



Funded by the European Union's
Seventh Framework Programme



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



trafooon

Traditional Food Network to improve the transfer of knowledge for innovation

Bakteriální infekce v našich intenzivních chovech ryb a jejich laboratorní diagnostika

Alois Čížek

*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie,
Fakulta veterinárního lékařství,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*



Traditional Food Network to improve the transfer of knowledge for innovation

Naše pracoviště

- **Diagnostický servis – terénní vzorky**
- **Výzkum**
 - Projekty NAZV (*dr. Piačková, prof. Mareš, doc. Palíková, ing. Veselý, prof. Navrátil,*)
 - CEITEC Výzkumná skupina Molekulární bakteriologie – antibiotická rezistence

Přehled nejvýznamnějších bakterióz



- **Bakteriální septikémie ryb** – mezofilní aeromonády,
- **Erythrodermatitída kaprů** – vředovitá choroba
- **Furunkulóza lososovitých**
- **Yersinióza** (Enteric Redmouth Disease; ERM)
- **Flavobakterióza**
- **Kolumnaróza**
- **Renibakterióza** (Bacterial Kidney Disease; BKD)
- **další bakteriální onemocnění** (*Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, mykobaktérie, ...)

Etiologie

G-

- č. Aeromonadaceae
Aeromonas (řada druhů, genospecies)
- č. Enterobacteriaceae
Y. ruckeri, *E. tarda*, *E. ictaluri*
- č. Flavobacteriaceae
F. psychrophilum, *F. branchiophilum*,
F. columnare

G+

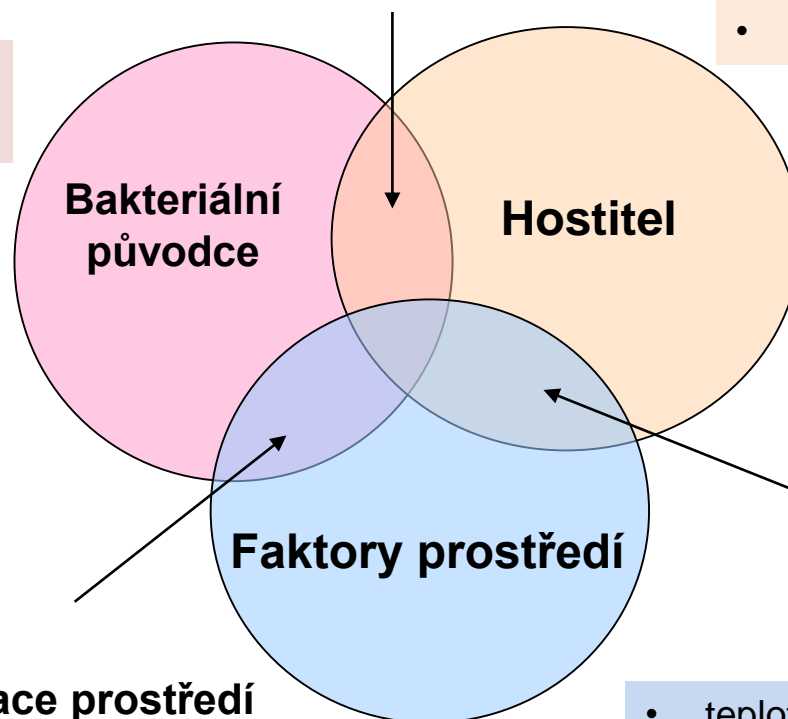
- č. Micrococcaceae
Renibacterium salmoninarum
- č. Streptococcaceae
S. iniae
- mykobaktéria, nokardie

Patogeneze bakterióz ryb

- virulence
- velikost infekční dávky

Kolonizace kůže, sliznic hostitele

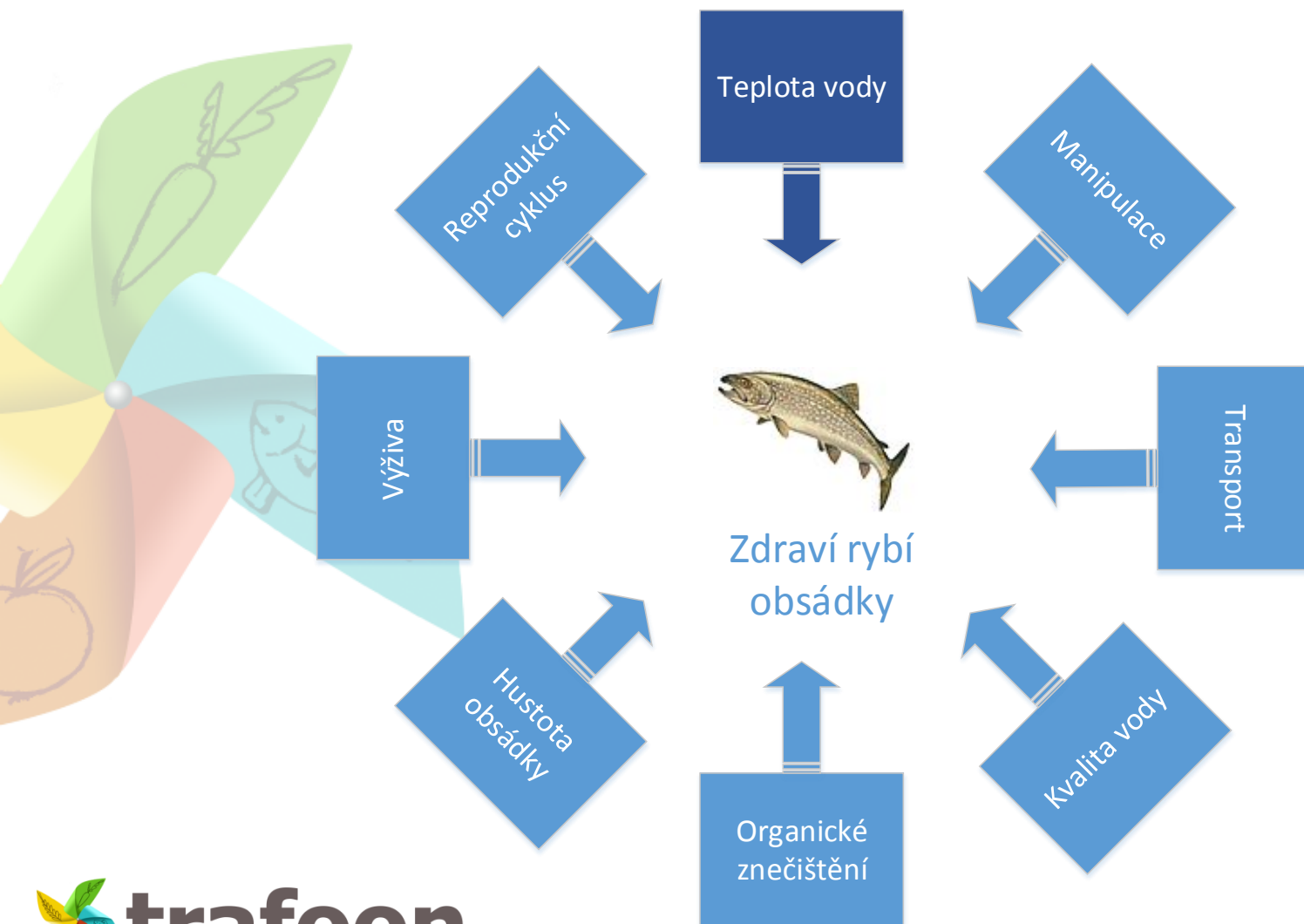
- geneticky uniformní populace
- stejné stáří
- stav imunity



