

Jersinioza ryb łososiowatych – charakterystyka czynnika etiologicznego i metody jego identyfikacji

AGNIESZKA PĘKALA, JERZY ANTYCHOWICZ

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Pękala A., Antychowicz J.

Yersiniosis of salmonids: characteristic etiological factors and methods of its identification

Summary

Yersinia ruckeri, a Gram-negative rod belonging to Enterobacteriaceae family, genus *Yersinia*, is a causative agent of yersiniosis of salmonids. The size of the active growth cells are $0.75 \times 1.0 \mu\text{m} - 3 \mu\text{m}$. The presence of flagella are connected with motile ability but non motile bacterium are isolated more frequently. The biochemical characteristics of *Y. ruckeri* strains are rather homogenous. *Y. ruckeri* rods in in vitro examination are characterized as quite sensitive to medicines. All of the Polish isolates were sensitive to oxytetracycline, flumequine and enrofloxacin. Classical bacteriological methods are mainly used for the diagnostics of yersiniosis. Tryptone soya agar or 5% blood agar are carried out for the isolation of the microorganism. Selective and facultative mediums such as Furones medium, ROD or Waltman-Shotts media are also used. Identification of the isolated strains is performed by the characteristics of their biochemical properties, after which an analysis of the obtained profiles is done. Commercial API 20E kits are used in the examination of biochemical characteristic of the isolates but it is necessary for the results of the identification to be always supplemented by complementary tests. The plate agglutination test and PCR are carried out as a confirmation of identification of *Y. ruckeri* rods. This last method, on account of its high sensitivity, is useful in the detection of asymptomatic carriers of bacterium *Y. ruckeri*.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, salmonids, taxonomy, diagnostic

Jersinioza (ERM-Enteric redmouth) jest jedną z najgroźniejszych chorób pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*), wywoływaną przez Gram-ujemne pałeczki *Yersinia ruckeri*, należące do rodziny Enterobacteriaceae (3, 4). Szacuje się, że w Polsce i na świecie straty w hodowlach pstrągów wywołane infekcją *Y. ruckeri* mogą wynosić 30-45%, a nawet dochodzić do 70% obsady (14). Diagnostyka jersiniozy opiera się głównie na izolacji drobnoustroju, a następnie jego identyfikacji przy użyciu metod biochemicznych. W badaniach laboratoryjnych wykorzystywane są również metody serologiczne oraz molekularne. W niniejszym opracowaniu przedstawiona jest charakterystyka bakterii *Y. ruckeri* oraz metody ich identyfikacji, z uwzględnieniem wyników najnowszych badań światowych i własnych.

Taksonomia bakterii *Y. ruckeri*

Y. ruckeri po raz pierwszy wyizolowano w 1955 r. od chorych pstrągów tęczowych w miejscowości Hagerman w stanie Idaho (USA) (25). Na podstawie morfologii bakterie zostały zakwalifikowane do rodziny Enterobacteriaceae (24). Dostępne wówczas metody badawcze nie pozwalały na jednoznaczną klasyfikację pałeczek *Y. ruckeri* do określonego rodzaju w obrębie

wskazanej rodziny. Dopiero późniejsze badania, oparte o procentową zawartość kompleksu guaniny z cytozyną (G + C) w genomowym DNA, posłużyły do klasyfikacji taksonomicznej tych bakterii (9). Badane szczepy zawierały od 47,5 do 48 mol % G + C (9, 12), co różniło je od bakterii z rodzaju *Serratia* (52-60 mol % G + C), a przybliżyło do rodzaju *Yersinia* (46-50 mol % G + C). Niektórzy badacze wykazywali jednak większe fenotypowe podobieństwo *Y. ruckeri* do *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* niż do należących do tego samego rodzaju *Y. enterocolitica* czy *Y. pseudotuberculosis* (13). Badania przeprowadzone w ostatnich latach, oparte na analizie filogenetycznej sekwencji DNA fragmentu 16S rRNA wykazały, że *Y. ruckeri*, choć tworzy wyraźnie odrębną grupę w obrębie rodzaju *Yersinia*, wykazuje jednak wysoki stopień pokrewieństwa z innymi gatunkami bakterii z tego rodzaju (15). W opracowaniu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology *Y. ruckeri* wciąż pozostaje zaliczona do rodzaju *Yersinia* (4).

