

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННОГО МЕТОДА ЗАЩИТЫ ЗДОРОВЬЯ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ – ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИБРИОЗА

Канд. биол. наук А.Е. Дрошнев, канд. биол. наук Е.А. Завьялова,
П.Д. Богданова, К.Ю. Булина (ФГБНУ ВИЭВ, Москва, Россия)

В статье представлена лабораторная технологическая схема приготовления вакцины противibriоза лососевых рыб с различными адьювантами. Показано, что все испытанные адьюванты (НАФ, ГОА, ISA 70) образуют стойкие эмульсии с водным вибриозным антигеном; опытные серии вакцин, изготовленные на их основе стерильны, безвредны для рыб. В ходе экспериментов установлены различия в реактогенности и антигенной активности разработанных биопрепаратов. Специфическая защита при одноразовой иммунизации радужной форели препаратом на основе НАФ предотвращает гибель 90% рыб, препаратом на основе ГОА – 80%, на основе ISA 70...95%.

Ключевые слова: вибрионы, вирулентность, вакцина, иммуногенность, антигенная активность, адьювант.

Введение. Перспективным направлением масштабного выращивания ценных видов рыб в РФ является марикультура. В нашей стране доля выращенной рыбы в море составляет 3...5%, ожидается увеличение объемов на порядки. При этом сдерживающими факторами являются потери от инфекционных болезней, среди которых важнейшей является вибриоз [1,2].

Вибриоз широко распространён в морях и солоноватых водоемах, поражает, как морских рыб, так и заходящих в прибрежные участки моря пресноводных. Течение и клиническая картина вибриоза различаются у разных видов рыб, но имеют некоторые общие признаки (кровоизлияния, некрозы, язвы на поверхности тела) [3].

Возбудителя данной болезни впервые выделил Bergmann в 1909 г. от больных угрей. Он описал это заболевание как краснуху или бубонную чуму угрей. Позднее, аналогичное заболевание угрей, мигрирующих в Балтийское море, регистрировал Schaperclaus в 1927 и в 1934 гг. Впервые в Японии бактерии *Vibrio anguillarum* описал Mugora et al. в 1976 г., а в Северной Америке Crosa et al. – в 1977 г. В нашей стране первые работы по изучению вибриоза рыб Каспийского моря выполнены Вылегжаниным (1958, 1967, 1973) [4]. В 1972 г. впервые выделены из воды и гидробионтов Черного моря [5]. В настоящее время заболеваемость вибриозом отмечена в Балтийском и Белом морях.

Во всем мире экономический ущерб от вибриоза исчисляется миллионами долларов, лечебные мероприятия не позволяют охватить все поголовье рыбы, тем самым возбудитель персистирует в стаде, а болезнь циклически переходит из острой стадии в хроническую и наоборот. Увеличение объемов производства, и, следовательно, плотностей посадки рыбы и количества хозяйств в локальных акваториях приводит к росту прессинга патогенных микроорганизмов, впослед-

ствии вызывающих эпизоотии.

Существует несколько методов вакцинации рыб: индивидуальные инъекции, погружение в ванны и введение орально. За рубежом применяются коммерческие вакцины, а в литературе подробнейшим образом описан ход работы и приводятся результаты исследований ученых [6,7,8,9] в сравнительном аспекте.

Для России сейчас особенно актуальна разработка профилактических средств путем создания вакцинных препаратов из эндемичных штаммов [10,11,12]. В 2011–2015 гг. нами были выделены и изучены биологические свойства вибрионов, отобраны штаммы в результате многократного пассирования которых (более 110 пассажей) установлено отсутствие диссоциации. Для галофильных вибрионов установлена зависимость летальной дозы от температуры воды, чем выше температура воды, тем меньше заражающая доза. Подобран режим инаktivации, установлена прививочная доза, обеспечивающая максимальную сохранность рыб при экспериментальном вибриозе.

Цель настоящего исследования разработать лабораторную технологическую схему и перейти к изготовлению опытных серий вакцины против вибриоза.

Материалы и методы

Рыбы форель – 500 экз., массой от 10 до 500 г.

Штаммы вибрионов. В работе использовали штаммы вибрионов (*Listonella anguillarum*) – «ВБФ», «Бок07», «АФ3/4» с охарактеризованными ранее свойствами [13, 14, 15, 16].

Среды и растворы для микробиологической работы. Жидкие, полужидкие и плотные питательные среды МПСА, МПСБ, МППА, МПЖ, среды Гисса, Хью-Лейфсона, Клигера, Кларка, Триптозо-соевый бульон (агар), ДДА, основной пептон.

Биопроба. Завезенную рыбу адаптировали в аквариумах с проточной водой в течение 10 дней, при температуре 10-15°C. Формировали опытные и контрольные группы рыб (не менее 10 экз. в каждой). Изоляцию исходных штаммов, при необходимости, от зараженных рыб проводили по общепринятой методике.

