost. | Gatunki zwierząt | Podmiot odpowiedzialny | Wytwórca |
|------|----------------------------|--|---|---|--|------------|------------------|-------------------------------------|--|
| 1 | AviPro AE | Żywa szczepionka dla kur, przeciwko zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego ptaków | zawiesina | 103 EID50 | fiol. 1000 dawek fiol. 5000 dawek fiol. 2500 dawek fiol. 10 000 dawek | PLW | kura | Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG | Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG |
| 2 | Encefal-Vac | Żywa szczepionka dla kur przeciwko zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego ptaków | liofilizat | 103 EID50 | fiol. 1000 dawek fiol. 2500 dawek | PLW | kura | Fatro S.p.A. | Neuva-Veterinary Biological Products Division of FATRO S.p.A. |
| 3 | Myelovax | Szczepionka przeciwko zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego | liofilizat | > 3 log ₁₀ EID50 | flakon 1000 dawek | PLW | kura | Meril S.A.S. | Meril Laboratory of Lyon - Gerland |
| 4 | Nobilis AE + Pox | Szczepionka przeciwko zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego kur oraz ospie kur i indyków | liofilizat + rozp. | (2,5 Log ₁₀ EID50 + 2,8 Log ₁₀ EID50)/dawkę | fiol. 500 dawek + rozp. fiol. 1000 dawek + rozp. | PLW | kura indyk | Intervet International B.V. | Intervet International B.V. |
| 5 | Nobilis AE 1143 | Szczepionka przeciwko zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego kur i indyków | | | | | | Intervet International B.V. | Intervet International B.V. |
| 6 | Poulvac AE | Szczepionka przeciwko zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego ptaków | liofilizat do sporządzania zawiesiny do podawania w wodzie do picia | | 1 fiol. 1000 dawek 10 fiol. 1000 dawek | | Kura | Pfizer Trading Polska Sp. z o.o. | Pfizer Global Manufacturing Weesp, C J van Houtenlaan 36, 1381 C P Weesp Pfizer Olot, S.L.U. |

| Case | Assay | Date | GMean | CV | Count | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|---------------------|-------|------|-------|-------|-------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| B01 COBB 500 CB 0-1 | AE | 30 | 1000 | 87.3 | 23 | 6 | 1 | 7 | 4 | 1 | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | | |
| C01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 30 | 2210 | 56.7 | 23 | 1 | 3 | 4 | 6 | 1 | 5 | 3 | | | | | | | | | | | |
| D01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 30 | 904 | 67.4 | 23 | 7 | 4 | 4 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | | | | | | | | | | |
| A01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 30 | 774 | 101.2 | 23 | 10 | 3 | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | |
| O01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 01 | 3567 | 43.6 | 23 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 8 | 6 | 2 | | | | | | | | | | |
| E01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 01 | 410 | 99.9 | 23 | 6 | 2 | 8 | 3 | 1 | 1 | 2 | | | | | | | | | | | |
| F01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 01 | 3452 | 36.3 | 23 | | | 3 | 3 | 8 | 5 | 2 | 2 | | | | | | | | | | |
| G01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 01 | 2851 | 40.4 | 23 | 2 | | | | 4 | 7 | 5 | 5 | | | | | | | | | | |
| H01 COBB 500 CB 0-1 | AE | 01 | 3070 | 44.6 | 23 | 1 | 1 | 2 | 3 | 5 | 5 | 5 | 1 | | | | | | | | | | |
| N01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 01 | 1414 | 70.5 | 23 | 3 | 4 | 5 | 4 | 4 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | |
| L01 COBB 500 CB 0-1 | AE | 01 | 339 | 118.0 | 23 | 11 | 5 | 4 | | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| F01 CB 0-1 | AE | 01 | 3165 | 43.2 | 23 | 2 | | 2 | | 3 | 6 | 9 | 1 | | | | | | | | | | |
| R01 CB 0-1 | AE | 01 | 2932 | 44.9 | 23 | 2 | | 1 | 4 | 5 | 7 | 2 | 2 | | | | | | | | | | |
| S01 CB 0-1 | AE | 01 | 4558 | 30.8 | 23 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 8 | 8 | | | | | | | | | |
| T01 CB 0-1 | AE | 01 | 142 | 141.9 | 23 | 16 | 2 | 3 | 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| U01 CB 0-1 | AE | 01 | 369 | 95.2 | 23 | 9 | 7 | 5 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| I01 COBB 500 CB 0-1 | AE | 01 | 1319 | 74.9 | 23 | 2 | 3 | 8 | 6 | 1 | 2 | | 1 | | | | | | | | | | |
| J01 COBB 500 CB 0-1 | AE | 01 | 1253 | 70.0 | 23 | 3 | 5 | 3 | 9 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | |
| K01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 01 | 3344 | 51.2 | 23 | | 3 | 2 | 1 | 3 | 6 | 2 | 6 | | | | | | | | | | |
| M01 ROSS 308 CB 0-1 | AE | 01 | 1831 | 65.2 | 23 | 5 | 1 | 2 | 4 | 1 | 8 | 2 | | | | | | | | | | | |

Ryc. 1. Zestawienie poziomu (GMT) i rozkładu mian w poszczególnych grupach przeciwiał matczynych przeciwko wirusowi AE u jednodniowych piskląt w 20 stadach kurcząt brojlerów (badania wykonano w roku 2010). (Zestawienie wykonano za pomocą programu xChek z wykorzystaniem baz danych ZCHP SGGW)

| Case | Assay | Date | GMean | CV | Count | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|---------------------|-------|------|-------|-------|-------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| D03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 40 | 76.2 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S03 CB 6-0 | AE | 07 | 45 | 89.9 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T03 CB 6-0 | AE | 07 | 43 | 87.2 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| U03 CB 6-0 | AE | 07 | 43 | 126.3 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 87 | 50.5 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 53 | 106.3 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 72 | 140.2 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 07 | 8 | 140.4 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 20 | 124.3 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R03 CB 6-0 | AE | 07 | 21 | 110.3 | 22 | 22 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| O03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 30 | 97.5 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 07 | 34 | 206.0 | 23 | 20 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| S02 CB 6-0 | AE | 08 | 49 | 98.7 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 08 | 47 | 131.5 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| J03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 08 | 41 | 96.4 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| K03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 71 | 70.0 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 08 | 55 | 94.7 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M03 ROS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 120 | 55.7 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 182 | 36.2 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| O03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 98 | 29.7 | 22 | 22 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P03 CB 6-0 | AE | 08 | 124 | 56.8 | 22 | 21 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |

Ryc. 2. Zestawienie poziomu (GMT) i rozkładu mian w poszczególnych grupach przeciwiał przeciwko wirusowi AE u trzytygodniowych ptaków w 20 stadach kurcząt brojlerów (badania wykonano w roku 2010). (Zestawienie wykonano za pomocą programu xChek z wykorzystaniem baz danych ZCHP SGGW)

| Case | Assay | Date | GMean | CV | Count | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|---------------------|-------|------|-------|-------|-------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| D03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 40 | 76.2 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S03 CB 6-0 | AE | 07 | 45 | 89.9 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T03 CB 6-0 | AE | 07 | 43 | 87.2 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| U03 CB 6-0 | AE | 07 | 43 | 126.3 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 87 | 50.5 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 53 | 106.3 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 72 | 140.2 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 07 | 8 | 140.4 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 20 | 124.3 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R03 CB 6-0 | AE | 07 | 21 | 110.3 | 22 | 22 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| O03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 07 | 30 | 97.5 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 07 | 34 | 206.0 | 23 | 20 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| S02 CB 6-0 | AE | 08 | 49 | 98.7 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 08 | 47 | 131.5 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| J03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 08 | 41 | 96.4 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| K03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 71 | 70.0 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L03 COBB 500 CB 6-0 | AE | 08 | 55 | 94.7 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M03 ROS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 120 | 55.7 | 23 | 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 182 | 36.2 | 23 | 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| O03 ROSS 308 CB 6-0 | AE | 08 | 98 | 29.7 | 22 | 22 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P03 CB 6-0 | AE | 08 | 124 | 56.8 | 22 | 21 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |

Ryc. 3. Zestawienie poziomu (GMT) i rozkładu mian w poszczególnych grupach przeciwiał przeciwko wirusowi AE u sześciotygodniowych ptaków w 20 stadach kurcząt brojlerów (badania wykonano w roku 2010). (Zestawienie wykonano za pomocą programu xChek z wykorzystaniem baz danych ZCHP SGGW)

We wcześniejszych badaniach z użyciem monitoringu serologicznego przeprowadzonych w stadach rodzicielskich brojlerów wykazano, że pomimo iż profilaktyka AE

jest szeroko prowadzona, to jej skuteczność budzi bardzo duże zastrzeżenia. W okresie między 1997 a 2003 r. z 36 stad zbadanych tylko 5% z nich było w pełni zabezpieczonych w okresie produkcji [6,39]. Ocena seroprewalencji specyficznych przeciwciał przeciwko AE w 150 stadach rodzicielskich brojlerów w okresie między 19. a 54. tyg. życia wykazała bardzo duże zróżnicowanie średnich mian geometrycznych (ryc. 4). Wśród 3416 zbadanych surowic ponad 15% było ujemnych. Odsetek ten w niektórych stadach sięgał 90%. Wzrastające zagrożenie spowodowało, że w niektórych rejonach kraju zaczęto intensyfikować program immunoprofilaktyki. Jest wiele modyfikacji klasycznego (między 10. a 16. tyg. jednokrotnie, szczepionka podana w wodzie do picia) programu szczepień, ale najczęściej stosuje się immunizację metodą wing-web i kolejne szczepienie w wodzie do picia. Mimo takiego programu nie udaje się osiągnąć pełnego zabezpieczenia stad (tab. 4). Prowadzone obecnie badania nad oceną różnych programów immunoprofilaktyki nie wskazują jednoznacznie, co jest tego przyczyną. Jak się wydaje, technika immunizacji, immunokompetentność układu odpornościowego szczepionych ptaków, poziom biosecurity i prowadzony reżim dezynfekcji mogą mieć potencjalnie największy wpływ na osiągnięte efekty szczepienia.

Zgodnie z zaleceniami interpretacji wyników badań monitoringowych w kierunku wykrycia przeciwciał przeciwko wirusowi AE w ocenie należy uwzględnić, iż:

- Specyficzne przeciwciała poszczepienne po immunizacji przeciwko AE powstają wolniej niż w przypadku innych chorób wirusowych.
- Do badania kontrolnego w teście AGP należy pobierać krew po 3–5 tyg. po szczepieniu.
- Do badania kontrolnego w teście ELISA należy pobierać krew po 5–7 tyg. po szczepieniu.
- Testem referencyjnym dla AE jest test jajowy (Embryo susceptibility test), oceniający rzeczywisty stopień zabezpieczenia stad brojlerów.
- Przeciwciała matczyne interferują z powstawaniem odporności czynnej.
- Miano dodatnie w ELISA jest równoznaczne z protekcją!
- Stada rodzicielskie brojlerów powinny być w 100% zabezpieczone (wszystkie wyniki dodatnie u jednodniowych piskląt).
- Jak można sądzić przy obecnym dostępie do metod diagnostyki serologicznej i molekularnej, wystąpienie przypadków AE w stadach kurcząt brojlerów jest wynikiem braku wiedzy prowadzącej do błędów w sztuce, błędów w technice szczepienia i braku monitoringu efektywności szczepień.

Przy właściwym programie szczepień i prowadzeniu stosownej kontroli ich efektywności strat można uniknąć. Jak się wydaje, konieczne są jednak dalsze badania nad nowymi sposobami immunizacji oraz diagnostyki, zwłaszcza molekularnej zakażeń wirusem AE w stadach rodzicielskich i towarowych kur nieśnych.

Tabela 4. Wyniki badania 8 stad rodzicielskich brojlerów szczepionych przeciwko AE. Badania wykonano w maju 2013 za pomocą testu AE ELI-SA firmy Idexx

| L.p. | Opis stada | Liczba prób | Wiek ptaków | AMT | GMT | SD | CV% | T max | T MIN | n+ | Program |
|------|------------|-------------|-------------|------|------|------|------|-------|-------|----|---|
| 1 | 0132GMS | 23 | 32-0 | 3937 | 2521 | 2666 | 67,7 | 8359 | 114 | 22 | AviPro AE 12T.Ż (WODA) |
| 2 | 0132ASB | 23 | 32-0 | 4232 | 3358 | 2176 | 51,4 | 9249 | 182 | 22 | Nobilis AE+POX 12T.Ż (WING-WEB) AviPro AE 15T.Ż(WODA) |
| 3 | 0131PGŁ | 23 | 31-0 | 2313 | 1485 | 1450 | 62,7 | 5087 | 18 | 21 | Nobilis AE+POX 12T.Ż (WING-WEB) AviPro AE 14T.Ż (WODA) |
| 4 | 0220PGŁ | 23 | 20-0 | 3374 | 2576 | 1790 | 53,1 | 6325 | 313 | 22 | Nobilis AE+POX 12T.Ż (WING-WEB) AviPro AE 14T.Ż (WODA) |
| 5 | 0123WBW | 23 | 23-0 | 3313 | 1934 | 2817 | 85,0 | 9718 | 105 | 20 | Nobilis AE+POX 12T.Ż (WING-WEB) AviPro AE 14T.Ż(WODA) |
| 6 | 0223WBT | 23 | 23-0 | 2465 | 1554 | 1879 | 76,2 | 6073 | 57 | 21 | Nobilis AE+POX 12T.Ż (WING-WEB) AviPro AE 14T.Ż (WODA) |
| 7 | 0121WLS | 23 | 21-0 | 3124 | 1680 | 2356 | 75,4 | 7990 | 89 | 18 | Nobilis AE+POX 12T.Ż (WING-WEB) AviPro AE 15T.Ż (WODA) |
| 8 | 0126BDA | 23 | 26-0 | 3113 | 2208 | 2448 | 78,6 | 8593 | 366 | 22 | Nobilis AE+POX 12T.Ż (WING-WEB) AviPro AE 14T.Ż (WODA) |

Piśmiennictwo

- [1] Ahmed A.A., El-Azm I.M., Ayoub N.N., El-Toukhi B.I., 1982. Studies on the serological detection of antibodies to avian encephalomyelitis virus. *Avian Pathol.*, 11, 253–262.
- [2] Bennejean G., Picault J.P., Lahellec M., Guittet M., 1976. Study of the properties of different strains of avian encephalomyelitis virus. *Folia Vet. Lat.*, 6, 179–188.
- [3] Borzemska W., 1972. Zakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego kur w świetle diagnozy różnicowej. *Życie Wet.*, 47, 298–301.
- [4] Butterfield W.K., 1975. Avian encephalomyelitis: the virus and immune response. *Am. J. Vet. Res.*, 36, 557–559.
- [5] Calnek B.W., 1998. Control of avian encephalomyelitis: a historical account. *Avian Dis.*, 42, 632–647.
- [6] Dymacz G., 2006. Zastosowanie monitoringu serologicznego do oceny programów immunoprofilaktyki chorób zakaźnych w stadach rodzicielskich brojlerów kurzych. Praca dokt. SGGW Warszawa.
- [7] Dymacz G., Szeleszczuk P., Houszka M., 2007. Przypadek zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego u kurcząt brojlerów. *Med. Wet.*, 63, 1485–1489.
- [8] Garrett J.K., Davis R.B., Ragland W.L., 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to avian encephalomyelitis virus in chickens. *Avian Dis.*, 28, 117–130.
- [9] Garrett J.K., Davis R.B., Ragland W.L., 1985. Correlation of serum antibody titer for avian encephalomyelitis virus (AEV) in hens with the resistance of progeny embryos to AEV. *Avian Dis.*, 29, 878–880.
- [10] Glisson J.R., Fletcher O.J., 1987. Clinical encephalitis following avian encephalomyelitis vaccination in broiler breeder pullets. *Avian Dis.*, 31, 383–385.
- [11] Girshick T., Crary C.K. Jr., 1982. Preparation of an agar-gel-precipitating antigen for avian encephalomyelitis and its use in evaluating the antibody status of poultry. *Avian Dis.*, 26, 798–804.
- [12] Houszka M., Mazurkiewicz M., Wachnik Z., 1975. Zaćma u kur w zakaźnym zapaleniu mózgu i rdzenia (AE). *Med. Wet.*, 31, 520–522.
- [13] Ide P.R., 1974. Application of the fluorescent antibody technique to the diagnosis of avian encephalomyelitis. *Can. J. Comp. Med.*, 38, 49–55.
- [14] Ikeda S., 1977. Immunodiffusion test in avian encephalomyelitis. I. Standardization of procedure and detection of antigen in infected chickens and embryos. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, 17, 81–87.
- [15] Ikeda S., 1977. Immunodiffusion test in avian encephalomyelitis. II. Detection of precipitating antibody in infected chickens in comparison with neutralizing antibody. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, 17, 88–94.
- [16] Ikeda S., Matsuda K., 1976. Susceptibility of chickens to avian encephalomyelitis virus. V. Behavior of a field strain in laying hens. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, 16, 90–96.
- [17] Ikeda S., Matsuda K., Yonaiyama K., 1976. Susceptibility of chickens to avian encephalomyelitis virus. II. Behavior of the virus in day-old chicks. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, 16, 1–7.

- [18] Ikeda S., Matsuda K., Yonaiyama K., 1976. Susceptibility of chickens to avian encephalomyelitis virus. III. Behavior of the virus in growing chicks. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, 16, 33–38.
- [19] Ikeda S., Matsuda K., 1976. Susceptibility of chickens to avian encephalomyelitis virus. IV. Behavior of the virus in laying hens. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, 16, 83–89.
- [20] Karczewski W., Weisbach R., 1970. Rozprzestrzenienie wirusa zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia. *Med. Wet.*, 26, 660–662.
- [21] Karpińska E., Szeleszczuk P., Czaja-Chrzanowska I., Moniuszko E., 2000. Spadki nieśności – nowe oblicze zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego. *Magazyn Wet. Suplement Drób.*, 61–63.
- [22] Koncicki A., 1992. Występowanie zakażeń wirusowych u kurcząt w rejonie olsztyńskim. *Mat. IX Kongresu PTNW, Olsztyn*, 243.
- [23] Latała A., Dąbrowski J., 1972. Pierwsze przypadki zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego u kurcząt na terenie woj. opolskiego. *Med. Wet.*, 28, 531–532.
- [24] Malik G., 1969. Histopathological lesions of avian encephalomyelitis in Hungary. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 19, 279–298.
- [25] Marek K., Roszkowski J., 1966. Zakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego u ptaków typu Avian Encephalomyelitis (AE) *Med. Wet.*, 22, 257–261.
- [26] Marvil P., Knowles N.J., Mockett A.P. A., Britton P., Brown T.D. K., Cavanagh D., 1999. Avian encephalomyelitis virus is a picornavirus and is most closely related to hepatitis A virus. *Journal of General Virology*, 80, 653–662.
- [27] Meroz M., Elkin N., Hadash D., Abrams M., 1990. Egg drop associated with avian encephalomyelitis virus. *Vet. Rec.*, 127, 532.
- [28] Nicholas R.A., Goddard R.D., Ream A.J., Hopkins I.G., Thornton D.H., 1986. Improved potency test for live avian encephalomyelitis vaccines. *Res. Vet. Sci.*, 41, 420–422.
- [29] Nicholas R.A., Thornton D.H., 1990. A standard vaccine for the virus content test of live avian encephalomyelitis virus vaccines. *Biologicals.*, 18, 131–133.
- [30] Ohishi K., Senda M., Yamamoto H., Nagai H., Norimatsu M., Sasaki H., 1994. Detection of avian encephalomyelitis viral antigen with a monoclonal antibody. *Avian Pathol.*, 23, 49–59.
- [31] Richter R., Kösters J., Kuhavanta-Kalkosol S., 1985. Comparative studies of the use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of antibodies against the avian encephalomyelitis agent. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 32, 116–127.
- [32] Shafren D.R., Tannock G.A., 1988. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian encephalomyelitis virus antigens. *Avian Dis.*, 32, 209–214.
- [33] Shafren D.R., Tannock G.A., Groves P.J., 1992. Antibody responses to avian encephalomyelitis virus vaccines when administered by different routes. *Aust. Vet. J.*, 69, 272–275.
- [34] Shafren D.R., Tannock G.A., Morrow C.J., 1989. Diagnosis of a field outbreak of avian encephalomyelitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Aust. Vet. J.*, 66, 224–225.
- [35] Shafren D.R., Tannock G.A., Roberts T.K., 1989. Development and application of an ELISA technique for the detection of antibody to avian encephalomyelitis viruses. *Res. Vet. Sci.*, 46, 95–99.

- [36] Smart I.J., Grix D.C., 1985. Measurement of antibodies to infectious avian encephalomyelitis virus by ELISA. *Avian Pathol.*, 14, 341–352.
- [37] Smart I.J., Grix D.C., Barr D.A., 1986. The application of the ELISA to the diagnosis and control of avian encephalomyelitis. *Aust. Vet. J.*, 63, 297–299.
- [38] Szeleszczuk P., Żbikowski A., 2009. Zakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego kurcząt – nie lekceważyć zagrożenia! *Polskie Drob.*, 17, 64–66.
- [39] Szeleszczuk P., Dymacz G., 2004. Zastosowanie monitoringu serologicznego do oceny skuteczności immunoprofilaktyki zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego w stadach rodzicielskich brojlerów kurzych. *Materiały XII Kongresu PTNW, Warszawa, t. I*, 358.
- [40] Tannock G.A., Shafren D.R., 1994. Avian encephalomyelitis: a review. *Avian Pathol.*, 23, 603–620.
- [41] van Veen L., Dwars M., Fabri T., 1998. Ataxia and paralysis in meat chickens, as a result of an infection with avian encephalomyelitis virus in the breeding flock. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 123, 344–348.
- [42] Westbury H.A., Sinkovic B., 1978. The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis. 3. The relationship between viraemia, invasion of the brain by the virus, and the development of specific serum neutralising antibody. *Aust. Vet. J.*, 54, 76–80.
- [43] Westbury H.A., Sinkovic B., 1978. The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis. 1. The effect of the age of the chicken and the route of administration of the virus. *Aust. Vet. J.*, 54, 68–71.
- [44] Westbury H.A., Sinkovic B., 1978. The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis. II. The effect of immunosuppression on the disease. *Aust. Vet. J.*, 54, 72–75.
- [45] Zobisch H., Gaede W., Kretschmar C., 1994. Development and testing of an indirect ELISA for the detection of antibodies against avian encephalomyelitis. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 107, 85–90.
- [46] Żbikowski A., Szeleszczuk P., Pawłowski K., Łukasiewicz M., 2010. Zastosowanie monitoringu serologicznego do oceny stopnia rozprzestrzenienia chorób wirusowych w stadach kur ozdobnych. *Monografia „Aktualne problemy w patologii drobiu”, F.P.H. „Elma”, Wrocław*, 206–214.
- [47] Żbikowski A., Szeleszczuk P., Pawłowski K., Łukasiewicz M., 2012. Występowanie zakażeń wirusem zakaźnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego kurcząt w stadach kur ozdobnych. *Mat. XIV Kongresu PTNW, Wrocław*, 13–15.09, 435.
- [48] Żbikowski A., Dolka B., Szeleszczuk P., Dolka I., 2013. Vertical transmission of vaccine avian encephalomyelitis virus broiler-chicken flocks in Poland (w druku).

Wpływ adenowirusów na skuteczność szczepień profilaktycznych przeciwko chorobie Mareka

The influence of adenovirus strain on the effectiveness of the prophylactic vaccinations against Marek's disease virus

Adenowirusy należą do rodziny *Adenoviridae*. Są to bezotoczkowe wirusy o kapsydzie wielkości 70–90 nm i genomie zbudowanym z ds. DNA [2]. Głównym białkiem kapsydu adenowirusów jest białko hexon kodowane przez gen hexon posiadający regiony wysoce zmienne w pętli L1 otoczone fragmentami konserwatywnymi [4, 5]. Adenowirusy mogą być przyczyną zakażeń utajonych i wkląć przebieg innych chorób, a także działać immunosupresyjnie [1]. Wirusy te są również czynnikiem etiologicznym takich chorób jak: wtórne zapalenie wątroby (IBH), krwotoczne zapalenie jelit indyków (HE) czy syndromu spadku nieśności (EDS) [3].

Choroba Mareka (MD) jest wirusową nowotworową chorobą drobiu, której czynnikiem etiologicznym jest herpesvirus choroby Mareka (MDV) [6]. Jedyną skuteczną formą walki jest stosowanie szczepień profilaktycznych. Do produkcji szczepionek używane są szczepy: Rispens/CVI988 oraz FC 126 (HVT). Szczepieniu poddaje się jednodniowe pisklęta tuż po wylęgu lub zarodki w 18. dniu inkubacji (*in ovo*).

Przypadki zakażeń wirusem choroby Mareka MD u ptaków przebiegają coraz częściej z przełamaniem odporności poszczepiennej i rozwinęciem się MD. Jedną z przyczyn obniżenia skuteczności tych szczepień mogą być zakażenia adenowirusami (FAdV) rozpowszechnionymi w populacji drobiu i często izolowanymi z przypadków choroby Mareka.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu zakażenia adenowirusami na replikację szczepu szczepionkowego Rispens/CIV988 w warunkach *in vivo* na pisklętach.

Materiał i metody

Szczepy wirusowe. Do badań wykorzystano szczep szczepionkowy wirusa choroby Mareka Rispens/CIV988, wyizolowany z komercyjnej szczepionki, terenowy szczep adenowirusa JN-5/10j izolat własny oraz referencyjny szczep adenowirusa pozyskany z Charles River Laboratory, US należący do serotypu FAdV-7.

Opracowanie sekwencji starterów i sondy. Do badań wykorzystano opracowane sekwencje starterów do identyfikacji genu pp38 szczepu Rispens pp38-F 5' CCC CAT CTG CTT CAT ACC AT 3', pp38-R 5' GTG ATG GGA AGG CGA TAG AA 3' oraz sondę *Taqman* probe – 5' CCACCGTGACAGCCACTCTC3" jak również sekwencje starterów do identyfikacji genu hexon, FAdV F JSN: 5'AATGTCACNAC-CGARAAGGC 3' and FAdV R JSN: 5'CBGCBTRCATGTACTGGTA 3'. Sekwencje zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3, a następnie zsyntetyzowano w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Real time PCR. Liczbę kopii genu pp 38 wyznaczono dzięki real time PCR. Reakcję wykonano w końcowej objętości mieszaniny w 20 µl: 10,5 µl 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix, 1 µl (0,4 µm) każdego ze starterów dla genu pp38 szczepu Rispens, 1,0 µl (0,02 µm) *Taqman* probes i 4,5 µl of wody jałowej. Zastosowano następujący profil termiczny metody: 50°C przez 2 min, 95°C przez 15 min: 40 cykli – 94°C przez 15 s i 60°C przez 1 min. QuantiTect PCR Probe wykorzystano także do identyfikacji genu hexon. W końcowej objętości 25 µl: 12,5 µl 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix, 1 µl 0,4 µm każdego ze starterów dla genu hexon adenowirusa oraz 8,5 µl wody jałowej. Zastosowano następujący profil termiczny 50°C przez 2 min, 95°C przez 15 min, 40 cykli – 94°C przez 15 s i 55°C przez 1 min.

Pisklęta SPF. Do badań wykorzystano 90 jednodniowych piskląt SPF (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, Niemcy). Pisklętom przez cały okres trwania doświadczenia podawano wodę i paszę *ad libitum*. Pisklęta odchowywano w zwierzętarni klasy CL3+.

Materiał do badań. Wycinki narządów wewnętrznych pobrane od ptaków homogenizowano, następnie trzykrotnie zamrażano i rozmrażano oraz izolowano całkowity komórkowy DNA. Tak przygotowany materiał przechowywano w -20°C do dalszych etapów badań.

Przebieg doświadczeń i wyniki

Pisklęta tuż po wylęgu podzielono na sześć grup, po 15 ptaków w każdej grupie. Szczepionkę podano w mięśnie uda w dawce około 2000 PFU w objętości 0,2 ml w prawą nogę (szczepienie standardowe). Terenowy szczep adenowirusa JN-5/10j w dawce $10^{3,0}$ TCID₅₀ w 0,2 ml podano w identyczny sposób w lewą nogę.

