

УДК 594.124:576.8(26)(262.5)

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ВИБРИОЗА – КУЛЬТУРЫ ШТАММА *VIBRIO ANGUILLARUM* С ПРИМЕНЕНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Т.В. Безгачина

ВНИРО, Москва, bezgachina@vniro.ru

IDENTIFICATION OF VIBRIOSIS AGENT AS STRAIN CULTURE OF *VIBRIO ANGUILLARUM*, USING THE MODERN SEROLOGICAL METHODS OF BACTERIAL DISEASE DIAGNOSIS

T.V. Bezgachina

VNIRO, Moscow, bezgachina@vniro.ru

Введение

Вибриоз является очень известным бактериальным заболеванием рыб и гидробионтов в морской, солоноватой и пресной воде, которое впервые было выявлено у угрей в 1909 г. [Bergmann, 1909]. Это заболевание встречается у многих видов костистых рыб, моллюсков, ракообразных за рубежом и в России. Возбудителем вибриоза является культура штамма *Vibrio anguillarum*. Заболевание начинается особенно интенсивно развиваться в теплое время года, достигая максимума при $t = 19-20$ °С [Висманис, 1980]. Вибриоз в период эпизоотии может привести к 90 % гибели культивируемых лососевых рыб.

Возбудитель вибриоза выделялся сотрудниками ВНИРО периодически с начала 80-х г. из воды Чёрного моря в районе Северного Кавказа, а также у диких и культивируемых рыб, а затем и у мидий. Был он идентифицирован и из лососевых рыб в Балтийском регионе.

Из прибрежных вод Чёрного моря возбудитель вибриоза за последнее время был выявлен в 2002 г. [Безгачина, Зуевский, 2003а, Безгачина, 2003б], в 2007 г. [Безгачина, 2008]; у мидий *Mytilus galloprovincialis* в 2005 г. [Безгачина, 2006], в 2006 г. [Безгачина, 2007а; Безгачина, 2007б], в 2007 г. [Безгачина, 2008]. В 2000 г. культура штамма *V. anguillarum* была выделена из морской воды в районе Сонострова Кандалакшского залива Белого моря [Безгачина, 2001; Безгачина, Козицкий, 2001].

Возбудитель вибриоза был идентифицирован в 2001 г. от радужной форели, культивируемой в садках в Белом море в форелевом хозяйстве Республики Карелия [Безгачина, Козицкий, 2002; Безгачина, 2003; Bezgachina, 2003].

В 2003–2004 гг. и в 2006 г. он был выделен от мидии *Mytilus edulis* и воды Белого моря в районе Соловецких островов [Безгачина, Козицкий, 2004; Безгачина, 2005; 2006; 2008]. На Камчатке в 1993–1999 гг. впервые был обнаружен вибриоз дикой горбуши в прибрежных водах Карагинского залива [Пугаева и др., 2000]. В 2007 г. он был отмечен у дикой горбуши как в Карагинском заливе, так и в северо-западной части Тихого океана [Сергеенко и др., 2008].

Выделение и идентификация *V. anguillarum* обычно проводится классическим бактериологическим методом, который, как правило, трудоемок и продолжителен.

Серологические методы диагностики бактериальных заболеваний издавна применяются в медицинской и ветеринарной практике, а в настоящее время также и в ихтиопатологии. Создание диагностической агглютинирующей сыворотки при изучении заболеваний объектов аквакультуры стало просто необходимо, так как дополнительная специфическая характеристика штамма позволяет более точно определить пути распространения возбудителя и причины возникновения заболевания. Вакцины, приготовленные из одного серотипа, оказываются неэффективными против другого.

В России созданы и использованы агглютинирующие сыворотки для диагностики вибриоза в Черноморском и Балтийском регионах, обладающие высокой активностью к гомологичной культуре штамма *V. anguillarum* и стабильной специфичностью к гетерологичным культурам и их формализованным антигенам.

Данные сыворотки были получены путем гипериммунизации кроликов антигенами из вышеперечисленных культур микроорганизмов. [Безгачина, 1986; Безгачина и др., 1987; Безгачина, Радин, Бондаренко, 1989; Безгачина, Шумилов, Бондаренко, 1995; Безгачина, 1998].