Kolonizace prostředí
(biofilmy, biofiltry)

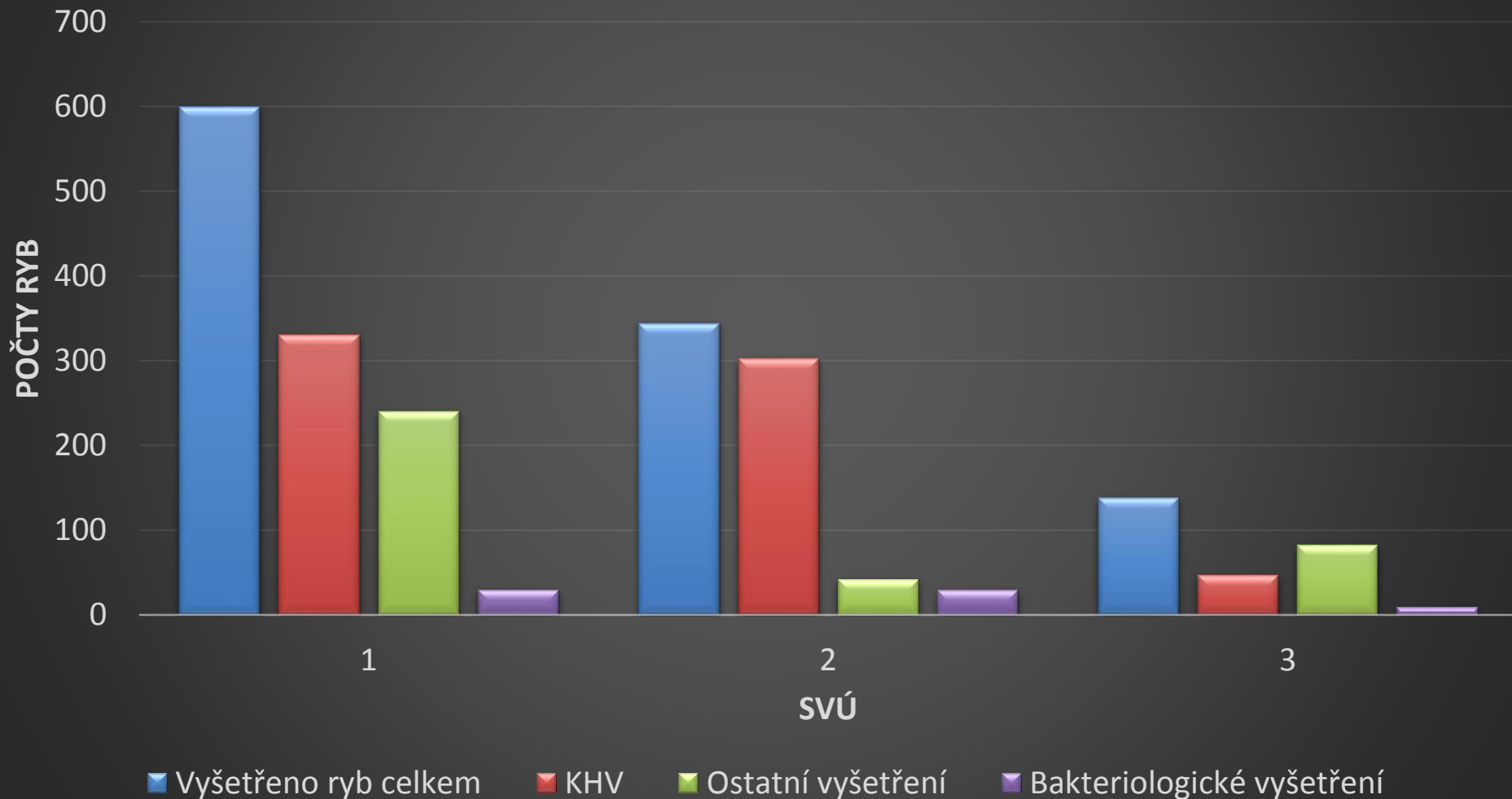
- teplota a kvalita vody
- plnohodnotná výživa
- hustota obsádky

Hlavní faktory usnadňující rozvoj bakterií jsou známé



Jaká je situace v našich chovech?

Údaje o počtech vyšetřených ryb na SVÚ
v roce 2014





Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb

Veronika Piačková, Alois Čížek, Tomáš Veselý,
Dagmar Pokorová



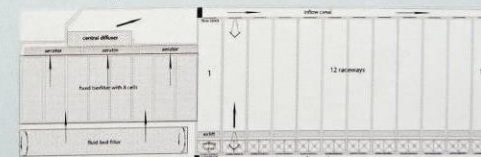
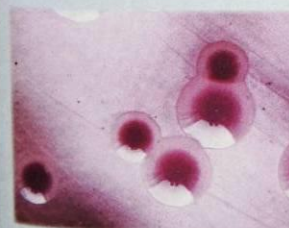
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Agronomická
fakulta

R07/2013
metodika

Využití hmotnostní spektrometrie MALDI TOF
a polymerázové řetězové reakce ke confirmaci
suspektních kultur *Aeromonas salmonicida*,
Flavobacterium psychrophilum a *Yersinia ruckeri*



Mendelova
univerzita
v Brně

Diagnostika bakterióz ryb

Terénní část

- Anamnéza
- Klinické vyšetření
- Pato-anatomické vyšetření
- **Odběr vhodných vzorků pro bakteriologické vyšetření**

Laboratorní část

- Mikroskopie, kultivační vyšetření, PCR
- Charakteristika izolátů bakterií – identifikace, antibiogram
- **Interpretace výsledků**

