

УДК 619:616.98:639.3.091

UDC 619:616.98:639.3.091

**ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО  
ИММУННОГО ОТВЕТА ОСЕТРОВЫХ РЫБ  
НА ВОЗБУДИТЕЛЬ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ  
БОЛЕЗНИ**

**CHARACTERISTICS OF A HUMORAL  
IMMUNE RESPONSE OF STURGEONS TO A  
HERPES VIRAL DISEASE AGENT**

Прокаева Инна Борисовна

м.н.с.

*Государственное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт ветеринарной вирусологии и  
микробиологии Российской академии  
сельскохозяйственных наук, г. Покров, Россия*

Prokaeva Inna Borisovna

junior research scientist

*State Research Institution National Research Institute  
for Veterinary Virology and Microbiology of Russian  
Academy for Agricultural Sciences, Pokrov, Russia*

В статье представлены результаты изучения особенностей течения герпесвирусной болезни у разных видов и гибридов осетровых рыб и динамика их специфического гуморального иммунного ответа на эту инфекцию

The article presents some results of the studying of the characteristics of the course of herpes viral disease in various sturgeon species and their hybrids, and the dynamics of their specific humoral response to this infection

Ключевые слова: ГЕРПЕСВИРУСНАЯ БОЛЕЗНЬ СИБИРСКОГО ОСЕТРА, ОСЕТРОВЫЕ, РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ, ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА, ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Keywords: HERPES VIRAL DISEASE OF SIBERIAN STURGEON, STURGEONS, NEUTRALIZATION TEST, VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODY, HUMORAL IMMUNE RESPONSE

**Введение**

Промышленному выращиванию осетровых рыб с целью воспроизводства природных запасов и получения товарной продукции уделяется все более 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 (AcіHV-2), впервые зарегистрирована у американских белого *Acipenser transmontanus* и тупорылого *Acipenser brevirostrum* осетров [9].

В России схожая болезнь была диагностирована весной 2006 г. у сибирского осетра *Acipenser baeri* и бестера в одном их осетровых хозяйств Тверской области [4,8].

Герпесвирусная болезнь сибирского осетра характеризуется острым течением и массовой гибелью разновозрастной молодежи с признаками

некрогеморрагического синдрома. Болезнь поражает промышленные популяции осетра и наиболее тяжело протекает в условиях индустриального разведения.

**Целью настоящей работы** являлось изучение особенностей течения экспериментальной герпесвирусной болезни у разных видов и гибридов осетровых рыб и их гуморального иммунного ответа на эту инфекцию.

### **Материалы и методы**

*Рыба.* В эксперименте использовали молодь следующих осетровых рыб: 2,5-месячную стерлядь *Acipenser ruthenus* и гибрид стерлядь х белуга х стерлядь (СБС), годовалую молодь сибирского осетра со средней массой тела 1–3г, 6,3 г и 97 г соответственно.

*Вирус.* Герпесвирус сибирского осетра, штамм SK1/0406, изолированный из покровных тканей больных осетров [4].

*Культура клеток.* Для выделения и накопления вируса, определения его титра и уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках крови осетровых рыб использовали постоянную линию клеток SSO-2 (пул печени, почки и селезенки сибирского осетра *Acipenser baeri*) [5].

*Постановка биопробы.* Гуморальный иммунный ответ у осетровых рыб изучали в 3-х опытах после экспериментального или естественного заражения герпесвирусом сибирского осетра. Заражение рыб проводили методом ванн с конечной концентрацией вируса  $10^{3,6}$ ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> воды – для СБС и  $10^4$ ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> воды – для стерляди. У годовиков сибирского осетра имела место естественная вспышка заболевания. Продолжительность заражения составляла 1 час при температуре воды 15-17°C. После заражения рыбу содержали в 250-литровых емкостях с проточной аэрируемой водой при температуре 15 – 17°C при регулярном кормлении форелевыми комбикормами (АК - 2ФП).

