

АВТОГЕНА ВАКЦИНАЦИЈА ЗА КОНТРОЛА НА ЈЕРСИНИОЗАТА (YERSINIOSIS SALMONIS) ВО САЛМОНИДНАТА АКВАКУЛТУРА ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Цветковиќ Александар¹, Христовски Мишо¹, Стојановски Стојмир²,
Мреношки Славчо³, Цветковиќ Искра³

¹Каџедрa за биологија и пaтoлoгија на риби, пчели и дивеч,

Факултeт за ветеринарна медицина - Скопје,

²Хидробиолошки завод, Р. Македонија,

³Каџедрa за микробиологија и имунологија,

Факултeт за ветеринарна медицина - Скопје

e-mail: acvetkovic@fvm.ukim.edu.mk

АБСТРАКТ

Целта на истражувањето беше да се произведе автогена вакцина од изолати на *Yersinia ruckeri* и да се истражи нејзината ефикасност во итеренски услови.

Колонии на *Yersinia ruckeri* биотипот 1 изолирани од калифорниска пастрмка со знаци на хеморагична септикемија беа култивирани во TSB и инактивирани со формалин. Подготвената вакцина беше разредена и аплицирана со имерзија на помладок од калифорниска пастрмка со просечна маса од 4,5 g во вакциналната суспензија. Дваесет и осум дена по вакцинацијата беше спроведена веештачка инфекција со имерзија на рибите во инфективна суспензија од истиот изолат. Смртноста на контролните риби беше 87%, а на вакцинираните 11%. Добиените релативни проценти на преживување од 87,4% укажува на висок степен на специфична ефикасност кај вакцинираните единки.

Клучни зборови: *Yersinia ruckeri*, калифорниска пастрмка, вакцинација, веештачка инфекција

ВОВЕД

Јерсиниозата (болест на црвени усни, црвена болест на црвена уста) е една од најважните болести кај фармски одгледувани и диви салмонидни видови риби насекаде во светот. Претставува бактериско, акутно до хронично заболување кое се манифестира со хиперемии и хеморагии на главата (12). Прво известување за појава на болеста во 1955 год. дал Rucker (25) и во негова чест од страна на Ewing и сор. (10), причинителот е наречен *Yersinia ruckeri*. Болеста е раширена во целиот свет каде има интензивно одгледување на салмонидни видови риби, а во Република Македонија прва изолација и идентификација е направена од страна на Markis и сор. (18) во 1999 год. кај помладите категории

· калифорниска пастрмка во полносистемски
· пастрмски рибник во околината на Кичево.

· Присуството на јерсиниозата во
· пастрмските рибници може успешно да се
· држи под контрола со примена на
· хемотерапевтици. Како резултат на нивната
· интензивна примена се јавува се поголема
· резистенција на причинителот, значително се
· поскапува производството и се јавуваат
· недозволени остатоци во месото на
· конзумните риби. Од тие причини, најдобар
· начин за превентива на болеста е добрата
· одгледувачка пракса и вакцинацијата на
· рибите во рибниците каде болеста е
· ендемична или постои ризик од нејзина појава
· (2, 9, 12, 20).

· Јерсиниозата е една од првите болести кај
· рибите за која е пронајдена ефикасна

профилактика со вакцинација и прва болест за која е произведена комерцијална вакцина (21, 22, 29). Прва успешна експериментална вакцинација е извршена во 70-те години од минатиот век, а за методот за подготовка на ваксината известуваат Ross и Klontz (24). Croy и Amend (8) први успешно примениле вакцинација против вибриозата со формалински препарат и метод на краткотрајно потопување. Истата постапка е усвоена и во имунопрофилактиката на јерсиниозата (9). Денес постојат голем број производители на комерцијални вакцини против јерсиниозата кај салмонидите. Најголем дел од нив се базирани на формалинска инактивација на бујонска култура од причинителот и апликација на ваксината со краткотрајно потопување на рибите во разредена вакцинална суспензија (2, 20, 27). И покрај постоењето на комерцијални вакцини, новите истражувања укажуваат на постоење на нови групи на причинителот против кои истите не покажуваат ефект. Од тие причини, најдобро е вакцинацијата против јерсиниозата да се изведува со вакцина добиена со инактивација на добиениот изолат (2, 3).

