

Diagnostyka bakteriologiczna gatunków *Enterococcus* spp. istotnych w patologii drobiu

Beata Dolka, Piotr Szeleszczuk

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Pomimo postępu diagnostyki bakteriologicznej i wypierania tradycyjnych metod technikami biologii molekularnej, nadal klasyczne badanie bakteriologiczne jest powszechnie uważane za „złoty standard”, w oparciu o wyniki którego mogą być następnie wykonywane kolejne badania diagnostyczne. Bez wątplenia badanie bakteriologiczne ma najistotniejsze znaczenie w praktycznej diagnostyce zakażeń wywołanych przez enterokoki u drobiu.

Etiologia i znaczenie kliniczne zakażeń enterokokowych u drobiu

Enterokoki (grec. *enteron* – jelito, łac. *coccus*, grec. *kókkos* – ziarnko, nasionko) to bakterie z rodzaju *Enterococcus* należące do tzw. paciorkowców kałowych. Są one składnikiem autochtonicznej (naturalnej) mikroflory przewodu pokarmowego ptaków, ale także ludzi i różnych gatunków ssaków; są również składnikiem flory układu rozrodczego oraz skóry. Powszechnie występują w środowisku, m.in. w wodzie, glebie, na roślinach i owadach. Kał zawierający te zarazki jest także częstą przyczyną zanieczyszczeń paszy, żywności oraz wody pitnej. Enterokoki pełnią rolę wskaźników sanitarnych czystości wód oraz w jakości higienicznej produktów mięsnych (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Terminu „*enterococcus*” po raz pierwszy użył Thiercelin (1899 r.) w celu wskazania pochodzenia dwoinek wyizolowanych z jelit, natomiast nazwa nowego rodzaju *Enterococcus* została zaproponowana w 1903 r. przez Thiercelin i Jouhad (7, 8). Wcześniej, zgodnie z podziałem paciorkowców (*Streptococcus*) opracowanym przez Rebeke Lancfield (9), w oparciu o różnice w budowie

grupowo swoistego antygeny wielocukrowego C, enterokoki zaklasyfikowano do rodzaju *Streptococcus* grupy D. Według niektórych danych około 80% szczepów enterokokowych posiada antygen grupy D, nie ma go jednak m.in. *E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. saccharolyticus* (3, 10). Badania te były zgodne z klasyfikacją podaną przez Shermana w 1937 r., który zaproponował podział paciorkowców na 4 grupy: ropotwórcze (*pyogenic*), kałowe (*enterococci*), mlekowe (*lactic*) i zielonielące (*viridans*), dające zielony kolor na agarze z krwią; 1). Określenie paciorkowce kałowe, enterokoki i paciorkowce grupy D używano zamiennie. Ostatecznie nazwa rodzaju *Enterococcus* została oficjalnie ustanowiona w 1984 r. przez Schleifer i Kilpper-Bälz, dla oddzielenia enterokoków od rodzaju *Streptococcus* (2).

Enterokoki u drobiu

Spośród 45 znanych gatunków bakterii z rodzaju *Enterococcus* (tab. 1; 1, 2, 6, 10), od różnych gatunków ptaków najczęściej izoluje się tylko kilka z nich, m.in. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* oraz *E. columbae* (3, 4, 5).

W piśmiennictwie można znaleźć dane, że ptaki kłują się z jałowym przewodem pokarmowym. Według innych autorów enterokoki licznie zasiedlają jelito ślepe i woreczek żółtkowy już w okresie inkubacji zarodków. Bakterie te mogą pochodzić np. z jajowodu nosiki czy z worków powietrznych zlokalizowanych blisko jajnika. Należy również uwzględnić możliwość przedostawania się bakterii (ze steku czy

Bacteriological examination for *Enterococcus* spp. important in poultry pathology

Dolka B., Szeleszczuk P., Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this article was to present some aspects of bacteriological examination used for enterococci isolates from poultry. In recent years the role of enterococcal infections in birds has largely increased. The genus *Enterococcus* comprises of 45 different species. Enterococci are commensal organisms in the intestines of animals but they can also survive and grow in soil, water, plants and food. However, enterococci have also been recognized as potentially pathogenic and placed among the most common nosocomial pathogens. They have become responsible for wild, pet-birds infections and have emerged poultry industry. In different bird species at least ten *Enterococcus* spp. can be isolated from GI tract and some, namely *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. cecorum* and *E. durans* have been most frequently associated with clinical avian diseases. Isolation and classification of enterococci to genus and species are essential for ultimate diagnosis, epidemiology and proper treatment. Different media and commercially available biochemical diagnostic systems/protocols are used for routine enterococci identification. Despite the progress in diagnostic techniques, employing molecular biology methods, conventional bacteriological examination is still regarded as the “gold standard” in microbiology and the most important in diagnosis of enterococcal infections in birds.

