

Agnieszka Lewandowska, Anetta Bogurska, Janusz Nyk, Ryszard Chorąży

**Inspekcja Weterynaryjna, Wojewódzki Inspektorat Weterynarii w Szczecinie, Zakład Higieny
Weterynaryjnej – Oddział w Koszalinie**

Wrażliwość *in vitro* na chemioterapeutyki izolatów *Yersinia ruckeri* pochodzących od ryb z ośrodków hodowlanych na terenie Pomorza Środkowego w latach 2013-2016

Wstęp

Yersinia ruckeri należy do najczęściej diagnozowanych, w Pracowni Chorób Ryb Oddziału Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Koszalinie, patogenów infekcyjnych, występujących w ośrodkach hodowli pstrągów na terenie Pomorza Środkowego. W latach 2013-2016 diagnozowano ją w liczbie od 22 do 43 próbek, co stanowiło odpowiednio od 16,4% do 28,2% wszystkich zbadanych próbek (Lewandowska i in. 2016). *Y. ruckeri* powoduje u ryb łososiowatych jersiniozę – ERM: Enteric Red Mouth (chorobę czerwonej gęby). Nazwa pochodzi od charakterystycznych zmian wybroczynowych zlokalizowanych w obrębie jamy gębowej, choć obserwacje własne wskazują, że ma to miejsce stosunkowo rzadko. Najczęściej obserwowane są dwie postacie choroby. Pierwsza – zmiany ograniczone są tylko do przewodu pokarmowego,

w postaci zapalenia nieżyłowego końcowego odcinka błony śluzowej jelita grubego, bądź żołądka oraz jelit. Druga postać – to uogólnione zakażenie w postaci licznych, punktowatych wybroczyn, bądź wylewów krwawych obejmujących narządy wewnętrzne oraz otrzewną. W jednym, jak i drugim przypadku występuje reakcja ze strony śledziony, w postaci przekrwienia, powiększenia oraz obrzęku tego narządu. Jersinioza powoduje bardzo duże straty w hodowli, szczególnie pstrąga tęczowego o wadze 50-100 g. W praktyce lekarsko-weterynaryjnej, w terapii ERM stosuje się głównie sulfonamidy potencjonowane trimetoprimem, w dalszej kolejności preparaty z grupy chinolonów oraz tetracykliny. Izolaty *Y. ruckeri* wykazują *in vitro* wysoką wrażliwość na chemioterapeutyki, co ma przełożenie na efektywność terapii *in vivo* u ryb.

Celem pracy było określenie wrażliwości izolatów *Y. ruckeri* (pozyskanych w latach 2013-2016) na chemioterapeutyki oraz wskazanie tendencji zmian pojawiających się szczepów opornych na niektóre substancje czynne preparatów stosowanych w zwalczaniu ERM w obiektach hodowlanych.

Charakterystyka *Yersinia ruckeri*

Y. ruckeri należy do rodziny *Enterobacteriaceae*. Jest Gram-ujemną pałeczką o zaokrąglonych końcach. Wymiary aktywnie rosnących komórek wynoszą 0,75 µm x 1,0-3 µm (Kościńska i in. 2002). Optymalna temperatura wzrostu *Y. ruckeri* na podłożu TSA wynosi 22-25°C. Nie wytwarza form przetrwalnikowych, ani otoczek. Posiada zdolność ruchu, gdyż zaopatrzona jest w 7-8 wici ułożonych wokół komórki bakterii. W Polsce izolowano szczepy nie wykazujące zdolności ruchu (Kościńska i Pękała 2004). Ze zdolnością ruchu związana jest cecha fenotypowa *Y. ruckeri* zdolności hydrolizy Tweenu 80. Bakterie wykazujące ruch i hydrolizujące Tween 80 zakwalifikowano do biotypu 1, w którym wyróżniono biogrupę 1 i 2 (Pękała 2008), natomiast nie wykazujące ruchu i nie hydrolizujące Tweenu 80 zakwalifikowano do biotypu 2 (Kościńska i Pękała 2004). Izolaty *Y. ruckeri* wykazują jednolite profile biochemiczne, ale mogą wykazywać różnice w reakcjach Voges-Proskauera, dekarboksylacji lizyny, wykorzystania cytrynianu, hydrolizy: argininy, Tweenu 80, żelatyny oraz reakcji z czerwienią metylową (Kościńska i in. 2002).

