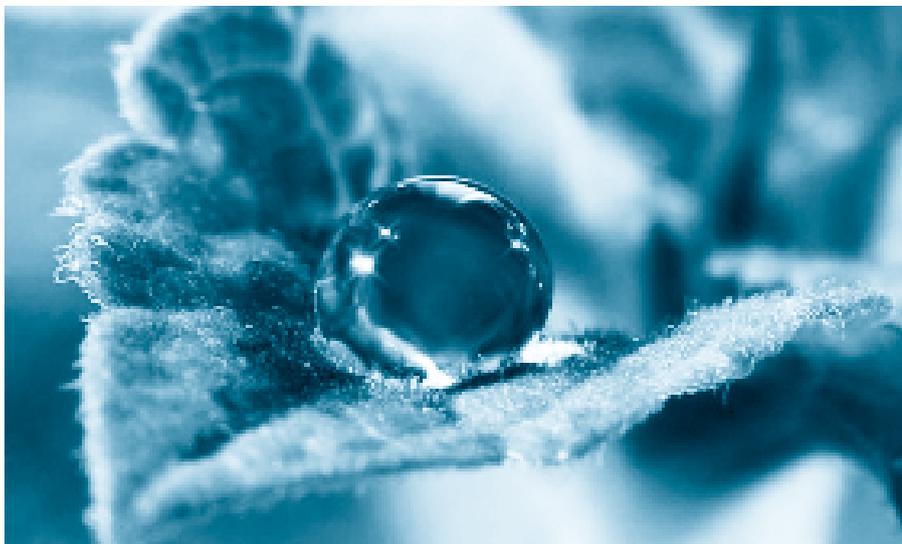


КОМПЛЕКСНЫЙ анализ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ОБЫКНОВЕННОЙ ЩУКИ *Esox lucius* Linnaeus, 1758

Микологическое исследование срезов мышечной ткани из очага опухоли на теле щуки *Esox lucius* показало обширное разрастание среди мышечных волокон гиф гриба *Aspergillus flavus*. Патологический процесс сопровождался появлением на внешних покровах язвенных образований, на которых с помощью разработанной системы праймеров были апробированы высокочувствительные молекулярно-генетические методы детекции патогенных микроорганизмов рода *Aeromonas*.



Введение

Инфекционные болезни рыб в естественных условиях регистрируются относительно редко, возможно, по причине быстрой гибели и природной утилизации больных особей [1]. В связи с этим каждый факт находок больных рыб дает уникальную возможность как для традиционных исследований ключевых индикаторных видов патогенных агентов в конкретных объектах, так и для апробации современных методов их детекции. Оценке возможности использования молекулярно-генетических методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для детекции и идентификации возбудителей инфекций посвящено множество исследований [2-4]. Ранее этим методом в язвенных поражениях внешних покровов рыб Восточной Сибири были обнаружены представители родов *Aeromonas* и *Flavobacterium* [5, 6].

Цель настоящей работы заключается в отработке комплексного подхода к анали-

Е.В. Дзюба*, кандидат биологических наук, исполняющий обязанности заведующего лабораторией иктиологии, ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

зу микроорганизмов, патогенных для рыб из естественных водоемов.

Материалы и методы исследования

При проведении экспедиционных работ в мае 2011 г. в районе р. Тальцинка (Иркутское вдхр.) в составе улова отмечен один экземпляр самки обыкновенной щуки *Esox lucius* с множественными точечными язвенными поражениями на внешних покровах и опухолью в средней части тела (рис. 1). Общая зоологическая длина рыбы составила 435 мм, масса 1041 г, возраст 3+. Гонады самки находились на V стадии зрелости.