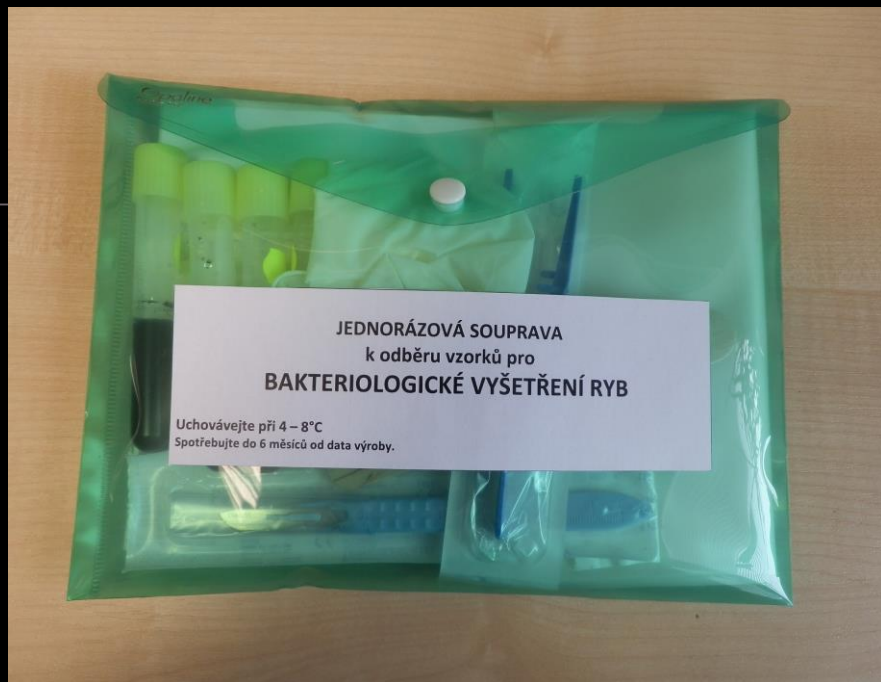
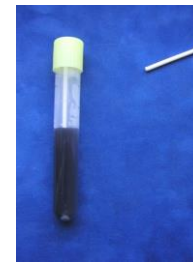
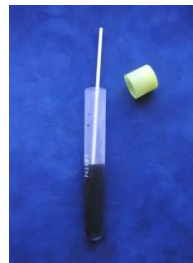


Foto: V. Piačková



NÁVOD K POUŽITÍ

- Postup odběru vzorků s obrazovou dokumentací
- Žádanka o bakteriologické vyšetření
- Seznam pracovišť v ČR, která provádějí bakteriologické vyšetření ryb



Laboratorní vyšetření

Mikroskopie

- Barvené otiskové preparáty (kolumnaróza, flavobakteriόza, mykobakteriόzy, renibakteriόza)
- FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) – flavobakteriόza

Kultivační vyšetření

- Kombinace základních a speciálních médií
- Podmínky inkubace podle nároků hledaného původce

Využití metod molekulární biologie

- PCR (existují protokoly k průkazu většiny původců, i v kombinaci – multiplex; detekční limity)
- qPCR – průkaz a kvantifikace původce v různých typech vzorků (voda, tkáně)
 - důležité pro aktivní monitorování v intenzivních akvakulturách
 - včasné zahájení antibiotické terapie

Charakteristika izolátů

Identifikace

- klasicky podle biochemické aktivity
- PCR
- MALDI-TOF MS

Antibiogram

- **závazné mezinárodní metodiky (CLSI, 2014; VET04-A2; VET03/VET04-S2)**
 - disková difusní metoda, diluční metody (MIC)
 - **parametry kontroly kvality, interpretační kritéria zatím neúplná**
- Certifikovaná metodika - Metody stanovení citlivosti původců erythrodermatitídy kaprů k antibakteriálním látkám (NAZV QJ 1210237)

Interpretace výsledků

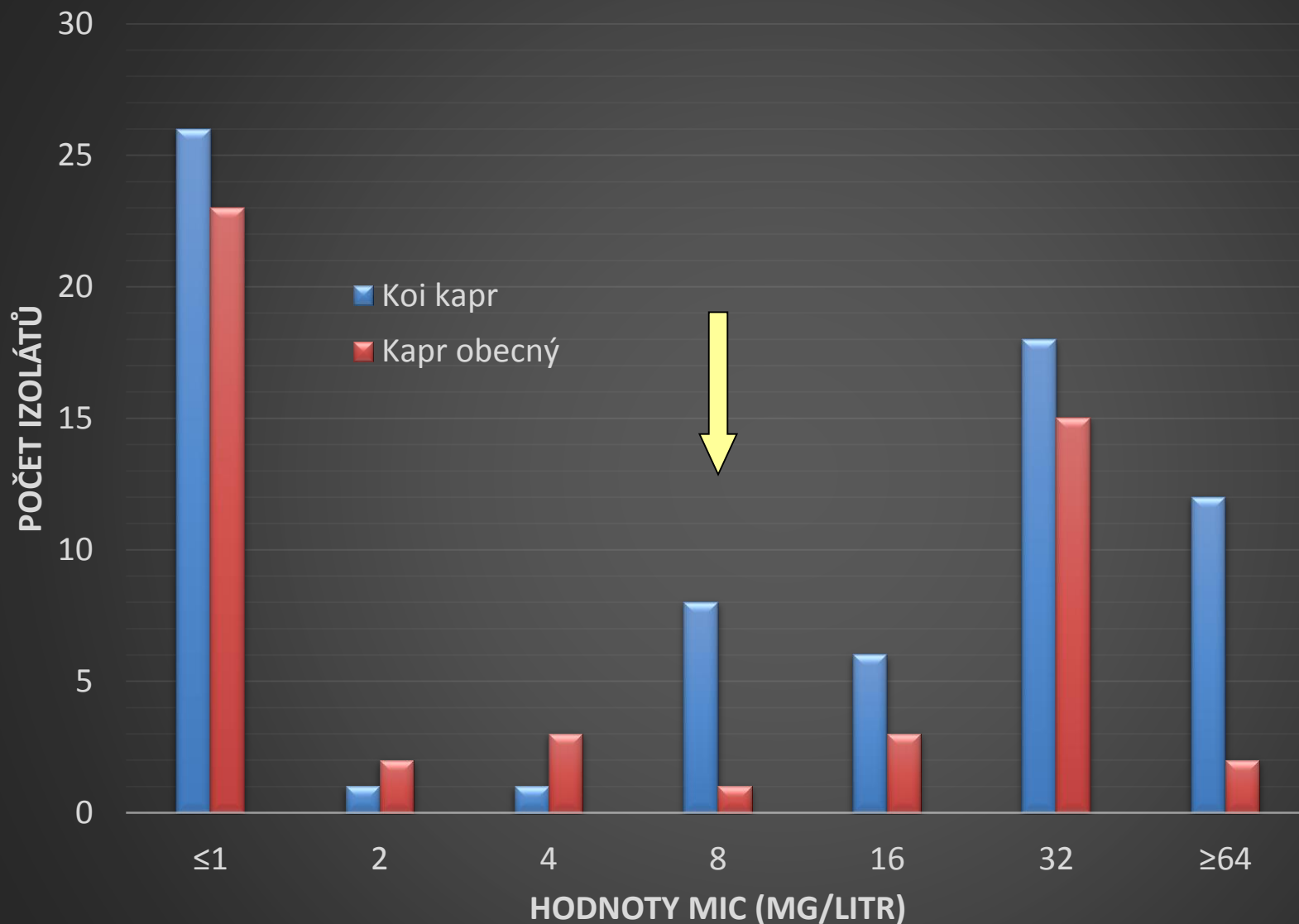
- Kvalifikovaní a zkušení pracovníci (SVÚ)
- Anamnéza + PA nález + kultivační nález nebo PCR
- Dostatečný počet vyšetřených vzorků
 - Kolonizace zdravých ryb
 - Nálezy patogenů u ryb bez PA nálezu
 - Smíšené infekce
- Doporučení zákazníkovi

