Immunohistochemiczna identyfikacja antygeny bakteryjnego *Aeromonas hydrophila* w nerkach i śledzionie karpia oraz ocena aktywności fagocytów nerek po immunizacji ryb w iniekcji dootrzewnowej i w kąpieli

ANTONINA Sopińska, DAGNA Szubstarska*

Zakład Chorób Ryb i Biologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

*SLW BIOLAB Weterynaryjne Laboratorium Diagnostyczne, ul. Grunwaldzka 62, 14-100 Ostróda

Otrzymano 15.04.2019

Zaakceptowano 10.06.2019

Sopińska A., Szubstarska D.

Immunohistochemical identification of the bacterial antigen of *Aeromonas hydrophila* in the kidneys and spleen of carps and evaluation of the activity of kidney phagocytes after intraperitoneal and immersion immunization

Summary

The aim of this study was to evaluate the activity of kidney phagocytes after immunization of fish with inactivated bacteria of *Aeromonas hydrophila* and to determine the location and permanence of the bacterial antigen in the lymphoid organs, the kidney and the spleen, of carps immunized intraperitoneally (group I) and by immersion (group II) at 12°C. We examined the absorption of bacteria by kidney leucocytes (PK%), the killing capacity of phagocytes (IB) and chemiluminescent activity (CL). Evaluations were performed 12 h, as well as 3, 7, 14 and 28 days after immunization. At all these time points, the values of the parameters examined were higher in fish immunized intraperitoneally than in those immunized by immersion. The absorption of bacterial cells by kidney phagocytes was particularly high after 14 days after immunization in fish group I whereas their killing and chemiluminescent activity was particularly high in 7 days after immunization in group I. Immunohistochemical examination revealed an extensive distribution and large amounts of the antigen in the interstitial part and melanomacrophage centers of the kidneys and spleen after the intraperitoneal administration of the antigen. By contrast, small amounts of the antigen were found in these organs after it had been administered by immersion.

Keywords: carp, immunization, phagocytosis, *Aeromonas hydrophila*, antigen location

Immunizacja zapoczątkowuje łańcuch procesów zbliżonych zwykle do naturalnego kontaktu z drobnoustrojem, które prowadzą do aktywacji komórek immunokompetentnych, wytworzenia cytokin i swoistych przeciwciał (28). W wielu ośrodkach naukowych krajowych i zagranicznych testowane są szczepionki dla ryb przygotowywane z całych bakterii lub ich składowych, tj.: LPS, białek błon komórkowych lub zewnątrzkomórkowych produktów (ECP) (6, 10-12, 14, 17, 24, 38). Badacze wskazują, że efekt immunizacji ryb zależy od wielu czynników, tj.: rodzaju szczepionki, dawki, temperatura wody, wieku ryb, a także

w dużym stopniu od sposobu podania antygeny: *per os*, w iniekcji dootrzewnowej lub w kąpieli (5, 38). Sposób immunizacji wywala odmienną wędrówkę antygeny w organizmie ryb i może mieć wpływ na różny poziom odpowiedzi immunologicznej (38). Wędrówka antygeny rozpoczyna się od przechwycenia go przez komórki prezentujące (APC), do których należą: komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B. W komórkach tych ten sam antygen podlega odmiennej fragmentacji i po wyniesieniu na powierzchnię z cząsteczkami MHC klasy II, po prezentacji limfocytom T może wyzwoić zróżnicowany poziom odpowiedzi (28, 38).

