

УДК 619:639.3:597.554.3:591.2

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА *YERSINIA RUCKERI* ПРИ ГИБЕЛИ КАРПА В ПРУДАХ НА ЮГЕ РОССИИ

**Анна Владимировна Казарникова**, д.б.н., ведущий научный сотрудник, kazarnikova@ssc-ras.ru  
Южный научный центр РАН (г. Ростов-на-Дону)

**Елена Васильевна Шестаковская**, к.б.н., заведующая, fish\_cps@mail.ru  
Ростовский филиал "Центральной производственной станции по акклиматизации  
и борьбе с болезнями рыб" (г. Ростов-на-Дону)

**Алена Викторовна Тришина**, к.б.н., старший научный сотрудник, alenatrichina@mail.ru  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (г. Ростов-на-Дону)

**Марко Галеотти**, профессор, marco.galeotti@uniud.it

**Мариса Манзано**, профессор, marisa.manzano@uniud.it  
Университет Удине (Италия)

Цель работы состояла в анализе причин гибели в прудах производителей карпа (*Cyprinus carpio*) и гибридов белого (*Hypophthalmichthys molitrix*) и пестрого (*H. nobilis*) толстолобика, зарегистрированной в апреле 2015 г. Всего иктиопатологическому исследованию (паразитологическому, бактериологическому и гистопатологическому) подвергли 25 рыб: клинически здоровых ( $n=10$ ) и с признаками заболевания ( $n=15$ ). Отобраны пробы воды. Данные гидрохимических тестов показали высокие уровни перманганатной окисляемости воды (2,4 – 2,8 предельно-допустимой концентрации), содержания нитритного (1,5 – 2 предельно-допустимой концентрации) и нитратного (1,4 – 1,5 предельно-допустимой концентрации) азота. Концентрация кислорода в придонных слоях не превышала 2,0 мг/дм<sup>3</sup>. При паразитологическом исследовании рыб диагностировали инвазию рыб моногенеями (*Dactylogyrus hypophthalmichthys*, *Dactylogyrus extensus*), трематодами (*Diplostomum spathaceum*) и моллюсками (*Unio pinctorum*). В результате бактериологических исследований было выделено 62 изолята из воды (30) и рыбы (32). Определение бактерий проводили согласно морфологическим и ферментативным свойствам. Для дополнительной идентификации их использовали MALDI TOF масс-спектрометрию и ПЦР. Обнаруженные микроорганизмы принадлежали к родам *Aeromonas* и *Yersinia*. Толстолобик был наиболее интенсивно инфицирован *A. hydrophila* ( $5 \cdot 10^3$  КОЕ/г), а карп – *Y. ruckeri* ( $2 \cdot 10^3$  КОЕ/г). Все штаммы *A. hydrophila* и *Y. ruckeri*, выделенные из рыб, оказались чувствительны к ципрофлоксацину, тетрациклину, левомицетину. К фуразолидону 90 % изолятов *aeromonad* и 100 % штаммов *Yersinia* были резистентны. В данном исследовании впервые для юга России описано заражение карпа *Yersinia ruckeri*. **Ключевые слова:** рыбоводство, заболевание, бактерии, йерсинии.

### Isolation and characteristic of *Yersinia ruckeri* during carp outbreaks in ponds of southern Russia

**A.V. Kazarnikova, H.V. Shestakovskaya, A.V. Trishina, M. Galeotti, M. Manzano**

The objective of this study was the analysis of reasons caused carp (*Cyprinus carpio*) and bighead hybrids (*Hypophthalmichthys molitrix* x *H. nobilis*) mortality kept in ponds at April, 2015. A total of 25 fish samples without ( $n=10$ ) and with ( $n=15$ ) clinical signs of disease were collected along with water samples. The results of water quality parameters showed on high level of permanganate oxidation (2,4 – 2,8 times the normal ratio), nitrite nitrogen (1,4 – 1,5). The concentration of oxygen near bottom was in the range of 2,0 mg/dm<sup>3</sup>. As the result of parasitological investigations monogenea (*Dactylogyrus hypophthalmichthys*, *D. extensus*), trematoda (*Diplostomum spathaceum*) and mollusk (*Unio pinctorum*) were detected. 62 different bacterial isolates were identified in water (30) and fish (32). Bacterial characterization was done by morphological and enzymatic properties. For additional identification used MALDI TOF mass-spectrometry and PCR. The detected microorganisms belong to genera *Aeromonas* and *Yersinia*. The highest indexes of bacterial contamination of bighead were registered for *A. hydrophila* ( $5 \cdot 10^3$  CFU/g) and in carp – for *Y. ruckeri* ( $2 \cdot 10^3$  CFU/g). All fish strains of *A. hydrophila* and *Y. ruckeri* were sensitive to ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol. 90 % of *aeromonas* and 100 % of *Yersinia* strains were resistant to furasolidone. At the first time for southern Russia the infection of carp by *Yersinia ruckeri* was detected. **Key words:** aquaculture, disease, bacteria, *Yersinia*.

