

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Л. Н. ЮХИМЕНКО, А. А. ДРУЖИНИНА, С. Б. ТОКАРЕВА,
М. С. КУКИН, Л. И. БЫЧКОВА

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
пресноводного рыбного хозяйства»,
п. Рыбное, 141821, Дмитровский район Московской области, Россия,
e-mail: vniiprh@mail.ru*

DIAGNOSTICS AND IDENTIFICATION METHODS OF FISH DISEASES BACTERIA AGENTS

L. N. YUKHIMENCO, A. A. DRUZHININA, S. B. TOKAREVA,
M. S. KUKIN, L. I. BYCHKOVA

*FSBSI (Federal State Budget Scientific Institution)
“All-Russian Research Institute of Freshwater Fisheries”*

Аннотация. Различные руководства по лабораторной диагностике бактериальных инфекций, используемые в настоящее время, во многом устарели, не учитывают структуру условно патогенных бактерий, являющихся этиологическими агентами бактериальной геморрагической септицемии (БГС), что затрудняет процесс идентификации возбудителей и соответственно – правильную диагностику. Предлагаемая схема выделения и идентификации возбудителей на протяжении многих лет используется в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ «ВНИИПРХ» и позволяет с достаточно высокой степенью достоверности проводить диагностические исследования.

Ключевые слова: болезни рыб, бактерии, диагностика, идентификация

Abstract. Different handbooks on laboratory diagnostics of bacterial infections used at present, became out of date, they do not take into account the structure of facultative-fishpathogenic bacteria being etiologically agents of the Bacterial Hemorrhagic Septicemia (BHS), what hampers the process of agents identification and accordingly the correct diagnostics. The offered schema for isolation and identification of agents has been using for many years in the ichtiopathological laboratory of FSBSI “VNIIPRKh” and allows to carry out diagnostic investigations at the sufficiently high level of severity.

Keyword: fish diseases, bacteria, diagnostics, identification

Введение. До настоящего времени существует множество различных руководств, схем, наставлений, практикумов по лабораторной диагностике и идентификации бактерий, относящихся к разным группам, которыми на протяжении многих лет пользовались специалисты. Для многих видов были разработаны схемы идентификации, ключевые признаки, которые облегчали процесс определения видовой принадлежности возбудителя. Однако многие схемы и тесты уже устарели, не учитывают структуру условно патогенных микроорганизмов, этиологическая роль которых при возникновении заболеваний установлена, что в значительной степени затрудняет процесс идентификации возбудителей и соответственно – правильную диагностику заболевания. В первую очередь это относится к бактериальной геморрагической септицемии – заболеванию полиэтиологичной природы, при котором выделяется до 9–10 компонентов, идентифицировать которые по старым методикам не представляется возможным [6].

В лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХ целенаправленные исследования бактериальных болезней рыб показали, что с каждым годом количество выделяемых условно патогенных микроорганизмов становится все больше и больше [7]. Заболевания, вызываемые каким-то одним возбудителем, сейчас практически не встречаются. Даже такие заболевания, как фурункулез, вибриоз, миксобактериоз, аэромоназ осложняются присутствием условно патогенных микроорганизмов. Все это очень осложняет диагностику, установление причины заболевания, а самое главное – выбор средства лечения, так как у многочисленных членов микробиоценоза чувствительность к антибактериальным препаратам может весьма различаться, и подавляя рост одних представителей, мы создаем условия для более бурного развития других.

Материалы и методы. Для получения достоверных результатов исследования посев от рыбы с клиническими признаками проводится непосредственно в хозяйстве на плотные питательные среды. При массовых обследованиях посев производят из печени и почек стерильно вскрытой рыбы на мясо-пептонный агар (МПА) или эритритагар и среду Эндо, при подозрении на

миксобактериоз – на среду Анакера-Ордала или Сабуро, на которых миксобактерии вырастают в виде голубоватых расплывчатых колоний или с желтым центром («глазунья»).

На МПА или эритритагаре отмечают уровень обсемененности, а по морфологическим признакам можно отметить предположительно наличие флавобактерий (по окраске колоний от желтого до оранжевого цвета), неферментирующих щелочеобразователей (НФЩ) – ацинетобактеров и моракселл (уплощенные колонии белого цвета), эпидермального стафилококка (выпуклые колонии белого цвета) или золотистого (колонии ярко-желтого цвета).

