Charakterystyka szczepów chorobotwórczych *Yersinia ruckeri* i ich znaczenie w immunoprofilaktyce pstrąga tęczowego

JOANNA PAJDAK, ELŻBIETA TERECH-MAJEWSKA, ALEKSANDRA PLATT-SAMORAJ, PATRYCJA SCHULZ*, ANDRZEJ KRZYSZTOF SIWICKI*, WOJCIECH SZWEDA

Katedra Epizootologii, *Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Otrzymano 03.04.2017

Zaakceptowano 23.05.2017

Pajdak J., Terech-Majewska E., Platt-Samoraj A., Schulz P., Siwicki A. K., Szweda W. Characterization of pathogenic *Yersinia ruckeri* strains and their importance in rainbow trout immunoprophylaxis

Summary

Due to the wide range of distribution, tendency to stationary persistence and high susceptibility of salmonid fish, vaccination against yersiniosis is an important part of prophylactic programs in many trout farms. The use of autovaccines prepared on the basis of isolates from a given fish farm is considered to be more effective than the use of commercial preparations. The aim of the study was to analyze cases of the disease in 2015 and to try to explain the failure of implemented prophylactic program based on autovaccination. *Y. ruckeri* strains isolated from one fish farm, from disease outbreaks in 2006, 2008 and 2015, as well as strains used for vaccine production were analyzed. Biotype evaluation, biochemical properties using API 20E assays, serotyping, and molecular identification were performed. All analyzed strains belonged to biotype 2. Two different profiles were obtained in API 20E tests. The first was obtained for vaccine strains and from disease cases in 2006 and 2008. The second was obtained for the strain isolated from the disease case in 2015. None of the profiles have been interpreted as *Y. ruckeri* in the APIweb. The identification of bacteria was confirmed by PCR. Disease strains and two vaccine strains belonged to the O1 serotype. Two of the vaccine strains have been qualified as O5 serotype. The obtained results indicate that the disease outbreak in 2015 was due to the emergence of a strain with increased pathogenicity and the use of an autovaccine based on strains belonging to the O5 serotype, considered to be less pathogenic. Immunization with the use of the O5 serotype does not provide complete protection against infection with other serotypes, so that fish remained susceptible to O1 serotype, which caused the disease in 2015. The results suggest the need for extending the diagnostics of strains used for the production of autovaccines.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, rainbow trout, vaccination

Yersinia ruckeri (*Y. ruckeri*) jest Gram-ujemną, oksydazo-ujemną pałeczką, będącą czynnikiem etiologicznym jersiniozy, zwanej też „choroby czerwonej gęby” (ERM, enteric redmouth disease). Po raz pierwszy została zidentyfikowana w stanie Idaho w USA, w 1958 r. (18). Od tamtego czasu bakteria ta stała się poważnym problemem w hodowlach ryb łososiowatych na całym świecie, istnieje jednak hipoteza, że występowała już wcześniej na terenie USA (4). Została stwierdzona zarówno w Ameryce Północnej, jak i Południowej, w Europie, Australii, Południowej Afryce, na Środkowym Wschodzie oraz w Chinach (12). Pierwsze doniesienia dotyczące występowania *Y. ruckeri* w Europie datowane są na lata 80. XX w. (4). W Polsce choroba po raz pierwszy została opisana

przez Grawińskiego w 1990 r. (10), jednak pierwsze badania nad rozprzestrzenieniem *Y. ruckeri*, z uwzględnieniem serotypów, zostały opublikowane stosunkowo niedawno, bo w 2010 r. (17).

Za gatunek najbardziej wrażliwy na zakażenie uważany jest pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*), jednak bakteria była izolowana z przypadków chorobowych również u innych gatunków ryb (12).