*Yersinia ruckeri* – грамтрицательная бактерия, вызывающая септическое заболевание рыб [33]. Инкубационный период йерсиниоза при температуре воды 13 – 15 °С составляет 5 – 10 дней. Болезнь может протекать в молниеносной, острой, подострой и хронической

формах. Факторы, способствующие ее возникновению и распространению, – наличие стрессов (хэндлинг и др.), неблагоприятные условия окружающей среды (дефицит кислорода, накопление органических веществ). Кроме лососевых рыб [33] возбудитель йерсиниоза

был выделен от жирноголового голяна (*Phoxinus phoxinus*), амурского осетра (*Acipenser schrencki*) [30], сибирского осетра (*A. baerii*) [36], окуня (*Micropterus salmoides*) [34], сиговых (*Coregonus peled*, *C. muksun*) [28], налима (*Lota lota*) [20] и других видов рыб.

Йерсиниоз протекает в виде септицемии, вызывает воспаление и эрозии во рту, на жаберных крышках, у основания лучей плавников. Гибель от него наблюдали у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) [33], палии (*Salvelinus fontinalis*) [17], канального сомика (*Ictalurus punctatus*) [19], атлантической трески (*Gadus morhua*) [23]. Болеет также семга (*Salmo salar*) [14], микижа (*Oncorhynchus mykiss*), нерка (*O. nerka*) [21], горбуша (*O. gorbuscha*), кижуч (*O. kisutch*) и чавыча (*O. tshawytscha*) [33].

С 2010 г. йерсиниоз выявили и в Российской Федерации, в список карантинных заболеваний он не входит [8], но наносит ущерб рыбоводным хозяйствам.

Гибель карпа (*Cyprinus carpio*), гибридов белого и пестрого толстолобиков (*Hypophthalmichthys molitrix* и *H. nobilis*) была зарегистрирована в прудах рыбоводного хозяйства, расположенного в нижнем течении р. Дон Ростовской области. Дальнейшие исследования рыб показали, что кроме *A. hydrophila*, который обнаружили у обоих видов рыб, от карпа выделили *Yersinia ruckeri*. Ранее, в пруду, где содержались карп и гибриды толстолобиков, выращивали радужную форель, завезенную из Краснодарского края. Ранее у карпа на юге России возбудителя йерсиниоза не выявляли.

Цель данной работы – проанализировать причины, которые привели к гибели рыб, изолировать и описать потенциального возбудителя йерсиниоза бактерию *Y. ruckeri*, исследовать чувствительность выделенных микроорганизмов к традиционно применяемым антибиотикам.

**Материалы и методы.** Гибель производителей карпа (P=0,4 – 3,7 кг; L=28 – 58 см, l=20 – 49 см) и гибридов белого и пестрого толстолобиков (P=6,2 – 7,6 кг; L=80 – 88 см, l=72 – 75 см) началась в середине марта. К моменту наших исследований (апрель 2015 г.) погибло 300 экз. Рыбу содержали в прудах (глубина – 1,6; площадь – 1 га; плотность посадки 8 т/га).

Каждую рыбу осматривали клинически, уделяя внимание повреждениям на поверхности тела. Внутренние органы изучали на наличие патологических изменений и затем отбирали для бактериологических исследований. Соскобы с жабр и поверхности тела, а также внутренние органы и желудочно-кишечный тракт исследовали компрессионным методом под микроскопом. Всего ихтиопатологическому тестированию подвергли 25 рыб: клинически здоровых (n=10) и с признаками заболевания (n=15).

Анализы воды осуществляли согласно руководству по химическому анализу поверхностных вод суши [2]. Температура ее на момент отбора проб была 15 °С. Полученные гидрохимические показатели сравнивали с нормативными [2] для выяснения связи между гибелью рыб и параметрами среды. Воду для бактериологического исследования, включавшего определение общего микробного числа (ОМЧ), коли-титра и коли-индекса, отбирали из поверхностных водоемов в стерильные стеклянные прозрачные бутылки емкостью 1,5 л согласно ГОСТ 31861 – 2012 [4]. Санитарно-микробиологическое изучение ее проводили согласно МУК 4.2.1884 – 04. [7]. Родовую и видовую принадлежность условно-патогенных бактерий определяли по результатам совокупности биохимических тестов [9]. Для быстрой выборочной идентификации микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper.

Всего для бактериологического анализа отобрали 15 рыб с признаками заболевания и 1 пробу воды.

Извлеченные из рыб паренхиматозные органы (печень, селезенка, почки) иссекали и эмульгировали в физиологическом растворе с последующим высевом на плотные питательные среды: МПА, Эндо, кровяной агар, среду для идентификации аэромонад. Посевы инкубировали 36 ч при 25 °С. Общую бактериальную обсемененность рассчитывали по количеству выросших колоний и выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г органа. Для выделения и накопления чистых культур несколько различных изолированных колоний с селективных сред пересекали в отдельные пробирки со скошенным агаром. Для этого часть колонии снимали петлей, не задевая соседние колонии. Изоляты бактерий, выделенные от больных рыб, идентифицировали по морфологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим свойствам [9, 22]. Для биохимических исследований использовали ручные системы идентификации микроорганизмов API20 NE, RapID 20 E (bioMeieux, Франция).