Naše výsledky

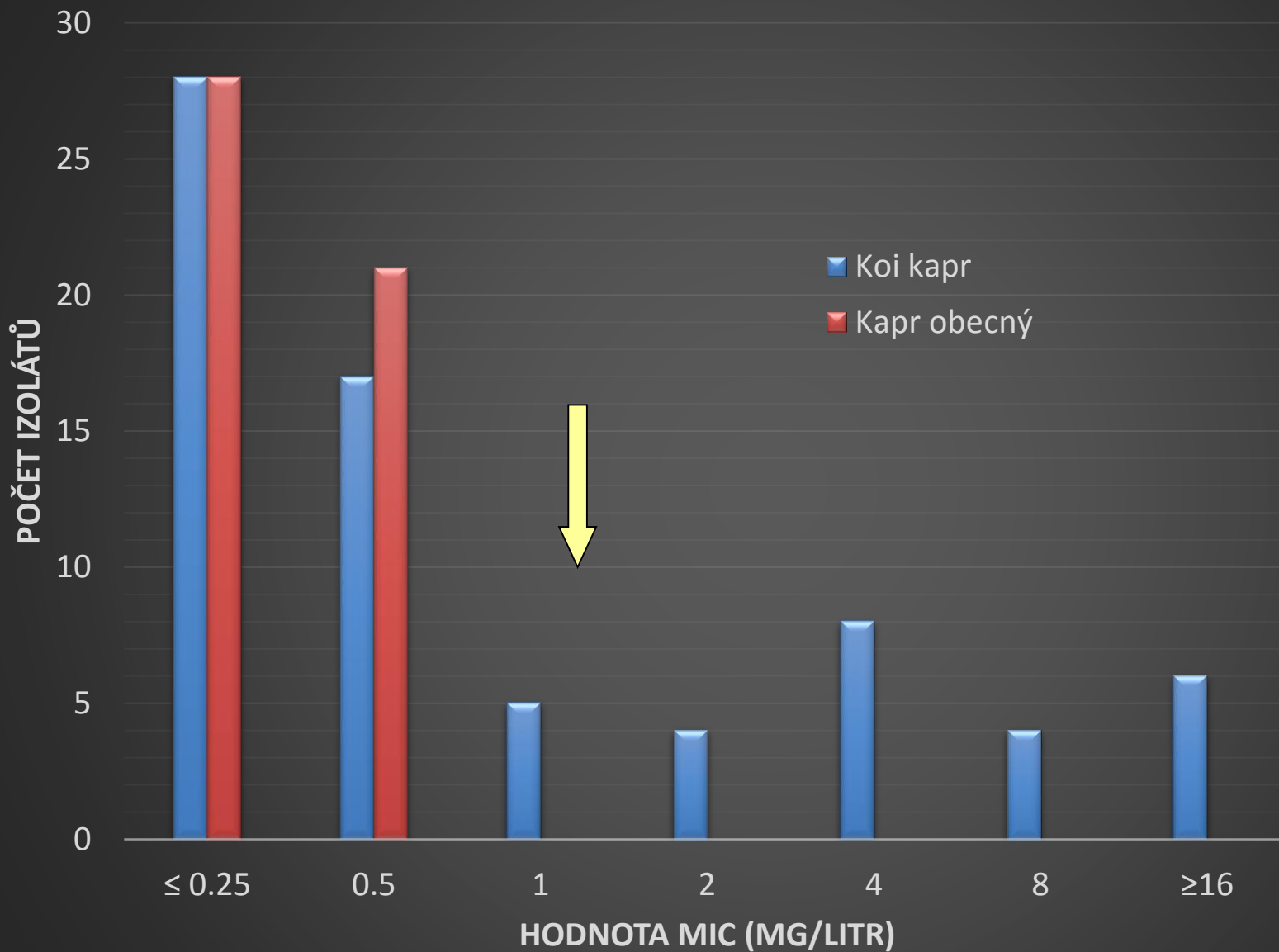
Naše studie

- Hodnocení citlivosti vůči antimikrobiálním látkám u mezofilních aeromonád izolovaných z kaprů obecných, koi kaprů a akvarijních ryb
- Charakteristika antimikrobiální citlivosti izolátů *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* z intenzivní akvakultury s recirkulací
- Výskyt *Flavobacterium psychrophilum* v našich chovech pstruha duhového

