

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

**Феоктистова Н.А., Ломакин А.А., Богданов И.И.,
Сульдина Е.В., Нафеев А.А.**

**Аэромоноз карповых: возбудители,
диагностика и профилактика инфекции**
монография

Ульяновск – 2023

УДК 579.64

Аэромоноз карповых: возбудители, диагностика и профилактика инфекции. Монография. / Н.А. Феоктистова, А.А. Ломакин, И.И. Богданов, Е.В. Сульдина, А.А. Нафеев. – Ульяновск, 2023. – 250 с.

Рецензенты:

Дежаткина Светлана Васильевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой «Морфология, физиология, кормление, разведение и частная зоотехния» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ,

Викторов Денис Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского технологического института им. С. П. Капицы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, выполненных согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 123031600041-9. Монография содержит краткий обзор литературных данных по проблеме исследования и отражает методологию и основные результаты по разработке комплексной трехкомпонентной тест-системы для диагностики аэромоноза карпа (бактериологический, генетический и бактериофаговый методы идентификации бактерий рода *Aeromonas*).

Монография адресована биологам, ветеринарам, специалистам, занимающимся аквакультурой, аспирантам, магистрантам и студентам учебных заведений биологического и сельскохозяйственного профиля, научным работникам и специалистам сельского хозяйства.

Печатается по решению научно-технического совета
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
Протокол № 2 от 11 октября 2023 года

ISBN 978-5-6051071-3-2

© Феоктистова Н.А., Ломакин А.А., Богданов И.И., Сульдина Е.В.,
Нафеев А.А., 2023
© ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	6
Глава I. Обзор литературы	10
1.1 Краткая характеристика семейства карповых	10
1.2 Аэромоноз карповых рыб	12
1.3 Анализ эпизоотической ситуации по аэромонозу карпа на территории Российской Федерации	18
1.4 Мероприятия по борьбе с аэромонозом карповых рыб	21
1.5 Методы лабораторной диагностики аэромоноза	29
1.6 Таксономия бактерий рода <i>Aeromonas</i>	31
1.7 Исследования зарубежных ученых в области диагностики аэромоноза	35
1.8 Способы лечения аэромоноза	47
1.9 Аэромонадные вакцины	58
1.10 Бактериофаги <i>Aeromonas</i> и их практическое применение	67
1.11 Пробиотические и иные препараты, эффективные при аэромонозе карпа	69
Глава II. Экспериментальные исследования	78
2.1 Материалы и методы	78
2.2 Разработка бактериологического компонента комплексной тест-системы для индикации и идентификации аэромонад	104
2.2.1 Разработка ускоренной бактериологической схемы выделения и идентификации бактерий рода <i>Aeromonas</i>	104
2.2.2 Разработка селективной питательной среды для выделения бактерий рода <i>Aeromonas</i> и ускоренной бактериологической схемы идентификации возбудителей аэромоноза карпа	122
2.2.3 Апробация разработанной ускоренной бактериологической схемы идентификации возбудителей аэромоноза карпа	128

2.2.4 Изучение профилей чувствительности выделенных штаммов к антимикробным препаратам	146
2.3 Разработка молекулярно-генетического компонента комплексной тест-системы для индикации и идентификации аэромонад	150
2.3.1 Разработка системы праймеров для детекции возбудителей аэромоноза методом ПЦР с электрофоретической детекцией	150
2.3.2 Разработка праймерных ПЦР - систем в режиме «реального времени» для индикации и идентификации бактерий рода <i>Aeromonas</i>	152
2.3.3 Разработка системы LAMP для индикации и идентификации бактерий рода <i>Aeromonas</i>	160
2.4 Разработка бактериофагового компонента комплексной тест-системы для индикации и идентификации аэромонад	169
2.4.1 Конструирование биопрепарата на основе бактериофагов <i>Aeromonas</i> и подбор технологических параметров его применения для профилактики аэромоноза карпа	169
2.4.1.1 Выделение и селекция бактериофагов	169
2.4.1.2 Биологические свойства выделенных бактериофагов	172
2.4.1.2.1 Определение титра фагов	172
2.4.1.2.2 Специфичность бактериофагов	174
2.4.1.2.3 Изменение титра бактериофагов при хранении	174
2.4.1.2.4 Влияние физических и химических факторов на аэромонадные бактериофаги	175
2.4.1.2.5 Спектр специфического литического действия аэромонадных бактериофагов	176
2.4.1.2.6 Разработка экспериментального биопрепарата на основе бактериофагов Av-4 и Ah-4 серии УЛГАУ	177
2.4.1.2.7 Лиофилизация фаговых биопрепаратов	182

2.4.2 Модификация методики реакции нарастания титра фага для аэромонадных бактериофагов	187
2.4.2.1 Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага	188
2.4.2.2 Постановка РНФ в пробах	189
2.4.2.3 Применение аэромонадных бактериофагов для идентификации методами «стекающая капля» и «SPOT-тест»	197
2.5 Разработка мероприятий по ликвидации аэромоноза и оздоровлению рыбоводных хозяйств и рыбохозяйственных водоемов	200
Заключение	205
Список используемых литературных источников	211
Приложение	241

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия во многих странах мира заметно увеличилось использование рыбы, являющейся важным источником обеспечения человека легко-усваиваемой белковой пищей. Усилившийся промысел в морях привел к оскудению рыбных запасов и уменьшению в нем отдельных наиболее ценных объектов, ранее доминировавших в уловах. В то же время лишь 5 % от общего объема добываемой рыбы и морепродуктов используется в наиболее ценном свежем виде [1]

В современных условиях четко обозначилась необходимость активного развития как морской, так и пресноводной аквакультуры. Однако выращивание рыбы в промышленных условиях сопряжено с воздействием разнообразных стрессовых факторов, таких как резкие колебания температуры воды (физические); дефицит кислорода, накопление в воде аммиака и других метаболитов, высокие уровни органического загрязнения, сублетальные дозы тяжелых металлов и токсических веществ (химические); использование кормов низкого качества, недокорм, частая смена рациона (кормовые); травмы, ушибы (травматические); стресс, вызванный перевозкой, переуплотненные посадки, тотальные обловы и другие рыбоводные операции [2-3].

Любые изменения, происходящие в среде обитания, отражаются на физиологическом состоянии и общей резистентности рыб и способствуют развитию возбудителей инфекционных и инвазионных болезней. В аквакультуре все чаще появляются новые, ранее не известные заболевания, приводящие не только к снижению общей продуктивности, но и к массовой гибели рыбы. Потери в случае возникновения эпизоотии бактериальных заболеваний, таких как фурункулез, вибриоз, иерсиниоз и других, достигают 70-100 % [4-5].

На основании вышеизложенного, можно сделать вывод, что в условиях высокоинтенсивной аквакультуры контроль инфекционных заболеваний приобретает особо важное значение. В настоящее время с этой целью

используется шесть основных методов, включающих в себя: высокую культуру выращивания рыбы; получение генетически устойчивых к тому или иному заболеванию породных групп и отдельных видов; полноценное кормление; предотвращение распространения заболеваний посредством введения карантинных и наложения ограничений на перемещение инфицированной рыбы; вакцинация; использование широкого спектра антибактериальных препаратов [6-7].

Одним из важнейших биологических факторов, нарушающих нормальные процессы в прудовом рыбоводном процессе, становятся инфекционные заболевания культивируемых рыб. В последние годы наиболее актуальной является проблема бактериозов рыб, обусловленных грамотрицательными бактериями, среди которых лидирующее место занимают подвижные аэромонады. Вызываемый ими язвенно-геморрагический синдром (бактериальная геморрагическая септицемия, аэромоноз, краснуха или краснухоподобное заболевание) наносит значительный ущерб, обуславливая гибель рыб и снижение темпа роста инфицированных особей, которое имеет место даже при отсутствии клинических проявлений болезни [9].

На пути развития рыбоводства стоят заболевания заразной и незаразной этиологии, которые приводят к уменьшению продуктивности рыбы, повышенным потерям рыбопосадочного материала, снижению качества получаемой продукции [9-10]. Одним из самых распространённых заболеваний прудовой рыбы инфекционной этиологии является аэромоноз карпов [11]. Аэромоноз карпов (краснуха карпов, геморрагическая септицемия, инфекционная брюшная водянка, люблинская болезнь) характеризуется воспалением кожного покрова, очагами кровоизлияний, водянкой, ерошением чешуи, пучеглазием, гидратацией мышечной ткани и всех внутренних органов. Исследователи посвящают свои публикации проблеме лечения аэромоноза рыбы, и предлагают различные методы,

основным из которых является применение антибактериальных препаратов [12-14].

Aeromonas являются автохтонными бактериями водной среды, которые можно выделить практически из любого источника воды, включая пресную воду, эстуарную среду, питьевую воду, сточные воды и нечистоты. Этот род является основным возбудителем инфекций у рыб и объединяет виды: *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. salmonicida*, *A. schubertii*, *A. sobria* biovar *sobria*, *A. veronii* biovar *sobria* и т.д. В настоящее время вышеназванные бактерии стали ассоциироваться с болезнями преимущественно пресноводных рыб. *A. hydrophila*, *A. caviae* и *A. veronii* также связаны с диарейными заболеваниями человека и раневыми инфекциями [15]. Естественная трансформация является общим свойством бактериальных изолятов рода *Aeromonas* из окружающей среды [16]. Более того, у *Aeromonas* часто выявляются интегроны и другие генетические элементы [17].

Аэромонозом болеют карпы, сазаны и их гибриды в возрасте от сеголетков до производителей; восприимчивы серебряный карась, линь, белый амур, лещ, плотва и некоторые другие карповые рыбы. На возрастную восприимчивость рыб к аэромонозу влияют температура воды и зональные особенности болезни. В южных районах чаще болеют сеголетки и двухлетки, в центральных и северо-западных - двухлетки, трехлетки и производители карпов, сазана и их гибридов [18].

Источником возбудителя инфекции являются больные рыбы, их выделения и трупы, а также рыбы-бактерионосители. Болезнь передается как прямым контактом больных рыб со здоровыми, так и непрямым - через зараженную воду и корма, с орудиями лова, инвентарем, тарой, спецодеждой, водоплавающей птицей, а также кровососущими паразитами (пиявками, аргулюсами). Особенно опасны бесконтрольные перевозки рыб из неблагополучных хозяйств [19].

Острые вспышки аэромоноза появляются в весенне-летний период при температуре воды 15-20 °С; к осени эпизоотия затухает и болезнь принимает подострое и хроническое течения. Развитию болезни способствуют плотная посадка и травмирование рыб, ослабление их резистентности (неполноценное кормление, истощение) и неблагоприятные условия в прудах (нарушение гидрохимического режима, загрязнение органическими веществами и др.) [20].

Возбудителем аэромоноза карповых рыб являются обитатели водоемов - подвижные аэромонады, относящиеся к роду *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae (punctata)*, *A. veronii*) [21].

Важнейший фактор повышения эффективности товарного рыбоводства - обеспечение его эпизоотического благополучия. В рыбопромысловых водоёмах влияние болезней рыб на эффективность промысла незначительно, однако рыбы могут быть переносчиками опасных для человека возбудителей

В этой связи актуально проводить мониторинг эпизоотического состояния рыбоводных хозяйств и рыбопромысловых водоёмов, позволяющий своевременно наметить комплекс противоэпизоотических мероприятий, направленных на уменьшение потерь рыбной продукции [22].

Цель коллектива авторов монографии – обзор литературных данных и разработка комплекса мероприятий по борьбе с аэромонозом карпа, включающего современные методы диагностики, экологически безопасных методов лечения и профилактики заболевания.

Глава I. Обзор литературы

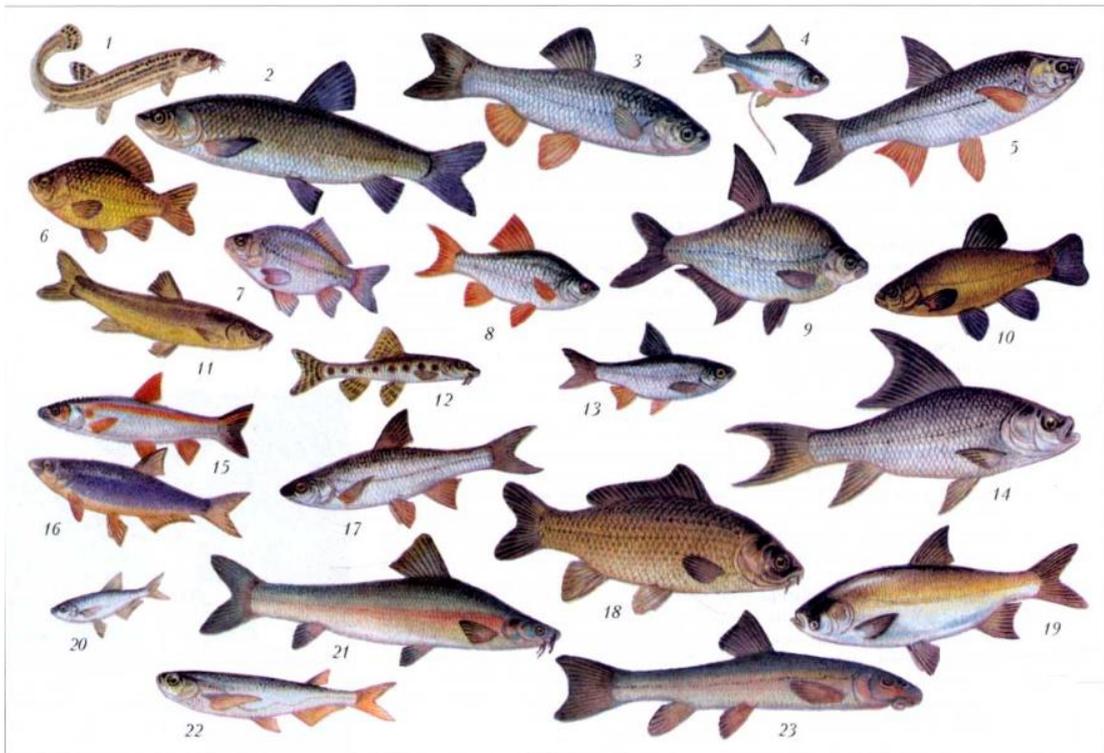
1.1 Краткая характеристика семейства карповых

Карп по промысловой значимости по праву занимает главенствующее место в семействе, которому он дал свое имя. Карп был известен еще в древности, хотя мясо его мало ценилось. Оценив по достоинству преимущества карпа перед остальными промысловыми рыбами, люди стали разводить его. Во второй половине XIX в. он был завезен в Америку, где очень быстро размножился. Сейчас редко можно встретить настоящего речного карпа. В Средней России преобладает выращенный во многих прудах польских и великорусских имений прудовой карп.

Тип: хордовые,
класс: лучепёрые рыбы,
отряд: карпообразные,
семейство: карповые,
научное название: *cyprinidae*.

Большая часть видов семейства карповых, за редким исключением, обитают в пресных водах рек и озер. Отдельные подвиды отдают предпочтение морским заливам и устьям рек, при впадении их в море, и замечательно чувствуют себя в соленой воде [23].

Отличительные особенности. Карповые отличаются наличием широкого костного плавника, темного серого цвета, который занимает почти всю поверхность спины рыбы. Еще одной характерной особенностью карповых видов являются подвижные губы с короткими плоскими усиками. Зубы у карповых отсутствуют, кроме жевательных, расположенных на нижней челюсти, в один или несколько рядов. В верхней челюсти у рыбы имеется специальная пластина, о которую измельчается и истирается пища при помощи зубов. У большинства карповых нет желудка [24].



Карпообразные: 1 – вьюн (*Misgurnus fossilis*); 2 – белый амур (*Ctenopharyngodon idella*); 3 – голавль (*Leuciscus cephalus*); 4 – горчак (*Rhodeus sericeus amarus*); 5 – жерех (*Aspius aspius*); 6 – золотой карась (*Carassius carassius*); 7 – серебряный карась (*Carassius auratus gibelio*); 8 – краснопёрка (*Scardinius erythrophthalmus*); 9 – лещ (*Abramis brama*); 10 – линь (*Tinca tinca*); 11 – маринка (*Schizothorax intermedius*); 12 – песчарь (*Gobio gobio*); 13 – плотва (*Rutilus rutilus*); 14 – карля (*Catla catla*); 15 – краснопёрка Брандта (*Tribolodon brandti*) в брачном наряде; 16 – рыбец (*Vimba vimba*); 17 – подуст (*Chondrostoma nasus*); 18 – сазан (*Cyprinus carpio*); 19 – белый толстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*); 20 – уклейка (*Alburnus alburnus*); 21 – аральский усач (*Barbus brachycephalus*); 22 – чехонь (*Pelecus cultratus*); 23 – чукучан (*Catostomus catostomus*).

Рисунок 1 – Представители семейства карповых

Белки пищи перерабатываются под действием трипсина и энтерокиназы - ферментов, выделяемых поджелудочной железой, железами кишечника и, в отличие от пепсина (который вырабатывает желудок), активных не в кислой, а в щелочной среде. Брюшко рыб круглое, редко с острым краем, но без костных образований.

Карп активен только лишь в теплое время, в дождливую, холодную погоду движения рыбы становятся неторопливыми. Если сравнивать с другими видами рыб, движение карпов под водой более медлительные.

Для зимовки рыбы из семейства карповых опускаются на большую глубину. Или же вовсе замедляют процессы жизнедеятельности и впадают в анабиоз до прихода теплого времени года. Ареал обитания карповых распространяется на Азию, Европу, Дальний Восток, а также на умеренные и теплые климатические широты [25].

1.2 Аэромоназ карповых рыб

Бактерии рода *Aeromonas* - граммотрицательные палочки от прямых с закругленными концами до сферических, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Оптимальный диапазон температуры 22 – 28 °С, большинство видов хорошо растет при $t=+37$ °С [26]. Широко распространены в воде пресных и соленых водоемах, их количество тесно коррелирует с загрязненностью водной среды, общим уровнем сапрофитов, численность прямо пропорциональна содержанию органических веществ и обратно пропорциональна количеству кислорода в воде [27]. Аэромонады входят в состав микрофлоры многих гидробионтов, но среди них имеются виды, патогенные для морских, пресноводных рыб, земноводных и пресмыкающихся [28-29]. Сообщается, что *A. hydrophila* является основным бактериальным патогеном, поражающим пресноводных рыб в условиях аквакультуры [30], может вызывать заболевания и в естественных водоемах. При этом *A. hydrophila* распространена в кишечной микрофлоре здоровых рыб, и поэтому стресс часто считается фактором, способствующим вспышкам аэромоназа [31-32]. Аэромонады обладают широким набором факторов патогенности, обеспечивающих их выживание при переходе от сапрофитизма к паразитизму [33]. Ведущая роль в этиологии заболевания принадлежит патогенным штаммам определенных видов, обладающим генетически обусловленными вирулентными свойствами [34-35]. Известно, что бактерии рода *Aeromonas* могут стать причиной острых кишечных заболеваний у людей, связанных с пищевым и водным факторами [36]. С 1968 г. *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* и *A. sobria* признаны факультативными патогенами для людей с ослабленным иммунитетом. Бактерии *A. caviae* потенциально способны вызывать гастроэнтериты и у здоровых людей. В силу вариабельности ферментативных свойств идентификация новых видов аэромонад нередко вызывает затруднение. Так, некоторые авторы считают, что практически все клинические изоляты, идентифицированные как *A. sobria*, в действительности представляют собой

A. veronii [23]. Экологические и клинические штаммы *A. jandaei* также являются патогенными для рыб и людей. Другим новым признаком этого вида установлена способность расти в диапазоне температур 4-42 °С [37-38].

Возбудителем аэромоноза карповых рыб являются обитатели водоемов - подвижные аэромонады, относящиеся к роду *Aeromonas* [39]. Аэромонады разделены на 7 видов: *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. sobria*, *A. veronii*.

Это - граммотрицательные короткие (1,2-1,8x0,6 мкм) палочки, с одним полярным жгутиком, спор и капсул не образуют, оксидазоположительные факультативные аэробы [40].

На основании многолетних исследований, проведенных во ВНИИПРХе, все подвижные аэромонады были разделены на три группы.

К первой группе относятся облигатные патогены, высоковирулентные аэромонады, сохраняющие свою вирулентность в течение длительного времени (более 14 лет), вызывающие при проведении биопробы 100%-ную гибель опытной рыбы.

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

Третью группу составляют аэромонады - представители нормального микробиоценоза воды прудов или кишечника карпов, не обладающие вирулентными свойствами при первичном выделении [41].

Эпизоотология. Аэромоноз встречается повсеместно и поражает все виды рыб. Более устойчивы к заражению караси, растительноядные рыбы. На возрастную восприимчивость рыб к аэромонозу влияют различные факторы окружающей среды и прежде всего температура.

Острые вспышки болезни наиболее многочисленные в весенне-летний период. К осени болезнь принимает хроническую форму.

Источником возбудителя аэромоноза являются больные рыбы и бактерионосители, их выделения и трупы. Пути передачи возбудителя разнообразны: прямой контакт больных рыб со здоровыми, через инфицированную воду, орудия лова, водоплавающих птиц. Переносчиками возбудителя могут быть кровососущие паразиты. Особую опасность представляют бесконтрольные перевозки рыбы из неблагополучных хозяйств [42].

Факторами, способствующими развитию аэромоноза, являются резкое повышение температуры воды, плотные посадки, снижение резистентности, неполноценное кормление, высокое содержание органических веществ в воде и другие нарушения гидрохимического режима, травматизация рыб.

Инкубационный период при аэромонозе составляет от 3 до 30 дней. Он зависит от температуры воды и физиологического состояния рыбы. Переболевшая рыба приобретает относительный иммунитет [43].

Клинические признаки и патогенез. Аэромоноз у рыб протекает остро, подостро и хронически.

Острое течение (асцитная форма) (рис. 2) сопровождается массовой гибелью рыб, которую чаще наблюдают в весенне-летний период. Болезнь проявляется в виде серозно-геморрагического воспаления отдельных участков или всего кожного покрова с очагами кровоизлияний различной величины и формы, водянкой, увеличением брюшка, пучеглазием, ерошением чешуи на отдельных участках или по всему телу у чешуйчатых карпов, у зеркальных и голых - образованием под кожей пузырей (везикул), наполненных прозрачной или кровянистой жидкостью. Плавники воспалены, нередко окрашены в кроваво-красный цвет. У отдельных рыб наблюдают кратерообразное выпячивание ануса. Больные рыбы малоподвижны, держатся в прибрежной зоне у

поверхности воды, слабо реагируют на внешние раздражители, у них нарушается координация движений, они опускаются на дно и погибают. При вскрытии в брюшной полости обнаруживают большое количество прозрачной, желтоватой или кровянистой жидкости, перитонит, спаечный процесс внутренних органов, катарально-геморрагическое воспаление кишечника, застой крови в паренхиматозных органах. Печень нередко желтоватой, темно-серой, а иногда зеленоватой окраски с очагами некроза в ее отдельных долях (мраморная). Желчный пузырь переполнен, селезенка увеличена в 1,5-2,0 раза, темно-вишневого цвета, кровеносные сосуды плавательного пузыря расширены, на перикарде видны точечные кровоизлияния [44].



Рисунок 2 - Острое течение (асцитная форма) аэромоноза у карпа (<https://fishquality.ru>)

Подострое течение (асцитно-язвенная форма) отмечают во все сезоны, но чаще в весенне-летний период. Оно характеризуется наличием у больных рыб асцита, серозно-геморрагического дерматита, с образованием изъязвлений на коже. Иногда наступает глубокий некроз мышц, что приводит к обнажению костей и органов брюшной полости вследствие разрушения брюшной стенки. Может развиваться некроз плавников с разрушением межлучевых перепонки [45].

Хроническое течение (язвенная форма) чаще всего регистрируют во второй половине лета и осенью. Болезнь протекает в основном доброкачественно и может проявляться очень слабо выраженными клиническими признаками (рис.3). При хроническом течении аэромоноза обнаруживают очаги воспаления, открытые и рубцующиеся язвы на коже и плавниках, а также соединительнотканые рубцы, образовавшиеся на месте заживших язв. Патологоанатомические признаки выражены более слабо. Иногда отмечают незначительную гиперемию отдельных Участков слизистой кишечника, анемию печени, увеличение желчного пузыря, отечность почек, выраженный спаечный процесс [46].

Описано два пути заражения рыб аэромонадами: эндогенный путь (через пищеварительный тракт) и экзогенный (через жабры и поврежденные участки тела). При этом могут отмечаться все три формы течения болезни.

В первом случае болезнь начинается в стенке кишечника рыб, ослабленных зимним голоданием. Бактериальные токсины и протеолитические ферменты разрушают стенку кишечника. Мышцы стенок становятся отечными, полупроницаемыми и тонкими. Избыточная слизь, заполняя просвет, выводится через анус в виде слизистых выделений. Патогенные бактерии проникают в кровеносные сосуды через капилляры кишечника и лимфатическую систему. Токсины и бактерии аккумулируются в печени, вызывая интенсивную дегенерацию этого органа, что проявляется в очагах воспаления и некротических зонах. Появляются тромбы в печени, в брюшной полости собирается асцитическая жидкость. Перед гибелью рыбы экссудат скапливается в брюшной полости и под кожей, в результате чего развиваются типичные симптомы - припухлости, экзофтальмия, ерошение чешуи.

Во втором случае признаки болезни проявляются поздно весной и на протяжении всего лета. Обычно они вызываются наружным инфицированием в результате разрушения чешуи или кожи под

воздействием хендлинга, укусов пиявок, язв от эктопаразитов, которые могут содержать этиологические агенты в своем теле. В коже появляются припухлости, заполненные желтой жидкостью, содержащей кровяные клетки и бактерии. Затем следуют некротические изменения в низлежащих мышцах, переходящие в глубокие абсцессы, которые могут прорываться на поверхность.

При обоих типах болезни аэромонады выделяются в большом количестве из воды, в результате чего болезнь проявляется до тех пор, пока все чувствительные рыбы инфицируются, заболеют, погибнут или выздоровят.



Рисунок 3 - Хроническое течение (язвенная форма) аэромоноза (<https://fishquality.ru>)

Выжившая рыба может иметь спайки кишечника, деформированную голову, отсутствие глаз, искривленный позвоночник, темные рубцы в местах, бывших наркотизированных язвенных участков. Темп роста у карпов, перенесших заболевание, обычно значительно ниже, чем у не болевших [47].

1.3 Анализ эпизоотической ситуации по аэромонозу карпа на территории Российской Федерации

Для изучения распространенности аэромоноза на территории Российской Федерации, проведен анализ материалов статистической отчетности Департамента ветеринарии МСХ Российской Федерации, отчетов о НИР, данных Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору и подведомственных ей лабораторий.

Сопоставив собранные сведения об эпизоотических очагах на рыбоводческих хозяйствах и рыбопромысловых водоёмах, установлено, что пик выявлений неблагополучных хозяйств по аэромонозу карповых рыб приходится на 2000 года. В число неблагополучных регионов вошли: Белгородская, Владимирская, Иркутская, Кемеровская, Курганская, Московская, Оренбургская, Свердловская, Тамбовская и Тверская области, Краснодарский край, Башкортостан, Мордовия, Хакасия, Северная Осетия, Бурятия и Татарстан. По данным Неретина М.В. (2007) в 2000 было - 34, в 2001 - 34, в 2002 - 37, в 2003 - 32, в 2004 - 24 и в 2005 – 179 неблагополучных пунктов. Московская область из них оказалась самой неблагополучной по данному заболеванию [48].

При анализе статистических данных, полученных из ФГБУ «Центр ветеринарии», о заболеваемости аэромонозом лососевых и карповых видов рыб в рыбоводных хозяйствах Российской Федерации в период с 2014 по 2018 годы установлено, что выявляемость данного заболевания носит эпизодический характер.

Вспышки аэромоноза карповых видов рыб в Российской Федерации регистрировались в Центральном федеральном округе в 2014 году (Брянская и Орловская области - по одному случаю, Московская область - шесть случаев), в 2016 году в Московской области - четыре случая (рис. 4).

В Южном федеральном округе - в Республике Адыгея один случай в 2015 году и в Волгоградской области по одному случаю заболевания в

2016 и 2017 годах. На территории Краснодарского края случаев аэромоноза в рассматриваемый период зарегистрировано не было.

В Северо-Кавказском федеральном округе выявлен один случай в 2016 году в Республики Северная Осетия-Алания.

В Приволжском федеральном округе по одному случаю заболевания было зафиксировано в 2014 году (Нижегородская область), в 2017 году (Нижегородская область и Пермский край).

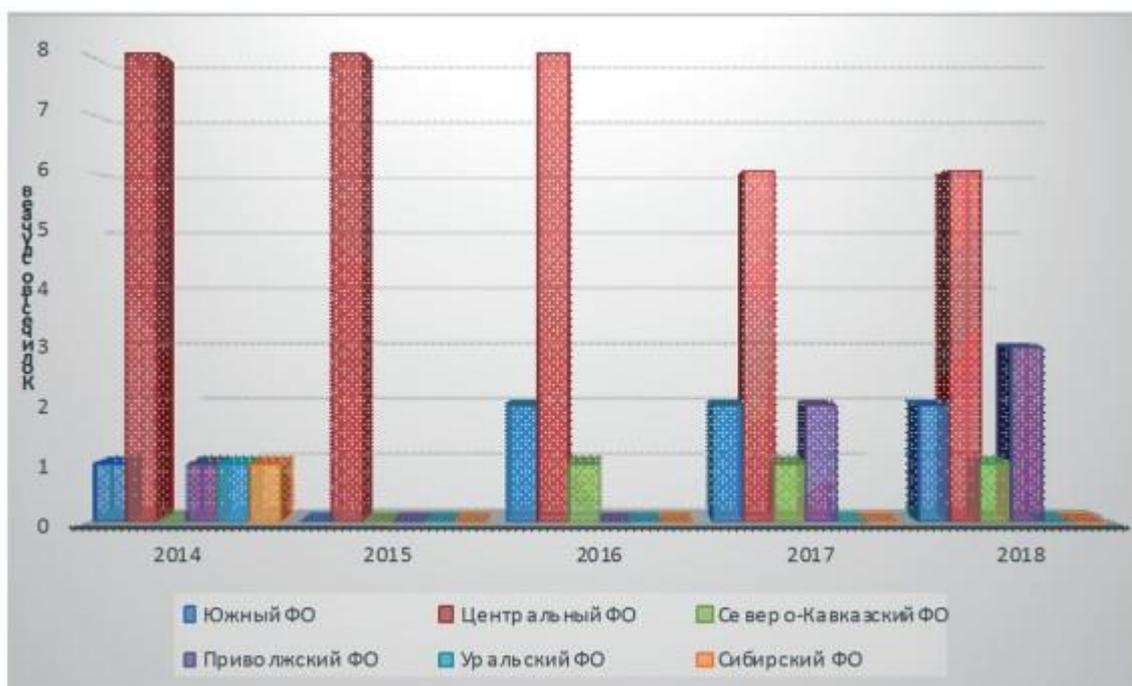


Рисунок 4 - Динамика заболеваемости аэромонозом карповых в Российской Федерации (http://vetkuban.com/num2_201907.html)

В 2014 году по одной вспышке заболевания было в Уральском федеральном округе (Курганская область) и в Сибирском федеральном округе (Иркутская область).

Наличие неблагополучных пунктов на начало 2018 года регистрировалось в Центральном, Южном, Северо-Кавказском и Приволжском федеральных округах (рис. 4).

В Северо-Западном и Дальневосточном федеральных округах случаи заболевания аэромонозом карпов за период с 2014 по 2018 год не регистрировались.

В 2017 году отмечалось установление ограничительных мероприятий (карантин) по данному инфекционному заболеванию на 1 рыбопромысловом водоеме, расположенном на территории деревни Большие Кулики муниципального образования Верхошижемское городское поселение Верхошижемского района Кировской области.

За последние 9 лет самое большое число неблагополучных по аэромонозу хозяйств выявлено на территории Московской, Оренбургской и Кировской областей. При этом анализ данных показал расхождение показателя распространенности данной инфекции за указанный период. Наибольшее количество вспышек было зарегистрировано в 2021 году в Челябинской, Кировской, Тверской, Свердловской областях.

В 2018-2019 гг аэромоноз выявлялся в Москве (2), в Московской области (1), в Оренбургской (1), Кировской (1) и Волгоградской (1) областях. По 1 неблагополучному пункту установлено в 2015 г в Республике Адыгея, в 2020 г в Оренбургской области и в 2022 году в Курской области. По этой причине очень важно проводить эпизоотический мониторинг водной экосистемы и ее обитателей, что позволит оценить ветеринарно-санитарное состояние водной среды и предупредить угрозу возникновения эпизоотических очагов. Причинами распространения болезней рыб являлись нарушения правил перевозки, наличие природных очагов возбудителей заболеваний в естественных водоёмах, снижение проводимых противоэпизоотических мероприятий: практически перестали проводить дезинфекцию и дезинвазию рыбоводных объектов, существенно снизили применение лечебных препаратов, мало внимания уделяли оптимизации гидрохимического (и особенно газового) режима водоёмов и улучшению экологического состояния водной среды.

1.4 Мероприятия по борьбе с аэромонозом карповых рыб

Учитывая положительную динамику количества рыбоводных хозяйств и рыбопромысловых водоемов в муниципальных образованиях Ульяновской области, при возникновении инфекционного процесса у особей рыб, возникают серьезные вопросы, связанные, в первую очередь, с эффективностью диагностических подходов и с сохранением благополучной эпизоотической обстановки в этих хозяйствах.

По данным сайта fish-info.ru/news «... В 2023 году в Ульяновской области вырос объем производства продукции аквакультуры. За первое полугодие было произведено 174 тонны продукции, что на 76 % выше уровня 2022 года. Как отметил заместитель Председателя Правительства-Министр агропромышленного комплекса и развития сельских территорий Ульяновской области Михаил Семёнкин, в последние годы в регионе доля рыбы, выращенной в бассейнах и установках замкнутого водоснабжения, превышает прудовую. Также увеличивается производство ценных видов рыбы, в частности, форели и осетровых».

Согласно Инструкции о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб, утвержденной руководителем Департамента ветеринарии Минсельхозпрода России В.М. Авиловым 17 августа 1998 года № 13-4-2/1366 [49], диагноз на аэромоноз ставят на основании клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов бактериологических исследований. При вспышке аэромоноза возбудитель болезни выделяется из паренхиматозных органов в монокультуре. Это, как правило, штаммы одного вида, относящиеся по показателю вирулентности к аэромонадам первой или второй группы. Вирулентность выделенных аэромонад оценивают по степени ДНК-азной активности или путем постановки биологической пробы. Патогенные свойства аэромонад определяют биопробой на 3 карпах массой 100-200 г из благополучных по аэромонозу водоемов. Для этого рыбам внутрибрюшинно вводят чистую бульонную культуру аэромонад, выделенную при бактериологическом

исследовании, в дозе 0,2 мл и наблюдают за ними в течение 10 дней. Контрольным рыбам внутрибрюшинно вводят тот же объем МПБ. Температура в аквариумах должна быть не ниже 18-20°C. Проба считается положительной, если после введения бульонной культуры карпы заболевают и гибнут в течение 7 суток с признаками аэромоноза. В случае гибели рыб из крови, сердца, почек и печени делают посеы для выделения чистой культуры возбудителя.

Мероприятия по ликвидации аэромоноза

Хозяйство, его отделения, фермы, отдельные участки, где установлен аэромоноз, объявляют неблагополучными по данному заболеванию и в них устанавливают карантин. По условиям карантина в неблагополучном хозяйстве запрещается:

- пересадка рыб в другие пруды хозяйства, естественные рыбохозяйственные водоемы;
- смешанные посадки рыб разных видов и возрастов, восприимчивых и аэромонозу;
- вывоз из карантинируемых водоемов, а также ввоз в них рыб и других гидробионтов; в отдельных случаях, с разрешения ветеринарных органов, допускается вывоз рыбы из благополучных прудов карантинируемых хозяйств, не связанных с неблагополучными прудами хозяйства, в другие хозяйства и водоемы с обязательным последующим ее карантинированием в течение года. Вывоз живой товарной рыбы разрешается только непосредственно в торговую сеть без выдерживания ее в садках на живорыбных базах. Воду, в которой перевозилась рыба из неблагополучных хозяйств, подвергают хлорированию и после этого сливают в общую канализационную сеть, а в сельской местности - выливают на поля на расстоянии не ближе 500 м от водоемов;
- тару после перевозки рыбы подвергают соответствующей обработке;
- содержание водоплавающей птицы на прудах;

- внесение в пруды навоза в качестве удобрения;
- использование незакрепленного за водоемами инвентаря, орудий лова, тары, транспортных средств;
- посещение рыбоводного хозяйства, рыбопромыслового водоема посторонними лицами.

Оздоровление рыбоводных хозяйств и рыбохозяйственных водоемов проводят летованием или комплексным методом по плану, утвержденному районной (городской) администрацией.

Небольшие полносистемные рыбоводные хозяйства со спускными прудами, рыбопитомники или отдельные пруды подлежат летованию в течение одного года с одновременным проведением всех ветеринарно-санитарных и рыбоводно-мелиоративных мероприятий. При этом:

- осенью пруды спускают, всю товарную рыбу, производителей и ремонтный молодняк реализуют через торговую сеть, рыбопосадочный материал направляют на корм животным;

- в течение зимы, весны и лета следующего года ложе прудов обеззараживают. С этой целью растительность выкашивают, хорошо просохшие участки прудов вспахивают и засевают викоовсяной смесью и овощными культурами; влажные и заболоченные участки, а также рыбосборные каналы и гидросооружения дезинфицируют негашеной (25-30 ц/га) или хлорной (3-5 ц/га) известью;

- обувь и спецодежду персонала, работающего на водоеме, орудия лова, инвентарь, оборудование и другие предметы дезинфицируют в соответствии с «Наставлением по применению формалина для обеззараживания орудия лова, рыбоводного инвентаря и спецодежды» от 21.04.81 г.;

- весной после проведенного летования обеззараженные пруды зарыбляют здоровым рыбопосадочным материалом из благополучного по инфекционным болезням хозяйства.

Оздоровление комплексным методом проводится в крупных полносистемных рыбоводных хозяйствах с зависимым водоснабжением, неспускными или не полностью спускными прудами, а также в закрытых естественных рыбохозяйственных водоемах. Метод включает в себя: меры по выявлению и устранению источников возбудителя болезни, разрыв путей передачи возбудителя, повышение естественной устойчивости рыб и создание оптимальных условия их содержания, препятствующих распространению болезни.

С целью нейтрализации кислотности воды и накапливающихся в ней органических остатков в нагульные, выростные и маточные пруды рекомендуется вносить известь гашеную (пушонку) или известковое молоко из расчета 150-300 кг/га водной площади (2-3 раза в течение летнего периода с интервалом 8-15 дней), добиваясь повышения рН воды до 8.5.

В неблагополучных рыбоводных хозяйствах формируют стадо производителей и ремонтный молодняк из числа рыб, переболевших аэромонозом и обладающих относительной устойчивостью против указанного заболевания.

В хронически неблагополучных по аэромонозу хозяйствах, естественных водоемах и водохранилищах разводят и выращивают невосприимчивые или более устойчивые к болезням виды рыб: растительноядные (белый амур, белый и пестрый толстолобики), щука, бестер, буффало, канальный сом и др.

Проводят обязательную дезинфекцию ложа прудов, гидротехнических сооружений, живорыбной тары, транспорта, оборудования, орудий лова, спецодежды и обуви.

Нерестовые, зимовальные, летние маточные, карантинные и изоляторные пруды дезинфицируют негашеной (25 н/га) или хлорной (5 ц/га) известью. По тем же нормам дезинфицируют и русло реки или ручья, расположенное по ложу нагульных прудов, рыбосборные ямы,

канавы, непросохшие участки ложа нагульных и выростных прудов. Гидротехнические сооружения (монахи, лотки, сороуловители, решетки, шандоры и др.) белят свежеприготовленным 25%-ным раствором негашеной или 10%-ным раствором хлорной извести.

Ликвидацию аэромоноза методом летования прудов можно проводить только в том случае, если выше по реке, питающей водой пруды хозяйства, нет других водоемов, неблагополучных по инфекционным болезням рыб. В противном случае оздоровление хозяйства методом летования прудов следует проводить только после ликвидации болезни в головном водоисточнике или одновременно с ним.

С лечебной целью применяют следующие медикаментозные препараты:

препараты нитрафуранового ряда:

- рыбам всех возрастных групп фуразолидон в дозе 6.0 г на 10 кг корма до исчезновения клинических признаков;

- фуракарп - для карпов всех возрастных групп 1 десятидневный курс (с двухдневным перерывом между пятидневками) кормления. Фуракарп смешивают с обычным комбикормом в соотношении 1:16;

- рыбам всех возрастных групп фуртин - в течение 10 дней (с двухдневным перерывом между пятидневками) из расчета по 12 г на 10 кг корма;

- фурадонин - применяют из расчета 1.5 г препарата на 1 кг корма до прекращения заболевания острой и подострой формами аэромоноза, не более 2х курсов с промежутком 2-3 недели;

антибиотики:

- в выростных, нагульных и летне-маточных прудах биомицин и левомицетин задают с гранулированным кормом или дробленным зерном в соотношении 1:2000. Одноразовая дача лечебного корма: сеголеткам – 0,3 г, двухлеткам до 200 г – 0,5 г, двухлеткам более 200 г – 1,5 г, производителям – 2,0 г. Корма, обогащенные антибиотиками,

скармливают на протяжении вегетационного периода по схеме: 3 дня кормят лечебными кормами, 4 - обычным, затем курс повторяют. При температуре воды до 12°C срок кормления обычным кормом можно увеличивать до 6-ти суток, при температуре воды выше 21°C - сокращать до 3-х суток;

- дибиомицин назначают из расчета 20000 ЕД на кг. Непосредственно перед применением препарат разводится в экмолине. 800000-1000000 ЕД/1 г препарата насыпают в пенициллиновый флакон, тщательно размешивают стеклянной палочкой с небольшим количеством экмолена, затем добавляют экмолин до 10 мл и перемешивают. Вместо экмолена можно использовать стерильное вазелиновое масло. Полученную суспензию вводят рыбам в брюшную полость по 0.25 мл/кг;

- бацилихин - смешивают с комбикормом за 2 часа до кормления в соответствии со следующими нормами - бацилихин -30 - 6 кг на тонну, бацилихин-60 - 3 кг на тонну, бацилихин-90 - 2 кг на тонну, бацилихин-120 - 1.5 кг на тонну. Курс лечебного кормления - 6 дней ежедневно. При необходимости курсе лечения повторяют;

- ветдипасфен - суточная лечебная доза 75 мг/кг массы рыбы. Препарат рыбам задается с лечебным гранулированным кормом, в состав которого входит 0.15% ветдипасфена. Скармливание лечебного корма производится ежедневно в соответствии с суточным рационом питания в зависимости от температуры воды. Курс лечебного кормления - 10 дней ежедневно;

- карповит (биошрот+витамицин) - применяют из расчета по 32 кг на 1т комбикорма, изготовленного методом влажного прессования или в форме мешанки после 8-часового настаивания. Препарат применяют в течение 6 суток 2-3 курса с перерывом 2-3 недели;

кормовые антибиотики:

- кормовой биомицин, биоветин, биовит-40, биовит-80, биовит-120, кормогризин-5, кормогризин-10, изготовленные промышленным

способом, скармливают в течение 6-ти дней: биоветина - 200 мг, биовита-120 - 400 мг, биовита-80 - 620 мг, биовита-40 – 1,3 г, кормогризина -5 - 400 мг и кормогризина-10 - 200 мг на 1 кг веса рыбы. В случаях острого течения болезни первые 1-2 дня кормогризин скармливают в любой дозе.

Кронолактон применяют в смеси с комбикормом. Препарат отмеривают и растворяют в воде из расчета, чтобы смочить суточное количество корма (3 части корма на 1 часть воды). Комбикорм тщательно перемешивают и через 2-3 часа распределяют по кормовым точкам. Обработку рыб с профилактической и лечебной целями проводят в следующем порядке: годовикам и двухлеткам карпа кронолактон с профилактической целью назначают весной при достижении температуры 14°C в дозе по 7 мл на 100 кг корма десятидневными курсами, состоящими из двух пятидневок с перерывом 48 часов между ними, после чего аналогичные обработки повторяют двукратно с недельным интервалом между курсами; сеголеткам кронолактон назначают с профилактической целью со второй половины июля вплоть до октября по вышеуказанной схеме; годовикам и двухлеткам карпа препарат применяют с лечебной целью по вышеуказанной схеме в период заболевания аэромонозом вплоть до прекращения болезни; производителям и ремонту карпов кронолактон применяют с лечебной целью в дозе 15-20 мг/экземпляр в течение 10 дней, с повторной обработкой через 7 дней вплоть до прекращения заболевания.

Для выбора наиболее эффективного антибиотика при лечении больных аэромонозом рыб предварительно следует определить чувствительность к нему бактерий, выделенных от этих рыб.

Товарных рыб, получавших антибиотики и фуразолидон, следует направлять в реализацию не ранее, чем через 30-45 дней после окончания лечения.

Карантин по аэромонозу рыб с рыбоводного хозяйства (рыбохозяйственного водоема) снимают по истечении одного года после

последнего случая заболевания рыб, отрицательных результатов биологической пробы в производственных прудах и проведения комплекса ветеринарно-санитарных и рыбоводно-мелиоративных мероприятий.

Мероприятия по профилактике

В целях профилактики аэромоноза рыб необходимо:

- завозить в хозяйство рыб только из водоемов, благополучных по инфекционным болезням;

- поступающих в хозяйство производителей и ремонт каритинировать в отдельных для самок и самцов прудах в течение 30 дней при среднесуточной температуре воды не ниже 12°C;

- рыбопосадочный материал (сеголетки, годовики, двухлетки) размещают в специально выделенные пруды отдельно от местных рыб;

- живорыбную тару и рыбоводный инвентарь, используемые при транспортировке рыбы, дезинфицируют до и после перевозки согласно «Наставлению по применению формалина для обеззараживания орудий лова, рыбоводного инвентаря и спецодежды» от 21.04.81 г.;

- при обловах и пересадках не допускать травмирования рыб;

- проводить комплекс мер, направленных на повышение резистентности организма рыб (полноценное кормление, оптимальные зоогигиенические условия, пробиотики);

- не допускать зарастания прудов жесткой растительностью;

- своевременно разгружать зимовальные пруды;

- регулярно не реже одного раза в квартал, а в вегетационный период во время обловов проводить ихтиопатологическое исследование рыб;

- строго выполнять требования, изложенные в действующих Ветеринарно-санитарных правилах для рыбоводных хозяйств.

Мероприятия по профилактике аэромоноза включают в себя ихтиопатологический мониторинг неблагополучных прудов, внесение

негашеной извести. Весной при бонитировке ремонтных особей и производителей инъецируют внутривентрально дибиомицином. Хорошие результаты получены в России при производственном испытании биохимической вакцины ВЮС-2.

1.5 Методы лабораторной диагностики аэромоноза

Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 14.04.2020 № 196 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов аэромонозов лососевых и карповых рыб» (Зарегистрирован 21.05.2020 № 58409) [50].

Согласно п. 3 Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов аэромонозов лососевых и карповых рыб: «...Аэромонозы - инфекционные (бактериальные) болезни лососевых и карповых рыб (далее - рыбы), включающие фурункулез лососевых и краснуху карповых.

Краснуха карповых (далее - краснуха) - инфекционная болезнь карповых рыб, характеризующаяся воспалением кожного покрова, кровоизлияниями, гидратацией мышечной ткани и внутренних органов».

Согласно п. 4 вышеназванного документа «...Возбудителями аэромонозов являются бактерии семейства *Aeromonadaceae* рода *Aeromonas*... Инкубационный период составляет: ... при краснухе — от 3 до 30 дней.

Согласно п. 15. вышеназванного документа «... При возникновении подозрения на аэромонозы специалистами госветслужбы должен проводиться отбор проб биологического и (или) патологического

материала в следующем порядке. Живых рыб массой 1,5 кг и менее с клиническими признаками аэромонозов, указанных в пункте 3 настоящих Правил, необходимо отбирать: в возрасте до 1 года - 25 экземпляров; старше 1 года - 5 экземпляров. Живых рыб в лабораторию следует перевозить в емкостях, заполненных на 2/3 объема водой из водоема, в котором содержались рыбы (или из артезианской скважины), при поддержании температуры воды 12 - 15°C. От трупов рыб в количестве, указанном в абзацах третьем и четвертом настоящего пункта, массой более 1,5 кг с клиническими признаками аэромонозов, указанных в пункте 3 настоящих Правил, для исследования в лабораторию направляются фрагменты пораженных органов (пеиени, почек, селезенки, сердца, кишечника) и тканей (кожи с подлежащей мускулатурой, жабр) размером 2 x 3 см, толщиной 0,5 - 1,0 см и массой не более 50 г. Патологический материал (фрагменты пораженных органов и тканей) от 5 трупов рыб объединяется в одну пробу. Допускается направление в лабораторию трупов рыб массой 1,5 кг и менее целиком в количестве, указанном в абзацах третьем и четвертом настоящего пункта. Пробы патологического материала охлаждаются и на период транспортирования в лабораторию помещаются в термоконтейнеры. Упаковка проб биологического и (или) патологического материала и их транспортирование должны обеспечивать их сохранность и пригодность исследований в течение срока транспортировки».

П. 17 и 18 настоящих Правил «Лабораторные исследования проб биологического и (или) патологического материала должны проводиться методом идентификации возбудителя. Диагноз на аэромонозы считается установленным при выделении и идентификации возбудителя».

1.6 Таксономия бактерий рода *Aeromonas*

Впервые представители рода *Aeromonas* были описаны Zimmermann в 1890 году, который выделил их водопроводной воды города Хемниц в Германии. Он назвал бактерии *Bacillus punctatus*, в дальнейшем идентифицированные как *Aeromonas caviae*. О первых изолятах, датированных 1891 годом, сообщили Sanarelli et al., который назвал бактерии *Bacillus hydrophilus fuscus* (ныне *Aeromonas hydrophila*). В 1898 году Russell дал подробное описание морфологических, культуральных и бактериологических свойств бактерии *Bacillus hydrophilus fuscus*. В конце XIX-начале XX века были описаны и иные представители рода *Aeromonas*: из воды (Beijerinck M.W., 1900), из молока (Hammer B.W., 1917), из радужной форели (Emmerich R., Weibel C., 1894). Учитывая, что методы, применяемые в это время для идентификации бактерий, были относительно примитивными, но уже в это время было ясно, что род объединяет две разные группы бактерий *Aeromonas*. Одна группа бактерий была подвижная, хорошо растет при 37°C. Другая группа бактерий, выделенная из больных рыб Emmerich и Weibel и названная ими *Bacillus der Forellenseuche* в 1894 году, была переименована Lehmann и Neumann в 1896 году в *Bacterium salmonicida*. Эта группа бактерий была неподвижная и не росла при $t = +37^{\circ}\text{C}$ и известна сегодня как *Aeromonas salmonicida* [51].

Этот род был включен в семейство *Vibrionaceae* в 1965 году в месте с родами *Vibrio* и *Plesiomonas*. В 1986 году Colwell et al. [52] провели анализ последовательности генов 16S рРНК и 5S рРНК, а также исследования гибридизации ДНК-ДНК и продемонстрировали, что *Aeromonas* сформировали другую филогенетическую ветвь, создав, таким образом, семейство *Aeromonadaceae*. В середине 1970-х годов виды данного рода были разделены на две группы по разным признакам: мезофильную группу (оптимальный рост при $t=35-37^{\circ}\text{C}$) с подвижными изолятами, ответственными за ряд инфекций у человека и определяемую как «*A. hydrophila*» и психрофильную группу (оптимальная температура роста 22–28

°C) с неподвижными штаммами, связанными с болезнями рыб и идентифицированными как «*A. salmonicida*». Однако в последние годы многие исследования показали, что температура роста выше 22 °C вызывает серьезные перестройки у *A. salmonicida*, такие как потеря системы секреции третьего типа (T3SS), которая является важным фактором вирулентности у бактерий, что приводит к образованию неvirulentных штаммов у рыб и модельных хозяев. Это согласуется с тем фактом, что эта бактерия инфицирует холодноводных рыб, в том числе лососевых, которые не выживают при температуре выше 25 °C [53].

По изданию Bergey's Manual род *Aeromonas* относится к классу *Gammaproteobacterias*, отряду *Aeromonadales*, семейство *Aeromonadaceae*, охватывающее три рода: *Aeromonas*, *Oceanimonas* и *Tolumonas*. Представители этого рода характеризуются как грамотрицательные палочки (0,3-1,0 × 1,0-3,5 мкм), оксидазо- и каталазоположительные, способные расщеплять нитраты до нитритов, ферментаторы глюкозы и устойчивые, за немногими исключениями. Этот род включает 36 видов, считающихся автохтонными для водных сред. Их также выделяют из пищевых продуктов, животных и при различных инфекционных процессах у человека [54-55].

Таксономия рода *Aeromonas* всегда подвергалась изменениям: с 1992 года было добавлено 22 новых вида. Идентификация на уровне вида с использованием фенотипической характеристики затруднена из-за вариативного поведения штаммов, что вызвало множество путаницы и ошибочных определений. Методы молекулярной идентификации, такие как последовательности генов домашнего хозяйства и их конкатенированный филогенетический анализ (т.е. многолокусный филогенетический анализ (MLPA)) помогли правильно распознать многие новые виды рода, преодолев ограничение высокого сходства 16S рРНК (ген, который встречается у некоторых близкородственных видов). Кроме того, разработка нескольких инструментов для сравнения и характеристики геномов позволила аналитикам распознать неправильно помеченные геномы и роль бактерий в

окружающей среде. В настоящее время род насчитывает 36 видов (рис. 5-6), которые были описаны с 1943 года: *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas aquatilis*, *Aeromonas australiensis*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas cavernicola*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas crassostreae*, *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas diversa*, *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas enterica*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas finlandiensis*, *Aeromonas fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas intestinalis*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas media*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas lacus*, *Aeromonas lusitana*, *Aeromonas piscicola*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas rvipollensis*, *Aeromonas rivuli*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sanarellii*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas simiae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas tecta*, *Aeromonas* и *Aeromonas veronii* [56-58].

Некоторые виды *Aeromonas* считаются новыми патогенами, поскольку они вызывают широкий спектр заболеваний у людей, в основном гастроэнтерит, раневые инфекции и бактериемию/сепсис, заражая людей с ослабленным иммунитетом и иммунокомпетентных людей [52].

Исследования показали, что 96,5% штаммов, связанных с клиническими случаями, были идентифицированы как один из четырех видов: *Aeromonas caviae* (29,9%), *Aeromonas dhakensis* (26,3%), *Aeromonas veronii* (24,8%) и *Aeromonas hydrophila* (15,5%) [56]. Кроме того, сообщалось о других видах, обычно связанных с болезнями рыб, таких как *Aeromonas salmonicida*, которые также вызывают инфекции у людей [59]. Более того, одним из важных вопросов при изучении этих инфекций является выбор адекватной животной модели или клеточной линии, воспроизводящей патогенность *Aeromonas* [60].

Вирулентность *Aeromonas* описана как многофакторная и связана с экспрессией генов (*exoA*, *alt*, *act* и др.), кодирующих различные токсины, структурными компонентами (*flaA*, *maf-5*, *flp* и др.), системами секреции (Т3SS), Т6SS и др.) и белками, связанными с металлами. Наличие этих факторов вирулентности позволяет бактериям колонизировать, внедряться и

преодолевать механизм иммунного ответа хозяина, что приводит к инфекции, вызывающей заболевание. Несколько исследований продемонстрировали экспрессию различных генов, связанных с иммунитетом, у хозяина после инфекции *Aeromonas*, в том числе тех, которые участвуют в распознавании патогенов, белков, участвующих в клеточной передаче сигналов и апоптозе [59-65].

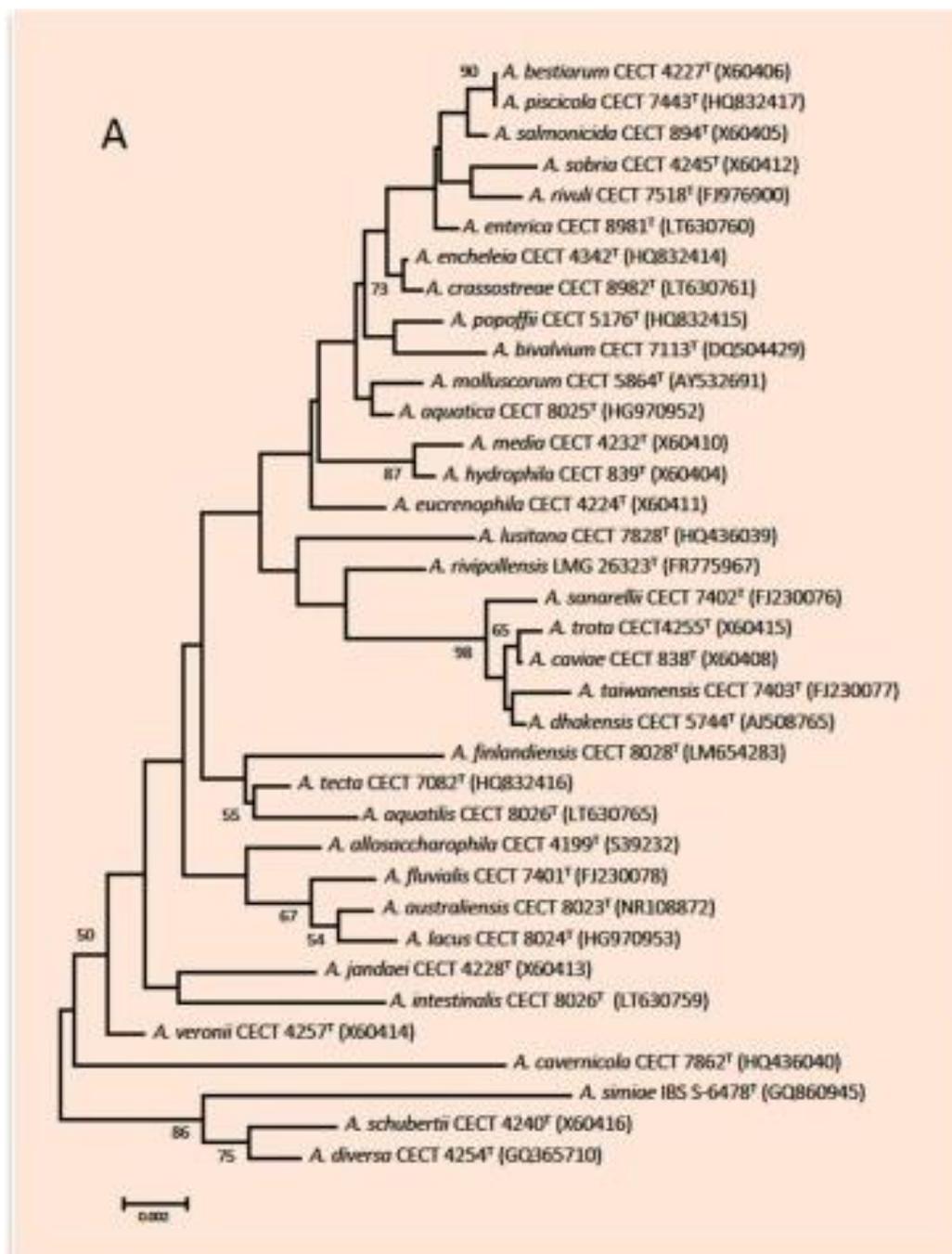


Рисунок 5 - Филогенетическое древо, основанное на последовательностях гена 16S рНК (1498 п.н.) среди 36 видов *Aeromonas* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022790/>)

Для описания новых видов прокариот Международный комитет по систематике прокариот (ICSP) рекомендует полифазное исследование, которое должно включать фенотипическую и филогенетическую дифференциацию от существующих видов [38]. Обсуждение критериев, предложенных ICSP в отношении рода *Aeromonas*, приведено в работе [66].

