

УДК 639.3.09

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ЙОДИНОЛА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ У РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

Светлана Леонидовна Рудакова¹, Юлия Петровна Щелкунова², Юлия Александровна Новоселова², Светлана Александровна Рекордатова², Ирина Юрьевна Кропочева²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), Москва, Россия, rudakova@vniro.ru

²Филиал по пресноводному рыбному хозяйству Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ВНИИПРХ), Московская область, пос. Рыбное, Россия, kondina.yu@mail.ru, node-n@rambler.ru

Аннотация. Экспериментальным путем показали отсутствие негативного влияния йодиола с концентрацией активного йода 100 мг/л на развитие эмбрионов радужной форели и его эффективность при дезинфекции икры, экспериментально зараженной IHNV.

Ключевые слова: йодиол, дезинфекция икры лососей, вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани, аквакультура

Благодарности: авторы выражают благодарность руководству Камчатского филиала и Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ВНИРО за оказанную поддержку и возможность проведения совместных экспериментальных работ.

PRELIMINARY RESULTS OF THE IODINOL USE FOR PREVENTION OF INFECTIOUS HEMATOPOETIC NECROSIS IN RAINBOW TROUT (EXPERIMENTAL DATA)

Svetlana L. Rudakova¹, Ulia P. Schelkunova², Ulia A. Novoselova², Svetlana A. Recordatova², Irina U. Kropocheva²

¹Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow, Russia, rudakova@vniro.ru

²Branch for the freshwater fisheries of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography ("VNIIPRKH"), Moscow Region, village Rybnoe, Russia, kondina.yu@mail.ru, node-n@rambler.ru

Abstract. It was experimentally shown that iodinol with an active iodine concentration of 100 mg/l has no negative effect on the rainbow trout embryos, while it was effective in disinfecting eggs experimentally infected with IHNV.

Keywords: iodinol, salmon eggs disinfection, infectious hematopoietic necrosis virus, aquaculture

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the heads of the Kamchatka Branch and the Freshwater Fisheries Branch of VNIRO for their support and the opportunity to conduct joint experimental work.

Вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани относится к сем. *Rhabdoviridae*, род *Novirhabdovirus*, является возбудителем инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) — заболевания, включенного в российский Перечень заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, а также в Перечень болезней Международного эпизоотического бюро, которые необходимо контролировать на государственном уровне (Приказ Минсельхоза России., 2011; Aquatic Animal code., 2020).

В Северной Америке IHNV эндемичен по всему тихоокеанскому северо-западу, где он встречается у большинства видов тихоокеанских лососей и форели (Wolf, 1988; Dixon et al., 2016). В Азию и Европу в 1960-е и 1980-е годы, соответственно, он был завезен при перевозках зараженной икры и молоди из Северной Америки (Sano et al., 1977; Vovo et al., 1987).

С 2000 г. IHNV выявляют в садковых и бассейновых хозяйствах России у радужной форели, где погибает молодь (Shchelkunov et al., 2001). Вирус выделяли

у половозрелой нерки (*Oncorhynchus nerka*), используемой для воспроизводства на лососевых рыболовных заводах (ЛРЗ) Камчатки, где зафиксировали три эпизоотии ИHN (Рудакова, 2004, 2009; Рудакова и др., 2017). Доказана горизонтальная передача патогена через воду и от производителей потомству (Mulcahy, Pascho, 1984, 1985). В связи с этим, для снижения вероятности передачи патогена, контаминирующей поверхность икринок, овариальную и семенную жидкости, в мировой практике с 70-х годов XX в. на рыболовных заводах для дезинфекции икры начали применять йодофор. По литературным данным, ванны в течение 10–60 мин с концентрацией активного йода 50–100 мг/л являются стандартной процедурой, применяемой сразу после оплодотворения икры и на стадии глазка. Большое количество зарубежных экспериментальных работ показало эффективность обработок икры после оплодотворения в йодофорах (Amend, 1974; Piper et al., 1986; Wood, 1979; McDaniel, 1994; Atemnkeng et al., 2006). В России для дезинфекции икры лососей рекомендуется использовать другой препарат — йодинол (Сборник инструкций..., 1998). В доступной литературе экспериментальных работ по эффективности йодинола при дезинфекции икры лососей для профилактики инфекционного некроза гемопозитической ткани мы не нашли.

