

ДНК-ВАКЦИНАЦІЯ ОБ'ЄКТІВ АКВАКУЛЬТУРИ

С. О. Костенко
svitlanakasijan@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

Аквакультура, здійснюючи потужний внесок у виробництво продуктів у світі, повинна бути стійкою, екологічною та економічною. Ріст обсягів аквакультури нерозривно пов'язаний з проблемами спалахів інфекційних захворювань, оскільки вони викликають високу смертність, важкі економічні втрати й екологічні наслідки. Тому інтенсивна аквакультура нежиттєздатна без запобігання поширенню вірусів. За кілька років вакцинація стала найважливішим методом профілактики захворювань у аквакультурі. Ефективна профілактика, яка ґрунтується на стимуляції імунної системи риби, є необхідною для подальшого розвитку галузі. Перспективні результати, отримані при ДНК-вакцинації риб проти деяких видів інфекцій, дають надії на досягнення прогресу у цій галузі в майбутньому. Однак сучасні методи вакцинації мають певні недоліки, пов'язані з труднощами захисту мальків, обмеженнями використання різних методів введення вакцини, появою нових вірусів.

Глобалізація індустрії аквакультури призвела до відповідного збільшення кількості нових вірусів, які заражають водні організми. Ці нові вірусні збудники є викликом для використання традиційних клітинних культур та імунологічних аналізів з метою виявлення нових вірусів, оскільки для їх ідентифікації немає антитіл. Вірусна метагеноміка має потенціал для виявлення нових вірусів без попереднього знання їхніх даних про послідовність геному і може дати рішення для вивчення непридатних вірусів.

Оскільки популяції об'єктів аквакультури гетерогенні за резистентністю до інфекційних захворювань, пошук тварин, стійких до патогенів, є важливим напрямком сучасної науки. Іншим підходом до отримання стійких до інфекцій ліній є створення трансгенних організмів, здатних продукувати речовини, які покращують імунну відповідь.

Ключові слова: ДНК-ВАКЦИНАЦІЯ, АКВАКУЛЬТУРА, ВІРУСИ РИБ, ВВЕДЕННЯ ДНК-ВАКЦИН

AQUACULTURE OBJECTS DNA VACCINATION

S. O. Kostenko
svitlanakasijan@ukr.net

National University of Life and Environmental Science of Ukraine,
15 Heroyiv Oborony str., Kyiv 03041, Ukraine

Aquaculture, by making a powerful contribution to the production of products in the world, must be sustainable, ecological and economical. The growth of aquaculture volumes is inextricably linked with the outbreaks of infectious diseases, as they cause high mortality, severe economic losses and environmental impacts. Therefore, intensive aquaculture is not viable without preventing the spread of viruses. In a few years, vaccination has become the most important method of preventing diseases in aquaculture. Effective prevention based on the stimulation of the immune system of the fish is necessary for further development of the industry. The promising results of DNA vaccination of fish against some types of infections give hope for progress in this area in the future. However, modern vaccination methods have certain disadvantages associated with the difficulty of protecting fry, restrictions on the use of various methods of introducing a vaccine, the emergence of new viruses.

The globalization of the aquaculture industry has led to an increase in the number of new viruses that infect aquatic organisms. These detected viral pathogens have proven that they are a challenge for the use of traditional cell cultures and immunological analyzes to detect new viruses for the identification of no antibodies. Virus metagenomics has the potential to detect new viruses without prior knowledge of their genome sequence data and can provide solutions for the study of unsuitable viruses.

Since the populations of aquaculture objects differ in their resistance to infectious diseases, the search for animals resistant to pathogens is an important trend in modern science. Another approach to obtaining lines resistant to infection is the creation of transgenic organisms that can produce substances that improve the immune response.

Keywords: DNA VACCINATION, AQUACULTURE, FISH VIRUS, INTRODUCTION OF DNA VACCINES

ДНК-ВАКЦИНАЦІЯ ОБ'ЄКТОВ АКВАКУЛЬТУРИ

С. А. Костенко
svitlanakasijan@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природопольовання України,
ул. Героев Оборони, 15, г. Киев, 03041, Україна

Аквакультура, осущестляючи потужний вклад в производство продуктов в мире, должна быть устойчивой, экологической и экономической. Рост объемов аквакультуры неразрывно связан с проблемами вспышек инфекционных заболеваний, поскольку они вызывают высокую смертность, тяжелые экономические потери и экологические последствия. Поэтому интенсивная аквакультура нежизнеспособна без предупреждения распространения вирусов. За несколько лет вакцинация стала важнейшим методом профилактики заболеваний в аквакультуре. Эффективная профилактика, основанная на стимуляции иммунной системы рыбы, необходима для дальнейшего развития отрасли. Перспективные результаты, полученные при ДНК-вакцинации рыб против некоторых видов инфекций, дают надежды на достижение прогресса в этой области в будущем. Однако современные методы вакцинации имеют определенные недостатки, связанные с трудностями защиты мальков, ограничениями использования различных методов введения вакцины, появлением новых вирусов.

