

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Минсельхозпрод России)

Утверждаю  
Зам. руководителя  
Департамента ветеринарии  
В.В.Селиверстов

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

25.11.99г. № 13-4-2/1795

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
по определению уровня естественной  
резистентности и оценке иммунного статуса  
рыб

#### 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Естественная резистентность рыб - это врожденная способность организма противостоять агрессивному влиянию патогенных факторов биотической и абиотической природы, в том числе, возбудителям инфекционных и инвазионных

болезней и продуктов их жизнедеятельности (экзо- и эндотоксинам).

Иммунный

статус - это структурно-функциональное состояние иммунной системы в конкретный

момент жизни особи. Иммунная система рыб представляет собой совокупность кле-

точных и гуморальных факторов иммунитета и состоит из клеток лимфоидно-макрофагального комплекса (лимфоцитов, гранулоцитов, клеток Купфера, Лангерганса и т.д.) и гуморальных компонентов (иммуноглобулины, система компонентов комплемента, лизоцим, С-реактивные белки, интерферон, лизины,

гемолизины, гемагглютинины и т.п.). Клеточные элементы иммунной системы организованы в тканевые и органы структуры. К ним относятся: тимус, селезенка, печень, лимфоидная ткань головного и туловищного отделов почек,

скопления лимфоидной ткани черепной коробки, кишечника, перикарда, Лейдигова и

эпигональных органов. Лейдигов и эпигональные органы встречаются только у

хрящевых, а скопления лимфоидно-миелоидной ткани в черепной коробке - у хрящевых и костных ганоидов. Значительная часть иммунокомпетентных клеток

является составной частью крови и лимфы. Иммунная система рыб отличается от

таковой высших позвоночных отсутствием лимфатических узлов, костного мозга и

фабрициевой сумки (как это имеет место у птиц); иммуноглобулины у рыб представлены только IgM подобными антителами, тогда как у теплокровных

- 5

классами (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE).

Для оценки естественной резистентности организмов рыб к заразным болезням,

используют разнообразные методические приемы анализа структурно-функционального

состояния иммунной системы. Они основаны на регистрации показателей

специфических и неспецифических факторов клеточного и гуморального иммунитета.

## 2. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА.

Неспецифические факторы иммунитета участвуют в реализации функций защиты организма рыб от чужеродных тел, независимо от специфических факторов, являются естественными или врожденными компонентами организма рыб и не возникают вновь при встрече с чужеродными телами. В зависимости от структурной организации их компонентов подразделяются на клеточные и гуморальные.

### 2.1. КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ

В организме рыб они представлены разнообразными по структурной организации клетками: лейкоцитами, макрофагами, эндотелиоцитами и т.д. Одной из основных функций этих клеток является фагоцитоз. Кроме того, они участвуют в синтезе медиаторов иммунного ответа и антибиотических веществ: лизоцима, интерферона, агглютининов, интерлейкинов и др.

#### 2.1.1. ЛЕЙКОЦИТЫ

Лейкоциты рыб представлены разнообразными по структуре и характеру выполняемой функции клетками: лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами, эозино- и базофилами. В основном, лейкоциты рыб, в отличие от высших позвоночных, представлены лимфоцитами, тогда как у теплокровных - клетками нейтрофильного ряда. У рыб на долю лимфоцитов приходится 45-99 % клеток от общего числа лейкоцитов, а у высших позвоночных-25-30%. В 1 мл крови рыб лейкоцитов содержится в 5-10 и более раз больше, чем у человека и животных. Количество лейкоцитов и отдельных типов клеток, его составляющих, в организме рыб колеблется и зависит от индивидуальных, возрастных особенностей, сезона года, зараженности их паразитами, присутствия в воде токсических факторов и условий содержания. На воздействие благоприятных и неблагоприятных факторов рыбы реагируют интенсивностью лейкопоза и изменением соотношения между лимфоцитами и гранулоцитами. В организме рыб, подвергнутых воздействию "агрессивных" факторов, увеличивается доля содержания клеток гранулоцитарного ряда (палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов и aberrantных форм клеток).

Изменения в составе лейкоцитов отражаются на степени сопротивляемости рыб к инфекционным и инвазионным болезням. Снижение содержания лимфоцитов отражается на интенсивности синтеза антител, отторжения трансплантата,

завершенности фагоцитоза и напряженности иммунитета к болезням. Существуют прямой и непрямой способы учета общего числа лейкоцитов в крови рыб. Исследования проводят в соответствии с "Методическими указаниями по проведению гематологического обследования рыб", утвержденными Департаментом ветеринарии 02.02.99 г., № 13-4-2/1738.

#### 2.1.2. ФАГОЦИТОЗ.

Функциональное состояние фагоцитов в большинстве случаев определяется по фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови или клеток, выделенных из головного, туловищного отделов почек и селезенки. Существуют разнообразные методические приемы количественной оценки фагоцитарной активности лейкоцитов. Одни основаны на подсчете числа фагоцитов с захваченными чужеродными телами под микроскопом, другие - на регистрации интенсивности проявления кислородзависимой антиинфекционной системы в реакции хемилюминесценции или по способности фагоцитов восстанавливать растворимый краситель нитросиний тетразолий в нерастворимый диформазап (НСТ-тест). Определение фагоцитарной активности лейкоцитов *in vitro* и *in vivo* в отношении микроорганизмов основано на учете фагоцитов под световым микроскопом. Хемилюминесцентный метод определения фагоцитарной активности клеток требует специального дорогостоящего оборудования и компьютерной техники. Способ определения фагоцитарной реакции лейкоцитов по НСТ-тесту более трудоемкий, чем основанный на использовании тест-микроорганизмов. Изучение фагоцитарной активности лейкоцитов в отношении микробов в практике лабораторных исследований чаще всего проводится *in vitro* и *in vivo*. В качестве тест-микробов рекомендуется использовать грамположительные и грамотрицательные микробы: *Staphilococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* и *Saccharomyces cerevisiae*.

##### 2.1.2.1. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ *IN VITRO* по Е.А. Коста и М.И. Стенко (1947).

- Принцип метода. Указанный метод основан на учете соотношения числа лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе, и общего числа клеток белой крови.

Оборудование и реактивы: пробирки стерильные; пипетки стерильные на 1,0 мл; пастеровские пипетки стерильные; 0,65%-ный стерильный раствор натрия хлорида; 2%-ный стерильный раствор натрия цитрата; водяная баня, отрегулированная на

60°C; объект фагоцитоза -одномиллиардная взвесь суточной культуры бактерий *A. hydrophila*, инаktivированных при 60°C в течение 30 минут, приготовленная на 0,65%-ном стерильном растворе натрия хлорида; термостат отрегулированный на 26°C; предметные стекла; шлифованное стекло; набор для окраски мазков крови; метиловый спирт или смесь этилового спирта с эфиром 1:1; рабочий раствор красителя азур-эозина; иммерсионное масло; микроскоп.

- Материал для исследования, ход определения и учет результатов. В пробирку вносят 0,1 мл 2%-ного стерильного раствора натрия цитрата, 0,2 мл свежевзятой крови от обследуемой рыбы, 0,2 мл объекта фагоцитоза. Взвесь осторожно, но тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре 26°C (для теплолюбивых рыб) и более низкой (для холодолюбивых). Через 15 и 30 минут, 1; 1,5 и 2 часа с момента термостатирования пастеровской пипеткой забирают смесь из пробирки, помещают на предметное стекло и делают мазки, которые фиксируют в течение 10 мин. смесью спирта с эфиром (1:1) или в течение 5 мин. метиловым спиртом. Затем мазки красят в течение 20-40 мин. рабочим раствором азур-эозина. После этого их просматривают под иммерсией (ок.7х об.90). Подсчитывают 100 (иногда 50) лейкоцитов. Захватывающую способность лейкоцитов выражают двумя показателями: процентом фагоцитоза - процентным отношением лейкоцитов, захвативших тест-микробы, к общему числу подсчитанных, и фагоцитарным индексом

- количеством тест-микробов, захваченных одним фагоцитирующим лейкоцитом.

#### 2.1.2.2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ *in vivo* по Г.Д. ГОНЧАРОВУ (1966).

- Принцип метода заключается в исследовании реакции фагоцитоза лейкоцитов в брюшной полости рыб. Анализ фагоцитарной реакции, проводится через 15, 30, 60, 90 и 120 мин, с момента введения микроорганизмов.