В настоящее время в России большое внимание уделяют развитию аквакультуры, предпочтения от государства стимулируют появление частных предприятий разных форм, в том числе использующих интенсивные технологии. Повышение плотностей посадки рыб и температур выращивания является одним из существенных факторов риска для развития вирусных болезней, лечение которых на настоящий момент не разработано. Поэтому главным направлением борьбы с вирусными инфекциями являются профилактика и контроль, основанные на действенных мерах дезинфекции.

Цель работы: экспериментальным путем показать безопасность обработки йодинолом икры радужной форели в процессе оплодотворения и инкубации, а также ее эффективность при заражении икры ИHNV.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работы проводили в Филиале по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» (ВНИИПРХ). Пер-

вый эксперимент по определению безопасности йодинола при развитии эмбрионов форели проводили в рыболовном цехе инкубации и выращивания рыб в период нерестовой кампании. Второй эксперимент по определению эффективности йодинола против вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани — в вирусологическом отделе лаборатории болезней рыб ВНИИПРХ.

При дезинфекции икры за основу брали методики из Сборника инструкций (1998) и Руководства для аквакультуры Аляски (McDaniel, 1994). При обработке икры йодинолом был использован «модифицированный метод» (Рудакова и др., 2020). Суть модификации заключается в применении препарата в момент оплодотворения икры, в отличие от традиционно — после набухания.

Для дезинфекции икры радужной форели в рыболовном цехе и в лаборатории применяли коммерческий йодинол с концентрацией активного йода 1 г/л. Для приготовления рабочего раствора препарат разводили в 10 частях воды (конечная концентрация 100 мг/л активного йода). При обработке икры йодинолом показатель pH поддерживали на уровне 6,5–7,5.

В первом эксперименте использовали икру радужной форели, полученную от трех самок, и сперму от пяти самцов. Перед оплодотворением половые продукты были объединены и затем весовым методом разделены на две равные партии: опытную и контрольную. Количество икринок в каждой партии было по 5000 шт.

При выполнении эксперимента икру смешивали с молоками и добавляли рабочий раствор йодинола в экспериментальную партию, вместо воды, перемешивали и оставляли для оплодотворения на 2 мин. После этого икру трижды промывали водой до полного удаления органики и помещали в контейнеры со свежим раствором йодинола (той же концентрации), для набухания. Через 30 мин йодинол сливали, икру промывали и оставляли в проточной воде для дальнейшего набухания. Оплодотворение контрольной партии икры и закладка ее на инкубацию проходили аналогично, но вместо йодинола использовали воду (табл. 1). Инкубацию икры проводили в инкубационных аппаратах горизонтального (лоткового) типа с замкнутым водоснабжением при температуре воды 14–15 °С.

Таблица 1. Условия проведения первого эксперимента — по определению влияния йодинола на развитие эмбрионов радужной форели

Партия икры	При оплодотворении	При набухании
Контрольная (партия 1)	Без дезинфекции, активация после смешивания икры и спермы в воде	В воде
Экспериментальная (партия 2)	Активация после смешивания икры и спермы в рабочем растворе йодинола	В рабочем растворе йодинола

Во время инкубации партии отделили перегородками и инкубировали отдельно, проводили подсчет отхода на каждом этапе. Наблюдение за развивающимися эмбрионами проводили в течение 14 суток.

