

УДК 579.62:619.57.083.1

Ключевые слова: вибрионы, вирулентность, вакцина, иммуногенность, антигенная активность, адъювант
Key words: vibrios, virulence, vaccine, immunogenicity, antigen activity, adjuvant

Дрошнев А. Е., Булина К. Ю., Завьялова Е. А.

ИММУНОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА АДЬЮВАНТ-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИБРИОЗА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

IMMUNOPROTECTIVE PROPERTIES OF VIBRIOSIS ADJUVANT VACCINE OF THE SALMONIDS

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии
имени Я.Р.Коваленко»

Адрес: 109428, Россия, Москва, Рязанский пр., д. 24, к.1. Тел. (495) 995-88-61
*All-Russian Research of Experimental Veterinary Medicine named after I.R. Kovalenko,
Federal State Budget Scientific Institution*
Address: 109428, Moscow, Rjazanskij ave., 24, housing 1. Tel. +7 495 995-88-61

Дрошнев Алексей Евгеньевич, к. б. н., вед. науч. сотрудник лаборатории ихтиопатологии.
E-mail: asdf1961@mail.ru

Droshnev Alexey E., PhD of Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Ichthyopathology.
E-mail: asdf1961@mail.ru

Булина Кристина Юрьевна, мл. науч. сотрудник лаборатории ихтиопатологии
Bulina Christina Y., Junior Researcher of Laboratory of Ichthyopathology

Завьялова Елена Александровна, к. б. н., зав. лабораторией ихтиопатологии. E-mail: aquazed@mail.ru
Zavyalova Elena A., PhD of Biological Sciences, Head of Laboratory of Ichthyopathology. E-mail: aquazed@mail.ru

Аннотация. В статье представлены результаты вакцинации форели инъекцией препаратами с разными адъювантами и купанием в растворе вакцины с предварительным гиперосмосом на ограниченном поголовье в рыбноводческом хозяйстве. В ходе работ оценивались иммуногенность, реактогенность и защитные свойства вакцины в условиях садкового выращивания, а также эффективность, технологичность и удобство разных способов введения биопрепарата. Изучение показало, что максимальные титры агглютинирующих антител были: в группе рыб, вакцинированных препаратом с ISA 70 - 1:512 – 1:1024; в группе рыб, иммунизированных вакциной на основе ГОА – 1:512; наименьшую активность проявил препарат, введенный иммерсионно - 1:128. Полученные данные свидетельствуют о положительной динамике нарастания специфических антител, которые создают иммунную защиту рыб при перевозках в потенциально опасную зону. Оптимальным для производства и использования можно считать адъювант ГОА, сочетающий высокий уровень защиты и низкую стоимость, не вызывающий побочных эффектов (местной воспалительной реакции), не требующий соблюдения специального термического режима при применении.

Summary. The article presents results of trout vaccination by different adjuvants injection and by bathing in vaccine solution with preliminary hyperosmos among the limited number at fish farms. During vaccine course of works there were evaluated such factors as immunogenicity, reactogenicity, protective properties in cage growing conditions, efficiency, manufacturability and convenience of different methods of the biological drug injection. The study showed that maximum titers of agglutinating antibodies were shown in the group of fish, vaccinated by the substance with ISA 70 - 1:512 – 1:1024; in the group of fish, immunized with the HOA based vaccine – 1:512; the less activity was demonstrated by the immersional substance - 1:128. Obtained data indicate positive dynamics of growing specific antibodies, that create fish's immune protection during transportations to the potentially dangerous zone. HOA adjuvant can be considered as optimal one for production and use, it's combining high protection level, low cost and lack of side effect (local inflammatory reaction). Special thermal mode is not required when applying.