Глобализация индустрии аквакультуры привела к соответствующему увеличению количества новых вирусов, заражающих водные организмы. Эти новые вирусные возбудители являются вызовом для использования традиционных клеточных культур и иммунологических анализов с целью выявления новых вирусов, поскольку для их идентификации нет антител.

Вирусная метагеномика имеет потенциал для выявления новых вирусов без предварительного получения данных о последовательности их генома.

Поскольку популяции объектов аквакультуры гетерогенны по резистентности к инфекционным заболеваниям, поиск животных, устойчивых к патогенам, является важным направлением современной науки. Другим подходом к получению устойчивых к инфекциям линий является создание трансгенных организмов, способных продуцировать соединения, улучшающие иммунный ответ.

Ключевые слова: ДНК-ВАКЦИНАЦИЯ, АКВАКУЛЬТУРА, ВИРУСЫ РЫБ, ВВЕДЕНИЕ ДНК-ВАКЦИН

Неухильне зростання населення Землі потребує постійного збільшення обсягів виробництва продуктів харчування [21]. За даними ФАО, ще з 1980-х рр. більшість природних запасів у морських водах було виловлено на максимально можливих рівнях [23]. Аквакультура залишається одним з найбільш швидкозростаючих секторів виробництва білків тваринного походження у всьому світі. Фактично, це єдине виробництво продукції тваринництва, яке зростає швидше, ніж населення землі, і цим забезпечує прийнятне доповнення і заміщення виловленої риби. У 2014 р. вперше аквакультура дала людству більше продукції рибництва, ніж рибальство. За прогнозами, ця частка аквакультури зросте до 62 % до 2030 р. [22].

Для розвитку аквакультури основними природними лімітуючими чинниками у всьому світі є вірусні хвороби. За статистичними да-

ними, втрати веселкової форелі (*Oncorhynchus mykiss*) від хвороб досягають 94 % (Національна Служба сільськогосподарської статистики, *United States Department of Agriculture. Economics*, NASS, 2017 р.) [64]. Якщо проти бактеріальних і паразитарних захворювань доступні ефективні лікарські препарати, то для вірусних хвороб вони відсутні. Використання антибіотиків та антипаразитарних препаратів вимагає довгого терміну лікування, може бути шкідливим для навколишнього середовища і часто викликає толерантність до них хвороботворних організмів. Таким чином, такі превентивні засоби захисту, як вакцини, на сьогодні є одним з ефективних засобів для вирішення проблем захворювань об'єктів аквакультури.

Перша наукова публікація щодо вакцинації риб стосувалася інактивованої і введеної в організм вакцини *Aeromonas salmonicida* [17].

Таблиця

Використання ДНК-вакцин в аквакультурі
The use of DNA vaccines in aquaculture

№	Назва виду / Name of the species	Джерела літератури / References
Вірус інфекційного некрозу гемопоетичної (сировотворної) тканини / Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)		
1	Веселкова форель / Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	[1, 10–12, 47]
2	Атлантичний лосось / Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	[63]
3	Чавича / Chinook salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	[25]
4	Нерка / Sockeye salmon (<i>Oncorhynchus Nerka</i>)	[25]
5	Веселкова форель / Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	[32, 37]
Вірус геморагічної септицемії / Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)		
6	Веселкова форель / Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	[1, 4, 8, 24, 27, 40]
7	Японська камбала / Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	[5]
8	Атлантичний лосось / Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	[1]
9	Азійський парліхт / Olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	[31, 36]
Рабдовірус Ніраме / Niram rhabdovirus (HIRRV)		
9	Японська камбала / Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	[52, 57, 70]
Інфекційний вірус некрозу підшлункової залози / Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)		
10	Атлантичний лосось / Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	[42]
11	Веселкова форель / Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	[14]
Ірідівірус морського червоного морського карася / Red seabream iridovirus (RSIV)		
12	Червоний морський карась / Red seabream (<i>Pagrus major</i>)	[6]
Вірус лімфоцитарної хвороби (вірус лімфоцитозу риби) / Lymphocystis disease virus (LCDV)		
13	Японська камбала / Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	[59–61]
Вірус інфекційної анемії лосося / Infectious salmon Anemia virus (ISAV)		
14	Атлантичний лосось / Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	[41]
Вірус весняної віремії коропа / Spring viraemia of carp virus (SVCV)		
15	Короп звичайний / Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	[30]
16	Короп кої / Koi carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	[20]
Вірус каналального сома / Channel catfish virus (CCV)		
17	Канальний сом / Channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	[46]
Вірус енцефалопатії / Atlantic halibut nodavirus (AHNV), One of Viral nervous necrosis virus (VNNV)		
18	Атлантичний палтус / Atlantic halibut (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	[53]

Продовження табл.

