

## ИЕРСИНИОЗ У РЫБ СЕМЕЙСТВА ЛОСОСЕВЫХ

<sup>1</sup>Решетникова О.В., <sup>1</sup>Сбойчаков В.Б., <sup>2</sup>Панин А.Л., <sup>2</sup>Краева Л.А.

<sup>1</sup>Лужский институт (филиал) ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина», г. Луга, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Аннотация.** В статье раскрыты особенности протекания иерсиниоза у рыб семейства лососевых, в частности – форели. Детально описана этиология этой болезни и методы современной лабораторной диагностики. Рассмотрены последние научные разработки по *Y. ruckeri*, включая современное распространение, диагностику и методы борьбы с иерсиниозом.

**Ключевые слова.** Иерсиниоз, *Yersinia ruckeri*, рыбы семейства лососевых, форель, этиология, лабораторная диагностика, профилактика.

## YERSINIOSIS IN FISH OF THE SALMON FAMILY

<sup>1</sup>Reshetnikova O.V., <sup>1</sup>Sboichakov V.B., <sup>2</sup>Panin A.L., <sup>2</sup>Kraeva L.A.

<sup>1</sup>Head Department, Luga Institute (branch) State Autonomous Educational Institution of Higher Education of the Leningrad Region «Pushkin Leningrad State University», Luga, Russian Federation, 188230 Volodarsky Street, 52, lit. A

<sup>2</sup>Saint-Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology Saint Petersburg, Russian Federation, 197101 Meera Street, 14, lit. A

**Abstract.** The article reveals the features of the course of yersiniosis in fish of the salmon family, in particular, trout. The etiology of this disease and methods of modern laboratory diagnostics are described in detail. The latest scientific developments on *Y. ruckeri*, including the modern distribution and diagnosis and methods of combating yersiniosis, are considered.

**Keywords.** Yersiniosis, *Yersinia ruckeri*, salmon fish, trout, etiology, laboratory diagnostics, prevention.

Рыба может рассматриваться как настоящая кладезь питательных веществ, а именно - белка, жирных кислот, витаминов, минералов и микроэлементов. Сегодня аквакультура может рассматриваться как весьма перспективное производство продуктов питания. Серьезным препятствием на этом пути являются эпизоотии среди рыб, что существенно тормозит индустрию аквакультуры. Наиболее частыми объектами аквакультуры в России являются холодноводные рыбы семейства лососевых, в частности, - радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*). Эта рыба быстро растет и нетребовательна к условиям культивирования.

На первом месте среди эпизоотий стоит иерсиниоз или кишечная красноточная болезнь, болезнь Редмута (ERM, Enteric redmouth). Это одно из наиболее частых заболеваний лососевых. Заболевание вызывается *Yersinia ruckeri*, грамтрицательной палочковидной бактерией, которая была впервые выделена из радужной форели в США [19]. В настоящее время эта болезнь встречается на всем американском континенте, а также в Европе, Австралии, Южной Африке, на Ближнем Востоке и в Китае. Отечественными авторами *Y. ruckeri* выделены от карпов, разводимых в прудовых хозяйствах на юге России [6]. Иерсиниозом заболевают все виды рыб семейства лососевых (горбуша, чавыча, кижучи, кумжа, нерка и другие), ленский осетр, что приводит к гибели от 25 до 50 %, а в отдельных случаях - и до 85 % рыб. Однако радужная форель особенно восприимчива к ERM. Кроме того, *Y. ruckeri* была выделена помимо рыб и у других животных (ондатра, пустельга, морские чайки, черепахи) и людей [22].

