

## AEROMONASNA BAKTERIJEMIJA MLAĐI KALIFORNIJSKE PASTRVE (*ONCORHYNCHUS MYKISS*), OSJETLJIVOST PREMA ANTIMIKROBNIM TVARIMA

D. Kapetanović, E. Teskeredžić

### Sažetak

*Aeromonas hydrophila* i druge bakterije roda *Aeromonas* ubikvitarne su u vodenom okolišu i dio su normalne bakteriološke flore mladi kalifornijske pastrve. Infekcije uzrokovane tim bakterijama registrirane su u mnogim zemljama svijeta. U ovom su radu prikazana naša iskustva i spoznaje s aeromonasnom bakterijemijom, kao uzrokom uginuća mladi kalifornijske pastrve. U studenome 2003. pastrvska mlad u dobi od 7 mjeseci počela je iznenada ugibati. U Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture dostavljeno je 17 uzoraka riba, uginulih i moribundnih pastrvica, koje su odmah i pregledane.

Primjenom Api 20 NE testova identificiran je *Aeromonas hydrophila* / *caviae* tip I s 99,9 % točnosti (1 test protiv), odnosno *Aeromonas hydrophila* / *caviae* tip II s 99,5 % točnosti (1 test protiv) iz uzoraka uzetih iz jetre, slezene, bubrega, crijeva i očnih lezija. Svi izolirani i identificirani sojevi testirani su na osjetljivost prema antibioticima disk difuzijskom metodom. Utvrđena je najveća osjetljivost na flumekvin, a relativno slabija prema kloramfenikolu i enrofloksacinu. Liječenje je uspješno provedeno Flubactinom®.

Ključne riječi: kalifornijska pastrva, *Aeromonas hydrophila* / *caviae*.

### UVOD

Pripadnici roda *Aeromonas* gram–negativne su štapičaste bakterije, oksidaza–pozitivne i fakultativno anaerobne, te fermentiraju glukozu. Ubikvitarne su bakterije u vodenom okolišu i čine dio normalne bakterijske flore mladi kalifornijske pastrve (Kapetanović i Teskeredžić, 2003). Infekcije uzrokovane vrstama roda *Aeromonas* registrirane su u mnogim zemljama u svijetu (Austin i Austin, 1999). Patološke promjene kao posljedica infekcije uključuju ulceracije na koži, gnjiljenje repa i peraja, ulceracije oka, eritroder-

---

Damir Kapetanović, dr. vet. med., dr. sc. Emin Teskeredžić, znanstveni savjetnik, Institut Ruder Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska, e–mail: kada@irb.hr

matitis, hemoragične septikemije, bolest izbočenih ljustica (Cipriano i sur., 2001). Akutni se oblik može očitovati u obliku fatalne septikemije čiji su uzročnici *Aeromonas hydrophila* i *Aeromonas caviae*. Tijek infekcije toliko je brz da riba uginu prije razvoja kompletne bolesti, izuzevši nekoliko znakova bolesti. Kada su klinički znakovi infekcije prisutni, zaražene ribe pokazuju egzoftalmus i crvenilo kože. Abdomen može biti nadut, škrge hemoragične, a po koži se razvijaju čirevi (Austin i Austin, 1999). Zabilježeno je nekoliko slučajeva patoloških promjena na oku kao posljedica aeromonasne septikemije. Najprije bude zahvaćeno jedno oko, proces se proširi na drugo oko, nakon čega nastane puknuće orbite koje uzrokuje sljepoću i smrt (Cipriano i sur., 2001).

Sistemne su infekcije karakterizirane difuznom nekrozom u nekoliko unutrašnjih organa. Jetra i bubreg ciljni su organi akutne septikemije. Jetra može postati blijeda ili zeleno obojena, a bubreg može biti natečen i prhak. Slezena i srce nisu nužno oštećeni. Crijeva i želudac često su natečeni, upaljeni i hemoragični i mogu se izbočiti iz abdomena. Crijevo ne sadrži hranu, a može biti ispunjeno žučkastim mukoznim sadržajem (Cipriano i sur., 2001).