Вірусний нервовий некроз (ВНН), червоний плямистий грудневий нервовий вірус некрозу Viral nervous necrosis (VNN), red-spotted grouper nervous necrosis virus		
19	Convict grouper (<i>Epinerhelus septemfasciatus</i>)	[9, 68]
Вірус синдрому білої плямистості / White spot syndrome virus (WSSV)		
20	Гігантська тигрова креветка / Black tiger shrimp (<i>Penaeus monodon</i>)	[33]
21	Японська тигрова креветка / Kuruma shrimp (<i>Marsiprenaeus japonicus</i>)	[33]
<i>Piscirickettsia salmonis</i>		
22	Кижуч або лосось срібний / Coho salmon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	[43]
<i>Aeromonas veroni</i>		
23	Плямистий піщаний окунь / Spotted sand bass (<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>)	[65]
<i>Edwardsiella tarda</i>		
24	Японська камбала / Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	[29, 54, 56]
<i>Mycobacterium marinum</i>		
25	Гібридний смугастий окунь, гібрид між смугастим (<i>Morone saxatilis</i>) і білим окунем (<i>M. chrysops</i>) Hybrid striped bass, a hybrid of <i>Morone saxatilis</i> and <i>M. chrysops</i>	[48–49]
<i>Streptococcus iniae</i>		
26	Калкан великий / Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	[55]
<i>Vibrio alginolyticus</i>		
27	Кампечинський лусіан / Red snapper (<i>Lutjanus campechanus</i>)	[38]
<i>V. anguillarum</i>		
28	Білий морський окунь, баррамунді / Asian seabass, barramundi (<i>Lates calcarifer</i>)	[34]
29	Японська камбала / Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	[56, 69]
<i>V. parahaemolyticus</i>		
30	Калкан великий / Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	[39]
<i>V. harveyi</i>		
31	Калкан великий / Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	[66]
32	Японська камбала / Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	[28]
<i>Cryptobia salmositica</i>		
33	Веселкова форель / Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	[58]
34	Атлантичний лосось / Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	[58]
<i>Cryptocaryon irritans</i>		
35	Групери / Grouper (<i>Epinerhelinae</i>)	[51]

Однак до 1970-х рр. увага наукової спільноти була зосереджена на використанні хіміотерапевтичних засобів захисту об'єктів аквакультури та антибіотиків. Лише поява антибіотикорезистентності змусила звернути увагу на пошуки вакцин. У 1976 р. у США була видана ліцензія на першу вакцину *Yersinia ruckeri*, яка забезпечила захист від кишкового грипу (ERM) [50].

Метою роботи був огляд літератури щодо розроблених на сьогодні ДНК-вакцин об'єктів аквакультури та методів їх введення.

Останнім часом показана висока ефективність ДНК-вакцин щодо багатьох патогенних мікроорганізмів та паразитів риб [26, 35, 62]. ДНК-вакцини є вакцинами третього покоління. Вони містять ДНК, яка кодує специфічні білки (антигени) збудника. ДНК-вакцини вносять у клітини, які використовують їх інформацію для синтезу білків. Оскільки ці білки є чужорідними для організму господаря, імунна система отримує попередження й ініціює імунні реакції. ДНК-вакцини мають потенційні переваги перед звичайними вакцинами, зокрема здатність індукувати більш широкий спектр типів імунної відповіді. Були розроблені ДНК-вакцини на основі ініціації імунної відповіді на білки різних патогенів багатьох важливих об'єктів аквакультури [18, 71]. Вимоги до ДНК-вакцин стосуються їхньої ефективності, безпечності для навколишнього середовища та споживання людиною [13].

У таблиці представлена інформація про ДНК-вакцини, створені і використані для вакцинації різних видів тварин з метою їх захисту від збудників захворювань (за [71] зі змінами та доповненнями).

Методи введення ДНК-вакцин. Є декілька методів введення ДНК-вакцин в організм тварин, серед яких найчастіше використовують ін'єкції, занурення, пероральне введення [50].

