

На правах рукописи



Рудакова Светлана Леонидовна

**СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЛОСОСЕЙ НА КАМЧАТКЕ И
ВОЗДЕЙСТВИЕ НА НИХ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА
ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ**

03.00.16. - экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2004

Работа выполнена в лаборатории болезней рыб и беспозвоночных Камчатского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО)

Научный руководитель: доктор биологических наук, ст.н.с.
Карпенко Владимир Илларионович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Лукин Анатолий Александрович

кандидат биологических наук
Ивантер Дмитрий Эрнестович

Ведущая организация: Северное отделение ПИНРО
(г. Архангельск)

Защита диссертации состоится «08» декабря 2004 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.190.01 при Петрозаводском государственном университете, по адресу: 185640, РК, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, Петрозаводский государственный университет, эколого-биологический факультет, ауд. № 326

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Петрозаводского государственного университета

Автореферат разослан « 08 » ноября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Узенбаев С.Д.

2007-4
18993

2544577

3

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время исследования в области экологии, связанные с изучением здоровья популяций гидробионтов, являются одним из наиболее перспективных направлений мирового рыбного хозяйства.

Одной из сложных экологических задач общей вирусологии является оценка влияния вирусов на гомеостаз экосистем в целом. Под гомеостазом мы понимаем, способность биологических систем противостоять изменениям и сохранять динамическое постоянство состава и свойств, а также поддерживать устойчивость экосистем вследствие сохранения постоянства видового состава и численности особей в биоценозах (Patten, 1961; Федоров, Соколова, 1972).

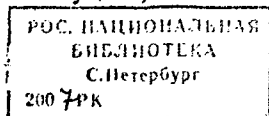
Вместе с тем, учитывая мощное влияние паразитических организмов (в частности вирусов) на структуру и численность популяций партнеров по паразитарным цепям, можно предположить их серьезное воздействие на состояние экосистемы в целом. Это влияние совсем не обязательно отрицательное, но оно может становиться таковым при мощном воздействии дестабилизирующих факторов, связанных с нерациональными действиями человека в условиях осуществляемой им хозяйственной деятельности (например, в аквакультуре, при акклиматизации и т.п.) (Безр, 2002).

Учитывая все вышеизложенное, мониторинговые исследования, направленные на изучение распространения вирусов в популяциях рыб, являются весьма актуальными для оценки состояния и прогноза изменения экосистемных трансформаций.

В последнее время большое внимание уделяется филогенетическому анализу различных изолятов вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани (IHNV) (Arakawa et al., 1990; Nichol et al., 1995; Emmenegger et al., 2000; Emmenegger, Kurath, 2002; Kurath et al., 2003 и др.). Всестороннее изучение этого вопроса позволит определить, где находится резервуар инфекции, как происходит распространение и эволюция IHNV.

У рыб обнаружено более 250 вирусов, из которых основная часть — в странах с высокоразвитой аквакультурой (США, Франция, Германия, Великобритания, Италия, Норвегия, Япония и др.). Наиболее опасными и экономически значимыми вирусными болезнями лососевых рыб являются: инфекционный некроз гемопозитической ткани (IHNV); инфекционный некроз поджелудочной железы (IPN) и вирусная геморрагическая септицемия (VHS).

В силу сравнительно невысокого уровня развития аквакультуры и продолжительного экономического кризиса вирусологическое обследование рыб в России не развито. По этой причине эпизоотическая обстановка в отношении вирусных инфекций в нашей стране выглядит относительно благополучно. Однако это благополучие кажущееся, и мы можем



наблюдать ухудшение ситуации на примере водоемов и лососевых рыбоводных хозяйств Камчатки.

В исследуемом регионе тихоокеанские лососи являются ценным объектом промысла. Чтобы восполнить их запасы и увеличить вылов, на полуострове стали развивать искусственное воспроизводство. В настоящее время здесь функционируют пять лососевых рыбоводных заводов (ЛРЗ), из которых два занимаются воспроизводством нерки (бассейн реки Большой). Успешная деятельность этих предприятий была осложнена вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани, который впервые был выделен на Камчатке в 2001 г. от производителей нерки, вернувшихся на нерест в водотоки, на которых расположены Малкинский ЛРЗ и ЛРЗ Озерки (Рудакова, 2003). Позднее на первом заводе у молоди нерки произошла вспышка заболевания, вызванная IHNV (Рудакова, 2004). Поэтому накопление новых данных о вирусных патогенах всегда представляет большой научный и практический интерес.

Работа посвящена изучению вируса некроза гемопоэтической ткани, его распространению и влиянию на естественные популяции лососей в водоемах Камчатки, течению эпизоотий на лососевых рыбоводных заводах и генетическому типированию камчатских изолятов этого агента. Кроме того, в работе представлены мероприятия, направленные на недопущение проникновения IHNV на ЛРЗ. До этого на Камчатке подобных исследований не проводили.

Цель работы – дать оценку состоянию здоровья популяций лососей Камчатки в отношении особо опасных вирусных инфекций, выявить особенности камчатских изолятов вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани и определить его воздействие на организм рыб в естественных и заводских условиях.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Провести анализ современного научного представления о IHNV;
2. Выявить распространение IHNV в популяциях половозрелых лососей на нерестилищах;
3. Определить возможность обнаружения эпизоотии инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) у молоди в естественных водоемах;
4. Изучить течение эпизоотии IHNV на лососевом рыбоводном заводе;
5. Изучить патогенез IHNV и оценить его влияние на организм рыб;
6. Провести генетическое типирование камчатских изолятов и определить степень их отличия от американских изолятов IHNV;
7. Разработать рекомендации, направленные на предотвращение проникновения IHNV на Камчатские ЛРЗ.

Научная новизна. Впервые для России представлены данные по распространению IHNV в естественных популяциях половозрелых тихоокеанских лососей в некоторых водоемах Камчатки, дана оценка их зараженности, возможности возникновения заболевания и выделения вируса от молоди. Проведен анализ развития и причин эпизоотии IHNV у мальков нерки на одном из ЛРЗ Камчатки. Описан патогенез заболевания при искусственном и естественном заражении молоди. Совместно с американскими учеными проведено филогенетическое типирование камчатских изолятов вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани и сравнение их с изолятами, выделенными во всех известных местах его распространения. Представлены дополнения к действующим инструкциям по профилактике и контролю IHNV при искусственном разведении молоди.

Практическая значимость. Результаты настоящих исследований позволяют дать оценку распространению IHNV в бассейне р. Большой и степени его воздействия на состояние гомеостаза биоценозов. В условиях все возрастающего интереса государственных и частных предприятий к искусственному воспроизводству лососей, оценка эпизоотической обстановки в естественных водоемах позволяет разработать рекомендации по выбору источника водоснабжения, заранее предпринять меры по предотвращению попадания опасных вирусных патогенов на рыбоводные заводы и, следовательно, избежать экономических потерь.

