

УДК 57.083.18:579.843:597.554.3

АПРОБАЦИЯ СИСТЕМЫ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ ОБЫКНОВЕННОГО КАРПА *CYPRINUS CARPIO LINNAEUS, 1758*

© 2012 Е.В. Дзюба¹, Н.Н. Деникина¹, Ю.Л. Кондратистов², Н.Л. Белькова^{1,3}¹ Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск² Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория³ Иркутский государственный университет

Поступила в редакцию 17.04.2012

Факторами, сдерживающими успешное развитие пресноводного рыбоводства, являются заболевания рыб различной этиологии. С помощью разработанной системы праймеров апробированы высокочувствительные методы детекции патогенных микроорганизмов родов *Aeromonas* и *Flavobacterium* в аквакультуре карпа. В язвенных поражениях внешних покровов рыб идентифицированы микроорганизмы *Flavobacterium psychrophilum* и *Aeromonas* sp. Обсуждаются возможные пути возникновения комплексных эпизоотий и целесообразность применения разработанных диагностических систем на рыбоводных заводах для мониторинга микробиоты в аквакультуре рыб и своевременной коррекции графика проведения санитарно-эпизоотических мероприятий.

Ключевые слова: *Cyprinus carpio*, молекулярно-генетические методы, *Aeromonas*, *Flavobacterium*

По данным ФАО рыба и рыбопродукты являются одним из главных источников белка для человека, на их долю приходится более 80% общего объема потребляемых морских продуктов. Поскольку вылов рыбы традиционной рыбной ловлей остается постоянным (статистика ФАО по рыбоводству), существующая нехватка в рыбе и рыбопродуктах должна быть восполнена за счет рыбоводства [1]. В настоящее время технология разведения гидробионтов в мари- и аквакультуре превратилась в динамично развивающийся сектор на международном рынке, обеспечивающий около 25% всего мирового потребления рыбы. При этом Российская Федерация по наличию водоемов, отвечающих требованиям культивирования гидробионтов, занимает первое место в мире [2]. Факторами, сдерживающими успешное развитие пресноводного рыбоводства, являются заболевания рыб различной этиологии.

Наиболее широко распространённым и наносящим значительный ущерб предприятиям аквакультуры бактериальным заболеванием является бактериальная геморрагическая септицемия (БГС, аэромоноз) – полиэтиологическое заболевание

рыб [3]. Традиционно работы по эпизоотической оценке рыбоводных предприятий выполняются с проведением бактериологических исследований выращиваемых рыб, кормов и воды. Посевы проводятся непосредственно из биологического материала на селективные питательные среды, культивирование отдельных групп микроорганизмов занимает от 5 до 10 сут. Длительность процедуры постановки диагноза и возможные ошибки, связанные с несвоевременностью получения результатов, нередко приводят к неправильному выбору лекарственных средств и как следствие – к ухудшению эпизоотической ситуации. В связи с этим актуальной является разработка современных чувствительных экспресс-методов детекции патогенных агентов в конкретных водных объектах. Множество исследований посвящены оценке возможности использования молекулярно-генетических методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для детекции и идентификации возбудителей инфекций [4-6]. Прямой анализ маркерных фрагментов геномов позволяет избежать проблем культивирования и неспецифической детекции, а также эффективно и быстро выявлять целевые группы микроорганизмов в пробах биологического материала. Диагностика бактериальных инфекций на основе видо-специфичной амплификации активно развивается и применяется в странах с развитой мари- и аквакультурой (Норвегия, Канада и др.) [7-11].

