

УДК 594.124:576.8(26)(262.5)

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ВИБРИОЗА — КУЛЬТУРЫ ШТАММА *VIBRIO ANGUILLARUM* С ПРИМЕНЕНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*Т.В. Безгачина*

ВНИРО, Москва, bezgachina@vniro.ru

## IDENTIFICATION OF VIBRIOSIS AGENT AS STRAIN CULTURE OF *VIBRIO ANGUILLARUM*, USING THE MODERN SEROLOGICAL METHODS OF BACTERIAL DISEASE DIAGNOSIS

*T.V. Bezgachina*

VNIRO, Moscow, bezgachina@vniro.ru

### Введение

Вибриоз является очень известным бактериальным заболеванием рыб и гидробионтов в морской, солоноватой и пресной воде, которое впервые было выявлено у угрей в 1909 г. [Bergmann, 1909]. Это заболевание встречается у многих видов костистых рыб, моллюсков, ракообразных за рубежом и в России. Возбудителем вибриоза является культура штамма *Vibrio anguillarum*. Заболевание начинается особенно интенсивно развиваться в теплое время года, достигая максимума при  $t = 19\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Висманис, 1980]. Вибриоз в период эпизоотии может привести к 90 % гибели культивируемых лососевых рыб.

Возбудитель вибриоза выделялся сотрудниками ВНИРО периодически с начала 80-х г. из воды Чёрного моря в районе Северного Кавказа, а также у диких и культивируемых рыб, а затем и у мидий. Был он идентифицирован и из лососевых рыб в Балтийском регионе.

Из прибрежных вод Чёрного моря возбудитель вибриоза за последнее время был выявлен в 2002 г. [Безгачина, Зуевский, 2003а, Безгачина, 2003б], в 2007 г. [Безгачина, 2008]; у мидий *Mytilus galloprovincialis* в 2005 г. [Безгачина, 2006], в 2006 г. [Безгачина, 2007а; Безгачина, 2007б], в 2007 г. [Безгачина, 2008]. В 2000 г. культура штамма *V. anguillarum* была выделена из морской воды в районе Сонострова Кандалакшского залива Белого моря [Безгачина, 2001; Безгачина, Козицкий, 2001].

Возбудитель вибриоза был идентифицирован в 2001 г. от радужной форели, культивируемой в садках в Белом море в форелевом хозяйстве Республики Карелия [Безгачина, Козицкий, 2002; Безгачина, 2003; Bezgachina, 2003].

В 2003–2004 гг. и в 2006 г. он был выделен от мидии *Mytilus edulis* и воды Белого моря в районе Соловецких островов [Безгачина, Козицкий, 2004; Безгачина, 2005; 2006; 2008]. На Камчатке в 1993–1999 гг. впервые был обнаружен вибриоз дикой горбуши в прибрежных водах Карагинского залива [Пугаева и др., 2000]. В 2007 г. он был отмечен у дикой горбуши как в Карагинском заливе, так и в северо-западной части Тихого океана [Сергеенко и др., 2008].

Выделение и идентификация *V. anguillarum* обычно проводится классическим бактериологическим методом, который, как правило, трудоемок и продолжителен.

Серологические методы диагностики бактериальных заболеваний издавна применяются в медицинской и ветеринарной практике, а в настоящее время также и в ихтиопатологии. Создание диагностической агглютинирующей сыворотки при изучении заболеваний объектов аквакультуры стало просто необходимо, так как дополнительная специфическая характеристика штамма позволяет более точно определить пути распространения возбудителя и причины возникновения заболевания. Вакцины, приготовленные из одного серотипа, оказываются неэффективными против другого.

В России созданы и использованы агглютинирующие сыворотки для диагностики вибриоза в Черноморском и Балтийском регионах, обладающие высокой активностью к гомологичной культуре штамма *V. anguillarum* и стабильной специфичностью к гетерологичным культурам и их формализованным антигенам.

Данные сыворотки были получены путем гипериммунизации кроликов антигенами из вышеперечисленных культур микроорганизмов. [Безгачина, 1986; Безгачина и др., 1987; Безгачина, Радин, Бондаренко, 1989; Безгачина, Шумилов, Бондаренко, 1995; Безгачина, 1998].

