     МИНИСТЕРСТВО                                                          УТВЕРЖДАЮ   
        СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА   
          И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ                                            Заместитель руководителя   
       РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ                                   Департамента ветеринарии   
          (Минсельхозпрод России)

     ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ                                               В.В. Селиверстов

107139, Москва, Орликов пер., 1/11   
       Для телеграмм: Москва, 84   
    Минсельхозпрод Телекс: 41773К ЛЕН   
    Телефоны: 975-58-50; 975-54-23   
     № 13-4-2-/1795      от  25.11.99

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ   
    ио определению уровня естественной   
    резистентности и оценке иммунного   
                       статуса рыб**

1. **Общие положения**

Естественная рсзистентность рыб - это врожденная способность организма   
противостоять агрессивному влиянию патогенных факторов биотической и   
абиотической природы, в том числе, возбудителям инспекционных 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 клеточных 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-рсактивныс белки, интерферон,   
лизины, гемолизины, гемагглютинины и т.п.). Клеточные элементы иммунной   
системы организованы в тканевые и органные 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   
иммунокомпстентных 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 неспецифичсских 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, интерлсйки-нов 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 лейкопоэза и изменением соотношения между   
лимфоцитами и гранулоцитами. В организме рыб, подвергнутых воздействию   
"агрессивных" факторов, увеличивается доля содержания клеток   
гранулоцитарного ряда (палочкоядерных, ссг-ментоядерных нейтрофилов и   
эозинофилов и аберрантных 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 хемилюминесцснции или по способности фагоцитов восстанавливать   
растворимый краситель нитросиний тетразолий в нерастворимый диформазан   
(НСТ-тест). Определение фагоцитарной активности лейкоцитов in vitro и in vivo в   
отношении микроорганизмов основано на учете фагоцитов под световым   
микроскопом. Хсмилюминесцентный 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   
грамположителъные и грамотри-цательные микробы: staphilococcus aureus,   
acromonas 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°С; объект фагоцитоза -одномиллиардная взвесь суточной   
культуры бактерий a. hydrophila, инактивированных при 60°С в течение 30 минут,   
приготовленная на 0,65%-ном стерильном растворе натрия хлорида; термостат   
отрегулированный на 26°С; предметные стекла; шли4юваннос стекло; набор для   
окраски мазков крови; метиловый спирт или смесь этилового спирта с эфиром ]: 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, (,|,2 мл   
свсжевзятой крови от обследуемой рыбы, 0,2 мл объекта фагоцитоза. Взвесь   
осторожно, но тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре   
26°С (для теплолюбивых рыб) и более низкой (для холодолюбивых). Через 15 и 30   
минут, 1; 1,5 и 2 часа с момента тер-мостатирования 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 рас-   
твором азур-эозина. После этого их просматривают под иммерсией (ок.7.x 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°С;   
одномиллиардная взвесь суточной культуры бактерий А. hydrophila,   
инактивированной при 60°С в течение 30 мин.; термостат, отрегулированный на   
26°С; 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), интсрфе-рон,   
лсктины, трансфсрины, 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 резистент-ности рыб.

2.2.1. **Определение бактерицидной активности сыворотки (БАСК)   
крови рыб**

БАСК отражает функциональное состояние гуморальных факторов защиты   
или естественной резистснтности. 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 фотоэлсктронефелометрический   
способы. Поскольку для оценки БАСК радиоуглсродным способом требуется   
специально приспособленное для этой цели оборудование рекомендуется   
пользовать оптический метод (О.В.Смирнова, Т.А.Кузьмина, 1966),   
адаптированный для рыб (Микряков и др. 1979: Зимин, 1983).

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.

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; одномиллиардная 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°С; ФЭК-56М; пастеровские пипетки, шприцы и   
инъекционные иглы для взятия крови, стерильные.