- Оборудование и реактивы: шприц и инъекционные иглы; 0,65%-ный стерильный раствор натрия хлорида; водяная баня, отрегулированная на 60°C; одномиллиардная взвесь суточной культуры бактерий *A. hydrophila*, инаktivированной при 60°C в течение 30 мин.; термостат, отрегулированный на 26°C; пастеровские пипетки стерильные; предметные стекла; шлифованное стекло;

метиловый спирт или смесь этилового спирта с эфиром 1:1; рабочий раствор азур-эозина; иммерсионное масло; микроскоп.

Материал для исследования, ход определения и учет результатов. Рыбам между брюшными плавниками внутрибрюшинно вводят указанное количество инактивированных микробных тел на 0,65%-ном стерильном растворе натрия хлорида, помещают их в аквариум и через 15 и 30 мин., 1, 1.5 и 2 часа с момента введения объекта фагоцитоза у рыб пастеровской пипеткой отбирают из места укола брюшной экссудат, наносят на предметные стекла и делают мазки. Полученные мазки фиксируют в течение 10 мин, смесью спирта ректификата с эфиром (1:1) или в течение 5 мин. метиловым спиртом. Затем мазки красят в течение 20-40 мин. рабочим раствором азур-эозина и исследуют под микроскопом (ок.7 х об.90). Подсчитывают 100-200 лейкоцитов. Оценку проводят аналогично методу Е.А. Коста и М.И. Стенко.

## 2.2. ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ

К гуморальным факторам иммунитета рыб относят разнообразные по структуре и иммунобиологической функции компоненты, входящие в состав крови, лимфы, тканевых жидкостей, кожной и кишечной слизи: лизоцим, комплемент, агглютинины (естественные антитела), интерферон, лектины, трансферины, лизины, бактериолизины, С-реактивный белок, хитиназа и т.д.

Ниже приведены методы определения бактерицидных свойств сыворотки крови (БАСК), комплемента, интерферона и естественных антител или агглютининов, наиболее объективно отражающих функциональное состояние иммунной системы и уровень естественной резистентности рыб.

### 2.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ (БАСК) КРОВИ РЫБ

БАСК отражает функциональное состояние гуморальных факторов защиты или естественной резистентности. Данный показатель используют при оценке характера течения инфекционного процесса, зараженности рыб паразитами и условий нагула.

Для учета величины антимикробных свойств сыворотки крови рекомендуется использовать радиоуглеродный и фотоэлектронеметрический способы.

Поскольку для оценки БАСК радиоуглеродным способом требуется специально приспособленное для этой цели оборудование рекомендуется использовать оптический метод (О.В.Смирнова, Т.А.Кузьмина, 1966), адаптированный для рыб (Микряков и др. 1979; Зимин, 1983).

2.2.1.1. Принцип метода основан на учете характера изменения оптической плотности МПБ или РПБ при росте на нем микробов с добавлением или без

добавления испытуемой сыворотки с помощью фотоэлектрического колориметра или спектрофотометра.

2.2.1.2. Оборудование и реактивы: пипетки стерильные на 1,0 мл; МПБ или РПБ

стерильный в пробирках по 2,5 и 3,0 мл или по 5,0 и 6,0 мл; сыворотка крови

исследуемых рыб; одномолиардная взвесь суточной культуры вирулентных бактерий

A. hydrophila (можно использовать и другие виды микроорганизмов), приготовленная на 0,65%-ном стерильном растворе натрия хлорида;

термостат,

отрегулированный на 26°C; ФЭК-56М; пастеровские пипетки, шприцы и инъекционные

иглы для взятия крови, стерильные.

2.2.1.3. Материал для исследования, ход определения и учет результатов. Оценку БАСК проводят в течение 1-5 суток от момента взятия крови. Кровь для

получения сыворотки собирают в стерильные пробирки каудозектомией, отсечением

жаберных артерий или из кровеносных сосудов хвостового стебля с помощью пастеровской пипетки или шприца. Полученную кровь отстаивают при комнатной

температуре 20-30 минут. После обведения сгустка крови с помощью стерильной

пастеровской пипетки пробирки ставят в холодильник на 18-24 часа при + 4° С.

Через сутки отделившуюся в пробирках сыворотку пастеровскими пипетками отсасывают и переносят в стерильные пробирки. Далее сыворотку центрифугируют

при 3000 об/мин, в течение 10-15 минут и используют для постановки опыта. В

пробирки вносят 2,5 мл МПБ или РПБ и 0,5 мл испытуемой сыворотки, а в три

контрольные пробирки - 3,0 мл среды. Затем пастеровской пипеткой во все пробирки добавляют по 2 капли одномолиардной взвеси суточной культуры тест -

бактерий. Содержимое пробирок тщательно перемешивают, отбирают по 3.0 мл смеси

и определяют оптическую плотность на ФЭК. После этого пробы помещают в термостат при 26°C на 3 часа, после чего вновь измеряют оптическую плотность их

содержимого. В пробирках с активной сывороткой крови оптическая плотность

остаётся на прежнем уровне или незначительно повышается. При слабой бактерицидной активности сыворотки оптическая плотность среды возрастает за

счет накопления в ней размножающихся микробов. В контрольных пробирках оптическая плотность среды возрастает. БАСК выражают через изменения оптической

плотности контрольных и подопытных проб, отражающие угнетение роста бактерий

в присутствии сыворотки, и рассчитывают по формуле:

$$DE_k - DE_0$$

$$БАСК (\%) = 100 \times \text{-----}$$

D Эк , где

DEк - разность оптической плотности второго и первого измерений в контрольных пробирках;

DEо - разность оптической плотности второго и первого измерений оптической

плотности в опытных пробирках.

100-коэффициент перевода оптической плотности в %.

#### 2.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕМЕНТА.

В качестве тест-объекта для определения активности комплемента *in vitro* используют эритроциты барана (по классическому пути) и эритроциты кролика (по альтернативному пути).

Активность комплемента обычно выражается в условных единицах. За одну 50 %

гемолитическую единицу (CH50) принимается количество комплемента, необходимое

для 50 %-го лизиса эритроцитов. Эта единица является условной, поскольку

зависит от концентрации эритроцитов, количества сенсibiliзирующих антител (для

классического пути), величины ионной силы среды, концентрации Ca<sup>+2</sup> и Mg<sup>+2</sup> рН,

времени и температуры реакции. Для каждого вида рыб подбираются оптимальные

значения этих показателей.

Отношение между количеством взятого комплемента и долей лизированных клеток

не является линейным, а выражается сигмовидной кривой, для математического

описания которой используется уравнение:

$$1/n$$

$X = K(y/1-y)$ , где:

X - количество комплемента (мл) в реакции; y - степень лизиса, выраженная в

долях единицы; K-константа, соответствующая 1CH50 при y=0,5; 1/n- константа

(определяет наклон кривой, зависит от условий опыта).

При логарифмировании этого уравнения получается функция, удобная для оценки

результатов:

$IgX = IgK + 1/n [Igy/1-y]$  Зависимость величины Iг X

от величины Iг (y/1-y) графически будет представлять прямую линию, по которой

можно определить искомую величину K. Зная величину K, легко рассчитать количество CH50, содержащихся в 1 мл неразведенной сыворотки.

#### 2.2.2.1. Определение гемолитической активности комплемента по классическому пути активации (метод Мейера в модификации Yano T., 1992).

- Принцип метода основан на способности комплемента присоединяться к

комплексу антиген -антитело (эритроциты барана - гемолизин) и вызывать специфический гемолиз сенсibilизированных эритроцитов.

За единицу активности (по Мейеру) комплемента теплокровных принимают такое количество неразведенной сыворотки, которое вызывает 50 % лизис  $5 \times 10^8$  оптимально сенсibilизированных эритроцитов барана в желатин - вероналовом

буфере (рН 7,4), содержащем 0,15 мМ Са и 0,5 мМ Мг, в течение 60 мин инкубации при  $37^\circ \text{C}$  в объеме 7,5 мл. По Yano T., в зависимости от вида рыб,

инкубацию осуществляют при  $20 - 25^\circ \text{C}$  в течение 60-120 мин. в желатин-вероналовом буфере (рН 7,3 - 7,4), содержащем 0,5 мМ Са и 1 мМ Мг в объеме 1,5 мл. Для сенсibilизации эритроцитов используют гемолизин того же (или близкого) вида рыб, что и испытуемый комплемент.