Immunizacja ryb przez kąpiel powoduje wnikanie antygeny przez skórę i skrzela, i uaktywnia obecne tam komórki fagocytarne, tj. keratocyty, komórki Langerhansa oraz makrofagi. Podanie antygeny przez iniekcję dootrzewną powoduje wychwytywanie go przez makrofagi otrzewnowe. Makrofagi obecne w wielu tkankach organizmu, wyposażone w lizosomy, nastawione są na pełną degradację fagocytowanego materiału, ale również w przypadku dużych pochłanianych cząsteczek lub bakterii odgrywają ważną rolę w prezentacji antygeny. Komórki te na ogół nie posiadają cząsteczek MHC klasy II, ale w trakcie aktywacji syntetyzują je pod wpływem interferonu γ . Komórki Langerhansa, należące do komórek dendrytycznych, pod względem zdolności fagocytarnych przypominają bardziej makrofagi, niż pozostałe komórki dendrytyczne, jednak po związaniu antygeny i dotarciu do narządów limfoidalnych przekształcają się we właściwe komórki dendrytyczne. Komórki dendrytyczne występują w tkance łącznej większości narządów lub między komórkami nabłonkowymi. Charakteryzują się niewielką zdolnością do endocytozy, natomiast w najwyższym stopniu przystosowane są do prezentacji antygenów, w tym również powstałych po fragmentacji przez makrofagi (28). Wiadomo, że mogą przez długi czas utrzymywać go w błonie komórkowej w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. Komórki dendrytyczne po opuszczeniu tkanek, drogą krwi docierają do narządów limfoidalnych – nerek i śledziony, celem prezentacji antygeny limfocytom T. W narządach limfoidalnych ryb antygen może być gromadzony i przetrzymywany także w makrofagach tworzących centra melanomakrofagowe i długotrwale stymulować komórki układu immunologicznego.

Prezentacja antygeny limfocytom T prowadzi do syntezy limfokin, które wpływają, m.in. na stymulację fagocytów, zwiększając ich właściwości żerne i bójcze na drodze zależnej – i niezależnej od tlenu (8, 14, 34). Zdolność niektórych komórek układu odpornościowego do wytwarzania reaktywnych form tlenu w procesie fagocytozy stała się podstawą badania ich aktywności bójczej metodą chemiluminescencyjną (14, 29, 36, 40).

Wobec różnorodnych sposobów oddziaływania antygeny i komórek immunizowanego organizmu, w badaniach nad utrzymywaniem się stanu pobudzenia układu immunologicznego po immunizacji znajduje zastosowanie metoda immunohistochemiczna, która pozwala ocenić lokalizację i czas utrzymywania się antygeny w tkankach (1, 13, 18, 30, 35).

Celem badań była ocena aktywności fagocytów nerek karpi po immunizacji ryb inaktywowanymi bakteriami *Aeromonas hydrophila* oraz wykazanie lokalizacji i czasu utrzymywania się antygeny bakteryjnego w narządach limfoidalnych: nerkach i śledzionie, immunizowanych karpi poprzez iniekcję dootrzewną i kąpiel, w temperaturze 12°C.

Materiał i metody

Badania wykonano na 142 karpach o masie ciała 150–200 g, pochodzących z gospodarstwa rybackiego z województwa lubelskiego. Na podstawie oględzin, badań anatomopatologicznych i parazytologicznych uznano je za zdrowe. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych, w akwariach 100 l, wyposażonych w termoregulację z ciągłym przepływem wody i stałym napowietrzaniem. Karpie przetrzymywano w zagęszczeniu 1 kg ryb/100 l wody. Podstawowe parametry fizyczne wody kształtowały się następująco: zawartość tlenu w wodzie wynosiła 6,6–6,7 mg/l, pH 7,0–7,4, twardość CaCO_3 72,5–80,3 mg/l, zawartość amoniaku 0,5–1 mg/l wody. Ryby karmiono codziennie paszą granulowaną.

Karpie podzielono na 2 grupy doświadczalne: I i II oraz 2 grupy kontrolne: K_1 i K_2 . Ryby adaptowano do warunków akwariowych przez okres 2 tygodni, utrzymując temperaturę wody na poziomie ok. 12°C $\pm$ 1°.

Antygen. Do immunizacji ryb użyto szczepu *Aeromonas hydrophila* oznaczonego jako J4N otrzymanego z Zakładu Chorób Ryb Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, patogennego dla karpi. Antygen do immunizacji uzyskano z całych komórek bakteryjnych po 18-godzinnej inkubacji w podłożu TSB. Po inaktywacji 0,3% formaliną miano antygeny doprowadzono do 5×10^7 cfu/ml⁻¹ przy użyciu spekula EPOLL-2T. Inaktywację bakterii potwierdzono brakiem ich wzrostu na agarze TSA.