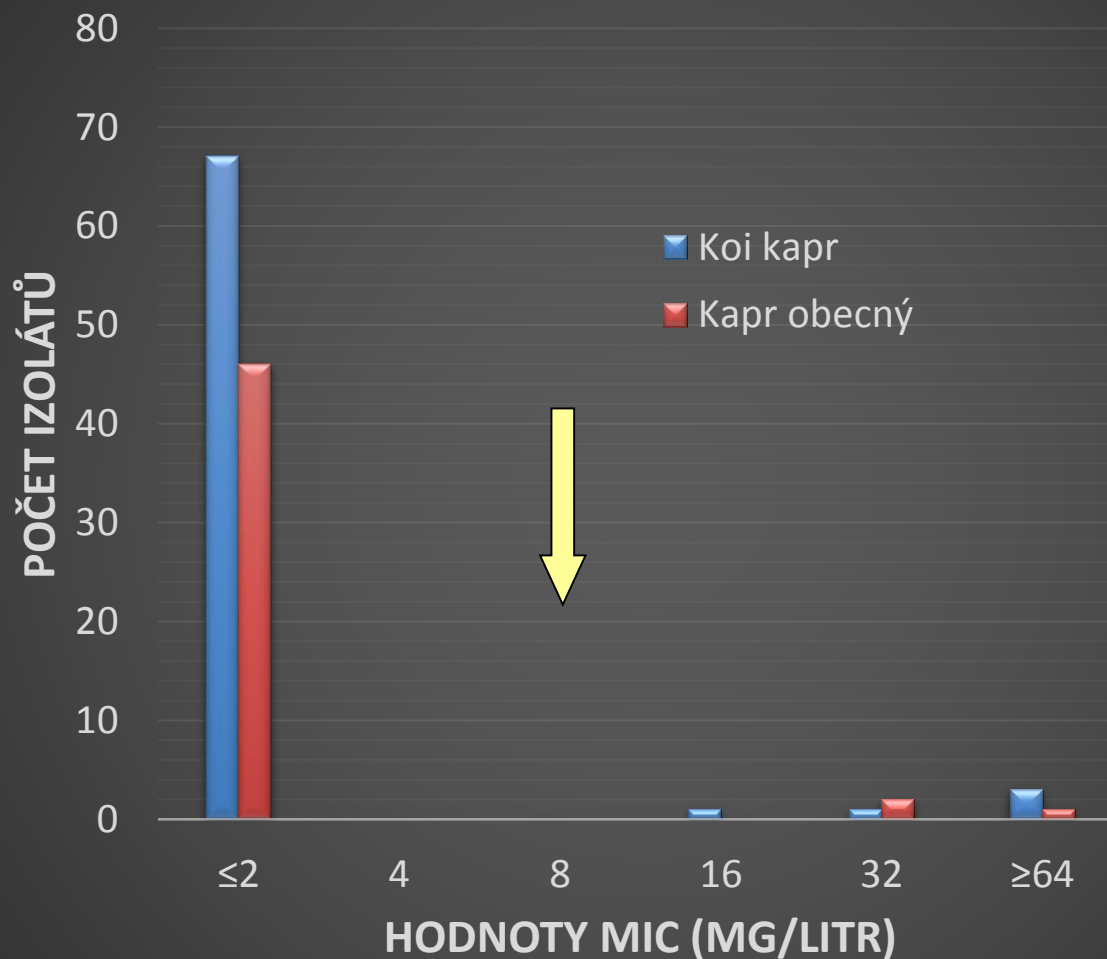
Rozložení hodnot MIC oxytetracyklinu u mezofilních aeromonád izolovaných z koi kaprů (n=72) a kaprů obecných (n=49)



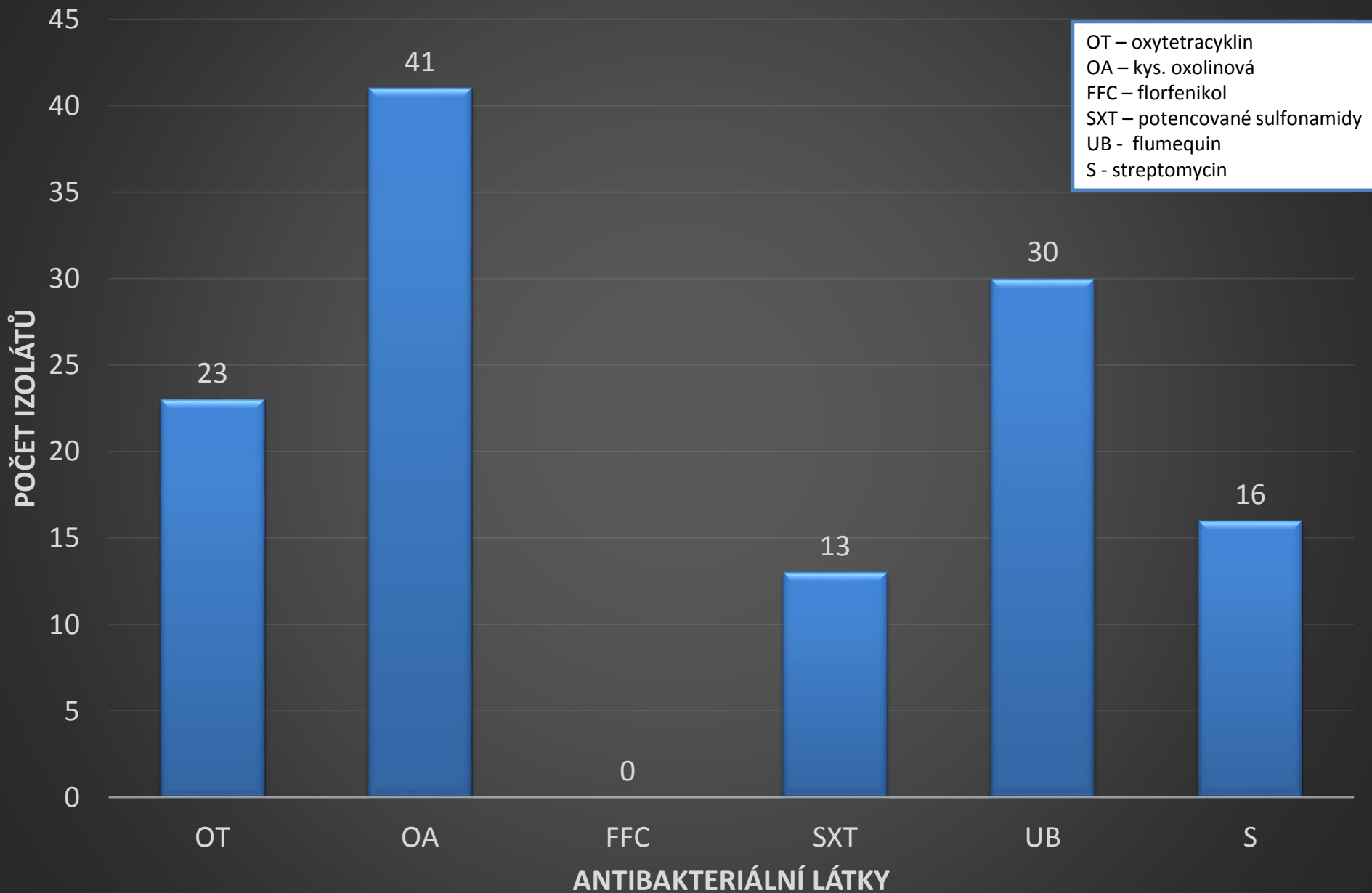
Rozložení hodnot MIC enrofloxacin u mezofilních aeromonád izolovaných z koi kaprů (n=72) a kaprů obecných (n=49)



