



## НАУЧНА ИНФОРМАЦИЯ

### Оценка на болестите по някои видове риба, причинени от резистентни на антимикробни средства бактерии

Използването на антимикробни средства в рибовъдството е отражение на бързото развитие на аквакултурите в световен мащаб. Интензифицирането на аквакултурите за постигане на пазарните изисквания може да доведе до увеличаване на инфекциозните заболявания от патогенни бактерии. Следователно антимикробните средства действат като контрол на възникващите инфекциозни заболявания, но употребата им трябва да следва правилата и разпоредбите на страната, в която се извършва дейността. Въпреки че разпоредбите налагат ограничения за използването на антимикробни средства в рибовъдството, много проучвания показват, че **резистентните бактерии са изолирани от тази система все по-често**. Появата на резистентни бактерии не се ограничава само до използването на антимикробни средства, но и до съвместна селекция на резистентни гени или дори наличие на кръстосана резистентност. **Резистентните бактерии от рибовъдството будят сериозна загриженост, тъй като те могат да бъдат придобити от хората при процеса на отглеждане, развъждане на аквакултури или по агро-хранителната верига, което може да представлява проблем за общественото здраве.**

Глобалното производство на риба е дейност, която се разраства бързо и е **основен източник на храна за хората** (HEUER *et al.*, 2009; FAO, 2018). През 1961 г. консумацията на риба на глава от населението в света е 9,0 кг, което нараства до **20,3 кг през 2016 г.** (FAO, 2018), надвишавайки нормата от 12 кг на глава от населението годишно, предложена от Световната здравна организация (СЗО). Това увеличение на консумацията може да бъде оправдано от **търсенето на по-здравословна хранителна диета, където рибното месо и аквакултурите са добра алтернатива** (CREPALDI *et al.*, 2006). Според FAO (2014), **ръстът на населението, нарастващите доходи и урбанизацията са фактори, които допринасят за увеличаването на производството**. Въпреки това, възможната поява на **бактериални заболявания и необходимостта от лечение на животните също се увеличават** (SHOEMAKER *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2013). *Aeromonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Streptococcus sp.* и *Edwardsiella tarda* са основните патогени, които **причиняват заболявания при рибите**. Тези щамове са отговорни за различни инфекциозни заболявания, като **кожни лезии, абсцеси, кървене и сепсис; тези патогени увеличават заболяемостта и смъртността при рибите и причиняват значителни икономически загуби**. По този начин използването на антимикробни средства при лечението и профилактиката на заболявания е избрано като метод за решаване на този проблем (OKACHA *et al.*, 2018). Използването на тези антибиотични средства в аквакултурите е важно за успешното лечение на риби и

поддържането на здравето и благополучието на животните (*MIRANDA et al., 2013*). Въпреки това, употребата на тези лекарства трябва да бъде внимателно регулирана и контролирана. През последните години се наблюдава голямо увеличение на употребата на антимикробни средства (АМС), особено във водещи промишлени рибни стопанства.

Само във Виетнам употребата на антимикробни средства при производството на пангасиус достигна около 400 000 тона през 2010 г. (*RICO et al., 2012*). Производството на сьомга и употребата на АМС в Чили през 2000 г. е достигнало приблизително 200 000 тона, удвоявайки се до 400 000 тона през 2007 г. (*CABELLO et al., 2013*).

Употребата на този голям брой АМС в производството и във водите играе важна роля при селекцията на резистентни бактерии. Според проучването на *CABELLO et al. (2016)*, водната среда (сладководна и морска) може да служи както като резервоар на резистентни бактерии, така и като генен пуул, отговорен за антимикробната резистентност. Развитието и разпространението на резистентни бактерии, съчетано с наличието на антимикробни остатъци в околната среда, представляват опасни рискове за общественото здраве (*ROMERO et al., 2012; DONE et al., 2015*). Зависимостта от приложението на АМС показва как подобни действия трябва да се извършват с повишено внимание и може да доведат до сериозни проблеми както в производството (смъртност и икономически загуби), така и за здравето на хората.

В настоящото изложение е направена оценка на антимикробните резистентни бактерии, причиняващи инфекции, които представляват заплаха за здравето на някои отглеждани видове риби. Акцентът на тази оценка е върху атлантическата сьомга (*Salmo salar*), шаранът (*Cyprinus spp.*), дъговата пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*), морска каракуда (*Sparus aurata*) и тилапия (*Oreochromis spp.*), избрани като представителни за най-важните видове риба и производствени системи, които се отглеждат с търговска цел в соленоводни и сладководни стопанства. Представено е актуалното състояние на антимикробната резистентност в *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* и *Flavobacterium columnare*. Тези бактерии не е установено да са най-значими, но се наблюдава резистентност към антимикробни средства, в оценените изолати от видове отглеждани риби в ЕС. Има изключително оскъдни и ограничени налични научни доказателства по тази тема.

ЕОБХ е получила мандат от ЕК да проучи актуалното състояние в световен мащаб по отношение на резистентни патогени по животните, причиняващи заразни болести, да идентифицира най-значимите бактерии в ЕС, да обобщи настоящото или потенциалното въздействие върху здравето на животните от тези най-значими бактерии в ЕС (цел ToR 2) и да извърши оценка на тези бактерии, които да бъдат категоризирани в съответствие с критериите от Регламент (ЕС) 2016/429 относно заразните болести по животните (ToR 3).

Методологията, използвана в настоящото становище, е по *ad hoc* методът за оценка на болестите по животните, причинени от бактерии, резистентни към антимикробни средства, в рамките на АНЛ (Експертна група на ЕОБХ по АНАВ, 2021 г.).