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

После выздоровления основной части экспериментально зараженной рыбы, которое наблюдали на 40-е сутки у СБС, на 105 сутки у стерляди и 120 сутки у сибирского осетра температуру воды в течение 2 – 3 недель повышали до 20°C.

От всех переболевших рыб на 92 сутки после экспериментального заражения СБС, начиная с 121 суток с момента заражения стерляди и на 174 сутки с момента появления первых признаков заболевания сибирского осетра и далее с интервалом в 2 – 2,5 месяца отбирали пробы крови с целью выявления вируснейтрализующих антител.

Титр антител определяли в реакции нейтрализации в культуре клеток SSO-2 по общепринятой методике. Для удаления неспецифических термолабильных ингибиторов сыворотки прогревали при 45°C в течение 30 мин [9].

Отбор и обработку патматериала проводили по общепринятой методике [2]. Расчет титров вируса и антител проводили по методу Рида и Менча [7]. Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами [1].

### **Результаты исследований и обсуждение**

В результате проведенных исследований показано, что течение герпесвирусной болезни у СБС и стерляди схоже с течением болезни у сибирского осетра. Инкубационный период болезни у 2,5-месячной молоди СБС более продолжительный (23 дня), чем у стерляди (11 дней) и сибирского осетра (6 дней) примерно такого же возраста [4].

Заболевание как у СБС, так и у стерляди начиналось с постепенного снижения поедаемости корма и появления угнетенных особей. У

заболевших рыб наблюдали кровоизлияния на вентральной стороне рострума, вокруг ротового отверстия (сифона), в межлучевой ткани грудных плавников. Отмечали экзофтальм, анемию жабр, но, в отличие от сибирского осетра, не наблюдали появления на коже бляшек гиперплазированного эпидермиса.

Гибель экспериментально зараженной молодежи СБС составила 46,7%, стерляди 40%, а годовиков сибирского осетра 37,4%, тогда как гибель 2-месячной молодежи сибирского осетра по литературным данным [3] составляла 100%. Динамика гибели осетровых рыб приведена на рис.1.