Рыбное хозяйство занимает существенное значение в экономической инфраструктуре Байкальского региона. В Иркутской области работают Бурдугузский рыбоводный завод на Иркутском водохранилище (ввод в эксплуатацию в 1968 г.) и Бельский – на р. Белой (ввод в 1964 г.). По

Дзюба Елена Владимировна, кандидат биологических наук, исполняющая обязанности заведующего лабораторией. E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Деникина Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник. E-mail: denikina@lin.irk.ru

Кондратистов Юрий Леонидович, заведующий отделом. E-mail: imvl2004@mail.ru

Белькова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник. E-mail: belkovan@mail.ru

данным ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория» ранее отмечались случаи возникновения заболеваний молоди карпа в бассейнах Бурдугузского рыбзавода, вызванные *Aeromonas hydrophila* (экспертиза № 137 от 24.01.2003 г.). С 2004 г. предприятие не функционировало и было вновь запущено в 2011 г. в рамках программы «Развитие рыбохозяйственного комплекса региона на 2012-2016 годы». Одна из целей проекта – создание условий для рыборазведения и производства рыбной продукции. Для успешного её достижения необходим мониторинг инфекционных заболеваний объектов культивирования с использованием современных методов детекции патогенных агентов.

Цель работы: разработка методов высокочувствительной детекции патогенных микроорганизмов родов *Aeromonas* и *Flavo-bacterium* на внешних покровах карпа *Cyprinus carpio*.

Материалы и методы. В сентябре 2011 г. на Бурдугузском рыбозаводе заводом началась эпизоотия язвенной болезни среди маточного стада карпа. На исследование был взят один экземпляр карпа с множественными обширными язвенными поражениями на внешних покровах тела (рис. 1).

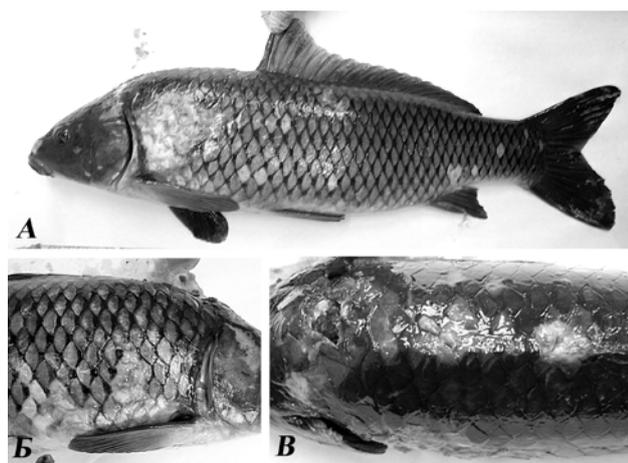


Рис. 1. Обширные поражения внешних покровов карпа: общий вид (А), возле грудных плавников и на жаберных крышках (Б), дорсальная поверхность тела возле спинного плавника (В)

Длина тела (до конца чешуйного покрова) самки карпа составила 540 мм, масса 2870 г. Непосредственно после отлова в лабораторных условиях были взяты соскобы и образцы тканей с пораженных участков тела, выделена суммарная ДНК с использованием коммерческого набора ДНК-сорб В (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) по протоколу фирмы-производителя. Фрагменты гена 16S рРНК амплифицировали как с разработанными в данном исследовании, так и с опубликованными ранее [12] праймерами, специфичными для представителей родов *Aeromonas* (AF1 5'-gataagttatgatgtaaagccccc и AHyd2 5'-ggggccttcacatctaacttатс

и *Flavobacterium* (Ff1 5'-tctaccttttacagaggatagc и Fr1 5'-gacgacaaccatgcagcacc). Реакцию амплификации проводили в режиме: 96°C 10''; 66°C 20''; 72°C 60'' 35 циклов. Полученные ампликоны, длиной 544 и 925 п.н., соответственно, лигировали в вектор GeneJET™ (GeneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas, Литва). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в Новосибирском приборном центре коллективного пользования СО РАН.

Результаты и обсуждение. Результаты ПЦР анализа суммарной ДНК, выделенной из поражений внешних покровов разной степени тяжести, продемонстрировали присутствие в них представителей родов *Aeromonas* и *Flavo-bacterium* (рис. 2). Секвенирование полученных фрагментов гена 16S рРНК позволило идентифицировать микроорганизмы *Flavobacterium psychrophilum* и *Aeromonas* sp.