Дополнительную идентификацию микроорганизмов проводили с использованием MALDI TOF масс-спектрометрии. Обработку и анализ масс-спектров осуществляли с помощью программного обеспечения фирмы BrukerDaltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и программного пакета FlexAnalysis 2.4 (Build 11). Белки идентифицировали путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с таковыми белков, аннотированных в базах данных BrukerTaxonomy.

Для определения общего микробного числа делали посев не менее двух различных объемов воды, отобраанных с таким расчетом, чтобы число выросших колоний колебалось в пределах от 30 до 300. Оценку общих колиформных бакте-

рий выполняли методом мембранной фильтрации, применяя ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм. Посевной объем рассчитывали, чтобы не менее чем на 2 фильтрах выросли изолированные колонии. После окончания фильтрации фильтры укладывали на поверхность агара Эндо фильтрующей поверхностью вверх.

Чувствительность / устойчивость выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам проводили диско-диффузионным методом. Использовали стандартные диски с различными антибактериальными субстанциями производства Hi Media (Индия).

Для изготовления гистологических препаратов кусочки тканей (печень, селезенка, сердце) от 5 рыб фиксировали в 4%-ном нейтральном буферном формалине. После этого образцы выдерживали при комнатной температуре и помещали в автоматический гистопроцессор (TISBE гистопроцессор, Diapath). Подготовленные экземпляры заливали в парафин (Paraplast-Plus, Diapath). С помощью микротомы (Reichert-Jung 2050) получали срезы толщиной 5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином по Гимзе и Граму. Препараты исследовали под световым микроскопом (Leica DMRB) и фотографировали системой Никон.

Микробиологические образцы, полученные от 5 карпов, помещали в пробирки с физиологическим раствором и хранили в холодильнике при 4 °С до начала исследования. Затем их пересекали на сердечно-мозговой агар (СМА) производства Италии (Oxoid, Milan, Italy) и инкубировали 48 ч при 20 °С. Выросшие культуры использовали для дальнейшей экстракции ДНК.

ДНК экстрагировали из выросших колоний с помощью оборудования для генетической очистки ДНК (Promega,

Италия) согласно существующему протоколу. Очистку и концентрацию образцов ДНК контролировали на спектрофотометре 2000 с (Thermo Fisher Scientific, США). В ПЦР контролем служили ДНК *Pseudomonas fluorescens* (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Milan, Italy, DISTAM); *Escherichia coli* (Dipartimento di Scienze Agro-Alimentari, Ambientali e Animali, Udine, Italy); *Vibrio ruber* 14379 (Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany, DSM); *Yersinia enterocolitica* (DSM), *Bacillus subtilis* 1092 (DSM); *Kokuria christinae* 232 (DSM); *Enterobacter cloacae* 30054 (DSM). Образцы ДНК стандартизировали до концентрации 250 нг/мкл, используя стерильную дистиллированную воду, и исследовали в ПЦР.

Для амплификации 575 базовых пар применяли два специфических праймера для *Yersinia ruckeri* YER8F (5'-GCGAGGAGGAAGGGTAAAGTG-3') и YER10R (5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3') [20]. Амплификацию проводили в общем объеме 50 мкл, содержащем 1,5 миллимоль/литр (mM)  $MgCl_2$ , 1,25 ед. Taq-полимеразы (Promega, Milan, Italy), 1 мкл каждого праймера концентрации 10 mM, 1 мкл – 10 mM dNTPs mix, 1 мкл ДНК концентрации 250 нг/мкл, в качестве отрицательного контроля служила дистиллированная вода. Параметры процедуры: пред-денатурация в течение 5 мин при 95 °C, затем 35 циклов по 1 мин при 95 °C, 1 мин при 61 °C, 1 мин при 72 °C и финальный этап при 72 °C в течение 7 мин.

Продукты ПЦР определяли на 1,5%-ном агар геле с помощью электрофореза и окрашивания 0,5 мкг/мл этидиум бромидом и визуализацией ультрафиолетом.

Ампликоны очищали с помощью QIA quick® PCR Purification Kit (Qiagen, Milan, Italy), высушивали и отсылали для секвенирования в Германию (Eurofins MWG GmbH, Martinsried, Germany), где для их

идентификации использовали программу NCBI/BLAST.

Сбор, фиксацию и дальнейшую обработку паразитов проводили по общепринятым в паразитологии методам [1, 6]. Видовую принадлежность их контролировали с помощью "Определителя паразитов пресноводных рыб" [10].

**Результаты исследований и обсуждение.** Данные гидрохимического анализа указывали на неблагоприятные условия, сложившиеся при выращивании рыб. О высоком уровне органического загрязнения свидетельствовали показатели перманганатной окисляемости (2,4 – 2,8 ПДК), нитритного (1,5 – 2 ПДК) и нитратного (1,4 – 1,5 ПДК) азота. Соотношение  $pH_{пов.}/pH_{дно}$  было равно 1,02, что соответствовало по Шессерину [2], концентрации кислорода в придонных слоях в пределах 0,0 – 2,0 мг/дм<sup>3</sup> и свидетельствовало о гипоксии. Превышение ПДК сульфатов в 2 раза (209 мг/дм<sup>3</sup>) скорее характеризовало природный фон и соответствовало норме для данного района. Низкая концентрация кальция (116,0 мг/дм<sup>3</sup>) в воде могла оказать негативное воздействие на организм рыб.