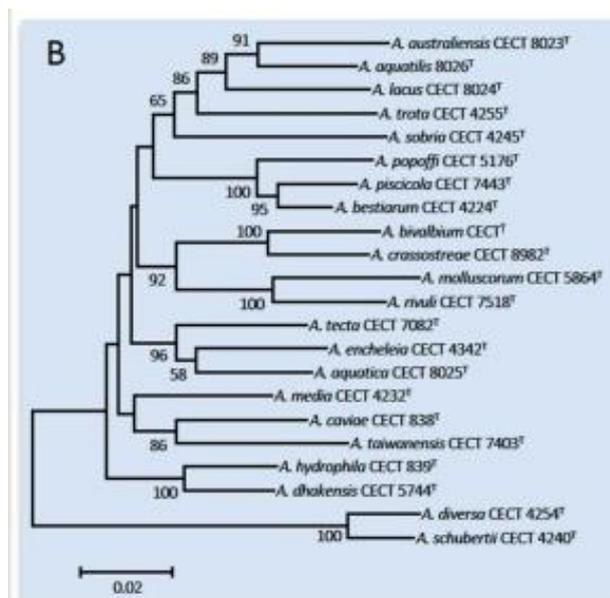


Рисунок 6 - Филогенетическое древо, основанное на конкатенированных последовательностях генов *groD* и *guyB* (1098) среди наиболее сходных видов на основе гена 16S рНК. Число в узлах указывает на замены значений начальной загрузки, оцененные сайтом (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022790/>)

1.7 Исследования зарубежных ученых в области диагностики аэромоноза

Бактериологическая идентификация

Триптиказный соевый агар (TSA) и триптиказный соевый бульон (TSB) обычно применяются для хранения образцов, выделенных из зараженной рыбы и резервуаров с водой. Крахмально-ампициллиновый агар используется для выделения *A. hydrophila* из пищевых продуктов. После роста бактериальных колоний добавляют раствор Люголя и амлазоположительные колонии считают *A. hydrophila*. Среды, такие как цефсулодин-иргасан-новобиоциновый агар (CIN), агар МакКонки и кровяной

агар, обогащенный ампициллином, используются при идентификации колоний *Aeromonas*, выделенных из образцов фекалий. Кроме того, для образцов того же типа используют таурохолат-теллурит-желатиновый агар (ТТГА), который тестируют на мазках из прямой кишки свиноматок. В этом случае оксидазо-положительные колонии, имеющие серый цвет без черного центра, но с зоной непрозрачности, тестируют на виды *Aeromonas*. Ампициллин-декстриновый агар (ADA) также используется для выделения бактерий этого рода, и цвет колоний, отображаемых в среде, отличает штаммы *Aeromonas* от представителей других родов бактерий. Однако, существует вероятность того, что цвета бактериальных колоний в ADA могут различаться в зависимости от производителя используемой среды, поскольку некоторые авторы сообщают, что предполагаемые колонии *Aeromonas* были желтыми, в то время как другие сообщают о белом цвете [67-68].

Обычные биохимические тесты, а также автоматизированные системы имеют ограниченное применение при идентификации некоторых видов *Aeromonas*. Кроме того, на их точность влияет изменение в таксономии рода. Согласно Bergey's Manual [54], род *Aeromonas* включает факультативно-анаэробные бактерии, ферментирующие d-глюкозу, которые являются ферментерами d-глюкозы с выделением газа или без него. Кроме того, они каталазо- и оксидазоположительны, восстанавливают нитраты до нитритов, продуцируют ряд ферментов и способны использовать другие углеводы помимо глюкозы.

Однако существуют некоторые методологии, которые дают более разнообразные результаты, чем те, которые были созданы ранее для идентификации *Aeromonas*. Например, штаммы были классифицированы как *Aeromonas sobria* с положительным результатом по аргинин-дигидролазе (АДГ), Фогес-Проскауэру и гидролизу желатина, вопреки тому, что ранее предлагалось в литературе. Другое исследование сообщило о том же результате: первый тест преобладал среди всех 25 штаммов *A. sobria*. Было обнаружено расхождение в продукции эластазы между *A. hydrophila* и *A.*

sobria, что способствовало дифференциации этих двух видов. Также были установлены свойства, подтверждающие различие между *A. veronii*, *A. sobria* и *A. encheleia*, а также отдельные характеристики, отличающие последние два вида. Штаммы *A. sobria* и *A. veronii* дифференцировали путем изучения возможности изолятов к гидролизу крахмала и ферментации арабинозы; последний тест был преимущественно отрицательным в биоваре *A. veronii sobria* [26, 54, 69].

Почти все виды *Aeromonas* можно обнаружить на модификации агара CIN (цефсулодин-иргасан-новобиоцин), который обычно используется для селекции *Yersinia enterocolitica*. Этот модифицированный CIN, известный как селективный агар для иерсиний (YSA, Difco), имеет более низкую концентрацию цефсулодина (4 мг/л), чем исходный состав CIN I (15 мг/л), который, как правило, ингибирует некоторые виды. Это позволяет одновременно обнаруживать как *Aeromonas*, так и *Yersinia* путем нанесения на чашки со средами штрихов и инкубации при 25°C в течение 28 часов [70].

Коммерческие системы идентификации (API 20E, Vitek, BBL Crystal, MicroScan W/A и др.) широко используются в клинических лабораториях, хотя несколько авторов продемонстрировали, что эти системы имеют ограничения. В 2010 году Lamu et al. сравнили точность шести коммерческих систем для идентификации бактерий рода *Aeromonas*, используя секвенирование *groB* в качестве эталона. Было показано, что соответствие между филогенетической идентификацией и системами коммерческой идентификации низкое, с ошибочной идентификацией на видовом уровне. Исследование также подтвердило результаты предыдущих исследований, которые выявили путаницу между родом *Aeromonas* и родом *Vibrio*. Эта путаница снова была подтверждена в отчете о клиническом случае, в котором штамм был идентифицирован как *Vibrio alginolyticus*, в то время как предварительная идентификация в больнице соответствовала *Aeromonas spp.* с использованием API20E [71].

Молекулярная идентификация

Методы, основанные на гене 16S рРНК

Ген 16S рРНК считается стабильным молекулярным маркером для идентификации видов бактерий, поскольку его распространение универсально и позволяет сравнивать микроорганизмы. Кроме того, его структура представляет собой мозаику вариабельных областей, пригодных для дифференциации близкородственных организмов, а их консервативные области полезны для сравнения отдаленных организмов, что позволяет создавать «универсальные» праймеры [72].

За последние два десятилетия род *Aeromonas* был подвергнут множеству глубоких филогенетических анализов, о чем писали Martínez-Murcia et al. [73]. Первый филогенетический анализ рода был основан на секвенировании гена 16S рРНК [74]. Эти анализы подтвердили большинство предыдущих классификаций, основанных на фенотипических признаках, но это было первое свидетельство таксономической сложности этого рода. Неоднозначная таксономия рода *Aeromonas* может быть сведена к трем основным проблемам:

- (1) секвенирование 16S рРНК не может отделить все известные виды,
- (2) реклассификации видов и предложения новых видов, основанные на редко выделяемых видах,
- (3) высокий уровень неправильной идентификации с помощью биохимических тестов.

Секвенирование гена 16S рРНК оказалось безуспешным для идентификации бактерий всех видов *Aeromonas* из-за низкого таксономического разрешения [75-76]. Последовательности гена 16S рРНК бактерий *Aeromonas* чрезвычайно консервативны по сравнению с другими бактериями и, таким образом, не обладают достаточной специфичностью для дифференциации близкородственных видов [73, 77]. Межвидовое сходство последовательностей гена 16S рРНК для бактерий рода *Aeromonas* колеблется от 96,8 до 100%. По данным Nagar et al. [76], общее среднее

сходство последовательности 16S рРНК для бактерий *Aeromonas* spp. составило 97,3%, что указывает на слабую дискриминационную способность этого генетического маркера. Более того, сообщалось о межвидовом сходстве последовательностей 16S рРНК группы видов, особенно актуальных для морепродуктов, бактерий *A. salmonicida*, *A. bestiarum* и *A. piscicola*, достигавшем 99,8–100%, и, таким образом, их невозможно было разделить с помощью анализа 16S рРНК [78]. По этой причине секвенирование генов, кодирующих белки, в настоящее время предпочтительно в качестве филогенетических маркеров одного гена с высоким разрешением с акцентом на белки, связанные с процессингом ДНК, такие как *gyrB* (кодирующий В-субъединицу ДНК-гиразы, топоизомеразу ДНК II типа) [79] и *rpoD* (кодирующий фактор, придающий промотор-специфическую инициацию транскрипции на РНК-полимеразе) [80]. Дискриминационная способность генов *gyrB* и *rpoD* значительно выше, чем у гена 16S рРНК, а среднее сходство последовательностей генов, отвечающих за ведение домашнего хозяйства, находится в диапазоне от 89 до 93% [81-82]. Другими моногенными филогенетическими маркерами, применяемыми для филогенетических исследований бактерий *Aeromonas*, являются *rpoB*, *dnaJ* и *recA* [83-84].

MALDI-TOF

Как описано ранее, одна из основных проблем в идентификации бактерий рода *Aeromonas* заключается в том, что некоторые виды фенотипически очень похожи (например, *A. caviae* и *A. media*, *A. veronii* и *A. sobria*). Поэтому в качестве альтернативы трудоемкому методу гибридизации ДНК-ДНК для решения таксономии бактерий рода *Aeromonas* было применено несколько молекулярных методов, и хотя анализ последовательностей генов рибосомной РНК позволил провести дискриминацию геновидов [85-86], в настоящее время все чаще используются другие гены, такие как *gyrB* и *rpoD* [87-90].

Тем не менее, секвенирование и филогенетические методы являются дорогостоящими, трудоемкими и поэтому не подходят для быстрой идентификации видов в диагностической лаборатории. Валидной альтернативой традиционным методам идентификации и классификации бактерий, основанным на характеристике молекул биомаркеров, но определенно более быстрым и надежным, является метод масс-спектрометрии [91]. MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry – time of flight) в сочетании с надежной базой данных является мощным методом идентификации и сравнения микробных изолятов на основе анализа белковых отпечатков цельных клеток. Применение MALDI-TOF MS в микробиологии важно для анализа протеомных и природных продуктов [92]. Этот метод может быть использован для обнаружения нелетучих и термически нестабильных молекул от нескольких до нескольких сотен кДа (наиболее применимый диапазон, используемый для анализа, составляет 2–20 кДа). Идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF MS основана на обнаружении массовых сигналов от биомаркеров, специфичных на уровне рода, вида или подгруппы. Основная информация, используемая для микробной идентификации, содержится в списке пиков, содержащем значения m/z и интенсивности. Этот список анализируется путем сравнения с базой данных SARAMIS (Spectral Archive And Microbial Identification System), в которой идентификация на уровне видов основана на проценте достоверности, относящейся к эталонным спектрам (SuperSpectra™), содержащим биомаркеры семейства, рода и вида, как описано в руководстве пользователя SARAMIS™. Для генерации одного SuperSpectra™ необходимо несколько представителей изолятов одного вида из разных локаций (больниц, референс-центров и коллекций штаммовых культур). Помимо FingerprintSpectra, каждый изолят будет определяться с помощью аккредитованных и опубликованных процедур идентификации микроорганизмов. SuperSpectra™ генерируются на основе измерений хорошо известных микроорганизмов и

содержат наборы биомаркеров рода, вида и штамма, характерных для соответствующей группы микроорганизмов. SuperSpectra™ вычисляются по типичным штаммам, охватывающим более 90% внутривидового разнообразия большинства видов. Точность идентификации в значительной степени зависит от надежности базы данных и выбора эталонных изолятов. Это особенно важно при рассмотрении родов, включающих виды клинического и экологического происхождения с высоким генетическим разнообразием [93-94].

Имеются отличные прецеденты применения MALDI-TOF MS для таксономических исследований [95-98], а также для рутинной диагностики [99].

Есть исследования, которые доказали применимость этого метода для идентификации бактерий рода *Aeromonas* [100-102]. Так, например, Chen et al. использовали MALDI-TOF MS для характеристики 217 клинических изолятов, ранее идентифицированных с помощью секвенирования *groB*, и обнаружили, что 100 % были правильно идентифицированы на уровне рода и 97 % на уровне вида. Год спустя Chen et al. повторно идентифицировали 65 клинических штаммов, ранее идентифицированных с помощью секвенирования *gyrB*, и показали 98,5 % совпадения на уровне рода и 92,3 % на уровне вида с использованием MALDI-TOF MS [103].

Эти результаты относительно схожи с теми, о которых сообщил Latif-Eugenin F.L. (2015). Он идентифицировал 179 клинических штаммов из испанских больниц, с правильной идентификацией 98,3 % на уровне рода и 91,1 % на уровне вида с использованием MALDI-TOF MS. Основываясь на этих данных, они предположили, что MALDI-TOF MS является полезным инструментом, поскольку ошибка идентификации составляет <10%, в то время как при фенотипических методах идентификации ошибка может быть очень высокой [104].

Основным ограничением метода является необходимость обновления базы данных для включения многих отсутствующих видов *Aeromonas*, таких

как *A. dhakensis*, или новых видов (*A. enteralis*, *A. crassostreae*, *A. enterica* и *A. aquatilis*) [105].

Недавнее исследование, в котором использовалась MALDI-TOF MS для характеристики *Aeromonas*, выделенные из рыб, показали, что количество правильных идентификаций увеличилось после добавления 14 новых спектров в базу данных MALDI-TOF Biotyper [106].

Гены домашнего хозяйства (housekeeping genes)

Гены домашнего хозяйства кодируют белки, выполняющие важные функции для выживания бактерий. Они были введены для описания новых видов с помощью MLPA, поскольку разрешение выше, чем у гена 16S рРНК. Для таксономического анализа идеальный housekeeping genes должен иметь следующие характеристики:

- (1) на него не должен влиять горизонтальный перенос генов;
- (2) они должны быть у всех бактерий;
- (3) они должны быть одиночными генами в геноме бактерий;
- (4) они должны представлять, как минимум, две консервативные области для дизайна праймеров [107-109].

Первым изученным housekeeping genes *Aeromonas* был ген *gyrB*, который кодирует субъединицу В ДНК-гиразы. Другим housekeeping genes, филогения которого сходна с *gyrB*, является ген *rpoD*, который кодирует сигма-фактор S70 (который обеспечивает специфичную для промотора инициацию транскрипции для РНК-полимеразы). Эти гены были использованы для распознавания и описания многих видов в последние годы. Филогенетическое дерево, полученное из последовательностей генов *gyrB* и *rpoD* очень сходных видов *Aeromonas* на основе гена 16S рРНК. Во многих исследованиях описаны другие housekeeping genes: *rpoB*, *recA*, *dnaJ*, *cpn60*, *mdh*, *gyrA*, *dnaX*, *atpD*, *groL*, *gltA*, *metG*, *ppsA*, *dnaK*, *radA*, *tsF* и *zipA*. Однако филогения, основанная на последовательности только одного housekeeping genes, иногда не является окончательной, и более высокое разрешение

достигается при использовании конкатенированных последовательностей нескольких генов домашнего хозяйства [110].

Методы генотипирования

Для определения принадлежности изолятов *Aeromonas* к одному и тому же клону пользуются методами энтеробактериальной повторяющейся межгенной консенсусной ПЦР (ERIC-PCR), случайной амплифицированной полиморфной ДНК-ПЦР (RAPD-PCR), полиморфизмом длины амплифицированного фрагмента (AFLP), гель-электрофорезом в пульсирующем поле (PFGE) и мультилокусным типированием последовательностей (MLST).

ERIC-PCR является одним из самых популярных методов генотипирования бактерий рода *Aeromonas*, поскольку он прост в применении, не требует дорогостоящего оборудования и обладает высокой воспроизводимостью. Следовательно, он использовался в нескольких масштабных исследованиях. В недавнем исследовании один штамм *A. caviae*, выделенный из образца салата, показал тот же образец генотипа ERIC, что и штамм, выделенный из образца оросительной воды. Кроме того, тот же генотип *A. sanarellii* был обнаружен в образцах петрушки и помидоров, орошаемых одной и той же регенерированной водой, что подтверждает потенциальный риск для здоровья человека [111-116].

MLST основан на анализе последовательностей нескольких генов, обычно семи, для распознавания последовательностей аллелей. Этот метод показывает высокую степень дискриминации и воспроизводимости по сравнению с другими методами, а также существует база данных, которая помогает исследователям сравнивать свои результаты.

База данных последовательностей генома бактериальных изолятов (BIGSdb) - это платформа, которая в настоящее время управляет базой данных MLST, и ее можно найти в общедоступных базах данных PubMLST. Схема MLST находится в свободном доступе и была создана для *Aeromonas* в 2010 г. на основе данных шести генов (*gyrB*, *groL*, *gltA*, *metG*, *ppsA* и *recA*).

Основная проблема метода заключается в необходимости иметь идеальные последовательности семи генов домашнего хозяйства (450–500 п. последнее обновление 22 октября 2019 г. содержало 751 штамм и 2817 последовательностей, которые соответствовали 652 профилям MLST (доступно в Интернете: <https://pubmlst.org/Aeromonas/submission.shtml>).

Метод гибридизации ДНК-ДНК

Геномная последовательность микроорганизма представляет собой предельный уровень информации, который может быть использован в филогенетических исследованиях [117]. Доля гуанинов (G) и цитозинов (C) в микробной ДНК является параметром, наиболее часто оцениваемым в филогенетической классификации на основе генома. Метод гибридизации ДНК-ДНК заключается в определении генетического расстояния между двумя микроорганизмами на основе содержания в них G+C [118]. Такая оценка устанавливает предел процента сходства в качестве критерия для классификации двух организмов как принадлежащих или не принадлежащих к одному и тому же виду. В случае гибридизации ДНК-ДНК, когда сходство геномных последовательностей составляет менее 70%, оцениваемые микроорганизмы считаются отдельными видами, тогда как при сходстве более 70% они классифицируются как принадлежащие к одному виду [118].

Долгое время эта форма оценки считалась золотым стандартом в отношении таксономической классификации доменов архей и бактерий. Однако, поскольку существует несколько ограничивающих факторов: сложность методики, высокая вероятность ошибок и необходимость проведения ряда других тестов для статистического подтверждения результатов, вместо этого был использован анализ сходства между последовательностями гена 16S рРНК [119]. Тем не менее, для того, чтобы сделать результаты, полученные гибридизации ДНК-ДНК, полезными, были разработаны другие методы. Метод *in silico* гибридизации ДНК-ДНК позволяет получать значения, близкие к получаемым из гибридизации ДНК-ДНК, устанавливая предельные значения по стандартизированным

параметрам. Таким образом, биоинформатические оценки могут быть облегчены, а вариации DDH преодолены [120].

Благодаря научным достижениям и доступности полных геномных последовательностей, были созданы новые индексы сравнения для вычисления сходства без необходимости функциональных шагов, объективным и воспроизводимым способом [121]. Например, филогенез расстояния от взрыва генома (GBDP), индекс максимальных уникальных совпадений (MUMI) и, чаще всего, средняя нуклеотидная идентичность (ANI), считались возможным золотым стандартом его генерации для видового различия. ANI - это среднее арифметическое значений идентичности и сходства между двумя геномами [117]. Как правило, он рассчитывается в два этапа, состоящих из фрагментации генома на последовательности примерно по 1020.н. и сравнения с помощью программы Blast каждого сгенерированного фрагмента с последовательностью другого генома; поэтому ANI рассчитывается по значениям идентичных нуклеотидов [121].

На современном рынке наборов для лабораторной диагностики инфекционных заболеваний реализуются коммерческие наборы для постановки полимеразной цепной реакции с целью детекции аэромонад.

Набор для обнаружения ПЦР в реальном времени «VIASURE *Aeromonas* + *Yersinia enterocolitica*» (Испания) предназначен для специфического обнаружения и дифференциации *Aeromonas* и/или *Yersinia enterocolitica* в образцах стула человека у пациентов с признаками и симптомами желудочно-кишечной инфекции. ДНК извлекают из образцов стула, размножают с помощью амплификации в реальном времени и детектируют с помощью специальных праймеров и флуоресцентного репортерного красителя для *Aeromonas* и/или *Yersinia enterocolitica*.

Набор для ПЦР в реальном времени AccuPower® *Aeromonas hydrophila* – это тест-система, которая может специфически обнаруживать *Aeromonas hydrophila* с помощью ПЦР в реальном времени. Система предназначена для

только для исследовательских целей и не может быть использована в диагностических целях.

Известны также тест-системы для детекции *Aeromonas hydrophila* методом постановки ПЦР производства «PCRmax» и «Bioformula».

AerSpp dtc-qPCR включает в себя серию видоспецифичных таргетных реагентов, разработанных для *Aeromonas spp.* для детектирования с помощью кПЦР, производства «Genetic PCR solutionsTM», Испания.

Вышеперечисленные наборы для детекции аэромонад иностранного производства, поэтому есть необходимость в разработке собственных лабораторных инструментов.

И последнее, но не менее важное: значительная часть противоречий по поводу представителей рода *Aeromonas* может быть отнесена к довольно неоднозначной видовой идентификации, основанной на биохимических тестах. Обычные биохимические тесты не обязательно соответствуют результатам, полученным генетическими методами, и это очевидно для экологических изолятов видов *Aeromonas* [122]. Системы фенотипической идентификации могут давать вводящие в заблуждение результаты из-за большой вариабельности ответов. Некоторая вариабельность, вероятно, связана с различиями в условиях проведения биохимических тестов, таких как температура реакции и время инкубации. Набор штаммов *Aeromonas*, выделенных из карпа обыкновенного (*Cyprinus carpio*), был идентифицирован как *A. hydrophila/Aeromonas caviae* с помощью тест-системы API 20NE. Секвенирование гена *rpoD* этих штаммов и последующий филогенетический анализ показали, что изоляты были *A. salmonicida* [123]. Более того, в исследовании клинических изолятов из образцов кала только 37% штаммов *Aeromonas* были правильно идентифицированы фенотипическим методом (панель биохимических тестов). Сравнение распределения видов с использованием генетической информации с различными биохимическими тестами показало, что биохимические

тесты (коммерческие системы, а также панели обычных биохимических тестов) могут ошибочно идентифицировать до 70% штаммов как *A. hydrophila*. В результате имеет место смещенная переоценка клинической и экологической значимости бактерий *A. hydrophila* [123].

1.8 Способы лечения аэромоноза

В отечественном рыбоводстве одними из первых антибиотиков для лечения аэромоноза карповых рыб были хлорамфеникол (левомицетин) и хлортетрациклин (биомицин) [124]. Для более эффективного воздействия на аэромонады существенное значение придавалось профилактическому скармливанию карпам препаратов других фармакологических групп - фуразолидона, метиленовой сини, сульфаниламидных препаратов [125]. Доказано, что аэромонады предрасположены к множественной антибиотикорезистентности. Например, устойчивость к тетрациклинам сочетается как с резистентностью к препаратам своей группы, так и к антибиотикам других групп. В таких случаях потенциальный риск для рыбохозяйственных предприятий представляет циркуляция в водной среде штаммов *Aeromonas spp.*, устойчивых к широкой группе антибиотиков. Бесконтрольное применение антибиотиков приводит не только к образованию резистентных штаммов, но и угрожает эффективности этих препаратов. Это одна из сложных проблем, затрудняющих объективную оценку уровня риска здоровья населения [126-127].

Основная сложность разработки мер борьбы против таких полиэтиологических заболеваний состоит в различной чувствительности изолятов к антибактериальным препаратам. Губительно действуя на одного возбудителя, используемый препарат способствует размножению другого и приводит к новой вспышке заболевания, но уже с другим этиологическим агентом. Особенно это актуально для таких ассоциаций, как псевдомонады – аэромонады – энтеробактерии и вибрионы – аэромонады – псевдомонады. Традиционные способы профилактики и лечения бактериальных инфекций,

направленные на длительное применение лечебных кормов с антибиотиками, приводят к изменению микробиоценоза рыбы и водоема и накоплению в водоемах резистентных форм патогенных микроорганизмов. Это влечет за собой снижение эффективности антибиотикотерапии. В настоящее время в странах, занимающихся интенсивным рыбоводством, актуальной задачей науки становится разработка биопрепаратов для лечения и профилактики бактериальных инфекций. Их применение позволяет повысить качество товарной рыбы и исключить формирование антибиотико-резистентных штаммов, патогенных как для выращиваемой рыбы, так и для человека. В этой связи открывается перспектива использования в ихтиопатологической практике препаратов из растительного сырья, которые в большинстве своем не токсичны, редко вызывают побочные явления, обладают антибактериальным действием в отношении широкого спектра возбудителей бактериальных болезней человека и животных [128-132].

Имеется ряд сообщений о достаточно высоком результате при оздоровлении рыбохозяйств от аэромоноза с помощью комплексного антимикробного препарата «Бровасептол» [133-134].

Однако, несмотря на высокую терапевтическую эффективность, он не имеет практического применения, так как в его состав входит пять активно действующих компонентов, на которые не установлены уровни нахождения их остатков в съедобных тканях рыбы, поэтому и нет возможности для использования в товарном рыбоводстве. Возникает актуальная потребность по внедрению современного, безопасного антибактериального препарата с широким спектром действия для лечения и профилактики аэромоноза карпов. Для этого Р.В. Петровым (2015) было решено применить новую модернизированную рецептуру препарата «Бровасептол концентрат™», состоящего из сульфаниламидов и триметоприма – средств, которые разрешены к применению в рыбоводстве [22]. По данным исследований введение в корм ферментных препаратов обеспечивает повышение переваримости питательных веществ, способствует ускорению роста рыб при

снижении затрат корма [10-13]. В состав лекарственно-кормовой смеси (ЛКС) Р.В. Петровым был включен ферментный препарат «Кемзайм». Ферменты в составе «Кемзайм»: экзогенные - целлюлозный комплекс - endo - 1, 4-beta-glucanase (Cellulase complex) для расщепления целлюлозы, формирует стенки клеток растений - бета-глюканаза - endo - 1,3 (4) -beta-glucanase (beta -glucanase) для расщепления бета-глюканов (в частности, в ячмене и овсе); эндогенные - альфаамилаза (alpha-amylase) - для оптимального расщепления крахмала до декстринов, протеаза (bacillolysin protease) - для оптимального расщепления протеинов до пептидов и аминокислот, липаза (lipase) - для оптимального расщепления жиров до свободных жирных кислот и глицерина.

По принципу аналогов исследователем были сформированы три опытные и две контрольные группы карпов-двухлеток по восемь особей в каждой. Вся рыба второй контрольной и опытных групп была предварительно (за 14 суток) перорально заражена выделенным полевым изолятом *A. hydrophila* (смывом по культуре в количестве 0,5 мл при разведении 10^7 КОЕ/мл). Рыба первой контрольной группы заражению не поддавалась. Для скармливания рыбе изготавливали три образца лекарственно-кормовой смеси. В состав первой входили «Бровасептол концентрат™», 100 мг/кг корма; в состав второй - «Бровасептол концентрат™», 100 мг/кг корма, «Кемзайм» 500 мг/кг корма; третий ЛКС - «Бровасептол концентрат™», 100 мг/кг корма, «Кемзайм» 1000 мг/кг корма. Данные ЛКС задавали рыбе в количестве 1,5 % от её веса в течение 5 суток. Результаты исследований Р.В. Петрова [22] представлены на рисунке 7.

В течение 35 суток в опытных группах 1-3 после задания ЛКС клинические признаки заболевания у рыб исчезли, а *A. hydrophila* бактериологическими исследованиями не была обнаружена. Рыба приобрела соответствующий товарный вид. В первой и второй опытных группах, где применялся «Бровасептол концентрат™» и «Бровасептол концентрат™» в сочетании с «Кемзайм» в дозе 500 мг/кг корма, остались живыми 87,5 %

карпов. В третьей опытной группе («Бровасептол концентраттм», 100 мг/кг + «Кемзайм» 1000 мг/кг) этот показатель составил 100%. Применение третьей ЛКС обеспечило достоверное ($P < 0,05$) повышение уровня общего белка в сыворотке крови по сравнению со второй контрольной группой карпов. Достоверного влияния на изменение количества альбуминов и глобулинов не отмечалось.

При исследовании на наличие продуктов перекисного окисления липидов установлено, что ЛКС № 3 влияет на уровень диеновых конъюгатов и гидроперекисей липидов, повышая их, что характерно для процессов при обезвреживании возбудителя аэромоназа (*A. hydrophila*).

О.В. Зданович и В.М. Егоров (2011) оценивали эффективность применения «Окситетравета 500» при лечении карпов, больных аэромоназом. Для определения ингибирующей концентрации «Окситетравета 500» готовили серийные разведения препарата и вносили его в твердые питательные среды.

Контроль численности микробной популяции осуществляли высевом стандартной суспензии *A. hydrophila* на среду с «Окситетраветом 500». Подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили через сутки после посева. Критерием чувствительности микроорганизмов к препарату служила минимальная концентрация, ингибирующая рост возбудителя при стандартных условиях постановки опыта *in vitro*. Авторами установлено, что «Окситетравет 500» задерживал рост бактерий в концентрации 6-8 мг/100 мл, ингибировал – при 15-20 мг/ 100 мл. Для проведения опытов по изучению эффективности препарата по принципу аналогов было сформировано 5 групп годовиков карпа по 10 экземпляров в каждой группе. Для проведения опытов использовали культуру *Aeromonas hydrophyla*. 1-ю группу рыб инфицировали двухсуточной культурой *A. hydrophyla* в дозе 0,25 мл. 2,3 и 4-ю группы карпов также заражали *A. hydrophyla* в дозе 0,25 мл и проводили лечение при появлении клинических признаков препаратом «Окситетравет 500» методом группового скармливания с комбикормом в дозах 25, 50 и 75 мг/кг веса

рыбы. Его содержание в комбикорме составило 0,075 %, 0,1 %, 0,15 %. Продолжительность кормления рыбы – 7 дней. 5-й контрольной группе рыб скармливали обычный комбикорм без антибиотика. Применение препарата «Окситетравет 500» с кормом в дозе 50 и 75 мг/кг веса рыбы (0,1 и 0,15 % лечебный комбикорм) дало высокий терапевтический эффект (через 10 дней после начала кормления рыбы лечебным кормом патологические изменения кожных покровов и внутренних органов отсутствовали). В 1 и 2-й группе наблюдалась гибель рыбы в количестве 6 и 3 штук, соответственно [135].

Показатель	Контрольные группы		Опытные группы			
	1	2	1	2	3	
	Без заражения <i>A. hydrophila</i> и без лечения	Заражение <i>A. hydrophila</i> , без лечения	ЛКС «Бровасептол концентрат», 100 мг/кг	ЛКС «Бровасептол концентрат», 100 мг/кг корма, «Кемзайм», 500 мг/кг корма	ЛКС «Бровасептол концентрат», 100мг/кг корма, «Кемзайм» 1000 г/кг корма	
Количество рыб в начале опыта, особей	8	8	8	8	8	
Количество рыб в конце опыта, особей	8	2	7	7	8	
Общий белок, г/л	21,3±1,14	13,1±1,36	17,9±0,96	18,3±1,02	20,4±0,69*	
Альбумины, %	38,52±1,98	42,35±1,26	40,65±1,20	40,36±1,45	38,93±1,28	
Глобулины	α	22,27±1,72	23,48±0,97	22,96±1,63	22,87±1,23	21,78±2,14
	β	21,89±1,58	17,03±0,99	18,36±0,53	18,54±0,87	18,52±0,69
	γ	17,25±2,36	16,89±1,98	17,54±0,47	17,51±0,63	13,98±0,98
Диеновые конъюгаты, у.е./мг белка	0,045±0,003	0,038±0,003	0,048±0,002	0,054±0,003*	0,056±0,002*	
Гидроперекиси липидов, у.е./мг белка	0,084±0,003	0,079±0,002	0,081±0,003	0,092±0,002	0,095±0,004*	
Малоновый диальдегид, у.е./мг белка	0,501±0,003	0,549±0,003	0,521±0,003	0,501±0,002	0,604±0,002	

Примечание: * - $P < 0,05$;

Рисунок 7 - Результаты применения препаратов «Кейзайм» и «Бровасептол концентрат™» для лечения карпов от аэромоноза (https://www.elibrary.ru/download/elibrary_26322439_63428933.pdf)

Известен препарат для лечения аэромоноза рыб – «Фосфопаг» (см., например, RU 2327464 C1, 27.06.2008), который позволяет экономически доступно излечивать аэромоноз у рыб в течение 3-4 суток, сократив отход рыб до 2-3% от числа заболевших. Но препарат имеет сложную схему применения - лечение состоит из внутрибрюшинной инъекции 20,0 мл на 1 кг 0,005% «Фосфопага» с последующим двоекратным помещением рыб

в ванны с 0,005% раствором «Фосфопага» на 15 часов с интервалом 2 суток, что делает использование препарата в условиях рыбоводств проблематичным [136].

Известно оздоровление карпов от аэромоноза с помощью лечебного корма «карповит», который назначают соответственно возрасту рыб (А.с. СССР, №1510804, кл. А01К 61/00, 1987 г.). Для приготовления кормового препарата подбирают ингредиенты корма соответственно возрасту рыб. Перед подачей в гранулятор в состав ингредиентов вводят смесь биошрота-20 и витамицина-2 в соотношении 2:1, при этом с лечебной целью смесь вводят в количестве 48 кг на 1 т рецептурных ингредиентов, а с профилактической целью - в количестве 32 кг на 1 т. Полученный корм под названием «Карповит» задают рыбам по назначению [137].

Биошрот-20 - препарат, содержащий биологически активные вещества (хлортетрациклин и тетрациклин) с витамином В₁₂ - сыпучий порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета, нерастворимый в воде. Биологически активные вещества препарата - хлортетрациклин и тетрациклин. В составе препарата имеется эпихлортетрациклин, витамин В и клетчатка. Биошрот-20 совместно с витамином-1 в соотношении 2:1 обладает целевым антимикробным действием (уничтожает и элиминирует патоген из организма рыб) и, кроме того, повышает резистентность рыб, активируя различные физиологические системы организма, улучшая белковый и витаминный обмен. Введение в состав ингредиентов корма смеси биошрота-20 с витамином-1 обеспечивает бактерицидную концентрацию тетрациклинов в крови и тканях рыб. Для предупреждения заболевания аэромоноза у рыб достаточно применить 32 кг смеси на 1 т корма ежедневно в течение 6 дней в весенне-летний период. Использование кормового препарата обеспечивает бактериостатическую концентрацию тетрациклинов в крови и тканях рыб [138].

Также известно оздоровление рыб от аэромоноза за счет скармливания корма с фуразолидоном из расчета 4,5-5 г на 10 кг корма в течение 10 дней с перерывом между пятидневками - 2 дня и обработки вод органическим красителем (см. Инструкция по борьбе с болезнями рыб в прудовых хозяйствах Северного Кавказа, утвержденная ГУВ МСХ СССР 05.07.1976 г. - прототип) [цит., по 136].

Задачей изобретения, описанного в патенте RU 2 808 519 C1, (28.11.2023), является расширение ассортимента средств, которые бы эффективно боролись с болезнями рыб различной этиологии. В качестве средства для лечения болезней рыб различной этиологии применяют лекарственный препарат АСД-2Ф - Антисептик - стимулятор Дорогова фракция 2 (АСД-2Ф) - продукт сухой термической возгонки сырья животного происхождения, который содержит комплекс биологически активных веществ, в том числе низкомолекулярные органические соединения, включая низшие карбоновые кислоты, их амиды и аммонийные соли, холиновые эфиры карбоновых кислот, холин, первичные и вторичные амины, пептиды, соли аммония углекислого, аммония уксуснокислого и воду. Исследование эффективности препарата АСД-2Ф при аэромонозе карпов проводили на 40 сеголетка карпа средней массой 28 г, из которых были сформированы опытная и контрольная группы по 20 рыб, размещенные в отдельных аквариумах с объемом воды по 120 л (температура воды 19-21°C, количество кислорода - 6,8-9 мг/л). В первый день опыта карпов обеих групп внутрибрюшинно заразили бактериальной вирулентной культурой возбудителя аэромоноза. *Aeromonas sp.* На 3 день эксперимента у рыб в обеих группах наблюдалось покраснение брюшной стенки вокруг места введения бактериальной культуры и небольшое вздутие брюшка. В этот же день опытной группе рыб начали скармливать кормо-лекарственную смесь, содержащую препарат АСД-2Ф в дозе 0,1 мл/кг массы тела рыбы. Для приготовления кормо-лекарственной предварительно смешивали АСД-2Ф

с водой в соотношении 1:2. Полученный раствор наносили на экструдированный корм для карпов и тщательно перемешивали до равномерного смачивания гранул раствором. Смесь корма с раствором препарата подсушивали при комнатной температуре в течение 15-20 минут, периодически помешивая, после чего скармливали карпам опытной группы в количестве 1% от массы рыб в утреннее кормление. Вечером рыб опытной группы докармливали кормом без препарата в том же количестве. Кормо-лекарственную смесь скармливали рыбам в течение 7 дней. Рыб контрольной группы на протяжении всего опыта кормили также два раза в день тем же экструдированным кормом, но без добавления препарата, в количестве 1% от массы рыб. Полученные результаты показали, что клинические признаки, а именно асцит и воспаление в области введения бактериальной культуры, у рыб в опытной группе развивались значительно медленнее и были менее выраженными, чем у рыб в контрольной группе. У рыб в контрольной группе на пятый день после заражения клинические признаки аэромоноза, а именно асцит и воспаление в области введения бактериальной культуры, стали ярко выраженными. Кроме того, зафиксирована гибель 3-х рыб. В последующие три дня в контрольной группе погибло еще 12 рыб с признаками острого аэромоноза. В опытной группе через 5-6 суток после заражения была отмечена гибель только 3-х рыб. У выживших карпов к 8-му дню после заражения покраснения стали слабо выражены, признаков асцита не наблюдалось. Начиная с 9 дня после введения культуры бактерий, гибель рыб более не фиксировалась ни в одной из групп, а у оставшихся карпов наблюдались покраснения и небольшие язвы на стадии заживления. Общее количество погибших рыб во время проведения эксперимента составило 3 экземпляра карпа в опытной группе и 15 - в контрольной. Таким образом, авторы изобретения утверждают, обработка рыб препаратом АСД-2Ф при обнаружении у них первых

признаков заражения аэромонозом, позволяет эффективно бороться с данной болезнью и снизить гибель рыб с 75% до 15% [139].

Авторы патента RU 2 309 586 C1 (30.03.2006) предлагают способ оздоровления карпов в рыбоводных хозяйствах на сбросных каналах электростанций, зараженных ассоциативными возбудителями аэромоноза и сапролегниоза, включающий скармливание корма с фуразолидоном из расчета 4,5-5 г на 10 кг корма в течение 10 дней с перерывом между пятидневками 2 дня, обработку вод органическим красителем, отличающийся тем, что одновременно с кормлением в проточную воду со скоростью 0,2 м/с добавляют трехкратно с интервалом 5 дней органический краситель, в качестве которого используют малахитовый зеленый из расчета 0,1-0,2 г/м³. Новизна исследования заключается в том, что за счет комплексного воздействия фуразолидона с кормом и органического красителя - малахитового зеленого расширяется спектр действия, а именно обеспечивается возможность лечения ассоциативного заболевания - аэромоноза и сапролегниоза [137].

В заявке на изобретение 2006123128/13, 30.06.2006 - препарат для лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии и способ лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии, предлагается метод лечения преимущественно аэромоноза и псевдомоноза карпов. Основные действующие вещества - йодистые препараты - йод металлический и калий йодистый, пролонгатор и растворитель – вода. В качестве пролонгатора брали 1,2-пропиленгликоль и дополнительно вводили витамины групп А, Е, В и минеральные вещества, янтарную кислоту, глюкозу, при этом компоненты, входящие в состав препарата, брали в следующем соотношении, г/100 мл:

- йод металлический, хч	0,112-0,187
- калий йодистый, хч	0,337-0,562
- витамин Е (альфа-токоферола ацетат)	0,060-0,100
- витамин А (ретинола-ацетат)	3,750-6,250 тыс. МЕ

- витамин В1 (тиамина гидрохлорид)	0,052-0,087
- витамин В2 (рибофлавин)	0,037-0,062
- витамин В6 (пиридоксина гидрохлорид)	0,034-0,056
- витамин В12(цианокобаламин)	0,026-0,044
- железо (карбонат), хч	0,337-0,562
- магний (фосфат), хч	0,337-0,562
- марганец (сульфат), хч	0,172-0,287
- медь (сульфат), хч	0,090-0,150
- цинк (сульфат), хч	0,315-0,525
- кобальт (хлорид), хч	0,071-0,119
- натрий (хлорид), хч	0,589-0,981
- янтарная кислота, осч	0,225-0,375
- глюкоза, чда	0,172-0,287
- спирт этиловый, ректификат (96°)	0,300-0,500
- 1,2-Пропиленгликоль	0,900-1,500
- вода дистиллированная	остальное

Способ лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии - препарат задают с кормом в дозах 1,00-1,50 мг на 1 кг массы рыбы, один раз в день, в течение 5-7 сут [140].

В заявке на изобретение 2007102836/12, 26.01.2007 описан способ дезинфекции водной среды от возбудителя аэромоназа карповых рыб, который включает воздействие на водную среду действующего агента, при этом на водную среду воздействуют ультразвуком удельной мощностью 25-30 Вт/л с частотой колебания 20-24 кГц в течение 20-35 минут. Обеспечивается эффективное обеззараживание воды [141].

Дегтярик С.М. с коллегами (2022) изучали влияние растительных экстрактов на возбудителей аэромоназов и псевдомоназов рыб. Отмечено, что даже при однократном введении растительных настоек признаки инфекционного заболевания развивались медленней, чем в контроле, гибель рыб отмечена в 10- 30 % случаев. У рыб, которые не погибли в начале

эксперимента, признаки заболевания исчезали в течение 7-11 суток. В то же время 3-х и 5- кратное введение в организм зараженной рыбы экстрактов растений, показавших ярко выраженные фитонцидные свойства в серии предыдущих опытов *in vitro*, подавляет развитие инфекционного процесса. Антагонистическая активность растительных экстрактов по отношению к аэромонадам, развивающимся в организме карпа, уменьшается пропорционально уменьшению их концентрации. При введении рыбе экстрактов 20%-ой и 10%-ой концентрации отмечалось либо полное исчезновение клинических признаков аэромоноза, поведение подопытной рыбы нормализовалось (сфагнум), либо выраженность признаков резко ослабевала (пижма, барбарис). В более низких концентрациях (5 - 1,25%) настой пижмы не оказывал заметного воздействия на состояние подопытной рыбы и, следовательно, на бактерии рода *Aeromonas*. При введении рыбе отвара плодов барбариса в концентрации 5% наблюдалось некоторое снижение выраженности клинических признаков аэромоноза, однако рыба была вялая, корм не брала. В более низких концентрациях (2,5 – 1,25%) отвар плодов барбариса не оказывал заметного воздействия на состояние подопытной рыбы. Наиболее ярко выраженным антибактериальным действием обладал настой сфагнума: при его введении в концентрациях 5 и 2,5% отмечена слабая выраженность клинических признаков, рыба хоть и неохотно, но брала корм. Наиболее выраженными бактерицидными и бактериостатическими свойствами по отношению к возбудителям бактериальных инфекций рыб обладали сфагнум болотный (зоны задержки роста бактериальной культуры составили 19-33 мм), лук обыкновенный (22-30 мм), пижма обыкновенная (15- 30 мм), чистотел большой (16-28 мм), барбарис обыкновенный (24-25 мм), чеснок обыкновенный (19-25 мм). Растительные экстракты влияют на вирулентность бактерий рода *Aeromonas*, введенных в организм рыб. При однократном введении *per os* рыбам, зараженным бактериями рода *Aeromonas*, растительных настоек признаки инфекционного заболевания развивались у рыб медленней, чем в контроле,

гибель составила 10-30 %. При трехкратном введении указанные признаки либо не развивались, либо были слабо выражены, гибели рыбы при этом не наблюдалось. При пятикратном введении клинические признаки инфекции исчезли спустя 2-6 суток, гибели рыбы отмечено не было [142].

1.9 Аэромонадные вакцины

Методом борьбы с болезнями рыб бактериальной этиологии может стать иммунопрофилактика. В мировой практике накоплен значительней опыт по повышению антибактериальной резистентности рыб, сохранению поголовья и поддержанию высоких темпов роста при помощи вакцинации [143]. Несмотря на важность и успех вакцинации, мало известно о механизмах биохимических реакций в тканях иммунизированных рыб [144]. Активные формы кислорода (АФК) выполняют важную роль в жизнедеятельности, однако при интенсификации их образования происходит усиление процессов окислительного стресса, что сопровождается нарушениями в свойствах биомембран, функционирования клеточного метаболизма и приводит к гибели клеток [145]. Защита от разрушающего действия свободных радикалов осуществляется неферментативным и ферментативным звеньями антиоксидантной системы (АОС), важное место в которой отводится глутатионредуктазной-глутатионпероксидазной системе. Целью исследования Г.М. Ткаченко, И. Грудневской (2011) была оценка последствия использования вакцины против *Aeromonas* spp. на активность ферментов глутатионового звена антиоксидантной системы (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза) в мышечной, жаберной и мозговой тканях радужной форели (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). В экспериментах радужная форель была разделена на две группы (контрольную и вакцинированную). Рыбу иммунизировали вакциной против аэромоназа, состоящей из инактивированных штаммов *Aeromonas salmonicida* и *A. hydrophila* в концентрации 1×10^{10} КОЕ/мл. АОС определяли с помощью глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО). Как

показали результаты исследований, иммунизация рыб вакциной против аэромоноза существенно влияет на активность ГР и ГПО (рис. 8).

В результате исследований Г.М. Ткаченко и И. Грудневской (2011) была проанализирована активность ферментов глутатионового звена АОС (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза) в мышечной, жаберной и мозговой тканях радужной форели, вакцинированной против аэромоноза. Исследователями было установлено, что иммунизация рыбы вакциной против *Aeromonas* spp. существенно уменьшает активность глутатионового звена АОС в мышечной и жаберной тканях, не влияя на активность ГР и ГПО в мозговой ткани. Проведенное исследование позволяет заключить, что влияние иммунизации рыб вакциной против аэромоноза проявляется в виде существенных изменений в активности ферментов, ответственных за S-тиоляцию/детиоляцию активных центров протеинов, защищая их от необратимой окислительной модификации и инактивации, что способствует поддержанию функциональной активности клеток [146].

Достижения последних лет включают производство цельноклеточных инактивированных моновалентных и поливалентных вакцин, живые аттенуированные бактерии и рекомбинантные вакцины. Цельноклеточные инактивированные моновалентные вакцины. В первые годы культивирования тилапии широко использовались традиционные инактивированные бактериальные вакцины для защиты от *A. hydrophila*. Цельноклеточная формалинкиллированная вакцина против *A. hydrophila* была впервые успешно использована на тилапии в 1986 году, и относительный уровень защиты этой вакцины составил 100% в течение 2 недель после вакцинации. В некоторых исследованиях цельноклеточные инактивированные моновалентные вакцины были разработаны путем смешивания различных типов иммуностимуляторов. Установлено, что добавление куркумы в корм (концентрация: 3–5 мг/г) и объединение ее с убитой цельноклеточной вакциной *A. hydrophila* (концентрация: 5 мг/г) обеспечивает 100% защиту после заражения [147-148].

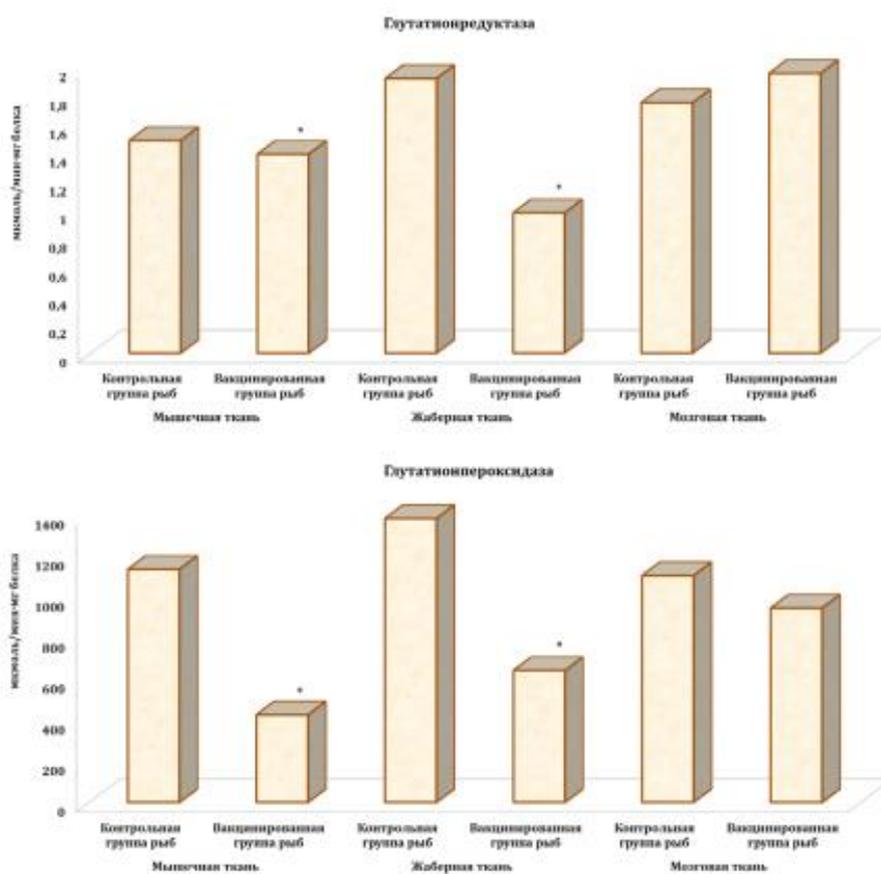


Рисунок 8 - Влияние иммунизации анти-*Aeromonas* вакциной на активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в мышечной, жаберной и мозговой тканях радужной форели.

* изменения статистически достоверные ($P < 0,05$) между показателями, полученными в контрольной и вакцинированной группах рыб [146]
Л.Н. Юхименко и Л.П. Смирновым в 1993 году была запатентована

«Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб», в состав которой входит антиген, характеризующийся следующими признаками: выделен из штамма бактерий *Aeromonas sobria* ВГНКИ, КРК 1-1983-ДЕП, цитоплазматические белки, мол. мас. 50 - 70 кДа (при определении методом электрофореза в полиакриламидном геле), изоэлектрическая точка 4,6 - 5,3 (при определении методом изоэлектрофокусирования при ионной силе 0,3 и носителе типа амфолит), максимумом поглощения в УФ-спектре (в метаноле) при длине волны 206 - 207 нм, титр 1:600 в реакции преципитации. Полученная вакцина эффективна

против различных форм заболеваний, вызываемых бактериальными агентами (аэромонадами, энтеробактериями), обладает высоким протективным действием, универсальностью и экологической чистотой. Производственные испытания проводили в Молдаве зоне наиболее неблагоприятной по аэромонаду и сложной в экологическом отношении (рис. 9). Годовикам карпа породной группы фресинет чешуйчатый и рамчатый весной внутрибрюшинно была введена вакцина 50 мкг/рыбу в 0,4 мл изотонического раствора хлорида натрия. Проинъецированная рыба без травм и признаков инфекционных заболеваний. Параллельно с инъекцированием проведен отбор контрольной рыбы для бактериологических исследований. От 7 из 10 карпов выделены различные микроорганизмы 2-3-х типов, в том числе аэромонады из печени и селезенки. По характеру ДНК-активности выделены аэромонады характеризовались как слабовирулентные - 3 культуры (с зоной деполимеризации ДНК 1-2 мм) и высоковирулентные - 8 штаммов (с зоной деполяризации ДНК 4-6 мм), 2 штамма - с ДНК-активностью (1-2 мм). Штаммы были идентифицированы как *A. punctate subsp. punctate* - 1 культура бактерий, 9 - как *A. hydrophila subsp. hydrophila*.

В том же хозяйстве весной 1991 г. проведена иммунизация годовиков карпа породной группы фресинет чешуйчатый и рамчатый и КВП (куболтский второго поколения) во время начавшейся вспышки аэромоназа (около 50% рыб было с язвами) (рис. 10). Для облегчения последующего учета для вакцинации рыбу отбирали без клинических признаков. При контрольном бактериологическом исследовании воды и рыбы с клиническими признаками без таковых обнаружены аэромонады, обладающие высокой вирулентностью. В воде - 1400 КОЕ/мл воды, от рыб с клиническими признаками из паренхиматозных органов аэромонады выделялись практически в чистом виде, от рыб без клинических признаков выделялись аэромонады и другие сапрофитные микроорганизмы. При бактериологическом исследовании печени в июле аэромонады у иммунизированных рыб не были обнаружены. В то же время у

иммунизированных выделено сапрофитов 5 КОЕ/2 мг печени, у неиммунизированных - 14 КОЕ/2 мг печени. В сентябре пруд был полностью спущен, вся рыба обловлена и просмотрена. При клиническом осмотре учитывали наличие рубцов, что свидетельствовало о перенесенном заболевании, и язв [149].

Группа рыб	Подгруппа	Годовики			Ремонт		
		К-во рыб	С клинич. призн-ми /в %%/	Без клин. призн-ов /в %%/	К-во рыб	С клинич. призн-ми /в %%/	Без клинич. признаков /в %%/
Фресинет чешуйчатый	К	125	68,7 / 2,1	39,2	100	77,7 / 2,3	20,0
	О	125	19,2 / 0	80,0	100	22,0 / 0	78,0
Фресинет рамчатый	К	125	66,6 / 1,5	31,9	100	59,7 / 9,6	30,7
	О	125	15,1 / 0	84,9	100	3,7 / 0	96,7

Примечание: в числителе - % рыб с рубцами, в знаменателе - с язвами.
К - контроль, О - опыт.

Рисунок 9 – Результаты вакцинации годовиков и карпов ремонтно-маточной группы весной 1991 г (Молдова) [149]

Гусева Н.В. (1998) изучала иммунный ответ рыб - объектов аквакультуры на вакцинацию против бактериальных заболеваний. Она установила, что в процессе выращивания карпа и лососевых рыб, являющихся основными объектами аквакультуры, наиболее массовые потери вызываются заболеваниями бактериальной этиологии и (аэромоназ, вибриоз, фурункулез и др.), что требует внедрения более эффективных, а главное экологически чистых методов профилактики, одним из которых является использование вакцин и иммуностимулирующих препаратов. По ее мнению, вакцина ВЮС-2 является сильнейшим активатором неспецифического гуморального и клеточного иммунитета различных видов рыб, что проявляется в активации антителообразования, лизоцима, бактерицидной активности слизи и сыворотки, адгезии бактериальных патогенов к

эпидермальной слизи, миграции макрофагов в конечный отдел кишечника рыб, фагоцитоза, выработки лейкоцитов, в том числе нейтрофилов и моноцитов, а также в гиперплазии и гипертрофии слизистых клеток эпидермиса. Исследователь определила, что пик выработки антител, специфичных к ВЮС-2, у карпа различных возрастных групп (годовики, двухгодовики, трехгодовики) при оптимальной температуре содержания наступает через 6 недель после вакцинации. В возрастном аспекте наибольшая продукция антител отмечается у двухгодовиков, а наименьшая - у трех-годовиков. В производственных условиях специфические к вакцине антитела регистрируются в сыворотке вакцинированных карпов в течение 17 месяцев. Вакцина ВЮС-2 не стимулирует продукцию антител к *Aeromonas salmonicida* у кумжи (*Salmo trutta*), а также не активизирует факторы клеточного и гуморального иммунитета карпа (*Cyprinus carpio*) против данного патогена. Протективные свойства ВЮС -2 проявляются в случае инфекционных заболеваний смешанной этиологии, вызванных представителями бактериальных семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae* [150].

Aly et al. (2015) разработали инактивированную моновалентную вакцину *A. hydrophila*. Кроме того, Aly et al. (2016) заметили, что комбинация иммуностимуляторов (например, чеснока и эхинацеи), пробиотиков и вакцины *A. hydrophila* способна развивать иммунный ответ, что повышает устойчивость сеголетков тилапии к инфекции в зимний сезон [151-152].

Была разработана инактивированная формалином цельноклеточная бактериальная вакцина *A. hydrophila*, которая также показала высокую защиту (RPS = 92%) для тилапии (масса тела = 110 ± 10 г) путем инъекционной иммунизации [153].

Также была изготовлена инактивированная вакцина *A. hydrophila*, продуцирующая значительный уровень антител у взрослых особей, икры и мальков [154].

