

# REZISTENCIA NA FLUOROCHINOLÓNY A VIRULENCIA KMEŇOV *AEROMONAS* IZOLOVANÝCH Z KOI KAPROV

Hanzen, J., Kmeť, V. \*

KOI CARP SLOVAKIA s.r.o. Obchodná 231, 946 51 Nesvady

\*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovenská republika

Aeromonády sú považované za indikátorové baktérie pre štúdium výskytu rezistencie na antibiotiká v chovoch rýb. V Českej republike je povolený oxytetracyklín a flumequín pre aplikáciu v obyčajných chovoch kaprov. U koi kaprov (*Cyprinus carpio koi*) (Nishikigoi) zistili signifikantne vyššiu rezistenciu aeromonád na ciprofloxacín ako u obyčajných kaprov. Rezistencia na tetracyklín bola u oboch variantov kaprov podobná a to na úrovni 50 %, resp. 41 %, pričom najčastejšie sa vyskytoval gén *tetE* (Čížek a kol., 2010).

Plazmidová chinolónová rezistencia (PMQR) je dôležitým mechanizmom získanej rezistencie na fluorochinolóny u gramnegatívnych baktérií. Zvýšená hladina MIC môže byť spôsobená získaním plazmidových génov, a to *cr* (ciprofloxacínového) variantu aminoglykozidovej acetyltransferázy *aac(6')-Ib-cr*, ktorá acetyluje ciprofloxacín a génov *qnrA*, *qnrB* a *qnrS*, kódujúcich proteín, ktorý chráni gyrázu *Escherichia coli* pred ciprofloxacínom (Morgan-Linnell a kol., 2009). Ďalším mechanizmom plazmidovej rezistencie je chinolónová efluxná pumpa *qepA*, ktorá je spojená s génom *rmtB* zodpovedným za vysokú hladinu aminoglykozidovej rezistencie u gramnegatívnych patogénnych baktérií (Perichon a kol., 2007).

Virulencia jednotlivých druhov *Aeromonas* je spôsobená rôznymi faktormi, ako napr. cytotoxický enterotoxín, hemolyzín, cytotoxické toxíny a flagela (Janda, Abbott, 2010). Ďalej *Aeromonas* produkuje rôzne bunkové hydrolytické enzýmy ako sú lipázy, proteázy a DNáza, ktoré poškodzujú hostiteľské bunky (Yano a kol., 2015). Stanovenie faktorov virulencie je dôležitým krokom k určeniu patogenity aeromonád.

Koi kapry chová stále viac ľudí. Ryby sú importované predovšetkým z Japonska, kde je chov sústredený v pomerne malom počte rodinných fariem. Vytváranie variet je procesom génovej manipulácie šľachtením z malého počtu jedincov. Na posilnenie znakov variet sa využíva príbuzenské kríženie, čo spôsobuje zníženie imunitných schopností týchto rýb. Z toho dôvodu sa u nich vyskytuje veľká náchylnosť na bakteriálne choroby. Kvalitné ryby sú cenou pomerne náročné, a preto sa ich chovatelia



snažia liečiť a zabrániť uhynutiu. Na liečbu sú používané antibiotiká a dezinfekčné látky. Dezinfekčné látky vyžadujú skúsenosť chovateľa a presnú prácu pri dávkovaní. Priestor medzi terapeutickou a letálnou koncentráciou pre ryby je u väčšiny dezinfekčných látok veľmi úzky. Používajú sa v roztoku, do ktorého je liečená ryba vkladaná a ponechaná v ňom dostatočne dlho podľa toho aká látka bola použitá. Je nevyhnutná častá a dôsledná kontrola parametrov vody, v ktorej je ryba umiestnená. Rybu je vždy potrebné liečiť v nádrži, ktorá dovoľuje častú kontrolu a manipuláciu. Na to obyčajne stačí nádrž s objemom 300 až 500 litrov v závislosti na veľkosti liečenej ryby. Takáto liečba má v sebe i dôležitý ekonomický aspekt. Antibiotiká sú často používané bez akejkoľvek konzultácie s veterinárnym lekárom. Ich podávanie je možné v krmive alebo injekčným podaním. Injekčné podanie vyžaduje zručnosť s podaním do vhodných častí tela ryby, informáciu o hmotnosti ryby, schopnosť chovateľa vypočítať koncentráciu a dávku liečiva pre konkrétneho kapra. Podanie v krmive je najčastejším postupom u väčšiny chovateľov. Pripraví si v domácich podmienkach roztok liečiva a tento aplikujú na krmivo. Týmto krmivom potom krmia ryby po určité dobu. Na rozdiel od injekčnej metódy tento postup nedokáže v žiadnom prípade individualizovať množstvo podanej účinnej

