

УДК: 579.62; 579.843.2

DOI 10.33861/2071-8020-2019-3-21-24

ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ АЭРОМОНОЗЕ РЫБ

Басанкина В.М. ■ ФГБУ «Краснодарская межобластная ветеринарная лаборатория», г. Краснодар

Басанкин А.В. ■ департамент ветеринарии Краснодарского края, г. Краснодар

Пруцаков С.В. ■ Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар



Введение. Обнаружение и идентификация возбудителей при возникновении заболевания у рыб с признаками бактериальной геморрагической септицемии на сегодняшний день является одной из главных задач, как для сотрудников диагностических лабораторий, так и для организаций, занимающихся разведением товарной рыбы. Следовательно, максимально ранняя диагностика могла бы служить гарантом снижения экономических потерь.

Целью нашей работы является совершенствование метода лабораторной диагностики инфекционной болезни рыб с признаками бактериальной геморрагической септицемии, позволяющего установить вид возбудителя и оценить его вирулентные и патогенные свойства за короткие сроки.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести лабораторные исследования больной рыбы с клиническими признаками заболевания из регионов Северного Кавказа для идентификации возбудителя.
2. Изучить культурально-биохимические свойства выделенных микроорганизмов при росте на питательных средах.
3. Определить протеолитические, сахаролитические и окислительно-восстановительные свойства ферментов у выделенных микроорганизмов.
4. Изучить вирулентные и патогенные свойства бактерий.
5. Апробировать постановку биологической пробы на обычных лабораторных животных (мыши, морские свинки) с целью обнаружения патогенных свойств у возбудителя.

Материалы и методы исследований. Научные исследования проводились в лаборатории эпизоотологии Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института и в отделе бактериологии ФГБУ «Краснодарская межобластная ветеринарная лаборатория».

Лабораторные исследования больной рыбы, доставленной из рыбодомных хозяйств, проводились в течение трех лет, используя два актуализированных (действующих) методических указания (далее, МУ) и две инструкции согласно виду рыб, а именно:

- при заболевании лососевых – инструкция «О мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб» (1997 г.);
- при заболевании карпов, сазанов и их гибридов – МУ по лабораторной диагностике аэромоноза (краснухи) карпов от 1986 г.; МУ по диагностике эритродерматита карпа от 1997 г. и инструкция «О мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб» (1998 г.) [2, 4, 5].

Объектами исследования служили особи рыб различных видов из 3 семейств:

- карповых (Cyprinidae) – карп *Cyprinus carpio*, толстолобик *Hypophthalmichthys molitrix*, белый амур *Stenopharyngodon idella*;
- клариевых (Clariidae) – африканский сом *Clarias gariepinus*;
- осетровых (Acipenseridae) – осетр русский *Acipenser guldenstadtii*.

стерлядь *Acipenser ruthenus*, шип *Acipenser nudiventris*, севрюга *Acipenser stellatus*, гибрид русского (азовская популяция) и сибирского (ленская популяция) осетра.

Аналізу подвергали живую свежеевыловленную рыбу с клиническими признаками заболевания. Лабораторные исследования проводили бактериологическим, микроскопическим, биологическим методами.

При изучении особенностей бактерий учитывались морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические свойства, вирулентность и патогенность выделенных микроорганизмов.

Определение наличия микроорганизмов в организмах рыб проводили качественным анализом образцов печени, почек, сердца, селезенки, желчного пузыря, головного мозга.

Рассматривая фенотипические свойства выделенных микроорганизмов (штаммов), использовали как стандартные (классические), так и усовершенствованные методы. В работе использовались простые и специальные питательные среды (обогащенные, элективные и дифференциально-диагностические).

Тинкториальные свойства учитывались после окраски препарата по Граму. При изучении фенотипических свойств бактерий учитывали образование биопленки на мясоептонном бульоне, культивируя микроорганизмы при двух температурах (24 °С и 37 °С) в течение 48 ч. Оценку культуральных (макроморфологических) свойств проводили после образования колоний на плотных питательных средах МПА, Эндо, TSA, цетримидный агар, определяя форму, размер и окраску выросших бактерий. Биохимические показатели учитывали на жидких питательных средах Гисса (большой пестрый ряд), по расщеплению до кислотообразования, а глубину ферментативного процесса по наличию в питательной среде конечных газообразных продуктов.