Группа рыб	Под-группа рыб	К-во рыб	Средняя навеска /в г/		С клинич. признаками /в%%/	Без клинич. признаков /в %%/
			при посадке	при облове		
Фре-синет чешуйчатый	К	50	60	573	70,3	29,7
	О	50		614	11,8	88,2
Фре-синет рамчатый	К	100	100	545	51,7	48,3
	О	100		590	13,6	86,4
КВП	К	100	95	686	62,2	37,8
	О	100		851	14,6	85,4

Рисунок 10 – Результаты вакцинации годовиков карпа весной 1991 г. (Молдова) [149]

Судя по приведенной выше информации, цельноклеточные моновалентные инактивированные вакцины могут обеспечить значительную защиту от *A. hydrophila* при заражении гомологичным вирулентным бактериальным штаммом. Для снижения смертности, вызываемой гомологичными инфекциями *A. hydrophila*, использование цельноклеточной убитой вакцины является разумным и недорогим выбором при применении в промышленных масштабах. Однако ученым необходимо будет отслеживать вариации серотипов преобладающих в эпидемии штаммов *A. hydrophila*, чтобы обеспечить непрерывную вакцинальную защиту.

Смертность рыбы в системах аквакультуры, вероятно, вызвана не только одним подвижным видом аэромонад (т.е. *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. sobria* или *A. jandaei*), но может быть вызвана различными бактериальными коинфекциями. Сообщается, что заболеваемость и смертность тилапии вызваны коинфекцией *A. hydrophila* и *S. agalactiae*; *A. veronii* и *Flavobacterium columnare*; *A. hydrophila*, *A. veronii* и *Streptococcus agalactiae* [155-156].

Было обнаружено, что цельноклеточная инактивированная поливалентная вакцина защищает рыбу от инфекции, вызванной *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* и *Pseudomonas fluorescens* [157].

Silva et al. (2009) разработали мультивалентную бактериальную вакцину против *A. hydrophila*, *Enterococcus durans* и *P. aeruginosa*. Эффективность двухвалентной или мультивалентной вакцины обычно контролируется оптимальной концентрацией отдельных антигенов, перекрестной защитой и конкуренцией между различными антигенами. Согласно другим данным, вакцинированная рыба продемонстрировала более высокий иммунный ответ после иммунизации поливалентными вакцинами, чем гомологичными моновалентными вакцинами. Это может быть связано с более высокой иммуногенностью, чем при использовании двух или трех отдельных экспрессируемых белков, из-за большей молекулярной массы экспрессируемого слитого белка [158].

Кроме того, моновалентная или поливалентная вакцинация против MAS может быть проблематичной в отдельных случаях, поскольку возбудитель *A. hydrophila* экспрессирует несколько типов серотипов, и если в разработанной вакцине не будет содержаться конкретный капсульный серотип, он не будет в достаточной степени способен защитить рыба от аэромоноза [159].

Живые бактериальные вакцины

В 2009 году была разработана живая аттенуированная двухвалентная вакцина против *A. hydrophila* и *P. putida* (масса тела 250 г); исследование заражения, проведенное с использованием этой вакцины, показало, что титры антител значительно различались у иммунизированных и неиммунизированных рыб [160].

Pridgeon и Klesius (2011) создали живую вакцину против различных вирулентных изолятов *A. hydrophila*, которая обеспечивала 100% защиту от патогенов через 14, 28 и 56 дней после вакцинации [161].

Рекомбинантные вакцины

Рекомбинантные бактериальные вакцины являются результатом достижений биотехнологии и разрабатываются путем отбора только иммуногенного компонента бактерий и его экспрессии в гетерологичном хозяине. Фактически, цельноклеточная вакцина *A. hydrophila* в основном эффективна против гомологичного серотипа, но неэффективна против гетерологичных серотипов. Поэтому исследователи разрабатывают рекомбинантные рыбные вакцины, чтобы решить проблему специфичности серотипа [162].

Исследователи заметили, что поверхностные белки Omp38 и OmpF *A. hydrophila* экспрессируются как эффективные кандидаты на вакцины против *A. hydrophila*. Фактически, многие антигенные белки были успешно обнаружены в качестве кандидатов на рекомбинантную вакцину *A. hydrophila*, но было разработано лишь несколько рекомбинантных вакцин *A. hydrophila* [163].

Была разработана вакцина на основе белка S-слоя против *A. hydrophila*, которая продемонстрировала высокую защиту у рыб, иммунизированных ею. В 2009 г. была создана живая рекомбинантная вакцина [164].

В 2013 году вакцина, разработанная на основе липополисахарида (ЛПС) *A. hydrophila*, обеспечивала самый высокий уровень защиты (RPS = 58%) при погружении рыбы на 120 секунд по сравнению с другими продолжительностями погружения. Существует несколько антигенных белков *A. hydrophila*, которые были идентифицированы как кандидаты на рекомбинантные вакцины. Некоторые исследования напрямую касались защитной эффективности этих мишеней у тилапии по сравнению с эффективностью традиционных убитых вакцин.

Исследования показали, что для разработки рекомбинантных вакцин для рекомбинантных белков Sip, PI и PGK необходимы определенные адьюванты, а для обеспечения лучшей защиты рыбы необходима повторная иммунизация. Хотя исследователи пытаются разработать рекомбинантные

вакцины, эти вакцины по-прежнему обеспечивают меньшую защиту, чем цельноклеточные вакцины в тех же условиях [165].

1.10 Бактериофаги *Aeromonas* и их практическое применение

Представители рода *Aeromonas* - грамотрицательные бактерии, широко распространенные в различных средах, включая воду, пищу и почву. Они являются возбудителями заболеваний рыб, а некоторые из них связаны с инфекционными заболеваниями человека [166-167]. Например, *Aeromonas hydrophila* может вызывать серьезные инфекции у человека, такие как бактериемия, пневмония, эндокардит, эмпиема, артрит, перитонит, инфекции кожи и мягких тканей и болезни рыб, включая краснуху и язвенные инфекции, которые несут огромные экономические потери в аквакультурной отрасли. О случаях выделения *A. hydrophila* с множественной устойчивостью к антибиотикам сообщалось в Корее и США, некоторые из этих штаммов привели к огромным экономическим потерям в отрасли аквакультуры. Однако сообщалось, что цефалоспорины и фторхинолоны третьего и четвертого поколений были эффективны против большинства инфекций, вызываемых представителями *Aeromonas*. Растущая проблема устойчивости к антибиотикам также вызывает беспокойство при лечении инфекций *Aeromonas*. Фаготерапия рассматривается как дополнительная или альтернативная терапия для лечения бактериальных инфекций помимо антибиотиков. Однако считается, что бактериофаги специфически инфицируют виды бактерий-хозяев, поэтому фаговые коктейли обычно используются в терапевтических целях для расширения спектра хозяев и преодоления устойчивых к фагам бактерий-хозяев [168].

На 1 апреля 2019 года в GenBank была доступна 51 полная последовательность генома фагов *Aeromonas*, 19 из которых принадлежит фагам *Aeromonas hydrophila*, 25 - *Aeromonas salmonicida* и 7 - другим видам *Aeromonas*. Таксономически большинство фагов *Aeromonas* представляют собой фаги с двухцепочечной ДНК, принадлежащие к семействам *Myoviridae*

(33/51), *Podoviridae* (7/51) и *Siphoviridae* (5/51), а также один вирус оцДНК и пять неклассифицированных бактериофагов. Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), фаги *Aeromonas* семейства *Myoviridae* далее подразделяются на род *Secunda 5 virus* (Aes012, Aes508, phiAS4, фаг 31 и фаг 25), подсемейство *Tevenvirinae* (Aeh1, Ah1 и AS-zj), а также род *Biquartavirus* (фаг 44RR2.8t), а также некоторые неклассифицированные миовирусы. Фаги семейства *Siphoviridae* классифицируются как род *T5virus* (AhSzw-1, AhSzq-1), род *Pis4avirus* (pIS4-A) или род *Hk97virus* (AsXd-1). Фаги семейства *Podoviridae* далее классифицируются как подсемейство *Autographivirinae* (AS7, 25AhydR2PP и CF7) или как неклассифицированные *подовирусы* (Ah1, vB_AsoP_Ca, ZPAH7B, ZPAH7).

В нескольких исследованиях были проанализированы фенотипические и генотипические характеристики и оценена эффективность фагов против *A. hydrophila*, включая фаги pAh1-C и pAh6-C, Axp1, пАч-1, Ф2, AP1, AP2, AP3 и AP4, CT45P и TG25P, MJG, AHP-1, Ax-2, PVN-02, AhyVDH1 и pAh6.2T. Анализ литературных данных свидетельствует, что фаги можно использовать для биоконтроля инфекций, вызываемой *A. hydrophila* у вьюна (*M. anguillicaudatus*), нильской тилапии (*O. niloticus*), полосатого сома (*P. hypenthalmus*) и радужной форели (*O. mykiss*) [169-172].

Первое применение фагов для борьбы с *A. hydrophila* произошло в 1981 г. Более трех десятилетий спустя было показано, что однократное введение простых суспензий фагов pAh1-C или pAh6-C увеличивает выживаемость против инфекции *A. hydrophila*. Однако фаг pAh6-C контролировал инфекцию *A. hydrophila* более эффективно, чем фаг pAh1-C [173].

Были продемонстрированы защитные эффекты с увеличением выживаемости (0–43%) и среднего времени до смерти у *M. anguillicaudatus*, инфицированных *A. hydrophila* [10^7 (КОЕ)/мл] и получавших лечение фагом Ax-2 [10^8 (БОЕ)/мл] [174].

О защитном действии фагов *Aeromonas* в борьбе с *A. hydrophila* у нильской тилапии (*O. niloticus*) сообщалось исследователями, которые применили смесь двух фагов путем погружения и снизили уровень смертности с 68% до 18% после 15-дневного лечения. В другом исследовании показан многообещающий эффект фага AP2 для лечения подвижной сепсиса *Aeromonas*, индуцированного *A. hydrophila* у нильской тилапии [174].

Авторы исследовали фаги на предмет их способности предотвращать и лечить бактериальные заболевания у сома (*P. hypophthalmus*). Изучалась способность фагов Ф2 и Ф5 инактивировать и контролировать *A. hydrophila* у полосатого сома путем инъекции. Наблюдаемая кумулятивная смертность рыб снижалась с увеличением MOI (кумулятивная смертность 0%, 45% и 68% при MOI 100, 1 и 0,01) [175].

Авторы продемонстрировали, что относительный процент выживаемости сомов с *A. hydrophila* составлял 75,6–87,8% при кормлении кормом, распыленным фагом PVN02 [176].

Экспериментально вводили фаг MJG путем инъекции, погружения и перорального введения для контроля *A. hydrophila* у радужной форели и достигли относительной выживаемости в процентах 100%, 66,7% и 50% соответственно [177].

Кроме того, показано, что обработка фагом pAh6.2TG значительно улучшала выживаемость нильской тилапии, подвергшейся воздействию смертельных доз *A. hydrophila* (10^7 КОЕ/мл), с относительным процентом выживаемости 73,3% и 50% при MOI 1,0 и 0,1. соответственно [178-179].

1.11 Пробиотические и иные препараты, эффективные при аэромонозе карпа

Потребности в экологически чистой аквакультуре, ингибировании патогенных бактерий, в повышении иммунного ответа, в снижении кормозатрат и потерь при выращивании, создают преимущество для

применения пробиотиков. В настоящее время находят применение пробиотические препараты на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*. Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработкам на их основе препаратов, отнесенных к поколению так называемых «самоэлиминирующихся антагонистов». Несмотря на то, что бациллы не являются представителями облигатной микрофлоры организма, они частично выполняют функции сходные с препаратами из нормальной флоры и обладают явным антагонизмом к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам [180].

На основании полученных Морозовой М.А. с соавтр. (2018) данных, была установлена высокая чувствительность к ципрофлоксацину и левомицетину (в 100 % случаев) 5 видов аэромонад: *Aeromonas hydrophila*, *A. jandaei*, *A. ichthiosmia*, *A. media*, *A. caviae* [181].

Детальная идентификация их в структуре рода позволила выделить *Aeromonas veronii* как превалирующий вид среди остальных. При этом у штаммов *A. veronii* наблюдалась 100 % чувствительность к ципрофлоксацину и 6,8 % (8/117) случаев резистентность к левомицетину [181]. При лечении бактериальных заболеваний рыб показана высокая эффективность гентамицина, левомицетина и ципрофлоксацина [182-185].

В исследованиях Морозовой М.А. с соавтр. (2018) практически все штаммы были чувствительны к гентамицину. Исключение составили *Aeromonas veronii* (6/117) и *Aeromonas caviae* (3/6). Необходимо отметить, что в медицинской практике этот препарат является «резервным» и назначение его без строгих показаний может привести в дальнейшем к безуспешной элиминации возбудителя. Его назначают только при тяжелом течении инфекционного заболевания, вызванного, в частности, смешанной микрофлорой, до определения антибиотикограммы возбудителей [185]. «Традиционными» препаратами, которые использовались в отечественном рыбоводстве был фуразолидон и тетрациклин [184]. На долю резистентных штаммов *A. veronii* приходилось 12 % (14/117) к тетрациклину и 23,1 %

(27/117) - к фуразолидону. Количество нечувствительных к фуразолидону выявлено среди *A. hydrophila* (4/10), *A. jandaei* (3/8), *A. caviae* (3/6). Предполагается, что основным фактором устойчивости аэромонад к этому препарату является многолетнее его применение рыбоводными хозяйствами не только для лечения бактериальных заболеваний, но и в профилактических целях.

В ходе проведенного микробиологического исследования Морозовой М.А. с соавтр. (2018) было определено антагонистическое действие пробиотических препаратов в отношении 56 штаммов аэромонад (рис. 11).

Виды аэромонад	Кол-во тест-штаммов аэромонад	Подавление пробиотиком тест-штаммов аэромонад	
		<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> («Субтилис С»)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B-1895 (пробиотическая добавка)
<i>Aeromonas veronii</i>	30	24*	24*
<i>A. hydrophila</i>	7	5	7
<i>A. jandaei</i>	6	3	6
<i>A. ichthiosmia</i>	4	4	4
<i>A. caviae</i>	6	4	4
<i>A. media</i>	3	1	2
Примечание: * количество штаммов аэромонад, чувствительных к пробиотику.			

Рисунок 11 – Антагонизм пробиотиков в отношении представителей рода *Aeromonas* [181]

Оба препарата продемонстрировали антагонистическую активность и по уровню ее убывания распределены нами в следующем порядке: добавка на основе *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895, «Субтилис С» (ассоциация *B. subtilis* и *B. licheniformis*). Как видно из представленных данных в 100 % случаев установлена чувствительность 3 видов аэромонад (*A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. ichthiosmia*) к воздействию *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 и *A. ichthiosmia* - к бактериальной ассоциации «Субтилис С» (рис. 12) [181].

При этом антагонистическая активность пробиотических бактерий не выявлена в отношении тест-штаммов *Aeromonas veronii* - 20 % (24/30), *A.*

caviae (4/6) и *A. media*. Проведенное исследование в связи с небольшим числом штаммов аэромонад пока не дает право делать какие-либо общие выводы. Однако полученные данные представляют интерес как с научной, так и с практической точки зрения. Ведь чувствительность представителей рода *Aeromonas* к пробиотикам и антибиотикам является важным аспектом в эффективности этих препаратов [181].



Рисунок 12 - Антагонизм штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 (1) и ассоциации *B. subtilis* и *B. licheniformis* (2) по отношению к *Aeromonas jandaei* [181]

Гаврилин К.В. (2004) в своей работе «Методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) карпа (*Cyprinus carpio*)» описал эффективность применения в прудовом рыбоводстве новых высокоэффективных при борьбе с бактериальной геморрагической септицемией препаратов - пробиотика субалина и бактерина из *A. sobria* 77-18, применение которых позволит избегать потерь, связанных с данным заболеванием, культивируемых гидробионтов за счет повышения способности организма рыб противостоять бактериальному прессингу из окружающей водной среды. Оба препарата являются альтернативой химиотерапевтическим мероприятиям. Их

применение позволит избегать загрязнения окружающей среды и получать высококачественную, экологически чистую и конкурентоспособную пищевую продукцию [186].

Препарат «СУБ-ПРО» (ООО «ВекторЕвро»)- высокоэффективный пробиотик, приготовленный на основе штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2335 и предназначенный для повышения продуктивности, сохранности и естественной резистентности организма животных, а также для профилактики и лечения дисбактериозов. Культура СУБ-ПРО стимулирует рост нормальной микрофлоры кишечника животных. Препарат зарегистрирован на территории РФ (ПВР-1-5.6/01948) и внесен в Государственный реестр лекарственных средств. Бактерии *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2335, входящие в состав СУБ-ПРО, являются антагонистически активными и вырабатывают антимикробные субстанции, обладающие бактериостатическим действием в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, нормализуют качественный и количественный состав микрофлоры кишечника, активизируют пристеночное пищеварение, способствуют восстановлению популяционного уровня представителей нормальной микрофлоры кишечника. СУБ-ПРО применяется для профилактики и лечения бактериальных болезней рыб, таких как энтерит, аэромоноз (краснуха), некроз плавников, миксобактериоз, лепидортоз (инфекционное ерошение чешуи), бактериальная плавниковая гниль, псевдомоноз (язвенная болезнь), белокожие, баранхиомикоз, ихтиофоноз, апролегниоз (ватная болезнь). Для профилактики, повышения производительности, нормализации пищеварения и улучшения физиологического состояния: 10 грамм на тонну корма в течение всего вегетационного периода. Для лечения при появлении первых признаков заболевания: от 100 до 1000 грамм на тонну корма курсами по 10 дней [187].

В Республике Беларусь для профилактики аэромоноза разработан пробиотик «Az-28», который, в отличие от других биологических препаратов, применяемых в аквакультуре, создан на основе живой культуры

азотфиксирующих бактерий *Azomonas agilis*, выделенных из прудов. Продуцируемая бактериями молочная кислота нормализует резидентную микрофлору, улучшает усвоение корма, повышает неспецифическую резистентность рыб, предотвращает размножение патогенных агентов [188-189].

Для профилактики инфекционных заболеваний рыб Р. Л. Асадчей (2005) разработан препарат-пробиотик «МЛ-95/25». Действие препарата основано на способности бактерий *Lactobacillus acidophilus* быстро размножаться при попадании в кишечник рыб, и, создавая в нем биоценоз, подавлять рост патогенной микрофлоры. Препарат обладает высокой антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным бактериям родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, постоянным обитателям кишечника рыб. Эффективность пробиотика установлена исследованиями, проведенными как в лабораторных, так и в производственных условиях [190].

Производственная компания КРОС Фарм предлагает пробиотик «МУЦИНОЛ» для применения в промышленном выращивании, декоративном разведении и содержании всех видов аквакультуры, который эффективно подавляет широкий спектр патогенных микроорганизмов (аэромонады, псевдомонады, сальмонелла, кишечная палочка и др.), оказывает иммуномодулирующее, ростостимулирующее воздействие на организм водных обитателей. Муцинол® - сухая лиофильно высушенная биомасса штаммов *Bac. subtilis* (ВКМ В-2716D) и *Bac. licheniformis* (ВКМ В-2717D) и носитель. В 1 г. Препарата содержится не менее 1×10^9 КОЕ (колониеобразующих единиц) живых спорообразующих бактерий [191]

Интересны исследования, которые выполнялись в Астраханском государственном техническом университете на базе кафедры «Аквакультура и водные биоресурсы». В ходе экспериментальных работ использовали продукционный корм ОТ-7 (протеин – 48 %, жир – 8 %, углеводы – 18 %, клетчатка – 1,5 %) с добавкой пробиотика «Бацелл», который состоит из

микробной массы спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* 945 (B-5225), ацидофильных бактерий *Lactobacillus acidophilus* L917 (B-4625), *Ruminococcus albus* 37 (B-4292). В 1 г пробиотической добавки содержится не менее 1×10^8 КОЕ бактерий каждого вида. Пробиотическая добавка «Бацелл» вводилась в комбикорм рыбы из расчета 0,2 % от массы сухого комбикорма. На втором этапе эксперимента использовали пробиотическую добавку «Субтилис», которая состояла из микробной массы спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* (ВКМ В-2250), *Bacillus subtilis* (ВКМ В-2287) и *Bacillus licheniformis* (ВКМ В-2252). В 1 г пробиотической добавки содержится не менее 1×10^9 КОЕ бактерий. Пробиотическая добавка к корму «Субтилис» вводилась в комбикорм рыбы из расчета 0,4 % от массы сухого комбикорма. Положительный эффект *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* и *Ruminococcus albus* был подтвержден при исследованиях линя и карпа [192].

Целью Matheus D Baldissera et al. (2019) исследования было оценить, нарушает ли инфекция *A. hydrophila* бронхиальную биоэнергетику. Авторы исследования определили, защищают ли пищевые добавки с кофеином от биоэнергетического дисбаланса жабр, индуцированного *A. hydrophila*. Обнаружено, что активность бронхиальных цитозольных креатинкиназ (КФК) и аденилаткиназ (А) была значительно ниже у рыб, экспериментально инфицированных *A. hydrophila*, чем у неинфицированных рыб, в то время как митохондриальная активность КФК была значительно выше. Активность бронхиальной лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и уровни лактата были значительно выше у рыб, экспериментально инфицированных *A. hydrophila*, чем у неинфицированных рыб, в то время как активность натрий-калиевого ионного насоса (Na, K-АТФазы) и уровни аденозинтрифосфата (АТФ) были значительно ниже. Достоверных различий между группами в отношении активности бронхиальной ФК не наблюдалось. Пищевая добавка с 8% кофеина улучшала активность бронхиального КФК (цитозольного и митохондриального), АК и ЛДГ, а также уровни АТФ, но не предотвращала

повышение уровня лактата бронхиальных тканей или ингибирование активности Na, K-АТФазы, вызванной аэромонозом. На основании этих данных мы полагаем, что снижение активности КФК (цитозольной) и АК способствует нарушению биоэнергетического гомеостаза, в то время как повышение активности митохондриального КФК можно рассматривать как попытку предотвратить или уменьшить энергетический дисбаланс при аэромонозе, вызванный *A. hydrophila*. Использование 8% кофеиновой добавки улучшало энергетический метаболизм за счет защитного воздействия на активность КК и АК, избегая необходимости использования анаэробного метаболизма. Таким образом, 8% диетический кофеин может быть использован для улучшения бронхиального энергетического гомеостаза во время аэромоноза, вызванного *A. hydrophila* [193].

Morselli M.V. et al. (2020), изучал влияние тимола, как ингибитора бактериальной инфекции, вызванной *Aeromonas hydrophila*, на бронхиальный энергетический обмен, потерю веса и смертность белого амура (*Stenopharyngodon idella*). Установлено, что все инфицированные рыбы погибли, в то время как 62,5% из тех, кто получал 100 мг/кг тимола, выжили. Цитозольная и митохондриальная активность креатинкиназы (КФК), а также активность аденилаткиназы (АК) и пируваткиназы (ФК) были значительно ниже в жабрах рыб, инфицированных *A. hydrophila*, чем в контрольной группе, а уровни АТФ были значительно ниже в инфицированной группе. Наконец, бронхиальные активные формы кислорода были значительно выше у рыб, инфицированных *A. hydrophila*, чем в контрольной группе. Добавки с пищей в дозе 100 и 300 мг тимола/кг предотвращали ингибирование активности бронхиального цитозольного и митохондриального КФК, вызванного инфекцией, а также ингибировали снижение уровня бронхиального АТФ. Добавление 100, 200 и 300 мг тимола/кг предотвращало ингибирование активности бронхиальных АК и ФК, индуцированных аэромонозом. Прием 100 мг тимола/кг предотвращал потерю веса после инфекции *A. hydrophila*. Эти данные свидетельствуют о том, что добавки со

100 мг тимола/кг обладают мощными бактерицидными свойствами и увеличивают продолжительность жизни [194].

Таким образом, развитие исследований по разработке новых биопрепаратов и дальнейшему изучению механизма их лечебно-профилактического действия дает основание утверждать, что в XXI веке пробиотики в значительной степени потеснят на рынке традиционные и небезопасные для организма препараты, особенно те из них, которые применяются с профилактической целью. Создание пробиотиков и их широкое применение является сегодня стратегическим направлением в борьбе со многими инфекционными, а также некоторыми неинфекционными заболеваниями.

Глава II. Экспериментальные исследования

2.1 Материалы и методы

В экспериментах были использованы штаммы из международной коллекции *Aeromonas veronii* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33568, *Alcaligenes spp B-5269*, *Acinetobacter calcoaceticus B-5971*, *Salmonella enterica* ATCC 130763, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и полевые штаммы *A. hydrophila pA*, *A. hydrophila A1*, *A. bestiarium ЧР*, *Aeromonas spp M2*, *Escherichia coli K12*, *Klebsiella pneumoniae С6*, хранящиеся в музее кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Для выделения штаммов бактерий рода *Aeromonas* и специфических для них бактериофагов были отобраны пробы из следующих водных источников (вода и карп):

1. Ручей Ключ Ульяновский район, Ульяновская область.
2. Пруд Ю.Г. Тереньгульский район, Ульяновская область.
3. Река Майна Старомайнский район, Ульяновская область.
4. Куйбышевское водохранилище, Старомайнский район, Ульяновская область.
5. Озеро Большое Чердаклинский район, Ульяновская область.
6. Река Кременки Старомайнский район, Ульяновская область.
7. Пруд с. Туруново Чувашская Республика.
8. Пруд, Чувашская область.
9. Пруд д. Малая Андреевка, Канашский район, Чувашская Республика.
10. Пруд с. Сосновка Тереньгульский район, Ульяновская область.
11. Пруд с. Белогорское Тереньгульский район, Ульяновская область.
12. Река Свяга г. Ульяновск район, Ульяновская область.
13. Река Волга, г. Ульяновск, Ульяновская область.
14. Черное озеро г. Ульяновск, Ульяновская область.

15. Озеро Большое, Чердаклинский район, Ульяновская область.
16. Озеро Песчаное Чердаклинский район, Ульяновская область.
17. Река Урень, с. Енганаево, Чердаклинский район, Ульяновская область.
18. Голубое озеро г. Ульяновск, Ульяновская область.
19. Река Калмаюр, с. Чувашский/Татарский Калмаюр Чердаклинский район.
20. Красная река Старомайнский район, Ульяновская область.
21. Пруд в д. Ивашевка, Самарская область.
22. Пруд п. Новая Воля, Цильнинский район, Ульяновская область.
23. Р. Бирюч (Левый приток Свияги), Ульяновская область.
24. Елховое озеро, Цильнинский район, Ульяновская область.
25. Озеро Артюшкино, Сенгилеевский район, Ульяновская область.
26. Озеро в с. Смородино, Сенгилеевский район, Ульяновская область.
27. Река Гуща, Майнский район с. Белое озеро. Ульяновская область.
28. Река Тагай, Майнский район с. Тагай; Ульяновская область.
29. Река Большая Якла Майнский район, Ульяновская область.
30. Река Красная, Старомайнский район, Ульяновская область.
31. Река Калмаюр Чердаклинский район, Ульяновская область.
32. Озеро Юлово, Инзенский район, Ульяновская область.
33. Озеро Аль (Элькюль), Янтиковский район, Чувашия.
34. Озеро Заводь, Порецкий район, Чувашия.
35. Озеро Кюльхири, Красноармейский район, Чувашия.
36. Река Средний Цивиль, Чувашская Республика.
37. Река Урень с. Енганаево, Чердаклинский район, Ульяновская область.
38. Пруд в с. Архангельское, Чердаклинский район, Ульяновская область.
39. Река Сура, Карсунский район, Ульяновская область.
40. Река Карсунка, Карсунский район, Ульяновская область.
41. Река Сура, Сурский район, Ульяновская область.
42. Пруд Новоникулинский, Цильнинский район, Ульяновская область.
43. Пруд Верхнетимерсяновский, Цильнинский район, Ульяновская область.

44. Пруд Полбинский, Цильнинский район , Ульяновская область.
45. Пруд Юшанский, Цильнинский район , Ульяновская область.
46. Пруд Елизаветинский, Майнский район, Ульяновская область.
47. Пруд Анненковский, Майнский район, Ульяновская область.
48. Пруд Ивановский, Ульяновский район, Ульяновская область.
49. Пруд Максимовский, Ульяновский район, Ульяновская область.
50. Пруд Большеключищинский, Ульяновский район, Ульяновская область.
51. Озеро Соловьево, Сурский район, Ульяновская область.
52. Озеро Алкеево, Сурский район, Ульяновская область.
53. Озеро Карасево, Сурский район, Ульяновская область.
54. Озеро Кривое, Сурский район, Ульяновская область.
55. Озеро Долгое, Сурский район, Ульяновская область.
56. Озеро Конопляное, Сурский район, Ульяновская область.
57. Озеро Явля, Сурский район, Ульяновская область.
58. Озеро Кирпичное, Ульяновск, Ульяновская область.
59. Солдатское озеро, Ульяновск, Ульяновская область.
60. Озеро Поганое, Николаевский район, Ульяновская область.
61. Озеро Светлое, Николаевский район, Ульяновская область.
62. Озеро Чекалинское, Чердаклинский район, Ульяновская область.
63. Озеро Пичерское, Сурский район, Ульяновская область.
64. Река Туарма, Барышский район, Ульяновская область.
65. Река Стемасс, Вешкаемский район, Ульяновская область.
66. Ружеевщинский пруд, Сурский район, Ульяновская область.
67. Белолебязье озеро, село Белое Озеро, Майнский район, Ульяновская область.
68. Озеро Становое, окрестности села Капда, Барышский район, Ульяновская область.
69. Озеро Кругляшка, окрестности села Ховрино, Вешкаймский район, Ульяновская область.

70. Озеро Крячек, Барышский район, Ульяновская область.
71. Озеро Осиновое, Ульяновск, Ульяновская область.
72. Озеро Дьякон, Ульяновск, Ульяновская область.
73. Озеро Стрелка, Ульяновск, Ульяновская область.
74. Старое озеро, Ульяновск, Ульяновская область.
75. Новое озеро, Ульяновск, Ульяновская область.
76. Озера Светлое, Николаевский район, Ульяновская область.
77. Река Яшинка, Ульяновск, Ульяновская область.
78. Река Большой Черемшан, Ульяновская область.
79. Озеро Зотово, Кузоватовский район, Ульяновская область.
80. Озеро Утиное, Новомалыклинский район, Ульяновская область.
81. Юловский пруд, Инзенский р-н, с. Юлово, Ульяновская область.
82. Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область.
83. Пруд Кортик, Цивильский муниципальный округ, п. Молодежный, Республика Чувашия.
84. Пруд, Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь.
85. Пруд, Волжский район, Самарская область, недалеко от с. Сухая Вязовка.
86. Пруд, с. Тростяное, городское поселение Смышляевка, Волжский район, Самарская область.
87. Пруд, с. Савруха, Похвистневский район, Самарская область.
88. Пруд, с. Кротково, Похвистневский район, Самарская область.
89. Пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия.
90. Пруд Шатьмапоси, Моргаушский муниципальный округ, Республика Чувашия.
91. Пруд Сюткюль, Моргаушский муниципальный округ, Чувашская область.

В таблице 1 представлены географические локации отбора проб, из которых были выделены искомые бактерии.

Таблица 1 – Объекты выделения бактерий

Название штамма	Место выделения штамма, год.
<i>Aeromonas veronii</i> bv.sobria 1	пруд Ю.Г., Тереньгульский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>Aeromonas veronii</i> bv.sobria 2	ручей Ключ, Ульяновский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>Aeromonas veronii</i> bv.sobria 3	Голубое озеро, г. Ульяновск, Ульяновская область, 2023 год
<i>Aeromonas veronii</i> bv.sobria 4	озеро Большое, Чердаклинский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>Aeromonas veronii</i> bv.sobria 5	озеро Песчаное, Чердаклинский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>Aeromonas veronii</i> bv.sobria 7И	пруд, д. Ивашевка, Самарская область, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.sobria 9B3	р. Бирюч (Левый приток Свияги), Ульяновская область, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.sobria 8B	пруд п. Новая Воля, Цильнинский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.sobria 13A	Елховое озеро, Цильнинский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.sobria P1	карп, пруд, с. Тростяное, городское поселение Смышляевка, Волжский район, Самарская область, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.sobria P2	карп, пруд, с. Савруха, Похвистневский район, Самарская область, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.veronii P3	карп, пруд, с. Кротково, Похвистневский район, Самарская область, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.sobria 3BH	карп, пруд, с. Новое Ахпердино Батыревский район, Республика Чувашия, 2023 год
<i>A. veronii</i> bv.sobria 43	карп, пруд, Шатьмапоси, Моргаушский муниципальный округ, Республика Чувашия, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 11	пруд Сюткюль, Моргаушский муниципальный округ, Чувашская область, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 12	озеро Большое, Чердаклинский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 13	Красная река Старомайнский район, Ульяновская область, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 14	пруд, д. Малая Андреевка, Чувашская Республика, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 15	Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 16	пруд Кортик, Цивильский муниципальный округ, п. Молодежный, Республика Чувашия, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 17	пруд, Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь, 2023 год
<i>Aeromonas hydrophila</i> 18	пруд, Волжский район, Самарская область, недалеко от с. Сухая Вязовка, 2023 год

Оборудование: микроскоп ZEISS Primo Star, Германия; тринокуляр с видеосистемой; термостат ТС-80М-2; термостат ТСО-1/80, СКТБ, автоклав ГК-100–3; шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80п УХЛ 424; установка бактерицидная УГД-2; лабораторная посуда общего назначения, мерная лабораторная посуда.

Для проведения полимеразной цепной реакции гельдокументирующая система Bio-print CX4 Edge (Vilber, Франция), центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с»-1 2 (ЛамСистем, Россия), твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Польша), центрифуга-встряхиватель медицинская серии CM-50M (ELMI, Польша), амплификатор детектирующий ДТпрайм (ДНК-технология, Россия), амплификатор Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США). Для проведения электрофорезирования использовали 10x буфер следующего состава (на 1000 мл): 60,5 г трис(гидроксиметил)аминометан (PanReas AppliChem), 6,0 г трилона Б (ЛенРеактив, Россия), 19,0 г борной кислоты (PanReas AppliChem). Ампликоны разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Агарозный гель окрашивали 1% раствором бромистого этидия (AppliChem, США), которого добавляли в концентрации 200 мкл на 1 литр геля.

Для электрофореза использовали источник питания PowerPac Basic (BioRad, США) и электрофорезная горизонтальная камера Mini-Sub Cell GT (BioRad, США). Сила тока при электрофорезировании составляла 150 В.

Для постановки ПЦР с электрофоретической детекцией использовали реакционную смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x) (БиоЛамбикс, Россия), имеющую следующий состав 100 mM Трис-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 0.4 mM каждого нуклеозидтрифосфата, 10 mM MgCl₂, 0.1 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы.

В исследованиях использовали: ДНКполимеразу Bst 3.0 (New England Biolabs, UK).

Подбор и дизайн праймеров был осуществлен с помощью ресурса NCBI BLAST-primer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), программы UGENA 44.0. Подбор зонда делали в программах UGENA 44.0 и Oligoevaluator ресурс (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>).

Синтез праймеров проводили, пользуясь услугами ООО «Синтол» (г. Москва, РФ).

Питательные среды и реактивы

Для оценки роста на средах их культивировали при температуре 19-20, 30-31, 36-37, 41-42°C использовали бульон LB по Lennox (Диаэм, Россия). В работе применяли агар бактериологический (Испания), питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (Оболенск), бульон LB по Lennox (Диаэм, Россия), BD *Aeromonas Yersinia* агаре (Becton Dickinson GmbH, Германия), Agar Base *Aeromonas* (RYAN) (Conda, Испания), среда Симмонса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), цитратный среда Кристенсена (ООО «Биотехновация»), уреазный среда Кристенсена (Hiimedia, Индия), Гемоглобин сухой (Timedia, Индия) Бульон с лизином / орнитином / аргинином (Hiimedia, Индия), Агар для определения ДНКазы (Conda, Испания), среда Кларка (глюкозофосфатный бульон) (НПЦ «Биокомпас-С»), среды Гисса (ООО «Биотехновация»), Питательная среда № 15 ГРМ для контроля микробной загрязненности (для определения индола) (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск (Россия), Нитратный бульон (Hiimedia, Индия), N, N-диметил-п-фенилендиамин (Aldrich, США), Набор д/опр. ацетоина в реакции Фогес-Проскауэра (НИЦФ), Реактив Эрлиха (НИЦФ), Раствор сульфаниловой кислоты (Hiimedia, Индия), .Альфа-Нафтиламиновый реактив (Hiimedia, Индия), реактивы для окраски по Граму (НИЦФ), сукцинат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), глюконат натрия натрия (Aldrich-Sigma, Германия), глутамат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), дигидрофосфат калия (PanReasAppliChem, Германия), натрия хлорид (PanReasAppliChem, Германия), бромтимоловый синий (Ленреактив, РФ), хлорид бария (НеваРеактив, Россия), хлорид аммония (НеваРеактив, Россия), нитрат калия

(ЛенРеактив, Россия), сульфат магния семиводный (ЛенРеактив, Россия), раствор теллурита калия 1% (Aldrich, США).

Для биохимической идентификации использовали набор НЕФЕРМтест 24 (Erba Lachema, Чехия). Все используемые в данном исследовании праймеры были синтезированы ООО «ДНК-Синтез».

Реактивы: гидролизат казеина(ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск),глюконат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), сукцинат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), глутамат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), дигидрофосфат калия (PanReasAppliChem, Германия), натрия хлорид (PanReasAppliChem, Германия), бромтимоловый синий (Ленреактив, РФ), хлорид бария (НеваРеактив, Россия), хлорид аммония (НеваРеактив, Россия), нитрат калия (ЛенРеактив, Россия), сульфат магния семиводный (ЛенРеактив, Россия), карбонат кальция (ЛенРеактив, Россия), Фурагин (Олайнфарм, Латвия), глюкоза (Диаэм, РФ), натрий цитрат 2-водный (Диаэм, РФ), селективная добавка для бордетелл(Conda, Испания),N, N-диметилп-фенилендиамин (Aldrich, США), раствор теллурита калия 1% (Aldrich, США).

Для окраски по методу Грама использовали «Набор для окраски мазков по Граму» (НИЦФ, Россия).

Выбор оптимального набора выделения нуклеиновых кислот проводили среди наборов: «ЛИРА+» для выделения РНК, ДНК и белков (Биолабмикс, Россия), «РеалБест УниМаг» (ВекторБест, Россия), «М-СОРБ-ООМ» (ООО «Синтол», Россия). Выделение выполняли согласно инструкции каждого из производителей. Эффективность очистки нуклеиновых кислот проводили при использовании спектрофотометра EPPENDORF BioSpectrometer kinetic (Германия). Степень чистоты НК определяли по соотношению A260/A280 (значение в диапазоне 1.5–2.0 указывало на хорошее качество ДНК). В результате проведенного исследования нами было установлено, что все исследуемые наборы показали высокую степень чистоты при выделении нуклеиновых кислот исследуемых штаммов. Установлено, что все наборы эффективны для экстракции нуклеиновых

кислот исследуемых штаммов бактерий, однако стоит отметить что наиболее прост при рутинных исследованиях оказался набор «М-СОРБ-ООМ», поэтому для дальнейших исследований мы будем использовать его.

В исследованиях использовали карпа из благополучного по аэромонозу хозяйства (Ульяновская область Чердаклинский район, с. Богдашкино) и беспородных белых мышей.

Исследования по изучению фенотипических признаков изолятов *Aeromonas* (морфологических, культуральных и биохимических) проводили, используя бактериологические классические методы идентификации микроорганизмов, опираясь на алгоритм, разработанный для типирования аэромонад:

- Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб: часть 1. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб. Москва, Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. С. 142-150 [195].

- Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб: часть 1. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности. Москва, Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. С. 150-152) [196],

- SMI ID 19: identification of *Vibrio* and *Aeromonas* species (Public Health England, 2015) [197].

Была изучена способность бактерий применять в качестве единственного источника углерода такие соединения как глютамат натрия и сукцинат натрия, пролин -L, β - аланин, тирозин -L и L-метионин. Для этого в качестве солевой основы нами был использован следующий солевой состав: хлорид аммония - 0,08 г/л, сульфат магния - 0,002 г/л, хлорид натрия - 4 г/л.

Изучение профилей чувствительности бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора. Для накопления бактериальной массы использовали бульон LB по Miller (Диаэм, Россия). Штаммы *Aeromonas* культивировали при 30°C в течении 24 часов.

Для изучения антибиотикочувствительности использовали индикаторные диски с антибиотиками:

- амоксициллином,
 - бензилпенициллином,
 - ампициллином,
 - цефтриаксоном,
 - цефуроксимом,
 - полимиксином,
 - кларитромицином,
 - доксициклином,
 - эритромицином,
 - амикацином,
 - неомицином,
 - гентамицином,
 - ломефлоксацином,
 - норфлоксацином,
 - фурадонином,
 - триметопримом/сульфаметоксазолом,
 - флуконазолом,
 - линкомицином
 - мупироцином
- производства (Himedia, Индия).

Исследование проводили согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [198] и рекомендациям МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)» [199].

Культуральные, биохимические и морфологические свойства бактерий определяли по тестам, указанным в Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology [26, 54]. Тест на оксидазу был проведен с применением 1% раствора N-N- диметил-парафенилендиамин. Каталазную активность изучали

с применением 3% раствора перекиси водорода. Приготовление и стерилизацию питательных сред, а также окраску мазков проводили согласно ГОСТ ISO 1113-1-2011. Приготовление разведений и суспензий – ГОСТ Р 51426-99. Посев на питательные среды согласно ГОСТ Р 26670-91. Отбор и подготовку лабораторных проб проводили по ГОСТ 26669-85, ГОСТ 31942-2012, ГОСТ 31861-2012. Контроль разработанных питательных сред проводили согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [200-201].

Биологическую пробу ставили на 3 карпах массой 100-200 г, полученных в благополучном по аэромонозу хозяйстве. Двухсуточную бульонную культуру с концентрацией 2 млрд. м.к. вводили рыбам внутривентрально в дозе 0,2 мл. Температура воды в аквариуме, где содержали рыб составляла +19°C. Одновременно ставили контроль на 3 рыбах, которым вводили стерильный МПБ в дозе 0,2 мл. Срок наблюдения составлял 10 суток. В случае заболевания или гибели рыб должно проводиться бактериологическое исследование. Биологическую пробу считали положительной, если все зараженные рыбы заболели или погибли с признаками аэромоноза, а из крови и внутренних органов реизолирована исходная культура. Лабораторный диагноз на аэромоноз считают установленным при выделении культуры со свойствами, характерными для возбудителя болезни и патогенной для подопытных рыб.

Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом, отработанными и модифицированными сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [202-212].

*Прямой метод выделения бактериофага из исследуемого материала
без предварительного обогащения*

Прямой способ выделения бактериофага без предварительного обогащения является наиболее простым и доступным, однако по чувствительности он уступает нижеприведенным методам выделения бактериофага с предварительным обогащением исследуемого материала.

Протокол исследования:

1. Бактериальная культура, находящаяся в экспоненциальной фазе роста, пропускается через фильтр «Millipore Millex-GP» с диаметром пор 0,22 мкм.

2. Каждый исследуемый фильтрат исследуется на наличие фага методом Отто «стекающая капля». Накануне опыта по чашкам Петри разливается 1,5 % мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Чашки с МПА ставят в термостат ($t=29\pm 1$ °C) для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов.

3. На чашку Петри с 1,5% МПА наносят газон 18 ± 2 часовой исследуемой культуры в концентрации 10^7 КОЕ /мл.

4. Бактериальный газон подсушивают в условиях термостата ($t=29\pm 1$ °C) в течение 20-30 минут.

5. Чашку Петри с подготовленным газоном делят на два сектора: «опытная» дорожка и контроль на механическое повреждение газона. На «опытную» дорожку наносят по 1-2 капли исследуемого фильтрата, на «контрольную» дорожку – стерильный МПБ в том же количестве, что и фильтрат.

6. Посевы помещают в термостат на 18 часов при (29 ± 1) °C.

Учет результатов

Результаты оценивают следующим образом:

- отсутствие лизиса;

+ лизис по ходу стекания капли;

++ лизис по ходу стекания капли и наличие стерильных пятен;

+++ наличие стерильного пятна и зон лизиса.

Метод индукции профага в клетке с применением митомицина С и ультрафиолетового облучения

Для определения наличия профага в бактериальной культуре необходимо воздействие на клетку факторами, индуцирующим механизмом репликации фаговой ДНК и стимулирующим лизис бактериальной клетки с выходом нового поколения вирусных частиц.

В качестве химического фактора воздействия используется митомицин С в дозе 0,5 мкг/мл.

Протокол исследования

1. Исследуемые бактериальные культуры засеваются в пробирки с МПБ, содержащим 0,5 мкг/мл митомицина С. После инкубации пробирок в течение 5 ± 1 ч при 29 ± 1 °С содержимое пробирок центрифугируется (3000 об./мин) и пропускается через фильтры «Millipore Millex-GP» с полиэфирсульфоновым наполнителем и диаметром пор 0,22 мкм.

2. Суспензии индикаторных бактериальных штаммов наносятся в объеме 0,1–0,2 мл на поверхность МПА в чашках Петри и втираются досуха шпателем.

3. Чашка Петри с МПА делится на 3 сектора, на которые наносится по 100 мкл.

3.1 содержимого пробирки с физиологическим раствором с 0,5 мкг/мл митомицина С (отрицательный контроль),

3.2 фаголизат бактериофага (положительный контроль),

3.3 тестируемая бактериальная культура (опыт).

4. После инкубации в течение 18 ч при 29 ± 1 °С чашки исследуются на наличие зон лизиса на бактериальном газоне.

Учет результатов

В месте внесения физиологического раствора с 0,5 мкг/мл митомицина С зоны лизиса фиксироваться не должна. В месте нанесения фаголизата бактериофага визуализируется зона лизиса. Наличие зоны лизиса газона на секторе с нанесенным содержимым тестируемой пробирки указывает на

лизогенное состояние штамма.

В качестве физического фактора воздействия применяется ультрафиолетовое облучение (УФО) с длиной волны 250 нм. Эксперимент проводится в полузатемненном помещении с целью предохранения облученных бактерий от фотореактивации

Протокол исследования:

1. Исследуемые культуры в период эксперимента должны находиться в экспоненциальной фазе роста. Суточная культура бактерий разводилась в соотношении 1:100 в фосфатном буфере с pH 7,6.

2. Разведение бактериальной культуры в объеме 2 мл помещали в чашку Петри и облучали в течение 20 (25, 30, 35, 40) секунд на расстоянии 40 (45, 50, 55, 60) см.

3. Затем облученные штаммы бактерий засеивались на мясо-пептонный бульон (МПБ) комнатной температуры (20-22 °С) в соотношении 1:100.

4. Посевы инкубируются при 29 ± 1 °С в течение 6,5-7,0 часов, после чего делается посев методом диффузии в «мягкий агар» - метод агаровых слоев по Грациа.

5. Накануне опыта по чашкам Петри разливается 1,5 % МПА в ламинарном боксе. Чашки Петри с МПА ставят в термостат для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов. Перед применением чашки Петри с МПА дополнительно подсушивают в термостате при (29 ± 1) °С 15-20 минут.

6. Готовят штатив с 10 пробирками, содержащими по 4,5 мл МПБ; в первую из них добавляют облученную бактериальную культуру в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивают другой пипеткой и в количестве 0,5 мл переносят в следующую пробирку, из второй - 0,5 мл в третью и т.д. В серии пробирок обученная культура разводится 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. до 10^{-10} (из этой пробирки после перемешивания выливается 0,5 мл разведения с целью соблюдения количественного единства в эксперименте).

7. Стерильный 0,7% МПА, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляют на водяной бане и остужают до температуры 46 ± 2 °С.

8. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносят 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл облученной культуры, в которой предполагается выход профага. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивается вращением в ладонях и выливается на поверхность 1,5% МПА.

9. Дополнительно ставится опыт на контроль бактериальной культуры (в пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносится 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл стерильного МПБ). Содержимое пробирки тщательно перемешивается вращением в ладонях и выливается на поверхность 1,5% МПА.

10. Опыт на контроль бактериофага (в пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносится 0,2 мл облученной культуры, в которой предполагается выход профага и 0,2 мл стерильного МПБ). Содержимое пробирки тщательно перемешивается вращением в ладонях и выливается на поверхность 1,5% МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности МПА.

11. Чашки Петри оставляют на горизонтальной поверхности стола до полного застывания верхнего слоя МПА, затем посеы инкубируют в термостате при температуре 29 ± 1 °С в течение 18 часов.

Учет результатов

При положительном результате на чашках Петри образуются зоны лизиса, при этом в чашках с контролем бактериальной культуры должен быть зафиксирован ровный газон культуры, а в чашке Петри с облученной культуры, в которой предполагается выход профага, отсутствие роста бактериальной культуры.

Методика выделения бактериофагов из объектов внешней среды с предварительным обогащением

Сущность данного метода заключается в предварительном обогащении исследуемого материала клетками того микроорганизма, к которому ищем

бактериофаг. Бактерии, внесенные в исследуемый материал, начинают размножаться, и вместе с ними увеличивается количество фага.

Первоначально готовятся разведения из измельченных объектов исследований в мясо-пептонном бульоне в соотношении 1:10, добавляются в концентрации 10^7 КОЕ /мл штаммы индикаторных бактерий. Колбы с пробами ставятся в термостат на 24 часа при температуре 29 ± 1 °С. Затем пробы фильтруются через ватно-марлевый фильтр для освобождения от механических примесей. После этого содержимое колб разливается в стерильные пробирки, центрифугируется при 3000 об./мин в течение 30 минут, затем прогревается в водяной бане при 60 ± 2 °С в течение 45 минут с целью подавления роста грамотрицательных бактерий. Каждый исследуемый фильтрат исследуется на наличие фага методом Отто «стекающая капля».

Протокол исследования.

1. Накануне опыта по чашкам Петри разливается 1,5 % мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Чашки с МПА ставят в термостат ($t=29 \pm 1$ °С) для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов.

2. На чашку Петри с 1,5% МПА наносят газон 18 ± 2 часовой исследуемой культуры в концентрации 10^7 КОЕ /мл.

3. Бактериальный газон подсушивают в условиях термостата ($t=29 \pm 1$ °С) в течение 20-30 минут.

4. Чашку Петри с подготовленным газоном делят на два сектора: «опытная» дорожка и контроль на механическое повреждение газона. На «опытную» дорожку наносят по 1-2 капли исследуемого фильтрата, на «контрольную» дорожку – стерильный МПБ в том же количестве, что и фильтрат.

5. Посевы помещают в термостат на 18 часов при (29 ± 1) °С.

Результаты оценивают следующим образом:

- отсутствие лизиса;

+ лизис по ходу стекания капли;

++ лизис по ходу стекания капли и наличие стерильных пятен;

+++ наличие стерильного пятна и зон лизиса.

Селекция выделенных бактериофагов

Селекция бактериофагов проводилась следующим образом. С зоны лизиса отбирали материал и вносили его в пробирку с 4,5 мл стерильного МПБ, туда же вносили 0,2 мл 16-18 часовой индикаторной бактериальной культуры (та культура, на газоне которой был выявлен лизис). Далее ставился контроль: в пробирку со стерильным МБП вносится 0,2 мл индикаторной культуры. Обе пробирки ставятся в термостат при $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Время культивирования подбирается визуально в диапазоне от 4 до 7 часов с интервалом 30 минут. Ориентиром завершения пассажа является наличие роста бактериальной культуры в контрольной пробирке и наличие просветления и отсутствие признаков роста бактериальной культуры в эксперименте.

Очистка бактериофагов от бактериальных клеток, эндотоксина и балластных веществ

Очистку бактериофагов от бактериальных клеток, эндотоксина и балластных веществ мы осуществляли методом трехступенчатой фильтрации:

1. осветляющая микрофильтрация через мембраны «Владипор» марки МФАС-ОС-3 с размером пор 0,8 мкм,
2. осветляющая микрофильтрация через мембраны «Владипор» марки МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм,
3. стерилизующая фильтрация с применением фильтрующей насадки фирмы «Millipore Millex-GP» с полиэфирсульфоновым наполнителем и диаметром пор 0,22 мкм.

Методы изучения биологических свойств бактериофагов

Методы изучения литической активности бактериофагов

Литическую активность бактериофагов определяли на плотной питательной среде *методом диффузии в «мягкий агар» - метод агаровых слоев по Грациа.*

Протокол исследований:

1. Накануне опыта по чашкам Петри разливали 1,5 % мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Чашки Петри с МПА ставили в термостат для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов. Затем они могли храниться в условиях бытового холодильника при температуре $2-4^{\circ}\text{C}$ в течение 3-4 дней. Перед применением чашки Петри с МПА дополнительно подсушивали в термостате при температуре $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 15-20 минут.
2. Индикаторную бактериальную культуру выращивали в условиях термостата в течение 16-18 часов при $(29 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ на МПБ.
3. Набирали в штатив ряд из 10 пробирок, содержащих по 4,5 мл МПБ; в первую из них добавляли изучаемый бактериофаг в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивали другой пипеткой и в количестве 0,5 мл переносили в следующую пробирку, из второй - 0,5 мл в третью и т.д. В серии пробирок бактериофаг разводили 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. до 10^{-10} (из этой пробирки после перемешивания выливали 0,5 мл разведения с целью соблюдения количественного единства в эксперименте).
4. Стерильный 0,7% МПА, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли на водяной бане и остужали до температуры $46 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
5. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл индикаторной бактериальной культуры и 0,2 мл разведения анализируемого бактериофага. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА.
6. Дополнительно ставили опыт на контроль культуры (в пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл стерильного МПБ). Содержимое пробирки тщательно перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА.
7. Опыт на контроль фага (в пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл фага (неразведенного) и 0,2 мл стерильного МПБ). Содержимое пробирки тщательно перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА.

8. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности МПА, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности стола до полного застывания верхнего слоя МПА, затем инкубировали посевы в термостате при $(29\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 часов.

Учет результатов

В каждой из чашек Петри подсчитывается количество выросших бляшкообразующих единиц и умножается на степень разведения. Единицы измерения – БОЕ/мл.

Изучение литической активности методом Аппельмана проводили по протоколу исследования.

1. Набирается ряд из 12 пробирок, содержащих по 4,5 мл мясо-пептонного бульона (МПБ).

2. В первую из них добавляется изучаемый бактериофаг в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивается другой пипеткой и в количестве 0,5 мл переносится в следующую пробирку, из второй - 0,5 мл в третью и т.д.

3. В 10 пробирках изучаемый бактериофаг разводится 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. до 10^{-10} (из этой пробирки после перемешивания выливается 0,5 мл разведения с целью соблюдения количественного единства в эксперименте).

4. В 11 пробирок, включая и контроль культуры, содержащих только 4,5 мл МПБ, вносится 0,2 мл индикаторной бактериальной культуры в экспоненциальной фазе роста.

5. В 12 пробирку с 4,5 МПБ добавляется только 0,5 мл анализируемого бактериофага.

6. Ставятся все 12 пробирок в термостат при показателях температуры $(29\pm 1)^\circ\text{C}$, после чего учитывается результат через 18 часов культивирования.

Учет результатов

Последняя прозрачная пробирка из ранжира и определяет титр фага по Аппельману и обозначается степенью разведения фага. Контроль культуры – пробирка с явно выраженными признаками роста бактериальной культуры на МПБ, контроль бактериофага – вид стерильного МПБ.

Определение титра фага при хранении

Бактериофаги, укупоренные в стеклянные флаконы, без добавления консервирующих веществ, хранятся при температуре $+2-4$ °С. Титр фага констатируется через каждые три месяца в течение 12 месяцев.

Протокол исследования:

1. Накануне опыта по чашкам Петри разливали 1,5 % мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Чашки Петри с МПА ставили в термостат для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов. Затем они могли храниться в условиях бытового холодильника при температуре $2-4$ °С в течение 3-4 дней. Перед применением чашки Петри с МПА дополнительно подсушивали в термостате при температуре 29 ± 1 °С 15-20 минут.

2. Индикаторную бактериальную культуру выращивали в условиях термостата в течение 16-18 часов при (29 ± 1) °С на МПБ.

3. Флакон с бактериофагов встряхивается и визуально определяется наличие осадка. Далее флакон обрабатывается ватным тампоном, смоченным 90 ° C_2H_5OH . При помощи стерильного шприца берется 0,5 мл бактериофага для исследований.

4. Набирали в штатив ряд из 10 пробирок, содержащих по 4,5 мл МПБ; в первую из них добавляли изучаемый бактериофаг в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивали другой пипеткой и в количестве 0,5 мл переносили в следующую пробирку, из второй - 0,5 мл в третью и т.д. В серии пробирок бактериофаг разводили 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. до 10^{-10} (из этой пробирки после перемешивания выливали 0,5 мл разведения с целью соблюдения количественного единства в эксперименте).

5. Стерильный 0,7% МПА, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли на водяной бане и остужали до температуры 46 ± 2 °С.

6. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл индикаторной бактериальной культуры и 0,2 мл разведения анализируемого бактериофага. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА.

7. Дополнительно ставили опыт на контроль культуры (в пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл стерильного МПБ). Содержимое пробирки тщательно перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА.

8. Опыт на контроль фага (в пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл фага (неразведенного) и 0,2 мл стерильного МПБ). Содержимое пробирки тщательно перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА.

9. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности МПА, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности стола до полного застывания верхнего слоя МПА, затем инкубировали посеvy в термостате при $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18 часов.

Учет результатов.

В каждой из чашек Петри подсчитывается количество выросших бляшкообразующих единиц и умножается на степень разведения. Единицы измерения – БОЕ/мл.

Определение специфичности бактериофага методом Отто «стекающая капля»

Протокол исследования:

1. Накануне опыта по чашкам Петри разливается 1,5 % мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Чашки с МПА ставят в термостат ($t=29 \pm 1 ^\circ\text{C}$) для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов.

2. На чашку Петри с 1,5% МПА наносят газон 18 ± 2 часовой исследуемой культуры в концентрации 10^7 КОЕ /мл.

3. Бактериальный газон подсушивают в условиях термостата ($t=29 \pm 1 ^\circ\text{C}$) в течение 20-30 минут.

4. Чашку Петри с подготовленным газоном делят на два сектора: «опытная» дорожка и контроль на механическое повреждение газона. На «опытную» дорожку наносят по 1-2 капли исследуемого фильтрата, на «контрольную» дорожку – стерильный МПБ в том же количестве, что и фильтрат.

