

Aktualne problemy dotyczące zakażeń paciorkowcami u ryb

MAŁGORZATA BEDNARSKA, MICHAŁ BEDNARSKI*, RYSZARD POLECHOŃSKI

Zakład Limnologii i Rybactwa Katedry Higieny Zwierząt i Ichtiologii Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt UP,
ul. Chełmońskiego 38C, 51-630 Wrocław

*Katedra Epizootologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Bednarska M., Bednarski M., Polechoński R.

Current problems of streptococcal infections in fish

Summary

Streptococcal infections in fish cause high economic losses in the fish farming industry. The species responsible for the streptococcal infection are *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Vagococcus salmoninarum* and *Carnobacterium piscicola*. The main pathogenic species are *L. garvieae* and *S. iniae*. In some countries, also in European ones, in the summer season these two species cause more than 50% mortality in the rainbow trout industry. Lactococcosis is rapidly spreading throughout the southern part of Europe. Vaccination can be an effective procedure in the control of lactococcosis. The immunity after injection indicates a good level of protection but of short duration. Some of the species of *Streptococcus* pathogenic for fish are zoonotic agents. Of primary importance is *Streptococcus iniae* which can cause bacteremic cellulitis and osteomyelitis in humans.

Keywords: fish, *Streptococcus*, Lactococcosis

Pierwsze doniesienia na temat zakażeń paciorkowcami u ryb pochodzą sprzed 50 lat z Japonii (10, 14, 24). Od tego czasu drobnoustroje te są często izolowane od chorych ryb i stanowią poważny problem, zwłaszcza w hodowli pstrągów. Śmiertelność pstrągów w wyniku tych zakażeń może sięgać nawet 50%. W wielu rejonach świata: na terenie Europy Południowej, Azji Południowej, Australii oraz w Stanach Zjednoczonych drobnoustroje te są przyczyną znacznych strat ekonomicznych w hodowli ryb (2, 10, 13).

Taksonomia paciorkowców chorobotwórczych dla ryb

W ostatnich dwóch dekadach dzięki rozwojowi techniki biologii molekularnej, a zwłaszcza sekwencjonowaniu podjednostki 16S rRNA, dokonano reklasyfikacji gatunków paciorkowców. Zgodnie z obecną taksonomią wyróżnia się następujące gatunki patogene dla ryb: *Lactococcus garvieae* (dawna nazwa *Enterococcus seriolicida*), *Lactococcus piscium*, *Streptococcus iniae* (dawna nazwa *S. shiloi*), *Streptococcus agalactiae* (dawna nazwa *S. difficilis*, *S. difficile*), *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Vagococcus salmoninarum* i *Carnobacterium piscicola* (3, 7-9, 13, 17, 20, 25).

Z klinicznego punktu widzenia drobnoustroje te można podzielić na dwie grupy w zależności od zakresu temperatur wody, w jakich wywołują zachorowania

(19, 25). Do pierwszej grupy należą gatunki chorobotwórcze dla ryb słodkowodnych i słonowodnych, wywołujące choroby w temperaturze wody powyżej 15°C. Należą do nich *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*, *S. parauberis* oraz *Lactococcus garvieae* wywołujący laktokokozę (*lactococcosis*). Bakterie należące do tej grupy są również uważane za potencjalne czynniki zoonotyczne. Do drugiej grupy należą gatunki paciorkowców, które wywołują zachorowania w niższych temperaturach wody – poniżej 12°C. Należą do nich: *Vagococcus salmoninarum*, *Lactococcus piscium* oraz *Carnobacterium piscicola* (8, 13, 19, 25).

Spośród wymienionych bakterii najważniejsze znaczenie w patologii ryb odgrywają zakażenia wywołane przez *L. garvieae*, *S. iniae*, *S. agalactiae* i *V. salmoninarum* (8, 19).

Lactococcus garvieae

Po raz pierwszy *L. garvieae* został wyizolowany od pstrągów na początku lat 90. ubiegłego wieku w Hiszpanii (13, 26). Następnie drobnoustroj ten zidentyfikowano we Włoszech (cyt. 10). Od tego czasu zachorowania wywołane przez *L. garvieae* rozprzestrzeniły się na terenie południowej Europy, a także Wielkiej Brytanii i Turcji (2, 13). Natomiast w Japonii, również na początku lat 90., wyizolowano od węgorzy japońskich (*Anguilla japonicus*) i *Seriola quinqueradiata* nieznanego wcześniej gatunek paciorkowców, który wy-

