

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Научный Совет по проблемам гидробиологии и ихтиологии РАН
Институт биологии внутренних вод
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
Отделение ветеринарной медицины
МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ФГУ Межведомственная ихтиологическая комиссия
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Московский государственный университет технологий и управления

ПРОБЛЕМЫ ИММУНОЛОГИИ, ПАТОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ РЫБ

*Расширенные материалы
III Международной конференции*

БОРОК – МОСКВА
2011

Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы III Международной конференции, Борок, 18-22 июля 2011 года / Под редакцией д.б.н., проф. В.Р. Микрякова, д.б.н. проф. А.М. Наумовой, д.б.н., проф. А.Л. Никифоров-Никишина, к.б.н. Л.В. Балабановой, к.б.н. Д.В. Микрякова. М.: Изд-во РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. 346 с.

Рассматриваются вопросы эволюционной, экологической, инфекционной, инвазионной патологии и иммунологии. Дается характеристика последствий антропогенного загрязнения водных экосистем, транспортного, токсического стрессов, условий содержания в аквакультурах на иммунологические, биохимические, генетические механизмы адаптации к паразитам, характер проявления патологических, эпизоотических процессов. Предлагаются новые подходы управления состоянием здоровья гидробионтов и иммунитетом рыб, основанные на использовании специфических и неспецифических иммуномодуляторов, гормональных препаратов и создании благоприятных для роста и развития экологических условий. Приводятся данные о возможности использования морфопатологических, биохимических, иммунологических, паразитологических показателей при оценке здоровья гидробионтов, обитающих в морских и пресноводных экосистемах и условиях аквакультуры.

Тематика представленных сообщений разнообразна и будет интересна биологам, ихтиопатоологам, иммунологам, паразитологам, экологам, токсикологам, рыбоведам, практическим работникам по разведению гидробионтов, специалистам, занимающимся вопросами охраны природы, борьбы с болезнями и преподавателям вузов.

Печатается по решению Оргкомитета
Международной научно-практической конференции.

Ответственные за выпуск: академик РАН *Д.С. Павлов*;
академик РАСХН *А.М. Смирнов*;
д.б.н., проф. *В.Р. Микряков*;
д.б.н. проф. *А.М. Наумова*;
д.б.н., проф. *А.Л. Никифоров-Никишин*;
к.б.н., *О.А. Фомичев*.

За достоверность представленных к публикации материалов ответственность несут авторы.

ISBN 978-5-9675-0545-4

Problems of immunology, pathology and fish health protection. Enlarged materials of III International conference, Borok, 18-22 July 2011. Under the editorship of Doctor of Biological Sciences, Prof. V. R. Mikryakov, Doctor of Biological Sciences, Prof. A.M. Naumova, Doctor of Biological Sciences, Prof. A. L. Nikiforov-Nikishin, Candidate of Biological Sciences L.V. Balabanova, Candidate of Biological Sciences D. V. Mikryakov.

Questions of evolutionary, ecological, infectious, invasion pathology and immunology are considered. Characteristic is given of the effects of anthropogenic pollution of aquatic ecosystems, of transport, toxic stresses, and aquaculture conditions on immunological, biochemical, genetic mechanisms of adaptation, growth rates, development, survival, pathological and epizootic processes. New approaches for the control of hydrobiont health and fish immunity based on specific and non-specific immunomodulators, hormonal preparations and ecological conditions favorable for growth and development are suggested. Data on the use of morphopathological, biochemical, immunological and parasitological indices for assesment of aquatic organisms inhabiting marine and freshwater ecosystems as well as in aquaculture are presented.

The themes of presented works are diverse and will be of interest to biologists, ichthyopathologists, immunologists, parasitologists, ecologists, toxicologists, pisciculturists, aquatic organism breeders, specialists in the field of environmental protection and health control and lecturers at institutes of higher education.