Budući da je riječ o bakteriji koja čini dio normalne mikroflore mladi kalifornijske pastrve, pojava bolesti označuje uvjetnu infekciju (Kapetanović i Teskeredžić, 2003). Zabilježena je osjetljivost uzročnika aeromonasne bakterijemije prema kloramfenikolu, florfenikolu, tetraciklinima, sulfonamidima i nitrofuranim (Cipriano i sur., 2001).

Cilj našeg rada bio je postavljanje etiološke dijagnoze izolacijom i biokemijskom tipizacijom uzročnika bolesti, te utvrđivanje njegove osjetljivosti na antibiotike.

## MATERIJAL I METODE

### Uzorci

U Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture Instituta »Ruder Bošković« u Zagrebu dostavljeno je 17 uzoraka mladi kalifornijske pastrve, uginulih i moribundnih pastrvica, prosječne mase 12,5 g i dužine 10,7 cm.

### Bakteriološka pretraga

Uzorci za bakteriološku pretragu uzimani su iz jetre, slezene, bubrega, kao i iz promjena na oku i upalnoga crijevnoga sadržaja. Užarenom bakteriološkom lopaticom spaljena je površina organa, a zatim je bakteriološkom ušicom uzet uzorak iz unutrašnjosti organa.

Za izolaciju je rabljen Tryptic soy agar (BBL). Nakon naciepljivanja na agar, materijal je stavljen u termostat na 22 °C na inkubaciju, tijekom 48–72 sata. Nakon inkubacije izrasle su kolonije precijepljene na nove podloge radi dobivanja čiste kulture. Purificirane bakterijske kolonije pregledane su makroskopski, razmazi su obojeni po Gramu, a identifikacija je provedena na temelju rezultata API 20 NE testova (bioMérieux, France).

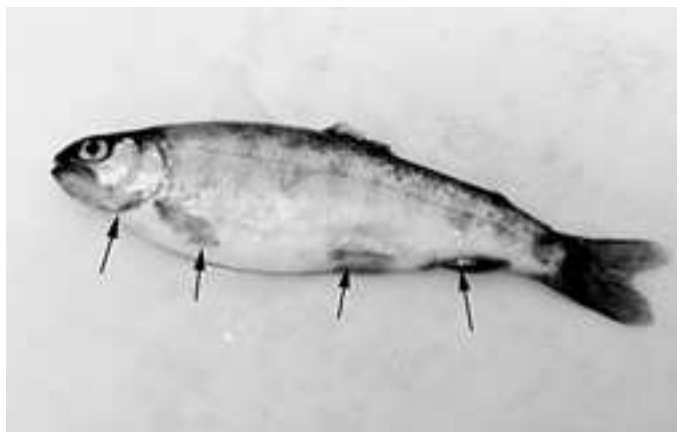
Testirana je osjetljivost svih izoliranih i identificiranih sojeva na antibiotike disk difuzijskom metodom (Naglić i sur., 1992). Upotrijebljeni su diskovi proizvođača BD–BBL: ampicilin (AM<sub>10</sub>), chloramphenicol (C<sub>30</sub>), enrofloxacin (ENO<sub>5</sub>), erythromycin (E<sub>15</sub>), flumequin (AR<sub>30</sub>), nitrofurantion (F/M<sub>300</sub>), norfloxacin (NOR<sub>10</sub>), novobiocin (NB<sub>5</sub>), oxytetracycline (T<sub>30</sub>), penicilin (P<sub>10</sub>), piperacilin (PIP<sub>100</sub>), sulfamethoxazole + trimethoprim (SXT), tetracycline (TE<sub>30</sub>) i trimethoprim (TMP<sub>5</sub>).

## REZULTATI

Kliničkom su pretragom utvrđena krvarenja po škržnim poklopcima, osnovi peraja i anusu, kao i bljedilo škrge (Slika 1). Od 17 pastrva, jedna nije imala jedno oko, a jedna je bila bez oba oka (Slika 2). Abdomen je bio proširen, a na pritisak iz anusa je izlazio tekući sadržaj.