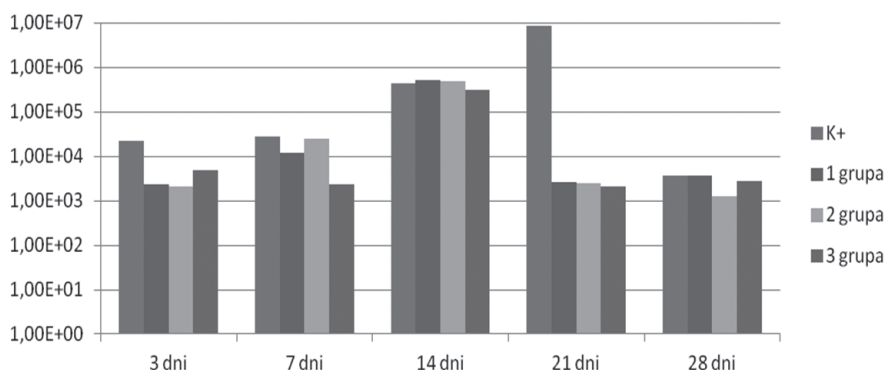
Pisklęta z grupy I trzy godziny po wylęgu zaszczepiono szczepionką przeciwko MD, a po 24 godz. zakażono szczepem adenowirusa JN-5/10j. Pisklęta z grupy II w pierwszym dniu życia jednocześnie szczepiono przeciwko MD i zakażono adenowirusem. Pisklęta z grupy III w pierwszym dniu życia zakażono adenowirusem, a po 24 godz. zaszczepiono szczepionką przeciwko MD. Pisklęta z grupy IV stanowiły kontrolę zakażenia, pisklętom w pierwszym dniu życia podano domięśniowo szczep adenowirusa. Pisklęta z grupy V stanowiły kontrolę szczepienia, w pierwszym dniu życia szczepiono przeciwko MD. W grupie VI kontrolnej pisklęta nie były szczepione ani zakażane.

W 3., 7., 14., 21. oraz 28. dniu życia od 3 ptaków z każdej grupy w czasie badania sekcyjnego pobrano narządy: grasicę, wątrobę, śledzionę, żołądek, jelita, nerki i torbę Fabrycjusza. W próbkach narządów za pomocą real time PCR określono liczbę kopii genu pp38 szczepu Rispens oraz genu hexon szczepu FAdV JN-5/10j.

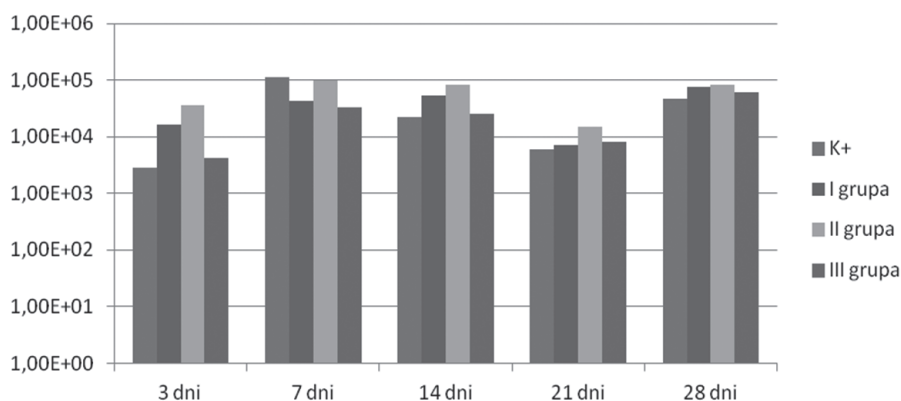
Stwierdzono, iż u ptaków zakażonych terenowym szczepem adenowirusa i szczepionych przeciwko MD widoczne było hamowanie replikacji genu pp38 szczepu Rispens od 3. do 21. dnia trwania doświadczenia we wszystkich badanych narządach wewnętrznych: grasicy, wątrobie, śledzionie, żołądku, nerkach, jelitach oraz torbie Fabrycjusza. Różnica w liczbie kopii genu pp38 w 21. dniu wynosiła około $3,5 \log_{10}$ u ptaków szczepionych i zakażonych w stosunku do ptaków tylko szczepionych. Po tym czasie adenowirus nie miał wpływu na tempo replikacji szczepu Rispens. Liczba kopii genu pp38 szczepu Rispens dla wszystkich badanych narządów wewnętrznych ptaków doświadczalnych utrzymywała się na podobnych poziomach. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 1.

Uzyskane wyniki wskazują, iż szczep Rispens miał wpływ na wzrost replikacji szczepu FAdV JN-5/10j, co na tym etapie badań jest trudne do wytłumaczenia. Najwyższą liczbę kopii genu hexon odnotowano 7., 14. oraz 28. dnia i wynosiła około $10^{4,5}$ do $10^{5,0}$. Średnią liczbę kopii genu hexon adenowirusa w narządach wewnętrznych ptaków przedstawiono na rycinie 2.

Uzyskane wyniki wskazują na wpływ zakażenia adenowirusami na hamowanie replikacji szczepu Rispens/CVI988 u ptaków zakażonych szczepem FAdV i szczepionych przeciwko MD.



Ryc. 1. Średnia liczba kopii genu pp38 szczepu Rispens/CVI988 w narządach wewnętrznych piskląt



Ryc. 2. Średnia liczba kopii genu hexon adenowirusa JN-5/10j w narządach wewnętrznych piskląt

Piśmiennictwo

- [1] Grigić H.C., Philippe D., Nagy E., 2006. Study of vertical transmission of fowl adenoviruses. *The Canadian Journal of Vet. Res.*, 70, 230–233.
- [2] Hess M., 2000. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathol.*, 29, 195–206.
- [3] McFerran J.B., McConnel A.B., 2003. Adenovirus Infections. *Diseases of Poultry*, 11 th Swayne, Iowa State University Press, 213–217.
- [4] Meulemans G., Couvreur B., Decaesstecker M., van den Berg B.P., van den Berg T.P., 2004. Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathol.*, 33, 164–170.
- [5] Raue R., Gerlach H., Muller H., 2005. Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus (PsAdV). *Archive Virology*, 150, 1933–1943.
- [6] Tian F., Luo J., Zhang H., Chang S., Song J., 2012. MiRNA expression signatures induced by Marek's disease virus infection in chickens. *Genomics*, 99, 152–159.

Charakterystyka genetyczna oraz zjadliwość dla kurcząt SPF atypowych szczepów wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza

Genetic characterisation and pathogenicity in SPF chickens of atypical isolates of infectious bursal disease virus

Zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza (choroba Gumboro, IBD) jest wysoce zakaźną chorobą wirusową kurcząt. Czynnikiem etiologicznym jest wirus zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza (IBDV). Narzędziem docelowym IBDV jest torba Fabrycjusza (tF), dlatego wirus upośledza odporność humoralną i powoduje znaczne straty ekonomiczne nie tylko na skutek padnięć ptaków, ale przede wszystkim w efekcie immunosupresji oraz wtórnych infekcji wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych. Wirus IBD jest najsilniejszym znanym immunosupresorem wśród czynników patogennych występujących u drobiu [4]. Zgodnie z polskim ustawodawstwem weterynaryjnym choroba Gumboro podlega obowiązkowi rejestracji.

Wirus IBD jest drobnoustrojem posiadającym genom składający się z 2 segmentów (A i B) dwuniciowego RNA (dsRNA). Do niedawna zjadliwość wirusa była przypisywana tylko proteinie VP2 stanowiącej zewnętrzne białko kapsydu, której kodujący gen znajduje się w segmencie A. W obrębie VP2 zlokalizowana jest wysoce zmienna

domena odpowiedzialna za indukcję przeciwciał neutralizujących i serotypową swoistość [5]. Jednak w ostatnich latach udowodniono przy użyciu metod inżynierii genetycznej (ang. reverse genetics), że VP2 nie jest jedynym białkiem wirusa odpowiedzialnym za zjadliwość IBDV [2]. Dlatego podjęto wiele badań mających na celu wyjaśnienie tego zagadnienia, a wyniki jednoznacznie wskazują na udział białka polimerazy wirusowej (VP1, segment B) w zjadliwości wirusa [1, 2, 3, 6].

W ramach zadań statutowych Zakład Chorób Drobiu PIWet-PIB przebadał i scharakteryzował genetycznie kilkadziesiąt izolatów wirusa choroby Gumboro. Jako rezultat tej charakterystyki, opartej na analizie obydwu segmentów genomu, zidentyfikowano szczepy o atypowej sekwencji nukleotydowej. Ponieważ każda zmiana w obrębie tzw. aminokwasów konserwatywnych może wpływać na zjadliwość wirusa, podjęto dodatkowe badania nad zjadliwością dwóch atypowych szczepów wysoce zjadliwych (vIBDV) celem wyjaśnienia, czy nietypowa sekwencja nukleotydów lub aminokwasów białka polimerazy RNA ma istotny wpływ na zjadliwość wirusa dla kurcząt SPF.

Materiał i metody

Próbki do badań. Materiał stanowiły 2 izolaty atypowego IBDV (Bug/03, 83/11) oraz szczep wysoce zjadliwy 75/11.

Izolacja i mianowanie IBDV na zależonych jajach kurzych SPF. Do badań użyto 10-dniowych zarodków kurzych, które inokulowano materiałem IBDV w ilości 0,1 ml/zarodek na błonę kosmówkowo-omoczniową (CAM). Zakażone zarodki inkubowano w 37°C, prowadząc codzienną obserwację do 6 dni po zakażeniu (d.p.i.). Zarodki padłe w tym okresie i schłodzone w 6. dniu d.p.i. oraz błony kosmówkowo-omoczniove pobierano do dalszych badań. Mianowanie wirusa przeprowadzono, inokulując 10-krotne rozcieńczenia homogenatu z toreb Fabrycjusza, jak opisano wyżej, używając po 4 zarodki na rozcieńczenie. Miano IBDV zostało obliczone zgodnie z metodą Reeda i Muencha [8].

Izolacja wirusowego RNA. Do izolacji wirusowego RNA zastosowano komercyjny zestaw RNeasy Mini kit firmy Qiagen zgodnie z instrukcją producenta.

Reakcja RT-PCR. Charakterystykę molekularną IBDV przeprowadzono przy użyciu opracowanej metody konwencjonalnej RT-PCR z zastosowaniem starterów dla białka VP2 (segment A) oraz VP1 (segment B). Wszystkie reakcje przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnego zestawu One Step RT-PCR firmy Qiagen, umożliwiającego przeprowadzenie reakcji RT-PCR w jednej probówce. W celu amplifikacji genu białka VP2 zaprojektowano parę staterów o nazwach VP2bisF i VP2bisR, a uzyskany produkt o wielkości ok. 735 pz zawierał fragment z tzw. wysoce zmienną domeną VP2 (vVP2). Do analizy wirusowego białka VP1 użyto 7 par staterów (SegB1s-SegB6s/SegB1as-SegB6as oraz B2F i R), które po złożeniu umożli-

liwiają poznanie ok. 98% całego segmentu B. Sekwencje starterów i warunki reakcji RT-PCR są dostępne u autorów niniejszego opracowania.

Elektroforeza w żelu agarozowym. Produkty uzyskane w PCR nanoszono na 2% żel agarozowy z dodanym bromkiem etydyny (1 mg/ml) i poddawano rozdzielni elektroforetycznej przez ok. 1 godz., stosując napięcie 130–150 V, a następnie wizualizowano w świetle UV w systemie do wizualizacji i analizy żeli (MiniBIS PRO 16 mm firmy Bio-Imaging Systems).

Sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna. Sekwencjonowanie zostało wykonane przez firmę Genomed (Polska) w dwóch kierunkach. Charakterystyka molekularna została wykonana przy użyciu programów LaserGene (DNASar) oraz MEGA wersja 5.1.

Zjadliwość na kurczętach SPF. Doświadczenie przeprowadzono w grupach liczących po dziesięć 5-tygodniowych kurcząt SPF. Grupy doświadczalne inokulowano dospojówkowo homogenatem tF zawierającą wirus w ilości 10^5 EID₅₀/0,1 ml na ptaka. Kurczęta po zakażeniu były utrzymywane w klatkach izolowanych dla drobiu z wymuszonym obiegiem powietrza z filtrami HEPA przez okres 10 dni. Kurczęta przed rozpoczęciem i po zakończeniu doświadczenia zostały zważone w celu obliczenia indeksu torby Fabrycjusza (stosunek masy narządu do masy ciała).

Wyniki

Charakterystyka genetyczna. Analiza sekwencji nukleotydowej dla genu białka VP2 wykazała dużą homologię szczepów Bug/03 oraz 83/11 do grupy polskich vvIBDV i znacząco niższą ze szczepami atenuowanymi klasycznymi (acIBDV) (tab. 1). Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność 4 konserwatywnych aminokwasów w obrębie domeny zmiennej białka VP2 typowych dla szczepów vvIBDV (A222, I256, I294 and S299). W przypadku genu białka VP1 homologia była niższa, a różnica pomiędzy szczepami vvIBDV i acIBDV (D78, S706, Winterfield 2512) zaskakująco niewielka (ok. 1%). Sekwencja genu białka polimerazy RNA po analizie i porównaniu z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank wykazała, że polskie izolaty są najbliższe spokrewnione z izolatem 9109 pochodzącym z USA. Szczep ten charakteryzuje się nietypową sekwencją nukleotydową genomu i zachodzi (w zależności od genu) podobieństwo zarówno do klasycznych, wysoce zjadliwych, jak i wariantowych IBDV [7]. Analizując markery zjadliwości w obrębie VP1, okazało się, że badane atypowe izolaty posiadały 5 konserwatywnych aminokwasów z siedmiu charakterystycznych dla szczepów vvIBDV (tab. 2).

Zjadliwość wirusa dla kurcząt SPF. W grupach zakażonych wirusami terenowymi zachorowalność i śmiertelność zaobserwowano pomiędzy 3. a 5. dniem p.i. Izolaty atypowe Bug/03 i 83/11 oraz typowy szczep vvIBDV (75/11) spowodowały odpowiednio 20, 70 i 60 % śmiertelności, przy 60–80% zachorowalności. Ptaki,

które padły pomiędzy 3. a 5. dniem p.i., miały powiększone torby Fabrycjusza, często z obecnością krwawych wybroczyn oraz niezmienione makroskopowo śledziony, a z kolei u ptaków, które przeżyły zakażenie i zostały poddane eutanazji w 10. dniu p.i., obserwowano atrofię tF i powiększoną śledzionę. W grupach kurcząt zakażonych stwierdzono wyraźnie niższe wartości indeksu torby Fabrycjusza w porównaniu z grupą kontrolną ujemną (tab. 3).

Tabela 1. Podobieństwo na poziomie nukleotydowym atypowych szczepów IBDV

| Szczep IBDV | Podobieństwo nukleotydowe [%] | | | |
|-------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| | VP2 | | VP1 | |
| | do polskich szczepów vvIBDV | do szczepów acIBDV | do polskich szczepów vvIBDV | do szczepów acIBDV |
| Bug/03 | 97,9–99,6 | 94,4–94,7 | 90,4–91,5 | 90,5–90,6 |
| 83/11 | 97,6–99,7 | 94,1–94,7 | 90,3–91,4 | 90,4–90,5 |

Tabela 2. Domniemane markery patogenności IBDV w obrębie VP1

| Zjadliwość | izolat | Pochodzenie | VP1 | | | | | | |
|-------------------------|--------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 61 | 145 | 287 | 508 | 511 | 646 | 687 |
| Wysoce zjadliwe | UK661 | Wielka Brytania | I | T | A | K | S | S | P |
| | D6948 | Holandia | I | T | A | K | S | S | P |
| Atypowe wysoce zjadliwe | Bug/03 | Polska | I | S | A | K | S | S | S |
| | 83/11 | Polska | I | S | A | K | S | S | S |
| Atypowy klasyczny | 9109 | USA | I | N | A | K | S | S | S |
| Klasyczne atenuowane | D78 | Holandia | V | N | T | R | R | G | S |

Tabela 3. Zjadliwość izolatów atypowych IBDV dla kurcząt SPF

| Grupa doświadczalna | Izolat challengowy IBDV | Śmiertelność | Wskaźnik rozwoju tF |
|---------------------|-------------------------|--------------|---------------------|
| 1 | Bug/03 | 2/10 (20%) | 0,9–2,4 |
| 2 | 83/11 | 7/10 (70%) | 0,7–1,0 |
| 3 | 75/11* | 6/10 (60%) | 1,0–1,8 |
| 4 | Kontrola ujemna | 0/10 (0%) | 5,2–5,8 |

* kontrola dodatnia

Wnioski

Analiza sekwencji aminokwasowej atypowych izolatów IBDV w obrębie regionu wysoce zmiennego białka VP2 wykazała obecność profilu antygenowego typowego dla szczepów vvIBDV (A222, I256, I294 and S299). W obrębie białka VP1 szczepów atypowych dwa konserwatywne aminokwasy nie pasowały do profilu szczepów vvIBDV (S145, S687). Zaobserwowana zamiana treoniny na serynę w pozycji 145 u szczepów atypowych jest specyficzna tylko dla nich, natomiast obecność seryny w pozycji 687 jest charakterystyczna dla szczepów klasycznych i atenuowanych.

Wyniki doświadczenia zjadliwości szczepów atypowych vvIBDV nie dają jednoznacznej odpowiedzi, czy wraz ze zmianami w obrębie aminokwasów konserwatywnych białka VP1 nastąpiła zmiana zjadliwości wirusa. Szczep 83/11 wykazał podobną zjadliwość do typowych szczepów vvIBDV (75/11), natomiast zjadliwość izolatu Bug/03 jest wyraźnie niższa. Odsetek przypadków śmiertelnych wywołany przez ten izolat jest porównywalny ze szczepem klasycznym, natomiast wskaźniki rozwoju torby Fabrycjusza są podobne do szczepu vvIBDV. W celu wyjaśnienia tych różnic należałoby podjąć analizę sekwencji aminokwasowej całego genomu (segmentu A), która pozwoliłaby wskazać wszystkie mutacje mogące mieć wpływ na zjadliwość wirusa.

Piśmiennictwo

- [1] van den Berg T.P., 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathol.*, 29, 175–194.
- [2] Boot H.J., Hoekman A.J.W., Gielkens A.L.J., 2005. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Arch. Virol.*, 150, 137–144.
- [3] Escaffre O., Le Nouen C., Amelot M., Ambroggio X., Ogden K.M., Guionie O., Toquin D., Muller H., Islam M.R., Eterradossi N., 2013. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, 87, 2767–2780.
- [4] Eterradossi N., Saif Y.M., 2011. Infectious bursal disease [in:] *Poultry Disease*, 185–208.
- [5] Fahey K.J., Erny K., Crooks J., 1989. A conformation immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J. Gen. Virol.*, 70, 1473–1481.
- [6] Nouen C., Toquin D., Muller H., Raue R., Kean K.M., Langlois P., Cherbonnel M., Eterradossi N., 2012. Different domains of RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. *Plos One*, 7, 1: e28064.
- [7] Petkov D., Linnemann E., Kapczyński D.R., Sellers H., 2007. Full length sequence analysis of four IBDV strains with different pathogenicities. *Virus Genes*, 34, 315–326.
- [8] Reed L.J., Muench H., 1938. A simple method of estimation of fifty per cent end-points. *Am. J. Hyg.*, 27, 493–497.

Wirus grypy ptaków H9N2 u indyków w Polsce – charakterystyka pierwszych przypadków

Avian influenza virus H9N2 in turkeys in Poland – characteristics of the first cases

Wirusy grypy ptaków (AI) podtypu H9N2 występują endemicznie u drobiu głównie na Bliskim Wschodzie, a także w Chinach i Azji Południowo-Wschodniej [1, 2, 4, 6, 7]. U drobiu grzebiącego objawy kliniczne występują zazwyczaj w postaci zaburzeń ze strony układu oddechowego, spadków nieśności, a śmiertelność jest zróżnicowana i w powikłanych przypadkach może być niekiedy wysoka.

W przeciwieństwie do podtypów H5 i H7 wirusa AI zakażenia wirusem H9N2 podlegają obowiązkowi zgłaszania i zwalczania tylko w przypadku spełnienia kryterium zjadliwości określonego w Dyrektywie Rady 2005/94/WE, czyli gdy indeks dożylny zjadliwości (IVPI) na kurczętach przekracza wartość 1,2 [6].

Wirusy grypy ptaków H9N2 posiadają potencjał zoonotyczny, co wynika m.in. z ich powinowactwa z receptorami α -2,6 kwasu sialowego, znajdującymi się w nabłonku górnych dróg oddechowych człowieka. Jednak dotychczas odnotowywane kliniczne przypadki zachorowań były nieliczne. Do zakażeń dochodziło m.in. w Hong Kongu i Chinach. Zwykle przebiegały łagodnie i przypominały klasyczną grypę, chociaż u dwojga dzieci w wieku 1 i 4 lata odnotowano wysoką gorączkę (dochodzącą do 40°C), wymioty, ból gardła i brzucha [9].

W kwietniu 2013 r. rozpoznano pierwsze przypadki zakażeń wirusem AI/H9N2 w Polsce, a ich charakterystyka jest tematem niniejszej pracy.

Materiał i metody

Opis przypadków

Ognisko 1: Dnia 24.04.2013 r. do Zakładu Chorób Drobiu PIWet-PIB w Puławach przesłano do badań próbki wymazów z tchawicy i wymazów z kloaki oraz krew pobrane w 5 stadach indyków rzeźnych w wieku 9 tyg. (2 stada) i 13 tyg. (3 stada) o łącznej obsadzie ponad 22 000 ptaków chowanych na fermie w jednym z powiatów województwa lubuskiego. W stadzie obserwowano objawy osowienia i „wyciszenia”, drastycznego spadku pobierania paszy i wody oraz duszność i kaszel. Nie notowano natomiast padnięć lub były one pojedyncze. Dwa tygodnie później dostarczono ponownie próbki krwi do badań serologicznych.

Ognisko 2: W dniach 7 i 9 maja dostarczono do badań wymazy z tchawicy, kloaki i krew z 2 stad indyków rzeźnych w wieku 16 tygodni (łączna obsada 8400 ptaków) innej fermy tego samego powiatu. Zaobserwowane objawy kliniczne były zbliżone do opisywanych wyżej.

Ogniska 3 i 4: Dnia 15 maja przesłano próbki z 2 stad indyków rzeźnych w wieku 4,5 tyg. (obsada 7500 szt.) i 8 tyg. (obsada 8000 szt.) mieszczących się na dwóch kolejnych fermach w tym samym powiecie. Oprócz wymazów z tchawicy, kloaki i krwi pobrano również narządy wewnętrzne (mózg, jelita, płuca, wątroba) od kilku padłych ptaków.

Badania diagnostyczne

Przeprowadzono badania w kierunku grypy ptaków metodą real time (r) RT-PCR/M (wykrywanie wszystkich wirusów typu A), a następnie próbki dodatkowo analizowano metodą rRT-PCR specyficzną dla podtypów H5, H7 i N1 oraz konwencjonalną metodą RT-PCR dla podtypu H9 [8, 10–13]. W przypadku pierwszego badanego stada wykonano również badanie RT-PCR dla podtypu N2 [5]. Produkt PCR po amplifikacji fragmentu genu H9 o wielkości ok. 500 pz poddano sekwencjonowaniu w firmie Genomed (Warszawa). Uzyskaną sekwencję wykorzystano do opracowania drzewa filogenetycznego metodą przyłączania sąsiada w programie MEGA 5, a do porównań użyto sekwencji wirusów H9 znajdujących się w bazie GenBank. Z wybranych próbek dodatnich w rRT-PCR prowadzono izolację wirusa na zarodkach kurzych SPF według standardowej procedury opisanej w podręczniku diagnostycznym grypy ptaków, a płyny zarodkowe wykazujące aktywność hemaglutynacyjną badano metodą hamowania hemaglutynacji w kierunku obecności podtypów H1-H16 wirusa AI [5]. Izolatem wirusa pochodzącym z pierwszego ogniska zakażono dożylnie 10 kurcząt

w wieku 6 tyg. wolnych od przeciwciał dla AI celem określenia indeksu dożyłnej zjadliwości (IVPI) [5]. Badania serologiczne wykonano metodami hamowania hemaglutynacji z antygenami H5, H7 i H9 wirusa AI według standardowej procedury [5] oraz testem ELISA (IDEXX ELISA AIV Multis-Screen).

Wyniki

We wszystkich badanych fermach wykryto obecność materiału genetycznego wirusa grypy ptaków podtypu H9, chociaż wyniki dodatnie nie dotyczyły wszystkich stad pochodzących z badanych ferm. Analizy w kierunku H5, H7 i N1 były ujemne. Próbkę z pierwszego stada były również dodatnie w kierunku genu N2, jednak intensywność prążka była znacznie niższa niż w RT-PCR/H9, a obniżona czułość wynika prawdopodobnie z braku pełnego dopasowania starterów i sekwencji. W badaniach serologicznych próbki z ogniska 1 były ujemne w pierwszym badaniu, natomiast wyniki dodatnie stwierdzono w próbkach pobranych 2 tygodnie później. Surowice z pozostałych ferm były dodatnie zarówno w teście ELISA, jak również w teście HI z antygenem H9 (w kierunku H5 i H7 – wynik ujemny), przy czym wyższy odsetek wyników dodatnich odnotowano w teście HI. Indeks dożyłnej zjadliwości wykazał wartość 0,0 (szczep niezjadliwy). Wstępne badania filogenetyczne wykazały, że izolat AIV/H9N2 z pierwszego ogniska jest blisko spokrewniony z wirusami AI/H9 wykrytymi u dzikich ptaków (kaczek krzyżówek) oraz u indyków w 2011 r. w Europie, jest jednak odległy filogenetycznie od szczepów krążących na Bliskim Wschodzie i w Chinach.

Wnioski

Niniejsze opracowanie jest pierwszym w kraju doniesieniem dotyczącym zakażeń wirusami grypy ptaków H9N2 w Polsce. Indyki wykazywały objawy grypy ptaków o niskiej zjadliwości (np. objawy oddechowe), jednak mało charakterystyczne i często spotykane w przebiegu zakażeń innymi patogenami układu oddechowego. Ze względu na powiązania epidemiologiczne pomiędzy poszczególnymi ogniskami określenie zjadliwości oraz podtypu neuraminidazy wykonano tylko w odniesieniu do izolatu z pierwszej fermy. We wszystkich przypadkach indyki były odchowywane do 4. tygodnia życia w Niemczech, tak więc znajomość sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania zakażeń H9N2 w tym kraju znacznie ułatwiłaby ustalenie źródła pochodzenia wirusa. Wstępne badania filogenetyczne pozwalają na obecnym etapie stwierdzić, że nie ma powiązań epidemiologicznych z przypadkami grypy H9N2 na Bliskim Wschodzie i w Chinach, mogą jednak sugerować, że pierwotnym źródłem wprowadzenia wirusa do populacji drobiu były ptaki dzikie. Izolat z pierwszego zgłoszonego przypadku wykazał niską zjadliwość

(IVPI=0,0) i zgodnie z definicją grypy ptaków zakażenia tym wirusem nie podlegają obowiązkowi zwalczania [6]. Pozostają jednak nierozwiązane kwestie. Po pierwsze, zakażenia powodują straty ekonomiczne wynikające przede wszystkim z wydłużenia okresu tuczu i kosztów zwalczania zakażeń wtórnych, dlatego niezbędne jest podniesienie świadomości lekarzy weterynarii i hodowców, że pojawił się nowy czynnik zakaźny u drobiu w kraju. Po drugie, wskazane jest monitorowanie rozwoju sytuacji i śledzenie zmian genetycznych, jakie będą pojawiać się w ewentualnych nowych ogniskach, gdyż konsekwencje epidemiologiczne mogą być znaczące, chociaż trudne do oszacowania na obecnym etapie. Po trzecie, z uwagi na potencjał zoonotyczny konieczne są dalsze badania molekularne celem ustalenia markerów adaptacji do organizmu człowieka.

