



**Мальцев В.Н., зав. сектором ихтиопатологии, кандидат биологических наук**

Отдел «Керченский» Азово-Черноморского филиала ФГБНУ «ВНИРО», ул. Свердлова, 2, г. Керчь, 298300, Россия, E-mail: maltsev66@mail.ru

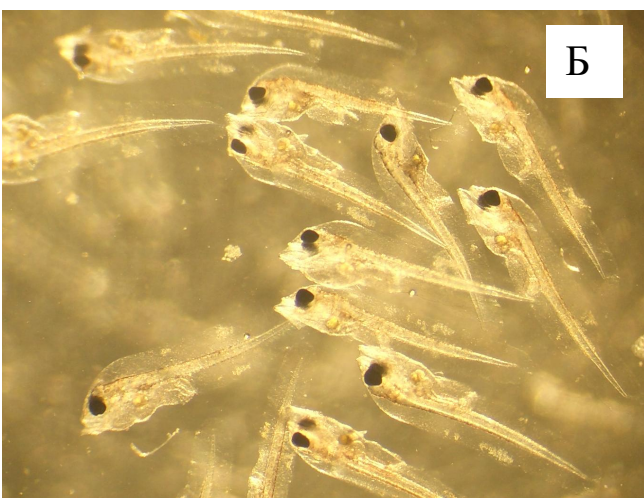


Рис. 1. Производитель азовской камбалы калкан (А) и искусственно полученные ее личинки (Б) (увеличение под биноклем 16 х) во время экспериментальных рыбоводных работ на НИБ «Заветное» (фото автора)

**Актуальность.** В настоящее время в Азово-Черноморском регионе России создается промышленная инфраструктура по выращиванию камбалообразных рыб. Делаются попытки внедрения разработанных ранее биотехнологий культивирования камбалы калкан (*Scophthalmus maximus*, =*S.maeoticus*) и глоссы (*Pleuronectes flesus*, =*Platichthys flesus*). В Крыму и в Краснодарском крае, кроме научно-исследовательской базы (НИБ) «Заветное» (отдел Азово-Черноморского филиала ФГБНУ «ВНИРО») (рис. 1), зарегистрированы еще 2 бассейновых камбаловых хозяйства, ведется проектирование государственного питомника для морских рыб (кефалей и камбал). По оценкам специалистов, природные условия Крыма и Кубани позволяют увеличить объемы товарной продукции морских рыбоводных хозяйств до 1,5-2,0 тыс. тонн в год. Камбалы восприимчивы к микроспоридиозам. Потенциальную опасность для разведения калкана и глоссы в Азово-Черноморском регионе представляет микроспоридиоз, вызываемый *Glugea stephani* (Glugeidae, Microsporidia). До настоящего времени сведения о встречаемости этого заболевания в России отражены лишь в научных публикациях, но не приводятся в ветеринарной отчетности. Это, а также отсутствие ветеринарных инструкций по диагностике, профилактике и лечению этой болезни существенно затрудняет ихтиопатологический контроль над ней. Известно, что внутриклеточные паразитические микроспоридии рыб высоко патогенны для своих хозяев. Они способны вызывать снижение темпа роста, ухудшать товарный вид и повышать смертность диких и культивируемых рыб; это может приводить к уменьшению товарной производительности морских рыбоводных хозяйств и сокращению промысловых запасов восприимчивых видов рыб [Lom, Dykova, 1992; Lom, 2002]. Практическая значимость микроспоридиозов возросла в последнее десятилетие в связи с увеличением объемов товарного выращивания рыб (аквакультуры) в мире [Recent Advances with Fish Microsporidia, 2022].

**Материал и методы.** Научную литературу собирали с использованием реферативных баз данных Scopus и Pro Quest, а также полнотекстовых источников научной информации на сайтах Google Академия, ScienceDirect, Wiley Online Library, Springer, с которыми сотрудники ФГБНУ «ВНИРО» и его филиалов имели доступ в рамках национальной подписки.