В России штамм *Y. ruckeri* впервые выделен при проведении бактериологического исследования из испражнений гастроэнтерологического больного, у которого отсутствовала соматическая патология, имеющего отрицательные результаты обследования на вирусные и бактериальные инфекции. Характерным для *Y. ruckeri* является отсутствие фермента уреазы, вследствие чего колонии на

элективных питательных средах не окрашивались в сине-зеленый цвет, как у других иерсиний. Дальнейшие исследования методом MALDI ToFMS и определение биохимической активности с использованием тест-системы API 20E показали, что бактерии относятся к виду *Y. ruckeri*. В качестве дополнительного метода определения родовой и видовой принадлежности исследуемого штамма применяли секвенирование гена 16SpPHK.

Есть публикация о выделении *Y. ruckeri* из раневого отделяемого человека после травмы, полученной во время купания [16]. Являясь абсолютным патогеном для лососевых и других рыб, часто употребляемых в пищу человеком не только в термически обработанном, но и сыром виде, ставит вопрос об их возможной этиологической значимости [2].

Исследования, проведенные в водоемах, расположенных на территории Финляндии, показали, что микроорганизмы были выделены у диких рыб (окуня, плотвы, сига), и искусственно выращиваемых (сиг, лосось). Было установлено, что штаммы микроорганизмов, выделенные из рыб, обитаемых во внутренних водоемах, были менее патогенными, чем из рыб, обитаемых в открытом море. Заражение рыб может происходить при прямом контакте особей, а также распространяться через воду. На заболеваемость оказывают влияние условия содержания: их ухудшение приводит к тому, что бактерия начинает выделяться в больших количествах с фекалиями рыб. Рыбы, обитающие в естественных природных условиях являются переносчиками бактерий, поддерживая уровень заболеваемости и усложняя борьбу с эпизоотиями [10].

У рыб, пораженных иерсиниозом, нарушается в начальной стадии болезни координация движений, которое проявляется в том, что рыба плавает по кругу, а также наблюдается отставание в росте и развитии, что приводит к потере живой массы. В дальнейшем увеличивается размер головы, поражаются челюсти, основания плавников, появляются эрозии во рту («красный рот»). Если заболевание протекает молниеносно, в этом случае клинические признаки не успевают развиваться. Иерсинии, из кишечника экспериментально зараженных особей, выделяются в течение 100 дней. Болезнь может поражать рыб всех возрастов, но более остро проявляется у молоди (мальков и сеголетков). Старые и крупные рыбы болеют хронически. Другие признаки заболевания включают экзофтальмию и потемнение кожи, а также подкожные кровоизлияния во рту и горле и вокруг них, что и дало этому заболеванию его общее название. Во внутренних органах больных рыб наблюдаются точечные кровоизлияния на поверхности печени, поджелудочной железы, пилорической слепой кишки, плавательного пузыря и в боковых мышцах. Селезенка увеличена в размерах, становится почти черного цвета, нижняя часть кишечника краснеет, заполнена непрозрачной желтоватой жидкостью.

Знаменательна история открытия *Y. ruckeri*. До её описания науке были известны только три вида иерсиний, которые оставили глубокий след в древней и современной истории человечества - *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Изучение возбудителя болезни «красного рта» форели показало высокую гомологию его ДНК и ДНК *Y. enterocolitica* [14]. *Y. Ruckeri* имеет 3,7 Мб генома с соотношением G + C ~ 47 %. Данные исследования позволили в 1978 году W.H. Ewingetal включить эти бактерии в род *Yersinia* под названием *Y. ruckeri* [17]. В род *Yersinia* сейчас входит более 20 видов бактерий. В соответствии с современной классификацией *Yersinia ruckeri* относится к роду *Yersinia*, в самостоятельном семействе *Yersiniaceae*, порядок *Enterobacteriales* [13]. Тем не менее, многие исследователи до сих пор включают род *Yersinia* в семейство энтеробактерий.