Полученная информация о носительстве вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани, вызывающего одно из наиболее опасных заболеваний лососевых рыб, поможет не допустить его распространения в другие водоемы России и зарубежья при перевозке икры и живой рыбы для искусственного воспроизводства или акклиматизации.

Представленные меры профилактики и контроля IHNV позволят ограничить проникновение этого патогена на рыбоводные заводы, и сократить связанные с эпизоотиями экономические потери.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, библиографического списка использованной литературы и содержит 11 таблиц, 18 рисунков. Библиографический список использованной литературы включает 199 источников, в том числе иностранных 151.

Общий объем работы 161 страниц.

Благодарности. Автор благодарит за помощь при выполнении работы сотрудников КамчатНИРО – Сазонова А.А. Карманову И.В., Карпенко В.И., Бочкову Е.В., Кольцову Н.Н., а также всех коллег, принимавших участие в сборах и первичной обработке биологических материалов во время экспедиционных работ; директора, Сахаровскую Л.В., и работников Малкинского лососевого рыбоводного завода за помощь в описании клинических признаков патологии и предоставленную информацию о квартальном и суммарном отходе мальков

нерки во время вспышки ИHN. Выражаю благодарность и признательность Щелкунову И.С. (ВНИИПРХ, п. Рыбное, Московской области), Орешковой С.Ф. и Рябчиковой Е.И. (ВГЦиБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область). Отдельно хотелось бы поблагодарить Гэл Кюрат (Западный научно-исследовательский центра по изучению рыб г. Сизтл, США), помогавшей в освоении метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и генетического типирования изолятов ИHNV.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на Российско-американской конференции «Здоровье морских и водных животных» (Shepherdstown, 2003), а также представлены на IV Региональной конференции по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии (Владивосток, 2001), Всероссийской конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок, 2003), Международной научно-практической конференции «Стратегия развития аквакультуры в условиях XXI века» (Минск, 2004), отчетной сессии ТИПРО (Петропавловск-Камчатский, 2004), и в виде годовых научных отчетов КамчатНИРО в 1996-2003 гг. По теме диссертации опубликовано 6 работ и 4 находятся в печати.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Физико-географическая характеристика района исследования и история изучения вопроса

В данной главе дана характеристика расположения, рельефа и климата Камчатского полуострова, перечислены основные ландшафтно-географические зоны и представлен гидролого-гидрохимический режим. Более подробно дано описание гидрографической сети территории и бассейна р. Большой, в которой был выделен вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани.

Представлена общая история изучения вирусных болезней рыб и дана краткая характеристика инфекций наиболее опасных для лососей. Учитывая целенаправленность наших исследований, большое внимание было уделено географическому распространению и основным направлениям изучения вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани.

Глава 2. Материал и методика

Экспедиционные работы проводили в период с 1996 по 2003 гг. на реках Авача, Паратунка, в бассейне р. Большой (рр. Ключевка, Плотникова, Быстрая, оз. Начикинское) и 5 ЛРЗ Камчатки (табл.1, 2). Всего было обследовано 7222 экз. рыб (молодь и половозрелые лососи).

Таблица 1

Количество заводской молоди лососей, обследованных вирусологическими методами в 1996-2003 гг.

Место вылова	Вид рыбы	Количество обследованных рыб по годам, экз.							
		1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Паратунский ЛРЗ	кета	60	60	60	120	120	120	60	60
	кижуч	-	-	-	-	-	120	60	-
Малкинский ЛРЗ	чавыча	60	15	60	120	120	120	60	60
	нерка	60	60	60	120	150	90	170	230
ЛРЗ	кета	60	60	120	120	120	90	90	90
	нерка	-	-	-	60	-	-	-	-
Кеткино ЛРЗ	кета	60	60	60	60	120	-	60	90
Озерки	нерка	60	60	60	60	60	-	135	120
Вилойский ЛРЗ	кета	60	-	-	60	60	90	60	90
	кижуч	-	-	-	-	-	30	60	90
Итого:		420	315	420	720	750	660	755	830
Всего: 4870									

Таблица 2

Количество молоди и половозрелых лососей из естественных водоемов, обследованных вирусологическими методами в 2000-2003 гг.

Место вылова	Вид рыбы	Количество обследованных рыб по годам, экз.			
		2000	2001	2002	2003
Дикая молодь					
Р. Авача	кета	-	30	60	60
	кижуч	12	59	30	-
	нерка	-	-	60	-
Р. Паратунка	кижуч	-	19	-	30
	кета	-	80	-	90
	нерка	-	-	60	30
Р. Ключевка	нерка	-	30	30	135
	кижуч	-	18	30	50
	мальма	-	30	30	5
устье р. Большой	нерка	-	-	-	45
	кижуч	-	-	-	42
	кета	-	-	-	60
	горбуша	-	-	-	60
оз. Начикинское	нерка	-	-	-	40
Итого:		12	266	300	647
Всего: 1225					
Половозрелые рыбы					
р. Авача	кижуч	15	-	30	8
	горбуша	-	25	-	-
	нерка	10	-	17	-
	кета	15	15	30	-

Продолжение таблицы 2

Место вылова	Вид рыбы	Количество обследованных рыб по годам, экз.			
		2000	2001	2002	2003
Р. Паратунка (производители для ПЭЛРЗ)	кижуч	15	-	13	-
	кета	15	20	20	30
Р. Паратунка	кета	-	-	-	30
	кижуч	20	-	-	-
Бас. р. Большая Р. Ключевка (производители для МЛРЗ)	нерка	-	30	185	65
	чавыча	27	20	30	30
Р. Плотникова (производители для ОЛРЗ)	кета	20	30	30	30
	нерка	15	30	30	30
Бас. р. Большая: р. Ганальский Вахтанг ручей Домашний озеро Начинское	нерка	-	-	19	-
	нерка	-	-	13	30
	нерка	-	-	-	30
Озеро Большой Виллой	кижуч	-	15	7	8
Итого:		167	185	454	321
Всего: 1127					

2.1. Вирусологические исследования на перевиваемых линиях клеток. Мальков лососей отбирали методом случайных выборок и привозили в лабораторию живыми. У половозрелых особей органы (почка, селезенка, головной мозг) и овариальную жидкость отбирали непосредственно на месте вылова. Собранный материал объединяли в пулы по 5 рыб (или их внутренние органы) и обрабатывали в лаборатории.

Для выделения вирусных агентов использовали линии клеток CHSE-214, СНН-1, RTG-2 и ЕРС, чувствительные к наиболее опасным вирусам (Yoshimizu et al., 1987). Культивирование линий клеток проводили по общепринятой методике (Amos, 1985). Заражение клеточных культур осуществляли по модифицированной методике, разработанной в вирусологической лаборатории ВНИИПРХ. Для расчета титра и идентификации вирусов использовали традиционные вирусологические методы – реакцию титрования и реакцию нейтрализации (Сборник инструкций..., 1998).