Бактериалните видове, върху които трябва да се съсредоточи вниманието са: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare* и *Flavobacterium psychrophilum*. Изследвани са следните видове риби: атлантическа съомга (*Salmo salar*), шаран (*Cyprinus spp.*), дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*), морска каракуда (*Sparus aurata*) и тилапия (*Oreochromis spp.*). Тези отглеждани видове риба са избрани на база **най-често предлагане в търговската мрежа и най-висока консумация**.

Според ФАО основните държави производителки на избраните отглеждани видове риба са посочени на **фигура 1**. Годишният размер на производство на тези видове риба е както следва:

- През 2018 г. **общото производство на шарани** представлява повече от **4 190 000 тона**, което представлява 7,7% от общото производство на риба, отглеждана в рибовъдни стопанства. Между 1985 г. и 2002 г. общото производство на шаран се е увеличило със среден световен темп от 9,5 % годишно (ФАО, 2022). Голяма част от производството се осъществява в **Китай**.
- **Тилапия** е вторият най-важен вид риби след шараните и **най-широко разпространената във всяка държава**. През 2018 г. **производството на нилска тилапия възлиза на над 4 500 000 тона**, което представлява 8,3% от световното производство на риба. Най-големият производител на тилапия е **Китай** с над 1 200 000 тона годишно производство. **Индонезия** отчете близо 1 200 000 тона производство, следвана от **Египет, Бразилия, Тайланд и Филипините** (ФАО, 2020а). **Лаос, Коста Рика, Еквадор, Колумбия, Хондурас и Тайван** също са основни производители на тилапия. Въпреки че консумацията на тилапия е много често срещана в много части на света, в Европа съществува също голям потенциал за разширяване на пазара (ФАО, 2022).
- Отглеждането на **атлантическа съомга** започва през 19 век в Обединеното кралство, а отглеждането и в рибовъдни стопанства е регистрирано за първи път в Норвегия през 60-те години на миналия век с цел повишаване на производствените количества атлантическата съомга. Ранните успехи в Норвегия предизвикват развитието на развъждане на атлантическа съомга в Шотландия, а по-късно и в Ирландия, Фарьорските острови, Канада, североизточното крайбрежие на САЩ, Чили и Австралия. Незначително производство се наблюдава и в Нова Зеландия, Франция и Испания. В световен мащаб годишно се произвеждат над **2 400 000 тона атлантическа съомга**, което представлява 4,5 % от продукцията на риба (ФАО, 2020). Понастоящем най-бързо разрастващият се **доставчик е Чили**, която има по-ниски разходи за труд и материали и следователно може да се конкурира ефективно с традиционните страни

производителки. **Основните пазари** за консервирана атлантическа сьомга са **Япония, Европейският съюз и Северна Америка** (ФАО, 2022).

- Производството на **дъгова пъстърва** е било **850000 тона в световен мащаб** през 2018 г., което е 1,6% от общото световно производство на риба (ФАО, 2020), като **Иран е най-големият производител**. Други основни държави производителки са **Турция, Чили, Норвегия, Перу, Китай, Русия, Италия, Дания, Франция, Колумбия, САЩ, Полша, Обединеното кралство и Испания** (ФАО, 2020). Много други държави са докладвали за малко производство, като някои от тях представляват относително незначително производство в сравнение с по-големите производители (ФАО, 2022).
- През 2018 г. световното производство на **каракуда** е било **близо 230 000 тона**. **По-голямата част от производството се осъществява в Средиземно море**, като **най-големите производители са Турция и Гърция**. **Египет, Тунис, Испания и Италия също са основни производители**. В Европа значително производство се наблюдава и в **Хърватия, Кипър, Албания и Малта** (ФАО, 2020). В Червено море, Персийския залив и Арабско море също се произвежда и каракуда (ФАО, 2022).



Main producer countries of *Oncorhynchus mykiss* (FAO Fishery Statistics, 2006)



Main producer countries of *Oreochromis niloticus* (FAO Fishery Statistics, 2006)



Main producer countries of *Cyprinus carpio* (FAO Fishery Statistics, 2006)



Main producer countries of *Salmo salar* (FAO Fishery Statistics, 2006)



Main producer countries of *Sparus aurata* (FAO Fishery Statistics, 2006)

**Фигура 1:** Основни държави производителки на тилапия, дъгова пъстърва, шаран, атлантическа съомга и морска каракуда

Антимикробните средства, считани за клинично значими, са ампицилин, енрофлоксацин, флорфеникол, флумехин, оксолинова киселина, сулфонамид-триметоприм и окситетрациклин. Когато повече от едно антимикробно средство от даден клас е сметено за допустимо за включване в доклада, е взет под внимание следният ред на предпочитание за всеки антимикробен клас и бактериален патоген:

- За данните за резистентността към флуорохинолон редът е енрофлоксацин > ципрофлоксацин
- За данните за резистентността на аминопеницилин редът е ампицилин > амоксицилин
- За данните за резистентността на тетрациклин редът е тетрациклин > окситетрациклин > доксициклин > хлортетрациклин

Данните за резистентността се отчитат самостоятелно като резистентни (% R) и/или включват междинната категория (% R / + I). При оценката на наборите от данни са взети следните допускания и решения:

- Когато не е предоставена информация за категория +I, се приема за % R.
- Когато делът на чувствителността (% S) е докладван без информация за +I, не е възможно да се изчисли %R. Вместо това е изчислен %R + I като 100 % - % S.
- Когато са използвани епидемиологични гранични *cut-off* стойности (ECV), докладваните %R, се счита, че включват и %R + I, тъй като категория I винаги се наблюдава сред изолати от недив тип (NWT).
- Когато % I е докладвано отделно, се смята, че включва %R и изчислено %R + I.
- За някои лекарства и наличие на месА/месС няма категория I за включените бактериални видове; поради това за тези изолати само % R е докладвано.

