

УДК 639.3.091

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ АЭРОМОНАД ПО СТЕПЕНИ ДНК-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Л.Н. Юхименко,

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
пресноводного рыбного хозяйства», п. Рыбное, Россия

Аннотация. Дана информация о биологических свойствах вирулентности аэромонад, выделенных от здоровой рыбы и из воды рыбоводных прудов, проведенной оценке эпизоотической значимости различных вирулентных видов и биоваров аэромонад. По уровню ДНКазной активности было выявлено три группы аэромонад.

Ключевые слова: ДНКазная активность, биопроба, эпизоотическая роль, патогенные штаммы

STUDY OF AEROMONADES VIRULENCE BY DNASA'S ACTIVITIES LEVEL

L.N. Yukhimenko

Summary. Information on biological properties of motility aeromonades isolated from fishes and water of fishfarming reservoirs as well as on epizootical significance of different virulent aeromonades species and biovars. Three groups of aeromonades are characterized on the level of their DNAsa's activities.

Keyword: DNAsa's activities, biological test, epizootical role, pathogenic strains.

Бактерии рода *Aeromonas* являются одним из компонентов бактериальной флоры воды и обнаруживаются практически во всех водоемах, особенно загрязненных органическими веществами. В интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах количество аэромонад колеблется от нескольких сотен до тысяч микробных клеток в 1 мл воды [4, 9, 10]. Благодаря биохимической активности аэромонады способствуют разложению органических веществ и самоочищению воды. В то же время хорошо известна роль аэромонад в этиологии различных патологий теплокровных животных, в том числе и у человека [3]. При этом штаммы аэромонад, выделенные от здо-

ровой и больной рыбы и из воды, различаются по вирулентности.

К факторам вирулентности у аэромонад могут быть отнесены желатиназа, казеиназа, липаза, лецитиназа, дезоксирибонуклеаза (ДНКаз), рибонуклеаза (РНКаз), гемолизины, цитотоксины и энтеротоксины.

Для изучения вирулентности бактерий было предложено множество методов: постановка биопробы, определение ДНКазной активности и так называемых ферментов патогенности, токсинов, способность к размножению в культуре клеток. Установлена взаимосвязь патогенности бактерий с белковым составом, для определения которой используется

метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ДЭПААГ) [6, 8]. Благодаря этому методу мы смогли установить три группы аэромонад.

К **первой группе** относятся облигатные патогены, высоковирулентные аэромонады, сохраняющие свою вирулентность в течение длительного времени (в нашем случае более 20 лет) и вызывающие при проведении биопробы контактным методом 100%-ную гибель опытной рыбы. Такие штаммы были нами выделены всего 3 раза — в Молдавии от белого толстолобика с ярко выраженной клинической картиной, в Дагестане и Туркмении от карпа.

Вторая группа — это штаммы с приобретенной или индуцированной вирулентностью, которые приобретают свои свойства в результате воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды или пассирования через организм рыбы. Такие штаммы в момент выделения могут быть высоковирулентными, но в процессе хранения на искусственных средах снижают или вообще могут потерять свою вирулентность. Биопроба контактным методом дает отрицательный результат.

Третью группу составляют аэромонады — представители нормального биоценоза воды или кишечника рыб, не обладающие вирулентными свойствами при первичном выделении, однако при создании соответствующих условий аэромонады третьей группы могут перейти во вторую и обратно [11].

Сложность и трудоемкость изучения биологических свойств аэромонад путем постановки биопробы заставили нас обратиться к изысканию модели, позволяющей упростить этот вид исследований. Таковой явилась ДНКазная активность [2, 5, 13].

Изучение ДНКазной активности, контролируемой постановкой биопро-

бы на карпах, энзиматической активности и белкового спектра с помощью ДЭПААГ позволило получить более полную характеристику свойств аэромонад и подтвердить наблюдения, касающиеся патогенеза заболеваний, вызываемых аэромонадами [10].