Для определения протеолитических свойств использовали среды с желатином, молоком, пептоном. Способность бактериальных штаммов продуцировать гемолизины изучали на кровяном агаре с дефибрированной кровью барана.

Вирулентность выделенных штаммов аэромонад оценивали по ДНК-азной активности на ДНК-азном агаре [8].

Для проведения бактериологических исследований использовали следующее лабораторное оборудование: БАВп-01 «Ламинар С-1, 2 (01), микроскоп люминесцентный проходящего и отраженного света Axio Imager Carl Zeiss, термостат 37±1 °С Binder BD-400, шейкер с адаптером REAX top, денситометр (детектор мутности суспензий) с адаптером A-16 DEN-1B, дозатор пипеточный одноканальный «Thermo» 1 – 100 – 1000 мкл, баня водяная LT-2 двухместная и питательные среды производства ФБУН ГНЦПМБ, п. Оболонск, Московская область; НИЦФ, Санкт-Петербург; HiMedia Laboratories, Индия, а также тест – полоски и реактивы: OXItest, VPtest, PYRtest. При более углубленного исследования в лабораторной диагностике применяли тест – системы: ЭНТЕРОтест 24, НЕФЕРМтест 24 производства ERBA Lachema, Чехия.

Последующую идентификацию микроорганизмов осуществляли

согласно определителю Берджи [10], нормативным документам [2, 4, 5, 6, 7] и др. источникам [1, 9].

Дополнительно проводили анализ выделенных культур на бактериологическом масс-спектрометре MALDI-TOF – с помощью десорбционного метода «мягкой» ионизации.

Для постановки окончательного диагноза изучали патогенные свойства выделенных культур с постановкой биологической пробы на белых мышах и морских свинках [3, 6].

Результаты исследований и их обсуждение. При изучении морфологических и тинкториальных особенностей микроорганизмов чаще всего наблюдали полиморфизм клеток, который заключался в наличии в нескольких полях зрения прямых и слегка изогнутых грамотрицательных палочек разной величины 0,2-0,5 × 1,0-2,8 мкм.

На плотных питательных средах при изучении культуральных свойств обнаружили разные колонии, отличающиеся по характеру роста, формой, размером, оттенками, консистенцией, структурой поверхности.

При росте на кровяном МПА из одной особи выделяли несколько штаммов, проявляющих гемолитическую активность разного типа (рисунок 1, 2, 3).

