

УДК: 639.3:597.554.3:591.2  
DOI: 10.23885/2500-0640-2017-13-1-102-114

## ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ *YERSINIA RUCKERI* У ВЫРАЩИВАЕМОГО В ПРУДАХ КАРПА *CYPRINUS CARPIO* НА ЮГЕ РОССИИ

© 2017 г. А.В. Казарникова<sup>1</sup>, Е.В. Шестаковская<sup>2</sup>, А.В. Тришина<sup>3</sup>,  
М. Галеотти<sup>4</sup>, М. Манзано<sup>4</sup>

**Аннотация.** Целью работы было проанализировать причины гибели в прудах производителей карпа *Cyprinus carpio* и гибридов белого, *Hypophthalmichthys molitrix*, и пестрого, *H. nobilis*, толстолобиков, зарегистрированной в апреле 2015 г. Всего ихтиопатологическому исследованию (паразитологическому, бактериологическому, гистопатологическому) подвергнуто 25 рыб, клинически здоровых ( $n = 10$ ) и с признаками заболевания ( $n = 15$ ). Отобраны пробы воды. Результаты гидрохимических исследований указывают на высокий уровень перманганатной окисляемости – 2,4–2,8 ПДК, нитритного азота – 1,5–2 ПДК, нитратного азота – 1,4–1,5 ПДК. Концентрация кислорода в придонных слоях находилась в пределах 2,0 мг/дм<sup>3</sup>. Паразитологическое исследование рыб выявило инвазию моногенеями (*Dactylogyrus hypophthalmichthys*, *D. extensus*), трематодами (*Diplostomum spathaceum*) и моллюсками (*Unio pictorum*). В результате бактериологических исследований было выделено 62 изолята из воды (30) и рыбы (32). Определение бактерий проводили по морфологическим и ферментативным свойствам. Для дополнительной идентификации бактерий использовали MALDI TOF масс-спектрометрию и ПЦР. Обнаруженные микроорганизмы принадлежали к родам *Aeromonas* и *Yersinia*. Наиболее высокие показатели микробной обсемененности были зарегистрированы у толстолобика для *A. hydrophila* ( $5 \times 10^3$  КОЕ/г) и у карпа для *Y. ruckeri* ( $2 \times 10^3$  КОЕ/г). Все штаммы *A. hydrophila* и *Y. ruckeri*, выделенные из рыб, оказались чувствительны к ципрофлоксацину, тетрациклину, левомицетину. К фуразолидону 90 % изолятов аэромонад и 100 % штаммов йерсиний были резистентны. В данном исследовании впервые для юга России описано заражение карпа *Yersinia ruckeri*.

**Ключевые слова:** рыбоводство, заболевание, бактерии, йерсинии.

### THE FIRST ISOLATION OF *YERSINIA RUCKERI* FROM CARP *CYPRINUS CARPIO* IN PONDS OF SOUTHERN RUSSIA

A.V. Kazarnikova<sup>1</sup>, H.V. Shestakovskaya<sup>2</sup>, A.V. Trishina<sup>3</sup>,  
M. Galeotti<sup>4</sup>, M. Manzano<sup>4</sup>

**Abstract.** The objective of this study was to analyse the reasons of carp *Cyprinus carpio*, silver carp and bighead hybrids (*Hypophthalmichthys molitrix* × *H. nobilis*) mortality registered in ponds in 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 analysis showed the high level of permanganate oxidation – 2.4–2.8 times more than the normal ratio, of nitrite nitrogen – 1.5–2 times more, and of nitrite nitrogen – 1.4–1.5 times more. The concentration of oxygen at the near bottom layer was in the range of 2.0 mg/dm<sup>3</sup>. As the result of parasitological investigations monogenea (*Dactylogyrus hypophthalmichthys*, *D. extensus*), trematoda

<sup>1</sup> Южный научный центр Российской академии наук (Southern Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation), Российская Федерация, 344006, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41, e-mail: kazarnikova@aanet.ru

<sup>2</sup> Центральная производственная станция по акклиматизации и борьбе с болезнями рыб, Ростовский филиал (Central Station for Acclimatization and Fish Disease Control, Rostov Branch, Rostov-on-Don, Russian Federation), Российская Федерация, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Обороны, 49, e-mail: fish\_cps@mail.ru

<sup>3</sup> Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation), Российская Федерация, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, e-mail: alenatrishina@mail.ru

<sup>4</sup> Университет Удине (Università degli Studi di Udine, Udine, Italia), Италия, г. Удине, e-mail: marco.galeotti@uniud.it, marisa.manzano@uniud.it

(*Diplostomum spathaceum*) and mollusk (*Unio pinctorum*) were detected. Sixty two different bacterial isolates were identified in water (30) and fish (32). Bacterial characterization was realized by morphological and enzymatic properties. For additional identification MALDI TOF mass-spectrometry and PCR were used. The detected microorganisms belonged to genera *Aeromonas* and *Yersinia*. The highest indexes of bacterial contamination were registered in bighead for *A. hydrophila* ( $5 \times 10^3$  CFU/g) and in carp – for *Y. ruckeri* ( $2 \times 10^3$  CFU/g). All fish strains of *A. hydrophila* and *Y. ruckeri* were sensitive to ciprofloxacin, tetracycline, and chloramphenicol. 90 % of aeromonas and 100 % of yersinia strains were resistant to furasolidone. The infection of carp by *Yersinia ruckeri* was detected and observed in Southern Russia for the first time.

**Key words:** aquaculture, disease, bacteria, *Yersinia*.

Йерсиниоз – септическое заболевание, возбудителем которого является бактерия *Yersinia ruckeri* – грамотрицательная палочка семейства Enterobacteriaceae с перитрихальным расположением жгутиков, очень подвижная в свежих культурах. Она зарегистрирована у многих видов рыб, имеет широкое географическое распространение и вызывает значительные экономические потери в рыбной отрасли аквакультуры.

Йерсиниоз наиболее часто поражает лососевых рыб, особенно радужную форель *Onchorhynchus mykiss* [1]. Возбудитель йерсиниоза был также выделен у жирноголового голяна *Phoxinus phoxinus*, амурского осетра *Acipenser schrencki* [2], сибирского осетра *A. baerii* [3], окуня *Micropterus salmoides* [4], пеляди *Coregonus peled* и муксуна *C. muksun* [5], налима *Lota lota* [6] и других рыб. Болезнь вызывала гибель радужной форели [1], палии *Salvelinus fontinalis* [7], канального сомика *Ictalurus punctatus* [8], атлантической трески *Gadus morhua* [9]. Заболевание было также зарегистрировано у семги *Salmo salar* [10], микижи *Oncorhynchus mykiss*, нерки *O. nerka* [11], горбуши *O. gorbuscha*, кижуча *O. kisutch* и чавычи *O. tshawytscha* [1]. Среди сеголетков и годовиков рыб оно протекает в острой и подострой, среди товарной форели – в хронической форме.

В 2010 г. йерсиниоз был выявлен в Российской Федерации, где в список карантинных заболеваний не входит [12], но за счет массовой гибели рыб и порчи товарного вида продукции наносит тяжелый урон рыбоводческим хозяйствам.