Во Република Македонија јерсиниозата е присутна само на еден рибник и нанесува значителни економски штети на производството. За да се држи под контрола, во рибникот се користат исклучиво антибиотици кои покажуваат варијабилан успех (12, 18).

Целта на трудот беше, за прв пат во Република Македонија, да се произведе вакцина добиена од наш изолат на *Yersinia ruckeri* и да се тестира нејзината ефикасност во теренски услови.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

● Подготовка на ваксината

За подготовка на ваксината беа користени колонии на *Yersinia ruckeri* биотип I изолирани од калифорниска пастрмка со знаци на хеморагична септикемија. Од изолатот на *Yersinia ruckeri* беше пресамена свежа култура на триптозен соја агар (TSA, Oxoid) и инкубирана на 25°C за време од 48 часа. Сите израснати колонии беа суспендирани во 500 ml триптозен соја бујон (TSB, Fluka) и инкубирани на 25°C за време од 48 часа. По истекот на инкубацијата, бактериските клетки во бујонот беа инаktivирани со додавање 1.5 ml (0,3% (v/v)) формалин и дополнителна инкубација од 48 часа на 25°C.

Стерилноста на добиениот препарат беше проверена со инокулација на 1 ml од

инаktivираниот бујон на крвен и триптозен соја агар инкубирани на 25°C за време од 72 часа.

● Вид на риба и услови на чување

Експериментот беше спроведен со подмладок на калифорниска пастрмка (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) со просечна маса од 4,5 g набавен од рибник во кој не беше утврдено присуство на *Y. ruckeri*.

Рибата беше чувана во базен на комерцијален пастрмски рибник преграден со мрежа на два дела со волумен од по 1,5 m³. И во двата дела од базенот беа насадени по 120 единки (вкупно 240). Рибите во горниот преграден дел ја претставуваа вакционалната група, а рибите во долниот дел, контролната.

Условите на чување беа - проток на вода 5 l/s, температура на вода 15,5°C и концентрација на кислород 8,7 mg/l. Исхраната беше со комерцијална екструдирани храна за пастрмки, согласно упатството на производителот.



Слика 1. Подготвени базени за населување



Слика 2. Населување на подмладокот

● Вакцинација на рибиџе

Вакцинацијата беше спроведена 21 ден по населувањето на подмладокот. Поради појавата на неспецифична смртност како резултат на манипулативниот стрес и едноставна калкулација на резултатите, по 20 единки и од двете групи беа отстранети од експериментот.

Подготвената вакцина во количество од 200 ml, во посебен пластичен сад беше разредена со 1800 ml вода од рибникот (1:10). Во вака подготвената суспензија, рибите од вакциналната група беа потопувани за време од 30 sec. Вкупно беа вакцинирани 100 единки. Рибите од контролната група (n=100) беа потопувани само во вода од рибникот.

Со цел спречување на послабиот имунолошки одговор поради стресот предизвикан од манипулацијата при вакцинацијата, рибите и во двете групи не беа хранети еден ден пред експериментот.



Слика 4. Вакцинација на подмладокот

● Тестирање на ефикасноста на вакцината

Вештачката инфекција беше спроведена 28 дена по вакцинацијата. Експерименталната инфективна доза ($\sim 1-2 \times 10^8$ CFU/ml = 0,5 McFarland standard) беше подготвена од 48 часовна култура на *Y. ruckeri* одгледана во триптозен соја бујон на температура од 25°C. Подготвената култура беше разредена со вода од рибникот во однос 1:20 (1 l култура + 19 l вода). И вакцинираната и контролната група риби беа потопувани во времетраење од 60 min. во разредената култура на *Y. ruckeri* со постојана аерација. По инфекцијата, рибите беа набљудувани за време од 21 ден.