Поради много ограничената информация, съответните данни за АМР от различните проучвания относно фенотипната резистентност към антимикробните средства и патогените, които представляват интерес, са извлечени и интерпретирани с използване на **гранични стойности на CLSI (CLSI, 2020)**.

### **ТоR 1: Глобално състояние на резистентни бактериални патогени по животните, които причиняват заразни болести**

Като се има предвид географското разпределение, данните за АМР са докладвани в три проучвания **от Африка** (всички от Египет), **две от Европа** (и двете от Швеция) и **две от Азия** (една от Ирак и друга от Тайланд).

Като цяло е **изключително трудно да се сравнят данните за АМР от различни проучвания** поради **разлики в структурата на изследването, популациите, методите, критериите за тълкуване** и т.н. Броят на резултатите от изследването за антимикробна чувствителност (AST) за всяко дадено антимикробно вещество, включва резултатите за *A. hydrophila* (n = 361, 61,3 % от всички AST) и *F. Psychrophilum* (n = 228, 38,7 %). Прилаганите **лабораторни методи** включват **диск дифузия, микроразреждане в бульон и посявки върху агар**.

Освен това **определението за АМР се различава в различните проучвания**, тъй като категория I, определена от клиничните гранични стойности (CBP), и не е включена във всички проучвания. Важно е също така да се спомене, че **не съществуват специфични за инфекцията и специфични за гостоприемника СВР за патогени при рибите**. Това усложнява тълкуването на данните. Взети заедно, резултатите от **всички разгледани проучвания** трябва да се тълкуват и цитират **предпазливо**.

Данните, включени в националните доклади за мониторинг на АМР са извлечени и са представени за съответната бактерия. Проведени са тестове за антимикробна чувствителност, като се използва методът за микроразреждане в бульон в съответствие с насоките на *CLSI (CLSI, 2020)*, а резултатите от изпитванията са интерпретирани, като се използват епидемиологичните гранични стойности (*ECOFF*), предложени от *Smith et*

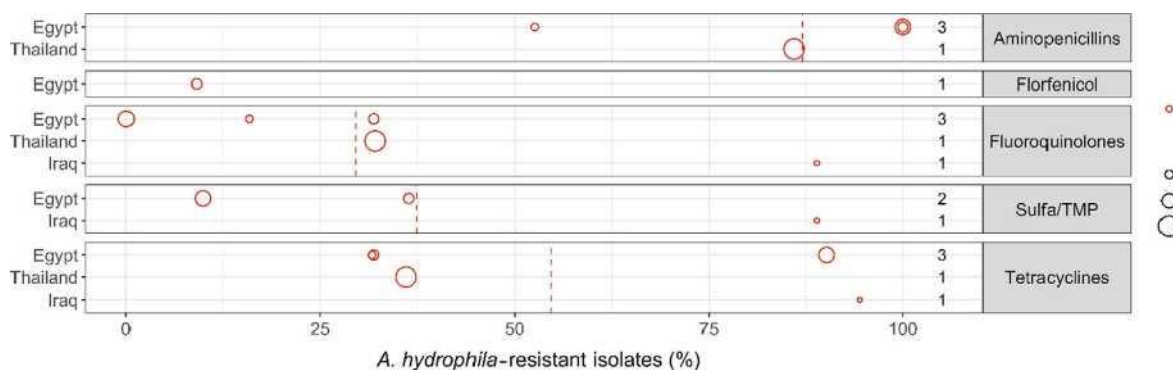
al. (2016).

### *Aeromonas hydrophila*

*Aeromonas hydrophila* (*Aeromonadales*; *Aeromonadaceae*) е опортюнистичен патоген по сладководните риби, който може да причини язви, кръвоизливи, фурункулоза и хеморагична септицемия, като по този начин застрашава здравето на животните и води до сериозни икономически загуби. Подходящ стандартен метод за изпитване за този вид е наличен в продължение на повече от десетилетие, но ECV са публикувани едва през 2020 г. (VET04) (CLSI, 2020).

Включени са общо пет проучвания с  $\geq 10$  *Aeromonas hydrophila* изолати и резултатите за едно или повече от съответните антимикробни средства (амицилин, енрофлоксацин, флорфеникол, флумексин, оксолинова киселина, окситетрациклин и сулфонамид — триметоприм). Тези проучвания включват изолати от Африка (всички от Египет) и два от Азия (Тайланд и Ирак). Всички изолати са извлечени от нилската тилапия (*Oreochromis niloticus*), с изключение на тези в проучването от Ирак, което включва изолат от шаран.

На **фигура 2** за всяка държава е показан дялът на резистентността, докладван в отделни проучвания с най-малко 10 изолати от *Aeromonas hydrophila*.



Всеки кръг представлява едно изследване, а размерът на всеки кръг отразява колко изолати са включени в изследването. Цветът на кръга илюстрира резистентността (червен кръг). Пунктираните линии показват, за всяко антимикробно средство, усреднената стойност на %R. Числата, изписани вляво на антимикробните наименования, отразяват броя на проучванията за определена комбинация лекарство/държава.

**Фигура 2:** Данни за резистентността на *Aeromonas hydrophila* за всяко включено проучване, сортирано по държави

В проучване на *Algammal et al., 2020* са оценени профилите AST за четири антимикробни средства (амоксицилин, ципрофлоксацин, сулфонамид -триметоприм и тетрациклин) на 61 изолати, като е използван метода на диск дифузия. Поради ограничените данни резултатите трябва да се тълкуват внимателно, тъй като може да не са показателни за действителната резистентност. Резултатите предполагат много високи нива на резистентност към амоксицилин (100 %) и тетрациклин (90,1 %) и ниски или много ниски нива на резистентност към сулфонамид-

триметоприм (9,9 %) и ципрофлоксацин (0 %).