Факторы, способствующие возникновению и распространению заболевания, – наличие стрессов (хэндлинг и др.), неблагоприятные условия окружающей среды (дефицит кислорода, накопление органических веществ), что мы наблюдали и в нашем исследовании.

В данной работе впервые сообщается о заражении *Yersinia ruckeri* производителей карпа *Cyprinus carpio* и их гибели от смешанной бактериальной инфекции в прудах рыбоводного хозяйства, расположенного в нижнем течении р. Дон в Ростовской области. Следует отметить, что у содержащихся со-

вместно с карпом производителей гибридов белого, *Hypophthalmichthys molitrix*, и пестрого, *H. nobilis*, толстолобиков бактерия *Y. ruckeri* не была обнаружена. Всего из воды и рыбы было выделено 3 вида бактерий – *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* и *Y. ruckeri*.

Целью данной работы было проанализировать причины, которые привели к гибели производителей карпа и гибридов толстолобиков в прудах рыбоводного хозяйства Ростовской области, а также изолировать и описать потенциального возбудителя йерсиниоза бактерию *Y. ruckeri*, выделенную впервые от карпа в данном регионе. Кроме этого, была исследована чувствительность к антибиотикам выделенных микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Гибель производителей карпа и гибридов белого и пестрого толстолобиков была зарегистрирована в зимовальных прудах (глубина 1,6 м, площадь 1 га) в апреле 2015 г. после их пересадки из другого пруда данного хозяйства при температуре 15 °С. Плотность посадки составила 8 т/га. Гибель рыб началась с середины марта и на момент исследования достигла 300 экз.

Каждую рыбу измеряли, взвешивали и осматривали клинически, уделяя внимание повреждениям на поверхности тела. Внутренние органы исследовали 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 исследованию подвергнуто 25 рыб, клинически здоровых ( $n = 10$ ) и с признаками заболевания ( $n = 15$ ).

Анализы воды проводили согласно руководству по химическому анализу поверхностных вод суши [13].

Воду для бактериологического исследования отбирали из поверхностных водоемов для определения общего микробного числа (ОМЧ), коли-титра и коли-индекса. Для отбора проб воды применяли

стерильные стеклянные прозрачные бутылки емкостью 1,5 л согласно ГОСТ 31861-2012 [14]. Санитарно-микробиологические исследования проб воды проводили согласно МУК 4.2.1884-04 [15]. Определение родовой и видовой принадлежности условно-патогенных бактерий осуществляли по совокупным результатам биохимических тестов [16; 17]. Для быстрой выборочной идентификации микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper.

Всего на бактериологический анализ взято 15 рыб с признаками заболевания и 1 проба воды.

Бактериальные изоляты были выделены от естественно зараженных рыб, а затем идентифицированы по их морфологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим свойствам [16–18].

Для бактериологического исследования извлекали паренхиматозные органы (печень, селезенка, почки), иссекали их и эмульгировали в физиологическом растворе с последующим высевом на плотные питательные среды: Soyabean Casein Digest agar, Blood agar, MacConkey agar, Aeromonas Isolation Medium Base, Potato Dextrose agar (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Посевы инкубировали при 25 °С в течение 36 часов. Общую бактериальную обсемененность рассчитывали по количеству выросших колоний и выражали в колониобразующих единицах (КОЕ) на 1 г органа. Для выделения и накопления чистых культур несколько различных изолированных колоний с селективных сред пересевали в отдельные пробирки со скошенным агаром. Для этого часть колонии снимали петлей, не задевая соседние колонии. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили путем изучения морфологии бактерий, их культуральных, биохимических и других признаков, присущих каждому виду. 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. Для обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «BrukerDaltonics» (Германия) flexControl 2.4 (Build 38), масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 2.4 (Build 11). Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в базах данных BrukerTaxonomy.

Для определения общего микробного числа делали посев не менее двух различных объемов воды, отобранных с таким расчетом, чтобы чис-

ло выросших колоний колебалось в пределах от 30 до 300. Определение общих колиформных бактерий выполняли методом мембранной фильтрации. Использовали ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм. Посевной объем рассчитывали так, чтобы не менее чем на двух фильтрах выросли изолированные колонии. После окончания фильтрации фильтры укладывали на поверхность MacConkey agar фильтрующей поверхностью вверх.

Чувствительность выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом. При изучении антибиотикограмм использовали стандартные диски с различными антибактериальными субстанциями производства Hi Media Laboratories Pvt. Limited (Индия). Интерпретацию результатов проводили согласно международным стандартам NCCLS.

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

Микробиологические образцы, полученные от 5 карпов, были помещены в пробирки с физиологическим раствором и хранились в холодильнике при температуре 4 °С до начала исследования. Затем был проведен посев на бульон с сердечно-мозговой вытяжкой (БСМ) производства Oxoid, (Милан, Италия) и инкубация при температуре 20 °С в течение 48 часов. Выросшие культуры использовали для дальнейшей экстракции ДНК.

ДНК экстрагировали из чистых колоний, выросших на БСМ, с помощью оборудования для генетической очистки ДНК (Promega, Милан, Италия) согласно существующему протоколу. Очистку и концентрацию образцов ДНК контролировали с помощью спектрофотометра 2000c (Thermo Fisher Scientific, Уилмингтон, Делавэр, США). ДНК от *Pseudomonas fluorescens* (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (DISTAM), Милан, Италия), *Escherichia coli* (Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Удине, Италия), *Vibrio ruber* DSM 14379 (Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen GmbH, Брауншвейг, Германия), *Yersinia enterocolitica* (DISTAM), *Bacillus subtilis* DSM 1092,

**Таблица 1.** Гидрохимические показатели воды в пруду, апрель 2015 г.  
**Table 1.** Water quality parameters in pond, April 2015