Editorial Board: Academician RAN *D.S. Pavlov*
Academician RAAS *A.M. Smirnov*
Doctor of Biological Sciences, Prof. *V.R. Mikryakov*;
Doctor of Biological Sciences, Prof. *A.M. Naumova*;
Doctor of Biological Sciences, Prof. *A.L. Nikiforov-Nikishin*;
Candidate of Biological Sciences, *O.A. Fomichov*;

Authors of the corresponding materials are responsible for reliability of the data presented in these collected articles.

Книга печатается по решению Ученого совета ИБВВ РАН от 11 мая 2011 г.
Издание осуществлено при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 11-04-00662-г

© Институт биологии внутренних вод РАН, 2011
© Межведомственная ихтиологическая комиссия, 2011
© Московский государственный университет
технологии и управления, 2011

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ У СТЕРЛЯДИ И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА РЫБ НА ИНФЕКЦИЮ

И.Б. Прокаева

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,
г. Покров, Россия, prokaeva-ul@yandex.ru

Промышленному выращиванию осетровых рыб с целью воспроизводства природных запасов и получения товарной продукции уделяется возрастающее внимание во всем мире. Интенсификация осетроводства повлекла за собой появление и распространение болезней этих видов рыб, наибольший ущерб из которых наносят вирусные болезни, в том числе вызываемые герпесвирусами.

Болезнь, вызываемая герпесвирусом осетровых 2 типа (AcHV-2), впервые зарегистрирована у американских белого *Acipenser transmontanus* и тупорылового *Acipenser brevirostrum* осетров (Watson et.al, 1995).

В России схожая болезнь была диагностирована весной 2006 г. у сибирского осетра *Acipenser baeri* и бестера в одном из осетровых хозяйств Тверской области (Щелкунов и др., 2007).

Герпесвирусная болезнь сибирского осетра характеризуется острым течением и массовой гибелью разновозрастной молоди сибирского осетра с признаками некрогеморрагического синдрома. Болезнь поражает промышленные популяции осетра и наиболее тяжело протекает в условиях индустриального разведения (Щелкунов А.И., Щелкунов И.С., 2010).

Одним из наиболее распространенных объектов выращивания в осетроводстве России является стерлядь *Acipenser ruthenus*, поэтому целью настоящей работы было изучение особенностей течения герпесвирусной болезни у этого вида рыб.

Рыба. В эксперименте использовали 2,5-месячную молодь стерляди со средней массой тела 6,3 г, свободную от вирусных инфекций.

Вирус. В работе использовали герпесвирус (штамм SK1/0406, изолированный из покровных тканей больных осетров) (Щелкунов и др., 2007).

Культура клеток. Для выделения и накопления вируса, определения его титра и уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках рыб использовали постоянную линию клеток SSO-2 (Щелкунов, Щелкунова, 2009).

Постановка биопробы. Заражение рыбы герпесвирусом проводили методом ванн с конечной концентрацией вируса 10^4 ТЦД₅₀/см³ воды. Продолжительность заражения составляла 1 час. После заражения рыбу содержали в 250-литровых емкостях с проточной аэрируемой водой при температуре 15 – 17°C при регулярном кормлении форелевыми комбикормами.

От погибших рыб индивидуально отбирали патматериал (слизь с поверхности тела, сифон, грудные плавники, жабры, печень, почки, селезенка, сердце) с целью определения содержания вируса.

При завершении эпизоотии, спустя примерно 3,5 месяца после заражения, температуру воды подняли до 20°C в течение 3 недель. Начиная с 121 суток с момента заражения и далее с интервалом в 2 – 2,5 месяца, отбирали сыворотку крови с целью определения титров вируснейтрализующих антител.

Отбор и обработку патматериала проводили по общепринятой методике (Метод. указ., 1998). Расчет титров вируса и антител проводили по методу Рида и Менча (Reed, Muench, 1938). Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами (Лакин, 1990).