Во тој период, сите угинати риби и рибите со изразени клинички симптоми на јерсиниоза беа отстранувани од рибникот и тестирани на присуство на *Y. ruckeri*.

Ефикасноста на вакцината беше утврдена со пресметување на релативниот процент на преживување (РПП) на рибите по вештачката инфекција според следнава формула:

$$\text{РПП \%} = (1 - \text{А} / \text{Б}) \times 100$$

каде е

А- процент на угинати риби од вакциналната група

Б- процент на угинати риби од контролната група



Слика 3. Разредување на вакциналната суспензија



Слика 5. Вештачка инфекција на подмладокот

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите од тестирањето на ефикасноста на вакцината се прикажани во табелите 1 и 2.

Табела 1. Резултати од вештачка инфекција кај вакциналната група

Вкупен број единки	Број угинати единки	Морталитет (%)
100	11	11

Табела 2. Резултати од вештачка инфекција кај контролната група

Вкупен број единки	Број угинати единки	Морталитет (%)
100	87	87

Со замена на добиените вредности во формулата за одредување на релативниот процент на преживување се добива:

$$\text{РПП} = (1 - 11 / 87) \times 100 = 87,4 \%$$

Од податоците во табелите 1 и 2, следува дека процентот на преживување на рибите во вакциналната група изнесува 89%, а во контролната група 13%.

ДИСКУСИЈА

Резултатите од експериментот реализиран со цел тестирање на автогена вакцина како метод за сузбивање на јерсиниозата ги потврдуваат наодите на Rodgers (23) за оправданоста на вакцинацијата во рибниците каде болеста се јавува. Одредени искуства во производството на вакцина против јерсиниозата (24) се стекнати и пред причинителот да го најде своето место во систематиката на бактериите причинители на болести кај рибите (10), по кое следат опсежни истражувања за можностите на примена на разни техники на подготовка на вакцината и тестирање на нејзината ефикасност (1, 6, 7, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 22).

Во постапката на подготовка на вакциналниот препарат, за инактивација на бактериските клетки користевме само формалин согласно препораките на Austin и сор. (3) и Johnson и сор. (14). Amend и сор. (1) во подготовката на препаратот користеле бутанол-екстрахиран LPS антиген од бактериите и заклучиле дека имерзионата

·
· вакцинација со овој екстракт е исто ефикасна
· како и инактивацијата со формалин. Наве-
· дените автори укажуваат дека препаратите
· подготвени на ваков начин се безбедни за
· употреба и даваат одлични резултати кај риби
· потешки од 1 g.

· Резултатите од вештачката инфекција
· одговараат на резултатите на Johnson и сор.
· (15), Johnson и Amend (16), Newman и Majnarich
· (19) и Raida и Buschman (22). Овие автори во
· истражувањето на можностите за вакци-
· нација на салмонидните риби против
· јерсиниоза примениле и други методи на
· примена (i/p, туширање и спреј) во зависност
· од категоријата и телесната маса на рибите.
· Тие утврдиле дека вакцинацијата со
· потопување дава најдобри резултати кај
· рибите со тежина 4 - 6 g. Вештачката
· инфекција со имерзија на рибите го имитира
· природниот начин на заразување и треба
· секогаш да се применува при тестирање на
· ефикасноста на вакцината. Оваа експо-
· зициона техника најверојатно ги активира
· имуните механизми на површината на телото
· и кореспондира на мукозниот одговор (22).
· Применетиот метод за вакцинација и

