

УДК 811.111

ОБНАРУЖЕНИЕ ПАТОГЕНОВ ФЛАВОБАКТЕРИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА СООБЩЕСТВ

Маллямова Э.Н., кандидат педагогических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-11, eschejdul@yandex.ru
Сергатенко М.А., магистрант,
тел. 89020012306, sergatenkom@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: аквакультура, патоген, обнаружение, метагеномика, *Flavobacterium*, капельная цифровая ПЦР

В данной статье описано обнаружение возбудителей флавобактерий рыб в окружающей среде с помощью высокопроизводительного анализа сообществ. Особо отмечены угрозы и последствия *Flavobacterium columnare* и *Flavobacterium psychrophilum*. Сообщается о современных методах идентификации *F. columnare* и *F. psychrophilum*. Подробно рассказывается о методах выращивания штамма с мест отбора проб. Большое внимание уделяется фильтрации и секвенированию образцов. Упоминается сравнение экспериментальных образцов и контроля. Данная статья будет интересна студентам, подробно изучающим данный вопрос.

Введение. Совершенствование методов обнаружения бактериальных патогенов является главным приоритетом в мировой индустрии аквакультуры, поскольку запоздалое обнаружение и идентификация патогена может привести к разрушительным вспышкам болезней и высоким производственным потерям. *Flavobacterium columnare* и *Flavobacterium psychrophilum*, возбудители колумнариса и бактериальной болезни холодной воды (BCWD), соответственно, представляют собой серьезную угрозу для рыбоводной отрасли. После попадания в рыбоводное хозяйство эти патогены могут быстро распространяться и образовывать биопленки, что позволяет им избежать биоцидной обработки. Из-за своей трансмиссивности,

длительного выживания в окружающей среде, устойчивости к биоцидным обработкам и снижения эффективности вакцин, *F. columnsare* и *F. psychrophilum* чрезвычайно трудно контролировать на рыбных фермах, что приводит к крупным экономическим потерям.

Результаты исследований и их обсуждение. Современные методы идентификации *F. columnsare* и *F. psychrophilum* широко варьируются в зависимости от потребностей и возможностей лаборатории, выполняющей идентификацию, и включают классические биохимические, основанные на антигенах, основанные на ПЦР и методы на основе массивов ДНК. Обнаружение *F. columnsare* и *F. psychrophilum* в пробах воды и поверхности еще более осложняется наличием множества непатогенных видов *Flavobacterium*. Эти среды также обычно содержат ингибиторы ПЦР, которые могут снизить надежность анализов на основе ПЦР. Кроме того, *F. psychrophilum* также может быть сложно идентифицировать с помощью культуральных подходов из-за его низкой скорости роста и чрезмерного роста других бактерий. Эти характеристики роста флавобактерий представляют собой проблему для своевременной идентификации, и необходимы альтернативные методы идентификации.

Секвенирование нового поколения (NGS) используется для отслеживания источников патогенов и имеет то преимущество, что позволяет обнаруживать широкий спектр патогенов одновременно, и оно все чаще становится доступным инструментом для использования в молекулярной эпидемиологии. Хотя диагностическая метагеномика по-прежнему остается неортодоксальным методом диагностики заболеваний рыб, недавние исследования по обнаружению и устойчивости вируса в водной среде обитания продемонстрировали потенциальные преимущества этого метода. Глубокое секвенирование ампликона дает возможность обнаружить наличие сохраняющихся этиологических агентов и может помочь предотвратить будущие вспышки в условиях аквакультуры. Исследования маркерных генов, в частности, распространены и канонически проводятся путем секвенирования вариабельной области гена 16S рРНК, который распространен повсеместно и позволяет различать бактериальные таксоны. В то время как традиционные подходы используют метод кластеризации последовательностей, более поздний подход

идентифицирует варианты последовательностей ампликонов (ASV), в которых считывания амплифицированных последовательностей корректируются с ошибками, а идентичные последовательности помещаются в ASV. Этот подход повышает чувствительность обнаружения патогенов по сравнению с традиционными подходами.

Количественная ПЦР (кПЦР) уже давно считается золотым стандартом обнаружения и количественного определения болезнетворных агентов. Совсем недавно капельная цифровая ПЦР (ddPCR) стала многообещающим достижением в области qPCR. Благодаря своей технологии разделения и устойчивости к ингибирующим частицам, ddPCR оказался эффективным и чувствительным подходом для обнаружения мишеней с низким содержанием копий ДНК и даже начал заменять традиционную qPCR в конкретных приложениях. Кроме того, результаты ddPCR сообщают об абсолютных количествах в образце, а не об относительных частотах, как показывают методы на основе NGS.