2.2. Исследования образцов крови. Кровь молоди нерки отбирали на Малкинском лососевом рыболовном заводе (МЛРЗ) в период эпизоотии ИHN, кеты – при постановке биопробы. Для сравнения использовали результаты анализов крови (1997-2003 гг.) заводской молоди (нерки и кеты) незараженной ИHNV. Кровь брали из хвостовой артерии. Мазки фиксировали в метаноле и окрашивали в растворе Гимза или Май-Грюнвальда-Гимза (Иванова, 1982; Amos, 1985). Количество незрелых эритроцитов и лейкоцитарную формулу крови определяли по общепринятым методикам (Лабораторный практикум..., 1983).

2.3. Электронно-микроскопические исследования. Материалом для настоящего исследования служили клеточные культуры с признаками цитопатического эффекта (ЦПЭ), инокулированные материалом от производителей нерки, используемых для заводского воспроизводства на МЛРЗ и ОЛРЗ в 2001-2003 гг., и от молоди нерки из МЛРЗ (цех № 1) в период эпизоотии 2002 г. Подготовку образцов проводили по общепринятой методике (Уикли, 1975; Glauret, 1991). Ультратонкие срезы просматривали под трансмиссионным электронным микроскопом НТАСН1-7000.

2.4. Определение генетического различия и построение филогенетического дерева для изолятов ИHNV. Для определения генетического различия американских и российских изолятов ИHNV использовали методы полимеразной цепной реакции (Aragawa et al., 1990) и секвенирования. В лаборатории молекулярной биологии Западного научно-исследовательского центра по изучению рыб г. Сиэтл, США, этот метод был адаптирован для выявления средней области гликопротеина (mid-G) генома вируса, состоящей из 303 нуклеотидов (от 686 до 988). Работу проводили на базе данного центра при сотрудничестве с доктором Гэл Кюрат (Gael Kurath).

Файлы последовательностей были смонтированы при помощи программного обеспечения Sequencher 4.1. (Корпорация генетических кодов) и проанализированы при помощи компьютерных программы MacVector 6.0 и AssemblyLIGN 1.0.9.

Сравнение генетических различий российских и американских изолятов было сделано на основании работы, ранее проведенной доктором Г. Кюрат с сотрудниками (Kurath et al., 2003). При этом вирусные изоляты с идентичными последовательностями были объединены в группы, обозначенные как «типы последовательностей». Им присваивали имена, начинающиеся с типичного изолята в группе, последующие буквы указывали на все области происхождения изолята в группе. Американские изоляты: А – Аляска; В – Британская Колумбия; W – побережье штата Вашингтон (включая реку Колумбию); FF – 4 фермы штата Айдахо (Troyer et al., 2000); R – река Колумбия; S – река Снэйк; О – побережье штата Орегон; С – Калифорния. Для типов последовательностей, представленных более чем одним вирусным изолятом, цифра на конце имени указывает на их общее количество в этой группе.

Для российских изолятов использовали расширенные имена, расшифровка которых представлена в таблице 3.

Таблица 3

Таблица. Расшифровка имен российских изолятов IHNV

Название изолята	Расшифровка
OH01SA	ЛРЗ Озерки, р. Плотникова, производители нерки, 2001
MH01SA	ЛРЗ Малкинский, р. Ключевка, производители нерки, 2001
MH02SFA	ЛРЗ Малкинский, эпизоотия среди молоди нерки, 2002
MH02SA	ЛРЗ Малкинский, р. Ключевка, производители нерки, 2002
LN03SA-1	Озеро Начикинское, дикая половозрелая нерка, 2003, разные пулы
LN03SA-2	
LN03SA-3	

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили, используя компьютерную программу PAUP* ver. 4 (Swofford, 1998).

Глава 3. Инфекционный некроз гемопоэтической ткани IHNV и его влияние на популяции нерки в бассейне р. Большой

3.1. Вирусносительство у половозрелых тихоокеанских лососей на нерестилищах.

В период с 2000 по 2003 г., в естественных популяциях половозрелых кеты, кижуча, горбуши и мальмы в р. Авача, Паратунка, бассейне р. Большой и оз. Большой Виллой не было выявлено особо опасных вирусных патогенов. Большое внимание уделяли видам лососей, культивируемым на заводах. На Камчатских ЛРЗ не выращивают своих производителей и половозрелых особей отлавливают на базовых водоемах.

В 2001 г. впервые на Камчатке от производителей нерки был выделен особо опасный патоген – вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) (Рудакова, 2003). В последующие годы вирусологические исследования были направлены на то, чтобы выяснить масштабы распространения этого вируса в естественных популяциях нерки в бассейне р. Большой (рис. 1).

У половозрелых лососевых рыб открытых форм (с клиническими признаками патологии) особо опасных вирусных заболеваний не наблюдали. В естественных водоемах IHNV выделяли от лососей только на нерестилищах. Максимальное распространение (66.7 – 100%) и высокие титры вируса ($0.4 \times 10^{7.6-8.2}$ ЦД₅₀/мл тестируемого материал) были выявлены в конце нереста или у отнерестившихся рыб.

Проанализировав собственные данные и обобщив опыт зарубежных ученых, пришли к выводу, что заражение камчатских производителей нерки IHNV могло произойти как в

пресной, так и в морской воде. Исходя из этого, можно утверждать, что возможность стать асимптоматическим носителем ИНУ сохраняется у нерки на всех стадиях ее жизненного цикла от икринки до половозрелой особи.

