

Оценка иммунного статуса рыб, привитых против вибриоза лососевых

Evaluation of the immune status of fishes, vaccinated against the vibriosis of salmons



Дрошнев А.Е./Droshnev A.E.
к.б.н., ведущий научный сотрудник
aquazeda@yandex.ru
ФНЦ - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-19
УДК 57.083.12.639

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

Key words: vibrio, virulence, vaccine, immunogenicity, antigen activity, adjuvant.

Резюме. Представлены экспериментальные данные, характеризующие иммуногенную активность разрабатываемой автором вакцины против вибриоза лососевых. Показано, что титр сывороточных специфических антител в крови рыб при парентеральном введении 600–900 млн. м.т. достигал 1:256, что свидетельствует о высокой антигенной активности препарата обеспечивающей сохранность до 87% поголовья рыб в течение 120 дней наблюдения.

Summary. Was provided the experimental data, characterizing the immunogenic activity of the vaccine, developed by the author against the vibriosis of salmons. It was demonstrated, that the titre of serum specific antibodies in the blood of fishes at the parenteral administration of administration of 600–900 mln.m.t. achieved 1:256, what witnesses the high antigen activity of the substance, providing for the safety up to 87% of the population of fishes within 120 days of the monitoring.

Аквакультура – искусственное разведение гидробионтов (рыб, моллюсков, ракообразных, водорослей) в России носит комплексный многоотраслевой характер, за счет использования крупнейшего в мире фонда внутренних водоемов и прибрежных акваторий морей. В настоящее время это 22,6 млн.га озёр, 5,2 млн. га водохранилищ, 1 млн. га ирригационных и сельскохозяйственных водоемов комплексного назначения, более 150 тыс.га прудов, 450 тыс. км речных систем, что создает громадные возможности для развития пресноводного рыболовства. Также Россия располагает самой протяжённой линией морского побережья – около 60 тыс.км, а общая площадь мелководий прилегающих морей (без арктических и субарктических зон) составляет 0,39 млн.км², что объективно способствует широкому развитию мариккультуры [11]. Основные водные ресурсы сосредоточены в Сибирском, Северо-Западном и Уральском федеральных округах. Порядка 65% объема товарного рыболовства составляют карповые и растительноядные рыбы, однако в последнее время перспективным направлением становится выращивание лососевых видов в Баренцевом и других морях, где климатические условия сопоставимы с норвежскими [14].

Во всех странах мира в мариккультуре широко распространены вибриоз – инфекционная болезнь лососевых, угрей и других видов рыб, вызываемая микробом из семейства Vibrionaceae, рода Vibrio [12]. В России вибриоз встречается у дикой рыбы, а также в лососевых и угревых хозяйствах,

использующих для выращивания рыб морскую или солоноватую воду и расположенных в бассейнах Балтийского, Баренцева, Белого и дальневосточных морей. Заболевание протекает энзоотически, сопровождается массовой гибелью рыб и требует значительных затрат на оздоровление неблагополучных хозяйств [3].

Возникновению болезни способствуют высокая температура воды (выше 15 °С), рН более 8,0, низкое содержание кислорода, загрязнение воды органическими веществами (БПК выше 2 мг/л) и азотными соединениями (содержание азота более 1 мг/л), хендлинг. При выращивании в морских садках потери рыб от заболевания достигают 70–90 %. При индустриальном рыболовстве на возникновение и течение болезни большое влияние оказывают условия содержания. Несбалансированные, некачественные корма, разновозрастной посадочный материал, переуплотненность и загрязнение воды являются факторами, повышающими восприимчивость рыб [1,4,10].

Среди представителей рода Vibrio есть виды несущие потенциальную опасность для здоровья человека, в связи со способностью вызывать пищевые токсикоинфекции [2].