látky rybe a je pravdepodobne jedným z dôvodov šírenia mechanizmov rezistencie zistených u baktérií v jazierkach. V uplynulých dvoch rokoch sme zozbierali vzorky z rán chorých rýb od viac ako desiatich chovateľov. Mnohé z rýb, od ktorých sme vzorky odobrali z dôvodu infekcie uhynuli. Uhynuli predovšetkým ryby, u ktorých sme zistili pôvodcu ochorenia s mechanizmami rezistencie a virulencie. Naším vedľajším zistením je i to, že u mnohých chovateľov koi kaprov sú ryby napadnuté parazitmi. Parazity spôsobujú primárne narušenie integrity kože alebo slizníc rýb a bakteriálna infekcia sa tak rozvinie ako druhotná z dôvodu kontaminovania vzniknutej rany. Rovnaký mechanizmus sa uplatní i pri rozvinutí infekcie po mechanickom poškodení ryby nevhodnou manipuláciou. V podmienkach farmy KOI CARP SLOVAKIA s.r.o. v Nesvadoch chováme niekoľko tisíc koi kaprov a zbavujeme všetky nami dovezené ryby parazitov okamžite po ich importe z Japonska. Liečbu prípadných infekcií vykonávame dezinfekčnými látkami.

Cieľom práce bolo identifikovať mechanizmy rezistencie na tetracyklín a fluorochinolóny a faktory virulencie u kmeňov *Aeromonas* izolovaných z koi kaprov.

## METODIKA

Mikroorganizmy v sterich z rán na koži kaprov boli pomnožené v peptónovej vode

**Tab. 1 Gény rezistencie a virulence u *Aeromonas* z koi kaprov – Genes of resistance and virulence in *Aeromonas* from koi carps**

Druh	Rezistencia	Virulencia	Počet
<i>A. caviae</i>	<i>tetA, tetE</i>	<i>ela, fla, lip</i>	1
<i>A. caviae</i>		<i>act, fla, lip</i>	1
<i>A. caviae</i>		<i>ela, fla, lip</i>	1
<i>A. eucrenophila</i>	<i>tetE</i>	<i>ela, fla, lip</i>	1
<i>A. enteropelogenes</i>	<i>tetD, tetE</i>	<i>act</i>	1
<i>A. media</i>	<i>tetE</i>	<i>ela</i>	1
<i>A. hydrophila</i>		<i>ela, fla, lip</i>	1
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetA</i>	<i>fla</i>	1
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetE</i>	<i>act, fla</i>	2
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetE</i>	<i>act, ela, fla</i>	2
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetE</i>	<i>act, fla, lip</i>	1
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetE</i>	<i>ela, fla</i>	1
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetE</i>	<i>act, ela, fla, lip</i>	1
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetA, tetE</i>	<i>fla, lip</i>	1
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetA, tetE</i>	<i>ela, fla</i>	1
<i>A. hydrophila</i>	<i>tetA, tetE</i>	<i>ela, fla, lip</i>	2
<i>A. veronii</i>		<i>act, fla</i>	1
<i>A. veronii</i>		<i>ela, fla, lip</i>	1
<i>A. veronii</i>		<i>act, fla, lip</i>	1
<i>A. veronii</i>	<i>tetE</i>	<i>act</i>	1
<i>A. veronii</i>	<i>tetE</i>	<i>act, fla</i>	3
<i>A. veronii</i>	<i>tetE</i>	<i>ela, fla, lip</i>	1
<i>A. veronii</i>	<i>tetA, tetE</i>	<i>act, fla</i>	1
<i>A. veronii</i>	<b><i>Int1, gnrS</i></b>	<i>fla</i>	1
<i>A. veronii</i>	<i>tetE, Int1, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>ela, fla lip</i>	1

a nasledovne vyočkované na médium Columbia agar s 5 % baranej krvi a inkubované pri teplote 28 °C 24 až 48 hodín. Suspektné kolónie boli predbežne identifikované farbením podľa Grama a oxidázovou aktivitou. Druh bol určený na prístroji Maldi Biotyper, štandardnou extrakciou so 70 % kyselinou mravčou. Celkove sme izolovali 30 kmeňov rodu *Aeromonas*, šiestich druhov.