-Оборудование и реактивы: спектрофотометр и кюветы с длиной оптического пути 1 см (при использовании приборов с иной длиной оптического пути необходимо

определить и использовать в расчетах величину оптической плотности (OD) для

заданной концентрации эритроцитов); рН - метр; водяная баня; дозирующие микропипетки на 0,2, 1,2 мл; пробирки (5-10 мл), выдерживающие центрифугирование; рефрижераторная центрифуга; стерильные шприцы; глюкоза;

NaCl; дистиллированная вода; Na-5,5,- диэтилбарбитурат (мединал); CaCl<sub>2</sub>; MgCl<sub>2</sub>;

желатин; IN HCl; ледяная уксусная кислота; ацетат натрия; EDTA; 10 % NaNO<sub>3</sub>;

эритроциты барана в растворе Олсвера (1:1); гемолизин; сыворотка крови рыб

(источник комплемента); 0.85% NaCl; маточный раствор солей (CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O - 7.35

г, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O - 20.33 г, дистиллированная вода до 100 мл).

- Приготовление буферных растворов:

- Вероналовый буфер, концентрат, рН 7.3-7.4 (5VB): NaCl - 41,5г, Na-5,5 -

диэтилбарбитурат - 5,1 г, IN HCl - 17.5 мл, дистиллированная вода - 1 л.

Желатин-вероналовый буфер (GVV ): желатин - 0,1 г, 5VB - 20 мл, маточный раствор солей - 0,1 мл, дистиллированная вода до 100 мл (хранить при  $+4^\circ \text{C}$  не более 1 недели).

- Глюкозо-желатин-вероналовый буфер (GGVB ): желатин - 0.1 г, 5VB - 10 мл,

глюкоза - 2,5 г, маточный раствор солей - 0,1 мл, 10% NaN<sub>3</sub> - 0,2 мл, дистиллированная вода до 100 мл (хранить при  $+4^\circ \text{C}$  не более 1 недели).

- 0,1 М EDTA буфер, рН 7,5: 2,92 г EDTA растворить в 90 мл дистиллированной воды, добавляя концентрированный раствор NaOH, довести рН до 7,5, долить дистиллированной воды до 100 мл.
- 0,01 М EDTA-желатин-вероналовый буфер (EDTA - GVB): желатин - 0,1 г, 5 VB - 20 мл, 0,1 М EDTA (рН 7,5) - 10 мл, дистиллированная вода до 100 мл (хранить при +4° С не более 1 недели).
- 0,001 М ацетатный буфер, рН 5,0: смешать 3 части 0,1 М уксусной кислоты с 7 частями 0,1 М ацетата натрия, развести в 100 раз, довести рН до 5,0.
- Получение гемолизина.
- Рыба. Для иммунизации используют неполовозрелую рыбу из благополучного хозяйства. Рыбу предварительно адаптируют и содержат в условиях наиболее оптимальных для каждого вида (температура воды, проточность, аэрация, полноценное кормление).
- Приготовление стромы эритроцитов барана. 100 мл крови барана в растворе Олсвера (1:1) центрифугируют при 500-1000 г 10 мин (+ 4° С) и дважды отмывают 200 мл физраствора. Осадок эритроцитов лизируют в 1 л дистиллированной воды, содержащей 0,4 мл ледяной уксусной кислоты, в течение ночи при + 4° С. Центрифугируют, затем осадок стромы промывают 6 раз 0,001 М ацетатным буфером (рН 5,0) и 1 раз физраствором, центрифугируя 20 мин. при 500-1000 г. Осадок тщательно ресуспендируют в 30 мл физраствора. В суспензии определяют содержание азота микрометодом Кьельдаля и доводят концентрацию до 1 мг/мл.
- Иммунизация рыб. Рыбу инъецируют в/б суспензией стромы эритроцитов из расчета 0,3-0,5 мг N/кг массы рыбы. Инъекции повторяют многократно (6-8 раз) с интервалом 5 дней. Перед каждой инъекцией (начиная с 4-5) отбирают сыворотки и определяют титр гемолизина. Количество инъекций зависит от титров полученных гемолизинов (определение тетрагемолизина см. ниже).
- Отбор антисывороток и условия хранения. Через 5 дней после последней инъекции стерильно отбирают максимальное количество крови. После образования и ретракции сгустка центрифугируют 5 мин при 1500 г. Отбирают сыворотки и  
2+  
разводят 1:1 GVB инактивируют прогреванием (карповые-20 мин при 50° С, лососевые - 20 мин при 42-45°С), расфасовывают и хранят при -20° С и ниже.

- Определение титра гемолизина. Готовят серийные 2-х кратные разведения  
2+

антисывороток GVB К 0,5 мл каждого разведения антисыворотки добавляют по 0,1 мл эритроцитов барана ( $1 \times 10^9$  кл/мл, см. ниже), по 0,4 мл GVB 2+ и по 0,5 мл

2+

комплемента, разведенного GVB 1:20-1:40 (в качестве комплемента используют свежую сыворотку, полученную от интактных рыб того же вида). Смесь инкубируют при 20 - 25° С в зависимости от вида рыб (карповые - 25°С - 60 минут, лососевые - 20° - 120 минут), центрифугируют 5 минут при 1600 г, определяют оптическую плотность (OD541) супернатанта и рассчитывают степень гемолиза. За титр гемолизина принимают разведение, дающее 50 % гемолиз.

- Получение и условия хранения комплемента. Комплемент рыб очень термолабилен и быстро инактивируется даже при 0° С (несколько часов), не переносит замораживания при минус 20° С, при минус 35° С активность сохраняется в течение месяца.

Кровь после отбора оставляют на 30 мин при комнатной температуре, затем на 1 час при 0°С (лед с водой) для ретракции сгустка, центрифугируют 5 мин при 1500 г (0°...+4° С) и отбирают сыворотки. Сыворотки как источник комплемента используют немедленно, а при необходимости хранят при -80° С или лиофилизируют.

- Приготовление суспензии эритроцитов. Эритроциты барана в растворе

2+

Олсвера (1:1) трижды отмывают EDTA-GVB и готовят 5% суспензию в GVB . К 0,1 мл

5 % суспензии эритроцитов добавляют 1,4 мл дистиллированной воды, после лизиса

эритроцитов измеряют OD541 против дистиллированной воды. Необходимой концентрации эритроцитов барана  $1 \times 10^9$  кл/мл соответствует OD541 0,680 при длине

оптического пути 1 см. Если 5 % суспензия не дает необходимого значения OD541,

значит ее необходимо развести (если  $OD541 < 0,680$ ) или сконцентрировать (если

$OD541 > 0,680$ ) во столько раз, во сколько полученное OD541 отличается от 0,680.

- Подбор разведения гемолизина для оптимальной сенсibilизации эритроцитов.

Готовят серийные двукратные разведения гемолизина (используют гемолизин с

2+

титром 1:1500 и выше) на GVB . Берут 2-4 ряда пробирок. В каждый ряд вносят по

0,1 мл/пробирку приготовленные разведения гемолизина. Во все пробирки добавляют по 0,1 мл суспензии эритроцитов. Встряхивают и инкубируют при 25° С 20 мин.

2+

Готовят несколько разведений комплемента на GVB - на каждый ряд свое разведение. Величина разведения зависит от вида рыб и активности комплемента (1:15 -1:80). В каждую пробирку ряда вносят по 1,3 мл комплемента одного и того же разведения. Инкубируют 60 мин при 25° С (для карпа), 120 мин при 20° С (для лососевых), 120 мин при 25° С (для тилапии), периодически встряхивая. Центрифугируют 5 мин при 1600 г, определяют OD541 и рассчитывают процент гемолиза супернатанта для каждой пробирки. Для каждого разведения комплемента строят график зависимости процента гемолиза от разведения гемолизина. Выбирают кривую с таким разведением комплемента, при котором максимальный гемолиз составляет 50-70% (т.е. кривая выходит на плато при гемолизе 50-70%). За оптимальное разведение гемолизина принимают максимальное разведение, вызывающее максимальный % гемолиза (выход кривой на плато) и для надежности это разведение уменьшают в 2 раза (например, кривая выходит на плато при разведении гемолизина 1:800, а за оптимальное принимают разведение 1:400).