Charakterystyka bakterii *Y. ruckeri*

Y. ruckeri jest Gram-ujemną pałeczką o wymiarach aktywnie rosnących komórek $0,75 \times 1,0-3 \mu\text{m}$ (4, 24). Bakterie nie wytwarzają form przetrwalnikowych ani

otoczek, zazwyczaj zaopatrzone są w 7-8 wici ułożonych peritrichalnie (24), co wiąże się z ich zdolnością ruchu. Coraz częściej izoluje się jednak nieruchliwe szczepy. Opisano je w Wielkiej Brytanii, gdzie stanowiły aż 90% wszystkich wyosobnionych izolatów. Podobne dane pochodzą z Niemczech i Norwegii (8, 16). Nie wykazujące ruchu pałeczki *Y. ruckeri* izolowano również w Polsce (18) i, jak wykazały badania autorów, są one dominujące, stanowiąc prawie 75% izolowanych *Y. ruckeri* (21).

Bakterie *Y. ruckeri* charakteryzują się dość jednorodnymi profilami biochemicznymi, a ewentualne różnice mogą dotyczyć reakcji

Voges-Proskauera, dekarboksylacji lizyny, wykorzystania cytrynianu, hydrolizy argininy, hydrolizy Tweenu 80, hydrolizy żelatyny oraz reakcji z czerwienią metylową (18, 21, 28). Charakterystykę biochemiczną polskich izolatów *Yersinia ruckeri* przedstawiono w tab. 1 (21).

W badaniach *in vitro* pałeczki *Y. ruckeri* charakteryzują się dużą wrażliwością na działanie chemioterapeutyków. Oznaczenia najniższej koncentracji poszczególnych leków inaktywujących 100% izolatów wykazały, że najskuteczniej działają, w kolejności: kwas nalidoksoowy, oksytetracyklina, gentamycyna, nitrofurantoina, tetracyklina, neomycyna, chlortetracyklina, erytromycyna i furazolidon (6). Badania własne autorki przeprowadzone na polskich izolatach *Y. ruckeri* wykazały ich wrażliwość na działanie oksytetracykliny, flumechiny i enrofloksacyny (20, 21). Doświadczenia przeprowadzone przez Rigos i Stevenson (22), którzy zastosowali u pstrągów tęczowych zakażonych izolatami *Y. ruckeri* należącymi do serotypu drugiego,

terapię antybiotykową opartą o oksytetracyklinę, dały z kolei odmienne wyniki. Wskazywały one na nieskuteczność tego antybiotyku w leczeniu jersiniozy. Występujące w Polsce izolaty *Y. ruckeri* charakteryzowały się ponadto wysoką wrażliwością na działanie sulfonamidów potencjonowanych trimetoprimem (21), co zgodne było z wynikami badań lekowrażliwości kanadyjskich i angielskich izolatów *Y. ruckeri* (5, 30). Dodatkowo wykazano, że 80% polskich izolatów tej bakterii wrażliwych jest na działanie popularnego w leczeniu jersiniozy kwasu oksolinowego (21).

