

В. Л. ВЛАДИМИРОВ

**ПРИОБРЕТЕННАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ
У КАРПА ПРИ КРАСНУХЕ — ИНФЕКЦИОННОМ
ЗАБОЛЕВАНИИ РЫБ**

(Представлено академиком Б. Е. Выховским 17 V 1971)

Факторы приобретенного иммунитета у рыб — антителообразование и аллергические реакции — за последние годы неоднократно являлись предметом тщательно проведенных исследований. Так, уже изучены закономерности проявления антителообразовательной функции в зависимости от филогенетического уровня развития рыб, их индивидуальных (возраст, степень половой зрелости, упитанность) и видовых особенностей, температурного фактора, от характера, дозы и длительности антигенного раздражения; установлен тип аллергической реактивности у рыб (¹). Оказалось, что факторы приобретенного иммунитета у рыб во многом сходны с таковыми теплокровных, но они менее выражены и, что главное, в своем проявлении зависят и от температурных условий среды.

Однако изучение этих факторов проводилось в основном при моделировании инфекционного процесса — иммунизации здоровых рыб различными авирулентными антигенными веществами или неспецифическими условнопатогенными агентами (гетерогенные сыворотки и эритроциты крови, гемоцианин, микробы *Aeromonas punctata*, вирусы гриппа, паратрипозный вирус, бактериофаги).

Между тем моделирование инфекционного процесса позволяет выявить только самые общие и приблизительные, но отнюдь не конкретные закономерности иммунологической защиты макроорганизма, которые имеют место исключительно лишь при его специфических заболеваниях.

Работы, посвященные изучению приобретенного иммунитета у рыб при специфичных для них инфекционных болезнях, крайне немногочисленны и круг поднятых в них вопросов весьма ограничен. В этих работах в основном приводятся результаты эпизоотологических наблюдений о возникновении повышенной невосприимчивости у инфицированных рыб после выздоровления и у здоровых особей после вакцинации (²⁻⁶). О характере же проявления самих защитных механизмов приобретенного иммунитета можно пока судить лишь по нижеследующему: титрам сывороточных агглютининов у форели при фурункулезе; титрам сывороточных противовирусных антител у карпа при краснухе; сезонной динамике сывороточных антител у пораженных краснухой карпов к микробу *Aeromonas punctata* — возбудителю вторичной инфекции (⁶⁻⁸).

Таким образом, форма и длительность приобретенного иммунитета у рыб при инфекционных заболеваниях, роль, динамика и взаимосвязь его факторов — антителообразования и аллергических реакций в инфекционном процессе еще не были предметом экспериментального изучения. Решение этих вопросов и явилось задачей данного исследования.

Объектом исследования послужил приобретенный иммунитет у карпа при краснухе — инфекционном заболевании, широко распространенном в прудовых хозяйствах СССР и Западной Европы и наносящем существенный экономический ущерб. Факторы естественного иммунитета у рыб при

этом заболевании были изучены ранее (⁹). Работа проводилась в 1968—1969 гг. на базе Центральной экспериментальной станции нашего института «Ропша» Ленинградской обл.

В опытах участвовало 1218 экз. двухлеток ропшинского гибрида карпа (каrp × амурский сазан) весом 80—90 г со средним коэффициентом упитанности, представляющих собой одну и ту же генетическую линию и не подвергавшихся ранее каким-либо инфекционным заболеваниям.

Обследованию подвергались рыбы как при естественном, так и экспериментальном заражении. Естественное инфицирование здоровых особей проводилось при совместном содержании их с уже пораженными краснухой карпами. Экспериментальное заражение осуществлялось интрацеребральным инъектированием возбудителя болезни в дозе по 0,1 DL₅₀.

Возбудитель краснухи для экспериментальных заражений добывался из мозга, сыворотки крови и экссудата от производителей и ремонта, больных острой формой. Методы его получения, очистки, концентрации и длительного сохранения будут описаны отдельно.

Определение доз возбудителя проводилось по методу кумулятивной детальности (¹⁰) на двухлетках.

Наличие и интенсивность синтеза тканевых и сывороточных антител выявлялось с помощью реакций нейтрализации (рН), длительного связывания комплемента (р.д.с.к.), пассивной гемоагглютинации (р.п.г.а.), торможения гемоагглютинации (р.т.г.а.) и бактериально-вирусной агглютинации (б.в.а.) с использованием 0,5% взвеси эритроцитов барана при р.д.с.к., р.п.г.а. и р.т.г.а. и взвеси микробов *Bacterium prodigiosum*, штамм № 17, спонтанно не агглютинирующегося в инактивированных нативных сыворотках карпа при б.в.а. Методы получения антисыворотки для рН были уже описаны (⁹). Тип и степень проявлений аллергических реакций у инфицированных рыб устанавливались путем внутрисердечных и подкожных инъекций различных доз аллергена.