Друго проучване от Египет относно бактериални изолати от нилска тилапия, използващо диск дифузия (*El-Bahar et al., 2019*), показва много високи нива на резистентност към аминопеницилините (в този случай ампицилин; 100 %), но значително по-високи нива за ципрофлоксацин (31,8 %) и сулфаметоксазол-триметоприм (36,4 %) и ниски нива на резистентност към флорфеникол (9,1 %).

Третото проучване от Египет (*Zaher et al., 2021*) също се основава на диск дифузия, но предоставя справка за класификация на изолати като чувствителни, междинни и устойчиви в различна среда и температура. Следователно резултатите трябва да се тълкуват внимателно. Наблюдават се ниски нива на резистентност към ампицилин сред 19-те изследвани изолати (52,6 %, като 32 % от останалите изолати са класифицирани като междинни). Делът на резистентни изолати също е нисък за тетрациклин (31,6 %) и за ципрофлоксацин (15,8 %).

В проучване от Тайланд (*Lukkana et al., 2012*) резултатите от AST, получени чрез метода на разреждане в агар на 50 изолати, извлечени от нилска тилапия, също са интерпретирани в съответствие с човешкото СВР. В този случай по-високият дял на резистентност е установен за амоксицилин (86 %), докато стойностите за енрофлоксацин и тетрациклин са по-ниски (съответно 32 % и 36 %), като много сходни стойности са получени и за окситетрациклин (34 %).

И накрая, в проучването от Ирак (*Taha et al., 2021*) 24 *A. hydrophila* са били тествани с помощта на метода за диск дифузия и резултатите са били интерпретирани и в съответствие с човешките гранични точки. В този случай са описани много високи проценти на резистентност за три антимикробни средства от съответните класове, т.е. ципрофлоксацин (89 %), доксициклин (94 %) и сулфонамид-триметоприм (89 %).

Само в едно проучване са докладвани данни за чувствителността на флорфеникол: проучване на *El-Bahar et al., 2019*, където е установено, че 9 % от 22 египетски изолати са резистентни на това антимикробно средство.

Тук е важно да се отбележи трудността да се направи разграничение между различните видове *Aeromonas* въз основа на фенотипни признаци или дори 16S rRNA генно секвениране (*Beaz-Hidalgo et al., 2010*) и следователно, в някои от тези статии, определянето на изолати на *Aeromonas* вид или комплекс трябва да се приема с повишено внимание.

*Scarano et al. (2018 г.)* е използвал методът за микроразреждане в бульон за определяне на MIC на 15 антимикробни продукта срещу 104 *Aeromonas spp.*, изолирани от *Sparus aurata* в Италия, 21 от които са били причислени към *A. hydrophila* или *A. hydrophila complex*, използвайки фенотипни методи и 16S rRNA секвениране. Стойностите на MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> и ECV и разпределението между различните категории са изчислени за цялата колекция от *Aeromonas*. Резистентността (% R + I) към аминопеницилините варира от 59,60 % за ампицилин до 57,7 % за амоксицилин, докато много по-ниски стойности са получени за оксолинова киселина (37,5 %), флумехин (22,1 %), флорфеникол (2,9 %) и окситетрациклин (19,2 %).

Докладват се различни нива на чувствителност към амоксицилин и/или



ампицилин в бактериалните изолати, въпреки че мезофилните *Aeromonas* се считат за неразривно устойчиви на аминопеницилини (CLSI, 2016 г.), като по този начин се подчертават трудностите, свързани с оценката на фенотипната резистентност в изолатите на *A. hydrophila* (и в бактериалните изолати от водни животни като цяло), процес, при който малките вариации могат да доведат до значителни вариации в резултатите.

### *Flavobacterium psychrophilum*

*Flavobacterium psychrophilum* (Flavobacteriales; Flavobacteriaceae) е бактериален причинител в студени води (BCWD), причиняващ инфекциозно заболяване при дъгова пъстърва (RTFS). Тези инфекции могат да бъдат свързани с висока смъртност по-специално при младите риби.

CLSI (VET03) (CLSI, 2020) публикува стандартни методи с подходящ контрол на качеството за определяне на MIC стойностите на *F. psychrophilum*. Някои ECV, приложими за данните, генерирани от тези тестове, са публикувани в VET04 (CLSI, 2020).

Включени са две шведски проучвания с  $\geq 10$  *F. psychrophilum* изолати и резултати за един или повече от съответните антимикробни средства. И двете проучвания включват главно изолати от дъгова пъстърва. Нито едно от проучванията не е установило резистентност към флорфеникол, докато 75 % (Soderlund et al., 2018) и 55 % (Swedres-Svarm, 2019) от изолатите са резистентни към оксолинова киселина. Малко по-високи нива на резистентност са открити към окситетрациклин (80 % и 76 %), като за всички лекарства се използват ориентировъчните ECOFF, предложени от Smith et al. (2016) за тълкуване на данните за чувствителността.

Честотата на НВТ (% R + I), установена в тези изследвания, е представена в таблица 1 за всички антимикробни средства с изключение на флорфеникол, който е изследван във всички изолати, но за които са открити само при диви щамове.