Najbardziej podatne na zachorowanie są młode ryby, wielkości 7,5-12 cm. U osobników starszych zakażenie ma charakter przewlekły i może przez dłuższy czas utrzymywać się w postaci bezobjawowego nosicielstwa. Choroba rozpoczyna się od pojedynczych śnięć, które z biegiem czasu dają wysoki odsetek śmiertelności w odniesieniu do całej populacji ryb. W przy-

padku pstrąga tęczowego śmiertelność może sięgać 70% obsady. Wśród objawów choroby wymienia się zmianę zachowania ryb, które stają się apatyczne, tracą apetyt i pływają przy powierzchni taflı wody. Inne objawy to: wytrzeszcz gałek ocznych, pociemnienie skóry, wybroczyny wewnątrz jamy ustnej, jak również wokół otworu gębowego. Sekcyjnie stwierdzane są: powiększenie śledziony, zapalenie końcowego odcinka jelit, które mogą być wypełnione żółtawym płynem, wybroczyny występujące na powierzchni wątroby, trzustki, wyrostków pylorycznych, pęcherza pławnego oraz w mięśniach. W przypadku wybuchu choroby leczenie antybiotykami jest z reguły skuteczne, jednak trudno doprowadzić do całkowitej eradykacji tego patogenu z danego obiektu hodowlanego. *Y. ruckeri* może utrzymywać się w osadach dennych nawet przez kilka miesięcy. Wykazuje również zdolność do tworzenia biofilmu na ścianach zbiorników hodowlanych. Zakażone ryby, po przechorowaniu, mogą wykształcić stan nosicielstwa, będąc źródłem zakażenia dla kolejnych ryb. Szacuje się, że nawet 25% ryb w gospodarstwie może być nosicielami, a siewstwo może się utrzymywać nawet przez dwa miesiące po zakażeniu, dlatego jersinioza ma tendencję do endemicznego utrzymywania się w niektórych gospodarstwach rybackich (11, 12, 14, 21).

Początkowo sądzono, że szczepy *Y. ruckeri* stanowią stosunkowo homologiczną fenotypowo grupę, jednakże z czasem pogląd ten uległ zmianie. W oparciu o zdolność ruchu oraz aktywność lipazy szczepy mogą być podzielone na dwa biotypy: biotyp 1, który jest lipazo-dodatni i wykazuje zdolność ruchu oraz biotyp 2, lipazo-ujemny, niewykazujący ruchu (5, 12). Pierwsze doniesienia o szczepach należących do biotypu 2 pojawiły się już w 1980 r., jednak zyskały na znaczeniu dopiero na początku XXI w., kiedy odkryto, że są one w stanie przełamać odporność poszczepienną. Uważa się, że szeroko prowadzone szczepienia przyczyniły się do zmniejszenia zasięgu występowania biotypu 1. Doprowadziło to do powstania niszy, która została zajęta przez biotyp 2. Aktualnie ten biotyp jest najszerszej rozpowszechniony w Europie (4).

Diagnostyka jersiniozy opiera się głównie na badaniach hodowlanych i późniejszej identyfikacji bakterii w oparciu o właściwości biochemiczne. Coraz częściej wykorzystywane są też metody serologiczne oraz molekularne, jednak nie stanowią one elementu rutynowej diagnostyki. Straty związane z wystąpieniem choroby mogą być ograniczone dzięki stosowaniu szybkiej diagnostyki, która pozwoliłaby nie tylko na dobór odpowiedniego leczenia, ale też skuteczniejsze działania prewencyjne w przyszłości (19).

W związku z tendencją do stacjonarnego utrzymywania jersiniozy oraz wysoką wrażliwością na zakażenie, szczepienia przeciwko *Y. ruckeri* są stałym elementem programów profilaktycznych w wielu gospodarstwach pstrągowych. W jednym z obiektów rybackich, z uwagi na występowanie zachorowań ryb

w latach 2006 i 2008, w kolejnych latach stosowano autoszczepionkę, która pozwoliła na ograniczenie strat związanych z zachorowaniami ryb na jersiniozę. W 2015 r. przeprowadzono badania monitoringowe ryb oraz próbek wody i osadów dennych, które nie wykazały obecności *Y. ruckeri* w tym gospodarstwie. Potwierdziły one jednak jej obecność w gospodarstwie sąsiednim. Po upływie tygodnia ryby w gospodarstwie, w którym we wcześniejszym badaniu nie stwierdzono obecności bakterii, zaczęły snąć z objawami typowymi dla ERM. Badania laboratoryjne potwierdziły obecność *Y. ruckeri*. Przeprowadzone badania miały na celu określenie prawdopodobnej przyczyny przełamania odporności poszczepiennej i wystąpienia jersiniozy. Analizie poddano zarówno szczepy wyizolowane z przypadków chorobowych w latach 2006, 2008, 2015, jak i szczepy stosowane w produkcji autoszczepionki.