На среде Эндо отмечают энтеробактерии различных родов: бактерии группы кишечной палочки – (БГКП) с различной интенсивностью окраски, в виде бледно-розовых колоний могут быть цитробактер, клебсиелла, энтеробактер, протей, аэромонады, НФЩ и БГКП с ослабленной ферментативной активностью.

На среде Сабуро могут расти, кроме миксобактерий, дрожжеподобные и плесневые грибы.

Если анамнестические данные неясные, производят дополнительный посев на энтерококкагар, на котором учитывают рост энтерококка.

После просмотра чашек отобранные колонии (прежде всего те, которые в большинстве) пересевают на первично-дифференцирующую среду Клиглера, по характеру роста на которой по результатам микроскопирования после проведения теста на каталазу, цитохромоксидазу, проводят предварительную идентификацию выросшей культуры до рода, а после посева на среду Хью-Лейфсона (проверка О/Ф теста) уточняют родовую принадлежность выделенной культуры (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Первично-дифференцирующие признаки для грамотрицательных бактерий (по Cowan, 1974)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Форма	к	кп	п	п	п	п	п	п	п	п	п	п	п	п
Подвижность	–	–	–	+	+	–	+	–	+	D	–	–	+	–
Аэробный рост	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*1	*2	+
Анаэробный рост	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	-	D	-
Оксидаза	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Глюкоза (к-та)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	D	-	-	+
Углеводы (О/Ф)	O	O	-	O	-	O	O	Ф	Ф	Ф	?	-	-	Ф
<i>Neisseria</i>	+													
<i>Acinetobacter</i>		+												
<i>Moraxella</i>			+											
<i>Chromobacterium lividum</i>				+										
<i>Alcaligenes</i>					+									
<i>Flavobacterium</i>						+								
<i>Pseudomonas</i>							+							
<i>Actinobacillus</i>								+						
<i>Pasteurella</i>								+						
<i>Necromonas</i>								+						
<i>Chromobacterium violaceum</i>									+					
<i>Beneckea</i>									+					
<i>Vibrio</i>									+					
<i>Plesiomonas</i>									+					
<i>Aeromonas</i>									+					
<i>Enterobacteria</i>										+				
<i>Haemophilus</i>											+			
<i>Eikenella</i>												+		
<i>Campylobacter</i>													+	
<i>Streptobacillus</i>														+

Условные обозначения: *1 – растет в воздушной среде + CO₂; *2 – растет в 5–6 % O₂; к – кокки; п – палочки; «-» – отрицательная реакция; «+» – положительная реакция; D – различные реакции разных видов внутри рода; О/Ф – окисление/ферментация; ? – не исследуется обычными методами

Определение каталазной и цитохромоксидазной активности проводят по общепринятой методике, а для проведения О/Ф тестирования разливают среду Хью-Лейфсона в пробирки по 9–10 мл и культуру засевают уколом до дна. Таким образом, использу-

ется одна пробирка, а не две и не нужно вазелиновое масло, что облегчает процесс мытья посуды. При таком методе посева ферментация начинается снизу, а окисление сверху. На этой же среде определяется и подвижность культуры: неподвижная культура растет строго по уколу, слабо подвижная – в виде корня с отростками, подвижная – вызывает помутнение всей среды. Дифференциацию аэромонад проводят в соответствии с признаками, приведенными в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Д и ф ф е р е н ц и а л ь н о - д и а г н о с т и ч е с к и е п р и з н а к и подвижных аэромонад

Вид, биовар	Тесты			
	Глюкоза	Салицин	L-арабиноза	Эскулин
<i>A. hydrophila</i> NH ₂ SыI(++++)	кГ	+	+	+
<i>A. eucrenophila</i> H ₂ S (-)	кГ	+	+	+
<i>A. sobria</i>	кГ	-	-	-
<i>A. caviae</i>	к	+	+	+
<i>A. media</i>	к	d	+	d
<i>A. sp.</i>	кГ	+	-	-
<i>A. sp. 1</i>	кГ	-	+	+
<i>A. sp. 2</i>	кГ	-	-	+
<i>A. sp. 3</i>	кГ	-	+	-
<i>A. sp. 4 (A. veronii)</i>	кГ	+	-	+
<i>A. sp. 5 (A. schubertii)</i>	к	-	-	-
<i>A. sp. 6</i>	к	+	-	-
<i>A. sp. 7</i>	к	-	+	+
<i>A. sp. 8</i>	к	-	-	+
<i>A. sp. 9</i>	к	-	+	-
<i>A. sp. 10</i>	к	+	+	-
<i>A. sp. 11</i>	к	+	-	+
<i>A. sp. 12</i>	кГ	+	+	-
<i>A. sp. 13 (H₂S +++)</i>	кГ	-	-	-

Условные обозначения: К – кислотообразование; КГ – кислото- и газообразование; + – положительная реакция; - – отрицательная реакция; d – различные варианты.