вештачка инфекција на рибите со имерзија е оправдан со оглед на телесната тежина на рибите во експериментот, едноставноста на изведувањето и природниот начин на влегување на антигенот во организмот. Стекнатите искуства на други автори и високиот процент на заштитени риби во ова истражување укажуваат дека и покрај постоењето комерцијални вакцини за контрола на јерсиниозата, најдобро е вакцинацијата да се спроведува во рибник каде се појавува заболувањето со изолат добиен од истиот рибник. Austin и сор. (3) во истражувањата спроведени во Велика Британија утврдиле присуство на т.н. нова биогрупа на *Yersinia ruckeri* против која комерцијалните вакцини не покажале задоволителен ефект. За успешна имунопрофилактика, наведените автори произвеле автогена вакцина од репрезентативен изолат и постигнале релативен процент на преживување на вакцинираните риби поголем за 29% во однос

на комерцијалната вакцина.

Утврденото преживување на рибите во контролната група во која морталитетот изнесуваше 87%, потврди дека дозата за вештачка инфекција е правилно одредена (8, 15, 28) и овозможи да го пресметаме релативниот процент на преживување на рибите како единствено мерило за тестирање на вакцината. Добиената вредност за РПП од 87,4% значително ја надминува долната граница од 60% препорачана од Johnson и сор. (15), односно 70% како што наведува Ward (28) и укажува на висок степен на стекната специфична отпорност кај вакцинираните единки.

Споредено со другите методи на вакцинација на рибите, имерзијата т.е. потопувањето на рибите во вакцинална суспензија е метод на избор поради едноставната употреба и минималниот стрес кај вакцинираните единки.

AUTOGENOUS VACCINATION FOR CONTROL OF YERSINIOSIS (YERSINIOSIS SALMONIS) IN THE SALMONID AQUACULTURE IN REPUBLIC OF MACEDONIA

Cvetkovik Aleksandar¹, Hristovski Miso¹, Stojanovski Stojmir²,
Mrenoski Slavco³, Cvetkovik Iskra³

¹Department for biology and pathology of fish, honey bees and wildlife,
Faculty of Veterinary Medicine - Skopje

²Hydrobiological Institute, Republic of Macedonia

³Department for Microbiology and Immunology,
Faculty of Veterinary Medicine - Skopje

e-mail: acvetkovic@fvm.ukim.edu.mk

ABSTRACT

The aim of this study was to produce an autogenous vaccine from *Yersinia ruckeri* isolate and to test it's efficacy in field conditions.

Colonies of *Yersinia ruckeri* biotype I isolated from rainbow trout with haemorrhagic septicemia were cultivated in TSB and inactivated with formalin. The vaccine was diluted and administered by immersion of rainbow trout fry (~ 4.5 g BW) in the vicinal suspension. The experimental infection was done 28 days post vaccination by immersing the fry in infectious suspension of the same isolate. Mortality of the control and vaccinated fish was 87% and 11%, respectively. Vaccinated fish showed high level of gained specific resistance to the infection (RPS 87,4%).

Key words: *yersinia ruckeri*, rainbow trout, vaccination, experimental infection