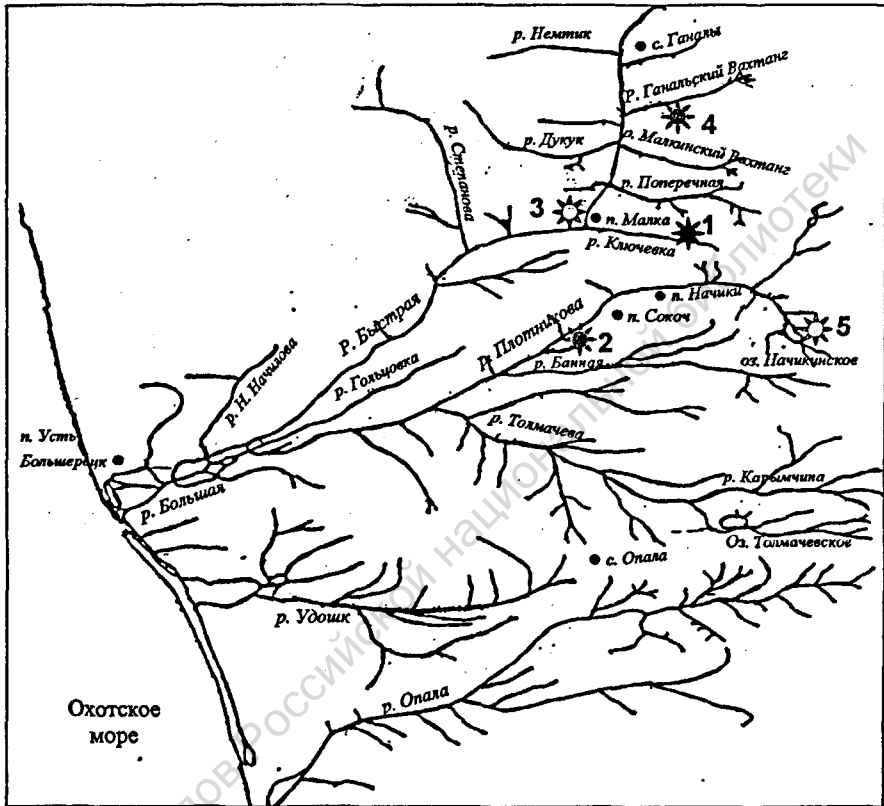


Рис. 1. Карта - схема бассейна р. Большой, * — обозначены места, где был выделен ИНУ (1 - р. Ключевка, МЛРЗ; 2 - р. Плотникова, ОЛРЗ; 3 - ручей Домашний; 4 - р. Ганальский Вахтанг; 5 - оз. Начкинское).

В пресноводный период изначально у молоди существует вероятность вертикального заражения вирусом (от родителей), затем в процессе питания инфицированными ракообразными и, наконец, горизонтально - в период нереста производителей-вирусоносителей. В этом случае выжившие после эпизоотии особи, скатываются в места нагула латентными носителями вируса, а затем возвращаются обратно в родную реку. Следовательно, ИНУ может циркулировать в бассейне р. Большой в течение многих лет.

Источником вирусной инфекции у камчатской нерки также могли быть западно-американские популяции лососей, так как ареал их нагула в море совпадает (Groot, Margolis, 1991) и IHNV широко распространен по западному побережью Северной Америки (Wolf, 1988). В пользу возможности передачи вируса в морской воде свидетельствует сообщения о том, что IHNV стал причиной эпизоотий у атлантического лосося, выращиваемого в садках в морской воде на побережье Британской Колумбии (Канада) (Armstrong et al., 1993). Таким образом, передача вируса могла произойти на фоне увеличения численности камчатских популяций нерки и повышения плотности скоплений рыб в местах нагула в океане.

Первое обнаружение вируса (2001 г.) в бассейне одной из самых крупных рек западного побережья Камчатки пришлось на период увеличения численности стад нерки. Наиболее ярко это заметно на примере озера Начикинское. Такого экстремально высокого количества производителей как в 2003 г. на нерестилище не было зафиксировано с 1966 г. (неопубликованные мониторинговые данные КамчатНИРО).

3.2. Течение эпизоотии у заводской молодежи. В 2002 г. на Малкинском лососевом рыболовном заводе (МЛРЗ) произошла вспышка вирусного некроза гемоэпителиальной ткани (IHNV). Предварительный диагноз подтвердили реакцией нейтрализации и электронно-микроскопическими исследованиями.

На заводе одновременно выращивали нерку и чавычу одного возраста, при этом для закладки оплодотворенной икры в инкубаторы отлавливали производителей из естественных водоемов. В качестве источника водоснабжения на МЛРЗ использовали подрусовой поток р. Ключевка, подогреваемый термальной водой. В период нереста реку перегораживают, чтобы не допустить захода производителей на территорию водозабора. Кроме того, нерку выращивали в двух разных цехах в одно и то же время с использованием одного и того же источника водоснабжения, однако эпизоотия IHNV была зарегистрирована только в цехе № 1.

Таким образом, можно исключить заражение обработанной йодиолом икры, личинок или мальков вирусом инфекционного некроза гемоэпителиальной ткани, попавшим на завод с водой или в результате не прямых контактов с производителями.

Нам представляется, что первичное заражение личинок на заводе произошло за счет передачи вируса от производителей из-за недостаточной обработки оплодотворенной икры раствором йодиола, либо благодаря проникновению вируса внутрь икринок. Однако, далеко не вся икра от вирусоносителей поражается вирусом изначально. Кроме того, какая-то ее часть погибает в ходе инкубации, поэтому количество первоначально инфицированных личинок незначительно (Mulcahy, Pascho, 1985).

Многие авторы (Amend, 1970; Hetrick et al., 1979) опытным путем показали, что инкубационный период развития вирусной инфекции напрямую связан с температурой воды.

Оптимальной температурой для развития болезни считается 10-12°C (Amend et al., 1972). Температурные условия на МЛРЗ (8-10 °С) были близки к оптимальным значениям, необходимым для развития ИHN.

Механизм передачи инфекции состоит из трех звеньев: выделение возбудителя инфекции из зараженного организма, пребывание возбудителя во внешней среде и внедрение его в здоровый организм. При горизонтальной передаче вирус размножается в инфицированной молоди и выделяется в воду (Wolf, 1988). Развитие заболевания на МЛРЗ проходило стремительно, клинические признаки у нерки соответствовали ранее описанным (Amend et al., 1969; Amend et al., 1972; Wolf, 1988).

3.3. Возможность обнаружения вирусной инфекции у дикой молоди. В естественных водоемах у молоди очень трудно зарегистрировать и оценить масштабы смертности в результате вспышки вирусного заболевания: погибшие, больные и ослабленные мальки сносятся течением или становятся легкой добычей хищников. Кроме того, плотность личинок и мальков в естественных водоемах более низкая, по сравнению с заводской и нет возможности вести постоянный контроль всей акватории. В литературе мы обнаружили четыре упоминания об эпизоотиях ИHN в дикой природе (Williams, Amend, 1976; Burke, Grischkowsky, 1984; Traxler, 1986; Traxler, Rankin, 1989).

В 2001–2002 гг. у половозрелой нерки из бассейна р. Большой обнаружили носительство вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани, поэтому в 2003 г. большое внимание уделяли вирусологическому обследованию молоди тихоокеанских лососей из бассейна этой реки и в особенности нерки. Отбор проб проводили в летние месяцы, когда температура воды была оптимальной для развития заболевания и в основном в местах, где были выявлены половозрелые вирусоносители. При обследовании отобранного материала, только от умирающей молоди нерки из озера Начикинское (ноябрь 2003 г.) удалось выделить вирус инфекционного некроза гемопозитической ткани.

Вероятно, высокая численность половозрелых рыб-вирусоносителей в Начикинском озере спровоцировала горизонтальную передачу ИHNV и явилась одной из причин инфекционного некроза гемопозитической ткани у мальков нерки. Тем не менее, нельзя полностью исключить вероятность его вертикальной передачи.

Глава 4. Патогенез и влияние вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани на организм рыб

4.1. Признаки патологии во время естественной эпизоотии и при искусственном заражении ИHNV. На основании анализа течения эпизоотии ИHN у молоди нерки на МЛРЗ и

экспериментального заражения IHNV молоди кеты, выделены четыре периода развития болезни. Симптомы болезни в обоих случаях были практически идентичные.