Изучение рода Vibrio, в частности вида Vibrio (Listonella) anguillarum актуально в современной ихтиопатологии. Было отмечено, что молодь радужной форели и атлантического лосося наиболее восприимчива к заражению Vibrio anguillarum, клинические признаки заболевания, которые характеризуются септициемией, поражением тканей почек, печени, желудочно-кишечного тракта, нарушением водно-солевого обмена и интоксикацией, проявляются через 30–40 суток после завоза невакцинированной рыбы в морскую воду, при температуре 15–20 °С, и за короткое время болезнь переходит в острую форму с массовой гибелью. При отсутствии терапии потери достигают 90%. Антибиотикотерапия не позволяет провести 100% деконтаминацию организма рыбы от вибрионов, болезнь переходит в хроническую форму, происходят многократные повторные вспышки.

Мировая аквакультура давно отказалась от применения антибиотических препаратов, отрицательно влияющих на иммунный статус организма рыбы и конечного потребителя продукции – человека. За последние двадцать лет, в странах занимающихся лососеводством, стала обязательной поголовная вакцинация рыб против 25 заболеваний разной этиологии, в том числе, в первую очередь против вибриоза [13,15].

По данным Росрыболовства, Россия производит примерно 0,2% мировой продукции аквакультуры. В 2000 году в стране вырастили 73,5 тыс. т товарной рыбы, в 2016–м – 143,9 тыс. т., следовательно, в связи с расширением производства продукции аквакультуры в России сейчас особенно актуальна разработка и внедрение вакцинных препаратов. Автором уже был проведен ряд поисковых исследований по данной теме [4,5,6,7,8,9].

Целью настоящего исследования является изучение эндемичных штаммов вибрионов, испытание новой отечественной вакцины на их основе и оценка иммунного статуса рыб после вакцинации.

Материалы и методы

Рыба. В работе использовали форель – 560 экз., массой от 10 до 500г.

Штаммы вибрионов. Всего в работе тестировали пятьдесят пять штаммов вибрионов: референтный Vibrio anguillarum ВУР-19 (из коллекции ВГНКИ); пятьдесят четыре полевых штамма, в том числе тридцать восемь, выделенных от радужной форели выращиваемой в условиях Белого моря: из них V.anguillarum – 26 шт. V.alginolyticus – 7 шт., V.ordalii – 5 шт.; двенадцать штаммов из паренхиматозных органов горбуши: V.anguillarum – 8 шт. V.alginolyticus – 3 шт., V.ordalii – 1 шт.; четыре штамма от зубатки, по 2 шт. V.anguillarum и V.ordalii – охарактеризованных ранее [4].

Среды и растворы для микробиологической работы. Жидкие, полужидкие и плотные питательные среды МПА, МПБ, рыбобептонный солевой агар РПСА и бульон РПСБ, МППА, МПЖ, среды Гисса, Хью-Лейфсона, Клигера, Клар-

ка, триптозо-соевый бульон/агар (TSA/TSB) с хлористым натрием, ДДА, ТСБС, основной щелочной пептон.

Результаты

Изучены морфологические, культурально-биохимические и тинкториальные свойства вибрионов, выделенных в период осень 2007 – лето 2016 годов. Вибрионы, выделяемые из воды и гидробионтов, имеют сходные морфологические и тинкториальные свойства. По галофильности вибрионы подразделяются на три биотипа. Два вида *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, относятся к I и II биотипу (содержание NaCl 3% и 7% соответственно), что может представлять потенциальную опасность для здоровья человека, в связи со способностью вызывать пищевые токсикоинфекции. Культуры *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. vulnificus* встречались в морской воде, реже в опреснённой воде с солёностью менее 10‰. Такое распространение этих видов обусловлено их толерантностью к концентрации солей. Некоторые виды вибрионов способны размножаться в условиях содержания солей NaCl до 16%.

В опытах заражения радужной форели галофильными вибрионами видов *V. anguillarum* и *V. ordalii* установлено, что для *V. anguillarum* минимальная LD₅₀ составляет 200 млн.м.к., тогда как *V. ordalii* 600–800 млн.м.к.

При многократном пассировании штаммов "ВБФ", "ББМ", "Бок/07", "АФ3/4" установлено отсутствие диссоциации на протяжении более 160 пассажей.