Введение

Вибриоз – массовое бактериальное заболевание рыб и гидробионтов в морской и солоноватой воде, которое впервые было выявлено у угрей в 1909 г. [11]. Это заболевание практически неизбежно возникает в интенсивной марикультуре в связи

с биологическими свойствами возбудителя *Vibrio anguillarum* (Listonella). Встречается у многих видов костистых рыб, моллюсков, ракообразных за рубежом и в России, особенно интенсивно развивается в теплое время года, достигая максимума при $t = (19-20) ^\circ\text{C}$ [3], в период эпизоотии мо-

жет привести к 90 % гибели культивируемых лососевых рыб.

Изучение рода *Vibrio*, в частности вида *Vibrio anguillarum* (*Listonella*), необходимо для современной ихтиопатологии. Данный представитель рода повсеместно распространен в солоноватых и морских водах, при этом вызывает у культивируемых рыб острое инфекционное заболевание – вибриоз, который характеризуется септициемией, поражением тканей почек, печени, желудочно-кишечного тракта, нарушением водно-солевого обмена и интоксикацией. Известно, что молодь форели радужной и атлантического лосося наиболее восприимчива к заражению *Vibrio anguillarum*, симптомы 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 [2, 5].

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, следовательно, плотностей посадки рыбы и количества хозяйств в локальных акваториях приводит к росту прессинга патогенных микроорганизмов, впоследствии вызывающих эпизоотии. Поэтому на сегодняшний день мировая практика борьбы с вибриозом заключается в поголовной вакцинопрофилактике и соблюдении ветеринарно-санитарных правил при выращивании. Существует несколько методов вакцинации рыб: индивидуальные инъекции, погружение в ванны и введение орально.

Таким образом, в связи с расширением производства продукции аквакультуры в России сейчас особенно актуальна разработка профилактических средств путем создания вакцинных препаратов из эндемичных штам-

мов. Авторами был проведен ряд поисковых исследований по данной теме [4, 6, 7, 8, 9, 12].

Цель настоящего исследования – провести испытания вакцины двумя способами: инъекцией и купанием в растворе вакцины с предварительным гиперосмосом на ограниченном поголовье в рыбоводческом хозяйстве. Сравнить иммуногенность, реактогенность и защитные свойства вакцины в условиях садкового выращивания, эффективность, технологичность и удобство разных способов введения биопрепарата.

Материалы и методы

Рыба: форель радужная – 1 170 818 экз. Для проведения исследования использовали радужную форель около 13-ти см длиной (средний вес 30 г) и 5-ти см (средний вес 8 г). Работы проводили в пресной воде в установке замкнутого водоснабжения (УЗВ) в стеклопластиковых емкостях на коммерческой ферме. Температура воды в течение всего эксперимента составляла (13–15) °С.

Бактериальные штаммы: вибрионы *Listonella anguillarum* – «ВБФ», «Бок07», «АФЗ/4» – с охарактеризованными ранее биологическими свойствами.

Питательные среды: основной щелочной пептон, МПА, МПБ, МППА, МПЖ, МПСА, ТКСВ, среды Гисса, Хью-Лейфсона, Клиггера, Кларка, солевой триптозо-соевый бульон (агар), ДДА.

Адьюванты: гель гидроокиси алюминия (ГОА), Montanide ISA 70.

Вакцинировали двумя способами: инъекцией по 0,1 см³ внутривентрально под общей анестезией (в индивидуальной дозе – соответствующей 1х10⁸ м.кл.) и купанием в растворе вакцины с предварительным гиперосмосом (рабочая концентрация – соответствующая 5х10⁹ м. кл.мл).

Анестезия. Перед вакцинацией необходимо вводить рыбу в состояние наркоза применением раствора бензокаина в этиловом спирте или этилового эфира бензойной кислоты.

Для определения титра поствакцинальных антител были проведены серологические исследования согласно «Справочнику по микробиологическим и вирусологическим методам исследования», Москва, 1982;

«Методическим указаниям по определению уровня естественной резистентности и оценке иммунного статуса рыб», №13-4-2/1738, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 04.10.99 [10].

Результаты исследований

Ранее авторами были изучены биологические свойства вибрионов, отобраны штаммы и разработан метод культивирования, позволяющий получать стабильный продукт для изготовления опытных серий вакцины против вибриоза.