В результате проведенных исследований показано, что течение герпесвирусной болезни у стерляди схоже с течением болезни у сибирского осетра. Инкубационный период болезни у 2,5-месячной молоди стерляди более продолжительный (11 дней), чем у сибирского осетра примерно такого же возраста (6 дней) (Щелкунов и др., 2007).

Заболевание начиналось с постепенного снижения поедаемости корма и появления угнетенных особей. У заболевших рыб появлялись кровоизлияния на вентральной стороне рострума, вокруг ротового отверстия (сифона), в межлучевой ткани грудных плавников, экзофтальм, анемия жабр. У стерляди в отличие от сибирского осетра не наблюдали появления на коже бляшек гиперплазированного эпидермиса.

Гибель рыбы начиналась на 22 сутки после заражения и в итоге достигала 40% (рис.1), тогда как гибель 2-месячной молоди сибирского осетра составляла 100% (Щелкунов и др., 2007).

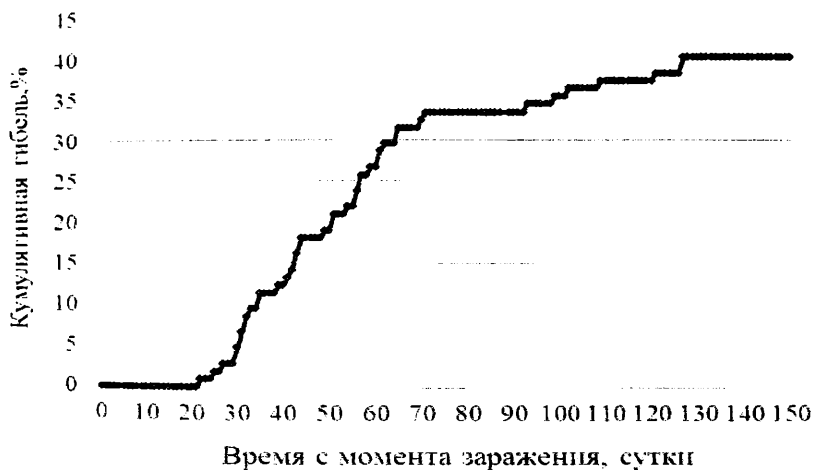


Рисунок 1. Динамика гибели зараженной герпесвирусом молоди стерляди

На стадии максимального подъема эпизоотии у стерляди отмечали общую бледность внутренних органов. Пищеварительный тракт обычно был свободен от пищевых масс, его задний отдел нередко имел признаки геморрагического воспаления. В целом патологоанатомическая картина заболевания у стерляди была аналогична таковой у сибирского осетра, за исключением цвета печени, которая у стерляди имела кремово-белый цвет, в то время как у сибирского осетра была молочно-белой (Щелкунов и др., 2007).

При определении содержания вируса в органах и тканях зараженной стерляди на разных стадиях эпизоотии получены следующие результаты. На стадии максимального подъема эпизоотии (22-35 сутки после заражения) вирус удавалось выделять почти изо всех исследованных органов и тканей погибающих рыб, за исключением селезенки, из которой вирус выделялся не всегда. На стадии угасания эпизоотии (39-65 сутки после заражения) наблюдали стертые признаки болезни с

переходом к ее хроническому течению. В этот период вирус обнаруживали не во всех органах и тканях. Наиболее продолжительное время вирус выявляли в тканях сифона - доля вирус-позитивных рыб через 65 суток после заражения составила 83,3% (табл.1). На постэпизоотической стадии (71-127 сутки после заражения) вирус выделен не был. На стадии максимального подъема эпизоотии содержание вируса во всех органах и тканях было достоверно выше, чем на стадии угасания эпизоотии ($P < 0,05$).