- Приготовление сенсibilизированных эритроцитов. Готовят оптимальное разведение гемолизина в EDTA-GVB. Это разведение медленно добавляют (при постоянном помешивании) к равному объему суспензии эритроцитов (1x10<sup>9</sup> кл/мл в EDTA-GVB) и инкубируют 30 мин при 25° С. Сенсibilизированные эритроциты отмывают в GGVB24, центрифугируют 5-10 мин при 500g и готовят суспензию

2+

эритроцитов в GGVB с концентрацией 5x10<sup>8</sup> кл/мл. Концентрацию эритроцитов контролируют, измеряя OD541 лизированных клеток (0,2 мл суспензии сенсibilизированных эритроцитов + 1,3 мл дистиллированной воды дают OD541, равную 0,680). Сенсibilизированные эритроциты хранят при +4° С в течение 1 недели.

- Техника постановки реакции и расчет активности комплемента. Все компоненты реакции смешивают при 0° С (лед с водой). Испытуемый комплемент

2+

разводят GVB в зависимости от предполагаемой его активности, чтобы попасть в область 50% лизиса (для карпа обычно 1/40 - 1/60, для лососевых - 1/60 - 1/80).

Берут ряд из 8 пробирок. В 5 пробирок вносят разные объемы разведенного

2+

испытуемого компонента (0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0 мл), GVB доводят объем до 1,3 мл, в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл сенсibilизированных эритроцитов. Три пробирки используют для контролей:

1 - контроль эритроцитов на спонтанный лизис (0.2 мл сенсibilизированных эритроцитов + 1,3 мл GVB24+); 2 - 100% лизис эритроцитов (0,2 мл суспензии сенсibilизированных эритроцитов + 1,3 мл дистиллированной воды); 3 - контроль OD541 компонента (1,0 мл разведенного компонента + 0,5 мл GVB+2). Пробирки инкубируют, периодически встряхивая (время и температура - оптимальные для каждого вида рыб). Центрифугируют 5 мин при 1600g. Измеряют OD541 супернатанта. Вычисляют степень гемолиза (y) с учетом поправок на контроли. Т.е., от полученного значения OD541 супернатанта каждой опытной пробирки вычитают OD541 контроля эритроцитов и OD541 контроля компонента (значение OD541 контроля компонента измеряют только для первой пробирки, в которой максимальный объем компонента, а для остальных пробирок эта величина уменьшается пропорционально уменьшению объема компонента). В логарифмическом масштабе строят график зависимости  $y/(1 - y)$  от объема компонента. При 50% гемолизе  $y/(1 - y) = 1$ . Графически находят объем компонента (K), вызывающий 50% гемолиз, что соответствует 1 гемолитической единице CH50. Количество CH50 в 1 мл (M) рассчитывают по формуле:  $M = 0.2 N : K$ , где N - величина, обратная разведению компонента, 0.2 - коэфф. коррекции, т.к. в используемом варианте объем реакционной смеси в 5 раз меньше (1.5 мл), чем в оригинальном по Мейеру (7.5 мл). Гемолитическая активность компонента карпа равна  $20.0 \pm 9.1$ , радужной форели -  $28.0 \pm 13.5$ , тилапии -  $205.1 \pm 76.6$ . (T.Yano, 1992).

-Определение гемолитической активности компонента по альтернативному пути активации (по YanoT., 1992).

Для определения активности компонента по альтернативному пути обычно используют эритроциты кролика, как активатор и тест-объект. Реакцию ведут в присутствии EGTA (желатный агент для  $Ca^{2+}$  чтобы блокировать классический путь активации) и  $Mg^{2+}$ .

Гемолитическая активность карпа (в отличие от радужной форели, тилапии, аю, порги, желтохвоста, человека, свиньи) возрастает в несколько десятков раз при добавлении в реакционную смесь 0.1 mM  $Ca^{2+}$ .

- Принцип метода основан на способности комплемента активироваться эритроцитами кролика и лизировать их.

За единицу активности комплемента (ACH50) принимают такое количество неразведенной сыворотки, которое вызывает 50% лизис  $4 \times 10^7$  эритроцитов при  $20^\circ\text{C}$

в желатин-вероналовом буфере, содержащем  $10\text{mM}^{2+}$  EGTA и  $10\text{mM}^{2+}$  Mg в объеме 0.7

мл; pH и время инкубации различаются в зависимости от вида рыб (радужная форель

- pH 7.0, 1.5 часа; карп - pH 7.5, 1.5 часа).

- Оборудование и реактивы: оборудование см. п. 2.2.2.1.; глюкоза; дистиллированная вода; Na-5,5-диэтилбарбитурат;  $\text{MgCb}^{2+}$ ; IN HCl; EGTA; желатин;

NaOH; эритроциты кролика; сыворотка крови рыб (источник комплемента).

- Приготовление буферных растворов:

-Вероналовый буфер, концентрат (5 VB), см.п.2.2.5.3.1.

- 0,1 М EGTA - Mg буфер, : EGTA - 38 г,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 20,3 г, NaOH - 7 г,

дистиллированная вода -1л, доводят pH до 7,5 1N NaOH.

- 0,01 М EGTA - Mg желатин-вероналовый буфер (EGTA-Mg-GVB): желатин-0,1 г; 5

VB-20 мл; 0,1 М EGTA-Mg-10 мл; дистиллированная вода до 100 мл, доводят pH до

7,5 (для карпа), до 7,0 (для радужной форели). Хранят при  $+4^\circ\text{C}$  в течение 1

недели.

- Приготовление суспензии эритроцитов кролика. Эритроциты кролика в растворе

Олсвера (1:1) отмывают трижды в EGTA-Mg-GVB и готовят суспензию с концентрацией

$2 \times 10^8$  кл/мл в этом же буфере. Концентрацию эритроцитов контролируют, измеряя

OD414 лизированных клеток (к 0,1 мл суспензии эритроцитов добавляют 3,4 мл

дистиллированной воды и измеряют OD414 лизата; если полученная величина OD414

отличается от 0,740, то суспензию эритроцитов необходимо развести или сконцентрировать во столько раз во сколько полученное OD414 отличается

от

0,740).

-Получение и условия хранения комплемента см.п.2.2.2.1.

-Техника постановки реакции и расчет активности комплемента. Все компоненты

реакции смешивают при  $0^\circ\text{C}$  (лед с водой). Испытуемый комплемент разводят в EGTA-

Mg-GVB в зависимости от вида рыб и предполагаемой активности (для карпа 1/15 -

1/20, радужной форели 1/100- 1/170).

Берут ряд из 8 пробирок. В 5 пробирок вносят разные объемы разведенного комплемента (0,1; 0,125; 0,160; 0,20; 0,25 мл), доводят общий объем до 0,25 мл

EGTA-Mg-GVB и добавляют в каждую пробирку по 0,1 мл суспензии эритроцитов. Три пробирки используют для контролей: 1- контроль эритроцитов на спонтанный лизис (0,25 мл EGTA-Mg-GVB +0,1 мл суспензии эритроцитов); 2-100 % лизис (0,1 мл суспензии эритроцитов + 3,4 мл дистиллированной воды); 3 - контроль комплемента (0,25 мл разведенного комплемента +0,1 мл EGTA-Mg-GVB).

Пробирки инкубируют 90 мин. при 20°C (для карпа, радужной форели), периодически встряхивают.

В каждую пробирку (кроме 2-го контроля) добавляют по 3,15 мл EGTA-Mg-GVB и центрифугируют 5 мин. при 1600g. Измеряют OD414. Вычисляют степень гемолиза

(у) с учетом поправок на контроль эритроцитов и комплемента (см.п.2.2.2.1.). В

логарифмическом масштабе строят график зависимости  $y/1-y$  от объема комплемента. При 50 % гемолизе  $y/(1-y)=1$ . Графически находят объем комплемента (К), вызывающий 50%-ный гемолиз, что соответствует одной гемолитической единице АСН50.