Больные рыбы держались у поверхности воды. При клиническом осмотре карпа у 53,3 % особей обнаружили изменения в жабрах (белый налет у основания жаберных лепестков, отечность, анемичность, обильно покрыты слизью и водорослями). У некоторых экземпляров на поверхности тела наблюдали белый ватообразный налет, вызванный паразитированием грибов порядка Saprolegniales. На поверхности тела, основании плавников и брюшной стороне отмечали точечные геморрагии.

У 60 % осмотренных производителей карпа на поверхности тела регистрировали плоские эпителиальные опухоли, мягкой, вязущей консистенции и гладкой блестящей поверхностью. На основании симптомов и эпизоотологических

Таблица 1

## Виды паразитов, обнаруженные у карпа и толстолобика при выращивании в прудах

Вид паразита	Хозяин	Локализация	ЭИ, %	ИИ, экз.
<i>D. hypophthalmichthys</i>	Толстолобик	Жабры	50	20
<i>D. extensus</i>	Карп	Жабры	100	12 – 40
<i>Diplostomum spathaceum</i>	Толстолобик	Хрусталик глаза	35	2 – 12
<i>Unio pinctorum</i>	Карп	Жабры	40	2 – 4
	Толстолобик		50	4 – 8

данных было сделано заключение о заболевании рыб оспой.

У 100 % осмотренных гибридов толстолобиков отмечали геморрагии кожных покровов, кровоизлияния на жаберных крышках и в основании грудных плавников. У отдельных экземпляров (40 %) выявили помутнение хрусталиков глаз.

При патологоанатомическом вскрытии карпа и гибридов толстолобиков печень и селезенка были в пределах нормы. Почки отечны, отмечали кровоизлияния под серозной оболочкой брюшной полости и на плавательном пузыре. Задний отдел кишечника гиперемирован с многочисленными кровоизлияниями.

Обследованные рыбы были заражены моногенями, трематодами и моллюсками (табл. 1). Наибольшую экстенсивность (ЭИ) и интенсивность (ИИ) инвазии *D. extensus* зарегистрировали у карпа.

В результате бактериологического исследования выделили 62 изолята (30 из воды и 32 из рыб), относящихся к 2 родам – *Aeromonas* и *Yersinia*. ОМЧ воды в обследованных садках составило  $3 \cdot 10^5$  КОЕ/мл; коли-индекс – 900; колититр – 1,11, что позволяет отнести их ко 2-й категории загрязненности. Среди выделенных аэромонад дифференцировали 2 их вида – *A. salmonicida* и *A. hydrophila* с титром  $1 \cdot 10^5$  КОЕ/мл.

Бактериальную контаминацию паренхиматозных органов установили у всех обследованных рыб. Качественный состав микрофлоры был представлен грамнегативными оксидазоотрицатель-

ными бактериями, идентифицированными как *Yersinia ruckeri* (карп), и оксидазоположительными бактериями *A. hydrophila* (карп, толстолобик). У толстолобика микробная контаминация паренхиматозных органов *A. hydrophila* ( $5 \cdot 10^3$  КОЕ/г) была значительно выше, чем у карпа ( $2 \cdot 10^2$  КОЕ/г). Для последнего обсемененность органов *Y. ruckeri* составила  $2 \cdot 10^3$  КОЕ/г.

Чувствительность/устойчивость к антибактериальным препаратам микроорганизмов, изолированных в данной работе, представлена в таблице 2. Все штаммы *A. hydrophila* и *Y. ruckeri*, выделенные из паренхиматозных органов рыб, оказались чувствительны к ципрофлоксацину, тетрациклину, левомицетину. К фуразолидону 90 % изолятов аэромонад и 100 % штаммов йерсиний были резистентны.

Выделенные штаммы *Y. ruckeri* (семейство Enterobacteriaceae) идентифицировали, согласно морфологическим и биохимическим свойствам [9]. На МПА бактерии формировали круглые, беловатые, сливающиеся колонии,

Таблица 2

## Чувствительность выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Чувствительность штаммов <i>Aeromonas hydrophila</i> , %	Чувствительность штаммов <i>Yersinia ruckeri</i> , %
Фуразолидон	300	10	0
Ципрофлоксацин	5	100	100
Тетрациклин	30	100	100
Левомецетин (хлорамфеникол)	30	100	100