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 каудоэкгомией, 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 одномиллиардной 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°С на 3 часа, после чего   
вновь измеряют оптическую плотность их содержимого. В пробирках с активной   
сывороткой крови оптическая плотность остается 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 угнстсние роста бактерий в присутствии   
сыворотки, и рассчитывают по формуле:

БАСК(%) = 100 х -dek ~ de ° ,

где de, d Ек - разность оптической плотности второго и первого измерений в   
контрольных пробирках; deo - разность оптической плотности второго и первого измерений оптической плотности в опытных пробирках.   
100-коэффициснт 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 % гемолитическуго единицу (СНад) принимается количество комплемента,   
необходимое для 50 %-го лизиса эритроцитов. Эта единица является условной,   
поскольку зависит от концентрации эритроцитов, количества сенсибилизирующих   
антител (для классического пути), величины ионной силы среды, концентрации   
Са^ и mg21, ph, времени и температуры реакции. Для каждого вида рыб   
подбираются оптимальные значения этих показателей.

Отношение между количеством взятого комплемента и долей лизи-рованных   
клеток нс является линейным, а выражается сигмовидной кривой, для   
математического описания которой используется уравнение:

Х = К (y/l-y)17"

где: Х - количество комплемента (мл) в реакции; у - степень лизиса, выраженная в   
долях единицы; К -константа, соответствующая ichso при у = 0,5; 1/п-константа   
(определяет наклон кривой, зависит от условий опыта).

При логарифмировании этого уравнения получается функция, удобная для   
оценки результатов:

igx =lgk+l/n[lg(y/l-y)]

Зависимость величины lg Х от величины lg(y/l-y) графически будет   
представлять прямую линию, по которой можно определить искомую величину К.   
Зная величину К, легко рассчитать количество chsn, содержащихся в 1 мл   
неразведенной сыворотки.

2.2.2.1. **Определение гемолитической активности комплемента** по   
классическому пути активации (метод Мейера в модификации yano Т.,   
1992).   
- Принцип метода основан на способности комплемента присоеди-   
няться к комплексу антиген - антитело (эритроциты барана - гемолизин) и   
вьвывать специфический гемолиэ сенсибилизированных эритроцитов.

За единицу активности (по Мейеру) комплемента теплокровных   
принимают такое количество неразведенной сыворотки, которое вызывает   
50 % лизис 5х108 оптимально сенсибилизированных эритроцитов барана в   
желатин - вероналовом буфере (рН 7,4), содержащем 0,15 mm Са2\* и 0,5   
mm mg24", в течение 60 мин инкубации при 37° С в объеме 7,5 мл. По   
yano Т., в зависимости от вида рыб, инкубацию осуществляют при 20- 25°   
С в течение 60-120 мин в желатин-вероналовом буфере (рН 7,3 -7,4),   
содержащем 0,5 mm Са2^ и 1 mm mg^ в объеме 1,5 мл. Для сенси-   
билизации 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 опти-   
ческого 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; про-   
бирки (5-10 мл), выдерживающие центрифугирование; рефрижераторная   
центрифуга; стерильные шприцы; глюкоза; naci; дистиллированная вода;   
na-5,5,- диэтилбарбитурат (мединал); cacl2; mgcl2; желатин; in hc1;   
ледяная уксусная кислота; ацетат натрия; edta; 10 % МаЖ)з; эритроциты   
барана в растворе Олсвера (1:1); гемолизин;сыворотка крови рыб (источник комплемента); 0.85% naci; маточный раствор солей (СаСЬ х 2НгО - 7.35 г, mgcl-i x 6h20 - 20.33 г, дистиллированная вода до 100 мл).