Y. ruckeri jest czynnikiem zakaźnym ERM. Występowanie choroby związane jest z serotypem O1 tej bakterii. Stwierdzono, że 91% wszystkich izolatów pochodzących z Europy należało do serotypu O1 (Davies 1990). Na terenie Polski występują serotypy O1, O5 i O7. Chorobotwórcze dla pstrągów tęczowych są serotypy: O1 zaliczony do biotypu 2 i O7. Serotyp O5 zakwalifikowany do biotypu 1 i biogrupy 2 nie jest chorobotwórczy dla pstrągów tęczowych (Pękała 2008).

Jersinioza jest poważnym problemem w hodowlach ryb łososiowatych. Straty w jej przebiegu mogą sięgać 50% obsady (Woo i in. 2003). Choroba występuje u pstrąga potokowego (*Salmo trutta m. fario*), pstrąga źródlanego (*Salmo fontinalis*), łososia czawyczy (*Oncorhynchus tshawytscha*), łososia kiżuczy (*Oncorhynchus kisutch*) (Dulin i in. 1976). *Y. ruckeri* izolowano do karasia złocistego (*Carassius auratus*), siei (*Coregonus laveret*), sielawy (*Coregonus albula*), bassa (*Micropterus salmoides*), turbota (*Paseta maxima*). W warunkach eksperymentalnych *Y. ruckeri* może być patogenna dla karpia (*Cyprinus carpio*). Nosicielem *Y. ruckeri* jest szczupak (*Esox lucius*).

Jednak najbardziej wrażliwy na zakażenie *Y. ruckeri* jest narybek pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) o wadze od 50 do 100 g. Straty w tej grupie asortymentowej mogą dochodzić do 70% obsady (Woo i in. 2003). Najwięk-

sze zachorowania na jersiniozę odnotowuje się przy temperaturze wody w zakresie 10-18°C. Poniżej temperatury 10°C objawy choroby obserwowane są bardzo rzadko (Antychowicz 1996). Obserwacje własne wskazują, że od kilku lat izoluje się szczepy *Y. ruckeri* z przypadków chorobowych występujących w miesiącach zimowych, gdzie temperatura wody oscyluje w zakresie 1-3°C.

Do zakażenia *Y. ruckeri* dochodzi drogą horyzontalną. Źródłem zakażenia są ryby chore oraz bezobjawowi nosiciele, rozsiewający bakterie z kałem. To powoduje również obecność *Y. ruckeri* w osadach dennych. Drobnoustroje mogą być przenoszone przez niewłaściwie dezynfekowany sprzęt rybacki. Istotnym wektorem w rozprzestrzenianiu się *Y. ruckeri* są zwierzęta wodne: ssaki – szczury piżmowe, rzęsorki, ptaki drapieżne oraz nawet raki. Ważnym i bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na zachorowalność i rozwój jersiniozy ma stres, np. podczas transportu lub inne czynniki stresogenne, np. zwiększona koncentracja amoniaku, deficyt tlenu, zmniejszony dopływ i przepływ wody.

Ważną cechą *Y. ruckeri* jest zdolność do wytwarzania tzw. biofilmu – warstwy stworzonej przez bakterie, przylegającej do powierzchni różnych przedmiotów, zbudowanych z drewna, PCV, włókna szklanego, betonu (Coquet i in. 2002a,b). Właściwość ta jest istotnym czynnikiem obecności i szerzenia się epidemii choroby u ryb w obiekcie hodowlanym.