Rozložení hodnot **MIC florfenikolu** u mezofilních aeromonád izolovaných z koi kaprů (n=72) a kaprů obecných (n=49)



Vyskyt rezistence u 45 izolátů *A. salmonicida*

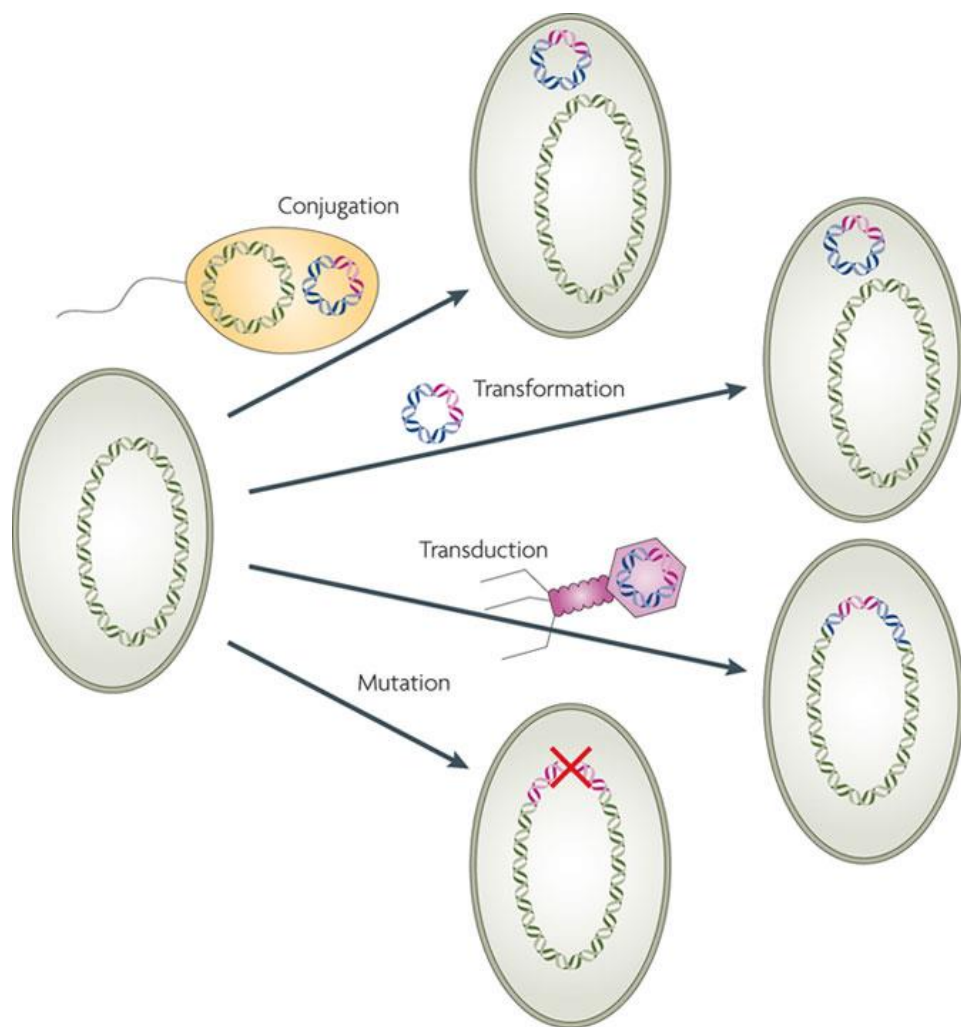


Registrované antimikrobiální látky pro léčbu ryb v užitkových chovech

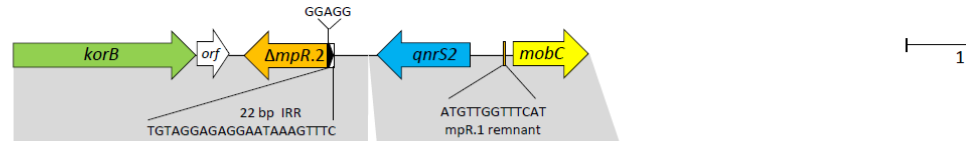
- **Oxytetracyklin** (Rupin Special)
- **Flumechin** (Flumiquil 50%)
- **Florfenikol** (Aquaflor 500 mg/g premix pro medikaci krmiva pro pstruha duhového)



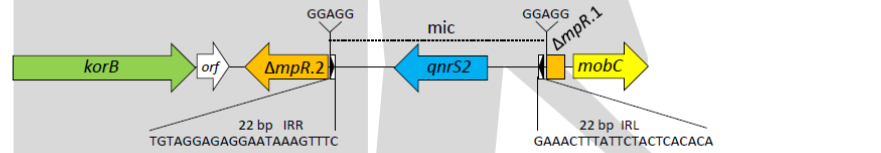
Antimikrobiální rezistence má genetický základ



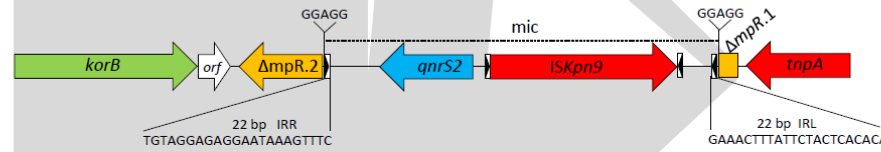
pAH6
(KT315926)
A. hydrophila
IncU plasmid
Fish, Czech Republic



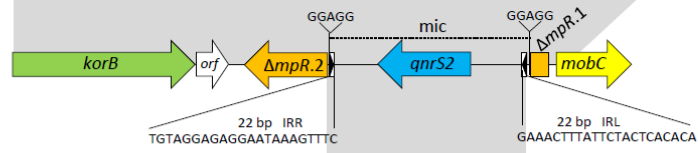
pAC3
(KM245123)
Aeromonas sp.
IncU plasmid (KM204147)
Wastewater, China