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 [7] праймерами, специфич-

*Адрес для корреспонденции: e_dzuba@lin.irk.ru

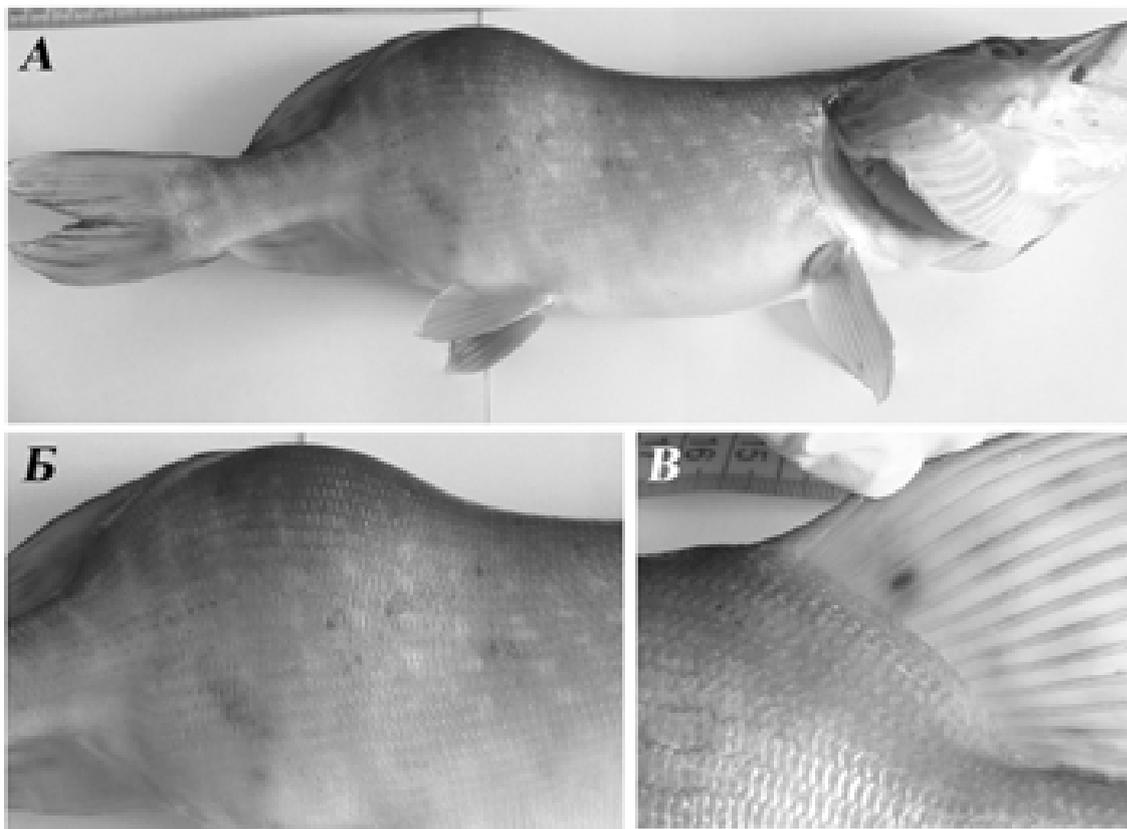


Рис. 1. Обыкновенная щука с опухолью в средней части тела (А), точечными язвенными поражениями на внешних покровах (Б) и спинном плавнике (В).

ными для представителей родов *Aeromonas* (AF1 5'-gataagtagatgtgaaagcccc и AHyd2 5'-ggggcctttcacatctaactatc) и *Flavobacterium* (Ff1 5'-tctaccttttacagagggatagc и Fr1 5'-gacgacaaccatgcagcacc). Эти микроорганизмы являются наиболее распространенными патогенами рыб пресноводных водоемов Восточной Сибири. Реакцию амплификации проводили в режиме: 96 °C 10"; 66 °C 20"; 72 °C 60" 35 циклов. Для лигирования полученных ампликонов использовали набор GeneJET™PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва).

Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в Новосибирском приборном центре коллективного пользования СО РАН. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью пакета программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>).

Микологическое исследование выполнено с использованием микроскопа «Olympus CX-21» по стандартным методикам [8-11]. Посевы материала из очага поражения (мышечная ткань) производили на питательные

Н.Н. Деникина, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории аналитической биоорганической химии, ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Е.В. Суханова, научный сотрудник отдела микробиологии, ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

среды Сабура, Чапека, мясо-пептонный агар с добавлением 2 % раствора глюкозы и культивировали при температуре 24-28 °C в течение 10 сут.