Minimálnu inhibičnú koncentráciu antibiotík (MIC) sme stanovili komerčným kitom spoločnosti Bel-Miditech (Bratislava) primárne určeným použitie v humánnej, klinickej mikrobiológii na určenie hladiny MIC u baktérií. Výsledky MIC boli interpretované podľa CLSI M31-A3 (2008). Pre vyhodnotenie hladiny rezistencie na ciprofloxacín a tetracyklín sme použili hodnotu MIC90. Je definovaná ako najnižšia koncentrácia antibiotika, ktorá potlačí rast 90% testovaných kmeňov baktérií daného druhu.

PCR metodiky. Dôkazu génov rezistencie na tetracyklín, *tetA* a *tetB* podľa (Ng a kol., (2001) a génov *tetC*, *tetD* a *tetE* podľa Navaz a kol. (2006). Plazmidovú chinolónovú rezistenciu (PMQR) gén *qnrS* sme detegovali podľa Robicsek a kol. (2005) a gén ciprofloxacínového variantu aminoglykozidovej acetyltransferázy *aac(6')-Ib-cr* podľa Kehrenberg a kol. (2007). Faktory

virulence: cytotoxický enterotoxín-*act*, elastáza-*ela*, lipáza-*lip* a flagelín-*fla* boli detegované metodikou podľa Sen a kol. (2004).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pre štúdium sme vybrali 30 kmeňov *Aeromonas*, ktoré pomocou Maldi tof metodiky boli zaradené do šiestich druhov a to: *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*,

*A. eucrenophila*, *A. enteropelogenes*, *A. media*. Hodnota MIC 90 tetracyklínu bola na úrovni 32 mg/L a MIC90 ciprofloxacínu bola 8,0 mg/L. U týchto rezistentných kmeňov na tetracyklín sme zistili najčastejšiu prítomnosť génu *tetE*. Ďalšie očakávané gény rezistencie ako *tetA* a *tetD* sa vyskytovali len ojedinele. Hodnoty MIC90 oxytetracyklínu boli u českých kmeňov aeromonád vyššie a to 64 mg/L (Čížek a kol., 2010).

U dvoch kmeňov *Aeromonas veronii* bola detegovaná plazmidová chinolónová rezistencia a to gény *aac(6')-Ib-cr* a *qnrS* spolu s integrónom 1 (Tab. 1). U jedného kmeňa *A. hydrophila* sa vyskytovali všetky štyri testované gény virulence spolu s génom tetracyklínovej rezistencie *tetE*. Hodnoty MIC90 oxytetracyklínu boli u českých kmeňov aeromonád z koi kaprov vyššie a to 64 mg/L a MIC90 ciprofloxacínu bola na rovnakej úrovni (Čížek a kol.,

2010). V našich podmienkach sme gén *qnrS* dokázali u *Escherichia coli* z hydiny (Kmeť, Kmeťová, 2010), z havranov (Kmeť a kol. 2013) a v komunálnych odpadových vodách (Čornejová a kol., 2015).

Koi kapry nemajú obmedzenia pre aplikáciu antimikrobiálnych látok, lebo sa chovajú len ako okrasné ryby. Dosiiahnuté výsledky o výskyte rezistencie a virulence však pomôžu pri ich terapii a prípadnom vývoji vakcín.

## ZÁVER

V práci popisujeme výskyt rezistencie na tetracyklín a ciprofloxacín u kmeňov rodu *Aeromonas* izolovaných zo sterov z rán na koži koi kaprov chovaných na Slovensku. Hodnota MIC90 tetracyklínu bola na úrovni 32 mg/L a MIC90 ciprofloxacínu 8,0 mg /L. U dvoch kmeňov *Aeromonas veronii* bola detegovaná plazmidová chinolónová rezistencia a to gény *aac(6')-Ib-cr* a *qnrS* spolu s integrónom 1. Najčastejšie sa vyskytovala kombinácia faktorov virulence: *ela, fla, lip* a *act, fla, lip*.

## SUMMARY

HANZEN J., KMEŤ V.: **Fluoroquinolone resistance and virulence in *Aeromonas* isolated from koi carps in Slovakia**

The occurrence of tetracyclin and ciprofloxacin resistance in *Aeromonas* isolated from swabs from wounds on the skin of koi carps in Slovakia is shown. MIC90 of tetracycline was 32 mg/L and MIC90 ciprofloxacin was 8,0 mg/L. Two strains *Aeromonas veronii* consist of plasmid quinolone resistance (PMQR) e.g. genes *aac(6')-Ib-cr* and *qnrS* together with integron 1. Most frequently the combination of virulence factors *ela, fla, lip* and *act, fla, lip* occurred.

## Podakovanie.

Výsledky tejto práce boli dosiahnuté pri riešení projektu APVV-14-0274

## Literatúra u autorov.