Вакцинація ін'єкцією надійно забезпечує введення безпосередньо в організм тварини контрольованої кількості антигену, що зберігає тривалу імунізацію. Обмеження цього методу стосуються необхідності анестезії риби перед ін'єкцією та наслідків стресу. Загалом ін'єкції — трудомісткий, непрактичний і дорогий метод для виробників продукції, вони вимагають багато часу. Найчастіше

схильні до хвороб мальки, а ін'єкції роблять риbam масою біля 20 г. Ін'єкції використовуються при вирощуванні атлантичного лосося (*Salmo salar*), де це економічно доцільно через розмір риби та численні збудники, які можуть призвести до великих втрат [50].

Вакцини традиційно вводять внутрішньочеревно, однак був розроблений метод внутрішньом'язової ін'єкції ДНК-вакцин проти вірусів IHN та VHS, який виявився ефективнішим [10].

Ще однією перевагою для ін'єкційної вакцинації є її здатність посилювати імуногенність вакцини додаванням ад'юванта. Ін'єкційні вакцини для риби часто вводять з ад'ювантом на основі олій, але використання їх має побічні ефекти. Як правило, виявляють порушення у ділянках ін'єкцій (Midtlyng et al., 1996), спайки між органами або органами та очеревиною (Mutolokiet al., 2004). На сьогодні тривають дослідження альтернативних ад'ювантів [50].

Імунізація зануренням, ймовірно, є найпростішим методом вакцинації, але підходить не для всіх ситуацій, пов'язаних з аквакультурою [50]. Є декілька різних методів занурення, у тому числі гіперосмотична фільтрація, безпосереднє занурення і спрей. Рибу занурюють в розчин (карбамід або хлорид натрію тощо) протягом короткого періоду часу, а потім у вакцину. Для вакцинації безпосереднім зануренням риб переносять у воду, яка містить вакцину, протягом певного періоду часу, а потім переміщують в резервуар. Спочатку гіперосмотична фільтрація була популярною, але після її використання риби були надто напружені. Згодом виявили, що безпосереднє занурення також ефективно надає захист.

Ультразвукова вакцинація — це високочастотна звукова хвиля приблизно 20 кГц, яка підвищує проникність клітин. Чжоу та співавт. (2002) показали, що ультразвук доставляє вакцину так само ефективно, як і внутрішньочеревна ін'єкція [72].

Наканісі і співавт. (2002) розробили комбінований метод імунізації (занурення з проколом) метод, який був ефективним, як ін'єкція. Використовуючи багатократне проколювання в боці радужної форелі, зануреної в бактерію *S. Iniae*, призвело до рівня смертності 40 %, що

відповідає аналогічному показнику за використання ін'єкції (виживаність контролю досягала 80 %) [45].

Пероральна вакцина виробляється з антигену, покритого або змішаного з кормом під час його виробництва. Перевага цього методу полягає у відсутності стресу для тварин та простоті обслуговування великої кількості риб [7].

Недоліком пероральної вакцинації є неможливість дозування антигену (на відміну від ін'єкцій), а також наявності руйнівного впливу на антиген ензимів шлунка та кишечника. Системами доставки пероральних вакцин слугують мікроводорості (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Siripornadulsil та ін., 2007), нано- та мікрочастинки (альгінат, хітозан), мікроплівки, пекарські дріжджі [16, 50].

Перераховані вище методи мають як переваги, так і недоліки щодо рівня захисту, побічних ефектів, практичності і економічності залежно від розміру риби для вакцинації та специфічності вірусу.

Стратегії діагностики вірусних захворювань. Аквакультура постійно стикається з проблемою виявлення нових патогенних вірусів, які уражають різні види тварин. Таким чином, з метою прискорення розробки своєчасних стратегій боротьби з хворобами існує нагальна необхідність розробки нових діагностичних інструментів, здатних виявляти ці віруси [44]. Традиційно діагностика вірусних захворювань базується на клітинній культурі, в якій віруси викликають цитопатичні ефекти, та імунологічних пробах, що виробляють антитіла зі здатністю специфічного зв'язування з діагностованим вірусом. На основі культури клітин *in vitro* були розроблені захисні вакцини проти багатьох захворювань риб.

Проте для ідентифікації основної частини нових вірусів, виявлених у водних середовищах, немає ні антитіл, ні специфічних праймерів для встановлення їх наявності за допомогою ПЛР, що унеможливило їх вивчення [67], аналіз за допомогою ПЛР [3], ідентифікацію нових вірусів, послідовності геномів яких невідомі.

Метагеномний аналіз вірусів є незалежним від клітинної культури підходом, що не вимагає попереднього знання послідовності

геному вірусу, який можна ідентифікувати. Він надає також унікальну можливість одночасно ідентифікувати декілька вірусів у одному зразку. Обсяг його застосування в аквакультурі має потенціал до розширення від аналізу наявності мікроорганізмів навколишнього середовища до пошуку нових вірусів, рутинної діагностики, спостережень за захворюваннями.