**Т а б л и ц а 3. Частота выделения высоковирулентных
из рыбы и воды (% от всех выделенных)**

Вид, биовар аэромонад	Выделены из рыбы	Выделены из воды
<i>A.sp.6</i>	71,4	58,2
<i>A.sp.1</i>	60,7	63,6
<i>A.sobria</i>	58,2	57,2
<i>A.hydrophila</i>	57,2	56,1
<i>A.sp.2</i>	51,5	50,0
<i>A.sp.</i>	50,0	63,5
<i>A.caviae</i>	47,1	51,6
<i>A.eucrenophila</i>	46,6	39,6
<i>A.sp.4 (veronii)</i>	46,1	42,7
<i>A.sp.5 (shubertii)</i>	45,6	44,5
<i>A.sp.9</i>	42,1	48,2
<i>A.sp.3</i>	37,2	43,2
<i>A.sp.11</i>	36,2	33,3
<i>A.sp.8</i>	31,9	25,5
<i>A.sp.12</i>	25,0	30,7
<i>A.sp.7</i>	15,9	22,4
<i>A.sp.10</i>	0	0

Идентифицированные энтеробактерии и аэромонады засевают на среду с ДНК для определения их вирулентности [3]. Эти же и остальные отобранные культуры засевают на чашки с МПА или эритритагаром для изучения антибиограмм методом индикаторных дисков [2].

Таким же способом можно проверять вирулентность и у энтеробактерий [1]. После анализа всех полученных данных выдают заключение и рекомендации.

Результаты исследований и обсуждение. Исследования, проведенные с 1980 г. в лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХ, показали, что в 1980–1989 гг. аэромонады составляли 80,6 %, а эпизоотически значимые условно патогенные микроорганизмы – 9,6 %, в 1990–1999 – 63,5 % и 21,6 %, в 2000–2014 гг. – 66,1 % и 42,0 % соответственно. В связи с этим и была предложена ука-

занная схема проведения исследований для работников ихтиопатологических лабораторий. Следует учитывать, что многие морфологические признаки, указываемые в руководствах, отмечаются, если культура типичная.

На практике приходится наблюдать феномен «роения» (ползучий рост, присущий ранее только протее) у бактерий группы кишечной палочки (БГКП), аэромонад, моракселл, ацинетобактеров. При этом одна колония может расплзтись по всей поверхности среды. Кроме этого, многие бактерии вырабатывают капсулу, которая служит защитой от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды, и размеры этой капсулы иногда такие, что тяжи с поверхности колоний стекают на крышку чашки Петри. Прежде всего это *Pseudomonas fluorescens var. capsulata* [5], а также могут быть аэромонады, БГКП, НФЩ и некоторые энтеробактерии. У выделенных аэромонад в обязательном порядке необходимо проверять вирулентность. Давно известно, что аэромонады являются важной составляющей водного микробиоценоза и принимают активное участие в процессах самоочистения водоема. Однако в условиях усиления агрессивности среды, когда возникает опасность гибели бактериальной клетки, она активизирует свои защитные свойства, ферментные системы, в результате чего повышается и вирулентность. Это свойство проверяется на ДНК-агаре. Определение у 2608 штаммов аэромонад, выделенных из рыбы, и 2816, выделенных из воды, ДНКазной активности позволило установить по степени вирулентности их эпизоотическую значимость (табл. 3).

Видовую принадлежность выделенных культур определяют путем посева на «пестрый» ряд Гисса (табл. 4–7) [4].