В работе использованы 70 источников, из которых на русском языке – 20 (28,6 %), на английском – 50 (71,4 %); монографий и диссертаций – 30 (42,9 %); научных статей – 29 (41,4 %); тезисов – 5 (7,1 %); нормативных документов – 8; электронных баз данных – 5. Из них 21 работа (30 %) опубликована в течение последних 10 лет. Обобщены современные научные данные о перечне хозяев *G. stephani*, его географическом распространении, эпизоотических особенностях вызываемого им микроспоридиоза камбал, в том числе источники заражения и факторы, влияющие на заболеваемость рыб. В течение 1998-2023 гг. периодически в отношении микроспоридиозов выполнялись клинические, патологоанатомические, гистологические, паразитологические и микроскопические исследования камбалы глоссы, азовского и черноморского калканов, пойманных из диких популяций или содержащихся на НИБ «Заветное». За указанный период нами исследовано 205 экз. камбал, из которых азовского калкана – 95, черноморского калкана – 39, глоссы – 71. Цисты (ксеномы) микроспоридий учитывали на внутренних органах в отраженном свете, а также на компрессионных препаратах в проходящем свете на увеличениях 16-32 х под биноклями МБС-1, МБС-10, МСП-2. Споры изучали на свежих водно-эмульсионных (временных) препаратах на увеличениях 400-1000 х под биологическим микроскопом МБИ-3, Микмед-6. Измерения спор делали окуляр-микрометром на микроскопе, откалиброванном (рассчитанном) с помощью объект-микрометра (ОШ-1). Используемое лабораторное оборудование соответствовало научным рекомендациям, а также нормативным требованиям к изучению паразитарных болезней рыб [Быховская-Павловская, 1985; Лабораторный практикум по болезням рыб, 1983; МУК 3.2.988-00]. Зараженность рыб цистами микроспоридий характеризовали следующими показателями: экстенсивность инвазии (ЭИ, доля зараженных рыб в исследуемой выборке, в %), интенсивность инвазии (ИИ, минимальное и максимальное количество цист в одной зараженной рыбе, в экз.). Для гистологических исследований инвазированных тканей рыб (кишечник) фиксировали 10 % нейтральным формалином. Промывку образцов, их спиртовую проводку, изготовление парафиновых блоков, их резку на санном микротоме МС-2 выполняли согласно общепринятым гистологическим методам [Роскин, Левинсон, 1957]. Срезы тканей толщиной 5-7 мкм окрашивали квасцовым гематоксилином – эозином или азаном по Гейденгайну. Результаты собственных и литературных данных стали основанием для наших экспертных обобщений относительно методов диагностики анализируемой болезни (таблица).

**Результаты.** Для *G. stephani* свойственна широкая хозяйственная специфичность. Этот паразит обнаружен более чем у 10 видов морских рыб, преимущественно камбалообразных. Инвазию *G. stephani* обнаруживали у речной (европейской) камбалы (*P.flesus*), морской камбалы (*Pleuronectes platessa*), зимней камбалы (*Pseudopleuronectes americanus*), английского морского языка (*Parophrys vetulus*), лиманды (*Limanda limanda*), желтохвостой лиманды (*L.ferruginea*), звездчатой камбалы (*Platichthys stellatus*), атлантического тюрбо (*Scophthalmus maximus*) и азово-черноморского калкана. Паразит регистрировался у средиземноморского побережья Франции, у побережья Англии, у атлантического и тихоокеанского побережий США, в Северном, Балтийском, Белом, Черном и Азовском морях. Ареалом *G. stephani* считается вся Голарктика [Canning, Lom, Dykova, 1986; Lom, Dykova, 1992; Lom, 2002].

Молодь камбал более восприимчива к этой болезни, чем взрослые рыбы; при этом все возрастные группы рыб могут быть инвазированы. Молодые камбалы заражаются микроспоридиями *G. stephani* в очень раннем возрасте (3 недели после выклева) [Lom, Dykova, 1992]. При низкой интенсивности инвазии болезнь протекает хронически, при высокой – остро, приводя к высоким показателям смертности зараженных рыб. Легкие инвазии кажутся безвредными для рыб, но это обманчивое представление. У тяжело пораженных камбал значительно уменьшается вес тела, и они погибают от истощения [Canning, Lom, Dykova, 1986]. При высокой интенсивности инвазии ксеномы (цисты) *G. stephani* полностью замещают собой ткани кишечника, который истончается, теряет эластичность, приобретает зернистую структуру (рис. 2). Эпителий кишечника сильно зараженных рыб разрушается, и он перестает усваивать пищу [Canning, Lom, Dykova, 1986]. В некоторых случаях у больных рыб нарушается проходимость кишечника. Это мы неоднократно наблюдали у камбалы глоссы в Сиваше. Больные кишечным микроспоридиозом камбалы становятся вялыми, их брюшка раздуваются, напоминая асцит (брюшную водянку). У сильно зараженных рыб снижается упитанность тела, уменьшается гемоглобин в крови, задерживается развитие гонад [Bruno, Alderman, Schlotfeldt, 1999; Khan, 2004]. Экстенсивность инвазии речной камбалы в Европе обычно достигает 50% и более. У зимней камбалы в США смертность от кишечного микроспоридиоза в течение первого года жизни составляла 40-50%. Высказывалось мнение, что этот микроспоридиоз способен снижать численность диких и культивируемых популяций речной и морской камбал [Kent, Shaw, Sanders, 2014]. Чрезвычайно высокую инвазированность кишечника и других внутренних органов (печени, почек, кожных покровов жаберной крышки) глоссы мы регистрировали в заливе Сиваш (ИИ – до нескольких тысяч ксеном; ЭИ – более 80%) (обследовано 32 экз. рыб). У сильно зараженной глоссы наблюдались макроскопические патологии органов в местах локализации цист; заметной была более низкая упитанность тела таких рыб.