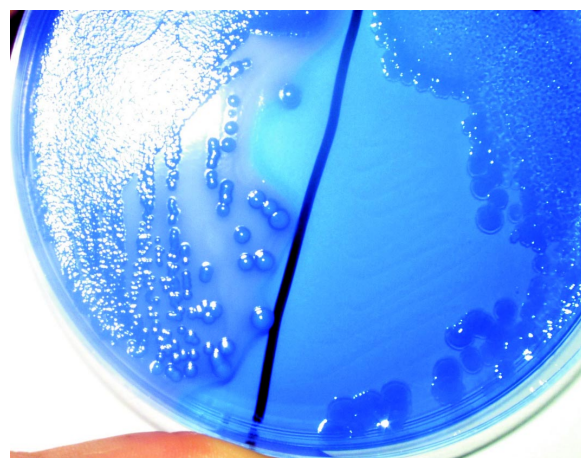
Diagnostyka bakterii *Y. ruckeri*

Izolacja. Izolację pałeczek *Y. ruckeri* przeprowadza się na agarze tryptozowo-sojowym lub agarze wzbogaconym 5% krwią. Po 48-godzinnej inkubacji w $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ rozwijają się okrągłe, białe-kremowe, lekko wzniesione, błyszczące kolonie o średnicy 2-3 mm (17, 18, 21, 28). W celu usprawnienia diagnostyki jersiniozy opracowano również podłoża selektywne oraz wybiórcze, takie jak podłoże Waltman-Shotts (31), podłoże wg Furones (10) oraz podłoże ROD (23). W rutynowych badaniach najczęściej stosowane jest podłoże wg Furones, które pozwala na różnicowanie patogennych i niepatogennych izolatów *Y. ruckeri* (17, 21). Po 48-72-godzinnej inkubacji w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, izolaty chorobotwórcze przybierają barwę ciemnoniebieską z kremowym środkiem oraz wytwarzają dyfundującą do podłoża strefę precypitacji wokół kolonii. Izolaty niechorobotwórcze są jasnoniebieskie i nie wytwarzają strefy precypitacji wokół kolonii (17, 21) (ryc. 1).

Identyfikacja biochemiczna. Podstawowa identyfikacja bakterii opiera się na analizie profilu biochemicznych badanych izolatów. W badaniach laboratoryjnych wykorzystywane są z powodzeniem komercyjne zestawy API 20E

Tab. 1. Charakterystyka profili biochemicznych polskich izolatów *Y. ruckeri*

Test	Wyniki dodatnie badanych izolatów	
	liczba	%
Zdolność ruchu	32	25,4
Hydroliza Tween 80	30	23,8
Hydroliza kazeiny	105	83,3
Wytwarzanie kwasu z glicerolu	126	100
Wytwarzanie kwasu z ksylozy	0	0
Wytwarzanie gazu z glukozy	0	0
Oksydaza	0	0
Katalaza	126	100
(O/F test)	126	100
M - R test	126	100
β -galaktozydaza (ONPG)	120	95,2
Dwuhydrolaza argininy	0	0
Dekarboksylaza lizyny	106	84,1
Dekarboksylaza ornityny	126	100
Wykorzystanie cytrynianu	84	66,6
Wytwarzanie H_2S	0	0
Wytwarzanie ureazy	0	0
Deaminaza tryptofanu	0	0
Wytwarzanie indolu	0	0
Reakcja Voges-Proskauera	87	69
Hydroliza żelatyny	85	67,5
Wytwarzanie kwasu z:		
glukozy	126	100
mannitolu	126	100
inozytolu	0	0
sorbitolu	8	6,3
ramnozy	0	0
sacharozy	0	0
melibiozy	0	0
amygdaliny	0	0
arabinozy	0	0
Redukacja NO_3	126	100



Ryc. 1. Hodowla bakterii *Y. ruckeri* po 96-godzinnej inkubacji w 25°C na podłożu wg Furones; po lewej stronie – izolat chorobotwórczy z charakterystyczną strefą precypitacji wokół kolonii, po prawej stronie izolat niechorobotwórczy (fot. Agnieszka Pękala)

firmy BioMerieux. Ze uwagi na główne przeznaczenie tych testów, jakim jest identyfikacja ludzkich patogenów, bakterie *Y. ruckeri* prawie zawsze rozpoznawane są jako *Hafnia alvei* (3, 17, 21). W celu uniknięcia błędnej identyfikacji niezbędne jest uzupełnienie badań biochemicznych o testy komplementarne, takie jak: wytwarzanie kwasu z ksylozy, a także wytwarzanie gazu z glikozy. *Hafnia alvei*, w przeciwieństwie do *Y. ruckeri*, wykazuje wszystkie reakcje dodatnie w wyżej wymienionych testach (17, 21).