Piśmiennictwo

- [1] Abdel-Moneim A.S., Affi M.A., El-Kady M.F., 2012. Isolation and mutation trend analysis of influenza A virus subtype H9N2 in Egypt. *Virology*, 27, 9, 173.
- [2] Bashashati M., Vasfi Marandi M., Sabouri F., 2013. Genetic diversity of early (1998) and recent (2010) avian influenza H9N2 virus strains isolated from poultry in Iran. *Arch. Virol.* [Epub ahead of print].
- [3] Capua I., Terregino C., Cattoli G., Mutinelli F., Rodriguez J.F., 2003. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.*, 32, 47–55.
- [4] Chen F., Yan Z.Q., Liu J., Ji J., Chang S., Liu D., Qin J.P., Ma J.Y., Bi Y.Z., Xie Q.M., 2012. Phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of 40 H9N2 subtype avian influenza viruses isolated from poultry in China from 2010 to 2011. *Virus Genes*, 45, 69–75.
- [5] Dyrektywa Rady 2005/94/WE z dnia 20 grudnia 2005 r. w sprawie wspólnotowych środków zwalczania grypy ptaków i uchylająca dyrektywę 92/40/EWG. *Dz.U. L 10 z 14.1.2006*, 1–64.
- [6] Decyzja Komisji z dnia 4 sierpnia 2006 r. zatwierdzająca podręcznik diagnostyczny dotyczący grypy ptaków, przewidziany w dyrektywie Rady 2005/94/WE, *Dziennik Urzędowy L 237, 31/08/2006 P. 0001–0027*.
- [7] Iqbal M., Yaqub T., Reddy K., McCauley J.W., 2009. Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses. *PLoS One*, 11, 4, e5788.
- [8] Lee M.S., Chang P.C., Shien J.H., Cheng M.C., Shieh H.K., 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods*, 97, 13–22.
- [9] Malik Peiris J.S., 2009. Avian influenza viruses in humans. *Rev. Sci. Tech.*, 28, 161–73.
- [10] Payungporn S., Chutinimitkul S., Chaisingh A., Damrongwantanapokin S., Buranathai C., Amonsin A., Theamboonlers A., Poovorawan Y., 2006. Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection. *J. Microbiol. Methods*, 131, 143–147.

- [11] Slomka M.J., Pavlidis T., Banks J., Shell W., McNally A., Essen S., Brown I.H., 2007. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. *Avian Dis.*, 51(Suppl.1), 373–377.
- [12] Slomka M.J., Pavlidis T., Coward V.J., Voeremans J., Koch G., Hanna A., Banks J., Brown I.H., 2009. Validated real time reverse transcriptase PCR methods for the diagnosis and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses*, 3, 151–164.
- [13] Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L., 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3256–3260.

Zastosowanie kart FTA[®] w diagnostyce grypy ptaków i rzekomego pomoru drobiu

The use of FTA[®] cards for diagnosis of avian influenza and newcastle disease

Grypa ptaków (influenza ptaków, AI) i rzekomy pomór drobiu (choroba Newcastle, ND) są najgroźniejszymi chorobami zakaźnymi ptaków podlegającymi obowiązkowi zgłaszania i zwalczania [7]. Ze względu na duże zróżnicowanie patogenności wirusów AI i ND i wynikające z tego kryteria dla choroby zwalczanej z urzędu w przypadku podejrzenia AI lub ND niezbędne jest przeprowadzenie laboratoryjnych badań diagnostycznych. W ostatnich latach rozpoznanie obu chorób uległo znaczącemu skróceniu dzięki wdrożeniu, również w Krajowym Laboratorium Referencyjnym (KLR) ds. AI i ND ZCHD PIWet-PIB, molekularnych metod jak RT-PCR i RT-PCR w czasie rzeczywistym (real time RT-PCR, rRT-PCR) do wykrywania i identyfikacji wirusów AI i ND oraz sekwencjonowanie do określenia patotypu tych wirusów. Zgodnie z międzynarodowymi przepisami (OIE, WHO) transport próbek materiału biologicznego do badań diagnostycznych, zwłaszcza w kierunku AI, musi odbywać się z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności i bezpieczeństwa biologicznego. Procedury te są drogie, czasochłonne i logistycznie skomplikowane. Ponadto, trudne jest zapewnienie właściwych warunków przechowywania i transportu materiału biologicznego, jak utrzymanie łańcucha chłodniczego i krótki czas od pobrania próbki do dostarczenia do laboratorium (w ciągu 24 godz.).

Karta FTA® (Flinders Technology Associates filter paper®) jest rodzajem bibuły filtracyjnej zawierającej związki chemiczne, które denaturują białka mikroorganizmów (próbki stają się niezakaźne), powodują lizę komórek i wiążą uwolnione z nich kwasy nukleinowe (DNA i/lub RNA). Umożliwia to przechowywanie próbek w temperaturze pokojowej, transport bez konieczności zachowania wyżej wymienionych warunków i środków bezpieczeństwa, a także długotrwałą stabilność kwasów nukleinowych do późniejszych badań molekularnych. W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań, które wykazały przydatność kart FTA® do pobierania, inaktywacji i przechowywania takich wirusów ptaków jak wirus choroby Mareka, wirus zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza i wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli [2, 3, 4]. Mniej poznana jest efektywność kart FTA® w odniesieniu do wirusów AI i ND [1, 5, 6].

Celem pracy była ocena:

- przydatności kart FTA® do bezpiecznego przesyłania próbek do badań w kierunku grypy ptaków i rzekomego pomoru drobiu,
- stabilności materiału wirusowego (płyny zarodkowe, wymazy i tkanki z wirusami AI i ND) przechowywanego na karcie FTA® w różnych temperaturach.

Materiał i metody

Wirusy. W badaniach użyto następujących wirusów:

- Wirusy grypy ptaków (AIV):
 - słabo patogenny szczep referencyjny podtypu H7: LPAIV/H7N1 (źródło: AHVLA Weybridge),
 - wysoce patogenny szczep podtypu H5: HPAIV/H5N1 (izolat własny 35/07).
- Wirusy rzekomego pomoru drobiu (NDV):
 - lentogeniczny szczep szczepionkowy LaSota: NDV/LaSota (szczep macierzysty szczepionki Vaccina L, kolekcja ZCHD PIWet-PIB,
 - welogeniczny szczep Radom: vNDV/Radom (izolat własny z lat 70.).

Karty FTA®. W badaniach użyto dwóch rodzajów kart FTA® firmy Whatman (ryc. 1):

- klasyczna karta FTA® (FTA® Classic Card),
- klasyczna karta FTA® z barwnym indykatozem (Indicating FTA® Classic Card).

Przygotowanie materiału wirusowego do badań. Wybrane szczepy AIV i NDV namnażano na zarodkach kurzych SPF poprzez zakażenie do worka omocznioowego w 9.–10. dniu inkubacji. Płyny zarodkowe pobrane z zarodków padłych lub schłodzonych w 5.–6. dniu p.i. badano na aktywność hemaglutynacyjną (HA) i po spulowaniu określano miano EID₅₀. Do czasu użycia materiały wirusowe przechowywano w temperaturze -70°C. Płyny zarodkowe pobrane od nie zakażonych zarodków SPF używano jako kontroli ujemnej.

Izolacja wirusowego RNA. W celu ekstrakcji wirusowego RNA użyto komercyjnego zestawu RNasy Mini Kit (Qiagen, Niemcy) według procedury producenta.



Ryc. 1. Karty FTA® klasyczna i klasyczna z barwnym indykatorem

Reakcje RT-PCR. RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania genu matriks (rRT-PCR/M) wirusów grypy typu A i konwencjonalny RT-PCR do wykrywania AIV podtypu H5 (RT-PCR/H5) i H7 (RT-PCR/H7) przeprowadzano zgodnie z procedurami zakładowymi, odpowiednio: ZCHD/PB-03 i ZCHD/PB-25. Natomiast rRT-PCR/M do wykrywania NDV i konwencjonalny RT-PCR do wykrywania genu F NDV (RT-PCR/F) przeprowadzano według procedur, odpowiednio: ZCHD/PB-30 i ZCHD/PB-20.

Sekwencjonowanie. Produkty RT-PCR/H5 i H7 i RT-PCR/F sekwencjonowano przy użyciu aparatu AB 3500 (Applied Biosystems) zgodnie z procedurą zakładową ZCHD/PB-31.

Inaktywacja wirusów na kartach FTA®. Każdy z użytych szczepów AIV i NDV w koncentracji 10^6 EID₅₀/ml nakrapiano (aplikowano) na klasyczną kartę FTA® z barwnym indykatorem w ilości po 0,1 ml na środek wyznaczonego miejsca dla próbek (4 okrągłe pola na karcie) w dwóch powtórzeniach dla 3 terminów badań i przechowywano w temperaturze pokojowej (ok. 21°C) w plastikowych woreczkach umieszczonych w kartonowym pudełku. Do reizolacji wirusów w wyznaczonym czasie (1 godz., 1 dzień i 3 dni po nakropieniu) z kart wycinano całe pole (krążek) nasączone materiałem wirusowym i po umieszczeniu w 1 ml PBS (pH 7,2) wirowano w 1500 rpm przez 10 min. Następnie eluatem zakażano po 4 zarodki SPF do worka omocznioowego w 9.–10. dniu inkubacji (0,2 ml/zarodek). Po 5–6 dniach p.i. płyny zarodkowe badano na aktywność HA zgodnie z procedurą ZCHD/PB-1. W przypadku ujemnego wyniku HA wykonywano kolejny ślepy pasaż na zarodkach.

Czułość wykrywania wirusowego RNA z kart FTA®. Sporządzano szereg 10-krotnych rozcieńczeń płynów zarodkowych z badanymi szczepami AIV i NDV w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) odpowiadających dawkom od 10^6 do 10^1 EID₅₀/ml. Następnie 0,1 ml każdego rozcieńczenia nakrapiano na pole dla próbek klasycznej karty FTA® z barwnym indykatorem (po 2 pola/rozcieńczenie) i karty pozostawiano do wysuszenia w temperaturze pokojowej przez co najmniej 1 godz. W ten sam sposób przygotowywano kontrolę ujemną, aplikując na pole karty 0,1 ml płynu zarodkowego z nie zakażonych zarodków SPF. Następnie z każdego pola wycinano

ok. $\frac{1}{4}$ (25%) jego powierzchni i umieszczano w probówce Ependorff z 0,2 ml buforu TE, wortexowano przez 15 sekund i pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 10 min. Do izolacji RNA pobierano 0,1 ml eluatu. Dla porównania izolowano również RNA bezpośrednio ze sporządzonych rozcieńczeń materiałów wirusowych. Identyfikację wirusów w wyizolowanym RNA prowadzono przy użyciu rRT-PCR/M dla wirusów AIV i NDV oraz RT-PCR/H5 i H7 dla AIV i RT-PCR/F dla NDV.

Stabilność RNA AIV i NDV na kartach FTA[®]. Rozcieńczeniem płynów zarodkowych z użytymi w badaniach wirusami odpowiadającym dawce 10^6 EID₅₀/ml inokulowano pola kart FTA[®] z barwnym indykátorem, przeznaczając 0,1 ml/pole. Inokulowane wirusami karty pozostawiano w temperaturze pokojowej do wysuszenia przez 1 godz., po czym pakowano do kartonowych pudełek w woreczkach foliowych i jedną część kart postawiano w temperaturze pokojowej, a drugą umieszczano w temperaturze -20°C . Pierwszą izolację wirusowego RNA z kart przeprowadzono po upływie 1 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie z kart przechowywanych w obu temperaturach (pokojowa i -20°C) pobierano próbki (w sposób opisany w części dotyczącej badania czułości) w terminach: 1, 7, 30, 60, 90, 120 i 150 dni. Dla porównania w tych samych terminach izolowano RNA z użytych do aplikacji kart FTA[®] wirusów w dawce 10^6 EID₅₀/ml i przechowywanych w temperaturze -70°C .

Wykrywanie AIV i NDV z odcisków wymazów i narządów na kartach FTA[®]. Od 5 kurcząt SPF zakażonych w 10 tyg. życia szczepem H5N1 HPAIV lub szczepem Radom vNDV donosowo i dospojówkowo dawką 10^6 EID₅₀/ptaka i utrzymywanych w klatkach izolowanych (w warunkach ujemnego ciśnienia), umieszczonych w pomieszczeniu o poziomie biobezpieczeństwa PCL 3, pobierano wymazy z gardzieli i kloaki oraz pośmiertnie wycinki narządów: płuca, śledziona, nerki i mózg, które odciskano na polach dla próbek w klasycznej karcie FTA[®]. Karty po wyschnięciu (min. 1 godz.) i umieszczeniu w foliowych woreczkach z zamknięciem strunowym przenoszono z zachowaniem zasad biobezpieczeństwa do laboratorium klasy PCL 3 plus, gdzie po umieszczeniu w kartonowym pudełku pozostawały w temperaturze pokojowej do czasu badania (do 3 dni od pobrania).

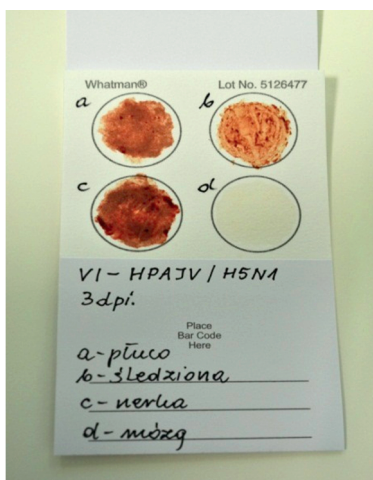
Wyniki i omówienie

Inaktywacja wirusów AI i ND na kartach FTA[®]. W płynach pobranych z zarodków inokulowanych eluatem z kart FTA nasączonych wirusami AIV/H7N1 i H5N1 oraz NDV/LaSota i Radom w żadnych z badanych terminów – po 1 godz., 1 dniu i 3 dniach utrzymywania w temperaturze pokojowej nie stwierdzono obecności żywego wirusa (ujemny wynik hemaglutynacji) zarówno po pierwszym, jak i drugim pasażu. Wyniki te wskazują na całkowitą inaktywację wirusów AI i ND na kartach FTA już po upływie 1 godziny od nałożenia na nie materiału wirusowego.

Czułość wykrywania wirusowego RNA z kart FTA[®]. RNA wirusów AI było wykrywane z kart FTA[®] metodą rRT-PCR dla genu M do koncentracji $10^3\text{EID}_{50}/\text{ml}$ dla LPAIV/H7N1 i $10^5\text{EID}_{50}/\text{ml}$ dla HPAIV/H5N1 i było dziesięciokrotnie wyższe w porównaniu z wykrywalnością RNA obu wirusów AI w płynach zarodkowych przed ich inaktywacją na kartach FTA. Natomiast minimalne wykrywane miano z kart FTA, gdzie możliwe było określenie patotypu badanych wirusów przez sekwencjonowanie produktu RT-PCR/H5 i H7, było takie samo w odniesieniu do HPAI/H5N1 i 10-krotnie wyższe w przypadku LPAI/H7N1. Z kolei RNA wirusów ND było wykrywane z kart FTA[®] metodą rRT-PCR dla genu M NDV do koncentracji $10^2\text{EID}_{50}/\text{ml}$ i $10^4\text{EID}_{50}/\text{ml}$, odpowiednio dla NDV/LaSota i vNDV/Radom, i było takie samo w porównaniu z wykrywalnością RNA obu wirusów ND w płynach zarodkowych przed ich inaktywacją na kartach FTA. Natomiast minimalne wykrywane miano, gdzie możliwe było określenie patotypu badanych wirusów przez sekwencjonowanie produktu RT-PCR/F, było 10- (vNDV/Radom) i 100-krotnie (NDV/LaSota) wyższe.

Stabilność RNA AIV i NDV na kartach FTA[®]. Stabilność RNA wirusów AI i ND na kartach FTA nasączonych płynem zarodkowym z wirusami AI (H7N1 i H5N1) i ND (LaSota i Radom) o koncentracji wyjściowej około $10^6\text{EID}_{50}/\text{ml}$ badano metodami: rRT-PCR/M AIV i NDV oraz RT-PCR/H5 i H7 AIV oraz RT-PCR/F NDV w próbkach kart FTA pobranych po 1, 7, 30, 60, 90, 120 i 150 dniach (ostatnie badanie) przechowywania w temperaturze pokojowej oraz -20°C i porównywano z materiałem wyjściowym tych wirusów przechowywanych w temperaturze -70°C . RNA wszystkich wirusów (dawka $10^6\text{EID}_{50}/\text{ml}$) badanych metodą rRT-PCR/M było wykrywane z kart FTA[®] do ostatniego terminu przechowywania w obu temperaturach, podobnie jak RNA wyjściowego materiału wirusowego przechowywanego w temperaturze -70°C , przy czym spadek ilości RNA w badanym okresie był zasadniczo obserwowany tylko w próbkach pobranych z kart FTA[®] przechowywanych w temperaturze pokojowej. Wyniki RT-PCR były takie same dla wszystkich wirusów przechowywanych na kartach FTA w -20°C , natomiast w temperaturze pokojowej ich stabilność była krótsza i RNA AIV wykrywano do 90 dni, a NDV tylko do 7 dni.

Wykrywanie AIV i NDV z odcisków wymazów i narządów na kartach FTA[®]. Dodatkowo wyniki rRT-PCR/M dla AIV i NDV uzyskano z wszystkich rodzajów próbek (wymazy z gardzieli i kloaki oraz płuca, śledziona, nerki i mózg) pobranych na karty FTA[®] (ryc. 2) w 3. i 4. dniu p.i. kurcząt SPF wirusem AIV/H5N1 oraz 3. i 5. dniu p.i. wirusem vNDV/Radom, a uzyskane wartości Ct wskazywały na dużą koncentrację tych wirusów. W takich samych rodzajach próbek pobranych od kontrolnych kurcząt SPF na karty FTA i badanych jak wyżej nie wykrywano wirusowego RNA.



Ryc. 2. Odciski narządów kurczątk eksperymentalnie zakażonych wirusem AIV/H5N1 na kartach FTA

Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że karty FTA[®] mogą być użyteczne do łatwego (przesyłka kurierska w temperaturze pokojowej) i bezpiecznego (szybka inaktywacja) przesyłania materiałów potencjalnie zakaźnych, w tym wymagających szczególnych środków ostrożności wirusów grypy ptaków i rzekomego pomoru drobiu do badań diagnostycznych metodami biologii molekularnej w celu nie tylko ich wykrycia i identyfikacji, ale również określenia podtypu (AIV) i patotypu (AIV i NDV). Wykrywane z kart FTA[®] najniższe stężenia wynosiły dla wirusów AI 10^3 i 10^5 EID₅₀/ml a dla wirusów ND 10^2 i 10^4 EID₅₀/ml, przy czym były niższe dla szczepów niezjadliwych. RNA wirusów AI i ND było wykrywane na kartach FTA[®] metodą rRT-PCR do co najmniej 150 dni przechowywania w obu porównywanych temperaturach, jednak ich przechowywanie w temperaturze -20°C sprzyjało lepszej stabilności RNA w porównaniu z temperaturą pokojową, gdzie możliwość detekcji (RT-PCR) i określenia patotypu (sekwencjonowanie) była krótsza a także zróżnicowana w zależności od wirusa (AIV – do 90 dni, NDV – do 7 dni).

Piśmiennictwo

- [1] Abdelwhab E.M., Luschow D., Harder T.C., Hafiz H.M., 2011. The use of FTA[®] filter papers for diagnosis of avian influenza virus. J.Virol.Meth., 174, 120–122.
- [2] Cortes A.L., Montiel E.R., Gimeno I.M., 2009. Validation of Marek's disease diagnosis and monitoring of Marek's disease vaccines from samples collected in FTA[®] cards. Avian Dis., 54, 510–516.

- [3] Moscoso H., Raybon E.O., Thayer S.G., Hofacre C.L., 2005. Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA[®] filter paper. *Avian Dis.*, 49, 24–29.
- [4] Moscoso H., Alvarado I., Hofacre C.L., 2006. Molecular analysis of infectious bursal disease virus from bursal tissues collected on FTA[®] filter paper. *Avian Dis.*, 50, 391–396.
- [5] Narayanan M.S., Parthiban M., Sathiya P., Kumanan K., 2010. Molecular detection of Newcastle disease virus using Flinder Tehnology Asspociates-PCR. *Vet. Arch.*, 80, 51–60.
- [6] Perozo F., Villegas P., Estevez C., Alvarado I., Purvis L.B., 2006. Use of FTA[®] filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. *Avian Pathol.*, 35, 93–98.
- [7] Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz.U. Nr 69, poz. 625 z późniejszymi zmianami).

Zakażenia rotawirusowe u drobiu w Polsce

Rotavirus infections of poultry in Poland

Wirusowe stany patologiczne (enteropatie) u drobiu, szczególnie u indyków ale również u kurcząt, mogą prowadzić do dużych strat ekonomicznych, głównie z powodu mniejszych przyrostów masy ciała. Najważniejszymi wirusami odpowiedzialnymi za enteropatie są adenowirusy, astrowirusy, koronawirusy indyckie, reowirusy, torowirusy oraz rotawirusy. Rotawirusy po raz pierwszy zostały zidentyfikowane jako przyczyna wodnistej biegunki i podwyższonej śmiertelności indyków w 1977 r. [1]. Od tamtej pory ukazało się wiele publikacji raportujących zakażenia rotawirusowe w stadach drobiu.

Rotawirus (RV) należy do rodziny *Reoviridae*. Bezotoczkowy wirion ma średnicę ok. 70–75 nm i składa się z 3 koncentrycznych warstw białka tworzących rdzeń zamknięty wewnątrz dwuwarstwowego kapsydu złożonego z zewnętrznej i wewnętrznej ściany. Rotawirus obserwowany przez mikroskop elektronowy przypomina koło z krótkimi szprychami odchodzącymi ze środka, stąd nazwa *rota*, który w łacinie oznacza koło. Informacja genetyczna wirusa zapisana jest na 11 segmentach dwułańcuchowego RNA [6]. W linii komórkowej MA104 zakażonej rotawirusem indyckim zidentyfikowano 10 białek wirusowych, z których 7 to białka strukturalne tworzące zewnętrzną i wewnętrzną ścianę, natomiast 3 pozostałe to białka niestrukturalne [4]. Badania serologiczne wykazały duże zróżnicowanie antygenowe rotawirusów, które można podzielić na grupy, podgrupy oraz typy. O przynależności do danej grupy decyduje budowa białka VP6 tworzącego kapsyd wewnętrzny. Według tego kryterium istnieje 7 serogrup (RVA-RVG), przy czym rotawirusy grupy A izo-

lowano zarówno od ssaków, jak i ptaków, natomiast z grupy B, C i E tylko od ssaków, a D, F i G tylko od ptaków. O przynależności do typu decydują epitopy znajdujące się na białku VP7 tworzącym zewnętrzny kapsyd (klasyfikacja do serotypu G) oraz na białku VP4 tworzącym wypustki (klasyfikacja do serotypu P). Do tej pory wśród rotawirusów należących do grupy A zidentyfikowano 19 serotypów G i 27 serotypów P, przy czym u ptaków były to RVA G7P17 [5].

Celem pracy była ocena występowania zakażeń rotawirusami w stadach indyków ras rzeźnych i kurcząt brojlerów w Polsce oraz ich charakterystyka molekularna.

Materiał i metody

Pobieranie i przygotowanie próbek

W okresie od stycznia 2008 do maja 2013 r. pobrano próbki z 257 stad indyków (po 10 indywidualnych wymazów kałowych ze stada), w wieku od 1 do 20 tyg., z różnych regionów kraju. Od 2011 r. do badań włączono także stada kur i do maja 2013 r. zgromadzono próbki (tkanki/narządy jak nerki, tchawica, trzustka, jelita oraz wymazy kałowe – 10 próbek/stado) ze 103 stad brojlerów kurzych, kur reprodukcyjnych oraz komercyjnych niosek w wieku od 1 do 73 tygodni. Ptaki w większości badanych stad wykazywały jeden lub więcej objawów enteropatii (biegunka, skupianie się ptaków – zaburzenia termoregulacji, osowienie, zahamowanie wzrostu), jednak część badanych stad była w dobrej kondycji zdrowotnej. Do czasu badań wszystkie próbki były przechowywane w temperaturze -65°C . Po powolnym rozmrożeniu każdy wymaz umieszczano w roztworze PBS z antybiotykami, inkubowano 1 godz. w temp. pokojowej, a następnie klarowano, wirując przez 20 min w $1500 \times g$. Z pobranych tkanek/narządów przygotowano 20% homogenaty i również wirowano. Do izolacji RNA pobierano 200 μl superanatanu, przy czym w przypadku próbek wymazów pulowano po 5 próbek indywidualnych w dwie próbki zbiorcze/stado. Do izolacji RNA użyto komercyjnego zestawu RNeasy Mini kit (Qiagen, Niemcy).

Metoda PCR i badanie pokrewieństwa filogenetycznego

Do badania obecności materiału genetycznego rotawirusów wykorzystano metodę jednoetapowego RT-PCR, w której użyte startery miały sekwencje komplementarne do genu białka niestrukturalnego NSP4 [2]. Uzyskane produkty PCR wizualizowano na 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy (1 mg/ml). W pozytywnych przypadkach obserwowano prążek wielkości ok. 630 par zasad (pz). Ponadto zidentyfikowane próbki rota-dodatnie analizowano w real time RT-PCR, w których zastosowane startery były komplementarne do konserwatywnych regionów genu białka VP6 grup RVA i RVD, umożliwiające określenie przynależności rotawirusów do grupy A i/lub D [9].

Produkty amplifikacji genu NSP4 sekwencjonowano we własnym zakresie, używając aparatu Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems, USA) lub korzystano z komercyjnego serwisu Genomed Sp. z o.o. Uzyskane sekwencje nukleotydowe składano w kontig przy użyciu programu SeqMan (DNASTAR, Madison, WI). Metodą Clustal W porównano otrzymane sekwencje polskich izolatów z kilkoma dostępnymi w bazie danych GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), korzystając z programu MegAlign (DNASTAR, Madison, WI). Drzewo filogenetyczne skonstruowano metodą neighbor-joining. Sekwencje nt zostały przepisane na sekwencje aminokwasów (aa), które także porównano w celu oszacowania czy zmiany w sekwencjach nt przekładają się na zmiany aa.

Analiza statystyczna

Dane dotyczące badanych stad takie jak stan zdrowia i wiek oraz wyniki uzyskane w tych badaniach (obecność/brak rotawirusów) były poddane analizie statystycznej. Do badań korelacji pomiędzy ww. parametrami stosowano metodę Spearmana (poziom istotności $p < 0,05$).

Wyniki

Spośród 257 przebadanych stad indyckich w 65 (25,3%) wykazano zakażenie rotawirusami, z czego po 10 stad (12,5 oraz 17,8%) przebadanych w 2008 i 2009 r., 6 stad (18,7%) w 2010 r., 17 (41%) w 2011 r., 20 stad (42%) w 2012 r. i 3 stada (30%) w 2013 r. W zdecydowanej większości zakażone ptaki były w wieku 1–3 tygodni, ale okazjonalnie rotawirusy wykrywano także u starszych indyków, najstarsze rota-dodatnie stado miało 10 tyg. W przypadku stad kur rotawirusy wykryto w 11 stadach, z czego w 5 stadach (20,8%) w 2011 r., 4 stadach (6,5%) w 2012 r. oraz 2 stadach (11,8%) w 2013 r. Badane wirusy identyfikowano w różnych typach produkcyjnych kur, zarówno u kurcząt broilerów, jak i nioskach/stadach rodzicielskich w wieku od 2 do 50 tygodni. Spośród 65 RV-dodatnich próbek od indyków 51 poddano analizie identyfikującej grupę A i/lub D. W przeważającej większości wykryte rotawirusy należały do grupy A (45 próbek, 88,2%), zaledwie 6 próbek oprócz wirusa grupy A zawierało także RVD. W przypadku 5 próbek nie udało się określić grupy zidentyfikowanego rotawirusa.