# МИКРОСПОРИДИОЗ КАМБАЛ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ *GLUGEA STEPHANI*

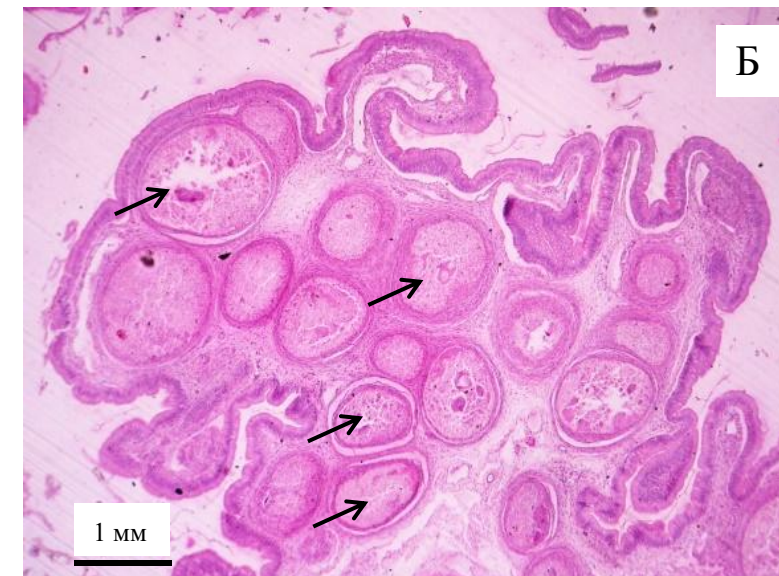
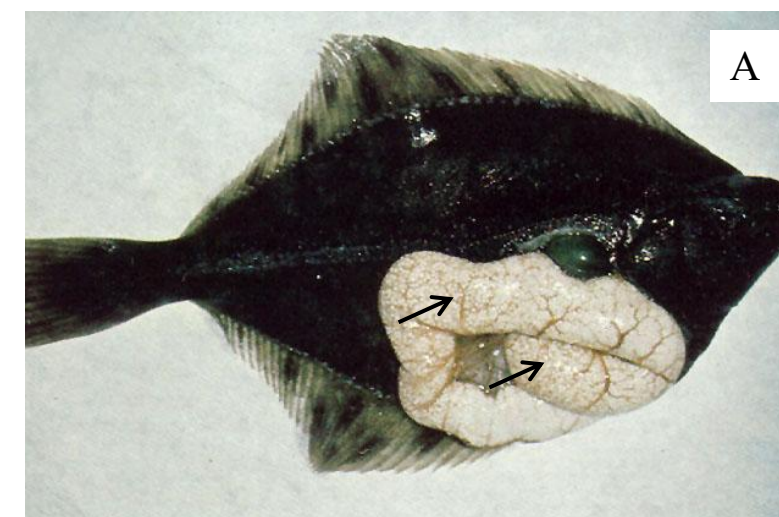


Рис. 2. Вскрытая речная (европейская) камбала (*P. flesus*) с патологоанатомическими признаками кишечного микроспоридиоза, вызванного *G. stephani* (черные стрелки указывают на характерную для этой болезни зернистую структуру кишечника, пораженного белыми цистами) (А) [FishBase, electronic resource]; гистологический срез через видоизмененную ткань кишечника камбалы глоссы, которая инвазирована цистами (ксеномами) *G. stephani* (черные стрелки); увеличение 100 х; окраска гематоксилин-эозином (Б) (оригинал).