Результаты. При культивировании вибрионов на плотных питательных средах в стеклянных матрасных колбах и жидких средах в «колбах – качалках» отмечали ряд недостатков: процесс проводился в неуправляемом режиме – отсутствует стерильная подача воздуха, не регулируется рН среды, продолжительность 24–48 ч. Данные способы не обеспечивают стабильного накопления жизнеспособных клеток, не позволяют вести инструментальный контроль, в силу чего уменьшается эффективность и качество конечного продукта. Для повышения стабильности препарата и сокращения времени культивирования использовали метод «модельного» глубинного культивирования в жидких питательных средах.

Таким образом, было установлено, что эффективной и экономически обоснованной средой является основной щелочной пептон с содержанием 10% морской воды. Общая концентрация вибрионов по окончании культивирования составила 15...22 млрд.м.к./см³, время 18–20 ч.

Процесс проводится по следующей схеме:

- подготовка и монтаж стеклянного сосуда-ферментера;
- стерилизация в сборе сосуда-ферментера с питательной средой;
- инокуляция 24-часовой матриксной культурой вибрионов, в соотношении 5% от объема питательной среды в сосуде-ферментере;
- культивирование при $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18–20 ч. В это время работает пеноотсос, подается стерильный воздух и ведется придонное перемешивание со скоростью 200–300 об./мин., рН культуральной жидкости регулируют на уровне 7,8–8,0 ед. подачей 0,1N раствора NaOH.
- инактивация бактериальной массы непосредственно в сосуде ферментере, введением 37% раствора формалина до конечной концентрации в общем объеме жидкости 0,35%. После перемешивания раствор выдерживают 24 часа при 37°C и 72 часа при $22 \dots 25^{\circ}\text{C}$.

-удаление культуральной жидкости проводят методом центрифугирования в режиме 4000g 30 минут, далее трижды отмывают бактериальную массу фосфатно-солевым буфером рН 7,4, что позволяет удалить балластные компоненты и формалин.

Применение «модельного» глубинного культивирования выявило ряд преимуществ в сравнении со способами выращивания на плотных питательных средах и в жидкой фазе при постоянном шуттелировании. Значительно увеличивается выход микробных клеток с объема питательной среды в 10 раз и в 6 раз соответственно, что позволяет сократить трудозатраты и экономические вложения. Время культивирования сокращается более чем в два раза, тем самым позволяет получать стандартную культуру за короткий срок.

Для повышения иммуногенности вакцины в состав вводили адъюванты: гидроокись алюминия (ГОА), НАФ, Montanide ISA 70. Эмульгирование НАФ, ГОА с водной, содержащей антиген средой проводили при соотношении компонентов (1:1), Montanide ISA 70 – образует эмульсию в пропорциях 7 частей адъюванта к 3 частям антигена.

Антиген для вакцин стандартизировали по оптической плотности и смешивали механическим способом при частоте диспергатора 10000 об/мин в течение 8 минут при 22°C и разливали в стерильные стеклянные флаконы.

Для всех вариантов вакцин конечная концентрация антигена составляла 1,0 млрд.м.к./см³.

Стабильность эмульсии проверяли путем ее замораживания при -40°C и дальнейшего оттаивания при $+37^{\circ}\text{C}$. Стабильность и внешний вид оценивали визуально. Изучение внешнего вида и стабильности эмульсии всех образцов показало, что они имеют белый цвет, отслоение не превышает 1...2% от объема, масло сверху флакона; для ГОА отслоение жидкой фазы до 40...50%, которое равномерно распределяется при встряхивании. Разрушения эмульсии в трех образцах после заморозки и нагревания не происходило, что позволяет считать способ получения и собственно препараты удовлетворяющими предъявляемым требованиям.

Стерильность препаратов определяли в соответствии с ГОСТ 28085 путем высева на МПА, МПБ, Сабуро-агар, среду Китт-Тароцци, TSA солевой, основной щелочной пептон с последующим термостатированием при 37°C и 17°C, наблюдением в течение 7 дней. При определении стерильности установлено, что все варианты вакцины не контаминированы бактериальной и грибной микрофлорой, роста на питательных средах в течение срока наблюдения не отмечали.

Безвредность определяли на радужной форели массой 30 и 300 грамм, путем внутрибрюшинного введения вакцины в дозе 1 см³ и 2 см³, что превышает рабочую концентрацию, как по объему, так и по содержанию антигена в 5...10 раз. За 30 дней наблюдения отклонений в поведении и гибели рыб не наблюдали, что подтверждает безвредность проверяемых препаратов.

Иммуногенность опытных серий вакцины проверяли на радужной форели, средней массой 30...50 г. Исходя из полученных нами данных в 2010–2012 гг., а также учитывая опыт иностранных исследователей, введение препаратов проводили внутрибрюшинно, в область основания брюшных плавников в объеме 0,2 см³, при температуре воды 17°C. Полученные результаты исследования показали различие в титрах вырабатываемых агглютинирующих антител (ТАА) по сравнению с контрольной группой. Максимальный титр агглютинирующих антител наблюдали на 30-50 день после введения. При этом наиболее высокие значения ТАА были в группе рыб, вакцинированной препаратом с НАФ, составили на 10 день и 20 день – 1:64-1:128, на 30–50 день – 1:256 – 1:512. В группах рыб, иммунизированных вакциной на основе ГОА и ISA 70, средний ТАА на 10-20 день был на уровне 1:32-1:64, а на 30–50 день – 1:256. Уровень антител сохранялся на протяжении 6 месяцев наблюдения.