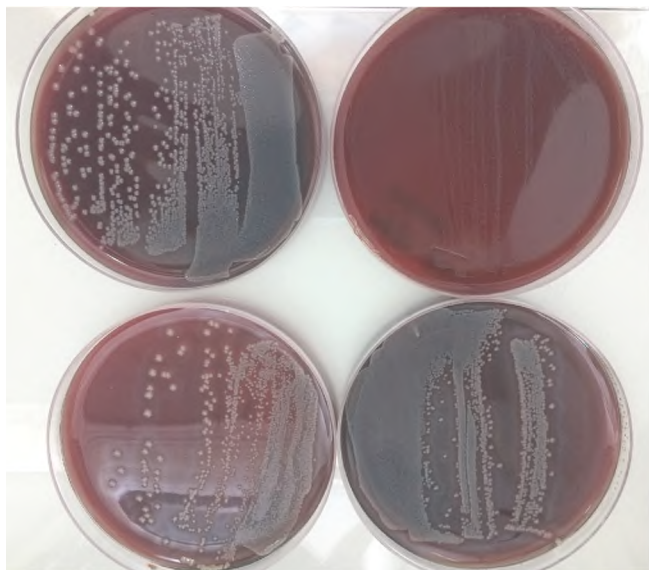


Рис. 1. Штаммы от одной особи с разным типом гемолитической активности

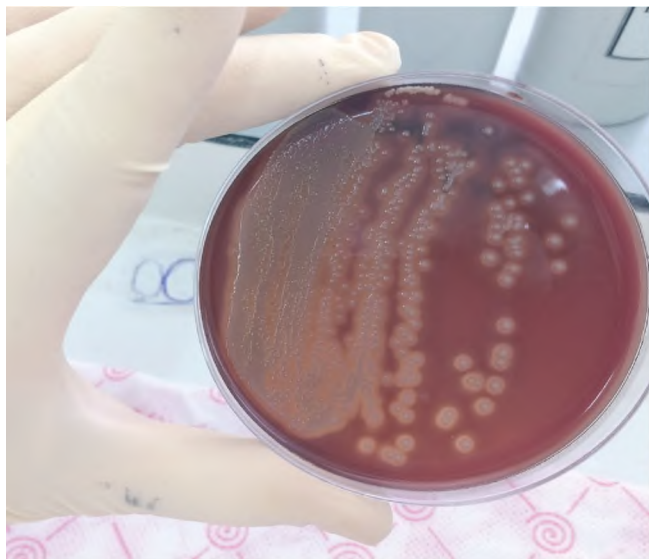


Рис. 2. Бета-гемолиз, характеризующийся полным растворением эритроцитов, с ферментативным обесцвечиванием гемоглобина (зона вокруг колонии прозрачная)



Рис. 3. Альфа-гемолиз, неполное разрушение эритроцитов с сохранением клеточной стромы

Выделенные бактерии от особей с клиническими признаками заболевания были отнесены к 21 виду из 11 родов: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. ichthiosmia*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *Pseudomonas putido*, *P. otitidis*, *P. mendocina*, *P. oleovorans*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *C. braakii*, *Enterobacter asburiae*, *E. cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *Shewanella putrefaciens*, *Acidovorax temperans*, *Acinetobacter tjernbergiae*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus garvieae* (рисунок 4).

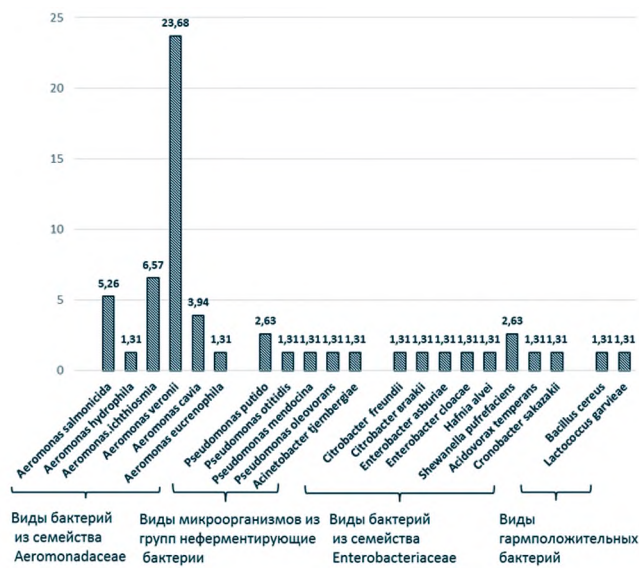


Рис. 4. Удельный вес грамотрицательных и грамположительных бактерий, выделенных из рыб, выловленных в водоемах Северного Кавказа

В результате питания, дыхания, размножения каждый вид микроорганизма продуцирует постоянный для него набор ферментов, определяя их биохимические свойства (табл. 1). Так все штаммы обладали оксидазоположительными свойствами, а также способностью расщеплять глюкозу, как в анаэробных, так и в аэробных условиях в среде Хью-Лейфсона с образованием кислоты, а некоторые и газа. Хорошо выражена протеолитическая активность и способность восстанавливать нитраты до нитритов.