woływał zachorowania o przebiegu identycznym do zakażeń wywołanych przez *L. garvieae*. Wyizolowany gatunek został nazwany *Enterococcus seriolicida* (17). Późniejsze szczegółowe badania porównawcze podjednostki 16S rRNA szczepów *Enterococcus seriolicida* pochodzących z Japonii i *Lactococcus garvieae* wykazały, że jest to ten sam gatunek (7). Od momentu pierwszego odkrycia rośnie liczba diagnozowanych przypadków laktokokozy, zarówno u gatunków ryb słodkowodnych, jak i morskich. W Europie laktokokoza występuje we Włoszech, Hiszpanii, Portugalii, Wielkiej Brytanii. Natomiast poza Europą zakażenia notowane są w Australii, Afryce Południowej, Izraelu, Japonii, Korei, Stanach Zjednoczonych i Turcji (4, 7-9). Zakażeniu *L. garvieae* ulegają głównie pstrągi tęczowe (*Oncorhynchus mykiss*), ale także inne gatunki ryb łososiowatych. Drobnoustrój ten izolowany był również od węgorzy japońskich (*Anguilla japonicus*), tilapii (*Oreochromis* sp.) i *Seriola quinqueradiata*. W Azji problem zakażeń *L. garvieae* dotyczy ponadto ryb słonowodnych – fląder (*Paralichthys olivaceus*) oraz gatunku *Sebastes schlegeli* utrzymywanego w hodowli (1, 15). Drobnoustrój ten izolowano również od krewetek słodkowodnych (*Macrobrachium rosenbergii*) na Tajwanie (5).

Objawy zakażenia. Najważniejszym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi choroby jest temperatura wody powyżej 15°C. Infekcje wywołane przez *L. garvieae* występują w okresie wysokich temperatur. W Europie w okresie letnim straty spowodowane przez laktokokozę w niektórych hodowlach pstrąga tęczowego sięgają ponad 50-60% (1, 4, 8, 13, 19, 25).

W przebiegu laktokokozy u ryb obserwowane są różnicowane objawy kliniczne. Zakażone ryby wykazują objawy letargu, utraty orientacji i zaburzeń w pływaniu, a także charakterystyczny obustronny wytrzeszcz gałek ocznych. Na pokrywach skrzelowych, skrzelach i gałce ocznej widoczne są wybroczyny. U zakażonych ryb występuje pociemnienie skóry oraz postępujące wychudzenie. Jelita, nerki, śledziona, wątroba i mózg są przekrwione. W przebiegu choroby może dojść do zapalenia opon mózgowych i mózgu (*meningoencephalitis*), krwotocznego zapalenia jelit, a niekiedy do posocznicy (1, 8, 13, 15, 26).

W zakażeniach doświadczalnych przeprowadzonych przez Kang i wsp. (15) na *Sebastes schlegeli*, z wykorzystaniem szczepów *L. garvieae* wyizolowanych w latach 1998-2001 od ryb słonowodnych w Korei i Japonii wykazano, że przebieg laktokokozy u ryb zależy w dużym stopniu od zjadliwości szczepu, która jest determinowana obecnością otoczki. Szczepy *L. garvieae* zawierające otoczkę powodowały masowe śniecia ryb. Śmiertelność ryb zakażonych szczepami otoczkowymi wyniosła od 60% do 100%. Natomiast w przypadku szczepów bezotoczkowych śmiertelność była istotnie niższa i wyniosła 20%.

Streptococcus iniae

Po raz pierwszy *S. iniae* wyizolowano w 1976 r. ze zmian skórnych delfina słodkowodnego *Inia geoffrensis*

zamieszkującego Amazonkę (21). W latach 80. ubiegłego wieku paciorkowiec ten był przyczyną wysokich strat w hodowli pstrąga tęczowego i tilapii w Izraelu, Japonii, Stanach Zjednoczonych i na Tajwanie (18).

Objawy zakażenia. Objawy wywołane przez *S. iniae* zależą w dużym stopniu od gatunku ryb. Zmiany skórne i nekrotyczne zapalenie mięśni szkieletowych występują u *Sciaenops ocellatus*, natomiast u pstrągów i u tilapii często w przebiegu choroby występuje zapalenie opon mózgowych i mózgu (*meningoencephalitis*) i zapalenie gałki ocznej (*panophthalmitis*). Zakażenie może również przebiegać u ryb bezobjawowo, np. u *Latex calcarifer* (18). Zakażone pstrągi wykazują objawy zbliżone do zakażeń wywołanych przez *L. garvieae*, w szczególności obustronny wytrzeszcz gałek ocznych i wodobrzusze. Jednak w przypadku zakażeń wywołanych przez *S. iniae* częściej występują objawy nerwowe, będące wynikiem zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (*meningitis*) lub zapalenia opon mózgowych i mózgu (*meningoencephalitis*). W przebiegu zakażenia może dochodzić do tworzenia się ropni w mózgu. Śmiertelność spowodowana zakażeniami wywołanymi przez *S. iniae* u pstrągów sięga do 50%, a u tilapii do 30% (6).