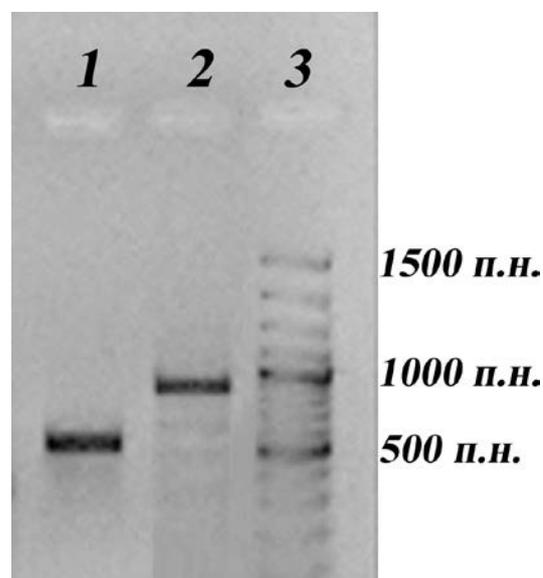


Рис. 2. Результаты амплификации фрагментов гена 16S рРНК суммарной ДНК из язвенных поражений карпа на праймерах, специфичных для *Aeromonas* (1) и *Flavobacterium* (2). 3 – маркер молекулярного веса

Использованная в работе система праймеров специфична для одного из наиболее широко распространенных семейств группы Bacteroidetes/Chlorobi класса Flavobacteriia – Flavobacteriaceae и позволяет амплифицировать до 100% известных представителей рода *Flavobacterium*, среди которых известен целый спектр патогенных для рыб микроорганизмов (*Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare*, *F. branchiophilum*). Обнаруженный в проведенном молекулярно-генетическом анализе *F. psychrophilum* (син.: *Cytophaga psychrophila*, *Flexibacter psychrophilus*) первоначально определен как типичный патоген, вызывающий язвы на теле и гниль плавников лососевых рыб при низких температурах

(бактериальная холодноводная болезнь, англ. «visceral myxobacteriosis» и/или «bacterial cold water disease» (BCWD), «coldwater disease» (CWD) [13]). *F. psychrophilum* выделяет протеолитические ферменты, которые вызывают прямое повреждение тканей и расширение зоны поражения, что является одним из предлагаемых факторов вирулентности бактерии [14, 15]. Инфицированные рыбы, как правило, имеют повреждения внешних покровов тела, приводящие к обнажению мышц и позвоночника [16]. Наиболее восприимчивы к заболеванию искусственно воспроизводимые виды рыб семейств Salmonidae, Coregonidae, Cyprinidae и Percidae [17].

Вторая апробированная система праймеров позволяет выявлять представителей рода *Aeromonas* – одного из типичных для водной микробиоты. Определенные в результате проведенной работы нуклеотидные последовательности идентичны *Aeromonas* sp. (GenBank: HQ246247), полученной при исследовании микробного сообщества аквакультуры тилапии [18] и отличаются одной заменой от *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae* и *A. jandaei*. Необходимо отметить, что последовательность анализированного фрагмента крайне консервативна для рода *Aeromonas* и идентична для патогенных видов.

Заболевания рыб, вызванные представителями рода *Aeromonas* в аквакультуре, характеризуются высокой летальностью. Наиболее полно изучен «фурункулез» – системная болезнь лососевых рыб, вызываемая *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* [19]. Другие подвиды *A. salmonicida* также вызывают системные и язвенные болезни рыб. Мезофильные аэромонады (*A. hydrophila*, *A. caviae* и *A. sobria*), чаще всего поражают прудовых рыб [19].

Смешанные инфекции у рыб возникают при одновременном сочетанном воздействии нескольких возбудителей. Кожа является наиболее восприимчивым органом-мишенью для инфекционных агентов рыб [20]. Инфицирование бактериями, грибами и вирусами способствует возникновению инфекционного язвенного синдрома кожи, которое характеризуется появлением красных пятен и язв на внешних покровах и сопровождается высокой смертностью различных видов рыб [21, 22 и др.]. Целостность кожи играет важную роль в защите рыб от бактериальных инфекций за счет присутствующих в слизи антимикробных продуктов (лизоцим, агглютинины) [23]. Отмечено значительное увеличение численности бактерий в местах отслоения эпителиальных клеток. Только редкие бактериальные клетки были обнаружены на неповрежденной коже или вблизи зон поражений [24]. Гистологические исследования распределения *F. psychrophilum* на коже рыб выявили его присутствие только на микротравмах, причем интактные участки кожи остаются неинфицированными. Бактерии имеют средство к коллагену, благодаря

чему при попадании в дерму мигрируют в миоцеллы через соединительную ткань. Впоследствии зоны поражений захватывают основную мускулатуру, что приводит к развитию некротического миозита и формированию открытых язв [25]. Аэромонады же преимущественно поражают ранее поврежденные ткани, как правило, зоны эрозии [24].