Keywords: *Enterococcus* spp., poultry, bacteriological examination.

środowiska) przez pory skorupy do zarodka (11, 12). Potwierdzono, że *Enterococcus faecalis* przejściowo zasiedla serce i płuca piskląt kurzych w okresie okołolęgowym (4). Kolonizacja przewodu pokarmowego przez enterokoki jest procesem stopniowym i wieloetapowym, a rozwój fizjologicznej flory jelitowej najintensywniej zachodzi po wykluciu. Stan mikroflory zasiedlającej przewód pokarmowy ptaka ma istotny wpływ na zdrowie organizmu i prawidłowe jego funkcjonowanie w przyszłości. Skład flory przewodu pokarmowego

pod względem enterokoków jest zdeterminowany przez rodzaj szczepów występujących w otaczającym środowisku w trakcie wykluwania piskląt.

W przypadku produkcji wielkotowarowej znaczenie mają środowisko podczas transportu i w wychowalni, pierwsza woda i pasza. W warunkach produkcji wielkotowarowej proces zasiedlenia przewodu pokarmowego piskląt ulega znacznemu opóźnieniu. Skutkiem tego piskląta mogą być bardziej podatne na kolonizację patogennymi bakteriami. Najbardziej naturalnym sposobem przyspieszenia rozwoju flory jelitowej jest podanie paszy. Wykazano, że karmienie nowo wyklutych piskląt przyspiesza proces ustanowienia własnej flory jelitowej, bowiem do kolonizacji dochodzi już po 1–3 godzinach. U zdrowych ptaków najwyższą koncentrację enterokoków stwierdza się w jelicie grubym. Skład flory bakteryjnej przewodu pokarmowego kurcząt pod względem zasiedlenia przez enterokoki się zmienia. Z wiekiem liczba enterokoków w przewodzie pokarmowym kurczęcia wzrasta szybko i regularnie, ale zmienia się nie tylko ich liczba, ale także skład gatunkowy (3, 11, 12). W tabeli 2 opisano gatunki enterokoków dominujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego w zależności od wieku (3).

Enterokoki należą do drobnoustrojów oportunistycznych, potencjalnie chorobotwórczych, co oznacza, że mogą powodować zakażenia (miejscowe lub uogólnione) poza fizjologicznym miejscem bytowania, szczególnie przy obniżonej odporności gospodarza (1, 13, 14). Do niedawna bardzo rzadko diagnozowano kliniczny przebieg zakażenia enterokokami u ptaków, co więcej, wiele stanów chorobowych w ogóle nie wiązano z tymi bakteriami. Głównie ze względu na fakt, że przez długi czas były uważane za komensale, drobnoustroje bezpieczne, co więcej, wykazano pozytywny wpływ enterokoków jako probiotyków zalecanych m.in. w leczeniu biegunek; znalazły one również zastosowanie w przemyśle mleczarskim. W medycynie enterokoki są jednymi z głównych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne. Mogą one być przyczyną bakteriemii, zapalenia wsierdza, zakażeń dróg moczowych i ran. Niebezpieczeństwo związane z enterokokami wynika także z ich szczególnej zdolności do wymieniania się genami w obrębie szczepów tego samego gatunku, ale także między różnymi gatunkami, a nawet rodzajami. Dzięki temu mogą same nabywać i przekazywać czynniki patogenności i oporności na antybiotyki. Wykazano, że dzikie ptaki często są przenośnikami szczepów wielolekoopornych. Największe zagrożenie niosą

szcypy wankomycynooporne (vancomycin-resistant enterococcus – VRE), bowiem są one niewrażliwe na dostępne antybiotyki. Brak skutecznych metod zapobiegania i zwalczania kolonizacji tymi szczepami (5, 13, 15, 16, 17).

W ostatnich latach na świecie obserwuje się wzrost znaczenia enterokoków w patologii ptaków, zwłaszcza drobiu. Zagadnienia związane z zakażeniem brojlerów kurzych i kur niosek przez enterokoki nie są do końca poznane i budzą kontrowersje. W patologii ptaków najważniejsze znaczenie ma *Enterococcus faecalis*, następnie *E. faecium*, *E. hirae*, *E. cecorum* i *E. durans*. Pozostałe gatunki mają mniejsze, aczkolwiek nie do końca określone znaczenie. Stany patologiczne powodowane przez zakażenie *Enterococcus* spp. u różnych gatunków ptaków zamieszczono w tabeli 3 (14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32). Zakażenia kur i indyków powodowane przez enterokoki są często nie do końca uwzględnianą przyczyną strat w przemyśle drobiarskim.

