

DOI: 10.48612/sbornik-2022-1-39  
УДК 574.24

### **UPGMA-АНАЛИЗ DNAJ AEROMONAS VERONII И РЯДА БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АЭРОМОНОЗОВ У КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГИДРОБИОНТОВ**

**Булавина Мария Константиновна**<sup>1</sup>

**Дроздов Анатолий Леонидович**<sup>2</sup>, д-р биол. наук

**Иньхуа Лу**<sup>3</sup>, PhD

**Осепчук Денис Васильевич**<sup>4,5</sup>, д-р с.-х. наук

**Зимин Андрей Антонович**<sup>6</sup>, канд. биол. наук

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пуцинский государственный естественно-научный институт»,

г. Пушино, Российская Федерация

<sup>2</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,

г. Владивосток, Российская Федерация

<sup>3</sup>Колледж наук о жизни, Шанхайский Педагогический Университет, г. Шанхай, Китай

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»,

г. Краснодар, Российская Федерация

<sup>5</sup>ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,

г. Краснодар, Российская Федерация

<sup>6</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской Академии Наук», г. Пушино, Россия

*Aeromonas veronii* может вызвать массовую гибель у двухстворчатых моллюсков и различных видов рыб. У человека эта бактерия может стать причиной сепсиса, раневых и кишечных инфекций. Заболевания, возбудителями которых является *A. veronii*, ведут к серьезным экономическим проблемам в разведении различных водных организмов. Вопрос точной идентификации этой бактерии оказывается в центре внимания производителей различных продуктов аквакультуры. Для формирования тест-систем определения видов возбудителей инфекции гидробионта необходимо изучить эволюцию различных генетических маркеров этой аэромонадной бактерии, что ляжет в основу будущих исследований ветеринаров и выбора методов лечебной обработки культуры конкретного гидробионта для ветеринаров.

**Ключевые слова:** *Aeromonas veronii*; dnaJ-ген; DnaJ шаперон; факторы вирулентности; *Hyriopsis cumingii* Lea

### **UPGMA-ANALYSIS OF DNAJ AEROMONAS VERONII AND A NUMBER OF RELATED SPECIES THAT CAUSE AEROMONOSIS IN CULTURED HYDROBIONTS.**

**Bulavina Maria Konstantinovna**<sup>1</sup>

**Drozhdov Anatoly Leonidovich**<sup>2</sup>, Dr. Biol. Sci

**Lu Yinhua**<sup>3</sup>, PhD

**Osepchuk Denis Vasilyevich**<sup>4,5</sup>, Dr. Agr. Sci

**Zimin Andrei Antonovich**<sup>6</sup>, PhD Biol. Sci

<sup>1</sup>Pushchino State Institute of Natural Science

<sup>2</sup>A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation

<sup>3</sup>College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

<sup>4</sup>Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation

<sup>5</sup>Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine,

Krasnodar, Russian Federation

<sup>6</sup>G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS - a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russian Federation

*Aeromonas veronii* can cause mass extinction of bivalves and various fish species. In humans, this bacterium can cause sepsis, wound and diarrhoeic diseases. Infections caused by *A. veronii* lead to serious economic problems in breeding various aquatic organisms. Manufacturers of various aquaculture products spotlight is on the issue of accurate identification of this microorganism. To form test systems for determining the types of hydrobiont infections pathogens, it is necessary to study evolution of various genetic markers of this aeromonadic bacterium, which will form the basis for future research by biologists and the choice of methods for the therapeutic treatment of a culture of a particular hydrobiont for veterinarians.

**Keywords:** *Aeromonas veronii*; dnaJ gene; DnaJ shaperon; virulence genes; *Hyriopsis cumingii* Lea

*Aeromonas spp.* – условные патогены, вызывающие инфекции у животных и человека после травмы или стрессовой реакции у организма-хозяина. У человека они вызывают такие болезни как эндокардит, гастроэнтерит, перитонит и сепсис. Это семейство распространено как в различных водоемах, так и сточной воде, почве, а так же представителей этого вида можно выделить из гидробионтов. *Aeromonas spp.* является основными патогенами в разводимой рыбе. В последние годы все больше и больше болезней рыб вызывают представители этого семейства, такие как *A. caviae*, *A. veronii*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. sobria* и *A. bestiarum*. *A. hydrophila* – считается наиболее опасным заболеванием для разводимой рыбы, вызывающей у них геморрагическую болезнь. Однако в последнее время *A. veronii* все чаще заражает рыб, у которых встречаются симптомы и гистологические поражения, схожие с *A. hydrophila* [1].