Таблица 1. Содержание герпесвируса сибирского осетра в клиническом материале экспериментально зараженных 2,5-месячных сеголетков стерляди

Показатели	слизь	сифон	грудной плавник	жабры	почка	печень	сердце	селезенка
Стадия максимального подъема эпизоотии (22-35 сутки после заражения)								
диапазон титров вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{г}$ ткани (n=9)	4,9-8,1	5,3-7,9	4,1-7,4	5,1-7,9	5,1-7,4	4,4-5,9	6,4-8,6	3,1-5,9
$\bar{x} \pm s_x$	6,5 \pm 1,2	6,7 \pm 0,8	5,6 \pm 1,2	6,5 \pm 1,3	6,0 \pm 0,7	5,2 \pm 0,7	7,0 \pm 0,8	4,5 \pm 1,1
Доля вирусопозитивных рыб, %	100	100	100	100	100	100	100	87,5
Стадия угасания эпизоотии (39-65 сутки после заражения)								
диапазон титров вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{г}$ ткани (n=12)	3,1-6,1	3,1-7,1	3,1-4,9	3,1-7,1	3,1-5,4	3,1-4,9	3,1-6,9	3,1-4,4
$\bar{x} \pm s_x$	3,9 \pm 1,0	4,6 \pm 1,5	3,3 \pm 0,5	4,5 \pm 1,7	3,7 \pm 1,0	3,5 \pm 0,7	3,9 \pm 1,2	3,2 \pm 0,4
Доля вирусопозитивных рыб, %	50	83,3	25	50	44,4	33,3	33,3	8,3
Постэпизоотическая стадия (71-127 сутки после заражения)								
диапазон титров вируса $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{г}$ ткани (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-
$\bar{x} \pm s_x$	-	-	-	-	-	-	-	-
Доля вирусопозитивных рыб, %	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: $\bar{x} \pm s_x$ - средняя арифметическая \pm среднее квадратическое отклонение; «-» - вирус не выделен (слепые пассажи не делали), порог детектирования $10^{3,1}$ ТЦД₅₀/г.

Как показал проведенный эксперимент, покровно-тканевой тропизм герпесвируса у стерляди был выражен не так явно, как у сибирского осетра,

разница титров вируса в покровных тканях и внутренних органах была не столь заметна. Предпочтительного накопления вируса в печени, как это имело место у сибирского осетра (Щелкунов, 2008), у стерляди не отмечали. В то же время содержание его в сердце стерляди было наиболее высоким.

Известно, что переболевшие особи сибирского осетра могут оставаться вирусносителями. В их крови появляются вируснейтрализующие антитела - у двухгодоваликов нередко в титрах 1:2000 и выше (Щелкунов А.И., Щелкунов И.С., 2010). К сожалению, определить титры антител у сеголетков сибирского осетра не представилось возможным по причине 100%-ной гибели рыб в короткие сроки (Щелкунов и др., 2007). В нашем эксперименте у 2,5-месячной стерляди наиболее высокая доля позитивных сывороток (66,7%) и титры антител (до 1:1076, т.е. $10,07 \log_2$) были зарегистрированы на 121 сутки после заражения (3 недели после выздоровления). Исследование сывороток в более поздние сроки показало снижение доли позитивных сывороток и титров вируснейтрализующих антител (до 1:31,3 т.е. $4,64 \log_2$) (табл. 2, рис.2).

Таблица 2.

Динамика специфического гуморального иммунного ответа 2,5-месячных сеголетков стерляди при экспериментальном заражении герпесвирусом сибирского осетра

Время после заражения, сутки	Количество исследованных сывороток	Доля позитивных сывороток, %	Реципрокные титры антител, \log_2	
			Диапазон	$\bar{x} \pm s_x$
121	30	66,7*	3,81-10,07	$6,63 \pm 1,78^{**}$
175	30	40	3,81-8,82	$4,91 \pm 1,65$
247	60	23,3	3,58-7,87	$5,09 \pm 1,44$
310	62	19,4	3,58-5,83	$4,64 \pm 1,04$

Примечание: порог детектирования $\leq 1:8$; * - достоверно выше доли позитивных сывороток через 175, 247 и 310 суток после заражения ($0,01 < P < 0,05$); ** - достоверно выше средних значений титров антител через 175, 247 и 310 суток после заражения ($P < 0,001$).