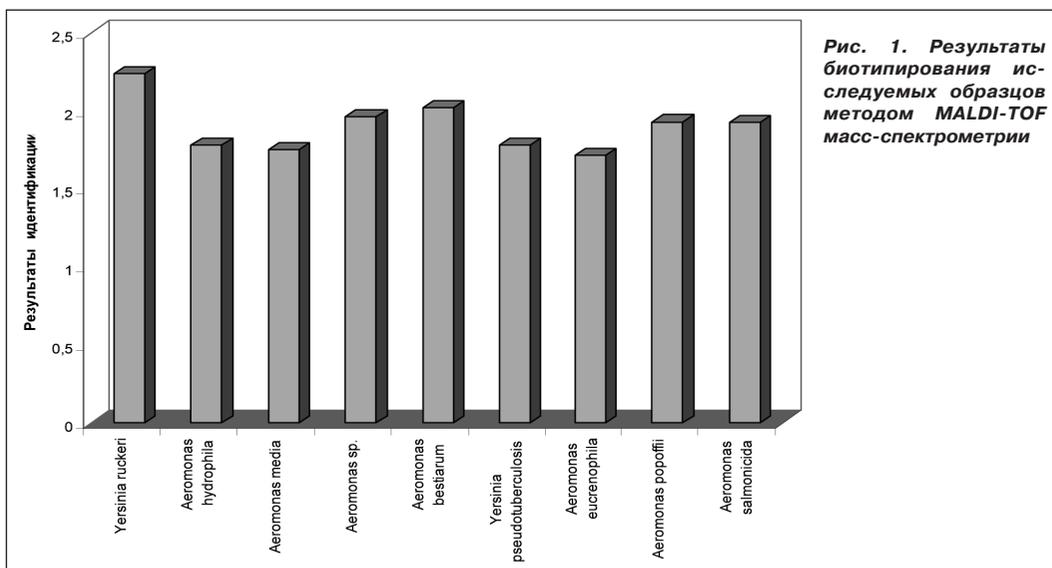


Рис. 1. Результаты биотипирования исследуемых образцов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии

на среде Эндо – выпуклые, округлые с ровным краем, диаметром 0,1 – 0,2 мм. В мазках – грамтрицательные палочки, подвижные в нативных препаратах. По результатам 30 тестов установили, что культура оксидазоотрицательная. Индол и сероводород не образует, MR+, VP-. Сбраживает глюкозу до кислоты без газа. Не ферментирует лактозу, сахарозу, рафинозу, арабинозу, рамнозу, дульцит, сорбит, инозит, салицин, разжижает желатин, редуцирует нитраты в нитриты, декарбоксилирует орнитин и лизин, не обладает аргининдегидролазой и фенилаланиндезаминазой, проявляет сильную липолитическую активность.

Исследование клинических образцов и результаты идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (2,238) полностью совпали с таковыми лабораторных исследований (рис. 1).

При помощи протокола индикации исследуемого образца праймерами YER8F и YER10R, разработанными А. Гибелло и соавт. [20], и последующим анализом фрагмента 16S рПНК установили, что тестируемые культуры соответствуют общему профилю штамма *Yersinia ruckeri* под номерами JQ657818.1, CP011078.1, KJ606914.1, CP009539.1, LN681231.1, KM220889.1,

KM220888.1 (совпадение 99 %) в существующей базе данных GenBank database (рис. 2).

При гистологическом исследовании рыб патологических изменений не выявили. В их селезенке наблюдали скопления лимфоцитов небольшой плотности (рис. 3, а). В печени карпов незначительные скопления лейкоцитов располагались вокруг сосудов (рис. 3, б). В сердце подобные скопления регистрировали вокруг миофибрилл (рис. 3, в). В почках (рис. 3, г) не зарегистрировано никаких изменений ни в гемопоэ-

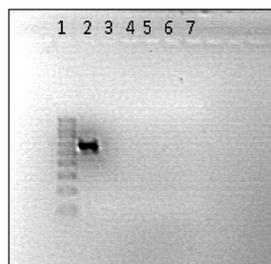
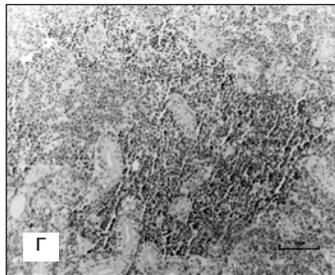
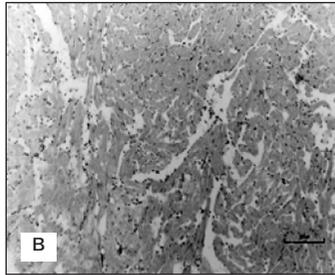
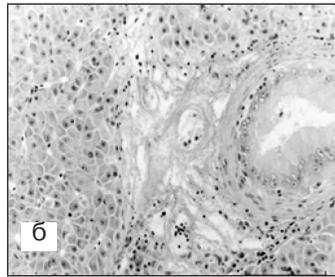
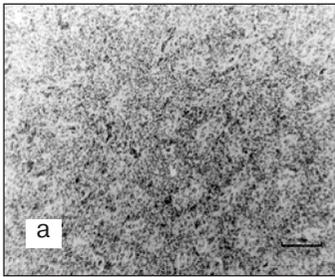


Рис. 2. Электрофореграмма результата ПЦР-идентификации *Yersinia ruckeri* с использованием праймера 16S рПНК (575bp): 1 – маркер молекулярного веса 100 bp (Sigma, Milan, Italy); 2 – определяемая ДНК; 3 – *Yersinia enterocolitica* DISTAM\*\*; 4 – *Pseudomonas fluorescens* DISTAM; 5 – *Enterobacter cloacae* DSM\* 30054; 6 – *Vibrio ruber* DSM 14379; 7 – отрицательный контроль

\*DSM – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Брауншвейг; \*\*DISTAM – Департамент пищевой микробиологии, науки и техники, Милан, Италия



**Рис. 3. Гистологическое исследование рыб: а – селезенка; б – печень; в – сердце; г – почки**

тической, ни в выделительной частях. В исследуемых органах бактерий не обнаружили.