Показатели, единицы измерения Indexes, units	Фактическое содержание, верхний слой The actual content, upper layer	Фактическое содержание, придонный слой The actual content, bottom layer	Нормативное содержание в воде для рыбохозяйственных целей Normative content for aquaculture
Перманганатная окисляемость, мгО <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> Permanganate oxidation, mgO <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	28,8	24,0	10,0
рН	8,13	7,95	7,0–8,0
Соотношение рН поверхность/дно pH ratio upper/bottom layer	1,02		–
Аммонийный азот, мг/дм <sup>3</sup> Ammonium nitrogen, mg/dm <sup>3</sup>	0,43	0,38	0,5
Нитритный азот, мг/дм <sup>3</sup> Nitrite nitrogen, mg/dm <sup>3</sup>	0,05	0,03	0,02
Нитратный азот, мг/дм <sup>3</sup> Nitrate nitrogen, mg/dm <sup>3</sup>	0,15	0,14	1,0
Суммарный азот, мг/дм <sup>3</sup> Total nitrogen, mg/dm <sup>3</sup>	0,7	0,55	1,5
Фосфаты, мг/дм <sup>3</sup> Phosphates, mg/dm <sup>3</sup>	0,03	0,028	0,2
Солевые компоненты / Salt components			
Гидрокарбонаты, мг-экв./л = мг/дм <sup>3</sup> Hydrocarbonate, mg-equiv./l = mg/dm <sup>3</sup>	4,2	4,6	4,0
Сульфаты, мг-экв./л = мг/дм <sup>3</sup> Sulfates, mg-equiv./l = mg/dm <sup>3</sup>	4,1 = 203,0	4,2 = 209,0	100,0
Хлориды, мг-экв./л = мг/дм <sup>3</sup> Chloride, mg-equiv./l = mg/dm <sup>3</sup>	3,5 = 124,0	3,8 = 134,7	300,0
Общая жесткость, мг-экв./л = мг/дм <sup>3</sup> , нем. градус Total hardness, mg-equiv./l = mg/dm <sup>3</sup> , German degree	8,4	7,4	2,0–8,0
Кальций, мг-экв./л = мг/дм <sup>3</sup> Calcium, mg-equiv./l = mg/dm <sup>3</sup>	5,8 = 116,0	5,2 = 104,0	180,0
Магний, мг-экв./л = мг/дм <sup>3</sup> Magnesium, mg-equiv./l = mg/dm <sup>3</sup>	2,6 = 34,0	2,2 = 23,0	40,0
Натрий, мг-экв./л = мг/дм <sup>3</sup> Sodium, mg-equiv./l = mg/dm <sup>3</sup>	3,4 = 78,2	5,2 = 120,0	120,0
Суммарная минерализация, мг/дм <sup>3</sup> Total mineralization, mg/dm <sup>3</sup>	811,0	870,0	до 1000,0 up to 1000.0
Расчетное количество диоксида углерода, мг/дм <sup>3</sup> Approximate amount of carbon dioxide, mg/dm <sup>3</sup>	4,0	6,0	до 10,0 up to 10.0

*Kokuria christinae* DSM 232, *Enterobacter cloacae* DSM 30054 использовали в качестве контроля в ПЦР-анализе. Образцы ДНК стандартизировали до концентрации 250 нг/мкл, применяя стерильную дистиллированную воду, и затем приступали к молекулярно-биологическим исследованиям.

Для амплификации 575 базовых пар использовали два специфических праймера для *Yersinia ruckeri* – YER8F (5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3') и YER10 R (5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3') [17]. Амплификацию проводили в общем объеме 50 мкл, содержащем 1,5 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 1,25 ед.



**Рис. 1.** Патологические изменения у карпов: а – изменения в жабрах; б – эпителиомы оспы  
**Fig. 1.** Pathologies in carp: a – disorders in gills; б – smallpox epithelioma

Тақ-полимеразы (Promega, Милан, Италия), 1 мкл каждого праймера концентрации 10 ммоль/л, 1 мкл 10 ммоль/л dNTPs mix, 1 мкл ДНК концентрации 250 нг/мкл, в качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду. Используемые параметры: пред-денатурация в течение 5 мин при 95 °С, затем 35 циклов по 1 мин при 95 °С, 1 мин при 61 °С, 1 мин при 72 °С и финальный этап при 72 °С в течение 7 мин.

Продукты ПЦР определяли на 1,5%-м агар-геле с помощью электрофореза, окрашиванием 0,5 мкг/мл этидиум бромидом и визуализацией с помощью ультрафиолета.

Очистку ампликонов проводили с помощью QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Милан, Италия), высушивали и отсылали для секвенирования в фирму Eurofins MWG GmbH (Мартинсрид, Герма-

ния), где для их идентификации была использована программа NCBI/BLAST.

Сбор, фиксацию и дальнейшую обработку паразитов проводили по общепринятым в паразитологии методам [19; 20]. Видовую принадлежность паразитов устанавливали с помощью «Определителя паразитов пресноводных рыб» [21; 22].

В тексте приняты следующие сокращения: *P* – вес, *L* – большая длина, *l* – малая длина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты гидрохимических исследований (табл. 1) указывают на неблагоприятные условия, сложившиеся при выращивании рыб. О высоком уровне органического загрязнения свидетельствуют показатели перманганатной окисляемости (2,4–

**Таблица 2.** Зараженность рыб паразитами, апрель 2015 г.  
**Table 2.** Invasion of fish by parasites, April 2015

Вид паразита Parasite species	Хозяин Host	Локализация Localization	Экстенсивность инвазии, % Prevalence of invasion, %	Интенсивность инвазии, экз. Intensity of invasion, specimens
<i>Dactylogyrus hypophthalmichthys</i>	толстолобик bighead	жабры gills	50	20
<i>Dactylogyrus extensus</i>	карп carp	жабры gills	100	12–40
<i>Diplostomum spathaceum</i>	толстолобик bighead	хрусталик глаза eyes lens	35	2–12
<i>Unio pinctorum</i>	карп, толстолобик carp, bighead	жабры gills	40 50	2–4 4–8

2,8 ПДК), нитритного азота (1,5–2 ПДК), нитратного азота (1,4–1,5 ПДК).

Показатель соотношения рН у поверхности воды и у дна характеризует кислородный режим водоема. Соотношение, равное 1,02 (табл. 1), указывает на то, что концентрация кислорода (по Шессерину [13]) в придонных слоях находилась в пределах 0,0–2,0 мг/дм<sup>3</sup>.

Превышение ПДК сульфатов в 2 раза (табл. 1), скорее всего, характеризует природный фон и соответствует норме для данного района [23].

Больные рыбы держались у поверхности воды. При клиническом осмотре карпов ( $P = 2,96 \pm 0,33$  кг,  $L = 64,0 \pm 3,27$  см,  $l = 53,1 \pm 3,07$  см) у 53,3 % рыб были обнаружены изменения в жабрах. У основания жаберных лепестков отмечен белый налет (рис. 1а). Жабры были отечны, анемичны, обильно покрыты слизью и водорослями. У некоторых экземпляров на поверхности тела был отмечен белый ватообразный налет, вызванный паразитированием грибов порядка Saprolegniales. На брюшной стороне тела зафиксированы точечные геморрагии.