Была поставлена задача изготовить две новые партии агглютинирующих сывороток *V. anguillarum* для разработки комплексных методов серодиагностики, путем гипериммунизации кроликов культурой штамма *V. anguillarum*, выделенной ранее в полевых условиях: в Балтийском регионе – штамм № 2 и Черноморском регионе – штамм № 19.

При использовании агглютинирующих сывороток происходит значительное сокращение срока идентификации возбудителя вибриоза до суток и менее.

## Материал и методика

Культура штамма *V. anguillarum* № 2 была выделена от лососевых рыб в Балтийском регионе, а № 19 – в Черноморском регионе России. Данные штаммы депонированы, лиофилизированы и находятся во Всероссийской коллекции микроорганизмов в ВГНКИ (г. Москва). При проведении исследований были применены бактериологические, серологические и биохимические методы исследования. Для получения агглютинирующей сыворотки были использованы кролики-доноры. В работе были применены два метода постановки реакции агглютинации:

- пробирочный, при котором ставят развернутую реакцию в пробирках;
- пластинчатый – реакция агглютинации на стекле.

При получении моновалентных агглютинирующих сывороток для диагностики вибриоза лососевых рыб были иммунизированы 20 кроликов – доноров (по 10 кроликов для каждой сыворотки) массой 2,5–3,0 кг культурой штамма № 2 и № 19, которые донорам вводили в возрастающих дозах пятикратно с интервалом между инъекциями 7–8 дней, причем первое введение проводили подкожно, а последующие внутривенно.

В качестве антигенов при иммунизации кроликов использовали двухсуточные культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19, выращенных на МПА

с добавлением 1,5 % NaCl. Культуры смывали 0,85%-ным физиологическим раствором, добавляя формалин до конечной концентрации его в суспензии 0,3 % и двукратно отмывали от примесей питательной среды формализованным физиологическим раствором на центрифуге при 3000 об/мин в течение 30 мин.

Далее, после последнего центрифугирования осадок культур разводили до определенной концентрации по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича. На 5-й день после последней инъекции антигенов у кроликов брали пробы крови.

Сыворотки были исследованы в пробирочной реакции агглютинации с гомологичными антигенами *V. anguillarum*. При постановке реакции агглютинации нативные гипериммунные и нормальную (контроль) кроличьи сыворотки разводили формализованным физиологическим раствором с концентрацией от 1:25 до 1:6400. Антигены были использованы в реакции агглютинации в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл.

Далее штатив с пробирками помещали в термостат при 37–38 °С на 18 ч и на 2 ч вне термостата. Учет реакции проводили по четырехбальной системе в крестах.

На 8-й день после 5-й инъекции при наличии титра антител у обеих партий кроликов 1:1600 – 1:3200 доноров тотально обескровливали и получали 2 сыворотки, которые объединяли в 2 емкости по отдельности (Балтийский и Черноморский регионы) и консервировали борной кислотой. Стерильные сыворотки расфасовывали в ампулы из нейтрального стекла по 1 мл и лиофилизировали при общепринятом режиме.

## Результаты и обсуждение

Антигены, полученные из культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19, применяемые при иммунизации кроликов для получения агглютинирующих сывороток, были исследованы в пробирочной реакции агглютинации на специфичность с сыворотками к различным гетерологичным микроорганизмам в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича и в реакции агглютинации на стекле. Они не давали реакции агглютинации с агглютинирующими адсорбированными сальмонеллезными О-, Н-сыворотками с широким диапазоном рецепторов, с О- и Н-агглютинирующими адсорбированными сыворотками аризона; протеус О, Н; О-псевдомонас; с холерной сывороткой Инаба и О-сывороткой.

Отрицательные результаты были получены в пробирочной РА с монорецепторными сыворотками 3-х подвидов кампилобактерий.

Антигены не агглютинировались адсорбированными сыворотками Шигелла Григорьева-Шига Штуцер Шмит, сальмонеллезной АВСДЕ, протеус НА, ОД, ОЕ, ОА, ОВ, ОС.

В результате проведения многочисленных исследований была выявлена отрицательная пробирочная реакция агглютинации и реакции агглютинации на стекле, что указывает на высокую видовую специфичность формализованных антигенов из культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19.

При исследовании на активность сыворотки *V. anguillarum* № 2-1 в пробирочной реакции агглютинации с 0,3%-ным формализованным антигеном из гомологичной культуры микроорганизмов *V. anguillarum* № 2 наблюдалась положительная реакция агглютинации при титре антител 1:25 – 1:1600 (4 креста), 1:3200 (3 креста).