Immunizacja. Rybom grupy I podano antygen w iniekcji dootrzewnowej w stężeniu 5×10^7 cfu/ml⁻¹ w ilości 0,1 ml. Rybom grupy kontrolnej K_1 podano dootrzewnowo 0,1 ml PBS.

Ryby grupy II immunizowano przez 30-minutową kąpiel w roztworze zawierającym inaktywowane komórki bakteryjne o stężeniu 5×10^7 cfu/ml⁻¹. Ryby grupy kontrolnej K_2 przebywały w wodzie bez dodatku antygeny.

Materiał do badań stanowiły komórki fagocytarne: makrofagi i neutrofile (MN i PMN) izolowane z nerek przednich ryb grupy I i II oraz kontrolnych. Materiał pobierano w grupach doświadczalnych każdorazowo od 6 ryb, w kolejnych terminach po immunizacji: po 12 godzinach, 3, 7, 14 i 28 dniach, od ryb grup kontrolnych – jednorazowo w 7. dniu doświadczenia.

Komórki fagocytarne izolowano z nerek przednich na Gradisolu (Aqua-Med., Łódź, Polska) o gęstości 1,115 g/ml, metodą rutynową. Izolowane komórki zawieszano w płynie odżywczym RPMI 1640 (Biomed, Lublin, Polska) w stężeniu 4×10^6 i 6×10^7 z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i 100 U/ml penicyliny i streptomycyny.

Oznaczanie odsetka pochłoniętych komórek bakteryjnych (PK%) wykonano według metody Mantur i wsp. (20), przy użyciu wzorcowego szczepu bakteryjnego *Staphylococcus aureus* 209 P o stężeniu 6×10^7 komórek ml⁻¹. W badaniach zastosowano równe objętości fagocytów i bakterii w jednakowym stężeniu. W celu określenia odsetka pochłoniętych komórek bakteryjnych przez fagocyty (PK%) po okresie inkubacji z próby doświadczalnej i próby kontrolnej pobierano po 100 ml roztworu, rozcieńczano wielokrotnie, a następnie wysiewano na agar wzbogacony i inkubowano w 37°C przez 18 godzin. Procent pochłoniętych przez fagocyty komórek bakteryjnych wyliczano według wzoru:

$$PK\% = \frac{P_1 - P_2}{P_2} \times 100$$

P_1 – liczba kolonii bakteryjnych z próby kontrolnej;

P_2 – liczba kolonii bakteryjnych z próby badanej.

Ocenę aktywności bakteriobójczej fagocytów nerek (indeks IB) wykonano na materiale z poprzedniej metody. W mieszaninie zawierającej leukocyty z pochłoniętymi bakteriami i wolne bakterie w podłożu przeprowadzono licząc komórek bakteryjnych znajdujących się poza leukocytami poprzez dodanie Lysostaphinu (Sigma) o działaniu litycznym. Następnie w celu uwolnienia bakterii znajdujących się wewnątrz komórek dokonano destrukcji fagocytów za pomocą Tritonu-X (Sigma). Uzyskaną zawiesinę komórek bakteryjnych posiewano na agar wzbogacony. Metoda ta pozwoliła na określenie liczby kolonii bakteryjnych, które nie zostały zabite wewnątrz komórek fagocytarnych i urosły na podłożu stałym (P_3). W oparciu o wynik uzyskany w pierwszym etapie badań, dotyczący parametru P_1 i P_2 oraz wynik uzyskany w drugim etapie dotyczący parametru P_3 , obliczono indeks bakteriobójczy wg wzoru:

$$IB = \frac{(P_1 - P_2) - P_3}{P_1 - P_2}$$

Oznaczenie aktywności fagocytarnej komórek metodą chemiluminescencyjną (CL) zależną od luminolu przeprowadzono wg metody Scotta i Klesiusa (30) w modyfikacji własnej. Oznaczenia przeprowadzano w liczniku scyntylacyjnym Tri-Carb 2100TR (Packard) dokonując pomiaru luminescencji co 1 minutę przez okres 20 minut. Badania wykonano w tych samych terminach po immunizacji, jak w poprzednich doświadczeniach.