**Таблица 1:** Дял на изолати от недив тип (% NWT) съгласно ECV, предложен от CLSI (VET04), открити в изолати *F. psychrophilum*, за които има налични необработени MIC данни

Държава	Дата на изолацията	Брой изолати	Антимикробно	% НВТ
Дания	1988 —2012	31	Оксилинова киселина	75
			Окситетрациклин	25
Обединеното кралство	2006—2013	22	Оксилинова киселина	70
			Окситетрациклин	65

Обединеното кралство	2005-2015	118	Оксилинова киселина	70
			Енрофлоксацин	80
			Окситетрациклин	51
САЩ	2008—2013	50	Оксилинова киселина	0
			Енрофлоксацин	0
			Окситетрациклин	24
Турция	2014 -2017	25	Оксилинова киселина	88
			Енрофлоксацин	88
			Окситетрациклин	51

Следва да се отбележи, че трите европейски проучвания показват, че **делът на фенотиповете на NWT, резистентни към хинолоните е висок (70—88 %)**, докато в проучването от САЩ се съобщава само за фенотипове от див тип, които са резистентни към оксолинова киселина или енрофлоксацин. Това би могло да отразява разликите в употребата на антимикробни средства в аквакултурите между двата региона, тъй като няколко членове на този клас антимикробни средства (флумехин, оксолинова киселина и енрофлоксацин) са получили разрешение за употреба в някои европейски държави, докато употребата им в САЩ не е разрешена.

В едно от проучванията е определена чувствителността към антимикробни средства, които обикновено се използват в чилийското рибовъдство. Общо 125 чилийски *F. psychrophilum* изолати от отглеждани пъстървови риби са анализирани чрез изчисляване на MIC агар гел метод. Те използват анализ на нормализираната резистентност (NRI), за да изчислят ECV ( $CO_{wt}$ )  $\leq 0,125$ ,  $\leq 2$  и  $\leq 0,5$  mg/ml съответно за амоксицилин, флорфеникол и окситетрациклин. За хинолоните  $CO_{wt}$  е  $\leq 1$ ,  $\leq 0,5$  и  $\leq 0,125$  mg/ml съответно за оксолинова киселина, флумехин и енрофлоксацин. Тези стойности на  $CO_{wt}$  по принцип са с две разреждания по-ниски от консенсусните ECV, определени от VET04 за MIC, генерирани при едни и същи условия на инкубация чрез стандартния метод за микро Разреждане. Честотите на фенотиповете на NWT, изчислени от Miranda et al. (2016) чрез прилагане на  $CO_{wt}$ , са много сходни с тези за европейските проучвания, както е показано в таблица 3.

**Таблица 2:** Епидемиологични гранични стойности ( $CO_{wt}$ ) и дял на изолати на NWT сред колекцията от 125 изолати на *F. Psychrophilum*, извлечени от отглеждани пъстървови риби в Чили, както е описано в Miranda et al. (2016)

Антимикробно средство	Данни от МИС	
	COwt ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	НВТ (%)
Амоксицилин	$\leq 0,125$	24
Флорфеникол	$\leq 2$	2
Окситетрациклин	$\leq 0,5$	70
Оксилинова киселина	$\leq 1$	45
Флумехин	$\leq 0,5$	39
Енрофлоксацин	$\leq 0,125$	38

*Hesami et al. (2010)* в Онтарио (Канада) са изследвани **72 изолати от пъстървови риби** (дребна пъстърва, атлантическа съомга и пъстърва *Salvelinus fontinalis*), като е използван метод **AST за микроразреждане в бульон**, който се различава от стандартния метод, посочен в VET03. Трябва да се вземе предвид, че данните, представени в настоящия документ не са достатъчни и стойностите на МИС за някои АМС показват **ниски пикове, характерни за диви видове**. Много различните разпределения на много сходните АМС - оксолинова киселина и флумехин са несъвместими с данните от други проучвания. Това **много затруднява определянето на подходящи гранични стойности или извършването на надеждна оценка на честотите на фенотиповете на резистентност при NWT**.

Информация за АМР в изолати *F. Psychrophilum* от пъстървова риба с произход развъдници, е включена в последните годишни доклади за две антимикробни средства, които представляват интерес в настоящото становище (флорфеникол и оксолинова киселина). Данните са докладвани в продължение на няколко години заедно, което възпрепятства извличането на годишни резултати, но резултатите за периода 2004—2018г. показват, че е налице **увеличение на процента резистентни към хинолони изолати (налидиксова киселина/оксолинова киселина) от нива под 40 % преди 2010 г. до над 50 % след настоящата година, като дялът на резистентни изолати през периода 2014—2018г. варира приблизително 40—75 %**.

### *Aeromonas salmonicida*

*Aeromonas salmonicida* (*Aeromonadales; Aeromonadaceae*) може да причини **улцерозни и хеморагични кожни язви при риби под стрес и е причинител на няколко болести по рибите** (фурункулоза, язвена болест на златните рибки и *erythrodermatitis* при шарани).

Ранни проучвания за определяне на възможните ECV за *A. salmonicida* са направени от два научни екипа: *Miller и Reimschuessel (2006)*, които оценяват фенотипа на резистентност към четири антимикробни продукта в 217 изолати от риба, получена в осем държави в Северна Америка и Европа. Прилагайки ECV във VET04, всички

изследвани изолати имат фенотипи на резистентни WT към флорфеникол, докато делът на изолати от NWT резистентни към другите антимикробни средства е 9 % (орметоприм-сулфадиметоксин), 13 % (оксолинова киселина) и 25 % (окситетрациклин). Интересното е, че MIC на оксолиновата киселина, получена в изолати от САЩ, е постоянно по-ниска от тези стойности при изолати от други държави (като всички щамове на САЩ спадат в популацията от диви видове за този антимикробен тип), което отново показва възможен ефект от различната употреба на антимикробни средства в аквакултурите в зависимост от държавата. *Smith et al. (2007)* използва диск дифузия за изследване на чувствителността на 106 изолати от пет европейски държави. Прилагайки ECV във VET04 към данните, получени в тези проучвания, всички изследвани изолати имат фенотипове от див тип за резистентност към флорфеникол, докато делът на резистентни изолати от недивия тип (NWT) към други антимикробни средства е 25 % (триметоприм-сулфаметоксазол), 56 % (оксолинова киселина) и 48 % (окситетрациклин).