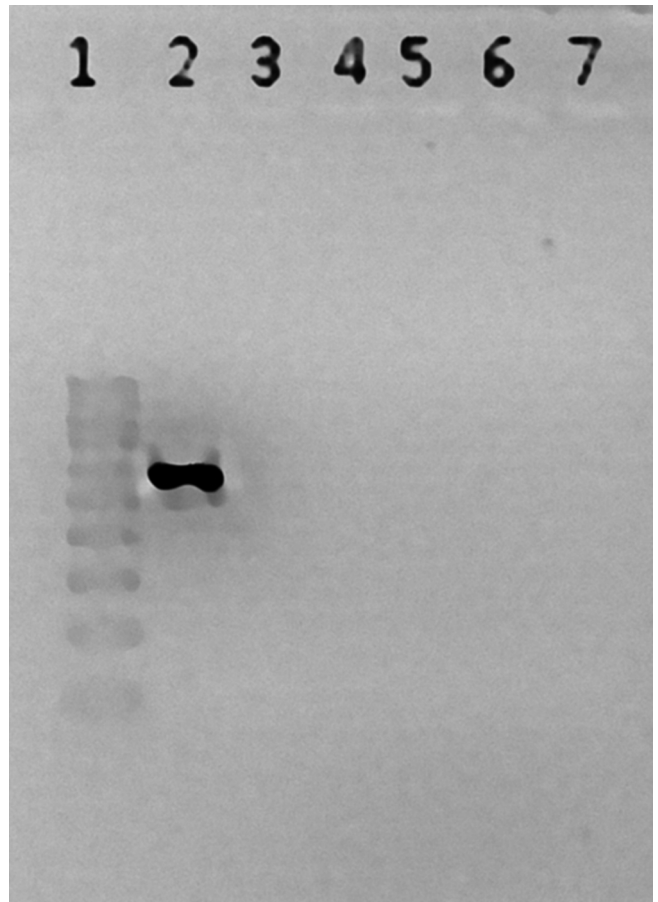
На поверхности тела 60 % осмотренных производителей карпа были отмечены плоские эпителиальные опухоли мягкой, вязущей консистенции и с гладкой блестящей поверхностью (рис. 1б). На основании симптомов и эпизоотологических данных было сделано заключение о заболевании рыб оспой.

У 100 % осмотренных гибридов толстолобиков ( $P = 9,2 \pm 0,18$  кг,  $L = 112,0 \pm 1,05$  см,  $l = 98,0 \pm 0,39$  см) была отмечена геморрагия кожных покровов, кровоизлияния на жаберных крышках и в основании грудных плавников. У 40 % экземпляров отмечали помутнение хрусталиков глаз.

Патологоанатомическое вскрытие карпов и гибридов толстолобиков не показало отклонения состояния печени и селезенки от нормы. Почки были отечными. Отмечены кровоизлияния на серозной оболочке брюшной полости и на плавательном пузыре. Задний отдел кишечника был гиперемирован с многочисленными кровоизлияниями.

Паразитологическое исследование выращенных рыб выявило их заражение 4 видами паразитов (табл. 2) – моногенеями (*Dactylogyrus hypophthalmichthys*, *D. extensus*), трематодами (*Diplostomum spathaceum*) и моллюсками (*Unio pinctorum*). Наибольшая экстенсивность (100 %) и интенсивность (12–40 экз.) инвазии была зарегистрирована для *Dactylogyrus extensus* у карпов.

В результате бактериологического исследования было выделено 62 изолятов (30 из воды и 32 из рыб), относящихся к 2 родам – *Aeromonas* и



**Рис. 2.** Электрофореграмма результата ПЦР-идентификации *Yersinia ruckeri* с использованием праймера 16S рННК (575bp): 1 – маркер молекулярного веса 100 bp (Sigma, Милан, Италия); 2 – определяемое 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, Германия); DISTAM – Департамент пищевой микробиологии, науки и техники (Милан, Италия)

**Fig. 2.** Amplicons obtained using the specific primers for *Yersinia ruckeri* YER8F and YER10: 1 – Molecular Weight Marker 100 bp (Sigma, Milan, Italy); 2 – DNA from isolate; 3 – *Yersinia enterocolitica* DISTAM; 4 – *Pseudomonas fluorescens* DISTAM; 5 – *Enterobacter cloacae* DSM 30054; 6 – *Vibrio ruber* DSM 14379; 7 – negative control. DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany); DISTAM – Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (Milan, Italy)

*Yersinia*. ОМЧ воды в обследованных садках составило  $3 \times 10^5$  КОЕ/мл, коли-индекс – 900; коли-титр – 1,11, что позволяет отнести данный водоем ко второй категории загрязненности. В количественном отношении среди бактерий в воде доминировали аэромонады. В структуре рода *Aeromonas* были выделены два вида: *Aeromonas salmonicida* и *A. hydrophila* –  $1 \times 10^5$  КОЕ/мл. Более высокие показатели микробной обсемененности паренхима-

**Таблица 3.** Дифференцирующие признаки *Yersinia ruckeri*, на основании которых была произведена идентификация выделенных штаммов ( $n = 10$ )

**Table 3.** Differentiating features of *Yersinia ruckeri*, on the basis of which the isolated strains were identified ( $n = 10$ )

Размер, мкм / Cell size, $\mu\text{m}$	1–3
Тинкториальные свойства Tinctorial properties	Гр– Gram-negative
Уреаза / Urease	–
Рамноза / Rhamnose	–
Мелибиоза / Melibiose	–
Сахароза / Sucrose	–
Глюкоза / Glucose	+(К)
Лактоза / Lactose	–
Раффиноза / Raffinose	–
Арабиноза / Arabinose	–
Сорбит / Sorbitol	–
Дульцит / Dulcitol	–
Инозит / Inositol	–
Салицин / Salicin	–
Гидролиз эскулина Esculin hydrolysis	–
Ксилоза / Xylose	–
Мальтоза / Maltose	+
Сорбоза / Sorbose	–
Орнитиндекарбоксилаза Ornithine decarboxylase	+
Лизиндекарбоксилаза Lysine decarboxylase	+
Аргининдигидролаза Arginin dihydrilase	–
Индол / Indole	–
Реакция Фогеса – Проскауэра при 25 °С Voges-Proskauer, 25 °С	–
Реакция с метил-рот / Methyl red	+
Подвижность при 25° С Motility at 25° С	+
Продукция индофеноксидазы Indophenoloxydase production	–
Каталаза / Catalase	–
Желатиназа / Gelatinase	+
Денитрификация / Nitrite reduction	+
Продукция $\text{H}_2\text{S}$ / $\text{H}_2\text{S}$ production	–
Фенилаланиндеаминаза Phenilalanin deaminase	–

Примечание. «+» – положительная реакция; «–» – отрицательная реакция

Note. «+» – positive; «–» – negative

тозных органов рыб были зарегистрированы для *A. hydrophila* у толстолобика и для *Y. ruckeri* у карпа.

Бактериальная контаминация паренхиматозных органов обнаружена у всех обследованных рыб. Качественный состав микрофлоры был представлен грамотрицательными оксидазоотрицательными бактериями, идентифицированными как *Yersinia ruckeri* (карп) и оксидазоположительными бактериями *Aeromonas hydrophila* (карп, толстолобик).