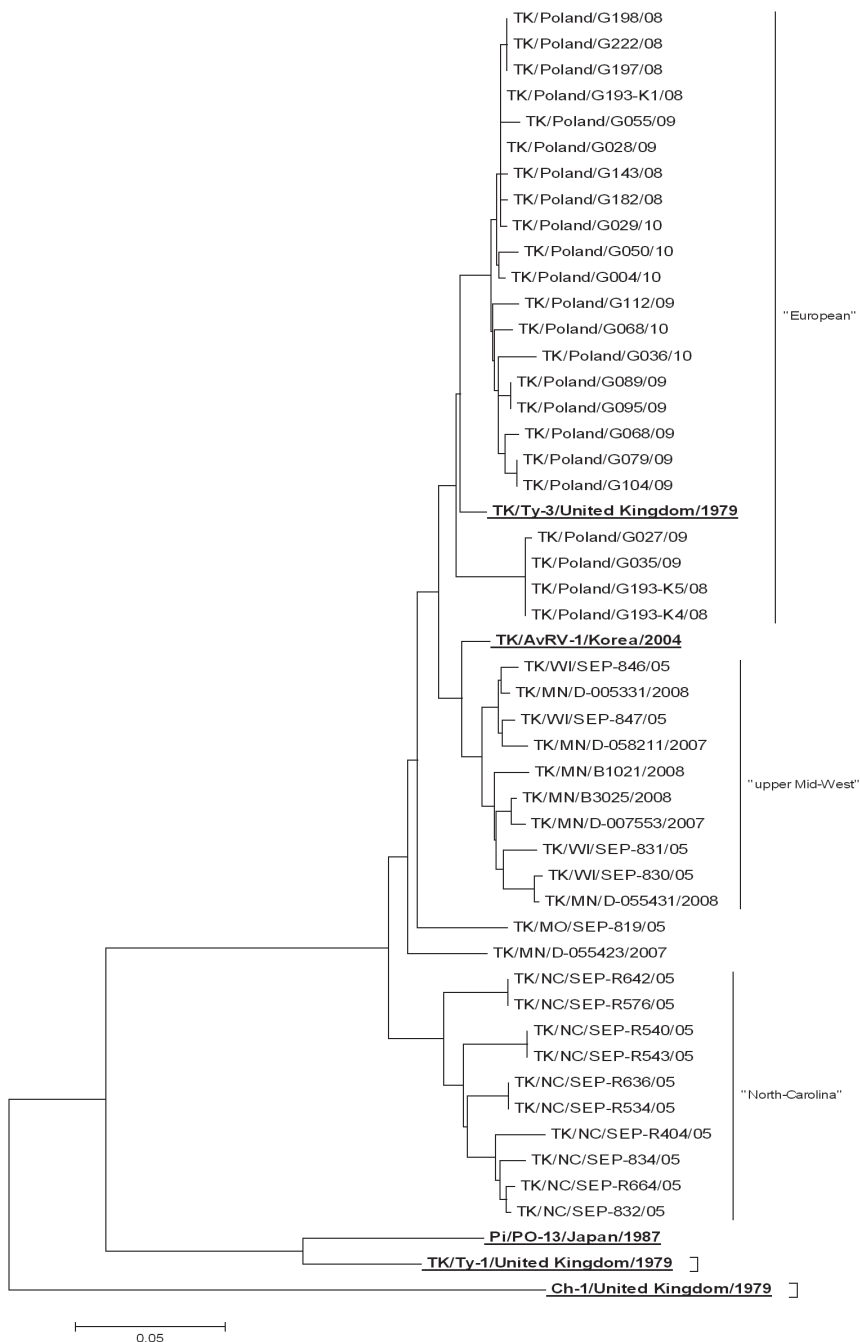
Sekwencjonowaniu poddano produkty amplifikacji z 23 rota-dodatnich próbek od indyków. Sekwencje nukleotydowe polskich rotawirusów wykazywały podobieństwo między sobą na poziomie 95,1–100%, z kolei ich homologia do referencyjnego szczepu Ty-3 oraz północno-amerykańskich rotawirusów wynosiła odpowiednio 96,7–98,1% i 91,8–97,0%. Na poziomie sekwencji aminokwasów homologia pomiędzy polskimi izolatami wynosi 95–100%, natomiast do referencyjnego Ty-3 96,9–99,4%, a do szczepów północnoamerykańskich 93,7–96,2%.

Fragmety genu NSP4 o wielkości 570 nt 23 polskich rotawirusów zostały porównane z sekwencjami z GenBanku. Analiza filogenetyczna wykazała, że wszystkie polskie rotawirusy znajdują się w jednej grupie razem z referencyjnym Ty-3 wyizolowanym od indyków w Wielkiej Brytanii w 1979 r. (ryc. 1). Jednakże nie stanowiły one jednorodnej grupy, gdyż 19 szczepów znajdowało się w podgrupie I, natomiast kolejne 4 szczepy w podgrupie II. Poza tym dodatkowe 2 podgrupy tworzyły rotawirusy północnoamerykańskie, opisywane jako podgrupy „upper Mid-West” i „North-Carolina”. Sekwencje genu NSP4 rotawirusów izolowanych od kurcząt oraz gołębia (odpowiednio Ch-1, PO-13) były odmienne od analizowanych izolatów rotawirusowych od indyków i tworzyły odrębną grupę. Aktualnie prowadzone są prace nad sekwencjonowaniem zidentyfikowanych rotawirusów w krajowych stadach kur i kurcząt (11 próbek dodatnich).

Analiza statystyczna wykazała ujemną korelację pomiędzy wiekiem a występowaniem rotawirusów, co oznacza częstsze występowanie tych patogenów u młodych zwierząt. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem rotawirusów a stanem zdrowia badanego drobiu.

Wnioski

Na terytorium Polski 25,3% komercyjnych stad indyków mięsnych wykazało zakażenie rotawirusowe. Zdecydowana większość (88,2%) należała do grupy RVA, w 9,3% stad dodatkowo identyfikowano RVD. W przypadku 6 stad rota-dodatnich (11,8%) nie dokonano identyfikacji RVA i RVD, co może sugerować obecność innych grup RV. Z kolei obecność rotawirusów wykryto w 10,7% przebadanych stad kurcząt broilerów i kur. W badaniach przeprowadzonych w USA wskazywano na zakażenie rotawirusami u 67,7–69,7% przebadanych stad indyków oraz 46,5% stad kurcząt broilerów [10, 11]. Z kolei badania stad indyków w Minnesocie wskazywały na 93% prewalencję tych wirusów [3]. W następnych badaniach autor ten przeanalizował pięć stad indyków na przestrzeni od 1. tyg. do 9. tyg. życia. W 30,6% przebadanych prób wykrywał rotawirusy, przy czym wirus był obecny zarówno w 1. tygodniu jak i w 9. tyg. życia ptaków, u ptaków jednak nie obserwowano większych problemów zdrowotnych. W badaniach brazylijskich zakażenia rotawirusowe identyfikowano u 51,8% przebadanych stad, przy czym w większości były to stada zdrowe [8]. W badaniach prób ze stad indyków i kurcząt z objawami enteropatii pochodzących z różnych krajów europejskich (Szwecja, Szkocja, Niemcy, Wlk. Brytania, Polska) oraz Bangladeszu obecność rotawirusów wykazano w 46,2% stad, a różnicowanie na grupy wykazało obecność RVA i RVD w odpowiednio 16,1 i 39,2% rota-dodatnich stadach, zaś 11,1% próbek zawierało obie grupy wirusa. W kolejnych badaniach tych autorów po zastosowaniu bardziej czułych metod detekcji prewalencja okazała się wyższa i wynosiła 85%, przy czym do grupy RVA



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne sekwencji nukleotydowej genu NSP4 polskich szczepów RV zawartych w pracy oraz sekwencji z bazy GenBanku. Nazwy porównywanych totawirusów zostały opisane w następujący sposób: gospodarz/kraj/indywidualny kod/rok. Pogrubioną czcionką oznaczono sekwencje szczepów referencyjnych. Drzewa filogenetyczne skonstruowano metodą neighbor joining, a wartości bootstrap wyliczono dla 1000 powtórzeń

należało 58,8% przebadanych rota-dodatnich próbek, natomiast do grupy RVD 65,9%, z kolei 38,9% próbek zawierało obie grupy RV [9].

Rotawirusy izolowano od różnych gatunków ptaków w wielu krajach: od kurcząt w Argentynie, Belgii, Brazylii, Chinach, Kubie, Niemczech, USA, Wielkiej Brytanii czy w byłym ZSRR, od perliczek we Włoszech, od bażantów we Włoszech, Wielkiej Brytanii i USA, od kaczek w Japonii i USA, od miejskich gołębi w Japonii, od kuropatw we Włoszech, USA i Japonii, od ptaków dzikich również w Japonii [7]. Świadczy to o światowym rozprzestrzenieniu rotawirusów u bardzo wielu gatunków ptaków.

Zwykle naturalnie występujące zakażenia u indyków wykazywano u młodych ptaków, w wieku poniżej 6 tyg. Taką zależność potwierdziły również nasze analizy. Natomiast badania eksperymentalne Yason i wsp. wykazały, że starsze ptaki w wieku 16 tyg. są bardziej wrażliwe na eksperymentalne zakażenie rotawirusami niż osobniki młodsze [14]. W badaniach stad kur zakażenia rotawirusowe identyfikowano zarówno u starszych ras reprodukcyjnych i niosek (>25 tyg. życia – 6 prób), jak i kurcząt broilerów między 2.–6. tyg. życia (6 prób). W zidentyfikowanych rota-dodatnich stadach kur obserwowano różne objawy kliniczne, w tym związane z enteropatią (biegunki), jednakże identyfikowano w nich także inne zakażenia (np. IBV, parwowirusy), dlatego trudno jednoznacznie określić przyczynę tych objawów.

U ptaków i ssaków rotawirusy wywołują zapalenie jelit oraz biegunki, ale zakażenie może przebiegać również subklinicznie. Monitoring przeprowadzony w stadach indyków w USA wykazał obecność rotawirusów w stadach chorych, jednak również w stadach zdrowych [12]. Z podobnych badań przeprowadzonych we Francji wynika, że rotawirus obecny był u 48,4% kurcząt z objawami biegunki w 2000 r. i 50% w 2001 r., natomiast u 20,2% kurcząt klinicznie zdrowych w 2000 r. i 18% w 2001 r. [13]. Również nasze dane nie wskazują na istnienie zależności pomiędzy zakażeniem rotawirusami a stanem zdrowotnym ptaków. Nie ma także żadnych udokumentowanych danych na temat różnic w zjadliwości pomiędzy szczepami rotawirusowymi, ale przez analogie do rotawirusów ssaków nie można ich wykluczyć. Różnice takie mogą być skutkiem reasortacji genetycznych zachodzących pomiędzy różnymi szczepami [7].

Prezentowane wyniki badań były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Polsce (grant nr. N308 578040).

Autorzy pragną podziękować Panu mgr. Łukaszowi Bocianowi (Zakład Epidemiologii i Oceny Ryzyka PIWet – PIB) za pomoc w analizie statystycznej otrzymanych wyników.

Piśmiennictwo

- [1] Bergeland M., McAdaragh J., 1977. Rotaviral enteritis in turkey poults. Proc. 26th West Poult. Dis. Conf., 129–130.
- [2] Day J.M., Spackman E., Pantin-Jackwood M., 2007. A multiplex RT-PCR test for the differential identification of turkey astrovirus type 1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus, and avian rotavirus. *Avian Dis.*, 51, 681–684.
- [3] Jindal N., Patnayak D., Chander Y., Ziegler A., 2009. Detection and molecular characterisation of enteric viruses from poult enteritis syndrome in turkeys. *Poultry Science* 89, 217–226.
- [4] Kang S.Y., Nagaraja K.V., Newman J.A., 1987. Characterization of viral polypeptides from avian rotavirus. *Avian Dis.*, 31, 607–621.
- [5] Martella V., Banyai K., Matthijnsens J., Buonavoglia C., Ciarlet M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.*, 140, 246–255.
- [6] Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K., Gentsch J.R., Iturriza-Gomara M., Kirkwood C.D., Martella V., Mertens P.P., Nakagomi O., Patton J.T., Ruggeri F.M., Saif L.J., Santos N., Steyer A., Taniguchi K., Desselberger U., Van Ranst M., 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.*, 153, 1621–1629.
- [7] McNulty M., Reynolds D., 2008. Rotavirus infection [in:] Saif Y., Fadly A., Galisson J., McDougald L., Nolan L., Swayne D. (Eds.) *Diseases of Poultry*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 338–350.
- [8] Moura-Alvarez J., Chacon J., Scanavini L., Nunez L., Astolfi-Ferreira C., Jones R., Piantino Fererira A., 2013. Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: Single and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease. *Poultry Science*, 92, 945–955.
- [9] Otto P.H., Ahmed M.U., Hotzel H., Machnowska P., Reetz J., Roth B., Trojnar E., Johne R., 2012. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet. Microbiol.*, 156, 8–15.
- [10] Pantin-Jackwood M.J., Day J.M., Jackwood M.W., Spackman E., 2008. Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. *Avian Dis.*, 52, 235–244.
- [11] Pantin-Jackwood M.J., Spackman E., Day J.M., Rives D., 2007. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. *Avian Dis.*, 51, 674–680.
- [12] Reynolds D.L., Saif Y.M., Theil K.W., 1987. A survey of enteric viruses of turkey poults. *Avian Dis.*, 31, 89–98.
- [13] Saison A., Puyalto-Moussu C., 2004. Epidemiology of and prophylaxis for neonatal diarrhoea in chicks. Results from a study in lower Normandy. *Equ'Idée*, 50.
- [14] Yason C.V., Schat K.A., 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: clinical signs and virology. *Am. J. Vet. Res.*, 48, 977–983.

Wykorzystanie sortera komórek oraz techniki elispot do oceny rozwoju pamięci immunologicznej komórek B IGA⁺ po szczepieniu indyków przeciwko aMPV

The use of cell sorter and elispot technique in estimation of IGA⁺ B cells immunological memory development, in turkeys vaccinated against aMPV

Ptasie metapneumowirusy (*avian Metapneumovirus* – aMPV) są silnie zakaźnym czynnikiem odpowiedzialnym za wywoływanie infekcji górnych dróg oddechowych (GDO), przede wszystkim u indyków, ale również u kur. Choroba wywoływana przez aMPV u indyków znana jest jako TRT (ang. turkey rhinotracheitis – zakaźne zapalenie nosa i tchawicy indyków).

aMPV zostały zaklasyfikowane do 4 podtypów (w zależności od struktury genów) – A, B, C i D. Mimo różnic w strukturze antygenowej aMPV wykazano fakt odporności krzyżowej między poszczególnymi podtypami (jednak w różnym stopniu dla poszczególnych z nich). W Polsce dominują podtypy A oraz B wirusa TRT.

Biorąc pod uwagę straty ekonomiczne w chowie indyków spowodowane częstymi przypadkami klinicznymi TRT w stadach szczepionych, badania nad zjawiskami rozwoju odporności poszczepiennej w stosunku do aMPV są niezwykle istotne. Niestety, istnieją jedynie nieliczne doniesienia na temat procesów odporności lokalnej przy zakażeniu oraz szczepieniu przeciwko aMPV u indyków. Dodatkowo przeprowadzone dotychczas badania nie są jednoznaczne, co wynikać może z podtypu aMPV użytego w doświadczeniu, wieku ptaków w grupach eksperymentalnych oraz ich pochodzenia (status immunologiczny).

Wykazano, iż komórki T ($CD4^+$ oraz $CD8^+$) są mocno zaangażowane w lokalne procesy immunologiczne na terenie górnych dróg oddechowych po szczepieniu i zakażeniu piskląt indyckich wirusem TRT, przy czym udział poszczególnych subpopulacji tych limfocytów wydaje się być w dużym stopniu zależny od podtypu (A-D) zakażającego wirusa TRT [2, 4] oraz wieku ptaków w dniu ekspozycji na działanie aMPV [6].

Badania nad udziałem odporności humoralnej (związanej z IgY) po szczepieniu przeciwko TRT u piskląt indyckich wskazują na różnice w rozwoju swoistej odpowiedzi immunologicznej, która zależna jest od obecności w dniu szczepienia ptaków przeciwciał matczynych (MDA – maternally derived antibodies) anty – aMPV w surowicy (i popłuczynach z GDO) [3, 5]. Mimo iż wykazano, że obecność przeciwciał matczynych nie ma większego wpływu na skuteczność przeprowadzanego szczepienia jednodniowych piskląt indyckich [3], dzisiaj nie można jednoznacznie stwierdzić, czy i w jaki sposób obecność MDA wpływa na stymulację poszczególnych elementów zaangażowanych w odporność poszczepienną przeciwko TRT.

Jak dotąd mało wiadomo na temat roli IgA w odporności lokalnej GDO w stosunku do wirusa TRT. Cha i wsp. [1] donoszą o wzroście subpopulacji limfocytów B o izotypie IgA^+ w błonie śluzowej górnych dróg oddechowych u indyków po ekspozycji na działanie wirusa TRT/podtyp C oraz o wzroście produkcji IgA w wydzielinie z nosa przy powtórnej ekspozycji na aMPV/C. W badaniach własnych wykazano wzrost poziomu swoistej IgA w popłuczynach z tchawicy w 14. dniu po szczepieniu atenuowanym aMPV/A, jednodniowych piskląt indyckich, jednak tylko i wyłącznie u ptaków nieposiadających w dniu szczepienia przeciwciał matczynych [5]. Z drugiej jednak strony, u ptaków z wysokim poziomem swoistych MDA anty-aMPV wykazaliśmy wzrost odsetka limfocytów B IgA^+ w gruczole Hardera (Harderian gland – HG), między 7.–14. dniem po szczepieniu w pierwszej dobie życia przeciwko TRT/A.

W świetle aktualnego stanu wiedzy wydaje się, że wytworzone (lub nabyte biernie) swoiste przeciwciała (w tym IgA) mogą ograniczać zdolności replikacyjne wirusa w błonie śluzowej GDO, co w kontekście zakażenia wpływa na złagodzenie przebiegu TRT i tym samym umożliwia ptakom szybszy powrót do zdrowia. Same immunoglobuliny jednak nie są w stanie zabezpieczyć ptaków przed zakażeniem i kliniczną postacią TRT.

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę przydatności sortowania komórek immunokompetentnych w określaniu rozwoju pamięci immunologicznej komórek B IgA⁺ w gruczole Hardera, po szczepieniu w pierwszej dobie życia piskląt indyckich, metodą dużej kropli, szczepionką Poulvac[®]TRT.

Materiał i metody

Indyki i szczepionka

W doświadczeniu wykorzystano 144 pisklęta indyckie typu Hybrid, które odchowywano zgodnie z technologią chowu w boksach Pawilonu Zakazań Eksperymentalnych Ptaków, Katedry Chorób Ptaków w Olsztynie. W pierwszej dobie życia pisklęta podzielono losowo na dwie równe grupy doświadczalne. Ptaki z grupy II w pierwszym dniu życia uodporniono szczepionką Poulvac[®]TRT (Fort Dodge, Holland) w dawce zalecanej przez producenta metodą dużej kropli. W tym samym czasie ptaki z grupy I otrzymały, tą samą drogą i w tej samej objętości, sterylny PBS.

Technika ELISPOT

Płytki ELISPOT opłaszczono wirusem szczepionkowym i/lub przeciwciałami poliklonalnymi anti-IgA (Gout Anti Chicken IgA, Abd Serotec, UK) i tak pozostawiono na 24 godziny w temp. 4°C. Po tym czasie inkubacji, płytki płukano 3-krotnie sterylnym PBS'em z 0,05% dodatkiem Tween 20 (Sigma Aldrich, Germany) i 3-krotnie sterylnym PBS'em. Następnie płytki blokowano RPMI z 20% dodatkiem Fetal Bovine Serum (Sigma Aldrich, Germany) przez 1 godzinę w 37°C. Po inkubacji zlewano nadmiar medium hodowlanego i zawiesinę limfocytów do hodowli przenoszono do dołków płytki. Płytki z limfocytami inkubowano przez 24 godziny w 39°C w atmosferze z 5% dodatkiem CO₂. Po inkubacji płytkę płukano 4-krotnie PBS'em z 0,05% dodatkiem Tween 20 i raz sterylnym PBS'em. Reakcję barwną przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciał anti-IgA sprzężonych z fosfatazą alkaliczną oraz z kompatybilnym dla tego enzymu substratem. Reakcję barwną hamowano poprzez zanurzenie płytek w sterylnej wodzie destylowanej. Liczenie komórek produkujących swoiste przeciwciała (Antibody Secreting Cells – ASC) wykonano z wykorzystaniem czytnika Eli-scan oraz kompatybilnego oprogramowania.

Rozcieńczenie wirusa szczepionkowego i przeciwciał anti-IgA użytych do opłaszczania płytek w realizowanych badaniach oraz stężenie koniugatu ustalono, wykonując wcześniej ich miareczkowanie.

Izolacja limfocytów z gruczołu Hardera

W 7. i 14. dniu po szczepieniu po 36 ptaków z obu grup poddawano eutanazji, a w trakcie sekcji pobierano od nich do dalszych badań gruczoły Hardera, które pulowano w jedną próbkę od 6 ptaków.

W celu wyizolowania limfocytów z gruczołu Hardera poddawane one były mechanicznemu roztarciu w homogenizatorze manualnym w obecności medium hodowlanego. Po uzyskaniu jednolitej zawiesiny całość przesączało przez nylonowe filtry o średnicy oczek 70 μm . Z uzyskanej zawiesiny izolowano komórki mononuklearne przy zastosowaniu gradientu Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, Germany) zgodnie z protokołem producenta, które sortowano za pomocą sortera komórek BD FACSAria II. Sortowanie to odbywało się z bezpośrednim dozowaniem komórek do poszczególnych dołków płytki ELISPOT w liczbie 1×10^4 na dołek. Poszczególne oznaczenia dla pojedynczej próbki wykonane zostały w potrójnym powtórzeniu zarówno dla dołków opłaszczonych wirusem szczepionkowym, jak i przeciwciałami anti-IgA.

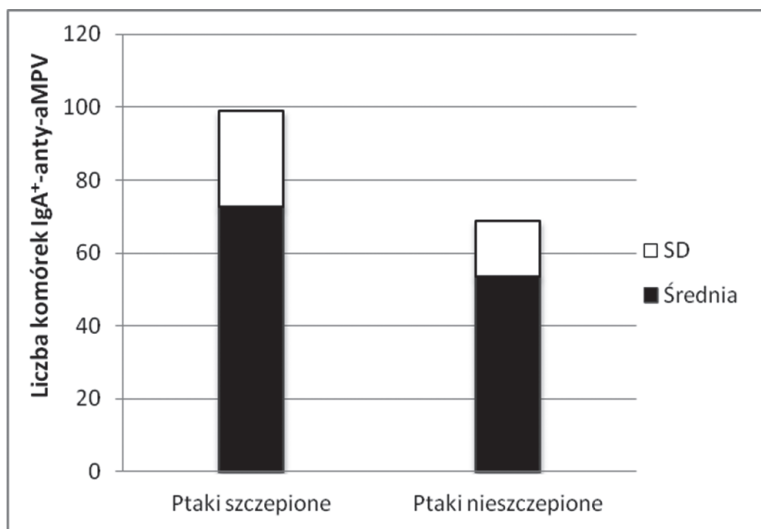
Wyniki i omówienie

Wyniki przeprowadzonych badań, przedstawione na ryc. 1–4 wskazują na wzrost, zarówno bezwzględny, jak i względny (w stosunku do całkowitej liczby IgA+ ASC), IgA+ anty-aMPV ASC już w 7. dobie po szczepieniu jednodniowych piskląt indyckich przy użyciu komercyjnej szczepionki przeciwko TRT/A. Dowodzi to o rozwoju pamięci immunologicznej komórek B IgA+ po wykonanym szczepieniu, pomimo iż użyte w doświadczeniu pisklęta pochodziły od niosek immunizowanych przeciwko TRT.

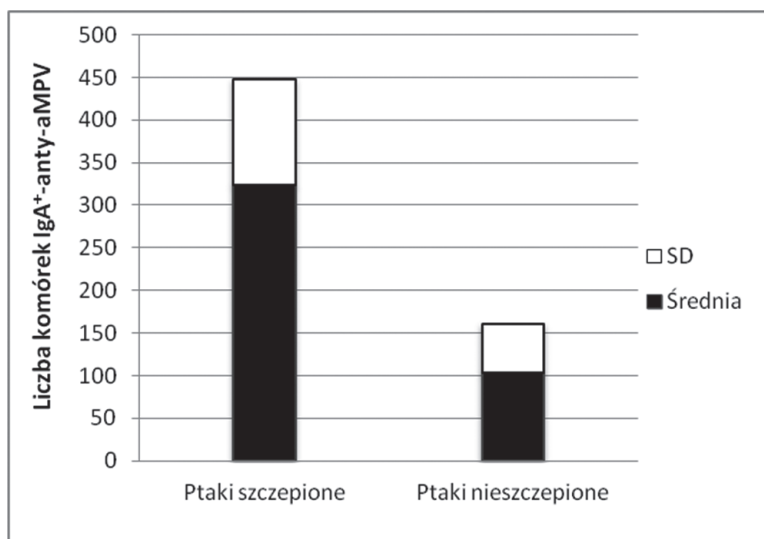
W związku z powyższymi wynikami prezentowanych badań sugerują, że odporność naturalna bierna może oddziaływać na różnych poziomach ekspresji w rozwoju poszczególnych parametrów odporności poszczepiennej w stosunku do aMPV.

Na uwagę zasługuje dodatkowo fakt wdrożenia nowatorskiej techniki sortowania komórek immunokompetentnych w toku przeprowadzanego doświadczenia. Technika ta w znacznym stopniu przyczynia się do uniformizacji jakościowej badanych próbek i przez to do uwierzytelnienia uzyskiwanych wyników badań. Dodatkową zaletą tego typu rozwiązania jest łatwość wykonania analizy uzyskiwanych danych, co wynika ze znacznego „oczyszczenia” badanych próbek z elementów niepożądanych (komórki nabłonkowe, detritus komórkowy), które mogą wpływać na jakość wykonywanych oznaczeń i przez to na trudności w interpretacji wyników.

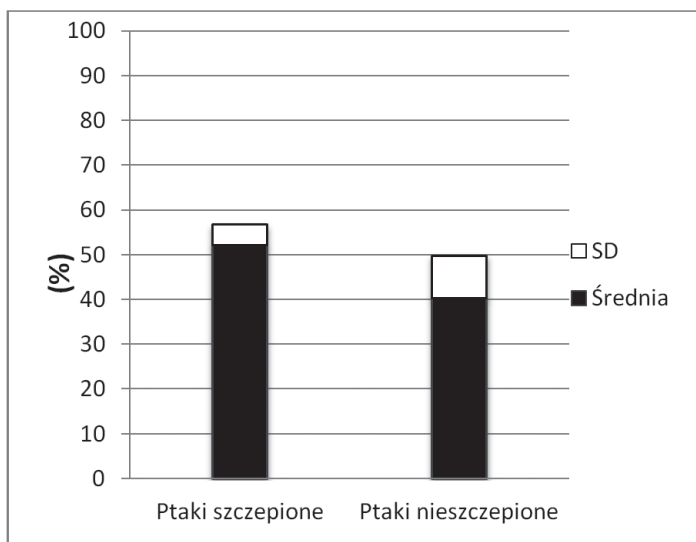
Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/N/NZ6/05757.