Культуры, образующие зону деполимеризации до 3 мм — слабовирулентные, могут не вызывать развития клинических признаков у рыб; при зоне деполимеризации до 5 мм — вирулентные и в биопробе ведут себя вариабельно; при зоне деполимеризации более 5 мм — высоковирулентные, способные вызывать признаки острого заболевания и даже гибель опытной рыбы. Первые годы проводили параллельные исследования по ДНКазной активности выделенных культур и их способности вызывать патологический процесс у рыб в биопробе. Всего параллельно было испытано около 1500 культур аэромонад, выделенных от больной и здоровой рыбы и из воды рыбохозяйственных водоемов. При этом было выявлено, что вирулентные по ДНКазной активности аэромонады, выделенные из патматериала от рыб с острыми клиническими признаками, дают положительный ответ и при постановке биопробы на рыбах. В то же время аэромонады, выделенные от клинически здоровой рыбы и из воды, обладающие довольно высокой ДНКазной активностью, примерно в 30% случаев давали отрицательный результат, т. е. не всегда вызывали развитие клинических признаков у рыб или их гибель.

С целью изучения эпизоотической роли авирулентных аэромонад в лабораторных условиях был проведен эксперимент.

Для этого отобрали 6 штаммов, выделенных от здоровой рыбы и из воды прудов, с ДНКазной активностью: –, –, –,

±, +, ++ и авирулентных в биопробе. Все штаммы было решено пропассировать через организм рыб. Для контроля реинфекции получили тетрациклиноустойчивые мутанты путем культивирования их на питательной среде, содержащий тетрациклин с нарастающей концентрацией. Предварительные исследования показали, что на среде с концентрацией тетрациклина 1:400 ничто не растет, и отобранные штаммы адаптировали к этой концентрации. Для этого потребовалось от 9 до 13 пассажей. После получения тетрациклинрезистентных мутантов начали пассирование их через организм карпов. Каждую культуру вводили 3 карпам, через двое суток проводили реинфекцию аэромонад с последующим заражением трех рыб. Параллельно с повышением вирулентности культур аэромонад увеличивалась и зона деполимеризации ДНК — до 5–7 мм. После 3–4 пассажей они вызывали острые клинические проявления и гибель рыб. Интересно отметить, что индуцированная ДНКазная активность у аэромонад второй группы, выделенных из воды или от здоровых рыб, иногда достигала 13–15 мм, однако в биопробе они не вызывали развития клинических признаков. Однако достаточно было небольшого «толчка», и они уже ничем не отличались от облигатных патогенов. Таким пусковым механизмом являлись стрессирующие факторы среды (перепад температур, недостаток кислорода, токсичные формы азота, органика и др.), а также длительное применение антибактериальных препаратов и т. д. Повышение агрессивности среды вызывает ответную реакцию со стороны микроорганизма, вынуждая его мобилизовывать все факторы защиты и агрессии. Чтобы не провоцировать подобные ситуации, необходимо регулярно проводить са-

нитарно-гигиенические мероприятия, не допускать бесконтрольного длительного использования антибиотиков (особенно с профилактической целью), повышать резистентность рыб экологически чистыми средствами — пробиотиками и вакцинами. Именно из штамма *Aeromonas sobria* 77–18, изолированного от белого толстолобика с острыми клиническими проявлениями в Молдавии (1983) и относящегося к первой группе аэромонад, методом гель-хроматографии на Сефадексе G-100 была выделена фракция 2 (56 кДа). В ходе экспериментальной проверки фракция 2 обеспечивала высокий уровень защиты от заболевания и была запатентована как вакцина ВЮС 2 [8]. Исследование иммуногенных свойств фракции 2 показало, что она активизирует такие факторы иммунитета у рыб, как антителообразование, синтез лизоцима, адгезию бактериальных патогенов в эпидермальной слизи, миграцию макрофагов в конечный отдел кишечника рыб, фагоцитоз [1]. Белки этой фракции защищали карпов как от гомологичных, так и от гетерологичных штаммов подвижных аэромонад, стимулировали высокий уровень напряженности иммунитета у лососевых рыб к фурункулезу (*A. salmonicida*) и к вибриозу (*Vibrio anguillarum*), обеспечивая в последнем случае 70%-ную защиту при последующем заражении. Защитное действие фракции 2 продемонстрировано также на канальных сомах при энтеросептической инфекции смешанной этиологии, вызванной представителями семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*.

При сравнении различных по патогенности штаммов аэромонад первой и второй групп в электрофоретических белковых спектрах было обнаружено до 40 индивидуальных полос. Молекулярные массы (Мм) фракций находились в

диапазоне 12–136 кДа. Количество белков с Мм ниже 40 и выше 60 кДа практически одинаково у исследованных штаммов. Специфические отличия у разных по вирулентности штаммов выражались в различной интенсивности окраски белковых зон в диапазоне 47–55,6 кДа. У штамма *A. sobria* 77–18 концентрация этих белков была значительно выше, чем у остальных, что и объясняло широкий диапазон его иммуногенной активности. Именно тем, что многие исследователи пытались создавать вакцины против подвижных аэромонад-штаммов, относящихся ко второй группе, объясняется их низкая эффективность против гетерологичных штаммов.