Materiał i metody

Szczepy *Y. ruckeri* pozyskiwano zarówno od ryb wykazujących objawy ERM, jak i w trakcie badań monitoringowych klinicznie zdrowych ryb. Materiał do badań stanowiły narządy wewnętrzne, głównie nerka, skrzela oraz wymaz z jelita. Do badań pobierano również próbki wody oraz osadów dennych.

Decyzja o wielkości próby, czyli liczby ryb potrzebnych do przeprowadzenia wiarygodnych badań, była zależna od aktualnej sytuacji zdrowotnej. Każdorazowo przed przystąpieniem do pobierania prób przeprowadzany był wywiad z hodowcą oraz wizytacja gospodarstwa wraz z obserwacją zachowania się ryb, na które składało się: pobieranie paszy, sposób pływania oraz ewentualne występowanie śnięć. W przypadku występowania objawów chorobowych próbę do badań stanowiło 10 ryb. W przypadku braku objawów klinicznych jersiniozy i/lub śnięć, losowo pobierano 30 ryb (14).

W celu określenia zasięgu występowania bakterii w środowisku, próbki wody i osadów były pobierane w miejscu dopływu wody do gospodarstwa, ze zbiorników, w których utrzymywano ryby oraz w miejscu odpływu wody z gospodarstwa. Każdorazowo na terenie gospodarstwa pobierano z trzech wyżej wymienionych miejsc próbkę wody z osadami o pojemności 100 ml.

Pobrane jałowo próbki narządów wewnętrznych poddawano homogenizacji. Homogenaty standardowo posiewano na agar odżywczy z dodatkiem 5% krwi (CBA – Columbia Blood Agar, Oxoid). Próbkę osadów dennych oraz 10-krotne rozcieńczenia próbki wody w ilości 1 ml na płytkę także posiewano na podłoże CBA. Po 24 h inkubacji w $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ charakterystyczne kolonie przesiewano na agar odżywczy TSA (Tryptic Soya Agar, Merck). Za kolonie charakterystyczne dla *Y. ruckeri* uznawano okrągłe, wyniesione, błyszczące, białawe kolonie nie zmieniające barwy podłoża. Po 24 h inkubacji w $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ wykonywano test na oksydazę oraz barwienie wybranych szczepów metodą Grama. Izolaty Gram-ujemne i oksydazo-ujemne posiewano na podłoże TSA oraz inkubowano przez 24 h w $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Wyosobnione kultury bakterii przechowywano w podłożu TSB (Tryptic Soya Broth, Merck) z glicerolem w -40°C (14).

Wstępna charakterystyka izolatów. Do badań wybrano cztery izolaty, na bazie których opracowano autoszczepionkę, oraz trzy izolaty wyizolowane z przypadków klinicznych – z lat 2006, 2008 oraz 2015. Każdy izolat *Y. ruckeri* barwiono metodą Grama, po czym określano jego morfologię. W tym celu 24 h hodowlę bakterii zawieszano w kropli wody destylowanej i przygotowywano rozmazy na szkiełku podstawowym. Po utrwaleniu nad płomieniem preparat barwiono metodą Grama, stosując zestaw Gram color (Merck), zgodnie z instrukcją producenta. Kształt bakterii określano poprzez obserwację w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 1000 ×, pod imersją (14). Zdolność ruchu badano z zastosowaniem API M medium (BioMerieux). Test wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta.

Właściwości biochemiczne poszczególnych izolatów *Y. ruckeri* badano przy użyciu systemu API 20E (BioMerieux), zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Wyniki oznaczenia – obecność lub brak reakcji, odczytywano na podstawie klucza zawartego w procedurze wykonywania testu, natomiast otrzymane rezultaty analizowano z zastosowaniem programu Apiweb (BioMerieux) celem identyfikacji badanej bakterii.

Izolacja DNA i identyfikacja z wykorzystaniem metody PCR. Szczep referencyjny oraz badane izolaty *Y. ruckeri* posiewano na płynne podłoże TSB. Inkubację hodowli prowadzono w cieplarni z wytrząsaniem (Stuart, orbital incubator) przy prędkości 75 obr./min., przez 24 h w 25°C ± 2°C. Gęstość optyczną (OD) hodowli bakteryjnej mierzono w aparacie BioPhotometer (Eppendorf, Germany) przy długości fali 540 nm. Do dalszych badań wykorzystywano hodowlę o gęstości 1 × 10⁹ komórek/ml.