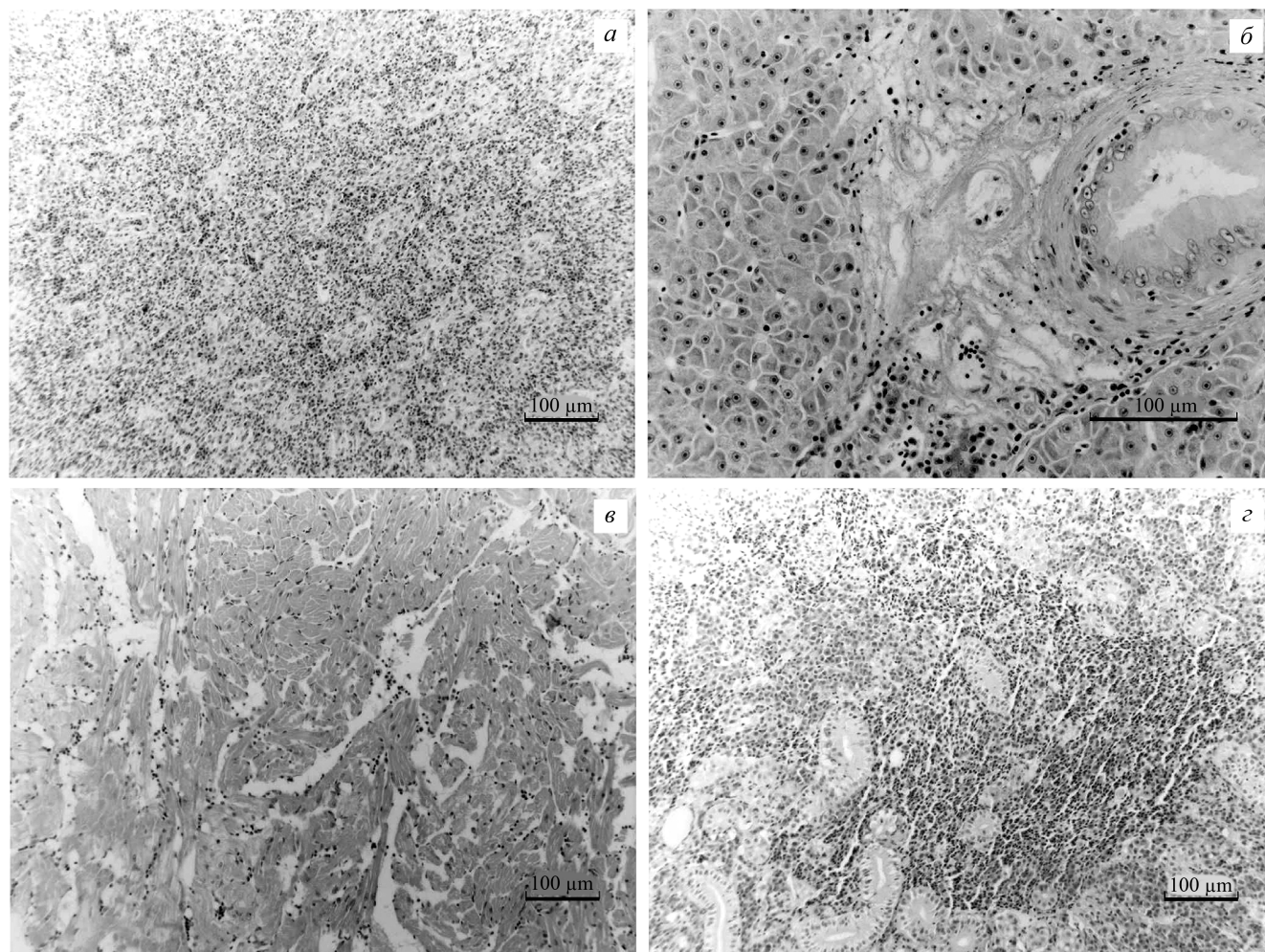
Более высокие показатели микробной обсемененности паренхиматозных органов рыб были зарегистрированы для *A. hydrophila* у толстолобиков –  $5 \times 10^3$  КОЕ/г. У карпов для *Y. ruckeri* они составили  $2 \times 10^3$  КОЕ/г, а для *A. hydrophila* –  $2 \times 10^2$  КОЕ/г.

Идентификация выделенных штаммов *Yersinia ruckeri* была проведена по их морфологическим и ферментативным свойствам [16]. Показано, что на мясо-пептонном агаре (МПА) бактерии формируют круглые беловатые сливающиеся колонии, на среде Эндо – выпуклые, округлые, с ровным краем, диаметром 0,1–0,2 мм. В мазках – грамотрицательные палочки. По результатам 30 тестов было выявлено, что культура оксидазоотрицательная, каталаза-отрицательная, сбрасывает глюкозу до кислоты, без газа. Индол и сероводород не образует, MR+, VP–. Не ферментирует лактозу, сахарозу, раффинозу, арабинозу, рамнозу, дульцит, сорбит, инозит, салицин, разжижает желатин, редуцирует нитраты в нитриты, декарбоксилирует орнитин и лизин, не обладает аргининдегидролазой и фенилаланиндеаминазой, проявляет сильную липолитическую активность (табл. 3).

Исследование клинических образцов и результаты идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (2,238) полностью совпали с результатами лабораторных исследований (табл. 4).

При использовании протокола индикации исследуемого образца праймерами YER8F и YER10R, разработанного А. Гибелло с соавторами [17], с последующим анализом фрагмента 16S рРНК (рис. 2) было установлено, что исследуемые 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).

Чувствительность к антибиотикам разных видов микроорганизмов, выделенных в данном исследовании, представлена в таблице 5. 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.



**Рис. 3.** Ткани внутренних органов карпа (окрашивание гематоксилином и эозином): *а* – селезенка; *б* – печень; *в* – сердце; *з* – почки

**Fig. 3.** Tissues of inner organs in carps (haematoxylin and eosin coloration): *a* – spleen of carp; *б* – liver; *в* – heart; *з* – kidneys

При исследовании гистологических препаратов паренхиматозных органов у обследованных рыб не было выявлено патологических изменений.

В селезенке обследованных рыб наблюдали скопления лимфоцитов небольшой плотности (рис. 3*а*). В печени всех обследованных карпов небольшие скопления лейкоцитов располагались вокруг сосудов (рис. 3*б*). В сердце подобные скопления регистрировали вокруг миофибрилл (рис. 3*в*). В почках (рис. 3*з*) не зарегистрировано никаких изменений ни в гемопоэтической, ни в выделительной частях. В исследуемых органах бактерий обнаружено не было.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупность неблагоприятных абиотических факторов оказывает влияние на способность организма рыб адаптироваться к окружающей среде. Нередко низкое содержание кислорода в воде

и неблагоприятные температуры вызывали гибель рыб от бактериальных заболеваний [24]. рН является одним из важнейших факторов, регулирующих большинство биохимических процессов. Известно, что уровень рН, содержание CO<sub>2</sub> и органическое загрязнение являются стресс-факторами для рыб и влияют на их выживание более, чем отдельно взятое низкое содержание растворенного кислорода [25]. Проведенные исследования указывают на негативное воздействие на организм рыб комплекса абиотических факторов – низкой концентрации кислорода в придонных слоях и высокого уровня органического загрязнения.

Обнаружение на поверхности тела рыб грибов порядка Saprolegniales и эпителием оспы свидетельствует об ослаблении организмов рыб и неблагоприятном санитарном состоянии прудов.

Инкубационный период йерсиниоза при температуре воды 13–15 °С составляет 5–10 дней. Болезнь может протекать в молниеносной, острой, подострой и хронической форме.



Микроорганизм может быть легко выделен из внутренних органов с использованием различных культуральных сред. Бактерии растут в широком диапазоне рабочих температур с оптимумом 28–29 °С [26]. В нашем исследовании были использованы питательные среды МПА и Эндо.