Специфичность анализа была проверена на 31 штамме бактерий. Это включало тестирование 11 штаммов *F. columnsare*, представляющих 4 генетические группы этого вида, а также типовой штамм, использованный в этом исследовании. Было показано, что анализ *F. columnsare* специфичен для *F. columnsare* группы 1 (которая включает типовой штамм, использованный в настоящем исследовании). Анализ *F. psychrophilum* был специфичным для семи протестированных штаммов *F. psychrophilum*, включая типовой штамм, использованный в этом исследовании. Ни один из анализов не прореагировал на нецелевые виды.

Стандарты были получены из экстрагированной геномной ДНК *F. psychrophilum*. Размер генома типового штамма *F. psychrophilum* (2,72 Мб) был получен из NCBI и использован для расчета примерного количества копий гена 16S рРНК на нанограмм геномной ДНК с учетом числа копий гена (шесть копий). Стандартная кривая имела эффективность 111,2% и значение R^2 0,991 с наклоном -3,079 и точкой пересечения у на отметке 33,262.

Образцы, которые не были инокулированы целевыми штаммами (ATCC 23463T и/или ATCC 49418T), использовались в качестве дополнительных отрицательных контролей, в результате чего для

каждого вида было получено семь отрицательных контролей. Для *F. columnaris* в образцах отрицательного контроля были обнаружены нулевые прочтения. Низкие уровни *F. psychrophilum* были обнаружены в одном из семи образцов отрицательного контроля, возможно, из-за низких уровней перекрестного загрязнения во время фильтрации, экстракции ДНК или ПЦР-амплификации. Кроме того, для секвенирования MiSeq были проанализированы отрицательные и имитационные общественные контроли, чтобы учесть потенциальное загрязнение и проблемы систематической ошибки ПЦР. Отрицательные контроли включали отрицательные контроли ПЦР и экстракции, ни один из которых не представил значительного количества прочтений, что указывает на то, что загрязнение не было серьезной проблемой на этих этапах. Контрольный образец бактериального сообщества дал ожидаемый состав сообщества.

Заключение. Биоинформатическая обработка. Данные последовательности гена 16S рРНК V4, полученные с помощью Illumina MiSeq, демультимплексировали через BaseSpace. Затем данные парных концов были импортированы в QIIME 2, а чтения были отфильтрованы, удалены шумы и дереплицированы с помощью плагина denoise-paired DADA2. Последовательности были таксономически классифицированы и скомпилированы с использованием плагинов классификатора признаков и таксонов. Таксономия была назначена с использованием предварительно обученного классификатора Наивного Байеса на основе базы данных Silva 132 99% OTU, при этом чтения были обрезаны, чтобы включить только область, связанную Пара праймеров 515F/806R. Количество считываний для представляющих интерес таксонов было получено с помощью функции загрузки csv в рамках визуализации гистограммы, предоставляемой QIIME 2. Параметры обработки QIIME 2 по умолчанию использовались на протяжении всего рабочего процесса, если не указано иное.

Библиографический список:

1. Маллямова, Э. Н. Трудности перевода ветеринарных текстов / Э. Н. Маллямова // Совершенствование системы подготовки и дополнительного профессионального образования кадров для агропромышленного комплекса: Материалы национальной научно-

практической конференции, Рязань, 14 декабря 2017 года. Том Часть I. – Рязань: Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева, 2017. – С. 168-172. – EDN YSGTWX.

2. National Library of Medicine. Detecting Flavobacterial Fish Pathogens in the Environment via High-Throughput Community Analysis [Электронный ресурс]: Официальный сайт. – М., 2022. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8788675/>

DETECTING FLAVOBACTERIAL FISH PATHOGENS IN THE ENVIRONMENT VIA HIGH-THROUGHPUT COMMUNITY ANALYSIS

Malliamova E.N., Sergatenko M.A.

Keywords: *aquaculture, pathogen, detection, metagenomics, Flavobacterium, drip digital PCR*

This article describes the detection of Flavobacterium pathogens of fish in the environment using high-throughput community analysis. It is specially noted the threats and consequences of Flavobacterium columnsare and Flavobacterium psychrophilum. It is reported current methods for the identification of F. columnsare and F. psychrophilum. It is spoken in detail sampling sites strain cultivation techniques. Much attention is paid to sample filtration and sequencing. Comparison of experimental samples and controls is mentioned. This article will be of interest to students who study this issue in detail.