Для второго эксперимента было отобрано 450 шт. неоплодотворенных икринок радужной форели. Икру поделили на три равные части по 150 икринок в каждой. Икру опытной партии и положительного контроля заразили вирусом IHNV (штамм FR2/00-12, коллекция ВНИИПРХ). Заражение проводили методом ванн, добавляли к икре вирусосодержащую суспензию до концентрации 10^5 ТЦД₅₀/мл и инкубировали 60 мин при температуре 10 °С при постоянном перемешивании. Затем в опытную партию добавили раствор йодиола, а в партии положительного и отрицательного контроля деионизованную воду, и выдерживали 30 мин при 10 °С. Далее икру всех трех партий дважды промыли деионизованной водой и добавили ресуспендированные в среде Игла МЕМ-10 перевиваемые клетки ЕРС. Пробы инкубировали 60 мин при 10 °С на качалке (50 качаний в минуту). Затем суспензию клеток отобрали из флаконов с

икрой и посеяли в культуральные флаконы объемом 25 см³, по два флакона на каждую группу. Инкубацию клеток вели при 15 °С в течение 14 дней, ежедневно исследуя под микроскопом. Схема эксперимента приведена в таблице 2.

Культивирование и заражение перевиваемых клеток, идентификацию в реакции нейтрализации и титрование вируса проводили в соответствии с общепринятой методикой (Сборник инструкций..., 1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первом эксперименте оплодотворение и развитие икры радужной форели происходило в стандартном режиме, без каких-либо отклонений (табл. 3).

На рисунке 1 приведена динамика отхода икры форели в течение первого эксперимента.

На графике видно, что динамика отхода инкубируемой икры партии 1 и партии 2 отличалась незначительно. В критических точках — на этапах обводнения (1-е сут), стадии эпителиальной бластулы (4-е сут) и стадии образования зародышевого валика (11-е сут) — различия в количественных значениях

Таблица 2. Условия проведения второго эксперимента — по определению эффективности йодиола против вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV)
Table 2. Conditions for the second experiment – to determine the effectiveness of iodinol against infectious hematopoietic tissue necrosis virus (IHNV)

Экспериментальные партии	Заражение IHNV	Обработка	Промывка	Перевиваемые линии клеток для инокуляции
Положительный контроль	+	вода	вода	ЕРС
Отрицательный контроль	–	вода	вода	ЕРС
Опытная	+	йодиол	вода	ЕРС

Таблица 3. Параметры инкубации икры форели в ходе эксперимента профилактической обработки йодиолом
Table 3. Parameters of incubation of trout eggs during the experiment of prophylactic treatment with iodinol

Показатели	Партия 2 (эксперимент)	Партия 1 (контроль)
Заложено икры на инкубацию, шт.,	5000	5000
Отход за 14 сут. инкубации, %	9,6	10,2
Температура воды при инкубации, °С	14,2	14,2
Содержание растворенного кислорода в воде, мг/л	7–10	7–10

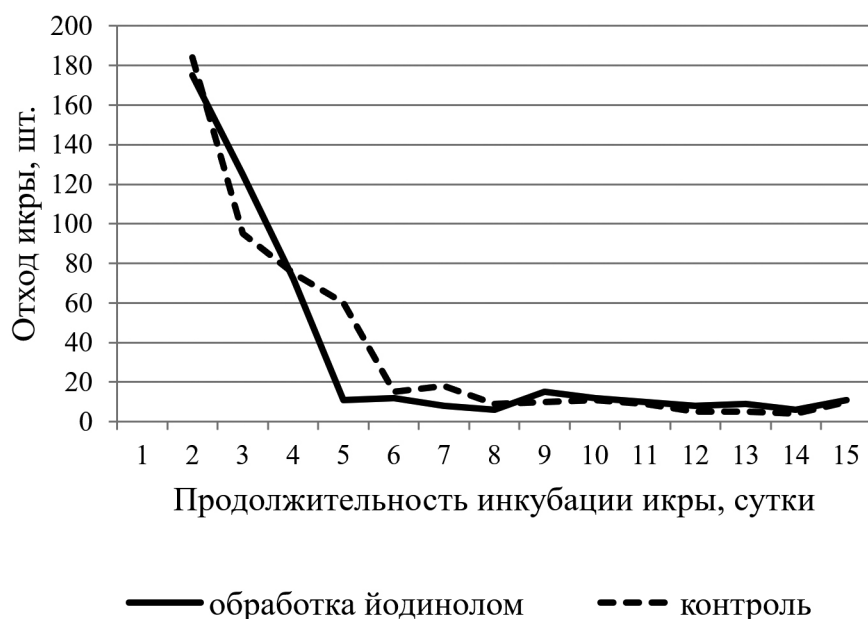


Рис. 1. Динамика отхода икры форели в период инкубации
Fig. 1. Dynamics of rainbow trout egg losses during incubation

отхода были незначительными. При этом следует отметить, что отход икринок в партии 2 на стадии бластулы был ниже. Отклонений в развитии личинок в партиях также не отмечали.