Эпизоотия на Бурдугузском рыболовном заводе началась после перевода маточного стада карпа из рыбохозяйственных прудов в бассейны с проточной водой. Так как регулярно проводимые в условиях аквакультуры манипуляции с рыбами во время отлова и транспортировки часто приводят к травмированию их внешних покровов, это в совокупности с присутствием патогенов в окружающей среде приводит к возникновению заболеваний.

Поскольку разработанная диагностическая система позволяет детектировать присутствие представителей родов *Aeromonas* и *Flavobacterium* в любых образцах (как в соскобах внешних покровов, так и в пробах воды), ее применение целесообразно на всех основных этапах технологического процесса для мониторинга микробиоты в аквакультуре рыб и своевременной коррекции графика проведения санитарно-эпизоотических мероприятий.

Работа выполнена при поддержке ГК № 16.512.11.2075 Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» проект № 30.13.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. The state of world fisheries and agriculture / FAO Fisheries and Aquaculture Department: Food and Agriculture organization of the United Nations. – Rome, 2010. 225 p.
2. Богерук, А.К. Аквакультура в России: история и современность // Рыбное хозяйство. 2005. № 4. С. 14-18.
3. Бычкова, Л.И. Бактериальная геморрагическая септицемия карпа (БГС) в пресноводной аквакультуре (причины возникновения и меры борьбы) / Л.И. Бычкова, Л.Н. Юхименко // II съезд НАСБЕ «Аквакультура Центральной и Восточной Европы: настоящее и будущее». Кишинев: Pontos, 2011. С. 34-37.
4. Altinok, I. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review / I. Altinok, I. Kurt // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2003. Vol. 3. P. 131-138.
5. Altinok, I. Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease // Dis. Aquat. Org. 2011. Vol. 93. Issue 3. P. 199-206.
6. Zerihun, M.A. Immunohistochemical and Taqman real-time PCR detection of mycobacterial infections in fish / M.A. Zerihun, M.J. Hjortaaas, K. Falk, D.J. Colquhoun // J. Fish Dis. 2011. Vol. 34. P. 235-246.
7. Haygood, M.G. Polymerase chain-reaction and 16S-ribosomal-RNA gene-sequences from the luminous bacterial symbionts of 2 deep-sea anglerfishes / M.G. Haygood, D.L. Distel, P.J. Herring // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1992. Vol. 72. P. 149-159.