Представители *Y.ruckeri* имеют факторы патогенности, обладают способностью к биопленкообразованию [21]. Штаммы *Y. ruckeri* классифицируют на серовары, биовары по типу белков внешней мембраны. Подавляющее большинство эпизоотий у лососевых вызывается сероваром O1a. Штаммы *Y. ruckeri* подразделяются на два биовара. Штаммы биовара 1 положительны по подвижности и секреции липазы, тогда как штаммы биовара 2 отрицательны по обоим тестам. Бактериальные клетки используют ворсинки либо жгутики для перемещения по поверхности, чтобы соединиться с другими бактериями и сформировать микроколонию [11].

Высокая степень экспрессии жгутиковых белков является фенотипической характеристикой бактерий, связанной с высокой адгезивностью, и необходима для инициирования развития биопленок. В настоящее время признано, что образование биопленок является важной особенностью выживания бактерий на поверхностях и в отложениях в водной среде. Возможно образование биопленки на твердых носителях, что часто встречается в аквариумах рыбоводных ферм. Эти биопленки являются источником рецидивирующей инфекции на заводах радужной форели. Распространение *Y. ruckeri* может быть связано с предполагаемыми переносчиками, к которым относятся водные беспозвоночные и птицы [1, 8].

Бактерии иерсинии имеют палочковидную форму, перетрихальные жгутики, грамтрицательные, спор и капсул не образуют. Оптимальная температура их жизнедеятельности 28±2 °С, однако характерными особенностями этих микроорганизмов являются их психрофильность и выраженная термотолерантность, они способны расти и размножаться в широком диапазоне температур от +4 до +42 С. Как и у всех иерсиний, подвижность проявляется в условиях

культивирования при температуре ниже 30 °С. Питательные среды, на которых культивируют иерсинии разнообразны, от обычных питательных сред (МПА, СІN-агар, среда Эндо), до сред с обедненным составом (пептонная вода), голодных (фосфатно-буферный раствор), синтетических средах, так как отличаются неприхотливостью к питательным веществам, что позволяет отнести их к прототрофам [9, 12].

К высокой температуре иерсинии чувствительны: погибают в течение нескольких секунд при 100 °С, способны выживать при температуре 50 – 60 °С до получаса. При низких температурах переносят большие концентрации раствора хлорида натрия (до 10 %). На иерсинии оказывает действие солнечное излучение: в течение 30 мин они погибают при прямом солнечном свете, и через 6-8 ч – при рассеянном. Все иерсинии чувствительны к высушиванию, погибают на открытых поверхностях в течение нескольких дней. Во влажной среде и невысокой температуре (14-18 °С) бактерии выживают более длительно. Влияние на жизнеспособность иерсиний оказывает концентрация водородных ионов среды (рН): в среде с рН 3,6 и ниже отмечается быстрое снижение числа жизнеспособных клеток, среда с рН 4,8 и выше благоприятна для роста иерсиний. Гибель иерсиний вызывают дезинфицирующие вещества и антисептики в стандартных разведениях (растворы хлорамина, перманганата калия, пероксида водорода, этиловый спирт) [9, 12].

Иерсиниозы относятся к сапрозоонозам - группе инфекций, возбудители которых обладая двойственной, сапрофитной и паразитической, природой, тесно связаны как с окружающей средой, так и с организмом теплокровных. Между этими экологическими нишами осуществляется непрерывная циркуляция возбудителя. Благодаря высокой экологической пластичности, иерсинии являются убиквитарными микроорганизмами. Они способны длительно сохраняться в окружающей среде, при этом их отличает полигостальность - широкий круг потенциальных хозяев в почвенных, водных, наземных экосистемах, где в процесс циркуляции микроба вовлекаются разнообразные простейшие, беспозвоночные, позвоночные животные, растения. Характерная особенность возбудителей иерсиниозов – психрофильность. Это способствует их длительному существованию в воде или почве, которые являются промежуточными факторами передачи [7, 9].

