



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) RU⁽¹¹⁾ 2 080 874⁽¹³⁾ C1
(51) МПК⁶ A 61 K 39/02

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 93016152/13, 20.03.1993

(46) Опубликовано: 10.06.1997

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: 1. Rij Kers G.T. Jhe immune system of cyprinicl, fish. Jhe immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline, in carp (*Cyprinus scarpio*). Aquaculture. 1980, v.19, N 2, p.177-189. 2. Rowe B., Jherelall E.J. Drug resistense in gram-negatine aerobic bacilli. Brit. Mecl. Bull., 1984, v.40, N 1, p.68-76. 3. Афанасьев В.И. Аэромоназ рыб и меры борьбы с ним. Автореф. на соиск.степ. докт. ветнаук, 1979, 37 с. 4. Krug S. Utersuchungen uber die Antigenverwandschaft von Aermonas - punctata Stammer. J. Bicnnenfischerei DDR, 1979, ХХУІ, Н.6, S.176-180. 5. Патент США N 3492400, кл. С 12 N 1/20, 1970.

(71) Заявитель(и):
Юхименко Л.Н.,
Смирнов Л.П.

(72) Автор(ы):
Юхименко Л.Н.,
Смирнов Л.П.

(73) Патентообладатель(ли):
Всероссийский научно-исследовательский
институт прудового рыбного хозяйства

(54) ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНО-ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ СЕПТИЦЕМИИ РЫБ

(57) Реферат:

Использование: рыбоводство, профилактика бактериальной геморрагической септицемии, аэромоназ рыб. Сущность изобретения: для профилактики бактериально-геморрагической септицемии используют антиген, характеризующийся следующими признаками: выделен из штамма бактерий *Aeromonas Sobria* ВГНКИ, КРК 1-1983-ДЕП, цитоплазматические белки, мол. мас. 50 - 70 кДа (при определении методом электрофореза в полиакриламидном геле), изоэлектрическая точка 4,6 - 5,3 (при

определении методом изоэлектрофокусирования при ионной силе 0,3 и носителе типа амфолит), максимумом поглощения в УФ-спектре (в метаноле) при длине волны 206 - 207 нм, титр 1:600 в реакции преципитации. Полученная вакцина эффективна против различных форм заболеваний, вызываемых бактериальными агентами (аэромонадами, энтеробактериями), обладает высоким протективным действием, универсальностью и экологической чистотой. 3 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 080 874** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 39/02**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **93016152/13, 20.03.1993**

(46) Date of publication: **10.06.1997**

(71) Applicant(s):
**Jukhimenko L.N.,
Smirnov L.P.**

(72) Inventor(s):
**Jukhimenko L.N.,
Smirnov L.P.**

(73) Proprietor(s):
**Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij
institut prudovogo rybnogo khozjajstva**

(54) **VACCINE FOR PROPHYLAXIS OF BACTERIAL-HEMORRHAGIC SEPTICEMIA IN FISHES**

(57) Abstract:

FIELD: fish breeding. SUBSTANCE: antigen isolated from bacterial strains of *Aeromonas sobria* VGNKI, KRK 1-1983-DEP is used for prophylaxis of bacterial-hemorrhagic septicemia. Antigen properties: cytoplasmic protein, molecular mass is 50-70 kDa, isoelectric point at

4.6-5.3, maximum absorption in UV-region (in methanol) at 206-207 nm, titer = 1:600 in precipitation reaction. Obtained vaccine is effective against different bacterial pathogens and shows high protective action, universality and ecological purity. EFFECT: enhanced effectiveness and quality of vaccine. 3 tbl

RU 2 0 8 0 8 7 4 C 1

RU 2 0 8 0 8 7 4 C 1

Изобретение относится к рыбоводству, в частности к средствам профилактики бактериальной геморрагической септицемии /аэромоноза/ рыб, вызываемой подвижными аэромонадами и другими грамотрицательными бактериями.

До настоящего времени для лечения и профилактики бактериальных болезней наиболее широкое применение находит использование лечебных кормов, содержащих антибиотики или другие антибактериальные препараты. Однако антибиотики отрицательно влияют на иммунологический статус рыбы /1/, способствуют появлению резистентных к антибиотикам форм микроорганизмов, в том числе и опасных для человека /2/.