Также положительный результат был отмечен при взаимодействии сыворотки *V. anguillarum* № 19-1 в пробирочной реакции агглютинации с 0,3%-ным

формализированным антигеном *V. anguillarum* № 19 при титре антител 1:25 – 1:200 (4 креста), 1:400 – 1:800 (3 креста), 1:1600 – 1:3200 (3 креста). Высокий титр антител наблюдался также при взаимодействии полученных сывороток *V. anguillarum* № 2-1 и № 19-1 с различными гомологичными культурами штаммов *V. anguillarum*, выделенными от лососевых рыб в Балтийском и Черноморском регионах.

После лиофилизации активность агглютинирующих сывороток *V. anguillarum* № 2-1 и № 19-1 в пробирочной реакции агглютинации не снизилась по сравнению с нативными сыворотками и титр антител составил 1:3200 (3 креста).

При исследовании сыворотки *V. anguillarum* № 2-1 на специфичность в пробирочной реакции агглютинации при разведении ее от 1:25 до 1:3200 были использованы 0,3%-ные формализированные антигены, изготовленные из гетерологичных штаммов микроорганизмов в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, а в реакции агглютинации на стекле живые – двухсуточные культуры микроорганизмов.

Отрицательная реакция агглютинации на стекле и пробирочная РА наблюдалась со следующими антигенами: *Campylobacter 1 n/b, 2 n/b, 3 n/b; Salmonella cholerae suis, Salmonella enteritidis, Salmonella dublin, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas alcaligenes, Hafnia, Acinetobacter colcoaticus, Aeromonas salmonicida 288,626; Aeromonas salmonicida – B, Aeromonas hydrophila, Proteus vulgaris, Vibrio alginolyticus, Vibrio salmonicida, Vibrio vulnificus, Vibrio damsela, Vibrio splendidus, Vibrio diazotrophicus, Vibrio carchariae, Vibrio pelagius.*

При исследовании сыворотки *V. anguillarum* № 19-1 на специфичность был использован тот же набор антигенов и во всех случаях наблюдалась отрицательная реакция агглютинации.

Таким образом, были получены очень эффективные диагностические сыворотки, которые также были использованы в ходе разработки реакции непрямой гемагглютинации и контролировали антигенную активность культур штаммов *V. anguillarum* при изготовлении вакцины против вибриоза.

ВНИРО, ВГНКИ и Щелковским биокомбинатом г. Москвы была создана и внедрена промышленная вакцина против вибриоза рыб (патенты на изобретение № 2284830, № 2284831 от 10 октября 2006 г.).

Научные исследования по разработке новых видов сывороток и вакцинопрофилактике в настоящее время продолжаются.

## **Выводы**

1. Были получены лиофилизированные, высокоактивные и строгоспецифичные моновалентные агглютинирующие кроличьи сыворотки *V. anguillarum* № 2-1 и № 19-1 для диагностики возбудителя вибриоза в Балтийском и Черноморском регионах.

2. Необходимо использовать 0,3%-ные формализированные антигены, изготовленные из культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19, идентифицированных от лососевых рыб в Балтийском и Черноморском регионах, в пробирочной и пластинчатой реакциях агглютинации с гомологичными сыворотками в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

3. Сыворотки предназначены также для контроля активности антигена эритроцитарного для диагностики вибриоза рыб и контроля антигенной активности культур штаммов *V. anguillarum* при изготовлении вакцины инактивированной против вибриоза рыб.

4. Применение агглютинирующих сывороток № 2-1 и № 19-1 для диагностики вибриоза позволит в кратчайшее время предотвратить его распространение на лососевых хозяйствах.

#### ЛИТЕРАТУРА

Безгачина Т.В. 1986. Агглютинирующая сыворотка для идентификации возбудителя вибриоза лососевых рыб // Профилактика, лечение и диагностика инфекционных болезней рыб: Тез. докл. V Всесоюзного симпозиума по инфекционным болезням лососевых рыб.— Москва.— С. 10.

Безгачина Т.В., Радин И.Д., Ыун А.И., Кязри, Шумилов К.В., Бондаренко В.З., Климанов, Томашевская. 1987. К вопросу серологической диагностики вибриоза лососевых рыб // Паразиты и болезни морских гидробионтов: Сб. научных трудов ВНИРО-ПИНРО.— Мурманск.— С. 30–39.