Вірусна метагеноміка має потенціал як багатогранний інструмент, здатний вивчати і виявляти етіологічні агенти одноразових інфекцій, коінфекцій, тканинного тропізму, профільованих вірусних інфекцій різних водних організмів, епідеміологічний моніторинг поширеності захворювань, еволюційний філогенетичний аналіз та вивчення геномної різноманітності вірусів квазівидів. Завдяки технологіям секвенування та аналітичним засобам біоінформатики аналіз стає дешевшим і простішим; можна очікувати, що метагеноміка незабаром стане рутинним інструментом для виявлення та вивчення нових патогенних мікроорганізмів, зокрема і вірусів. Це дозволить здійснювати своєчасний контроль захворюваності об'єктів аквакультури з можливістю врахування невідомих до цього часу збудників.

Оскільки популяції об'єктів аквакультури різняться за резистентністю до інфекційних захворювань [15], пошук тварин, стійких до патогенів, є важливим напрямом сучасної науки. Іншим підходом до отримання стійких до інфекцій ліній є створення трансгенних організмів, здатних продукувати речовини, які покращують імунну відповідь [19].

Висновки

Аквакультура, здійснюючи потужний внесок у виробництво продуктів у світі, повинна бути стійкою, екологічною та економічною. Ріст обсягів аквакультури нерозривно пов'язаний з проблемами спалахів інфекційних захворювань, оскільки вони викликають високу смертність, важкі економічні втрати й екологічні наслідки. Тому інтенсивна аквакультура нежиттєздатна без запобігання поширенню вірусів. За кілька років вакцинація стала найважливішим методом профілактики захворювань в аквакультурі, й ефективна про-

філактика, яка ґрунтується на стимуляції імунної системи риби, є необхідною для подальшого розвитку галузі. Перспективні результати, отримані при ДНК-вакцинації риб проти деяких видів інфекцій, дають надії на досягнення прогресу у цій галузі у майбутньому. Однак сучасні методи вакцинації мають певні недоліки, пов'язані з труднощами захисту мальків, обмеженнями використання різних методів введення вакцини, появою нових вірусів.

Глобалізація індустрії аквакультури призвела до відповідного збільшення кількості нових вірусів, які заражають водні організми. Ці виявлені вірусні збудники довели, що вони є викликом для використання традиційних клітинних культур та імунологічних аналізів, оскільки для встановлення наявності нових вірусів та їх ідентифікації немає антитіл. Вірусна метагеноміка має потенціал для виявлення нових вірусів без попереднього знання їхніх даних про послідовність геному і може дати рішення для вивчення вірусів.

Перспективи подальших досліджень

полягають у пошуку методів діагностики захворювань, ідентифікації збудників, захисту мальків, використанні тварин, стійких до патогенів, створенні трансгенних організмів, здатних продукувати речовини, що покращують імунну відповідь.

1. Anderson E. D., Mourich D. V., Fahrenkrug S. C., La Patra S., Shepherd J., Leong J. A. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular marine biology and biotechnology*, 1996, vol. 5, issue 2, pp. 114–122.

2. Ayoola S. O., Idowu A. A. Biotechnology and Species Development in Aquaculture. *African Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 7, no. 25, pp. 4722–4725.

3. Bibby K. Metagenomic identification of viral pathogens. *Trends in Biotechnology*, 2013, vol. 31, issue 5, pp. 275–279. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.01.016.

4. Boudinot P., Blanco M., de Kinkelin P., Benmansour A. Combined DNA with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology*, 1998, vol. 249, no. 2, pp. 297–306. DOI: 10.1006/viro.1998.9322.

5. Byon J. Y., Ohira T., Hirano I., Aoki T. Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis.

Vaccine, 2006, vol. 24, issue 7, pp. 921–930. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.087.

6. Caipang C. M., Hirano I., Aoki T. Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, vol. 20, issue 4, pp. 597–609. DOI: 10.1016/j.fsi.2005.08.002.

7. Caruffo M., Maturana C., Kambalapally S., Larenas J., Tobar J. A. Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in *Salmo Salar*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, vol. 54, pp. 54–59. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.03.009.

8. Chico V., Ortega-Villaizan M., Falco A., Tafalla C., Perez L., Coll J. M., Estepa A. The immunogenicity of viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. *Vaccine*, 2009, vol. 27, issue 13, pp. 1938–1948. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.103.

9. Cho S. Y., Kim H. J., Lan N. T., Han H.-J., Lee D.-C., Hwang J. Y., Kwon M.-G., Kang B. K., Han S. Y., Moon H., Kang H. A., Kim H.-J. Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Veterinary Microbiology*, 2017, vol. 204, pp. 159–164. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.04.022.