Известно применение кротанолактона в качестве средства для лечения и профилактики аэромоноза карпов /3/. Практика показала, что средство не всегда является эффективным, что может быть связано с узким спектром его действия.

Попытка использования бактеринов для борьбы с аэромонозом, вызываемым подвижными аэромонадами, не дали положительного эффекта в связи с чрезвычайно высокой антигенной гетерогенностью аэромонад /4/.

Известная вакцина для иммунизации лососевых рыб против фурункулеза /5/, в которой в качестве антигенного вещества использовано содержимое разрушенной бактериальной клетки *Aeromonas salmonicida* надосадочная жидкость, полученная после центрифугирования, сорбированная на алюмокалиевых квасцах. Положительным является оральный способ введения вакцины с кормом. К негативным моментам следует отнести необходимость многократного введения препарата, сравнительно низкая эффективность и узкий диапазон действия /только против фурункулеза лососевых/.

Задачей изобретения является получение высокоэффективного профилактического средства против различных форм заболеваний, вызываемых бактериальными агентами /аэромонадами, энтеробактериями/, обладающего высоким протективным действием, универсальностью и экологической чистотой.

Указанный технический результат достигается тем, что в вакцине для профилактики бактериальной геморрагической септицемии используют антиген, характеризующийся следующими признаками:

выделен из штамма бактерий *Aeromonas sobria* ВГНКИ КРК 1-1983 ДЕП;

цитоплазматические белки;

молекулярная масса 50 70 кДа /при определении методом электрофореза в полиакриламидном геле/;

изоэлектрическая точка 4,6 5,3 /при определении методом изоэлектрофокусирования при ионной силе 0,3 и носителе типа амфолит/;

максимум поглощения в УФ-спектре /в метаноле/ при длине волны 206 207 нм;

титр 1 600 в реакции преципитации.

Внешне вакцина представляет аморфный порошок светло-желтого цвета с зеленоватым оттенком, хорошо растворимый в изотоническом растворе хлорида натрия. При введении 10-кратной иммунизирующей дозы годовикам карпа не вызывает никаких патологических симптомов.

Штамм *A. sobria* выделен из паренхиматозных органов белого толстолобика с клиническими признаками заболевания, депонирован в Коллекции микроорганизмов ГНКИ с регистрационным номером КРК 1-1983 ДЕП, характеризующийся следующими свойствами.

Морфологические и культуральные свойства.

Вегетативные клетки. При культивировании на эритроцит-агаре при 25 - 26°C бактерии палочковидной формы, концы закругленные, грамотрицательные, не кислотоустойчивые. Спор и цист не образуют.

На эритроцит-агаре через 18 20 ч колонии размером 1 1,5 мм, круглые, выпуклые с ровным краем, консистенция вязкая, S-форма, кремовато-белые, полупрозрачные. На среде Риппея-Кабелли через 18 20 ч аналогичные колонии желто-оранжевого цвета.

На мясо-пептонном бульоне при тех же условиях культивирования равномерное помутнение среды, нежная тонкая пленка.

Физиологические и биохимические свойства.

Хемогетерографы, используют в качестве источника углерода различные сахара и органические кислоты. Факультативный анаэроб.

Сбраживает до кислоты и газа: маннит, мальтозу, галактозу, трегалозу, рибозу, фруктозу. Не усваивает: рамнозу, салицин, сорбит, дульцит, ксилозу, адонит, раффинозу, целлобиозу, мелицитозу, D- и L-арабинозу, инозит, инулин, сорбозу. 5
Образует газ на среде с глюкозой и глицерином, замедленно сбраживает лактозу, растет на цитратной среде Симмонса, не растет на среде с мочевиной по Христенсу, вызывает редукцию нитратов, в реакции Фогеса-Проскауэра и с метиловым красным отрицательный, резистентный к вибриостатическому агенту 0/129.