**- Приготовление буферных растворов**:

- Вероналовый буфер, концентрат, рН 7,3-7.4 (5vb): naci - 41,5 г,   
Ма-5,5-диэтилбарбитурат - 5,1 г, in hc1 - 17.5 мл, дистиллированная вода -1 л. Желатин-вероналовый буфер (gvb^): желатин - 0,1 г, 5vb - 20 мл,   
маточный раствор солей - 0,1 мл, дистиллированная вода до 100 мл   
(хранить при +4°С не более 1 недели) Глюкозо-желатин-вероналовый буфер (ggvb24): желатин - 0.1 г, 5vb - 10 мл, глюкоза - 2,5 г, маточный раствор солей — 0,1 мл, 10%   
nanos - 0,2 мл, дистиллированная вода до 100 мл (хранить при +4° С не   
более 1 недели). - 0,1 М edta буфер, рН 7<5: 2Д2 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, дистилированная 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 g 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 б раз 0,0б1 М ацетатным   
буфером (рН 5,0) и 1 раз физраство-ром, центрифугируя 20 мин. при 500-1000 g.   
Осадок тщательно ресус-певдируют в 30 мл физраствора. В суспензии определяют   
содержание азота микромстодом 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. Инъекций повторяют многократно (6-8 раз)   
с интервалом 5 дней. Перед каждой инъекцией (начиная с 4-5) отбирают   
сыворотки и определяют титр гемодизина. Количество инъекций зависит от титров   
полученных гемолйзинов (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 g. Отбирают   
сыворотки и разводят 1:1 gvb2^ 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   
антисывороток gvb2^ К 0,5 мл каждого разведения антисыворотки добавляют по   
0,1 мл эритроцитов барана (1х109 кл/мл, см. ниже), по 0,4 мл gvb 2+ и по 0,5 мл   
комплемента, разведенного gvb2^ 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 g, 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 g (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   
Олсвера (1:1) трижды отмывают edta-gvb и готовят 5% суспензию в gvb2^ К   
0,1 мл 5 % суспензии эритроцитов добавляют 1,4 мл дистиллированной воды,   
после лизиса эритроцитов измеряют ods4i против дистиллированной воды.   
Необходимой концентрации эритроцитов барана 1х109 кл/мл соответствует 0d541   
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   
ods4i отличается от 0,680.

- Подбор разведения гемолизина для оптимальной сенсибилизации   
эритроцитов. Готовят серийные двукратные разведения гемолизина (используют   
гемолизин с титром 1:1500 и выше) на gvb2'. 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. Готовят несколько разведении комплемента на   
gvb24 - 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 кар-   
па), 120 мин при 20° С (для лососевых), 120 мин при 25° С (для тиляпии),   
периодически встряхивая. Центрифугируют 5 мин при 16ДО g, 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 гемолизнна 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 сенсибилизированных эритроцитов**. Готовят оптимальное   
разведение гемолизина в edta-gvb. Это разведение медленно добавляют (при   
постоянном помешивании) к равному объему суспензии эритроцитов (1х109 кл/мл   
в edta-gvb) и инкубируют 30 мин при 25° С. Сенсибилизированные эритроциты   
отмывают в ggvb2^, центрифугируют 5-10 мин при 500g и готовят суспензию   
эритроцитов в ggvb^ с концентрацией 5х108 кл/мл. Концентрацию эритроцитов   
контролируют, измеряя ods4i лизированных клеток (0,2 мл суспензии   
сенсибилизированных эритроцитов + 1,3 мл дистиллированной воды дают ods4i,   
равную 0,680). Сенсибилизированные 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   
разводят gvb24 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   
испытуемого комплемента (0,4; 0.5; 0.6; 0.8; 1.0 мл), gvb21 доводят объем до 1,3   
мл, в каждую пробирку добавляют по 0.2 мл сенсибилизированных эритроцитов.   
Три пробирки используют для контролей: 1 -контроль эритроцитов на спонтанный   
лизис (0.2 мл сенсибилизированных эритроцитов + 1.3 мл gvb^); 2 - 100% лизис   
эритроцитов (0.2 мл суспензии сенсибилизированных эритроцитов + 1.3 мл   
дистиллированной воды); 3 - контроль od.541 комплемента (1.0 мл разведенного   
комплемента + 0.5 мл gvb^).

Пробирки инкубируют, периодически встряхивая (время и температура -   
оптимальные для каждого вида рыб). Центрифугируют 5 мин при 1600g. Измеряют   
od541 супернатанта. Вычисляют степень гемолиза (у) с учетом поправок на   
контроли. Т.е. от полученного значения od.,41 супернатанта каждой опытной   
пробирки вычитают od.s4i контроля эритроцитов и ods4i контроля комплемента   
(значение ods^i контроля комплемента измеряют только для первой пробирки, в   
которой максимальный объем комплемента, а для остальных пробирок эта   
величина уменьшается пропорционально уменьшению объема комплемента).

В логарифмическом масштабе строят график зависимости у/(1 - у) от объема   
комплемента. При 50% гемолизе у/(1 - у) = 1. Графически находят объем   
комплемента (К), вызывающий 50% гемолиз, что соответствует 1 гемолитической   
единице chso Количество СН5о в 1 мл (М) рассчитывают по формуле:

М = 0.2 n : К,

где: n - величина, обратная разведению комплемента; 0.2 - коэфф. коррекции, т.к. в используемом варианте объем реакционной смеси в 5 раз меньше (1.5 мл), чем в оригинальном по Мейсру (7.5 мл). *Гемолитическая активность комплемента* карпа равна 20.0 ± 9.1, радужнойфорели - 28.0 ± 13.5, тиляпии - 205.1 ± 76.6. (t.yano, 1992).

