

МРНТИ: 34.25.39; 34.27.33

С.А. СУЛЕЙМЕНОВА<sup>1\*</sup>, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ<sup>1</sup>, Ж.О. МАЖИБАЕВА<sup>2</sup>,  
К.О. КАРАМЕНДИН<sup>1</sup>, А.И. КЫДЫРМАНОВ<sup>1</sup>

\*suleymenova.87@inbox.ru

<sup>1</sup>ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,

<sup>2</sup>ТОО «Научно-производственный центр Рыбного Хозяйства»

Алматы, Казахстан

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СКРИНИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ РАКООБРАЗНЫХ И ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ЯЗВЕННОГО СИНДРОМА В МАССЕ ЦИСТ РАЧКОВ АРТЕМИИ (*ARTEMIA PARTHENOGENETICA*), СОБРАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ ВОДОЕМАХ КАЗАХСТАНА

doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.05

### Аннотация

В статье приводятся сведения о молекулярном скрининге водной плесени в массе цист рачков артемии из различных водоемов РК. Отмечена необходимость диагностики водяной плесени *Aphanomyces invadans* в массе цист рачков артемии, как возможного заражения ею рыбоводных водоемов, прудов и бассейнов при их применении в качестве корма для рыб. Показано, что исследованные пробы цист артемии не содержат возбудителей чумы ракообразных и эпизоотического язвенного синдрома *Aphanomyces astaci* и *Aphanomyces invadans*.

**Ключевые слова:** рачки, циста, водяная плесень, артемия, чума ракообразных, эпизоотический язвенный синдром, полимеразная цепная реакция

В течение прошлого столетия рост новых форм интенсивной аквакультуры, увеличение глобального перемещения водных животных и их продуктов, а также различные источники антропогенного стресса для водных экосистем привели к появлению многих новых болезней у ракообразных.

В отличие от инфекционных заболеваний теплокровных животных и человека, вирусные болезни ракообразных остаются мало изученными. В настоящее время список заболеваний водных животных, составленный Международным Эпизоотическим Бюро (МЭБ), включает две инфекции амфибий, девять - рыб, семь - моллюсков, восемь - ракообразных. Паразитарные заболевания преобладают среди моллюсков, в то время как вирусные инфекции занимают доминирующее положение в популяциях ракообразных [1].

Одним из важных патогенов ракообразных является, представитель рода *Aphanomyces*, известный как водяная плесень - возбудитель чумы ракообразных. Мицелиальные организмы семейства *Oomycetida* (водяная плесень) долгое время считались грибами из-за характерного нитчатого роста, однако они не являются представителями *Eumycota*, вместе с диатомовыми водорослями и бурыми водорослями классифицируется в группе, называемой *Stramenopiles* или *Chromista* [2, 3].

Четыре группы (А – D) *A. astaci* были описаны на основе случайной амплификации полиморфной ДНК-полимеразной цепной реакции (RAPD PCR) [4,5]: Группа А (так называемые штаммы *Astacus*) включает ряд штаммов, выделенных из *Astacus astacus* и *Astacus leptodactylus*. Считается, что эти штаммы были распространены в Европе в течение длительного времени. Группа В (штаммы *Pacifastacus* I) включает изоляты как *A. astacus*, выделенные в Швеции, так и *Pacifastacus leniusculus* - из озера Тахо, США. Завезенный в Европу штамм *P. leniusculus*, вероятно, завез *A. astaci* и заразил местный *A. astacus*. Группа С (штаммы *Pacifastacus* II) состоит из штамма, выделенного

из *P. leniusculus* в Питт-Лейк, Канада. Другой штамм (Pc), выделенный из *Procambarus clarkii* в Испании, находится в группе D (штамм *Procambarus*). Штаммы *A. astaci*, которые были распространены в Европе в течение многих лет (штаммы группы A), по-видимому, менее патогенны, чем штаммы, недавно завезенные с раками, импортируемыми из Северной Америки с 1960-х годов.

Инфекция *A. invadans* чаще всего известна как эпизоотический язвенный синдром (EUS). Он также известен как болезнь красных пятен (RSD), микотический гранулематоз (MG) и язвенный микоз (UM). В 2005 году ученые предложили назвать это заболевание эпизоотическим гранулематозным афаномикозом [6]. Данное заболевание имеет сложную инфекционную этиологию и клинически характеризуется наличием инвазивной инфекции *A. invadans* и некротизирующих язвенных поражений, обычно приводящих к гранулематозному ответу. Однако термин EUS продолжает использоваться большинством ученых. Заболевание вызывается оомицетом *A. invadans*. Инфекция *A. invadans* широко распространилась с момента первой вспышки в 1971 году в Японии, и на сегодняшний день зарегистрирован только один генотип.