Подготовка соответствующих реагентов и постановка вышеперечисленных серологических реакций осуществлялись по общепринятым методам, широко применимым в медицинской и ветеринарной практике (¹¹), с одной, правда, существенной в данном случае, модификацией: сыворотки крови рыб, когда это предусматривалось ходом постановки реакций, прогревались при 56° для инактивации комплемента и гемолизина в течение 30 мин., как это принято для сывороток теплокровных, а только 5 мин. Такого 5-минутного прогрева оказалось достаточно для полного разрушения комплемента и гемолизина рыб. Вместе с тем столь короткий срок прогрева еще не вызывает заметного снижения титров сывороточных антител, которые у рыб весьма термолабильны.

Подопытная рыба содержалась в небольших прудиках, разнообразных бассейнах, садках и аквариумах и регулярно подкармливалась.

Каждый численный результат получен для ≥ 25 экз. рыб.

У двухлетков, переболевших острой формой краснухи, возникает абсолютный постинфекционный иммунитет, сохраняющийся у некоторых особей не менее года. Так, переболевшие в июне двухлетки, выздоровевшие и не показывающие в дальнейшем клинических признаков болезни, при совместном содержании их с особями, еще больными острой формой, инфицируются повторно и проявляют типичную клинику заболевания в основном лишь по истечении одного года. Но и через год после первично перенесенной болезни еще имеются особи — до 33,3% от числа переболевших, — сохраняющие абсолютную иммунологическую резистентность к краснухе и не подверженные ни естественному, ни экспериментальному инфицированию (табл. 1).

У карпов, пораженных краснухой, выявлены не только сывороточные антитела, что было известно и ранее (⁸), но и еще незарегистрированные для рыб тканевые антитела. Последние с достоверностью обнаружены

только в мозгу. Тканевые антитела при 20—22° появились на 6 сутки после экспериментального заражения, сывороточные антитела — на 10 сутки.

Пик антителообразования наблюдался у сывороточных антител — при острой форме, а у тканевых — при хронической форме течения краснухи. Для сывороточных антител при начальной форме заболевания он составлял $1/6 \pm 12\%$, при острой $1/128 \pm 16\%$, при хронической $1/96 \pm 12\%$; для тканевых антител: при начальной форме заболевания $1/4 \pm 9\%$; при острой $1/32 \pm 16\%$, при хронической $1/48 \pm 28\%$. В каждой группе обследовано не менее 25 экземпляров рыб, всего 78 экземпляров; $t = 20-22^\circ$. Максимальные титры антител у естественно зараженных двухлеток в зависимости от метода определения составили:

Метод определения	р. т. г. а.	р. п. г. а.	р. д. с. к.	б. в. а.
Тканевые антитела	$1/256$	$1/256$	$1/64$	$1/93$
Сывороточные антитела	$1/4096$	$1/2048$	$1/256$	$1/512$

Если сывороточные антитела исчезают к зиме и весной вновь не появляются, то тканевые антитела у некоторых карпов сохраняются подчас свыше года без существенного снижения количественных показателей (табл. 2). Это свидетельствует о так называемом эффекте «неразведения» иммунитета, весьма характерном для нейротропных возбудителей заболеваний и у теплокровных. Именно длительность сохранения противовирусных антител в клетках нервной ткани у переболевших особей, в данном случае у карпов при краснухе, и обеспечивает последним продолжительность приобретенной иммунологической невосприимчивости к повторному заболеванию.

И тканевые, и сывороточные антитела обладают четко выраженными вируснейтрализующими свойствами.

Тканевые комплементосвязывающие антитела с титром $1/64$ способны инактивировать 28 ± 3 дозы DL_{50} пативного возбудителя краснухи. Смесь тканевых антител в такой концентрации со 100 дозами DL_{50} возбудителя была инкубирована в течение 1 часа при 24°, после чего с помощью метода кумулятивной летальности устанавливался уровень инфекционности этой смеси. Он оказался равным уже не 100 DL_{50} как ранее, а $72 \pm 3DL_{50}$. Подобным же нейтрализующим действием обладают и сывороточные антитела.

Сывороточные антитела у карпа высокоспецифичны. В р.д.с.к. они реагируют с гетерологичными антигенами, например с инактивированным вирусом гриппа, в разведениях, не превышающих $1/4-1/6$, тогда как с гомологичным антигеном та же сыворотка показывает титр $1/64$. Тканевые антитела несколько менее специфичны.

