

**SISTEMSKA *CITROBACTER FREUNDII* INFEKCIJA KOD  
ŠARANSKH VRSTA RIBA\***  
***SISTEMIC CITROBACTER FREUNDII INFECTION IN CARP***

Svetlana Jeremić, Dobrila Jakić-Dimić\*\*

*U radu smo opisali kliničko oboljenje šaranskih vrsta riba koje je ukazivalo na tipičnu akutnu bakterijsku septikemiju izazvanu gram-negativnom bakterijom *Citrobacter freundii*. Početkom godine, pri niskim temperaturama vode, primećen je neuobičajeni mortalitet šaranskih vrsta riba.*

*Za laboratorijska ispitivanja uzeto je 39 uzoraka obolelih riba koje su potamnele, sa izraženim egzoftalmusom, krvarenjima po koži i u očima i 10 uzoraka klinički zdravih riba. Deo promenjenih organa: škrge, parenhimatozne organe i creva koristili smo za izolovanje uzročnika. U ispitivanjima smo koristili uobičajene metode bakteriološkog pregleda. Kulture su identifikovane ispitivanjem ključnih fenotipskih obeležja i pomoću Api 20E sistema kao *Citrobacter freundii*.*

*Drugi deo parenhimatoznih organa i creva fiksirali smo u 10% formalinu i pripremili standardnom histološkom tehnikom. Patološko-histološkim ispitivanjem utvrđene su zapaljenjske i nekrotične promene na unutrašnjim organima.*

*Veštačkom infekcijom sa čistom kulturom *Citrobacter freundii* uspele smo da reprodukujemo oboljenje.*

*To je ujedno i prvi objavljeni izveštaj o utvrđivanju *Citrobacter freundii* kao uzročnika bolesti šaranskih vrsta riba u Srbiji.*

*Ključne reči: *Citrobacter freundii*, izolacija, identifikacija, šaranske vrste riba, biološki ogled*

**Uvod / Introduction**

Intenzivno gajenje šaranskih vrsta riba se svrstava u najrentabilnije načine proizvodnje belančevina životinjskog porekla. Osnovni uslov za ispunjenje

\* Rad primljen za štampu 19. 2. 2003. godine

\*\* Dr sc. Svetlana Jeremić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Odeljenje za zdravstvenu zaštitu riba, Beograd

ovog zahteva je održavanje životnih i proizvodnih funkcija riba u fiziološkim granicama. Međutim, svaka promena abiotičkih činilaca sredine (smanjenje procenta kiseonika, česte promene temperature vode, promene pH vrednosti, povećana koncentracija amonijaka i ugljen-dioksida), kao i velika gustina nasada i nesprovođenje preventivnih mera pre prezimljavanja pogoduju širenju mnogobrojnih bolesti, a među njima i bakterioze. Posebno veliki gubici se beleže kod mlađi šarana posle zimovanja koji su nastali kao posledica smanjene otpornosti organizma mladih riba posle zimskog gladovanja, niskih temperatura i degradovanja sredine.

U radu smo opisali kliničko oboljenje šaranskih vrsta riba koje je ukazivalo na tipičnu akutnu bakterijsku septikemiju po koži i unutrašnjim organima izazvanu gram-negativnom bakterijom. Procenat uginuća šarana (*Cyprinus carpio*) i babuški (*Carassius carassius*) bio je znatno veći, a znatno niži mortalitet se javio kod mlađi amura (*Ctenopharyngodon idella*) i crvenperki (*Rutilus rutilus*).

Kulture *Citrobacter freundii* su izolovane i identifikovane ispitivanjem ključnih fenotipskih obeležja i pomoću Api 20E sistema za enterobakterije.

Patološko-histološkim ispitivanjem su utvrđene zapaljenjske i nekrotične promene na unutrašnjim organima. Veštačkom infekcijom sa čistom kulturom *Citrobacter freundii* uspeli smo da reprodukujemo oboljenje.