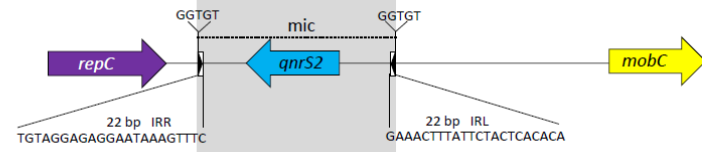
pP2G1
(HE616910)
Aeromonas sp.
IncU plasmid
River water, Spain



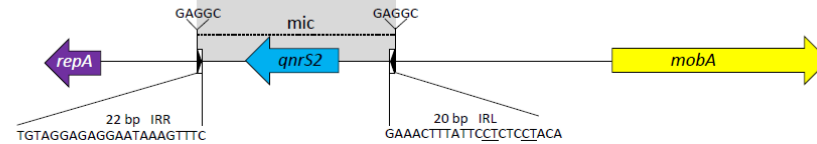
pASCH21
(KT315928)
A. salmonicida
IncU plasmid
Fish, Thailand



pAHIB101-pBF7.8
(KM245123)
A. hydrophila
IncQ2 plasmid
Fish, China



pAQ2-1
(JN315884)
A. sobria
ColE-type plasmid
Fish, Korea



- Multirezistence je vázána na plazmidy skupiny IncU
- Prokázány epidemiologicky významné **PMQR** - geny *qnrS* u většiny izolátů aeromonád

Bakteriologicky bylo vyšetřeno 115 akvarijních ryb 49 druhů - importy z 8 zemí: Vietnam (46x), Thajsko (17x), Čína (12x), Slovensko (9x), Česká republika (6x), Brazílie (2x), Peru (1x) a Singapur (1x)

Acanthocobitis boota 1x
Acanthophtalmus kuhli 2x
Acanthopsis choirorhynchus 1x
Aphycharax rubripinnis 2x
Aphyosemion australe 2x
Aphyosemion gardneri 1x
Apistogramma agassizii 1x
Balantiocheilus melanopterus 2x
Barbus tetrazona 2x
Botia hymenophysa 2x
Botia macracantha 1x
Botia modesta 1x
Botia striata 1x
Bunocephalus coracoideus 1x
Carassius auratus 1x
Caridina – kreveta 1x
Carinotetraodon lorteri 1x
Carnegiella laevis 1x
Colisa chuna 1x
Colisa lalia 2x
Corydoras boa 1x
[*Crossocheilus siamensis*](#) 1x
Cyrtocara borleyi 1x
Epalzeorhynchus kallopterus 1x
Fundulopanchax arnoldi 1x
Gyrinocheilus aymonieri 2x
Gyrinocheilus blunt 2x

Hypostomus plecostomus 11x
Chanda ranga 2x
Kryptopterus biccirhis 1x
Kryptopterus bicolor 2x
Labeo bicolor 9x
Labeo chrysophekadion 1x
Lamprologus brichardi 1x
Leiocassis siamensis 2x
Macrogathus spp. 1x
Pangio kuhlii 6x
Papiliochromis ramirezi 1x
Pleurodeles waltl – mlok 1x
Poecilia reticulata 7x
Poecilia sphenops 2x
Poecilia velifera 4x
Pterygoplychtis gibbiceps 2x
Pterophyllum scallare 1x
Sesarma mederi – krab 1x
Sewellia lineolata 1x
Tetraodon nigroviridis 1x
Trichogaster trichopterus 1x
Tropheus moorii 2x
Xiphophorus helleri 2x
Xiphophorus maculatus 19x

WWW.MOJE-AKVARIUM.NET

© 2005

Tabulka č. 1: Zastoupení izolovaných druhů bakterií z akvarijských ryb (n = 115)

Druh	Počet izolátů daného druhu	Procentuální zastoupení
<i>Aeromonas</i> spp. *	80	67,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13	11,0
<i>Pseudomonas putida</i>	8	6,8
<i>Citrobacter freundii</i>	3	2,5
<i>Shewanella putrefaciens</i>	3	2,5
<i>Vibrio cholerae</i>	2	1,7
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,8
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0,8
<i>Vibrio fluvialis</i>	1	0,8
<i>Comamonas testosteroni</i>	1	0,8
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	0,8
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	0,8
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0,8



Genetické pozadí rezistence k fluorovaným chinolonům

- z 80 izolátů aeromonád 20 (25 %) s průkazem PMQR
 - epidemiologicky významné rezistence k fluorovaným chinolonům **PMQR** (geny *qnrS2*, *qnrB*, *aac-Ib-cr*)
 - vazba na plazmidy skupiny **IncU**
 - Vietnam, Thajsko, Čína, Singapur
 - Globální šíření