*A. veronii* – грамотрицательная палочковидная бактерия, была первоначально описана Ф. Хикман-Бреннером в 1987 году. Этот возбудитель обычно выделяют из окружающей среды, клинических и пищевых образцов. Штаммы *A. veronii* все чаще выделяют из больных рыб. Клинические симптомы обычно включают язву, плавниковую/хвостовую гниль, вздутие живота, экзофтальм и кровоизлияние. Однако симптомы проявляются неодинаково; различный партеногенез наблюдается в зависимости от конкретных бактериальных изолятов или штаммов *A. veronii*. Однако, до сих пор слишком мало исследований, посвященных вирулентности, особенности роста и гистологическим поражением, культивируемых гидробионтов при инфекции данным видом аэромонад. На развитие заболевания и хода его течения у зараженного организма влияют набор факторов вирулентности конкретного возбудителя. Факто-

ры вирулентности *A. veronii* представлены цитотоническими энтеротоксинами (act, alt, ast), аэролизинном (aer), полярными жгутиками (fla), серинпротеазой (ser), эластазой (ahyB), липазой (lip), ДНКазой (exu), глицерофосфолипидами, такими как холестеринацилтрансфераза (gcaT) и системой секреции III типа (ascV). Изучение наличия факторов, связанных с вирулентностью, в клинических изолятах *A. veronii* необходимо для понимания патогенеза и эпидемиологии. Однако, практически не существует данных экспрессии этих генов на основе эпизоотий. Более того во многих случаях не указывается вид и штамм возбудителя при аэромонадной инфекции [2, 3]. Широко распространенная среди аэромонад устойчивость к антибиотикам [1] заставляет задуматься о применении бактериофагов в качестве терапевтических средств как это делается для *E. coli* [4, 5].

*A. veronii* оказался причиной массовой гибели двухстворчатого моллюска *Hyriopsis cumingii* Lea за счет быстрого развития эпизоотической инфекции в провинции Хунань в период с 2005 по 2011 год, где заболевания вызывал штамм SJ-2. Это явилось большой проблемой для жемчужного промысла, так как данный вид моллюсков основной производитель речного жемчуга в Китае. Штамм SJ-2 *A. veronii* вызывал полиорганные поражения и нарушение функции ряда органов, что приводило к постепенному снижению нормального обмена веществ, и в конечном итоге приводило к летальному исходу. Были исследованы макроскопические поражения, патологические изменения отдельных органов и ряд цитопатологических признаков [7].

Для типирования аэромонад с помощью ПЦР используют различные генетические маркеры, гены 16S rРНК, ген *gypB* и другие. Большой интерес у исследователей вызывает использование в качестве ПЦР – маркера гена

шаперона DnaJ. С этой точки зрения изучение эволюционных характеристик как гена, так и кодируемого им белка может помочь пониманию рамок использования этого маркера в практике ветеринарной работы. С другой стороны вопросы эволюции этого консервативного у аэромонад гена могут помочь решить некоторые вопросы внутриродовой таксономии этих возбудителей.

**Методика исследований.** В качестве реперной последовательности для поиска гомологичных белков базы данных nr (non-redundant protein sequences) с помощью алгоритма BLASTp была взята последовательность белка DnaJ *Aeromonas veronii* (GenBank: BAF64205.1) длиной 297 аминокислотных остатков. Среди аминокислотных последовательностей баз данных были отобраны 40 белков наиболее близких гомологов исследу-

емого шаперона. Множественное выравнивание было поведено с помощью алгоритма MUSCLE. Данные множественного выравнивания были использованы для построения эволюционного дерева методом UPGMA (Рис. 1) [10]. Для UPGMA использовалась Jones-Taylor-Thornton (JTT) модель аминокислотных замен, эволюционные расстояния были выражены в единицах количества аминокислотных замен на сайт [9]. Консенсусное филогенетическое дерево было получено путем 1000 повторов метода bootstrap [8]. В этом анализе использовали 40 последовательностей белков. Все позиции, содержащие бреши в элайменте были полностью удалены. Всего в финальном наборе данных было 194 позиции. Филогенетический анализ этих белков проводился в пакете программ MEGA X [10].