Подобран режим инаktivации, установлена прививочная доза, обеспечивающая максимальную сохранность рыб при экспериментальном вибриозе. Контрольные образцы полученных серий для оценки внешнего вида и стабильности эмульсии изучали методом замораживания при -40°C и дальнейшего оттаивания при $+37^{\circ}\text{C}$. Исследование показало, что способ получения и препараты удовлетворяют предъявляемым требованиям. При тестировании на стерильность препаратов в соответствии с ГОСТ 28085 установлено, что все варианты вакцины не контаминированы бактериальной и грибной микрофлорой, роста на питательных средах в течение срока наблюдения не отмечали, а также безвредны для радужной форели. Проанализированный таким образом препарат использовали в производственных опытах.

Опыт №1 – иммерсионная вакцинация использовалась только для вакцины на водной основе. Перед вакцинацией и после нее, независимо от применяемого метода, рыб выдерживали на голодной диете в течение 1–2 сут.

Для проведения работ использовали сачки, приемные ведра 30 л с сетчатыми вкладышами объемом 20 л – 8 шт., ведра для наливания воды – 2 шт., емкость для гиперосмоса 600 л (заполнение $\frac{1}{2}$ объема), обеспечение воды в емкостях кислородом, мерная посуда с ценой деления 1 мл.

Рыб доставали из бассейна с помощью сачка, помещали в сетчатый вкладыш, взвешивали, погружали в раствор хлористого натрия для создания гиперосмотической фильтрации антигенов, после чего перемещали рыбу в рабочий раствор вакцины, далее пе-

ресаживали в бассейн для выращивания.

В емкости готовили раствор хлористого натрия 2,5 %, в приемных ведрах – рабочий раствор вакцины путем растворения 1-го литра биопрепарата в 19-ти литрах воды. Время обработки рыб в растворе хлористого натрия и вакцины – последовательно по две минуты. Одновременно в приемных ведрах вакцинировалось 10 кг рыбы, по (2,5-3,0) кг в каждом вкладыше.

Всего в ходе опыта было провакцинировано 1 020 496 особей форели радужной средней массой (5–8) грамм за два рабочих дня. Общая биомасса провакцинированной рыбы составила 5 200 кг, в ходе работ израсходовано 26 литров вакцины. Отхода рыбы во время проведения работ выявлено не было, поведение и аппетит рыбы на следующий день соответствовали норме.

Инъекционная вакцинация – опыт №2. Перед прививкой проводили общую анестезию по методике, разработанной авторами ранее [1]. При введении рыб в состояние наркоза проводили легкую оксигенацию анестетического раствора. Далее рыб подавали на стол для введения вакцины, после чего пересаживали в отдельный бассейн с чистой водой и достаточным количеством кислорода. Инъекцию делали в брюшную область перед брюшными плавниками, немного правее линии середины тела. Иглу использовали такой длины, чтобы она прошла через брюшную стенку, не задев внутренние органы. Инъекционные прививки осуществляли ручным способом.

Всего в ходе опыта за два дня работ было провакцинировано 150 322 шт., из них 70 тыс. шт. в первый день, 80 322 шт. – во второй. Выбраковано с дефектами развития или недостаточной навески около 1300 шт. Средняя скорость вакцинации в час – 8000 шт. Отход на следующий день – 128 шт., во второй день – 3 шт. Поведение рыбы на следующий день соответствовало норме.

Сравнение способов вакцинации и применяемых адъювантов. Рыб для исследования условно разделили на четыре группы: три опытных и две контрольных, содержащихся в том же цехе, с которыми не проводили никаких манипуляций (табл. 1).