Z uwagi na rosnące znaczenie enterokoków w patologii drobiu istnieje potrzeba ukierunkowanych badań bakteriologicznych, które mają pierwszorzędne znaczenie w diagnostyce zakażeń przez nie wywołanych.

Materiał do badań

Materiał do badań bakteriologicznych powinny stanowić próbki pobrane pośmiertnie ze zmienionych chorobowo narządów lub wymazy z nich. Na podstawie lokalizacji zmian w narządach wewnętrznych można jedynie domniemywać, jaki gatunek *Enterococcus* mógł być przyczyną problemu, jednakże konieczne jest szczegółowe badanie (tab. 4). Próbkę (fragmenty tkanek) pobiera się na jałową płytkę Petriego lub do jałowych jednorazowych pojemników. W przypadku wymazów zaleca się, aby używać wymazówek z wacikiem wiskozowym i podłożem transportowym Amies. Podczas pobierania wymazu z narządu należy jałową wymazówką przebić jego miąższ. Przyżyciowo materiał stanowią próbki krwi i wymazy ze steku. Próbki powinny być dostarczone do laboratorium niezwłocznie po pobraniu. Podłoże transportowe w wymazówce może zapewnić prawidłową żywotność mikroorganizmom

Tabela 1. Systematyka bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Domena (<i>dominium, regio</i>)	<i>Bacteria</i> (bakterie)			
Typ (<i>phylum</i>)	(B XIII) Firmicutes (typ pospolitych Gram-dodatnich bakterii)			
Klasa (<i>classis</i>)	(III) Bacilli			
Rząd (<i>ordo</i>)	(II) Lactobacillales (bakterie kwasu mlekowego)			
Rodzina (<i>familia</i>)	(IV) Enterococcaceae			
Rodzaj (<i>genus</i>)	(I) <i>Enterococcus</i>			
Gatunek (<i>species</i>)				
<i>E. aquimarinus</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E. phoeniculicola</i>	<i>E. seriolicida</i>
<i>E. asini</i>	<i>E. devriesei</i>	<i>E. hermanniensis</i>	<i>E. plantarum</i>	<i>E. silesiacus</i>
<i>E. avium</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. porcinus</i>	<i>E. solitarius</i>
<i>E. caccae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. italicus</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. sulfureus</i>
<i>E. camelliae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. lactis</i>	<i>E. quebecensis</i>	<i>E. termitis</i>
<i>E. canintestini</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. thailandicus</i>
<i>E. canis</i>	<i>E. flavescens</i>	<i>E. moraviensis</i>	<i>E. ratti</i>	<i>E. ureasiticus</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. viikkiensis</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. gilvus</i>	<i>E. pallens</i>	<i>E. saccharominimus</i>	<i>E. villorum</i>

Tabela 2. Skład gatunkowy bakterii *Enterococcus* spp. w przewodzie pokarmowym kury

Wiek kurcząt	Odcinek przewodu pokarmowego		
	wole	jelito cienkie	Jelito ślepe
1 dzień	<i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i> > <i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i> > <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> > <i>E. faecium</i>
3–4 tyg.	<i>E. cecorum</i> > <i>E. faecium</i> > <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> > <i>E. hirae</i> > <i>E. durans</i> > <i>E. cecorum</i> > <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> > <i>E. durans</i> > <i>E. cecorum</i>
12 tyg.	<i>E. cecorum</i> > <i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i>	<i>E. cecorum</i> > <i>E. faecium</i> > <i>E. faecalis</i>	<i>E. cecorum</i> > <i>E. faecium</i> > <i>E. faecalis</i>

do 72 godz., aczkolwiek najlepsze rezultaty dla namnażania kultur bakteryjnych uzyskuje się w pierwszych 24 godzinach od pobrania próbki do badania mikrobiologicznego. W skierowaniu do badania należy podać oprócz podstawowych informacji dotyczących właściciela, gatunku zwierzęcia, rodzaju i miejsca pobranego materiału, datę jego pobrania. Dodatkowo należy sprecyzować żądany kierunek badania oraz informacje o ewentualnym ostatnim stosowaniu chemioterapeutyków. W większości przypadków ze zmienionych patologicznie narządów od chorych ptaków izoluje się czyste kultury enterokoków.