Анафилактические реакции при краснухе у карпов не проявляются. Даже при наивысшей степени синтеза сывороточных антител внутрисердечные инъекции 2 доз DL_{50} полностью инактивированного возбудителя не вызывают шокового состояния и гибели подопытных рыб. Имеет место лишь временная, на 1—2 часа, потеря координации движений, учащение дыхания в 1,5—2 раза (судя по движению жаберных крышек), подергивание плавников. Реакции же замедленного действия типа туберкулиновой пробы выражены при краснухе у карпов достаточно четко, при этом

Поражаемость краснухой двухлеток карпа, ранее переболевших уже этим заболеванием, в зависимости от срока после выздоровления (процент к числу инфицируемых *)

Способ заражения	1 мес.	4 мес.	12 мес.
Естественные у переболевших у контрольных	0 $68 \pm 9,4$	0 $56 \pm 9,9$	$64 \pm 9,5$ $84 \pm 7,0$
Экспериментальное у переболевших у контрольных	0 $80 \pm 8,0$	$4 \pm 3,9$ $64 \pm 9,5$	$56 \pm 9,9$ $84 \pm 7,5$

* В каждой группе участвовало не менее 25 экземпляров рыб, всего 318 экземпляров.

Титры комплементсвязывающих антител у пораженных краснухой двухлеток карпа после выздоровления и при содержании их в естественных условиях*

Вид антител	1968 г.				1969 г.		
	июнь (18,1°)	август (16,2°)	октябрь (6,5°)	декабрь (2,0°)	февраль (2,0°)	апрель (4,1°)	июнь (17,2°)
Сывороточные	1/128 ±16 **	1/128 ±12	1/32 ±16	1/2 ±11	0	0	0
Тканевые	1/32 ±38	1/48 ±28	1/48 ±36	1/32 ±60	1/24 ±47	1/24 ±60	1/18 ±90

* Высыпка краснухи произошла в первой половине июня 1968 г.; клиническое выздоровление закончилось в августе того же года; одновременно обследовалось не менее 25 экз. рыб.
** Отклонение от средней арифметической выражено в процентах.

степень проявления этих реакций находится в определенной связи с синтезом сывороточных антител.

В индуктивный период антителообразования (с 1 по 8 сутки после экспериментального заражения) подкожное инъецирование 0,01 DL₅₀ дозы инактивированного агента еще не вызывает явлений, характерных для аллергической реактивности замедленного действия. При появлении сывороточных комплементсвязывающих антител в титре 1/8 — 1/16 после подкожного инъецирования вышеуказанной дозы возбудителя уже на 2—3 сутки в месте укола появляется небольшой, до 2—3 мм в диаметре, отек и наблюдается слабая гиперемия кожи. С нарастанием титров сывороточных антител такого рода признаки приобретают все более четкий характер. При оптимуме антителообразования отек может достигать диаметра 8—12 мм и сопровождаться сильной гиперемией и некрозом кожных покровов у подопытных особей. С падением титров антител, когда наступает, вероятно, сферная частичная, а затем и полная десенсибилизация макроорганизма, аллергические реакции этого типа проявляют себя все слабее и к зиме полностью исчезают.

Кожная аллергическая проба при краснухе специфична. Инактивированный вирус гриппа, использованный в качестве аллергена, не вызывает у сенсibilизированных возбудителем краснухи двухлеток каких-либо типичных признаков аллергической реактивности замедленного действия.

Таким образом, можно считать установленным, что абсолютная иммунологическая резистентность карпа к краснухе обеспечивается в основном двумя защитными факторами: при естественной невосприимчивости — неспецифическими противовирусными ингибиторами сыворотки крови⁽⁹⁾; при приобретенной невосприимчивости — преимущественно специфическими тканевыми антителами, поскольку именно они, а не сывороточные антитела сохраняются у переболевших особей в течение длительного срока.

Государственный научно-исследовательский
институт озерного и речного рыбного хозяйства
Ленинград

Поступило
25 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. И. Лукьяненко, Иммунология рыб, Киев, 1970. ² Н. М. Аршаница, Изв. Гос. н.-и. инст. озерн. и речн. рыбн. хоз., 69 (1969). ³ А. К. Щербина, Болезни рыб и меры борьбы с ними, Киев, 1960. ⁴ Г. Д. Гончаров, Рыб. хоз., 4 (1949). ⁵ G. E. Krantz, J. M. Redecliff, C. E. Heist, Fish-Culturist, 26, 2 (1964). ⁶ W. Schäperclaus, H. Mann, Zs. Fisherei, 37 (1939). ⁷ G. E. Krantz, J. M. Redecliff, C. E. Heist, Fish-Culturist, 26, 1 (1964). ⁸ Г. Д. Гончаров, Тр. Всесоюзн. н.-и. инст. морск. рыбн. хоз. и океаногр., 19 (1951). ⁹ В. Л. Владимиров, ДАН, 202, № 4 (1972). ¹⁰ L. J. Reed, H. A. Muench, Am. J. Hyg., 27 (1938). ¹¹ М. О. Биргер, Справочник по микробиологич. и вирусологич. методам исследования, М., 1964.