5. Посевы помещают в термостат на 18 часов при $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Результаты оценивают следующим образом:

- отсутствие лизиса;
- + лизис по ходу стекания капли;
- ++ лизис по ходу стекания капли и наличие стерильных пятен;
- +++ наличие стерильного пятна и зон лизиса.

Методы оценки стабильности бактериофагов к воздействию агрессивных факторов

Устойчивость бактериофагов-кандидатов к температуре

Степень устойчивости бактериофагов к воздействию температуры проводили следующим способом: исследуемые бактериофаги разводили 1:10 в МПБ (рН 7,2–7,4) для того, чтобы получить бактериофаг определенной концентрации. Затем пробирки с фагами прогревали на водяной бане при определенной температуре в течение 30 минут. По завершении обработки бактериофага определяли количество бляшкообразующих единиц фага методом диффузии в «мягкий агар» - метод агаровых слоев по Грациа

Устойчивость бактериофагов к воздействию трихлорметана

Определение чувствительности бактериофагов к трихлорметану проводили методом обработки фаговой суспензии им в соотношении 1:10 при постоянном перемешивании.

Протокол исследования:

1. В 3 пробирки с 4,5 мл МПБ, вносится по 0,2 мл испытываемого бактериофага и 0,2 мл бактериальной культуры, чувствительной к данному фагу (индикаторная культура). Пробирки культивировали при температуре $36 \pm 1 ^\circ\text{C}$ 18 ч.

2. В каждую пробирку добавляется по 0,5 мл трихлорметана. Время экспозиции с трихлорметаном при непрерывном встряхивании соответственно: 1-я пробирка – 15 мин; 2-я пробирка – 30 мин; 3-я пробирка – 45 мин. Полученную смесь откручивали на центрифуге 30 мин при 5000 об/мин. Собирали супернатант.

3. Активность бактериофага определяли по методу Грациа. Контролем служил стерильный фильтрат фаголизата, полученный с использованием бактериальных фильтров.

Определение параметров инфекционного процесса в системе фаг - клетка для бактериофагов, входящих в состав технологического вспомогательного средства.

Получение фаговой биомассы с высоким титром фаговых частиц

Фаговую биомассу с высокой литической активностью получали методом выращивания на плотных питательных средах [174]. Он включает следующие этапы.

1-й этап – это получение бактериальной культуры штамма-хозяина в экспоненциальной фазе роста. Бактериальную культуру, выросшую на МПА, микробиологической петлей засевают в МПБ, разлитый по 4,5 мл из расчета одна пробирка на одну матрасную колбу. Посеянные таким образом индикаторные штаммы культивируют в термостате при температуре 29 ± 1 °C 20 ± 2 ч.

2-й этап – нанесение бактериальной культуры штамма-хозяина на поверхность МПА. В матрасные колбы с МПА вносят бактериальную культуру штамма-хозяина в экспоненциальной фазе роста и распределяют ее по всей поверхности питательной среды, создавая монослой. Стерильной микробиологической пипеткой удаляют лишнюю жидкость. Культивируют в термостате течение $6,5 \pm 0,5$ ч при температуре 29 ± 1 °C.

3-й этап – нанесение «маточного» штамма бактериофага. В подороженный газон бактериальной культуры вносят стерильной микробиологической пипеткой 2,0 мл одноименного (маточного)

бактериофага в титре 10^6 – 10^7 БОЕ/мл. Соотношение посевной культуры и бактериофага составляет 100:1, т.е. на 100 бактериальных клеток – 1 частица бактериофага. Покачивающим движением распределяют бактериофаг так, чтобы он тонким слоем покрыл всю поверхность газона бактериальной культуры. Лишняя жидкость удаляется стерильной микробиологической пипеткой. Инкубируются в посевах термостате 14 ± 1 ч при температуре 29 ± 1 °С.

4-й этап – сбор бактериофага. В матрасную колбу в асептических условиях вносится физиологический раствор с рН 7,0–7,2 в количестве 0,04–0,045 мл на 1 см² (9 мл на один матрас). Покачивающим движением производится смыв фага с поверхности МПА. собирают Жидкая фракция (вирионы бактериофага, обломки бактериальных клеток, живых нелизированных клеток штамма-хозяина) собирается микробиологической пипеткой и переносится в стерильные центрифужные пробирки. Центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин.

5-й этап – очистка и контроль фаголизата.

Полученный, таким образом, фаголизат стерилизуется методом трехступенчатой фильтрации.

Методика постановки реакции нарастания титра фага

Для определения параметров постановки РНФ и отработки количественных показателей реакции, имеющих диагностическое значение, проводятся исследования с использованием стерильного МПБ, инкубированного совместно с 18-часовой индикаторной культурой в концентрации от 10^3 до 10^8 м.к./мл при температуре (29 ± 1) °С. В качестве контроля был использован интактный стерильный МПБ. Рабочее разведение бактериофага для постановки РНФ содержало 10^2 – 10^5 БОЕ/мл. Поэтому первоначально осуществляется разведение бактериофага, с учетом того, что готовый к работе биопрепарат должен содержать 10^8 БОЕ/мл.

Методика постановки эксперимента: в опытные колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили индикаторную культуру в концентрации 10^3 – 10^8

м.к./мл. Содержимое колб встряхивали в шуттель-аппарате в течение 10 минут. Чтобы установить оптимальное время, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями необходимо было провести эксперименты на тест-объекте (применялся стерильный МПБ) при сохранении биотехнологических параметров культивирования каждого бактериофага (температурный режим, количество бактериальной культуры и титр фага) для постановки РНФ.

Оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров: предварительное подращивание исследуемого материала не предусматривалось, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре (29 ± 1) °С; предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5 часов при температуре (29 ± 1) °С, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре (29 ± 1) °С; предварительное подращивание исследуемого материала в течение 15 часов при температуре (29 ± 1) °С, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре (29 ± 1) °С; предварительное подращивание исследуемого материала в течение 24 часов при температуре (29 ± 1) °С, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре (29 ± 1) °С.

После проведения подготовки материала для исследований с учетом вышеописанных параметров осуществляли работу по следующему алгоритму:

1. готовили для опытной и контрольной проб по 6 широких пробирок (диаметр 20 мм) и номеровали их (1, 2, 3 и, соответственно 1к, 2к и 3к, – для каждого разведения культуры);
2. в пробирки № 1, 2 вносили по 9 мл МПБ с индикаторной культурой, а в пробирки 1к, 2к вносили по 9 мл стерильного МПБ (контроль), в пробирки № 3 и 3к – 9 мл стерильного МПБ;
3. в пробирки № 1, 3, 1к и 3к добавляли 1 мл индикаторного фага в

рабочем разведении (для каждого эксперимента свой титр – 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 БОЕ/мл; в пробирки № 2 и 2к вносили по 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага); пробирки № 1 и 1к, в которых находились МПБ (контаминированный бактериями и стерильный) и индикаторный фаг, являлись опытными. Пробирки № 2 (МПБ+ бактерии) и 2к – без фага были контрольными для выявления в пробах МПБ свободного фага. пробирки № 3 и 3к – контроль на титр индикаторного фага;

4. посевы ставили в термостат при температуре $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на то количество часов, которое предусматривает вариант эксперимента (5, 10, 16, 24 часов);

5. после культивирования посевов в условиях термостата содержимое каждой пробирки разводили МПБ (рН 7,4 – 7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирок №3 и 3к (контроль на титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний фага (для удобства подсчета). В пробирках № 3 и 3к индикаторный фаг находился в концентрации $10^2 - 10^5$ БОЕ/мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков БОЕ/мл, содержимое пробирок № 3 и 3к разводили в 20 раз, т.е. 0,25 мл исследуемой смеси вносили в 4,5 мл МПБ. Содержимое опытных пробирок № 1, 1к и № 2, 2к разводили аналогично.

6. содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага методом диффузии в «мягкий» агар по Грация (п. 5.1).

Для анализа количественных данных использовалось программное обеспечение Microsoft Office Excel 2007 и STATISTICA 8.0. Вычисляли значение средней арифметической (M), ошибки репрезентативности (m), доверительный коэффициент (по Стьюденту, t) и степени вероятности (P). Достоверным считали различия при $p \leq 0,05$.

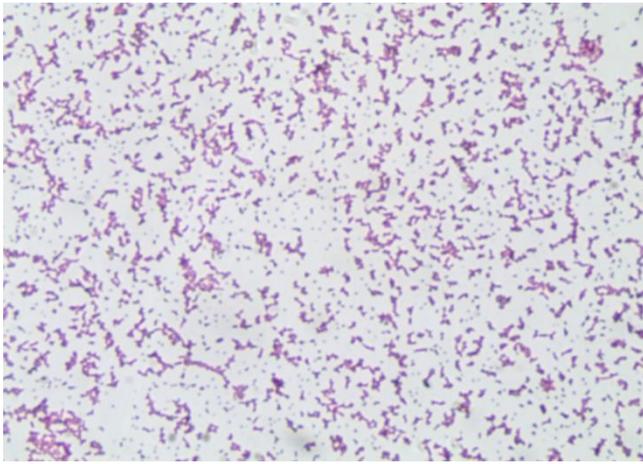
2.2 Разработка бактериологического компонента комплексной тест-системы для индикации и идентификации аэромонад

2.2.1 Разработка ускоренной бактериологической схемы выделения и идентификации бактерий рода *Aeromonas*

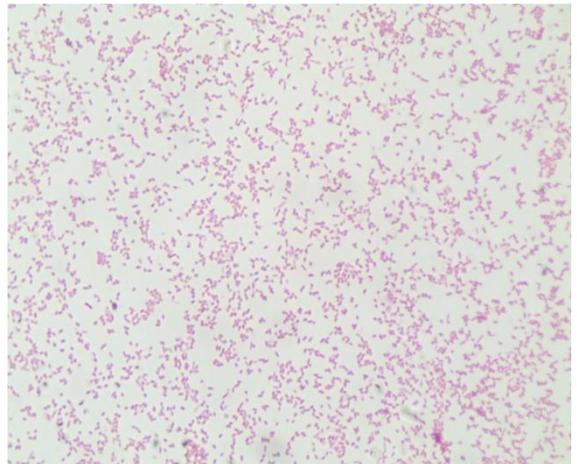
Экспериментально нами было установлено, что клетки бактерий *A. hydrophila*, *A. bestiarium*, *A. veronii* и *A. caviae (punctata)* (коллекция кафедры МВЭ и ВСЭ) - это грамотрицательные подвижные палочки, располагающиеся в масках единично или парами (рис. 13-14).

Установлено, что данные штаммы бактерий способны к росту на LB-бульоне по Lennox, что *A. hydrophila*, *A. bestiarium*, *A. veronii* и *A. caviae (punctata)* при культивировании на на LB-бульоне по Lennox в присутствии 3% хлорида натрия при 30⁰С через 24 часа культивирования растут с помутнением всего столбика среды, при тех же условиях культивирования при 5% хлорида натрия рост на питательной среде отсутствует. На LB-агаре по Lennox был отмечен схожий рост у всех исследуемые штаммов: колонии имеют схожую морфологию через 24 часа инкубирования при 30⁰С-кремово-белового цвета колонии диаметром 1-2 мм, с ровным краем, выпуклые, глянцевые.

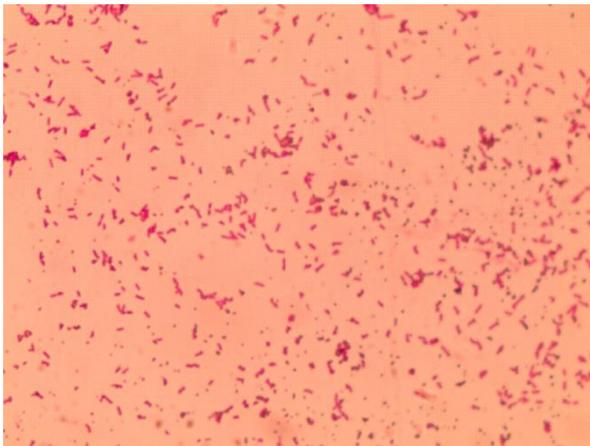
На Колумбийском агаре с добавлением 5% бараньей крови через 24 часа культивированная у всех штаммов *A. hydrophila*, *A. veronii* и *A. bestiarium* было выявлено наличие β-гемолиза, такие же результаты были и при использовании 5% порошка гемоглобина. У штамма *A. caviae (punctata)* при культивировании на обоих средах не было детектировано гемолитической активности.



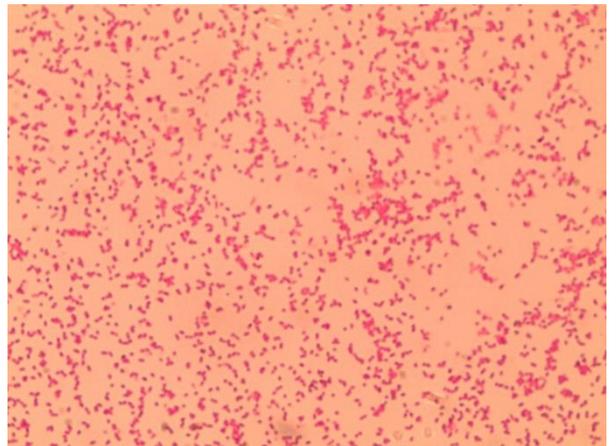
А



Б



В



Г

Рисунок 13 – Бактериологические мазки, окрашенные по методу Грама, приготовленные из штаммов: *A. caviae* ATCC 15468(А), *A. hydrophila* pA (Б), *Aeromonas spp.* M2 (В), *A. bestiarium* ЧР (Г) (x1000)

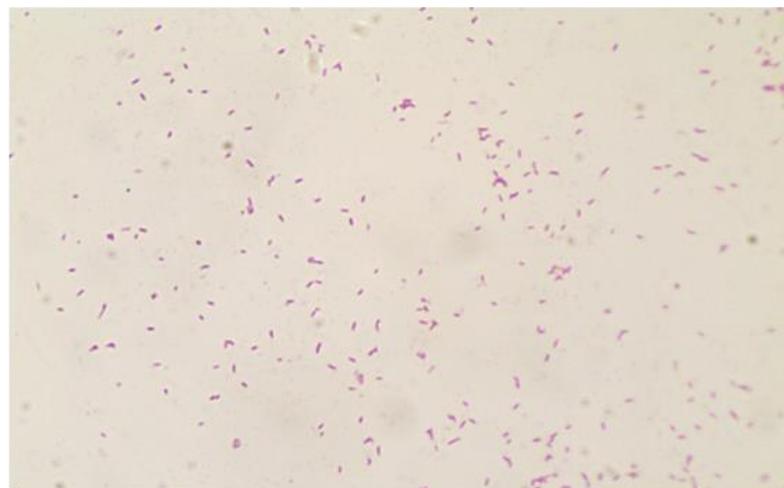


Рисунок 14 - Бактериологический мазок, окрашенный по методу Грама, приготовленные из штамма *A. veronii* *bv. sobria* ATCC 9071 (x1000)

На *Aeromonas-Yersinia* agar (цефсулодин-иргасан-новобиоциновый (CIN) агар) *A. hydrophila* и *A. bestiarium*, *Aeromonas spp M2*, *A. veronii bv.sobria* ATCC 9071 при 30⁰C через 24 часа штаммы растут в виде малиновых колоний диаметром 1-2 мм, выпуклые и глянцевые. При культивировании через 48 часов происходит изменение цвета среды и колоний на желтый, это связано с изменением водородного показателя с кислотного на щелочной. Штамм *A. caviae* при культивировании на *Aeromonas -Yersinia* agar через 24 часа имел морфологию колоний схожую с другими представителями рода, при этом на агаре под местом роста колоний наблюдалось обесцвечивание среды.

Для выделения и идентификации бактерий рода *Aeromonas* используют селективный агар для аэромонад (BSIBG-агар). На данной среде исследуемые штаммы бактерий *A. hydrophila*, *A. bestiarium* и штамм *Aeromonas spp M2* способны к росту, в отличие от *A. caviae*, *A. salmonicida* и *A. veronii*. Штаммы *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. hydrophila pA*, *A. hydrophila A1* и *Aeromonas spp M2* растут через 24 часа при 30⁰C в виде кремовых колоний, диаметром около 1 мм, выпуклых, глянцевых с ровным краем. Через 48 - 72 часа культивирования колонии сохраняют морфологию, лишь увеличиваются в диаметре до 2-3 мм. На протяжении всего времени инкубирования штаммов происходит накопление продуктов жизнедеятельности бактерий, которые изменяют цвет среды на желтый. Это свидетельствует о том, что данные штаммы не способны к ферментации ксилоры. При этом штамм бактерий *A. bestiarium* рост через 24 часа имеет более слабый рост, чем бактерий *A. hydrophila*, которые образуют мелкие (диаметром менее 1 мм) выпуклые глянцевые, с ровным краем колонии, которые еще через 24 часа увеличиваются в диаметре до 1-2 мм.

В обоих описанных выше средах ключевым селективным компонентом выступает иргасан, подавляющий рост грамположительных и многих грамотрицательных бактерии. В среде цефсулодин-иргасан-новобиоциновом (CIN) агаре селективными компонентами являются цефсулодин (подавляет

нормальную флору кишечных бактерий), новобиоцин (подавляет нормальную флору кишечных бактерий), кристаллический фиолетовый (подавляет рост грамположительных и многих грамотрицательных бактерий), дезоксихолат натрия (подавляет рост грамположительных и многих грамотрицательных бактерий) и холат натрия (подавляет рост грамположительных и многих грамотрицательных бактерий). Дифференциация бактерий основана на ферментации маннита. Микроорганизмы, способные ферментировать маннит, снижают рН вокруг колонии, и это проявляется через соответствующее изменение цвета на нейтрально-красный, что ведет к образованию колоний, которые имеют красный цвет. Из-за локального снижения рН также может присутствовать зона преципитации желчи. Внешний вид колоний имеет некоторое сходство с «бычьими глазами». Микроорганизмы, которые не метаболизируют маннит в кислоту, образуют бесцветные полупрозрачные колонии. В состав BSIBG-агара входят соли желчных кислот и бриллиантовый зеленый, ингибирующие грамположительные бактерии, тиосульфат натрия, ингибирующие бактерии семейства *Enterobacteriaceae*.

Помимо BSIBG-агара для выделения аэромонад используют селективную среду (RYAN). На этой среде штаммы бактерий растут после 24 часов культивирования при 30⁰С в виде сине-зеленых колоний диаметром 1-2 мм, выпуклых, глянцевых с ровным краем. Селективность данной среды обусловлена селективным компонентом в качестве которого выступает ампициллин, тиосульфат натрия и соли желчных кислот. Для дифференциации от других родов бактерий служат такие источники углевода как лактоза, сорбит, ксилоза и инозит, бактерии рода *Aeromonas* не способны к ферментации ряда этих соединений, индикаторы бромтимоловый синий и тимоловый синий меняют свой цвет на желтый при образовании кислоты. Бактерии, продуцирующие H₂S, при утилизации цитрат железа и аммония образуют колонии с черным центром.

Установлено, что все исследуемые штаммы бактерий проявляют биологические свойства характерные для данных видов аэромонад. Они растут в широком температурном диапазоне от 10 до 42°C, способны к росту на LB-бульоне в присутствии 3% хлорида натрия, положительны на продукцию оксидазы, нитратов, индола, ДНКазу, желатиназу, способны к ферментации глюкозы, мальтозы, маннитола, сахарозы, фруктозы, утилизации пролина, β -аланина, тирозина-L, L-метионина, сукцината и глутамата натрия (таблица 2).

Ни один из изученных штаммов не способен к росту на LB-бульоне с 5% NaCl и на LB-агар с 320 мг/л теллурита калия, образованию пигмента, утилизации цитрата на среде Кристенсена, продукции уреазы, утилизации ацетата и тартрата, а также к ферментации рамнозы, сорбита, ксилозы. Штаммы бактерий *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. hydrophila* pA, *A. hydrophila* A1, *A. bestiarium* ЧР и *Aeromonas spp* M2 обладают лизиндекорбоксилазной и аргининдекорбоксилазной активностью, *A. caviae* ATCC 15468, в отличие от остальных штаммов, обладает только орнитиндекорбоксилазной активностью и не продуцируют 2-кетоглюконат.

Отличительными характеристиками штаммов между собой являются следующие свойства: утилизация цитрат на среде Симмонса и DL-лактата, ферментация салицина, продукция ацетамида, β -галактозидазы и эскулина и фенилаланина. В отличие от штаммов *A. hydrophila* ATCC 49140 и *A. hydrophila* A1, другие исследуемые штаммы способны к утилизации цитрата натрия на среде Симмонса. Штамм *A. hydrophila* pA не способен к утилизации галактозы и продукции фенилфталеина, штаммы *Aeromonas spp* M2 и *A. hydrophila* ATCC 49140 не утилизируют салицин. *A. bestiarium* не способен к утилизации DL-лактата, что является одним из отличительных свойств данного вида бактерий от вида *A. hydrophila*.

Отличительным свойством штамма *Aeromona sp* M2 является не способность накапливать ацетоин (реакция Фогеса-Проскауэра), продукция ацетамида, β -галактозидазы и эскулина.



А

Б

Рисунок 15 - Рост штаммов А) *A. hydrophila* ATCC 49140, Б) *A. hydrophila* А1 на селективном агаре для аэромонад (BSIBG-агаре) через 24 часа при $t=30^{\circ}\text{C}$



Рисунок 16 - Рост штамма *A. bestiarum* ЧР на селективном агаре для аэромонад (BSIBG-агаре) через 48 часов при $t=30^{\circ}\text{C}$



А

Б

Рисунок 17 - Рост штаммов *A. caviae* ATCC 15468 (А) и *Aeromonas* spp М2 на CIN-агар через 48 часов при $t=30^{\circ}\text{C}$



Рисунок 18 - Изучение способности к восстановлению глюконата штаммов *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. hydrophila* А1, *bestiarum* ЧР, *A. caviae* ATCC 15468



Рисунок 19 - Рост штаммов *A. hydrophila* ATCC 49140 , *A. hydrophila* A1, *A. bestiarum* ЧР на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибрированной крови барана через 24 часа культивирования при температуре 30°C

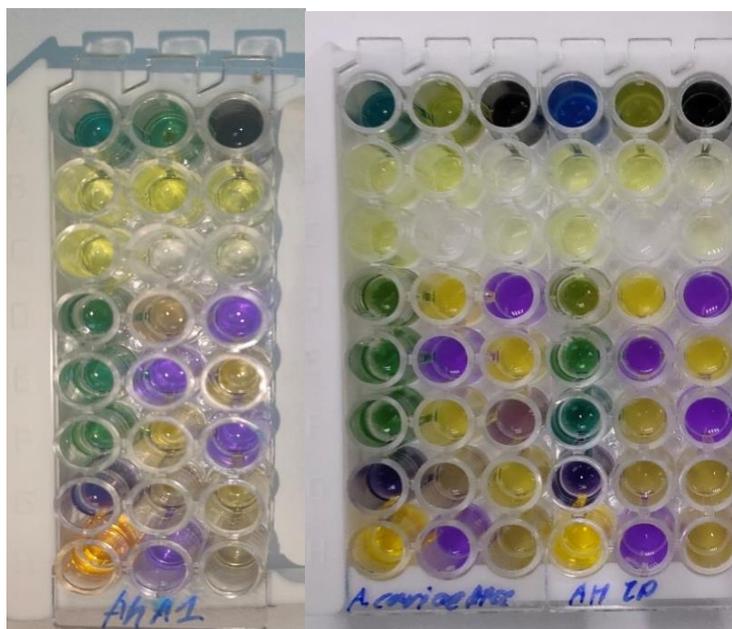


Рисунок 20 - Изучение биохимических свойств штаммов *A. hydrophila* ATCC 49140 , *A. hydrophila* A1, *A. bestiarum* ЧР, *A. caviae* ATCC 15468 при использовании НЕФЕРМтест 24 через 24 часа при температуре 30°C



Рисунок 21 - Изучение биохимических свойств штаммов *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. hydrophila* A1, *A. bestiarum* ЧР и *Aeromonas* spp. M2 на среде на разложение DL-лактата через 24 часа при температуре 30⁰С



Рисунок 22 - Рост штаммов *A. hydrophila* ATCC 49140 , *A. hydrophila* A1, *bestiarum* ЧР, *A. hydrophila* pA на RYAN-агаре через 24 часа культивирования при температуре 30⁰С



Рисунок 23 - Рост штамма *A. hydrophila pA* на RYAN-агаре через 24 часа культивирования при температуре 30⁰С

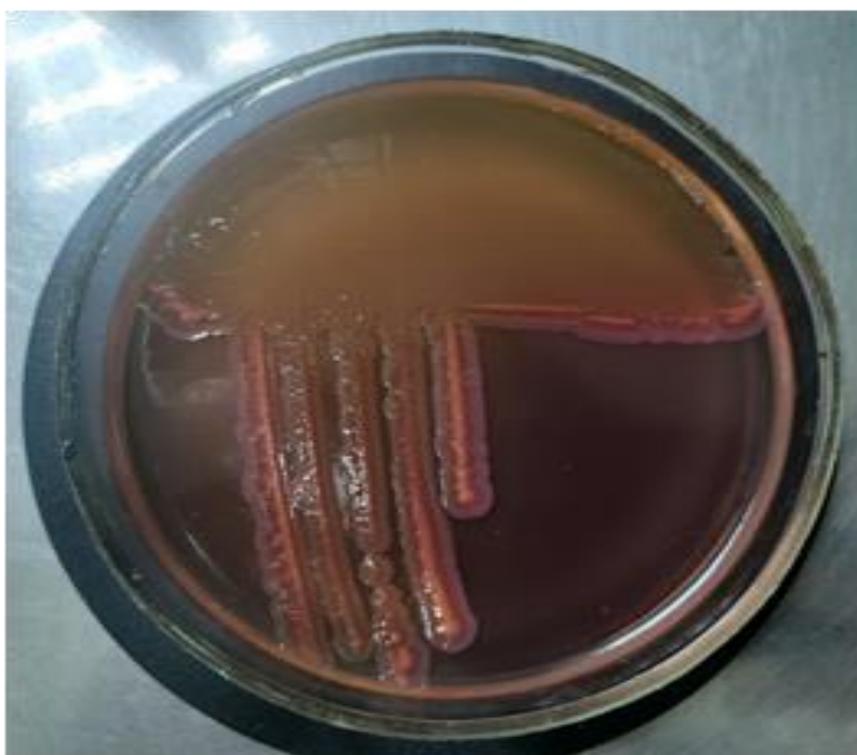


Рисунок 24 - Рост штамма *Aeromonas veronii bv. sobria* ATCC 9071(A) на CIN – агаре через 48 часов культивирования при t=30⁰

Таблица 2 – Физиолого-биологические свойства изучаемых штаммов

Aeromonas

Свойство	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	<i>A. hydrophila</i> pA	<i>A. hydrophila</i> AI	<i>Aeromonas</i> <i>bestiarum</i> ЧР	<i>Aeromonas</i> spp M2	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	<i>A. veronii</i> <i>bv. sobria</i> ATCC
Окраска по Граму	–	–	–	–	–	–	–
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+
10°C	+	+	+	+	+	+	+
20°C	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+	+
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	+	+	–	–	+
Рост при 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
Рост при 5% NaCl	–	–	–	–	–	–	–
Рост на LB-агар с 320 мг/л теллурида калия	–	–	–	–	–	–	–
Лизиндекорбоксилаза	+	+	+	+	+	–	+
Аргининдекорбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+
Орнитиндекорбоксилаза	–	–	–	–	–	–	–
Производство нитратов	+	+	+	+	+	+	–
Образование пигмента	–	–	–	–	–	–	+
Ацетат	–	–	–	–	–	–	–
Индол	+	+	+	+	+	+	+
Среда Симмонса на цитрат	–	+	+	+	–	+	–
Среда Кристенсена на цитрат	–	–	–	–	–	–	–
Уреазный агар Кристенсена	–	–	–	–	–	–	–
ДНКаза	+	+	+	+	+	+	+
Желатиназа	+	+	+	+	+	+	+
О/Ф глюкозы	F	F	F	F	F	F	F
Лактоза	–	–	–	–	–	–	–
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+
Маннитол	+	+	+	+	+	+	+
Рамноза	–	–	–	–	–	–	–
Сорбит	–	–	–	–	+	–	–
Салицин	–	+	+	+	–	+	–
Ксилоза	–	–	–	–	–	–	–
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+

Свойство	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	<i>A. hydrophila</i> рА	<i>A. hydrophila</i> А1	<i>Aeromonas</i> <i>bestiarum</i> ЧР	<i>Aeromonas</i> spp M2	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	<i>A. veronii</i> <i>bv.sobria</i> ATCC
Арабиноза	+	-	+	+	+	+	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	-	+	+	+	+	+
Целлобиоза	+	+	-	-	-	+	-
β-гемолиз	+	+	+	+	+	-	+
DL-лактат	+	+	+	-	+	+	-
2-кетоглюконат	+	+	+	+	+	-	+
Фенилаланин	+	-	+	+	+	+	+
Ацетамид	-	+	+	-	-	-	-
β-глюкозидаза	+	+	+	+	-	+	-
N - ацетил - β- D- глюкозаминидаза	+	+	+	+	+	+	+
Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+
α- галактозидаза	-	-	-	-	-	-	-
β- галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+
Малонат	-	-	-	-	-	-	-
γ-глутамилтрансфераза	+	+	+	+	+	+	-
Фосфатаза	+	+	+	+	+	+	-
Эскулин	+	+	+	+	-	+	-
Сукцинат натрия	+	+	+	+	+	+	+
Глутамат натрия	+	+	+	+	+	+	+
Пролин -L	+	+	+	+	+	+	+
β- Аланин	+	+	+	+	+	+	+
Трирозин-L	+	+	+	+	+	+	+
L-метионин	+	+	+	+	+	+	+
Тартрат	-	-	-	-	-	-	-

На рисунках 15-24 представлены иллюстрации, отражающие рост эталонных штаммов бактерий на различных питательных средах и результаты изучения их некоторых биохимических свойств (таблица 2).

При изучении профилей чувствительности к антимикробным препаратам было экспериментально установлено, что штаммы *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. hydrophila* ЧР, *A. hydrophila* А1, *Aeromonas* spp M1, *A. caviae* ATCC 15468, *A. veronii* *bv.sobria* ATCC 9071 обладают резистентностью к β-лактамным пенициллинам, макролидам. Все указанные выше штаммы

устойчивость проявляют к ряду аминогликозидов, в частности к неомицину и гентамицину. Бактерии *A. hydrophila* ATCC 49140 и *Aeromonas spp* ЧР чувствительны к β-лактамным цефалоспорином, к ряду фторхинолонов (лемефлоксацину, норфлоксацину). Штаммы *A. hydrophila* A1 и *Aeromonas spp* M1 чувствительны к триметоприм/сульфаметоксазолу, амикацину. Стоит так же отметить, что штамм *Aeromonas spp.* M2 проявляет устойчивость к широкому спектру антимикробных веществ, по сравнению с другими штаммами использованными в этом эксперименте.

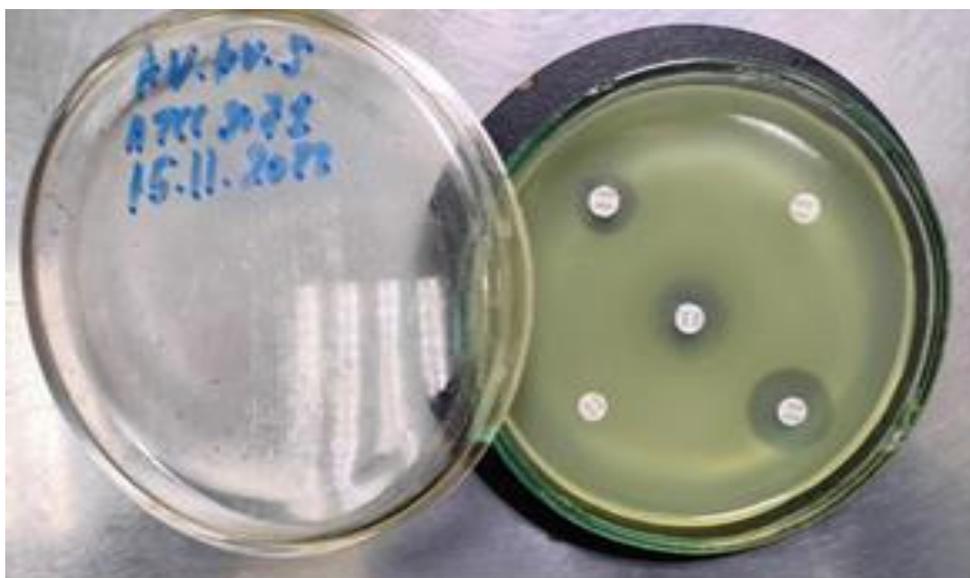


Рисунок 25 - Изучение чувствительности штаммов бактерий *A. veronii* *bv. sobria* ATCC 9071 диско-диффузным методом через 24 часа культивирования при температуре 30⁰С

Результаты экспериментов представлены в таблице 3 и на рисунке 25.

Штаммы *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. hydrophila* ЧР, *A. hydrophila* A1, *Aeromonas spp* M2, *A. caviae* ATCC 15468 обладают резистентностью к β-лактамным пенициллинам, макролидам, устойчивы фурадониу, мупироцину, линкомицину, эритромицину. Все указанные выше штаммы проявляют устойчивость к ряду аминогликозидов, в частности к неомицину и гентамицину.

**Таблица 3 - Изучение профилей чувствительности штаммов бактерий
рода *Aeromonas***

Наименование	Концентрация	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	<i>A. bestiarum</i> ЧР	<i>A. hydrophila</i> А1	<i>A. hydrophila</i> рА	<i>A. spp</i> М2	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	<i>A. veronii</i> <i>bv. sobria</i> ATCC 9071
<i>β</i> -лактамы пенициллины								
<i>Амоксициллин</i>	20 мкг	0	0	0	0	0	0	0
<i>Бензилпенициллин</i>	10 мкг	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ампициллин</i>	10 мкг	0	0	0	0	0	0	0
<i>β</i> -лактамы цефалоспорины								
<i>Цефтриаксон</i>	30 мкг	23	24	17	21	0	25	25
<i>Цефуроксим</i>	30 мкг	26	27	19	19	0	0	34
Природные макролиды								
<i>Полимиксин</i>	300 ед	14	11	10	9	15	0	17
Полусинтетические макролиды								
<i>Кларитромицин</i>	15 мкг	0	20	16	18	0	17	15
<i>Доксициклин</i>	20 мкг	18	17	18	16	16	18	17
<i>Эритромицин</i>	15 мкг	0	0	0	0	0	12	12
Аминогликозиды								
<i>Амикацин</i>	30 мкг	8	21	23	23	15	0	20
<i>Неомицин</i>	30 мкг	10	10	0	12	13	0	15
<i>Гентамицин</i>	10 мкг	11	0	0	0	14	0	19
Фторхинолоны								
<i>Ломефлоксацин</i>	10 мкг	22	21	32	25	14	0	25
<i>Норфлоксацин</i>	10 мкг	23	26	34	23	24	18	34
Производные нитрофуранов								
<i>Фурадонин</i>	300 мкг	18	12	14	14	0	18	17
Сульфаниламиды								
<i>Триметоприм/ Сульфаметоксазол</i>	1,25/25,75 ед	0	16	23	18	23	16	16
Другие								
<i>Флуконазол</i>	40 мкг	0	0	14	0	0	0	9
<i>Мутироцин</i>	5 мкг	11	0	0	0	0	0	13
Линкозамиды								
<i>Линкомицин</i>	15 мкг	0	0	0	0	0	0	11

Штаммы *A. hydrophila* ATCC 49140 и *Aeromonas spp* ЧР чувствительны к β-лактамам цефалоспоринов, к ряду фторхинолонов (лемефлоксацину, норфлоксацину). Штаммы *A. hydrophila* А1 и *Aeromonas spp* М1 чувствительны к триметоприм/сульфаметоксазолу, амикацину. Стоит так же отметить, что штамм *Aeromonas spp.* М2 проявляет устойчивость к широкому

спектру антимикробных веществ, по сравнению с другими штаммами использованными в этом исследовании.

Экспериментально было установлено, что геном изучаемых штаммов *Aeromonas*, за исключением *A. caviae*, обладает фрагментом гена, фланкируемого праймерной системой, детектирующей аэролизин (*aerA*). Он характерен для выделенной филогенетической группы аэромонад (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas enteropelogenes*, *Aeromonas rivuli*) (рис. 26).

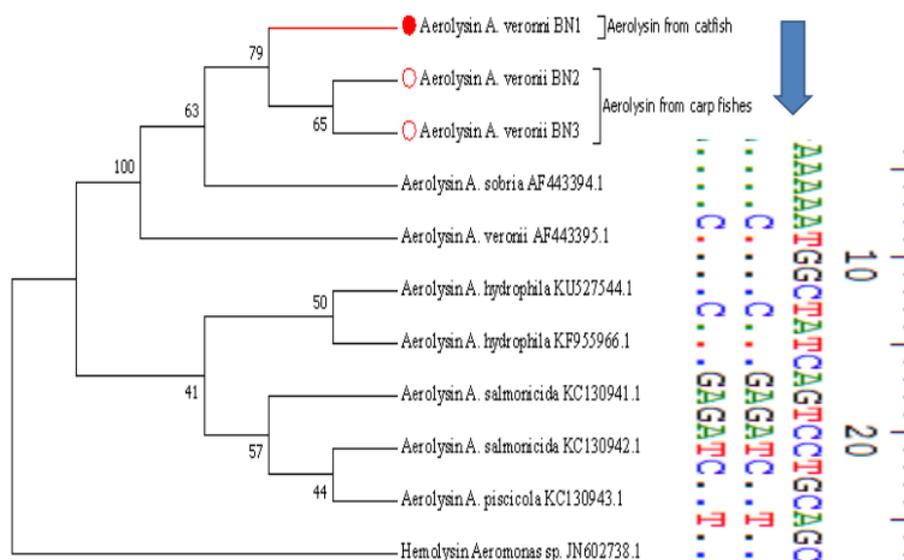


Рисунок 26 - Филогенетическое родство таксонов на основе *Aeromonas (aerA)* (<https://www.researchgate.net/publication/320608850>)

Это было установлено при помощи подобранных авторами специфических праймеров (F-GATGGCGATGGCTGGGTGAT, R-TGGCGATCAGACTGGGTCAC). Подбор и дизайн праймеров был осуществлен с помощью ресурса NCBI BLAST-primer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), программы UGENA 44.0. Подбор зонда делали в программах UGENA 44.0 и Oligoevaluator ресурс (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). Определено, что все

исследуемые штаммы *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas bestiarum* характеризуются данным участком гена (таблица 4).

Для подтверждения видовой принадлежности штаммов *A. veronii* bv *sobria* были разработаны праймерные системы для детекции таких генов «домашнего хозяйства», как ген, кодирующий белок наружной мембраны *ompA*, и ген, кодирующий белок клеточного деления, *zipA*. В дополнении к этому нами был подобран праймер, фланкирующий фрагмент гена, кодирующего аэролизин (*aerA*) (таблица 5).

Протокол амплификации:

1. предварительная денатурация-95⁰С в течении 5 минут, 1 цикл,
2. денатурация- 95⁰С в течение 5 сек,
3. отжиг- 60 ⁰С в течении 15 сек, 40 циклов.

Таблица 4 – Системы праймеров для детекции бактерий видов *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. bestiarum*

Название бактерии	Целевой ген	Праймеры	Длина продукта
<i>A. hydrophila</i>	<i>aerA</i>	Прямой праймер AAGCCCGCCCAGGTCATT	161 п.н.
		Обратный праймер TATTCGGGAGCGGCAACC	
<i>A. hydrophila</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер GCGACAGCCCCGACTTT	376 п.н.
		Обратный праймер CGGGGCTGCGGCTGATA	
<i>A. caviae</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер TTGCCGCCCTGTGAA	246 п.н.
		Обратный праймер CGTCATCGTAAGCGGGCTCT	
<i>A. bestiarum</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер САТААСGGGCCTGCTTGTATTC	92 п.н.
		Обратный праймер CCTGGTCGAACCGGCTTATG	

Таблица 5 - Системы праймеров для детекции бактерий *A. veronii*

Название бактерии	Целевой ген	Праймеры	Длина продукта
<i>A. veronii</i>	<i>ompA</i>	Прямой праймер СААССАТСАСAGGTGCAGGA	79 п.н.
		Обратный праймер GCGGTTTATCGCTTTGGTCA	
<i>A. veronii</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер GCGACAGCCCCGACTTT	107п.н.
		Обратный праймер CGGGGCTGCGGCTGATA	
<i>A. veronii</i>	<i>hlyA</i>	Прямой праймер ТСАААСАССТТGCACCAGCGTCT	173 п.н.
		Обратный праймер TTGCTGGGGATTGTGGGGCT	

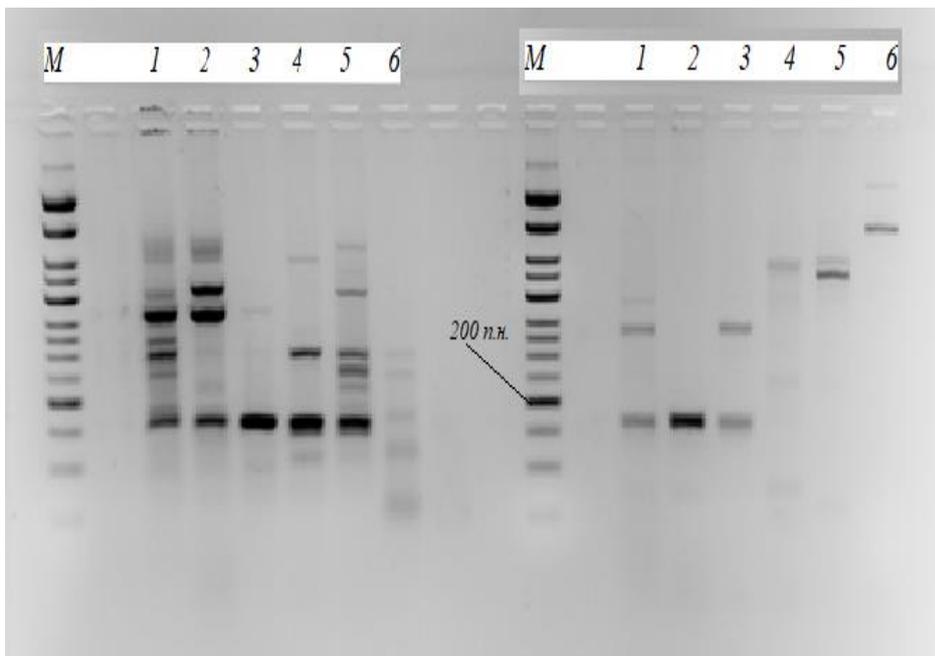


Рисунок 27 - Результат электрофорезирования продукта амплификации фрагмента гена, фланкируемого праймерной системой, детектирующей аэролизин, характерный для изучаемых штаммов бактерий (слева) и видоспецифичной праймерной системы для детекции бактерий вида *Aeromonas hydrophyla* (справа): расположение проб: М – маркер, 1- *A. hydrophila* ATCC 49140, 2 - *A. hydrophila* A1, 3 - *A. hydrophila* PA, 4 - *A. bestiarium* CP, 5 - *Aeromonas* sp M2, 6 - отрицательный контроль

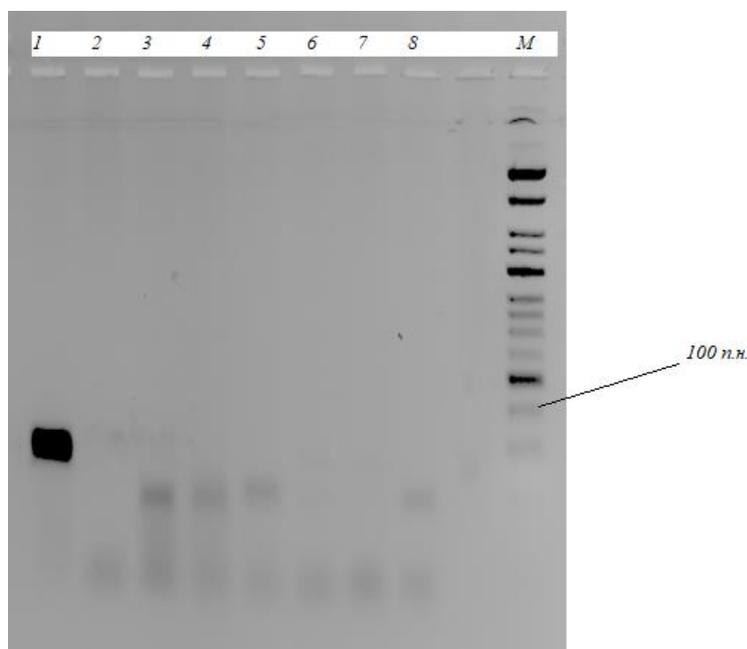


Рисунок 28 - Результат электрофорезирования продукта амплификации видоспецифичной праймерной для детекции бактерий вида *A. bestiarium*: расположение проб: 1- *A. bestiarium* CP, 2.-*A. hydrophila* ATCC 49140, 3 - *A. veronii* ATCC 9071, 4. - *A. caviae* ATCC 15468, 5- *A. hydrophila* A1, 6. *A. hydrophila* PA, 7.- *Aeromonas* sp M2, 8- отрицательный контроль, М-маркер

В результате ряда экспериментов было установлено, что эффективной для детекции бактерий *A. hydrophila* является праймерная система, таргетным участком которой выступает ген, кодирующий аэролизин (*aerA*). При ее помощи можно типировать все три штамма, в результате амплификации во всех случаях образуется специфичный апликон (рис. 27).

На рисунке 28 представлены результаты электрофорезирования продукта амплификации видоспецифичной праймерной для детекции бактерий вида *A. bestiarium*.

При амплификации праймерной системы целевым участком которой является ген, отвечающий за деление клеток (*zip A*), можно типировать только штаммы *A. hydrophila* ATCC 49140 и *A. hydrophila* A1, при амплификации нуклеиновой кислоты штамма *A. hydrophila* pA образуется неспецифичный продукт, имеющий меньшую длину.

В результате ряда экспериментов было установлено, что штамм *A. veronii* можно идентифицировать при использовании разработанных праймерных систем (рисунки 29-30).

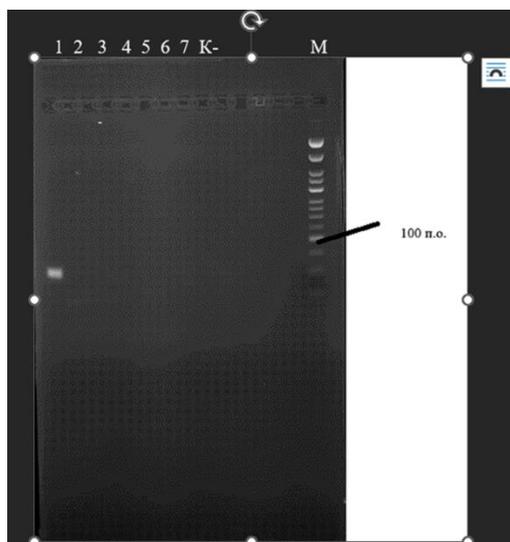


Рисунок 29 - Изучение специфичности праймеров для детекции участка гена *zipA* участка бактерий *A. veronii* (1. *A. veronii* ATCC 9071, 2. *A. salmonicida* ATCC 33568, 3. *A. caviae* ATCC 15468, 4. *A. hydrophila* ATCC 49140, 5. *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, 6. *E coli* K12, 7. *S. enteridis* ATCC 13076, K- отрицательный контроль, M – маркер).

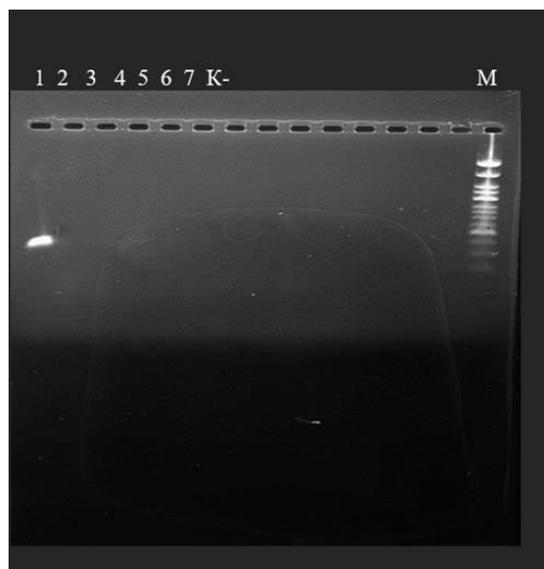


Рисунок 30 - Изучение специфичности праймеров для детекции участка гена *hlyA* участка бактерий *A. veronii* (1. *A. veronii* ATCC 9071, 2. *A. salmonicida* ATCC 33568, 3. *A. caviae* ATCC 15468, 4. *A. hydrophila* ATCC 49140, 5. *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, 6. *E coli* K12, 7. *S. enteridis* ATCC 13076, K- отрицательный контроль, M – маркер).

2.2.2 Разработка селективной питательной среды для выделения бактерий рода *Aeromonas* и ускоренной бактериологической схемы идентификации возбудителей аэромоноза карпа

В качестве среды накопления и первичной идентификации была использована среда А.в.1-УлГАУ, имеющая следующий состав на 1000 мл дистиллированной воды:

- мальтоза-D (+) моногидрат 3 грамма/литр,
- фосфат калия двухосновный 1 грамм/литр,
- натрия хлорид 5 грамм/литр,
- пептон сухой ферментативный 1 грамм/литр,
- хлорид бария 1 грамма/литр,
- додецилсульфат натрия 5 грамм/литр,
- бромтимоловый синий 1 грамм/литр.

В качестве дифференциально-диагностической среды были использованы среды агар с желчными солями и иргасановым бриллиантовым

зеленым (BSIBG agar) для выделения видов *A. hydrophila* и *A. bestiarum*, и *Aeromonas – Yersinia* agar (CIN agar) для *A. caviae*.

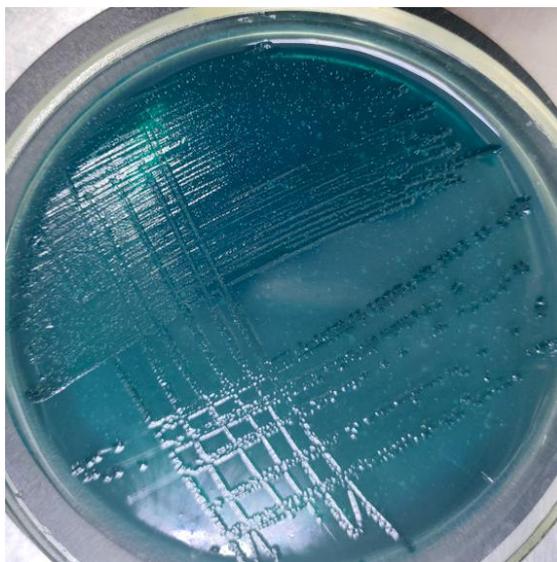


Рисунок 31 - Рост выделенных штаммов *Aeromonas* среде А.в.1-УГАУ через 24 часа культивирования при 30⁰С

После инкубирования бактерий в течении 48 часов при температурите 30⁰С, производили дальнейшую типизацию только бактерий, имеющих характерную для представителей рода *Aeromonas* морфологию колоний. Все выделенные штаммы *A. hydrophila* и *A. bestiarum* способны к росту на дифференциально-диагностической среде BSIBG-агаре, в отличие от *Aeromonas caviae* и *Aeromonas veronii*.

В качестве дифференциально-диагностической среды для бактерий *A. caviae* предлагаем CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin).

В качестве дифференциально-диагностической среды выявления, индикации и идентификации для *Aeromonas veronii* использовали среду А.в.2-УлГАУ, имеющая следующий состав (г/л):

- крахмал водороставримый – 20,0,
- хлорид натрия - 5,0,
- пептон – 6,0,
- бромтимоловый синий – 0,08,

- агар бактериологический – 0.08,
 - иргозан – 0,006,
 - хлорид бария - 6,0,
 - додецилсульфат натрия - 1.0,
- pH 7,2±0,2.

На данной среде штаммы *Aeromonas veronii* растут через 18-24 часа в виде желтых, мелких колоний (диаметром менее 1мм), выпуклых, глянцевых с ровным краем.

Для бактериологической идентификации и получения чистой культуры использовали ГРМ-агар с добавлением 1% ксилозы и 0,08% бромтимолового синего. Бактерии следует инкубировать в течении 24 часов при температуре 30°C.

Последним этапом бактериологической идентификации является изучение способности выделенных штаммов бактерий продуцировать аргинингидролазу, орнитиндекарбоксилазу и лизиндекарбоксилазу, постановка реакции Фогеса-Проскауэра, утилизация DL-лактата, продукция ферментов желатиназы и уреазы, ферментация углеводов в частности глюкозы, сахарозы, маннита, мальтозы, сорбита и ксилозы.

Для выявления способности бактерии утилизировать DL-лактат использовали среду со следующим составом на 1 литр: DL- Молочная кислота (60%) – 2,5 мл; NaCl - 5 г; NH₄H₂PO₄ - 1 гр; K₂HPO₄ - 1 г; MgSO₄·7H₂O – 0,2 г; агара - 15 г; 0,2% бромтимолового синего - 40 мл, pH 6.8 Так же важным этапом исследования является изучение гемолитической активности штаммов на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибрированной крови барана или раствора гемоглобина.

Для дифференциации бактерий рода *Aeromonas* были выбраны представленные на рисунке 32 биохимические характеристики.

Для выявления штаммов бактерий рода *Aeromonas* – возбудителей аэромоноза карпа рекомендуем использовать тесты на аргинин, орнитин и лизин. Штаммы *A. hydrophila*, *A. bestiarium*, *A. caviae* и *A.veronii bv.sobria*

продуцируют аргинин- и лизиндекарбоксилазу, в отличие от штаммов *A. veronii* bv. *veronii*, которые относятся к единственному виду из представителей рода, который обладает активностью в отношении орнитина. Для дифференциации между *A. hydrophila* и *A. bestiarium* предложен тест на утилизацию DL-лактата, который положителен у *A. hydrophila* (положительная в 71% <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806660/>) и *A. caviae*. Для типирования *A. caviae* предлагаем поставить реакцию Фогеса-Проскауэра, которая отрицательная у этого вида бактерий, так же вышеназванный вид бактерий не характеризуется гемолитической активностью.

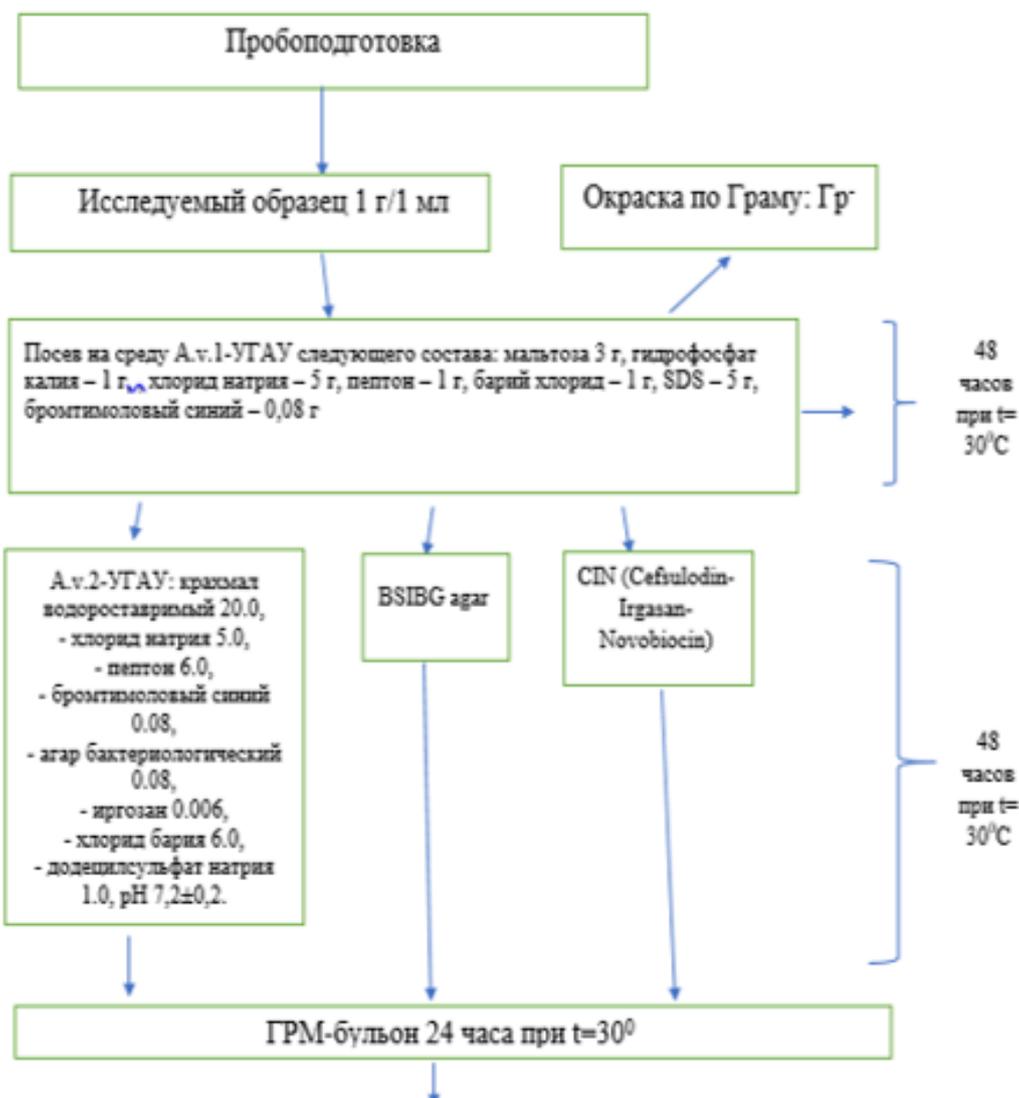
Для подтверждения принадлежности бактерий к роду *Aeromonas* рекомендуется провести исследование на желатиназную активность, а также установить способность изучаемых штаммов бактерий к ферментации таких углеводов, как глюкоза, маннит, мальтоза, сахароза. Данные характеристики положительны у возбудителей аэромоноза карпа.