2.2.2.2. **Определение гемолитической активности комплемента** по   
альтернативному пути активации (по yano Т., 1992).

Для определения активности комплемента по альтернативному пути обычно   
используют эритроциты кролика, как активатор и тест-объект. Реакцию ведут в   
присутствии egta (хелатньш агент для Са2^ чтобы блокировать классический   
путь активации) и mg2+.

Гемолитическая активность карпа (в отличие от радужной форели, тиляпии,   
аю, порги, ' желтохвоста, человека, свиньи) возрастает в несколько десятков раз   
при добавлении в реакционную смесь 0.1 mm ca2^   
- Принцип метода основан на способности комплемента активироваться   
эритроцитами кролика и лизировать их.   
За единицу активности комплемента (АСН5о) принимают такое количество   
неразведенной сыворотки, которое вызывает 50% лизис 4х10 эритроцитов при   
20°С в желатин-вероналовом буфере, содержащем 10mМ egta и 10mm mg^ в   
объеме 0.7 мл; рН и время инкубации различаются в зависимости от вида рыб   
(радужная форель - рН 7.0, 1.5 часа; карп - рН 7.5, 1.5 часа).   
- Оборудование и реактивы; оборудование см. п. 2.2.2.1.; глюкоза;   
дистилированная вода; Ма-5,5-диэтилбарбитурат; mgcl2+2; in hc1;   
egta; желатин; naoh; эритроциты кролика; сыворотка крови рыб (источник   
комплемента).

**- Приготовление буферных растворов**:

- Всроналовый буфер, концентрат (5 vb), см.п, 2.2.2.1.   
- 0,1 М egta - mg буфер,: egta - 38 r, mgc12 x 6 Н20 - 20,3 г, naoh – 7   
r, дистилированная вода - 1л, доводят рН до 7,5 in naoh.   
- 0,01 М egta - mg желатин-вероналовый буфер (egta-mg-gvb):   
жедатин-0,1 г; 5 vb-20 мл; 0,1 М egta-mg-10 мл; дистилированная вода до 100   
мл, доводят рН до 7,5 (для карпа), до 7,0 (для радужной форели). Хранят при +4° С   
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 2х108 кл/мл в этом же буфере. Концентрацию эритроцитов   
контролируют, измеряя odw лизированных клеток (к 0,1 мл суспензии   
эритроцитов добавляют 3,4 мл дистиллированной воды и измеряют od4i4 лизата;   
если полученная величина od4i4 отличается от 0,740, то суспензию эритроцитов   
необходимо развести или сконцентрировать во столько раз во сколько полученное   
00414 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° С (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° С (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 od4i4. Вычисляют степень   
гемолиза (у) с учетом поправок на контроль эритроцитов и комплемента   
(см.п.2.2.2.1.). В логарифмическом масштабе строят график зависимости у/1-у от   
объема комплемента. При 50 % гемолизе у/(1-у)=1. Графически находят объем   
комплемента (К), вызывающий 50 %-ньш гсмолиз, что соответствует одной   
гемолитической единице АСН5и.   
Количество АСН5о в 1 мл (М) рассчитывают по формуле:

М = 0,5 n : К,

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 Т., 1992, гемолитическая активность комплемента   
карпа равна 58,9 j: 13,5, радужной форели - 345 +\_ 108, тидяпии- 574 j: 250, барана   
- 15,4, морской свинки - 11,9, собаки -14,4, человека -18,4.

2.2.3. **Определение активности иптерферона** спектрофотометри-ческим   
методом (t.renault et al. 1991, с дополнением)

Разработано несколько методов определения активности интерфе-рона,   
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; ддя карпа - ЕРС- svcv. В качестве источника интерферона   
используют сыворотки рыб, в случае исследования мальков - го-могенат тушек   
рыб.

2.2.3.1. Принцип метода. Спектрофотометрический микрометод титрования   
интерферона основан на различии оптической плотности ин-тактного клеточного   
монослоя и 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- и 8-канальные на 0,2 мл);   
96-луночные культуральные микропанели; СС>2 - 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%   
этанояе.