Materiał i metody

Materiałem do analizy były wyniki badań mikrobiologicznych próbek pochodzących od ryb, pozyskanych w latach 2013-2016. W roku 2013 zbadano 10800 ryb, stanowiących 361 próbek. W 2014 r. – 11850 ryb (395 próbek), w 2015 r. – 16200 ryb (540 próbek), a w roku 2016 – 12750 ryb (425 próbek). Ryby pochodziły z 111 ośrodków hodowli ryb łososiowatych, z czego 61 z województwa zachodniopomorskiego i 50 z województwa pomorskiego. Ryby dostarczane były w partiach od kilku do kilkudziesięciu ryb, w zależności od gatunku, asortymentu i masy jednostkowej. Do badań mikrobiologicznych pobierano głównie dogłową część nerki oraz śledzionę. Pobrane tkanki były posiewane na podłoża mikrobiologiczne – w przypadku *Y. ruckeri*, był to agar tryptozowo-sojowy (TSA). Inkubacja trwała od 24 do 48 godzin, w temperaturze 25 ± 1°C, w warunkach tlenowych. Identyfikacja opierała się głównie na zastosowaniu testu Mono-Yr oraz w przypadku niektórych izolatów zastosowano dodatkowo test Api 20 E. Antybiogramy wykonywano metodą dyfuzyjno-krażkową, na podłożu TSA i inkubowano w temperaturze 25 ± 1°C. Odczytu stref zahamowania wzrostu dokonywano po upływie 24 h za pomocą linijki ze skalą milimetrową. Interpretacji wyniku jako szczep wrażliwy, średniowrażliwy bądź oporny dokonywano wykorzystując tabele opracowane przez CLSI.

Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono zbiorcze zestawienie wrażliwości izolatów *Yersinia ruckeri* na stosowane chemioterapeutyki w latach 2013-2016. Rysunki 1-4 przedstawiają zmiany wrażliwości na stosowane chemioterapeutyki w każdym roku.

W roku 2013 izolaty *Y. ruckeri* w 95,7% wrażliwe były na fenikole – florfenikol, a tylko 4,3% izolatów było średnio-

lowane szczepy *Y. ruckeri* wrażliwe były od 87 do 91,3%, średniowrażliwe od 0 do 4,35% i odporne od 4,35 do 13%. Na chinolony – enrofloksacynę, norfloksacynę, flumechinę wrażliwych było od 34,8 do 43,5% izolowanych szczepów i 8,7% szczepów średniowrażliwych, opornych było od 47,8 do 56,5% szczepów.

W roku 2014 na tetracykliny wrażliwych było od 95,7 do 100% izolowanych szczepów *Y. ruckeri*, nie było szczepów średniowrażliwych i tylko 4,3% szczepów było opornych na

TABELA 1

Wrażliwość izolowanych szczepów *Yersinia ruckeri* na stosowane *in vitro* chemioterapeutyki wyrażona w procentach (%) w latach 2013-2016

Grupa związków	Chemioterapeutyk	2013			2014			2015			2016		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
tetracykliny	doksycyklina	95,7	0	4,3	100	0	0	96,6	0	3,4	90,9	4,55	4,55
	oksytetracyklina	74	13	13	95,7	0	4,3	89,7	0	10,3	90,9	4,55	4,55
fenikole	florfenikol	95,7	4,3	0	100	0	0	100	0	0	95,5	0	4,5
β-laktamy	amoksycylina	74	13	13	78,3	8,7	13	86,2	0	13,8	72,7	4,6	22,7
sulfonamidy potencjonowane trimetoprimem*	sulfametoksazol/TRM	87	0	13	87	8,7	4,3	96,6	3,4	0	81,8	0	18,2
	sulfadiazyna/TRM	91,3	4,35	4,35	95,7	0	4,3	96,6	3,4	0	86,4	0	13,6
	sulfamerazyna/TRM	91,3	4,35	4,35	95,7	0	4,3	96,6	3,4	0	81,8	0	18,2
chinolony	enrofloksacyna	43,5	8,7	47,8	30,4	43,5	26,1	44,8	6,9	48,3	18,2	18,2	63,6
	norfloksacyna	43,5	8,7	47,8	30,4	43,5	26,1	44,8	6,9	48,3	18,2	18,2	63,6
	flumechina	34,8	8,7	56,5	30,4	43,5	26,1	41,4	6,9	51,7	18,2	18,2	63,6