Оптимальные накопительные среды – РПСА, РПСБ, TSA, TSB с добавлением 3–5% NaCl.

На следующем этапе исследований отобранные штаммы вибрионов (*Listonella anguillarum*) – "ВБФ", "Бок/07", "АФ3/4" тестировали в опытах прямого заражения радужной форели при разных температурах, вводили внутривентриально от 50 до 500 млн.м.к., с шагом 50, в объеме 0,2 см³.

Наибольшей вирулентностью обладали два штамма – "ВБФ" и "АФ3/4", LD₅₀ при 8 °С составляет 200 млн.м.к., при 15–18 °С – 100 млн.м.к. В проведенных опытах термостабильности антигенов *Vibrio anguillarum* различного происхождения отмечали разрушение Н-антигена при кипячении, но с сохранением агглютинирующей способности соматического (О) антигена. Введение прокипяченной суспензии бакмассы в различных дозах радужной форели не вызывало формирования стойкой защиты. Заражение рыб спустя 21 сутки сопровождалось развитием клинических признаков вибриоза и гибелью в течение 10–14 дней 40–80% подопытной форели. Титр агглютининов составлял 1:16–1:32.

Поэтому дальнейшие опыты проводили с цельными микробными клетками, инактивированными формалином в дозе от 200 млн.м.к. до 900 млн.м.к., с шагом 100, которые вводили внутривентриально, в область брюшных плавников в объеме 0,1 см³. Формирование иммунного ответа у радужной форели массой 30 г. контролировали при разных температурах воды: 5, 10, 15 °С. Полученные результаты свидетельствуют, что самые низкие титры агглютининов наблюдали при 5 °С и дозе от 200 до 400 млн.м.к. – 1:8–1:16, при увеличении дозы титр не превышал 1:32. При температуре 10–15 °С и дозе от 100 до 500 млн.м.к. титры в среднем составляли – 1:128, при увеличении дозы до 600–900 млн.м.к. – 1:256. Полученные на данном этапе исследования результаты свидетельствуют о необходимости использования адъювантов.

Наличие антител в РА наблюдали через 10 дней после инъекции, максимальных значений титр достигал на 21 день и сохранялся в течение 4-х месяцев наблюдения.

Специфическую защиту изучали методом прямого внутривентриального заражения вакцинированной рыбы двухсуточными культурами штамма "ВБФ" в дозе 200 млн.м.к., при температуре 10–15 °С. В качестве контроля использовали интактную форель такой же кондиции. Данный температурный интервал был выбран потому, что естественное течение вибриоза при садковом выращивании наблюдается именно при таких условиях.

Проведенные эксперименты показали, что в контрольных группах погибало 100% рыб, а в опытных – в

зависимости от прививочной дозы, погибало от 4 до 8 экземпляров, что составляло от 13 до 27%, при этом соответственно, выживало 73–87 % рыб.

Таким образом, было установлено, что прививочная доза от 200 до 500 млн.м.к. не достаточно эффективна – защита на уровне 73%. Дозы от 600 до 900 млн.м.к. обеспечивали сохранность поголовья до 87%. Однако, использование высокой концентрации антигена (800–900 млн.м.к.) без значительного увеличения эффективности, экономически нецелесообразно, следовательно, в дальнейшем, для конструирования вакцинного препарата целесообразно использовать дозу 700 млн.м.к. и использовать адъюванты.

Выводы

1. Вибрионы, выделяемые из воды и гидробионтов, имеют сходные морфологические и тинкториальные свойства, по степени галофильности разделяются на три биотипа. Подавляющее большинство культур относится к первому и второму биотипу, что может представлять потенциальную опасность для здоровья человека, в связи со способностью вызывать пищевые токсикоинфекции. При индустриальном рыбоводстве на возникновение и течение болезни большое влияние оказывают условия содержания и контаминация вибрионами видов *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. alginolyticus*. Этиологическим агентами вибриозов в подавляющем большинстве случаев являются *V. anguillarum*.