Комплекс неблагоприятных абиотических факторов влияет на способность организма рыб адаптироваться к окружающей среде. Нередко низкое содержание кислорода в воде и низкая/высокая температура способствовали гибели рыб от бактериальных болезней [5]. рН – один из важнейших факторов, регулирующих большинство биохимических процессов. Известно, что неблагоприятные показатели рН, содержания  $\text{CO}_2$  и органического загрязнения являются стресс-факторами для рыб и совместно влияют на их выживание более чем каждый отдельно взятый показатель [26]. Проведенные исследования указывают на негативное воздействие комплекса абиотических факторов на организм рыб – низкую концентрацию кислорода в придонных слоях ( $2,0 \text{ мг/дм}^3$ ) и высокий уровень органического загрязнения, что подтверждают показатели перманганатной окисляемости ( $2,4 - 2,8 \text{ ПДК}$ ), нитритного ( $1,5 - 2 \text{ ПДК}$ ) и нитратного азота ( $1,4 - 1,5 \text{ ПДК}$ ).

Обнаружение на поверхности тела рыб грибов порядка Saprolegniales и эпи-

телиом оспы свидетельствует об ослаблении организма рыб и неблагоприятном санитарном состоянии прудов.

Паразитологическое исследование производителей карпа и толстолобика выявило инвазию моногенеями (*Dactylogyrus hypophtalmichthys*, *D. extensus*), трематодами (*Diplostomum spathaceum*) и моллюсками (*Unio pinctorum*). Наибольшую экстенсивность (100 %) и интенсивность (12 – 40 экз.) инвазии *D. extensus* регистрировали у карпа. Однако такой уровень инвазии не мог быть причиной гибели рыб.

Идентификация изолятов, выделенных из воды и рыб (карп, толстолобик), позволила отнести их к родам *Aeromonas* и *Yersinia*. В количественном отношении среди бактерий в воде доминировали аэромонады (*A. salmonicida*, *A. hydrophila*). Микробная обсемененность паренхиматозных органов у толстолобика была более высокой *A. hydrophila* ( $5 \cdot 10^3 \text{ КОЕ/г}$ ), а у карпа – *Y. ruckeri* ( $2 \cdot 10^3 \text{ КОЕ/г}$ ).

Возбудитель йерсиниоза – *Y. ruckeri* может быть выделен из внутренних органов рыб с использованием разных культуральных сред, при широком диапазоне рабочих температур (оптимум  $28 - 29 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [31]. Мы для идентифи-

кации использовали питательные среды МПА, Эндо, соево-козеиновый агар, агар МакКонкей, декстрозный агар.

Штаммы *Y. ruckeri* подразделяют на 2 серотипа по их способности ферментировать сорбит. Большинство из них, выделенных при эпизоотиях, не могли ферментировать сорбит, и были отнесены к серотипу 1, как и *Y. ruckeri*, описываемая в данном случае. В то же время штаммы серотипа 2 ферментируют сорбит, они менее патогенны для рыб [17].

В Европе для лечения лососевых рыб при йерсиниозе чаще используют окситетрациклин [29]. Однако *Y. ruckeri* способна формировать биопленки [18], которые высоко устойчивы к оксолиновой кислоте, часто применяемой для лечения йерсиниоза [35]. Во Франции [15] наиболее хорошие результаты при этой инфекции показали триметоприм / сульфаметаксозол. Кроме того для лечения заразившейся *Y. ruckeri* рыбы применяют энрофлоксацин и доксициклин. Проведенные нами исследования показали чувствительность *Y. ruckeri* к ципрофлоксацину, тетрациклину, левомицетину и устойчивость к фуразолидону.

Заражение карпа *Yersinia ruckeri* на юге России было впервые описано в данной работе. У толстолбиков, выращиваемых совместно с карпом в одном пруду, бактерии данного вида не обнаружили. Гибели рыб способствовали неблагоприятные условия – хэндлиг, высокая плотность посадки, низкое содержание кислорода и смешанная бактериальная инфекция. До этого в прудах, в которых была зафиксирована гибель карпа, содержалась радужная форель, завезенная из Краснодарского края. Скорее всего, последующее заражение карпа *Y. ruckeri* произошло от форели, у которой данный возбудитель регистрируют достаточно часто. Известно, что *Y. ruckeri* может долгое время выживать в пресной и морской воде [32]. Таким образом,

возбудитель мог оставаться в пруду данного рыбоводного хозяйства и после реализации радужной форели.