*Trimetoprim – TRM

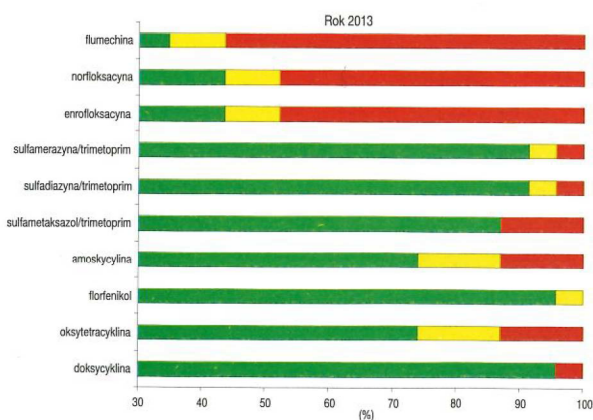
S – susceptible – wrażliwy

I – intermediate – średniowrażliwy

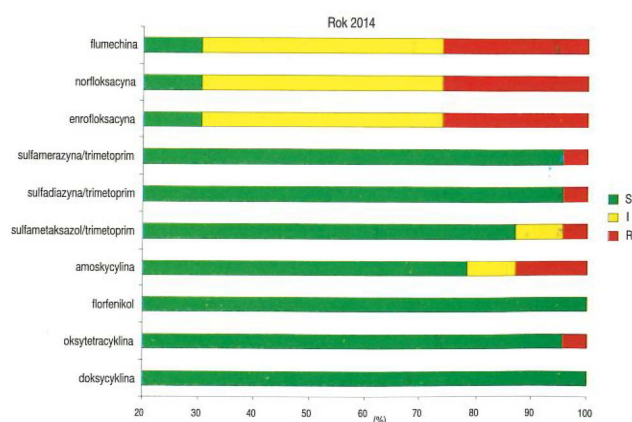
R – resistance – oporny

wrażliwych na ten chemioterapeutyk. Nie występowały izolaty odporne na florfenikol. Izolowane szczepy *Y. ruckeri* od 74 do 95,7% wrażliwe były na tetracykliny – doksycylinę i oksytetracylinę. Nie było szczepów średniowrażliwych na doksycylinę, ale było 13% szczepów średniowrażliwych na oksytetracylinę i od 4,3 do 13% szczepów opornych na te antybiotyki. Na β-laktamy – amoksycylinę wrażliwych było 74% szczepów, 13% było średniowrażliwych i 13% opornych. Na sulfonamidy potencjonowane trimetoprimem (TRM – sulfametoksazol, sulfadiazyna, sulfamerazyna) izo-

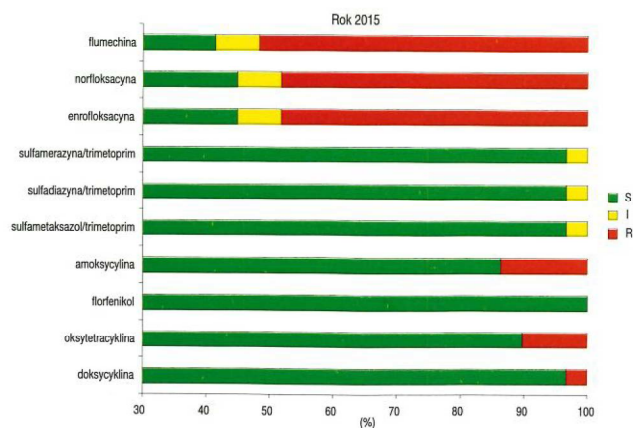
oksytetracyklinę. Na florfenikol wrażliwych było 100% izolowanych szczepów. Na amoksycylinę wrażliwych było 78,3% izolowanych szczepów, 8,7% było średniowrażliwych i 13% opornych. Na sulfonamidy potencjonowane TRM wrażliwych było od 87 do 95,7% szczepów, 8,7% było średniowrażliwych – sulfametoksazol, a opornych – sulfadiazyna, sulfamerazyna było 4,3% szczepów. Na chinolony wrażliwych było tylko 30,4% izolowanych szczepów *Y. ruckeri*, 43,5% średniowrażliwych i 26,1% szczepów było opornych.



Rys. 1. Wrażliwość izolowanych szczepów *Y. ruckeri* na stosowane *in vitro* chemioterapeutyki wyrażona w procentach (%) w roku 2013.