Hodowla i różnicowanie biochemiczne

Enterokoki nie mają wysokich wymagań odżywczych, dobrze rosną na podłożach bakteriologicznych, które są powszechnie używane w diagnostyce bakteriologicznej oraz na podłożach wybiórczo-izolacyjnych, selektywnych (tab. 5; 5, 33, 34). Enterokoki to bakterie mezofilne, rosną w zakresie 10–45°C (1). Chociaż zdarzają się wyjątki, np. *E. dispar* i *E. sulfureus* nie rosną w temp. 45°C, a *E. cecorum* i *E. columbae* w 10°C (10). Najwyższą wrażliwość na temperaturę wykazuje *E. durans*, także *E. faecalis* i *E. casseliflavus* (35). Enterokoki są względnie beztlenowe (mikroaerofilne), do swojego wzrostu wymagają w trakcie inkubacji obniżonego ciśnienia parcjalnego tlenu. Inkubację prowadzi się w temp. 35±2°C przez 18–72 godz. w atmosferze wzbogaconej dwutlenkiem węgla (5% CO₂). Pierwszego odczytu płytek (ocena stopnia wzrostu, wielkości, kształtu i zabarwienia kolonii) należy dokonać po 18 do 24 godz., w razie potrzeby inkubować ponownie, wykonać kolejny odczyt po upływie od 42 do 48 godzin. Na agarze z krwią enterokoki rosną w postaci drobnych, okrągłych (Ø ok. 2 mm), szarawych, przezrystych kolonii. Różne gatunki *Enterococcus* tworzą podobne do siebie kolonie, wywołują hemolizę typu α (rzadko β), w postaci zazielenienia wokół kolonii (ryc. 1 A) są katalazo- i oksydazo-ujemne (ryc. 1 B i C). W badaniu mikroskopowym, morfologicznie enterokoki to Gram-dodatnie ziarenkowce,

występujące pojedynczo, podwójnie (dwinki) lub układające się w krótkie łańcuszki („paciorki”) lub nieregularne skupiska (ryc. 1H; 2, 13, 35, 36).

Skład podłoża determinuje wzrost różnych gatunków enterokoków (35). Pożywki wybiórcze do izolacji enterokoków zwykle zawierają 0,02% azydku sodu, który hamuje wzrost Gram-ujemnej flory towarzyszącej, jednakże przy wyższym stężeniu (0,04%) hamowany jest wzrost niektórych enterokoków (*E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*; 37). Podłoże Slanetza-Bartleya pozwala na różnicowanie enterokoków, dzięki ich zdolności do redukcji TTC (chlorek

2,3,5-trifenyloctetrazoliowy), zawartego w pożywce. Powstały czerwony barwnik – formazan jest absorbowany przez bakterie. Niektóre gatunki, np. *E. faecalis*, *E. durans* i *E. hirae*, rosną w postaci czerwono-brunatnych kolonii z metalicznym połyskiem, w odróżnieniu od *E. faecium*, którego kolonie są różowoczerwone (5, 34). Według innych danych piśmiennictwa wzrost *E. cecorum* i *E. sulfureus* jest na tym podłożu hamowany (10, 35). Enterokoki wykazują oporność na wysokie stężenie soli. Większość gatunków (z wyjątkiem *E. cecorum*, *E. columbae* i *E. asi-ni*) rośnie po inkubacji w podłożu płynnym zawierającym 6,5% NaCl (ryc. 1D).

Tabela 3. Stany patologiczne powodowane przez zakażenie *Enterococcus* spp. u ptaków

Gatunek	Choroba/objawy/zmiany
<i>E. faecalis</i>	artropatia amyloidowa
	artropatie u niosek
	jatrogena artropatia amyloidowa
	zespół nadciśnienia płucnego u brojlerów (pulmonary hypertension syndrome – PHS)
	u niosek: first-week mortality (FWM)
	posocznica
	zapalenie wsierdza (<i>endocarditis</i>)
<i>E. faecium</i>	zapalenie stawów u kaczek, posocznica u kacząt
	ziarniak wątroby u indyków
<i>E. hirae</i>	zapalenie tchawicy u kanarków
	posocznica i upadki kacząt
	zapalenie wsierdza (<i>endocarditis</i>)
	osteomyelitis kości udowej (zapalenie kości i szpiku) u kurcząt
<i>E. cecorum</i>	rozmiękanie mózgu (<i>encephalomalatio</i>) u kurcząt
	zahamowanie wzrostu, upadki
	posocznica u papug
	enterokokowa choroba zwyrodnieniowa stawów kręgosłupa u kur (enterococcal vertebral osteoarthritis – EVOA)
	zapalenie stawów kręgosłupa (<i>spondylitis</i>)
	martwica głowy kości udowej (femoral head necrosis – FHN) u kur i indyków
	spondylolisteza (<i>spondylolisthesis</i> , ześlizgnięcie kręgow, kręgozmyk)
osteomyelitis kręgosłupa (zapaleniem kości i szpiku kostnego)	
<i>E. durans</i>	zapalenie stawów (<i>arthritis</i>)
	posocznica u gołębi pocztowych
	rozmiękanie mózgu (<i>encephalomalatio</i>) kurcząt
<i>E. raffinosus</i>	posocznica
	śluzowa biegunka u strusiąt