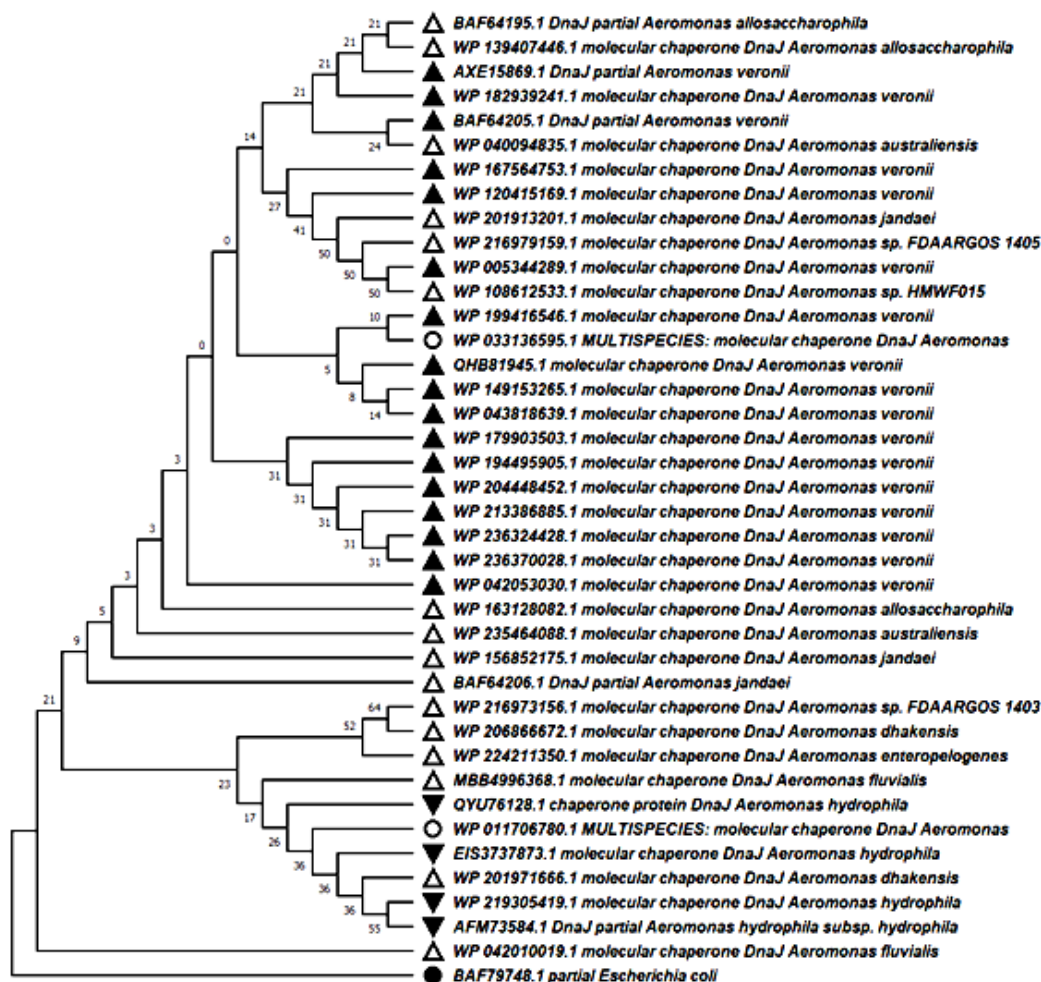


Рисунок 1 – Эволюционные отношения аминокислотных последовательностей DnaJ *A. veronii* и ряда близкородственных видов аэромонад, полученные методом UPGMA с использованием Jones-Taylor-Thornton (JTT) модели аминокислотных замен. DnaJ *Aeromonas veronii* обозначены черными треугольниками вверх, остальные DnaJ *Aeromonas* - белыми треугольниками, Multispecies DnaJ *Aeromonas* - белыми кружками, DnaJ *Escherichia coli* – черным кружком

**Результаты исследований и их обсуждение.** В первую очередь нужно обратить внимание на разделение на большую ветвь с различными штаммами *Aeromonas* и одиночным штаммом *E.coli* (рис.1) [3]. Представители этих микроорганизмов имеют сильное сходство, особенно в отношении использования нитратов-N и мочевины-N, а также они являются возбудителями диа-

рейного синдрома у человека и вызывают лизис эритроцитов. Все это говорит о родстве этих групп бактерий [1]. DnaJ – является белком теплового шока, содержащим консенсусную последовательность из 70 аминокислот (J-домен). В семействе *Aeromonas* отмечается до 98,7 % сходства последовательностей dnaJ.