Rys. 2. Wrażliwość izolowanych szczepów *Y. ruckeri* na stosowane *in vitro* chemioterapeutyki wyrażona w procentach (%) w roku 2014.



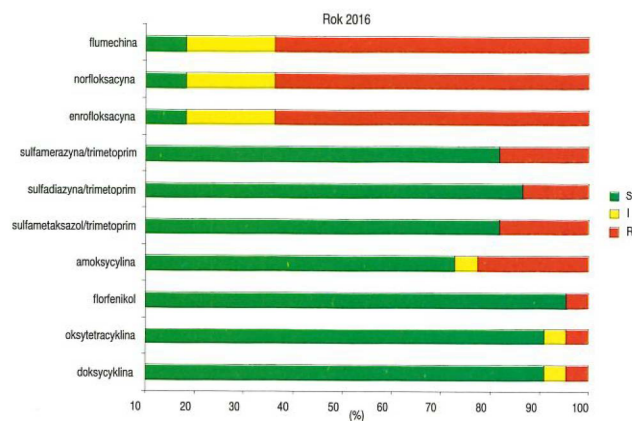
Rys. 3. Wrażliwość izolowanych szczepów *Y. ruckeri* na stosowane *in vitro* chemioterapeutyki wyrażona w procentach (%) w roku 2015.

W roku 2015 na tetracykliny wrażliwych było od 89,7 do 96,6% izolowanych szczepów *Y. ruckeri*, nie było szczepów średniowrażliwych i tylko od 3,4 do 10,3% szczepów opornych. Na florfenikol wrażliwych było 100% izolowanych szczepów. Na amoksycylinę wrażliwych było 86,2% izolowanych szczepów, nie było szczepów średniowrażliwych, a 13,8% było opornych. Na sulfonamidy potencjonowane TRM wrażliwych było 96,6% szczepów, 3,4% średniowrażliwych. Nie było szczepów opornych. Na chinolony wrażliwych było 44,8% izolowanych szczepów *Y. ruckeri*, 6,9% było średniowrażliwych i od 48,3 do 51,7% szczepów opornych.

W roku 2016 na tetracykliny wrażliwych było: 90,9% izolowanych szczepów *Y. ruckeri*, od 0 do 4,55% szczepów średniowrażliwych i 4,55% szczepów opornych. Na florfenikol wrażliwych było 95,5% izolowanych szczepów. Nie było szczepów średniowrażliwych i 4,5% było opornych. Na amoksycylinę wrażliwych było 72,7% izolowanych szczepów, 4,6% średniowrażliwych i 22,7% opornych. Na sulfonamidy potencjonowane TRM wrażliwych było od 81,8 do 86,4% szczepów, nie było szczepów średniowrażliwych i od 13,6 do 18,2% szczepów opornych. Na chinolony wrażliwych było 18,2% izolowanych szczepów *Y. ruckeri*, 18,2% średniowrażliwych i aż 63,6% izolowanych szczepów było opornych.

Dyskusja

W hodowli ryb chemioterapeutyki stosowane są w postaci kąpiei, iniekcji lub zadawane w paszy. Kąpiele lecznicze stosuje się przeważnie wśród ryb małych – wylęg i narybek lub w niektórych schorzeniach, np. skrzelii lub skóry. Iniekcje wykorzystuje się na małą skalę, przeważnie u ryb dużych, np. szczególnie cennych tarlaków. Stosowanie chemioterapeutyków w paszy ma największe znaczenie w leczeniu chorób ryb. Zadawanie chemioterapeutyków w paszy wiąże się jednak z ich niekorzystnym wpływem na ryby, jak również na środowisko, w którym ryby żyją. I są to zarówno stawy (pstrągowe), jak i środowisko cieku lub

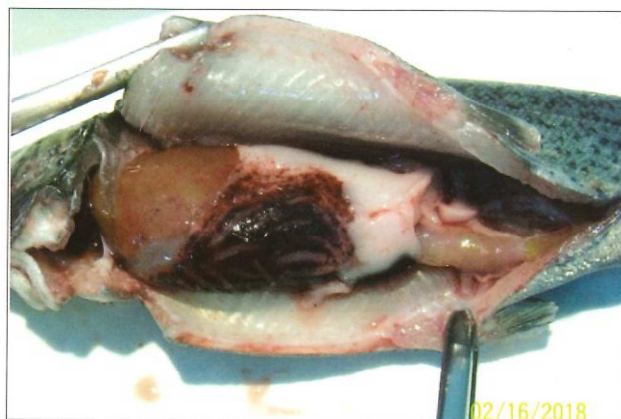


Rys. 4. Wrażliwość izolowanych szczepów *Y. ruckeri* na stosowane *in vitro* chemioterapeutyki wyrażona w procentach (%) w roku 2016.