Таблица 4

Признак	Escherichia	Edwardsiella		Salmonellae		Klebsiella	Enterobacter		Hafnia	Proteus			Providencia		
		ictaluri	tarda	Salmonella	Ari-zona		Citrobacter	cloacae		aero-lyquefaciens	vulgaris	mira-bilis	mor-ganii	ret-geri	alkali-factens
Подвижность	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+	+
Индол/H ₂ S	+/-	-/-	+/+	-	-	-/+	-/+	-	-	-	-	[-]	+	+	+/-
Реакция MR/VP	+/+	-/-	+/-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Желатин	-	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-
Мочевина	-	-	-	-	-	-/d	(+) ⁴	(+)	-	-	-	+	+	+	-
Малонаг Na	-	-	-	-	-	+/d	+ ⁴	+	+/-	d	-	-	-	-	-
Цитрат Симмонса	-	-	-	+	+	+	+ ⁴	+	+	d	+	+	+	+	+
Цитрат Христенсена	+/d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d
Глюкоза (газ)	+/-	+	+	+	+	+	+ ⁴	+	+	d	+/-	+	d	-/+	+
Лактоза	+/-	-	-	-	d	d	+ ⁴	+	+	d	-	-	-	-	-
Маннит	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Сахароза	d	-	-	-	-	d	+	+	+	d	+	d	-/d	d	d
Инозит	-/+	-	-	d	-	-/d	+ ⁴	+	+	+	+	-	-	+	+
Салицин	d	-	-	-	-	d	+	+	+	d	d	d	-	-	-
Дульцит	d	-	-	+	-	d	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ксилоза	+/d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	d	-	-	+	+	+	+ ⁴	+	+	-	+	+	+	+	+

Т а б л и ц а 5. Дифференцирующие признаки видов рода Moraxella подрода Moraxella

Признак	M. atlantae	M. bovis	M. lacunata	M. nonliquefaciens	M. osloensis	M. phenylpyrivica
Гемолиз	–	[+]	–	–	–	–
Гидролиз желатина	–	[+]	–	–	–	–
Рост в присутствии 6% NaCl	–	–	–	–	–	[+]
Уреаза	–	–	–	–	[–]	d
Восстановление NO ₃ ⁻	–	[–]	+	+	d	[+]

Условные обозначения: [+] – большинство штаммов положительные; [–] – большинство штаммов отрицательные.

Т а б л и ц а 6. Дифференциация видов рода Acinetobacter

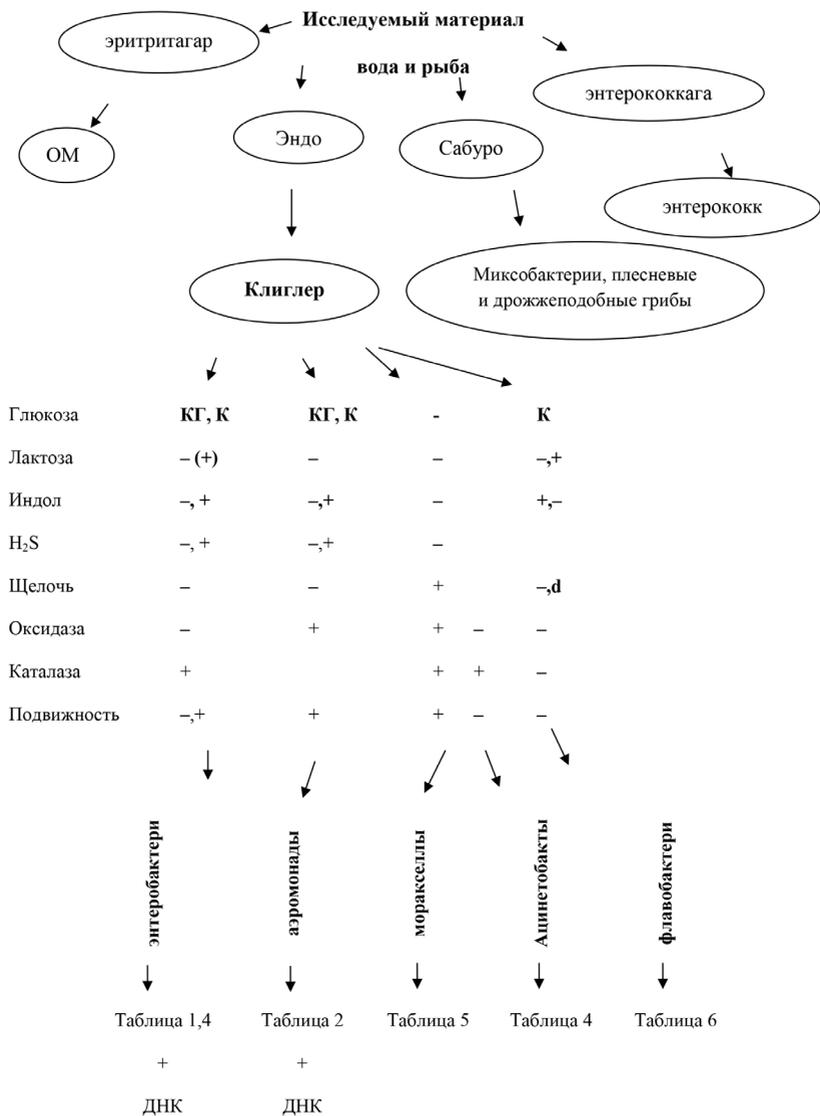
Признак	A. baumannii	A. calcoaceticus	A. haemolyticus	A. johnsonii	A. junii	A. lwoffii
Рост при 44 °С	+	–	–	–	–	–
37 °С	+	+	+	–	+	+
Гидролиз желатина	–	–	96	–	–	–
Гемолиз	–	–	+	–	–	–
Цитрат Na (Симмонса)	+	+	91	+	82	–
K-та из глюкозы	95	+	52	–	–	6