Неотдавнашно проучване, чрез диск дифузия и микроразреждане в бульон, включва информация за AMP за три антимикробни средства, представляващи интерес за 74 *A. salmonicida* изолати от заболели риби във Франция (*Baron et al., 2021*). Резултатите показват, че делът на резистентните щамове от NWT е бил най-висок за оксолиновата киселина (95 -96 %), среден за тетрациклин (59 - 66%) и най-нисък за флорфеникол (24 - 27 %).

Има известни още две MIC проучвания, предоставящи данни за чувствителността на *A. salmonicida*. И двете са използвали стандартния метод за изпитване CLSI (VET03) и са тълкували своите данни с ECVs в VET04. CEFAS изследва 50 изолати в Обединеното кралство и демонстрира, че честотата на резистентност при NWT е 2 % за флорфеникол, 30 % за оксолинова киселина и 16 % за окситетрациклин. ANSES изследва 154 френски изолати и демонстрира, че честотата на резистентност при NWT е 18 % за флорфеникол, 91 % за оксолинова киселина и 51 % за окситетрациклин.

*Duman et al. (2020)* изследва 102 изолати на *Aeromonas*, открити от множество видове риби, някои от които имат клинични признаци в Турция. Те категоризират 18 % от изолатите си като *A. salmonicida*. *A. salmonicida* е видът с най-голям дял изолати, носещи гени на резистентност към флорфеникол, сулфонамид и тетрациклин. Гените на резистентността са много чести в изолати, които са фенотипно див тип, е трудно да се знае каква стойност да се даде на тези генетични изследвания. Тетрациклин е единственият антибиотик, за който са представени MIC данни конкретно за изолатите на *A. salmonicida*. Има твърде малко изолати от див тип, за да се даде възможност за анализ на тези данни за *A. salmonicida* резистентност към тетрациклин.

**Таблица 3:** Честота на фенотиповете на NWT в проучванията на *A. salmonicida*

	Miller and Reimschuessel (2006)	Smith and colleagues	Baron et al. (2021)	ANSES	CEFAS
Метод	MIC	Диск дифузия	MIC	MIC	MIC

брой изолати	217	106	74	50	154
флорфеникол	0	0	25	18	2
окситетрациклин	25	48	—	51	16
оксилинова киселина	13	56	95	91	30
триметоприм- сулфаметоксазол	—	25	—	—	—
орметоприм- сулфадиметоксин	9	—	—	—	—

### *Flavobacterium columnare*

*Flavobacterium columnare* (*Flavobacteriales*; *Flavobacteriaceae*) е Грам-отрицателна бактерия, често изолирана от сладководни води. Бактерията причинява инфекциозни заболявания при голямо разнообразие от диви и култивирани сладководни риби по целия свят.

За *F. columnare* са известни две проучвания, които включват резултати от клинични *F. columnare* щамове от риби.

*Declercq et al. (2013)* са направили оценка на антимикробната чувствителност *in vitro* на 97 *F. columnare* изолати, изолирани в световен мащаб между 1987 г. и 2011 г. от 17 вида риби, използвайки техниката за микроразреждане в бульон. Нито един от изолатите не показва придобита резистентност към флорфеникол, гентамицин, орметоприм-сулфаметоксин и триметоприм-сулфаметоксазол. Придобита резистентност към хлорамфеникол е открита в 1 %, към нитрофуран в 5 %, към окситетрациклин в 11 % и към енрофлоксацин, флумехин и оксолинова киселина съответно в 10 %, 16 % и 16 % от изолатите. Изолати, показващи придобита резистентност, произхождат от видове, различни от тези, които представляват интерес в настоящото проучване (видове декоративни риби или вьетнамски сом).

*Gieseke et al. (2016)* чрез използване на оптимизирания протокол на метода за микроразреждане в бульон анализира чувствителността на 120 *F. columnare* изолати срещу антимикробни средства, често използвани в аквакултурите, включително ампицилин, еритромицин, флорфеникол, окситетрациклин, енрофлоксацин, флумехин, оксолинова киселина, гентамицин, орметоприм/сулфадиметоксин и триметоприм-сулфаметоксазол. Изолатите са получени от пет различни държави и 20 вида риба, включително различни пъстървови риби, шаран и сом, наред с други. Честотите на изолати от NWT за *F. columnare* са 3,3 % за ампицилин и флорфеникол, 5,8 % за еритромицин, 5 % за окситетрациклин и енрофлоксацин, 7,5 % за флумехин и 6,6 % за оксолинова киселина.

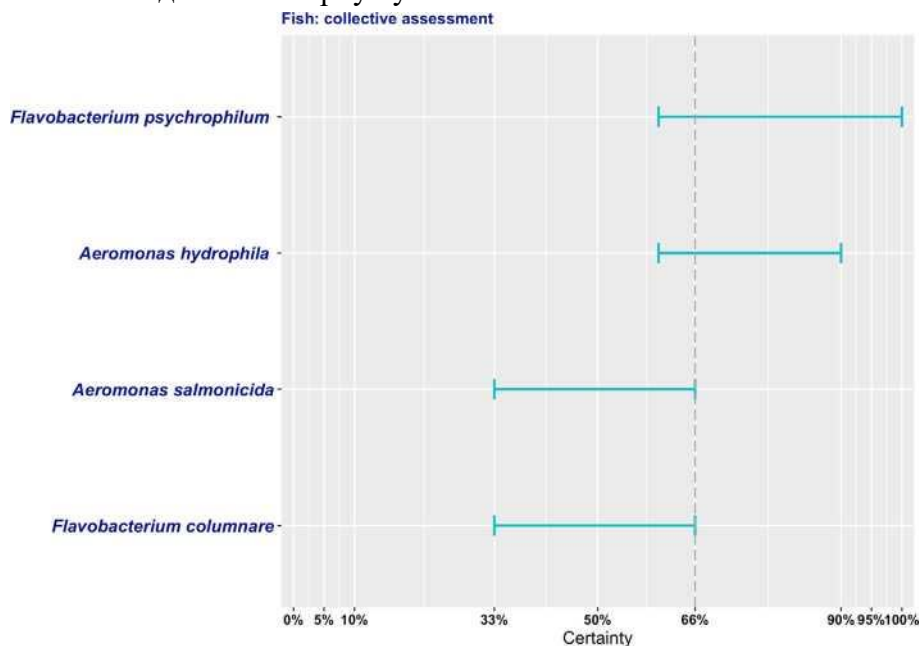
### ТоR 2: идентифициране на най-важните бактерии в ЕС