Первые признаки патологии не являются строго специфичными для данного заболевания: замедленная реакция на раздражители, потемнение кожи, отечность и бело-серые тужи из анального отверстия. При вскрытии отмечали анемию внутренних органов, кишечник не содержал пищевых масс и был заполнен содержимым беловатого цвета. В период предвестников происходит постепенное, пока еще незначительное, увеличение количества погибших рыб (рис. 3).

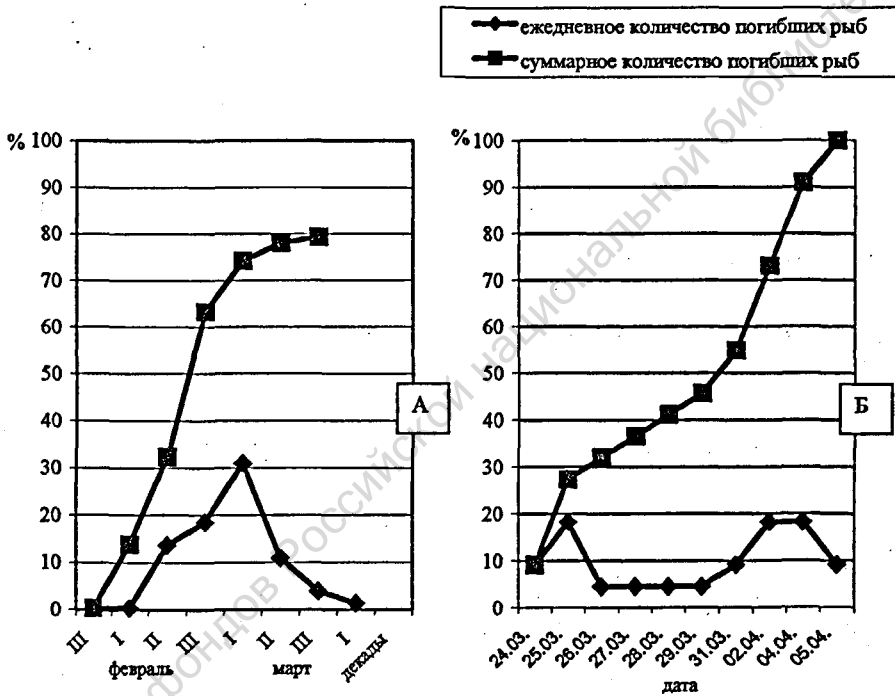


Рис. 3. Отход молоди при IHNV: А – эпизоотия у нерки на МЛРЗ; Б – экспериментальное заражение кеты

В период полного развития болезни появляются типичные для IHNV признаки патологии: экзофтальмия, обширная гематома за головой, кровоизлияния вокруг ануса и у основания плавников, раздутое брюшко; при вскрытии: асцитная жидкость в брюшной полости, печень бледно-песочного цвета, задний отдел почки отечный с кровоизлияниями, желудочно-кишечный тракт – заполнен светло-желтой слизью. В этот период подекадный

отход молоди достигает наивысшего предела. Затем наступает период относительной стабильности (признаки патологии остаются неизменными), но подекадный отход молоди постепенно сокращается (рис. 3).

Период угасания эпизоотии характеризуется появлением особей с искривлениями позвоночника, что указывает на переход болезни у этих рыб в заключительную стадию, после которой может наступить выздоровление. Однако количество таких особей во время эпизоотии на МЛРЗ не превышало 1% от общего числа обследованных рыб, а при экспериментальном заражении вообще отмечено не было. До момента уничтожения молоди нерки, сохранялось наличие особей с клиническими признаками инфекции, и вирус по-прежнему выделяли от умирающих и внешне здоровых рыб. Суммарный отход молоди нерки за период эпизоотии на МЛРЗ составил 79.3% при экспериментальном заражении – 100% (рис. 3).

4.2. Изменение гематологических показателей в течение болезни. Во время обострения ИHN у всех рыб с типичными признаками патологии в поле зрения микроскопа практически отсутствовали элементы крови эритроидного ряда. Вместо них присутствовали в больших количествах некробиотические тельца, лимфоциты и макрофаги (рис. 4).

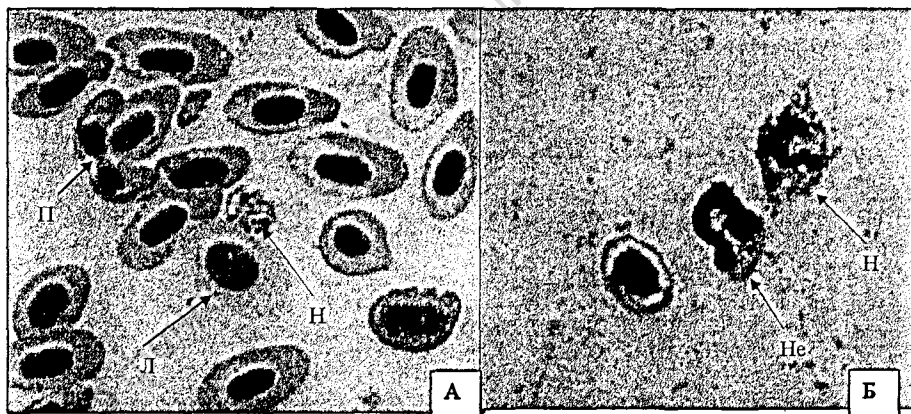


Рисунок 4. Картина крови при эпизоотии ИHN у молоди нерки на МЛРЗ: А – в период «предвестников болезни», Б – в период полного развития болезни (Н – некробиотическое тельце; Нс – нейтрофил; Л – лизирующий эритроцит; П – патологически делящийся эритроцит). Увеличение $\times 1000$. Окраска по Гимза.

При любой инфекции возникает воспалительно-некротический процесс в тканях, поэтому происходило значительное увеличение фагоцитирующих клеток. Таким образом, все вышеперечисленные изменения, за исключением некробиотических телец, отмеченные в крови пораженной ИHNV молоди, соответствовали общим для всех инфекционных

заболеваний. Последние впервые в небольших количествах появляются в «период предвестников» болезни у рыб с клиническими признаками и на их основании с полной уверенностью можно сказать, что начинается вирусная, а не бактериальная болезнь. Это позволит немедленно принять соответствующие профилактические меры, чтобы не допустить распространение инфекции на остальные объекты рыборазведения.

4.3. Механизм инфицирования и патогенное воздействие IHNV на организм рыб. Для того чтобы произошло заражение и началось заболевание, вирус должен проникнуть в организм хозяина и вступить в контакт с чувствительными тканями. В результате происходит репликация вирусных частиц и повреждение клеток, что и лежит в основе клинического проявления болезни, вызываемой вирусами. Кроме того, необходимо, чтобы в это время патоген сумел избежать действия защитных факторов хозяина.