Диагностика водяной плесени *A. invadans* в массе цист рачков артемии является одним из важных мер предупреждения контаминации рыбоводных водоемов, прудов и бассейнов при применении их в качестве корма для рыб. Артемии (*лат. Artemia*) относятся к ракообразным из класса жаброногих (*Branchiopoda*), выделяемые в собственное семейство – *Artemiidae*. Все представители – планктонные организмы, населяющие морские мелководья и солёные озёра.

Целью данного исследования является молекулярный скрининг на наличие водной плесени в массе цист рачков артемии, собранных из различных водоемов РК.

### Материалы и методы

Сбор биологических материалов от рачков артемии.

Биологические образцы цист рачков артемии собирали в естественных водоемах в весенний и осенний периоды в соответствии с Руководством МЭБ по диагностике болезней водных животных [7]. Материалы хранили в жидком азоте (-196°C).

Экстракцию микробной ДНК из проб осуществляли с помощью набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (A29790), в соответствии с рекомендациями производителя из 200 мкл образца [8].

Для молекулярной индикации и идентификации чумы ракообразных использована полимеразная цепная реакция (ПЦР-анализ), нацеленная на область ITS (внутренний транскрибируемый спейсер) кластера ядерных рибосомных генов в геноме *A. astaci*. В ПЦР-анализе использованы видоспецифичные праймерные сайты, расположенные в областях ITS1 и ITS2 (Прямой праймер (BO 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3' и обратный праймер (BO 640) 5'-СТА-ТСС-GAC-ТСС-GCA-ТТС-TG-3'). Ожидаемый продукт представляет собой фрагмент длиной 569 пар нуклеотидов. Для подтверждения идентичности проведено секвенирование продукта ПЦР.

Реакцию проводили в термоциклере Eppendorf Gradient. Начальную денатурацию смеси проводили при 96°C в течение 5 минут, затем 40 циклов амплификации: 1 минута - при 96°C, 1 минута - при 59°C и 1 минута - при 72°C со стадией финальной элонгации в течение 7 минут при 72°C. Амплифицированную ДНК анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Горизонтальный гель-электрофорез проводили в 2% растворе агарозы (Sigma, США), окрашенном бромистым этидием, в трис-ацетатном буфере при напряжении 88V (8 вольт/см) на аппарате Biostep (Великобритания).

### Результаты исследования

Биоматериалы в виде цист рачков артемии *Artemia parthenogenetica*, собранные в мае и августе 2021 г. из водоемов Северо-Казахстанской, Павлодарской и Кызылординской областей, были доставлены в лабораторию экологии вирусов НПЦ микробиологии и вирусологии (таблица).

Таблица – Характеристика собранного биоматериала (цисты *Artemia parthenogenetica* и *A. franciscana*).

Место (водоем) сбора биоматериалов	Время сбора и количество образцов (биомасса цист артемии)	
	Май 2021 г.	Август 2021 г.
Северо-Казахстанская область		
оз. Становое	1	1
оз. Менгисор	1	1
Павлодарская область		
оз. Шарбакты	1	1
оз. Калатуз	1	-
оз. Кызылтуз	1	1
оз. Казы	1	1
оз. Сейтень	1	1
оз. Ащытакыр	1	-
Кызылординская область		
Тущыбаский залив	1	2
Чернышовский залив	-	2
Итого: 18 проб	9	9

Как видно из таблицы, нами получено четыре образца в виде массы цист артемии из двух точек Северо-Казахстанской области, 10 проб - из Павлодарской области и пять материалов - из Кызылординской области.

Скрининг цист рачков артемии *Artemia parthenogenetica*, собранных из водоемов Северо-Казахстанской, Павлодарской и Кызылординской областей в мае и августе 2021 г. на наличие возбудителей инфекции, поражающие ракообразных, водной плесени *A. astaci* и *A. invadans*.

В результате молекулярного скрининга в ПЦР нуклеиновые кислоты возбудителей высокопатогенной для ракообразных водной плесени *A. astaci* и *A. invadans* в образцах цист рачков артемии не обнаружены.