Таблица – Экспертная оценка эффективности методов диагностики (тестирований) микроспоридиоза камбал, вызываемого *Glugea stephani*

Методы диагностики (тестирований)	Эпизоотический мониторинг		Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	молодь	взрослые		
Паразитология (световая микроскопия)	чувствителен, слабо специфичен, рекомендован	чувствителен, слабо специфичен, рекомендован	чувствителен, слабо специфичен, рекомендован	не рекомендован
Гистопатология	не рекомендован	не рекомендован	чувствителен, специфичен на родовом уровне, рекомендован	чувствителен, специфичен на родовом уровне, рекомендован
Просвечивающая электронная микроскопия	не рекомендован	не рекомендован	не рекомендован	чувствителен, специфичен на видовом уровне, рекомендован
ПЦР	высоко чувствителен и специфичен на видовом уровне, рекомендован	высоко чувствителен и специфичен на видовом уровне, рекомендован	высоко чувствителен и специфичен на видовом уровне, рекомендован	высоко чувствителен и специфичен на видовом уровне, рекомендован
ПЦР с последующим секвенированием	не рекомендован	не рекомендован	не рекомендован	высоко чувствителен и специфичен на видовом уровне, рекомендован

ПЦР к гену малой рибосомальной субъединицы рРНК применяют для обнаружения генетических материалов *G. stephani* в тканях и органах рыб на ранних (до образования ксеном) и на поздних стадиях развития этой болезни; возможно последующее секвенирование ПЦР продуктов [Noga, 2010; Microsporidia: diverse, dynamic..., 2013; Smith, 2019]. Нуклеотидная последовательность гена малой рибосомальной субъединицы рРНК *G. stephani* указана в GenBank под номером AF056015 [*Glugea stephani* small subunit..., electronic resource]. Использование для ПЦР сборных проб, включающих патологические материалы от 5-10 и более рыб, а также возможность автоматизированной их обработки позволяет рекомендовать ПЦР для эпизоотического мониторинга (скрининга) этой болезни.

**Заключение.** Результаты наших исследований показали существование природных очагов микроспоридиоза, вызываемого *G. stephani*, в Азовском и Черном морях, а также целесообразность диагностического контроля над ним в азово-черноморском регионе. Этот контроль позволит точнее прогнозировать состояние промысловых популяций местных камбал, сократить возможные риски и ущерб от этой болезни при их культивировании, повысить производительность камбаловых морских питомников и товарных ферм. Результаты исследований могут использоваться для разработки ветеринарных инструкций. Работы выполнены по заказу Федерального агентства по рыболовству РФ; государственное задание «Проведение прикладных научных исследований», тема 13 (2023 г.).

Встречались глоссы, у которых задняя часть инвазированного кишечника выступала (вываливалась) наружу через анальное отверстие [Килочичкий, Мальцев, Петрович, 2007]. У азовского калкана, пойманного в разных районах моря (обследовано более 80 экз. рыб), цисты *G. stephani* мы обнаруживали в стенках кишечника и желудка; ИИ достигала 200 цист; ЭИ - до 18,8%. (результаты исследований 1998-2013 гг.). Микроспоридии, предположительно, *G. stephani*, указаны для черноморского калкана, пойманного в Керченско-Таманском районе (предпроливье) Черного моря [Бортников, Стрижакова, Шевкоплясова, 2015]. Наши данные указывают на значительное патогенное влияние этой болезни на состояние диких популяций камбал в Азовском море, и показывают, что в Азовском и, по-видимому, в Черном морях существуют природные очаги этого микроспоридиоза, которые могут представлять угрозу для культивируемых рыб. Потепление климата, межрегиональные перевозки камбал для целей рыбоводства, а также увеличение численности и расширение ареалов местных камбал (например, кратное увеличение запасов азовского калкана в последние годы) могут привести к ухудшению эпизоотической ситуации по этому заболеванию в азово-черноморском регионе. При этом мы пока не обнаруживали этой болезни при экспериментальном выращивании молоди (сеголеток) черноморского калкана (обследованы 30 экз.) и азовского калкана (18 экз.) на НИБ «Заветное» (2016-2023 гг.), что может быть обусловлено местными условиями в этом бассейновом рыбоводном хозяйстве.