В практических лабораториях нет возможности изучать электрофореграммы выделенных аэромонад. Однако

проверка их биологических свойств путем постановки биопробы контактным методом позволит дать правильную оценку их эпизоотической значимости. При выделении аэромонад первой группы следует накладывать карантин, а во всех остальных — карантинные ограничения, проводить санитарно-гигиенические мероприятия и повышать культуру рыбоводства.

В лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ «ВНИИПРХ» за период с 1980 по 2014 г. по ДНКазной активности было проверено 2608 штаммов аэромонад, выделенных от рыб, и 2816 штаммов, выделенных из воды. Все штаммы относились к 4 видам и 13 биоварам (таблицу). В дальнейшем в соответствии с данными, приведенными в Определителе бактерий Берджи (1997), биовары *A. sp.* 4 и *A. sp.* 5 соответственно

Таблица

Этиологическая структура ДНКазы положительных аэромонад, выделенных от рыб и из воды

Аэромонады	Зоны деполимеризации ДНК (мм)								Всего N %	
	0–1,5		2,0–3,5		4,0–5,5		6,0–13,0			
	N %	N %	N %	N %	N %	N %	N %	N %		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>A. sobria</i>	198	17,5	275	24,3	324	28,6	335	29,6	1132	43,4
	231	17,0	291	23,3	385	30,8	361	26,4	1250	44,4
<i>A. eucrenophila</i>	16	35,6	8	17,8	13	28,8	8	17,8	45	1,7
	56	50,5	11	9,9	26	23,4	18	16,2	111	3,9
<i>A. hydrophila</i>	39	16,9	60	25,9	67	29,0	65	28,2	231	8,9
	20	17,2	31	26,7	30	25,9	35	30,2	116	4,1
<i>A. caviae</i>	34	20,9	52	32,1	47	29,1	29	18,0	162	6,2
	26	21,3	33	27,0	37	30,3	26	21,3	122	4,4
<i>A. sp</i>	7	38,9	2	11,1	6	33,3	3	16,7	18	0,7
	13	17,6	14	33,3	27	36,5	20	27,0	74	2,6
<i>A. sp. 1</i>	10	12,7	21	26,6	30	37,9	18	22,8	79	3,0
	10	9,1	30	27,3	45	40,9	25	22,7	110	3,9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A. sp. 2	36	22,1	43	26,4	44	26,9	40	24,6	163	6,3
	37	26,4	33	23,6	38	27,1	32	22,9	140	4,9
A. sp. 3	21	24,4	33	38,4	11	12,8	21	24,4	86	3,3
	25	21,2	42	35,6	20	16,9	31	26,3	118	4,3
A. sp. 4	29	20,6	47	33,3	47	33,3	18	12,8	141	5,4
	35	25,7	43	31,6	43	31,6	15	11,1	136	4,8
A. sp. 5	71	26,5	75	27,9	82	30,6	40	15,0	268	10,3
	66	33,3	44	22,2	60	22,4	29	22,1	198	7,1
A. sp. 6	0	0	2	28,6	1	14,3	4	57,1	7	0,3
	0	0	23	41,8	22	40,0	10	18,2	55	1,9
A. sp. 7	19	33,3	29	50,9	3	5,3	6	10,6	57	2,2
	39	41,5	34	36,2	12	12,8	9	9,5	94	3,3
A. sp. 8	25	25,8	41	42,3	23	23,7	8	8,2	97	3,7
	32	31,4	44	43,0	15	14,7	11	10,8	102	3,6
A. sp. 9	6	31,6	5	26,3	6	31,6	2	10,5	19	0,7
	5	18,5	9	33,3	11	40,7	2	7,5	27	0,9
A. sp. 10	0	0	0	0	1		0	0	1	0,4
	0	0	0	0	6		0	0	6	0,2
A. sp. 11	32	34,0	28	29,8	28	29,8	6	6,4	94	3,6
	57	39,6	39	27,1	35	24,3	13	9,0	144	5,2
A. sp. 12	3	37,5	3	3,5	2	25,0	0	0	8	0,26
	5	38,5	4	30,8	3	23,1	1	7,6	13	0,5
Всего	546	20,9	724	27,8	735	28,2	603	23,1	2608	
	639	22,7	725	25,7	815	28,9	638	22,7	2816	

Примечание: белая строка — культуры, выделенные от рыбы; серая строка — культуры, выделенные из воды.