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



В съответствие с методологията, представена в научното становище относно *ad hoc* метода за оценка на болестите по животните, причинени от бактерии, резистентни към антимикробни средства, в рамките на AHL (Експертна група по ANAW на ЕОБХ, 2021), въз основа на наличните доказателства не е възможно да се определи с достатъчна сигурност (т.е. > 66 %) някой от патогените, оценени сред най-значимите бактерии, резистентни към антимикробни средства при определени видове отглеждани риби в ЕС. *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare* и *Flavobacterium psychrophilum* са много важни патогени в ЕС по отношение на видовете риби, разглеждани тук, поради широкото им разпространение и честото използване на антимикробни средства, необходими за тяхното лечение, с възможно изключение на *A. salmonicida*, за които има ефективни ваксини. Като се имат предвид много ограничените налични терапевтични възможности, които са лицензирани за лечение на инфекции при риби, резистентността към някой от тези лицензирани антимикробни средства е от голямо значение. Доказателства за широко разпространена резистентност към някои от тези антимикробни средства (напр. тетрациклини и хинолони) са открити за четирите патогена, което допълнително ограничава алтернативите за лечение. Намалени нива на чувствителност (т.е. повишаване на стойностите на MIC) към антимикробни средства, които обикновено се използват в аквакултурите, като тетрациклин, окситетрациклин и триметоприм, са докладвани при *Aeromonas* още през 1991 г. (Inglis et al., 1991). Докладваното широко разпространение на щамове с намалена чувствителност по-специално към тетрациклини (> 30—40 %) се дължи на широко разпространената употреба на този антимикробен клас в аквакултурите за лечение на инфекции, дължащи се на патогенни видове *Aeromonas* (Duman et al., 2020). Въпреки това в оценката са установени много неясноти, които възпрепятстват включването на който и да е от четирите патогена сред най-значимите резистентни бактерии, изолирани от различните видове риби, включително липсата на клинични гранични стойности (и наличието на стандартизирани ECVs, въведени едва наскоро) и възможните географски различия в разпространението на фенотипно резистентни щамове. Въпреки това *F. Psychrophilum* и *A. hydrophila* са двата най-високо оценени бактериални вида поради високото разпространение на инфекции, причинени от тези патогени сред отглежданите видове риби, и ограничените възможности за предотвратяване/ограничаване на инфекциите. За *A. salmonicida* наличието на ефективни ваксини води до по-ниска оценка, въпреки че трудностите, свързани с ваксинацията (напр. разходи, необходимост от индивидуално третиране на всяка риба) могат да доведат до употребата на антимикробни средства. И накрая, *F. columnare* също е класирана по-ниско поради наличието на други превантивни мерки, свързани с подобряване на животновъдството, които също могат да спомогнат за ограничаване на въздействието му, без непременно да се разчита само на антимикробно лечение. Следва обаче да се отбележи, че повечето държави в рамките на ЕС са издали лиценз само за много ограничен брой антимикробни средства (3—5) за употреба при риби. Следователно резистентността към някой от тези агенти може да има пропорционално по-голямо въздействие върху наличните терапевтични възможности за лечение и следователно потенциално по-

голямо въздействие върху хуманното отношение към животните.



**Фигура 3:** Степен на сигурност за включването на избраните антимикробни резистентни патогени на някои видове отглеждани риби сред най-важните в ЕС

## Заклучения

В настоящото становище ЕОБХ представя резултатите от оценката, извършена с цел да се отговори на ToR 1 (глобално състояние на бактериите, резистентни на антимикробни средства от животински произход) и на първата част от ToR 2 (определяне на най-значимите резистентни бактерии в ЕС) съгласно *ad hoc* методологията (Експертна група на ЕОБХ по АНАВ, 2021 г.). Втората част от ToR 2 и ToR 3, няма да бъдат оценени, тъй като нито един от патогените в обхвата на настоящото становище не е включен сред най-важните патогени, резистентни на антимикробни средства, в избраните видове отглеждани риби за ЕС. ЕОБХ е обобщила актуалното състояние в световен мащаб по отношение на АМР при някои видове отглеждани риби (атлантическа сьомга, шаран, дъгова пъстърва, морска каракуда и тилапия) за следните бактериални видове: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare* и *Flavobacterium psychrophilum*.

Въз основа на наличните доказателства и експертното становище **нико един от оценените бактериални видове не е включен сред най-значимите патогени, резистентни на антимикробни средства при риби в ЕС.** Въпреки това *F. Psychrophilum* и *A. hydrophila* са класирани по-високо от другите патогени въз основа на ограничените получени доказателства, което предполага, че резистентността към някои клинично значими антимикробни средства може да не е рядкост и да остане скрита поради ограничените възможности за тяхната профилактика и контрол извън антимикробното лечение.