Таблица 1

Биохимические свойства различных видов бактерий из семейства Aeromonadaceae

Наименование питательных сред	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. ichthosmia</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. eucrenophyla</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. veronii</i>
МПА с 5% дефиб. кр. бар.	+	+	+/-	-	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+	+
Эскулин	+	-	+	+/-	+/-	+/-
ДНК-агар	+	+	+/-	-	+	+
Образование индола	-	+	-	-	-	-
Образование сероводорода	+	+/-	+/-	-	+	+
Аргинин	+	+	+	+	+	+
Орнитин	-	-	-	-	-	-
Лизин	-	-	-	-	-	-
Глюкоза	+	+	+	+	+	+
Арабиноза	+	-	+	+	+	+/-
Салицин	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-
Лактоза	-	-	+/-	+	+	-
Манноза	+	+	+/-	+	+	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+
Маннит	+	+	+	+	+	+/-
Рамноза	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	+	+	+	+	+/-	+
Ксилоза	-	-	+/-	+	-	-
Дульцит	-	-	-	-	-	-
Раффиноза	-	-	-	-	-	+/-
Сорбит	-	-	+/-	-	+	-
Восстановление нитратов до нитритов	+	+	+	+	+	+
Разжижение желатина	+	+	+	+/-	+	+
Подвижность	+	+	+	+	-	+
Расщепление мочевины	-	-	-	-	-	-

Из-за отсутствия четкой границы между видами бактерий при изучении биохимических свойств классическим методом их внутривидовая идентификация затруднена (рисунок 5, 6).

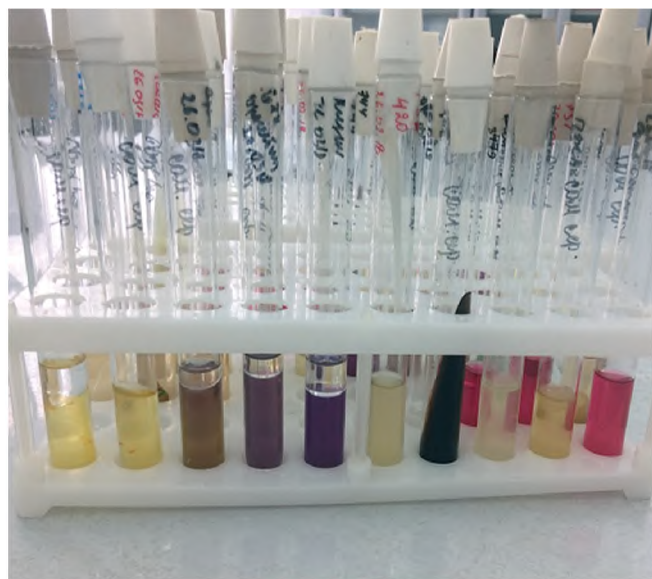


Рис. 5. Биохимические свойства бактерий из семейства Aeromonadaceae, выделенных из сома

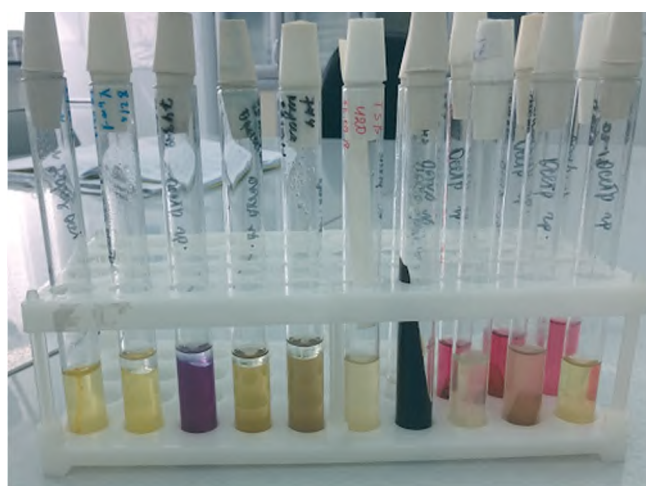


Рис. 6. Биохимические свойства бактерий семейства Aeromonadaceae, выделенных из осетра

Возможность проведения глубокого изучения состава микрофлоры посредством анализатора MALDI-TOF позволили определить практически 100% специфичность выделенных микроорганизмов. Достоверность идентификации составила от 2,286 (B+++), до 2,424 (B+++).