Таким образом, проведенный молекулярно-генетический скрининг на наличие возбудителей водной плесени рода *Aphanomyces* и возбудителей массовых вирусных инфекций ракообразных в пробах цист артемии *Artemia parthenogenetica*. позволяют сделать вывод о том, что в исследованных пробах не содержатся возбудители водной плесени *A. astaci* и *A. invadans*.

### Литература:

- 1 OIE (Office International Des Epizooties) Manual of Diagnostic tests for Aquatic animals. 2009. 6th edn. OIE. Paris.
- 2 Sumbali, Geeta; Johri, B. M (January 2005). The fungi. ISBN 978-1-84265-153-7.
3. Ruggiero; et al. (2015), "Higher Level Classification of All Living Organisms". PLOS ONE.

10 (4): e0119248.

4 Dieguez Uribeondo J., Huang T.-S., Cerenius L. & Soderhall K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.* 99. 574–578.

5 Huang, T.S., Cerenius L. & Soderhall K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture.* 126. 1–10.

6 Baldock F.C., Blazer V., Callinan R., Hatai K., Karunasagar I., Mohan C.V. & Bondad-Reantaso M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. In: *Diseases in Asian Aquaculture V*, Walker P., Laster R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 555–585.

7 OIE Manual of Diagnostic tests for Aquatic animals. - 2009

8 PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit. Purification of high-quality microbial and host DNA from buccal, vaginal, or skin swab samples. Catalog Number A29790 Pub. No. MAN0014268 Rev. A.0.

С.А. СУЛЕЙМЕНОВА<sup>1\*</sup>, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ<sup>1</sup>, Ж.О. МАЖИБАЕВА<sup>2</sup>, К.О. КАРАМЕНДИН<sup>1</sup>, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ<sup>1</sup>

\*suleymenova.87@inbox.ru

<sup>1</sup>«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС,

<sup>2</sup>«Балық шаруашылығы ғылыми өндірістік орталығы» ЖШС

Алматы, Қазақстан

## ҚАЗАҚСТАННЫҢ ТҮРЛІ СУ ҚОЙМАЛАРЫНАН ЖИНАЛҒАН АРТЕМИЯ (ARTEMIA PARTHENOGENETICA) ЦИСТАЛАРЫ МАССАСЫНАН ШАЯН ТӘРІЗДІЛЕР ТҰҚЫМДАСЫ ОБАСЫ ЖӘНЕ ЭПИЗООТИЯЛЫҚ ОЙЫҚ ЖАРАЛЫ СИНДРОМЫНЫҢ ҚОЗДЫРҒЫШТАРЫНА МОЛЕКУЛАЛЫҚ СКРИНИНГ

### Түйін

Мақалада Қазақстан Республикасының әртүрлі су қоймаларынан алынған *Artemia* шаяндары цисталарын су зеңіне молекулалық скринингі туралы ақпарат берілген. Сондай-ақ *Artemia* шаяндары цисталарының массасында су зеңін *Aphanomyces invadans* балаудың маңыздылығы олардың балық өсіретін су қоймаларына, тоғандар мен бассейндерге, оларды балыққа жем ретінде пайдаланған кезде жұқтыру мүмкіндігін көрсеткен. *Artemia* цисталарының зерттелген үлгілерінде шаян тәрізділер обасы мен эпизоотиялық жара синдромының *Aphanomyces astaci* және *A. invadans* қоздырғыштары кездеспегені көрсетілді.

**Кілтті сөздер:** шаянтәрізділер, цисталар, су зеңі, шаяндар, шаян тәрізділер обасы, эпизоотиялық ойық жара синдромы, полимеразды тізбекті реакция.

IRSTI: 34.25.39; 34.27.33

S.A. SULEIMENOVA<sup>1\*</sup>, E.T. KASYMBEKOV<sup>1</sup>, J.O. MAZHIBAYEVA<sup>2</sup>  
K.O. KARAMENDIN<sup>1</sup>, A.I. KYDYRMANOV<sup>1</sup>.

\*suleymenova.87@inbox.ru

<sup>1</sup>LLP "Research and Production Center for Microbiology and Virology",

<sup>2</sup>LLC "Research and Production Center of Fisheries"

Almaty, Kazakhstan

**MOLECULAR SCREENING OF THE CAUSATIVE AGENTS OF CRAYFISH  
PLAGUE AND EPIZOOTIC ULCERATIVE SYNDROME IN THE MASS OF  
ARTEMIA (*ARTEMIA PARTHENOGENETICA*) CYSTS SAMPLED FROM  
DIFFERENT WATERS OF KAZAKHSTAN**

**doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.05**

**Summary**

The article provides information on molecular screening of water mould in the mass of *Artemia* crustacean cysts from various reservoirs of the Republic of Kazakhstan. The importance of the diagnosis of water mould *Aphanomyces invadans* in the mass of brine shrimp cysts associated with their possible infection of fish ponds, ponds and basins when used as fish feed is also given. It was shown that the studied samples of *Artemia* cysts did not contain the pathogens of crustacean plague and epizootic ulcerative syndrome *Aphanomyces astaci* and *A. invadans*.