10 Гидролизует желатин, крахмал, казеин, твины 20, 21, 40, 60, 65, 80 и 85. Не растет на среде с цианистым калием, не обладает гиалуронидазой и плазмокоагулазой, обладает β -гемолизинном, бутандиолдегидрогеназой, b-галактозидазой, фенилаланиндезаминазой, декарбоксилазой /ДНКазой/, образует индол.

15 В составе цитоплазматических белков штамма методом электрофореза в полиариламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия выявлено до 40 белковых компонентов. На фракцию с мол. мас. $57 \pm \text{кДа}$ приходится от 17% и выше от суммы белков на электрофореграмме. Концентрация этого белка у авирулентного штамма менее 10% от общей суммы белков.

Ферментный состав.

20 Отличительная особенность протеолитическая активность в широком диапазоне pH /4,0 9,0/ с максимумом в нейтральной зоне /7,0 7,2/. Протеолитическая активность непатогенного штамма 78 18 проявляется в узкой зоне значений pH /7,1 7,6/. Активность нейтральной протеиназы в 3,5 раза выше таковой у авирулентного штамма.

Жирнокислый состав.

25 Методом газо-жидкостной хроматографии установлено, что в липидах штамма уровень жирных кислот с нечетным числом атомов углерода в 2 7 раз выше, чем у штамма 78 16, при этом содержание кислот с 17 углеродными атомами не менее 8% от суммы всех жирных кислот. Указанная закономерность сохраняется независимо от среды выращивания микроорганизма.

30 Штамм 77 18 /КРК 1-1983-ДЕП/ обладает вирулентными свойствами. $\text{ЛД}_{100} - 9,55 \cdot 10^7$. Вызывает 100%-ную гибель рыбы при внутримышечном введении в течение 3 4 ч без развития клинических признаков. С данным штаммом впервые получена положительная биопроба контактным способом.

35 Пример 1. Получение бактериальной массы. Для получения матровой расплодки штамм *A. sobria* засевают во флаконы емкостью 100 мл, наполненные на 3/4 жидкой средой /МПБ/ и инкубируют в термостате при 25° в течение 18 ч.

Матровая расплодка бактерий засеивается в стеклянные матрасы емкостью 1,0 2,0 л на плотную среду эритрит-агар. Выросшую бактериальную массу смазывают охлажденной до 4-5°С дистиллированной водой.

40 Получение внутриклеточного содержимого из бактериальной массы.

45 Бактерии осаждают путем центрифугирования /2700 об/мин, 150 мин/. Разрушение бактериальных клеток осуществляется методом десятикратных замораживаний оттаиваний. Осаждение бактериальных оболочек и осветление раствора внутриклеточных белков проводят центрифугированием при 2700 об/мин/ в течение 2,5 ч.

50 Сливают супернатант с осадка и растворяют в нем сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 80%-ного насыщения. Раствор отстаивают в холодильнике при 0-4°С 15 20 ч для формирования белкового осадка, затем центрифугируют в таком же режиме. Осадок растворяют в буферном растворе 0,05 М трис-НСI, pH 6,0; 0,2 М КСI и концентрируют на фильтрационной ячейке через мембрану UM 30.

Концентрат наносят на колонку $K_{50}/100$, заполненную сефадексом Г-100, и разделяют на фракции, регистрируя их выход на проточном фотометре Uvicoid.

Отбирают фракцию, выходящую под N 2, и содержащую белки с мол. мас. 50 - 70 кДа. Изoeлектрическую точку отобранной фракции, определенную методом

изоэлектрофокусирования при ионной силе 0,3 и носителях типа амфолит, а максимум поглощения в УФ-спектре /в метаноле/, наблюдали при длине волны 206 207 нм.

Собранную фракцию концентрируют на мембранном фильтре UM-30 и лиофилизируют до сухого состояния. Сухой порошок развешивают по флаконам и запечатывают.

Производственные испытания проводили в Молдаве зоне наиболее неблагоприятной по аэромонозу и сложной в экологическом отношении.