ЛИТЕРАТУРА

- | | |
|--|---|
| 1. Amend D.F., Johnson K.A., Croy T.R. and McCarthy D.H. (1983) Some factors affecting the potency of <i>Yersinia ruckeri</i> bacterin. <i>Journal of Fish Diseases</i> 6, 337-344. | 6. Cipriano R. and Ruppenthal T. (1987) Immunisation of salmonids against <i>Yersinia ruckeri</i> : significance of humoral immunity and cross protection between serotypes. <i>Journal of Wildlife Diseases</i> 23, 545-550. |
| 2. Austin, B. and Austin, D. (2007) <i>Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish</i> , 4th ed. Praxis Publishing, Chichester UK, pp. 594. | 7. Cossarini-Dunier M. (1986) Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, <i>Salmo gairdneri</i> Richardson, after vaccination with <i>Yersinia ruckeri</i> bacterin. <i>Journal of Fish Diseases</i> 9, 27-33. |
| 3. Austin D.A., Robertson P.A.W. and Austin B. (2003) Recovery of a new biogroup of <i>Yersinia ruckeri</i> from diseased rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Walbaum). <i>Systematic and Applied Microbiology</i> 26, 127-131. | 8. Croy T.R. and Amend D.F. (1977) Immunization of sockeye salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. <i>Aquaculture</i> 12, 317-325. |
| 4. Bullock G.L. and Anderson D.P. (1984) Immunisation against <i>Yersinia ruckeri</i> , cause of enteric redmouth disease. In: de Klinkelin, P (ed.) <i>Symposium on Fish Vaccination</i> . OIE, Paris, pp. 151-166. | 9. Ellis E.A. (1988) <i>Fish Vaccination</i> . Academic Press Limited, London NW1 7DX. pp. 259. |
| 5. Cagiran H. and Tanrikul T. (1998) Testing the effectiveness of a <i>Yersinia</i> vaccine in infected and chemically treated juvenile rainbow trout | 10. Ewing E.W., Ross A.J., Brenner D.J. and Fanning G.R. (1978) <i>Yersinia ruckeri</i> sp.nov., the redmouth (RM) bacterium. <i>International Journal of Systematic Bacteriology</i> 28, 37-44. |

11. Furones D.M., Rodgers J.C. and Munn B.C. (1993) *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Rev. of Fish Diseases*, 105-125.
12. Христовски М. и Стојановски С. (2005) *Биологија, Одгледување и Болести на Рибите*. Национален форум за заштита на животните на Македонија, Скопје, стр. 370.
13. Jeremic S. and Andjelic D. (2000) Immersive vaccination of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*-Walbaum) with *Yersinia ruckeri* bacterin. *Acta Veterinaria* (Beograd) 50, 2-3, 77-82.
14. Johnson K.A., Flynn J.K. and Amend D.F. (1982a) Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *Journal of Fish Diseases* 5, 207-213.
15. Johnson K.A., Flynn J.K. and Amend D.F. (1982b) Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *Journal of Fish Diseases* 5, 197-205.
16. Johnson K.A. and Amend D.F. (1983a) Comparison of efficacy of several delivery methods using *Yersinia ruckeri* bacterin on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 6, 331-336.
17. Johnson K.A. and Amend D.F. (1983b) Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *Journal of Fish Diseases* 6, 473-476.
18. Markic Z., Hristovski M., Pejkoski C., Mrenoski S. and Davceva O. (1999) First isolation and identification of *Yersinia ruckeri* in Republic of Macedonia. Book of Abstracts, *Microbiologica Balcanica '99*, Plovdiv, Bulgaria.
19. Newmann S.G. and Majnarich J.J. (1982) Direct immersion vaccination of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), with a *Yersinia ruckeri* bacterin. *Journal of Fish Diseases* 5, 339-341.
20. Noga E.J. (2000) *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa 50014.
21. Plumb J.J. (1999) *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 50014, pp. 342.
22. Raida M.K. and Buchmann K. (2008) Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine* 26 (8), 1050-1062.
23. Rodgers C.J. (1991) The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 14, 291-301.
24. Ross A.J. and Klontz G.W. (1965) Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiologic agent of "Redmoutd Disease". *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 22, 713-719.
25. Rucker A.J. (1966) Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin del'Office International des Epizooties* 65, 825-830.
26. Tebbit G.L., Erikson J.D. and Vandewater R.B. (1981) Development and use of *Yersinia ruckeri* vaccines to control enteric redmouth disease. In: International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Fish Vaccines, Leetown, West Virginia. *Developments in Biological Standardisation* 49, pp. 395-401.
27. Tobback E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F. and Chiers K. (2007) *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 30, 257-268.
28. Ward P.D. (1982) The development of bacterial vaccines for fish. 47-58. in *Microbial diseases of fish*. ed. R.J. Roberts, Academic Press, London.
29. Woo P.T.K. and Bruno D.W. (1999) *Fish Diseases and Disorders Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CABI Publishing, Oxon OX10 8DE, UK, pp. 874.