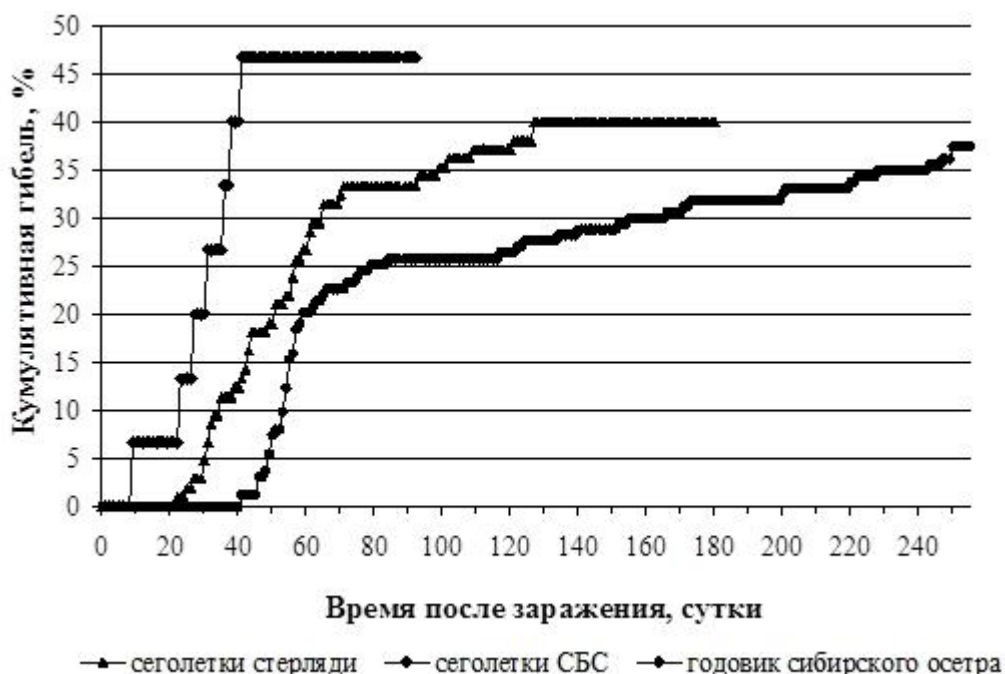


Рис. 1. Динамика гибели зараженной герпесвирусом молодежи осетровых рыб

На стадии максимального развития эпизоотии у павших сеголетков СБС и 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 была аналогична таковой у сибирского осетра за исключением цвета печени, которая у стерляди имела кремово-белый цвет, в то время как у сибирского осетра цвет печени был молочно-белый.

При определении содержания вируса в органах и тканях зараженных сеголетков СБС вирус был обнаружен как во внутренних органах, так и в слизи с поверхности тела рыб. На 23 сутки после заражения вирус выделяли из плавников и пула внутренних органов, титр вируса при этом составил 7,35 и 6,6 lgТЦД<sub>50</sub>/г материала соответственно. К 27 и 36 суткам титр вируса в пуле внутренних органов и слизи с поверхности тела рыб снижался и составлял 5,35 и 3,35 - 5,1 lgТЦД<sub>50</sub>/г соответственно.

В дальнейшем, практический интерес представляло определение содержания вируса в органах и тканях зараженных сеголетков стерляди на разных стадиях эпизоотии. На стадии максимального подъема эпизоотии (22-35 сутки после заражения) вирус выделяли почти из всех исследованных органов и тканей больной и погибшей рыбы, за исключением селезенки, из которой вирус выделяли не всегда. На стадии угасания эпизоотии (39-65 сутки после заражения) наблюдали стертые признаки болезни с переходом ее к хроническому течению. В этот период вирус обнаруживали не во всех органах и тканях (табл. 1). Наиболее продолжительное время вирус выявляли в тканях сифона - количество вирусопозитивных рыб через 65 суток после заражения составляла 83,3%. 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 ( $P < 0,05$ ). Результаты этих исследований приведены в таблице 1.

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, lgТЦД <sub>50</sub> /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±1,2	6,7±0,8	5,6±1,2	6,5±1,3	6,0±0,7	5,2±0,7	7,0±0,8	4,5±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, lgТЦД <sub>50</sub> /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±1,0	4,6±1,5	3,3±0,5	4,5±1,7	3,7±1,0	3,5±0,7	3,9±1,2	3,2±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 lgТЦД <sub>50</sub> /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<sup>3,1</sup>ТЦД<sub>50</sub>/г.

Как показали проведенные эксперименты, покровно тканевой тропизм герпесвируса у СБС и стерляди выражен не так явно, как у сеголетков сибирского осетра [6] и 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, у стерляди не отмечали. В то же время наиболее высоким было содержание вируса в сердце стерляди.

Предполагается, что переболевшие особи сибирского осетра могут становиться вирусоносителями, поскольку в их крови появляются вируснейтрализующие антитела, достигающие у двухгодовиков титров 1:2000 и выше [3]. У молоди СБС вируснейтрализующие антитела были выявлены у 4-х из 8 выживших рыб на 92 сутки после заражения. Титры антител находились в пределах от 1:17 до 1:113.

В эксперименте на молоди стерляди наиболее высокая доля серопозитивных рыб (66,7%) и титров вируснейтрализующих антител в их крови (до 1:1076) были зарегистрированы на 121 сутки после заражения (3 недели после выздоровления). Исследование сывороток крови этих рыб в более поздние сроки (на 175, 247 и 310 сутки после заражения) показало снижение доли серопозитивных рыб и титров вируснейтрализующих антител (табл. 2, рис.2).