Результаты эксперимента по определению воздействия йодиола на вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) представлены в таблице 4.

Таким образом, обработка йодиолом оказалась эффективной при дезинфекции икры форели, зараженной IHNV.

Результаты, полученные ранее при дезинфекции икры нерки на камчатских ЛРЗ (Рудакова и др., 2020), и проведенного эксперимента на икре радужной форели, показали, что действие йодиола на биологические мембраны икры и сперматозоиды не вызывает выраженного токсического эффекта и не вызывает их гибели, в отличие от йодофоров. Это обусловлено тем, что йодиол представляет собой йодо-крахмальный комплекс, и именно крахмал снижает токсичное воздействие. Йодиол с концентрацией молекулярного йода 1:1000 является не токсичным, не антигенным и не вызывает пирогенных реакций при введении животным, может применяться орально и парентерально (Мохнач, 1968, 1974). Исследования показали, что при нанесении на слизистые оболочки йодиол медленно расщепляет молекулярный йод и является сильным антисептическим и противовоспалительным веществом, а после разложения улучшает обмен веществ (Мохнач, 1968).

На предприятиях аквакультуры в США и других странах икру лососей дезинфицируют с помощью темно-коричневого раствора йодофора — комплекса йода с поливинилпирролидоном (McDaniel, 1994). Йодистый комплекс повидона дополнительно стабилизируется йодидами или йодатами, содержащими 1% активного йода и этиловый спирт. Поливинилпирролидон обеспечивает постепенное выделение йода, удлиняя его взаимодействие с тканями организма и уменьшая его раздражающее действие (Zawada et al., 2014). В йодофоре веществом-носителем йода является пирролидон, который обладает токсическими свойствами для эмбрионов и способен разрушать органические соединения, в частности биологические мембраны. Именно поэтому в инструкциях по дезинфекции икры лососей йодофором всегда предупреж-

дают, что обеззараживание надо проводить после оплодотворения, не допускать попадания раствора на неоплодотворенную икру (Manual of diagnostic tests..., 2019; Aquatic animal..., 2020). Следовательно, основным и очень важным отличием растворов, используемых для дезинфекции икры в России и мировой практике, является степень токсичности этих препаратов. Конечная же концентрация активного йода перед использованием его для дезинфекции икры в йодиоле и йодофоре одинаковая: 100 мг/л и pH ≈ 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предварительные результаты экспериментальных исследований по обработке икры форели йодиолом в момент оплодотворения показали отсутствие негативного влияния на развитие эмбрионов и эффективность этого дезинфектанта против вируса IHNV.

Полученные результаты являются предварительными, и для оценки пролонгированного воздействия препарата на молодь форели необходимы дополнительные исследования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Мохнач В.О. 1968. Теоретические основы биологического действия галоидных соединений. Л.: Наука. 279 с.
- Мохнач В.О. 1974. Йод и проблемы жизни. Л.: Наука. 254 с.
- Приказ Минсельхоза России от 19.12.2011 № 476 (ред. от 25.09.2020) «Об утверждении перечня заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)» [Электронный ресурс. КонсультантПлюс http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_126146/] (дата обращения 02.09.2022).
- Рудакова С.Л. 2004. Анализ развития эпизоотий, вызванной вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) у мальков нерки *Oncorhynchus nerka* при искусственном выращивании (Камчатка) // Вопр. рыболовства. Т. 5, № 2 (18). С. 362–374.
- Рудакова С.Л. 2009. Профилактика и контроль инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) на лососевых рыбозаводах // Ветеринарная практика. № 1 (44). С. 30–37.
- Рудакова С.Л., Бочкова Е.В., Акбатыров А.Н. 2017. Эпизоотия инфекционного некроза гемопоэтической ткани у молоди нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) на ЛРЗ «Озерки» (Камчатка) в 2017 г. / Сб. матер. Всерос. науч. конф. с междунар. участием, посвящ. 85-летию КамчатНИРО (3–6 октября 2017 г., Петропавловск-Камчатский). Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО. С. 329–334.
- Рудакова С.Л., Бочкова Е.В., Волкова Т.В., Сахаровская Л.В. 2020. Модификация метода профилактической обработки икры нерки йодиолом от IHNV на ЛРЗ Камчатки // Тр. ВНИРО. Т. 182. С. 141–151.
- Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. 1998. Ч. 1. М.: Отдел маркетинга АМБагро. 310 с.