10. Corbeil S., Kurath G., LaPatra S. E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, vol. 10, issue 8, pp. 711–723. DOI: 10.1006/fsim.2000.0286.

11. Corbeil S., LaPatra S. E., Anderson E. D., Jones J., Vincent B., Hsu Y.-L., Kurath G. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, vol. 39, no. 1, pp. 29–36. DOI: 10.3354/dao039029.

12. Corbeil S., LaPatra S. E., Anderson G., Kurath G. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine*, 2000, vol. 18, issue 25, pp. 2817–2824. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00078-5.

13. Council. Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals; 2006. L328, pp. 14–56. Available at: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:328:0014:0056:EN:PDF>.

14. De las Heras A. I., Rodríguez Saint-Jean S., Pérez-Prieto S. I. Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, no. 28, issue 4, pp. 562–570. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.12.006.

15. Doan Q. K., Vandeputte M., Chatain B., Haf-ray P., Vergnet A., Breuil G., Allal F. Genetic variation

of resistance to Viral Nervous Necrosis and genetic correlations with production traits in wild populations of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 2017, vol. 478, pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.05.011.

16. Dubey S., Avadhani K., Mutalik S., Sivadasan S. M., Maiti B., Girisha S. K., Venugopal M. N., Mutoloki S., Evensen Ø., Karunasagar I., Munang'andu H. M. *Edwardsiella tarda* OmpA Encapsulated in Chitosan Nanoparticles Shows Superior Protection over Inactivated Whole Cell Vaccine in Orally Vaccinated Fringed-Lipped Peninsula Carp (*Labeo fimbriatus*). *Vaccines*, 2016, vol. 4, issue 4, p. 40. DOI: 10.3390/vaccines4040040.

17. Duff D. C. B. The oral immunization of trout against bacterium salmonicida. *The Journal of Immunology*, 1942, vol. 44, no. 1, pp. 87–94.

18. Dunham R. A. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. CABI Publishing, 2004, 372 p. DOI: 10.1079/9780851995960.0000.

19. Dunham R. A., Winn R. N. Chapter 1. Production of transgenic fish. In: Pinkert C. A. *Transgenic Animal Technology*. A Laboratory Handbook. 3rd ed. Elsevier, 2014, 714 p.

20. Emmenegger E. J., Kurath G. DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine*, 2008, vol. 26, issue 50, pp. 6415–6521. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.08.071.

21. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries. Available at: <http://www.fao.org/fisheries>.

22. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics>.

23. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Document card. Available at: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/68440a7a-2adb-416d-872b-b233eb44f6c9>.

24. Fernandez-Alonso M., Rocha A., Coll J. M. DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*, 2001, vol. 19, no. 23–24, pp. 3067–3075.

25. Garver K. A., LaPatra S. E., Kurath G. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, vol. 64, no. 1, pp. 13–22. DOI: 10.3354/dao064013.

26. Gómez-Casado E., Estepa A., Coll J. M. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*, 2011, vol. 29, issue 15, pp. 2657–2671. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.097.

27. Heppell J., Lorenzen N., Armstrong N. K., Wu T., Lorenzen E., Einer-Jensen K., Schorr J., Davis H. L. Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish and Shellfish Immunology*, 1998, vol. 8, issue 4, pp. 271–286. DOI: 10.1006/fsim.1997.0133.

28. Hu Y.-H., Sun L. A bivalent *Vibrio harveyi* DNA vaccine induces strong protection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vaccine*, 2011, vol. 29, issue 26, pp. 4328–4333. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.021.

29. Jiao X. D., Zhang M., Hu Y. H., Sun L. Construction and evaluation of DNA vaccines encoding *Edwardsiella tarda* antigens. *Vaccine*, 2009, vol. 27, issue 38, pp. 5195–5202. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.071.

30. Kanellos T., Sylvester I. D., D'Mello F., Howard C. R., Mackie A., Dixon P. F., Chang K.-C., Ramstad A., Midtlyng P. J., Russell P. H. DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus. *Vaccine*, 2006, vol. 24, issue 23, pp. 4927–4933. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.03.062.

31. Kim M. S., Choi S. H., Kim K. H. Effect of G gene-deleted recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (rVHSV-ΔD G) on the replication of wild type VHSV in a fish cell line and in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, vol. 54, pp. 598–601. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.05.014.

32. Kim C. H., Johnson M. C., Drennan J. D., Simon B. E., Thomann E., Leong J. A. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish. *Journal of Virology*, 2000, vol. 74, no. 15, pp. 7048–7054. DOI: 10.1128/JVI.74.15.7048-7054.2000.