Tabela 4. Lokalizacja zmian przy zakażeniu enterokokami u drobiu

Bakteria	Stan patologiczny/objawy	Odcinek Th kręgosłupa	Stawy, kości	Serce	Wątroba	Śledziona	Nerki	Płuca	Mózg
<i>E. faecalis</i>	artropatia amyloidowa		X		X	X	X		
<i>E. faecalis</i>	zespół nadciśnienia płucnego u brojlerów (pulmonary hypertension syndrome – PHS)			X	X			X	
<i>E. cecorum</i>	enterokokowa choroba zwyrodnieniowa stawów kręgosłupa u kur (enterococcal vertebral osteoarthritis – EVOA)	X	X	X	X				
<i>E. hirae</i>	zapalenie wsierdza (<i>endocarditis</i>)		X	X	X	X		X	X

Tabela 5. Przegląd wybranych podłoży bakteriologicznych (pożywek) do hodowli bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Nazwa podłoża	Postać	Wybrane składniki
Agar z 5% krwią owczą Columbia Agar with 5% Sheep Blood	stałe	- agar odżywczy - krew barania bez włókniaka 5% pH 7,3 ± 0,2
Podłoże agarowe CNA z 5% krwią owczą (Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood)	stałe	- kolastyna - kwas nalidyksowy - krew owcza pozbawiona włókniaka 5% pH 7,3 ± 0,2
Agar z żółcią, eskuliną i azydkiem (Bile Esculin Azide Agar)	stałe	- azydek sodu - eskulina - żółć wołowa - sole żelaza pH 7,1 ± 0,2
Agar D-Coccosel (DCO)	stałe	- agar z żółcią, eskuliną i azydkiem sodu
Bile Esculin Agar	stałe	- eskulina, żółć
KAA agar (Kanamycin aesculin azide agar)	stałe	- siarczan kanamycyny - eskulina - azydek sodu - agar
Slanetz -Bartley Agar (SB, M-enterococcus agar)	stałe	- azydek sodu TTC - wodorofosforan dipotasowy - glukoza - tryptoza, ekstrakt drożdżowy, agar
Edwards LAB-AGAR	stałe	- eskulina - fiolet krystaliczny - siarczan talu
EVA Broth (Ethyl violet azide, Litsky)	płynne	- azydek sodu - fiolet etylowy
Azide Dextrose Broth	płynne	- dekstroza - azydek sodu - pepton, ekstrakt wołowy

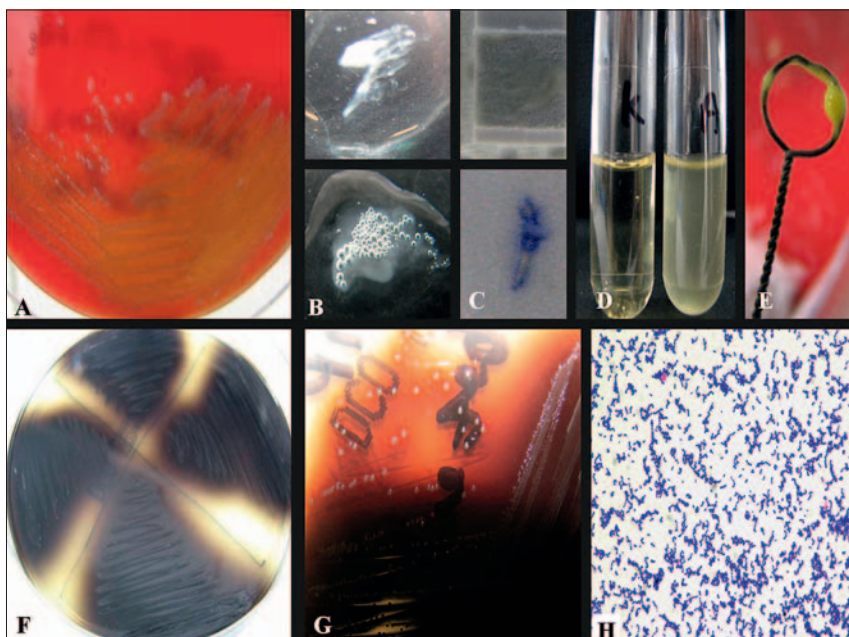
Wykazują one wzrost w podłożu bulionowym o pH 9,6 (alkalifilne, optimum pH 8–11; 1); w mleku zawierającym 0,1% błękit metylenowy, na podłożu zawierającym 0,04% teluryn (najlepiej *E. faecalis*).