Genomowe DNA bakterii izolowano z zastosowaniem komercyjnego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology), zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Stężenie oraz czystość wyizolowanego DNA określano metodą spektrofotometryczną (BioPhotometer, Eppendorf, Germany) przy długości fali 260 nm oraz 280 nm. Do badania metodą PCR przeznaczano DNA o współczynniku A260/A280 mieszczącym się w granicach 1,8 do 2,0 (14).

Do PCR wykorzystano trzy różne pary starterów w celu identyfikacji oraz określenia obecności wybranych genów odpowiedzialnych za patogenność. W celu potwierdzenia identyfikacji użyto starterów Yer8 oraz Yer10 opisanych przez Altinok i wsp. (1), które umożliwiają powielenie fragmentu DNA regionu konserwatywnego małej podjednostki rybosomalnego RNA (16SrRNA). W celu dokładniejszej analizy szczepów przeprowadzono również amplifikację fragmentów genów *yrp1* oraz *yh1A*, które są związane z wirulencją. Syntezę starterów zlecono firmie GenoMed S.A. Sekwencje nukleotydowe użytych starterów zostały przedstawione w tab. 1.

Próbki zostały przygotowane z pomocą zestawu HotStarTaq Plus Master Mix Kit (1000) (Qiagen), zgodnie z zaleceniami producenta. Amplifikacja została przeprowadzona w aparacie Mastercycler® epgradient S (Eppendorf, Germany).

Uzyskane amplikony poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advance DNA Stain

Tab. 1. Startery użyte do identyfikacji *Y. ruckeri*

Nazwa startera	Sekwencja startera	Piśmiennictwo
Yer 8 Yer 10	(F): 5' GCG AGG AGG AAG GGT TAA GTG 3' (R): 5' GAA GGC ACC AAG GCA TCT CTG 3'	(1)
Yrp 1 Yrp 2	(F): 5' GCCAAGATCTCATTACAATCTTGGGCA3' (R): 5' CGTTAGATCTCGCACCATGTAATTCAT 3'	(7)
Yh1A1 Yh1A2	(F): 5' ATATCCGGGCGGAAGGC 3' (R): 5' ATTGTCGATCAATAAGC 3'	(9)

(Abo). Do pierwszej studzienki nanoszono 12 µl GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Abo), do pozostałych po 12 µl mieszaniny reakcyjnej PCR. Elektroforezę przeprowadzono w aparacie firmy BioRad, w buforze 1 × TAE przez 30 min przy napięciu 65 V/cm długości żelu. Wyniki rozdziału elektroforetycznego odczytywano w świetle UV, w aparacie do wizualizacji i archiwizacji obrazu GelDoc (BioRad) z oprogramowaniem komputerowym QuantityOne (BioRad).

Określenie serotypu. Przynależność izolatów do serotypu określono przy użyciu metody aglutynacji płytkowej. Antygeny przygotowane zostały według metody opisanej przez Davies (6). Poliklonalne surowice królicze przeciwko poszczególnym serotypom *Y. ruckeri* otrzymano z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – PIB w Puławach, gdzie przygotowano je zgodnie z metodyką opisaną w podręczniku OIE (Manual OIE, 2003) oraz przez Davies (6). Test aglutynacji został wykonany na płytce 96-dołkowej. Do każdego dołka nanoszono po 100 µl PBS z formaliną (0,4%), 100 µl odpowiedniej surowicy oraz 100 µl zawiesiny bakteryjnej badanego szczepu. W co drugim rzędzie nanoszono surowicę kontrolną. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 24 h w 37-38°C. Obecność osadu bakterii na dnie dołka oznaczała wynik ujemny (14).