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 looooog ; низким рН (добавляют НС1   
до рН 2,0, выдерживают 24-48 часов при +4° С, восстанавливают рН до 7.0 добав-   
лением naoh).

Если в качестве индуктора использовали дсРНК или другие препараты (но не   
вирусы), эта процедура исключается. Содержащие интерфе-рон 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   
разведении. Готовят вируссодержащую суспензию в поддерживающей среде с   
титром 4х103 БОЕ/0.2 мл для системы rtg-2 - ipnv и 100 ТЦД5о/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 - 95х103 клеток/О. 1 мл; ЕРС - 80-85х103 клеток/О. 1 мл).

2.2.3.6. Техника титрования ингерферона. 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/лунка. Чтобы исключить неспецифическое и токсическое действие образцов,   
титрование начинают с разведения 1:8, а количество разведении 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 СОг-инкубатор при температуре,   
оптимальной для роста культуры клеток (20° С для rtg-2, 25° С для ЕРС). При   
отсутствии СО; - 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 микропансли 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 СО-г - 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 микропанслсй удаляют стряхиванием, клетки окрашивают в   
течение 10 мин 1%-нь1м 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 элюиро-вания, сразу после   
высушивания. Рассчитывают среднее значение od595, 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:   
od5o = (odmax - odmin):2

Количество единиц активности интерферона в 1 мл образца (Аиф ) рассчитывают по формуле:   
Аиф= 1/vtn + [(Т n+1 - tn) x (odn - odmin - od5o):(odn - odn+1 v - объем образца, 0.1 мл;   
t,i -величина, обратная разведению образца, дающему больше 50% защиты   
клеток от инфекции; Т пн - величина, обратная разведению образца, дающему меньше 50% защиты клеток; odn - оптическая плотность образца, защищающего больше 50% клеток; od,n+1 - 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, подставлял вместо величины оптической плотности долю   
непораженных клеток (в процентах). Специфическая иммунная система   
Специфическая иммунная система состоит из клеточных и гуморальных   
компонентов. От неспецифических факторов они отличаются специфичностью   
взаимодействия с чужеродными агентами. Специфичность иммунных реакции   
определяется лимфоцитами и иммуноглобули-нами.   
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 иммуномоду пирующих к 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 митоге-ны (конкавалин А, фитогсмагглютинин,   
липополисахариды, птичий туберкулин) и т.д. Для оценки качественного состава и   
количества отдельных типов клеток применяются методы розеткообразования или   
реакция бластрансформации.

**Определение   содержания   Т-лимфоцитов   методом   Е-   
розеткообразования**.   
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 рсцепторов Т-лимфоциты способны вступать в реакцию   
с эритроцитами барана и образовывать так называемые розетки. Подсчитав   
количество Е-розеткообразующих 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 Хсн-кса (или среда   
199); 3 %-ный раствор глутарового альдегида; метиловый зеленый; пиронин;   
хлороформ; лимфоциты; фикол-верографин (плотностью -1,007 г/мл);   
силиконизированные или пластиковые пробирки; центрифуга настольная;   
пипетки, пробирки центрифужные; гспарин; кровь рыб; микроскоп; камера   
Горяева.

  Материалы для исследования, ход определения и учет результатов.   
Из крови рыб выделяют 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 Хснкса; на дно сухой пробирки аккуратно наливают 1,5-2 мл градиента   
плотности; наклонив пробирку под углом 45°; пробирки цснтри4)угируют при i500   
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; под-   
считывают 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 и инкубируют при 26° С в течение 1 часа. По истечении инкубации клетки   
фиксируют глутаровым альдегидом (0,05 мл 3% раствора) и после отмы-вания от   
глутарового альдегида делают мазки. Мазки фиксируют в метаноле. красят метил-   
грюн-пиронином по Брашс и микроскопируют. Число Н-розеткообразующих   
клеток в процентах вычисляют в результате подсчета 200-300 лимфоцитов в   
препарате. За розеткообразуюшую клетку (РОК) принимают лимфоцит,   
присоединивший нс 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, сенсибилизированными 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 лим-({юцитов рыб,   
концентрацией 2 млн. клеток/мл, в среде 199 (или Хснкса). Способ получения Лф   
(см. выше). ЭБ - 0,5%-ная взвесь эритроцитов барана - индикаторы для Т-   
лимфоцитов; частицы зимозана конъюгирован-ньге с комплементом (индикаторы   
для В-лимфоцитов). Разбавители: физ-раствор, среда 199. Материалы и   
оборудование: гепарин, хлористый аммоний, 0,2%-ный раствор трипановой сини,   
глутаральдсгид,разделяющий раствор с плотностью 1,077 г/мл,   
силиконизированныс цснтрифужные 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 но   
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. Имуноглобулины. 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 иммуноглобули-нов   
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 анио-нообменниках, осаждения насыщенными   
растворами фосфатов или сульфатов. Существуют также иммунологические   
методы определения содержания гамма-глобулинов у рыб с помощью   
антисывороток.