были отнесены к видам *Aeromonas veronii* и *A. schubertii*.

Как показали наши исследования, проведенные в разных зонах, среди культур, выделенных от рыбы и из воды, преобладали *A. sobria*. Реже всего выделялись (по нисходящей) *A. eucrenophila* (1,7% из рыбы и 3,9% из воды), *A. sp.* (0,7–2,6%), *A. sp. 9* (0,7–0,9%), *A. sp. 6* (0,3–1,9%), *A. sp. 10* (0,4–0,2%) и *A. sp. 12* (0,26–0,5%) соответ-

ственно. По степени вирулентности среди культур, выделенных из рыбы, наиболее вирулентными (ДНКазная активность 4–13 мм) оказались аэромонады *A. sp. 6* (71,4%), *A. sp. 1* (60,7%), *A. sobria* (58,2%), *A. hydrophila* (57,2%), *A. sp. 2* (51,5%), *A. sp.* (50,0%). Менее 50% — *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. sp. 4*, *A. sp. 5*, *A. sp. 9* (47,1–42,1%), менее 40% — *A. sp. 3*, *A. sp. 11*, *A. sp. 8* (37,2–31,9%). Высоковирулентные

культуры *A. sp.* 12 от рыб выделялись в 25% случаев.

Из воды наиболее часто выделялись высоковирулентные аэромонады биоваров *A. sp.* 1 и *A. sp.* (63,6–63,5%), более 50% было среди *A. sp.* 6, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sp.* 2 (58,2–57,2–56,1–51,6 — 50,0%). Менее 50% от общего количества ДНКазоположительных культур с высокой вирулентностью было среди биоваров *A. sp.* 9, 5, 3, 4 (48,2–44,5–43,2–42,7%). Суммарно среди аэромонад, выделенных от рыбы, 51,3% были высоковирулентны, а среди аэромонад, выделенных из воды, 51,6%. Кроме трех штаммов, выделенных от рыб в Молдавии, Дагестане и Туркмении, и отнесенных к первой группе, все остальные были отнесены ко второй группе, хотя после выделения при постановке биопробы они вызывали острые клинические проявления: язвы, экзофтальмию, кровоизлияние в глазном яблоке, ерошение чешуи и асцит. При проведении биопробы с культурами первой группы у рыб отмечалось нарушение координации, судорожные волнообразные сокращения поверхности тела, рыба опускалась на дно и в течение одного-двух часов погибала.

Изучение вирулентности аэромонад имеет большое значение, так как позволяет дать правильную оценку эпизоотической ситуации в хозяйстве и грамотно провести соответствующие противоэпизоотические мероприятия. В случае выделения аэромонад первой группы необходим карантин, тогда как при вспышке, вызванной аэромонадами второй группы, достаточно применения карантинных ограничений, курса лечения, а самое главное — проведения санитарно-гигиенических мероприятий. В настоящее время не во всех лабораториях есть возможность изучения электрофореграмм выделенных культур, поэтому наиболее доступным методом исследования является биопроба. При внутрибрюшинном заражении свежесделанной бульонной культурой 1-й группы гибель рыбы наступает в течение нескольких часов.

Обширная информация отечественных и зарубежных авторов свидетельствует об эпидемиологическом значении аэромонад, поэтому, работая с патологическим материалом, всегда следует очень строго соблюдать правила техники безопасности и личной гигиены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусева Н.В. Иммунный ответ рыб — объектов аквакультуры на вакцинацию против бактериальных заболеваний: диссертация на соиск. ... канд. биол. наук. — М., 1998. с. 189.
2. Йоргенсен Дж.Х., Пфаллер М.А. Микробиологический справочник для клиницистов: пер. с англ. — М.: Мир. 2006. — С. 14–15.
3. Калина Г.П. Микроорганизмы рода *Aeromonas*, патогенность для человека, патогенез и эпидемиология (обзор зарубежной литературы) // ЖМЭИ. — 1974. — № 10. — С. 105–109.
4. Каховский А.Е. Профилактика болезней рыб бактериальной этиологии в интенсивно эксплуатируемых прудах: автореф. дисс. ... канд. биол. наук — М., 1991. 20 с.
5. Мессина О.В., Юсупова Д.В. Дезоксирибонуклеазы патогенных бактерий (обзор литературы) // ЖМЭИ. — 1966. — № 3. — С. 39–43.
6. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности // Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 1. — М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. — С. 150–151.