Была поставлена задача изготовить две новые партии агглютинирующих сывороток *V. anguillarum* для разработки комплексных методов серодиагностики, путем гипериммунизации кроликов культурой штамма *V. anguillarum*, выделенной ранее в полевых условиях: в Балтийском регионе — штамм № 2 и Черноморском регионе — штамм № 19.

При использовании агглютинирующих сывороток происходит значительное сокращение срока идентификации возбудителя вибриоза до суток и менее.

Материал и методика

Культура штамма *V. anguillarum* № 2 была выделена от лососевых рыб в Балтийском регионе, а № 19 — в Черноморском регионе России. Данные штаммы депонированы, лиофилизированы и находятся во Всероссийской коллекции микроорганизмов в ВГНКИ (г. Москва). При проведении исследований были применены бактериологические, серологические и биохимические методы исследования. Для получения агглютинирующей сыворотки были использованы кролики-доноры. В работе были применены два метода постановки реакции агглютинации:

- пробирочный, при котором ставят развернутую реакцию в пробирках;
- пластинчатый — реакция агглютинации на стекле.

При получении моновалентных агглютинирующих сывороток для диагностики вибриоза лососевых рыб были иммунизированы 20 кроликов — доноров (по 10 кроликов для каждой сыворотки) массой 2,5–3,0 кг культурой штамма № 2 и № 19, которые донорам вводили в возрастающих дозах пятикратно с интервалом между инъекциями 7–8 дней, причем первое введение проводили подкожно, а последующие внутривенно.

В качестве антигенов при иммунизации кроликов использовали двухсуточные культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19, выращенных на МПА

с добавлением 1,5 % NaCl. Культуры смывали 0,85%-ным физиологическим раствором, добавляя формалин до конечной концентрации его в суспензии 0,3 % и двукратно отмывали от примесей питательной среды формализованным физиологическим раствором на центрифуге при 3000 об/мин в течение 30 мин.

Далее, после последнего центрифугирования осадок культур разводили до определенной концентрации по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича. На 5-й день после последней инъекции антигенов у кроликов брали пробы крови.

Сыворотки были исследованы в пробирочной реакции агглютинации с гомологичными антигенами *V. anguillarum*. При постановке реакции агглютинации нативные гипериммунные и нормальную (контроль) кроличьи сыворотки разводили формализованным физиологическим раствором с концентрацией от 1:25 до 1:6400. Антигены были использованы в реакции агглютинации в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл.

Далее штатив с пробирками помещали в термостат при 37–38 °С на 18 ч и на 2 ч вне термостата. Учет реакции проводили по четырехбальной системе в крестах.

На 8-й день после 5-й инъекции при наличии титра антител у обеих партий кроликов 1:1600 — 1:3200 доноров тотально обескровливали и получали 2 сыворотки, которые объединяли в 2 емкости по отдельности (Балтийский и Черноморский регионы) и консервировали борной кислотой. Стерильные сыворотки расфасовывали в ампулы из нейтрального стекла по 1 мл и лиофилизировали при общепринятом режиме.

Результаты и обсуждение

Антигены, полученные из культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19, применяемые при иммунизации кроликов для получения агглютинирующих сывороток, были исследованы в пробирочной реакции агглютинации на специфичность с сыворотками к различным гетерологичным микроорганизмам в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича и в реакции агглютинации на стекле. Они не давали реакции агглютинации с агглютинирующими адсорбированными сальмонеллезными О-, Н-сыворотками с широким диапазоном рецепторов, с О- и Н-агглютинирующими адсорбированными сыворотками аризона; протеус О, Н; О-псевдомонас; с холерной сывороткой Инаба и О-сывороткой.

Отрицательные результаты были получены в пробирочной РА с монорецепторными сыворотками 3-х подвидов кампилобактерий.

Антигены не агглютинировались адсорбированными сыворотками Шигелла Григорьева-Шига Штуцер Шмит, сальмонеллезной АВСДЕ, протеус НА, ОД, ОЕ, ОА, ОВ, ОС.

В результате проведения многочисленных исследований была выявлена отрицательная пробирочная реакция агглютинации и реакции агглютинации на стекле, что указывает на высокую видовую специфичность формализованных антигенов из культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19.