Уреазная активность и способность к ферментации ксилозы и сорбита отрицательны у возбудителей аэромоноза карпа, однако встречаются мутантные штаммы, способные к ферментации сорбита (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016816059390156B>).

После выполнения первых двух этапов, описанных в выше разработанной схеме, можно произвести выделение нуклеиновой кислоты из колонии бактерий, имеющих характерную морфологию при росте на дифференциально-диагностической среде.

Для ускорения исследований предлагается использовать системы специфических праймеров для постановки полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации электрофоретическим методом (таблица 5).

Для повышения качества выделения ДНК рекомендуем выполнить серию промывки суспензии бактерий деионизированной водой для отмывки клеток от остатков среды.



Биохимическое исследование t=30°C 5 суток

Название микроорганизма	аргинин	орнитин	лизин	реакция фогеса-Проскауэра	желатиназа	уреаза	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза	сорбит	ксилитоза	Гемолитическая активность	Лактат
<i>A. veronii</i> <i>bv. veronii</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>A. veronii</i> <i>bv. sobria</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>A. hydrophila</i>	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>A. bestiarum</i>	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>A. caviae</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+

Рисунок 32 - Ускоренная бактериологическая схема идентификации возбудителей аэромоноза карпа

Таблица 5 – Подобранные системы специфических праймеров для постановки ПЦР с детекцией продуктов амплификации электрофоретическим методом для изучаемых видов аэромонад

Название бактерии	Целевой ген	Праймеры	Длина продукта
<i>A. hydrophila</i>	<i>aerA</i>	Прямой праймер AAGCCCGCCCAGGTCATT	161 п.н.
		Обратный праймер TATTCGGGAGCGGCAACC	
<i>A. hydrophila</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер GCGACAGCCCCGACTTT	376 п.н.
		Обратный праймер CGGGGCTGCGGCTGATA	
<i>A. caviae</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер TTGCCGCCCCTGTTGAA	246 п.н.
		Обратный праймер CGTCATCGTAAGCGGGCTCT	
<i>A. bestiarium</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер CATAACGGGCCTGCTTGATTC	92 п.н.
		Обратный праймер CCTGGTTCGAACCGGCTTATG	
<i>A. veronii</i>	<i>ompA</i>	Прямой праймер CAACCATCACAGGTGCAGGA	79 п.н.
		Обратный праймер GCGGTTTATCGCTTTGGTCA	
<i>A. veronii</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер GCGACAGCCCCGACTTT	107 п.н.
		Обратный праймер CGGGGCTGCGGCTGATA	
<i>A. veronii</i>	<i>hlyA</i>	Прямой праймер TCAAACACCTTGCACCAGCGTCT	173 п.н.
		Обратный праймер TTGCTGGGGATTGTCTGGGCT	

Для постановки ПЦР концентрация праймеров рекомендуем использовать реакционную смесь с следующим составом: 100 mM Трис-НСl, рН 8.5, 100 mM КСl, 0.4 mM каждого нуклеозидтрифосфата, 10 mM MgCl₂, 0.1 ед. акт./мкл HS-Тaq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы Тaq ДНК-полимеразы. Концентрация должна составлять 10 пМ смеси праймеров на одну реакцию.

Протокол проведения амплификации включает этапы:

1. предварительная денатурация-95⁰С в течении 5 минут, 1 цикл,
2. денатурация- 95⁰С в течение 5 сек,
3. отжиг- 60⁰С в течении 15 сек, 40 циклов.

Были проведены дополнительные исследования по разработке системы праймеров для детекции представителей рода *Aeromonas* методом ПЦР с электрофоретической детекцией результата амплификации. Основываясь на работе М А Yáñez (2003), в качестве целевого гена был выбран ген домашнего хозяйства субъединицы ДНКгиразы В (*gyrB*). Подбор праймеров был выполнен на основе представленных геномов бактерий рода *Aeromonas* в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и на сайта Американской коллекции типовых культур (АТСС). Поиск и подбор специфичного участка был выполнен при помощи программы UGENE V 44.0 (<http://ugene.net>) и сайта NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Проверка сценичности примеров выполнена нами на ресурсе Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), в результате были подобраны следующие праймеры:

- прямой праймер (F) CCAGAACAAGACCCCGATCC;
- обратный (R) GTCAGCGCGGTACGGAAAC.

Протокол амплификации аналогичен вышеописанному.

2.2.3 Апробация разработанной ускоренной бактериологической схемы идентификации возбудителей аэромоноза карпа

Согласно «Методических указаний по лабораторной диагностике аэромоноза (краснухи) карпов (утв. Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР 23 апреля 1986 г. N 13-3/5)» диагноз на аэромоноз ставят на основании клинических, эпизоотологических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований [213]. Для исследования в лабораторию направляют не менее 5 живых рыб с признаками острого и подострого течения болезни. Рыба с признаками хронического течения заболевания для исследования непригодна.

За время проведения исследований на территории Ульяновской области, Республики Чувашия, Самарской области официально

установленных вспышек аэромоноза карпа выявлено не было. В виду этого для апробации разработанной ускоренной бактериологической схемы идентификации возбудителей аэромоноза карпа исследованию была подвергнута 91 проба объектов санитарного надзора, включающая 5 проб живых карпов (по 5 рыб) и 86 проб воды из водоемов, находящихся на территории Ульяновской и Самарской областей и Республики Чувашия.

При работе с рыбой высевы делали из крови, асцитной жидкости, паренхиматозных органов. Пробы воды доставляли в лабораторию у стерильных, герметично упакованных емкостях.

Исследования проводили по разработанной схеме.

При изучении морфологических свойств штаммов вида *Aeromonas veronii* было установлено, что это подвижные грамотрицательные бактерии, располагающиеся в мазках одиночно или парами.

На основе колумбийского агара с добавлением как 5% крови барана и 2% сухого гемоглобина был детектирован β -гемолиз через 48 часов инкубирования при температуре 30⁰С.

При росте цефсулодин-Иргасан-Новобиоцин (CIN) агаре обнаружены различные морфотипы роста колоний. Так к примеру штаммы *A.veronii bv sobria 13A*, *A.veronii bv sobria 3BH*, *A. veronii sobria 43*, *A. veronii sobria 7II*, *A. veronii bv sobria 8B* имели колонии малинового цвета, диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем через 24 часа инкубирования. Через 48 часов у штаммов *A.veronii bv sobria 3BH*, *A. veronii sobria 7II* происходило изменение цвета колоний на бледно-малиновый с уплотнением в центре, в цвет самой среды. Это было обусловлено тем, что бактерии в данный период культивирования используют пептон и дрожжевой экстракт в качестве источника углерода. Через 48 часов культивирования колонии штаммов *A.veronii bv sobria 13A*, *A. veronii sobria 43* становились желто-кремового цвета, матовыми и жухлыми, в отличие от штамма *A. veronii bv sobria 8B*, который на протяжении инкубирования в течении 72 часов сохранял первоначальную морфологию колоний.



Рисунок 33 - Рост бактерий *Aeromonas veronii* *bv. sobria* 2 на CIN –
агаре через 48 часов культивирования при 30° С



Рисунок 34 - Рост бактерий *A. veronii* 1 на CIN-агаре через 48 часов
культивирования при 30°С

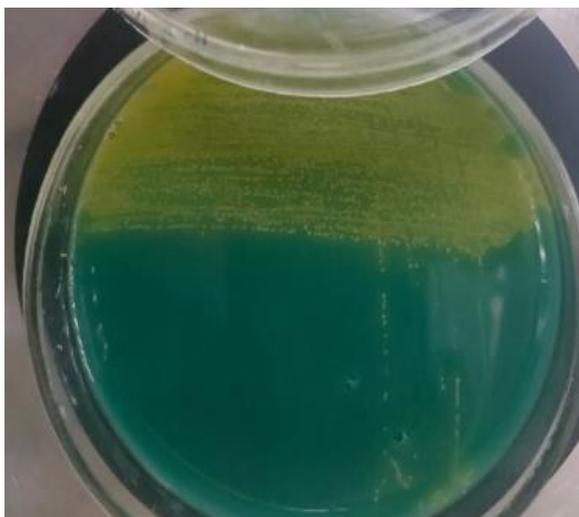
Колонии штамма *A. veronii sobria* 9B3 уже через 24 часа культивирования в начале штриха имели желто – кремовый цвет, основной штрих - колонии малиновые, диаметром 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем. Через 48 часов все колонии становились желто-кремового цвета (рис. 33-34).

На селективном агаре для аэромонад (BSIBG–агар) был установлен рост штаммов бактерий, предположительно относящихся к видам *A. hydrophila*, *A. bestiarium*, которые способны к росту на этой среде в отличие от *A. caviae*, *A. salmonicida* и *A. veronii*. Штаммы через 24 часа при температуре 30⁰С имели колонии кремового цвета диаметром около 1 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем; через 48-72 часа культивирования колонии сохраняли морфологию, увеличиваясь в диаметре до 2-3 мм. В процессе инкубирования штаммов бактерий происходило накопление продуктов жизнедеятельности, которые изменяли цвет среды на желтый. Данный факт указывал на то, что культивируемые штаммы бактерий не способны к ферментации ксилозы. При этом штамм *A. bestiarium* 11 имел рост через 24 часа более слабый чем, бактерий *A. hydrophila*, мелкие (диаметром менее 1 мм), выпуклые, выпуклые глянцевые, с ровным краем, через 24 часа колонии увеличивались в диаметре до 1-2 мм.

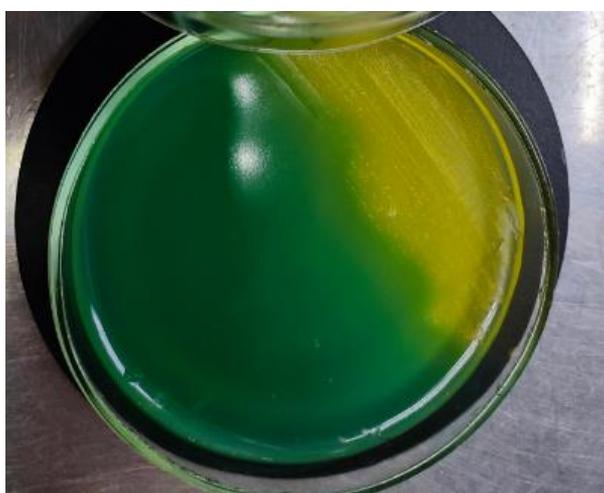
На среде А.в.2-УГАУ через 18-24 часа были зафиксированы желтые, мелкие розоватые колонии, глянцевые с ровным краем (рис. 35).

Идентификация бактерий *Aeromonas veronii*

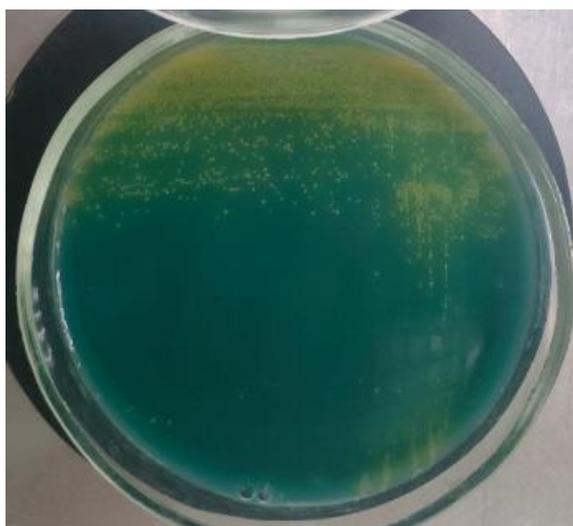
При изучении биохимических свойств по разработанной нами схеме было установлено, что были выделены представители вида, относящиеся к двум биоварам: *A. veron* bv. *veronii* и *A. veronii* bv. *sobria*.



А



Б



В

Рисунок 35 – Рост выделенных штаммов *Aeromonas* среде А.в.2-УГАУ через 24 часа культивирования при 30⁰С: А) *A. veronii* bv. *sobria* 43, Б) *A. veronii* bv. *sobria*. 3, В) *A. veronii* bv. *sobria*. 4

Это было доказано тем, что все штаммы *A. veronii* *bv. sobria* характеризуются продукцией ферментов лизин- и аргениндекарбоксилазы, не способны к продукции эскулиназы. Штамм *A. veronii* *bv. veronii* P3 не продуцирует ферменты лизин- и аргениндекарбоксилазы, а продуцируют к орнитиндекарбоксилазу, в отличие от других представителей рода, гидролизуют эскулин и ферментируют салицин. Поэтому возникла необходимость для дополнительных исследований с целью достоверной идентификации выделенных штаммов бактерий.

Установлено, что следующие свойства положительны у многих представителей вида: продукция оксидазы, накопление ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра) (рис. 38), 2-кетоглюконата, продукция индола и нитратов, ДНКазы, желатиназа, N - ацетил - β - D- глюкозаминидазу, β - галактозидаза, утилизации сукцината натрия, глутамата натрия, пролина-L, β - аланина, тирозина-L и L-метионина.

Определено, что выделенные штаммы ферментируют следующие углеводы: глюкозу, мальтозу, маннитол и трегалозу. Стоит отметить, что *Aeromonas veronii sobria* P2, *A. veron* *bv. veronii* P3, *A. veronii* *bv. sobria* 1, *A. veronii* *bv. sobria* 2, *A. veronii* *bv. sobria*. 3, *A. veronii* *bv. sobria*. 4, *A. veronii* *bv. sobria*. 5, *A. veronii* *bv. sobria* 13A, *A. veronii* *bv. sobria* 3BH и *A. veronii* *bv. sobria* 7 утилизируют цитрат натрия на среде Симмонса, на среде Кристенсена (рисунок 37) это свойство положительно только у штамма *Aeromonas veronii sobria* P2. К ферментации лактозы, в отличии от других штаммов этого вида, способны *A. veronii* *bv. sobria* 2, *A. veronii* *bv. sobria*. 4, *A. veronii* *bv. sobria* 13A, *A. veronii* *bv. sobria* 3BH и *A. veronii* *bv. sobria* 7И, арабинозу, в свою очередь, ферментируют штаммы *Aeromonas veronii*- ATCC 9071, *A. veronii* *bv. sobria* 43, *A. veronii* *bv. sobria*. 3, *A. veronii* *bv. sobria*. 4, *A. veronii* *bv. sobria* 7И. Продуцируют α - галактозидазу *A. veronii* *sobria*. P1 *A. veronii* *bv. sobria*2. Штаммы *A. veronii* *sobria*. P1 и *A. veronii* *bv. sobria*. s. 2 способны к ферментации целлобиозы (таблица 6 и рис. 36).

Таблица 6 – Физиолого-биологические свойства бактерий *Aeromonas veronii*

Свойство		<i>Aeromonas veronii biovar</i>															
		<i>sobria</i> N=14														<i>veronii</i> N=1	
		ATCC 9071	P1	P2	I	2	3	4	5	13A	43	3BH	7II	8B	9B3	% «+» реакций	P3
1.	окраска по Граму	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
2.	подвижность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
3.	оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
4.	рост при 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
5.	рост при 5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
6.	рост на LB-агар с 320 мг/л теллурита калия	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
7.	β-гемолиз	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
8.	рост при t 20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
9.	рост при t 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
10.	рост при t 35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
11.	рост при t 42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
12.	лизиндекорб оксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
13.	аргениндекорб оксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-
14.	орнитиндекорб оксилаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	+
15.	образование пигмента	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-

Продолжение таблицы 6

Свойство		<i>Aeromonas veronii</i> biovar														
		<i>sobria</i> N=14														<i>ve</i> <i>ro</i> <i>nii</i> N =1
		ATCC 9071	P1	P2	I	2	3	4	5	13A	43	3BH	7II	8B	9B3	% «+» реакций
16.	продукция нитратов	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
17.	ацетат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	15	-
18.	индол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
19.	Фогеса-Проскауэра	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
20.	ДНКза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
21.	желатиназа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
22.	среда Симмонса на цитрат	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	77	+
23.	среда Кристенсена на цитрат	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-
24.	Уреазный агар Кристесена	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
25.	DL-лактат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
ферментация углеводов																
26.	О/Ф глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
27.	лактоза	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	23	-
28.	мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
29.	маннит	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
30.	рамноза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
31.	сорбит	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
32.	салицин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	+
33.	Ксилоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-

Продолжение таблицы 6

Свойство		<i>Aeromonas veronii biovar</i>															
		<i>sobria</i> N=14														<i>veroni</i> N=1	
		ATCC 9071	P1	P2	1	2	3	4	5	13A	43	3BH	7II	8B	9B3	% «+» реакций	P3
34.	сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
35.	арабиноза	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	31	-
36.	фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
37.	галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
38.	целлобиоза	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	15	-
39.	трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
40.	2-кетоглюконат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
41.	фенилаланин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	69	+
42.	ацетамид	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
43.	N - ацетил - β- D- глюкозаминидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
44.	α- галактозид аза	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	23	-
45.	β- галактозид аза	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	92	+
46.	малонат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
47.	γ- глутамилтрансфераза	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	61	+
48.	фосфатаза	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	38	+
49.	эскулин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	+

Продолжение таблицы 6

Свойство		<i>Aeromonas veronii biovar</i>															
		<i>sobria</i> N=14														<i>veroni</i> N=1	
		ATCC 9071	P1	P2	1	2	3	4	5	13A	43	3BH	7И	8B	9B3	% «+» реакций	P3
утилизация																	
50.	сукцинат натрия	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
51.	глутамат натрия	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
52.	пролина - L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
53.	β -аланина	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
54.	тирозина-L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
55.	L-метионина	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+
56.	β -глюкозид аза	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	23	+

Аргументируем: все изоляты *A. veronii bv. sobria* обладают ферментами лизин- и аргениндекарбоксилазой, не способны к продукции эскулиназы, в свою очередь штамм *A. veronii bv. veronii P3* не продуцирует ферменты лизин- и аргениндекарбоксилазы, продуцирует орнитиндекорбоксилазу, в отличие от других представителей рода, гидролизует эскулин и ферментирует салицин, в отличие от бактерий *A. veronii bv. sobria*. Положительны у всех изучаемых штаммов: продукция оксидазы, накопление ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра), 2-кетоглюконата, продукция индола и нитратов, ДНКазы, желатиназы, ацетамида, N - ацетил - β - D-

глюкозаминидазы, β - галактозидазы; утилизации сукцината натрия, глутамата натрия, пролина-L, β - аланина, тирозина-L и L-метионина.

Выделенные штаммы ферментируют следующие углеводы: глюкозу, мальтозу, маннитол и трегалозу. Стоит отметить, что штаммы *Aeromonas veronii sobria* P2, *A. veron* bv. *veronii*. P3, *A. veronii* bv. *sobria* 1, *A. veronii* bv. *sobria* s. 2, *A. veronii* bv. *sobria*. 3, *A. veronii* bv. *sobria* 4, *A. veronii* bv. *sobria*. 5, *A. veronii* bv. *sobria* 13A, *A. veronii* bv. *sobria* 3BH и *A. veronii* bv. *sobria* 7 утилизируют цитрат натрия на среде Симмонса, но на среде Кристенсена это свойство положительно проявляется только у штамма *Aeromonas veronii sobria* P2. К ферментации лактозы в отличие от других штаммов этого вида способны *A. veronii* bv. *sobria* 2, *A. veronii* bv. *sobria* 4, *A. veronii* bv. *sobria* 13A, *A. veronii* bv. *sobria* 3BH и *A. veronii* bv. *sobria* 7И; арабинозу ферментируют штаммы: *Aeromonas veronii*- ATCC 9071, *A. veronii* bv. *sobria* 43, *A. veronii* bv. *sobria*. 3, *A. veronii* bv. *sobria* 4, *A. veronii* bv. *sobria* 7И. Продуцируют α - галактозидазу *A. veronii sobria*. P1 *A. veronii* bv. *sobria*2. Штаммы *A. veronii sobria*. P1 и *A. veronii* bv. *sobria*. s. 2 способны к ферментации целлобиозы.



Рисунок 36 - Изучение биохимических свойств выделенных бактерий при использовании НЕФЕРМтест-24 через 24 часа при температуре культивирования 30°C

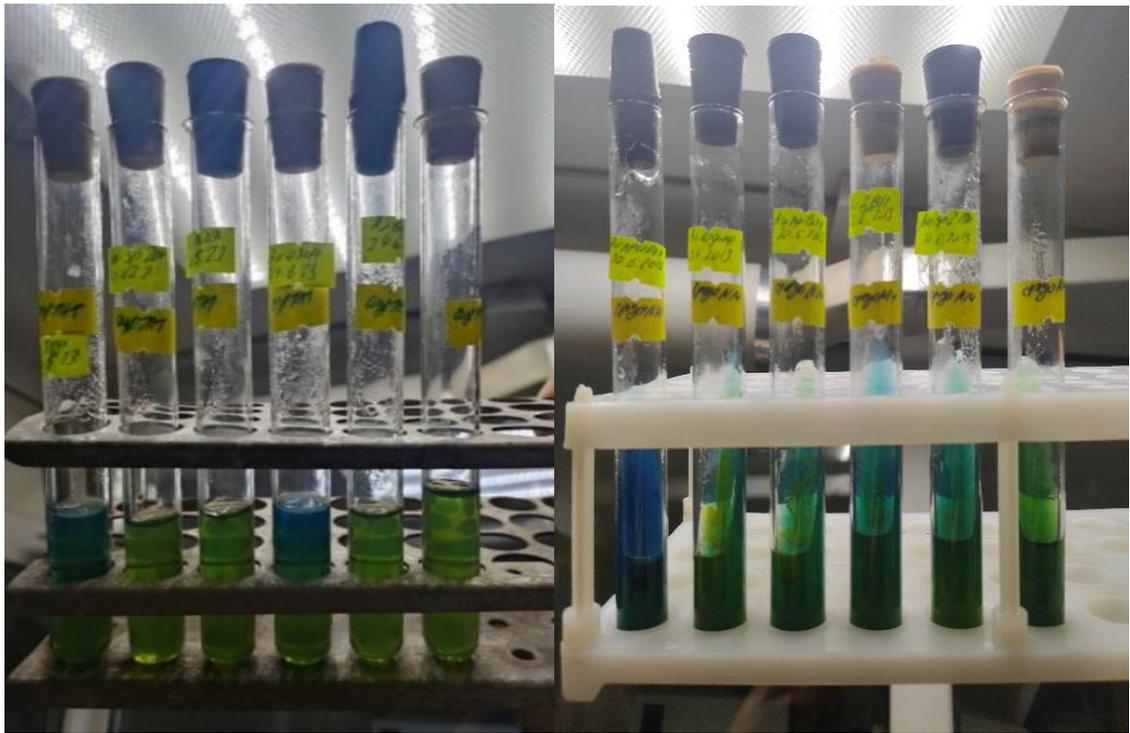


Рисунок 37 - Изучение способности выделенных бактерий утилизировать ацетат на ацетатном агаре и утилизировать цитрат натрия на цитратном агаре Кристенсена (24 часа при температуре культивирования 30⁰С)

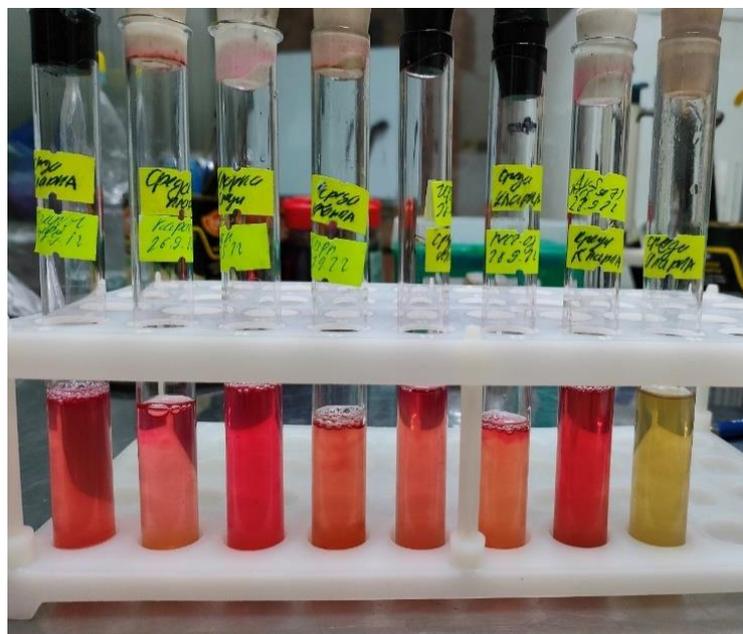


Рисунок 38 - Результаты постановки реакции Фогеса-Проскауэра на выделенных штаммах бактерий

По литературным данным вид *A. veronii* включает две биогруппы. Первым был выделен в таксономическую группу орнитиндекарбоксилазоположительный подвид *A. veronii* (HG 10) [54]. Вторая группа характеризуется положительной реакцией на лизиндекарбоксилазу, аргининдигидролазу и отрицательной - на орнитиндекарбоксилазу (представитель - «клиническая» *A. sobria* (HG 8)). Хотя экологические штаммы HG 7 *A. sobria* и прежний HG 8 *A. sobria* фенотипически очень похожи, они генетически и клинически совершенно разные. По этой причине было решено разделить вид на два отдельных биовара - *veronii* и *sobria* [59].

Проведенные исследования позволили выделить 14 новых штаммов *A. veronii*, 13 из которых относятся к подвиду *A. veronii* *bv. sobria* и 1 - *A. veronii* *bv. veronii*. Четыре из 14 штаммов были выделены из проб рыбы (*A. veronii* *sobria* P1, *Aeromonas veronii sobria* P2, *A. veronii* *bv. veronii*. P3, *A. veronii* *sobria* 3BH).

Идентифицированные штаммы бактерий проявили свойства, характерные для вышеназванных биоваров. 13 штаммов *A. veronii* *bv. sobria* - это грамотрицательные, подвижные оксидазоположительные палочки, ферментирующие лизин- и аргининдекарбоксилазу, растущие в широком температурном диапазоне (t +20-42°C). Штаммы этой биогруппы (100 %) были положительны в реакции Фогеса-Проскауэра, росли при 3 % NaCl, продуцировали нитраты и 2-кетоглюконат, утилизировали сукцинат и глютамат натрия, пролин-L, β-аланин, тирозин-L и L-метионин. Была отмечена положительная реакция у всех 13 изолятов на желатиназу, ДНКазу и β-гемолиз, при ферментации глюкозы, мальтозы, маннитола, сахарозы, фруктозы. Из 13 штаммов только 2 были способны к утилизации ацетата (15 % от выделенных штаммов *A. veronii* *bv. sobria*), один давал положительную реакцию на цитратном агаре Кристенсена (8 %), на среде Симмонса утилизация цитрата была детектирована у 77 % штаммов. 23 % штаммов были способны к ферментации лактозы и 31 % - арабинозы. 69 %

выделенных изолятов продуцировали фенилаланин. В результате исследования установлено, что 23 % - на α - галактозидазу, 92 % - способны продуцировать β - галактозидазу, 62% γ -глутамилтрансферазу, и только 38 % штаммов продуцировали фосфатазу. Так же в результате работы был выделен штамм *A. veronii* bv. *veronii* P3. Данный штамм обладал характерными свойствами для представителей биогруппы, к которым относятся ферментация салицина, продукция орнитиндекарбоксилазы, но не лизин- и аргениндекарбоксилазы и утилизация эскулина. Полученные нами данные коррелируют с результатами, приведенными зарубежными учеными [36]. Следующим этапом исследования был проведён анализ молекулярно-генетических свойств выделенных штаммов, первым этапом была их подтверждена родовая принадлежность. На основе указанных ранее праймеров было установлено, что все выделенные изоляты обладают участками генов *hlyA*, *ompA*, *zipA* (рисунок 39-41).

В результате рядов экспериментов было установлено, что все выделенные штаммы *A. veronii* идентифицированы при использовании разработанных праймерных систем.

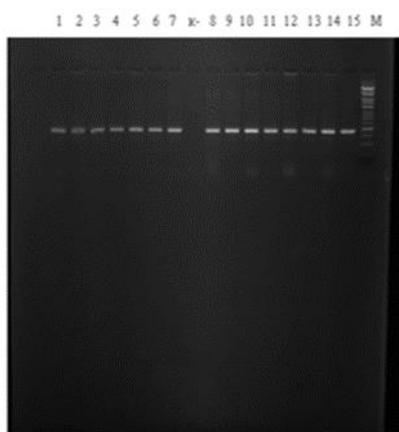


Рисунок 39 - Результаты электрофорезирования результатов амплификации участка гена *hlyA* для идентификации штаммов бактерий *Aeromonas veronii*: 1. *Aeromonas veronii* ATCC 9071, 2. *A. veronii sobria* P, 3. *A. veronii sobria* P2, 4. *A. veronii* bv. *veronii*. P3, 5. *A. veronii sobria* 3BH, 6. *A. veronii sobria* 1, 7. *A. veronii sobria*. s. 2, 8. *A. veronii sobria* 3, 9. *A. veronii sobria* 4, 10. *A. veronii sobria*, 5, 11. *A. veronii sobria* 13A, 12. *A. veronii sobria* 43, 13. *A. veronii sobria* 7И, 14. *A. veronii* bv *sobria* 8B, 15. *A. veronii sobria* 9B3, К-. отрицательный контроль, М - маркер.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 К- М

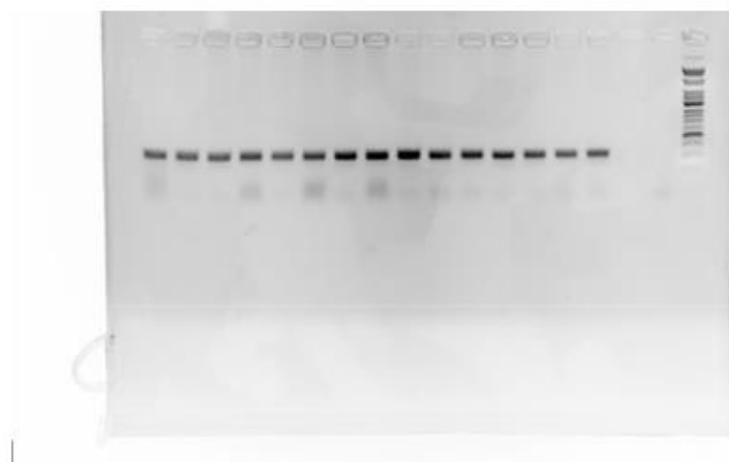


Рисунок 40 - Результаты электрофорезирования результатов амплификации участка гена *ompA* для идентификации штаммов бактерий *Aeromonas veronii*: *Aeromonas veronii*- ATCC 9071, *A. veronii sobria*. P1, *A. veronii sobria* P2, *A. veron* bv. *veronii*. P3, *A. veronii sobria* 3BH, *A. veronii sobria* 1, 7. *A. veronii sobria*. s. 2, *A. veronii sobria*. 3, *A. veronii sobria*. 4, 10. *A. veronii sobria*, 5, *A. veronii sobria* 13A, *A. veronii sobria* 43, 13A. *veronii sobria* 7И, 14. *A. veronii* bv *sobria* 8B, *A. veronii sobria* 9B3, К-. отрицательный контроль, М - маркер.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 К- М

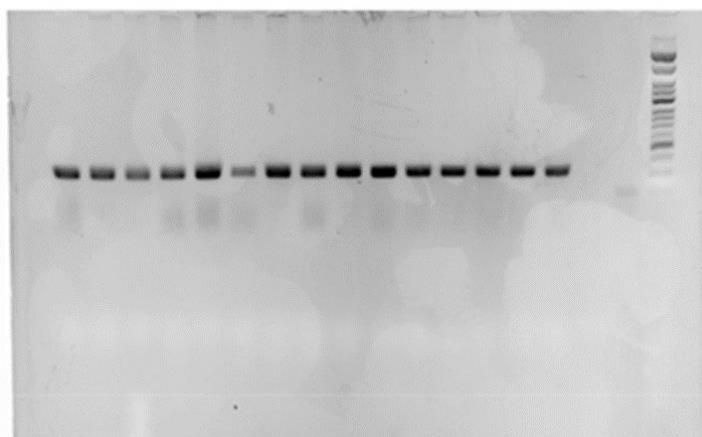


Рисунок 41 - Результаты электрофорезирования результатов амплификации участка гена *zipA* для идентификации штаммов бактерий *Aeromonas veronii*: *Aeromonas veronii*: *Aeromonas veronii*- ATCC 9071, *A. veronii sobria*. P1, *A. veronii sobria* P2, *A. veron* bv. *veronii*. P3, *A. veronii sobria* 3BH, *A. veronii sobria* 1, 7. *A. veronii sobria*. s. 2, *A. veronii sobria*. 3, *A. veronii sobria*. 4, 10. *A. veronii sobria*, 5, *A. veronii sobria* 13A, *A. veronii sobria* 43, 13A. *veronii sobria* 7И, 14. *A. veronii* bv *sobria* 8B, *A. veronii sobria* 9B3, К-. отрицательный контроль, М - маркер.

Биологическое исследование, проведенное на выделенных культурах, идентифицированных как *A. veronii*, не дало положительных результатов, используемая в экспериментах рыба в течение 10 суток не погибла. Явно выраженных признаков заболевания аэромоназом зафиксировано не было.

Идентификация бактерий *Aeromonas hydrophila*

Были проведены исследования по идентификации штаммов бактерий, которые на селективных средах имели рост колоний, характерный для *Aeromonas hydrophila*. Результаты исследований сведены в таблицу 8. Изучение биологических свойств выделенных штаммов бактерий свидетельствует о том, что они имеют характеристики, сходные с физиологическими характеристиками референс-штамма и полевых штаммов из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, представленные в таблице 2.

Проведенные исследования позволили выделить 8 новых штаммов *A. hydrophila* из проб воды из открытых водоемов.

Все 8 штаммов *Aeromonas hydrophila* - это грамотрицательные, подвижные оксидазоположительные палочки, ферментирующие лизин- и аргининдекарбоксилазу, растущие в широком температурном диапазоне ($t +20-42^{\circ}\text{C}$). Штаммы (100 %) были положительны в реакции Фогеса-Проскауэра, росли при 3 % NaCl, продуцировали нитраты и 2-кетоглюконат, утилизировали сукцинат и глутамат натрия, пролин-L, β -аланин, тирозин-L и L-метионин. Была отмечена положительная реакция у всех 8 изолятов на желатиназу и β -гемолиз, при ферментации глюкозы, мальтозы, маннитола, сахарозы. Положительный тест на ДНКазу. Из 8 штаммов ни один штамм не давал положительную реакцию на цитратном агаре Кристенсена и на среде Симмонса. 25 % штаммов были способны к ферментации лактозы и 100 % - арабинозы. 100 % выделенных изолятов продуцировали фенилаланин.

Таблица 7 – Физиолого-биологические свойства бактерий *Aeromonas hydrophila*

Свойство		<i>Aeromonas</i> N=8								
		<i>A. hydrophila</i> 11	<i>A. hydrophila</i> 12	<i>A. hydrophila</i> 13	<i>A. hydrophila</i> 14	<i>A. hydrophila</i> 15	<i>A. hydrophila</i> 16	<i>A. hydrophila</i> 17	<i>A. hydrophila</i> 18	«%» + реакция
1.	Окраска по Граму	-	-	-	-	-	-	-	-	0
2.	Подвижность	+	+	+	+	+	+	+	+	100
3.	Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
4.	Фогеса-Проскауэра	+	+	+	+	+	+	+	+	100
5.	Рост при 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	100
6.	Рост при 5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	0
7.	Продукция нитратов	+	+	+	+	+	+	+	+	100
8.	Образование пигмента	-	-	-	-	-	-	-	-	0
9.	Ацетат	-	-	-	-	-	-	-	-	0
10.	Индол	-	-	-	-	-	-	-	-	0
11.	Среда Симмонса на цитрат	-	-	-	-	-	-	-	-	0
12.	Среда Кристенсена на цитрат	-	-	-	-	-	-	-	-	0
13.	Уреазный агар Кристенсена	-	-	-	-	-	-	-	-	0
14.	ДНКаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
15.	Окраска по Граму	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.	Желатиназа	+	+	+	+	+	+	+	+	100
17.	О/Ф глюкозы	-	-	-	-	-	-	-	-	0
18.	Лактоза	+	-	+	-	-	-	-	-	25
19.	Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
20.	Маннит	+	+	+	+	+	+	+	+	100
21.	Рамноза	-	-	-	-	-	-	-	-	0
22.	Сорбит	-	-	-	-	-	-	-	-	0
23.	Салицин	-	-	-	-	-	-	-	-	0
24.	Ксилоза	-	-	-	-	-	-	-	-	0
25.	Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
26.	Арабиноза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
27.	Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
28.	Аргениндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100

Свойство		Aeromonas N=8								
		<i>A. hydrophila 11</i>	<i>A. hydrophila 12</i>	<i>A. hydrophila 13</i>	<i>A. hydrophila 14</i>	<i>A. hydrophila 15</i>	<i>A. hydrophila 16</i>	<i>A. hydrophila 17</i>	<i>A. hydrophila 18</i>	«%» + реакции
29.	Орнитиндекабоксилаза	–	–	–	–	–	–	–	–	0
30.	20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	100
31.	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	100
32.	35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	100
33.	β-гемолиз	+	+	+	+	+	+	+	+	100
34.	DL-лактат	+	+	+	+	+	+	+	+	100
35.	2-кетоглюконат	+	+	+	+	+	+	+	+	100
36.	фенилаланин	+	+	+	+	+	+	+	+	100
37.	Ацетамид	–	–	–	–	–	–	–	–	0
38.	β-глюкозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
39.	N - ацетил - β- D- глюкозаминидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
40.	Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
41.	α- галактозидаза	–	–	–	–	–	–	–	–	0
42.	β- галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
43.	Малонат	–	–	–	–	–	–	–	–	0
44.	Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
45.	Целлобиоза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
46.	γ-глутамилтрансфераза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
47.	Фосфатаза	+	+	+	+	+	+	+	+	100
48.	Эскулин	+	+	+	+	+	+	+	+	100
49.	Сукцинат натрия	+	+	+	+	+	+	+	+	100
50.	Глутамат натрия	+	+	+	+	+	+	+	+	100
51.	Пролин -L	+	+	+	+	+	+	+	+	100
52.	β- Аланин	+	+	+	+	+	+	+	+	100
53.	L-метионин	+	+	+	+	+	+	+	+	100
54.	LB-агар с 320 мг/л теллурида калия	–	–	–	–	–	–	–	–	0

В результате исследования установлено, что 100 % штаммов положительны на β-галактозидазу, 0 % - на α- галактозидазу, 100 % - способны продуцировать β-аланин, 100% γ-глутамилтрансферазу, 100 % штаммов продуцировали фосфатазу.

Следующим этапом исследования был подтверждена родовая принадлежность. На основе указанных ранее праймеров было установлено,

что все выделенные изоляты обладают участком гена, кодирующего аэролизин (*aerA*) (рис. 42).

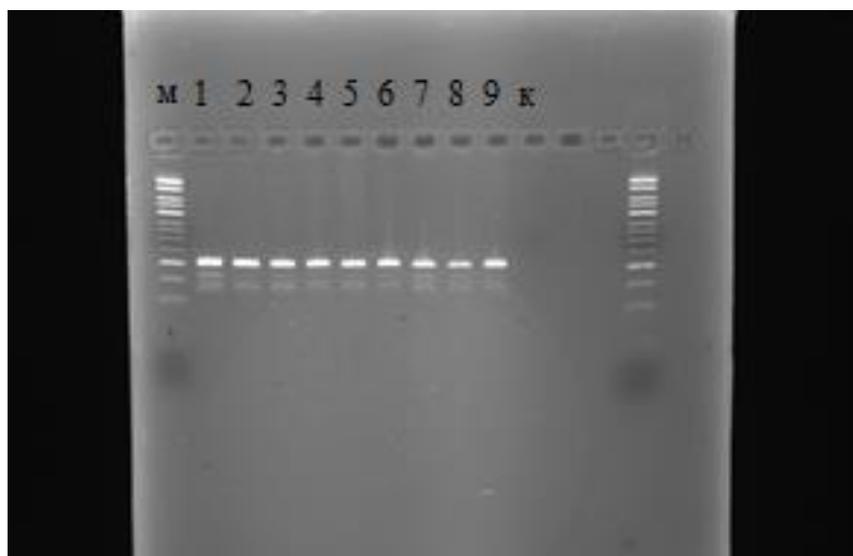


Рисунок 42 - Результат амплификации участка гена *aerA* с подобранными праймерами 1- *A. hydrophila* ATCC 49140, 2- *A. hydrophila* 11, 3 - *A. hydrophila* 12, 4 - *A. hydrophila* 13, 5 - *A. hydrophila* 14, 6 - *A. hydrophila* 15, 7 - *A. hydrophila* 16, 8 - *A. hydrophila* 17, 9 - *A. hydrophila* 18, к- контроль, м-маркер.

Биологическое исследование, проведенное на выделенных культурах, идентифицированных как *A. hydrophila*, не дало положительных результатов, используемая в экспериментах рыба в течение 10 суток не погибла. Явно выраженных признаков заболевания аэромонозом зафиксировано не было.

2.2.4 Изучение профилей чувствительности выделенных штаммов к антимикробным препаратам

В результате экспериментов было установлено, что штаммы бактерий *A. veronii*, как и представители *A. hydrophila* проявляют устойчивость к β-лактамным пенициллинам (амоксициллину, бензилпенициллину, ампициллину), слабо чувствительны к полимиксину, относящемуся к классу природных макролидов, как и к полусинтетическим макролидам, неомицину,

представителю амикликозидов, а также устойчивы к флуконазолу, мупироцину и линкомицину (табл. 9-11, рис.43).

Таблица 9 - Изучение антибиотикочувствительности бактерий вида

Aeromonas veronii

Наименование	Концентрация	A.veronii ATCC 9071	A. veronii bv.sobria 1	A. veronii bv.sobria P1	A. veronii bv.sobria 3	A. veronii bv.sobria 5	A. veronii bv.sobria 4	A. veronii bv.sobria P2	A. veronii bv.veronii P3	A. veronii bv.sobria 2
β-лактамы пенициллины										
Амоксициллин	20 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Бензилпенициллин	10 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ампициллин	10 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-лактамы цефалоспорины										
Цефтриаксон	30 мкг	25	27	23	22	26	27	25	26	29
Цефуросим	30 мкг	34	31	36	32	30	29	30	32	40
Природные макролиды										
Полимиксин	300 ед	17	11	12	13	11	12	11	11	15
Полусинтетические макролиды										
Кларитромицин	15 мкг	15	0	16	16	14	13	12	11	22
Доксициклин	20 мкг	17	15	10	13	14	16	14	13	17
Эритромицин	15 мкг	12	10	14	12	0	0	10	12	22
Аминогликозиды										
Амикацин	30 мкг	20	16	15	20	19	16	13	16	23
Неомицин	30 мкг	15	17	18	14	16	15	15	14	20
Гентамицин	10 мкг	19	16	16	25	12	14	12	16	21
Фторхинолоны										
Ломефлоксацин	10 мкг	25	21	21	29	28	22	23	24	35
Норфлоксацин	10 мкг	34	24	30	26	20	21	14	17	39
Производные нитрофуранов										
Фурадонин	300 мкг	17	13	16	17	14	14	0	11	24
Сульфаниламиды										
Триметоприм/Сульфаметоксозол	1,25/25,75 ед	16	14	17	12	16	20	11	16	24
Другие										
Флуконазол	40 мкг	9	15	13	0	0	0	0	0	9
Мупироцин	5 мкг	13	12	12	0	9	13	12	0	15
Линкозамиды										
Линкомицин	15 мкг	11	0	12	0	23	14	0	10	0

Таблица 10 - Изучение антибиотикочувствительности бактерий вида

Aeromonas veronii

Наименование	Концентрация						
		A. veronii bv. sobria 13A	A. veronii bv. sobria 9B3	A. veronii bv. sobria 43	A. veronii bv. sobria 3BH	A. veronii bv. sobria 7И	A. veronii bv. sobria 8B
β-лактамы пенициллины							
Амоксициллин	20 мкг	0	0	0	0	0	0
Бензилпенициллин	10 мкг	0	0	0	0	0	0
Ампициллин	10 мкг	0	0	0	0	0	0
β-лактамы цефалоспорины							
Цефтриаксон	30 мкг	34	38	31	31	36	38
Цефутоксим	30 мкг	26	25	23	21	28	25
Природные макролиды							
Полимиксин	300 ед	6	8	11	13	16	8
Полусинтетические макролиды							
Кларитромицин	15 мкг	4	9	5	13	13	9
Доксициклин	20 мкг	18	12	21	20	18	12
Эритромицин	15 мкг	3	12	15	11	11	12
Аминогликозиды							
Амикацин	30 мкг	0	0	19	17	19	0
Неомицин	30 мкг	4	17	15	15	13	17
Гентамицин	10 мкг	18	21	17	20	16	21
Фторхинолоны							
Ломефлоксацин	10 мкг	28	34	26	21	31	34
Норфлоксацин	10 мкг	26	36	24	26	29	36
Сульфаниламиды							
Триметоприм/Сульфаметоксазол	1,25/25,75 ед	12	17	18	18	12	17
Другие							
Флуконазол	40 мкг	12	0	8	12	0	0
Мупироцин	5 мкг	18	11	14	15	16	11
Линкозамиды							
Линкомицин	15 мкг	2	11	12	0	0	11

Ингибирующее действие на штаммы вида *A. veronii* оказывают β-лактамы цефалоспорины (цефутоксим, цефтриаксон) и фторхинолоны.

Таблица 11 – Результаты определения чувствительности штаммов бактерий рода *Aeromonas* к антимикробным препаратам

Наименование	Концентрация	<i>A. hydrophila</i> 11	<i>A. hydrophila</i> 12	<i>A. hydrophila</i> 13	<i>A. hydrophila</i> 14	<i>A. hydrophila</i> 15	<i>A. hydrophila</i> 16	<i>A. hydrophila</i> 17	<i>A. hydrophila</i> 18
β-лактамы пенициллины									
Амоксициллин	20 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0
Бензилпенициллин	10 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0
Ампициллин	10 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0
β-лактамы цефалоспорины									
Цефтриаксон	30 мкг	23	24	17	25	22	19	20	25
Цефуросим	30 мкг	26	27	19	23	26	21	22	27
Природные макролиды									
Полимиксин	300 ед	14	11	10	12	10	13	15	11
Полусинтетические макролиды									
Кларитромицин	15 мкг	0	20	16	12	17	15	9	17
Доксициклин	20 мкг	18	17	17	16	15	17	19	16
Эритромицин	15 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0
Аминогликозиды									
Амикацин	30 мкг	8	21	23	11	9	15	18	10
Неомицин	30 мкг	10	10	0	9	4	2	0	0
Гентамицин	10 мкг	11	0	0	0	0	3	4	2
Фторхинолоны									
Ломефлоксацин	10 мкг	22	21	32	30	24	28	26	27
Норфлоксацин	10 мкг	23	26	34	24	27	31	29	28
Производные нитрофуранов									
Фурадонин	300 мкг	18	12	14	17	19	15	16	17
Сульфаниламиды									
Триметоприм/ Сульфаметоксазол	1,25/25,75 ед	0	16	23	12	17	8	11	16
Другие									
Флуконазол	40 мкг	0	0	14	12	5	6	0	4
Мупироцин	5 мкг	4	0	0	0	5	0	3	0
Линкозамиды									
Линкомицин	15 мкг	0	0	0	0	0	0	0	0

Установлено, что штаммы *A. hydrophila* обладают резистентностью к β-лактамам пенициллинам, не устойчивы к мупироцину и эритромицину.

Бактерии *A. hydrophila* чувствительны к β -лактамным цефалоспорином, к ряду фторхинолонов (лемефлоксацину, норфлоксацину).

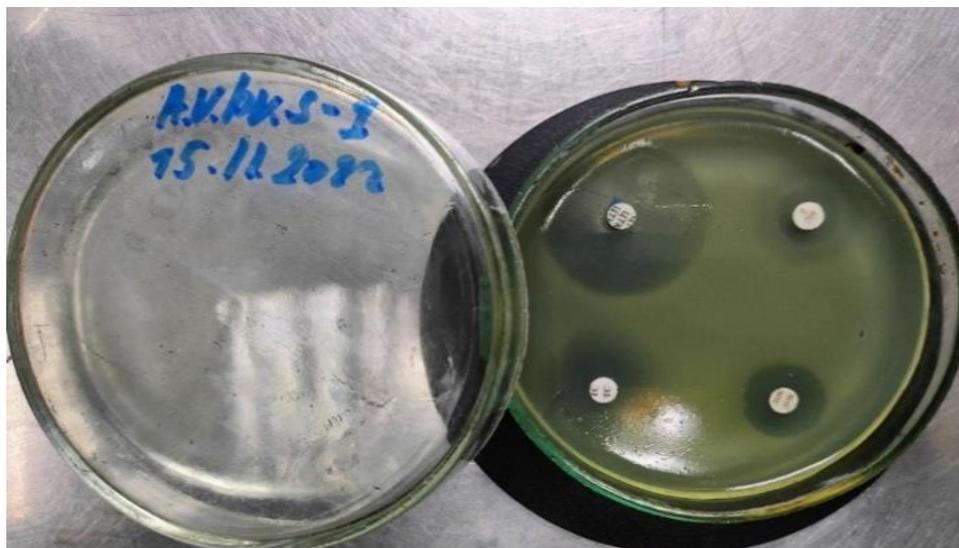


Рисунок 43 - Изучение антибиотикочувствительности штамма *A. veronii* *bv. sobria-1* (24 часа культивирования при температуре 30⁰C)

2.3 Разработка молекулярно-генетического компонента комплексной тест-системы для индикации и идентификации аэромонад

2.3.1 Разработка системы праймеров для детекции возбудителей аэромоноза методом ПЦР с электрофоретической детекцией

Основываясь на работе М А Yáñez· (2003), в качестве целевого гена нами был выбран ген домашнего хозяйства субъединице ДНК-гиразы В (*gyrB*) [214]. Подбор праймеров был выполнен на основе представленных геномов бактерий рода *Aeromonas* в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и на сайте Американской коллекции типовых культур (ATCC). Поиск и подбор специфичного участка был выполнен при помощи программы UGENE V 44.0 (<http://ugene.net>) и сайта NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Проверка сценичности примеров выполнена на ресурсе Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). В результате экспериментов

подобраны следующие праймеры: прямой праймер (F)
 CCAGAACAAGACCCCGATCC; обратный (R)
 GTCAGCGCGGTACGGAAAC.

Протокол амплификации был следующим:

1. предварительная денатурация-95⁰С в течении 5 минут, 1 цикл,
2. денатурация- 95⁰С в течение 5 сек,
3. отжиг- 60⁰С в течении 15 сек, 40 циклов.

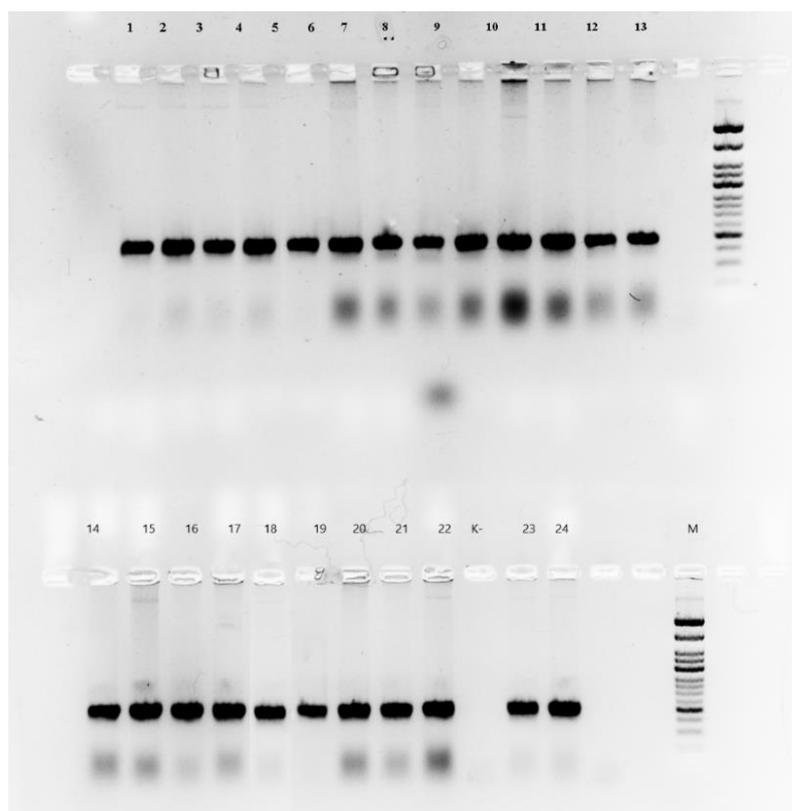


Рисунок 44 - Результат амплификации фрагмента гена субъединицы ДНК-гиразы В (*gyrB*), характерного для бактерий рода *Aeromonas*: референс-штаммы 1 - *A. salmonicida* ATCC 33568, 2 - *A. caviae* ATCC 15468, 3 - *A. veronii* ATCC 9071, 4 - *A. hydrophila* ATCC 49140) и штаммы, выделенные из объектов окружающей среды (5 - *Aeromonas* spp ЧР, 6 - *A. hydrophila* 11, 7 - *A. hydrophila* 12, 8 - *A. hydrophila* 13, 9 - *A. hydrophila* 14, 10 - *A. hydrophila* 15, 11 - *A. hydrophila* 16, 12 - *A. hydrophila* 17, 13 - *A. hydrophila* 18, 14 - *Aeromonas* spp M1, 15 - *A. veronii* bv.sobria 1, 16 - *A. veronii* bv.sobria 2, 17 - *A. veronii* bv.sobria 3, 18 - *A. veronii* bv.sobria 4, 19 - *A. veronii* bv.sobria 5, 20 - *A. veronii* bv.sobria P1, 21 - *A. veronii* bv.sobria 43, 22 - *A. veronii* bv.sobria P2, 23 - *A. veronii* bv.veronii P3, 24 - *A. hydrophila* A1

В качестве положительных контролей выступали референс – штаммы: *A. salmonicida* ATCC 33568, *A. caviae* ATCC 1546, *A. veronii* ATCC 9071, *A. hydrophila* ATCC 49140). В качестве отрицательных контролей выступали нуклеиновые кислоты следующих бактерий: *Alcaligenes spp* B-5269, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Salmonella enterica* ATCC 130763, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

После выполнения амплификации и электрофорезирования, было установлено что все находящиеся в коллекции штаммы относятся к роду *Aeromonas*, результаты амплификации ряда штаммов представлены на рисунке 44.

Разработанная система праймеров для детекции возбудителей аэромоноза методом ПЦР с электрофоретической детекцией результата амплификации позволит выполнить родовую идентификацию штаммов *Aeromonas*, основанную на детекции участка гена «домашнего хозяйства» субъединице ДНК-гиразы В (*gyrB*).

2.3.2 Разработка праймерных ПЦР - систем в режиме «реального времени» для индикации и идентификации бактерий рода *Aeromonas*

Следующим этапом работы был произведён поиск *in-silico* таргентных участков геномов бактерий *Aeromonas spp* для создания систем праймеров для видовой идентификации в «режиме реального времени» следующих видов: *A. hydrophila*, *A.veronii*, *A.salmonicida*, *A. caviae*. Были выбраны эти виды потому, что они являются одними из основных представителей рода *Aeromonas*, которые вызывают инфекционные процессы как у животных, в частности, рыб, так и человека.

После представления геномов были проанализированы основные гены, используемые для видовой типизации бактерий данного рода: *atpD* , *cpn60* , *dnaJ* , *dnaK* , *dnaX* , *gltA* , *gyrA* , *gyrB* , *mdh* , *metG* , *ppsA* , *radA* , *recA* , *rpoB* ,

rpoD, *tsf* и *zipA* [55, 66, 215]. Для детекции видов бактерий *A. hydrophila* при помощи метода в ряде статей используется ген, кодирующий аэролизин (*aerA*) [216]. В качестве целевых регионов геномов для идентификации бактерий *A. caviae* и *A. veronii*, был использован ген, кодирующий белок клеточного деления *zipA*, который стабилизирует протофиламенты *FtsZ* путем их поперечного связывания и служит якорем цитоплазматической мембраны для Z-кольца, также необходим для рекрутирования в септальное кольцо нижестоящих белков клеточного деления.

Первым этапом исследования была выполнена проверка специфичности подобранных праймерных систем, в качестве контролей выступали как штаммы представителей рода *Aeromonas*, так и ряд бактерий-ассоциантов: *Alcaligenes spp B-5269*, *Acinetobacter calcoaceticus B-5971*, *Escherichia coli K12*, *Klebsiella pneumoniae C6*, *Salmonella enterica ATCC 130763*, *Yersinia enterocolitica ATCC 23715*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538-P*, *Enterococcus faecalis ATCC 29212*.