33. Kumar S. R., Ahmed V. P. I., Sarathi M., Bassha A. N., Hameed A. S. S. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, vol. 24, issue 4, pp. 467–478. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.01.004.

34. Kumar S. R., Parameswaran V., Ahmed V. P. I., Musthaq S. S., Hameed A. S. S. Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, vol. 23, issue 2, pp. 316–326. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.11.005.

35. Kurath G. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 2008, vol. 27, no. 1, pp. 175–196. DOI: 10.20506/rst.27.1.1793.

36. Kwak J. S., Kim M. S., Kim K. H. Generation of a recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) expressing olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) interferon-γ and its effects on type I interferon response and virulence. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, vol. 68, pp. 530–535. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.07.052.

37. LaPatra S. E., Corbeil S., Jones G. R., Shewmaker W. D., Lorenzen N., Anderson E. D., Kurath G. Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine*, 2001, vol. 19, issue 28–29, pp. 4011–4019. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00113-X.

38. Liang H. Y., Wu Z. H., Jian J. C., Huang Y. C. Protection of red snapper (*Lutjanus sanguineus*) against *Vibrio alginolyticus* with a DNA vaccine con-

aining flagellin flaA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, vol. 52, issue 2, pp. 156–161. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02981.x.

39. Liu R., Chen J., Li K., Zhang X. Identification and evaluation as a DNA vaccine candidate of a virulence-associated serine protease from a pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolate. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, vol. 30, issue 16, pp. 1241–1248. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.04.005.

40. Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K., Heppell J., Wu T., Davis H. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*, 1998, vol. 8, no. 4, pp. 261–270. DOI: 10.1006/fsim.1997.0134.

41. Mikalsen A. B., Sindre H., Torgersen J., Rimstad E. Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. *Vaccine*, 2005, vol. 23, issue 41, pp. 4895–4905. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.05.025.

42. Mikalsen A. B., Torgersen J., Aleström P., Hellemann A.-L., Koppang E.-O., Rimstad E. Protection of atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, vol. 60, no. 1, pp. 11–20. DOI: 10.3354/dao060011.

43. Miquel A., Müller I., Ferrer P., Valenzuela P. D., Burzio L. O. Immunoresponse of Coho salmon immunized with a gene expression library from *Piscirickettsia salmonis*. *Biological search*, 2003, vol. 36, no. 3–4, pp. 313–323.

44. Munang'andu H. M., Mugimba K. K., Byarugaba D. K., Mutoloki S., Evensen Ø. Current Advances on Virus Discovery and Diagnostic Role of Viral Metagenomics in Aquatic Organisms. *Frontiers in Microbiology*, 2017, vol. 8, article 406. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00406.

45. Nakanishi T., Kiryu I., Ototake M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*, 2002, vol. 20, issue 31–32, pp. 3764–3769. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00291-8.

46. Nusbaum K. E., Smith B. F., DeInnocentes P., Bird R. C. Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (IHV-1). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, vol. 84, issue 3–4, pp. 151–168. DOI: 10.1016/S0165-2427(01)00399-3.

47. Oberg L. A., Wirkkula J., Mourich D., Leong J. C. Bacterially expressed nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish. *Journal of Virology*, 1991, vol. 65, no. 8, pp. 4486–4489.

48. Pasnik D. J., Smith S. A. Immune and histopathologic responses of DNA-vaccinated hybrid striped bass *Morone saxatilis* x *M. chrysops* after acute *Mycobacterium marinum* infection. *Diseases of Aquatic*

Organisms, 2006, vol. 73, no. 1, pp. 33–41. DOI: 10.3354/dao073033.

49. Pasnik D. J., Smith S. A. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, vol. 103, issue 3–4, pp. 195–206. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.08.017.

50. Plan K. P., LaPatra S. E. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, vol. 35, issue 12, pp. 1256–1262. DOI: 10.1016/j.dci.2011.03.007.

51. Priya T. A. J., Lin Y.-H., Wang Y.-C., Yang C.-S., Chang P.-S., Song Y.-L. Codon changed immobilization antigen (iAg), a potent DNA vaccine in fish against *Cryptocaryon irritans* infection. *Vaccine*, 2012, vol. 30, issue 5, pp. 893–903. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.11.102.

52. Seo J. Y., Kim K.-H., Kim S.-G., Oh M.-J., Nam S.-W., Kim Y.-T., Choi T.-J. Protection of flounder against hirame rhabdovirus (HIRRV) with a DNA vaccine containing the glycoprotein gene. *Vaccine*, 2006, vol. 24, issue 7, pp. 1009–1015. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.07.109.