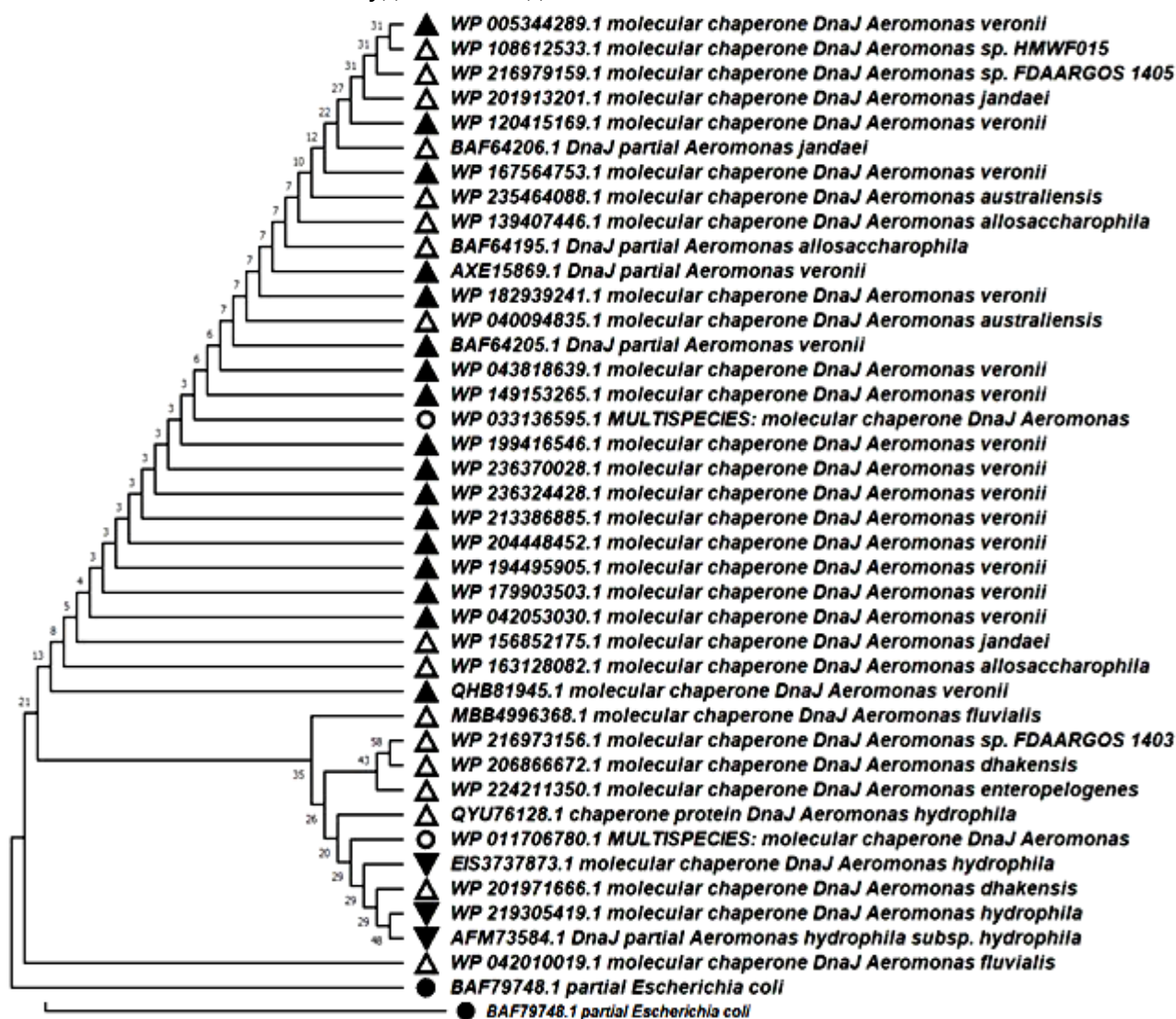


Рисунок 2 – Эволюционные отношения аминокислотных последовательностей DnaJ *A. veronii* и ряда близкородственных видов аэромонад, полученные методом UPGMA с использованием Equal Input method для модели аминокислотных замен [10]. Обозначения те же, что и на рисунке 1.