Таблица 12 - Разработанные системы праймеров для идентификации бактерий рода *Aeromonas* в режиме «реального времени»

Название бактерии	Целевой ген	Праймеры	Длина продукта
<i>A. hydrophila</i>	<i>aerA</i>	Прямой праймер AAGCCCGCCCAGGTCATT	161 п.н.
		Обратный праймер TATTCGGGAGCGGCAACC	
		Зонд FAM TGCAACCGCTGGACGAAGAG BHQ1	
<i>A. veronii</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер GCGACAGCCCCGACTTT	107 п.н.
		Обратный праймер CGGGGCTGCGGCTGATA	
		Зонд HEXCAGAGACAGTCCGTACCGCC BHQ2	
<i>A. caviae</i>	<i>zipA</i>	Прямой праймер TTGCCGCCCTGTTGAA	246 п.н.
		Обратный праймер CGTCATCGTAAGCGGGCTCT	
		Зонд FAM GCACAGGTGATCCGCCGTA BHQ1	

Таблица 13 - Определение расстояние Хеминга у представителей рода

Aeromonas по гена *zipA*

NZ_CP084358.1:1983 433-1984548 Aeromonas encheleia	NZ_LR134376.1:34223 05-3423417 Aeromonas encheleia	NZ_CDCE01000020.1:3 90297-391421 Aeromonas diversa	NZ_CP084351.1:1244 283-1245404 Aeromonas dhakensis	NZ_AF022254.1:33331 424-3332554 Aeromonas caviae	NZ_NXB001000000.1:1 312237-313331 Aeromonas bivalvium	NZ_PPUX01000003.1:1 59702-160826 Aeromonas bestiarum	NZ_CDDH01000009.1: 28416-29579 Aeromonas australiensis	NZ_JRGL01000005.1:5 6779-57912 Aeromonas aquatica	NZ_CP065745.1:36953- 81222 Aeromonas allosaccharophila	
621	776	708	571	816	633	817	521	818	0	allosaccharophila strain EDAABGOS_933
812	462	783	787	466	773	499	802	0	818	aquatica strain AE235
643	800	708	565	813	661	818	0	802	521	Aeromonas australiensis strain_CECT_8023
799	535	785	801	512	753	0	818	499	817	Aeromonas bestiarum strain GA97-22
636	783	665	628	753	0	753	661	773	633	strain Z119-2 NOTE: 1. length 4612
786	473	802	796	0	753	512	813	466	816	21-3332554 Aeromonas caviae strain WP8-S18- 8-1245404 Aeromonas dhakensis strain 71431
625	793	689	0	796	628	801	565	787	571	Aeromonas diversa CDC strain_134376
691	760	0	689	802	665	785	708	783	708	encheleia strain NCTC12017
787	0	760	793	473	783	535	800	462	776	3-1984548 Aeromonas enteropelogenes strain
0	787	691	625	786	636	799	643	812	621	Aeromonas eurenophila strain_CECT_4224
611	763	693	607	817	655	804	635	781	622	finlandensis strain 1282D contig46_subole
615	805	713	565	824	657	813	599	816	579	Aeromonas fluvialis strain_LMG_24681
791	522	795	790	446	777	509	820	459	819	hydrophila strain EDAABGOS_916
807	315	778	796	508	769	508	791	514	792	landaei strain EDAABGOS_986
792	532	802	809	532	779	498	811	516	810	laevis strain AE122 Contig154_subole
790	534	805	810	538	777	493	813	515	811	6-3296023 Aeromonas media strain TR3_1
793	469	791	804	328	762	516	805	448	811	Aeromonas multisequans_848
821	547	784	785	441	762	542	797	575	817	Aeromonas piscicola strain_LMG_24783
625	771	471	551	806	631	806	569	808	583	Aeromonas popoffii strain_CIP_105493
623	762	476	566	797	632	796	572	796	591	Aeromonas rivipollensis strain G78
610	777	691	480	792	632	808	633	776	594	3-3181495 Aeromonas rivuli strain 20-VB00005
799	541	785	776	589	780	542	814	551	826	213748 Aeromonas salmonicida strain SRW-
626	777	706	570	808	635	818	605	798	581	Aeromonas sanarellii strain_LMG_24682
622	785	695	554	816	596	796	590	801	583	Aeromonas schubertii strain ATCC_43700
772	531	778	765	524	755	510	770	541	773	-692345 Aeromonas simiae strain A6
660	783	597	664	784	659	753	680	759	647	Aeromonas sobria strain CECT_4245_subole
629	813	707	601	832	665	820	621	829	626	Aeromonas taiwanensis strain_LMG_24683
615	781	700	474	804	595	800	602	794	597	Aeromonas tecta strain CECT_7082_subole
767	292	793	795	492	768	525	773	483	789	veroni strain EDAABGOS_632
617	767	706	566	815	642	809	519	817	42	

NZ_JAMILA010000011 1:154088-155215 Aeromonas rivipollensis	NZ_CDBI010000791:1 118439-119563 Aeromonas popoffii	NZ_CDBI010000341 1:20874-22004 Aeromonas piscicola	NZ_AQFO01000038 1:20874-22004 Aeromonas	896-3296023 Aeromonas media strain TR3_1	NZ_IRGM010001541:5 8484-59632 Aeromonas lacus	NZ_CP066092.1:111189 9-1113047 Aeromonas landaei	NZ_CP065651.1:396476 3-3965875 Aeromonas hydrophila	NZ_IRGK010000461:1 83705-84841 Aeromonas fluvialis	NZ_CDBO01000074.1 83705-84841 Aeromonas fluvialis	NZ_IRGK010000046.1:1 9500-20699 Aeromonas finlandensis	NZ_CDDF01000005.1:1 47100-148233 Aeromonas eutrophenila	
594	591	583	817	811	811	810	792	579	819	579	622	
776	796	808	575	448	515	516	514	459	459	816	781	
633	572	569	797	805	813	811	791	820	820	599	635	
808	796	806	542	516	493	498	508	509	509	813	804	
632	632	631	762	762	777	779	769	777	777	657	655	
792	797	806	441	328	538	532	508	446	446	824	817	
480	566	551	785	804	810	809	796	790	790	565	607	
691	476	471	784	791	805	802	778	795	795	713	693	
777	762	771	547	469	534	532	315	522	522	805	763	
610	623	625	821	793	790	792	807	791	791	615	611	
616	612	600	830	805	810	812	781	799	799	624	0	
598	507	494	802	817	844	842	810	829	829	0	624	
797	796	805	570	439	516	514	471	0	0	829	799	
779	764	770	559	486	527	524	0	471	471	810	781	
812	798	807	553	527	22	0	524	514	514	842	812	
809	797	806	548	533	0	22	527	516	516	844	810	
772	792	804	571	0	533	527	486	439	439	817	805	
808	791	799	0	571	548	553	559	570	570	802	830	
598	44	0	799	804	806	807	770	805	805	494	600	
600	0	44	791	792	797	798	764	796	796	507	612	
0	600	598	808	772	809	812	779	797	797	598	616	
779	794	804	505	559	569	573	540	563	563	816	787	
362	440	429	803	801	811	814	770	792	792	504	610	
596	473	467	824	811	799	800	776	807	807	497	323	
775	769	779	540	515	536	536	525	557	557	795	760	
673	690	686	785	780	773	770	771	756	756	683	670	
627	500	488	816	832	842	840	803	833	833	503	620	
462	572	563	819	790	812	812	781	803	803	600	349	
769	782	792	537	495	533	536	499	538	538	793	776	
595	589	580	818	809	809	808	794	818	818	580	620	

NZ_CP04060.1:4363646-4364815 Aeromonas veronii	NZ_CDCA01000045.1:173130-174245 Aeromonas tecta	NZ_CDD01000100.1:68269-69402 Aeromonas taiwanensis	NZ_CDBW01000016.1:143105-144319 Aeromonas sobria	NZ_CP040449.1:691266-692345 Aeromonas simiae	NZ_LPUO01000023.1:127865-128965 Aeromonas schubertii	NZ_CDBN01000007.1:21526-22659 Aeromonas sanarellii	NZ_CP051883.1:212621-213748 Aeromonas salmonicida	NZ_CP079742.1:3180353-3181495 Aeromonas rivuli	Alloisaccharophila strain
42	789	597	626	647	773	583	581	826	
817	483	794	829	759	541	801	798	551	Aeromonas aquatica strain_AE2335_cantif5
519	773	602	621	680	770	590	605	814	Aeromonas australiensis strain
809	525	800	820	753	510	796	818	542	Aeromonas bestiarum strain GA97-22
642	768	595	665	659	755	596	635	780	Strain Z119-2
815	492	804	832	784	524	816	808	589	Strain J119-2
566	795	474	601	664	765	554	570	776	Aeromonas caviae strain_MK8_S18
706	793	700	707	597	778	695	706	785	Aeromonas dhakensis
767	292	781	813	783	531	785	777	541	Aeromonas encheleia strain_MK101_0417
617	767	615	629	660	772	622	626	799	Aeromonas aeromonas strain
620	776	349	620	670	760	323	610	787	Aeromonas eucerephila strain
580	793	600	503	683	795	497	504	816	Aeromonas finlandensis strain
818	538	803	833	756	557	807	792	563	Aeromonas fluviatilis strain_LMG_24681
794	499	781	803	771	525	776	770	540	Aeromonas hydrophila strain
808	536	812	840	770	536	800	814	573	Aeromonas jandaei strain
809	533	812	842	773	536	799	811	569	Aeromonas lacus strain_AE122_Capitel54
809	495	790	832	780	515	811	801	559	Aeromonas media strain_TR3_1
818	537	819	816	785	540	824	803	505	Aeromonas aeromonas strain
580	792	563	488	686	779	467	429	804	Aeromonas piscicola strain_LMG_24783
589	782	572	500	690	769	473	440	794	Aeromonas popoffii strain_CPT_105403
595	769	462	627	673	775	596	362	779	Aeromonas Fyvipollensis strain G78
824	544	783	824	789	542	791	791	0	Aeromonas rivuli strain_ZH1040005
581	779	592	525	665	798	467	0	791	salmonicida strain_SPRAY_OG1
587	792	232	507	661	782	0	467	791	Aeromonas sanarellii strain
779	523	763	799	751	0	782	798	542	Aeromonas schubertii strain ATCC 43700
656	785	689	695	0	751	661	665	789	66-692345 Aeromonas simiae strain A6
626	815	609	0	695	799	507	525	824	Aeromonas sobria strain_CECT_4245
598	782	0	609	689	763	232	592	783	Aeromonas taiwanensis strain
781	0	782	815	785	523	792	779	544	Aeromonas tecta strain_CECT_7087_subole
0	781	598	626	656	779	587	581	824	Aeromonas veronii strain

Для постановки реакции полимеразной цепной реакции был использован следующий протокол:

1. предварительная денатурация-95⁰С в течении 5 минут, 1 цикл,
2. денатурация - 95⁰С в течение 5 сек,
3. отжиг- 60 ⁰С в течении 15 сек, 50 циклов.

Было установлено, что разработанные праймерные системы были эффективны в отношении штаммов бактерий *A. veronii* *A. caviae* и *A. hydrophila*, включая те штаммы, что были выделены из объектов санитарного надзора. Чувствительность разработанных систем составила 1,25 пг/мкл (рис. 46-47).

Number of the well	ID of the tube	Cp, Fam	Result
B1	C- (60-40)		-
B2	A. hydr ATCC 49140 8 dilution		-
B3	A. hydr ATCC 49140 7 dilution		-
B4	A. hydr ATCC 49140 6 dilution		-
B5	A. hydr ATCC 49140 5 dilution		-
B6	A. hydr ATCC 49140 4 dilution	34,1	+
B7	A. hydr ATCC 49140 3 dilution	32,3	+
B8	A. hydr ATCC 49140 2 dilution	30,9	+
B9	A. hydr ATCC 49140 1 dilution	28,1	+

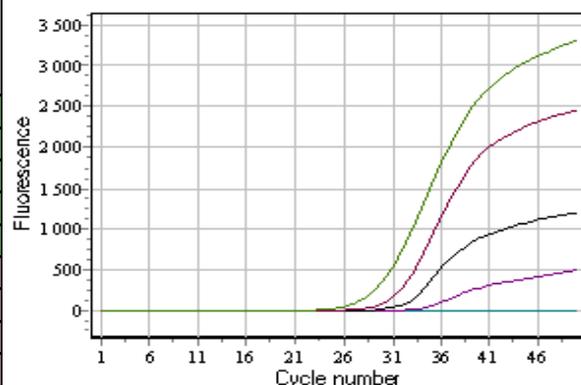


Рисунок 45 - Изучение чувствительности разработанной ПЦР тест-системы для детекции и идентификации бактерий рода *Aeromonas hydrophila* (детекция по каналу FAM)

Number of the well	ID of the tube	Cp, Fam	Result
A2	A.caviae ATCC 15468 1dil	25,5	+
A3	A. caviae ATCC 15468 2	30,1	+
A4	A. caviae ATCC 15468 3	33,3	+
A5	A. caviae ATCC 15468 4	35,4	+
A6	A. caviae ATCC 15468 5		-
A7	A. caviae ATCC 15468 6		-
A8	A. caviae ATCC 15468 7		-
A9	A. caviae ATCC 15468 8		-
A10	C- (60-40)		-

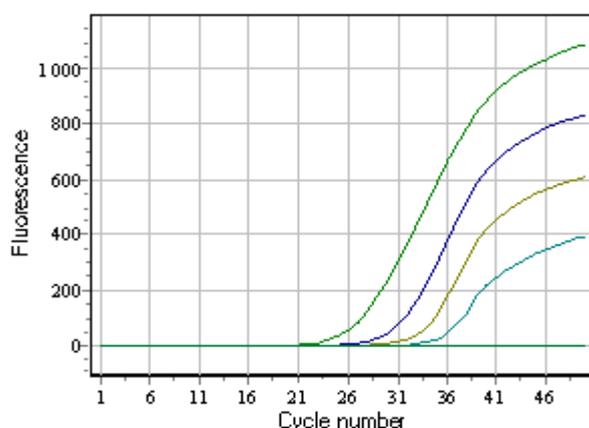


Рисунок 46 - Изучение чувствительности разработанной ПЦР тест-системы для детекции и идентификации бактерий рода *Aeromonas caviae* (детекция по каналу FAM)

Number of the well	ID of the tube	Ct, Hex	Result
D2	A, veronii ATCC9071 1 dilution	19,4	+
D3	A, veronii ATCC9071 2 dilution	26,7	+
D4	A, veronii ATCC9071 3 dilution	30,3	+
D5	A, veronii ATCC9071 4 dilution	32,2	+
D6	A, veronii ATCC9071 5 dilution		-
D7	A, veronii ATCC9071 6 dilution		-
D8	A, veronii ATCC9071 7 dilution		-
D9	A, veronii ATCC9071 8 dilution		-
D10	C-		-

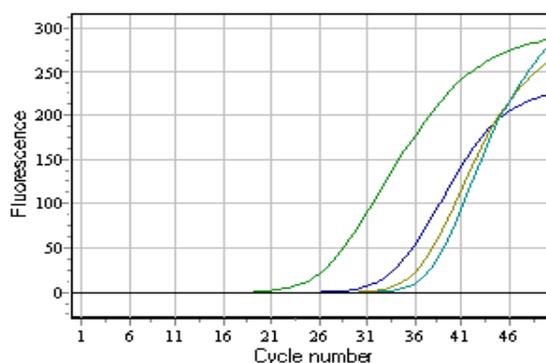
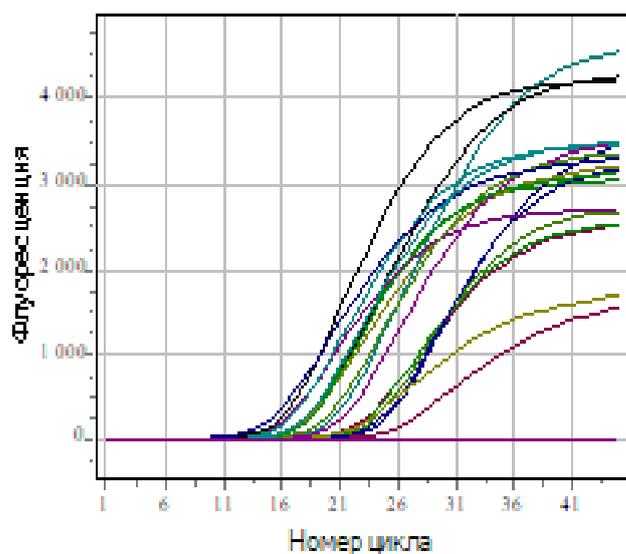


Рисунок 47 - Изучение чувствительности разработанной ПЦР тест-системы для детекции и идентификации бактерий рода *Aeromonas veronii* (детекция по каналу HEX)

Однако, штаммы *Aeromonas spp ЧР*, *Aeromonas spp М1*, *Aeromonas spp 43* не были идентифицированы до вида ни одной из разработанных систем праймеров. Стоит отметить, что у них был выявлен фрагмент гена, фланкируемый праймерной системой, детектирующей аэролизин, характерный для выделенной филогенетической группы аэромонад. Это было уставлено при помощи праймеров (F-GATGGCGATGGCTGGGTGAT, R- TGGCGATCAGACTGGGTTCAC).

Была проведена апробация предложенной ПЦР-тест-системы с детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени» для типирования выделенных в ходе резализации проекта штаммов бактерий *A. hydrophila*, *A. veronii*. Результаты апробации представлены на рисунках 48-49. Детекцию результата аппликации снимали по следующим каналам: по каналу Fam детектировались реакция праймеров на *A. hydrophila*, по каналу Hex - *A.veronii*.



Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Нех
B2	<i>A.veronii</i> _1	17,1
B3	<i>A.veronii</i> _2	23,9
B4	<i>A.veronii</i> _1	17,0
B5	<i>A.veronii</i> _4	19,5
B6	<i>A.veronii</i> _5	15,3
B7	<i>A.veronii</i> _21	17,4
B8	<i>A.veronii</i> _P1	21,8
B9	<i>A.veronii</i> _P2	22,6
C2	<i>A.veronii</i> _3BH	22,0
C3	<i>A.veronii</i> _13A	23,5
C4	<i>A.veronii</i> _43	20,9
C5	<i>A.veronii</i> _P3	15,7
C6	<i>A.veronii</i> _8B	20,4
C7	<i>A.veronii</i> _9B3	15,6
C8	<i>A.veronii</i> _13A	24,2
C9	<i>A.veronii</i> _3BH	18,8
D2	<i>A.veronii</i> _21	17,4
D3	<i>A.veronii</i> _5	14,2
D5	K+	17,0
D6	K-	-

Рисунок 48 - Результаты амплификации штаммов *Aeromonas veronii* при помощи разработанной ПЦР тест- системы в режиме «реального времени» для детекции *A. veronii*

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam
A1	<i>A. hydrophila</i> 11	34,9
A2	<i>A. hydrophila</i> 12	35,4
A3	<i>A. hydrophila</i> 13	32,4
A4	<i>A. hydrophila</i> 14	32,9
A5	<i>A. hydrophila</i> 15	25,1
A6	<i>A. hydrophila</i> 16	33,5
A7	<i>A. hydrophila</i> 17	26,6
A8	<i>A. hydrophila</i> A1	25,7
A9	<i>A. hydrophila</i> A 18	25,9
A10	<i>A. hydrophila</i> pA	27,2
B1	K-	
B2	K+	36,6

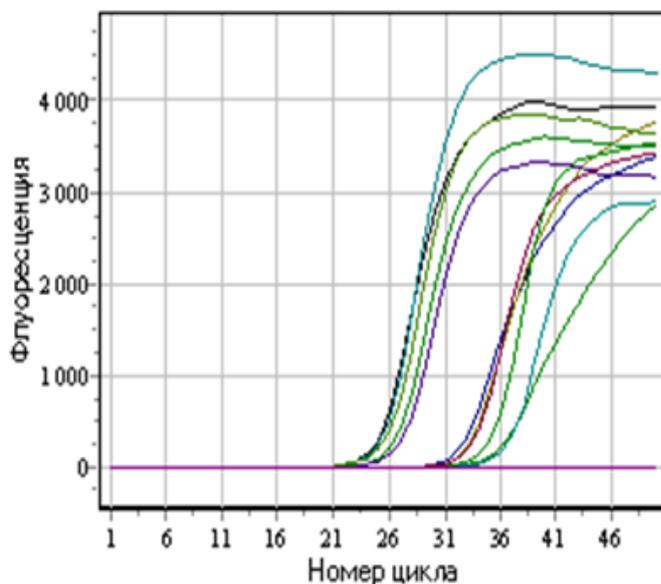


Рисунок 49 - Результаты амплификации штаммов *Aeromonas hydrophila* при помощи разработанной ПЦР тест- системы в режиме «реального времени» для детекции *A. hydrophila*

В результате исследований нами было установлено, что при помощи разработанных мПЦР-РВ для детекции и идентификации бактерий представителей рода *Aeromonas* получилось типировать 14 штаммов *A.veronii* (показатель Ср варьирует у штаммов от 14,2 до 24,2) и 8 штаммов *A. hydrophila* (показатель Ср варьирует у штаммов от 25,1 до 35,4).

Предложенные праймерные системы позволят сократить время для индикации и идентификации штаммов видов бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii*. Время проведения исследования с предварительной пробоподготовкой составит 4 часа.

2.3.3 Разработка системы LAMP для индикации и идентификации бактерий рода *Aeromonas*

Метод LAMP основан на автоматическом цикле синтеза ДНК цепи со смещением при использовании ДНК-полимераз с высокой активностью смещения и четырех (шести) специально созданных праймеров. Четыре праймера сконструированы таким образом, чтобы быть нацеленными на шесть определенных регионов гена-мишени. Последние обозначаются как F3с, F2с и F1с на 3'-конце и B1с, B2с и B3с на 5'-конце. Различают внешние (Outer) и внутренние (Inner) праймеры. Первый внешний праймер F3 (Forward Outer Primer) состоит из F3 региона, который комплементарен F3с фрагменту гена-мишени. Вторым внешним праймером B3 (Backward Outer Primer) состоит из B3 региона, который комплементарен B3с участку гена-мишени. Третий праймер - внутренний FIP (Forward Inner Primer) содержит F2 фрагмент на 3'-конце, который комплементарен F2с, а также такую же последовательность, как и F1с регион ДНК мишени на 5'-конце. Четвертый праймер BIP (Backward Inner Primer) также является внутренним и состоит из региона B2 на 3'-конце и такой же последовательности, как и B1с регион на 5'-конце.

Этапы метода LAMP показаны на рисунке 50. Реакция протекает в изотермических условиях, так как денатурация цепей происходит за счет их смещения. Сама реакция инициируется внутренними праймерами, содержащими смысловые и бессмысленные последовательности ДНК мишени. При рабочей температуре F2 регион внутреннего праймера F1P гибридизируется с мишенью, и цепь достраивается с помощью ДНК-полимеразы. Затем внешний праймер F3 присоединяется к F3c фрагменту мишени, и полимеразы достраивает цепь, при этом смещая только что синтезированную последовательность. Смещенная цепь формирует петлеобразные структуры на 5'-конце, так как F1c участок гибридизируется с F1 регионом. На 3'-конце праймеры также гибридизируются с мишенью, и в итоге получается новая цепь с петлеобразными структурами на обоих концах. С такой, похожей на гантель ДНК начинается второй этап – цикл экспоненциальной амплификации. Цепи с несколькими инвертированными повторяющимися последовательностями ДНК мишени могут быть синтезированы благодаря повторениям процессов достраивания и смещения цепей. В целях осуществления детекции «в реальном времени» по оптическому каналу, в систему вводились следующие дополнения: модификация 5'-конца праймера F1P (B1P) гасителем флуоресценции (BHQ1/BHQ2) и использование дополнительного зонда Fd (Bd), комплементарного F1c (B1c) участку праймера F1P (B1P) с модификацией 3'-конца красителем флуоресценции (FAM/HEX/ROX/Cy5).

На первом этапе подбора праймеров для LAMP необходимо на примере модельной системы, в качестве которой была выбрана мишень контроля взятия материала (она же эндогенный внутренний контроль), разработать универсальную концепцию для успешного подбора праймеров на все ДНК-мишени, являющимися маркерными последовательностями рассматриваемых микроорганизмов.

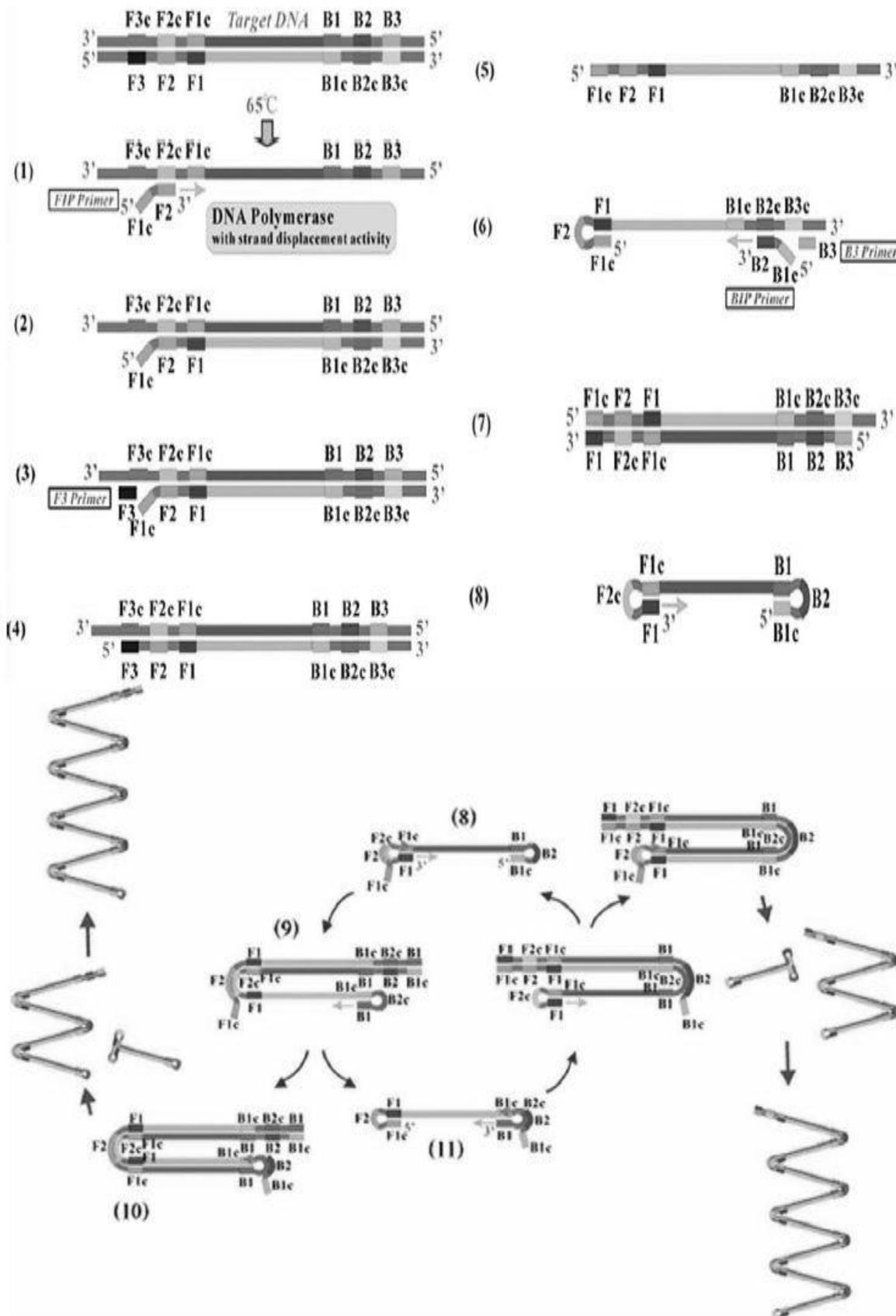


Рисунок 50 - Этапы LAMP

Учитывая особенности LAMP, для разработки концепции подбора праймеров был составлен ряд критериев:

1. температуры плавления F3/B3, F2/B2 (в составе FIP/BIP)
2. температуры плавления F1c/B1c (в составе FIP/BIP), Fd,
3. энергия dG dimer(minimum),
4. расстояние между 3'-концом F3 (B3) и F2(B2)-участка праймера FIP (BIP) со стороны 5',
5. расстояние между 3'-концом F2(B2)-участка праймера FIP (BIP) и ближайшим к нему концом региона F1c (B1c) на матрице,
6. расстояние между ближайшими друг к другу концами участков F1c и B1 на матрице,
7. наличие дополнительной вставки между F1c и F2 в составе FIP (B1c и B2 в составе BIP),
8. наличие/отсутствие в системе Loop праймеров LF и LB,
9. расстояние между 3'-концом праймера LF (LB) и 3'-концом участка F2 (B2) в составе FIP (BIP),
10. расстояние между 5'-концом праймера LF (LB) и ближайшим концом участка F1c (B1) на матрице,
11. средний GC-состав праймеров.

В качестве таргетных участков ДНК для детекции бактерий *A. hydrophila*, *A. veronii* и *A. caviae* были использованы аналогичные гены, что и при создании ПЦР тест-системы, в качестве целевых регионов геномов для идентификации *A. caviae* и *A. veronii* использован ген, кодирующий белок клеточного деления *zipA*, *A. hydrophila* -*aerA*. Для подбора праймеров петлевой изотермической амплификации был использован NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com/#/>). В результате работы были подобраны праймеры, представленные на рисунках 51-53.

	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dG	3' dG	% GC	(required oligos are orange)
F3	3	17	15	59.64	- 6.94	- 5.24	67	TGCCGAGCCCAAGCT
B3	170	186	17	59.19	- 5.79	- 6.07	59	CGGTTCGTCGAACGCTT
FIP			36					TCAAAGGCGGGGACGGC AG GCGCAGTGAAGAGAGCC
BIP			38					AGATGACGAGGACGATCT GCCG ACAGGAGGCGGCGGAA
F1c	59	77	19	66.92	- 4.02	- 7.02	68	TCAAAGGCGGGGACGGC AG
B1c	84	105	22	65.74	- 4.15	- 7.02	59	AGATGACGAGGACGATCT GCCG

Рисунок 51 - Список праймеров для создания протокола постановки LAMP для детекции *A. veronii*

	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dG	3' dG	% GC	(required oligos are orange)
F3	24	39	16	60.2 9	- 6.4 7	- 5.3 1	69	CTCGGGGGCTGCATGA
B3	18 9	20 6	18	59.2 7	- 5.3 5	- 5.5 1	61	CAGGTCATTCGCCGTACC
FIP			36					CGCGACCGCACCCACTTT GTATTCGGGAGCGGCAA C
BIP			34					GCTCGACCAGCGGCTCTT TCCACCGTTCCCCTCC
F1c	94	11 1	18	65.1 2	- 7.3 6	- 4.1 6	67	CGCGACCGCACCCACTTT
B1c	11 9	13 6	18	64.0 1	- 6.2 8	- 5.0 9	67	GCTCGACCAGCGGCTCTT

Рисунок 52 - Список праймеров для создания протокола постановки LAMP для детекции *A. hydrophila*

Как было отмечено ранее, в целях осуществления детекции «в реальном времени» по оптическому каналу, в систему вводились следующие дополнения: модификация 5'-конца праймера FIP с гасителем флуоресценции (BHQ1/BHQ2) и использование дополнительного зонда Fd (Bd), комплементарного F1c (B1c) участку праймера FIP (BIP) с модификацией 3'-конца красителем флуоресценции (FAM).

	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dG	3' dG	% GC	(required oligos are orange)
F3	98	117	20	60.08	- 4.94	- 7.36	55	AGAGGACTATGAAGAG CCGG
B3	276	291	16	59.40	- 7.51	- 4.01	63	CGCGTGCACCGAAAGT
FIP			37					GCGGATCACCTGTGCAG GTTT TTGCCGCCCTGTTGA
BIP			33					GCAGCGCGAGCCCATG AT TGCGCCTGGGCATA
F1c	159	179	21	65.25	- 6.42	- 4.50	57	GCGGATCACCTGTGCAG GTTT
B1c	206	223	18	65.14	- 7.42	- 3.95	67	GCAGCGCGAGCCCATG AT

Рисунок 53 - Список праймеров для создания протокола постановки LAMP для детекции *A. caviae*

Таблица 15 – Зонды для детекции изучаемых аэромонад

Зонды для детекции <i>A.veronii</i>	Q-FAM:5'-TCAAAGGCGGGGACGGCAG GCGCAGTGAAGAGAGCC-3'
	Fd:5'-CTGCCGTCCCCGCCTTTGA-BHQ1-1'
Зонды для детекции <i>A.hydrophila</i>	Q-FAM-5'- CGCGACCGCACCCACTTT GTATTCGGGAGCGGCAAC -3'
	Fd:5'-CTGCCGTCCCCGCCTTTGA-BHQ1-3'
Зонды для детекции <i>A.caviae</i>	Q-FAM-5'- CGCGACCGCACCCACTTT GTATTCGGGAGCGGCAAC -3'
	Fd:5'- AAAGTGGGTGCGGTTCGCG -BHQ1-3'

Для приготовления реакционных смесей использовали набор реагентов Bst 3.0 DNA Polymerase (BioLabs). Итоговый состав реакционных смесей: 1x Isothermal Amplification Buffer II, MgSO₄ – 8 mM всего (2 mM в составе Isothermal Amplification Buffer II + 6 mM вносилось дополнительно), dNTP – 1,4 mM каждого, Bst 3.0 полимеразы – 6 е.а./мкл, образец ДНК – не менее 10 копий на реакцию, праймеры BIP – 1,6 μM, FIP (без флуоресцентной метки) – 0,8 μM, смесь олигонуклеотидов FIP: FAM:Fd- BHQ1 (0,4 μM каждого),

праймеры F3 и B3 – по 0,2 μM каждый, LF и LB – по 0,4 μM каждый, общий объём реакции довели деионизованной водой до 25 $\mu\text{л}$.

Эквимольную смесь олигонуклеотидов FIP- FAM:Fd- BHQ1 готовили предварительно, нагревали до 95 $^{\circ}\text{C}$ в течение 2 минут и плавно остужали до комнатной температуры с целью формирования устойчивого дуплекса.

Аmplification осуществляли на детектирующем амплификаторе DTrime (ДНК-Технология). Протокол амплификации: 60 $^{\circ}\text{C}$ – 1 минута 30 секунд со съёмкой флуоресцентного сигнала, 60 циклов. Общая продолжительность амплификации на этапе тестирования работоспособности праймеров составляла 90 минут.

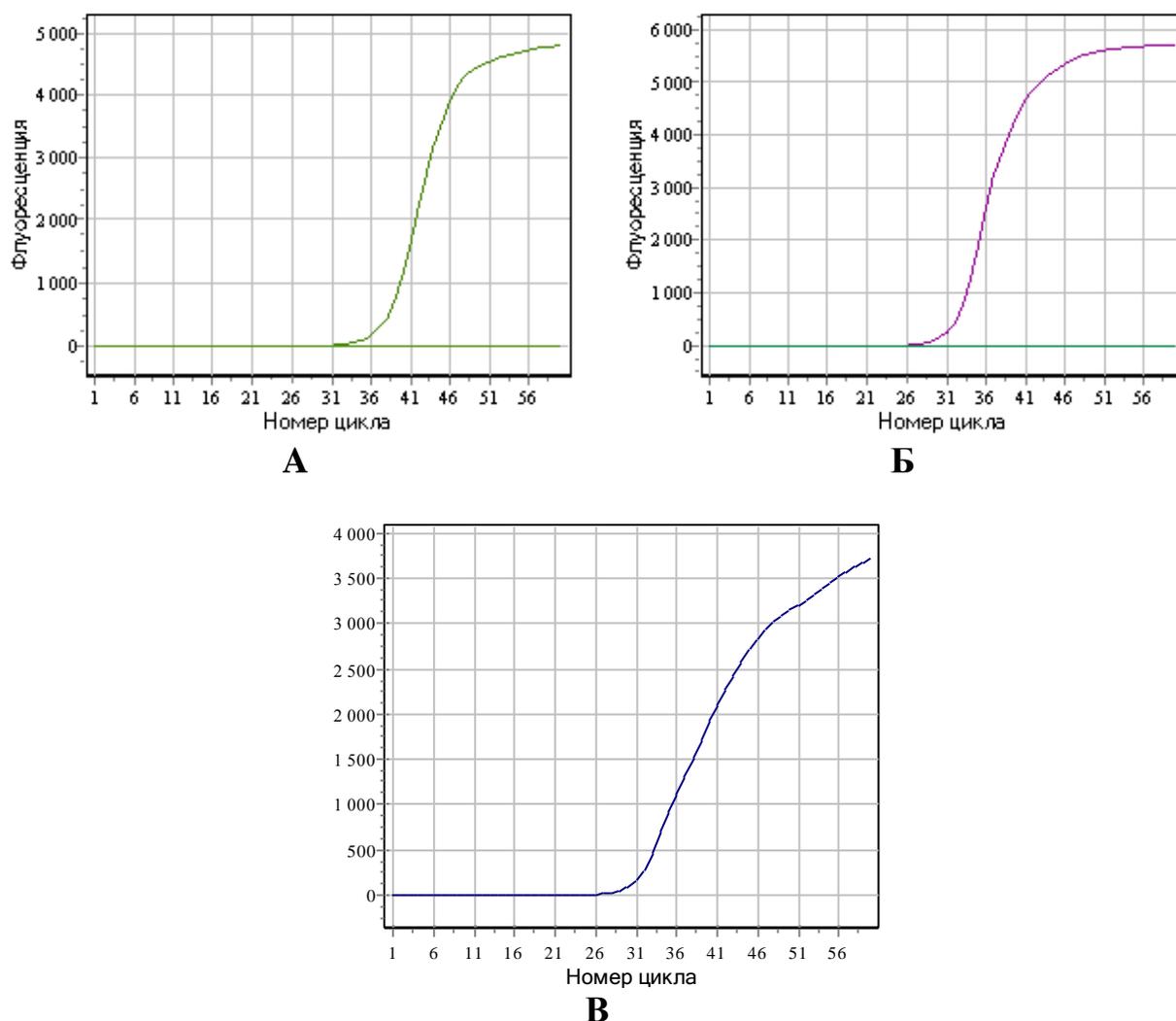


Рисунок 54 - Изучение специфичности разработанных праймерных системы для детекции *A. veronii* (А), *A. hydrophila* (Б), *A. caviae* (В) методом петлевой изотермической реакции в режиме «реального времени» (RT-LAMP)

Полученные результаты свидетельствовали о полной работоспособности тестируемых праймерных систем и реакционной смеси вышеописанного состава. Примеры полученных графиков нарастания уровня флуоресценции. Была доказана специфичность данных праймерных систем для детекции бактерий видов *A.veronii*, *A.caviae*, и *A.hydrophila*. Для изучения специфичности использовали рефференс – штаммы: *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, *A. caveae* ATCC 15468, концентрация НК для образцов составляла 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$. В качестве бактерий-ассоциантов были использованы НК следующих штаммов: *Alcaligenes spp B-5269*, *Acinetobacter calcoaceticus B-5971*, *Escherichia coli K12*, *Klebsiella pneumoniae C6*, *Salmonella enterica ATCC 130763*, *Yersinia enterocolitica ATCC 23715*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538-P*, *Enterococcus faecalis ATCC 29212*.

Таблица 16 - Показатель выхода реакции при изучении специфичности разработанных тест-систем в отношении *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A.caviae*

Бактерия	<i>A. veronii</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>
Ст, FAM	37,9	32,1	36,4

Следующим этапом исследования было выполнено изучение специфичности разработанных в отношении других штаммов изучаемых видов бактерий. Было установлено, что разработанная тест-система эффективна и апробирована на 14 штаммах *A.veronii* и 8 штаммов *A.hydrophila*.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Результат
B2	<i>A.veronii_1</i>	29,3	+
B3	<i>A.veronii_2</i>	26,4	+
B4	<i>A.veronii_1</i>	26,4	+
B5	<i>A.veronii_4</i>	25,9	+
B6	<i>A.veronii_5</i>	26,1	+
B7	<i>A.veronii_21</i>	27,7	+
B8	<i>A.veronii_P1</i>	27,5	+
B9	<i>A.veronii_P2</i>	28,1	+
C2	<i>A.veronii_3BH</i>	23,6	+
C3	<i>A.veronii_13A</i>	25,3	+
C4	<i>A.veronii_43</i>	23,8	+
C5	<i>A.veronii_P3</i>	32,0	+
C6	<i>A.veronii_8B</i>	31,1	+
C7	<i>A.veronii_9B3</i>	32,0	+
C8	<i>A.veronii_13A</i>	27,8	+
C9	<i>A.veronii_3BH</i>	29,1	+
D2	<i>A.veronii_21</i>	29,2	+
D3	<i>A.veronii_5</i>	29,0	+
D5	K+	41,1	+
D6	K-		-

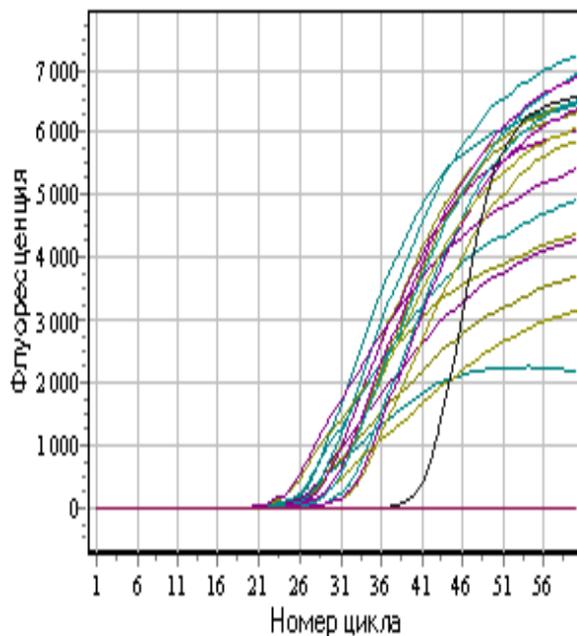


Рисунок 55 - Результаты амплификации штаммов *Aeromonas veronii* при помощи метода изотермической петлевой амплификации в режиме «реального времени» (RT-LAMP)

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат
B4	<i>A. hydrophila 11</i>	36,0		+
B5	<i>A. hydrophila 12</i>	36,8		+
B6	<i>A. hydrophila 13</i>	36,9		+
B7	<i>A. hydrophila 14</i>	40,6		+
B8	<i>A. hydrophila 15</i>	42,8		+
C4	<i>A. hydrophila 16</i>	36,8		+
C5	<i>A. hydrophila 17</i>	37,5		+
C6	<i>A. hydrophila A1</i>	37,7		+
C7	<i>A. hydrophila A</i>	36,8		+
C8	K+	37,8		+
D4	K-			-

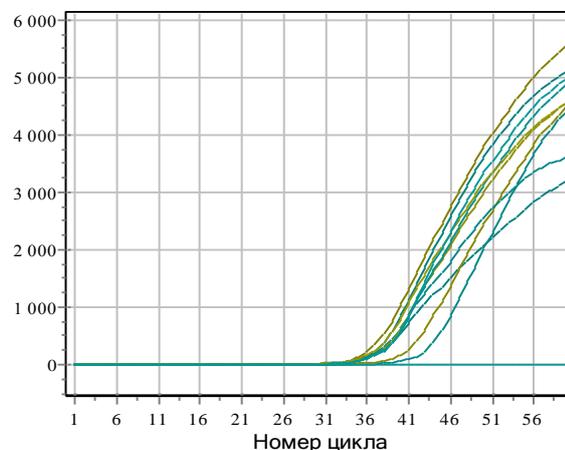


Рисунок 56 - Результаты амплификации штаммов *Aeromonas hydrophila* при помощи метода изотермической петлевой амплификации в режиме «реального времени» (RT-LAMP)

2.4 Разработка бактериофагового компонента комплексной тест-системы для индикации и идентификации аэромонад

2.4.1 Конструирование биопрепарата на основе бактериофагов *Aeromonas* и подбор технологических параметров его применения для профилактики аэромоноза карпа

2.4.1.1 Выделение и селекция бактериофагов

При выделении фага из объектов окружающей среды [179] был заменен в протоколе исследований этап высева фильтрата на 1,5 % МПА методом агаровых слоев по *A. Gratia* на метод Отто «стекающая капля» [202] (рис. 57-58). Это было сделано с целью экономии расходных материалов и снижения трудозатрат. Также было установлено, что при первичном выявлении бактериофага метод Отто позволяет четко видеть его наличие или отсутствие на газоне культуры, в то время как метод агаровых слоев затрудняет этот этап. Для подтверждения мы провели эксперименты, заключающиеся в том, что каждый из 8 фильтратов (по 4 на газонах бактериальных штаммов *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas veronii*) были исследованы на наличие фага методом агаровых слоев. Установлено, что на газоне культур *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. hydrophila* 18, *A. hydrophila* 14, *A. hydrophila* 12, *A. veronii* *bv. sobria* ATCC 9071, *A. veronii* *bv. sobria* 1, *A. veronii* *bv. sobria* 2, *A. veronii* *bv. veronii* P3, выявлены зоны лизиса (рис. 59-60). Затраты на постановку эксперимента в 3 раза больше и при аналогичном результате, что и при применении метода Отто. В таблицах 17-18 представлены результаты исследований. Схема селекции бактериофагов: зоны лизиса отбирали бактериологической петлей и вносили в пробирку с 4,5 мл стерильного мясо-пептонного бульона (МПБ), туда же вносили 0,2 мл 16-18 часовой индикаторной культуры (таблицы 17-18). Время культивирования подбирали визуально в диапазоне от 4 до 7 часов с интервалом 30 минут при температурном оптимуме (36±1) °С.



Рисунок 57 – Наличие зоны лизиса выделенного бактериофага Ah-1 серии УлГАУ на газоне индикаторной культуры: *A. hydrophila* ATCC 49140 при нанесении фильтрата по методу Отто – время термостатирования 18 часов при температуре 29 ± 1 °C

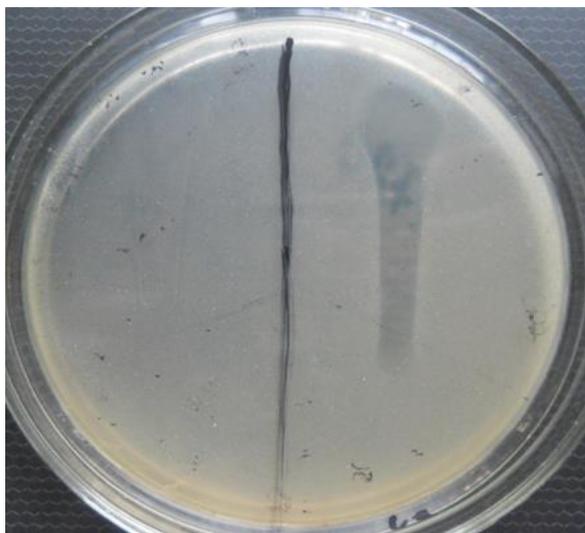


Рисунок 58 – Наличие зоны лизиса выделенного бактериофага Av-1 серии УлГАУ на газоне индикаторной культуры: *A. veronii* bv. *veronii* P3 при нанесении фильтрата по методу Отто – время термостатирования 18 часов при температуре 29 ± 1 °C

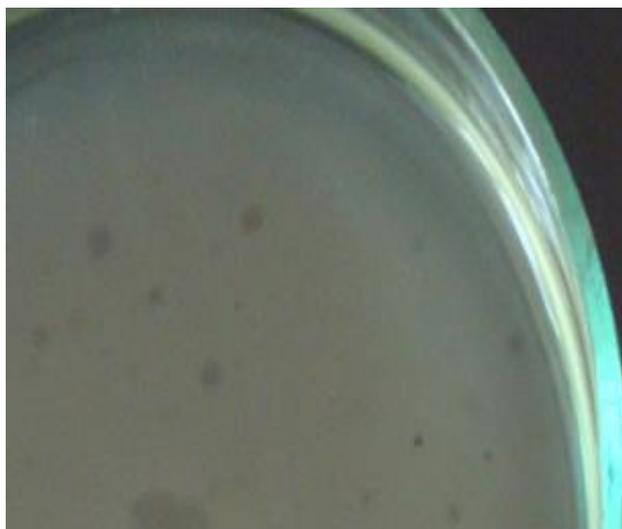


Рисунок 59 - Формирование негативных колоний выделенного актериофага Av-1 серии УЛГАУ на газоне индикаторной культуры: *A. hydrophila* ATCC 9071 время термостатирования 18 часов при температуре 29 ± 1 °С



Рисунок 60 - Формирование негативных колоний выделенного актериофага Av-3 серии УЛГАУ на газоне индикаторной культуры: *A. veronii bv.sobria* 2 время термостатирования 18 часов при температуре 29 ± 1 °С

Ориентиром завершения пассажа было наличие роста в контрольной пробирке. Эмпирическим методом было установлено, что 4,5-5,0 часовое культивирование посевов достаточно для пассирования выделенных фагов на вышеназванных культурах, используемых нами в качестве индикаторных.

Очистка бактериофагов от бактериальных клеток проводилась методом многоступенчатой мембранной фильтрации. Очищенные бактериофаги хранились в условиях бытового холодильника при температуре 2-4 °С.

Таблица 17 – Выделенные бактериофаги *A. hydrophila*

Название бактериофага	Место получения пробы	Индикаторная культура бактерий	Морфология бляшкообразующих единиц
Ah-1 серии УлГАУ	Юловский пруд, Инзенский р-н, с. Юлово, Ульяновская область, 2023 год	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	Прозрачные, d=1-3 мм
Ah-2 серии УлГАУ	Озеро Утинное, Новомалыклинский район, Ульяновская область, 2023 год	<i>A. hydrophila</i> 18	Прозрачные, d=3-4 мм
Ah-3 серии УлГАУ	Михайловские пруды, Кинельский район, Самарская область, 2023 год	<i>A. hydrophila</i> 14	Прозрачные, d=5 мм, наличие зоны вторичного роста
Ah-4 серии УлГАУ	Пруд, с. Тростяное, городское поселение Смышляевка, Волжский район, Самарская область, 2023 год	<i>A. hydrophila</i> 12	Прозрачные, d=4-5 мм

Таблица 18 – Выделенные бактериофаги *A. veronii*

Название бактериофага	Место получения пробы	Индикаторная культура бактерий	Морфология бляшкообразующих единиц,
Av-1 серии УлГАУ	Пруд Кортик, Цивильский муниципальный округ, п. Молодежный, Республика Чувашия, 2023 год	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071	Прозрачные, d=5-6 мм, наличие зоны вторичного роста
Av-2 серии УлГАУ	Пруд, Пестравский район Самарской области, недалеко от села Тростянь, 2023 год	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> 1	Прозрачные, d=2-4 мм
Av-3 серии УлГАУ	Озеро Зотово, Кузоватовский район, Ульяновская область, 2023 год	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> 2	Прозрачные, d=3-5 мм
Av-4 серии УлГАУ	Пруд, Волжский район, Самарская область, недалеко от с. Сухая Вязовка, 2023 год	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> P3	Прозрачные, d=1-3 мм

2.4.1.2 Биологические свойства выделенных бактериофагов

2.4.1.2.1 Определение титра фагов

Литическая активность выделенных бактериофагов определялась методом титрования на жидкой среде (метод Аппельмана) – метод последовательных десятикратных разведений и методом диффузии верхнем слое мягкого агара (методом агаровых слоев по А. Gratia).

Посев последовательных разведений фагового лизата с целью повышения точности эксперимента проводили трижды. Результаты исследований отражены в таблицах 19-20.

Таблица 19 – Основная характеристика биологических свойств бактериофагов *A. veronii*

№	Название изучаемого биологического свойства бактериофага	Результат изучения характерных биологических свойств бактериофагов <i>A. veronii</i>			
		Av-1 серии УлГАУ	Av-2 серии УлГАУ	Av-3 серии УлГАУ	Av-4 серии УлГАУ
1	Литическая активность, БОЕ (бляшкообразующих единиц) /мл (по методу агаровых слоев по <i>A. Gratia</i>)	(1,0±0,1) x10 ^{8*}	(1,9±0,1) x10 ⁶	(1,4±0,1) x10 ^{7**}	(3,0±0,1) x10 ⁸
2	Литическая активность (по методу Аппельмана)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
3	Спектр литического действия на культуре (по методу Отто)	+	++	+++	++
Примечание: *) – P < 0,05; **) – P < 0,01					

Таблица 20 – Основная характеристика биологических свойств бактериофагов *A. hydrophila*

№	Название изучаемого биологического свойства бактериофага	Результат изучения характерных биологических свойств бактериофагов <i>A. hydrophila</i>			
		Ah-1 серии УлГАУ	Ah-2 серии УлГАУ	Ah серии УлГАУ	Ah-4 серии УлГАУ
1	Литическая активность, БОЕ (бляшкообразующих единиц) /мл (по методу агаровых слоев по <i>A. Gratia</i>)	(2,0±0,1) x10 ^{8*}	(3,1±0,1) x10 ⁷	(5,6±0,1) x10 ^{7**}	(8,0±0,1) x10 ⁸
2	Литическая активность (по методу Аппельмана)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
3	Спектр литического действия на культуре (по методу Отто)	++	+++	+++	+
Примечание: *) – P < 0,05; **) – P < 0,01					

Проведенные исследования по определению титра фагов позволяют нам утверждать, что выделенные бактериофаги *A. veronii* имеют различный титр в диапазоне от 10⁻⁵ до 10⁻⁷ по Аппельману и от (1,9±0,1)x10⁶ до (3,0±0,1)x10⁸ БОЕ/мл по *A. Gratia*.

Бактериофаги *A. hydrophila* характеризуются литической активностью в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-7} по Аппельману и от $(3,1 \pm 0,1) \times 10^7$ до $(8,0 \pm 0,1) \times 10^8$ БОЕ/мл по А. Gratia

2.4.1.2.2 Специфичность бактериофагов

Изучение специфичности бактериофагов проводили на культурах: *Aeromonas veronii* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *A. salmonicida* ATCC 33568, *Alcaligenes spp* B-5269, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Salmonella enterica* ATCC 130763, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Aeromonas bestiarum* ЧР, *Aeromonas spp* M2, *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae* С6. Экспериментально установлено, что на чашках Петри, засеянных вышеперечисленными культурами, зон лизиса при нанесении выделенных и селекционированных фагов при визуальном осмотре выявлено не было, что свидетельствует о строгой их специфичности в пределах вида для каждой группы фагов - *Aeromonas veronii* или *Aeromonas hydrophila*. Этот факт дает возможность в дальнейшем использовать бактериофаги Ah-1, Ah-2, Ah-3, Ah-4 серии УлГАУ для индикации *Aeromonas hydrophila* и бактериофаги A-v1, Av-2, Av-3, Av-4 серии УлГАУ для индикации *Aeromonas veronii*.

2.4.1.2.3 Изменение титра бактериофагов при хранении

Изучение изменения титра бактериофагов при хранении аэромонадных бактериофагов, закрытых в стерильные флаконы без добавления консерванта, которые хранились в условиях бытового холодильника (2-4 °С) проводили методом диффузии в «мягкий агар» методом агаровых слоев по А. Gratia. Результаты исследований представлены в таблицах 21-22.

Таблица 21 – Изменение литической активности бактериофагов***Aeromonas veronii* при хранении, количество БОЕ/мл**

Временной интервал	Название бактериофага			
	Av-1 серии УЛГАУ	Av-2 серии УЛГАУ	Av-3 серии УЛГАУ	Av-4 серии УЛГАУ
момент укупоривания	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{8*}$	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^6$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{7**}$	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^{8*}$
3 месяца	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{8*}$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{6**}$	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^{7*}$	$(1,9 \pm 0,6) \times 10^{8*}$
Примечание: *) – $P < 0,05$; **) – $P < 0,01$				

Таблица 22 – Изменение литической активности бактериофагов***Aeromonas hydrophila* при хранении, количество БОЕ/мл**

Временной интервал	Название бактериофага			
	Ah-1 серии УЛГАУ	Ah-2 серии УЛГАУ	Ah-3 серии УЛГАУ	Ah-4 серии УЛГАУ
момент укупоривания	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{8*}$	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^7$	$(5,6 \pm 0,1) \times 10^{7**}$	$(8,0 \pm 0,1) \times 10^8$
3 месяца	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^{8*}$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^7$	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^{7**}$	$(5,4 \pm 0,3) \times 10^8$
Примечание: *) – $P < 0,05$; **) – $P < 0,01$				

Определено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемого бактериофага оставалась без изменений. По литературным данным последующее 5-6 кратное пассирование бактериофага на индикаторных культурах позволяет восстановить исходный титр фага, который был установлен при укупоривании в стерильные флаконы [205-206].

2.4.1.2.4 Влияние физических и химических факторов на аэромонадные бактериофаги

В ходе экспериментов нами было установлено, что при изменении показателя pH в пределах 3,4-8,2 не происходило разрушения бактериофагов Ah-1, Ah-2, Ah-3, Ah-4 серии УЛГАУ, культивируемых на индикаторных культурах бактерий *Aeromonas hydrophila*, как и бактериофагов, специфичных для бактерий вида *Aeromonas veronii* - Av-1, Av-2, Av-3, Av-4 серии УЛГАУ.

Была изучена устойчивость бактериофагов Ah-1, Ah-2, Ah-3, Ah-4 серии УЛГАУ и -v1, Av-2, Av-3, Av-4 серии УЛГАУ к воздействию температуры в

диапазоне 50-90 °С с интервалом в 4 °С. Нагревание фага проводили на водяной бане в течение 30 минут. Установлено, что температура в диапазоне 50-61 °С не значительно изменяет титр бактериофагов по сравнению с контролем. Эксперимент показал, что температура в 62 °С активно влияет на выход ДНК выделенных и селекционированных бактериофагов – литическая активность снизилась в среднем на 2-3 порядка.

Эмпирическим методом установлено, что деструктивные изменения у исследуемых бактериофагов Ah-1, Ah-2, Ah-3, Ah-4 серии УлГАУ и -v1, Av-2, Av-3, Av-4 серии УлГАУ были зафиксированы при 10 минутном взаимодействии с трихлорметаном в соотношении 10:1.

2.4.1.2.5 Спектр специфического литического действия аэромонадных бактериофагов

Результаты исследований представлены в таблицах 23-24.

Таблица 23 – Спектр специфического литического действия бактериофагов

Aeromonas veronii

№	название фага	Индикаторная культура бактерий	Количество лизируемых культур бактерий, N=15	Процент лизируемых бактериальных штаммов
1.	Av-1 серии УлГАУ	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071	8	53
2.	Av-2 серии УлГАУ	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> 1	4	27
3.	Av-3 серии УлГАУ	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> 2	12	80
4.	Av-4 серии УлГАУ	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> P3	15	100

Полученные данные по изучению спектра специфического литического действия свидетельствуют о том, что выделенные и селекционированные в 2023 году аэромонадные бактериофаги: Av-4 серии УлГАУ активно лизирует 15 культур *A. veronii* из 15 изученных на всех этапах работы (1 референс и 14 полных штаммов), Ah-4 серии УлГАУ лизирует 11 бактериальных штаммов

из 11 присутствующих в работе (8 полевых штаммов, 1 референс-штамм, 2 полевых штамма из коллекции кафедры МВЭ и ВСЭ) Таким образом, совокупный показатель спектра специфического литического действия двух бактериофагов равен 100 %.

Таблица 24 – Спектр специфического литического действия бактериофагов *Aeromonas hydrophila*

№	название фага	Индикаторная культура бактерий	Количество лизируемых культур бактерий, N=11	Процент лизируемых бактериальных штаммов
1.	Ah-1 серии УлГАУ	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	5	45
2.	Ah-2 серии УлГАУ	<i>A. hydrophila</i> 18	3	27
3.	Ah-3 серии УлГАУ	<i>A. hydrophila</i> 14	6	55
4.	Ah-4 серии УлГАУ	<i>A. hydrophila</i> 12	11	100

Для дальнейших исследований в работе будут использованы бактериофаги Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ, которые характеризуются высокими титрами литической активности и широким спектром специфического литического действия.