Воротами инфекции при ИHN являются клетки жаберного эпителия, хотя не исключено, что вирус может проникать в организм рыб через желудочно-кишечный тракт и кожу. Гиперплазия жаберного эпителия и высокие значения титров вируса указывают на возможность первичного размножения вируса в этих клетках. После проникновения, часть вирусных частиц, вероятно, разносится током крови в органы-мишени, а часть остается для первичной репликации. На вторичное поражение желудочно-кишечного тракта указывают гистологические изменения, выявленные на разных стадиях развития болезни у молоди нерки на МЛРЗ (Гаврюсева, 2004). Наибольшая деструкция в процессе поражения организма IHNV происходит в гемопозитической ткани почки и селезенки, а последующие отклонения в органах и тканях вызваны, очевидно, отравлением организма токсинами, образованными в результате разрушения тканей. Высокая проницаемость кровеносных сосудов приводит к образованию обширных гематом и точечных кровоизлияний у основания плавников.

Глава 5. Морфология и филогенетическое типирование вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани.

5.1. Морфология рабдовирусов. На основании литературных данных дано общее представление о структуре рабдовирусов.

5.2. Морфология IHNV. Вирионы IHNV имеют пулевидную форму. При измерении на ультратонких срезах, проведенном Дарлингтоном с соавторами (Darlington et al., 1972), средняя длина трех изолятов этого вируса была равна 170 нм (разброс 150-190 нм), диаметр – 70 нм (разброс 65-75 нм). Внешняя оболочка с выступами составляла около 10 нм. Измерения длины и диаметра IHNV, изолированного от производителей и молоди нерки на Камчатке, показали сходные результаты, однако разброс измерений длины вириона в нашем случае был

несколько больше, от 150 до 220 нм (рис. 5). Вероятно, это можно объяснить образованием так называемых дефектных частиц в процессе наращивания вируса на культурах клеток.

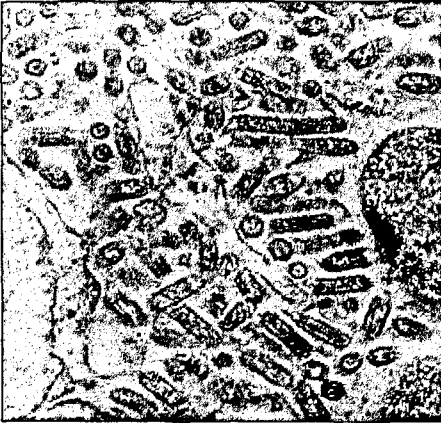


Рисунок 5. Электронная микрофотография скопления частиц вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) в межклеточном пространстве клеток линии CHSE-214 при заражении материалом от молоди нерки из Малкинского ЛРЗ в период эпизоотии (увеличение х 30000).

В отличие от вирусов бешенства (RV) и везикулярного стоматита (VSV), IHNV имеет 6 вирусных генов вместо 5. Шестой ген кодирует ранее неизвестный вирусный белок NV или невирионный белок. Это дало основание добавить новый род, объединяющий рабдовирусы рыб, который был одобрен в Интернациональном Комитете по Таксономии Вирусов и назван *Novirhabdovirus* (Kurath et al., 1997).

5.3. Генетическое типирование камчатских изолятов вируса некроза гемопоэтической ткани. Провели филогенетическое типирование 7 камчатских изолятов IHNV и сравнили с американскими, обработка которых была ранее выполнена Гэл Кюрат (Gael Kurath, 1993).

В результате проделанной работы получили филогенетическое дерево, в котором все камчатские изоляты находятся в самой большой U-геногруппе (рис. 6). Анализ генетических различий 7 камчатских изолятов показал четыре типа последовательностей, из которых одна была идентична наиболее часто встречающемуся северо-американскому типу (A40W11n37), распространенному на Аляске и в штате Вашингтон. Другая соответствовала второму по частоте встречаемости в Америке типу последовательностей (W19ABWn26) и две отличались от двух первых только на один-два нуклеотида.

Среди геногрупп дерева U-геногруппа занимает самую большую область распространения вируса (3700 км между двумя самыми отдаленными точками отбора проб в Северной Америке) и содержит самое большое количество вирусных изолятов. Несмотря на это, она имеет самые низкие внутривидовые расхождения, поддерживая предельную

генетическую гомогенность и статизм, как было ранее описано в региональных исследованиях (Emmenegger et al., 2000; Emmenegger, Kurath, 2002).

RUI-11 Mix
M4C1, 9/30/03

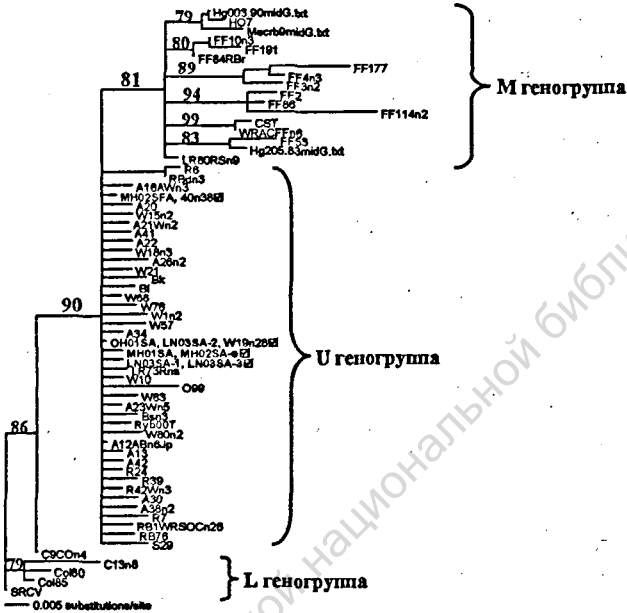


Рис. 6. Филогенетическое дерево, полученное при анализе нуклеотидных последовательностей основных генотипов, субгрупп и генетических типов, известных в настоящее время, и 7 камчатских изолятов H1N1, обозначенных [E].

Известно, что лососевые из реки Колумбия и других северных рек Американского континента, как и нерка из Камчатских водоемов, мигрируют на север Тихого океана и проводят 1-3 года в морской воде, где существует большая вероятность их смешивания в океанической зоне. Это могло способствовать образованию одной очень большой популяции хозяев в пределах данного региона и привести к генетической гомогенности в популяции вируса. Как именно происходит передача патогенна в океане, пока достоверно не известно.

Глава 6. Пути предотвращения ИHN эпизootий на рыбоводных заводах

Проблема борьбы с ИHNV при искусственных условиях выращивания является одной из наиболее актуальных для рыбоводных заводов, специализирующихся на культивировании тихоокеанских лососей. Это обусловлено тем, что в настоящее время не существует доступной коммерческой вакцины или средств химиотерапии, способных сократить

смертность молоди при ее поражении. Наши исследования показали высокое распространение этого патогена в выборках при обследовании естественных популяций нерки. На основе принципов, изложенных в «Руководстве по искусственному воспроизводству нерки на Аляске» (Alaska sockeye salmon..., 1994) и собственных наработок, предлагаем внести дополнения к существующим рекомендациям по профилактике и борьбе с инфекционным некрозом гемопозитической ткани для ЛРЗ и адаптировать их к используемой биотехнике.