Uzyskane wyniki badań aktywności fagocytarnej (PK%, IB, CL) poddano analizie statystycznej, która obejmowała określenie średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego oraz istotności różnic przy pomocy testu t-Studenta na poziomie $p \leq 0,05$ między grupą doświadczalną a kontrolną oraz między grupami doświadczalnymi.

Określenie miejsc lokalizacji antygeny bakteryjnego przeprowadzono metodą immunohistochemiczną wg Adams i Maria de Mateo (1) w modyfikacji własnej. Materiał do badań stanowiły narządy limfoidalne ryb immunizowanych i kontrolnych: nerki i śledziona. Narządy pobierano każdorazowo od 5 ryb grup doświadczalnych, w następujących terminach po immunizacji: 12 godzinach, 3, 7, 14, 28 dniach oraz po 3 miesiącach, zaś od ryb kontrolnych jednorazowo w 7. tygodniu doświadczenia. Pobrany materiał utrwalano przez 24 godziny w 10% zbuforowanej formalinie, a następnie zatapiano w parafinie.

Skrawki tkankowe (nerki i śledziona) o grubości 5 μm po odparafinowaniu i nawodnieniu, inkubowano w 10% H_2O_2 w celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy. Następnie na skrawkach przeprowadzono reakcję immunohistochemiczną (peroksydaza-antyperoksydaza) z użyciem specyficznych przeciwciał przeciwko antygenowi bakteryjnemu J4N *Aeromonas hydrophila*. Kolejno, skrawki poddano działaniu wtórnych przeciwciał sprzężonych z peroksydazą (surowica kozia antykrólicza skoniugowana z peroksydazą chrzanową). Dla wykrycia antygeny użyto jako chromogenu 3'3'-diaminobenzyny (DAB) (Sigma), otrzymując brązowy, nierozpuszczalny produkt reakcji. Dodatkowo, po zakończeniu powyższej procedury preparaty wybarwiano HE.

Mikrofotografie niezbędne do analiz jakościowych wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego BX51 (Olympus) sprzężonego z kamerą cyfrową (Olympus Color View IIIu). Wszystkie obrazy zostały zarchiwizowane.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań nad zdolnością fagocytarną granulocytów i makrofagów karpi immunizowanych antygenem bakteryjnym, przedstawiono w tabeli 1. U ryb grupy I i II badane parametry aktywności fagocytarnej leukocytów nerek (PK%, IB, LC) były statystycznie istotnie wyższe we wszystkich terminach badań w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 1). Porównując zdolności fagocytarne leukocytów nerek karpi grupy I i II stwierdzono w każdym terminie badań statystycznie istotnie wyższe wartości u ryb grupy I. Najwyższy odsetek pochłoniętych bakterii wystąpił u ryb grupy I, w 14. dniu i wyniósł $52,47 \pm 3,04$ a ryb grupy II, w 7. dniu i osiągnął $38,52 \pm 2,5\%$. Najniższe wartości u obu grup wystąpiły po 12 godzinach od immunizacji i wynosiły, odpowiednio: $28,19 \pm 1,76$ i $22,86 \pm 2,64$. Najwyższą aktywnością bójczą (IB) charakteryzowały się fagocyty ryb grupy I i II, po 7 dniach od immunizacji. Wartość IB wynosiła u ryb grupy I – $0,607 \pm 0,02$, u ryb grupy II – $0,382 \pm 0,02$. Po tym okresie nastąpił spadek tej wartości u obu grup doświadczalnych, który utrzymywał się na niższym poziomie do końca doświadczenia, jednak zawsze był statystycznie istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej (tab. 1).

Wyniki badań nad aktywnością luminescencyjną (CL) fagocytów nerek karpia u ryb doświadczalnych i kontrolnych przedstawiono w tabeli 2. U ryb grupy I, luminescencja osiągnęła najwyższe wartości w 7.