2.4.1.2.6 Разработка экспериментального биопрепарата на основе бактериофагов Av-4 и Ah-4 серии УлГАУ

Бактериофаг Av-4 серии УлГАУ изготавливаются на коммерческом мясопептонном бульоне, культивированием с индикаторной культурой *A. veronii bv.veronii* P3.

Бактериофаг Ah-4 серии УлГАУ изготавливаются на коммерческом мясопептонном бульоне, культивированием с индикаторной культурой *A. hydrophila* 12.

Индикаторные культуры хранятся при температуре 2-4°C на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) в пробирке с содержанием 0,3% бактериологического агара, каждые 4 месяца должен осуществляться ее пересев. Производственные штаммы бактерий обладают характерными для своего вида морфологическими, биохимическими и культуральными свойствами.

Для повышения активности бактериофагов Av-4 и Ah-4 серии УлГАУ проводили пассажи. Оптимальное время пассажа бактериофага Ah-4 серии УлГАУ с индикаторной культурой *A. hydrophila* 12 составляет 5 часов, оптимальное соотношение составляет 1:1 (0,2 мл/0,2 мл), температурный оптимум 29±1°C. Оптимальное время пассажа бактериофага Av-4 серии УлГАУ с индикаторной культурой *A. veronii bv.veronii* P3 составляет 5 часов, оптимальное соотношение составляет 1:1 (0,2 мл/0,2 мл), температурный оптимум 29±1°C.

Очистка – мембранная фильтрация через фильтры (filter type: 0, 45 и 0,22 µm GV). Готовый экспериментальный биопрепарат – прозрачная жидкость, без какого-либо осадка и посторонних примесей, желтоватого цвета (цвет засеянной среды). Титр фага – не ниже 10⁷ БОЕ/мл. Предполагаемый срок годности – 12 месяцев при температуре 2-4°C.

Пилотная технология получения биопрепарата на основе бактериофагов

Согласно разработанной рецептуре, в процессе получения 2 экспериментально-производственных партий фагового биопрепарата была отработана пилотная технология производства, которая представляет собой следующую цепочку этапов:

1-й этап. Подготовка стартерных культур пары бактериофаг – штамм-хозяин.

Штаммы бактерий, используемые для наработки бактериофагов, лиофилизируют, используя сублимационную сушку CoolSafe110 FreezeDryer. Штаммы бактерий в соотношении 1:1 смешивают с защитной средой

(сахароза 20 %, желатин 1 %), разливают во флаконы по 2 мл и высушивают в течение 12 ч при давлении $\leq 0,03$ гПа и при постепенном повышении температуры от -50 до +20°C.

Фенотипически охарактеризованные штаммы бактериофагов лиофилизируют по схеме, соответствующей изложенной выше в отношении штаммов бактерий, используя следующую защитную среду: сухое обезжиренное молоко (9 %), лактоза (5 %), сахароза (5 %) (исследования по ее подбору представлены ниже по тексту).

2-й этап. Подготовка помещения и оборудования

Перед началом дезинфекции проверяют эффективность вентиляционного оборудования и НЕРА фильтров. Боксированное помещение и ламинар обрабатывают при помощи аламинола. Дезинфекцию оборудования, предназначенного для розлива и укупорки флаконов с ТВС, а также поддонов для флаконов и емкости для крышек, проводят 70 % раствором спирта.

3-й этап. Приготовление материалов

Перед стерилизацией осуществляют мойку стеклянной посуды. Стерилизацию лабораторной посуды осуществляют по следующему режиму: сухожаровой шкаф – 1 ч при 200 °С. Стерилизацию емкостей большого объема и частей перистальтического насоса (силиконовый шланг) проводят в автоклаве под давлением пара 1,2 атмосферы и рабочей температуре 121 °С, время стерилизации – 20 мин. Сухая стерилизация гамма-лучами пластиковых флаконов и крышек производится по контракту по следующей схеме: 18,5 кГр при скорости конвейера 3,0 см/сек.

4-й этап. Питательные среды

Разливают в литровые матрасы и стерилизуют при следующих режимах: под давлением 1,2 атмосферы и рабочей температуре 121 °С.

5-й этап. Подготовка фаголизатов бактериофагов

Фаголизаты бактериофагов получали способом, запатентованным в РФ (патент №2 525 141) [217] – с учетом модификации, приведенной в разделе

диссертации 2.4.3. 4,5 мл 18-часовой бактериальной культуры штамма хозяина в титре 10^9 КОЕ/мл засевают в матрац для культивирования – скошенная плотная питательная среда толщиной слоя от 10 мм до 25 мм, культивируют в течение 3–3,5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма хозяина, затем на полученный газон культуры штамма хозяина засевают маточный бактериофаг в титре 10^6 – 10^7 БОЕ/мл, герметично закрывают сосуд для культивирования. Культивируют в течение 4–5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма бактериофага и толщине слоя воздуха над поверхностью плотной питательной среды от 25 мм до 40 мм, получают фаголизат при суспендировании бактериофага с поверхности плотной питательной среды физиологическим раствором или буферным раствором с рН 7,0–7,2 в количестве 9–10 мл, отсасывают фаголизат в стерильную емкость, добавляют трихлорметан в количестве 1:10, выдерживают в течение 30 мин при непрерывном шуттелировании, центрифугируют в течение 30 мин при 5000 об./мин, отбирают надосадочную жидкость в стерильные пробирки и проверяют титр по Грациа. Полученные отдельно бактериофаги в титре не менее 10^{11} БОЕ/мл смешивают в стерильной емкости, в равных объемах.

6-й этап. Стерилизация фаголизата

Полученный коктейль фаголизатов фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм.

7-й этап. Сведение компонентов фагового биопрепарата

Коктейль стерильных фильтратов фаголизатов с учетом конечного титра бактериофагов доводят до объема 100 мл, с помощью уравновешенного буфера (Hyglos) в стерильном флаконе.

8-й этап. Розлив

Асептический розлив и укупорка во флаконы по 100 мл с крышкой, содержащей контроль первого вскрытия.

9-й этап. Маркировка

Маркировка включает следующие сведения о продукте: наименование, указание «не для розничной продажи», наименование и местонахождение изготовителя, объем, дату изготовления и дату упаковывания, срок годности и условия хранения, номер партии. Критические контрольные точки на этапах создания фагового биопрепарата:

1. Контроль микробиологической чистоты флаконов и крышек для розлива. 5 флаконов из партии отбирают в боксе из двойного пакета. Заливают 10 мл стерильного МПБ (можно использовать LB-бульон, тиогликолевую среду). Флаконы закрывают, тщательно встряхивают, ставят в термостат при 37 °С и 25 °С на 48 ч. Затем, из каждого флакона, делают высев 0,1 мл на чашки с плотными питательными средами (кровяной агар, Сабуро) методом spot-теста. Инкубируют при 37 °С 1 сутки на кровяном агаре и при 25 °С – 3 суток на среде Сабуро. После инкубации контролируют наличие или отсутствие роста на чашках. Стерильным пинцетом выбирают 5 крышек из партии, замачивают в емкости с 250 мл стерильной жидкой питательной среды (МПБ, LB-бульон, тиогликолевая среда). Емкость закрывают, ставят в термостат при 37 °С и 25 °С на 48 ч, после чего повторяют методику посева и учета результатов в соответствии с процедурой, приведенной для флаконов.

2. Контроль специфической активности фаголизатов. Специфическую активность фаголизатов оценивали по методу Грация

3. Контроль фаголизата на аномальную токсичность

Объем 1 мл фаголизата вводили внутрибрюшинно 5 здоровым мышам обоего пола. После введения фаголизата наблюдали за животным в течение 7 суток. Фаговый биопрепарат считается прошедшим испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одно из подопытных животных.

4. Микробиологическая чистота фаголизата

Контролируемые по каждой партии продукта микробиологические показатели, приведенные в ТР ТС 029/2012 [218]: КМАФАнМ, БГКП, сальмонеллы, *E. coli*.

5. Определение эндотоксина в фаговом биопрепарате

Определение уровня эндотоксина после рабочего разведения фагового биопрепарата (до титра каждого бактериофага 10^9 БОЕ/мл) определяли с помощью реакции гелирования лизата амебоцитов крови мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛтест). Предельные значения уровня эндотоксина составляло не более 50 ЕЭ/мл.

Определение срока годности фагового биопрепарата

Необходимым этапом при конструировании рецептуры и разработке технологии получения фагового биопрепарата является определение срока годности готовой формы. Для этого образцы из 6 партий продукции хранили в течение 3 месяцев при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$, периодически отбирая для контроля согласно ОФС.1.1.0004.15 Отбор проб «Государственная фармакопея Российской Федерации», XIII издание, том I, 2015 год [219].

2.4.1.2.7 Лиофилизация фаговых биопрепаратов

Для нарастания тира фага делали 3 серии пассажа. Для этого в 4,5 мл МПБ смешивали 0,5 мл 18-часовой бульонной культуры и 0,1 мл фага. Термостатировали при температуре $29\pm 1^\circ\text{C}$ 18 часов. После наступления лизиса бактерий и просветления среды смесь с фагами пропускали через мембранные фильтры. Далее из профильтрованной смеси проводили пересев 0,1 мл фага (второй пассаж) в пробирку, содержащую 4,5 мл питательного стерильного бульона, и добавляли индикаторную культуру в объеме 0,5 мл. Смеси инкубировали при температуре $29\pm 1^\circ\text{C}$ 18 часов. После чего проводили еще один пассаж по такой же схеме. Далее фаголизат после 3-го пассажа пропускали через фильтры, и использовали готовый фильтрат для дальнейших исследований.

После пассирования фага его в объеме 0,4 мл пересевали во флакон с содержанием 100 мл МПБ и добавляли 0,4 мл индикаторной культуры. Инкубировали при температуре при 29 ± 1 °С 18 часов. Затем проводили центрифугирование при 3000 тыс. об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость фага пропускали через мембранные фильтры и разливали во флаконы. Разлитые во флаконы фаги контролировали на стерильность и определяли его титр.

Бактериофаги проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры методом «стекающая капля». Концентрацию фаговых частиц определяли методом агаровых слоев [220].

По отзывам и рекомендациям из литературы [221-228] были подобраны компоненты и составлены четыре среды для лиофилизации.

1. Сухое обезжиренное молоко (9%), лактоза (5%), сахароза (5%).
2. Дрожжевой экстракт (3%), сахароза (2%).
3. Лактоза (1%), сорбит (1%), сахароза (3%), желатин (2%), дрожжевой экстракт (1%).
4. Сухое обезжиренное молоко (14%), инозит (5%).

Среды 1 и 2 были разработаны авторским коллективом. Стабилизаторы 3 и 4 уже проверены на опытах высушивания бактериофагов.

Компоненты для каждой среды смешивали в 100 мл дистиллированной воды, и растворяли на кипящей водяной бане (чтобы избежать подгорание компонентов). Стерилизацию проводили автоклавированием при 0,5 атм в течение 25-30 минут. Готовые среды хранили в холодильнике при температуре не выше 10°C (рис. 61).

Следующим этапом работы было смешивание готовых стабилизаторов и суспензий бактериофагов. Ампулы, шприцы, иглы, хлопковая ткань, пробирки перед работой были проавтоклавируются. Дно одной из сторон ампулы разбивали с помощью стеклянного пробойника и укладывали в штативы. Стабилизаторы и суспензии смешивали 1:1 (по 5 мл) в стерильных пробирках. Перед разливом в ампулы пробирку слегка встряхивали для

смешивания получившейся массы. Разливали по 1 мл в ампулы с помощью шприцов с металлическими иглами. Ампулы объединяли в пучки по 10 штук и сверху накрывали их хлопковой тканью для сохранения стерильности. Далее ампулы ставили на предварительную заморозку в холодильную камеру при температуре -45°C на 18 часов.



Рисунок 61 – Внешний вид сред для лиофилизации (стабилизаторы)

Перед процессом лиофилизации проводили уборку помещения. Столы и оборудование протирали смесью из 70% спирта и 1% хлорамина. Включали бактерицидные лампы на 15 минут. Достав ампулы из холодильника, переносили их в камеру лиофильной сушки, предварительно положив мини холодильники под нижнюю полку камеры для поддержания еще большей минусовой температуры. Между ампулами также устанавливали датчик температуры для контроля. Накрывали колпаком и включали вакуум (рис. 62).

Для осуществления режима первичного высушивания в камере сублиматора создается вакуум для того, чтобы обеспечить свободную диффузию водяных паров от замороженной массы к охлажденной

поверхности конденсатора. В общей сложности процесс лиофилизации длился 24 часа. Первые 12-14 часов температура возрастала от -30°C до 0°C .

На протяжении большей части цикла сублимации высушиваемый продукт находится при значительно более низкой температуре, чем полки сублиматора. Лишь к концу этого цикла температура продукта сравнивается с температурой полок. Конечное содержание воды после первичного высушивания обычно составляет от 7 до 10%. Следовательно, для достижения влаги в диапазоне от 1 до 3%, необходим цикл вторичного высушивания.



Рисунок 62 - Установка лиофильной сушки в процессе работы

Следующий этап лиофилизации называется десорбцией. При осуществлении данной стадии необходимо избежать эффекта пересушки, т.е. снижения допустимого содержания влаги ниже 1%. В промежутке времени 15-24 ч. Температура повышалась от 0°C до $+18^{\circ}\text{C}$.

Досушивание препаратов проводили с помощью инфракрасной лампы для удаления остаточной влаги, доводя температуру датчика до 28°C .

Отключали конденсор, спускали вакуум, после снимали колпак, убирали датчик и доставали полки с ампулами.

Высушенные препараты запаивали под вакуумом. На незапаянный конец ампулы надевали резиновый вакуум-шланг, который присоединяли к вакуум-насосу. С помощью газовой горелки, когда внутри ампулы достигнуто необходимое разряжение, не отключая вакуум-насоса, обогревали вкруговую наиболее узкое место ампулы. Стекло размягчалось и под влиянием наружного атмосферного давления сплавлялось, закрывая просвет в трубке. После этого узким пламенем размягчали стекло на наружной части ампулы и растягивали выше места сая участок сплошного стекла. Наружную часть растянутой трубки оттягивали и закругляли на пламени. Хранили запаянные ампулы в условиях бытового холодильника при температуре 4-6°C.

После высушивания и запайки ампул осматривали внешний вид лиофилизированного фагового биопрепарата (рис. 63-64).

В результате экспериментов было установлено, что

- окраска лиофилизированных биопрепаратов равномерная,
- сокращение объема, по сравнению с исходными ампулами перед высушиванием, не наблюдается,
- появление пузырьков на поверхности высушенного материала, как результат наличия в замороженной массе некоторого количества жидкости, не наблюдали,
- крупную неравномерную пористость наблюдали во всех ампулах со стабилизатором № 2,
- содержимое всех ампул с высушенным материалом растворялось стерильм МПБ,
- в ампулах со стабилизатором № 2 и 3 зафиксировано длительное растворение в сравнении со стабилизаторами 1 и 4.



Рисунок 63- Высушенные бактериофаги Ah-1 серии УлГАУ, Ah-2 серии УлГАУ, Ah-3 серии УлГАУ, Ah-4 серии УлГАУ (слева направо),



Рисунок 64 - Высушенные бактериофаги Av-1 серии УлГАУ, Av-2 серии УлГАУ, Av-3 серии УлГАУ, Av-4 серии УлГАУ (слева направо)

Экспериментально было установлено, что оптимальной средой для лиофилизации является состав: сухое обезжиренное молоко (9 %), лактоза (5 %), сахара (5 %), который позволяет сохранить 30-50 % вирионов бактериофага.

2.4.2 Модификация методики реакции нарастания титра фага для аэромонадных бактериофагов

При проведении лабораторных исследований не всегда есть возможность для типирования инфекционного агента использовать полимеразную цепную реакцию с детекцией продуктов амплификации в

режиме «реального времени», электрофоретическим методом или LAMP. Использование бактериофагов в реакции нарастания титра фага (РНФ) способна за 24 часа дать результат без выделения «чистой культуры» бактерий и сразу получить эффективный препарат для ингибирования роста изучаемого инфекционного агента. Сущность РНФ заключается в том, что если в исследуемом материале присутствует искомый возбудитель, то добавленный к такому материалу гомологичный фаг, вступив во взаимодействие с ним, размножится, и последующее увеличение концентрации свободного внеклеточного фага укажет на присутствие в исследуемом материале гомологичного возбудителя.

2.4.2.1 Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага

Экспериментально нами было установлено, что количество БОЕ/мл в опыте с бактериофагами Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ в более чем 5 раз превышало количество БОЕ/мл в контроле при концентрации бактериальной массы *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 в МПБ 10^3 м.к./мл. Данные показатели являются индикаторными, согласно принятых критериев оценки реакции.

Опытным путем нами было установлено, что предварительное подращивание материала во временной экспозиции (5, 16, 24 ч) и культивирование посевов в условиях термостата при температуре $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в промежутке времени (5, 10, 15, 24 ч) позволяет обнаружить бактерии *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 при постановке реакции нарастания титра фага (РНФ) в концентрации 10^3 м.к./мл. Аналогичную концентрацию бактерий *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 возможно выявить при постановке РНФ без предварительного подращивания исследуемого материала при временной экспозиции культивирования (фаг+индикаторная культура) равной 5 часам.

Таким образом, временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ, составляет 24 часа = 30 мин (закладка опыта) + 5 часов (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грация) + 18 часов (время культивирования посевов). Подращивание исследуемого материала не повышает чувствительность реакции, поэтому использовать его не рекомендуется.

2.4.2.3 Постановка РНФ в пробах

Первоначально исследования проводились с использованием в качестве тест-объекта стерильных проб воды и рыбы, искусственно контаминированных бактериями *A. hydrophila* 12 и *A. veronii bv.veronii* P3. Опытным путем нами было установлено, что предварительное подращивание материала в течение 5 часов и культивирование посевов в условиях термостата при температуре $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18 часов позволяет провести индикацию бактерий *A. hydrophila* 12 и *A. veronii bv.veronii* P3 в пробах стерильной проб воды и рыбы при постановке РНФ в концентрации $n \times 10^3$ м.к./мл. Результаты исследований отражены в таблицах 25-28.

Таблица 25 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба воды) с бактериофагом Av-4 серии УлГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> P3 стерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10^3	21±3	-	144±5	6,8
10^4	21±3	-	229±7	10,9
10^5	21±3	-	лизис	-
10^6	21±3	-	лизис	-
10^7	21±3	-	лизис	-

Таблица 26 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба воды) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 стерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	19±1	-	129±3	6,8
10 ⁴	19±1	-	231±5	12,2
10 ⁵	19±1	-	лизис	-
10 ⁶	19±1	-	лизис	-
10 ⁷	19±1	-	лизис	-

Таблица 27 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба рыбы) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv. veronii</i> P3 стерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	21±3	-	119±3	5,6
10 ⁴	21±3	-	202±5	9,6
10 ⁵	21±3	-	лизис	-
10 ⁶	21±3	-	лизис	-
10 ⁷	21±3	-	лизис	-

Таблица 28 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба рыбы) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 стерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	19±1	-	117±2	6,1
10 ⁴	19±1	-	207±6	10,8
10 ⁵	19±1	-	лизис	-
10 ⁶	19±1	-	лизис	-
10 ⁷	19±1	-	лизис	-

Таблица 29 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii bv.veronii</i> P3 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10^3	21±3	-	38±5	1,8
10^4	21±3	-	70±7	3,3
10^5	21±3	-	99±9	4,7
10^6	21±3	-	124±7	5,9
10^7	21±3	-	лизис	-

Таблица 30 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10^3	23±1	-	39±5	1,7
10^4	23±1	-	74±7	3,2
10^5	23±1	-	101±9	4,4
10^6	23±1	-	144±7	6,3
10^7	23±1	-	лизис	-

Таблица 31 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii bv.veronii</i> P3 нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10^3	21±3	-	31±2	1,5
10^4	21±3	-	67±3	3,2
10^5	21±3	-	91±5	4,3
10^6	21±3	-	117±5	5,6
10^7	21±3	-	лизис	-

Таблица 32 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila 12</i> нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	23±1	-	40±4	1,7
10 ⁴	23±1	-	64±5	2,8
10 ⁵	23±1	-	105±6	4,6
10 ⁶	23±1	-	142±5	6,2
10 ⁷	23±1	-	лизис	-

Вторым этапом нашей работы была отработка реакции нарастания титра фага на нестерильных пробах воды и рыбы, искусственно контаминированных бактериями *A. hydrophila 12* и *A. veronii bv.veronii* РЗ. Полученные данные были сгруппированы в таблицу 29-32.

Результаты этих экспериментов показали, что чувствительность РНФ при фагоиндикации возбудителей аэромоназа карпа в стерильных пробах воды и рыбы составляет $n \times 10^3$ КОЕ/г против $n \times 10^4-10^7$ КОЕ/г для нестерильных образцов воды и рыбы. Следует отметить, что чувствительность РНФ при исследовании искусственно зараженных проб нестерильной воды и рыбы значительно колебалась в вышеназванном диапазоне, что объясняется конкурентным ростом близкородственных видов сапрофитных микроорганизмов, которые были естественной нормофлорой образцов исследований. Следующая серия экспериментов была посвящена детальному разбору методики постановки РНФ и выяснению возможных причин ее недостаточной чувствительности. Следует отметить, что при проведении экспериментов освобождение исследуемых проб от контаминации сопутствующими сапрофитами методами прогревания при различных температурных режимах (60-76 °С с интервалом в 2 часа) и низкоскоростным центрифугированием (1000-2000 об/мин в течение 20-35 минут с интервалом в 5 минут) не обеспечивало в должной степени достижения поставленной

цели. С целью максимально избавиться от микробной контаминации исследуемых образцов нестерильной воды и рыбы испытывали следующий методический прием: в колбы, подлежащие исследованию, после добавления индикаторного фага и соответствующего периода инкубирования добавляли трихлорметан (хлороформ) из расчета 1 мл/10 мл исследуемой жидкости. Содержимое тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30-40 мин. После оседания трихлорметана на дно пробирки надосадочную часть исследовали на наличие фага. Экспериментально установлено, что этот прием может быть заменен фильтрованием через мембранные фильтры фирмы Millipore (filtertype: 0,22 μm GV) в целях экономии времени на проведение исследования. Результаты исследований представлены в таблицах 33-36.

При такой модификации РНФ на фоне нежного газона индикаторной культуры наблюдаются четко различимые негативные колонии, количество которых в опытной пробе было в 5-10 раз больше, чем в контрольной.

Таблица 33 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> P3 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M \pm m)	Контроль свободного фага (M \pm m)	Опыт (M \pm m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	21 \pm 3	-	120 \pm 5	5,7
10 ⁴	21 \pm 3	-	лизис	-
10 ⁵	21 \pm 3	-	лизис	-
10 ⁶	21 \pm 3	-	лизис	-
10 ⁷	21 \pm 3	-	лизис	-

Таблица 34 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	23±1	-	129±6	5,6
10 ⁴	23±1	-	лизис	-
10 ⁵	23±1	-	лизис	-
10 ⁶	23±1	-	лизис	-
10 ⁷	23±1	-	лизис	-

После отработки методики освобождения исследуемого материала от сопутствующей микрофлоры были проведены эксперименты по оптимизации схемы постановки РНФ в нестерильных пробах воды и рыбы. Использовали два варианта условий: первый - подращивание исследуемого материала и последующее подращивание композиции (фаг+культура) при температуре (29±1) °С; второй - отработанный на стерильных пробах почвы - подращивание композиции (фаг+культура) в течение 5 часов при температуре (29±1) °С.

Таблица 35 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv. veronii</i> P3 нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	21±3	-	116±4	5,5
10 ⁴	21±3	-	лизис	-
10 ⁵	21±3	-	лизис	-
10 ⁶	21±3	-	лизис	-
10 ⁷	21±3	-	лизис	-

Таблица 36 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Ah-4 серии УлГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	23±1	-	120±5	5,2
10 ⁴	23±1	-	лизис	-
10 ⁵	23±1	-	лизис	-
10 ⁶	23±1	-	лизис	-
10 ⁷	23±1	-	лизис	-

В обоих вариантах эксперимента заражающая доза *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 составляла 10²-10⁴ КОЕ/г воды/рыбы.

Таким образом, эксперименты по оптимизации методики постановки РНФ показали, что для обнаружения бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii* bv. *veronii* в нестерильных пробах воды и рыбы в лабораторных условиях наиболее оптимальным является предварительное подращивание исследуемого материала в течение 2 ч при (29±1) °С с последующим заражением фагами Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ и инкубированием смеси в течение 4 ч при (29±1) °С (рисунок 65).

Для определения специфичности РНФ с применением фагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ было проведено исследование образцов воды и рыбы, контаминированных бактериями *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *A. salmonicida* ATCC 33568, *Alcaligenes* spp B-5269, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Salmonella enterica* ATCC 130763, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Aeromonas bestiarum* ЧР, *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae* С6, в монокультуре. Результаты получены отрицательные. Методика исследований описана выше.

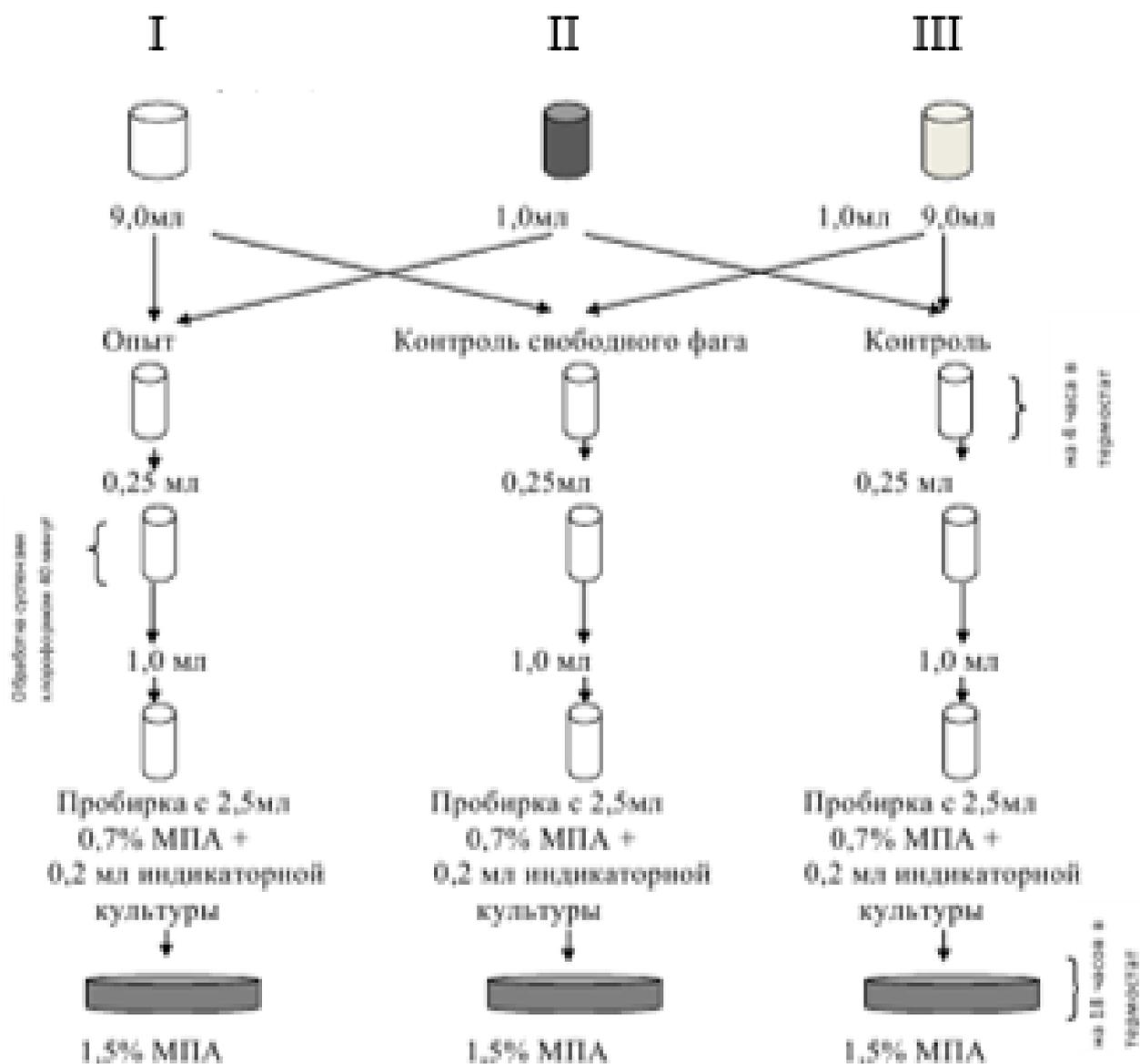


Рисунок 65 – Оптимизированная схема постановки реакции нарастания титра фага с применением изучаемого сибирезвонного фага в пробах нестерильной воды и рыбы с целью индикации бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii bv. veronii*: I – контроль, II – контроль на наличие свободного бактериофага, III – опыт

2.4.2.3 Применение аэромонадных бактериофагов для идентификации методами «стекающая капля» и «SPOT-тест»

«SPOT-тест»

Протокол исследований:

1. Накануне опыта по чашкам Петри разливали 1,5 % мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Чашки Петри с МПА ставили в термостат для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов. Затем они могли храниться в условиях бытового холодильника при температуре $2-4$ °С в течение 3-4 дней. Перед применением чашки Петри с МПА дополнительно подсушивали в термостате при температуре 29 ± 1 °С 15-20 минут.

2. Изучаемую бактериальную культуру выращивали в условиях термостата в течение 16-18 часов при (29 ± 1) °С на МПБ.

3. На чашки Петри наносили по 0,1 мл 16–18-часовой бульонной культуры микроорганизмов, растирали шпателем по всей поверхности чашки с целью получения равномерного газона бактериальной культуры. Для подсыхания газона чашки с МПА инкубировали в течение 30 минут в условиях термостата температуры (29 ± 1) °С.

4. На чашку Петри наносятся границы сегментов, в которые по капле вносятся бактериофаги и в один сегмент вносится капля стерильного МПБ – в качестве контроля.

5. Посевы инкубируются в условиях термостата при показателях температуры (29 ± 1) °С, после чего учитывается результат через 18 часов культивирования.

Учет результатов. При положительном результате на месте соприкосновения бактериофага с газоном культуры образуется зона лизиса (рис. 6б) при отрицательном результате и в контроле – явно выраженный равномерный рост бактериальной культуры.

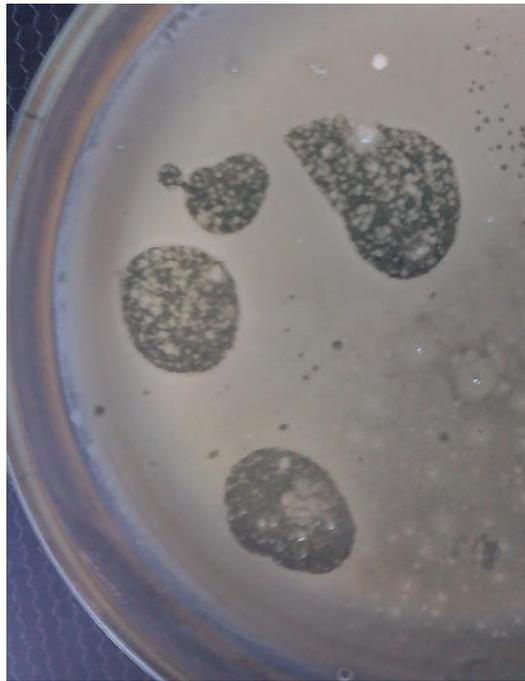


Рисунок 66 – Образование зоны лизиса при идентификации бактерий *A. hydrophila* 12 бактериофагами Ah-1, Ah-2, Ah-3, Ah-4 серии УЛГАУ



Рисунок 67 - Определение специфичности бактериофага Av-4 серии УЛГАУ методом Отто «стекающая капля» на бактериальном штамме *A. veronii bv.veronii* P3: результат +++

Определение специфичности бактериофага методом «стекающая капля»

Протокол исследования:

1. Накануне опыта по чашкам Петри разливается 1,5 %

мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Чашки с МПА ставят в термостат ($t=29\pm 1$ °C) для проверки на стерильность на 11 ± 5 часов.

2. На чашку Петри с 1,5% МПА наносят газон 18 ± 2 часовой исследуемой культуры в концентрации 10^7 КОЕ /мл.

3. Бактериальный газон подсушивают в условиях термостата ($t=29\pm 1$ °C) в течение 20-30 минут.

4. Чашку Петри с подготовленным газоном делят на два сектора: «опытная» дорожка и контроль на механическое повреждение газона. На «опытную» дорожку наносят по 1-2 капли исследуемого фильтрата, на «контрольную» дорожку – стерильный МПБ в том же количестве, что и фильтрат.

5. Посевы помещают в термостат на 18 часов при (29 ± 1) °C.

Результаты оценивают следующим образом:

- отсутствие лизиса;

+ лизис по ходу стекания капли;

++ лизис по ходу стекания капли и наличие стерильных пятен;

+++ наличие стерильного пятна и зон лизиса (рис. 67).

В лабораторной практике рекомендуется применять вышеописанные протоколы для идентификации бактерий – возбудителей аэромоноза карпа, как простые по исполнению и экономически целесообразные. Применение бактериофагового биопрепарата на этапе диагностики позволит при положительном результате получить эффективный препарат для проведения дезинфекции. Использование разработанных биопрепаратов на основе фагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ на данном этапе исследований невозможно, так как не были проведены исследования по изучению генома бактериофагов с целью определения отсутствия в них «локусов, кодирующих факторы патогенности».

2.5 Разработка мероприятий по ликвидации аэромоноза и оздоровлению рыбоводных хозяйств и рыбохозяйственных водоемов

В разработанную ранее систему мероприятий по ликвидации аэромоноза и оздоровлению рыбоводных хозяйств и рыбохозяйственных водоемов предлагаем:

1. в качестве меры по выявлению и устранению источников возбудителя болезни:

- ввести в лабораторную практику в дополнение к «Инструкции о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб, утвержденной руководителем Департамента ветеринарии Минсельхозпрода России В.М. Авиловым 17 августа 1998 года № 13-4-2/1366», где описано, что диагноз на аэромоноз ставят на основании клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов бактериологических исследований. разработанную комплексную трехкомпонентную тест-систему для диагностики аэромоноза (бактериологический, генетический и бактериофаговый методы идентификации бактерий рода *Aeromonas*:

1. *бактериологический компонент* включает ускоренную бактериологическую схему идентификации возбудителей аэромоноза карпа (рис. 23),

2. *генетический компонент* –

2.1 тест-система для идентификации возбудителей аэромоноза методом петлевой изотермической амплификации (LAMP);

2.2 полимеразная цепная реакция с детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени» для индикации и идентификации бактерий рода *Aeromonas*, где для детекции *A. hydrophila* использован ген, кодирующий аэролизин (*aerA*), а качестве целевых регионов геномов для идентификации бактерий *A. caviae* и *A. veronii*, был использован ген, кодирующий белок клеточного деления *zipA*;

2.3 полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией результата амплификации, для детекции использованы гены *hlyA*, *ompA*, *zipA*;

3. *бактериофаговый компонент* - применение специфических бактериофагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ для индикации методом реакции нарастания титра фага (РНФ) (результат в течение 24 часов без выделения «чистой культуры» возбудителя инфекции) (рис. 48) и идентификации «чистой культуры» возбудителя инфекции «SPOT-тестом» и методом «стекающая капля» (результат через 18 часов);

2. для разрыва путей передачи возбудителя, повышения естественной устойчивости рыб и создания оптимальных условий их содержания, препятствующих распространению болезни:

- использовать в качестве дополнительного дезинфицирующего средства для гидротехнических сооружений, живорыбной тары, транспорта, оборудования, орудий лова, спецодежды и обуви бактериофаговые биопрепараты - Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ.

Инструкция по применению фаговых биопрепаратов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ при проведении дезинфекции

Общие положения

1. При проведении дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов жидкий препарат наносится на поверхности в помещениях, объекты, предметы. Используемый жидкий бактериофаг должен быть прозрачным и не содержать осадка. Вскрытие флакона с бактериофагом осуществляется с соблюдением правил асептики. Перед использованием флакон необходимо встряхнуть. Вскрытый флакон должен быть использован в течение 2 часов.

2. Доза препарата при проведении дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов составляет 1-2 мл/м². Для достижения наибольшего эффекта бактериофаг наносится на объекты внешней среды методом распыления, для чего целесообразно использовать беспропеллентные аэрозольные упаковки однократного применения, где и происходит смешивание биопрепаратов на основе бактериофагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ в соотношении 1:1. Для снижения мешающего

эффекта вспенивания препарата допускается его разведение физиологическим раствором в соотношении 1:1.

3. Бактериофаги наносятся на возможные места скопления возбудителей: живорыбную тару, транспорт, оборудование, орудия лова, спецодежду и т. д.

4. Дезинфекция биологическим методом с использованием бактериофагов может проводиться в любое время суток, но желательно за 3-4 часа до выполнения текущей (заключительной) дезинфекции химическими дезинфицирующими средствами или же через аналогичное количество времени после ее осуществления.

5. При правильном распылении на участках нанесения бактериофаговых биопрепаратов виден мелкодисперсный слой. Таким нанесением фага обеспечивается интенсивная циркуляция бактериофагов во внешней среде, резко повышается вероятность его контакта с соответствующими бактериями, определяя высокую эффективность такого способа использования бактериофага.

6. Контроль качества дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов осуществляется путем проведения микробиологических исследований смывов с обработанных поверхностей через 6-8 часов после проведения дезинфекции.

7. В процессе проведения дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов ветеринарный врач должен осуществлять визуальный контроль, который предполагает оценку технологии применения препарата во время дезинфекции.

Схемы использования фаговых биопрепаратов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ при проведении дезинфекции

1. В соответствии с эпизоотологической ситуацией в хозяйстве и прогнозом ее развития используются две схемы дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов: интермиттирующая и однократная.

2. Интермиттирующая схема используется как мера профилактики возникновения и распространения аэромоназа карпа в хозяйстве при высоком риске заноса (распространения) возбудителей инфекционной болезни.

3. Интермиттирующая схема предполагает регулярное, через каждые 3 дня, проведение дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ. Обработка проводится в течение времени, равному трем инкубационным периодам инфекционного заболевания, в отношении которого осуществляется профилактика (инкубационный период при аэромонозе, в зависимости от температурных условий и физиологического состояния рыб, составляет от 3 до 30 дней).

4. Однократная схема дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ используется при интенсивном обсеменении хозяйства полирезистентными возбудителями, а также при заключительной дезинфекции после снятия карантина с хозяйства.

5. При установлении карантина на хозяйство применяется как интермиттирующая, так и однократная схемы.

6. Применение биологического метода дезинфекции с использованием бактериофагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ проводится согласно инструкции. Определение схемы применения биологического метода дезинфекции с использованием бактериофагов проводится после консультации с ветеринарным врачом хозяйства.

7. Не рекомендуется непрерывное длительное (более 3 инкубационных периодов) использование бактериофагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ из-за риска формирования резистентных к фагу бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii*. При отсутствии возбудителя бактериофаги Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ элиминируются в хозяйстве в течение 3 суток.

3. с лечебной целью возможно применение следующих антимикробных препаратов, чувствительность к которым была установлена у «полевых» штаммов бактерий и референс-штаммов в ходе реализации проекта:

- установлено, что штаммы *A. hydrophila* и *A. caviae* обладают резистентностью к β-лактамным пенициллинам, не устойчивы к мупироцину и эритромицину. Некоторые представители бактерии *A. hydrophila* чувствительны к β-лактамным цефалоспорином, к ряду фторхинолонов (лемефлоксацину, норфлоксацину), к триметоприм/сульфаметоксазолу, амикацину. Штаммы бактерий *A. veronii*, как и изучаемые изоляты *A. hydrophila* и *A. caviae*, проявляют устойчивость к β-лактамным пенициллинам (амоксициллину, бензилпенициллину, ампициллину), слабо чувствительны к полимиксину, относящемуся к классу природных макролидов, к полусинтетическим макролидам и неомицину, представителю амикликозидов, а так же относительно устойчивы к флуконазолу, мупироцину и линкомицину. Ингибирующее действие на штаммы вида *A. veronii* установлено у β-лактамных цефалоспоринов (цефуроксима и цефтриаксона) и фторхинолонов.

4. В целях профилактики аэромоноза рыб рекомендуется рыбоводный инвентарь, используемый при транспортировке рыбы, дезинфицировать до и после перевозки Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ.

Разработанные мероприятия по ликвидации аэромоноза и оздоровлению рыбоводных хозяйств и рыбохозяйственных водоемов обсуждены с сотрудниками Агентства ветеринарии Ульяновской области и были продемонстрированы в ОГБУ «Симбирский референтный центр ветеринарии и безопасности продовольствия».

Заключение

Род *Aeromonas* включает в себя более тридцати грамотрицательных видов бактерий, которые в основном действуют как условно-патогенные микроорганизмы. Эти бактерии распространены в природе в различных водных экосистемах, где их можно выделить из рыб и ракообразных. Способность к адаптации также позволяет аэромонам колонизировать наземную среду и ее обитателей, поэтому эти микроорганизмы могут быть идентифицированы из различных источников, таких как почва, растения, фрукты, овощи, птицы, рептилии, земноводные и другие. Инфекционные процессы обычно развиваются у людей с ослабленным иммунитетом. У рыб и других морских животных этот процесс происходит в условиях стресса. Такие события чаще всего связаны с неправильной практикой в аквакультуре. Аэромонада имеет различные диапазоны элементов, называемые факторами вирулентности, которые способствуют адгезии, колонизации и инвазии в клетки хозяина. Эти факторы вирулентности, такие как, например, мембранные компоненты, ферменты и токсины, по-разному экспрессируются у разных видов, что делает некоторые штаммы более вирулентными, чем другие. Из-за их разнообразия ни один фактор вирулентности не считается определяющим в инфекционном процессе, продуцируемом этими микроорганизмами. В отличие от других родов, виды *Aeromonas* не всегда достоверно дифференцируются обычными биохимическими тестами. Поэтому для этого необходимы инструменты для проведения детекции молекулярно-генетическими методами [229].

Проведенные авторским коллективом исследования позволили разработать и апробировать комплексную трехкомпонентную тест-систему для диагностики аэромоноза карпа (бактериологический, генетический и бактериофаговый методы идентификации бактерий рода *Aeromonas*:

- бактериологический компонент включает селективную среду (A.v.1-УГАУ, имеющую следующий состав на 1000 мл дистиллированной воды: мальтоза-D (+) моногидрат 3 грамма/литр, фосфат калия двухосновный 1

грамм/литр, натрия хлорид 5 грамм/литр, пептон сухой ферментативный 1 грамм/литр, хлорид бария 1 грамма/литр, додецилсульфат натрия 5 грамм/литр, бромтимоловый синий 1 грамм/литр) и систему идентификации на основании изучения физиолого-биохимических свойств бактерий,

- генетический - разработана тест-система для идентификации возбудителей аэромоноза методом петлевой изотермической амплификации (LAMP); полимеразная цепная реакция с детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени» для индикации и идентификации бактерий рода *Aeromonas*, где для детекции *A. hydrophila* использован ген, кодирующий аэролизин (*aerA*), а качестве целевых регионов геномов для идентификации бактерий *A. caviae* и *A. veronii*, был использован ген, кодирующий белок клеточного деления *zipA*; полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией результата амплификации, для детекции использованы гены *hlyA*, *ompA*, *zipA*;

- бактериофаговый - применение специфических бактериофагов для индикации методом реакции нарастания титра фага (РНФ) и идентификации спот-тестом и методом «стекающая капля». Разработан биопрепарат на основе фагов бактерий рода *Aeromonas* - Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ: в лабораторной практике для индикации возбудителей аэромоноза карпа без выделения «чистой культуры» бактерий его рекомендуется применять методом реакции нарастания титра фага (РНФ) - результат в течение 24 часов; для идентификации «SPOT-тестом» и методом «стекающая капля» - результат через 18 часов; для дезинфекции разработаны интермиттирующая и однократная схемы, доза препарата составляет 1-2 мл/м², метод – распыление с использованием беспропеллентных аэрозольных упаковок однократного применения).

Куклиной Н.Г. (2017) была разработана комплексная схема выделения и идентификации бактерии *A. salmonicida*, включающая сконструированные бактериологические питательные среды (жидкая среда накопления А.Б1.1-УГСХА обеспечивала преимущественный рост и размножение бактерий *A.*

salmonicida и плотная дифференциально-диагностическая среда А.Б1.2-УГСХА позволяла дифференцировать штаммы *A. salmonicida* от бактерий других видов и родов), бактериологические тесты и фаговый биопрепарат As 125-УГСХА для постановки спот-теста. Ею были выделены бактериофаги *A. salmonicida* в количестве 17 штаммов из объектов водной среды. В ходе диссертационных исследований была модифицирована схема индикации бактерии *A. salmonicida* методом РНФ с применением бактериофага As125-УГСХА, что позволяющая выявлять бактерии *A. salmonicida* за 28 часов [230].

Насибуллин И.Р. (2020) было выделено и селекционировано 5 изолятов специфических бактериофагов *A. hydrophila*, изучены их основные биологические и молекулярно-генетические свойства. Был выбран бактериофаг Б43-УГСХА, отвечающий всем требованиям для индикаторных биопрепаратов и на его основе сконструирован бактериофаговый препарат. Были разработаны схемы фагоидентификации и фагоиндикации бактерий *A. hydrophila*, которые позволяли ускорить время получения результата [231].

Предложенная в диссертационной работе Канаевой Т.И. (2009) схема позволяет выделять и идентифицировать штаммы *Aeromonas hydrophila* из пищевого сырья, пищевых продуктов и объектов внешней среды. С помощью сконструированной дифференциально-диагностической среды появилась возможность определять биоварианты *Aeromonas hydrophila*. Ею был сконструирован биопрепарат-диагностикум для антигенной идентификации бактерий вида *Aeromonas hydrophila* методом РА. Была разработана для сотрудников медико-биологических научных учреждений и врачей бактериологических лабораторий, а так же в помощь работникам рыбоводческих хозяйств «Инструкция по выделению и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*», которая определяла временный порядок и правила проведения лабораторных исследований по выделению и идентификации данных бактерий [232].

Разработанная авторским коллективом комплексная трехкомпонентная тест-система для диагностики аэромоноза карпа основана на обновленных данных по физиолого-биологическим свойствам бактерий *Aeromonas hydrophila* и представляет собой методически разнообразную схему, которая может быть применена в условиях бактериологической лаборатории и в лаборатории полимеразной цепной реакции, которая может быть оснащена амплификаторами для постановки как классической ПЦР, так и ПЦР-РВ.

Использование бактериофаговых биопрепаратов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ для лечения аэромоноза карпа не представляется возможным из-за неполной биологической характеристики – это отсутствие возможности провести полногеномное секвенирование с целью определения участков генома, отвечающих за патогенность – «локусов патогенности».

Апробация разработанной комплексной тест-системы позволила коллективу авторов создать коллекцию бактериальных культур *Aeromonas spp.*, включающую 8 штаммов *A. hydrophila* и 13 штаммов *A. veronii* *bv. sobria* и 1 - *A. veronii* *bv. veronii*. К сожалению, не удалось выделить *A. caviae* (*A. punctata*, *A. caviae* и *A. punctata subsp. caviae* являются гомотипическими синонимами по правилам Бактериологического кодекса) [233].

На основании анализа литературных источников [234-241], авторы сделали вывод о том, что *A. caviae* выделяются из водных источников в широтах, ближе расположенных к экватору, чем исследованный регион (Ульяновская и Самарская область, Республика Чувашия, где в период запланированного отбора проб в соответствии с календарным планом исследований фиксировалась среднесуточная температура, которая была ниже климатической нормы).

Бактерии *Aeromonas veronii* являются условно-патогенными микроорганизмами, вызывающими заболевания у гидробионтов, но его ключевые факторы вирулентности остаются неясными. Sichun Zheng et al. (2024) провели скрининг гена *tolC* со значительно различающимися уровнями экспрессии у двух изолятов, *A. veronii* GL2 (более высокая

вирулентность) и *A. veronii* FO1 (более низкая вирулентность). Поэтому исследователи сконструировали мутантный штамм Δ tolC и проанализировали его иммунологические свойства. Δ tolC демонстрировал сниженную способность к образованию биопленок, ингибировал стрессовую реакцию оболочки, опосредованную несколькими антибиотиками, кроме цефуроксима, что подразумевает, что способность уклоняться от иммунитета хозяина может быть ограничена. Испытания показали, что ЛД50 Δ tolC было в 10,89 раза больше, чем у GL2. Ферментативная активность группы Δ tolC была значительно ниже, а пиковое время было отсрочено до 12 ч, о чем свидетельствуют результаты кОТ-ПЦР. Гистопатологическое исследование показало, что степень поражения тканей в группе Δ tolC была облегчена. Результаты показывают, что tolC является важным фактором вирулентности *A. veronii*, что является референсом для живой аттенуированной вакцины [242].

В результате проведенной аналитической работы и собственных лабораторных исследований разработан новый комплекс мероприятий по борьбе с аэромонозом карпа включающий современные, не трудоемкие методы диагностики заболевания и контроля объектов внешней среды и рыбы (карпа) на наличие бактерий *Aeromonas spp.*, позволяющие провести достоверную идентификацию патогенных аэромонад за 24-72 часа бактериологическим и молекулярно-генетическим методами.

В заключении, хотелось бы отметить, что помимо массового вымирания прудовых рыб (канального сома), карпа и лососевых, а также sporadических и эпизоотических заболеваний млекопитающих, рептилий, амфибий и птиц, виды *Aeromonas* также ответственны за кишечные и внекишечные заболевания у людей, включая гастроэнтерит (острую диарею), бактериемию / сепсис и раневые инфекции [236, 241]. Изоляты *Aeromonas* (из объектов внешней среды) несут различные комбинации генов вирулентности и устойчивости к β -лактамазам и демонстрируют фенотипы вирулентности и профили устойчивости к противомикробным препаратам, сходные с

такowymi у клинических изолятов. Представители рода *Aeromonas* могут вызывать тяжелые инфекции у людей с ослабленным иммунитетом при контакте с вирулентными патогенами в окружающей среде, но характеристики представителей *Aeromonas* в окружающей среде остаются до конца неясными. Считаем, что разработанная комплексная тест-система позволит сформировать коллекцию бактериальных агентов для дальнейших исследований *Aeromonas spp.*

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Стресс и болезни рыб / Г.А. Ведемейер, Ф.П. Мейер, Л. Смит. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. - 127 с.
2. Развитие пресноводной аквакультуры предприятиями и организациями Росрыбхоза / Ю.П. Мамонтов, Ю.Т. Сечин, М.Е. Гепецкий // Рыбное хозяйство. – 1997. - С. 12-16.
3. Головин, П.Л. Стресс у рыб /П.Л. Головин // Тр. Зоол. ин-та. АН СССР. – 1987. - Т. 171. - С.22.32.
4. Конев, Н.В. Нормальная микрофлора рыб и ее роль в возникновении бактериальных заболеваний, вызванных стрессом. / Н.В. Конев // Научные тетради. – 1997. - № 4. - 44 с.
5. Newman, S.G. Bacterial vaccines for fish / S.G. Newman // Ann. Rev. Fish Dis. - 1993. - P. 145-185
6. Noga, E.J. Fish Diseases: diagnosis and treatment / E.J. Noga. - St. Louis: Mosby-Year Book Inc., 1995. - 367 p.
7. Bacterial Fish Pathogens / B.I. Austin, D.A. Austin. - New York: Ellis Horwood, 1993. - 384 p.
8. Гусева, Н.В. Иммуный ответ рыб - объектов аквакультуры на вакцинацию против бактериальных заболеваний/ Наталья Владимировна Гусева 03.00.10. М., 1998. – 198с.
9. Давидов, О.М. Основи ветеринарно-санітарного контролю в рибництві / О.М. Давидов, Ю.Д. Темніханов // Посібник. - Київ: Фірма «ІНКОС», 2004. - 144с.
10. Давыдов, О.Н. Болезни пресноводных рыб / О.М. Давидов, Ю.Д. Темніханов. - К.: «Ветинформ», 2003. - 544 с.
11. Компанец, Э.В. Бактерии рода *Aeromonas* и их роль в аквакультуре / Э.В. Компанец, П.М. Исаева, И.А. Балахнин // Микробиологический журнал.-1992. - № 4 (54). - С. 89-99.

12. Куценко, В.Г. Епізоотичне обстеження ставків та профілактика основних захворювань риби / Куценко В.Г. // Здоров'я тварин і ліки. - 2008. - №10. - С. 21.
13. Давыдов, О.Н. Биологические препараты и химические вещества в аквакультуре / О.Н. Давыдов, А.В. Абрамов, Л.Я. Куровская. - К.:Логос, 2009. - 307с.
14. Басанкина, В.М. Эпизоотические особенности аэромоноза рыб в условиях региона Северного Кавказа. Дисс. ... канд. вет. наук: 06.02.02. - М.: 2020. - 161 с.
15. Канаева, Т.И. Разработка биотехнологических параметров выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23. - Ульяновск: 2009. - 19 с.
16. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater - an attempt to set generic epidemiological cut-off values / S. Baron, S.A. Granier, E. Larvor, E. Jouy, M. Cineux, A. Wilhelm // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 503.
17. Janda, J.M. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection / J.M. Janda, S.L. Abbott // *Clinical microbiology reviews*. – 2010. – Vol. 23. – №. 1. – P. 35-73.
18. Potential enterotoxicity and antimicrobial resistance pattern of *Aeromonas* species isolated from pet turtles and their environment / S.H. M.P. Wimalasena, G.W. Shin, S. Hossain & G.J. Heo, // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2017. – Vol. 79. – №. 5. – P. 921-926.
19. Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer among environmental *Aeromonas* species / J.R. Huddleston, J.M. Brokaw, J.C. Zak & R.M. Jeter // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2013. – Vol. 36. – №. 4. – P. 224-234.
20. Quinolone resistant *Aeromonas spp.* as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater / A.R. Varela, O.C. Nunes, C.M. Manaia // *Science of the Total Environment*. – 2016. – Vol. 542.

– P. 665-671.

21. Antimicrobial resistance of *Aeromonas spp.* isolated from the growth pond to the commercial product in a rainbow trout farm following a flumequine treatment / M. Naviner, L. Gordon, E. Giraud, M. Denis, C. Mangion, H. Le Bris & J.P. Ganière // *Aquaculture*. – 2011. – Vol. 315. – №. 3-4. – P. 236-241.

22. Петров, Р.В. Применение препаратов «Кемзайм» и «Бровасептол концентрат™» для лечения карпов при аэромонозе / Р.В. Петров // *Доклады ТАСХН*. – 2015. - № 3. – С. 54-57.

23. Герасимчик, В. А. Болезни рыб и пчел: учебное пособие для студентов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В. А. Герасимчик, Е. Ф. Садовникова. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 293 с.

24. Лабораторный практикум по болезням рыб : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ихтиология и рыбоводство» и для учащихся средних специальных учебных заведений, обучающихся по специальности «Ихтиология и рыбоводство» / В. А. Мусселиус [и др.] ; ред. В. А. Мусселиус. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 295 с.

25. Методы общей бактериологии: учебно-методическое пособие / сост. Д. А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: Ульяновская ГСХ, 2008. – 130 с.

26. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. / пер. с англ.; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига и др. М.: Мир, 1997. - Т. 1. - С. 368–432.

27. Роль аэромонад в санитарно-гигиеническом мониторинге гидроэкосистемы Волго-Каспийского региона / Л.В. Ларцева, О.В. Обухова, И.А. Лисицкая // *Гигиена и санитария*. - 2011. - № 3. - С. 15–17.

28. Андросик, Н.Н. Рыба как источник пищевых отравлений человека и животных, кишечных инфекций и гельминтозов / Н.Н. Андросик // *Ученые записки Витеб. гос. акад. вет. медицины*. - Витебск, 1998. - Т. 34. - С. 101–102

29. Скурат, Э.К. Аэромоназ и псевдомоназ карпа и меры борьбы с ним / Э.К. Скурат, Е.И. Гребнева // Вопр. рыб. хоз-ва Беларуси. Минск. - 1994. - Вып. 12. - С. 127–134.

30. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*) / S.L. Angka, T.J. Lam, Y.M. Sin // Aquaculture. – 1995. – Vol. 130. – P. 103-112.

31. Trust, T.J. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / T.J. Trust // Fish. Res. Board Can. - 1974. – Vol. 36(10). – P. 1174–1179.

32. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine / G.M. Karunasagar, G.M. Rosalind, I. Karunasagar // Fish Shellfish Immunol. - 1993. – Vol. 3. – P. 413-417.

33. Особенности маркеров патогенности аэромонад, инфицирующих судака в дельте Волги в условиях антропогенного воздействия / Я.М. Болдырева, О.В. Обухова, И.А. Лисицкая // Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф.: Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. - М., 2003. - С. 17–18.

34. Leung, K.Y. Morphological changes in carp epithelial cells infected with *Aeromonas hydrophila* / K.Y. Leung // Fish Diseases. - 1996. - Vol. 19. - №. 2. - P.167–174.

35. Соколова, Н.А. К вопросу о факторах патогенности аэромонад / Н.А. Соколова // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре : сб. докл. науч.-практ. конф. М.: Россельхозакадемия, 2000. С. 118.

36. *Aeromonas spp.*: An Emerging Nosocomial Pathogen / P. Batra, P. Mathur, M.C. Misra // Lab Physicians. - 2016. - P.1–4.

37. Esteve, C. Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: emendation of *A. jandaei* / C. Esteve // International journal of systematic and evolutionary microbiology. - 2003. - Vol. 53. –P. 16-18.

38. Hickman-Brenner F.W. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea / F.W. Hickman-Brenner // J. Clin. Microbiol. - 1987. - № 25. - P.900–906.

39. Оценка чувствительности аэромонад к антибактериальным препаратам и споровым пробиотикам / М. А. Морозова, М. А. Дьяченко, В. А. Чистяков, Ю. О. Пархоменко, Ю. В. Степанова // материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию Азовского научно-исследовательского института рыбного хозяйства «Актуальные вопросы рыболовства, рыбоводства (аквакультуры) и экологического мониторинга водных экосистем». – г. Ростов-на-Дону, 2018. – С. 70-75.