Flavobacterium psychrophilum

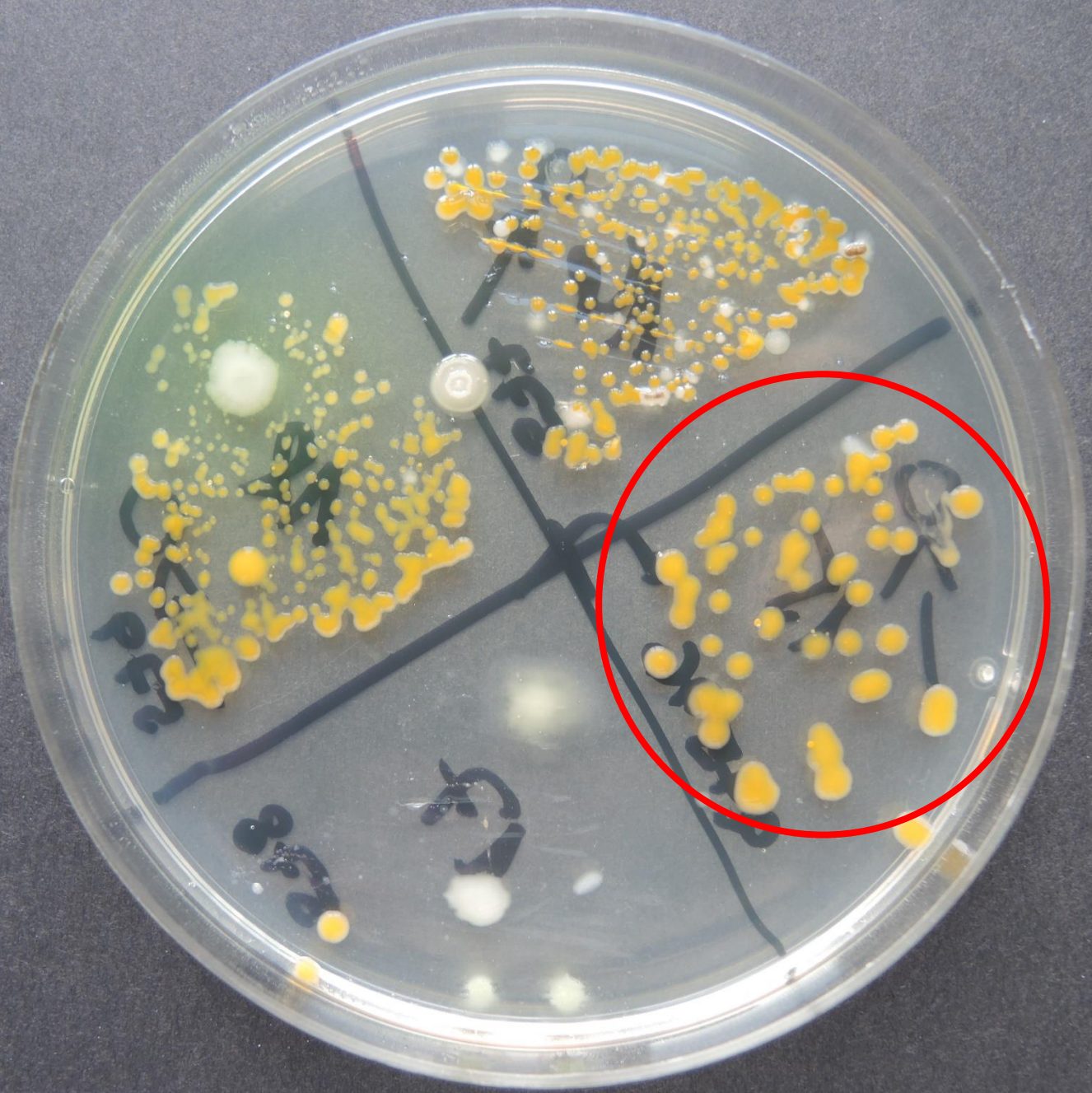


- Rainbow Trouth Fry Syndrome (RTFS)

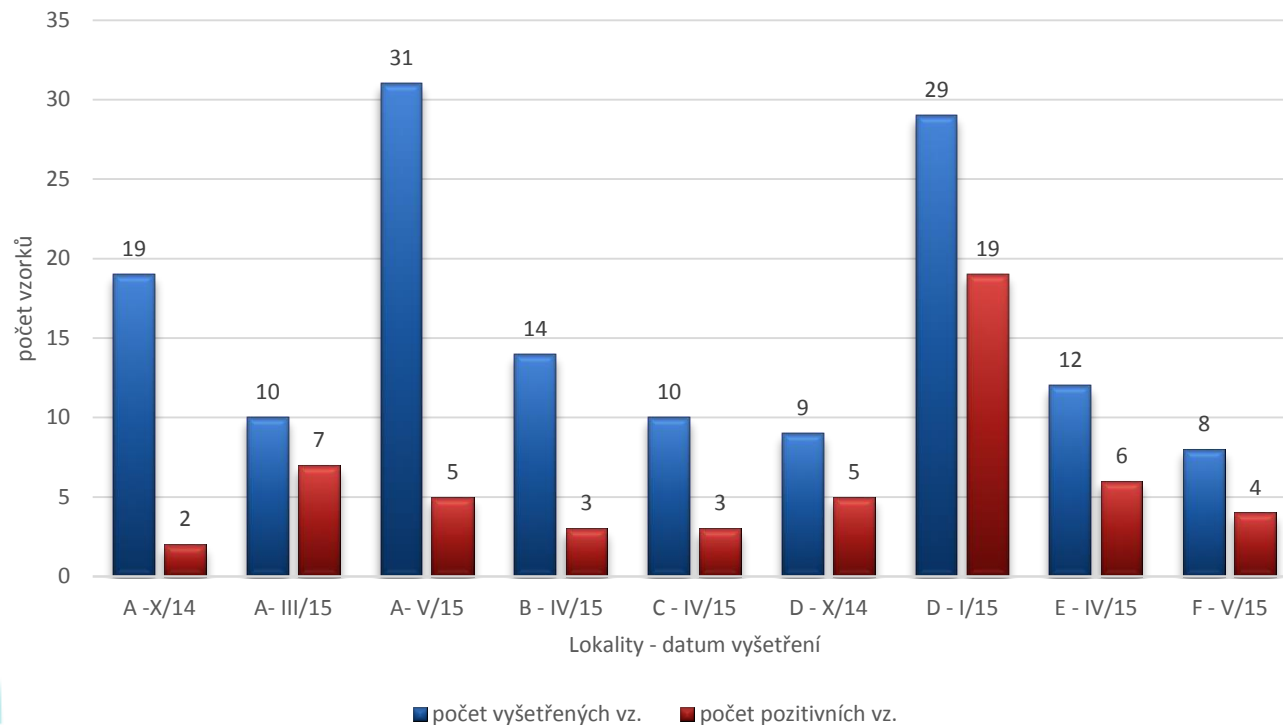


- Bacterial Cold Water Disease (BCWD)





Nálezy *Flavobacterium psychrophilum* v 6 chovech pstruha duhového



Zajímavé nálezy

- *Yersinia ruckeri* - candát obecný – plůdek
- *Plesiomonas shigelloides* – mník jednouvousý, candát obecný
- Multirezistentní *A. hydrophila* - *Gurra rufa*
- *Flavobacterium columnarae* - keříčkovec červenolemý (*Clarias gariepinus*)

Gurra rufa – *A. hydrophila* (žábra, orgány, kůže) s rezistencí k flumequinu, oxytetracyklinu, kyselině oxolinové, potencovaným sulfonamidům



Závěry

- 40% prevalence rezistence vůči OTC u izolátů z kaprů obecných naznačuje potřebu laboratorní kontroly citlivosti před započítáním léčby Rupinem
- Kapři koi a importované akvarijní ryby jsou často kolonizovány multirezistentními aeromonádami
 - nález rezistentní *A. hydrophila* z *Gurra rufa* ukazuje na potenciální rizika infekcí člověka
- Epidemiologicky významná PMQR (geny *qnrS2*, *qnrB*, *aac-Ib-cr*) je vázaná na plazmidy skupiny IncU
- V našich chovech lososovitých ryb musíme počítat s infekcemi vyvolanými *F. psychrophilum*

Poděkování spolupracovníkům

- *RNDr. Monika Dolejská, Ph.D.;*
- *Mgr. Ivan Manga, Ph.D.;*
- *RNDr. Hana Dobiášová*



Podpořeno granty NAZV č. QJ1210237 a QJ 1210013

Děkuji za pozornost