Таблица 2 – ДИНАМИКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У СЕГОЛЕТКОВ СТЕРЛЯДИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСОМ СИБИРСКОГО ОСЕТРА

Время после заражения, сутки	Количество исследованных сывороток	Доля серопозитивных рыб, %	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 антител  $\leq 1:8$ ; \*- 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 ( $P < 0,001$ ).



Рис. 2. Динамика встречаемости титров вируснейтрализующих антител у сеголетков стерляди после экспериментального заражения герпесвирусом сибирского осетра

Таким образом, гуморальный иммунный ответ двухлетков стерляди на герпесвирусную инфекцию продолжается не менее 7 месяцев после завершения заболевания, и отмечается корреляция доли серопозитивных рыб и содержания вируснейтрализующих антител в их крови.

В эксперименте на годовалой молоди сибирского осетра при ее естественном заражении наиболее высокая доля серопозитивных рыб (92,73%) и титры вируснейтрализующих антител (от 1:14 до 1:3200) были зарегистрированы на 202 сутки от начала эксперимента. Исследование сывороток в более поздние сроки также показало снижение количества серопозитивных рыб и титров вируснейтрализующих антител (табл. 3, рис.3).



Таблица 3 - ДИНАМИКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ГОДОВОЛОЙ МОЛОДИ СИБИРСКОГО ОСЕТРА НА ЕСТЕСТВЕННОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСОМ СИБИРСКОГО ОСЕТРА

Время от начала эксперимента, сутки	Количество исследованных сывороток	Доля серопозитивных рыб, %	Реципрокные титры антител, $\log_2$	
			Диапазон	$\bar{x} \pm s_x$
202	55	92,73	3,58-11,65	6,29±1,93
257	49	87,76	3,58 –10,39	6,14±1,64
312	48	77,08	3,58 –8,64	5,89±1,49
375	46	60,87	3,58 –7,80	5,58±1,29
454	45	60	3,58 – 6,82	5,33±0,92
511	45	51,11	3,58 – 6,82	5,36±0,99

Примечание: порог детектирования антител  $\leq 1:8$



Рис. 3. Динамика встречаемости титров вируснейтрализующих антител у годовалой молодежи сибирского осетра после естественного заражения герпесвирусом сибирского осетра

### Заключение

Представленные данные свидетельствуют о чувствительности 2,5-месячной молодежи гибрида СБС и стерляди к герпесвирусу сибирского осетра. Течение герпесвирусной болезни у этих рыб схоже с течением болезни у сибирского осетра. При этом главными отличиями заболевания являются отсутствие бляшек гиперплазированной эпидермиса, менее

выраженный покровно-тканевой тропизм вируса, не столь сильное поражение печени и у стерляди преимущественное накопление вируса в сердце рыб.

Впервые изучена динамика накопления противогерпетических антител у осетровых рыб. При температуре 19-20°C, примерно через 1-3 месяца после перенесённого заболевания у осетровых рыб вырабатываются вируснейтрализующие антитела, которые выявляются на протяжении не менее 7 (стерлядь) – 13 (сибирский осетр) месяцев после выздоровления. Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках крови осетровых рыб позволяет проводить ретроспективную диагностику данной болезни.

#### Литература

1. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – 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. Щелкунов А.И., Щелкунов И.С. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра // Ветеринария. – 2010. - № 1. – С. 18-21.
4. 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.
5. Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Постоянная линия клеток SSO-2 пула паренхиматозных органов сибирского осетра *Acipenser baeri*. Патент на изобретение РФ № 2348689, зарегистрирован в Гос. реестре изобретений РФ 10 марта 2009 г.
6. Щелкунов А.И. Покровно-тканевой 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.
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. Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I., Kolbassova Y.P., Didenko L.V., Bykovsky A. Ph. First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia//Dis. Aquat. Org. – 2009. - Vol. 86, N. 3, P. 193-203.
9. 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.