40. Юхименко, Л. Н. Современное состояние проблемы аэромоноза рыб / Л. Н. Юхименко, Г. С. Койдан // Экспресс-информация / Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментального рыбного хозяйства. – Москва, 1997. – Вып. 2. – С. 1–5.

41. Юхименко, Л. Н. Временные рекомендации по выделению и идентификации аэромонад / Л. Н. Юхименко, В. Ф. Викторова, И. Фаркаш. – Москва : ВНИИПРХ, 1987. – 14 с.

42. Методические указания по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных : справочник / сост. Б. И. Антонов [и др.] ; под ред. Б. И. Антонова // Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции. – Москва : Агропромиздат, 1986. – С. 270–278.

43. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas spp.* / J.M. Bello-López, O.A. Cabrero-Martínez, G. Ibáñez-Cervantes, C. Hernández-Cortez, L.I. Pelcastre-Rodríguez, L.U. Gonzalez-Avila & G. Castro-Escarpulli // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7. – №. 9. – P. 363.

44. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas spp.* in drinking and waste water treatment plants / V. Figueira, I. Vaz-Moreira, M. Silva & C.M. Manaia // Water research. – 2011. – Vol. 45. – №. 17. – P. 5599-5611.

45. Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds / M. Zdanowicz, Z.J. Mudryk, P. Perliński // Veterinary research communications. – 2020. – Vol. 44. – №. 1. – P. 9-18.

46. *Aeromonas sobria* infection in farmed mud loach (*Misgurnus mizolepis*) in Korea, a bacteriological survey/ J. Yu, B.H. Koo, D. Kim, D.W. Kim, S.W. Park // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2015. – Vol. 16. – №. 2. – P. 194.

47. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish / M. Hatha, A.A. Vivekanandhan & G.J. Joice // International journal of food microbiology. – 2005. – Vol. 98. – №. 2. – P. 131-134.

48. Неретин, В.М. Ветеринарно-санитарная экспертиза карповых рыб при аэромонозе Автореф. дисс. ... канд. ветер. наук: 16.00.06. - М: 2007. - 28 с.

49. Инструкции о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб, утвержденной руководителем Департамента ветеринарии Минсельхозпрода России В.М. Авиловым 17 августа 1998 года № 13-4-2/1366.

50. Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 14.04.2020 № 196 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов аэромонозов лососевых и карповых рыб» (Зарегистрирован 21.05.2020 № 58409).

51. Sanarelli, G. Ueber einen neuen mikroorganismus des Wassers, welcher fur thiere mit veraenderlicher und konstanter temperatur pathogen ist / G. Sanarelli // Zentrale Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionshygiene, Abt. – 1991. – Vol. 2. – P. 222–228.

52. Proposal to recognise the family *Aeromonadaceae* fam. Nov / R.R. Colwell, M.R. McDonell, D.J. Ley // Int. J. Med. Microbiol. – 1986. – Vol. 26. – P. 19–27.

53. An insertion sequence-dependent plasmid rearrangement in *Aeromonas*

salmonicida causes the loss of the type three secretion system / K.H. Tanaka, S. Dallaire-Dufresne, R.K. Daher, M. Frenette, S.J. Charette // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. e33725.

54. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. / A. Martin-Carnahan, S.W. Joseph / In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M., editors. - Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2005. - pp. 556–578.

55. *Aeromonas lusitana* sp. nov., isolated from untreated water and vegetables / A. Martínez-Murcia, R. Beaz-Hidalgo, A. Navarro, M.J. Carvalho, M. Aravena-Román, A. Correia, M.J. Figueras, M.J. Saavedra // Curr. Microbiol. – 2016. – Vol. 72. – P. 795–803.

56. Fernández-Bravo, A. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity / A. Fernández-Bravo, M.J. Figueras // Microorganisms. – 2020. - Jan 17. - Vol. 8(1). – P. 129.

57. Investigation of the virulence and genomics of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from human patients / A.T. Vincent, A. Fernández-Bravo, M. Sanchis, E. Mayayo, M.J. Figueras, S.J. Charette // Infect. Genet. Evol. – 2019. – Vol. 68. – P. 1–9.

58. The animal model determines the results of *Aeromonas* virulence factors / A. Romero, P.R. Saraceni, S. Merino, A. Figueras, J.M. Tomás, B. Novoa // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1245.

59. Differential regulation of caspase-1 activation via NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* infection / A.J. McCoy, Y. Koizumi, N. Higa, T. Suzuki // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185. – P. 7077–7084.

60. Cytotoxins of the human pathogen *Aeromonas hydrophila* trigger, via the NLRP3 inflammasome, caspase-1 activation in macrophages / A.J. McCoy, Y. Koizumi, C. Toma, N. Higa, V. Dixit, S. Taniguchi, J. Tschopp, T. Suzuki // Eur. J. Immunol. – 2010. – Vol. 40. – P. 2797–2803.

61. *Aeromonas hydrophila* utilizes TLR4 topology for synchronous

activation of MyD88 and TRIF to orchestrate anti-inflammatory responses in zebrafish / N. Srivastava, A. Shelly, M. Kumar, A. Pant, B. Das, T. Majumdar, S. Mazumder // *Cell Death Discov.* – 2017. – Vol. 3. – P. 17067.

62. Tomás, J.M. The main *Aeromonas* pathogenic factors / J.M. Tomás // *ISRN Microbiol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–22.

63. Beaz-Hidalgo, R. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease / R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras // *J. Fish Dis.* – 2013. – Vol. 36. – P. 371–388.

64. Fernández-Bravo, A. Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus *Aeromonas* / A. Fernández-Bravo // *Universidad Rovira i Virgili. - Tarragona, Spain: 2019.* – P. 34.

65. Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus* / J. Su, C. Yang, F. Xiong, Y. Wang, Z. Zhu // *Fish Shellfish. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 33–39.

66. Recommendations for a new bacterial species description based on analysis of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter* / M.J. Figueras, Beaz-R. Hidalgo, L. Collado, A.J. Martínez-Murcia // *Bull. BISMIS.* – 2011. – Vol. 2. – P. 1–16.

67. Plasmid composition in *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* 01-B526 unravels unsuspected type three secretion system loss patterns / K.Y. Tanaka, A.T. Vincent, J.-G. Emond-Rheault, M. Adamczuk, M. Frenette, S.J. Charette // *BMC Genom.* – 2017. – №18. – P. 528.

68. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas* / A. Martínez-Murcia, E. Garay, M. Collins, C. Esteve // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1992. – №91. – P. 199–205.

69. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms / R. Beaz-Hidalgo, F. Latif-Eugenin, M. Hossain, K. Berg, R. Niemi, J. Rapala, C. Lyra, M. Liles, M.J. Figueras // *Syst. Appl. Microbiol.* –

2015. – № 38. – P. 161–168.

70. *Aeromonas intestinalis* and *Aeromonas enterica* isolated from human faeces, *Aeromonas crassostreae* from oyster and *Aeromonas aquatilis* isolated from lake water represent novel species / M.J. Figueras, F. Latif-Eugenin, F. Ballester, I. Pujol, D. Tena, K. Berg, M.J. Hossain et al. // *New Microbes New Infect.* – 2017. – №15. – P. 74–76.

71. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies / M.R. Chacón, G. Castro-Escarpulli, L. Soler, J. Guarro, M.J. Figueras // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 44. – P. 221–225.

72. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. / L. Soler, F. Marco, J. Vilá, M.R. Chacon, J. Guarro, M.J. Figueras // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 5732–5734.

73. Martínez-Murcia, A. *Aeromonas* / A. Martínez-Murcia A., B. Lamy // *Academic Press.* – 2015. – P. 155–200.

74. Martínez-Murcia A.J., Benlloch S., Collins M.D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 42. – P.412–421.

75. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains / A. Morandi, O. Zhaxybayeva, J.P. Gogarten, J. Graf // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 6561–6564.

76. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis / V.Nagar, R. Shashidhar, J.R. Bandekar // *J. Microb. Biot.* – 2013. – Vol. 29. – P. 745–752.

77. Molecular characterization of *Shewanella* and *Aeromonas* isolates associated with spoilage of Common carp (*Cyprinus carpio*) / R. Beaz-Hidalgo, D. Agueria, F. Latif-Eugenin, M.I. Yeannes, M.J. Figueras // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2015. – Vol. 362. – P. 1–8.

78. Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum* / M.J. Figueras, R. Beaz-Hidalgo, Y. Senderovich, S. Laviad, M. Halpern // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2011/ - Vol. 3. – P. 239–244.

79. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences / M.A. Yanez, V. Catalan, D. Apraiz, M.J. Figueras, A.J. Martinez-Murcia // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 53. – P. 875–883.

80. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes I / L. Soler, M.A. Yáñez, M.R. Chacon, M.G. Aguilera-Arreola, V. Catalán, M.J. Figueras, A.J. Martínez-Murcia // *J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – Vol.54. – P. 1511–1519.

81. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi / S. Hoel, O. Vadstein, A.N. Jakobsen // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 12-15.

82. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences / M. Kupfer, P. Kuhnert, B.M. Korczak, R. Peduzzi, A. Demarta // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 56. – P. 2743–2751.

83. Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas* / P.H. Nhung, H. Hata, K. Ohkusu, M. Noda, M.M. Shah, K. Goto, T. Ezaki // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – P. 1232–1237.

84. Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level / A. Sepe, P. Barbieri, R. Peduzzi, A. Demarta // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 439–444.

85. Martinez-Murcia, A.J. An automated RNA extraction procedure and application for 16S rRNA sequencing of *Leuconostoc amelobiosum* / A.J. Martinez-Murcia // *Microbiologia.* – 1991. – Vol. 7. – P. 106–112.

86. Martinez-Murcia, A.J. Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization group 11 and *Aeromonas*

group 501 / A.J. Martinez-Murcia // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – Vol. 49. - Vol. 4. – P. 1403–1408.

87. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes / L. Soler, M.A. Yanez, M.R. Chacon, M.G. Aguilera-Arreola, V. Catalan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54. – P. 1511–1519.

88. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum* / A.J. Martinez-Murcia, L. Soler, M.J. Saavedra, M.R. Chacon, J. Guarro // Int. Microbiol. – 2005. – Vol. 8. – P. 259–269.

89. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas* / M.J. Saavedra, M.J. Figueras, A.J. Martinez-Murcia // Int J .Syst. Evol. Microbiol. – 2006. - Vol. 56. – P. 2481–2487.

90. Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new members of the species *Aeromonas allosaccharophila* / M.J. Saavedra, V. Perea, M.C. Fontes, C. Martins, A. Martinez-Murcia // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2007. – Vol. 91. – P. 159–167.

91. Fenselau, C. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry / C. Fenselau, P.A. Demirev // Mass Spectrom Rev. – 2006. – Vol. 20. – P. 157–171.

92. Lay, J.O.J. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria / J.O.J. Lay // Mass Spectrom Rev. – 2001. – Vol. 20. – P. 172–194.

93. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (*cyanobacteria*) colonies: toward an understanding of metabolic diversity / M. Welker, B. Marsalek, L. Sejnohova, H. von Dohren // Peptides. – 2006. – Vol. 27. – P. 2090–2103.

94. Welker, M. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology / M. Welker, E.R. Moore // Syst. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 34. – P. 2–11.

95. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting / V. Gaia, S. Casati, M. Tonolla // Syst. Appl.

Microbiol. – 2011. – Vol. 34. – P. 40–44.

96. Typing of nitrogen-fixing *Frankia* strains by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry / D. Hahn, B. Mirza, C. Benagli, G. Vogel, M. Tonolla // Syst. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 34. – P. 63–68.

97. Differentiation of species of the *Streptococcus bovis* /equinus-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses / D. Hinse, T. Vollmer, M. Erhard, M. Welker, E.R. Moore // Syst. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 34. – P. 52–57.

98. Ribosomal protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for phylogeny-based subspecies resolution of *Bifidobacterium longum* / H. Sato, K. Teramoto, Y. Ishii, K. Watanabe, Y. Benno // Syst. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 34. – P. 76–80.

99. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria / C. Benagli, V. Rossi, M. Dolina, M. Tonolla, O. Petrini // PLoS. – 2011. – Vol. 6. – P. e16424.

100. Differentiation of *Aeromonas* isolated from drinking water distribution systems / M.J. Donohue, A.W. Smallwood, S. Pfaller, M. Rodgers, J.A. Shoemaker // Anal. Chem. – 2007. – Vol. 79. – P. 1939–1946.

101. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells / M.J. Donohue, A.W. Smallwood, S. Pfaller, M. Rodgers, J.A. Shoemaker // J. Microbiol. Methods. – 2006. – Vol. 65. – P. 380–389.

102. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish / A.J. Martinez-Murcia, M.J. Saavedra, V.R. Mota, T. Maier, E. Stackebrandt // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58. – P. 1169–1175.

103. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent / P.-L. Chen, C.-J. Wu, C.-S. Chen, P.-J. Tsai, H. Tang, W. Ko, S. Cutler

// Clin. Microbiol. Infect. – 2014. – Vol. 20. – P. 428–434.

104. Latif-Eugenin, F.L. *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal / F.L Latif-Eugenin. - Universidad Rovira i Virgili. – 2015. – P. 3.

105. Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. / A. Vavrova , T. Balazova, I. Sedlacek, L. Tvrzova, O. Sedo // Folia Microbiol. – 2015. – Vol. 60. – P. 375–383.

106. Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates / H.B. Shin, J. Yoon, Y. Lee, M.S. Kim, K. Lee // Yonsei Med. J. – 2015. – Vol. 56. – P. 550–555.

107. Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution / F. Roger , H. Marchandin, E. Jumas-Bilak, A. Kodjo, B. Lamy // BMC Microbiol. – 2012. – Vol. 12. – P. 62.

108. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation / A. Alperi, M.J. Figueras, I. Inza, A.J. Martínez-Murcia // Int. Microbiol. – 2008. – Vol. 11. – P. 185–194.

109. Comprehensive analysis reveals the evolution and pathogenicity of *Aeromonas*, viewed from both single isolated species and microbial communities / C. Zhong , M. Han, P. Yang, C. Chen, H. Yu, L. Wang, K. Ning // mSystems. – 2019. – Vol. 4. – P. 13-19.

110. Harayama, S. Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes / S. Harayama, H. Kasai // Springer Science and Business Media. – 2006. – P. 105–139.

111. Identification of the major outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* / R.O. Ebanks, M. Goguen, S. Mckinnon, D.M. Pinto, N.W. Ross // Dis. Aquat. Org. – 2005. – № 68. – P. 29-38.

112. Lund, V. Genetic diversity among A-proteins of atypical strains of *Aeromonas salmonicida* / V. Lund, H. Mikkelsen // Dis. Aquat. Org. – 2004. – № 3. – P. 257-262.

113. Phenotypic and genetic characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from pond sediments / N. Maiti, A. Mandal, S. Mohanty, R. Mandal // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 32. – P. 1–8.

114. Phylogenetic identification of *Aeromonas simiae* from a pig, first isolate since species description / M.C. Fontes, M.J. Saavedra, A. Monera, C. Martins, A. Martínez-Murcia // *Veter. Microbiol.* – 2010. – Vol. 142. – P. 313–316.

115. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples / F. Latif-Eugenín, R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras // *J. Appl. Microbiol.* – 2016. – Vol. 121. – P. 883–891.

116. Jolley, K.A. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level / K.A. Jolley, M.C. Maiden // *BMC Bioinform.* – 2010. – Vol. 11. – P. 595.

117. Chun Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes / M. Kim, H. Oh, S. Park, J. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2014. – P. 346-351,

118. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? / J.P. Meier-Kolthoff, M. Goker, C. Sproer, H.-P. Kenk // *Arch. Microbiol.* - 2013. – P. 413-418.

119. Goker Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions / J.P. Meier-Kolthoff, A.F. Auch, H.-P. Klenk // *BMC Bioinf.* – 2013. – Vol. 14 (60). – P. 1471-2105.

120Gogarten Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case / S.M. Colston, M.S. Fullmer, L. Beka, J.P. Lamy, // *mBio.* – 2014. – Vol. 5 (6). – P. 1-13.

121. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity / I. Lee, Y.O. Kim, S. Park, J. Chun // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – P. 1100-1103.

122. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species

from Malaysia / S.D. Puthuchery, S.M. Pua, K.H. Chua // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. e30205.

123. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. / Ø. Ørmen, P.E. Granum, J. Lassen, M.J. Figueras // APMIS. – 2005. – Vol. 113. – P. 203–207.

124. Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media* / S. Persson, S. Al-Shuweli, S. Yapici, J.N. Jensen, K.E. Olsen // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – P. 653–656.

125. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes / M.E. Martino, L. Fasolato, F. Montemurro, M. Rosteghin, A. Manfrin, T. Patarnello, E. Novelli, B. Cardazzo // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77. – P. 4986–5000.

126. Нечипоренко, Ю.Д. К вопросу патогенеза краснухи карпов / Ю.Д. Нечипоренко, В.В. Манжелый // Рыбное хозяйство: респ. межвед. – М.: Высшая школа, 1963. - С. 13-119.

127. Бабенко, О.В. Опыт борьбы с аэромоназом карпа / О.В. Бабенко, Г.С. Оганесян // Ветеринария. – 1997. - № 7. - С. 14–15.

128. Аксенов, В.И. Антибиотики в продуктах животноводства / В.И. Аксенов, В.А. Ковалев. - М.: Колос, 1977. - 73 с.

129. Мирзоева, Л.М. Контроль за применением химиопрепаратов в рыбоводстве / Л.М. Мирзоева // Рыбн. хоз-во. Сер. Рыбохоз. использ. внутр. водоемов / Зарубежный опыт: Экспресс-информация / ЦНИИТЭИРХ. - 1987 Вып. 8. - С. 15–17.

130. Токин, Б.П. Целебные яды растений: Повесть о фитонцидах / Б.П. Токин. - Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1980. – С. 42-57.

131. Токин, Б.П. Фитонциды как экологическая и эволюционная проблема / Б.П. Токин // Материалы VIII совещ. по проблеме фитонцидов: Тез. докл., Киев, 16-18 окт. 1979 г. - Киев: Наукова думка, 1979. – С. 3-5.

132. Айзенман, Б.Е. Антибиотики из высших растений / Б.Е. Айзенман // Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства. – Киев: Наукова думка, 1967. – С. 23–28.

133. Матвієнко, Н.М. Вивчення доцільності застосування бактерицидного препарату «Бровасептол» в аквакультури / Н.М. Матвієнко, А.І. Мрук, Н.Й. Тушницька // Науково технічний бюллетень. – Львів .- Вип. 8. - 2007. - № 3-4. - С. 436-438.

134. Тушницька, Н.Й. Вплив препаратів «Бровасептол» і «Вітан» на активність антиоксидантної системи в організмі коропа, хворого на краснуху при різних способах їх введення / Н.Й. Тушницька, Г.В. Янович // Біологія тварин. - 2007. - Т. 9. - № 1-2. - С. 195-198.

135. Зданович, О.В. Эффективность применения «Окситетравета 500» при лечении карпов, больных аэромонозом / О.В. Зданович, В.М. Егоров // Студенты - науке и практике АПК: материалы 96-й Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 25-26 мая 2011 г.). - Витебск : ВГАВМ, 2011 – URL: <https://repo.vsavm.by/bitstream/123456789/14335/1/%D0%BA-2011-26-6-59-60.pdf> (дата обращения 12.10.2023).

136. Патент № 2 327 464 С1 Российская Федерация, А61К 31/664 (2006.01). Способ лечения аэромоноза у рыб: № 2006137202/13: заявл. 20.10.2006: опубликовано 27.06.2008 /Медведев Илья Николаевич Беспарточный Борис Дмитриевич; патентообладатель: Медведев Илья Николаевич Беспарточный Борис Дмитриевич.

137. Патент № 2 309 586 С1 Российская Федерация, А01К 61/00 (2006.01). Способ оздоровления карпов в рыбоводных хозяйствах на сбросных каналах электростанций, зараженных ассоциативными возбудителями аэромоноза и сапролегниоза: № 2006110325/12: заявл.

30.03.2006: опубликовано 10.11.2007 / Лысенко Александр Анатолиевич, Куклева Яна Викторовна, Христич Виктор Анатольевич; патентообладатель: Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный аграрный университет».

138. Наставление по применению биощрота в ветеринарии № 22-5/26 Рег № 10.07.10-92.ОВФП/ утверждено начальником управления ветеринарии МСХ РФ 7 мая 1992 г – URL: <http://www.agrozoo.ru/text/vetprep.html> (дата обращения 21.01.2023).

139. Патент № 2 808 519 С1 Российская Федерация, А01К 61/13 (2017.01). Средство для лечения болезней рыб: № 2022135088: заявл. 29.12.2022: опубликовано 28.11.2023 / Сорокин Павел Антонович, Енгашев Виктор Владимирович, Гончарова Маргарита Николаевна, Енгашева Екатерина Сергеевна, Кустарева Ирина Александровна, Касьянов Александр Алексеевич, Сапожников Владимир Ноевич, Енгашев Владимир Григорьевич, Сочнев Василий Васильевич, Уша Борис Вениаминович, Гламаздин Игорь Геннадьевич, Удавлиев Дамир Исмаилович, Енгашев Сергей Владимирович, Комаров Александр Анатольевич; патентообладатель: общество с ограниченной ответственностью «Научно-внедренческий центр Агроветзащита», Енгашев Сергей Владимирович.

140. Заявка на патент №: 2006123128/13, 30.06.2006. Препарат для лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии и способ лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии: опубликовано 10.01.2008 / Борисова Мария Николаевна, Дрошнев Алексей Евгеньевич, Завьялова Елена Александровна; патентообладатель: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ).

141. Заявка на патент №: 2007102836/12, 26.01.2007. Способ дезинфекции водной среды от возбудителя аэромоназа карповых рыб:

опубликовано 20.09.2008 / Бутко Михаил Павлович, Смирнов Анатолий Михайлович, Неретин Михаил Вячеславович (RU); патентообладатель: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии).

142. Вопросы рыбного хозяйства Беларуси / С.М. Дегтярик, Е.И. Гребнева, Г.В. Слободницкая, Н.А. Бенецкая, Е.В. Максимьюк, А.В. Беспалый // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. – 2016. – № (32). – С. 249-261.

143. Дас, Д.К. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигнализации/ Д.К. Дас, Н. Молик // Биохимия. - 2004. – Том 69(1). – С. 16-24.

144. Gudding, R. Recent developments in fish vaccinology / R. Gudding, A. Lillehaug, R. Evensen // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1999. – Vol. 72. - № 1-2. – P. 203-212.

145. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish - a review / K. Srikanth, E. Pereira, A.C. Duarte, I. Ahmad // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. – 2013. – Vol. 20. - № 4. – P. 2133-2149.

146. Ткаченко, Г.М. Глутатионовое звено антиоксидантной системы в тканях радужной форели (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*), иммунизированной анти-аеромонас вакциной / Ткаченко Г.М., И. Грудневская // Сельскохозяйственный журнал. 2016. №9. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/glutationovoe-zveno-antioksidantnoy-sistemy-v-tkanyah-raduzhnoy-foreli-oncorhynchus-mykiss-walbaum-immunizirovannoy-anti-aeromonas> (дата обращения: 15.11.2023).

147. Yagi, K. Active oxygens, lipid peroxides, and antioxidants / K. Yagi. – Japan Scientific Societies Press, Japan. – 1993. – 372 p.

148. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile Tilapia / L. Ruangpan, T. Kitao, T. Yoshida // Veterinary Immunology and

Immunopathology. - 1986. – Vol. 12. – P. 345–350.

149. Патент № 2 080 874 С1 Российская Федерация, А61К 39/02. Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб: № 93016152/13: заявл. 30.03.1993: опубликовано 10.06.1997 /Юхименко Л.Н., Смирнов Л.П.; патентообладатель: Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства.

150. Гусева, Н.В. Иммунный ответ рыб - объектов аквакультуры на вакцинацию против бактериальных заболеваний/ Наталья Владимировна Гусева 03.00.10. М., 1998. – 198с.

151. The response of new-season Nile Tilapia to *Aeromonas hydrophila* vaccine / S.M. Aly, A.S. Albutti, A.H. Rahmani, M. Nashwa // International Journal of Clinical and Experimental Medicine. – 2011. Vol. 8. – P. 4508–4514.

152. Trials to improve the response of *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas hydrophila* vaccine using immunostimulants (garlic, echinacea) and probiotics (Organic Green and Vet-Yeast) / S.M. Aly, A. Zohairy, M.A. Rahmani, A.H.M. Fathi, N.M.A. Atti // African Journal of Biotechnology. – 2016. – Vol. 15. – P. 989–994.

153. Vaccination in Nile Tilapia broodstock with whole cell vaccine and disease resistance in its fry against *Aeromonas hydrophila* /S. Sukenda, O. Carman, R. Rahman, D. Hidayatullah, N.S. Yumaidawati // Jurnal Akuakultur Indonesia. – 2017. – Vol. 16. – P. 268–276.

154. Specific immune response kinetics and mortality patterns of tilapia *Oreochromis niloticus* on post-cocktail vaccination period against the infection of *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* / S. Sukenda, T. Sumiati, S. Nuryati, A. M. Lusiastuti, D. Hidayatullah // Omni-Akuatika. – Vol. 13. – P. 6–15.

155. Stratev, D. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: a mini-review / D. Stratev, O.A. Odeyemi // Journal of Infection and Public Health. – 2016. – Vol. 9. - P. 535–544.

156. Stratev, D. An overview of motile *Aeromonas* septicemia management / D. Stratev, O.A. Odeyemi // Aquaculture International. – 2017. – Vol. 25. - P.

1095–1105.

157. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives / C. Tafalla, J. Bogwald, R.A. Dalmo // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2013. Vol. 35. – P. 1740–1750.

158. Hematological and immunological responses of Nile Tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes / B.C. Silva, M.L. Martins, A. Jatobá, C.C.B. Neto, F.N. Vieira, G.V. Pereira, G.T. Jerônimo, W.Q. Seiffert, J.L. P. Mouriño // *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. – 2009. – Vol. 29. – P. 874–880

159. Use of modified live vaccines in aquaculture / C.A. Shoemaker, H. Phillip, P.H. Klesius // *Journal of the World Aquaculture Society*. – 2009. – Vol. 40. – P. 573–585.

160. Indoor study on the immunization of red tilapia: *Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus* against *Aeromonas* and *Pseudomonas* septicemias / Y.M. Abdel-Hadi, M.N. Shamsudin, K. Yusoff, S. Zakaria // *Journal of Fisheries International*. – 2009. – Vol. 4. – P. 45–51

161. Pridgeon, J. W. Development and efficacy of novobiocin and rifampicin-resistant *Aeromonas hydrophila* as novel vaccines in Channel Catfish and Nile Tilapia / J. W. Pridgeon, P. H. Klesius // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 7896–7904.

162. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds / Y. Yano, K. Hamano, I. Tsutsui, D. Aue-Umneoy, M. Ban, M. Satomi // *Food Microbiol.* – 2015. – Vol. 47. – P. 21–27.

163. Trials for vaccination of tilapia fish against *Aeromonas* and *Pseudomonas* infections using monovalent, bivalent, and polyvalent vaccines / K.M. Osman, L.A. Mohamed, E.H.A. Rahman, W.S. Solim // *World Journal of Fish and Marine Sciences*. – 2009. – Vol. 1. – P. 297–304.

164. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination / D.J. Pasnik, J.J. Evans, P.H. Klesius // *Diseases of Aquatic Organisms*. – 2015. –

Vol. 66. – P. 129–134.

165. Pathogenic bacteria in *Oreochromis niloticus* var. Stirling tilapia culture. / Z.G.H. Pech, C.M.R. Chavez, F.L. Reynoso // Journal of Fisheries and Aquaculture. – 2017. – Vol. 8. – P. 2.

166. Куклина, Н.Г. Бактериофаговый препарат для индикации и идентификации *Aeromonas salmonicida*: автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 06.02.02 / Куклина Наталья Григорьевна; [Место защиты: Башкир. гос. аграр. ун-т]. - Уфа, 2017. - 23 с.

167. Васильев, Д.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофага *Aeromonas salmonicida* / Д.А. Васильев, А.В. Алёшкин, С.Н.Золотухин и др. // Естественные и технические науки. - 2017. -№ 12 (114). - С. 39-47.

168. Temperate phage-antibiotic synergy eradicates bacteria through depletion of lysogens / A.M. Al-Anany, R. Fatima, A.P. Hynes / Cell Rep. – 2021. – Vol. 35(8) – p. 34-36.

169. Characterization, genome analysis and antibiofilm efficacy of lytic Proteus phages RP6 and RP7 isolated from university hospital sewage / S. Ali, A. Karaynir, H. Salih, S. Öncü, B. Bozdoğan // Virus Res. – 2023. – 326 p.

170. Abedon, S. T. Optimizing bacteriophage plaque fecundity / S.T. Abedon, R.R. Culler // J. Theor. Biol. – 2007. – Vol. 249. - 582–592.

171. Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila* / M. Akmal, A. Rahimi-Midani, M. Hafeez-ur-Rehman, A. Hussain, T.-J. Choi // Pathogens. – 2020. – Vol. 9. – P. 215.

172. Isolation of a lytic bacteriophage against virulent *Aeromonas hydrophila* from an organized equine farm /T. Anand, R.K. Vaid, B. Bera, J. Singh, S. Barua, N. Virmani // J. Basic Microbiol. – 2022. – Vol. 56. – P. 432–437.

173. High-resolution Repli-Seq defines the temporal choreography of initiation, elongation and termination of replication in mammalian cells / P.

Zhao, T. Sasaki, D.M. Gilbert // *Genome Biol.* – 2020. - Vol. 21. – P. 76.

174. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles/ P.G. Falkowski, T. Fenchel, E.F. Delong // *Science.* – 2008. – Vol. 320. – P. 1034–1039.

175. Phage puppet masters of the marine microbial realm /M. Breitbart, C. Bonnain, K. Malki, N.A. Sawaya // *Nat Microbiol.* – 2018. – Vol. 3. – P. 754–766.

176. Dennehy, J.J. Bacteriophages as model organisms for virus emergence research / J.J. Dennehy // *Trends Microbiol.* – 2009. – Vol. 17. – P. 450–457.

177 The arms race between bacteria and their phage foes / H.G. Hampton, B.N.J. Watson, P.C. Fineran // *Nature.* – 2020. – Vol. 57. – P. 327–336.

178. Understanding the impacts of bacteriophage viruses: From laboratory evolution to natural ecosystems / B. Koskella, C.A. Hernandez, R.M. Wheatley // *Annu Rev Virol.* – 2022. - № 9. – P. 57–58.

179. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology / R.K. Aziz, D. Bartels, A. Best // *BMC Genomics.* – 2008. - № 9. – P. 75.

180. Fermentation and downstream processing of *Bacillus* / R.J. Sharp, M.D. Scawen, T. Atkinson // *Biotechnology Handbook: Bacillus.* - Harwood C.R. New York: Plenum Press, 1989. P. - 255–292.

181. Оценка чувствительности аэромонад к антибактериальным препаратам и споровым пробиотикам / М. А. Морозова, М. А. Дьяченко, В. А. Чистяков, Ю. О. Пархоменко, Ю. В. Степанова // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию азовского научно-исследовательского института рыбного хозяйства «Актуальные вопросы рыболовства, рыбоводства (аквакультуры) и экологического мониторинга водных экосистем» (11–12 декабря 2018 года). – Ростов-на-Дону, 2018. – С. 70-75.

182. Гаврилин, К.В. Уровень чувствительности возбудителей бактериальных болезней рыб к антибактериальным препаратам /К.В. Гаврилин // *Ветеринарная патология.* – 2008. - № 3 (26). - С. 91–94.

183. Гаврилин, К.В. Результаты мониторинга

антибиотикорезистентности основных групп ихтиопатогенных бактерий за 2014 год / К.В. Гаврилин // Ветеринарная патология. – 2014. - № 4. - С. 14–15.

184. Отчет о научно-исследовательской работе (государственный контракт № 32-02/2013) Научное обоснование перечня антибиотиков, применяемых в аквакультуре, и обеспечение методического подхода [Электронный ресурс]. URL: <http://www.nauka.xpdf.ru/17kulturologiya/324512-5-otchet-nauchno-issledovatel'skoy-rabotegosudarstvenniy-kontrakt-32-02-2013> (дата обращения 12.01.2023).

185. Клиническая фармакология и фармакотерапия / Ю.Б. Белоусов, В.С. Моисеев, В.К. Лепяхин. - М., 1997. - 532 с.

186. Гаврилин, К.В. Методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) карпа (*CYPRINUS CARPIO L.*): дис. ... кандидата биологических наук : 03.00.10 / Гаврилин Кирилл Владимирович. - М., 2004. - 150 с.

187. ВекторЕвро. Пробиотик СУБ-ПРО - лекарственное средство для животных нового поколения. URL: vet-probiotic.ru (дата обращения 23.02.2023).

188. Пробиотик – препарат для профилактики бактериальных заболеваний рыб / Э.К. Скурат, В.А. Сиволоцкая, С.М. Дегтярик // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: Тез. докл. науч.-практ. конф. – Москва: МИК, 2000. – С. 114–115.

189. Пробиотики для профилактики бактериальных инфекций у рыб / Э.К. Скурат, В.А. Сиволоцкая, Т.А. Говор // Аналит. и реф. инф. Сер.: Болезни гидробионтов в аквакультуре. – 2001. – № 1. – С. 30–32.

190. Асадчая, Р.Л. Использование пробиотиков для профилактики бактериальных болезней рыб / Р.Л. Асадчая // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2005. - № 5. – С. 183-185.

191. Производственная компания КросФарм. МУЦИНОЛ - пробиотик-

иммуномодулятор. URL: <https://krosfarm.ru> (дата обращения 12.01.2023).

192. Аламдари, Х. Использование пробиотических препаратов при кормлении осетровых рыб: результаты испытания при температуре воды ниже оптимальной / Х. Аламдари, С.В. Пономарёв // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: рыбное хозяйство. - 2013. - № 3. – С. 133-140.

193. Caffeine supplementation in diet mitigates *Aeromonas hydrophila* - induced impairment of the gill phosphotransfer network in grass carp *Ctenopharyngodon idella* / M.D. Baldissera, C. Freitas Souza, J.B. Dias, A.S. Da Silva, B. Baldisserotto // Microb Pathog. – 2019. - Vol. 136. – P. 103710.

194. Effects of thymol supplementation on performance, mortality and branchial energetic metabolism in grass carp experimentally infected by *Aeromonas hydrophila* / M.B. Morselli, M.D. Baldissera, C.F. Souza, J.H. Reis, B. Baldisserotto, A.A. Sousa, F. Zimmer, D.L.A. Lopes, T.G. Petrolli, A.S. Da Silva // Microb Pathog. – 2020. – Vol. 139. – P. 103915.

195. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб: часть 1. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб. - Москва, Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. - С. 142-150.

196. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб: часть 1. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности. - Москва, Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. - С. 150-152).

197. SMI ID 19: identification of *Vibrio* and *Aeromonas* species (Public Health England, 2015) - URL: <https://www.gov.uk/government/publications/smi-id-19-identification-of-vibrio-species> (дата обращения 12.08.2023).

198. Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» - URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200038583> – дата обращения 12.04.2023.

199. Microbous (Российский микробиологический портал). МАКМАХ

«Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)» - URL: <https://microbius.ru/library/rekomendatsii-makmah-opredelenie-chuvstvitelnosti-mikroorganizmov-k-antimikrobnym-preparatam-2021-novaya-versiya-2021-01> - дата обращения 12.04.2023.

200. Техэксперт – URL: <http://docs.cntd.ru/> - дата обращения 12.01.2023.

201. StandartGOST. МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» - URL: <https://standartgost.ru/g/pkey-14293831170> - дата обращения 12.09.2023.

202. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. - М.: Медгиз, 1961. - С. 169-187.

203. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2007. - С. 32.

204. Алешкин, А.В. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации / А.В. Алешкин, Э.А. Светоч, Н.В. Воложанцев [и др.] // Бактериология.- 2016. - Том 1. - №1. - С. 22-31.

205. Калдыркаев, А.И. Выделение бактериофагов вида *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Г.Ф. Архипова // Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины: материалы конференции молодых ученых. - Покров, 2009. - С.154-157.

206. Feoktistova, N.A. Biological properties of anthrax bacteriophage / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, D.I. Klymushkin, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A.Toigildina, K.V. Belova // Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences Paper. – 2018. - Vol 20, Issue 1. - P. 337-340.

207. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина и др. // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции.- Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.

208. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus*/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. - Ульяновск: УлГУ, 2011. - С. 136-139.

209. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – С.32.

210. Алешкин, А.В. Лекции по исследованию и применению бактериофагов / А.В. Алешкин. - Ульяновск, УГСХА, 2016. – 112 с.

211. Мартынова, К.В. Выделение и идентификация бактерий *Bacillus coagulans* из пищевого сырья и продуктов питания / К.В. Мартынова, Н.А. Феоктистова // Материалы IX Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» посвящённой 75-летию Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина. Часть 2. - Ульяновск, 2018. – С. 16-17.

212. Феоктистова, Н.А. Параметры реакции нарастания титра фага с сибиреязвенным бактериофагов / Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. - 2015. - № 4 (75). - с. 47-51.

213. Методические указания по лабораторной диагностике аэромоноза (краснухи) карпов (утв. Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР 23 апреля 1986 г. N 13-3/5) – URL: <https://docs.cntd.ru/document/551625005> (дата обращения 12.02.2023)

214. *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences / М.А. Yáñez, V. Catalán, D. Apráiz, M.J. Figueras, A.J. Martínez-Murcia// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – № 53 (3). – P. 875-883.

215. Navarro, A. Phylogenetic analyses of the genus *Aeromonas* based on

housekeeping gene sequencing and its influence on systematics / A. Navarro, A. Martínez-Murcia // J. Appl. Microbiol. – 2018. - № 125(3). – P. 622-631.

216. PCR Detection of Putative Hemolysin and Aerolysin Genes in An *Aeromonas hydrophila* Isolates from Diarrhea in Babylon Province / R. Taj Aldeen Wejdan, F. Al-rubaiae Abeer, K.H. Al-bermani Oruba, S. Naji Noor // Journal of Natural Sciences Research. – 2014. - Vol.4, №.11. – P. 41-48.

217. Патент №2 525 141 С1 Российская Федерация, С12N 7/00 (2006.01) А61К 35/76 (2006.01). Способ получения бактериофага: № 2013126187/10: заявл.: 07.06.2013: опубликовано 10.08.2014 Бюл. № 22 / Киселева Ирина Анатольевна, Алешкин Андрей Владимирович, Верёвкин Владимир Васильевич, Светоч Эдуард Арсеньевич, Афанасьев Станислав Степанович, Рубальский Евгений Олегович, Рубальская Елена Евгеньевна, Рубальский Максим Олегович, Ефимова Ольга Григорьевна, Васильев Дмитрий Аркадьевич, Золотухин Сергей Николаевич.

218. ТР ТС 029/2012. Технический регламент Таможенного союза - Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств (с изменениями на 18 сентября 2014 года) - URL: <http://docs.cntd.ru/document/902359401> - дата обращения 20.09.2019.

219. ОФС.1.1.0004.15 Отбор проб «Государственная фармакопея Российской Федерации», XIII издание, том I, 2015 год. Дата начала действия: 01 января 2016 – URL: <http://docs.cntd.ru/document/420324463> - - дата обращения 20.09.2019.

220. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение. / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – 636 с.

221. Бибен, И.А. Лиофилизация пробиотической культуры *Bac. subtilis* VI-12 / И.А. Бибен // Уральский Научный Вестник . - 2016. - Т. 4, № 1. - с. 35-39.

222. Будыка, Д.А. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины / Д.А. Будыка, Н.В. Абзаева // Инфекция и иммунитет. - 2016. - Т. 6, № 1. - с. 87-92.

223. Давыдкин, Ю.П. О движущей силе процесса сублимации влаги из различных материалов / Ю. П. Давыдкин, В. Д. Похиленко, В. Ю. Давыдкин, И. Ю. Давыдкин // Системы управления и автоматизации технологических процессов - М. НИИСЭНТИ, 1993. - Вып. 1. - 40 с.

224. Методы для длительного хранения бактериофагов / О.В. Дмитрачкова, А.Д. Герасимович, Г.И. Новик // Сборник материалов III Международной молодежной научно-практической конференции (6-9 ноября 2012 года). – Минск, 2012. - С. 241-244.

225. Долинов, К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов / К. Е. Долинов. – М: Медицина, 1969. - 232с.

226. Лимарева, Т.Д. Влияние условий сублимационного высушивания пробиотиков на специфическую активность / Т.Д. Лимарева, Н.В. Девякович, М.И. Демешева // Сибирский медицинский журнал (Томск). - 2009. - Т. 24. - № 2-2. - С. 68-71.

227. Подбор защитных сред для лиофильного высушивания холерных фагов / Л.Д. Македонова, В.И. Арутюнов, Т.Л. Кудрякова, Л.А. Наталич, В.В. Кадетов // Вирусы микроорганизмов и растений. - Ташкент, 1986. - С.203-204.

228. Никитин, Е.Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов / Под ред. Е.Е. Никитина, И.В.Звягина. – М.: Колос, 1971. – 306 с.

229. The genus *Aeromonas*: A general approach / R.V. Gonçalves Pessoa, W.F. de Oliveira, D.S.C. Marques, M.T. Dos Santos Correia, E.V.M.M. de Carvalho, L.C.V.B. Coelho // Microb Pathog. – 2019. – Vol.130. – P. 81-94.

230. Куклина, Н.Г. Бактериофаговый препарат для индикации и идентификации *Aeromonas salmonicida*: дис. ... кандидата биологических наук: 06.02.02 /Куклина Наталья Григорьевна. - Уфа, 2017. - 128 с.

231. Насибуллин, И.Р. Индикация и идентификация *Aeromonas hydrophila* с использованием биопрепарата на основе специфического

бактериофага: дис. ... кандидата биологических наук : 06.02.02 // Насибуллин Ильдар Равильевич. – Саратов, 2020. – 176 с.

232. Канаева, Т.И. Разработка методов выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*: дис. ... кандидата биологических наук: 03.00.23 / Канаева Татьяна Ивановна. – Саратов, 2009. – 131 с.

233. NSBI National Center for Biotechnology Information. - URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения 12.01.2023).

234. Ecology and importance of bacterial species of the family Vibrionaceae. / J. Karolcek, E. Urgeová, A. Durisová, M. Draskovicová, L. Klokocníková, K. Viteková, D. Kadlecík, M. Hocmanová, J. Durkovský // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1982. – Vol. 26(3). – P. 275-84.

235. Phenotypic, molecular and pathological characterization of motile *Aeromonads* isolated from diseased fishes cultured in Uruguay / A. Perretta, K. Antúnez, P. Zunino // J. Fish. Dis. – 2018. - Vol. 41(10). – P. 1559-1569.

236. Genotypic and phenotypic identification of *Aeromonas* species and CphA-mediated carbapenem resistance in Queensland, Australia / H.A. Sinclair, C. Heney, H.E. Sidjabat, N.M. George, H. Bergh, S.N. Anuj, G.R. Nimmo, D.L. Paterson // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2016. - Vol. 85(1). – P. 98-101.

237. Monfort, P. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond / P. Monfort, B. Baleux // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – Vol. 56 (7). – P. 1999-2006.

238. Virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in relation to source and biotype / S.M. Kirov, B. Rees, R.C. Wellock, J.M. Goldsmid, A.D. van Galen // J. Clin. Microbiol. – 1986. – Vol. 24 (5). – P. 827-834.

239. Prevalence of Potentially Pathogenic Antibiotic-Resistant *Aeromonas* spp. in Treated Urban Wastewater Effluents versus Recipient Riverine Populations: a 3-Year Comparative Study / T. Skwor, S. Stringer, J. Haggerty, J. Johnson, S. Duhr, M. Johnson, M. Seckinger, M. Stemme // Appl. Environ. Microbiol. – 2020. – Vol. 21. - № 86(3). – P. e02053-19.

240. A rapid MALDI-TOF MS identification database at genospecies level

for clinical and environmental *Aeromonas* strains / C. Benagli, A. Demarta, A. Caminada, D. Ziegler, O. Petrini, M. Tonolla // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 (10). – P. e48441.

241. Strong Genomic and Phenotypic Heterogeneity in the *Aeromonas sobria* Species Complex / J. Gauthier, A.T. Vincent, S.J. Charette, N. Derome // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. - № 8. – P. 2434.

242. *Aeromonas veronii* tolC modulates its virulence and the immune response of freshwater pearl mussels, *Hyriopsis cumingii* / S. Zheng, X. Tang, Q. Yang, X. Zhou, Y. Li, Z. Wu // Dev. Comp. Immunol. – 2023. – Vol. 14. - № 153. – P. 105137.

243. *Aeromonas* Isolates from Fish and Patients in Tainan City, Taiwan: Genotypic and Phenotypic Characteristics / C.J. Wu, W.C. Ko, N.Y. Lee, S.T. Su, C.W. Li, M.C. Li, Y.W. Chen, Y.C. Su, C.Y. Shu, Y.T. Lin, P.L. Chen // Appl/ Environ/ Microbiol. – 2019. – Vol. 16. - № 85(21). – P. e01360-19.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

**Временная инструкция по изготовлению и
контролю лабораторной серии бактериофагов
Aeromonas hydrophila Ah-4 серии УлГАУ и *Aeromonas*
veronii Av-4 серии УлГАУ**

Ульяновск - 2023

СЫРЬЕ И МАТЕРИАЛЫ

Действующим веществом фагового биопрепарата является смесь стерильных фильтратов фаголизатов, активных в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* *bv.veronii*.

Содержание видоспецифических активных бактериофагов в готовой форме продукта должно составлять $10^7 - 10^9$ БОЕ/мл. Концентрация бактериофаговых частиц подобрана на основании данных зарубежной научной литературы и проведенных собственными силами лабораторных испытаний, экономической целесообразности с учетом последующего разведения для осуществления фаговой дезинфекции. В качестве вспомогательного компонента рецептуры был использован Equilibration Buffer. В таблице 1 приведена рецептура фагового биопрепарата.

Таблица 1 – Рецептура биопрепарата для деконтаминации пищевого сырья и готовых продуктов питания на основе бактериофагов

Наименование компонента	Объем, мл
Equilibration Buffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 mM CaCl ₂ , pH 7.5)	40
Коктейль бактериофагов	60

Фаговый биопрепарат средство фасуют в асептических условиях по 100 мл в стеклянные флаконы и закрывают резиновыми пробками с алюмириевыми фиксаторам, объемом 100 ± 10 мл по ГОСТ Р 53416-2009 [1].

Подготовка стартерных культур пары бактериофаг – штамм-хозяин

Штаммы бактерий и бактериофагов, используемые для наработки бактериофагов (таблица 2), лиофилизируют, используя сублимационную сушку на защитной среде (состав: сухое обезжиренное молоко (9 %), лактоза (5 %), сахароза (5 %)).

Высушенные препараты бактериофагов проверяют на отсутствие посторонней микрофлоры. Для этого ампулы протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и вскрывают с использованием специальной режущей

пластинки. Далее с помощью шприца набирают буферный раствор в объеме 1 мл. Высушенная суспензия должна хорошо растворяться со стабилизатором. После пипеткой отбирают 1 мл растворенной суспензии бактериофагов и выливают на чашку с МПА и растирают шпателем. Чаши Петри с посевами инкубируют при температуре 37°C 24 часа.

Таблица 2 – Штаммы индикаторных бактерий для наработки бактериофагов

Бактериофаг	Штамм
<i>A.h. - 4 серии УлГАУ</i>	<i>Aeromonas hydrophila 12</i>
<i>A.v. – 4 серии УлГАУ</i>	<i>Aeromonas veronii bv.veronii P3</i>

Подготовка помещения и оборудования

Перед началом дезинфекции проверяют эффективность вентиляционного оборудования и НЕРА фильтров. Боксированное помещение и ламинар обрабатывают при помощи аламинола. Дезинфекцию оборудования, предназначенного для розлива и закупорки флаконов с фаговыми биопрепаратами, а также поддонов для флаконов и емкости для крышек, проводят 70 % раствором спирта.

Приготовление материалов

Перед стерилизацией осуществляют мойку стеклянной посуды. Стерилизацию лабораторной посуды осуществляют по следующему режиму: сухожаровой шкаф – 1 ч при 200 °С. Стерилизацию емкостей большого объема и частей перистальтического насоса (силиконовый шланг) проводят в автоклаве под давлением пара 1,2 атмосферы и рабочей температуре 121 °С, время стерилизации – 20 мин. Сухая стерилизация гамма-лучами пластиковых флаконов и крышек производится по контракту по следующей схеме: 18,5 кГр при скорости конвейера 3,0 см/сек.

Питательные среды

Разливают в литровые матрасы и стерилизуют при следующих режимах: под давлением 1,2 атмосферы и рабочей температуре 121 °С.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

1-й этап. Подготовка фаголизатов бактериофагов. Фаголизаты бактериофагов получают способом, запатентованным в РФ - патент №2525141 [2]. 4,5 мл 18-часовой бактериальной культуры штамма-хозяина в титре 10^9 КОЕ/мл засевают в матрас для культивирования – скошенная плотная питательная среда толщиной слоя от 10 мм до 25 мм, культивируют в течение 3–3,5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма-хозяина, затем на полученный газон культуры штамма-хозяина засевают маточный бактериофаг в титре 10^6 – 10^7 БОЕ/мл, герметично закрывают сосуд для культивирования.

Культивируют в течение 4–5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма бактериофага и толщине слоя воздуха над поверхностью плотной питательной среды от 25 мм до 40 мм, получают фаголизат при суспендировании бактериофага с поверхности плотной питательной среды физиологическим раствором или буферным раствором с pH 7,0–7,2 в количестве 9–10 мл, отсасывают фаголизат в стерильную емкость, добавляют трихлорметан в количестве 1:10, выдерживают в течение 30 мин при непрерывном шуттелировании, центрифугируют в течение 30 мин при 5000 об./мин, отбирают надосадочную жидкость в стерильные пробирки и проверяют титр по Грациа. Полученные отдельно бактериофаги в титре не менее 10^7 БОЕ/мл смешивают в стерильной емкости, в равных объемах.

2-й этап. Стерилизация фаголизата. Полученный коктейль фаголизатов фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм.

3-й этап. Сведение компонентов фагового биопрепарата. Коктейль стерильных фильтратов фаголизатов с учетом конечного титра бактериофагов доводят до объема 100 мл, с помощью уравновешенного буфера (Huglos) в стерильном флаконе.

4-й этап. Розлив. Фаговый биопрепарат средство фасуют в асептических условиях по 100 мл в стеклянные флаконы и закрывают

резиновыми пробками с алюмириевыми фиксаторам, объемом 100 ± 10 мл по ГОСТ Р 53416-2009 [1].

5-й этап. Маркировка. Маркировка включает следующие сведения о продукте: наименование, указание «не для розничной продажи», наименование и местонахождение изготовителя, объем, дату изготовления и дату упаковывания, срок годности и условия хранения, номер партии.

6-й этап. Хранение биопрепарата осуществляется при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 9 месяцев.

Критические контрольные точки (ККТ) на этапах создания фагового биопрепарата:

- **контроль микробиологической чистоты флаконов и крышек для розлива.** 5 флаконов из партии отбирают в боксе из двойного пакета. Заливают 10 мл стерильного МПБ (можно использовать LB-бульон, тиогликолевую среду). Флаконы закрывают, тщательно встряхивают, ставят в термостат при 37°C и 25°C на 48 ч. Затем, из каждого флакона, делают высев 0,1 мл на чашки с плотными питательными средами (кровяной агар, Сабуро) методом spot-теста. Инкубируют при 37°C 1 сутки на кровяном агаре и при 25°C – 3 суток на среде Сабуро. После инкубации контролируют наличие или отсутствие роста на чашках. Стерильным пинцетом выбирают 5 крышек из партии, замачивают в емкости с 250 мл стерильной жидкой питательной среды (МПБ, LB-бульон, тиогликолевая среда). Емкость закрывают, ставят в термостат при 37°C и 25°C на 48 ч, после чего повторяют методику посева и учета результатов в соответствии с процедурой, приведенной для флаконов;

- **контроль специфической активности фаголизатов.** Специфическую активность фаголизатов оценивали по методу Грациа. Накануне опыта готовя питательные среды. В чашки Петри разливают 1,5% МПА по 25 мл среды. Среду в чашках подсушивают в термостате до полного удаления конденсата. Агар должен быть абсолютно сухим, так как даже незначительное увлажнение может изменить количественные показатели

содержания частиц фага в исследуемой жидкости. Берут 0,7% МПА в пробирках по 2,5 мл в каждой, расплавляют его на водяной бане и охлаждают до 48–50 °С. Из жидкости, содержащей титруемый бактериофаг, готовят в пробирках ряд последовательных разведений. Затем в пробирку с 0,7% МПА вносят 1 мл соответствующего разведения исследуемого бактериофага, слегка перемешивают, добавляют 0,1–0,2 мл 10^9 культуры, чувствительной к бактериофагу – индикаторной (таблица 1), опять слегка перемешивают и содержимое пробирки выливают в чашку с МПА (вторым слоем). Смесь равномерно распределяют по поверхности агара и оставляют чашку Петри в горизонтальном положении на 40–50 мин, то есть до полного охлаждения агара. Затем чашки слегка подсушивают и инкубируют в термостате при оптимальной температуре роста микроорганизмов (таблица 3) в течение 21 ± 3 ч.

Таблица 3 – Температура инкубации посевов бактериофагов с индикаторными культурами

Бактериофаг	Штамм	$^{\circ}\text{C}$
<i>A.h.</i> - 4 серии УлГАУ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 12	29 ± 1
<i>A.v.</i> – 4 серии УлГАУ	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> P3	29 ± 1

На фоне равномерного роста микробов отмечаются пятна, где рост отсутствовал (полный лизис). При большом количестве бактериофага наступает лизис микроорганизмов на всей поверхности агара. Когда количество фаговых частиц невелико, то участков лизиса мало, и можно рассчитать количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл препарата, допуская, что каждый участок лизиса образовывался в результате действия одной частицы фага.

В таблице 4 приведены примерные результаты определения титра фага по методу Грациа.

- **контроль фаголизата на аномальную токсичность.** Объем 1 мл фаголизата вводят внутрибрюшинно 5 здоровым мышам обоего пола. После

введения фаголизата наблюдают за животным в течение 7 суток. Фаговый биопрепарат считается прошедшим испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одно из подопытных животных.

Таблица 4 – Контроль специфической активности фаголизатов

Бактериофаг	Средний титр по 10 экспериментально производственным партиям, БОЕ/мл	Контрольные значения титра, БОЕ/мл
<i>A.h.</i> - 4 серии УлГАУ	$8,0 \times 10^8 \pm 1,1$	Не менее 10^8
<i>A.v.</i> – 4 серии УлГАУ	$3,0 \times 10^8 \pm 1,3$	Не менее 10^8

- **микробиологическая чистота фаголизата.** Контролируемые по каждой партии продукта микробиологические показатели, приведенные в ТР ТС 029/2012 [3], указаны в таблице 5.

- **определение эндотоксина в фаговом биопрепарате.** Определение уровня эндотоксина после рабочего разведения фагового биопрепарата (до титра каждого бактериофага 10^9 БОЕ/мл) определяют с помощью реакции гелирования лизата амебоцитов крови мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛтест). Предельные значения уровня эндотоксина составляют не более 50 ЕЭ/мл.

Таблица 5 – Контроль микробиологической чистоты фаголизата

Показатели	Требования ТР ТС 029/2012 к ферментным препаратам
КМАФАнМ, КОЕ/мл, не более	5×10^4
БГКП в 0,1 мл	Не допускается
Сальмонеллы в 25 мл	Не допускается
<i>E. coli</i> в 25 мл	Не допускается
Сульфитредуцирующие клостридии, не допускаются в массе продукта, г	0,01

Определение срока годности фагового биопрепарата

Образцы из 6 партий продукции хранят в течение 9 месяцев при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$, периодически отбирая для контроля согласно

ОФС.1.1.0004.15 Отбор проб «Государственная фармакопея Российской Федерации» [4]. С периодичностью 1 раз в три месяца определяют титр фага по методу Грациа.

В процессе хранения готового продукта при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ активность всех бактериофагов не должна опускаться ниже $n \times 10^5$ БОЕ/мл.

Библиографический список

[1] ГОСТ Р 53416-2009 Тара стеклянная для лекарственных средств. Общие технические условия – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200075116> - дата обращения 12.01.2023.

[2] Патент №2 525 141 С1 Российская Федерация, С12N 7/00 (2006.01) А61К 35/76 (2006.01). Способ получения бактериофага: № 2013126187/10: заявл.: 07.06.2013: опубликовано 10.08.2014 Бюл. № 22 / Киселева Ирина Анатольевна, Алешкин Андрей Владимирович, Верёвкин Владимир Васильевич, Светоч Эдуард Арсеньевич, Афанасьев Станислав Степанович, Рубальский Евгений Олегович, Рубальская Елена Евгеньевна, Рубальский Максим Олегович, Ефимова Ольга Григорьевна, Васильев Дмитрий Аркадьевич, Золотухин Сергей Николаевич.

[3] ТР ТС 029/2012. Технический регламент Таможенного союза - Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств (с изменениями на 18 сентября 2014 года) - URL: <http://docs.cntd.ru/document/902359401> - дата обращения 20.09.2023.

[4] ОФС.1.1.0004.15 Отбор проб «Государственная фармакопея Российской Федерации», XIII издание, том I, 2015 год. Дата начала действия: 01 января 2016 – URL: <http://docs.cntd.ru/document/420324463> - дата обращения 20.09.2023.

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет

Ломакин Артем Андреевич, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет

Богданов Ильгизар Исмаилович, кандидат ветеринарных наук, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет

Сульдина Екатерина Владимировна, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет

Нафеев Александр Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных и кожно-венерических болезней медицинского факультета ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет; заведующий отделением особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области»

Аэромоноз карповых: возбудители, диагностика и профилактика инфекции.

Монография. – Ульяновск. – 250 с.

Подписано в печать 05.12.2023г. Формат 60x90/16
Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. 15,625. Тираж 500 экз. Заказ № 114/1

Адрес издателя: 432072, г. Ульяновск, 1-й Инженерный проезд, 17