При исследовании на активность сыворотки *V. anguillarum* № 2-1 в пробирочной реакции агглютинации с 0,3%-ным формализованным антигеном из гомологичной культуры микроорганизмов *V. anguillarum* № 2 наблюдалась положительная реакция агглютинации при титре антител 1:25 — 1:1600 (4 креста), 1:3200 (3 креста).

Также положительный результат был отмечен при взаимодействии сыворотки *V. anguillarum* № 19-1 в пробирочной реакции агглютинации с 0,3%-ным

формализированным антигеном *V. anguillarum* № 19 при титре антител 1:25 — 1:200 (4 креста), 1:400 — 1:800 (3 креста), 1:1600 — 1:3200 (3 креста). Высокий титр антител наблюдался также при взаимодействии полученных сывороток *V. anguillarum* № 2-1 и № 19-1 с различными гомологичными культурами штаммов *V. anguillarum*, выделенными от лососевых рыб в Балтийском и Черноморском регионах.

После лиофилизации активность агглютинирующих сывороток *V. anguillarum* № 2-1 и № 19-1 в пробирочной реакции агглютинации не снизилась по сравнению с нативными сыворотками и титр антител составил 1:3200 (3 креста).

При исследовании сыворотки *V. anguillarum* № 2-1 на специфичность в пробирочной реакции агглютинации при разведении ее от 1:25 до 1:3200 были использованы 0,3%-ные формализированные антигены, изготовленные из гетерологичных штаммов микроорганизмов в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, а в реакции агглютинации на стекле живые — двухсуточные культуры микроорганизмов.

Отрицательная реакция агглютинации на стекле и пробирочная РА наблюдалась со следующими антигенами: *Campylobacter 1 n/b*, *2 n/b*, *3 n/b*; *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Hafnia*, *Acinetobacter colcoaceticus*, *Aeromonas salmonicida* 288,626; *Aeromonas salmonicida — B*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio diazotrophicus*, *Vibrio cambelii*, *Vibrio pelagius*.

При исследовании сыворотки *V. anguillarum* № 19-1 на специфичность был использован тот же набор антигенов и во всех случаях наблюдалась отрицательная реакция агглютинации.

Таким образом, были получены очень эффективные диагностические сыворотки, которые также были использованы в ходе разработки реакции непрямой гемагглютинации и контролировали антигенную активность культур штаммов *V. anguillarum* при изготовлении вакцины против вибриоза.

ВНИРО, ВГНКИ и Щелковским биокombинатом г. Москвы была создана и внедрена промышленная вакцина против вибриоза рыб (патенты на изобретение № 2284830, № 2284831 от 10 октября 2006 г.).

Научные исследования по разработке новых видов сывороток и вакцинопрофилактике в настоящее время продолжаются.

Выводы

1. Были получены лиофилизированные, высокоактивные и строгоспецифичные моновалентные агглютинирующие кроличьи сыворотки *V. anguillarum* № 2-1 и № 19-1 для диагностики возбудителя вибриоза в Балтийском и Черноморском регионах.

2. Необходимо использовать 0,3%-ные формализированные антигены, изготовленные из культуры штаммов *V. anguillarum* № 2 и № 19, идентифицированных от лососевых рыб в Балтийском и Черноморском регионах, в пробирочной и пластинчатой реакциях агглютинации с гомологичными сыворотками в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

3. Сыворотки предназначены также для контроля активности антигена эритроцитарного для диагностики вибриоза рыб и контроля антигенной активности культур штаммов *V. anguillarum* при изготовлении вакцины инактивированной против вибриоза рыб.

4. Применение агглютинирующих сывороток № 2-1 и № 19-1 для диагностики вибриоза позволит в кратчайшее время предотвратить его распространение на лососевых хозяйствах.