6.1. Источник водоснабжения. Обязательным условием выращивания молоди на ЛРЗ является использование воды свободной от вируса на всех этапах производственного процесса. В России на действующих ЛРЗ предусмотрена фильтрация и очистка воды от взвесей, свободноживущих стадий паразитов, но нет установок, позволяющих уничтожить вирусы и бактерии. Переоборудование действующих заводов – занятие дорогостоящее и не всегда оправданное. В этом случае рекомендуем регулярно проводить вирусологическое обследование икhtiофауны базовых водоемов. В период нереста перегораживать водотоки и не допускать захода лососей на территорию водозаборов или выше по течению.

6.2. Отбор производителей. Садки для выдерживания производителей не должны быть переполнены, особенно если рыба выдерживается более 2-3 дней. Не допускать, чтобы они были окружены другими половозрелыми рыбами, нерестящимися в водоеме. В этом случае концентрация вируса в воде возрастает и увеличивается риск его горизонтальной передачи.

6.3. Оплодотворение и дезинфекция икры. Необходимо проводить тщательную обработку поверхности производителей рабочим раствором йодиола.

На этом этапе рекомендуем внести следующие изменения и дополнения:

1. Для оплодотворения и дезинфекции объединять икру от минимально возможного количества самок (в идеале от 1-2) и использовать для оплодотворения как можно меньше самцов. После этого икру от рыб отобранных в один день можно объединить при размещении в инкубаторы.

2. При активации икры (1-2 минуты) не использовать воду из водоема, так как она может содержать IHNV. Оплодотворенную икру от одной партии рыб сразу же промывать в рабочем растворе йодиола и дезинфицировать в течение 30-60 минут.

3. После обработки икры в растворе йодиола в течение указанного времени, икра от нескольких самок может быть смешана при размещении в большие транспортные контейнеры или инкубаторы.

6.4. Инкубация оплодотворенной икры. Начиная с этого момента в практике рыбоводства необходимо придерживаться принципа компартиментализации (раздельная

инкубация оплодотворенной икры и выращивание молоди, полученной от половозрелых рыб, отобранных за один день).

6.5. Выдерживание личинок и подращивание молоди. Личинок нерки необходимо разместить по максимально возможному количеству лотков или бассейнов и каждый такой резервуар необходимо обслуживать как отдельную единицу. В идеале, один инкубатор должен соответствовать одному бассейну для выдерживания личинок, что позволит свести к минимуму риск потерь от болезни.

На основании наших исследований другие виды лососевых рыб в обследованных водоемах не являются носителями IHNV. В связи с этим, настоятельно рекомендуем не выращивать нерку в одном цехе вместе с другими чувствительными к IHNV видами рыб, такими как чавыча или кета.

6.6. Выявление и локализация IHNV. При наличии клинических признаков и увеличении смертности молоди выше нормативного необходимо незамедлительно проконсультироваться с ихтиопатологом. После выделения вируса на перевиваемых линиях клеток, директор завода должен иметь право принять решение уничтожить всех мальков нерки в бассейне или лотке, предположительно пораженном IHNV, для того чтобы защитить всех остальных рыб, выращиваемых на заводе. Нет необходимости ждать результатов идентификации вируса и постановки биопробы. На постановку окончательного диагноза обычными вирусологическими методами, описанными в действующих инструкциях, уйдет не меньше месяца, за это время может произойти горизонтальная передача вируса в близлежащие бассейны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с поставленной целью и задачами провели вирусологическое тестирование лососей (кеты, кижуча, чавычи, нерки, горбуши, мальмы) в естественных водоемах Камчатки (р. Авача, Паратунка, бассейне р. Большой и оз. Большой Виллой) на которых базируются 5 лососевых рыбоводных заводов. Впервые на Камчатке вирус инфекционного некроза гемопозитической ткани был выделен нами в 2001 г. от производителей нерки, используемых для воспроизводства на МЛРЗ и ОЛРЗ. Последующее обследование естественных нерестилищ нерки в бассейне р. Большой показало, что в реках Ключевка, Ганальский Вахтанг, ручье Домашний и озере Начикинское популяции нерки являются носителями IHNV. Степень зараженности обследованных рыб и значения титров вируса варьируют в зависимости от водоема и увеличиваются в течение нереста от 16.6 до 100%. Таким образом, в России в перечисленных водоемах Камчатки существует природный очаг особо опасного для лососевых рыб вирусного патогена.

В естественных популяциях рыб вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани играет роль фактора, регулирующего численность поколений. Поэтому на фоне увеличения возврата нерки в бассейн реки Большой мы наблюдали его распространение и высокие значения вирулентности у половозрелых рыб и диагностировали заболевание ИHN среди молоди нерки в озере Начикинское. Гомеостаз является неотъемлемой частью природных сообществ, поэтому в природе последствия эпизоотий не являются катастрофическими. Однако, при воздействии дестабилизирующих факторов, связанных с нерациональными действиями человека в условиях осуществляемой им хозяйственной деятельности (например, в аквакультуре, при акклиматизации и т.п.), возможно их серьезное воздействие на состояние экосистемы в целом.

В 2002 г. у мальков нерки на МЛРЗ диагностировали вспышку инфекционного некроза гемопоэтической ткани. Заражение, вероятно, произошло в результате вертикальной передачи патогена потомству от производителей-вирусоносителей с высокими значениями титра вируса. Болезнь протекала в острой форме, с типичными для данного заболевания признаками патологии. Предприятие понесло большие экономические потери в результате высокой смертности молоди и уничтожения всех рыб, выращиваемых в одном цехе и, следовательно, возврат этого поколения рыб будет меньше планируемого.

В настоящее время не существует доступной коммерческой вакцины или методов терапии ИHNV. Методы профилактики и сдерживания вирусной инфекции на заводах являются наиболее эффективными мерами контроля потерь от этой болезни. Несоответствие мировым стандартам инструкций по профилактике и контролю за ИHNV в России явилось одной из причин ИHN эпизоотии у нерки, выращиваемой на МЛРЗ. Разработанные нами дополнения существующих мероприятий позволят сократить вероятность развития заболевания на ЛРЗ, расположенных на водоемах неблагоприятных по этому заболеванию.

Отсутствие экспресс-диагностики ИHNV, длительность и трудоемкость вирусологического тестирования материала на перевиваемых линиях клеток не позволяют осуществить быструю диагностику заболевания на ЛРЗ. Гематологические исследования проведенные при естественной эпизоотии у молоди нерки и искусственном заражении мальков кеты ИHNV показали наличие в крови специфических некробиотических телец, что позволяет быстро дифференцировать вирусное поражение от бактериального и принять соответствующие меры к его локализации.