Identyfikacja serologiczna. Niewielki stopień zróżnicowania antygenowego w obrębie gatunku *Y. ruckeri* sprawia, że badania serologiczne są bardzo przydatne w identyfikacji tych bakterii (7, 19, 27). Najpopularniejszym testem, wykorzystywanym tak w diagnostyce różnicowej, jak i potwierdzającej, jest test aglutynacji płytkowej (3, 17). Do wykonania oznaczenia używane są surowice odpornościowe rozcieńczone w odstępach logarytmicznym, w zakresie od 1 : 20 do 1 : 2560 (21). Wyniki testu odczytywane są po 24-godzinnej inkubacji w 37°C, porównując miano aglutynacji badanych izolatów do miana aglutynacji szczepu referencyjnego z surowicą homologiczną (21).

Identyfikacja metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Techniki oparte o metody biologii molekularnej, w tym cyklicznej amplifikacji fragmentu DNA (PCR), znalazły zastosowanie w diagnostyce chorób zakaźnych, między innymi jersiniozy (2, 26, 29). Zastosowanie specyficznych starterów umożliwia wykrycie klinicznych przypadków jersiniozy, zakażeń eksperymentalnych, a nawet nosicielstwa bakterii (11). Kluczowe znaczenie ma przy tym ustalenie progu wykrywalności dla bakterii *Y. ruckeri*. Gibello i wsp. (11) byli w stanie wykryć $6,5 \times 10^2$ komórek bakterii/ml. Zastosowanie tych samych par starterów przez Taylor i Winton (29) umożliwiło wykrycie $2,8 \times 10^5$ komórek bakterii/ml. W badaniach własnych autorka, wykorzystując startery opisane przez Altinok i wsp. (1) umożliwiające powielenie fragmentu DNA regionu konserwatywnego małej podjednostki (16S) rybosomalnego RNA, ustaliła próg wykrywalności na 5×10^2 komórek bakterii/ml (21).

Podsumowanie

Pałeczki *Yersinia ruckeri*, choć zidentyfikowane i scharakteryzowane przeszło pół wieku temu, wciąż są tematem wielu badań, zarówno dotyczących taksonomii (4, 9, 12, 13, 15, 24, 25), jak i metod identyfikacji. Te ostatnie zagadnienia są niezwykle ważne wobec nasilających się w ostatnich latach zarówno w kraju, jak i na świecie (14) problemów zdrowotnych ryb łososiowych, związanych właśnie z zachorowaniami na jersiniozę. Powoduje to potrzebę głębszego zapoznania się z charakterystyką bakterii wywołującej tę chorobę, jak i metodami jej diagnostyki.

Piśmiennictwo

- Altinok I., Grizzle J. M., Liu Z.: Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* 2001, 44, 29-34.
- Argenton F., De Mas S., Malocco C., Dalla Valle L., Giorgetti G., Colombo L.: Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for