Научната оценка на цялостното състояние на резистентните бактериални патогени на някои видове отглеждани риби и на тяхното значение за ЕС е

**възпрепятствана от няколко важни източника на несигурност, главно поради липсата на данни и методологията, следвана в тази оценка:**

- Поради обхвата на ELR само проучвания, публикувани през последните 10 години и на английски език, са сметени за допустими, като по този начин се въведе евентуално отклонение при подбора.
- **Информацията в проучванията, извлечени в ELR, е ограничена и много разнородна, което затруднява много подробната оценка на представителността на изолати, включени във всяко проучване. Например невинаги е било възможно да се разграничат данните за АМР от клиничните и екологичните щамове. Освен това изолати, включени в прегледаните изследвания, често произхождат от животни, подложени на предходно антиминобно лечение, което може да е довело до по-високи нива на резистентност в изследваните изолати. В действителност колекциите от щамове, налични във ветеринарните диагностични лаборатории, на които се основават няколко от разгледаните изследвания, може в голяма част от случаите да са произхождали от огнища на болести, които не са били първоначално ефективно контролирани чрез антиминобно лечение. Освен това щамове с намалена чувствителност към АМС по-често се съхраняват в исторически колекции и сбирки от щамове в диагностичните лаборатории, като по този начин се допринася за пристрастност в тълкуването на резултатите за резистентност към антиминобни средства.**
- Въпреки че в оценката са включени само проучвания с минимален праг на качество, използваната методология също е била разнообразна (напр. използване на методи за дифузия на диска или микроразреждане, СВР или ЕСОФФ и т.н.). Поради това представените резултати следва да бъдат внимателно разгледани, тъй като те може да не са представителни за действителното положение, особено в случаите, в които размерът на извадката е бил малък.

## Препоръки

Данните за АМР при бактериалните патогени са **необходими за подобряване на здравето на животните, насърчаване на рационалното използване на антиминобни средства и идентифициране на специфични терапевтични предизвикателства, дължащи се на АМР.**

Налице е **спешна необходимост от качествени данни за чувствителността на бактериите, изолирани от водни животни.** Данни с подходящо качество могат да бъдат генерирани единствено чрез използването на стандартизирани методи и международно хармонизирани критерии за тълкуване.

Вече съществуват стандартизирани методи за много от най-важните бактериални видове (*Smith, 2019*). Настоящата **спешна необходимост е да се увеличи броят на специфичните за отделните видове критерии за тълкуване на данните, генерирани от тези методи.**



Antibiotic	How resistance is reported (% R or %R + I)	Weighted arithmetic mean proportion of resistance (%)	Maximum resistance % observed	Minimum resistance % observed	Standard deviation (SD)	Bacterial species/genus
Aminopenicillins	R	87.1	100	52.6	16.1	<i>A. hydrophila</i>
Fluoroquinolones	R	29.6	88.9	0	26.1	<i>A. hydrophila</i>
Sulfa/TMP	R	37.4	88.9	9.9	31.8	<i>A. hydrophila</i>
Tetracyclines	R	54.7	94.4	31.6	27.8	<i>A. hydrophila</i>
Florfenicol	R + I	0	0	0	0	<i>F. psychrophilum</i>
Oxolinic acid	R + I	58.5	75	55	7.6	<i>F. psychrophilum</i>

**Фигура 4:** Точни проценти на антибиотична резистентност, интермедийерни стойности на резистентност и чувствителност на микроорганизми, изолирани от някои видове риби, отглеждани в контролирани развъдници

#### Изготвил:

Красимира Захариева,  
Главен експерт в дирекция „ОРХВ“

#### Използвана литература:

- *Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area - Milva Pepi and Silvano Focardi*
- *Assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: kept fish species - EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW)*
- *Integrated poultry-fish farming system encourages multidrug-resistant gram-negative bacteria dissemination in pond environment and fishes - Folasade M., Adeyemia Olabisi, O. Ojob Anthony, A. Badejof Omotayo, O. Oyedaraac Janet, O. Olaitana Charles, O. Adetunjid Daniel, I. Heffte Adeniyi, A. Ogunjobif Sunday, B.Akinde*
- *Antimicrobials and resistant bacteria in global fish farming and the possible risk for public health - Luís Eduardo de Souza Gazal, Kelly Cristina Tagliari de Brito, Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Gerson Nakazato, Lissandra Souto Cavalli, Luciana Kazue Otutumi, Benito Guimarães de Brito*
- *Prevalence and Antimicrobial Resistance of Escherichia coli, Salmonella and Vibrio Derived from Farm-Raised Red Hybrid Tilapia (Oreochromis spp.) and Asian Sea Bass (Lates calcarifer, Bloch 1970) on the West Coast of Peninsular Malaysia - Rita Rosmala Dewi, Latiffah Hassan, Hassan Mohammad Daud, Mohd. Fuad Matori, Fauziah Nordin, Nur Indah Ahmad and Zunita Zakaria*
- *Bacteriological Assessment and Antibiotic Susceptibility Profile of Bacteria Recovered from Clarias gariepinus Selected from Various Fish Farms in Anambra North Senatorial Zones in Anambra State, Nigeria - Chioma M. Ogbukagu, Chikodili G. Anaukwu, Chito C. Ekwealor, Anthonia N. Mba, Ikechukwu A. Ekwealor*
- *Antibiotic susceptibility pattern of fish pathogens: A new approach of emerging the bacterial resistance through biofilm formation in in-vitro condition - Mrityunjoy Acharjee,*

*Rezaul Hoque, Shawda Shafiq Shreya, Nafisa Tabassum, Mahima Ranjan Acharjee, Md. Rezanujjaman, Moshfiqur Rahman, Al Amin, Md. Rayhan Mahmud*

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0