U radu će biti razmatrana pojava za nas novog bakterijskog oboljenja, što je ujedno i prvi objavljeni izveštaj o utvrđivanju *Citrobacter freundii* kao uzročnika bolesti šaranskih vrsta riba u Srbiji.

#### **Materijal i metode rada / *Materials and methods***

Krajem marta i početkom aprila 2002. godine primećen je neobičajen mortalitet šaranskih vrsta riba, s tim da je procenat uginuća mlađi šarana i babuški bio znatno veći, a znatno niži mortalitet se javio kod mlađi amura i crvenperki.

Za laboratorijska ispitivanja uzeli smo 39 uzoraka obolelih riba, koje su potamnele sa izraženim egzoftalmusom, krvarenjima po koži, perajima, oko očiju i lokomotornom ataksijom i 10 uzoraka klinički zdravih riba. Deo promenjenih organa (jetra, bubreg i creva) fiksirali smo u 10% formalinu, uklopili u parafin, pravili tkivne listiće debljine 6 mikrona i obojili hematoksilin-eozinom.

Kao materijal za izolovanje uzročnika koristili smo škrge, parenhimatozne organe (jetra, bubreg i slezina) i creva obolelih i klinički zdravih riba. Škrge, parenhimatozni organi i creva sakupljeni su aseptično i inokulisani u ploče sa TSA agarom obogaćenim sa 10% FTS, sa endo agarom, krvnim agarom i inkubisane na temperaturi od 30°C tokom 5 dana. Sa triptoza soja agara i endo agara sumnjive kolonije smo presejali na 2% hranljivi agar radi dobijanja čiste kulture, koje su zatim identifikovane ispitivanjem ključnih fenotipskih obeležja i pomoću Api 20E sistema za enterobakterije. Pored toga ispitali smo oksidazu i katalazu.

Izolat (01-870) ispitan na patogenost. Za biološki ogled uzeta je mlađ šarana. Grupa se sastojala od 20 šarančića prosečne mase od 10 do 13 g koji su

bili držani u akvarijumu u aerisanoj statičkoj vodi na temperaturi od 11°C. Riba su bile injicirane i.p. sa 0,2 ml bakterijske supstancije koja je sadržala oko 10<sup>7</sup> c.f.u./ml. Sve inficirane ribe su svakodnevno posmatrane, a uginule i moribundne su ispitane bakteriološki.

### **Rezultati rada i diskusija / Results and discussion**

Do osamdesetih godina prošloga veka postojale su indicije da *Citrobacter freundii* može da prouzrokuje oboljenje kod riba. Ipak definitivni podaci nisu postignuti sve do radova Satoa i sar. 1982. [6] kada je organizam dokazan kao patogen za akvarijumske ribe, a devedesetih godina i kod gajenih riba. *Citrobacter freundii* bio je izolovan kod obolelih atlantskih salmonida u Španiji i SAD [3, 5] i kod šarana u Indiji [4].

Prva uginuća šaranskih vrsta riba započela su pri temperaturi vode od 11°C u periodu mart-april. Obolele ribe su mirne, nekoordinisanih pokreta i plutaju po površini vode. Ne reaguju na spoljašnje nadražaje i tamno su pigmentisane.

Spoljašnjim pregledom koji obuhvata kožu, peraja i pregledom prirodnih otvora kod svih primeraka primećena je povećana količina sluzne mase. Na koži su utvrđene erozije i otpadanje ljusaka. Difuzna krvarenja po koži i perajima. Kod svih primeraka utvrđen je obostrani egzoftalmus i krvarenje u očima. Na ventralnom delu trbuha utvrđena su difuzna krvarenja. Analni otvor je zacrvenjen. Škrge su blede usled anemije sa tačkastim krvarenjima, edematozne i kod pojedinih primeraka sa nekrozom vrhova škržnih listića.