Годовикам карпа породной группы фресинет чешуйчатый и рамчатый весной внутрибрюшинно была введена вакцина 50 мкг/рыбу в 0,4 мл изотонического раствора хлорида натрия. Проинъецированная рыба без травм и признаков инфекционных заболеваний. Параллельно с инъецированием проведен отбор контрольной рыбы для бактериологических исследований. От 7 из 10 карпов выделены различные микроорганизмы 2 3-х типов, в том числе аэромонады из печени и селезенки. По характеру ДНКазной активности выделены аэромонады характеризовались как слабовирулентные /3 культуры с зоной деполимеризации ДНК 1 2 мм/ и высоковирулентные /8 штаммов с зоной деполяризации ДНК 4 6 мм/. 2 штамма с ДНКазной активностью 1 2 мм были идентифицированы как *A. punctate subsp. punctate*, 9 как *A. hydrophila subsp. hydrophila*.

В этом же хозяйстве аналогичным способом была проведена весенняя вакцинация карпов ремонтной группы фресинет чешуйчатый и рамчатый.

При облове осенью эффективность вакцинации учитывали по наличию или отсутствию язв и рубцов /табл.1/.

Пример 2. Получение вакцины и вакцинацию проводили аналогично примеру 1. В том же хозяйстве весной 1991 г. проведена иммунизация годовиков карпа породной группы фресинет чешуйчатый и рамчатый и КВП /куболтский второго поколения/ во время начавшейся вспышки аэромоноза /около 50% рыб было с язвами/. Для облегчения последующего учета для вакцинации рыбу отбирали без клинических признаков. При контрольном бактериологическом исследовании воды и рыбы с клиническими признаками без таковых обнаружены аэромонады, обладающие высокой вирулентностью. В воде 1400 КОЕ/мл воды /колониеобразующих единиц/, от рыб с клиническими признаками из паренхиматозных органов аэромонады выделялись практически в чистом виде, от рыб без клинических признаков аэромонады и другие сапрофитные микроорганизмы. При бактериологическом исследовании печени в июле аэромонады у иммунизированных рыб не были обнаружены. В то же время у иммунизированных выделено сарофитов 5 КОЕ/2 мг печени, у неиммунизированных 14 КОЕ/2 мг печени. В сентябре пруд был полностью спущен, вся рыба обловлена и просмотрена. При клиническом осмотре учитывали наличие рубцов, что свидетельствовало о перенесенном заболевании, и язв /табл. 2/.

Пример 3. Получение вакцины проводили, как указано в примере 1. В ноябре 1991 г. была проведена вакцинация канального сома ремонтно-маточной группы в Приднепровском хозяйстве, в котором отмечали значительный отход рыбы от септического заболевания, сопровождавшегося сильным поражением кишечника. Бактериологические исследования воды, паренхиматозных органов пораженных рыб и содержимого кишечника выявили разнообразную микрофлору от 5 до 7 видов микроорганизмов: высоковирулентные аэромонады, энтеробактерии / *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Gitrobacter*, /, стафилококки, неферментирующие бактерии. В тяжелых случаях стенка кишечника была буквально расплавлена.

Основной массе рыб провела инъецирование раствора левомицетина /20 мкг/кг веса/, 400 экз. провакцинировали /50 кг/рыбу/, 100 экз. контроль. Вся опытная /0/ и контрольная /К/ была посажена в один бассейн площадью 200 м² вместе с рыбой, инъецированной левомицетином /К_л/. Повторные бактериологические исследования показали значительную бактериальную обсемененность воды бассейна /376 тыс. КОЕ/мл/. При этом среди бактерий присутствовали бактерии *Pseudomonas capsulata* возбудитель псевдомоноза рыб. Микуробиоценоз содержимого кишечника был представлен в основном

энтеробактериями, в меньшем количестве аэромонадами, псевдомонадами, стафилококком. У рыб контрольной группы и инъецированной раствором левомицетина бактериальные ассоциации выделялись и из паренхиматозных органов, что свидетельствовало о снижении резистентности рыбы. Причем среди K_n гибель единичных особей началась уже в декабре.