Штаммы *Y. ruckeri* подразделяются на два биотипа. Штаммы биотипа 1 являются положительными для моторики и секреции липазы, в то время как штаммы биотипа 2 являются отрицательными для обоих тестов.

Наиболее часто в Европе при лечении йерсиниоза лососевых используют окситетрациклин [27]. Однако бактерия *Y. ruckeri* способна формировать биопленки, что влияет на развитие эпизоотий в рыбоводных хозяйствах [28]. Биопленки показали высокую устойчивость к оксолиновой кислоте, антибиотикам, часто используемому при лечении йерсиниоза [29]. Во Франции [30] наиболее хорошие результаты зарегистрированы для триметоприма/сульфаметаксозола. Кроме этого, при лечении йерсиниоза используют энрофлоксацин и доксициклин [30]. Исследование чувствительности к антибиотикам выделенных микроорганизмов в нашей работе показало реагирование *Y. ruckeri* на действие ципрофлоксацина, тетрациклина, левомицетина и устойчивость к фуразолидону.

Заражение карпа *Y. ruckeri* на юге России было впервые зарегистрировано в данном исследовании. У толстолобиков, выращиваемых совместно с карпами в одном пруду, бактерии данного вида обнаружены не были. Гибели рыб способствовали неблагоприятные условия выращивания – хэндлинг, 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 регистрируется достаточно часто. Известно, что *Y. ruckeri* может долгое время выживать в пресной и морской воде [31]. Таким образом, возбудитель мог оставаться в пруду данного рыбоводного хозяйства уже после реализации радужной форели.

Однако случай заболевания карпа не классический, так как отсутствовали клинические признаки болезни – воспаление и эрозия во рту («красный рот»), на жаберных крышках, у основания лучей плавников. По литературным данным [32] известно, что йерсиниоз может развиваться молниеносно, когда клинические признаки не успевают проявиться. В описываемом случае такой сценарий может быть обусловлен отсутствием резистентности карпа к данному возбудителю и развитием смешанной бактериальной инфекции, отягощенной *Aeromonas hydrophila*.

В настоящей работе патологоанатомическое и гистологическое исследование не выявило изменений в структуре внутренних органов, за исключением скоплений лейкоцитов небольшой плотности во многих органах и среднюю инфильтрацию лейкоцитов в печени рыб. Эти наблюдения идут вразрез с данными бактериологического и ПЦР-анализа, которые определили наличие во всех исследуемых карпах *Y. ruckeri*. Нам не удалось выявить типичные для йерсиниоза гистологические изменения: гиперемии с воспалительным процессом во всех

**Таблица 4.** Результаты исследования клинических образцов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results),  $n = 30$

**Table 4.** The results of investigations of clinical isolates by MALDI-TOF mass – spectrometry method (Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results),  $n = 30$

Показатель Characteristic	Анализируемый номер Analyzed ID	Организм (наилучший показатель) Primary indicator	Величина показателя Score value	Организм (второй показатель) Secondary indicator	Величина показателя Score value
E19 (++) (A)	1	<i>Yersinia ruckeri</i>	2,238	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1,782
E21 (+) (B)	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,779	<i>Aeromonas media</i>	1,752
E22 (+) (B)	2	<i>Aeromonas media</i>	1,751	<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1,715
F1 (+) (B)	4	<i>Aeromonas</i> sp.	1,963	<i>Aeromonas popoffii</i>	1,929
F2 (++) (A)	4	<i>Aeromonas bestiarum</i>	2,02	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1,927

**Таблица 5.** Исследование чувствительности/устойчивости (%) к разным антибактериальным препаратам выделенных микроорганизмов  
**Table 5.** Sensivity (%) of detected microorganisms against different antibiotics

Антибактериальный препарат Antibiotic	Содержание препарата в диске, мкг Disk antibiotic content, µg	Количество чувствительных штаммов <i>Aeromonas hydrophila</i> (%) Number of sensitive strains of <i>Aeromonas hydrophila</i> (%)	Количество чувствительных штаммов <i>Yersinia ruckeri</i> (%) Number of sensitive strains of <i>Yersinia ruckeri</i> (%)
Фуразолидон Furazolidone	300	10	0
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	5	100	100
Тетрациклин Tetracycline	30	100	100
Левомецетин (хлорамфеникол) Chloramphenicol	30	100	100

тканях, с колониями бактерий в почках, селезенке, сердце, печени и жабрах. Результаты бактериологического исследования и ПЦР-анализа не позволяют считать *Y. ruckeri* возбудителем заболевания и причиной гибели рыб, и рассматривать данный случай следует как бактерионосительство.

В доступной литературе нами обнаружено только 3 статьи, авторы которых использовали ПЦР для работы с *Y. ruckeri*. В работах Т.Л. Джеффри с коллегами [33] и А. Церро с соавторами [34] представлены праймеры, разработанные на основе гена 16S рРНК. Это, несомненно, консервативный участок гена, однако современными исследованиями показано, что использование праймеров, сконструированных на основе рибосомальных генов, часто дает ложноположительные результаты. То есть было обосновано, что праймеры, комплементарные последовательностям гена 16S рРНК, определяют не только *Y. ruckeri*, но и ДНК других представителей семейства Enterobacteriaceae, что недопустимо при дифференциальной диагностике. Поэтому вышеуказанные авторы рекомендуют дополнительно использовать секвенирование для подтверждения специфичности синтезируемых в реакции ампликонов.

В работе М. Котетишвили с соавторами [35] использованы 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. molarctii*. В ходе исследования было установле-

но, что *Y. ruckeri* является наиболее генетически однородной и наиболее отдаленной группой внутри рода, однако вопросы о достоверных межвидовых отличиях от других представителей семейства Enterobacteriaceae не изучались.

Внеклеточные токсины *Y. ruckeri*, Ygp1 и Yh1A. Ygp1 протеазы, способствуют вирулентности бактерий и участвуют в колонизации и во вторжении в различные ткани. Действительно, Ygp1 протеаза расщепляет внеклеточный матрикс и мышечные белки, что может привести к мембранным изменениям и, как следствие, к утечке крови из сосудов. Гемолизин Yh1A способен лизировать эритроциты. Подобно Ygp1 оперону, экспрессия Yh1A значительно выше при температуре 18 °С, чем при 28 °С [36]. По-видимому, существуют и другие, еще не выявленные, механизмы патогенного воздействия йерсиний. Нет сомнений, что по мере открытия новых детерминант патогенности у *Yersinia* spp. сложность и многообразие взаимодействия этого патогена и макроорганизма будут возрастать, как и механизмы влияния на регуляцию смерти эукариотических клеток.