Исследования на иерсиниоз в условиях лаборатории состоят из следующего алгоритма последовательных этапов, которые включают индикацию, идентификацию, видовую дифференциацию иерсиний с использованием комплекса диагностических методов. Бактериологические методы включают: отбор и посев проб, выделение «чистой» культуры, изучение морфологии колоний, микроскопию выросших микроорганизмов, биохимическую идентификацию с использованием тест-систем биохимического типирования. Высев со среды накопления на дифференциально-диагностические питательные среды с повторным исследованием методом полимеразной цепной реакции [4, 9, 20].

Для последующей идентификации и видовой дифференциации выделенных культур используют метод MALDI-ToF масс-спектрометрии и тесты для определения биохимической активности, серотипа, маркеров патогенности. Спектры собираются в автоматическом режиме с использованием программы Flex Control при функционировании прибора в линейном позитивном режиме с необходимыми параметрами. Анализ спектров и идентификация микроорганизмов проводится с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. Заключение о таксономической принадлежности микроорганизма осуществляется на основании значения индекса совпадения (SV). Значение SV > 2,3 соответствует достоверной идентификации до вида; SV < 2,299, но > 2,000 – достоверной идентификации до рода, вероятной идентификации до вида; значение SV в диапазоне 1,7 – 1,999 рассматривается как вероятная идентификация до рода, и менее 1,7 – как недостоверный результат [3].

Высокая контагиозность и смертность рыб при иерсиниозе обуславливают необходимость разработки экспресс-методов диагностики с целью быстрого и своевременного принятия карантинных мер и профилактических мероприятий. Одним из таких методов является иммуноферментный анализ (ИФА). Отличительной особенностью ИФА является высокая чувствительность и специфичность, коррелирующие с результатами, полученными при использовании других серологических методов, а также широкое распространение специального оборудования, позволяющего почти полностью автоматизировать процесс выявления антигенов иерсиний [5].

Меры профилактики иерсиниоза следующие: 1) неспецифическая профилактика, основанная на предупреждении проникновения инфекции в другие хозяйства, строгом соблюдении рыбоводно-мелиоративных и ветеринарно-санитарных требований; 2) этиотропная терапия (используют антибиотики) или комбинированная терапия (сульфамеразин с тетрациклином в течение 10 дней, профилактически — курсом в 5 дней).

3) превентивная терапия, основанная на использовании специфических желточных иммуноглобулинов (IgY). Скармливание рыбам этого биологического препарата приводило к

незначительному снижению смертности, однако, тот же препарат, введенный внутривентрально до помещения рыб в воду оказался более эффективным в отношении радужной форели [18].

4) специфическая профилактика (вакцинация), основана на стимуляции иммунной системы рыб. В вакцине используют одновалентные, инактивированные цельноклеточные суспензии *Y. ruckeri* серовара O1 биовара 1, которые можно вводить рыбам погружением в воду, содержащую вакцину, инъекцией или даже перорально [15].

Иммунная система у молодых рыб развита слабо, поэтому вакцинацию радужной форели проводят для рыб массой тела не менее 2–4 г. Наилучшие результаты получаются при индивидуальном введении вакцины в тело рыбы, но при работе с рыбой малых размеров эту процедуру проводить сложно. Массовую вакцинацию рыб можно проводить путем их погружения в воду с вакциной.