Условные обозначения: числа – процент положительных штаммов.

Т а б л и ц а 7. Дифференцирующие признаки видов рода Flavobacterium

Признак	F. aquatile	F. balustinum	F. branchiophila	F. breve	F. gleum	F. indologenes	F. meningosepticum	F. odoratum	F. thalophilum
Образование кислоты из:									
Глюкозы	+	+	+	D	+	+	d	–	+
Арабинозы	–	–	–	–	D	–	–	–	+
Лактозы	+	–	–	–	–	–	d	–	+
Мальтозы	+	–	+	d	+	+	+	–	+
Сахарозы	+	–	+	–	–	–	–	–	+
Эскулин	–	+	–	–	+	+	+	–	+
Индол	–	+	–	+	+	+	d	–	+
Уреаза	–	–	–	–	d	–	d	+	+
Желатиназа	–	+	+	+		+	+	+	d

Т а б л и ц а 8. Схema выделения и идентификации рыбопатогенных бактерий



Закключение. Многолетние наблюдения показали, что использование такой методики с применением табличных материалов при проведении диагностических исследований позволяет быстрее, легче, доступнее для работников практических лабораторий и достовернее установить причину заболевания и определить тактику дальнейшего поведения: назначать курс лечения антибактериальными препаратами или кормления пробиотиками для повышения резистентности рыб.

Для облегчения работы специалистов при проведении диагностики заболевания и идентификации возбудителя приводим алгоритм исследования в форме блок-схемы (табл. 8).

Список использованных источников

1. Завгородняя, Е. Ф. Некоторые биологические свойства возбудителей брюшного тифа и паратифа В, выделенных от больных и бактерионосителей / Е. Ф. Завгородняя, И. Е. Троп // ЖМЭИ. – 1973. – № 5. – С. 21–24.
2. Лабораторный практикум по болезням рыб / В. А. Мусселиус [и др.] ; под ред. В. А. Мусселиус. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. – 296 с.
3. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. – Ч. 1. – М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1999. – С. 150.
4. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / пер. с англ. ; под ред. Дж. Хоулта и др. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
5. Юхименко, Л. Н. Эпизоотическая значимость *Pseudomonas fluorescens* var. *capsulata* / Л. Н. Юхименко, Л. Н. Бычкова, П. П. Головин // Рыбное хоз-во. Серия Аквакультура. Болезни рыб : сб. науч. тр. ВНИЭРХ. – М., 1998. – Вып. 2. – С. 8–13.
6. Юхименко, Л. Н., Бычкова Л. И. Этиологическая структура возбудителей бактериальной геморрагической септицемии рыб / Л. Н. Юхименко, Л. И. Бычкова // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2 : расширен. материалы Междунар. науч.-практ. конф., Борок, 17–20 июля 2007 г. – М.: Россельхозакад., 2007. – С. 95–99.
7. Юхименко, Л. Н. Возбудители бактериальной геморрагической септицемии (БГС) рыб, микрофлора воды и комбикормов, имеющая эпидемиологическое значение / Л. Н. Юхименко, Л. И. Бычкова, А. А. Дружинина // Дальневосточ. журн. инфекцион. патологии. – 2015. – № 26. – С. 43–45.