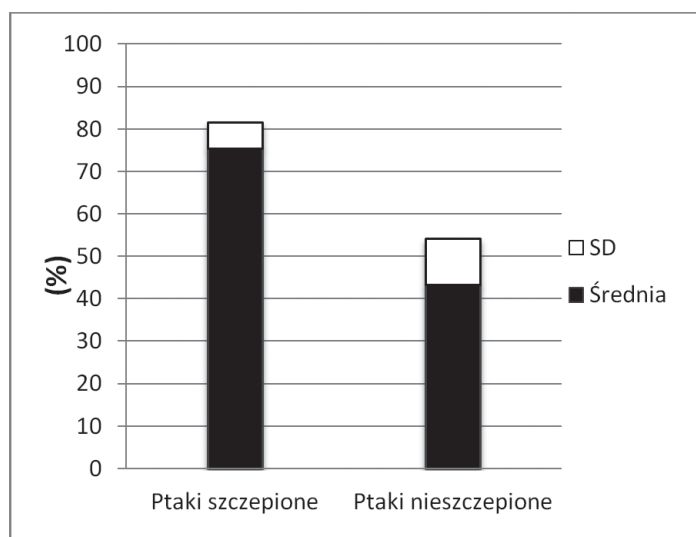
Ryc. 1. Średnia bezwzględna liczba komórek IgA⁺ anty-aMPV / 10⁵ limfocytów, w HG indyków w 7. dniu po szczepieniu w pierwszej dobie życia (SD – odchylenie standardowe)



Ryc. 2. Średnia bezwzględna liczba komórek IgA⁺ anty-aMPV / 10⁵ limfocytów, w HG indyków w 14. dniu po szczepieniu w pierwszej dobie życia (SD – odchylenie standardowe)



Ryc. 3. Stosunek procentowego udziału komórek IgA⁺ anti-aMPV specyficznych pośród komórek IgA⁺ ASC w 7. dobie po szczepieniu



Ryc. 4. Stosunek procentowego udziału komórek IgA⁺ anti-aMPV specyficznych pośród komórek IgA⁺ ASC w 14. dobie po szczepieniu

Piśmiennictwo

- [1] Cha R.M., Khatri M., Sharma J.M., 2007. B-cell infiltration in the respiratory mucosa of turkeys exposed to subtype C avian metapneumovirus. *Avian Dis.*, 51, 764–770.
- [2] Cha R.M., 2009. Immunopathogenesis of Avian Metapneumovirus in the Turkeys. Praca doktorska, University of Minnesota.
- [3] Cook J.K., Holmes H.C., Finney P.M., Dolby C.A., Ellis M.M., Huggins M.B., 1989. A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 2. The use of the attenuated strain as an experimental vaccine. *Avian Pathol*, 18, 523–534.
- [4] Liman M., Rautenschlein S., 2007. Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian Metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 115, 273–285.
- [5] Śmiałek M., Koncicki A. – Wyniki nieopublikowane.
- [6] Śmiałek M., Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A., 2012. Wybrane parametry lokalnej odporności komórkowej oraz humoralnej u indyków uodpornianych przeciwko TRT. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław, 400.

Wrażliwość szczepów *Erysipelothrix rhusiopathiae* wyizolowanych z klinicznych przypadków różycy u gęsi na wybrane chemioterapeutyki

Antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from clinical form of erysipelas in geese

Różycza jest chorobą wywoływaną przez włoskowiec różycy – *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Drobnoustrój ten może występować nie tylko jako patogen, ale także komensal wielu gatunków dzikich i domowych ssaków, ptaków, gadów i ryb. Bakteria ta najczęściej kojarzona jest jako czynnik wywołujący pokrzywkową postać różycy u trzody chlewnej, charakteryzującą się wystąpieniem romboidalnych wykwitów na skórze. Niewiele danych literaturowych dotyczy przypadków występowania różycy u gęsi [1, 4, 5], i brak w nich informacji na temat lekowrażliwości badanych szczepów.

Celem pracy było określenie lekowrażliwości wyznaczanej przy użyciu wskaźnika MIC (minimalne stężenie hamujące) dla wyizolowanych szczepów włoskowca różycy wobec wybranych chemioterapeutyków. Do badań wybrano amoksycylinę doksyklicynę i enrofloksacynę, gdyż wymienione chemioterapeutyki są powszechnie stosowane w leczeniu drobiu.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły 33 szczepy włoskowca różycy wyizolowane z klinicznych przypadków różycy u gęsi w latach 2007–2011. Materiał pochodził z ferm zlokalizowanych na terenie Dolnego Śląska, Wielkopolski i Ziemi Łódzkiej.

Szczepy ożywiano przez wysianie na agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i poddanie 24-godzinnej inkubacji. Do określenia wrażliwości na wybrane chemioterapeutyki użyto E-testów (bioMerieux, Francja), pasków z rozłożonym zdefiniowanym gradientem stężeń chemioterapeutyków (15 podwójnych kolejnych rozcieńczeń). E-testy nakładano na podłoże stałe (agar tryptozowo-sojowy z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej) z wysianą wcześniej zawiesiną bakterii, zgodnie z metodyką podaną przez producenta. Inkubację prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 37°C, dokonując następnie odczytu wartości MIC w punkcie przecięcia powstałej eliptycznej strefy zahamowania wzrostu z brzegiem paska. Wartości leżące w połowie rozcieńczenia zaokrąglano do wyższego. Wrażliwość na badane chemioterapeutyki analizowano poprzez użycie granicznych wartości MIC według aktualnych norm Europejskiego Komitetu ds. Badań Lekowrażliwości Drobnoustrojów (European Committee Antibiobacterial Susceptibility Testing – EUCAST) oraz wartości MIC ustalonych przez amerykański Instytut ds. Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) dla włoskowca różycy.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane dane zestawiono w tabeli 1.

Pośród badanych chemioterapeutyków najniższe wartości MIC zanotowano w odniesieniu do amoksycyliny i wynosiły one w przedziałach poniżej 0,016 do 0,095 µg/ml.

Wartość graniczna MIC dla szczepów opornych zgodnie z wytycznymi EUCAST wynosi 2 µg/ml, a zaś zgodnie z wytycznymi CLSI 0,25 µg/ml. Wartość MIC₅₀ dla badanych szczepów wyniosła 0,032 µg/ml, a MIC₉₀ 0,064 µg/ml. Uzyskane wartości MIC dla gęsi izolatów włoskowca różycy świadczą, iż 100% badanych szczepów wykazało pełną wrażliwość na amoksycylinę. Wielu autorów [2, 3, 6, 7, 9, 10] także wykazało pełną wrażliwość badanych szczepów na leki z grupy penicylin (ampicylina, beznylpenicylina, penicylina).

Wartości MIC dla doksycykliny rozkładały się w dwóch przedziałach 0,25–1 µg/ml i 12–64 µg/ml. Wartość graniczna MIC dla włoskowca różycy jest nie została ustalona przez EUCAST, natomiast CLSI odsyła do wartości granicznej dla tetracykliny wyznaczonej dla *Streptococcus sp.* wynoszącej 2 µg/ml. Wartość MIC₅₀ dla doksycykliny wynosiła 24 µg/ml, zaś MIC₉₀ 48 µg/ml. Badane szczepy

wykazywały wrażliwość na doksycyklinę na poziomie 27%. Obserwowany rozkład wartości MIC w 2 przedziałach świadczy o istnieniu 2 populacji szczepów – wysoce wrażliwej i wysoce odpornej na doksycyklinę. Tendencję do rozkładu wartości MIC dla doksycykliny w 2 przedziałach zanotował również Yamamoto [10], a wartości MIC mieściły się w przedziałach 0,2–1,56 µg/ml oraz 6,25–25 µg/ml. Zmienną wrażliwość dla chemioterapeutyków z grupy tetracyklin notowali również Chuma i wsp. [2] oraz Opriessnig i wsp. [6]. Ponad połowa pochodzących z Japonii oraz 1/3 pochodzących z USA izolatów włoskowca różycy była oporna na oksytetracyklinę [2, 6]. Vendetti i wsp. [9] wykazali, iż wartość MIC₅₀ dla tetracykliny wśród szczepów włoskowca różycy wyizolowanych od świń we Włoszech wyniosła 1 µg/ml, a MIC₉₀ 64 µg/ml.

Wartości MIC dla enrofloksacyny również rozkładały się w 2 przedziałach od 0,064 do 0,5 µg/ml oraz od 12 do powyżej 32 µg/ml. Wartość graniczna dla fluorochinolonów zgodnie z normami EUCAST wynosi 0,5 µg/ml, a według CLSI – 1 µg/ml. Wrażliwość na enrofloksacynę badanych szczepów kształtowała się na poziomie 21% (wszystkie wartości MIC >0,5 µg/ml). Nie można było określić wartości MIC₅₀ i MIC₉₀, ponieważ dla 67% izolatów wartość MIC wyniosła 32 µg/ml i było to maksymalne stężenie możliwe do określenia E-testem. Oznacza to, iż wartość MIC dla badanych szczepów była równa lub wyższa od 32 µg/ml. Do oznaczenia wartości MIC₅₀ oraz MIC₉₀ konieczne byłoby rozszerzenie badań przez wykonanie dodatkowego szeregu rozcieńczeń w kierunku wartości MIC wyższych od 32 µg/ml.

W przypadku enrofloksacyny Errikson i wsp. [3], badający lekowrażliwość szczepów pochodzących od ptaków, świń oraz pasożytów zewnętrznych drobiu (*Dermanysys gallinae*), otrzymali wartości MIC₅₀₋₀ 12 µg/ml i MIC₉₀₋₀ 0,25 µg/ml. Yamamoto i wsp. [10] analizujący lekowrażliwość szczepów izolowanych od świń stwierdzili, iż wartości MIC wahały się między 0,05 a 0,2 µg/ml. Wyniki otrzymane przez oba zespoły świadczą o pełnej wrażliwości izolatów na enrofloksacynę. Także Opriessnig i wsp. [6] badający szczepy pochodzące od świń z USA wykazali, że 100% badanych przez nich szczepów było wrażliwych na enrofloksacynę. Jedynie Chuma i wsp. [2] odnotowali wyizolowanie szczepów włoskowca różycy opornych na enrofloksacynę. Szczepy odporne stanowiły 12,8% spośród 149 badanych izolatów pozyskanych od świń w Japonii. Wartości MIC szczepów opornych wahały się między 8 a 32 µg/ml. Różnice między danymi literaturowymi i badaniami własnymi dotyczącymi minimalnych stężeń hamujących dla enrofloksacyny oraz liczby szczepów opornych wynikają najprawdopodobniej z powszechnego stosowania enrofloksacyny w przemyśle drobiarskim i ze znacznie rozwiniętej lekooporności drobnoustrojów na ten chemioterapeutyk.

Tabela 1. Wyznaczone wartości MIC szczepów *Erysipelothrix rhusiopathiae* wobec wybranych chemioterapeutyków

| Amoksycylina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|---------|------|------|------|-----|------|-----|--------|------|---------|-----|-----|-----|--------|
| Stężenie leku w µg/ml | <0,016 | 0,016 | 0,023 | 0,032 | 0,047 | 0,064 | 0,094 | 0,125 | 0,19 | 0,25 | 0,38 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | |
| Liczba szczepów n=33 | 2 | 3 | 4 | 8 | 5 | 8 | 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Odsetek szczepów o danej wartości MIC w populacji | 6,1 | 9,1 | 12,1 | 24,2 | 15,2 | 24,2 | 9,1 | | | | | | | | | | | | | | |
| Wartości MIC 50 i MIC 90 | | | | MIC 50 | | MIC 90 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Wartość graniczna MIC | | | | | | | CLSI | | | | | | | | | | EU-CAST | | | | |
| Enrofloksacyna | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stężenie leku w µg/ml | <0,047 | 0,064 | 0,094 | 0,125 | 0,19 | 0,25 | 0,38 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 12 | 16 | 24 | 32 | |
| Liczba szczepów n=33 | | 2 | 2 | 3 | | 1 | | 1 | | | | | | | | | 2 | | | | 22 |
| Odsetek szczepów o danej wartości MIC w populacji | | 6,1 | 6,1 | 9,1 | | 3,0 | | 3,0 | | | | | | | | | 6,1 | | | | 66,7 |
| Wartości MIC 50 i MIC 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Wartość graniczna MIC | | | | | | | | EU-CAST | | CLSI | | | | | | | | | | | |
| Doksycyklina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stężenie leku w µg/ml | <0,19 | 0,25 | 0,38 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 12 | 16 | 24 | 32 | 48 | 64 | 96 | 128 | |
| Liczba szczepów, n=33 | | 2 | 1 | 2 | 3 | 1 | | | | | | | 1 | 3 | 8 | 7 | 4 | 1 | | | |
| Odsetek szczepów o danej wartości MIC w populacji | | 6,1 | 3,0 | 3,0 | 9,1 | 3,0 | | | | | | | 3,0 | 9,1 | 24,2 | 21,2 | 12,1 | 3,0 | | | |
| Wartości MIC 50 i MIC 90 | | | | | | | | | | | | | | | MIC 50 | | | | | | MIC 90 |
| Wartość graniczna MIC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Wnioski

Badania własne potwierdziły, iż włośkowiec różycy izolowany od gęsi jest wysoce wrażliwy na antybiotyki beta-laktamowe, jednakże większość szczepów wykazała wysoką lekooporność w stosunku do enrofloksacyny, nienotowaną przez innych autorów. Wrażliwość na doksycyklinę jest zmienna.

Zadanie jest współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Praca została wykonana w ramach grantu N N308 575140 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Piśmiennictwo

- [1] Bailie W., Burry R., Bicknell E., Knudtson W., 1970. Erysipelothrix infection in gosling. *Avian Diseases*, 14, 555–556.
- [2] Chuma T., Kawamoto T., Shahada F., Fujimoto H., Okamoto K., 2010. Antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs in Southern Japan with a modified agar dilution method. *J. Vet. Med. Sci.*, 72, 643–645.
- [3] Eriksson H., Jansson D., Johansson K., Båverud V., Chirico J., Aspán A., 2009. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from poultry, pigs, emus, the poultry red mite and other animals. *Vet Microbiol.*, 28, 137–141.
- [4] Gunnig R., Morton B., 1988. Outbreak of erysipelas in farmed geese. *The Veterinary Record*, 20, 191.
- [5] Janowska I., Krasnodębska-Depta A., Bieszke R., 1978. Przypadek różycy u gęsi. *Med. Wet.*, 34, 471–472.
- [6] Opriesnig T., Hoffman L.J., Harris D.L., Gaul S.B., Halbur P.G. 2004. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 16, 101–107.
- [7] Takahashi T., Sawada T., Muramatsu M., Tamura Y., Fujisawa T., Benno Y., Mitsuoka T., 1987. Serotype, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 536–539.
- [8] Vallespi G., Pipet D., Mattoni S., Lopardo H., 2005. Fatal mitral valve endocarditis by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Rev. Argent. Microbiol.*, 37, 78–80.
- [9] Venditti M., Gelfusa V., Tarasi A., Brandimarte C., Serra P., 1990. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2038–2040.
- [10] Yamamoto K., Kijima M., Yoshimura H., Takahashi T., 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from Pigs with Swine Erysipelas in Japan, 1988–1998. *J. Vet. Med. B* 48, 115–126.

Zakażenia wirusowe dzikich ptaków wodnych w Polsce

The viral infections of wild water birds in Poland

Ptaki są jedną z najciekawszych i najbarwniejszych grup zwierząt. Międzynarodowa Rada Ochrony Ptaków oszacowała, iż wyginieciem zagrożonych jest 1029 gatunków, co stanowi 11% ogólnej liczby wszystkich określonych gatunków ptaków. Ptaki są narażone na wyginiecie z powodu utraty swoich miejsc lęgowych i żerowania, ale także z powodu zakażeń bakteryjnych, jak i wirusowych [1].

Bardzo często ptaki dzikie mają kontakt z drobiem domowym, w tym z gęśmi i kaczkami, dla których mogą być rezerwuarem wirusów patogennych, z których należy wymienić: parwowirus (GPV), polyomawirus (GHPV), cirkowirus (GoCV), adenowirus (adeno) oraz wirus Zachodniego Nilu (WZN) patogenny zarówno dla ptaków, jak i człowieka [1, 2, 3].

Celem badania było stwierdzenie ewentualnej obecności materiału genetycznego ww. wirusów u dzikich ptaków wodnych.

Materiał i metody

Próbki do badań. Padłe dzikie ptaki wodne otrzymywano w ramach sieci pobierania próbek stworzonej w Programie Wieloletnim realizowanym w PIWet – PIB w Puławach. Ptaki otrzymywano z Ośrodków Rehabilitacji Dzikich Ptaków, Ogrodów Zoologicznych, Kół Łowieckich oraz Stacji Badania Wędrówek Ptaków. Łącznie do analiz otrzymano 359 ptaków, w tym 212 łabędzi, 12 czapli, 57 dzikich kaczek, 68 dzikich gęsi, 9 mew oraz 1 żurawia. Ptaki do badań pochodziły z terenu

ośmiu województw: zachodniopomorskiego (34 ptaki), warmińsko-mazurskiego (67 ptaków), kujawsko-pomorskiego (72 ptaki), mazowieckiego (96 ptaków), wielkopolskiego (57 ptaków), łódzkiego (14 ptaków), śląskiego (12) i małopolskiego (7). W trakcie badania anatomopatologicznego od tych ptaków pobierano wycinki narządów wewnętrznych (wątroba, śledziona i nerki), które po homogenizacji użyto do izolacji całkowitego, komórkowego DNA oraz RNA.

Startery do PCR. Zastosowano następujące sekwencje charakterystyczne dla regionów kodujących: parwowirusa gęsiego (GPV) – VPD1–5' CCG GGT TGC AGG AGG TAC 3', VPD2–5' AGC TAC AAC AAC CAC ATC 3'; cirkowirusa gęsiego (GoCV) – GCV1–5' TAA ATG CGA GTT TGA GTC T 3', GCV2–5' CAT TTA ACC CCT TCC AAA GAG T 3'; poliowirusa gęsiego (GHPV) – GPOL1–5' GAG GTT GTT GGA GTG ACC ACA ATG 3', GPOL2–5' ACA ACG GTG CAA TTC CAA GGG TTG 3'; adenowirusa (adeno) – FADV F – 5' ATG GGA GCC ACC TAT TTC GAC AT 3', FADV R – 5' AAA TTG TCC CAC ACC CGA TGT AT 3'. Ponadto zastosowano 2 pary starterów do reakcji RT-PCR wykrywającej materiał genetyczny wirusa Zachodniego Nilu – WNV3–5' GCC ACC GGA AGT TGA GTA GA 3', WNV4–5' CTG GTT GTG CAG AGC AGA AG 3', WNV5–5' AAA GCC CAA TGT CAG ACC AC 3', WNV6–5' TAG TCC TTT CGC CCT GGT TA 3'.

Reakcja amplifikacji (PCR). Przeprowadzano ją w mieszaninie reakcyjnej o objętości 50 µl zawierającej: 5 µl buforu do PCR, 2 µl mieszaniny deoksynukleotydów, po 2 µl każdego ze starterów, 2 µl wyizolowanego DNA, 1 µl Taq polimerazy DNA oraz 36 µl wody dejonizowanej. Warunki termiczne reakcji były następujące: 30 cykli; denaturacja wstępna – 94°C – 30 s; przyłączanie starterów – 30 s w zakresie temperatur 52–61°C w zależności od starterów; wydłużanie łańcucha – 72°C – 1 min; końcowe wydłużanie łańcucha – 72°C – 10 min.

Reakcja amplifikacji (RT-PCR). Reakcja ta posłużyła do wykrycia materiału genetycznego wirusa Zachodniego Nilu i została przeprowadzona przy zastosowaniu zestawu komercyjnego firmy Qiagen.

Elektroforeza produktów PCR. Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przez 1 godz. przy napięciu 120 V. Po zakończonej elektroforezie uzyskane produkty PCR analizowano w świetle UV, porównując ich wielkość ze wzorcem DNA.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonej reakcji amplifikacji obecność materiału genetycznego cirkowirusa gęsi stwierdzono u 2 ptaków: u dzikiej kaczki, którą otrzymano z terenu województwa kujawsko-pomorskiego oraz u 1 czapli z terenu województwa warmińsko-mazurskiego. Obecność materiału genetycznego polyomawirusów wykryto w próbkach pochodzących od dzikiej kaczki i łabędzia (odpowiednio z wo-

jewództwa zachodniopomorskiego i warmińsko-mazurskiego). U 6 ptaków (3 dzikie kaczki i 3 dzikie łabędzie) pochodzących wyłącznie z województwa warmińsko-mazurskiego stwierdzono obecność adenowirusów. W badanych próbkach od 359 ptaków nie stwierdzono obecności DNA parwowirusa gęsiego oraz RNA wirusa Zachodniego Nilu.

Badania są wykonywane w ramach projektu NCBiR, nr 12-0126-10.

Piśmiennictwo

- [1] Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A., 2003. Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 641–646.
- [2] Potti J., Blanco G., Lemus J.A., Canal D., 2007. Infectious offspring: how birds acquire and transmit an avian polyomavirus in the wild. *Plos One.*, 2, e1276.
- [3] Ziegler U., Seidowski D., Angenvoort J., Eiden M., Muller K., Nowotny N., Groschup M.M., 2012. Monitoring of West Nile virus infections in Germany. *Zoonoses Public Health.*, 59, 95–101.

Wybrane zakażenia bakteryjne ptaków wolno żyjących

Selected bacterial infections in free-living birds

Zgodnie z najnowszymi raportami Europejskiej Agencji ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) drobnoustroje z rodzaju *Campylobacter* oraz *Salmonella* należą do najczęściej wymienianych patogenów wywołujących zakażenia oraz zatrucia pokarmowe u ludzi [2, 3]. Istotną rolę w zachorowaniach ludzi pełnią również werotoksyczne szczepy *Escherichia coli*.

Za najczęstsze źródło zakażeń ludzi tymi drobnoustrojami uznaje się drób oraz produkty drobiowe nie poddane właściwej obróbce termicznej lub wtórnie zanieczyszczone. Ponadto, na świecie pojawia się coraz więcej doniesień na temat potencjalnego udziału ptaków wolno żyjących w rozprzestrzenianiu zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje [1, 5].

Celem prowadzonych badań jest określenie roli ptaków wolno żyjących w łańcuchu epidemiologicznym zakażeń zwierząt i ludzi drobnoustrojami z rodzaju *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. oraz *Escherichia coli* poprzez ocenę częstotliwości występowania tych drobnoustrojów w krajowej populacji ptaków wolno żyjących oraz przeprowadzenie charakterystyki fenotypowej i genotypowej wyizolowanych drobnoustrojów.

Materiał i metody

Zgromadzony materiał do badań pochodził od różnych gatunków ptaków wolno żyjących, które podzielono na 3 grupy:

- ptaki żerujące w środowisku wodnym (kaczka krzyżówka, kormoran, łabędź);
- ptaki drobne:
 - wróblowe (sikorka bogatka, sikorka modraszka, wróbel mazurek, dzwonec),
 - jerzykowe (jerzyk),
- ptaki drapieżne (pustułka, sokół wędrowny).

Materiał pobierano przyżyciowo (kał, wymazy kałowe) lub pośmiertnie (narządy wewnętrzne).

Łącznie w kierunku obecności *Escherichia coli* przebadano 955 ptaków, w kierunku *Salmonella* spp. 850 ptaków, natomiast w kierunku *Campylobacter* spp. 450 osobników.

Zakres badań obejmował:

A. Badania mikrobiologiczne celem wyizolowania drobnoustrojów:

Badanie w kierunku pałeczek *Salmonella* wykonano zgodnie z normą PN EN ISO 6579:2003 + A1:2007, dotyczącą wykrywania pałeczek *Salmonella* w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego oraz identyfikacji serologicznej izolatów *Salmonella*.

Do izolacji i identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* wykorzystano metody zgodne z normą PN-ISO 10272: „Mikrobiologia żywności i pasz; Horyzontalna metoda wykrywania termotolerancyjnych bakterii z rodzaju *Campylobacter*”.

Badanie w kierunku *Escherichia coli* wykonano poprzez posiew bezpośredni badanego materiału na selektywne podłoże McConkey’a (Merck, Niemcy), a uzyskane kolonie wstępnie typizowano oraz z wykorzystaniem odpowiednich testów biochemicznych: TSI (Merck, Niemcy), Urea/Indol Medium (BioMeriex, Francja).

B. Metody molekularne z wykorzystaniem technik PCR celem:

- określenia przynależności drobnoustrojów do rodzaju *Salmonella* oraz do konkretnych podgatunków (poprzez wykrycie genów: *STM*, *stn*, *invA*, *gatD*, *mdcA* i *fljB*);
- określenia przynależności drobnoustrojów do rodzaju *Campylobacter* oraz do konkretnych gatunków (poprzez wykrycie genów: *mapA*, *ceuE* i trzech genów 16SrRNA dających odpowiednio produkt 408 pz, 506 pz oraz 997 pz);
- określenia przynależności szczepów do rodzaju *E. coli* i do grup filogenetycznych A, B1, B2 i D.

W kolejnej reakcji, z użyciem primerów rozpoznających sekwencję flankującą fragmenty wybranych genów: *cva A/B*, *cvi C*, *iss*, *astA*, *irp2*, *papC*, *iucD* i *tsh*, określono prewalencję wybranych genów wirulencji [5].

Wyniki

Częstotliwość występowania wybranych drobnoustrojów u ptaków wolno żyjących przedstawiono w tabeli 1.

Drobnoustroje z rodzaju *Salmonella* stwierdzono u 6,82% badanych ptaków wolno żyjących. Najwięcej izolatów uzyskano od gatunku sikorka bogatka (12 szczepów) oraz kaczka krzyżówka (10 szczepów). Dotychczas zidentyfikowane szczepy należą do dwóch podgatunków: *Salmonella enterica subsp. enterica* (26 szczepów) i *Salmonella enterica subsp. salamae* (14 szczepów). Natomiast 18 szczepów należących do rodzaju *Salmonella* nie udało się zaklasyfikować do żadnego z podgatunków.

Pałeczki z rodzaju *E. coli* stwierdzono u prawie 50% ptaków. Wyniki dotyczące przynależności drobnoustrojów z rodzaju *Escherichia coli* do poszczególnych grup filogenetycznych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1. Zakażenia bakteryjne ptaków wolno żyjących

| Kierunek badania | Liczba ptaków/prób badanych | Liczba wyników dodatnich |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>Salmonella</i> spp. | 850 | 58 (6,82%) |
| <i>Escherichia coli</i> | 955 | 476 (49,84%) |
| <i>Campylobacter</i> spp. | 450 | 32 (7,11%) |

Tabela 2. Przynależność szczepów *E. coli* do poszczególnych grup filogenetycznych (%)

| Grupa ptaków | Grupa A | Grupa B1 | Grupa B2 | Grupa D | Brak klasyfikacji |
|--------------|---------|----------|----------|---------|-------------------|
| Blażkodziobe | 20,8 | 5,0 | 10,0 | 20,8 | 43,4 |
| Drapieżne | 0,0 | 75,0 | 0,0 | 5,0 | 20,0 |
| Wróblowe | 0,0 | 25,0 | 0,0 | 0,0 | 75,0 |

Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Johnsona i wsp. [1] większość szczepów *E. coli* wykazujących cechy zjadliwości wobec ludzi należy do grupy B2 oraz D. Otrzymane przez nas wyniki wskazują na obecność w populacji ptaków dzikich (blażkodziobe oraz drapieżne) szczepów *E. coli* należących do tych dwóch grup. Pośród ptaków blażkodziobych szczepy te stanowiły łącznie 30,8%, natomiast wśród ptaków drapieżnych wykryto 5% szczepów *E. coli* należących do grupy D.

Nasze badania w zakresie obecności genów warunkujących zjadliwość szczepów *E. coli* nie wykazały obecności genu *stx* determinującego werotoksyczność szczepów.

Powyzszą charakterystykę wykonano obecnie dla szczepów *E. coli* wyizolowanych od blażkodziobych (kaczka krzyżówka), jak również od ptaków drapieżnych (sokół wędrowny, myszołów, orzeł bielik) i ptaków wróblowych (sikorka bogatka, wróbel mazurek).

Szczepy izolowane od blażkodziobych (kaczka krzyżówka) posiadają gen *irp2* (16,7%), odpowiedzialny za syntezę yersiniobaktyny, gen *astA* (12,5%) kodujący enterotoksynę EAST oraz gen *iss* (4,2%) warunkujący odporność na bójcze działanie surowicy. Z kolei wśród szczepów pochodzących od wróblowych wykazano obecność genów *astA* oraz *irp2*. Natomiast wśród szczepów *E. coli* izolowanych od pta-

ków drapieżnych dominuje gen *iss*. Pośród tych ostatnich szczepów wykryto także gen *vat* odpowiedzialny za wakuocytarny autotransfer toksyn. Powyższe geny warunkują cechy zjadliwości *E. coli* niebezpieczne dla ptaków.