Количество АСН50 в 1 мл (М) рассчитывают по формуле:

$$M = 0,5 N : K, \text{ где:}$$

N-величина обратная разведению комплемента, 0,5-коэфф. коррекции, т.к. в

используемом варианте объем реакционной смеси в 2 раза меньше, чем в оригинальном. По данным Yano T.,1992, гемолитическая активность комплемента

карпа равна  $58,9 \pm 13,5$ , радужной форели -  $345 \pm 108$ , тилапии-  $574 \pm 250$ ,

барана -  $15,4$ , морской свинки -  $11,9$ , собаки -  $14,4$ , человека -  $18,4$ .

### 2.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИНТЕРФЕРОНА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(Т.Renault et al. 1991, с дополнением)

Разработано несколько методов определения активности интерферона, основанных на его способности ингибировать ЦПД вируса в культуре клеток,

снижать число бляшек в ней, подавлять титр вируса и синтез РНК. Титром интерферона считают наибольшее разведение испытуемого материала, уменьшающее на

50% показатель активности вируса в контроле. При исследовании большого количества образцов часто используют микрометод титрования интерферона в

культуре клеток. При этом очень важно выбрать соответствующую систему "культура

клеток - вирус". Вирус должен иметь высокую чувствительность к интерферону и

вызывать в культуре клеток четкие изменения, приводящие к разрушению монослоя.

Используют культуру клеток гомологичную интерферону и высоко чувствительную к

его защитному действию. Для титрования интерферона лососевых рыб наиболее распространенной является система: RTG-2-IPNV; для карпа - EPC- SVCV. В качестве источника интерферона используют сыворотки рыб, в случае исследования мальков -гомогенат тушек рыб.

2.2.3.1. Принцип метода. Спектрофотометрический микрометод титрования интерферона основан на различии оптической плотности интактного клеточного монослоя с признаками ЦПД после окрашивания соответствующими красителями. За единицу активности интерферона принимают такое разведение образца, которое защищает 50% клеточного монослоя, то есть оптическая плотность клеточного монослоя, обработанного этим разведением, равна 50% оптической плотности контрольного неинфицированного монослоя.

2.2.3.2. Оборудование и реактивы: фотометр для работы с 96-луночными микропанелями (ридер); дозирующие микропипетки (1-й 8-канальные на 0.2 мл); 96-луночные культуральные микропанели; CO<sub>2</sub> - инкубатор или термостат с эксикатором и со свечкой; инвертированный микроскоп; стерильная фильтровальная бумага; вирус; культура клеток; ростовая и поддерживающая среды, необходимые для выбранной культуры клеток (ростовая среда содержит 10% сыворотки, поддерживающая - 2%); 1%-ный раствор кристаллвиолета в 20% этаноле.

2.2.3.3. Подготовка образцов интерферона к исследованию. Сыворотки получают общепринятым способом. Гомогенат готовят на поддерживающей среде в соотношении 1:4. Центрифугируют 15 мин при 3500g и собирают супернатант. Сыворотки или супернатант освобождают от вируса (если его использовали в качестве индуктора интерферона) одним из способов: прогреванием (время и температура зависят от использованного вируса; VHSV -30 мин при 45° С); ультрацентрифугированием - 4 часа при 100000g; низким рН (добавляют HCl до рН 2,0, выдерживают 24-48 часов при +4° С, восстанавливают рН до 7.0 добавлением NaOH).

Если в качестве индуктора использовали дсРНК или другие препараты (но не вирусы), эта процедура исключается. Содержащие интерферон образцы можно хранить при -20° С и ниже.

2.2.3.4. Подготовка рабочей дозы вируса. Вирус накапливают в наиболее чувствительной культуре клеток и титруют методом серийных 10-кратных разведений. Готовят вирусосодержащую суспензию в поддерживающей среде с титром 4x10<sup>3</sup> БОЕ/0.2 мл для системы RTG-2 - IPNV и 100 ТЦЛ, 50/0,2 мл для системы EPC-

SVCV.

2.2.3.5. Подготовка суспензии клеток. Суспензию клеток готовят в ростовой среде с такой концентрацией клеток, чтобы через сутки образовался монослой (RTG-2 - 95x10<sup>3</sup> клеток/0.1 мл; EPC - 80-85x10<sup>3</sup> клеток/0.1 мл).

2.2.3.6. Техника титрования интерферона. Восьмиканальной микропипеткой готовят 2-кратные разведения образцов интерферона на ростовой среде в 96-луночной микропанели (для каждого разведения используют 3-4 лунки) по 0,1 мл/луночка. Чтобы исключить неспецифическое и токсическое действие образцов, титрование начинают с разведения 1:8, а количество разведений зависит от предполагаемого титра интерферона. Обычно достаточно конечного разведения 1:1024.

В качестве контролей используют: 1 - контроль клеток (в 3-4 лунки вносят по 0.1 мл ростовой среды); 2 - контроль на токсичность образца (в 3-4 лунки вносят по 0.1 мл образца, разведенного 1:8); 3 - контроль рабочей дозы вируса (в 6-8 лунок вносят по 0.1 мл ростовой среды).

Во все лунки (опытные и контрольные) вносят по 0,1 мл суспензии клеток. Микропанели закрывают крышкой и помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор при температуре, оптимальной для роста культуры клеток (20° С для RTG-2, 25° С для EPC). При отсутствии CO<sub>2</sub> - инкубатора можно использовать эксикатор, в который помещают микропанели, зажигают свечу, закрывают крышку и ставят в термостат с указанной температурой. Для герметизации края крышки эксикатора обмазывают вазелином. Через 18-20 час инкубации микропанели открывают, переворачивают и аккуратно стряхивают, чтобы удалить среду. Края панели промокают стерильной фильтровальной бумагой.

Во все подопытные лунки и лунки контроля рабочей дозы вируса вносят по 0.2 мл рабочей дозы вируса. В лунки контролей 1 и 2 вносят по 0,2 мл поддерживающей среды.

Микропанели закрывают и помещают в CO<sub>2</sub> - инкубатор при температуре, оптимальной для репродукции вируса. Инкубируют до развития ЦПД на 100% в лунках с контролем рабочей дозы вируса.

2.2.3.7. Учет результатов и расчет активности интерферона.

Среду из микропанелей удаляют стряхиванием, клетки окрашивают в течение 10 мин 1%-ным раствором кристаллвиолета в 20%-ном этаноле. Краситель удаляют, а клетки промывают 3 раза водой и высушивают.

Краситель элюируют 70%-ным этанолом (0.1 мл/лунку) и определяют OD595. Можно определять оптическую плотность клеток без элюирования, сразу после высушивания. Рассчитывают среднее значение OD59; для лунок с контрольными клетками (ODmax), с рабочей дозой вируса, т.е. при 100% поражении монослоя (ODmin), а также среднее значение OD595 для каждого разведения интерферона.

Оптическую плотность образцов при 50% защите клеток определяют по формуле:

$$OD50 = (ODmax - ODmin) : 2$$

Количество единиц активности интерферона в 1 мл образца (АиФ) рассчитывают по формуле:

$$АиФ = 1/V T_n + [(T_{n+1} - T_n) \times (OD_n - OD_{min} - OD50) : (OD_n - OD_{n+1})]$$

V - объем образца, 0.1 мл;

T<sub>n</sub> - величина, обратная разведению образца, дающему больше 50% защиты клеток от инфекции;

T<sub>n+1</sub> - величина, обратная разведению образца, дающему меньше 50% защиты клеток;

OD<sub>n</sub> - оптическая плотность образца, защищающего больше 50% клеток;

OD<sub>n+1</sub> -

оптическая плотность образца, защищающего меньше 50% клеток.

При отсутствии фотометра долю непораженных клеток в каждой лунке (в процентах) определяют приблизительно, исследуя микропанель под инвертированным

микроскопом. Активность интерферона рассчитывают по этой же формуле, подставляя

вместо величины оптической плотности долю непораженных клеток (в процентах).

### 3. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУННАЯ СИСТЕМА

Специфическая иммунная система состоит из клеточных и гуморальных компонентов. От неспецифических факторов они отличаются специфичностью взаимодействия с чужеродными агентами. Специфичность иммунных реакций определяется лимфоцитами и иммуноглобулинами.