Enterokoki przeżywają ogrzewanie w 60°C przez 30 min, a najbardziej odporne *E. faecalis* i *E. faecium* – 1 godzinę (1, 2, 37).

Identyfikacja przynależności enterokoków do rodzaju opiera się na określeniu

zdolności hydrolizy eskuliny w obecności wysokiego (40%) stężenia soli żółci, które hamuje wzrost większości drobnoustrojów (składnik selektywny podłoża). W wyniku rozwoju bakterii dochodzi do rozkładu eskuliny (czynnik różnicujący podłoża) do glukozy oraz eskuletyny, która reaguje z obecnymi w podłożu jonami żelaza, tworząc ciemnobrązowy lub czarny kompleks, co jest widoczne w postaci charakterystycznego zaciemnienia podłoża (czarny strąk wokół wyrosłych kolonii; ryc. 1F,G; 33, 37). Cechą umożliwiającą wstępne rozpoznanie enterokoków jest stwierdzenie aktywności PYR-azy (peptydazy pirolidonylowej) – enzymu wytwarzanego przez enterokoki. Pod wpływem enzymu dochodzi do hydrolizy L-pyrrolidonyl-β-naphthylamidu (PYR). Uwolniony β-naftyamid z barwnikiem diazowym tworzą kompleks o różowofioletowej (purpurowej) barwie. Reakcja jest swoista dla enterokoków i *Streptococcus pyogenes* (grupa A wg Lancefield). Wynik ujemny dają *E. cecorum*, *E. columbae* i *E. saccharolyticus* (37, 38).

Identyfikacja gatunków enterokoków opiera się na określeniu ich cech biochemicznych (tab. 6; 3, 13, 36). Metabolizm enterokoków opiera się na procesie fermentacji, w przebiegu którego z glukozy powstaje kwas mlekowy (a nie



Ryc. 1. Wybrane cechy enterokoków: A – hemoliza α, B – katalazo-ujemne, C – oksydazo-ujemne, D – wzrost w podłożu płynnym zawierającym 6,5% NaCl, E – wytwarzanie żółtego pigmentu (*E. casseliflavus*), F, G – hydroliza eskuliny (zaczernienie podłoża), H – Gram-dodatnie (fioletowe) ziarenkowce

Tabela 6. Właściwości biochemiczne gatunków *Enterococcus*

Rodzaj reakcji	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. raffinosus</i>
N-acetyloglukozamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinoza	-	+	-	-	-	+	+	+	+
D-arabitol	-	-	d	-	-	+	-	-	+
D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Galaktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	d	-
Laktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Mannitol	+	+	d	-	-	+	+	+	+
D-mannoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioza	-	(+)	+	+	d	d	+	+	+
Melezytoza	(+)	-	d	-	-	+	d	d	+
Metyl- α -D-glukopyranozyd	(-)	-	d	-	-	+	+	+	+
Metylo- α -D-mannopiranozyd	(-)	-	-	-	-	V	V	(-)	ND
D-raffinoza	-	d	+	+	-	-	d	+	-
Ryboza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	d	-	-	+	d	d	+
D-tagatoza	+	-	-	(-)	-	+	-	+	+
Voges-proskauer	+	+	d	+	+	d	d	d	d
Fosfataza alkaliczna	d	(-)	+	-	-	-	ND	-	-
Dihydrolaza argininy	+	+	-	+	+	-	d	+	-
Hydroliza eskuliny	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A-galaktozydaza	-	d	d	+	-	-	+	+	d
B-galaktozydaza	d	+	d	(+)	d	d	+	+	-
B-glukuronidaza	-	-	+	-	-	-	-	d	-
Hydroliza hipuratu	d	d	d	d	V	d	-	d	d
Aminopeptydaza pirodonylowa (PYR)	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Objaśnienia:

+: 90% i więcej izolatów dało wynik dodatni

(+): 75-89% izolatów dało wynik dodatni

V: 26-74% dało wynik dodatni

(-): 11-25% dało wynik dodatni

- : 10 lub mniej izolatów dało wynik dodatni

ND: brak danych

d: rozbieżne dane piśmiennictwa

gaz). Do charakterystycznych cech poszczególnych gatunków należą m.in.: fermentacja: mannitolu, sorbitolu, arabinozy, rafinozy, hydroliza argininy, produkcja acetonu (reakcja Voges-Proskauera). Wszystkie enterokoki rozkładają aminopeptydazę leucytową (test LAP). Pomocna może być obserwacja ruchu (zdolność taką mają tylko *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* i *E. flavescens*), wytwarzanie żółtego barwnika (ryc. 1E; tylko *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. sulfureus* i *E. flavescens*), czy siarkowodoru (*E. malodoratus*; 5, 36).

Aktualnie badanie biochemiczne przeprowadza się za pomocą dostępnych na rynku testów, np. API 20 STREP, rapid ID 32 STREP (bioMérieux), EN-COCCUStest i STREPTOtest 24 (Erba Lachema), MICROGEN® STREP ID (Microgen Bioproducts), automatycznych systemów, pozwalających na jednoczesne oznaczenie lekowrażliwości, np. VITEK® (bioMérieux). Nowoczesną metodą umożliwiającą identyfikację gatunków jest system Biolog (MICROSTATION™ ID System, OMNILOG® SYSTEM). Technologia ta opiera

się na analizie metabolizmu bakterii w odniesieniu do zróżnicowanych źródeł węgla, znajdujących się na 96-dołkowej płytce (GenIII). Badany mikroorganizm, wykorzystując specyficzne dla siebie źródła węgla, tworzy jedyny i unikatowy metaboliczny wzór, tzw. odcisk palca mikroorganizmu, który jest zapisywany i porównywany z setkami profili znajdującymi się w bazie danych. Możliwa jest też analiza częstotliwości jego występowania oraz zmian. W wielu przypadkach trudności może stanowić np. identyfikacja

gatunków blisko spokrewnionych czy szczepów atypowych, które nie mają typowych cech biochemicznych, wówczas pomocne będą metody genotypowe oparte na analizie materiału genetycznego enterokoków, co bardziej szczegółowo autorzy opisali we wcześniejszym opracowaniu (39).