Показано, что течение герпесвирусной болезни у молоди стерляди в основных чертах схоже с течением болезни у сибирского осетра. Главными отличиями заболевания у стерляди являются отсутствие бляшек гиперплазированного эпидермиса, менее выраженный покровно-тканевой тропизм вируса, не столь сильное поражение печени и преимущественное накопление вируса в сердце рыб.

При температуре 19-20°C примерно через 1-3 месяца после выздоровления вырабатываются вируснейтрализующие антитела (в титрах до 1:1076) и выявляются на протяжении не менее 7 месяцев после выздоровления. Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках крови сеголетков стерляди позволяет проводить ретроспективную диагностику данной болезни.

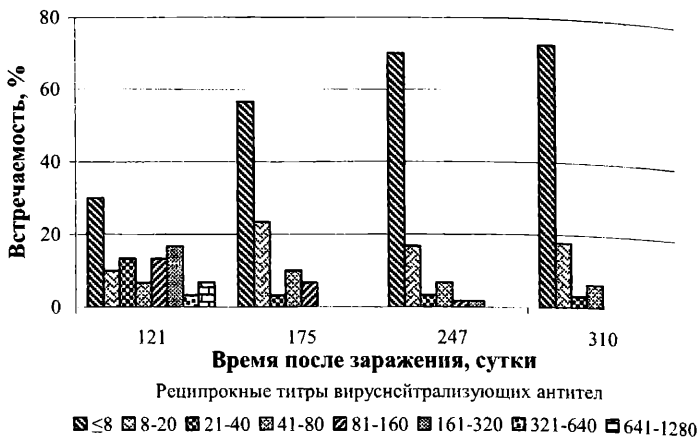


Рисунок 2. Динамика встречаемости титров вируснейтрализующих антител у 2,5-месячных сеголетков стерляди после экспериментального заражения герпесвирусом сибирского осетра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лакин Г.Ф. Биометрия / – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Методические указания по идентификации и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб. Вирусные болезни. Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. - М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. - Ч.1. - С. 60-113.
3. Патент на изобретение РФ № 2348689, зарегистрирован в Гос. реестре изобретений РФ 10 марта 2009 г. Постоянная линия клеток SSO-2 пула паренхиматозных органов сибирского осетра *Acipenser baeri* / Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И.
4. Щелкунов А.И. Покровно-жансовой тропизм герпесвируса сибирского осетра // Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел: материалы междунар. науч.-практ. конф. – М., 9-10 октября 2008. – С. 437-440.
5. Щелкунов А.И., Щелкунов И.С. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра // Ветеринария. – 2010. - № 1. – С. 18-21.
6. Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов А.И., Колбасова Ю.П., Диденко Л.В., Быковский А.Ф. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России // Российский вет. журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2007. - № 1. - С. 10-12.
7. Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty percent endpoints // American J. Hygiene. - 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
8. Watson L.R., Yun S.C., Groff J.M., Hedrick R.P. Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus* // Dis. Aquat. Org. – 1995. – Vol. 22. – P. 199-210.

PECULIARITIES OF HERPESVIRAL DISEASE IN STERLET *ACIPENSER RUTHENUS* AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF FISH TO INFECTION

I.B. Prokaeva

Under experimental conditions, it was shown that in sterlet fingerlings the course of disease caused by isolate SK1/0406 belonging to the AcHV-2 type virus, was similar to that in Siberian sturgeon. The principal differences of clinical picture in diseased sterlet compared with Siberian sturgeon were the absence of epidermal hyperplasia plaques, less prominent integumentary tropism of the virus, milder pathology of the liver and high virus titres in the heart. High titres of virus neutralizing antibodies (up to 1 : 1076) were found in sera of sterlet, which recovered from disease. This makes possible retrospective diagnosis of the disease.