Безгачина Т.В., Радин И.Д., Бондаренко В.З. 1989. Гипериммунная сыворотка кроликов для серодиагностики вибриоза лососевых // Рыбное хозяйство. № 3.— С. 38–39.

Безгачина Т.В., Шумилов К.В., Бондаренко В.З. 1995. Диагностика вибриоза лососевых рыб в Черноморском регионе России // Проблемы выращивания лососевых рыб в России: Сб. докл. Всероссийского совещания 1–4 августа 1995 г.— Мурманск: ПИНРО.— С. 75–77.

Безгачина Т.В. 1998. Определение концентрации формализированных антигенов *Vibrio anguillarum* № 1, № 2, № 3, № 4, № 5, № 19 в пластинчатой реакции агглютинации на стекле с агглютинирующими сыворотками кроликов *Vibrio anguillarum* № 2, № 4, № 19 для диагностики вибриоза рыб // Паразиты и болезни морских и пресноводных рыб Северного бассейна: Сб. научных трудов.— Мурманск: ПИНРО.— С. 137–159.

Безгачина Т.В., Козицкий А.Н. 2001. Идентификация возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* в морской воде в районе Сонострова Кандалакшского залива Белого моря // Биологические основы устойчивого развития прибрежных морских экосистем: Тез. докл. Международной конференции.— Мурманск: РАН — Апатиты.— С. 29.

Безгачина Т.В. 2001. О специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum*, выделенной из морской воды в районе Сонострова Кандалакшского залива Белого моря // Проблема и перспективы аквакультуры в России: Материалы докладов научно-практической конференции. Адлер–Краснодар.— С. 15–16.

Безгачина Т.В., Козицкий А.Н. 2002. Выделение возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* от радужной форели, культивируемой в садках в Белом море в форелевом хозяйстве Республики Карелия // Проблемы воспроизводства, кормов и борьба с болезнями рыб при выращивании в искусственных условиях: Тез. докл. научно-практической конференции.— Петрозаводск.— С. 29.

Безгачина Т.В., Зуевский С.Е. 2003а. Идентификация возбудителя вибриоза — бактерии *Vibrio anguillarum* из прибрежной воды Черного моря в районе Северного Кавказа в 2002 г. // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тез. докл. Всероссийской научно-практической конференции 16–18 июля 2003 г.— М.: Минсельхоз РФ, Институт биологии внутренних вод.— С. 15.

Безгачина Т.В. 2003б. О специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, выделенной в 2002 г. из прибрежных вод Чёрного моря в районе Северного Кавказа // Инновации в науке и образовании — 2003: Материалы Международной научной конференции, посвященной 90-летию высшего рыбохозяйственного образования.— Калининград: КГТУ.— С. 37.

Безгачина Т.В. 2003. Специфичность антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* от радужной форели при ее культивировании в Белом море на форелевом хозяйстве Республики Карелия // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоёмов Европейского Севера: Тез. докл. III Международной конференции 11–15 февраля 2003 г., Сыктывкар, Республика Коми, Россия, Институт биологии Коми.— Сыктывкар.— С. 13.

Безгачина Т.В., Козицкий А.Н. 2004. Выделение возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* от мидии *Mytilus edulis* и морской воды Белого моря в районе Соловецких островов в летний период 2003 г. // Инновации в науке и образовании — 2004: Материалы Международной конференции, посвященной 10-летию КГТУ.— Калининград.— С. 44.

Безгачина Т.В. 2005. Обнаружение возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* от мидии *Mytilus edulis* и морской воды Белого моря в районе Соловецких островов в летний период 2004 г. // Эпизоотологический мониторинг в аквакультуре: состояние и перспективы: Расширенные материалы Всероссийской научно-практической конференции-семинара 13–14 сентября 2005 г.: Минсельхоз РФ, Федеральное агентство по рыболовству, ФГУ «Межведомствен-

ная ихтиологическая комиссия», Российская Академия сельскохозяйственных наук (Отделение ветеринарной медицины, зоотехники).— Москва.— С. 8–9.