Sekcijom je ustanovljeno da su svi unutrašnji organi, kao i zid ribljeg mehura, edematozni. U trbušnoj šupljini nalazi se mala količina crvenkaste tečnosti. Na unutrašnjim organima zapažaju se krvarenja, prvenstveno na unutrašnjem zidu ribljeg mehura, gonadama, crevima, mišićima, bubrezima i jetri. Slezina je povećana i nejednake boje. Zid creva je edematozan, lumen je proširen, bez sadržaja hrane, ispunjen krvavom tečnošću sa tačkastim i difuznim krvarenjima.

Naši rezultati patološko-anatomskog ispitivanja bili su identični sa rezultatima koje su dobili Karunasager i sar. 1991 [4] koji su kod šarana patološko-anatomskim pregledom utvrdili erozije i hemoragije po koži, fokalne nodule u bubrezima i druge tipične lezije za hemoragične septikemije, a razlikovali su se od rezultata koje su dobili Austin i sar. 1992. godine [2] kod kalifornijske pastrmke. Oni su utvrdili samo gastroenteritis, dok tipičnih spoljašnjih znakova bolesti nije bilo, osim jako izraženog mortaliteta.

Patološko-histološke promene smo utvrdili na jetri, bubrezima i crevima. U jetri u većem broju slučajeva utvrdili smo masnu degeneraciju jetre, odnosno nakupljanje masnih ćelija u jetri. Kod drugih primeraka utvrđene su zapaljenjske i nekrotične promene i slabija krvarenja u tkivu jetre.

Mikroskopskim pregledom tkiva bubrega utvrdili smo da su epitelije bubrežnih kanalića intaktne. Lumen bubrežnih tubula je vidljiv i potpuno prazan. U

intersticijumu bubrega, odnosno intertubularno ili perivaskularno jasno se uočava mononuklearni celularni infiltrat koji na pojedinim mestima pokazuje tendenciju međusobnog konfluisanja, obuhvatajući na taj način veća područja bubrežnog tkiva. Tu i tamo detektuju se slabija krvarenja.

Mikroskopski preparati creva ukazuju da je proprija mukoze infiltrirana inflamatornim ćelijskim elementima srednjeg intenziteta. Duž crevnog epitela mestimično se vide umnožene peharaste ćelije. U pojedinim preparatima crevne resice su hipertrofične sa tendencijom spajanja.

Zasejavanjem na TSA dobijen je naoko čist proziran bakterijski rast iz jetre, bubrega i creva iz svih obolelih riba. Formirane su okrugle, glatke konveksne kolonije prečnika 2 do 4 mm. Na krvnom agaru nisu izazvale hemolizu. Nisu izolovane bakterije iz 10 klinički zdravih riba. Na endo agaru obrazovale su srednje velike prozračne, bezbojne kolonije koje su podsećale na kolonije salmonela i šigela. Te kolonije su posle inkubacije od daljih 48 časova postale svetloružičaste, a posle 3 do 5 dana dobile su crvenu boju, jer su sporo razgrađivale laktozu. Kulture su sadržavale gram-negativne asporogene pokretne štapiće.

Tabela 1. *Biohemijske karakteristike izolata Citrobacter freundii inkubisanih na 30°C 48h*  
*Table 1. Biochemical characteristics of Citrobacter freundii isolates incubated at 30°C for 48h*

Reakcija / <i>Reaction</i>	Izolat iz šarana / <i>Carp isolate</i>	Izolat iz babuški / <i>Crusian carp</i>	Izolat Austin / <i>Isolate Austin</i>
ONPG	+	+	+
ADH	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
CIT	-	-	-
H <sub>2</sub> S	+	+	+
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	-	-
VP	-	-	-
GEL	-	-	+
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	-	-
SOR	+	+	+
RHA	+	+	-

(nastavak tabele 1)