Однако случай заболевания карпа йерсиниозом нельзя считать классическим, так как отсутствовали клинические признаки болезни – воспаление и эрозия во рту ("красный рот"), на жаберных крышках, у основания лучей плавников. По литературным данным [3], йерсиниоз может развиваться молниеносно, когда клинические признаки не успевают развиваться. В описываемом случае такой сценарий может быть обусловлен отсутствием резистентности карпа к данному возбудителю и развитием смешанной бактериальной инфекции, отягощенной *Aeromonas hydrophila*.

При гистологическом исследовании не выявлено патологических изменений в структуре внутренних органов рыб, за исключением скоплений лейкоцитов небольшой плотности в селезенке и печени рыб. Нам не удалось выявить и типичных для йерсиниоза гистологических изменений – гиперемии с воспалительным процессом в тканях, с колониями бактерий в почках, селезенке, сердце, печени и жабрах. Все вышесказанное не дает оснований считать *Yersinia ruckeri* возбудителем заболевания и причиной гибели рыб. В свою очередь, результаты бактериологического изучения и ПЦР позволяют предположить, что эта инфекция проявилась в форме носительства.

Т.Л. Джефри и соавт. [24], а также А. Церро и Ж.А. Джиарро [16] в своих экспериментах применяли праймеры, разработанные на основе гена 16S рПНК. Это, несомненно, консервативный участок гена, однако современными исследованиями показано, что праймеры, сконструированные на основе рибосомальных генов, часто дают ложноположительные результаты, детектируют не только *Yersinia ruckeri*, но и ДНК других представителей

семейства Enterobacteriaceae, что недопустимо при дифференциальной диагностике. Поэтому авторы рекомендуют дополнительно использовать секвенирование для подтверждения специфичности ампликонов, синтезируемых в реакции.

М. Котетишвили и соавт. [25] применяли праймеры на основе фрагментов генов рибосомальной РНК, глутаминсинтетазы А, гиразы Б, рекомбинантного белка А для мультилокусного секвенирования и изучения филогенетических взаимоотношений йерсиний разных видов, а именно *Yersinia aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. molaretii*. В ходе экспериментов они установили, что *Yersinia ruckeri* является наиболее генетически однородной и наиболее отдаленной группой внутри рода.

Ю.П. Рудь и соавт. [11, 12] с помощью метода молекулярной экспресс-диагностики *Y. ruckeri* показали, что специфические олигонуклеотидные праймеры продуцируют ампликоны размером 600 пар нуклеотидов и фланкируют участок мишени амплификации.

Нами были использованы 2 специфических праймера для *Yersinia ruckeri* YER8F и YER10R [20]. Для подтверждения специфичности ампликонов, синтезируемых в реакции, дополнительно применяли секвенирование.

Внеклеточные токсины *Y. ruckeri* Yrp1 и Yh1A – важные факторы ее вирулентности. Yrp1 протеаза расщепляет большое разнообразие внеклеточного матрикса и мышечные белки, а также может привести к мембранным изменениям. Гемолизин Yh1A способен лизировать эритроциты. Вероятно, это сыграло определенную роль в возникновении описанной нами весенней вспышки болезни у карпов. Заболевания являются основной причиной потерь в аквакультуре [27].

**Заключение.** Возрастающие объемы перевозок рыбопосадочного материала повышают риск завоза возбудителей инфекционных и инвазионных болезней рыб, как в активном, так и в пассивном состоянии. Локальные сообщества рыб не всегда могут быть к ним устойчивы. Случай, описанный в данной работе, еще раз служит тому подтверждением. Привезенная из Краснодарского края радужная форель, скорее всего, была носителем *Y. ruckeri*. При переходе на карпа, не имеющего к ней иммунитета, бактерии способствовали снижению резистентности организма рыб к неблагоприятным факторам окружающей среды и при комплексном воздействии с другими паразитическими организмами последующей их гибели.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Быховская – Павловская И.Е. Паразиты рыб: Руководство по изучению. М.: Наука, 1985; 121 с.
2. Боева Л.В. Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. Ч. 1. Ростов-на-Дону: НОК, 2009; 1046 с.
3. Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхтменко Л.Н. Ихтиопатология. М.: Мир, 2010; 448 с.
4. ГОСТ 31861 – 2012. Вода. Общие требования к отбору проб [http://docs.cntd.ru/document/gost-31861 – 2012](http://docs.cntd.ru/document/gost-31861-2012).
5. Казарникова А.В., Шестаковская Е.В., Галеотти М., Тришина А.В., Турченко А.А. Влияние условий выращивания и смешанной бактериальной инфекции на гибель ленского осетра *Acipenser baerii* в садках. Наука Юга России. 2015; 11(1):70 – 79.
6. Лабораторный практикум по болезням рыб. Под ред. В.А. Мусселиус. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983; 296 с.
7. МУК 4.2.1884 – 04. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. [http://ohranatruda.ru/ot\\_biblio/normativ/data\\_normativ/45/45900/](http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/45/45900/).
8. "Об утверждении перечня заразных, в том числе особо опасных болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)". Приказ от 19 декабря 2011 г. № 476. <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/2964.html>.
9. Определитель бактерий Берджи. Под редакцией Д. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. М.: Мир. 1997; 1, 2.
10. Определитель паразитов пресноводных рыб. Под ред. О.Н. Бауера. Л.: Наука, 1984; 1985; 1987: 1 – 3.
11. Рудь Ю.П., Жук Л.В., Владимирский И.Б. Использование мультиплексной полимеразной

цепной реакции в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний рыб. Рыбогосподарська наука України. 2012; 3(21):59 – 62.