Специфическую защиту изучали методом внутрибрюшинного заражения вакцинированной рыбы двухсуточной культурой штамма «ВБФ» в дозе 200 млн.м.к. при температуре 17°C, по схеме отработанной ранее. Установлено, что одноразовая иммунизация радужной форели препаратом на основе НАФ предотвращает гибель 90% рыб, препаратом на основе ГОА – 80%, на основе ISA 70...95%.

Недостатком использования вакцин на основе масляных адъювантов является местная воспалительная реакция, вследствие чего образуется соединительная ткань между стенками внутренних органов и брюшной полости (фибрин). В месте инъекции образуется черный пигмент (гемосидерин).

Выводы

1. Эффективной и экономически обоснованной средой для культивирования галофильных вибрионов является основной щелочной пептон с содержанием 10% морской воды.

2. При культивировании по разработанной нами схеме общая концентрация вибрионов при «модельном» глубинном культивировании составляет 15...22 млрд.м.к./см³, время 18–20 ч.

3. Установлено, что все испытанные адъюванты (НАФ, ГОА, ISA 70) образуют стойкие эмульсии с водным вибриозным антигеном. Опытные серии вак-

цин, изготовленные на их основе стерильны, безвредны для рыб. В ходе экспериментов установлены различия в реактогенности и антигенной активности разработанных биопрепаратов.

4. Наиболее высокие значения титра агглютинирующих антител (ТАА) в группе рыб, вакцинированной препаратом с НАФ, на 10 день и 20 день – 1:64-1:128, на 30-50 день – 1:256 – 1:512. У рыб, иммунизированных вакциной на основе ГОА и ISA 70, средний ТАА на 10-20 день на уровне 1:32-1:64, а на 30-50 день – 1:256. Уровень антител сохранялся на протяжении 6 месяцев наблюдения.

5. Специфическая защита при одноразовой иммунизации радужной форели препаратом на основе НАФ предотвращает гибель 90% рыб, препаратом на основе ГОА – 80%, на основе ISA 70...95%.

Литература:

1. Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломыцев С.А. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России // Ветеринария. 2011. № 8. С. 3-7
2. Пичугина Т.Д., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е. Мониторинг в рыбоводстве // Ветеринарная жизнь. 2004. № 15 (15). С. 2.
3. Гурина Л.М. /Роль галофильных вибрионов в возникновении инфекционных заболеваний морских гидробионтов Азово-Черноморского бассейна. //Ветеринарная медицина: межведомственный тематический сборник, №92, 2009, с. 150-153
4. Безгачина Т.В. /Диагностика вибриоза радужной форели в аквакультуре. //Автореф. на соискание уч. ст. канд. биол. наук., Москва, 1998, 23 с.
5. Либинзон А.Б., Брудный Р.А., Нагорная А.Ф. /Галофильные вибрионы Черного моря и их роль в патологии человека// ЖМЭИ, 1987, №2, с. 97
6. Ototake M., Moore J.D., Nakanishi T. /Prolonged Immersion Improves the Effectiveness of Dilute Vibrio Vaccine for Rainbow Trout// JFP, 1999, 34(3), 151-154
7. Horne M. T., Tatler M., McDerment S., Agius C. /Vaccination of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperatures and the long-term persistence of protection// JFD, 1982, 5.343-345
8. Egidius E. C. & Andersen K. /Bath-immunization—a practical and non-stressing method of vaccinating sea farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against vibriosis// JFD, 1979,2.405-410
9. Antira R., Gould R. & Amend D. F. /*Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) by direct and hyperosmotic immersion// JFD, 1980, 3,161-165
10. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Гулюкин М.И., Хлунов О.В. Современная вакцинопрофилактика радужной форели против вибриоза // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2012. № 1. С. 31-33.
11. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Хлунов О.В. Разработка новых и совершенствование применяемых методов профилактики вибриоза лососевых рыб // В сборнике: Аграрная наука и образование в условиях становления инновационной экономики материалы международной научно-практической конференции. Оренбург, 2012. С. 341-345
12. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А. Конструирование вакцинного препарата против вибриоза лососевых рыб //Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2013. Т. 77. С. 234-238
13. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Хлунов О.В. Видовое разнообразие галофильных вибрионов Белого моря и их эпизоотическая значимость // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел Международная научно-практическая конференция, посвященная

50-летию со дня основания лаборатории лейкозологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны. 2011. С. 78-80.

14. Manual of diagnostic tests for aquatic animals, OiE, fifth edition, 2006
15. Manual of diagnostic tests for aquatic animals, OiE, sixth edition, 2009
16. Определитель бактерий Берджи, Д.Хоулта и др./Под ред. Покровского В.И./ 1997

Сведения об авторах:

Дрошнев А.Е. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Завьялова Е.А. – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией

Богданова П.Д. – младший научный сотрудник

Булина К.Ю. – младший научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ), Москва, Россия

E-mail: aquazeda@mail.ru