Случай, описанный в данной работе, еще раз служит тому подтверждением. Привезенная из Краснодарского края радужная форель, скорее всего, была носителем бактерий *Yersinia ruckeri*. При переходе на карпа, не имеющего к ним иммунитета, бактерии способствовали снижению резистентности организма рыб к неблагоприятным факторам окружающей среды и при комплексном воздействии с *A. hydrophila* – последующей гибели карпа. Следовательно, ни один новый объект не должен быть вселен в существующее сообщество без уверенности в том, что он безопасен.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tobback E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F., Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. 30(5): 257–268.
2. Shaowu L., Wang D., Hongbai L., Tongyan L. 2013. Isolation of *Yersinia ruckeri* Strain H01 from Farm-Raised Amur Sturgeon *Acipenser schrencki* in China. *Journal of Aquatic Animal Health*. 25(1): 9–14.
3. Vuillaume A., Brun R., Chene P., Sochon E., Lesel R. 1987. First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon *Acipenser baeri* Brandt, in South West of France. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 7(1): 18–19.
4. Valtonen E. T., Rintamäki P., Koskivaara M. 1992. Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland. *Journal of Fish Diseases*. 15(2): 163–171. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1992.tb00650.x
5. Rintamäki P., Valtonen E.T., Frerichs G.N. 1986. Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland. *Journal of Fish Diseases*. 9(2): 137–140. doi: 10.1111/j.1365-2761.1986.tb00993.x
6. Dwilow A.G., Souter B.W., Knight K. 1987. Isolation of *Yersinia ruckeri* from burbot, *Lota lota* (L.), from the Mackenzie River, Canada. *Journal of Fish Diseases*. 10(4): 315–317. doi: 10.1111/j.1365-2761.1987.tb01076.x
7. Cipriano R.C., Ruppenthal T., Schill W.B., Pyle S.W., Schotts E.B. 1987. Susceptibility of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) to experimental infections with different serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Microbios Letters*. 35: 27–31.
8. Danley M.L., Goodwin A.E., Killian H.S. 1999. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*. 22(6): 451–456. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00196.x
9. Gudmundsdottir B.K., Gudmundsdottir S., Gudmundsdottir S., Magnadottir B. 2013. Yersiniosis in Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), characterization of the infective strain and host reactions. *Journal of Fish Diseases*. 37(6): 511–519. doi: 10.1111/jfd.12139
10. Bastardo A., Bohle H., Ravelo C., Toranzo A.E., Romalde J.L. 2011. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Disease of Aquatic Organisms*. 93(3): 207–214. doi: 10.3354/dao02296
11. Fouz B., Zarza C., Amaro C. 2006. First description of non-motile serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *Journal of Fish Diseases*. 29(6): 339–346. doi: 10.1111/j.1365-2761.2006.00723.x
12. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. Приказ от 19 декабря 2011 г. № 476 «Об утверждении перечня заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)». URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/2964.html> (дата обращения: 12.08.2016).
13. Боева Л.В. 2009. *Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. Ч. 1*. Ростов н/Д, НОК: 1046 с.
14. ГОСТ 31861-2012. Вода. Общие требования к отбору проб. URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-31861-2012> (дата обращения: 12.08.2016).
15. МУК 4.2.1884-04. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. URL: [http://ohranatruda.ru/ot\\_biblio/normativ/data\\_normativ/45/45900/](http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/45/45900/) (дата обращения: 12.08.2016).
16. Хоулт Д., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. (ред.). 1997. *Определитель бактерий Берджи. Т. 1*. М., Мир: 432 с.
17. Хоулт Д., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. (ред.). 1997. *Определитель бактерий Берджи. Т. 2*. М., Мир: 368 с.
18. Gibello A., Blanco M.M., Moreno M.A., Cutuli M.T., Domenech A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. 1999. Development of a PCR Assay for the Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissue of inoculated and naturally infected Trout. *Applied Environmental Microbiology*. 65(1): 346–350.
19. Быховская-Павловская И.Е. 1985. *Паразиты рыб: Руководство по изучению*. М., Наука: 121 с.
20. *Лабораторный практикум по болезням рыб*. 1983. М., Легкая и пищевая промышленность: 296 с.
21. *Определитель паразитов пресноводных рыб. Т. 2*. 1985. Л., Наука: 425 с.
22. *Определитель паразитов пресноводных рыб. Т. 3*. 1987. Л., Наука: 583 с.
23. *Экологический вестник Дона «О состоянии окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области в 2015 году»*. 2016. Ростов н/Дону, Правительство Ростовской области, Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области: 370 с.
24. Казарникова А.В., Шестаковская Е.В., Галеотти М., Тришина А.В., Турченко А.А. 2015. Влияние условий выращивания и смешанной бактериальной инфекции на гибель ленокского осетра *Acipenser baerii* в садках. *Вестник Южного научного центра*. 11(1): 70–79.
25. Mathur P., Agarwal S., Nag M. 2008. Assessment of physico-chemical characteristics and suggested restoration measures for Pushkar Lake Ajmer Rajasthan. In: *Proceedings of Taal2007: The 12<sup>th</sup> World Lake Conference (Jaipur, Rajasthan, India, 28 October – 2 November, 2007)*: 1518–1529.
26. Stevenson R., Flett D., Raymond B.T. 1993. Enteric redmouth (ERM) and other entobacterial infections of fish. In: *Bacterial diseases of fish*. New York, Halsted Press: 80–106.
27. Rodgers C.J. 1991. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*. 14(3): 291–301. doi: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00826.x
28. Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T. 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*. 26(4): 373–378. doi: 10.1016/S0927-7765(02)00023-1
29. Vendrell D., Balcázar J., Calvo A., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Gironés O., Múzquiz J. 2009. Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*. 71(2): 331–333. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.03.003
30. Calvez S., Gantelet H., Blanc G., Douet D., Daniel P. 2014. *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and