Результаты и их обсуждение

При патологоанатомическом исследовании рыбы установлено, что в задней части тела, за анальным отверстием, ближе к хвостовому стеблю просматривается опухоль округлой формы, диаметром 7 см, тестоватой консистенции. На разрезе опухоли визуальными изменениями не отмечено, за исключением искривления позвоночного столба в месте локализации патологического процесса. При световой микроскопии гистологических препаратов, приготовленных из срезов мышечной ткани, отобранной из очага опухоли, обнаружено разрастание среди мышечных волокон гиф грибов.

Для установления видовой принадлежности гриба были сделаны посевы материала из очага поражения. На четвертые сутки был зарегистрирован рост колоний гриба. На агаре Чапека отмечен рост ко-

лоний с жёлто-зелёной спороносной зоной. Обнаружены конидиеносцы двух типов: септированные и несептированные. Стеригмы в большинстве случаев одноярусные, реже встречались двухъярусные. Зарегистрировано обильное образование склероциев. Конидии имели грушевидную или шаровидную форму. Таким образом, по культуральным признакам колоний гриба на средах, а также изучению под микроскопом мицелия гриба и расположения спор, был определён вид *Aspergillus flavus*.

Результаты анализа суммарной ДНК, выделенной из язв щуки, продемонстрировали присутствие в ней только представителей рода *Aeromonas*, флавобактерии не детектированы (рис. 2). Молекулярно-генетическая идентификация полученных фрагментов гена 16S рРНК длиной 544 п.н. позволила определить нуклеотидную последовательность *Aeromonas hydrophila*.

Кожа является наиболее восприимчивым органом-мишенью для инфекционных агентов рыб [12]. Инфицирование патогенными микроорганизмами (бактериями, грибами, паразитами и вирусами) способствует возникновению различных неоплазий и инфекционного язвенного синдрома кожи, которое характеризуется появлением красных пятен и язв на внешних покровах и сопро-

Ю.Л. Кондратистов, заведующий отделом, ФГБУ Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория

А.М. Аблов, директор, ФГБУ Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория

А.О. Харитонов, младший научный сотрудник, ФГУП Госрыбцентр, Байкальский филиал

Н.Л. Белькова, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

вождается высокой смертностью различных видов рыб [13-18].

У рыб встречаются простые, смешанные и вторичные (вторичные) инфекции. Смешанные инфекции возникают при одновременном сочетанном воздействии нескольких возбудителей, зачастую принадлежащих к разным таксонам. Например, у *Channa striatus* (Perciformes: Channidae) с эпизоотическим язвенным синдромом (англ. epizootic ulcerative syndrome (EUS), «red-spot») детектированы бактерии (*A. hydrophila*, *Flavobacterium* sp.) и грибковая флора (*A. flavus* и *Aphanomyces invadans*) [19].

Представители рода *Aspergillus* (Ascomycota, Trichomaceae) широко распространены в окружающей среде. В настоящее время известно около 185 различных видов *Aspergillus*, из которых для 20 документально подтверждена патогенность для человека [20]. *A. flavus* имеет широкий круг хозяев, в том числе людей, животных и растений, продуцирует афлатоксины, принадлежащие к одной из наиболее сильных, вызывающих рак группе микотоксинов, и способен выживать в широком диапазоне температур.

Впервые инфекции, вызываемые грибами рода *Aspergillus* (*A. flavus* и *A. niger*), были описаны у рыб рода *Tilapia* [21, 22]. Эти два вида чаще всего ответственны за опухолевые проявления, что подтверждается экспериментальными данными [23].