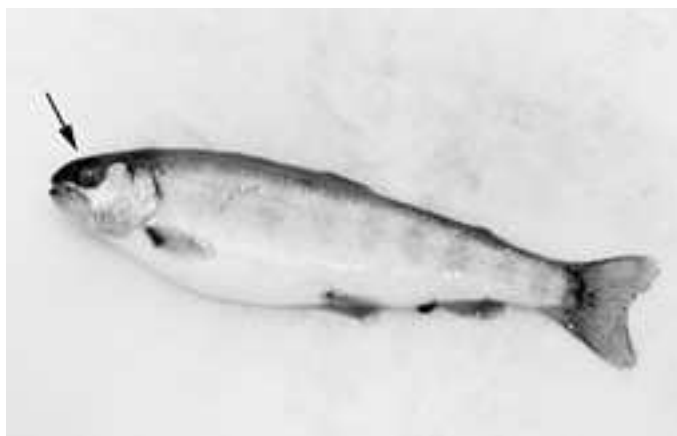
*Sl. 1. Aeromonasna bakterijemija: krvarenja po škržnom poklopcu, osnovi peraja, oko anusa i korijenu repa*

*Fig. 1. Aeromonadae bacteraemia: haemorrhagiae on the opercular area, at base of fins, around anus and at the base of tail.*



*Sl. 2. Aeromonasna bakterijemija: lezije na oku*

*Fig. 2. Aeromonadae bacteraemia: eye damage.*





*Sl. 3. Aeromonasna bakterijemija: gastroenteritis (želudac ispunjen tekućinom i zrakom)*

*Fig. 3. Aeromonadae bacteraemia: gastro-enteritis (gaster fulfil with liquid and air).*

Patoanatomski, uočeni su ascites i izrazito blijeda jetra. U nekih je riba bubreg bio povećan. U želucu se nalazio tekući sadržaj pomiješan s plinom, a crijeva zahvaćena enteritisom bila su djelomično ispunjena žućkastom tekućinom (Slika 3). U dviju riba utvrđena je prisutnost hrane.

Bakteriološkom pretragom jetre, slezene i bubrega, kao i iz promjena na očima i iz upalnoga crijevnog sadržaja izolirane su okrugle, prozirne, bjeličaste, glatke, uzdignute kolonije promjera 0,5–2 mm.

Promatranjem pod mikroskopom razmaza obojenih po Gramu uočene su gram–negativne štapićaste bakterije.

Na osnovi pozitivnih reakcija na oksidazu, uzročnik je identificiran primjenom API 20 NE testa. Biokemijske aktivnosti izolata utvrđene API 20 NE sistemom sumirane su u Tablici 1. Oba tipa izoliranih uzročnika odgovaraju za *Aeromonas hydrophila / caviae*, s tom razlikom da je točnost tipa *A. hydrophila / caviae* tipa I iznosila 99,9 % (1 test protiv), a *A. hydrophila / caviae* tipa II točnost je bila 99,5 % (1 test protiv).

Rezultati ispitivanja osjetljivosti na djelovanje antimikrobnih tvari obaju tipova *A. hydrophila / caviae* prezentirani su u Tablici 2.

## RASPRAVA

Klinički znakovi oboljelih kalifornijskih pastrva utvrđeni prigodom pretrage odgovaraju onima već opisanima kao posljedica patogenoga djelovanja *Aeromonas hydrophila / caviae* (Austin i Austin, 1999; Cipriano i sur., 2001).

Svi izolati iz uzoraka uzetih za bakteriološku pretragu pripadaju skupini *A. hydrophila / caviae*, a to su potvrdili API 20 NE testovi ispitivanja biokemijskih svojstava izoliranih bakterija. Sistem API 20 NE upotrijebljen je za brzo određivanje profila dobivenih izolata. Izolati su dobiveni iz različitih organa oboljelih riba.

Tablica 1. Rezultati API 20 NE testova

Table 1. Results of API 20 NE tests.