Безгачина Т.В. 2006. Идентификация культуры штамма *Vibrio anguillarum* из мидии Чёрного моря — актуальная проблема в ихтиопатологии // Тез. докл. IX съезда Гидробиологического общества РАН, Тольятти, 18–22 сентября 2006 г., РАН, Гидробиологическое общество, Институт экологии Волжского бассейна.— Тольятти.— С. 40.

Безгачина Т.В. 2006. К вопросу о специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, выделенной из мидии *Mytilus edulis* и морской воды Белого моря в районе Соловецких островов // Паразиты и болезни гидробионтов Ледовитоморской провинции: Тез. докл. Сателлитного 5-го Всероссийского симпозиума с международным участием. Президиум Сибирского отделения РАН, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Министерство образования и науки Республики Бурятия.— Улан-Удэ.— С. 136–137.

Безгачина Т.В. 2007а. Выделение культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза у мидий Чёрного моря в 2006 г. // Чтения памяти академика К.В. Симакова: Тез. докл. Всероссийской научной конференции. — Магадан, 27–29 ноября 2007 г. РАН. Северо-Восточный научный центр.— С. 175.

Безгачина Т.В. 2007б. К вопросу о специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, идентифицированной в 2006 г. у мидий Чёрного моря // Естественные и инвазийные процессы формирования биоразнообразия водных и наземных экосистем: Тез. докл. Международной научной конференции 5–8 июня 2007 г. РАН. Южный Научный Центр.— Ростов-на-Дону.— С. 46–47.

Безгачина Т.В. 2008. Выявление культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза у мидий Чёрного моря *Mytilus galloprovincialis* в районе Северного Кавказа в летний период 2007 г. // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: Сб. научных трудов, выпуск 24, РУП. Институт рыбного хозяйства.— Минск.— С. 373–375.

Безгачина Т.В. 2008. Исследование на активность и специфичность антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, выделенной из прибрежных вод Чёрного моря в районе Северного Кавказа в летний период 2007 г. // Современное состояние водных биоресурсов: Материалы Международной конференции. Новосибирский государственный аграрный университет. ФГУП «Росрыбцентр».— Новосибирск.— С. 366–368.

Безгачина Т.В. 2008. Выявление возбудителя вибриоза штамма *Vibrio anguillarum* у мидий Белого моря — актуальная проблема в ихтиопатологии // Природа шельфа и архипелагов Европейской Арктики: Материалы Международной научной конференции, выпуск 8, РАН, Кольский Научный Центр, Министерство образования и науки.— М.: ГЕОС.— С. 30–32.

Висманис К.О. 1980. Профилактика и лечение рыб при аквакультуре // Рыбное хозяйство. № 2.— С. 37–39.

Патент на изобретение № 2284830 от 10.10.2006 г. Приоритет от 18.04.2005 г. «Способ получения инактивированной вакцины против вибриоза рыб». РФ Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.— Москва.— С. 6.

Патент на изобретение № 2284831 от 10.10.2006 г. Приоритет от 18.04.2005 г. «Инактивированная вакцина против вибриоза рыб». РФ Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.— Москва.— С. 4.

Пугаева В.П., Устищенко Е.А, Рудакова С.Л., Сазонова А.А. 2000. Вибриоз у дикой горбуши *Oncorhynchus gorbusha* (Walbaum) в прибрежных водах Карагинского залива // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. Вып. 5.— Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО.— С. 175–180.

Сергеенко Н.В., Надеева О.А., Гаврюшева Т.В. 2008. Санитарно-эпидемиологическое состояние популяций тихоокеанских лососей Камчатки // Современное состояние водных биоресурсов: Материалы Международной конференции 26–28 марта 2008 г. Новосибирск. Новосибирский государственный аграрный университет, ФГУП «Росрыбцентр».— Новосибирск.— С. 387–391.

Bergman A.M. 1909. Die rote Beulenkrankheit des Hals // Ber. Kgl. Bayer. Biolog. Versuch.— Munchen.— P. 10–54.

Bezgachina T.V. 2003. Specific features of antigen from strain culture of *Vibrio anguillarum* in rainbow trout during cultivation in Karelian Republic. Abstract EAAP 11 International Conference on «Diseases of Fish and Shellfish» European Association Fish Pathologists 21<sup>st</sup>–26<sup>th</sup> September . Corinthia San Gorg Conference Centre St. Iulians.— Malta.— P. 112.