Филогенетическое дерево, представленное на рис.1 основано на UPGMA – анализе эволюционных сходств аминокислотных последовательностей данного шаперона аэромонад, полученное с использованием Jones-Taylor-Thornton (JTT) модели аминокислот-

ных замен. Крупная ветвь, представленная штаммами *Aeromonas*, снова разделяется на две ветви, на одной из которых представлен лишь *Aeromonas fluvialis*, а другая образует две большие группы. В одной из групп представлено несколько штаммов *Aeromonas*

*hydrophila*, в другой преобладают штаммы *Aeromonas veronii*. Две эти группы вызывают инфекции у ряда видов рыб, приводящих к массовой гибели и демонстрируют устойчивость к антибиотикам [7].

Ветвь с преобладанием *Aeromonas hydrophila*, так же разделяется на две ветви: на одной лишь два представителя *Aeromonas* sp. FDAARGOS 1403, *Aeromonas dhakensis* и *Aeromonas enteropelogenes*. *A. dhakensis* и *A. enteropelogenes* объединяет способность вызывать диарейный симптом у человека, но среди этой ветви только *A. enteropelogenes* чувствителен к ампициллину. Другая ветвь группы с преобладанием *Aeromonas hydrophila*, кроме уже названного вида имеет два штамма *Aeromonas fluvialis*, и множество видов *Aeromonas*.

В ветви с преобладанием *Aeromonas veronii*, кроме данного вида обнаружены два представителя *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas australiensis* и *Aeromonas allosaccharophila*. Последние штаммы образуют самостоятельную ветвь. Кроме них в этой ветви представлены *A. jandaei*, *Aeromonas* sp. FDAARGOS 140, *Aeromonas* sp. HMWF015.

Мы повторили эволюционное исследование этих последовательностей методом UPGMA с использованием Equal Input method для модели аминокислотных замен. Дерево приведено на рисунке 2. Хотя ветвление и обладает отличиями, но общий результат эволюционных отношений этих белков у *Aeromonas veronii* и близкородственных ей видов во многом совпадает. Это говорит об устойчивости полученного результата и сделанных из филогенетического анализа данного шаперона выводов.

Выбор подходящих олигонуклеотидов для использования их в качестве видоспецифических праймеров для типизирующей ПЦР возможен в определенных рамках. При использовании ПЦР также может возникнуть неопределенности связанные с близостью видов аэромонад группы *A. veronii*. Решением проблемы определения этиологии инфекционного заболевания гидробионта с помощью идентификации *A. veronii* может стать мультиплексный ПЦР с использованием как данного маркера, так и 16S, *gyrB* и других. Несмотря на сложность мультиплексного ПЦР с 5 и более парами праймеров, возможно, единственным способом разрешения данной задачи является увеличение числа получаемых фрагментов и постановки двух или более ре-

акций мультиплексного ПЦР.

К сожалению, при таком способе невозможно использование ПЦР в режиме реального времени. Быстрая и точная идентификация в лаборатории будет возможна только при применении технологии преформированных агарозных или аналогичных гелей и анализа результатов двух или более мультиплексных полимеразных цепных реакций с помощью обучающегося искусственного интеллекта.

Для идентификации конкретных штаммов *A. veronii* у культивируемых видов гидробионтов использование доступных для анализа реакций мультиплексного ПЦР, скорее всего, окажется полностью непригодным. Эту проблему может решить серологический анализ, но гораздо эффективнее будет применение бактериофагов для формирования набора для фаготипирования изучаемого штамма или штаммов возбудителя.