Reakcija / <i>Reaction</i>	Izolat iz šarana / <i>Carp isolate</i>	Izolat iz babuški / <i>Crusian carp</i>	Izolat Austin / <i>Isolate Austin</i>
SAC	+	+	-
MEL	-	+	-
AMY	+	+	+
ARA	+	+	+
OX	-	-	-
KAT.	+	+	+

Izolati su bili osetljivi na flumekvin nalidističnu kiselinu, OTC i pojačane sulfonamide.  
*Isolates were sensitive to flumequin, nalidistic acid, OTC, and enhanced sulphonamides.*

Kao što je prikazano u tabeli 1 ispitani izolati iz šarana i babuški stvarali su katalazu,  $\beta$ -galaktozidazu,  $H_2S$ , ali ne i arginin dehidrolazu, lizin, ornitin dekarboksilazu i indol. VP reakcija je bila negativna. Želatin i ureja nisu bili degradirani.

Iz dobijenih rezultata naši izolati iz šarana i babuški nisu degradisali želatin, dok je izolat Austina [2] degradirao želatin. Na citrat nije korišćen.

Naši izolati su stvarali kiselinu iz glikoze, manoze, sorbitola, ramnoze, saharoze, amigdalina i arabinoze. Pored toga, izolat *Citrobacter freundii* iz babuški stvarao je kiselinu iz melebioze. Izolat Austina i sar. [2] nije stvarao kiselinu iz ramnoze, saharoze i melebioze. Upoređivanjem biohemijskih osobina naših izolata sa osobinama izolata koji je opisao Austin [2] došli smo do zaključka da postoje sojevi *Citrobacter freundii* koji slabije ili više razgrađuju ugljene hidrate. Iz dobijenih rezultata kulture su identifikovane kao *Citrobacter freundii*.

Znaci oboljenja i mortalitet od 50 posto posle biološkog oglada usledio je 8 dana od i.p. infekcije. Kod moribundnih i uginulih šarana utvrdili smo tačkasta i difuzna krvarenja po koži i perajima. Škrge su bile anemične sa tačkastim krvarenjima i otokom škržnih listića.

Sekcijom su utvrđeni peritonitis i krvavi transudat u trbušnoj šupljini. Jetra je svetloružičaste boje sa tačkastim krvarenjima. Slezina je uvećana sa zaobljenim ivicama. Bubrege je sivkaste boje. Zapaljenje creva sa sluzavim sadržajem.

*Citrobacter freundii* je izolovan iz svih uginulih i moribundnih riba. Štaviše patogen je reizolovan iz bubrega i jetre od svih preživelih riba na kraju oglada.

Iako je *Citrobacter freundii* uobičajen stanovnik u eutrofnim hladnim vodama [1] smatramo da je oboljenje nastalo nakon prezimljavanja posle hladne zime, sa većim brojem ledenih dana i čestim snežnim padavinama. Ribe su poikilotermni organizmi, tj. poprimaju temperaturu vode koja ih okružuje, pa svaka promena temperature veoma mnogo utiče na tok životnih procesa. Mlađ šaran-

skih vrsta riba je osetljivija od odraslih i najniža dozvoljena temperatura u ribnjaku za mlađ je od 0,1 do 0,2°C. Kod dugih zahlađenja, pri tim temperaturama smanjuje se otpornost organizma riba i pojavljuje se oboljenje koje prati masovno uginuće mlađi.

To je ujedno i prvi objavljeni izveštaj o utvrđivanju *Citrobacter freundii* kao uzročnika bolesti šaranskih vrsta riba u Srbiji.