- hybridization tests and PCR-based diagnosis of *Yersinia ruckeri*. *Dis. Aquat. Org.* 1996, 24, 121-127.
- Austin B., Austin A.: Bacterial fish pathogens. Diseases of fish farmed and wild fish. Praxis Publishing, Chichester, UK 2007, 111-112.
- Bottone E. J., Bercovier H., Mollaret H. H.: Genus. XLI. *Yersinia* van Loghem 1944, 15^{AL}. [w:] Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. (wyd.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. t. 2, cz. B, Springer-Verlag, New York 2005, 838-848.
- Bullock G. L., Mastrone G., Starliper C., Schill B.: Potentiated sulfonamide therapy of enteric redmouth disease. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1983, 40, 101-102.
- Ceschia G., Giorgetti G., Bertoldini G., Fontebasso S.: The in vitro sensitivity of *Yersinia ruckeri* to specific antibiotics. *J. Fish Dis.* 1987, 10, 65-67.
- Daly J. G., Lindvik B., Stevenson R. M. W.: Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Columbia. *Dis. Aquat. Org.* 1986, 1, 151-153.
- Davies R. L., Frerichs G. N.: Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J. Fish Dis.* 1989, 12, 357-365.
- Ewing E. W., Ross A. J., Brenner D. J., Fanning G. R.: *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1978, 28, 37-44.
- Furones M. D., Gilpin M. L., Munn C. B.: Culture media for the differentiation of isolate *Yersinia ruckeri*, based on detection of a virulence factor. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, 74, 360-366.
- Gibello A., Blanco M. M., Moreno M. A., Cutuli M. T., Doménech A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J. F.: Development of PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 346-350.
- Grandis S. A. de, Krell P. J., Flett D. E., Stevenson R. M. W.: Deoxyribonucleic acid relatedness of serovars of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988, 38, 4995-5008.
- Green M., Austin B.: The identification of *Yersinia ruckeri* and its relationship to other representatives of the Enterobacteriaceae. *Aquaculture* 1982, 34, 185-192.
- Horne M. T., Barnes A. C.: Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*), [w:] Woo P. T. K., Bruno D. W. (wyd.): *Fish diseases and disorders, viral, bacterial and fungal infections*. T. 3, Cabi Publishing, Wallingford 1999, 455-477.
- Ibrahim A., Goebel B. M., Liesack W., Griffiths M., Stackedrandt E.: The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993, 114, 173-178.
- Klein B. U., Kleingeld D. W., Böhm K. H.: First isolation of a non-motile/Tween 80 negative *Yersinia ruckeri* strain in Germany. *Bull. Europ. Ass. Fish Pathol.* 1994, 14, 165-166.
- Kozińska A., Guz L., Pękala A.: Diagnostyka wybranych patogenów bakteryjnych w ichtiopatologii. Państwowy Instytut Weterynaryjny 2002, 66-71.
- Kozińska A., Pękala A.: Występowanie *Yersinia ruckeri* u ryb łososiowatych w Polsce i fenotypowa charakterystyka izolatów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 880-882.
- O'Leary P. J.: Enteric redmouth of salmonids: A biochemical and serological comparison of selected isolates. Praca magisterska, Oregon State University 1977.
- Pękala A.: Bakterie najczęściej izolowane od pstrągów i ich wrażliwość na wybrane chemioterapeutyki. XII Kongres PTNW, Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004, s. 402.
- Pękala A.: Charakterystyka fenotypowa i genotypowa krajowych izolatów *Yersinia ruckeri* w aspekcie ich patogenności dla ryb. Praca doktorska, Zakład Chorób Ryb, PIWet-PIB, Puławy 2008.
- Rigos G., Stevenson R.: The effect of antibiotic treatment on the establishment of persistent infection with *Yersinia ruckeri* Serovar II in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Internat.* 2001, 9, 247-253.
- Rodgers C. J.: Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. *J. Fish Dis.* 1992, 15, 243-254.
- Ross A. J., Rucker R. R., Ewing W. H.: Description of a bacterium associated with redmouth diseases of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.* 1966, 12, 763-770.
- Rucker R. R.: Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Internat. Off. Epizoot.* 1966, 65, 825-830.
- Sakai T., Oseko N., Iida T.: Rapid and simple method for the detection of *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease. *Fish Pathol.* 2006, 41, 127-130.
- Stevenson R. M. W., Airdrie D. E.: Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *J. Fish Dis.* 1984, 7, 247-254.
- Stevenson R. M. W., Flett D., Raymond B. T.: Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections of fish. Rozdział 5, [w:] Inglis V., Roberts R. J., Bromage N. R. (wyd.) *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993, 80-105.
- Taylor P. W., Winton J. R.: Optimization of nested polymerase chain reaction assay for identification of *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* and *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Aquat. Anim. Health* 2002, 14, 216-224.
- Treves-Brown K. M.: *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Holandia 2000.
- Waltman W. D., Shotts E. B.: A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1984, 41, 804-806.

Adres autora: dr Agnieszka Pękala, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: A.Pekala@piwet.pulawy.pl