#### Список использованных источников

1. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С. и др. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - № 3. - 2014. – С. 22-29.
2. Богумильчик Е.А., Кокорина Г.И., Зуева Е.В., Поутонен Т.Б. и др. Выделение *Yersinia ruckeri* от человека // Материалы IV национального конгресса бактериологов и международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018». – Омск:, 2018. - С. 15.
3. Богумильчик, Е.А. Профили масс-спектров бактерий рода *Yersinia* близкородственных *Yersinia enterocolitica* видов для MALDI ToF масс-спектрометрии: база данных / Е.А. Богумильчик [и др.]. - М., 2018. – Зарегистр. в Гос. реестре баз данных 17.12.2018, № 2018622063.
4. Ваганова, А.Н. Разработка методики выявления генетических маркеров *Ureaplasma diversum* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени: автореферат дис. ... кандидата биологических. - СПб. :, 2019. - 23 с.
5. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Богданова П.Д., Гулюкин М.И. Способ серологической диагностики йерсиниоза лососевых рыб, вызываемого *Yersinia ruckeri*, методом иммуноферментного анализа и диагностический набор для осуществления способа: патент на изобретение / Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Богданова П.Д., Гулюкин М.И. – М. :, 2006. - Зарегистр. в Гос. реестре изобретений РФ 10.01.2006, RU № 2 595 883 С1.
6. Казарникова, А.В. Выделение и характеристика *Yersinia ruckeri* при гибели карпов прудах на юге России / А.В. Казарникова [и др.] // Ветеринария, - 2017. - № 8. - С. 19-28.
7. Литвин, В.Ю. Сапронозы как природно-очаговые болезни / В.Ю. Литвин, Г.П. Сомов, В.И. Пушкарева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2010. - Т. 1, № 50. - С. 10-16.
8. Миронова Л.В. Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга: автореферат дис. ... доктора медицинских наук. - Иркутск, 2017. - 46 с.
9. Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях: методические указания МУК 4.2.3019-12 / Е.Б. Ежлова [и др.]. - М.: Изд-во ФГУЗ «ФЦГЭ Роспотребнадзора», 2012. – 60 с.
10. Пекарская Н.П., Семанин А.Г., Золотухин С.Н. Иерсиниоз у рыб лососевых пород // Современные проблемы и перспективы агропромышленного комплекса Сибири (сборник трудов конференции). – М. :, 2017. - С. 157-159.
11. Софронова О.Н. Микробиологические и экологические особенности штаммов иерсиний, циркулирующих на территории Якутии: автореф. дис. ... канд. мед. наук – М. :, 2000. - 23 с.
12. Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А. и др. Микробиологический молекулярно-генетический мониторинг за возбудителями кишечных инфекций как составная часть эпидемиологического надзора // Бюллетень СО РАМН, том 31, № 4. - 2011. – С. 99-105.
13. Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S.R. // Int. J. Syst. t. Evo. I Microbiol. – 2016. – Vol. 66, № 12. – P. 5575-5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485.
14. Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Falcao, D.P., Weaver, R.E., Fanning, G. R. Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions. International Journal of Systematic Bacteriology – 1976. Vol. 26. – P. 180–194.
15. Busch R.A. Protective vaccines for mass immunization of trout // Salmonid. – 1998. - Vol. 1. – P. 10–22.
16. De Keukeleire, S. *Yersinia ruckeri*, an unusual microorganism isolated from a human wound infection / S. De Keukeleire S. // New Microbes New Infect. – 2014. - Vol. 2, № 4. - P. 134-135. doi: 10.1002/nmi2.56.
17. Ewing, W.H., Ross, A.J., Brenner, D.J., Fanning, G.R. "*Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium." International Journal of Systematic Bacteriology – 1978. Vol. 28. – P. 37-44.

18. Lee S.B., Mine Y., Stevenson R.M. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri* // J. Agric. Food. Chem. – 2000. - Jan; 48 (1). - P. 110-5. doi: 10.1021/jf9906073. PMID: 10637061.
19. Ross A.J., Rucker R.R., Ewing W.H. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). – 1996. - Can. J. Microbiol. – Vol. 12, № 1. - P. 763–770.
20. Tan L.K. Evaluation of a modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar for isolation of *Yersinia* / L.K. Tan, P.T. Ooi, E. Carniel, K.L. Thong // PLoS One. – 2014. - Vol. 9, № 8. – 9 p. doi: 10.1371/journal.pone.0106329.
21. Tobback E. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish / E. Tobback[et al.] // J Fish Dis.– 2007. - Vol. 30, № 5. – P. 257-68.
22. Willumsen B. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri* // J. Fish. Dis. –1989. - Vol. 12. – P. 275-277.