При изучении биологических (вирулентных) свойств бактерий, обладающих гемолитической и протеолитической активностью, была обнаружена высокая степень их патогенности. Нами были отработаны два метода, а именно постановка биологической пробы на белых мышах массой 16-18 г и на морских свинках массой 180-200 г.

При проведении биологических исследований 48-часовую бульон-

ную культуру вводили интрабрюшинно трём белым мышам в дозе 0,5 мл. Вирулентные штаммы вызывали гибель белых мышей в течение двух суток.

Одновременно проверяли специфические свойства аэромонад на двух морских свинок, для чего из одного штамма сразу ставили две пробы на одной морской свинке (дермонекротическую и конъюнктивальную).

При постановке дермонекротической пробы культуру вводили на тщательно выстриженный участок кожи бока морской свинки внутрикожно в дозе 0,3-0,5 мл бульонной культуры. Конъюнктивальную пробу проводили, нанося на конъюнктиву глаза 2 капли испытуемой бульонной культуры с последующим легким массажем век ватным тампоном. Оба метода дали положительную реакцию в течение 2-3 суток. В первом случае вирулентные штаммы давали положительную реакцию на месте введения у морских свинок в виде образования некроза. Во втором случае у морских свинок отмечался гнойный кератоконъюнктивит.

При лабораторном исследовании на патогенность с постановкой биопробы на обычных лабораторных животных доказано, что гибель наступала через 6 – 10 часов, а реакция на дермонекротическую и конъюнктивальную – в течение 2-3 суток, что очень сильно сокращает сроки исследования по сравнению с биопробой на живой рыбе, при которой срок наблюдения составляет 10 суток.

Таким образом, можно сделать следующие **Выводы**:

1. Полученные данные о наличии нескольких видов аэромонад из одной особи, ранее не регистрирующихся в водоемах Северного Кавказа в ассоциациях с условно-патогенной микрофлорой из других семейств, полностью подтверждают наличие эмергентной инфекции, а именно смену возбудителя при возникновении инфекционного процесса у рыб.

2. Отмечена сезонная динамика повышения вирулентности у возбудителей в весенне-летний период за счет загрязнения водоема органическими веществами.

3. Апробирован метод постановки биопробы на морских свинок и белых мышах, который позволяет сократить сроки исследования.

Список литературы:

1. Временные рекомендации по выделению и идентификации аэромонад / Юхименко Л.Н. [и др.]. ВНИИПРХ, 1987. С. 3.
2. Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб, утв. 26.11.97 № 13-4-2/1090.
3. Кухаренко Н.С., Яковлева Н.В. К проблеме диагностики бактериальных инфекций рыб (аэромоназ). Вестник Алтайского государственного аграрного университета. № 9 (95), 2012. С. 94.
4. Методические указания по диагностике аэромоназа (краснухи) карпов, утв. 23.04.86 №13-3/5.
5. Методические указания по диагностике эритродерматита карпа, утв. 09.12.97 № 13-4-2/1115.
6. Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями, утв. 11.10.1999 № 13-7-2/1759.
7. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомоноза рыб, утв. 22.09.98 № 13-4-2/1403.
8. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени DNКазной активности, утв. 09.12.97 № 13-4-2/1116.
9. Сидоров М.А., Skorodumov D.I., Fedotov V.B. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. М.: Колос, 1995. С. 225.
10. Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition, 2005, p. 557.