Vagococcus salmoninarum

Zakażenia *V. salmoninarum* w ostatnich latach stały się istotnym problemem w Europejskiej hodowli pstrągów. Drobnoustrój ten jest często izolowany z przypadków zachorowań na terenie Francji, Włoch i Hiszpanii. Zachorowania obserwowane są przy temperaturze wody 10-12°C. Choroba występuje u ryb dorosłych lub prawie dorosłych, o masie ciała powyżej 150-200 g. Szczególnie często obserwowana jest po tarle, zwłaszcza u samic. We Włoszech problem dotyka głównie hodowli na terenach górskich, powodując straty 15-20%. Śmiertelność może jednak być znacznie wyższa i sięgać nawet 20-50% (13, 23). Choroba ma najczęściej przebieg przewlekły. W jej wyniku dochodzi do bardzo silnego obustronnego wytrzeszczu gałek ocznych często z zapaleniem gałki ocznej (*panophthalmitis*), prowadzącego nawet do ich pęknięcia (13). W zakażeniach doświadczalnych obserwowano objawy letargu, anoreksji, pociemnienie skóry, wybroczyny przy podstawach płetw, w okolicy jamy gębowej, odbytu oraz na gałkach ocznych. U blisko 60% wystąpiło zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (*meningitis*), a u 16% zapalenie i martwica serca. Izolowane w ostatnim czasie szczepy *V. salmoninarum* wykazują znaczny wzrost oporności na chemioterapeutyki dopuszczone do stosowania w akwakulturze w krajach Unii Europejskiej (23).

Pozostałe gatunki paciorkowców

S. agalactiae początkowo został sklasyfikowany jako *S. difficile*. Późniejsze szczegółowe badania porównawcze podjednostek 16S rRNA obu gatunków nie wykazały żadnych różnic, a w konsekwencji zaklasyfikowano *S. difficile* do gatunku *S. agalactiae*. Opisany drobnoustrój może powodować wysoką zachorowalność i śmiertelność ryb słodkowodnych i morskich (16).

Przebieg i objawy zakażeń wywołanych przez gatunki: *S. agalactiae*, *S. parauberis*, *S. dysgalactiae* są podobne do laktokokozy, za wyjątkiem *S. dysgalactiae*, który dodatkowo powoduje zmiany nekrotyczne w okolicy przedogonowej zarówno przy zakażeniu naturalnym jak i doświadczalnym (19, 20).

Pozostałe gatunki paciorkowców nie odgrywają istotnej roli w patologii ryb hodowlanych.

Aspekt zoonotyczny i chorobotwórczość dla zwierząt stałocieplnych

Obecnie największe zagrożenie dla ludzi spośród omawianych gatunków stanowi *S. iniae*. Był on izolowany z kilku przypadków poważnych zakażeń u ludzi na skutek zranień powstałych w wyniku obróbki ryb słodkowodnych (najczęściej tilapii). W ostatnich 15 latach opisano 15 przypadków wystąpienia infekcji *S. iniae* u ludzi. W wyniku zakażenia obserwowano zapalenie tkanki podskórnej (*cellulitis*). W pojedynczych przypadkach wystąpiło zapalenie stawów lub zapalenie kości i szpiku (*osteomyelitis*), a w jednym zapaleniu opon mózgowych i mięśnia sercowego. Przypuszcza się, że znaczna część przypadków (zwłaszcza zakażeń miejscowych na tle *S. iniae*) nie jest diagnozowana, ponieważ w przebiegu klinicznym są zbliżone do zapaleń tkanki podskórnej na tle innych drobnoustrojów, jak *S. aureus*, *S. pyogenes*, i innych gatunków paciorkowców β -hemolitycznych. Problem może szczególnie dotyczyć mieszkańców Azji, którzy częściej we własnym zakresie dokonują obróbki świeżych ryb (11, 18). *Lactococcus garvieae* jest niezwykle rzadko izolowany od ludzi. Wszystkie przypadki dotyczyły pacjentów z zapaleniem mięśnia sercowego, nie zostało jednak ustalone źródło zakażenia. Drobnoustrój ten był także izolowany z przypadków zapalenia wymienia (*mastitis*) u bawołów i krów (12).

Metody zwalczania. W związku z obserwowanym wzrostem zachorowań ryb na tle zakażeń paciorkowcami, a także rosnącą antybiotykoopornością szczepów prowadzone są badania nad wprowadzeniem szczepień ochronnych przeciwko *L. garvieae*, *S. iniae* i *S. parauberis*. Dobre wyniki otrzymano po dootrzewnowym podaniu szczepionek inaktywowanych formaliną. Jednorazowe szczepienia dawały skuteczną ochronę ryb przez okres 3-4 miesięcy. Jednak czas ochronnego działania szczepień nie gwarantował ochrony przez cały okres wysokich temperatur wody (powyżej 16°C), np. krajach Europy Południowej. Wysoka skuteczność szczepień, jednak ograniczona w czasie, wymuszała zastosowanie dawki przypominającej, która była podana *per os*. Zastosowane szczepienia bezotoczkowe *L. garvieae* nie dawały wystarczającej ochrony przed zakażeniem szczepami otoczkowymi. Wprowadzenie do szczepionek adjuwantów pozwoliło na uzyskanie ochrony przez okres 6-8 miesięcy (22).