Промежуточные или паратенические хозяева у *G. stephani* не известны; паразит обладает прямым жизненным циклом, что делает его более опасным в аквакультуре. Предполагалось, что веслоногие ракообразные и амфиподы являются одним из транзитных путей передачи инвазии [Olson, 1976; Kent, Shaw, Sanders, 2014]. Источником инвазии служит зараженная рыба, выделяющая споры паразита во внешнюю среду, как во время болезни, так и после гибели [Khan, 2004]. Камбалы заражаются, заглатывая зрелые споры. Ксеномы появляются у рыб в течение 1-2 месяцев после заражения, после чего смертность зараженных рыб усиливается [McVicar, 1975; Kinne, 1984; Canning, Lom, Dykova, 1986]. Подозревалась возможность самозаражения рыб [Lom, Dykova, 1992]. Весенне-летнее повышение температуры воды усиливает зараженность зимней камбалы; неоднократно обнаружено, что заболеваемость камбал повышается летом и падает зимой. То же самое мы наблюдали у камбал в Азовском море. Снижение показателей зараженности камбал в зимний период связывают с гибелью тяжело больных рыб [Khan, 2004]. В последние годы отмечают повышение заболеваемости этим микроспоридиозом европейской камбалы в Балтийском море, спровоцированное, как считают, прогрессивным загрязнением этого моря промышленными и бытовыми стоками [Infection of the European flounder..., 2023].

Предварительный диагноз на кишечный микроспоридиоз, вызываемый *G. stephani*, ставят на основании обнаружения у рыб совокупности эпизоотических, клинических и патологоанатомических признаков этой болезни. При вскрытии больных камбал в стенках их кишечника, а иногда и в полости тела, на печени и в других органах находят множество ксеном, содержащих зрелые споры возбудителя. Экспертная оценка эффективности разных методов окончательной диагностики этой болезни приведена в таблице. Предварительный диагноз ставят по результатам лабораторных паразитологических (световая микроскопия) исследований морфологии спор на свежих временных препаратах и (или) на фиксированных окрашенных мазках (увеличение x400-1000).

Прижизненная диагностика болезни возможна при микроскопировании фекалий рыб. Для дифференциальной морфологической диагностики спор *G. stephani* используют определительные таблицы из иностранных публикаций [Canning, Lom, Dykova, 1986; Lom, Dykova, 1992], а также их описания в отечественных определителях [Определитель паразитов..., 1975; Определитель паразитов пресноводных..., 1984].

Постановка светооптического окончательного диагноза на основании строения спор микроспоридий (рис. 3) возможна, но затруднительна в связи с высокой их морфологической изменчивостью. В некоторых случаях для более точной диагностики применяют методику фиксированных гистологических срезов (окраска гематоксилин-эозином), позволяющую изучить не только строение спор, но и вегетативные стадии микроспоридий и их патогенность. Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия дает возможность поставить диагноз на основе ультраструктурных признаков спор паразита, его меро- и спорогонии, взаимоотношения паразита с клетками хозяина. Однако, из-за своей сравнительной трудоемкости гистологические и электронно микроскопические тестирования не рекомендованы нами для эпизоотического мониторинга этой болезни (таблица). Для этих целей более подходят светооптические и молекулярно-генетические исследования.

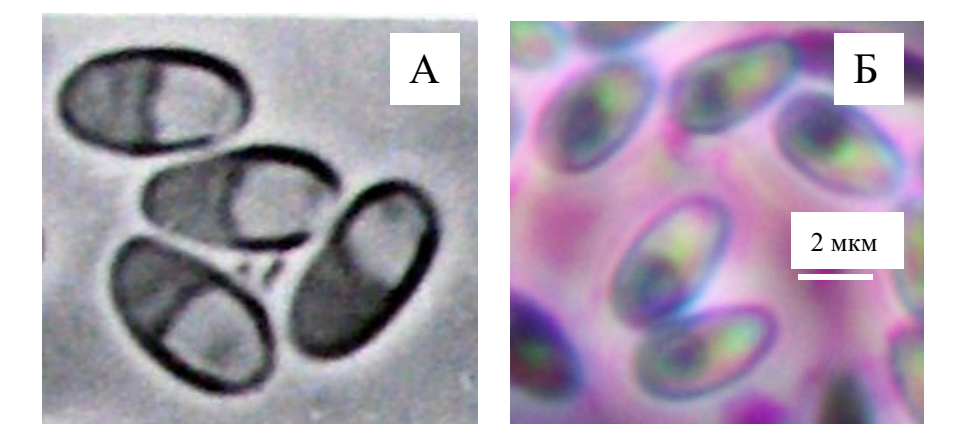


Рис. 3. Свежие не окрашенные споры *Glugea stephani* из кишечника морской камбалы *Platessa platessa* [Canning, Lom, Dykova, 1986] (А) и споры *G. stephani* на водно-эмульсионном препарате от азовского калкана (оригинал); световая микроскопия, фазовый контраст, увеличение 1000 х (Б)