Резюме. Обнаружение и идентификация возбудителей при возникновении заболевания у рыб с признаками бактериальной геморрагической септицемии является одной из важнейших задач ветеринарных врачей и ихтиопатологов. Механизмы лабораторной диагностики *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida* достаточно хорошо изучены для указанных возбудителей, в отличие от условно-патогенных видов бактерий данного семейства, которые лишь с недавнего времени привлекли внимание исследователей как возбудители заболевания и поэтому требуют дальнейшего изучения. В настоящее время, используя и анализируя методические указания и инструкции при лабораторной диагностике, авторы обратили внимание, что в методических указаниях за 1986 и 1997 годы и в инструкции за 1997 год указывается конкретный возбудитель и лишь в инструкции за 1998 год говорится, что возбудителями болезни являются патогенные варианты, относящиеся к роду *Aeromonas*, семейства *Vibrionaceae*. Патогенные свойства аэромонад определяют биопробой на 3 карпах массой 100-200 г из благополучных по аэромоназу водоемов. Сроки исследования по данным методических указаний и инструкций составляют 20-21 день. Также в данных методических указаний и инструкций отсутствует информация о развитии заболевания с признаками бактериальной геморрагической септицемии у других видов рыб, таких как клариевые, осетровые и других гидробионтов. В указанных выше документах отсутствует четкая дифференциальная диагностика видов возможных возбудителей, а также в связи с результатами исследований иностранных ученых, проведенных с использованием анализа 16S рРНК – нуклеотидов, получено дополнительное основание для отделения семейства *Aeromonadaceae* от семейства *Vibrionaceae*. Поэтому разработка методических указаний по лабораторной диагностике аэромоназа с признаками бактериальной геморрагической септицемии для разных видов рыб и гидробионтов является актуальным вопросом в связи с тем, что с течением времени происходит изменение видового состава возбудителя за счет развития эмергентной инфекции у рыб, а применение обычных лабораторных животных позволило сократить срок исследования и является более доступным методом для лабораторий разного уровня.

Ключевые слова: рыба, карповые, клариевые, осетровые, бактерии *Aeromonas*, возбудитель, условно-патогенные виды аэромонад, патогенные свойства,

ва, эмергентная инфекция, биологическая проба, лабораторные животные.

Сведения об авторах:

Басанкина Виктория Михайловна, ветеринарный врач отдела бактериологии ОГБУ «Краснодарская межобластная ветеринарная лаборатория», аспирант Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»; 350004, г. Краснодар, ул. Калинина, 15; тел.: 8-918-2593649; e-mail: vbasankina@mail.ru.

Пруцаков Сергей Владимирович, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией эпизоотологии Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»; 350004, г. Краснодар, ул. 1-я Линия, 1; тел.: 8-918-4687755; e-mail: enteroplus@mail.ru.

Ответственный за переписку с редакцией: Басанкин Алексей Вадимович, кандидат ветеринарных наук, заместитель начальника отдела организации противоэпизоотических мероприятий и лечебно-профилактической работы департамента ветеринарии Краснодарского края; 350000, г. Краснодар, ул. Рашилевская, 36; тел.: 8-918-9550057; e-mail: abasankin@mail.ru.

FEATURES OF LABORATORY DIAGNOSIS AT FISH AEROMONOSIS

Basankina V.M., Basankin A.V., Prutsakov S.V.

Summary. Detection and identification of pathogens in case of a disease in fish with signs of bacterial hemorrhagic septicemia is one of the most important tasks for veterinarians and ichthyopathologists. The laboratory diagnostics mechanisms of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* are well studied for these pathogens, in contrast to opportunistic species of this family of bacteria, which only recently attracted the attention of researchers as pathogens of the disease and therefore require further study. Currently, using and analyzing the guidelines and instructions for laboratory diagnostics, authors noted that the guidelines for 1986 and 1997 and the instruction for 1997 indicate the specific pathogen and only in the instruction for 1998 it says that the causative agents of the disease are pathogenic variants belonging to the genus *Aeromonas*, family *Vibrionaceae*. Pathogenic properties of aeromonads are determined by biological test on 3 carps weighing 100-200 g from safe on *Aeromonas* water reservoirs. The study period according to the guidelines and instructions is 20-21 days. Also there is no information on the development of the disease with signs of bacterial hemorrhagic septicemia in other species of fish, such as clariid, sturgeon and other hydrobionts. In the above mentioned documents, there is no clear differential diagnosis of the types of possible pathogens, as well as in connection with the results of studies by foreign scientists using the 16S rRNA-nucleotide analysis, an additional basis was obtained for separating the *Aeromonadaceae* family from the *Vibrionaceae* family. Therefore, the development of guidelines for laboratory diagnosis of aeromonosis with signs of bacterial hemorrhagic septicemia for different fish species and hydrobionts is the topical issue due to the fact that over time the species composition of the pathogen changes due to the development of the emergent infection in fish, and the use of ordinary laboratory animals allowed shorten the study period and is a more affordable method for laboratories of different levels.