Obecność *Campylobacter* spp. w populacji ptaków dzikich stwierdzono na poziomie 7,11% (32 szczepy na 450 badanych prób). Najczęściej drobnoustroje te izolowano od ptaków związanych ze środowiskiem wodnym. Najwięcej izolatów pozyskano od kaczki krzyżówki (26,14%), z czego wszystkie szczepy należały do gatunku *C. jejuni*. W przypadku kormorana czarnego wyizolowano wyłącznie *C. coli* (7,93%). Natomiast od ptaków morskich (uhła zwyczajna) uzyskano 4 szczepy z *Campylobacter*, z których 3 należą do *C. jejuni*, a jeden do *C. lari*.

Podsumowanie

Ptaki wolno żyjące, uwzględniając ich gatunek, miejsce bytowania oraz sposób odżywiania się, wykazują zróżnicowany stopień zakażenia drobnoustrojami z rodzaju: *Salmonella*, *Campylobacter* oraz *Escherichia coli*. Wydaje się, że mogą odgrywać istotną rolę w rozprzestrzenianiu zoonotycznych drobnoustrojów w środowisku oraz stanowić istotne ogniwo w łańcuchu epidemiologicznym zakażeń ludzi i zwierząt.

Praca jest realizowana w ramach projektu NCBiR NR 12 0126 10.

Piśmiennictwo

- [1] Dobbin G., Hariharan H., Daoust P.-Y., Hariharan S., Heaney S., Coles M., Price L., Muckle A., 2005. Bacterial flora of free-living Double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) chicks on Prince Edward Island, Canada, with reference to enteric bacteria and antibiotic resistance *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 28, 71–82.
- [2] EFSA Annual Report, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; *EFSA Journal*, 10(3), 2597, 442.
- [3] EFSA Annual Report, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA Journal*, 11(4), 3129, 250.
- [4] French N.P., Midwinter A., Holland B., Collins-Emerson J., Pattison R., Colles F., Carter P., 2009. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild-bird fecal material in children's playgrounds. *Appl Environ Microbiol.*, 75(3), 779–783.
- [5] Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H.C., Wieler L.H., 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 49(2), 269–273.
- [6] Johnson J.R., Delavari P., Kuskowski M., Stell A.L., 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*, *J. Infect Dis.*, 183, 78–88.

Wykrywanie szczepów wirusa choroby Derzsy'ego metodą lamp (loop-mediated isothermal amplification)

Detection of Derzsy disease virus strains by lamp method

Polska jest pionierem w produkcji gęsi w Europie. Przyjmuje się, że populacja gęsi w Polsce wynosi około 6 milionów sztuk. Szczególnie niebezpieczną, a jednocześnie najczęściej występującą chorobą wirusową u gęsi jest choroba Derzsy'ego (DD – Derzsy Disease), wywoływana przez parwowirus z rodziny *Parvoviridae* [1]. Podlega ona obowiązkowi rejestracji i stanowi poważny problem epizootyczny oraz ekonomiczny w wielkostadnej produkcji gęsi. Wirus powoduje masowe padnięcia gąsiąt, sięgające nawet 100%, znaczne spadki wagowe, a także ubytki w upierzeniu.

Dotychczas do wykrywania wirusa choroby Derzsy'ego stosowana była głównie technika PCR oraz real time PCR [2, 3, 6], jednak wymagają one zastosowania drogiego sprzętu i pochłaniają stosunkowo dużo czasu (nawet 4–5 godzin). W reakcji LAMP (loop mediated isothermal amplification) amplifikacja DNA zachodzi w warunkach stałej temperatury w prostej łaźni wodnej, z zastosowaniem 2–3 par starterów komplementarnych do odpowiedniego genu. Możliwość odczytywania wyników istnieje nawet po 30 minutach. W przypadku wyniku dodatniego widoczna jest w promieniach UV silna fluorescencja [4, 5].

Celem przeprowadzonych badań jest opracowanie metody LAMP do usprawnienia diagnostyki choroby Derzsy'ego i skrócenia czasu oczekiwania na wynik.

Materiał i metody

Próbki. Materiał do badań stanowiło 27 próbek pochodzących od gęsi z klinicznymi objawami choroby Derzsy'ego. Z wątrób i serc chorych ptaków wykonano 20% homogenaty, a następnie izolowano całkowite, komórkowe DNA (Qiagen).

Szczep standardowy. Standardowy szczep 24/03 (GenBank accession number – GQ 468411) został wyizolowany od gęsi w wieku 2,5 tygodni, z klinicznymi objawami DD. Szczep ten namnażano w hodowli fibroblastów 14-dniowych zarodków gęsi (GEF-goose embryo fibroblasts). Codziennie przez 7 dni obserwowano hodowlę, oceniając efekt cytopatyczny (CPE cytopathic effect).

PCR. Reakcję amplifikacji przeprowadzono przy użyciu starterów komplementarnych do genu VP3: GPV F 5'-TTTATGGCAGAGGGAGGAGGC – 3', GPV R 5' – GGGTTACAGATTTTGAGTTAG – 3', a następnie produkty reakcji izolowano w 2% żelu agarozowym i obserwowano pod lampą UV. Obecność produktów wielkości 1604 pz świadczyła o pozytywnym wyniku.

LAMP (loop mediated isothermal amplification). Do reakcji użyto 3 par starterów komplementarnych do genu VP3 (tab. 1). Kontrolę dodatnią stanowił szczep 24/03, natomiast ujemną DNA wyizolowane z niezakażonej hodowli GEF. Mieszanina reakcyjna zawierała polimerazę *Bsm* oraz barwnik SYBR Green lub Gel Red. Inkubacje przeprowadzono w łaźni wodnej, stosując różne temperatury: 55, 58, 60, 63, 65°C oraz odmienny czas: 20, 30, 60, 120 min. Po reakcji do prób dodano barwnik SYBR Green lub Gel Red, a wyniki odczytywano pod lampą UV, obserwując zieloną (SYBR Green) lub pomarańczową (Gel Red) luminescencję w przypadku obecności materiału genetycznego DDV bądź jej brak w przypadku prób ujemnych. Aby potwierdzić reakcję, dokonano rozdziału elektroforetycznego otrzymanych produktów. Charakterystyczna drabinka w żelu agarozowym widziana pod lampą UV świadczyła o wyniku pozytywnym.

Tabela 1. Sekwencje zastosowanych starterów

| Typ primerów | Sekwencja |
|--------------------|--|
| F3 forward outer | 5'-GGTTTGGCAGAACAGGGATA-3' |
| B3 backward outer | 5'-GCCCGTAGAGTACTGGGTTA-3' |
| FIP forward inner | 5'-GGCCAAATCCTCCGAGATTCGGTTTTTGGGGCAAAAATACCGAAGA-3' |
| BIP backward inner | 5'-CAATCCACCACCGCAGGTGTTTTTCCACTTCTGGTGCACGTATT-3' |
| LF loop forward | 5'-AAGGATGGAATTTACCATCAG-3' |
| LB loop backward | 5'-ATCAAGAATACACCAGTGCC-3' |

Specyficzność. Specyficzność reakcji sprawdzano przy zastosowaniu DNA: ptasiego adenowirusa typ-1 szczep CELO (FadV-1), gęsiego cirkowirusa (GoCV) oraz poliomawirusa (GHPV) oraz DNA wyizolowanego z niezakażonej hodowli fibroblastów gęsi (GEF).

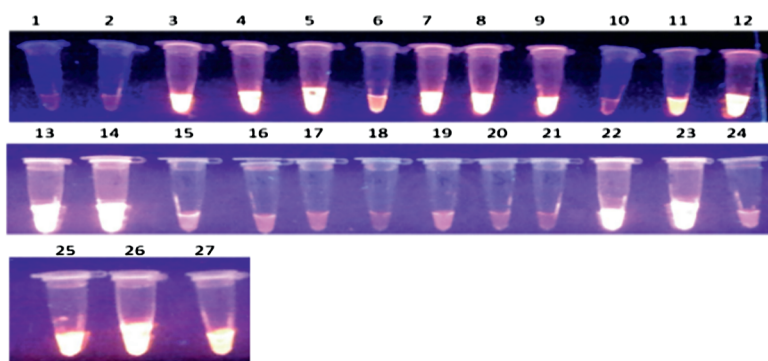
Czułość. Czułość reakcji określano poprzez zastosowanie pięciu 10-krotnych rozcieńczeń DNA izolowanego ze szczepu standardowego 24/03 o mianie od 100 do 0,001 TCID₅₀.

Wyniki i dyskusja

LAMP. Pozytywne wyniki widoczne jako zielona lub pomarańczowa luminescencja obserwowane były przy stosowaniu 60, 63 i 65°C przez 30, 60 i 120 min inkubacji. Następujące parametry uznano za optymalne do przeprowadzenia reakcji: 30 min inkubacji w temperaturze 60°C. Wyniki zostały potwierdzone przez elektroforezę otrzymanych produktów.

Czułość i specyficzność. Obecność luminescencji i charakterystycznej drabinki w żelu agarozowym widoczna była tylko w próbce zawierającej DDV, w pozostałych nie obserwowano fluorescencji pod lampą UV. Metoda pozwoliła na wykrywanie 0,1 TCID₅₀ szczepu DDV.

Porównanie metody LAMP i PCR z zastosowaniem materiałów z przypadków terenowych. 27 prób terenowych z podejrzeniem choroby Derzsy'ego przebadano, stosując metodę LAMP i PCR. Metodą LAMP wykryto materiał genetyczny DDV w 16 próbach (59,2%), natomiast metodą PCR w 15 (55,5%) (ryc. 1).



Ryc. 1. LAMP. Próbkki pozytywne: 3–9, 11–14, 22–23, oraz 25–27. Próbkki negatywne 1–2, 10, 15–21 oraz 24

Przeprowadzone badania własne pozwoliły na opracowanie LAMP jako szybkiej i dokładnej metody do wykrywania parwowirusów gęsich. Do przeprowadzenia testu wymagane jest użycie polimerazy *Bsm* oraz trzech par starterów, komplementarnych do genu VP3 wirusa DD, a także łaźnia wodna i lampka UV do wizualizacji wyników. Ocena wyników jest możliwa już po 30 minutach w temperaturze 60°C. Specyficzność reakcji została potwierdzona przez wykorzystanie wirusów należących do innych grup systematycznych (GCV, FadV, GHPV, MDV). Natomiast czułość została sprawdzona poprzez zastosowanie różnych koncentracji wirusa DD od 100 do 0,01 TCID₅₀ i ustalono, że wynosi 0,1 TCID₅₀

Yang i wsp. [7] zastosowali LAMP do diagnostyki choroby Derzsy'ego. W ich badaniach optymalne wyniki uzyskiwano po 20 minutach w temperaturze 65°C. Autorzy ponadto wykazali, że czułość i specyficzność LAMP jest porównywalna z FQ-PCR. W naszych badaniach, stosując PCR, wykrywano 1,0 TCID₅₀ DDV, natomiast LAMP wykrywał 0,1 TCID₅₀ tego wirusa. Obecność materiału genetycznego DDV za pomocą PCR wykazano w 15 z 27 przebadanych próbkach terenowych (55,5%), natomiast LAMP wykrył jego obecność w 16 próbkach (59,2%).

Podsumowując, opracowana metoda LAMP pozwala na szybkie wykrywanie omawianego wirusa nawet przez laboratoria, w których za względów ekonomicznych zastosowanie innych metod jest zbyt kosztowne i skomplikowane. Metoda ta jest konkurencyjna w stosunku do metod wirusologicznych, serologicznych, a nawet molekularnych. Nie wymaga zastosowania specjalistycznego (drogiego) sprzętu ani dużego doświadczenia osoby wykonującej badanie. Technika ta może znacznie usprawnić diagnostykę choroby Derzsy'ego oraz skrócić czas oczekiwania na wyniki.

Piśmiennictwo

- [1] Brown K.E., Green S.W., Young N.S., 1995. Goose parvovirus – an autonomus member of the Dependovirus genus. *Virology*, 210, 283–291.
- [2] Huang C., Cheng A.C., Wang M.S., Liu F., Han X.F., Wang G., Zhou W.G., Wen M., Jia R.Y., Guo Y.F., Chen X.Y., Zhou Y., 2004. Development and application of PCR to detect goose parvovirus. *Vet. Sci. China*, 9, 54–60.
- [3] Limn C.K., Yamada T., Nakamura M., 1996. Detection of goose parvovirus genome by polymerase chain reaction: distribution of goose parvovirus in Muscovy ducklings. *Virus Res.*, 1, 162–172.
- [4] Nagamine K., Watanabe K., Ohtsuka K., Hase T., Notomi T., 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin. Chem.*, 47, 1742–1743.
- [5] Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28, 63.
- [6] Yang J.L., Cheng A.Ch., Wang M.S., Pan K.Ch., Li M., Guo Y.F., Li Ch.F., Zhu D.K., Chen X.Y., 2009. Development of a fluorescent quantitative real time PCR assay for the detection of goose parvovirus *in vivo*. *Virology J.*, 6, 142 doi: 10.1186/1743–422X-6–142.
- [7] Yang J.L., Yang R., Cheng A.C., Wang M.S., Fu L.Z., Yang S.Q., Zhang S.H., Yang L., Xu Z.Y., 2010. A simple and rapid method for detection of goose parvovirus in the field by loop-mediated isothermal amplification. *Virology J.*, 7, 14 doi: 10.1186/1743–422X-7–14.

Histomonozą drobiu – opis przypadku

The cases report of histomoniasis

Histomonozą obok kokcydiozy jest uznawana za jedną z najważniejszych chorób pasożytniczych drobiu wywoływanych przez pierwotniaki. Mimo iż pierwsze przypadki histomonozy opisano przeszło sto lat temu, bo już w 1893 r. u indyków [7] i w 1900 r. u kurcząt, nadal stanowi poważne zagrożenie dla wielkotowarowej produkcji drobiu grzebiącego.

Histomonozą zwana czarną główką (Blackhead disease) wywoływana jest przez wiciowce z gatunku *Histomonas meleagridis*. Pierwotniak ten najczęściej atakuje indyki w wieku 2–16 tygodni. Jednak w ostatnich latach obserwuje się coraz częstsze przypadki zachorowań również wśród stad kur (*Gallus gallus*), głównie kur reprodukcyjnych mięsnych.

Histomonas meleagridis jest drobnym pierwotniakiem wrażliwym na działanie czynników środowiskowych. Nie formuje cyst ani innych form przetrwalnikowych. Najczęściej wiciowce dostają się do organizmu żywiciela poprzez jaja nicieni *Heterakis gallinarum* pasożytujących w jelicie ślepych ptaków [2]. Opisano jednak możliwość zarażenia ptaków bez udziału *Heterakis gallinarum* drogą wstępującą z kloaki do jelit ślepych poprzez kontakt bezpośredni z zarażonymi ptakami („cloacal drinking”) [5].

Objawy kliniczne choroby są mało specyficzne. Występuje spadek apetytu, zwiększenie zużycia wody, ptaki są osowiałe, niechętnie się poruszają, pojawia się biegunka, a kał staje się pienisty, jasnożółty lub zielonkawy [6]. Stopień śmiertelności może być zróżnicowany i zależy od przebiegu choroby: od 15% w przypadku postaci przewlekłej do nawet 100% w ostrej.

W obrazie sekcyjnym początkowo notowane są zmiany w przewodzie pokarmowym, głównie w obrębie jelit ślepych, które są silnie wzdęte, a ich ściany stają się zgrubiałe i przekrwione, obserwuje się również owrzodzenia na błonie śluzowej

oraz stwierdza się obecność włókniaka w świetle jelit ślepych. Po około 10 dniach od inwazji zaobserwować można zmiany na wątrobie. Są to charakterystyczne zmiany nekrotyczne otoczone pasem przekrwienia, osiągające średnicę do 1 cm.

W związku z wprowadzeniem w 2003 r. zakazu stosowania na terenie krajów Unii Europejskiej u zwierząt, których tkanki przeznaczone są do spożycia przez ludzi, leków z grupy imidazoli (Metronidazol, Ronidazol, Dimetridazol, Nifursol) będących lekami z wyboru przeciwko histomonozie choroba ta nabiera coraz większego znaczenia i stanowi poważny problem w produkcji drobiarskiej.

Opis przypadku

W stadzie kur reprodukcyjnych mięsnych linii Ross 308 w wieku 31 tygodni objawy kliniczne nasuwały podejrzenie wystąpienia histomonozы. Stado utrzymywano w kurniku produkcyjnym od 19. tygodnia życia. Początkowa obsada stada wynosiła 10 000 szt. Obiekt przed wstawieniem ptaków odpowiednio umyto i poddano dezynfekcji (mycie myjką wysokociśnieniową z użyciem preparatu Quatersan, bieleńie wapnem z dodatkiem 5% roztworu podchlorynu sodu, zamgławianie parami formaliny, zasłanie słomą, oprysk 2% roztworem Sanajodu). Na fermie znajdowały się 2 kurniki, w których utrzymywano ptaki w tym samym wieku pochodzące z tej samej odchowalni.

Materiał i metody

Do Zakładu Chorób Ptaków dostarczono zwłoki 5 kur reprodukcyjnych mięsnych linii Ross 308 w wieku 31 tygodni pochodzących ze stada liczącego 10 000 sztuk. U ptaków w stadzie klinicznie zaobserwowano niechęć do ruchu, podbierania paszy i wody, osowiałość, przysiadanie na skokach. Obserwowano pienistą biegunkę oraz gwałtowny spadek nieśności o około 35%. Zarejestrowano także podwyższenie śmiertelności ptaków w stadzie (około 0,2% dziennie). Wykonano następujące badania diagnostyczne:

- **Badanie sekcyjne.** Badaniu poddano wszystkie dostarczone do Zakładu ptaki. Dodatkowo pobrano od nich wycinki narządów wewnętrznych takich jak wątroba oraz jelita ślepe w celu wykonania badań molekularnych metodą PCR.
- **Badanie parazytologiczne.** W celu przeprowadzenia badania parazytologicznego pobrano wycinki jelit ślepych oraz wątroby, z których wykonano preparaty mikroskopowe.
- **Badanie PCR.** Technikami biologii molekularnej z wykorzystaniem metody PCR przeprowadzono diagnostykę w kierunku wykrycia materiału genetycznego pierwotniaka *Histomonas meleagridis*. Materiał do badań stanowiły wycinki jelit ślepych oraz wątroby zabezpieczone podczas badania sekcyjnego.

Z pobranych wycinków izolowano całkowite, komórkowe DNA przy użyciu komercyjnych kitów do izolacji DNA Genomic Mini firmy AA Biotechnology (Gdańsk, Polska). Izolacja DNA przeprowadzona została zgodnie z procedurą producenta. W celu identyfikacji gatunkowej zastosowane zostały 2 pary starterów komplementarnych do części sekwencji małej podjednostki rybosomu RNA: HIS5F i HIS5R oraz Hmf i Hmr [3, 4]. Primery do reakcji syntezowane były w firmie Genomed Polska. Reakcja PCR prowadzona została przy użyciu termocyklera iCycler z firmy Bio-Rad. Wszystkie odczynniki do reakcji PCR pochodziły z firmy AA Biotechnology (Gdańsk, Polska). Profil termiczny reakcji PCR ustalony został eksperymentalnie. Produkty reakcji PCR rozdzielone zostały na 1,5% żelu agarozowym (Prona Abo Polska) z dodatkiem Midori Green (Nippon) w buforze TAE (Bio-Rad) i wizualizowane przy użyciu zestawu do dokumentacji żeli Gel-Doc (Bio-Rad).

Wyniki

Badanie sekcyjne ptaków wykazało obecność owalnych zmian nekrotycznych na wątrobie o średnicy 6–7 mm oraz owrzodzeń na błonie śluzowej jelit ślepych. W świetle jelit ślepych obserwowano obecność złożeń włókniaka. W pozostałych narządach nie zaobserwowano żadnych zmian makroskopowych.

Pomimo obecności zmian anatomopatologicznych typowych dla histomonozы w badaniu parazytologicznym nie stwierdzono obecności pierwotniaka *Histomonas meleagridis*. Sytuacja taka prawdopodobnie była konsekwencją długiego czasu, jaki minął od śmierci zwierząt do momentu wykonania badania parazytologicznego, bowiem identyfikacja pierwotniaków w preparatach wymaga świeżego materiału. W zeszkrobinach z błony śluzowej jelit ślepych nie stwierdzono obecności oocyst *Eimeria* spp. oraz obecności jaj nicieni, w tym *Heterakis gallinarum*.

W wyniku przeprowadzonej reakcji amplifikacji otrzymano produkty PCR o wielkości 209 oraz 574 bp świadczące o obecności w badanych narządach wewnętrznych kur materiału genetycznego *Histomonas meleagridis*.

Obraz kliniczny, sekcyjny i przeprowadzone badanie z zastosowaniem techniki biologii molekularnej potwierdzają wystąpienie klinicznego przypadku histomonozы w stadzie kur reprodukcyjnych mięsnych.

Do tej pory histomonozа była utożsamiana z chorobą dotyczącą głównie indyków, jednak dane literaturowe z ostatnich lat świadczą o coraz częstszych przypadkach zdiagnozowania histomonozы w stadach kur reprodukcyjnych mięsnych. W 2010 r. Wieliczko i wsp. [8] rozpoznali przypadek histomonozы w stadzie kur reprodukcyjnych mięsnych linii Cobb 500 odchowywanych na ściółce, a w 2011 r. Dolka i wsp. [1] opisali podobny przypadek w stadzie kur 16 tygodniowych linii Ross 308 [1]. Problem histomonozы kur reprodukcyjnych mięsnych w Polsce staje się coraz po-

wszechniejszy i ze względu na ograniczone możliwości profilaktyki i braku zarejestrowanych produktów leczniczych stanowi poważne wyzwanie dla lekarzy weterynarii.

Piśmiennictwo

- [1] Dolka B., Żbikowski A., Szeleszczuk P., Dolka I., 2011. Histomonozą stad rodzicielskich brojlerów kurzych w świetle własnych obserwacji, Konferencja Drobiarska „Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem pasożytów”, Wrocław, 53–59.
- [2] Gawęł A., Antonik S., 2005. Histomonozą indyków. Indyk Polski, 1, 18.
- [3] Grabensteiner E., Hess M., 2006. PCR for the identification and differentiation of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* spp. Vet. Parasitology, 142, 223–230.
- [4] Huber K., Chauve C., Zenner L., 2005. Detection of *Histomonas meleagridis* in turkey cecal droppings by PCR amplification of the small subunit ribosomal DNA sequence. Vet. Parasitology, 131, 311–316.
- [5] Huber K., Reynaud M.C., Callait M.P., Zenner L., 2005. *Histomonas meleagridis* in turkeys: dissemination kinetics in host tissues after cloacal infection. Poultry Sci., 85, 1008–1014.
- [6] Mazurkiewicz M., 2005. Choroby drobiu, Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, 528–530.
- [7] Smith T., 1895. An infectious disease among Turkey caused by protozoa (*infectious entero-hepatitis*). US Dept. Agric., Bur. Ann. Ind. Bull., 8, 1–38.
- [8] Wieliczko A., Janczewski A., Chrzęstek K., Kuczkowski M., 2010. Histomonozą w stadzie kur – przypadek kliniczny. Mag. Wet. – Monografia – Choroby ptaków, 5, 472–473.

TOMASZ STENZEL
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
GRAŻYNA SZULIA, JUSTYNA FORDOŃSKA, JOLANTA GÓRSKA
Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Olsztynie
MARCIN ŚMIAŁEK, BARTŁOMIJ TYKAŁOWSKI, DARIA PESTKA, ANDRZEJ KONCICKI
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,

Antybiotykooporność wybranych bakterii izolowanych od gołębi w Polsce na przestrzeni lat 2010–2013

Antimicrobial resistance of selected bacteria isolated from pigeons in Poland in the years 2010–2013

Gołębie domowe utrzymywane w Polsce można podzielić na trzy główne typy użytkowe: gołębie pocztowe (biorące udział w wyścigach), gołębie ozdobne (biorące udział w wystawach i pokazach) oraz gołębie amatorskie (nierasowe, utrzymywane z reguły bez żadnej kontroli i opieki weterynaryjnej). Ceny gołębi pocztowych oraz niektórych ras ozdobnych bywają wysokie, w związku z tym istnieje świadoma potrzeba utrzymywania ich w jak najlepszym zdrowiu. Dotyczy to głównie gołębi pocztowych, u których wysoka kondycja jest konieczna do osiągnięcia dobrych wyników w wyścigach. Niestety, w związku z niskim poziomem wiedzy lekarzy weterynarii dotyczące chorób i leczenia tej grupy pacjentów oraz niewielką liczbą zarejestrowanych na krajowym rynku produktów leczniczych przeznaczonych do terapii tych ptaków współpraca na linii hodowca–lekarz weterynarii z reguły jest słaba. Potęguje to fakt ogólnej dostępności dla hodowców preparatów leczniczych niezarejestrowanych w Polsce do legalnego stosowania. Składnikami takich preparatów często są antybiotyki lub kombinacje antybiotyków, kokcydiostatyków oraz substancji o działaniu przeciw-

rzęsistkowym. Powyższa sytuacja sprawia, że duża część hodowców stosuje właśnie te preparaty bez kontroli czy nawet konsultacji z lekarzem weterynarii. Braki u hodowców gołębi wiedzy dotyczącej zasad prowadzenia terapii skutkuje nieuzasadnionym czy wręcz bezmyślnym stosowaniem chemioterapeutyków, co staje się przyczyną powstawania lekooporności bakterii występujących u gołębi domowych.

Aktualnie wiadomo, że samodzielne zakażenia bakteryjne rzadko stanowią problem w patologii gołębi. Większość zachorowań gołębi, szczególnie młodych, to zakażenia bakteryjne towarzyszące infekcjom cirkowirusowym. Choroba nazywana potocznie zespołem chorobowym gołębi młodych (YPDS – Young Pigeon Disease Syndrome) jest możliwa do leczenia i wskazana jest w tym czasie osłonowa antybiotykoterapia [8, 10]. Leczenie bywa jednak nieskuteczne, głównie na skutek zbyt późnej interwencji i występującej u bakterii lekooporności. Do bakterii najczęściej występujących w YPDS należą *Escherichia (E.) coli*, gronkowce, paciorkowce oraz *Klebsiella pneumoniae* [8].

Dobrze znaną chorobą bakteryjną gołębi jest salmonelloza. Jest to choroba mogąca poczynić duże spustoszenie w stadach wrażliwych ptaków, a wśród piskląt może doprowadzać do blisko 100% śmiertelności. W obecnych czasach straciła jednak na znaczeniu i zakażenia pałeczkami *Salmonella* są rzadziej notowane. Najczęściej stwierdzana jest wśród gołębi ozdobnych, szczególnie utrzymywanych w bardzo licznych stadach [4].

Celem niniejszego opracowania było oszacowanie stopnia lekooporności na wybrane antybiotyki u *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* oraz gronkowców β -hemolitycznych koagulazo dodatnich izolowanych od gołębi hodowanych w Polsce.

Materiał i metody

Próbki. Próbkami do badań stanowiły gołębie różnych typów użytkowych pochodzące z łącznie 634 stad ulokowanych w całej Polsce. Ptaki były dostarczane do Katedry Chorób Ptaków UWM w Olsztynie na przestrzeni lat 2010–2013. Materiał do badań stanowiły wymazy z kloaki oraz kałomoczu pobrane od gołębi zdrowych (okresowe badania kontrolne) lub chorych. Jeżeli w chorych stadach notowane były padnięcia, wówczas pobierano próbki narządów wewnętrznych (wątroba, jelita, serce, nerki) i wykonywano z nich posiewy bakteriologiczne.