Аспергиллёз у гидробионтов регистрируется крайне редко. На территории Иркутской области по данным ФГУ «Иркутская областная ветеринарная лаборатория» ранее отмечались случаи выделения грибов *A. flavus*, *A. niger* и *A. fumigatus* из икры рыб, инкубируемой на Бельском рыбопроизводном заводе (экспертизы: № 2053 от 17.11.77 г., № 2189 от 08.12.77 г., № 1118 от 18.06.80 г.). Кроме того, гриб *A. fumigatus* был выделен при микологическом исследовании мальков черного байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* из р. Тальцинка (экспертиза № 1408 от 10.06.86 г.).

Многие виды рода *Aeromonas* патогенны для позвоночных животных. Заболевания рыб, вызванные *Aeromonas* spp., характеризуются высокой летальностью. Септицемия и язвенные болезни внешних покровов, вызываемые подвижными аэромонадами (*A. hydrophila* (= *A. formicans* и *A. liquefaciens*), *A. hydrophila* subsp. *dhakenis*, *A. jandaei*, *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. sobria* (*A. sobria* biovar *sobria* и *A. veronii* biovar *sobria*), отмечены у многих видов пресноводных рыб [24].

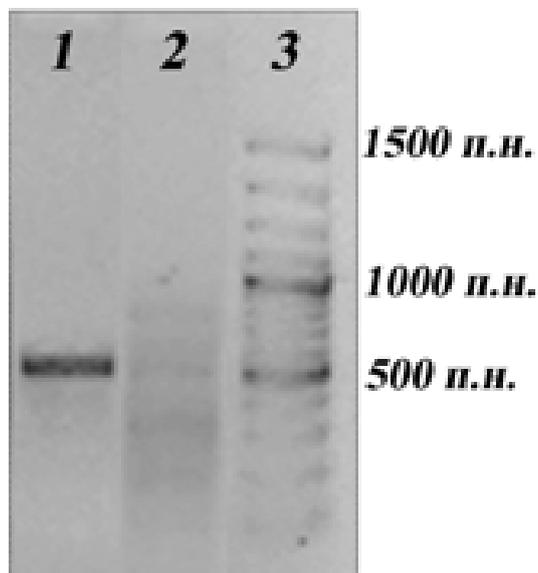


Рис. 2. Результаты амплификации фрагментов гена 16S рРНК суммарной ДНК из язвенных поражений щуки на специфичных праймерах:

1 — *Aeromonas*; 2 — *Flavobacterium*; 3 — маркер молекулярного веса.

Заключение

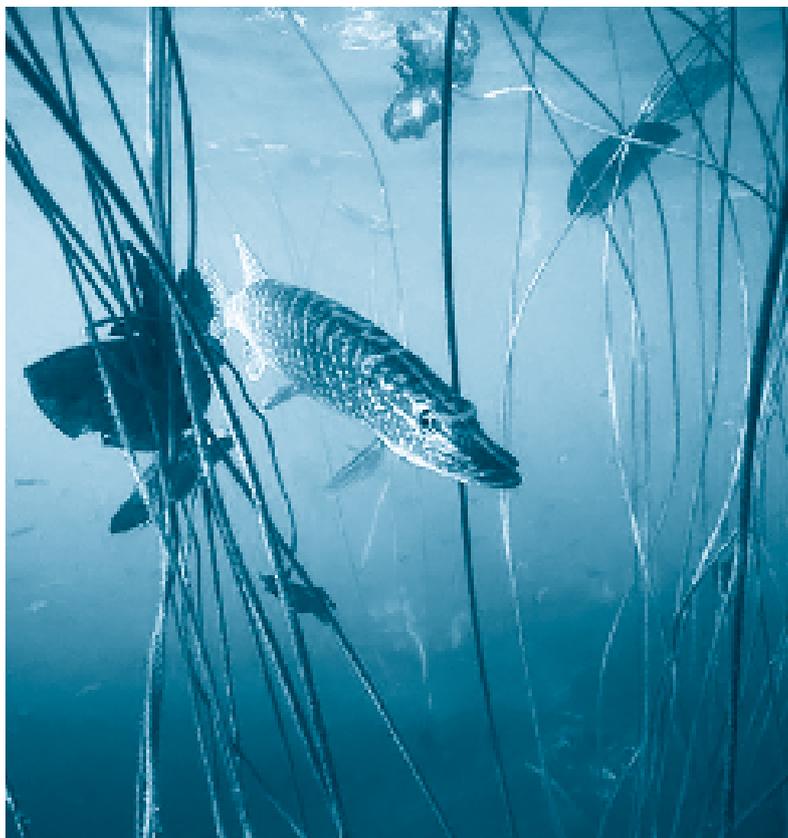
В водоемах бассейна р. Ангара (р. Тальцинка, Иркутское и Братское водохранилища) по данным ФГУ «Иркутская областная ветеринарная лаборатория» ранее отмечались случаи возникновения заболеваний рыб (окуня *Perca fluviatilis*, форели *Parasalmo mykiss*, карпа *Cyprinus carpio*), вызванные *A. hydrophila* (экспертизы: № 2835 от 21.11.1995 г., № 48 от 13.01.2003 г. и № 137 от 24.01.2003 г.). Однако в последнее время некоторые исследователи ставят под сомнение роль *A. hydrophila* как возбудителя заболевания, т.к. в некоторых случаях его присутствие в тканях рыб определяется только в качестве вторичного инфекционного агента [24]. Есть основания предполагать, что первичным этиологическим агентом в данном случае является *A. flavus*. Его разрастание в мышечной ткани щуки привело к ограничению подвижности, а вероятное выделение афлатоксинов могло вызвать общую интоксикацию организма. Оба эти фактора привели к ослаблению иммунитета и утрате резистентности к бактериальным инфекциям.