При контрольном исследовании рыбы в августе у рыб с клиническими признаками /сильное вздутие брюшка, гиперемия и выпячивание анального отверстия/ патолого-анатомические признаки были такие же, как при первичном исследовании поражение паренхиматозных органов, расплавление стенок кишечника. При исследовании рыбы всех трех групп опытной, контрольной и инъецированной левомицетином без клинических признаков у рыб групп К и K_n отмечали отечность и легкую гиперемию слизистой кишечника, рыхлость, кровенаполненность паренхиматозных органов. У рыб группы 0 при наличии аналогичной микрофлоры в содержимом кишечника никаких патолого-анатомических изменений не было отмечено. В декабре 1992 г. был проведен полный облов и учет полученных результатов /табл. 3/.

Пример 4. В июне 1992 г. проведена вакцинация 150 экз. годовиков радужной форели при T° воды 18°C . Рыба была отсажена в отдельный садок и содержалась в соответствии с рыбоводными требованиями.

Для экспериментального заражения рыба опытной и контрольной групп была перевезена в аквариальную НИИ. Заражение проводили внутримышечно суточной бульонной культурой возбудителя фурункулеза лососевых *A. salmonicida*. У рыб контрольной группы вздутие в месте инъекции появилось уже через 18 ч. Гибель началась на 4-6 сутки. В опытной группе клинические проявления были отмечены на 2-3 сутки, первая рыба погибла на 8-е сутки, затем с интервалом один-два дня еще 2 и 3. Всего в контрольной группе погибло 48,2% рыб, в опытной 4%

Полученные результаты свидетельствуют не только о высокой эффективности вакцины против аэромоноза, вызываемого подвижными аэромонадами, но и о протективном действии при бактериальной геморрагической септицемии, вызываемой комплексом микроорганизмов, и при фурункулезе лососевых.

Формула изобретения

Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб, отличающаяся тем, что содержит антиген, характеризующийся следующими признаками: выделен из штамма бактерий *Achromonas sobria* ВГНКИ N КРК 1-1983-ДЕП; цитоплазматические белки мол. м. 50 70 кДа (при определении методом электрофореза в полиакриламидном геле), изоэлектрическая точка 4,6 - 5,3 (при определении методом изоэлектрофокусирования при ионной силе 0,3 и носителе типа амфолит), максимум поглощения в УФ-спектре (в материале) при длине волны 206 207 нм, титр 1:600 в реакции преципитации.

Результаты вакцинации годовиков и карпов ремонтно-маточной группы
весной 1991 г. /Молдова/

Группа рыб	Под-группа	Годовики			Ремонт		
		К-во рыб	С клинич. призна-ми /в %%/	Без клин. призна-ов /в %%/	К-во рыб	С клинич. призна-ми /в %%/	Без клинич. призна-ков /в %%/
Фре-синет чешуйчатый	К	125	68,7 / 2,1	39,2	100	77,7 / 2,3	20,0
	О	125	19,2 / 0	80,0	100	22,0 / 0	78,0
Фре-синет рамчатый	К	125	66,6 / 1,5	31,9	100	59,7 / 9,6	30,7
	О	125	15,1 / 0	84,9	100	3,7 / 0	96,7

Примечание: в числителе - % рыб с рубцами, в знаменателе - с язвами.
К - контроль, О - опыт.

Т а б л и ц а 2

Результаты вакцинации годовиков карпа весной 1991 г. /Молдова/

Группа рыб	Под-группа рыб	К-во рыб	Средняя навеска /в г/		С клинич. призна-ками /в %%/	Без клинич. призна-ков /в %%/
			при посадке	при облове		
Фре-синет чешуйчатый	К	50	60	573	70,3	29,7
	О	50		614	11,8	88,2
Фре-синет рамчатый	К	100	100	545	51,7	48,3
	О	100		590	13,6	86,4
КВП	К	100	95	686	62,2	37,8
	О	100		851	14,6	85,4

Результаты вакцинации канального сома ремонтной группы осенью 1991 г.
/Приднестровское р/х/

Группа рыб	К-во рыб	Из них погибло	
		Всего	в %%
Контрольная /К/	100	29	29,0
Вакцинированная /О/	400	0	0
Инъецированная левометином /К _л /	2500	134	5,36