Badania bakteriologiczne – posiewy. Pobrane próbki posiewano bezpośrednio na podłoża: Słanetza, MacConkeya, Czapmana oraz podłoże agarowe z czerwienią fenolową i zielenią brylantową (BGA). Po wstępnym namnażaniu kolonie odpowiadające wyglądom koloniom gronkowców przesiewano na podłoże agarowe z 5% dodatkiem krwi baraniej w celu określenia, czy dany szczep posiada zdolność do hemolizy. W przypadku potwierdzenia właściwości hemolitycznych danego szczepu gronkowców kolonie przesiewano na podłoże wzbogacone plazmą króliczą (Biomedica, Polska) w celu zróżnicowania ich na szczepy wytwarzające koagu-

lązę (Kag+) lub niewytwarzające tego enzymu (Kag-). Gronkowce oznaczone jako β -hemolityczne koagulazododatnie różnicowano dodatkowo na gatunki *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus intermedius* za pomocą gotowego zestawu API 32 Staph (bioMerieux, Francja). Diagnostykę *Salmonelli* wykonywano po namnażaniu w zbuforowanej wodzie peptonowej i posianiu na podłoża MRSV, XLD (agar z xylozą i lizyną) i BGA. Badania te przeprowadzone zostały zgodnie z wytycznymi PN-EN ISO 6579:2003+A:2007. Różnicowanie na serowary wykonano przy użyciu surowic diagnostycznych firmy Immunolab (Polska).

Badania bakteriologiczne – ocena wrażliwości na antybiotyki. Ocena wrażliwości wyizolowanych szczepów na antybiotyki wykonano metodą dyfuzyjno-krążkową. W tym celu zastosowano krążki fimry Oxoid (Wielka Brytania) zawierające następujące antybiotyki: amoksycylina (25 μ g), amoksycylina z kwasem klawulonowym (30 μ g), oxacylina (1 μ g) – tylko w przypadku wyizolowania gronkowców β -hemolitycznych koagulazo dodatnich, enrofloksacyna (5 μ g), flumechina (30 μ g), norfloksacyna (10 μ g), oksytetracyklina (30 μ g), doksy cyklina (30 μ g), linkomycyna + spektynomycyna (109 μ g), kolistyna (10 μ g) florfenikol (30 μ g), neomycyna (30 μ g) oraz sulfametoksazol potencjonowany trimetoprimem (25 μ g). Oporność na antybiotyki była oceniana zgodnie z wytycznymi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) na podstawie wielkości strefy zahamowania wzrostu kolonii bakteryjnych. Graniczne parametry stref zahamowania dla poszczególnych kolonii bakteryjnych zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka krążków do antybiogramów wykorzystywanych w badaniach

| Antybiotyki | Stężenie (μ g/krążek) | Stopień wrażliwości wg producenta (mm) | | |
|--------------------------------|----------------------------|--|-------|-----------|
| | | W | SW | O |
| Amoksycylina | 25 | ≥ 20 | - | ≤ 19 |
| Amoksycylina + kw. klawulonowy | 30 | ≥ 20 | - | ≤ 19 |
| Oxacylina | 1 | | | |
| Enrofloksacyna | 5 | ≥ 21 | 16–20 | ≤ 15 |
| Flumechina | 30 | ≥ 22 | 19–21 | ≤ 18 |
| Norfloksacyna | 10 | ≥ 17 | 13–16 | ≤ 12 |
| Doksy cyklina | 30 | ≥ 16 | 13–15 | ≤ 12 |
| Oksytetracyklina | 30 | ≥ 19 | 15–18 | ≤ 14 |
| Linkomycyna+spektynomycyna | 109 | ≥ 13 | 11–12 | ≤ 10 |
| Kolistyna | 10 | ≥ 11 | 9–10 | ≤ 8 |
| Sulfametoksazol+trimetoprim | 25 | ≥ 16 | 11–15 | ≤ 10 |
| Florfenikol | 30 | ≥ 20 | 17–19 | ≤ 16 |
| Neomycyna | 30 | ≥ 17 | 13–16 | ≤ 12 |

Objaśnienia skrótów: W – wrażliwy, SW – średnio wrażliwy, O – oporny

Wyniki

Prewalencja występowania poszczególnych bakterii u gołębi domowych. Dane dotyczące procentowego udziału poszczególnych bakterii zostały zestawione w tabeli 2. Jak wynika z jej treści, najczęściej notowanymi bakteriami były gronkowce β -hemolityczne koagulazododatnie (37%) oraz *E. coli* (36%), a także gronkowce koagulazoujemne (24%), które uznano za florę saprofityczną i niewykorzystywano tych szczepów do dalszych analiz. Spośród badanych gronkowców 1% udało się sklasyfikować jako *Staphylococcus aureus* oraz 9% jako *Staphylococcus intermedius*. Prewalencja zakażeń *Salmonella Typhimurium* okazała się niska i wynosiła zaledwie 7%.

Tabela 2. Występowanie wybranych bakterii w u gołębi domowych w Polsce w latach 2010–2013. Łączna liczba przebadanych stad wynosiła 634

| Stwierdzone drobnoustroje | Liczba prób dodatnich | |
|---|-----------------------|-----|
| | (n) | (%) |
| <i>E. coli</i> niehemolityczne | 226 | 36 |
| <i>E. coli</i> hememolityczne | 3 | 0 |
| <i>Staphylococcus</i> β -hemolityczne koagulazododatnie | 234 | 37 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 | 1 |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> | 56 | 9 |
| <i>Staphylococcus</i> β -hemolityczne koagulazoujemne | 150 | 24 |
| <i>Salmonella Typhimurium</i> | 43 | 7 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 25 | 4 |

Ocena lekooporności bakterii. Wyniki oceny lekooporności badanych szczepów bakterii zestawiono w tabeli 3. Jak wynika z danych w niej zawartych, wrażliwość na poszczególne antybiotyki różniła się w zależności od szczepu bakterii, co jest związane z ich cechami genetycznymi. W przypadku izolatów *E. coli* najmniej skutecznymi antybiotykami okazały się tetracykliny (74% szczepów opornych na doksycylinę i 75% szczepów opornych na oksytetracyklinę) oraz amoksycylina (63% szczepów opornych). W przypadku gronkowców największą oporność odnotowano w stosunku do oksytetracykliny (95% szczepów opornych) oraz chinolonów (około 70%). Około 5% gronkowców okazało się opornych na oxacylinę. Najmniejszą lekooporność odnotowano pośród izolatów *Salmonella Typhimurium*, gdzie zaledwie po 2% szczepów było opornych na neomycynę i kolistynę.

Izolaty *E. coli* wykazywały największą wrażliwość względem kolistyny (96%), połączenia linkomycyny ze spektynomycyną (91%) oraz florfenikolu i amoksycyliny z kwasem klawulonowym (po 86%). Z kolei gronkowce najbardziej wrażliwe były na florfenikol (99%), sulfametoksazol potencjonowany trimetoprimem (93%)

oraz antybiotyki β -laktamowe (średnio 93%). Izolaty *Salmonella* Typhimurium były wrażliwe na większość badanych antybiotyków.

Tabela 3. Wrażliwość na wybrane antybiotyki badanych szczepów bakterii

| Antybiotyki | <i>E. coli</i> n. hem. | | | <i>Staphylococcus</i> β -hem. Kag+ | | | <i>Staphylococcus</i> intermedius | | | <i>Staphylococcus</i> aureus | | | <i>Salmonella</i> Typhimurium | | |
|---------------------------------|------------------------|--------|-------|--|--------|-------|-----------------------------------|--------|-------|------------------------------|--------|-------|-------------------------------|--------|-------|
| | W (%) | SW (%) | O (%) | W (%) | SW (%) | O (%) | W (%) | SW (%) | O (%) | W (%) | SW (%) | O (%) | W (%) | SW (%) | O (%) |
| Amoksyacylina | 34 | 3 | 63 | 88 | 0 | 12 | 92 | 0 | 8 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| Amoksyacylina + kw. klawulonowy | 86 | 6 | 8 | 97 | 0 | 3 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| Oxacylina | X | X | X | 95 | 0 | 5 | 96 | 0 | 4 | 100 | 0 | 0 | X | X | X |
| Enrofloksacylina | 61 | 17 | 22 | 23 | 2 | 75 | 33 | 0 | 67 | 20 | 0 | 80 | 100 | 0 | 0 |
| Flumechina | 39 | 8 | 53 | 23 | 3 | 74 | 30 | 10 | 60 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| Norfloksacylina | 76 | 2 | 22 | 31 | 1 | 68 | 39 | 2 | 59 | 50 | 0 | 50 | 100 | 0 | 0 |
| Doksycyklina | 22 | 5 | 74 | 18 | 39 | 42 | 19 | 33 | 48 | 0 | 80 | 20 | 98 | 2 | 0 |
| Oksytetracyklina | 21 | 4 | 75 | 5 | 0 | 95 | 4 | 0 | 96 | 0 | 0 | 100 | 98 | 2 | 0 |
| Linkomycyna + spektynomycyna | 91 | 2 | 7 | 31 | 0 | 69 | 38 | 0 | 62 | 60 | 0 | 40 | 100 | 0 | 0 |
| Kolistyna | 96 | 2 | 2 | 16 | 36 | 47 | 16 | 25 | 59 | 60 | 20 | 20 | 98 | 0 | 2 |
| Sulfametoksazol + trimetoprim | 47 | 0 | 53 | 93 | 0 | 8 | 94 | 0 | 6 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| Florfenikol | 86 | 6 | 8 | 99 | 0 | 1 | 96 | 2 | 2 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| Neomycyna | 14 | 71 | 15 | 62 | 27 | 11 | 67 | 22 | 11 | 60 | 40 | 0 | 88 | 9 | 2 |

Objaśnienia skrótów: W – szczep wrażliwy, SW – szczep średnio wrażliwy, O – szczep oporny, X – nie badano

Wnioski

Choroby powodowane przez bakterie odporne na jednocześnie kilka antybiotyków stanowią coraz większy problem zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej, co może mieć potencjalny wpływ na skuteczność terapii [5]. Izolaty *E. coli* i gronkowców uwzględnione w niniejszych badaniach okazały się odporne na najczęściej stosowane antybiotyki. Dużą skutecznością w przypadku *E. coli* wykazywały się wprawdzie kolistyna oraz połączenie linkomycyny ze spektynomycyną, ale ze względu na słabe wchłanianie się tych substancji aktywnych z przewodu pokarmowego skuteczność ich stosowania w terapii zakażeń ogólnoustrojowych może być znacznie ograniczona. Skuteczną substancją okazał się także florfenikol, lecz uwzględniając toksyczność tego antybiotyku oraz niechętnie pobieranie go przez ptaki, również i jego zastosowanie w terapii jest ograniczone. Dużą lekooporność

zanotowano także wśród izolowanych od gołębi gronkowców, które okazały się odporne na chinolony i tetracykliny. Najlepszą wrażliwość stwierdzono wobec antybiotyków beta-laktamowych, które nadal stanowią lek z wyboru w przypadku leczenia infekcji wywoływanych przez te bakterie. Znacznie lepszą skuteczność potwierdzono w przypadku amoksycyliny z kwasem klawulonowym niż samej amoksycyliny i uwzględniając fakt, że większość izolatów *E. coli* analizowanych w niniejszych badaniach również była na nie wrażliwa, może być to lek stosowany do leczenia infekcji mieszanych tymi drobnoustrojami.

Bardzo niepokojące głównie z punktu widzenia możliwości występowania zakażeń u ludzi jest stwierdzenie gronkowców β -hemolitycznych koagulazododatnich opornych na metycylinę (MRSA) [6]. Wprawdzie określenie MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) dotyczy gronkowców złocistych, jednak w badanych próbkach szczepy metycylinooporne stwierdzano w przypadku izolacji *Staphylococcus intermedius* oraz gronkowców, których niesklasyfikowano na gatunki. Oporne na metycylinę szczepy gronków są częstą przyczyną zakażeń wewnątrzszpitalnych. Wykształcony przez drobnoustroje typ oporności oznacza brak wrażliwości na wszystkie antybiotyki z grupy beta-laktamów, w tym penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy czy karbapenemy, ponadto w 90% występuje krzyżowa oporność z makrolidami oraz fluorochinolonami. Oporność ta polega na syntezie zmienionego białka wiążącego antybiotyk – tzw. PBP (Penicilin Binding Protein). Zmienione białko PBP nie wykazuje powinowactwa do beta-laktamu [11]. Transmisja MRSA z gołębi na człowieka jest możliwa ze względu na nierzadko dużą ilość czasu, jaką hodowcy poświęcają ptakom przy jednoczesnym niezachowywaniu podstawowych zasad higieny podczas kontaktu z ptakami. Coraz rzadziej, ale niestety nadal, zdarzają się przypadki karmienia piskląt gołębi ras krótkodziobych przez podawanie ziaren bezpośrednio z ust hodowcy, co znacznie ułatwia potencjalną transmisję zakażeń. Natomiast sam fakt transmisji takich drobnoustrojów czy nawet drobnoustrojów dla ludzi niechorobotwórczych a opornych na antybiotyki może stanowić poważny problem dla medycyny ludzkiej, wynikający z prawdopodobieństwa przekazywania lekooporności choćby przez plazmidy [2].

Prezentowane w niniejszym opracowaniu dane wskazujące na bardzo dużą lekooporność bakterii izolowanych od gołębi zgodne są z wynikami uzyskanymi w innych krajach [1, 3, 7, 9]. Uwagę przykuwają prace, które ukazały się kilka czy kilkanaście lat temu, ponieważ ich analiza w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez autorów sugeruje, że lekooporność bakterii występujących w populacji gołębi systematycznie wzrasta. Zjawisko to zdecydowanie może zostać wytłumaczone nadużywaniem substancji przeciwbakteryjnych w hodowli gołębi. Ze względu na fakt, że hodowcy gołębi mają skłonności do samodzielnego leczenia swoich podopiecznych lub stosowania jedno- albo dwudniowych „kuracji profilaktycznych” bez żadnej diagnozy, sytuacja związana z lekoopornością bakterii u gołębi będzie ulegać pogorszeniu.

Bardzo kontrastowe wyniki do omawianych powyżej uzyskano po przeanalizowaniu wrażliwości na antybiotyki szczepów *Salmonella* Typhimurium. Uzyskane dane są jednak zgodne z dostępnymi w literaturze informacjami pochodzącymi od innych autorów [3]. Co ciekawe, lekooporność była nie tylko niska, ale i powtarzalna w przypadku większości analizowanych izolatów tej bakterii. Mimo tego faktu salmonelloza jest chorobą bardzo trudną do zwalczania u gołębi, co wynika z jednej strony z dużej oporności tych bakterii na czynniki fizykochemiczne (zdolność do utrzymywania się w środowisku bytowania ptaków przez długi czas), a z drugiej – z możliwości występowania jej wewnątrzkomórkowo.

Podsumowując, lekooporność wśród gołębi szczepów bakterii jest bardzo duża i zdecydowanie wynika z niekontrolowanego stosowania substancji przeciwbakteryjnych u tych ptaków. Powyższe może stanowić realne zagrożenie dla zdrowia człowieka, ze względu na łatwą transmisję bakterii z ptaków na ludzi opiekujących się nimi spowodowaną długą ekspozycją organizmu człowieka na bakterie. Jedynym wyjściem z tej sytuacji wydaje się być ograniczenie stosowania antybiotyków w hodowli gołębi, w tym głównie zaprzestania stosowania terapii profilaktycznych. Uwzględniając jednak małą liczbę preparatów zarejestrowanych do stosowania u tych ptaków oraz praktycznie nieograniczony dostęp hodowców gołębi do leków (większy niż lekarzy weterynarii!) oraz niechętną współpracę na linii lekarz–hodowca, może okazać się to niemożliwe.

Piśmiennictwo

- [1] Futagawa-Saito K., Ba-Thein W., Fukuyasu T., 2007. High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. *Research in Veterinary Science*, 83, 336–339.
- [2] Gómez-Sanz E., Kadlec K., Feßler A.T., Zarazaga M., Torres C., Schwarz S., 2013. Novel erm(T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Epub ahead of print].
- [3] Kimpe A., Decostere A., Martel A., Haesebrouck F., Devriese L.A., 2002. Prevalence of antimicrobial resistance among pigeon isolates of *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Avian Pathology*, 31, 393–397.
- [4] Kriz P., Sisak F., Slana I., Karpiskova r., Docekal J., Skoric M., Fictum P., Babak V., Pavlik I., 2011. *Mycobacterium avium* Subsp. *avium* and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium var. Copenhagen phage type DT2 in pigeons. *Foodborne pathogens and disease*, 10, 1135–1137.
- [5] Livermore D.M., 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36 (Suppl. 1), 11–23.
- [6] Prosperi M., Veras N., Azarian T., Rathore M., Nolan D., Rand K., Cook R.L., Johnson J., Morris J.G. Jr, Salemi M., 2013. Molecular Epidemiology of Community-Associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomic era: a Cross-Sectional Study. *Scientific Reports*, 3, 1902.

- [7] Radimersky T., Frolkova P., Janoszowska D., Dolejska M., Svec P., Roubalova E., Cikova P., Cizek A., Literak I., 2010. Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*) in feral pigeons. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1687–1695.
- [8] Raue R., Schmidt V., Freick M., Reinhardt B., Johne R., Kamphausen L., Kaleta E.F., Müller H., Krautwald-Junghanns M.E., 2005. A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathology*, 34, 418–425.
- [9] Scullion F.T., Scullion M.G., 2010. Multiresistant *Escherichia coli* in racing pigeons. *Veterinary Record*, 167, 880.
- [10] Stenzel T., Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A., 2012. Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland. *Veterinary Record*, 171, 562.
- [11] Yoshida H., Kawai F., Obayashi E., Akashi S., Roper D.I., Tame J.R., Park S.Y., 2012. Crystal structures of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms. *Journal of Molecular Biology*, 423, 351–364.

GRZEGORZ WOŹNIAKOWSKI
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
TOMASZ STENZEL
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
ANDRZEJ KONCICKI
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Otrzymanie rekombinowanego białka CI cirkowirusa gołębi (PiCoV)

Development of recombinant CI protein of pigeon circovirus (PiCoV)

Cirkowirusy stanowią jeden z największych problemów zdrowotnych w hodowli gołębi. Szczególnie wrażliwe na zakażenie są młode gołębie od 3. do 20. tygodnia życia, u których występuje syndrom chorobowy młodych gołębi (YPDS) wywołany przez wieloczynnikowe zakażenia wirusowe, cechujący się wysoką śmiertelnością. Charakterystycznymi objawami klinicznymi towarzyszącymi zakażeniom cirkowirusami są: ospałość, utrata wagi, trudności w oddychaniu, biegunka i nieprawidłowe upierzenie. Cirkowirusy gołębi odgrywają przede wszystkim rolę immunosupresyjną i wklajają wtórne zakażenia wirusowe i bakteryjne. Po raz pierwszy ich występowanie opisano w USA, a następnie w Australii, Południowej Afryce, Kanadzie i Europie. Cirkowirus gołębi (PiCoV) należy do rodzaju *Circovirus* rodziny *Circoviridae*. Bezotoczkowe wiriony PiCoV posiadają jednoniciowy DNA o wielkości od 1,7 do 2,5 kbp w zależności od zróżnicowania genetycznego izolatów terenowych. W genomie PiCoV występuje pięć otwartych ramek odczytu (ORFs). Pierwsza ramka koduje białko związane z replikacją wirusa (Rep). Z kolei białko kapsydu

(Cap) kodowane jest przez region C1 i ma ono wielkość 274 aminokwasów i masę 31,9 kDa. W przebiegu zakażenia PiCoV zmiany anatomopatologiczne obserwowane są głównie w narządach związanych z układem limfatycznym, w którym dochodzi do znacznego obniżenia ogólnej liczby limfocytów. Diagnostyka zakażeń PiCoV na podstawie objawów klinicznych czy też zmian anatomopatologicznych jest kłopotliwa, gdyż u niektórych ptaków wirus nie wywołuje postaci klinicznej choroby. Metody izolacji wirusa w hodowlach komórkowych nie są skuteczne w przypadku PiCoV. Jedną z najbardziej przydatnych metod diagnostycznych jest łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), która pozwala na badanie występowania PiCoV w narządach wewnętrznych gołębi oraz krwi obwodowej. Pomimo dużej przydatności tej metody testy serologiczne takie jak ELISA stanowią bardzo dobrą alternatywę dla PCR i służą często jako potwierdzenie wyników uzyskanych metodami biologii molekularnej. Z tego względu wartościowe wydaje się, że opracowanie testu ELISA na bazie rekombinowanego białka kapsydu PiCoV pozwoliłoby na skuteczną diagnostykę zakażeń cirkowirusami u gołębi. Celem podjętych badań było otrzymanie rekombinowanego białka C1 PiCoV do testów serologicznych.

Materiał i metody

Do badań użyto izolatu GW2012 pozyskanego od gołębi hodowlanych w wieku 16 tygodni. U gołębi obserwowano nieprawidłowości w upierzeniu oraz znaczne wychudzenie. Z wątrób gołębi wykazujących objawy kliniczne izolowano całkowity DNA przy użyciu zestawu komercyjnego w celu stwierdzenia obecności PiCoV metodą PCR. Dlatego też zaprojektowano startery oligonukleotydowe komplementarne do regionu kodującego białko C1 PiCoV, posiadające miejsca restrykcyjne dla enzymów *HindIII* oraz *SalI*. Sekwencje starterów były następujące:

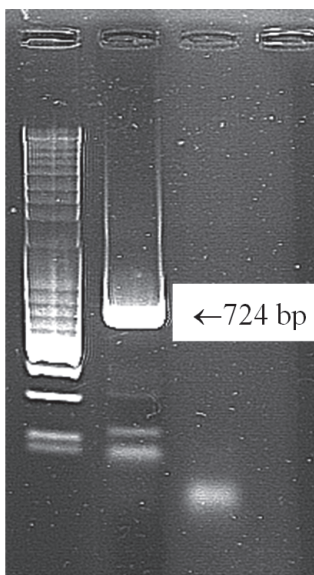
- PiCoV F: 5'-CCAAAGCTTATGAGGAGGCGGAGATTCAGACG-3'
- PiCoV R: 5'-GTGGTCGACTTATTTCAGAATCCACAGCTGAGT-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji genu C1 był następujący: 2,5 µl 10 x stężonego buforu do PCR (50 mM KCl, pH=9, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂); po 0,5 µl (0,2 µm) każdego ze starterów, 1 µl dNTP (0,2 µm); 4 µl betainy (1 M); 0,5 µl polimerazy DNA *Taq* (5 U/µl) oraz 14,5 µl wody dejonizowanej o stopniu czystości 1. Do tak sporządzonej mieszaniny dodawano 2 µl DNA izolatu GW2012. Otrzymany w 1% żelu agarozowym produkt PCR oczyszczano i sekwencjonowano, a następnie poddano ligacji po trawieniu enzymami *HindIII* oraz *SalI* z plazmidem ekspresyjnym pET (Novagen). W ten sposób uzyskano plazmid pC1PiCoV, którym transformowano komórki bakteryjne *E.coli* linii BL21 (DE3) Rosetta. Wyrosłe po 24 godz. inkubacji na podłożu Luria-Berani (LB) z dodatkiem ampicyliny (50 µg/ml), IPTG i X-Gal białe kolonie bakterii zawierające plazmid pC1PiCoV sprawdzano metodą PCR. O prawidłowym wprowadzeniu genu C1 do wektora ekspresyjnego świadczyła

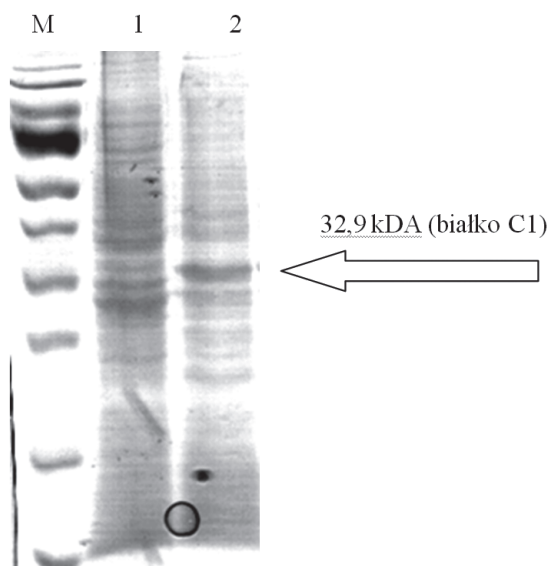
obecność produktu o wielkości 724 bp. Następnie pojedynczą kolonią bakteryjną inokulowano 2 ml podłoża płynnego z dodatkiem ampicyliny i inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin z jednoczesnym wytrząsaniem 225 obr./min. W kolejnym etapie 250 ml podłoża LB z ampicyliną inokulowano 1 ml hodowli bakterii z poprzedniego etapu. W celu indukcji ekspresji białka C1 w momencie logarytmicznego wzrostu komórek bakteryjnych przy $OD_{600}=0,5-0,6$ dodawano 1 mM IPTG. Jako kontrolę użyto komórek bakterii nie indukowanych IPTG. Po pięciu godzinach inkubacji w 37°C z wytrząsaniem hodowlę bakterii odwirowywano przy 8000 x g przez 10 min, a z uzyskanego osadu komórek bakteryjnych oczyszczano rekombinowane białko przy użyciu kolumnienek ze złożem niklowym (Clontech). Otrzymane białko sprawdzano w 12% żelu SDS-PAGE w warunkach denaturujących i przechowywano do dalszych etapów badań w temperaturze -70°C.

Wyniki

Badania potwierdziły przynależność izolatu GW2012 do cirkowirusów gołębi. W opracowanej metodzie PCR uzyskano wyraźny produkt wielkości 724 bp (ryc. 1). Przeprowadzona analiza sekwencji produktu PCR kodującego białko C1 kapsydu PiCoV potwierdziła jego 100% stopień podobieństwa do sekwencji izolatów znajdujących się w bazie danych GenBanku. Otrzymanie oczyszczonego produktu PCR pozwoliło na konstrukcję wektora ekspresyjnego pC1PiCoV, użytego następnie do transformacji kompetentnych komórek *E. coli* BL21. Wyrosłe białe kolonie bakterii wykazały obecność insertu genu C1 PiCoV. W kolejnym etapie badań użyto rekombinowanych kolonii bakterii do inokulacji podłoża płynnego i indukcji ekspresji rekombinowanego białka. Wykazano, że indukcja 1 mM IPTG powodowała znaczny wzrost ekspresji białka C1, co obserwowano po rozdziale elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym jako znaczne zmętnienie hodowli płynnej, jak również pogrubienie prążka w żelu SDS-PAGE o wielkości 32,9 kDA (ryc. 2). Otrzymane rekombinowane białko zostało oczyszczone i będzie użyte w kolejnym etapie badań do opracowania testu ELISA do wykrywania specyficznych przeciwciał PiCoV.



Ryc. 1. PCR. Amplifikacja regionu CI cirkowirusa gołębi (PiCoV). Zaznaczono produkt PCR wielkości 724 bp



Ryc. 2. Analiza rekombinowanego białka CI PiCoV w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. 1 – hodowla bakterii nie indukowana IPTG, 2 – hodowla bakterii indukowana 1 mM IPTG

Piśmiennictwo

- [1] Daum I., Finsterbusch T., Härtle S., Göbel T.W., Mankertz A., Korbel R., Grund C., 2009. Cloning and expression of a truncated pigeon circovirus capsid protein suitable for antibody detection in infected pigeons. *Avian Pathol.*, 38, 135–141.
- [2] Krapez U., Slavec B., Steyer A.F., Pintaric S., Dobeic M., Rojs O.Z., Dovc A., 2012. Prevalence of pigeon circovirus infections in feral pigeons in Ljubljana, Slovenia. *Avian Dis.*, 56, 432–435.
- [3] Schmidt V., Schlömer J., Lüken C., Johne R., Biere B., Müller H., Krautwald-Jungmanns M.E., 2008. Experimental infection of domestic pigeons with pigeon circovirus. *Avian Dis.*, 52, 380–386.
- [4] Stenzel T.A., Pestka D., Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A., 2012. Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland. *Vet. Rec.*, 171, 562.
- [5] Todd D., Fringuelli E., Scott A.N., Borghmans B.J., Duchatel J.P., Shivaprasad H.L., Raidal S.R., Abadie J.X., Franciosini M.P., Smyth J.A., 2008. Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Res. Vet. Sci.*, 84, 311–319.