53. Sommerset I., Lorenzen E., Lorenzen N., Bleie H., Nerland A. H. A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, 2003, vol. 21, issue 32, pp. 4661–4667. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00526-7.

54. Sun Y., Liu C.-S., Sun L. Construction and analysis of the immune effect of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccine encoding a D15-like surface antigen. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, vol. 30, issue 1, pp. 273–279. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.10.020.

55. Sun Y., Liu C.-S., Sun L. Identification of an *Edwardsiella tarda* surface antigen and analysis of its immunoprotective potential as a purified recombinant subunit vaccine and a surface-anchored subunit vaccine expressed by a fish commensal strain. *Vaccine*, 2010, vol. 28, issue 40, pp. 6603–6608. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.050.

56. Sun Y., Zhang M., Liu C.-S., Qiu R., Sun L. A divalent DNA vaccine based on Sialo and OmpU induces cross protection against *Streptococcus iniae* and *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, vol. 32, issue 6, pp. 1216–1222. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.03.024.

57. Takano T., Iwahori A., Hirono I., Aoki T. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, vol. 17, issue 4, pp. 367–374. DOI: 10.1016/j.fsi.2004.04.012.

58. Tan C.-W., Jesudhasan P., Woo P. T. K. Towards a metalloprotease-DNA vaccine against piscine cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium salmositica*. *Parasitology Research*, 2008, vol. 102, issue 2, pp. 265–275. DOI: 10.1007/s00436-007-0757-7.

59. Tian J., Sun X., Chen X., Yu J., Qu L., Wang L. The formulation and immunisation of oral poly (DL-lac-

tide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International Immunopharmacology*, 2008, vol. 8, issue 6, pp. 900–908. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.02.006.

60. Tian J., Yu J. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, vol. 30, issue 1, pp. 109–117. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.09.016.

61. Tian J., Yu J., Sun X. Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunisation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, vol. 126, issue 3–4, pp. 220–229. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.07.002.

62. Tonheim T. C., Bøgwald J., Dalmo R. A. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, vol. 25, issue 1–2, pp. 1–18. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.03.007.

63. Traxler G. S., Anderson E., LaPatra S. E., Richard J., Shewmaker B., Kurath G. Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, vol. 38, no. 3, pp. 183–190. DOI: 10.3354/dao038183.

64. United States Department of Agriculture. Available at: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/TrouProd/TrouProd-02-26-2018.pdf>

65. Vazquez-Juarez R. C., Gomez-Chiarri M., Barrera-Saldaña H., Hernandez-Saavedra N., Dumas S., Ascencio F. Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2005, vol. 19, issue 2, pp. 153–163. DOI: 10.1016/j.fsi.2004.12.007.

66. Wang Q., Chen J., Liu R., Jia J. Identification and evaluation of an outer membrane protein OmpU from a pathogenic *Vibrio harveyi* isolate as vaccine

candidate in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Letters in Applied Microbiology*, 2011, vol. 53, issue 1, pp. 22–29. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03062.x.

67. Wang D., Coscoy L., Zylberberg M., Avila P. C., Boushey H. A., Ganem D., DeRisi J. L. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2002, vol. 99, no. 24, pp. 15687–15692. DOI: 10.1073/pnas.242579699.

68. Wi G. R., Hwang J. Y., Kwon M.-G., Kim H. J., Kang H. A., Kim H.-J. Protective immunity against nervous necrosis virus in convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* following vaccination with virus-like particles produced in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Veterinary Microbiology*, 2015, vol. 177, issue 1–2, pp. 214–218. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.02.021.

69. Yang H., Chen J., Yang G., Zhang X.-H., Liu R., Xue X. Protection of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Vibrio anguillarum* with a DNA vaccine containing the mutated zinc-metalloprotease gene. *Vaccine*, 2009, vol. 27, issue 15, pp. 2150–2155. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.101.

70. Yasuike M., Kondo H., Hirono I., Aoki T. Difference in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* gene expression profile following hirame rhabdovirus (HIRRV) G and N protein DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, vol. 23, issue 3, pp. 531–541. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.12.006.

71. Yoshimizu M., Kasai H., Aoki T., Ototake M., Sakai M., Jung T.-S., Hikima J., Okamoto N., Sakamoto T., Ozaki A., Yazawa R. Prevention and treatment of diseases caused by fish pathogens. *Fish diseases, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, 2016, pp. 56–62. Available at: https://oacis.repo.nii.ac.jp/index.php?action=pages_view_main

72. Zhou Y. C., Huang H., Wang J., Zhang B., Su Y. Q. Vaccination of the grouper, *Epinephalus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique. *Aquaculture*, 2002, vol. 203, issue 3–4, pp. 229–238. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00634-2.