12. Рудь Ю.П., Цыганок И.О. Молекулярная диагностика *Yersinia ruckeri*. Рыбогосподарська наука України. 2014; 2(28):69 – 78.

13. Altinok I. The infectious route of *Yersinia ruckeri* is affected by salinity. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 2004; 24:253 – 259.

14. Bastardo A., Bohle H., Ravelo C., Toranzo A.E., Romalde J.L. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. Disiase of Aquatic Organisms. 2011; 22:93(3):207 – 214.

15. Calvez S., Gantelet H., Blanc G., Douet D., Daniel P. *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. Disease of Aquatic Organisms. 2014; 109:117 – 126.

16. Cerro A., Marquez I., Guijarro J.A. Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. Applied Environmental Microbiology. 2002; 68(10):5177 – 5180.

17. Cipriano R.C., Ruppenthal T., Schill W.B., Pyle S.W., Schotts E.B. Susceptibility of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) to experimental infections with different serotypes of *Yersinia ruckeri*. Microbios Letters. 1987; 35:27 – 31.

18. Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2002; 26:373 – 378.

19. Danley M.L., Goodwin A.E., Killian H.S. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. Journal of Fish Diseases. 1999; 22(6):451 – 456.

20. Dwiilow A.G., Souter B.W., Knight K. Isolation of *Yersinia ruckeri* from burbot, *Lota lota* (L.), from the Mackenzie River, Canada. Journal of Fish Diseases. 1987; 10(4):315 – 317.

21. Fouz B., Zarza C., Amaro C. First description of non-motile serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. Journal of Fish Disiases. 2006; 29(6): 339 – 346.

22. Gibello A., Blanco M.M., Moreno M.A., Cutuli M.T., Domenech A., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J.F. Development of a PCR Assay for the Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissue of inoculated and naturally infected Trout. Applied Environmental Microbiology. 1999; 346 – 350.

23. Gudmundsdottir B.K., Gudmundsdottir S., Gudmundsdottir S., Magnadottir B. *Yersiniosis* in Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), characterization of the infective strain and host reactions. Journal of Fish Diseases. 2013; 37(6):511 – 519.

24. LeJeune J.T., Rurangirwa F.R. Polymerase Chain Reaction for Definitive Identification of *Yersinia ruckeri*. Journal of veterinary diagnostic investigations. 2000; 12:558 – 561.

25. Kotetishvili M., Wauters A.K., Morris J.G., Sulakvelidze A., Stine O.C. Multilocus Sequence Typing for Studying Genetic Relationships among *Yersinia* Species. Journal

of clinical microbiology. 2005; 43(6):2674 – 2684.

26. Mathur P., Agarwal S., Nag M. Assessment of physico-chemical characteristics and suggested restoration measures for Pushkar Lake Ajmer Rajasthan. The 12th world lake conference, India. 2008.

27. Meyer F.P. Aquaculture diseases and health management. Journal of Animal Science. 1991; 69:4201 – 4208.

28. Rintamaki P., Valtonen E.T., Frerichs G.N. Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus mukun Pallas*, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland. Journal of Fish Diseases. 1986; 9(2):137 – 140.

29. Rodgers C.J. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. Journal of Fish Diseases. 1991; 14(3):291 – 301.

30. Shaowu L., Wang D., Hongbai L., Tongyan L. Isolation of *Yersinia ruckeri* Strain H01 from Farm-Raised Amur Sturgeon *Acipenser schrencki* in China. Journal of Aquatic Animal Health. 2013; 25(1):9 – 14.

31. Stevenson R., Flett D., Raymond B.T. Enteric redmouth (ERM) and other entobacterial infections of fish. Roberts R.J., Bromage N.R., editors: Bacterial diseases of fish. New York, Halsted Press. 1993; 80 – 106.

32. Thorsen B.K., Enger O., Norland S., Hoff K.A. Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. Applied Environmental Microbiology. 1992; 58(5):1624 – 1628.

33. Tobbac E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F., Chiers K. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. Journal of Fish Diseases. 2007; 30(5):257 – 268.

34. Valtonen E.T., Rintamaki P., Koskivaara M. Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland. Journal of Fish Diseases. 1992; 15:163 – 171.

35. Vendrell D., Balcazar J., Calvo A., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Girones O., Muzquiz J. Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue. Coll. Surf. Biointerfaces. 2009; 71:331 – 333.

36. Vuillaume A., Brun R., Chene P., Sochon E., Lesel R. First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon *Acipenser baeri* Brandt, in South West of France. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 1987; 7(1):18, 19.

**Исследования проведены в рамках: ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы" проекта "Разработка технических средств, биотехнологий выращивания нетрадиционных видов рыб и беспозвоночных для прогресса аквакультуры Южного и Северо-Западного федеральных округов России", соглашение № 14.607.21.0163 от 03.10.2016 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований и экспериментальных разработок (проекта) RFMEFI60716X0163.**