7. Определитель бактерий Берджи: пер. с англ. В 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта и др. — М.: Мир, 1997. — 800 с.
8. Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н. Временные методические рекомендации по сравнительному анализу штаммов аэромонад методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. — М., 1988. — 14 с.
9. Юхименко Л.Н. Проблема аэромонада: итоги исследования // Болезни рыб: Тр. ВНИИПРХ. Вып. 79. — М.: Компания Спутник+. 2004. — С. 206–215.
10. Юхименко Л.Н., Викторова В.Ф., Федорченко В. И Выделение аэромонад из воды рыбободных прудов // Болезни рыб и водная токсикология: Тр. ВНИИПРХ. Вып. 50. — 1987. — С. 37–46.
11. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С. Современное состояние проблемы аэромонада рыб // Ж. Рыбное хозяйство, серия: Аквакультура. Болезни рыб. М.: ЭКИНАС, 1997. — Вып. 2. С. 1–9.
12. Юхименко Л.Н., Харитонов С.Н., Староверова Г.С. [и др.]. Материалы к изучению роли аэромонад в патологии человека // ЖМЭИ. — 1977. — № 7. — С. 143.
13. Jeffris C., Holtman D., Puse D. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid // J. Bacteriol. — 1957. — Vol. 73, № 4. — P. 590–591.

ОТ МОСКВЫ ДО САХАЛИНА

Входит в Перечень изданий ВАК.

В нашей стране с ее огромной территорией, пригодной для сельского хозяйства, наличием квалифицированных специалистов в отрасли, огромным научным заделом ведения крупномасштабного животноводства в ближайшей перспективе абсолютно реально создание высокоэффективной, современной отрасли сельского хозяйства. Дело в том, что животноводство России в настоящее время переживает не лучшие времена, и приятно сознавать, что на рынке печатной продукции имеется издание, которое пропагандирует как последние достижения в области научных исследований, так и практические рекомендации для специ-

алистов различных отраслей животноводства.

Журнал «Главный зоотехник» популярен во всех регионах нашей огромной страны и является в своем роде уникальным изданием, в котором освещены практически все направления животноводства — от скотоводства до рыбоводства и звероводства. В то же время в нем рассматривается и широкий спектр вопросов, связанных с успешным ведением той или иной отрасли: состояние и перспективы развития племенной работы и воспроизводства стада, кормление и содержание животных, технологии производственных процессов, направленных на повышение продуктивности различных пород скота, свиней, овец и птицы.

ЖУРНАЛ «ГЛАВНЫЙ ЗООТЕХНИК»



Редакционная подписка в 1,5–2 раза дешевле, чем подписка на почте.

На правах рекламы

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ! Получить счет для оплаты подписки через редакцию можно, прислав заявку в произвольной форме на адрес: podpiska@panor.ru
 Подробнее о подписке — на сайте www.panor.ru, тел. (495) 664-27-61

ЖУРНАЛ «КОРМЛЕНИЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И КОРМОПРОИЗВОДСТВО»

ВСЕ О КОРМЛЕНИИ

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Входит в Перечень изданий ВАК.

Главное условие успешного развития животноводства — производство достаточного количества кормов. Максимально полное использование генетического потенциала продуктивности требует увеличения производства кормов, повышения их качества и совершенствования структуры кормопроизводства. Решение всех поставленных вопросов читатель найдет в полюбившемся всем специалистам в области кормления с.-х. животных журнале «Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство», где публикуются очень важные для практиков и ученых материалы, ав-

торами которых являются как широко известные, так и молодые специалисты-исследователи. Содержание статей отличается новизной и возможностью применения на практике, что очень важно для специалистов таких хозяйств, которые испытывают значительные трудности в доступной информации о новых технологиях кормления, приготовления кормосмесей, инновационных технологиях заготовки кормов и их консервировании, требованиях к качеству отечественных и зарубежных кормовых добавок, о контроле качества и безопасности сырья и комбикормов, ветеринарном и фитосанитарном контроле и др. Обо всем этом журнал рассказывает подробно и конкретно.



Редакционная подписка в 1,5–2 раза дешевле, чем подписка на почте.

На правах рекламы

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ! Получить счет для оплаты подписки через редакцию можно, прислав заявку в произвольной форме на адрес: podpiska@panor.ru
 Подробнее о подписке — на сайте www.panor.ru, тел. (495) 664-27-61