ЛИТЕРАТУРА

- Безгачина Т.В. 1986. Агглютинирующая сыворотка для идентификации возбудителя вибриоза лососевых рыб // Профилактика, лечение и диагностика инфекционных болезней рыб: Тез. докл. V Всесоюзного симпозиума по инфекционным болезням лососевых рыб. — Москва. — С. 10.
- Безгачина Т.В., Радин И.Д., Бун А.И., Кяэри, Шумилов К.В., Бондаренко В.З., Климанов, Томашевская. 1987. К вопросу серологической диагностики вибриоза лососевых рыб // Паразиты и болезни морских гидробионтов: Сб. научных трудов ВНИРО-ПИНРО. — Мурманск. — С. 30–39.
- Безгачина Т.В., Радин И.Д., Бондаренко В.З. 1989. Гипериммунная сыворотка кроликов для серодиагностики вибриоза лососевых // Рыбное хозяйство. № 3. — С. 38–39.
- Безгачина Т.В., Шумилов К.В., Бондаренко В.З. 1995. Диагностика вибриоза лососевых рыб в Черноморском регионе России // Проблемы выращивания лососевых рыб в России: Сб. докл. Всероссийского совещания 1–4 августа 1995 г. — Мурманск: ПИНРО. — С. 75–77.
- Безгачина Т.В. 1998. Определение концентрации формализированных антигенов *Vibrio anguillarum* № 1, № 2, № 3, № 4, № 5, № 19 в пластинчатой реакции агглютинации на стекле с агглютинирующими сыворотками кроликов *Vibrio anguillarum* № 2, № 4, № 19 для диагностики вибриоза рыб // Паразиты и болезни морских и пресноводных рыб Северного бассейна: Сб. научных трудов. — Мурманск: ПИНРО. — С. 137–159.
- Безгачина Т.В., Козицкий А.Н. 2001. Идентификация возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* в морской воде в районе Сонострова Кандалакшского залива Белого моря // Биологические основы устойчивого развития прибрежных морских экосистем: Тез. докл. Международной конференции. — Мурманск: РАН — Апатиты. — С. 29.
- Безгачина Т.В. 2001. О специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum*, выделенной из морской воды в районе Сонострова Кандалакшского залива Белого моря // Проблема и перспективы аквакультуры в России: Материалы докладов научно-практической конференции. Адлер—Краснодар. — С. 15–16.
- Безгачина Т.В., Козицкий А.Н. 2002. Выделение возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* от радужной форели, культивируемой в садках в Белом море в форелевом хозяйстве Республики Карелия // Проблемы воспроизводства, кормов и борьба с болезнями рыб при выращивании в искусственных условиях: Тез. докл. научно-практической конференции. — Петрозаводск. — С. 29.
- Безгачина Т.В., Зуевский С.Е. 2003а. Идентификация возбудителя вибриоза — бактерии *Vibrio anguillarum* из прибрежной воды Черного моря в районе Северного Кавказа в 2002 г. // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тез. докл. Всероссийской научно-практической конференции 16–18 июля 2003 г. — Москва: Минсельхоз РФ, Институт биологии внутренних вод. — С. 15.
- Безгачина Т.В. 2003б. О специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, выделенной в 2002 г. из прибрежных вод Черного моря в районе Северного Кавказа // Инновации в науке и образовании — 2003: Материалы Международной научной конференции, посвященной 90-летию высшего рыбохозяйственного образования. — Калининград: КГТУ. — С. 37.
- Безгачина Т.В. 2003. Специфичность антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* от радужной форели при ее культивировании в Белом море на форелевом хозяйстве Республики Карелия // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоёмов Европейского Севера: Тез. докл. III Международной конференции 11–15 февраля 2003 г., Сыктывкар, Республика Коми, Россия, Институт биологии Коми. — Сыктывкар. — С. 13.
- Безгачина Т.В., Козицкий А.Н. 2004. Выделение возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* от мидии *Mytilus edulis* и морской воды Белого моря в районе Соловецких островов в летний период 2003 г. // Инновации в науке и образовании — 2004: Материалы Международной конференции, посвященной 10-летию КГТУ. — Калининград. — С. 44.
- Безгачина Т.В. 2005. Обнаружение возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* от мидии *Mytilus edulis* и морской воды Белого моря в районе Соловецких островов в летний период 2004 г. // Эпизоотологический мониторинг в аквакультуре: состояние и перспективы: Расширенные материалы Всероссийской научно-практической конференции-семинара 13–14 сентября 2005 г.: Минсельхоз РФ, Федеральное агентство по рыболовству, ФГУ «Меж-

ведомственная ихтиологическая комиссия», Российская Академия сельскохозяйственных наук (Отделение ветеринарной медицины, зоотехники). — Москва. — С. 8–9.