2. Для конструирования вакцинного препарата подобрано 4 штамма *V. anguillarum*: "ВБФ", "ББМ", "Бок/07" и "АФ3/4" в результате многократного пассирования которых (более 160 пассажей) установлено отсутствие диссоциации. Данные штаммы нетребовательны к составу питательных сред, оптимальные накопительные среды – рыбопептонный солевой агар (РПСА) и бульон (РПСБ), триптозосоевый агар и бульон (TSA, TSB) с добавлением 3–5% NaCl. При культивировании не меняют культурально-биохимических свойств.

3. В качестве модели для определения вирулентности вибрионов целесообразно использовать парентеральное заражение радужной форели массой от 30г. Для галофильных вибрионов установлена зависимость летальной дозы от температуры воды, чем выше температура воды, тем меньше заражающая доза.

4. Инактивация бактерий путем создания концентрации 0,35% формалина позволяет сохранить антигенные свойства и обеспечивает стерильность. По термотолерантности *Vibrio anguillarum* имеет термостабильный соматический О-антиген и жгутиковый термолабильный Н-антиген. Использование цельного антигена вибрионов создает невосприимчивость к болезни до 87% поголовья рыб.

5. Определена прямая зависимость степени иммунного ответа радужной форели от температуры воды. Уровень специфических антител при одинаковой дозе введения антигена и оптимальных температурах (10–15 °С) составлял 1:128–1:256, что превышало на порядки значения титров при инъецировании при низких температурах (5 °С) 1:8–1:32.

Литература

1. Безгачина Т.В. Активность и специфичность антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* - возбудителя вибриоза, выделенной из прибрежных вод Черного моря в районе Северного Кавказа в летний период 2007 года / Рыбоводство и рыбное хозяйство, 2008, 8, стр. 39-40.
2. Беленева И.А., Масленникова Э.Ф., Магарламов Т.Ю. Физиолого-биохимические свойства галофильных вибрионов *Vibrio parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, изолированных из гидробионтов залива Петра Великого Японского моря. / Биология моря. 2004, том 30, №2, стр.114-119.
3. 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
4. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А. Видовое разнообразие галофильных вибрионов Белого моря и их эпизоотическая значимость. / Материалы научно-практической конференции "Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел", Москва, 2011 г. С.81-83
5. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Богданова П.Д., Булина К.Ю. Разработка современного метода защиты здоровья лососевых

- рыб - вакцины против вибриоза // Инновации в сельском хозяйстве. 2016. № 5 (20). С. 408-413.
6. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Гулюкин М.И. Профилактика вибриоза лососевых рыб при промышленном выращивании. // Ветеринария Кубани, 2017, №2, с.22-23
7. 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.
8. 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.
9. Дрошнев А.Е., Булина К.Ю., Завьялова Е.А. Иммунопротективные свойства адъювант вакцины против вибриоза лососевых рыб // Актуальные вопросы ветеринарной биологии, 2018, № 1 (37), С. 20-24
10. Пугаева В.П., Устименко У.А., Рудакова С.Л., Сазонов А.А. Вибриоз у дикой горбуши *Oncorhynchus garbuscha* (Walbaum) в прибрежных водах Карагинского залива / Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и Северо-Западной части Тихого океана. - Петропавловск-Камчатский. - КамчатНИРО. - 2000. - вып.5. - стр.175-180
11. Фомин А.В. Тенденции и перспективы развития аквакультуры в России, Рыбоводство и рыбное хозяйство, №6, 2008, с.17-20
12. Egidius E. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. / *Aquaculture*, 1987, 67, p.15-28
13. Fish Vaccines. A short, but remarkable journey / P. Smith // *Veterinary Vaccines conference*, 3-4 December, 2014, Brussels, Belgium.
14. <http://www.agroinvestor.ru/markets/article/17117-posmotrite-narybu/> (дата обращения 21.08.2018)
15. Sommerset I., Krossoy B., Biering E., Frost P. Vaccines for fish in aquaculture // *Expert Rev. Vaccines*. - 2005. - Vol. 4. - P. 89-101.