Wyniki i omówienie

Wyniki badań obejmujące charakterystykę wyizolowanych szczepów *Y. ruckeri* przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Charakterystyka szczepów *Y. ruckeri*

Szczep	Biotyp	Serotyp	API 20E	PCR	Uwagi
RW0914 <i>Y. ruckeri</i> E17	bt 2	05	5306100	Yer + Yrp1 + Yh1A +	szczepionkowy
RW0914 <i>Y. ruckeri</i> E18	bt 2	01	5306100	Yer + Yrp + Yh1A +	szczepionkowy
RW0914 <i>Y. ruckeri</i> E19	bt 2	05	5306100	Yer + Yrp1 + Yh1A +	szczepionkowy
RW0914 <i>Y. ruckeri</i> E20	bt 2	01	5306100	Yer + Yrp1 + Yh1A +	szczepionkowy
RW1206 <i>Y. ruckeri</i> D	bt 2	01	5306100	Yer + Yrp1 + Yh1A +	przypadek chorobowy 2006
RW0608 <i>Y. ruckeri</i> F	bt 2	01	5306100	Yer + Yrp1 + Yh1A +	przypadek chorobowy 2008
RW270515 <i>Y. ruckeri</i> 31	bt 2	01	4104100	Yer + Yrp1 + Yh1A +	przypadek chorobowy 2015

Wszystkie zgromadzone izolaty bakteryjne barwiły się Gram-ujemnie, były oksydazo-ujemne oraz nie wykazywały zdolności ruchu, dlatego zostały zakwalifikowane do biotypu 2. W wynikach testu API 20 E uzyskano dwa różne kody numeryczne. Szczepy szczepionkowe oraz wyizolowane z przypadków chorobowych w latach 2006 i 2008 charakteryzowały się kodem 5306100. Szczepy uzyskane z przypadku chorobowego w 2015 r. uzyskały kod 4104100. Odmienne reakcje zanotowano w przypadku testów ONPG, CIT oraz GEL. Szczepy z 2015 r. były w tych testach negatywne, natomiast pozostałe dały wynik pozytywny. Kod numeryczny 4104100 został zakwalifikowany w systemie Apiweb jako *Hafnia alvei* (*H. alvei*) z możliwością *Y. ruckeri*, z kolei kod 5306100 dał wynik wątpliwy bez wskazania na *Y. ruckeri*.

Przynależność badanych szczepów do *Y. ruckeri* została potwierdzona metodą PCR. Wszystkie szczepy dały dodatni wynik w odniesieniu do trzech badanych fragmentów genów: *yer*, *yrp1* oraz *yhlA*. Nie uzyskano szczepów *Y. ruckeri* z próbek wody i osadów dennych.

Badanie serologiczne wykazało przynależność dwóch szczepów szczepionkowych oraz trzech szczepów z przypadków chorobowych do serotypu O1. Dwa ze szczepów szczepionkowych zostały zakwalifikowane do serotypu O5.

Z uwagi na znaczne straty ekonomiczne związane z wystąpieniem choroby, wielu hodowców decyduje się na szczepienia ryb przeciwko jersiniozie. Jedną z dostępnych na polskim rynku szczepionek jest YERSI-FISHVAX (FATRO, Polska, Sp. z o.o). Producent nie podaje jednak dokładnej charakterystyki szczepu, na bazie którego szczepionka została przygotowana, co jest o tyle istotne, że szczepy terenowe należące do biotypu 2 mogą przełamywać odporność poszczepienną, jeśli szczepionka była oparta jedynie na szczepie należącym do biotypu 1. Z tego względu lepszym rozwiązaniem wydaje się stosowanie auto-

szczepionek, opartych na bazie szczepu wyizolowanego z danego gospodarstwa. W przypadku stosowania autoszczepionek wskazana jest jednak kontrola sytuacji epizootycznej w danym obiekcie oraz, w przypadku stwierdzenia obecności *Y. ruckeri*, dokładna analiza szczepu pod kątem biochemicznym, enzymatycznym i/lub antygenowym. Szczególnie istotne jest to w przypadku zaobserwowania spadku skuteczności autoszczepionki. Powodzenie stosowanych szczepień jest uzależnione nie tylko od składu szczepionki, ale też drogi jej podania, wieku szczepionych ryb oraz warunków temperaturowych, w jakich zabieg ten jest przeprowadzany. Najczęściej stosowaną metodą jest szczepienie w kąpieli wodnej. Minimalna masa jednostkowa ryb powinna wynosić około 4 g. Zalecany zakres temperaturowy powinien się mieścić w granicach od 10°C do 18°C (16).