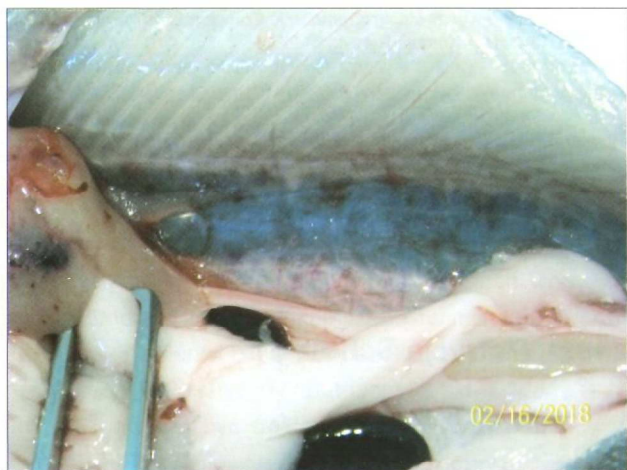
rzeki, z których pobierana jest woda do hodowli i odprowadzana jest woda poprodukcyjna. Według Hoole i wsp. (2001), za Antychowiczem (2007), trzeba określić następujące warunki, niezbędne przy stosowaniu leków w terapii ryb:

- dokładna identyfikacja czynnika chorobotwórczego;
- wybór odpowiedniego środka leczniczego;
- wybór odpowiedniej metody aplikacji leku, która zapewniłaby skuteczne leczenie, a równocześnie byłaby bezpieczna dla ryb;
- zweryfikowanie wybranej terapii pod kątem zgodności z panującymi w danym kraju przepisami;
- prowadzenie rejestru leczenia ryb i innych metod użytych do zwalczania określonych chorób.

Przy stosowaniu leków w paszy, leczenie to raczej zapobieganie chorobie wśród ryb, które żerują, niż leczenie ryb chorych, które nie pobierają pokarmu i tym samym leku. Brak żerowania przez ryby chore niesie ryzyko recydywy choroby w obiekcie. Takie przypadki notowano już wielokrotnie. Po okresie wyleczenia i braku objawów choroby u ryb, w krótkim czasie, od 7 do 14 dni, ponownie występowały objawy typowe dla jersiniozy, co było potwierdzone badaniem mikrobiologicznym. Przyczyny takiego stanu mogły być różne: obecność nosicieli *Y. ruckeri*, niewyleczono-



Fot. 1. Zmiany anatomopatologiczne w jamie ciała pstrąga tęczowego w przebiegu jersiniozy.



Fot. 2. Charakterystyczne wybroczyny i wylewy krwawe w pęcherzu pławnym pstrąga tęczowego w przebiegu jersiniozy.

nych ryb, zawleczenie patogenu przez zwierzęta wodne lub nowa infekcja patogenu, który przedostał się do obiektu hodowlanego z nurtem wody z innego, wyżej położonego na rzece ośrodka hodowlanego. Wyizolowana w tym przypadku *Y. ruckeri* była wrażliwa na inne chemioterapeutyki.