Филогенетические данные, полученные в результате анализа камчатских изолятов ИHNV свидетельствуют, что камчатские и северо-американские изоляты этого вируса идентичны или очень близки генетически и произошли от общего предка, образовавшего многочисленную U геногруппу. На основании полученных филогенетических данных можно

с высокой долей вероятности констатировать наличие резервуара и горизонтальной передачи вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани в океане.

Вероятно, что географическая область распространения IHNV будет продолжать расширяться. Миграция инфицированных анадромных видов рыб и перевозка инфицированной икры или рыбы может способствовать его распространению внутри или между странами. Мониторинговые вирусологические исследования лососей Камчатки позволяют получить информацию об эпизоотической обстановке в рыбохозяйственных водоемах. Это исключит возможность вложения больших средств на строительство лососевых рыбоводных заводов или прудовых хозяйств в местах с неблагоприятной эпизоотической обстановкой и предотвратит расселение этого патогенна с объектами акклиматизации в другие регионы страны. Для полной оценки степени распространения IHNV в водоемах Камчатки, необходимо провести исследование крупнейших в Азии стад нерки рек Озерной и Камчатки.

Перспективным направлением дальнейшего исследования является попытка выделить IHNV у половозрелой нерки в устье нерестовых водоемов, используя более чувствительный по сравнению с перевиваемыми линиями клеток метод полимеразной цепной реакции. Это позволит доказать или опровергнуть теорию, согласно которой рыба приходит на нерест будучи уже инфицирована вирусом, а массовому выделению патогенна в период нереста способствует снижение активности иммунной системы.

ВЫВОДЫ

1. В популяциях половозрелых тихоокеанских лососей (кеты, кижуча, горбуши, мальмы) и их молодь в реках Авача, Паратунка, бассейне р. Большой и оз. Большой Виллой, а также у искусственно выращиваемой на лососевых рыбоводных заводах молоди кеты, чавычи и кижуча не было выявлено особо опасных вирусных патогенов.

2. Вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани впервые выделен у половозрелых особей в популяциях нерки бассейна р. Большой (рр. Ключевка, Ганальский Вахтаг, ручей Домашний и озеро Начикинское).

3. Распространение IHNV у половозрелой и выявление заболевания у молоди нерки в бассейне р. Большой на Камчатке связано с увеличением численности популяций нерки в последние годы. Передача вируса на нерестилищах происходит через воду, что обуславливает высокую встречаемость рыб-вирусоносителей в конце нерестового сезона.

4. На Малкинском ЛРЗ диагностировали IHNV эпизоотию у мальков нерки. В заводских условиях заражение вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани произошло в результате вертикальной передачи вируса от производителей потомству.

5. Установлено, что внешние и внутренние признаки патологии при естественной эпизоотии у молоди нерки и при искусственном заражении мальков кеты IHNV практически идентичные, при этом "воротами" инфекции являются клетки жаберного эпителия.

6. Наличие некробиотических телесц, на этапе "предвестников болезни", позволяет дифференцировать вирусное поражение от бактериального, что дает возможность использовать этот показатель в качестве предварительной экспресс-диагностики ИHN.

7. Филогенетическое исследование показало, что камчатские и северо-американские изоляты IHNV идентичны или очень близки генетически и произошли от общего предка.

8. Предложены дополнения к действующим мерам по профилактике и контролю IHNV на лососевых рыбоводных заводах, которые позволят сократить вероятность эпизоотий на ЛРЗ, расположенных на водоемах неблагополучных по этому заболеванию.

9. Учитывая высокую патогенность IHNV для многих видов лососей, следует ввести обязательное вирусологическое тестирование половозрелых и молоди рыб используемых для акклиматизации и искусственного выращивания, как на территории Камчатки, так и в других регионах России.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рудакова С.Л. Выделение и идентификация вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) от производителей нерки на Камчатке // Тез. докл. IV Регион. конф. по актуал. пробл. экологии, морской биологии и биотехнологии. 23-24 ноября. 2001. Владивосток: Изд-во Дальневост. Ун-та. 2001. С. 100-101.

2. Рудакова С.Л. Некроз гемопоэтической ткани у производителей нерки и предполагаемые источники инфекции // Вопросы рыболовства, том 4, № 1 (13). 2003. с. 93-102.

3. Рудакова С.Л. Анализ развития эпизоотии, вызванной вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) у мальков нерки *Oncorhynchus nerka* при искусственном выращивании (Камчатка) // Вопросы рыболовства, том 5, № 2 (18). 2004. с. 362-374.

4. Рудакова С.Л. Рекомендации по борьбе с инфекционным некрозом гемопоэтической ткани при искусственном воспроизводстве нерки на рыбоводных заводах Камчатки / Стратегия развития аквакультуры в условиях XXI века. Материалы международной научно-практической конференции. Минск. Изд-во "Тонпик". 2004. с. 338-341.

5. Rudakova S.L. Infectious hematopoietic necrosis virus: repetitive isolation from adult sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) from river Bolshaya-Bistraya (Kamchatka) // Second

Бл.

bilateral conference "Aquatic and marine animal health", Shepherdstown, West Virginia, 21-28 September 2003, p. 17.

6. Karmanova I.V., Rudakova S.L., Ustimenko E.A., Sergeenko N.V., Liniova G.P., Korneeva S.A., Gavriuseva T.V. Health of Pacific salmonids held under natural and artificial conditions of reproduction in Kamchatka // Second bilateral conference "Aquatic and marine animal health", Shepherdstown, West Virginia, 21-28 September 2003, p. 8.

7. Рудакова С.Л., Бочкова Е.В. Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (ИHN) в популяции нерки *Oncorhynchus nerka* (WALBAUM) озера Начикинское (Камчатка) // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Борок (в печати).

8. Карманова И.В., Рудакова С.Л., Гаврюсева Т.В., Устименко Е.А., Сергиенко Н.В., Линева Г.П., Корнеева С.А. Инфекционные и инвазионные возбудители болезней рыб в аквакультуре (Камчатка). Сб. научных трудов. Болезни рыб. - М., 2004. - Вып. 79. - С. 97-104 (в печати).

9. Rudakova S.L., Bochkova E.V. Repetitive isolation of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from adult sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Kamchatka // Aquaculture (In press).

10. Karmanova I.V., Rudakova S.A., Ustimenko E.A., Sergeenko N.V., Liniova G.P., Korneeva S.A., Gavriuseva T.V. Microorganisms and parasites associated with feral and hatchery-reared pacific salmon in Kamchatka // Aquaculture (In p

РНБ Русский фонд

2007-4

18993

Светлана Леонид

**СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЛОСОСЕЙ НА КАМЧАТКЕ И
ВОЗДЕЙСТВИЕ НА НИХ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА
ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ**

Подписано к печати 15 октября 2004 г.

Заказ от 18 октября 2004 г.

Издательство КамчатНИРО,

683602, Петропавловск-Камчатский, Набережная 18

Объем 24 стр. А5

Тираж 100 экз.

10 OCT 2004