Testovi / Tests	<i>A. hydrophila/caviae</i>	
	type I	type II
NO <sub>3</sub> — Nitrate reduction	+	+
TRP — Indole production	+	+
GLU — Acidification	+	+
ADH — Arginine dihydrolase	+	–
URE — Urease	–	–
ESC — Hydrolysis ( $\beta$ -glucosidase)	+	+
GEL — Hydrolysis (protease)	+	+
PNG — $\beta$ -galactosidase	+	+
GLU — glucose	+	+
ARA — arabinose	+	+
MNE — mannose	+	+
MAN — mannitol	+	+
NAG — N-acetyl-glucosamine	+	+
MAL — maltose	+	+
GNT — gluconate	+	+
CAP — caprate	+	+
ADI — adipate	+	–
MLT — malate	+	+
CIT — citrate	+	+
PAC — phenyl-acetate	–	–
OX — oxidase	+	+

Na osnovi provedenih testova i određenih biokemijskih svojstava utvrđena su dva tipa *A. hydrophila* / *caviae*. *A. hydrophila* / *caviae* tip I razlikuje se od *A. hydrophila* / *caviae* tip II u posjedovanju arginin-dihidrogenaze (ADH), kao i u sposobnosti fermentacije adipata (ADI).

Dosadašnje spoznaje utvrđuju da *A. hydrophila* / *caviae* posjeduje ADH, a da je ADI negativna (Janda, 1985). Rezultati ispitivanja metabolizma arginina upućuju na to da se argininom različite bakterije koriste kao izvorom dušika, ugljika i energije (Shirai i Mizuguchi, 2003). Virulencija mikroorganizama često je povezana s proizvodnjom pojedinih enzima. Katabolizam arginina preko arginin-dihidrogenaze može biti važan izvor energije za bakterijski rast (Arenai sur., 1999). Isto tako, adipat se u stanici  $\beta$ -oksidacijom razlaže do sukcinil-CoA i acetil-CoA koji se dalje iskorištavaju u energijskom metabolizmu (Tykaer i sur., 2002). Iako točna uloga ovih dvaju biokemijskih

Tablica 2. Podaci o antibiogramu

Table 2. Results of testing antimicrobial sensitivity.

Antimikrobna tvar / Antimicrobial matter	Oznaka / Sign	Stupanj osjetljivosti / Degree of sensibility	
		<i>A. hydrophila/caviae</i>	
		type I	type II
Ampicilin	AM <sub>10</sub>	R	R
Chloramphenicol	C <sub>30</sub>	I	S
Enrofloxacin	ENO <sub>5</sub>	S	I
Erythromycin	E <sub>15</sub>	I	R
Flumequin	AR <sub>30</sub>	S	S
Nitrofurantion	F/M <sub>300</sub>	R	R
Norfloxacin	NOR <sub>10</sub>	I	I
Novobiocin	NB <sub>5</sub>	I	I
Oxytetracycline	T <sub>30</sub>	I	I
Penicilin	P <sub>10</sub>	R	R
Piperacilin	PIP <sub>100</sub>	R	R
Sulfametoxazole ++ trimethoprim	SXT	R	S
Tetracycline	TE <sub>30</sub>	I	I
Trimethoprim	TMP <sub>5</sub>	R	I

Stupanj osjetljivosti: S — osjetljiv; I — srednje osjetljiv; R — neosjetljiv.

Degree of sensibility: S — sensitive; I — indifferent; R — resistant.

parametara u metabolizmu *Aeromonas* spp. nije detaljnije istražena, rezultati upućuju na njihov utjecaj na rezistenciju bakterija.

Naši rezultati upućuju na razlike u pogledu rezistencije na antimikrobne tvari između *A. hydrophila / caviae* tip I i *A. hydrophila / caviae* tip II. Veći stupanj rezistencije zabilježen je kod *A. hydrophila / caviae* tip I, koja je ADH i ADI pozitivna. Oba izolirana tipa *A. hydrophila / caviae* pokazuju najveću osjetljivost prema flumekvinu, a relativno manje prema kloramfenikolu i enrofloksacinu, što upućuje na smanjenu osjetljivost uzročnika prema tim antimikrobnim tvarima (Cipriano i sur., 2001).

## ZAKLJUČAK

Rezultati bakteriološke pretrage dostavljenih uzoraka kalifornijske pastrve upućuju na zaključak da je *Aeromonas hydrophila / caviae* uzročnik bakterijemije koja je dovela do uginuća riba.