Analiza wrażliwości izolatów *Y. ruckeri* na stosowane chemioterapeutyki w latach 2013-2016 wskazuje na zmiany we wzroście liczby izolatów *Y. ruckeri* opornych na niektóre stosowane chemioterapeutyki. W 2016 roku 63,6% izolatów było opornych na **chinolony**, a w roku 2013 było to 47,8-56,5%. Odpowiednio średniowrażliwych było 18,2 i 8,7%, wrażliwych 18,2 i od 34,8 do 43,5%. Podobna tendencja występuje we wrażliwości na **sulfonamidypotencjonowane**, które stosowane są w przypadku jersiniozy jako lek z wyboru. W roku 2016 wrażliwych na sulfonamidy było 81,8% izolowanych szczepów *Y. ruckeri*, a w roku 2013 od 87,0 do 91,3%. W roku 2016 było już od 13,6 do 18,2% szczepów odpornych na sulfonamidy, a w roku 2013 tylko od 4,35 do 13%. Nie nastąpiła istotna zmiana we wrażliwości izolowanych szczepów *Y. ruckeri* na **β -laktamy** 74-72,7% szczepów wrażliwych, chociaż zwiększyła się liczba szczepów opornych z 13 do 22,7% kosztem średniowrażliwych. Nadal zdecydowana większość izolatów *Y. ruckeri* jest wrażliwych na **tetracykliny** i **fenikole**. Ich wrażliwość utrzymuje się na poziomie 74-100% w przypadku tetracyklin oraz 95,5-100% w przypadku fenikoli. Jak można zaobserwować, największe zmiany (pojawienie się szczepów opornych) dotyczą sulfonamidów potencjonowanych, natomiast w przypadku chinolonów tendencja zmian polega, w ostatnich dwóch latach, na wzroście liczby szczepów opornych na tę grupę chemioterapeutyków.

Wnioski

W latach 2013-2016 odnotowano wzrost liczby izolatów *Y. ruckeri* opornych na niektóre chemioterapeutyki sto-



Fot. 3. Izolat *Y. ruckeri* na podłożu TSA po 48 godzinach inkubacji.



Fot. 4. Antybiogram dla izolatu *Y. ruckeri* po 24 godzinach inkubacji.

sowane w terapii jersiniozy. Wzrosła również liczba izolatów średniowrażliwych na stosowane chemioterapeutyki.

Zaobserwowana tendencja wzrostu oporności izolatów *Y. ruckeri* na niektóre chemioterapeutyki może w kolejnych latach doprowadzić do braku ich skuteczności w terapii jersiniozy i konieczności stosowania innych substancji czynnych.

Szybka i wiarygodna diagnostyka mikrobiologiczna ERM, z określeniem wrażliwości izolowanego szczepu *Y. ruckeri* na chemioterapeutyki, jest podstawą do skutecznej terapii tej jednostki chorobowej.

Literatura

- Antychowicz J. 1996 – Choroby i zatrucia ryb – Wyd. SGGW: 163-167.
- Antychowicz J. 2007 – Choroby ryb śródlądowych – PWRiL Warszawa.
- Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T. 2002a – Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm material: influence of cell and material surface properties – Colloids and Surfaces B: Biointerface 26: 373-378.
- Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T. 2002b – Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* stain with biofilm-forming capacity in rainbow trout farm – Appl. Environ. Microbiol. 68(2) :470-475.
- Davies R.L. 1990 – O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates – Wet. Micro. 22: 299-307.

- Dulin M.P., Huddleston T., Larson R.E., Klontz G.W. 1976 – Enteric redmouth disease – Forest Wildlife Range Experimental Station. University of Idaho Bulletin 8: 1-15.
- Kozińska A., Pękała A. 2004 – Występowanie *Yersinia ruckeri* u ryb łososiowatych w Polsce i fenotypowa charakterystyka izolatów – Med. Wet. 60: 880-882.
- Lewandowska A., Bogurska A., Chorąży R., Nyk J., Mazur W. 2017 – Patogeny infekcyjne i inwazyjne diagnozowane u ryb pochodzących z ośrodków hodowlanych na terenie Pomorza Środkowego w latach 2013-2016 – Komun. Ryb. 4: 19-27.
- Pękała A. 2008 – Charakterystyka fenotypowa i genotypowa krajowych izolatów *Yersinia ruckeri* w aspekcie ich patogenności dla ryb – Praca doktorska, PIWet-PIB Puławy.
- Rucker R.R. 1996 – Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) – Bull. Off. Int. Epizoot. 65: 825-830.
- Woo P.T.K., Bruno D.W., Lim L.H.S. 2003 – Diseases and disorders of finfish in cage culture – CABI Publishing, UK.