**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 !. 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   
однозамещснното. 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 фос4)атного 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 разме-   
шивают путем встряхивания (при хранении добавляют i 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 перевертывания ее 5-6 раз, после чего   
из этой пробирки переносят по 0.5 мл смеси в пробирки n i, 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 ОГГ растворов в пробирках n 1, 2, 3, 4 против контроля (n 0) на ФЭКс при красном   
светофильтре в кювете с длинной оптического пути 1 см. Определение оптической плотности проводится сначала в пробирке n4, затем в пробирках n 3, 2 и 1.   
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 = ОПгамма-глобулинов.

Принимая сумму ОП альбуминов и всех глобулиновых 4>ракций за 100%   
(ОП пробирки n1), вычисляют долю содержания каждой фракции в процентах.   
Процентное содержание гамма-глобулинов определяют по (формуле:   
Относительное содержание гамма-глобулина, % = ОПкк х 1 ()(). где:   
ЮП   
ongg - гамма-глобулина (ОП - пробирки n 4), ?0n - 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, иммунодиффузныс, лазерные.   
Наиболее простыми и общепринятыми методами определения антител в   
организме рыб являются: реакция агглютинации, реакция агглютинации дате кс-   
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 ч 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 пилотированием. 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 рядя, из которой стандартный объем смеси удаляют. В результате   
получают серию разведении, 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°С. 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 рыхлый 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) - РА-ЛАг   
(Зингер, Плотц, 1956).

Принцип метода. Реакция агглютинации мслкодисперсных частиц латекса,   
нагруженных: антигеном (АГ), под воздействием специфических антител (at)   
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. at - 5%-ный раствор растворимого антигена (в   
качестве источника АГ могут служить гомогенаты аутоантигс-нов, 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: боратныи или глициновый буфер с рН 8,1-8,3. Боратный буфер: 50   
мл 0,1 М раствора борной кислоты (6,184 г НзВОз 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 10 г nacl. Материалы:   
пипетки, пробирки, колбы и др.

Техника постановки реакции. Дм сенсибилизации частиц латекса к 0,1 мл   
10%-ной суспензии мслкодиспсрсных 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 латскс-аплютинации начинают с   
приготовления в дополнительном ряду пробирок разведении 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 разведении исследуемой сыворотки и добавляют по 1   
капле суспензии частиц латекса, сенсибилизированных соответствующим АГ. В   
контроле смешивают аналогичные объемы частиц латекса с разведсниями   
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 н учитывают результат реакции.

**Пробирочная реакция латекс-агглютинации**. В опытный ряд пробирок   
приливают по 1 мл соответствующих разведении исследуемой сыворотки и   
добавляют по 1 мл латскс-АГ. Контрольные смеси: 1) борат-ньш буфср+суспснзия   
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   
латсксного 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 абитических (включая   
токсические) факторов на выживаемость рыб.

4.1. **Методика определения напряженности иммунитета (с ис-   
пользованием a.hydrophila)**

4.1.1. Принцип метода основан на экспериментальном заражении рыб   
вирулентной культурой, вызывающей 50% или 10()%-нуто гибель исследуемого   
вида рыб. Причем, в группе рыб с низким уровнем естественной резистентности   
ld5o 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°С и не выше 26° С)   
пять (и более) аквариумов или бассейнов с аэрацией или садки, установленные в   
карантинном пруду, помещают по 25 экз. (из расчета не более 5 г ихтиомассы на 1   
л воды) отобранных рыб, которым предварительно вводят внутрибрюшинно   
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 вьккивае-мости   
устанавливают дозу инфекта, вызывающую 50 или 100%-ную гибель рыб, с   
характерными для данной инспекции клиническими и патоло-гоанатомическими   
изменениями. Расчет летальной дозы, вызывающей 50%-ную гибель рыб (ld5o),   
проводят по методу Рида и Менча (Гончаров, 1973).   
Расчитанной дозой ld50 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 иммуногеиеза, течения   
болезни и т.д. Постановку и проведение опыта, а также учет результатов   
осуществляют так же, как и при отработке дозы ld5o. 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 пугем 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.