Смертность во время проведения вакцинации указанными способами и в течение 30-ти дней наблюдения после была от минимальной (единичные особи) в группе №1 до нескольких сотен рыб в день вакцинации и на следующий в группе №2. Это связано с тем, что масляные адьюванты переносятся рыбами тяжелее за счет развития местной аллергической реакции. Однако через три дня после проведения работ количество погибших рыб не превышало средних нормативных значений по цеху и даже было меньше, так как при вакцинации инъекцией проводилась дополнительная бонитировка – удалялись особи с отклонениями от физиологической нормы (имеющие искривления тела, отсутствующие плавники, жаберные крышки и т.п., истощенные) и кондиции, не соответствующие своему возрасту.

Иммуногенность опытных серий вакцин проверяли на радужной форели по уровню накопления (титру) агглютинирующих антител (ТАА) по сравнению с контрольной группой. Изучение иммуногенной активности трех образцов вакцины показало различия в уровне вырабатываемых антител. Реакцию микроагглютинации (РМА) на стекле и в планшетах проводили с образцами сыворотки крови форели через 10, 20, далее каждые 30 дней на протяжении 5-ти месяцев сезона выращивания. Для исследования отбирали не менее 10 экз. из каждой группы, «Vibrio-Vak ISA 70», «Vibrio-Vak ГОА» и «Vibrio-Vak иммерсия», и ставили РМА с антигенами *Listonella (Vibrio) anguillarum I-II* серотипов, в качестве контроля использовали кроличьи типовые антисыворотки. Со всеми образцами сыворотки крови радужной форели регистрировали положительную реакцию (образование комплекса

антиген-антитело), характеризующуюся выпадением хлопьевидного, зернистого осадка с просветлением надосадочной жидкости.

Полученные данные выявили иммунологическую особенность, которая характеризовалась формированием более высоких ТАА в естественных условиях, чем значения, полученные при лабораторных экспериментах в аквариальной. Так, в ответ на введение вакцины, изготовленной на основе ISA 70, титр антител составил 1:128 через 300 градусо-дней (20 дней при $t = -15$ °C). За этот же период в группе рыб, иммунизированных вакциной на основе ГОА, средний ТАА был на уровне 1:64.

Максимальный титр агглютинирующих антител наблюдали на 50–80 день после введения, что вероятнее всего связано с климатическими условиями рыбоводного сезона 2017 г. «холодное лето». При этом наиболее высокие значения ТАА были в группе рыб, вакцинированных препаратом ISA 70, составили (1:512 – 1:1024). В группах рыб, иммунизированных вакциной на основе ГОА, – 1:512.

Наименьшую активность проявил препарат, введенный иммерсионно: средний титр антител у рыб в этой группе был на уровне 1:32 через 300 градусо-дней, 1:128 - на 50-80 день. Уровень антител сохранялся на протяжении 5-ти месяцев наблюдения.

Заключение

При иммерсионной иммунизации отмечали хорошую переносимость, безвредность и простоту процедуры. Недостаточная эффективность введения бактериона без использования адьюванта (иммерсионно) была показана нами, а ранее многими исследователями, но и применение наиболее распространенных

Таблица 1

Схема вакцинации радужной форели против вибриоза

Тип вакцины	Группа №1 Вакцинация купанием «Vibrio-Vak иммерсия»	Группа №2 Вакцинация инъекцией, «Vibrio-Vak ISA 70»	Группа №3 Вакцинация инъекцией, «Vibrio-Vak ГОА»	Группа №4 – контроль I (для иммерсии, группа №1)	Группа №5 – контроль II (для инъекции, группы №2 и №3)
Размер/вес рыбы (см/г)	5/8	13/30	13/30	5/8	13/30
Количество (шт.)	1 020 496	70 000	80 322	100 000	10 000

из существующих сейчас вариантов, ГОА и ISA 70, имеет достоинства и недостатки.

Существенным недостатком использования вакцины на основе масляного адьюванта была местная воспалительная реакция, приводящая к повышенной смертности рыб в начальный период применения вакцины, а также к образованию соединительной ткани между стенками внутренних органов и брюшной полости (фибрин). В месте инъекции образовался черный пигмент (гемосидерин). К тому же, несмотря на высокую иммуногенность масляной вакцины, высокая вязкость препарата при использовании в условиях низких температур, что характерно для лососеводства, также является недостатком при ручном инъецировании за счет засорения трубок инъектора и капилляров игл.