**Key words:** crustaceans, cyst, water mold, brine shrimp, plague of crustaceans, epizootic ulcerative syndrome, polymerase chain reaction

Over the past century, the growth of new forms of intensive aquaculture, an increase in the global movement of aquatic animals and their products, and various sources of anthropogenic stress for marine ecosystems have led to the emergence of many new diseases in crustaceans.

In contrast to infectious diseases of warm-blooded animals and humans, viral diseases of crustaceans remain poorly understood. The list of aquatic animal diseases compiled by the Bureau of International Epizootic (OIE) includes two infections of amphibians, nine fish, seven molluscs, and eight crustaceans. Parasitic diseases predominate among molluscs, while viral diseases occupy a dominant position in crustacean populations.

In contrast to infectious diseases of warm-blooded animals and humans, viral diseases of crustaceans remain poorly understood. The list of aquatic animal diseases compiled by the Bureau of International Epizootic (OIE) includes two infections of amphibians, nine fish, seven molluscs, and eight crustaceans. Parasitic diseases predominate among molluscs, while viral diseases occupy a dominant position in crustacean populations [1].

One of the important pathogens of crustaceans is a representative of the genus *Aphanomyces*, known as water mould - the causative agent of the crustacean plague. The family *Oomycetida* (water mould) has long been considered a fungus due to its characteristic filamentous growth, it is not a member of *Eumycota*, but together with diatoms and brown algae, it is classified in a group called *Stramenopiles* or *Chromista* [2, 3].

Four groups (A - D) of *A. astaci* have been described based on random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) [4, 5]: Group A (so-called *Astacus* strains) includes several strains isolated from *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*; It is believed that these strains have been in Europe for an extended period. Group B (*Pacifastacus* I

strains) includes both *A. astacus* in Sweden and *Pacifastacus leniusculus* from Lake Tahoe, USA. Introduced to Europe, *P. leniusculus* probably introduced *A. astaci* and infected native *A. astacus* in Europe. Group C (*Pacifastacus* II strains) is isolated from *P. leniusculus* from Pitt Lake, Canada. Another strain (Pc), isolated from *Procambarus clarkii* in Spain, is in group D (*Procambarus* strain). *A. astaci* strains that have been present in Europe for many years (group A strains) appear to be less pathogenic than strains recently introduced with cancers imported from North America since the 1960s.

*A. invadans* infection is most commonly known as an epizootic ulcerative syndrome (EUS). It is also known as red spot disease (RSD), mycotic granulomatosis (MG), and ulcerative mycosis (UM). In 2005, scientists proposed to call this disease epizootic granulomatous aphanomycosis. [6].

The disease has a complex infectious aetiology and is clinically characterized by the presence of invasive *A. invadans* infection and necrotizing ulcerative lesions, usually resulting in a granulomatous response. However, the term EUS continues to be used by most scholars. The disease is caused by oomycete-fungus *A. invadans*. *A. invadans* infection has spread widely since the first outbreak in 1971 in Japan, and to date, only one genotype has been reported.

Diagnostics of *A. invadans* water mould in the mass of *Artemia* crustacean cysts is critical to prevent contamination of fish-breeding reservoirs, ponds, and pools when used as fish feed. *Artemia* is a genus of aquatic crustaceans also known as brine shrimp. *Artemia*, the only genus in the family *Artemiidae*. All representatives are planktonic organisms inhabiting shallow marine waters and salt lakes.

The purpose of this study is molecular screening for water mould in the mass of cysts in brine shrimp collected from various reservoirs of the Republic of Kazakhstan.

### Materials and methods

Collection of biological materials from brine shrimp

Samples of brine shrimp cysts were collected in natural water bodies in spring and autumn following the OIE Manual of Diagnostic tests for Aquatic animals. [7]. The materials were stored in liquid nitrogen (-196°C).

According to the manufacturer's recommendations, extraction of microbial DNA from samples was carried out using the PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (A29790) from a 200 µL sample [8].