Przedstawione wyniki badań dotyczą gospodarstwa, w którym *Y. ruckeri* wykazuje tendencję do stacjonarnego utrzymywania się, w związku z czym jest stałym elementem programu profilaktycznego, a ryby są szczepione autoszczepionką opracowywaną na bazie szczepów pochodzących z tego gospodarstwa. W badaniu kontrolnym ryb przeprowadzonym w kwietniu 2015 r. nie stwierdzono występowania *Y. ruckeri*. Badanie sąsiedniego obiektu rybackiego przeprowadzone na początku maja 2015 r. wykazało obecność bakterii w próbkach pobranych od ryb, które nie wykazywały objawów klinicznych jersiniozy. Po upływie tygodnia w badanym gospodarstwie rybackim stwierdzono pojedyncze śnięcia ryb. Upadkom towarzyszyły objawy kliniczne typowe dla ERM (ryc. 1 i 2). Badania bakteriologiczne potwierdziły obecność *Y. ruckeri* w narządach ryb z grupy, w której wystąpiły śnięcia. W związku z wystąpieniem przełamania odporności poszczepiennej ryb przeprowadzono analizę szczepów pochodzących z tego gospodarstwa – zarówno szczepionkowych, jak również tych pochodzących z przypadków chorobowych.

W badaniu próbek wody oraz osadów dennych nie stwierdzono obecności *Y. ruckeri*. Podobne wyniki

Ryc. 1. Jersinioza u pstrąga tęczowego. Wybroczyny widoczne wokół otworu gębowego

Ryc. 2. Jersinioza u pstrąga tęczowego. Wybroczyny w mięśniach i narządach wewnętrznych

uzyskano w badaniach prowadzonych na terenie Turcji. Pomimo obecności bakterii w próbkach uzyskanych od ryb, z próbek wody nie udało się wyizolować *Y. ruckeri* (19). Prawdopodobną przyczyną jest trudność z odnalezieniem kolonii charakterystycznych dla *Y. ruckeri* wśród licznych kolonii innych bakterii znajdujących się w próbkach wody i osadów dennych.

Stwierdzono, że szczepy należące do biotypu 2 są zdolne do przełamania odporności poszczepiennej, jeśli szczepionka była oparta na biotypie 1 (3, 20). Uzyskane wyniki pokazały, że w opisywanym przypadku zarówno szczepy szczepionkowe, jak i te z przypadków chorobowych, nie wykazują ruchu, dlatego należą do biotypu 2. Wykluczono w związku z tym wystąpienie odmiennego biotypu jako przyczynę przełamania odporności poszczepiennej.

Do czynników wirulencji *Y. ruckeri* zalicza się m.in. żelazozależną *Serratia*-podobną hemolizynę Yh1A, która ma właściwości hemo- i cytolityczne (8). Kolejnym czynnikiem wirulencji jest metaloproteaza, która pozwala na rozprzestrzenianie się bakterii w organizmie poprzez rozkład fibronektyny, aktyny oraz miozyny (12). Gen odpowiedzialny za produkcję tej proteazy *yrp1* został sklonowany i poddany analizie, która pozwoliła określić, że kodowana przez niego proteina należy do rodziny serralizyn, a jej wydzielanie zachodzi poprzez sekrecję typu I. W zależności od zdolności do produkcji tej metaloproteazy szczepy mogą zostać podzielone na Azo+ oraz Azo-. Szczepy Azo+ są uznawane za wirulentne (8). Badania molekularne potwierdziły przynależność gatunkową uzyskanych izolatów, która w oparciu o testy biochemiczne była wątpliwa.

Uzyskane wyniki testów API 20E zakwalifikowały szczep RW270515 *Y. ruckeri* 31 z 2015 r. jako *H. alvei*. Podobne przypadki są odnotowane w dostępnej literaturze (15). Z uwagi na zawodność testów API 20E zalecane jest wykonanie testów komplementarnych, takich jak wytwarzanie kwasu z ksylozy oraz gazu z glukozy. *H. alvei*, w przeciwieństwie do *Y. ruckeri* charakteryzuje się wynikami dodatnimi w wyżej wymienionych testach (15).

Szczep RW270515 *Y. ruckeri* 31 z 2015 r. różnił się od pozostałych analizowanych szczepów wynikami ujemnymi w odniesieniu do β -galaktozydazy, wykorzystania cytrynianu oraz hydrolizy żelatyny. Odróżnia go to nie tylko od pozostałych analizowanych szczepów, ale także od większości polskich izolatów opisywanych przez Pękałę i Antychowicza (15), według których wyniki dodatnie w opisywanych testach wykazuje, odpowiednio, 95,5% (ONPG), 66,6% (CIT) oraz 67,5% (GEL) izolatów.