**Выводы.** Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей DnaJ *A. veronii* и гомологичных шаперонов ряда близкородственных видов аэромонад с помощью множественного выравнивания средством MUSKL и последующего построения филогенетического дерева методом UPGMA показал лишь относительную перспективность этого маркера для определения детектируемого возбудителя аэромоназов культивируемых гидробионтов.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669/>

### Список литературы

1. Chen F. (2019) Isolation, Identification and Characteristics of *Aeromonas veronii* From Diseased Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*) / Chen F, Sun J, Han Z, Yang X, Xian J-a, Lv A, Hu X and Shi H // Front. Microbiol. 10:2742.
2. Aguilera-Arreola M. G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study / Aguilera-Arreola M.G., Hernández-Rodríguez C., Zúñiga G., Figueras M.J., Garduño R.A., Castro-Escarpullí G. // Can J Microbiol. 2007 Jul;53(7):877-87.
3. Assis F. E. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, southern Brazil / Assis FE, Wolf S, Surek M, De Toni F, Souza EM, Pedrosa

FO, Farah SM, Picheth

G, Fadel-Picheth SM. // J Infect Dev Ctries. 2014 Dec 15;8(12):1609-14.

4. Скобликов Н. Э. Выделение и отбор нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* для противоколибактериозных препаратов / Н. Э. Скобликов, С. И. Кононенко, Д. В. Осепчук, Е. А. Москаленко, В. В. Авдиенко, А. А. Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016. – № 122. – С. 554–566. Doi: 10.21515/1990-4665-122-040.

5. Никулин Н. А. Конструирование терепетических фаговых коктейлей на основе бактериофагов Т4-типа: преимущества и недостатки. / Н. А. Никулин, С. И. Кононенко, А. Г. Кощаев, А. А. Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного универси-

тета. 2017. – № 133. – С. 823–849.

7. Zhong L. Pathogen Isolation and Pathologic Observation on Explosive Epidemics of *Hyriopsis cumingii* Lea / Zhong L., Xu B., Yan D., Xiao T., Liu Q. // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 16: 935-945 (2016) DOI: 10.4194/1303-2712-v16\_4\_21

8. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / Felsenstein J. // Evolution 1985. 39:783-791.

9. Jones D. T. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences /D. T. Jones, W. R. Taylor, J. M. Thornton // Computer Applications in the Biosciences 1992. 8; 275-282.

10. Kumar S. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // Molecular Biology and Evolution 2018. 35:1547-1549.

DOI: 10.48612/sbornik-2022-1-40

УДК 639.3.091(571.65)

### **ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА ПРОМЫСЛОВОЙ РЫБЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПАРАЗИТАРНОЙ ЧИСТОТЫ В УСЛОВИЯХ МАГАДАНСКОЙ ОБЛАСТИ**

**Витомскова Екатерина Анатольевна**, канд. вет. наук

ФГБНУ «Магаданский научно-исследовательский институт сельского хозяйства»,  
г. Магадан, Российская Федерация *orcid*: 0000-0003-3161-2475

Проведение ветеринарно-санитарной экспертизы промысловой рыбы и рыбной продукции на показатели паразитарной чистоты перед её реализацией, хранением и транспортировкой является необходимым мероприятием для обеспечения безопасности при употреблении в пищу людям. Исследованию на паразитарную чистоту подвергнуто 27 видов рыб, выловленных в 20-ти рыбохозяйственных водоёмах Магаданской области. Установлена инвазия личинками анизакид *Anisakis simplex* и *Pseudoterranova decipiens*; плероцеркоидами дифиллоботриид *Diphyllobothrium sobolevi*, *Pyramicocephalus phocarum*, акантеллами коринозом *Corynosoma strumosum*. Разработан комплекс мероприятий по обеспечению качества рыбной продукции по показателям паразитарной чистоты с внедрением в практику работы заинтересованных ведомств.

**Ключевые слова:** промысловые рыбы; личинки анизакид; плероцеркоиды дифиллоботриид; экстенсивность инвазии; Магаданская область

### **VETERINARY AND SANITARY EXAMINATION OF COMMERCIAL FISH FOR INDICATORS OF PARASITIC PURITY IN THE CONDITIONS OF THE MAGADAN REGION**

**Vitomskova Ekaterina Anatolyevna**, PhD Vet. Sci.

Magadan Scientific Research Institute of Agriculture, Magadan, Russian Federation

Conducting a veterinary and sanitary examination of commercial fish and fish products for indi-