For molecular indication and identification of crustacean plague, a polymerase chain reaction (PCR analysis) was used aimed at the ITS region (internal transcribed spacer) of the nuclear ribosomal gene cluster in the *A. astaci* genome. The PCR analysis used species-specific primer sites located in the ITS1 and ITS2 regions (Forward primer (BO 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3' and reverse primer (BO 640) 5' -CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-3'). The expected product is a 569 bp fragment. Sequencing of the PCR product will be performed to confirm identity.

The reaction was carried out in an Eppendorf Gradient thermal cycler. The initial denaturation of the mixture was carried out at 96 ° C for 5 minutes, then 40 amplification cycles: 1 minute at 96 ° C, 1 minute at 59 ° C and 1 minute at 72 ° C with a final elongation stage for 7 minutes at 72 ° C. The amplified DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis.

Horizontal gel electrophoresis was performed in a 2% agarose solution (Sigma, United States) stained with ethidium bromide in tris-acetate buffer at 88V (8 volts/cm) on a Biostep apparatus (UK).

### Research results

Biomaterials in the form of cysts of brine shrimp *Artemia parthenogenetica* collected in May and August 2021 from water bodies of the North Kazakhstan, Pavlodar and Kyzylorda regions were delivered to the laboratory of viral ecology of the Research and Production Center for Microbiology and Virology (Table).

Table - Characteristics of the collected biomaterial (cysts of *Artemia parthenogenetica* and *A. franciscana*).

Place (reservoir) of collection of biomaterials	Collection time and number of samples (biomass of <i>Artemia</i> cysts)	
	May 2021	August 2021
North-Kazakhstan region		
lake Stanovoe	1	1
lake Mengisor	1	1
Pavlodar region		
lake Sharbakts	1	1
lake Calatuz	1	-
lake Kyzyltuz	1	1
lake Kazy	1	1
lake Seyten	1	1
lake Ashtytakyr	1	-
Kyzylorda Region		
Tushchabaskiy Bay	1	2
Chernyshovsky Bay	-	2
Total: 18 samples	9	9

As can be seen from the table, we obtained four samples in the form of a mass of *Artemia* cysts from two spots of the North Kazakhstan region, 10 specimens from the Pavlodar region and five materials from the Kyzylorda region.

Screening of cysts of crustaceans *Artemia parthenogenetica* collected from water bodies of the North Kazakhstan, Pavlodar and Kyzylorda regions in May and August 2021 for the presence of infectious agents affecting crustaceans such as water mould *A. astaci* and *A. invadans*.

As a result of molecular PCR screening, nucleic acids, highly pathogenic for the crustaceans aquatic mould *A. astaci* and *A. invadans*, were not detected in the samples of *Artemia* shrimp cysts.

Thus, using molecular genetic methods, molecular genetic screening for the presence of water mould of the genus *Aphanomyces* and pathogens of mass viral infections of crustaceans in samples of *Artemia parthenogenetica* cysts was carried out. The data obtained allow us to conclude that the water moulds *A. astaci* and *A. invadans* do not contain in the studied samples of *Artemia* cysts.

### References:

- 1 OIE (Office International Des Epizooties) Manual of Diagnostic tests for Aquatic animals. 2009. 6th edn. OIE. Paris.
- 2 Sumbali, Geeta; Johri, B. M (January 2005). The fungi. ISBN 978-1-84265-153-7.
3. Ruggiero; et al. (2015), "Higher Level Classification of All Living Organisms". PLOS ONE. 10 (4): e0119248.

4 Dieguez Uribeondo J., Huang T.-S., Cerenius L. & Soderhall K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.* 99. 574–578.

5 Huang, T.S., Cerenius L. & Soderhall K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*. 126. 1–10.

6 Baldock F.C., Blazer V., Callinan R., Hatai K., Karunasagar I., Mohan C.V. & Bondad-Reantaso M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. In: *Diseases in Asian Aquaculture V*, Walker P., Laster R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 555–585.

7 OIE Manual of Diagnostic tests for Aquatic animals. - 2009

8 PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit. Purification of high-quality microbial and host DNA from buccal, vaginal, or skin swab samples. Catalog Number A29790 Pub. No. MAN0014268 Rev. A.0.

### **Financing**

The study is funded by the Ministry of Ecology, Geology and Natural Resources of the Republic of Kazakhstan (Grant No. BR10264205 "Comprehensive assessment of the state of fish resources and other aquatic organisms in the main fishing water bodies of Kazakhstan and the development of scientifically based recommendations for their sustainable use").