Pozostałe uzyskane w badaniach własnych szczepy uzyskały kod 5306100, oznaczający wynik „wątpliwy” z najbliższym istotnym taksonem *Vibrio mimicus*. Podobne wyniki zostały uzyskane przez Altun i wsp. (2). Przeanalizowane przez nich szczepy w testach API 20E prezentowały kod 5304100, z uwagi na ujemną

reakcję GEL. Przeprowadzone przez nich równoległe badania metodami klasycznymi potwierdziły jednak zdolność analizowanych szczepów do hydrolizy żelatyny. Calvez i wsp. (5) w swoich badaniach przeanalizowali 128 izolatów *Y. ruckeri*, otrzymując 10 różnych kodów numerycznych, w tym opisany powyżej 5306100. Zawodność testów API 20E sugeruje konieczność potwierdzenia uzyskanej identyfikacji metodą serologiczną lub molekularną.

Serotypizacja jest ważnym elementem pozwalającym na zróżnicowanie szczepów danej bakterii. W 1984 r., w oparciu o antygen komórkowy wyróżniono 6 serotypów (serowarów) *Y. ruckeri*: I, II, III, IV, V oraz VI. Kolejne badania podważyły jednak przynależność serotypu IV do *Y. ruckeri*. Obecnie najczęściej stosowany jest podział zaproponowany przez Davisa (6). W oparciu o antygen otoczkowy O wyróżniono 5 serotypów – O1, O2, O5, O6, O7, przy czym za najbardziej patogenny uznawany jest serotyp O1. Serotyp ten jest również najbardziej rozpowszechniony w Europie (5, 12, 13). Badania przeprowadzone w Polsce potwierdziły, że również na terenie naszego kraju serotyp ten jest izolowany najczęściej, aczkolwiek potwierdzono również występowanie serotypów O5 oraz O7. Warto zaznaczyć, że serotyp O5 pochodził od szczupaka (*Esox lucius*), natomiast O7 od karpia (*Cyprinus carpio*) oraz pstrąga tęczowego, który nie wykazywał żadnych objawów chorobowych. Z przypadków klinicznych choroby izolowano serotyp O1 (17). Przeprowadzone własne badania serologiczne wykazały przynależność pięciu z analizowanych szczepów do serotypu O1. Potwierdza to dane literaturowe, opisujące ten serotyp jako najszerszej rozpowszechniony w Europie i Polsce (5, 12, 17). Dwa z analizowanych szczepów szczepionkowych zostały zakwalifikowane do serotypu O5 uznawanego za mniej patogenny. Szczepy te zostały użyte do produkcji autoszczepionki zastosowanej w szczepieniu ryb w przypadku zachorowania w 2015 r. Uzyskane wyniki wykazały odmienną przynależność serologiczną szczepów szczepionkowych oraz tego wyizolowanego z przypadku chorobowego w 2015 r. Pozwala to wnioskować, że jest to jedna z przyczyn braku skuteczności zastosowanego szczepienia oraz przełamania odporności.

System Apiweb określił profil szczepu RW270515 *Y. ruckeri* 31 wyizolowanego w 2015 r. jako „niskie różnicowanie, potwierdzić testami serologicznymi, organizm wysoce patogenny”. Zarówno badania molekularne, jak i serologiczne potwierdziły jego identyfikację jako *Y. ruckeri*, natomiast o wysokiej patogenności szczepu świadczy wiek chorych ryb, które osiągnęły masę ciała zbliżoną do jednego kilograma. Przeniesienie patogennego szczepu nastąpiło najprawdopodobniej z sąsiedniego gospodarstwa, w którym stwierdzono obecność *Y. ruckeri*. Pojawienie się szczepu o zwiększonej patogenności oraz słaba odporność poszczepienna uzyskana na bazie szczepu

o odmiennym serotypie są najbardziej prawdopodobnymi przyczynami zachorowania ryb w opisywanym przypadku. Autoszczepionki są uznawane za najbardziej skuteczną metodę ochrony zdrowia ryb, jednak przy ich przygotowywaniu nie zawsze określana jest pełna charakterystyka użytego szczepu bakterii. Uzupełnienie identyfikacji o badania serologiczne i molekularne pozwoli na opracowanie skuteczniejszej strategii profilaktycznej dla danego gospodarstwa rybackiego. Uzyskane wyniki pozwalają określić prawdopodobne przyczyny zawodności szczepienia oraz zachorowania ryb w 2015 r.