Таким образом, применение комплексного подхода к определению патогенных микроорганизмов позволило детектировать *A. flavus* и *A. hydrophila*. Разработанная молекулярно-генетическая система диагностики представителей рода *Aeromonas* позволяет детектировать их присутствие в биологических образцах любого происхождения и может быть востребована при проведении мониторинга микробиоты рыб и воды в естественных водоемах.

Авторы выражают глубокую признательность Н.П. Леви врачу-гистологу ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория» за помощь в проведении исследований. Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», проект №30.9 «Микрофлора, ассоциированная с рыбами: биоразнообразие и экологическая безопасность».

Литература

1. Гаевская А.В. Справочник основных болезней и паразитов промысловых рыб Атлантического океана. — АтлантНИРО / А.В. Гаевская, А.А. Ковалева. Калининград: Кн. изд-во, 1991. 208 с.



2. Altinok I. Molecular diagnosis of fish diseases: a review / Altinok I., Kurt I. // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2003. V. 3. P. 131-138.

3. Altinok I. Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease // Dis. Aquat. Org. 2011. V. 93. Iss. 3. P. 199-206.

4. Zerihun M.A. Immunohistochemical and Taqman real-time PCR detection of mycobacterial infections in fish / Zerihun M.A., Hjortaa M.J., Falk K., Colquhoun D.J. // J. Fish Dis. 2011. V. 34. P. 235-246.

5. Дзюба Е.В. Высокочувствительная детекция возбудителей грибковых и бактериальных заболеваний рыб / Е.В. Дзюба, Н.Н. Деникина, Н.Л. Белькова, Ю.Л. Кондратистов, А.М. Аблов // Мат. II Междунар. науч.-практич. конф. «Проблемы современной биологии». М.: Изд-во «Спутник». 2011. С. 80-84.

6. Дзюба Е.В. Высокочувствительная детекция возбудителей бактериального язвенного синдрома байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) / Е.В. Дзюба, Н.Н. Деникина, Е.В. Суханова, М.П. Белых, И.В. Ханаев, Н.М. Пронин, Н.Л. Белькова // Изв. ИГУ. Серия «Биология. Экология». 2011. Т. 4. № 4. С. 46-52.