Biokemijskom karakterizacijom uzročnika identificirana su dva tipa *Aeromonas hydrophila* / *caviae*. Utvrđeno je postojanje razlike u posjedovanju arginin–dihidrogenaze (ADH), kao i u sposobnosti fermentacije adipata (ADI).

Na osnovi ispitivanja osjetljivosti prema antimikrobnim tvarima evidentna je u tome smislu razlika između dvaju izoliranih tipova *A. hydrophila* / *caviae*. Najučinkovitija antimikrobna tvar protiv *A. hydrophila* / *caviae* tip I i tip II bio je flumekvin.

*A. hydrophila caviae* tip I pokazala je veći stupanj rezistencije na djelovanje antimikrobnih tvari. U skladu s opisanim razlikama u biokemijskim svojstvima izoliranih sojeva iz roda *Aeromonas* (ADH i ADI) i utvrđenim razlikama u rezistenciji, naši rezultati upućuju na utjecaj ovih dvaju biokemijskih parametara na rezistenciju.

### Summary

## AEROMONAS SPP BACTEREMIA OF RAINBOW TROUT FRY (*ONCORHYNCHUS MYKISS*): BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE CAUSATIVE ORGANISM AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY

D. Kapetanović, E. Teskeredžić

*Aeromonas hydrophila* and other members of *Aeromonas* genus are ubiquitous in aquatic environment and make part of normal bacterial flora of rainbow trout. *Aeromonas spp.* infections are worldwide registered. Here we present our experience and knowledge on *Aeromonas* bacteremia, which causes mortality of rainbow trout fry.

Rainbow trout fry, 7 month old, started to die in November 2003. Fish samples (17 samples) of dead and moribund fish were delivered to the Laboratory for aquaculture.

With Api 20 NE tests *Aeromonas hydrophila* / *caviae* type I was identified with an average probability of 99.9 % (one test against), as well as *Aeromonas hydrophila* / *caviae* type II with an average probability of 99.5 % (one test against) from liver, spleen, kidney, intestines and damaged eye. All of isolated and identified samples were tested for antibiotic susceptibility by disc diffusion method. The test showed that specimens were most sensitive on flumequin,

---

Damir Kapetanović, dr. vet. med., dr. sc. Emin Teskeredžić, senior scientist, Ruder Bošković Institute, Center for marine and environmental research, Laboratory for aquaculture, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia, e-mail: kada@irb.hr

and relatively less sensitive on chloramphenicol and enrofloxacin. Therapy was successfully applied with Flubactin®.

Key words: rainbow trout, *Aeromonas hydrophila* / *caviae*.

## LITERATURA

- Arena, M. E., Saguir, F. M., Manca de Nadra, M. C. (1999): Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. International Journal of Food Microbiology, 47, 203–209.
- Austin, B., Austin, D. A. (1999): Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer–Praxis publishing. Third (revised) edition. Chichester, UK, 6 pp.
- Cipriano, R. C., Bullock, G. L., Pyle, S. W. (2001): Aeromonas Hydrophila and motile aeromonad septicemias of fish. Fish disease keafket, 68.
- Janda, J. M. (1985): Biochemical and exoenzymatic properties of *Aeromonas* species. Diagnostic Microbiology and Infectious disease, 3, (3), 223–232.
- Kapetanović, D., Teskeredžić, E. (2003): Bakterijska flora ličinki i mlada kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). Ribarstvo, 61, (3), 103–119.
- Naglić, T., Hajsig, D., Mađić, J., Pinter, Lj. (1992): Praktikum opće mikrobiologije i imunologije, Školska knjiga, Zagreb, p. 33–37.
- Shirai, H., Mizuguchi, K. (2003): Prediction of the structure and function of AstA and AstB, the first two enzymes of the arginine succinyltransferase pathway of arginine catabolism. FEBS Letters, 555, 505–510.
- Thykaer, J., Chrstensen, B., Nielsen, J. (2002): Metabolic network analysis of an Adipoyl-7-ADCA-producing strain of *Penicillium chrysogenum*: Education of Adipate degradation. Metabolic engineering, 4, (2), 151–158.

Primljeno: 30. 6. 2004.

Prihvaćeno: 4. 10. 2004.