Piśmiennictwo

- Altinok I., Grizzle J. M., Liu Z. J.: Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* 2001, 44, 29-34.
- Altun S., Onuk E. E., Ciftci A., Duman M., Buyukekiz A. G.: Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2013, 19, 2, 225-232.
- Bastardo A., Ravelo C., Romalde J. L.: A polyphasic approach to study the intraspecific diversity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in salmonid culture. *Vet. Microbiol.* 2012, 160, 176-182.
- Bastardo A., Ravelo C., Romalde J. L.: Phylogeography of *Yersinia ruckeri* reveals effects of past evolutionary events on the current strain distribution and explains variations in the global transmission of enteric redmouth (ERM) disease. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1198.
- Calvez S., Gantelet H., Blanc G., Douet D. G., Daniel P.: *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. *Dis. Aquat. Org.* 2014, 109, 117-126.
- Davies R. L.: O-serotyping of *Yersinia-ruckeri* with special emphasis on european isolates. *Vet. Microbiol.* 1990, 22, 299-307.
- Fernandez L., Lopez J. R., Secades P., Menendez A., Marquez I., Guijarro J. A.: In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microb.* 2003, 69, 7328-7335.
- Fernandez L., Mendez J., Guijarro J. A.: Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Vet. Microbiol.* 2007, 125, 1-10.
- Fernandez L., Prieto M., Guijarro J. A.: The iron- and temperature-regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*. *Microbiology* 2007, 153, 483-489.
- Grawiński E.: The occurrence of redmouth disease in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Med. Weter.* 1990, 46, 183-185.
- Huang Y. D., Jung A., Schafer W. J., Mock D., Michael G. B., Runge M., Schwarz S., Steinhagen D.: Analysis of *Yersinia ruckeri* strains isolated from trout farms in northwest Germany. *Dis. Aquat. Org.* 2015, 116, 243-249.
- Kumar G., Menanteau-Ledouble S., Saleh M., El-Matbouli M.: *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet. Res.* 2015, 46, 103.
- Ormsby M. J., Caws T., Burchmore R., Wallis T., Verner-Jeffreys D. W., Davies R. L.: *Yersinia ruckeri* isolates recovered from diseased Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Scotland are more diverse than those from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and represent distinct subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82, 5785-5794.
- Pekala A.: Charakterystyka fenotypowa i genotypowa krajowych izolatów *Yersinia ruckeri* w aspekcie ich patogenności dla ryb. Praca doktorska, Zakład Chorób Ryb, PIWet-PIB, Puławy 2008.
- Pekala A., Antychowicz J.: Jersinioza ryb łososiowatych – charakterystyka czynnika etiologicznego i metody jego identyfikacji. *Med. Weter.* 2010, 66, 299-301.
- Pekala A., Antychowicz J.: Jersinioza ryb łososiowatych – epizootologia choroby, metody jej zwalczania. *Med. Weter.* 2010, 66, 374-377.
- Pekala A., Kozinska A., Antychowicz J.: Serological variation among polish isolates of *Yersinia ruckeri*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, 54, 305-308.
- Rucker R. R.: Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Internat. Off. Epizoot.* 1966, 65, 825-830.
- Seker E., Karahan M., Ispir U., Cetinkaya B., Saglam N., Sariyeyupoglu M.: Investigation of *Yersinia ruckeri* infection in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) farms by polymerase chain reaction (PCR) and bacteriological culture. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2012, 18, 913-916.
- Tinsley J. W., Austin D. A., Lyndon A. R., Austin B.: Novel non-motile phenotypes of *Yersinia ruckeri* suggest expansion of the current clonal complex theory. *J. Fish Dis.* 2011, 34, 311-317.
- Toback E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F., Chiers K.: *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 2007, 30, 257-268.

Adres autora: lek. wet. Joanna Pajdak, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn, e-mail: joanna.pajdak@uwm.edu.pl