MARIA BIERNACKA, WOJCIECH MŁODAWSKI,
AGNIESZKA OLSZYŃSKA, JOANNA SZYBALSKA,
JOANNA ŚWIDER, KATARZYNA WITT,
SYLWIA DONER, PIOTR SZELESZCZUK
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Ocena parazytofauny jelitowej warszawskich gołębi miejskich (*Columba livia f. urbana*) w sezonowym cyklu obserwacji

Evaluation of the prevalence of intestinal parasites in Warsaw's urban pigeons (*Columba livia* *f. urbana*) in the seasonal cycle of observation

Gołębie (*Columba livia f. urbana*) powszechnie występują w aglomeracjach miejskich w całej Polsce. W Warszawie latem na 1 km² przypada 390–680 gołębi, zimą od 970 do nawet 1760 gołębi. Duże zagęszczenie tych ptaków w mieście sprzyja często występowaniu chorób pasożytniczych. Wśród najczęściej występujących inwazji gołębi wymienia się między innymi kokcydiozę (*Eimeria columbarum*, *E. labbeana*, *E. columbae*), glistnicę (*Ascaridia columbae*), kapilariozę (*Capillaria obsignata*) oraz rzadziej zarażenia *Raillietina* (*R. bonini*, *R. tetragona*, *R. echinobothrida*) [2, 3, 4].

Materiał i metody

Badania dotyczące stopnia zarażenia warszawskich gołębi miejskich rozpoczęto w okresie wiosna-lato 2012 r. [1]. Następnie kontynuowano je w okresie jesiennym (2012). Celem pracy było prześledzenie sezonowego kształtowania stopnia zarażenia określonymi gatunkami pasożytów jelitowych. Badaniem podstawowym była standardowa metoda flotacji z wykorzystaniem nasyconego roztworu chlorku sodu. Preparaty oglądano pod powiększeniem 10-krotnym oraz 40-krotnym. W pierwszym etapie badań zebrano 106 próbek kału gołębi z różnych dzielnic Warszawy. Do badań zostało zakwalifikowanych 78 próbek. W 56 z nich stwierdzono wystąpienie różnego rodzaju pasożytów o różnym nasileniu.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań pokazały, iż najczęściej występującą pasożytozą była kokcydioza oraz kapilarioza. Zarażenie *Eimeria* spp. wystąpiło w 64% badanych próbek, a *Capillaria* spp. w 25% badanych próbek. Zarażenie nicieniami *Ascaridia* spp. utrzymywało się na najniższym poziomie i stanowiło 11% badanych próbek. Badania wskazują również, że warszawskie gołębie charakteryzują się wysokim poziomem zarażenia pasożytami jelitowymi, który wynosił 73% i był o 30% wyższy niż u gołębi z terenu Wrocławia (47,5%) [2]. Zupełnie inne wyniki otrzymano po zbadaniu próbek zebranych w okresie jesiennym (2012), podczas którego pobrano 98 próbek kałomoczu. Wówczas formy inwazyjne pasożytów jelitowych wystąpiły w 97% badanych próbek. Częściej występowały wówczas inwazje mieszane, które były widoczne w 54% badanych próbek. Trzy rodzaje pasożytów zaobserwowano w 10% próbek. Nasilenie inwazji było znacznie wyższe niż w sezonie wiosenno-letnim. Charakterystyczne było występowanie inwazji *Eimeria* spp. niemal w każdej próbce (95% prób), co stanowiło ponad połowę badanej populacji. Dodatkowo zaobserwowano wystąpienie innych pasożytów, które nie były obecne w próbach zebranych w okresie wiosennym, takich jak *Ornithostrongylus quadriradiatus*. Nicien ten może być przyczyną nieżytowego oraz krwotocznego zapalenia jelit. Nasilenie inwazji w okresie jesiennym może być skutkiem występowania w populacji gołębi zwiększonej ilości osobników młodych, które z reguły są bardziej narażone na pasożyty przewodu pokarmowego. W okresie jesiennym następuje również pogorszenie warunków pogodowych, a pokarm nie jest już łatwo dostępny, co ewentualnie również może mieć wpływ na wyżej opisane wyniki.

Piśmiennictwo

- [1] Biernacka M., Witt K., Młodawski W., Doner S., Szeleszczuk P., 2012. Parazytofauna przewodu pokarmowego warszawskich gołębi miejskich (*Columba livia forma urbana*). Mat. XIV Kongresu PTNW, Wrocław, 402.
- [2] Piasecki T., 2006. Ocena stanu zdrowotnego gołębi miejskich w aspekcie zagrożenia zdrowia ludzi. *Med. Wet.*, 62, 531–535.
- [3] Stenzel T., Koncicki A., 2007. Occurrence of parasitic invasions in domestic pigeons (*Columbia livia domestica*) in the Northern Poland, *Pol. J. Vet. Sci.*, 10, 275–278.
- [4] Szeleszczuk P., Kruszewicz A., 1986. Wyniki parazytologicznego badania kału gołębi pocztowych Okręgu Warszawskiego. *Hodowca Gołębi Poczтовых*, 60, 6–8.

Eksperymentalne zakażenie gołębi, kurcząt, indyków i gęsi gołębim variantem wirusa rzekomego pomoru drobiu

Experimental infection of pigeons, chickens, turkeys and geese with pigeon variant of newcastle disease virus

Wariant gołębi wirusa rzekomego pomoru drobiu (ang. pigeon paramyxovirus type 1, PPMV-1) jest czynnikiem etiologicznym zakaźnej choroby gołębi, manifestującej się u tego gatunku zaburzeniami ze strony układu pokarmowego (biegunka), oddechowego (zapalenie spojówek, wypływ z otworów nosowych, duszność) oraz nerwowego (kręcz szyi, zaburzenia równowagi, paraliż, drżenia szyi i skrzydeł) [11]. Wirus PPMV-1 jest tożsamy z wirusem rzekomego pomoru drobiu, zwanym też wirusem choroby Newcastle (ang. *Newcastle disease virus*, NDV), różni się jednak antygenowo od typowych szczepów wywołujących zakażenia drobiu i chociaż PPMV-1 jest zwykle specyficzny gatunkowo (zdecydowana większość zakażeń dotyczy gołębi), notowane były przypadki zachorowań lub izolacji tego patogenu od innych gatunków ptaków [1, 2, 4, 9]. Przepisy administracyjnego zwalczania rzekomego pomoru drobiu (ND) traktują jednakowo wszystkie zakażenia patogennym wirusem NDV, bez względu na jego przynależność anty-

genową czy genetyczną, dlatego stada drobiu zakażone patogennym wariantem gołębi PPMV-1 są zwykle wybijane [7, 13]. Wirus PPMV-1 jest odpowiedzialny za tzw. czwartą falę panzootii rzekomego pomoru drobiu, pierwszy raz rozpoznanej u gołębi na Bliskim Wschodzie pod koniec lat 70. i rozprzestrzeniającej się w latach 80. przez północną Afrykę do Włoch, a następnie szerzącej się na całym świecie i trwającej do dziś [11].

Celem pracy była ocena wrażliwości gołębi, kurcząt, indyków oraz gęsi na eksperymentalne zakażenie krajowym izolatem PPMV-1.

Materiał i metody

Wirus. W badaniach użyto wirusa PPMV-1/Poland/332/05 wyizolowanego od gołębi miejskich w 2005 r. Wykonana charakterystyka antygenowa, molekularna oraz określenie patogenności *in vivo* na pisklętach SPF (test ICPI) wykazały, że jest to patogenny wariant gołębi NDV.

Ptaki. Kurczęta SPF pochodziły z własnego wylęgu (jaja wylęgowe importowano z VALO-BioMedia, Niemcy), gęsi i indyki zakupiono w zakładzie wylęgowym, natomiast gołębie z prywatnej hodowli. Do badań eksperymentalnych wykorzystano ptaki klinicznie zdrowe, a w momencie zakażenia wiek ich wahał się od 3 do 5 tygodni. Przed zakażeniem eksperymentalnym wszystkie ptaki były przebadane serologicznie w kierunku obecności przeciwciał dla wirusa rzekomego pomoru drobiu z wynikiem ujemnym.

Model doświadczeń. Grupy składające się z 10 ptaków każdego gatunku były zakażane dawką wirusa 10^6EID_{50} /ptaka w objętości 0,1 ml dospójwoko i donosowo. Ptaki były utrzymywane w zwierzętarni o poziomie zabezpieczenia klasy PCL-3. Około 24 godziny po zakażeniu do klatki wprowadzono 2 w pełni wrażliwe osobniki odpowiedniego gatunku, stanowiące kontrolę siewstwa i transmisji wirusa od zwierząt zakażonych. Prowadzono codzienną obserwację kliniczną, a w 2., 4., 7., 10. i 14. dniu po zakażeniu (p.i.) od wszystkich ptaków pobierano wymazy z jamy ustno-gardłowej oraz kloaki. Ponadto w ww. terminach od dwóch ptaków z każdej grupy zakażonej pobierano narządy: mózg, płuca, wątrobę, śledzionę, nerki, dwunastnicę i jelito ślepe do badań metodą real time RT-PCR.

Real time RT-PCR. W badaniach zastosowano metodę RRT-PCR do wykrywania genu M wirusa ND [8, 14] w modyfikacji własnej. Wyniki badań odnoszono do krzywej standardowej wyznaczonej poprzez badanie 10-krotnych rozcieńczeń RNA wirusa PPMV-1/Poland/332/05 o znanym mianie EID_{50} , a następnie prowadzono analizę ilościową przy użyciu programu 7500 Software v. 2.0.5 (Applied Biosystems), której wyniki przedstawiano w postaci ekwiwalentu miana (eq EID_{50}) na 0,1 gram tkanki (narządy) lub 1 ml płynu transportowego (wymazy).

Wyniki

Obserwacja kliniczna. Nie stwierdzono objawów klinicznych u kurcząt, indyków i gęsi, natomiast u gołębi od 4. dnia po zakażeniu występowały objawy nerwowe w postaci drżeń skrzydeł i zaburzeń koordynacji ruchowej oraz lekka biegunka. Dwa gołębie padły pomiędzy 8.–11. dniem po zakażeniu.

Wyniki badań real time RT-PCR

Gołębie. U zakażonych eksperymentalnie gołębi materiał genetyczny wykrywano pomiędzy 2. a 10. dniem p.i. w wymazach oraz pomiędzy 2. a 14. dniem p.i. w narządach, ze szczytem w 7. dniu p.i. Średnia ilość materiału genetycznego w wielu przypadkach wynosiła 10^6 eqEID₅₀– 10^7 eqEID₅₀/ml płynu (lub gram tkanki). Wirus uległ efektywnej transmisji do wrażliwych gołębi kontaktowych, jednak do 14. dnia p.i. nie wykazywały objawów klinicznych.

Kury. Materiał genetyczny u zakażonych kurcząt zidentyfikowano w narządach i wymazach pomiędzy 2.–14. dniem, ze szczytem w 4. dniu p.i., w największej ilości odpowiadającej dawce 10^5 – 10^6 EID₅₀/g w śledzionie, dwunastnicy i jelicie ślepym. Wirus uległ transmisji do ptaka kontaktowego, u którego w 7. dniu p.i. wykryto jednak bardzo niewielką ilość materiału genetycznego PPMV-1.

Indyki. U zakażonych indyków materiał genetyczny wykrywano w wymazach z jamy ustno-gardłowej od 2. dnia p.i. (średnia ilość materiału genetycznego ok. 10^4 EID₅₀/ml), a później jego ilość spadała do poziomu zwykle uznawanego za ujemny. Wyższy poziom odnotowano w próbkach wymazów z kloaki, gdzie wirus utrzymywał się na poziomie 10^3 eqEID₅₀/ml – 10^4 eqEID₅₀/ml do 7. dnia p.i. W odniesieniu do narządów największą ilość RNA wykrywano w mózgu oraz płucach (10^3 eqEID₅₀– 10^5 eqEID₅₀/ml). Stwierdzono transmisję do indyków kontaktowych, jednak tylko próbki wymazów z kloaki były dodatnie w 14. dniu p.i.

Gęsi. Obecność wirusowe RNA wykazywano tylko w wymazach z jamy ustno-gardłowej i kloaki u trzech zakażonych eksperymentalnie gęsi w 2 i 4 dniu p.i. Ilość materiału genetycznego była bardzo niska, nie wykryto również obecności RNA w narządach oraz u ptaków kontaktowych.

Dyskusja

Patogenne wirusy PPMV-1 są groźne nie tylko dla gołębi, ale mogą również wywoływać zachorowania u drobiu i ptaków łownych utrzymywanych w zamknięciu [1, 2, 4, 5, 9]. Doniesienia dotyczące naturalnych zakażeń PPMV-1 u drobiu pochodzą z Europy, Ameryki Północnej i Południowej oraz Afryki. W takiej sytuacji, zgodnie z przepisami Kodeksu Zdrowia Zwierząt Lądowych OIE, kraj traci status wolnego od rzekomego pomoru drobiu [7]. Przebieg naturalnego zakażenia

PPMV-1 może być ekstremalnie różny – od bezobjawowego do nasilonych objawów klinicznych i wysokiej śmiertelności. Brak objawów klinicznych stwierdzono u bażantów importowanych do Włoch w 1994 r. [5]. Z kolei u kuropatw w Szkocji, u których potwierdzono obecność PPMV-1 w 2006 r., zanotowano znaczący wzrost śmiertelności, któremu towarzyszyły objawy kliniczne takie jak: biegunka, niewielkiego stopnia niezborność ruchowa i zahamowania przyrostów masy ciała [9].

Wyniki przeprowadzonych badań eksperymentalnych wykazały niską wrażliwość kurcząt, indyków i gęsi na zakażenie PPMV-1, wyrażoną brakiem objawów klinicznych i padnięć (przy zachorowalności i śmiertelności obserwowanej u gołębi zakażonych taką samą dawką). W odniesieniu do gęsi trudno nawet mówić o patogenności, gdyż wykrywalność niewielkiej ilości materiału genetycznego w wymazach pobranych od pojedynczych gęsi w pierwszych dniach po zakażeniu mogła świadczyć o detekcji wirusa użytego do zakażenia kontrolnego. Wirus replikował się jednak w organizmie kurcząt i indyków, o czym świadczą wyniki dystrybucji wirusowego RNA w różnych narządach oraz siewstwo. W ograniczonym stopniu dochodziło również do transmisji do ptaków kontaktowych, co dowodzi, że wirus ma zdolność pasażowania przez organizm ptaków. Konsekwencją takich pasażów mogą być zmiany genetyczne prowadzące do wzrostu zjadliwości. W dotychczas podejmowanych badaniach eksperymentalnych wykazywano wzrost zjadliwości PPMV-1 w następstwie kilkakrotnych pasażów na kurczętach, aczkolwiek nie dotyczyło to wszystkich izolatów [3, 8, 10, 12].

Podsumowując, monitorowanie występowania zakażeń PPMV-1 u ptaków innych niż gołębie jest uzasadnione, chociaż w naturalnej (niepasażowanej) formie wirusy te nie powinny stanowić większego zagrożenia, szczególnie u drobiu wodnego.

Piśmiennictwo

- [1] Abolnik C., Horner R.F., Maharaj R., Viljoen G.J., 2004. Characterization of a pigeon paramyxovirus (PPMV-1) isolated from chickens in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 71, 157–160.
- [2] Alexander D.J., Parsons G., Marshal R., 1984. Infections of fowl with Newcastle disease virus by food contamination with pigeon faeces. *Vet Rec.*, 115, 601–602.
- [3] Alexander D.J., Parsons G., 1986. Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983–1985. *Avian Pathol.*, 15, 487–493.
- [4] Alexander D.J., Manvell R.J., Frost K.M., Pollitt W.J., Welchman D., Perry K., 1997. An outbreak of Newcastle disease in pheasants in Great Britain in May 1996. *Veterinary Record*, 140, 20–22.

- [5] Capua I., Manvel R.J., Antonucci D., Scaramozzino P., 1994. Isolation of the pigeon PMV-1 variant of Newcastle virus from imported pheasants (*Phasianus colchicus*). *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B*, 10, 675–678.
- [6] Cattoli G., De Battisti C., Marciano S., Ormelli S., Monne I., Terregino C., Capua I., 2009. False-negative results of a validated real-time PCR protocol for diagnosis of new-castle disease due to genetic variability of the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 3791–3792.
- [7] Code of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, 2008. Chapter 2.3.14. Newcastle disease.
- [8] Gelb J. Jr., Fries P.A., Peterson F.S., 1987. Pathogenicity and cross-protection of pigeon paramyxovirus-1 and Newcastle disease virus in young chickens. *Avian Dis.*, 31, 601–606.
- [9] Irvine R.M., Aldous E.W., Manvell R.J., Cox W.J., Ceeraz V., Fuller C.M., Wood A.M., Milne J.C., Wilson M., Hepple r.G., Hurst A., Sharpe C.E., Alexander D.J., Brown I.H., 2009. Outbreak of Newcastle disease due to pigeon paramyxovirus type 1 in grey partridges (*Perdix perdix*) in Scotland in October 2006. *Vet. Rec.*, 161, 531–535.
- [10] Kommers G.D., King D.J., Seal B.S., Carmichael K.P., Brown C.C., 2002. Pathogenicity of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens. *Vet. Pathol.*, 39, 353–362.
- [11] Marlier D., Vindevogel H., 2006. Viral infections in pigeons. *Vet. J.*, 172, 40–51.
- [12] Toro H., Hoerr F.J., Farmer K., Dykstra C.C., Roberts S.R., Perdue M., 2005. Pigeon paramyxovirus: association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. *Avian Dis.*, 49, 92–98.
- [13] Ustawa z dnia 11 marca 2004 o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. *Dz.U. z 2004 r. Nr 69, poz. 625.*
- [14] Wise M.G., Suarez D.L., Seal B.S., Pedersen J.C., Senne D.A., King D.J., Kapczynski D.R., Spackman E., 2004. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 329–338.

Przypadki *omphalitis* w stadzie strusiąt – doniesienie wstępne

The cases of *omphalitis* in ostrich-chicks flock – preliminary report

Hodowla i chów fermowy strusi (*Struthio camelus*) w Polsce cieszą się dużym zainteresowaniem, chociaż od czasu założenia pierwszej fermy strusi w naszym kraju minęło 20 lat (1993 r. Garczyn k. Kościerzyny woj. pomorskie). Pomimo postępu w tej gałęzi drobiarskiej hodowcy nadal napotykać na trudności, zwłaszcza w początkowej fazie odchowu strusi. Ogromna większość zagrożeń dotyczy strusi bardzo młodych. Nie włączając zamierania zarodków w trakcie inkubacji, najwyższą śmiertelność stwierdza się od momentu wyklucia do 1. miesiąca życia [4, 5, 9, 10].

W prezentowanej pracy przedstawiono przypadki zapalenia pępka i woreczka żółtkowego, będące przyczyną upadków strusi w pierwszym okresie odchowu. Rozpoznanie dokonano na podstawie badań sekcyjnych, bakteriologicznych, diagnostyki histopatologicznej i PCR.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły zwłoki ok. 15-dniowych strusiąt pochodzące z tego samego stada. Z wywiadu ustalono, że strusięta w wieku 3 dni zostały zaimportowane na fermę do dalszego odchowu. Odchów hodowca prowadził według ogólnie przyjętych zasad. Stwierdzono nagłe upadki strusiąt w wieku ok. 2 tygodni. Śmiertelność wynosiła 85%. Przed śmiercią zaobserwowano objawy nerwowe (zarzucanie głowy

na grzbiet). W celu ustalenia przyczyn wysokich upadków przeprowadzono następujące badania:

Badanie sekcyjne i histopatologiczne. W trakcie sekcji dokonano oceny makroskopowej narządów. Do badań mikroskopowych pobrano wycinki z narządów wewnętrznych (wątroba, śledziona, grasica, nerki, mózg), które utrwalano w roztworze 10% formaliny, a następnie poddawano standardowej obróbce histopatologicznej.

Badanie mikrobiologiczne. Z próbek wątroby, śledziona, nerki, worka powietrznego i woreczka żółtkowego wykonano posiewy na podłoża bakteriologiczne.

Badanie PCR. Technikę PCR zastosowano w celu wykrycia materiału genetycznego cirkowirusa oraz adenowirusa. W celu wykluczenia zakażenia strusi paramyksowirusem ptasim – serotyp 1 (Avian Paramyxovirus serotype 1, APMV-1) przeprowadzono badanie RT – PCR. Sekwencje poszczególnych starterów podano w tabeli 1. Profil termiczny reakcji był zgodny z podanym w piśmiennictwie [1, 2, 7]. Wielkość produktów amplifikacji oceniano przez porównanie jego położenia z wzorcem masowym DNA O’Range Gene Ruler 100 bp (Fermentas). Przewidywane wielkości produktu podano w tabeli 1.

Tabela 1. Sekwencje użytych starterów w PCR oraz wielkość produktu amplifikacji

| Kierunek badania | Startery | Sekwencja (5'→3') | Wielkość produktu (pz) | Piśmiennictwo |
|----------------------------------|----------|-----------------------------------|------------------------|---------------|
| OCV (Ostriches Circovirus) | Struifor | TGC TAG TGA TAA TGC TCC TC | 296 | [2] |
| | Struirev | CAG ATA TCT ACG TCA GGC AT | | |
| FAV (Fowl Adenovirus) | Hexon A | CAA RTT CAG RCA GAC GGT | 897 | [7] |
| | Hexon B | TAG TGA TGM CGS GAC ATC AT | | |
| APMV-1 (Avian Paramyxovirus – 1) | NDV-F | GGT GAG TCT ATC CGG ARG ATA CAA G | 201 | [1] |
| | NDV-R | TCA TTG GTT GCR GCA ATG CTC T | | |

Wyniki i omówienie

Zakażenia pępka i woreczka żółtkowego (*omphalitis*) u strusiąt są najczęstszą przyczyną śmiertelności w okresie okołolęgowym (ang. first-week ostrich chick mortality, hatchery-born disease) [9].

W opisywanym przypadku podczas oględzin zewnętrznych zwłok strusiąt stwierdzono znaczne wychudzenie, ubytek puchu, niezagojony pępek lub strup w miejscu pępka. Woreczek żółtkowy u wszystkich ptaków był całkowicie wciągnięty. Zauważono zielonkawe zabarwienie skóry w okolicy brzucha. Według Gutsche [3]

objawem *omphalitis* jest zwiotczałe podbrzusze oraz zielonkawe zabarwienie skóry. W czasie oględzin wewnętrznych zwłok strusi stwierdzono obecność niezresorbowanego woreczka żółtkowego w jamie ciała. Stopień resorpcji i wielkość woreczka u strusiąt były zróżnicowane (zajmował nawet do ok. 50% jamy ciała). Ponadto woreczki były zmienione zapalnie (przekrwienie, koagulacja i zmiana zabarwienia treści), stwierdzono ścięczenie przewodu żółtkowo-jelitowego. Według dostępnych danych niezresorbowany woreczek żółtkowy może stanowić 15–40% masy ciała pisklęcia [10]. W badaniach Mushi i wsp. [8] odnotowali najwyższy odsetek upadków strusiąt z niezresorbowanym woreczkiem w wieku 5–7 dni. Według tych autorów obecność woreczka u strusiąt powyżej 13. dnia życia świadczy o jego zatrzymaniu.

Na podstawie wyników badania histopatologicznego stwierdzono uszkodzenie narządów układu limfatycznego (martwica tkanki limfatycznego śledziony i grasicy, nacieki heterofilii i przekrwienie grasicy) oraz uszkodzenie wątroby (zwyrodnienie tłuszczowe hepatocytów, zastój krwi). Z posiewów bakteriologicznych pobranych tkanek wyhodowano liczne *Streptococcus* sp. β -hemolityczne i liczne *Proteus* sp. Zgodnie z piśmiennictwem najczęstszą przyczyną *omphalitis* jest zakażenie *E. coli* (80%), *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. [4, 6]. Mushi i wsp. [8] izolowali z niezresorbowanych woreczków *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *Bacillus licheniformis*, *Achromobacter* spp. i *Acinetobacter calcoaceticus*.

Zmiany sekcyjne (niekompletna resorpcja woreczka) i wyniki przeprowadzonych badań mikrobiologicznych potwierdziły, że przyczyną upadków w stadzie strusiąt było bakteryjne zapalenie pępka i woreczka żółtkowego (*omphalitis*), postać chroniczna. Zgodnie z piśmiennictwem w przebiegu postaci chronicznej obserwuje się zahamowany wzrost, upadki do 3.–4. tyg. życia. Przy postaci ostrej upadki stwierdza się w krótkim czasie po wykluciu (do 6.–7. dnia). Gdy proces dotyczy woreczka żółtkowego, stwierdza się zamieralność zarodków zwykle pod koniec okresu inkubacji [9].

W badaniu PCR otrzymano wynik dodatni w kierunku obecności materiału genetycznego cirkowirusa, wykluczono zakażenie adenowirusem. Wynik dodatni dla RT-PCR w kierunku APMV-1 uzyskano w 1 na 3 badane próbki.

Na podstawie wyników badań sugeruje się, że w opisywanym przypadku zakażenie strusiąt cirkowirusem, niekompletna resorpcja woreczka żółtkowego (immunoglobulin), narażenie na stres mogły być przyczyną immunosupresji oraz tzw. zespołu słabego strusiącia (ostrich chick fading syndrome – OCFS).

W stadzie podjęto leczenie za pomocą florfenikolu (Floron® oral solution, KRKA, Słowenia), zalecono suplementację witamin i minerałów, podawanie preparatów zasiedlających przewód pokarmowy (Proteksin, Probiotics) oraz poprawę warunków utrzymania (brak dostępu do piasku). Działania te nie przyniosły jednak sukcesu.

Aktualnie prowadzone są dalsze badania mające na celu określenie przyczyn problemu.

Piśmiennictwo

- [1] Creelan J.L., Graham D.A., McCullough S.J., 2002. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one – step reverse transcriptase – polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, 31, 493–499.
- [2] Eisenberg S.W., van Asten A.J., van Ederen A.M., Dorrestein G.M., 2003. Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on a farm in The Netherlands. *Vet. Microbiol.*, 95, 27–38.
- [3] Gutsche K., 1995. Diseases [in:] Kreibich A., Sommer M. (eds.). *Ostrich Farm Management*. Landwirtschaftsverlag GmbH Münster-Hiltrup Auflage., 144–172.
- [4] Horbańczuk J.O., 2003. *Struś afrykański*. Auto-Graf. Warszawa.
- [5] Huchzermeyer F.W., 2002. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. *Rev. Sci.Tech.*, 21, 265–276.
- [6] Mazurkiewicz M. (red.), 2011. *Choroby drobiu*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 78–131, 200.
- [7] Meulemans G., Boschmans M., Berg T.P., Decaesstecker M., 2001. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol.*, 30, 655–660.
- [8] Mushi E.Z., Binta M.G., Chabo R.G., 2004. Yolk sac utilization in ostrich (*Struthio camelus*) chicks. *Onderstepoort. J. Vet. Res.*, 71, 247–249.
- [9] Shanawany M.M., Dingle J.G., 1999. Ostrich production systems. Część 1–2. *FAO Animal Production and Health Paper Tom 144*, Food and Agriculture Organization, 1–256.
- [10] Stewart J., 1994. Ratites. Chapter 48 [in:] Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. (eds). *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing, Florida, USA, 1284–1326.

Firmy sponsorujące konferencję pt. Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnie- niem lekooporności drobnoustrojów Wrocław 2013

SPONSOR GŁÓWNY

ZOETIS POLSKA SP. Z O.O.

SPONSORZY

BIOPOINT M. JANKOWSKI, M. NIEWIDOMSKA SP. J.

CEVA ANIMAL HEALTH POLSKA SP. Z O.O.

FATRO POLSKA SP. Z O.O.

JHJ SP. Z O.O.

KRKA - POLSKA SP. Z O.O.

LOHMANN ANIMAL HEALTH POLSKA SP. Z O.O.

SCANVET POLAND SP. ZO.O.

VET-AGRO SP. Z O. O.

VETOS-FARMA SP. Z O.O

VET-TRADE POLSKA SP. Z O.O.

VETOQUINOL BIOWET SP. Z O.O.