**Приложение 1**   
к Методическим указаниям по определению уровня   
естественной резистентности и оценке   
иммунного статуса рыб, утв. 25 ноября 1999 г.

**Уровень фагоцитарной активности лейкоцитов карпа на стадии   
поглощения, %**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Возраст рыб, время фагоцитоза с момен- та термостатирова-ния или введения  Объекта фагоцитоза | | Низкий | | Средний | | Высокий | |
| Процент фагоцитоза | Фагоцитарный индекс | Процент фагоцитоза | Фагоцитарный индекс | Процент фагоцитоза | Фаго-цитар-ный индекс |
| сеголетки | 15 мин. | 6,0+2,0 | - | 8,0+2,0 | - | 10 и  более | - |
| 30 мин. | 7,0+2,0 | 0,3+0,2 | 9,0+2,0 | 0,6+0,2 | 11-"- | 0,7 и более |
| 1 час | 17,0+4,0 | 0,8±0,2 | 21,0+4,0 | 0,1+0,2 | 25 -"- | 1,2-"- |
| 1,5 часа | 24,0+5,0 | 1,3+0,2 | 29,0+5,0 | 1,5+0,2 | 34 -"- | 1.7-"- |
| 2 часа | 19,0+5,0 | 1,4+0,2 | 24,0+5,0 | 1,6+0,2 | 29 -"- | 1,8-"- |
| двухлетки | 15 мин. | 9.0+3,0 |  | 12,0+3,0 | - | 15 -"- | - |
| 30 мин. | 13,0+5,0 | 0,3+0,2 | 18,0+5,0 | 0,5+0,2 | 23 -"- | 0,7 -"- |
| 1 час | 20,0+7,0 | 0.9+0,2 | 27,0+7,0 | 1,1+0,2 | 34 -"- | 1,3-"- |
| 1,5 часа | 28,0+8,0 | 1,3+0,2 | 36,0+6,0 | 1,5+0,2 | 44.-"- | 1,7-"- |
| 2 часа | 27.0+8,0 | 1,4+0,2 | 35,0+8,0 | 1,6+0,2 | 43 -"- | 1,8-"- |
| трехлетки | 15 мин. | 9,0+3,0 |  | 12,0+3,0 | - | 15-"- | - |
| 30 мин. | 14,0+5,0 | 0,4+0,2 | 19,0+5,0 | 0,6+0,2 | 24 -"- | 0,8 -"- |
| 1 час | 24,0+6,0 | 1,0+0,2 | 30,0+6,0 | 1,2+0,2 | 36 -"- | 1,4-"- |
| 1,5 часа | 30,0+s,0 | 1,2+0,4 | 38,0+8,0 | 1,6+0,4 | 46 -"- | 2,0 -"- |
| 2 часа | 28.0+8.0 | 1,4+0,3 | 36,0+8,0 | 1,7+0,3 | 44 -"- | 2,0 -"- |
| 4-8-летки | 1 5 мин. | 10,0+5,0 |  | 15,0+5,0 | - | 20 -".- | - |
| 30 мин. | 15,0+5,0 | 0,4+0,2 | 20,0+5,0 | 0,6+0,2 | 25 -"- | 0,8 -"- |
| 1 час | 22,0+8,0 | 1,2+0,2 | 32,0+8,0 | 1,2+0,2 | 40 -"- | 1,4-"- |
| 1,5 часа | 30,0+9,0 | 1,2+0-4 | 39,0+9,0 | 1,6+0,4 | 48 -"- | 2,0 -"- |
| 2 часа | 29,0+9,0 | 1,4+0,3 | 38,0+9,0 | 1,7+0,3 | 47 -"- | 2,0-"- |