Key words: fish, cyprinid, clariid, sturgeon, *Aeromonas* bacteria, pathogen, conditionally pathogenic species of aeromonad, pathogenic properties, emergent infection, biological sample, laboratory animals.

References:

1. Yuhimenko L.N. et al. Vremennyye rekomendatsii po vydeleniyu i identifikatsii aeromonad [Temporary recommendations on isolation and identification of aeromonads]. – 1987: 3.
2. Instruktziya o meropriyatiyakh po profilaktike i meram borby s furunkulezom lososyevykh ryb [Instruction on preventive measures and measures against furunculosis of salmon]. – Moscow, 1997 (13-4-2/1090).
3. Kухarenko N.S., Yakovleva N.V. K probleme diagnostiki bakterialnykh infektsiy ryb (aeromonoz) [To problem of bacterial infections diagnostics of fish (aeromonosis)]. – Vestnik Altai SAU. – Barnaul, 2012 (9 (95)). – p. 94.
4. Metodicheskiye ukazaniya po diagnostike aeromonoz (krasnukhi) karpov [Guidelines for diagnostics of aeromonosis (rubella) of carps]. – Moscow, 1986 (№ 13-3/5).
5. Metodicheskiye ukazaniya po diagnostike eritrodermatita karpa [Guidelines for diagnostics of erythrodermatitis of carp]. – Moscow, 1997 (№ 13-4-2/1115).
6. Metodicheskiye ukazaniya po bakteriologicheskoy diagnostike smeshannoy kishhechnoy infektsiy molodnyaka zhivotnykh, vyzvayemoy patogennymi enterobakteriyami [Guidelines for bacteriological diagnostics of mixed intestinal infection of young animals caused by pathogenic enterobacteria]. – Moscow, 1999 (№ 13-7-2/1759).
7. Metodicheskiye ukazaniya po laboratornoy diagnostike psevdomonoz ryb [Guidelines for laboratory diagnostics of fish pseudomonas]. – Moscow, 1998 (№ 13-4-2/1403).
8. Metodicheskiye ukazaniya po opredeleniyu patogennosti aeromonad po stepeni DNKaznoy aktivnosti [Guidelines for pathogenicity determining of aeromonads by degree of DNA activity]. – Moscow, 1997 (№ 13-4-2/1116).
9. Sidorov M.A., Skorodumov D.I., Fedotov V.B. Opredelitel zoopatogennykh mikroorganizmov [Determinant of zoopathogenic microorganisms]. – Kolos. – Moscow, 1995. – p. 225.
10. Vide supra.

Author affiliation:

Basankina Viktoria M., veterinarian of the Department of bacteriology of the Krasnodar Interregional Veterinary Laboratory, post-graduate student of the Krasnodar Research Veterinary Institute; 15, Kalinina st., Krasnodar, 350004; phone: 8-918-2593649; e-mail: vbasankina@mail.ru.

Prutsakov Sergey V., D.Sc. in Veterinary Medicine, head of the department of epizootology of the Krasnodar Research Veterinary Institute; phone: 8-918-4687755; e-mail: enteroplus@mail.ru.

Responsible for correspondence with the editorial board: Basankin Alexey V., Ph.D. in Veterinary Medicine, deputy head of the department of organization of antiepidemiologic measures and treatment-and-prophylactic work of the Veterinary Department of Krasnodar region; 36, Rashpilevskaya st., Krasnodar, 350000; phone: 8-918-9550057; e-mail: abasankin@mail.ru.