Безгачина Т.В. 2006. Идентификация культуры штамма *Vibrio anguillarum* из мидии Чёрного моря — актуальная проблема в ихтиопатологии // Тез. докл. IX съезда Гидробиологического общества РАН, Тольятти, 18–22 сентября 2006 г., РАН, Гидробиологическое общество, Институт экологии Волжского бассейна. — Тольятти. — С. 40.

Безгачина Т.В. 2006. К вопросу о специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, выделенной из мидии *Mytilus edulis* и морской воды Белого моря в районе Соловецких островов // Паразиты и болезни гидробионтов Ледовитоморской провинции: Тез. докл. Сателлитного 5-го Всероссийского симпозиума с международным участием. Президиум Сибирского отделения РАН, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Министерство образования и науки Республики Бурятия. — Улан-Удэ. — С. 136–137.

Безгачина Т.В. 2007а. Выделение культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза у мидий Чёрного моря в 2006 г. // Чтения памяти академика К.В. Симакова: Тез. докл. Всероссийской научной конференции. — Магадан, 27–29 ноября 2007 г. РАН. Северо-Восточный научный центр. — С. 175.

Безгачина Т.В. 2007б. К вопросу о специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, идентифицированной в 2006 г. у мидий Чёрного моря // Естественные и инвазийные процессы формирования биоразнообразия водных и наземных экосистем: Тез. докл. Международной научной конференции 5–8 июня 2007 г. РАН. Южный Научный Центр. — Ростов-на-Дону. — С. 46–47.

Безгачина Т.В. 2008. Выявление культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза у мидий Чёрного моря *Mytilus galloprovincialis* в районе Северного Кавказа в летний период 2007 г. // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: Сб. научных трудов, выпуск 24, РУП. Институт рыбного хозяйства. — Минск. — С. 373–375.

Безгачина Т.В. 2008. Исследование на активность и специфичность антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* — возбудителя вибриоза, выделенной из прибрежных вод Чёрного моря в районе Северного Кавказа в летний период 2007 г. // Современное состояние водных биоресурсов: Материалы Международной конференции. Новосибирский государственный аграрный университет. ФГУП «Росрыбцентр». — Новосибирск. — С. 366–368.

Безгачина Т.В. 2008. Выявление возбудителя вибриоза штамма *Vibrio anguillarum* у мидий Белого моря — актуальная проблема в ихтиопатологии // Природа шельфа и архипелагов Европейской Арктики: Материалы Международной научной конференции, выпуск 8, РАН, Кольский Научный Центр, Министерство образования и науки. — М.: ГЕОС. — С. 30–32.

Висманис К.О. 1980. Профилактика и лечение рыб при аквакультуре // Рыбное хозяйство. № 2. — С. 37–39.

Патент на изобретение № 2284830 от 10.10.2006 г. Приоритет от 18.04.2005 г. «Способ получения инактивированной вакцины против вибриоза рыб». РФ Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. — Москва. — С. 6.

Патент на изобретение № 2284831 от 10.10.2006 г. Приоритет от 18.04.2005 г. «Инактивированная вакцина против вибриоза рыб». РФ Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. — Москва. — С. 4.

Пугаева В.П., Устименко Е.А., Рудакова С.Л., Сазонова А.А. 2000. Вибриоз у дикой горбуши *Oncorhynchus gorbusha* (Walbaum) в прибрежных водах Карагинского залива // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. Вып. 5. — Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО. — С. 175–180.

Сергеенко Н.В., Надеева О.А., Гаврюсева Т.В. 2008. Санитарно-эпидемиологическое состояние популяций тихоокеанских лососей Камчатки // Современное состояние водных биоресурсов: Материалы Международной конференции 26–28 марта 2008 г. Новосибирск. Новосибирский государственный аграрный университет, ФГУП «Росрыбцентр». — Новосибирск. — С. 387–391.

Bergman A.M. 1909. Die rote Beulenkrankheit des Hals // Ber. Kgl. Bayer. Biolog. Versuch. — Munchen. — P. 10–54.

Bezgachina T.V. 2003. Specific features of antigen from strain culture of *Vibrio anguillarum* in rainbow trout during cultivation in Karelian Republic. Abstract EAFP 11 International Conference on «Diseases of Fish and Shellfish» European Association Fish Pathologists 21st–26th September. Corinthia San Gorg Conference Centre St. Julians. — Malta. — P. 112.