8. Haygood, M.G. Light organ symbioses in fishes // Crit. Rev. Microbiol. 1993. Vol. 19. P. 191-216.
9. Van der Maarel, M.J.E.C. Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species / M.J.E.C. Van der Maarel, W. Sprenger, R. Haanstra, L.J. Forney // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 173. P. 189-194.
10. Spanggaard, B. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification / B. Spanggaard, I. Huber, T. Nielsen et al. // Aquaculture. 2000. Vol. 182. P. 1-15.
11. Buller, N.B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual / Oxfordshire: CABI publishing, 2004. 361 p.
12. Nielsen, M.E. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province in China? / M.E. Nielsen, L. Høi, A. Schmidt et al. // Dis. Aquat. Org. 2001. Vol. 46. P. 23-29.
13. Baudin-Laurencin, F. La myxobactériose viscérale de la truite arc-en-ciel в R: Une forme nouvelle de la maladie de l'eau froide à *Cytophaga psychrophila* / F. Baudin-Laurencin // Acad. Vét. de France. 1989. Vol. 62. P. 147-157.
14. Madsen, L. Characterization of *Flavobacterium psychrophilum*; a comparison of proteolytic activity and virulence of strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / In: A.C. Barnes, G.A. Davidson, M.P. Hiney, D. McIntosh (Eds.) Methodology in Fish Diseases Research / L. Madsen, I. Dalsgaard // Fisheries Research Services, Aberdeen, 1998. P. 45-52.
15. Madsen, L. Comparative studies of Danish *Flavobacterium psychrophilum* isolates: ribotypes, plasmid profiles, serotypes and virulence / L. Madsen, I. Dalsgaard // J. Fish Dis. 2000. Vol. 23. P. 211-218.
16. Tiirola, M. Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes / M. Tiirola et al. // Dis. Aquat. Org. 2002. Vol. 51. No 2. P. 93-100.
17. Lonnstrom, L.-G. *Flavobacterium psychrophilum* associated with mortality of farmed perch, *Perca fluviatilis* L. / L.-G. Lonnstrom, M. L. Hoffren, T. Wiklund // J. Fish Dis. 2008. Vol. 31. P. 793-797.
18. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: база данных содержит мировую медико-биологическую и геномную информацию. – Bethesda MD, 20894 USA., 2012. Режим доступа: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/309261162?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=RJVPTYV0012](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/309261162?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=RJVPTYV0012).
19. Austin, B. Taxonomy of bacterial fish pathogens // Vet. Res. 2011. Vol. 42. P. 20.
20. Noga, E.J. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. – Mosby-Yearbook, St. Louis, MO, 1996. 367 p.
21. Frerichs, G.N. Viruses associated with the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fish in South-East Asia // Vet. Res. 1995. Vol. 26. No 5-6. P. 449-454.
22. Andrew, T.G. Epizootic ulcerative syndrome affecting fish in the Zambezi river system in southern Africa / T.G. Andrew, K.D. Huchzermeyer, B.C. Mbeha, S.M. Nengu // Vet. Rec. 2008. Vol. 163. No 21. P. 629-631.
23. Alexander, J.B. Non-immunoglobulin humoral defense mechanisms in fish / In: Manning, M.J., Tatner, M.F. (eds). Fish immunology. – Academic Press, London, 1985. P. 133-140.
24. Gostin, I.N. SEM investigations regarding skin micro-morphology and modification induced by bacterial infections in *Cyprinus carpio* and *Salmo trutta fario* / I.N. Gostin, A.N. Neagu, V. Vulpe // IJEEE. 2011. Issue 2. Vol. 5. P. 274-281.
25. Miwa, S. Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis* / S. Miwa, C. Nakayasu // Dis. Aquat. Org. 2005. Vol. 67. P. 93-104.

APPROBATION THE SYSTEM OF HIGHLY SENSITIVE DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN THE AQUACULTURE OF ORDINARY CARP *CYPRINUS CARPIO* LINNAEUS, 1758

© 2012 E.V. Dzyuba¹, N.N. Denikina¹, Yu.L. Kondratistov², N.L. Belkova^{1,3}

¹Limnological Institutes SB RAS, Irkutsk

²Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory

³Irkutsk State University

The factors constraining successful development of fresh-water fish breeding are diseases of various etiology of fishes. By means of the developed system of primers highly sensitive methods of detection the pathogenic microorganisms of sorts *Aeromonas* and *Flavobacterium* in carp aquaculture are approved. In cankers of external covers at fishes microorganisms *Flavobacterium psychrophilum* and *Aeromonas* sp. are identified. Possible paths of emergence the complex epizootiya and expediency of application of the developed diagnostic systems at fish-breeding plants for monitoring microbiota in fishes aquaculture and well-timed correction of the schedule of carrying out sanitary epizootic actions are discussed.

Key words: *cyprinus carpio*, molecular and genetic methods, *Aeromonas*, *Flavobacterium*

Elena Dzyuba, Candidate of Biology, Fulfilling Duties of the Head of Laboratory. E-mail: e_dzyuba@lin.irk.ru

Nataliya Denikina, Candidate of Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow. E-mail: denikina@lin.irk.ru

Yuriy Kondratistov, Chief of the Department. E-mail: imvl2004@mail.ru

Nataliya Belkova, Candidate of Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow. E-mail: belkovan@mail.ru