#### Literatura / References

1. Allen D. A., Austin B., Colwell R. R.: Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. J. Gen. Microbiol. 129, 2043-2062, 1983. - 2. Austin B., Stobie M., Robertson P. A. W.: *Citrobacter freundii*: the cause of gastro-enteritis leading to progressive low level mortalities infarmed rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* walbaum, in Scotland; Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 12, 5, 166 -168, 1992. - 3. Baya A. M., Lupiani B., Hetrick F. M., Toranzo A. E.: Increasing importance of *Citrobacter freundii* as a Fish pathogen. Fish Health Section/AM. Fish. Soc. Newsletter 18, 4, 1990. - 4. Karunasagar I., Pai R.: Systemic *Citrobacter freundii* infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. fingerlings. J. Fish Dis, 15, 95-98, 1992. - 5. Sanz F.: Rainbow trout mortalities associated with a mixed infection with *Citrobacter freundii* and IPN virus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11, 222-224, 1991. - 6. Sato N., Yamane N., Kawamura T.: Systemic *Citrobacter freundii* infection among sunfish *Mola mola* in Matsushima aquarium. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49, 1551-1557, 1982.

**Napomena:** Sredstva za izradu ovog rada obezbeđena su iz projekta „Nekonvencionalna animalna proizvodnja” (Br. 505.0541B) Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije

#### ENGLISH

#### SYSTEMIC *CITROBACTER FREUNDII* INFECTION IN CARP

Svetlana Jeremić, Dobrila Jakić-Dimić

The paper describes a clinical disease in carp fish species which indicated a typical acute bacterial septicaemia caused by the gram-negative bacteria *Citrobacter freundii*. An unusual mortality of carp fish species was observed during low water temperatures at the beginning of the year.

A total of 39 samples were taken for laboratory examinations from diseased fish which had become darker, with expressed exophthalmus bleedings on the skin and eyes, and 10 samples from clinically healthy fish. Part of the altered organs: gills, parenchymatous organs and intestines were used for isolating the causes. The usual methods of bacteriological examinations were used for the investigations. Cultures were identified by examining key phenotype markings and using an Api 20E system as *Citrobacter freundii*.

Other parts of parenchymatous organs and intestines were fixed in 10% formaline prepared according to the standard histological method. Pathohistological examinations established inflammatory and necrotic changes in internal organs.

We succeeded in reproducing the disease with an artificial infection using a pure culture of *Citrobacter freundii*.

This is the first published report on establishing *Citrobacter freundii* as the cause of carp diseases in Serbia.

Key words: *Citrobacter freundii*, isolation, identification, carp fish species, biological experiment

## РУССКИЙ

### СИСТЕМНАЯ *CITROBACTER FREUNDII* ИНФЕКЦИЯ У САЗАНОВЫХ ВИДОВ РЫБ

Светлана Еремич, Добрила Јакич-Димич

В работе мы описали клиническое заболевание сазановых видов, которое указывало на типичную острую бактериальную септицемию, вызванную грам отрицательной бактерией *Citrobacter freundii*. В начале года при низких температурах воды замечена необычная смертность сазановых видов рыб.

Для лабораторных испытаний взяты 39 образчиков, заболевших рыб, потемневшие, с выраженным экзофтальмусом кровотечениями и по коже и в глазах и 10 образчиков клинически здоровых рыб. Часть измененных органов: жабры, паренхиматозные органы и кишки мы использовали для изолирования возбудителя. В испытаниях мы использовали обычные методы бактериологического осмотра. Культуры установлены испытанием ключевых фенотипных признаков и помощью Ари 20Е системы как *Citrobacter freundii*.

Вторую часть паренхиматозных органов и кишок мы фиксировали в 10% формалине мы подготовили стандартной гистологической техникой. Патогистологическим испытанием установлены воспалительные и некротические изменения на внутренних органах.

Искусственной инфекцией с чистой культурой *Citrobacter freundii* мы успели репродуцировать заболевание.

Это вместе и первое объявленное известие о установлении *Citrobacter freundii* как возбудителя болезни сазановых видов рыб в Сербии.

Ключевые слова: *Citrobacter freundii*, изоляция, идентификация, сазановые виды рыб, биологический опыт