Состояние специфического звена иммунной системы рыб важно знать при оценке

иммунного статуса, определении потенциальных возможностей организма рыб противостоять воздействию агрессивных факторов среды и установлении характера

влияния иммуномодулирующих и вакцинных средств. Оно оценивается по данным

анализа клеточных и гуморальных факторов иммунитета.

#### 3.1. КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ

Основную роль в формировании специфического клеточного иммунного ответа рыб

на чужеродные агенты играют лимфоциты.

### 3.1.1. ЛИМФОЦИТЫ

3.1.1.1. Метод определения абсолютного и относительного содержания лимфоцитов основан на установлении относительного числа лимфоцитов в процентах по лейкоцитарной формуле и проведении расчета содержания клеток, приходящихся на долю лимфоцитов из общего количества лейкоцитов, обнаруженных в 1 мл крови при прямом подсчете.

#### 3.1.1.2. Определение Т- и В-лимфоцитов.

Существуют разнообразные способы определения Т- и В-лимфоцитов в организме рыб. Они основаны на учете характера реагирования лимфоцитов с маркерами или со специфическими антисыворотками против отдельных клеточных популяций. В качестве маркеров используют эритроциты барана, мышей, зимозан. Т- и В-зависимые митогены (конкавалин А, фитогемагглютинин, липополисахариды, птичий туберкулин) и т.д. Для оценки качественного состава и количества отдельных типов клеток применяются методы розеткообразования или реакция бласттрансформации. — Определение содержания Т-лимфоцитов методом Е-рокеткообразования. Принцип метода. Т-лимфоциты в организме позвоночных, в т.ч. рыб, выполняют разнообразные функции, связанные с распознаванием "своего" и "чужого" и поддержанием генетического постоянства внутренней среды. Данный показатель используется при оценке состояния Т-клеточного иммунитета. Т-лимфоциты несут на своей поверхности рецепторы для эритроцитов барана (ЭБ). Благодаря наличию таких рецепторов Т-лимфоциты способны вступать в реакцию с эритроцитами барана и образовывать так называемые розетки. Подсчитав количество Е-рокеткообразующих клеток, судят о количественном содержании (относительном и абсолютном) Т-лимфоцитов в исследуемом образце.

- Оборудование, реагенты и реактивы: 0,5 %-ная суспензия эритроцитов барана; раствор Олсвера; фосфатный буфер (рН-7,4); раствор Хенкса (или среда 199); 3 %-ный раствор глутарового альдегида; метиловый зеленый; пиронин; хлороформ; лимфоциты; фиколин-верографин (плотность - 1,007 г/мл); силиконизированные или пластиковые пробирки; центрифуга настольная; пипетки, пробирки центрифужные; гепарин; кровь рыб; микроскоп; камера Горяева. Материалы для исследования, ход определения и учет результатов.

Из крови рыб выщеляют лимфоциты путем центрифугирования в градиенте фикол-верографина. В силиконизированную пробирку, смоченную раствором гепарина (или цитрата натрия), набирают 1-2 мл крови рыб, разводят 1:1 раствором Хенкса; на дно сухой пробирки аккуратно наливают 1,5-2 мл градиента плотности; наклонив пробирку под углом 45°; пробирку центрифугируют при 1500 об/мин в течение 40 минут; после центрифугирования пипеткой собирают кольцо лимфоцитов, находящееся между слоями плазмы и градиентом плотности; клетки дважды отмывают раствором Хенкса при 1500 об/мин в течение 10 минут; подсчитывают концентрацию лимфоцитов в камере Горяева и доводят раствором Хенкса (или средой 199) до 2 млн. кл/мл. - трижды отмытые эритроциты барана разводят средой 199 до 0,5% концентрации. В силиконизированную пробирку объемом 1-2 мл вносят 0,1 мл 0,5% раствора эритроцитов барана, к эритроцитам барана добавляют 0,1 мл суспензии лимфоцитов (2 млн. кл/мл), смесь инкубируют 5 мин при 26° С, после инкубации смесь центрифугируют в течение 5 мин при 750 об/мин (около 200 г) и инкубируют при 26° С в течение 1 часа. По истечении инкубации клетки фиксируют глутаровым альдегидом (0,05 мл 3% раствора) и после отмывания от глутарового альдегида делают мазки. Мазки фиксируют в метаноле, красят метил-грюн-пиронином по Браше и микроскопируют. Число Е-розеткообразующих клеток в процентах вычисляют в результате подсчета 200-300 лимфоцитов в препарате. За розеткообразующую клетку (РОК) принимают лимфоцит, присоединивший не менее 3 эритроцитов барана. Абсолютные цифры Е-розеткообразующих клеток в 1 мкл выводят на основании количества лимфоцитов в 1 мкл крови. Лимфоциты можно выделить из суспензии клеток селезенки, лимфоидной ткани про- и мезонефроса и тимуса.

— Определение Т-, В-, Д- и 0-лимфоцитов (по Мэндес, 1973).

Принцип метода. При смешивании лимфоидных клеток рыб с эритроцитами барана (ЭБ), частичками зимозана, сенсibilизированными макроглобулиновыми антителами с комплементом, происходит их избирательная адсорбция лимфоидными клетками: на Т-лимфоцитах адсорбируются эритроциты барана, на В-лимфоцитах - частицы зимозана, на Д-лимфоцитах - частицы зимозана и эритроциты барана; 0-лимфоциты остаются свободными от эритроцитов и частичек зимозана. Данный метод применяется для идентификации популяционной структуры лимфоцитов.

- Компоненты, материалы и оборудование. Лф - суспензия лимфоцитов рыб, концентрацией 2 млн. клеток/мл, в среде 199 (или Хенкса). Способ получения Лф (см. выше). ЭБ - 0,5%-ная взвесь эритроцитов барана - индикаторы для Т-лимфоцитов; частицы зимозана конъюгированные с комплементом (индикаторы для В-лимфоцитов). Разбавители: физраствор, среда 199. Материалы и оборудование: гепарин, хлористый аммоний, 0,2%-ный раствор трипановой сини, глутаральдегид, разделяющий раствор с плотностью 1,077 г/мл, силиконизированные центрифужные и другие пробирки, пипетки, счетные камеры Горяева или Бюркера, холодильник, фазовоконтрастный микроскоп.

- Техника постановки реакции. В силиконизированную пробирку приливают по 0,1 мл взвеси лимфоцитов, 0,5%-ной взвеси эритроцитов барана и частички зимозана с комплементом. Смесь клеток инкубируют 5 мин при 26°С, центрифугируют 5 мин при 800-1000 об/мин и вновь инкубируют при 12°С - 60 мин. Осадок осторожно ресуспендируют, наносят каплю взвеси клеток на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Из капли взвеси можно готовить мазки на предметных стеклах и покрасить их по Романовскому-Гимза.

- Учет и оценка результатов реакции осуществляются одновременно и параллельно в световом и фазово-контрастном микроскопах. Просматривают 200 лимфоцитов и определяют процент РОК. Т-лимфоцит образует розетку из 3 и более ЭБ, В-лимфоцит - из 3 и более частиц зимозана; Д-лимфоцит образует смешанную розетку - 2 ЭБ + 2 и более частиц зимозана; 0-лимфоцит розеток не образует.

### 3.2. ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ.

3.2.1. Иммуноглобулины. Они являются биохимической основой специфического гуморального иммунитета, выполняют функцию специфических антител к конкретным антигенам, синтезируются плазматическими клетками (В-лимфоцитами) и секретируются в кровь или тканевые жидкости. Основная их часть относится к гамма - глобулиновой фракции сыворотки крови.

Методы определения содержания в организме рыб иммуноглобулинов основаны на оценке содержания гамма-глобулинов в сыворотке крови или других биологических жидкостях. Простыми и доступными приемами исследования гамма-глобулинов в сыворотке крови и других жидкостях являются методы электрофореза, хроматографии

на анионообменниках, осаждения насыщенными растворами фосфатов или сульфатов.

Существуют также иммунологические методы определения содержания гамма-глобулинов у рыб с помощью антисывороток.

### 3.2.1.1. Определение иммуноглобулинов в сыворотке крови рыб по гамма-глобулину методом осаждения.

- Принцип метода. При взаимодействия с насыщенными растворами фосфатов, определенной концентрации гамма - глобулины осаждаются, изменяя тем самым оптическую плотность исследуемого образца. Определение производится параллельно с другими фракциями сыворотки крови (альбуминами, альфа и бета-глобулинами), по изменению оптической плотности (ОП) на ФЭКе.