Применение разработанной вакцины иммерсионно, через купание, не позволило получить значительных титров антител; только значения, достаточные для защиты рыб в течение первого рыбоводного года, в отличие от ГОА и масляных вакцин, по экспериментальным данным, полученным ранее, восприимчивость серопозитивных рыб (с титрами в РА от 1:32 до 1:128) к заражению *Listonella (Vibrio) anguillarum* через воду («естественное заражение») составляет (20-30) %, с титрами в РА 1:128 до 1:1600 – восприимчивость (10-15) %, при этом данная лекарственная форма наиболее удобна для применения в аквакультуре России на сегодняшний день из-за простоты и большой производительности. Для вакцинации можно использовать рыб размером от 5-ти грамм; количество рыб, которое можно обработать за один день, достигает 500 тыс. шт.

Следовательно, для промышленного производства можно рекомендовать компоненты, сочетающие достойный уровень защиты, но не вызывающие побочных эффектов с экономическими последствиями – такие как ГОА.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг., тема (проект) №0578-2014-0016 «Разработать адьювант-вакцину против вибриоза лососевых рыб, позволяющую проводить массовую обработку и про-

филактику рыб» без привлечения дополнительных источников финансирования.

Благодарности. Авторы искренне благодарят компании AQUALIFE SERVICES LTD. (Шотландия) за помощь в проведении инъекционной вакцинации и ООО «Русское море-аквакультура» (Россия, Карелия) за предоставленную для работ молодь лососевых.

Список литературы

1. Анестезия радужной форели / Е.А. Завьялова, А.Е. Дрошнев, М.И. Гулюкин и др. // Сельскохозяйственные животные. 2012. № 4. С. 22–24.
2. Безгачина Т.В. Проблемы здоровья рыб при культивировании их в садках // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2014. № 12. С. 22–26.
3. Висманис К.О. Профилактика и лечение рыб при аквакультуре // Рыбное хозяйство. 1980. № 2. С. 37–39.
4. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Гулюкин М.И. Профилактика вибриоза лососевых рыб при промышленном выращивании // Ветеринария Кубани. 2017. № 2. С. 22–23.
5. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Хлунов О.В. Видовое разнообразие галофильных вибрионов Белого моря и их эпизоотическая значимость // Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел: матер. междунар. науч.-практ. конф. 2011. С. 78–80.
6. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Хлунов О.В. Разработка новых и совершенствование применяемых методов профилактики вибриоза лососевых рыб // Аграрная наука и образование в условиях становления инновационной экономики: матер. междунар. науч.-практ. конф. Оренбург, 2012. С. 341–345.
7. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е. Специфическая профилактика вибриоза лососевых рыб: необходимость и перспективы // Матер. VI междунар. вет. конгр., 2016. С. 356–357.
8. Разработка современного метода защиты здоровья лососевых рыб – вакцины против вибриоза / А.Е. Дрошнев, Е.А. Завьялова, П.Д. Богданова, К.Ю. Булина // Инновации в сельском хозяйстве. 2016. № 5 (20). С. 408–413.
9. Современная вакцинопрофилактика радужной форели против вибриоза / А.Е. Дрошнев, Е.А. Завьялова, М.И. Гулюкин, О.В. Хлунов // Сельскохозяйственные животные. 2012. № 1. С. 31–33.
10. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб в 2 томах. М.: АМБ агро, 1998.
11. Bergman, A.M. Die rote Beulenkrankheit des Hals // Ber. Kgl. Bayer. Biolog. Versuch. Munchen. 1909. P. 10–54.
12. Experience of vaccination of salmonid fishes against vibriosis while industrial breeding in Russia / A. Droshnev, E. Zavyalova, K. Bulina, M. Gulyukin // Norwegian Journal of development of the International Science. 2017. N 4, part 1. P. 93–96.