7. Nielsen M.E. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province in China? / Nielsen M.E., Høi L.,

- Schmidt A., Qian D., Shimada T., Shen J., Larsen J. // Dis. Aquat. Org. 2001. V. 46. P. 23-29.
8. Седов В.А. Лабораторные исследования в ветеринарии: Вирусные, грибковые, бактериальные и паразитарные болезни рыб / Справочник // Под ред. В.А. Седова. М.: Медицина, 1997. 166 с.
9. Методические указания по проведению микологических исследований патологического материала от 24.07. 1954 г.
10. Методические указания по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях № 13-7-2/2137 от 11.09.2000 г.
11. Методические указания по патогистологической технике от 04.10.2005 г.
12. Noga E.J. Fish Disease: Diagnosis and Treatment / Mosby-Yearbook, St. Louis, MO, 1996. 367 p.
13. Mulcahy M.F. Lymphosarcoma in the pike, *Esox lucius* L., (Pisces; Esocidae) in Ireland // Proc. R. Ir. Acad. B. 1963. V. 63. P. 103-109.
14. Papas T.S. Presence of DMA Polymerase in Lymphosarcoma in Northern Pike (*Esox lucius*) / Papas T.S., Pry T.W., Schafer M.P., Sonstegard R.A. // Cancer Res. 1977. Suppl. 37. P. 3214-3217.
15. Van Beneden R.J. Oncogenes in Hematopoietic and Hepatic Fish Neoplasms / Van Beneden R.J., Henderson K.W., Blair D.G., Papas T.S., Gardner H.S. // Cancer Res. 1990. Suppl. 50. P. 5671-5674.
16. Anders K. Role of viruses in the induction of skin tumours and tumour-like proliferations of fish / Anders K., Yoshimizu M. // Dis. Aquat. Org. 1994. V. 19. P. 215-232.
- Ключевые слова:** *Esox lucius*, молекулярно-генетические методы, *Aspergillus flavus*, *Aeromonas hydrophila*
17. Frerichs G.N. Viruses associated with the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fish in South-East Asia // Vet. Res. 1995. V. 26. No 5-6. P. 449-454.
18. Andrew T.G. Epizootic ulcerative syndrome affecting fish in the Zambezi river system in southern Africa / Andrew T.G., Huchzermeyer K.D., Mbeha B.C., Nengu S.M. // Vet. Res. 2008. V. 163. No 21. P. 629-631.
19. Dhanaraj M. Microbial Flora from the Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Infected Murrel *Channa striatus* (Bloch, 1797) in Tirunelveli Region / Dhanaraj M., Haniffa M.A.K., Muthu Ramakrishnan C., Arun Singh S.V. // Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2008. V. 32. No 3. P. 221-224.
20. Krishnan S. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance / Krishnan S., Manavathu E.K., Chandrasekar P.H. // Mycoses. 2009. V. 52. P. 206-222.
21. Olufemi B.E. Aspergillomycosis in intensively cultured tilapia from Kenya/Olufemi B.E., Agius C., Roberts R.J. // Vet. Res. 1983. V. 112. P. 203-204.
22. Michel C. Pathology of tilapias // Aquat. Living Resour. 1989. V. 2. P. 117-126.
23. Olufemi B.E. Induction of clinical aspergillosis by feeding contaminated diet to tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) / Olufemi B.E., Roberts R.J. // J. Fish Dis. 1986. V. 9. P. 123-128.
24. Austin B. Taxonomy of bacterial fish pathogens // Vet. Res. 2011. V. 42. 13 p.

E.V. Dzyuba, N.N. Denikina, E.V. Sukhanova, Yu.L. Kondratistov, A.M. Ablon, A.O. Kharitonov, N.L. Bel'kova

COMPLEX ANALYSIS OF PATHOGENIC MICROORGANISMS OF *ESOX LUCIUS* LINNAEUS, 1758

Microbiological investigation of muscular tissue sections from a tumor nidus of *Esox lucius* showed extensive expansion of *Aspergillus flavus* hypha between the muscle fibers. The pathological process was accompanied by forming investment ulcers and their research was carried out by highly-sensitive molecular-genetic methods of *Aeromonas* detection using developed primer system.

Key words: *Esox lucius*, molecular-genetic methods, *Aspergillus flavus*, *Aeromonas hydrophila*