Piśmiennictwo

1. Baeck G. W., Kim J. H., Gomez D. K., Park S. Ch.: Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. J. Vet. Sci. 2006, 7, 53-58.

- Bark S., McGregor D.: The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. Trout News 2001, 31, 9-11.
- Berridge B. R., Bercovier H., Frelief P.F.: *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. Vet. Microbiol. 2001, 78, 165-173.
- Cagirhan H.: Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. J. Fisheries Aquatic Sci. 2004, 21, 267-269.
- Chen S.-C., Lin Y.-D., Liaw L.-L., Wang P.-C.: *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis. Aquat. Org. 2001, 45, 45-52.
- Eldar A., Bejerano Y., Livoff A., Horovitz A., Bercovier H.: Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. Vet. Microbiol. 1995, 43, 33-40.
- Eldar A., Ghittino C., Asanta L., Bozzetta E., Goria M., Prearo M., Bercovier H.: *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. Curr. Microbiol. 1996, 32, 85-88.
- Eldar A., Ghittino C.: *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis. Aquat. Org. 1999, 36, 227-231.
- Eldar A., Goria M., Ghittino C., Zlotkin A., Bercovier H.: Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. Appl. Environ. Microbiol. 1999a, 65, 1005-1008.
- Eyngor M., Zlotkin A., Ghittino C., Prearo M., Douet D.-G., Chilmoneczek S., Eldar A.: Clonality and Diversity of Fish Pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 5132-5137.
- Facklam R., Elliott J., Shewmaker L., Reingold A.: Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 933-937.
- Fejer J. J., Ratzan K. R., Sharp S. E., Saiz E.: *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of case and review of the literature. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1998, 32, 127-130.
- Ghittino C., Latini M., Agnetti F., Panziera C., Lauro L., Ciappelloni R., Petracca G.: Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. Vet. Res. Commun. 2003, 27, 471-479.
- Hoshina T.: An epidemic diseases affecting rainbow trout in Japan. J. Tokyo Univ. Fish 1956, 42, 35-46.
- Kang S.-H., Shin G.-W., Shin Y.-S., Palaksha K. J., Kim Y.-R., Yang H.-H., Lee E.-Y., Lee E.-G., Huh N.-E., Ju O. M., Jung T.-S.: Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). J. Vet. Sci. 2004, 5, 387-390.
- Kawamura Y., Itoh Y., Mishima N., Ohkusu K., Kasai H., Ezaki T.: High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar et al. 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005, 55, 961-965.
- Kusada R., Kawai K., Salati F., Banner C. R., Fryer J. L.: *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol. 1991, 41, 406-409.
- Lau S. K. P., Woo P. C. Y., Tse H., Leung K.-W., Wong S. S. Y., Yuen K.-Y.: Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 1004-1009.
- Mata A. I., Gibello A., Casamayor A., Blanco M. M., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J. F.: Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water *Streptococcosis* in fish. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 3183-3187.
- Nomoto R., Munasinghe L. I., Jin D. H., Shimahara Y., Yasuda H., Nakamura A., Misawa N., Itami T., Yoshida T.: Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. J. Fish Dis. 2004, 12, 679-686.
- Peir G. B., Madin S. H.: *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1976, 26, 545-553.
- Ravelo C., Magarinos B., Herrero C. M., Costa L., Toranzo A. E., Romalde J. L.: Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 2006, 251, 153-158.
- Ruiz-Zaruela I., de Bias I., Girones O., Ghittino C., Muazquiz J. L.: Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), broodstocks: characterization of the pathogen. Vet. Res. Commun. 2005, 7, 553-562.
- Teixeira L. M., Merquior V. L. C., Vianini M. C. E., Carvalho M. G. S., Fracalanza S. E. L., Steigerwalt A. G., Brenner D. J., Facklam R. R.: Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1996, 46, 664-668.
- Toranzo A. E., Magarinos B., Romalde J. L.: A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 2005, 246, 37-61.
- Vela A. I., Vazquez J., Gibello A., Blanco M. M., Moreno M. A., Liebana P., Albendea C., Alcalá B., Mendez A., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J. F.: Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. J. Clin. Microbiol. 2000, 38, 3791-3795.

Adres autora: lek. wet. Małgorzata Bednarska, ul. Chelmońskiego 38C, 51-630 Wrocław; e-mail: m.bednarska@poczta.onet.pl