- antibiotic susceptibility. *Disease of Aquatic Organisms*. 109: 117–126. doi: 10.3354/dao02725
31. Thorsen B.K., Enger O., Norland S., Hoff K.A. 1992. Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. *Applied Environmental Microbiology*. 58(5): 1624–1628.
32. Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхтменко Л.Н. 2010. *Ихтиопатология*. М., Мир: 448 с.
33. LeJeune J.T., Rurangirwa F.R. 2000. Polymerase Chain Reaction for Definitive Identification of *Yersinia Ruckeri*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12: 558–561.
34. Cerro A., Marquez I., Guijarro J.A. 2002. Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. *Applied Environmental Microbiology*. 68(10): 5177–5180. doi: 10.1128/AEM.68.10.5177-5180.2002
35. Kotetishvili M., Wauters A.K., Morris J.G., Sulakvelidze A., Stine O.C. 2005. Multilocus Sequence Typing for Studying Genetic Relationships among *Yersinia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(6): 2674–2684. doi: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005
36. Altinok I. 2004. The infectious route of *Yersinia ruckeri* is affected by salinity. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 24(5): 253–259.
- caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*. 22(6): 451–456. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00196.x
9. Gudmundsdottir B.K., Gudmundsdottir S., Gudmundsdottir S., Magnadottir B. 2013. Yersiniosis in Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), characterization of the infective strain and host reactions. *Journal of Fish Diseases*. 37(6): 511–519. doi: 10.1111/jfd.12139
10. Bastardo A., Bohle H., Ravelo C., Toranzo A.E., Romalde J.L. 2011. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Disease of Aquatic Organisms*. 93(3): 207–214. doi: 10.3354/dao02296
11. Fouz B., Zarza C., Amaro C. 2006. First description of non-motile serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *Journal of Fish Diseases*. 29(6): 339–346. doi: 10.1111/j.1365-2761.2006.00723.x
12. *Ministerstvo sel'skogo khozyaystva Rossiyskoy Federatsii. Prikaz ot 19 dekabrya 2011 g. № 476 "Ob utverzhdenii perechnya zaraznykh, v tom chisle osobo opasnykh, bolezney zhivotnykh, po kotorym mogut ustanavlivat'sya ogranichitel'nye meropriyatiya (karantin)". [The Ministry of Agriculture of the Russian Federation. Order of 19 December 2011 No 476 "On Approval of the List of communicable, including especially dangerous animal diseases, which should be treated with the measures (quarantine)". Available at: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/2964.html> (accessed 12 August 2016). (In Russian).*
13. Boeva L.V. 2009. *Rukovodstvo po khimicheskomu analizu poverkhnostnykh vod sushi. Chast' I. [Guidelines for chemical analysis of water. Part I]. Rostov-on-Don, NOK: 1046 p. (In Russian).*
14. *GOST 31861-2012. Voda. Obshchie trebovaniya po otboru prob. [Water. The guidelines for water analysis]. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/gost-31861-2012> (accessed 12 August 2016). (In Russian).*
15. *MUK 4.2.1884-04. Sanitarno-mikrobiologicheskii i sanitarno-parazitologicheskii analiz vody poverkhnostnykh vodnykh ob'ektov. [Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water]. Available at: [http://ohranatruda.ru/ot\\_biblio/normativ/data\\_normativ/45/45900/](http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/45/45900/) (accessed 12 August 2016). (In Russian).*
16. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.). 1997. *Opredelitel' bakteriy Berdzhii. T. 1. [Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol. 1]. Moscow, Mir: 432 p. (In Russian).*
17. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.). 1997. *Opredelitel' bakteriy Berdzhii. T. 2. [Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol. 2]. Moscow, Mir: 368 p. (In Russian).*
18. Gibello A., Blanco M.M., Moreno M.A., Cutuli M.T., Domenech A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. 1999. Development of a PCR Assay for the Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissue of inoculated and naturally infected Trout. *Applied Environmental Microbiology*. 65(1): 346–350.
19. Bykhovskaya-Pavlovskaya I.E. 1985. *Parazity ryb: Rukovodstvo po izucheniyu. [Parasites of fish: Study Guide]. Moscow, Nauka: 121 p. (In Russian).*

REFERENCES

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

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

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

4. Valtonen E. T., Rintamäki P., Koskivaara M. 1992. Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland. *Journal of Fish Diseases*. 15(2): 163–171. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1992.tb00650.x

5. Rintamäki P., Valtonen E.T., Frerichs G.N. 1986. Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland. *Journal of Fish Diseases*. 9(2): 137–140. doi: 10.1111/j.1365-2761.1986.tb00993.x

6. Dwilow A.G., Souter B.W., Knight K. 1987. Isolation of *Yersinia ruckeri* from burbot, *Lota lota* (L.), from the Mackenzie River, Canada. *Journal of Fish Diseases*. 10(4): 315–317. doi: 10.1111/j.1365-2761.1987.tb01076.x

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

8. Danley M.L., Goodwin A.E., Killian H.S. 1999. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque),

20. *Laboratornyy praktikum po boleznyam ryb* [Laboratory course on fish diseases]. 1983. Moscow, Legkaya i pishchevaya promyshlennost': 296 p. (In Russian).
21. *Opredelitel' parazitov presnovodnykh ryb. T. 2.* [Key to fresh water fish parasites. Vol. 2]. 1985. Leningrad, Nauka: 425 p. (In Russian).
22. *Opredelitel' parazitov presnovodnykh ryb. T. 3.* [Key to fresh water fish parasites. Vol. 3]. 1987. Leningrad, Nauka: 583 p. (In Russian).
23. *Ekologicheskiy vestnik Dona "O sostoyanii okruzhayushchey sredy i prirodnykh resursov Rostovskoy oblasti v 2015 godu".* [Ecological Bulletin of Don "State of the Environment and Natural Resources of the Rostov Region in 2015"]. 2016. Rostov-on-Don, Government of Rostov Region, Ministry of Natural Resources and Ecology of Rostov Region: 370 p. (In Russian).
24. Kazarnikova A.V., Shestakovskaya E.V., Galeotti M., Trishina A.V., Turchenko A.A. 2015. [The influence of growth conditions and mixed bacterial infection on Lena sturgeon *Acipenser baerii* mortality in cages]. *Vestnik Yuzhnogo nauchnogo tsentra.* 11(1): 70–79. (In Russian).
25. Mathur P., Agarwal S., Nag M. 2008. Assessment of physico-chemical characteristics and suggested restoration measures for Pushkar Lake Ajmer Rajasthan. In: *Proceedings of Taal2007: The 12<sup>th</sup> World Lake Conference (Jaipur, Rajasthan, India, 28 October – 2 November, 2007)*: 1518–1529.
26. Stevenson R., Flett D., Raymond B.T. 1993. Enteric redmouth (ERM) and other entobacterial infections of fish. In: *Bacterial diseases of fish*. New York, Halsted Press: 80–106.
27. Rodgers C.J. 1991. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases.* 14(3): 291–301. doi: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00826.x
28. Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T. 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 26(4): 373–378. doi: 10.1016/S0927-7765(02)00023-1
29. Vendrell D., Balcázar J., Calvo A., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Gironés O., Múzquiz J. 2009. Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 71(2): 331–333. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.03.003
30. Calvez S., Gantelet H., Blanc G., Douet D., Daniel P. 2014. *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. *Disease of Aquatic Organisms.* 109: 117–126. doi: 10.3354/dao02725
31. Thorsen B.K., Enger O., Norland S., Hoff K.A. 1992. Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. *Applied Environmental Microbiology.* 58(5): 1624–1628.
32. Golovina N.A., Strelkov Yu.A., Voronin V.N., Golovin P.P., Evdokimova E.B., Yukhtmenko L.N. 2010. *Ikhtiopatologiya.* [Ichthyopathology]. Moscow, Mir: 448 p. (In Russian).
33. LeJeune J.T., Rurangirwa F.R. 2000. Polymerase Chain Reaction for Definitive Identification of *Yersinia Ruckeri*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 12: 558–561.
34. Cerro A., Marquez I., Guijarro J.A. 2002. Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. *Applied Environmental Microbiology.* 68(10): 5177–5180. doi: 10.1128/AEM.68.10.5177-5180.2002
35. Kotetishvili M., Wauters A.K., Morris J.G., Sulakvelidze A., Stine O.C. 2005. Multilocus Sequence Typing for Studying Genetic Relationships among *Yersinia* Species. *Journal of Clinical Microbiology.* 43(6): 2674–2684. doi: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005
36. Altinok I. 2004. The infectious route of *Yersinia ruckeri* is affected by salinity. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.* 24(5): 253–259.

Поступила 16.09.2016