Piśmiennictwo

- Sherman J. M.: The streptococci. *Bacteriol. Rev.* 1937, **1**, 3-97.
- Schleifer K. H., Kilpper-Balz R.: Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1984, **34**, 31-34.
- Devriese L. A., Hommez J., Wijfels R., Haesebrouck F.: Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 1991, **71**, 46-50.
- Tankson J. D., Thaxton J. P., Vizzier-Thaxton Y.: Bacteria in heart and lungs of young chicks. *J. Appl. Microbiol.* 2002, **92**, 443-450.
- Klein G.: Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **88**, 123-131.
- Euzéby J. P.: List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. LPSN 2012. <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>
- Thiercelin M. E.: Sur UN diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C.R. Séances Soc. Biol.* 1899, **5**, 269-271.
- Thiercelin M. E., Jouhaud L.: Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations périphériques et microblastes. *C.R. Séances Soc. Biol.* 1903, **55**, 686-688.
- Lancefield R. C.: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1933, **57**, 571-595.
- Devriese L. A., Pot B., Collins, M. D.: Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, **75**, 399-408.
- Kizerwetter-Swida M., Biniek M.: Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken. *J. Anim. Feed. Sci.* 2008, **17**, 224-232.
- Borzemska W.: Opóźnienie resorpcji woreczka żółtkowego. W: Mazurkiewicz M. (red.): *Choroby drobiu*. F. P. H. ELMA. Wrocław 2011, s. 115-120.
- Murray B. E.: The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, **3**, 46-65.
- Robbins K., Borst L., Martin M. P., Jay P., Suyemoto M., Barnes H. J.: Phenotypic analysis of *Enterococcus cecorum* field isolates associated with vertebral osteoarthritis. AAAP Scientific Program – AVMA Annual Convention. Atlanta, GA. 2010. <http://www.cvm.ncsu.edu/dphp/pfm/documents/Robbinsaaap2010>
- Devriese L. A., Cauwerts K., Hermans K., Wood A. M.: *Enterococcus cecorum* septicaemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens. *Flemish Vet. J.* 2002, **71**, 219-221.
- Marrow J., Whittington J. K., Mitchell M., Hoyer L. L., Maddox C.: Prevalence and antibiotic-resistance characteristics of *Enterococcus* spp. Isolated from free-living and captive raptors in Central Illinois. *J. Wildl. Dis.* 2009, **45**, 302-313.
- Franz C. M. A. P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A.: Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, **151**, 125-140.
- Jortner B. S., Helmboldt C. F.: Streptococcal bacterial endocarditis in chickens associated lesions of the central nervous system. *Vet. Pathol.* 1971, **8**, 54-62.
- Hernandez D. J., Roberts E. D., Adams L. G., Vera T.: Pathogenesis of hepatic granulomas in turkeys infected with *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *Avian Dis.* 1972, **15**, 201-216.
- Bisgaard M.: Arthritis in ducks. Etiology and public health aspects. *Avian Pathol.* 1981, **10**, 11-21.
- Sandhu T. S.: Fecal streptococcal infection of commercial white pekin ducklings. *Avian Dis.* 1988, **32**, 570-573.
- Devriese L. A., Uyttendroek E., Ducatelle R., Viaene N., Derijcke J., Gevaert D.: Tracheitis due to *Enterococcus faecalis* infection in canaries. *J. Assoc. Avian. Vet.* 1990, **4**, 113-116.
- Devriese L. A., Cruz Colque J. I., Haesebrouck F., Desmidt M., Uyttendroek E., Ducatelle R.: *Enterococcus hirae* in septicaemia of psittacine birds. *Vet. Rec.* 1992, **130**, 558-559.
- Cardona C. J., Bickford A. A., Charlton B. R., Cooper G. L.: *Enterococcus durans* infection in young chickens associated with bacteremia and encephalomalacia. *Avian Dis.* 1993, **37**, 234-239.
- Randall C. J., Wood A. M., MacKenzie G.: Encephalomalacia in first-week chicks. *Vet. Rec.* 1993, **132**, 418.
- Landman, W. J. M., Gruys E., Dwars R. M.: A syndrome associated with growth depression and amyloid arthropathy in layers: a preliminary report. *Avian Pathol.* 1994, **23**, 461-470.
- Chadfield M. S., Christensen J. P., Juhl-Hansen J., Christensen H., Bisgaard M.: Characterization of *Enterococcus hirae* outbreaks in broiler flocks demonstrating increased mortality because of septicemia and endocarditis and/or altered production parameters. *Avian Dis.* 2005, **49**, 16-23.
- Tankson J. D., Thaxton J. P., Vizzier-Thaxton Y.: Pulmonary hypertension syndrome in broilers caused by *Enterococcus faecalis*. *IAI.* 2001, **69**, 6318-6322.
- Brash M., Joyce M., Slavic D.: First report of *Enterococcus cecorum* infection in meat turkeys in Ontario. *AHL Newsletter.* 2011, **15**, 5.
- Brash M., Slavic D.: An unusual case of *Enterococcus cecorum* septicemia in a racing pigeon. *AHL Newsletter.* 2011, **15**, 30.
- Olsen R. H., Frantzen C., Christensen H., Bisgaard M.: An Investigation on First-Week Mortality in Layers. *Avian Dis.* 2012, **56**, 51-57.
- Salehi T. Z., Badouei M. A., Ghaffari M. M., Khormali M.: Isolation of *Enterococcus raffinosus* from an ostrich chick with diarrhoea. *Comp. Clin. Pathol.* 2012, **21**, 209-211.
- Facklam R. R., Moody M.: Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test. *Appl. Microbiol.* 1970, **20**, 245-250.
- Reuter G.: Culture media for enterococci and group D-streptococci. *Int. J. Food Microbiol.* 1992, **17**, 101-111.
- Jackson C. R., Fedorka-Cray P. J., Jackson-Hall M.C., Hiatt L. M.: Effect of media, temperature and culture conditions on the species population and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens. *Lett. Appl. Microbiol.* 2005, **41**, 262-268.
- Manero A., Blanch A. R.: Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.* 1999, **65**, 4425-4430.
- Domig K.J., Mayer H. K., Kneifel W.: Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **88**, 147-164.
- Godsey J. R., Schulman R., Eriquez L.: The hydrolysis of L-pyrrolidonyl-b-naphthylamide as an aid in the rapid identification of *Streptococcus pyogenes*, *S. avium* and group D enterococci. *Abstracts of the Annual Meeting of the ASM* 1981; abstract C-84.
- Dolka B., Szelezczuk P.: Zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce zakażeń *Enterococcus cecorum* u kur. *Życie Wet.* 2012, **87**, 594-597.