- Оборудование и реактивы. ФЭК, химические пробирки, пипетки на 1, 2, 5, 10 мл, бюретка на 100 мл, мерные колбы на 100 и 500 мл, холодильник, сыворотка крови, фосфатные растворы (основной и рабочий), штативы для пробирок.

- Материал для исследования, ход определения и учет результатов.

Вначале

готовят основной фосфатный раствор: 335 г гидроокиси натрия растворяют в 400 мл дистиллированной воды, добавляют 226,8 г фосфорнокислого калия однозамещенного.

После растворения охлаждают до комнатной температуры и добавляют дистиллированную воду до объема 500 мл, затем готовят рабочие фосфатные растворы для осаждения каждой фракции белков. Берут 4 мерных колбы на 100 мл,

которые нумеруют соответственно N 1, 2, 3 и 4. В каждую колбу вносят строго

определенное количество основного фосфатного раствора: 92,4 мл - N 1, 74,9 мл -

N 2, 58,8 мл - N 3, 48,7 мл - N 4 и до метки 100 мл доливают дистиллированную

воду. После этого рабочие растворы в колбах тщательно размешивают путем встряхивания (при хранении добавляют 1 каплю хлороформа на 100 мл раствора). После приготовления фосфатных растворов приступают к определению

белковых фракций в исследуемых образцах. На каждую пробу сыворотки крови берут

6 пробирок и нумеруют:

0, 1, 2, 3, 4, 5. В пробирку под цифрой 0 вносятся 10 мл дистиллированной воды,

в пробирки под номерами 1, 2, 3 и 4 - по 5 мл соответствующих этим цифрам

рабочих фосфатных растворов. В пробирку N5 вносят 0.5 мл исследуемой сыворотки

крови, 0.75 мл дистиллированной воды и 3.75 мл основного фосфатного раствора,

пробирку закрывают пробкой и перемешивают путем переворачивания ее 5-6 раз,

после чего из этой пробирки переносят по 0.5 мл смеси в пробирки N 1, 2, 3, 4 и 1 мл в пробирку под номером 0 (контроль).

Содержимое пробирок тщательно и осторожно перемешивают, избегая образования пены и пузырьков воздуха и выдерживают 15 мин при комнатной температуре. По истечении указанного срока осуществляют измерение ОП растворов в пробирках N 1, 2, 3, 4 против контроля (N 0) на ФЭКе при красном светофильтре в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Определение оптической плотности проводится сначала в пробирке N4, затем в пробирках N 3, 2и1.

Расчет результатов производится по схеме:

ОП пробирки N1 - ОП пробирки N2 = ОП альбуминов;

ОП пробирки N2 - ОП пробирки N3 = ОП альфа-глобулинов;

ОП пробирки N3 - ОП пробирки N4 = ОП бета-глобулинов;

ОП пробирки N4 = ОП гамма-глобулинов.

Принимая сумму ОП альбуминов и всех глобулиновых фракций за 100% (ОП пробирки N1), вычисляют долю содержания каждой фракции в процентах.

Процентное

содержание гамма-глобулинов определяют

по формуле: 
$$\frac{\text{Относительное содержание гамма-глобулина, \%}}{\text{ОП}} = \frac{\text{ОП}_{\text{гг}} \times 100}{\text{E}_{20\text{П}}}$$

где

ОП<sub>гг</sub> - гамма-глобулина (ОП - пробирки N 4),

E<sub>0п</sub> - сумма ОП всех белковых фракций (ОП пробирки N 1),

100 - коэффициент перевода содержания гамма-глобулина в %.

Зная концентрацию общего белка в единице объема можно произвести перерасчет

в абсолютные величины. Ошибка метода составляет ± 4%.

### 3.2.2. АНТИТЕЛА.

Антитела представляют собой сывороточные белки, синтезируемые В-лимфоцитами

при попадании в организм антигена или чужеродных тел и вступающие с ними во

взаимодействие. Главными свойствами антител являются специфичность и гетерогенность. Специфичность антител определяется антигеном, вызывающим их

синтез. Рыбы, как и высшие позвоночные, синтезируют разнообразные по структуре

и функции антитела: агглютинины, преципитины, антитоксины, комплементсвязывающие и вируснейтрализующие антитела, гемолизины, полные и

неполные. Антитела по происхождению подразделяются на естественные и индуцируемые (образующиеся после парентерального и энтерального введения

антигена). Они являются одной из информационных структур иммунной системы,

выполняющих функцию иммунологической памяти об антигене. Благодаря высокой

специфичности антитела используются при определении природы антигенов

вызывающих их синтез, напряженности активно приобретенного иммунитета, характера течения процесса иммуногенеза и характера влияния благоприятных и неблагоприятных факторов на иммунную систему рыб.

Существуют многочисленные методы определения содержания антител в организме рыб: серологические, иммуноэлектрофоретические, радиоиммунные, иммуноферментные, иммунодиффузные, лазерные.

Наиболее простыми и общепринятыми методами определения антител в организме рыб являются: реакция агглютинации, реакция агглютинации латекс-антигена (или антител).

#### 3.2.2.1. Определение антител в реакции агглютинации.

Реакция агглютинации (РА) используется для идентификации возбудителя болезни с помощью стандартной (референтной) агглютинирующей сыворотки. Агглютинацией называется склеивание микробов агглютининами сыворотки в присутствии электролитов, т.е. солевых растворов.

- Принцип метода основан на установлении способности сыворотки крови иммунных рыб склеивать микроорганизмы, вызвавшие этот иммунный ответ.

- Оборудование и реактивы: пробирки стерильные; 0,65%-ный стерильный раствор натрия хлорида; сыворотка крови обследуемых рыб; водяная баня, отрегулированная на 60° С; одномиллиардная взвесь суточной культуры инактивированных микроорганизмов возбудителей болезни рыб, приготовленная на 0.65%- ном стерильном растворе натрия хлорида; термостат, отрегулированный на 26° С; агглютиноскоп; пастеровские пипетки, пробирки, шприцы и инъекционные иглы для взятия крови - стерильные.

- Материал для исследования, ход определения и учет результатов. В штатив размещают ряд из 8 или более пробирок. В первую вносят 0.2 мл сыворотки, в остальные - такой же объем 0.65%-ного стерильного раствора натрия хлорида. Во вторую пробирку к разбавителю добавляют 0.2 мл цельной сыворотки и тщательно перемешивают содержимое пробирки пипетированием. Стандартный объем (0.2 мл) смеси переносят в следующую (третью) пробирку, тщательно смешивают с разбавителем и переносят в четвертую, и так далее до предпоследней пробирки ряда, из которой стандартный объем смеси удаляют. В результате получают серию разведения, в которой содержание исходной сыворотки (и соответственно антител)

убывает в геометрической прогрессии 1:2, 1:4, 1:8 и т.д. до 1:64 и более. После внесения 0,2 мл жидкости в очередную пробирку пипетку заменяют на новую. В пробирки с разведенной сывороткой (кроме первой - контроль сыворотки) и в последнюю пробирку с физраствором (контроль антигена) вносят по 0.05 мл (1 капля) тест-антигена, тщательно перемешивают до получения равномерной взвеси и помещают в термостат на 2-3 часа при 26°C. Контролем служат сыворотка и антиген без сыворотки (первая и последняя пробирки ряда). Штатив с пробирками вынимают из термостата и проводят предварительную оценку реакции, затем оставляют при комнатной температуре на 20-24 часа. Окончательную оценку реакции осуществляют с помощью агглютиноскопа. Учет реакции проводят по четырехбалльной системе:

"++++" - полная агглютинация (осадок рыжый в виде зонтика, жидкость над осадком прозрачная, при встряхивании видны хлопья или зерна различной величины);  
"+++ " - полная агглютинация (осадок такой же, надосадочная жидкость менее прозрачна);  
"++" - неполная агглютинация (осадок небольшой, надосадочная жидкость непрозрачная);  
"+" - следы агглютинации (осадок незначительный, надосадочная жидкость непрозрачная);  
"- " - отрицательная реакция (осадка нет, взвесь равномерно мутная).