Таблица 4. Результаты эксперимента по определению эффективности йодиола против IHNV
Table 4. Results of the experiment to determine effectiveness of iodinol against IHNV

Экспериментальные партии	Температура инкубации, °С	Продолжительность инкубации, дней	IHNV	Титр вируса, ТЦД ₅₀ /мл
Положительный контроль	15	14	есть	8,35
Отрицательный контроль	15	14	нет	–
Партия 1	15	14	нет	–
Партия 2	15	14	есть	5,1

- Amend D.F.* 1974. Comparative toxicity of two iodophors to rainbow trout eggs // Transaction of the American Fisheries Society. 103 (1). P. 73–78. Aquatic Animal code. Accessible via: https://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_disinfection_eggs.htm. 03.06.2020.
- Atemnkeng M.A., Plaizer-Vercammen J., Schuermans A.* 2006. Comparison of free and bound iodine species as a function of three commercial povidone-iodine formulations and their microbiocidal activity // Int. J. Pharm. 317. P. 161–166.
- Bovo G., Giorgetti G., Jorgensen P.E.V., Nelson N.J.* 1987. Infectious hematopoietic necrosis: first detection in Italy // Bull Eur Assoc Fish Pathol. 7. P. 124.
- Dixon P., Paley R., Alegria-Moran R., Oidtmann B.* 2016. Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV): a review // Vet. Res. 47. P. 1–63.
- Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 2019. The World Organisation for Animal Health (OIE). Eighth ed. OIE, Paris. 483 p.
- McDaniel T.R.* 1994. Alaska sockeye salmon culture manual / T.R. McDaniel, K.M. Pratt, T.R. Meyers, T.D. Ellison, J.E. Follett, J.A. Burke / Special fisheries report number Alaska Department of Fish and Game. Div. Commer. Fish., Manag. Develop. Alaska. 40 p.
- Mulcahy D., Pascho R.J.* 1984. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish viruses // Science. 225. P. 333–335.
- Mulcahy D., Pascho R.J.* 1985. Vertical transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) – isolation of virus from dead eggs and fry // Fish Diseases. 8. P. 393–396.
- Piper R.G., McElwain I.B., Orme L.E., McCraren J.P., Fowler L.G., Leonard J.R.* 1986. Fish hatchery management, Washington D.C. US Fish and Wildlife Service. 45 p.
- Sano T., Nishimura T., Okamoto N., Yamazaki T., Hanada H., Watanabe Y.* 1977. Studies on viral diseases of Japanese fish – VI. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the mainland of Japan // J. Tokyo Univ. Fisheries. 63. P. 81–85.
- Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I., Kupinskaya O.A., Didenko L.V., Bykovsky A.F., Olesen N.J.* 2001. Infectious hematopoietic necrosis (IHN): the first confirmed finding in Russia // 10th Intern. Conf. EAAP. Diseases of fish and shellfish. Book of abstracts. Dublin. P. 44.
- Wolf K.* 1988. Fish viruses and fish viral diseases / U.S. Fish and wildlife service. Ithaca, Londo, 478 p.
- Wood J.W.* 1979. Diseases of Pacific salmon, their prevention and treatment. State of Washington, Department of Fisheries, Hatchery Division. 39 p.
- Zawada A., Polechonski R., Bronowska A.* 2014. Iodine disinfection of sea trout, *Salmo trutta* (L.), eggs and the effect on egg surfaces // Arch. Pol. Fish. 22. P. 121–126.