В контроле антигена - осадка нет, взвесь равномерно мутная. Наивысшее разведение исследуемой сыворотки, в которой происходит агглютинация добавленных микробных клеток при оценке не менее, чем на два креста, считают ее титром.

3.2.2.2. Реакция агглютинации латекс-антигена (или антител) - РАЛАГ (Зингер, Плотц, 1956).

- Принцип метода. Реакция агглютинации мелкодисперсных частиц латекса, нагруженных антигеном (АГ), под воздействием специфических антител (АТ) иммунной сыворотки или антителами, при взаимодействии с гомологичным АГ, применяется для обнаружения содержания антител у иммунных рыб к разным АГ и диагностики возбудителя болезни.

- Компоненты и материалы. АГ - 5%-ный раствор растворимого антигена (в качестве источника АГ могут служить гомогенаты аутоантигенов, возбудителей болезни,

вакцины, сыворотки крови и т.д.). Исследуемая сыворотка рыб. 10%-ная суспензия частиц полистиролового латекса стандартной величины - от 0,77 до 0,81 мкм на

0.65% растворе NaCl. Хранят при 2-4° С, но не дольше 4-х недель.

Разбавители:

боратный или глициновый буфер с рН 8,1-8,3. Боратный буфер: 50 мл 0,1 М раствора борной кислоты (6,184 г H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> растворяют в 1000 мл диет. воды), 5,9 мл

0,1%-ного раствора NaOH и 100 мл 0,85%-ного раствора хлорида натрия.

Глициновый

буфер: к 1 л 0,1 М раствора глицина, доведенного до рН 8,2 с помощью 1 н.

раствора NaOH, добавляют Юг NaCl. Материалы: пипетки, пробирки, колбы и др.

- Техника постановки реакции.

Для сенсibilизации частиц латекса к 0,1 мл 10%-ной суспензии мелко дисперсных частиц добавляют 0,5 мл 5%-ного раствора АГ и 9,4 мл боратного

буфера. Суспензию тщательно перемешивают и выдерживают 2 ч при 26°С.

Постановку

реакции латекс-агглютинации начинают с приготовления в дополнительном ряду

пробирок разведения сыворотки исследуемых рыб на боратном буфере в соотношениях

от 1:10, 1:20 до 1:1280-1:2560.

- Капельная реакция латекс-агглютинации.

В ряд микропробирок вносят по 2 капли соответствующих разведения исследуемой сыворотки и добавляют по 1 капле суспензии частиц латекса, сенсibilизированных соответствующим АГ. В контроле смешивают аналогичные объемы

частиц латекса с разведениями инактивированной нормальной сыворотки.

Штатив с

пробирками встряхивают и выдерживают при 26° С 30 мин. Затем смеси центрифугируют при 1500 об/мин в течение 3 мин, осторожно встряхивают и учитывают результат реакции.

- Пробирочная реакция латекс-агглютинации. В опытный ряд пробирок приливают по

1 мл соответствующих разведения исследуемой сыворотки и добавляют по 1 мл

латекс-АГ. Контрольные смеси: 1) боратный буфер+суспензия латекс-АГ; 2) разведения нормальной сыворотки + суспензия латекс-АГ. Пробирки встряхивают,

помещают в водяную баню при 26°С на 2 ч, центрифугируют при 1500 об/мин в

течение 10 мин, осторожно встряхивают и учитывают результат реакции.

- Учет и оценка результатов реакции производятся по образованию зерен латексного агглютината и просветлению жидкости в пробирке. Учет результатов

целесообразнее проводить в агглютиноскопе;

оценка проводится по 4-балльной системе.

#### 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАПРЯЖЕННОСТИ ИММУНИТЕТА.

Под напряженностью иммунитета следует понимать способность организма рыб противостоять агрессивному влиянию возбудителей болезни и их продуктам метаболизма и распада (экзо- или эндотоксинам). Напряженность иммунитета отражает совокупную деятельность всех функциональных структур иммунной системы рыб на уровне целостного организма.

Одним из объективных способов оценки напряженности иммунитета или устойчивости рыб к паразитам, вызывающим инфекционные и инвазионные болезни, является заражение рыб патогенными организмами или их токсинами. Оценка напряженности иммунитета применяется в селекционной работе, при определении эффективности вакцинации, последствий влияния благоприятных и неблагоприятных для жизнедеятельности биотических и абиотических (включая токсические) факторов на выживаемость рыб.

#### 4.1. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАПРЯЖЕННОСТИ ИММУНИТЕТА (с использованием *A. hydrophila*)

4.1.1. Принцип метода основан на экспериментальном заражении рыб вирулентной культурой, вызывающей 50% или 100%-ную гибель исследуемого вида рыб. Причем, в группе рыб с низким уровнем естественной резистентности LD<sub>50</sub> меньше, чем в группе рыб с более высоким уровнем напряженности естественного иммунитета.

4.1.2. Оборудование и реактивы: аквариумы, пробирки, шприцы, рыба, суточная культура вирулентных бактерий - возбудителя инфекционной болезни рыб.

4.1.3. Материал для исследования, ход определения и учет результатов. Отбирают 60 экз. рыб, имеющих средний для данной партии рыб показатель навески. В заполненные водой (с температурой не ниже 18°C и не выше 26°C пять (и более) аквариумов или бассейнов с аэрацией или садки, установленные в карантинном пруду, помещают по 25 экз. (из расчета не более 5 г иктиомассы на 1 л воды) отобранных рыб, которым предварительно вводят внутривентрально одномиллиардную взвесь суточной вирулентной культуры бактерий *A. hydrophila*, приготовленную на 0.65%-ном стерильном растворе натрия хлорида в дозах 0.125; 0.25; 0.5; 0.75; 1 мл (и более). Наблюдение за инфицированной рыбой ведут в течение 10 суток с момента инъекции микробной взвеси и по выживаемости устанавливают дозу инфекта, вызывающую 50 или 100%-ную гибель рыб, с характерными для данной инфекции клиническими и патологоанатомическими изменениями. Расчет летальной дозы, вызывающей 50%-ную гибель рыб (LD<sub>50</sub>), проводят

по методу Рида и Менча (Гончаров, 1973).

Расчитанной дозой LD<sub>50</sub> инфекта проводят заражение по 25 экз. исследуемых рыб, относящихся к одному виду, возрасту, с одинаковой массой, но находящихся при разных условиях содержания, либо на разных этапах иммуногенеза, течения болезни и т.д. Постановку и проведение опыта, а также учет результатов осуществляют так же, как и при отработке дозы LD<sub>50</sub>-Напряженность иммунитета определяют с учетом процента погибших рыб в опытной группе в сравнении с контролем.

По окончании аквариумных опытов проводят обеззараживание воды в аквариумах путем создания в них 10%-ной концентрации формалина или 10%-ного раствора хлорной извести. Через час воду спускают в канализационную сеть, а рыб сжигают. Весь инвентарь и посуду, бывшие в употреблении при работе с больной рыбой, дезинфицируют в 10%-ном растворе формалина в течение часа.

При завершении биологической пробы в бетонированных бассейнах, земляных садках, карантинных прудах рыбу сжигают и проводят дезинфекцию воды путем хлорирования, доводя содержание свободного хлора в воде до 4-5 мг/л. Сутки спустя воду пропускают через известковый фильтр (используют только свежую негашеную известь). После этого проводят дезинфекцию ложа прудов или садков и бассейнов негашеной или хлорной известью и оставляют их без воды на срок не менее месяца.

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу "Методические указания по определению уровней естественной резистентности организма рыб (к инфекционным болезням)", утвержденные ГУВ Госагропрома СССР 13.07.87 № 432-3

Методические указания по определению уровня естественной резистентности и оценке иммунного статуса рыб подготовлены специалистами ИБВВ РАН и ВНИИПРХ.

ие 1

определению

резистентности и

Приложен

к Методическим указаниям по

уровня естественной

оценке иммунного статуса рыб,

утв.

Уровень фагоцитарной активности лейкоцитов карпа на стадии  
поглощения, %

Возраст рыб, время фагоцитоза с момента термостатирования или введения объекта фагоцитоза	Низкий		Средний		Высокий
	Процент фагоцитоза	Фагоцитар- ный индекс	Процент фагоцитоза		