Tab. 1. Odsetek pochłoniętych komórek bakteryjnych (PK%) i indeks bakteriobójczy (IB) fagocytów nerek karpi grup doświadczalnych (I, II) i kontrolnych w temperaturze 12°C ($n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SD}$)

	Grupy ryb	Terminy badań					
		12 h	3 dni	7 dni	14 dni	28 dni	kontrola
PK%	I	28,19** $\pm 1,76$	37,16** $\pm 2,34$	44,63** $\pm 3,10$	52,43** $\pm 3,04$	46,54** $\pm 2,64$	19,68 $\pm 2,44$
	II	22,86** $\pm 2,64$	33,13** $\pm 2,85$	38,52** $\pm 2,54$	35,40** $\pm 2,59$	27,40** $\pm 2,78$	17,26 $\pm 2,65$
IB	I	0,365** $\pm 0,03$	0,486** $\pm 0,02$	0,607** $\pm 0,02$	0,548** $\pm 0,03$	0,514** $\pm 0,02$	0,125 $\pm 0,03$
	II	0,267** $\pm 0,01$	0,291** $\pm 0,02$	0,382** $\pm 0,02$	0,362** $\pm 0,02$	0,300** $\pm 0,03$	0,122 $\pm 0,02$

Objaśnienia: * – różnice statystycznie istotne w porównaniu z grupą kontrolną przy $p \leq 0,05$; ** – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami ryb I i II w poszczególnych okresach badania przy $p \leq 0,05$

Tab. 2. Najwyższe wartości aktywności luminescencyjnej (CL) fagocytów nerek karpi grup doświadczalnych (I, II) i kontrolnej, w temperaturze 12°C (n = 6, $\bar{x} \pm SD$)

Terminy badań	Grupy ryb	
	I 1×10^3	II 1×10^3
12 godz.	245,92* $\pm$ 5,04	374,96* $\pm$ 3,85
3 dni	1834,30* $\pm$ 4,63	820,46* $\pm$ 3,88
7 dni	9955,04* $\pm$ 3,28	1171,12* $\pm$ 4,79
14 dni	8455,76* $\pm$ 3,76	1318,71* $\pm$ 4,30
28 dni	2342,70* $\pm$ 3,18	1962,47* $\pm$ 6,17
Kontrola	177,76 $\pm$ 3,60	177,76 $\pm$ 3,60

Objaśnienia: * – różnice statystycznie istotne w porównaniu z grupą kontrolną przy $p \leq 0,05$

dniu po immunizacji, u ryb grupy II – w 28. dniu po immunizacji (tab. 2).

Porównując uzyskane wyniki między grupami doświadczalnymi zwraca uwagę, szczególnie w 7. dniu badania, kilkakrotnie wyższa aktywność chemiluminescencyjna fagocytów karpi immunizowanych przez iniekcję dootrzewną niż przez kąpiel i wynosiła u ryb grupy I 9955,04 $\pm$ 3,28; u ryb grupy II – 1171,12 $\pm$ 4,79.

Wyniki obserwacji mikroskopowych nad lokalizacją i utrzymywaniem się antygeny bakteryjnego w narządach limfoidalnych po immunizacji ryb wskazują na jego obecność w nerce i śledzionie u obu grup doświadczalnych, na ogół we wszystkich terminach badań.

W nerkach u ryb grupy I po 12 godz. stwierdzono silne immunozabarwienie komórek miąższowych i kanalików nerkowych (ryc. 1b), po 3 dniach obserwowano zwiększoną liczbę centrów melanomakrofagowych, z niewielkim immunozabarwieniem (ryc. 1). W następnych terminach obserwacji natężenie produktu reakcji uległo zmniejszeniu w części międzykanalikowej nerek, a utrzymywało się do końca doświadczenia w centrach melanomakrofagowych.

W śledzionie ryb grupy I po 12 godz. od immunizacji wystąpiło słabe immunozabarwienie komórek (ryc. 2b), które w następnych terminach było bardziej wyraźne, szczególnie w pobliżu zatok sinusoidalnych (ryc. 2b). Od 7. dnia po immunizacji obserwowano w śledzionie wzrost liczby centrów melanomakrofagowych, początkowo złożonych z kilku, a następnie z wielu komórek, w których stwierdzano obecność brązowego barwnika (ryc. 2c, 2d).

W nerkach ryb grupy II w pierwszych terminach badania (12 godzin i 3 dni) barwny produkt reakcji immunocytochemicznej był obecny w niewielu miejscach, dopiero w 7. dniu do końca doświadczenia stwierdzono obecność barwnika w większych obszarach narządu, a w następnych terminach skupiony był głównie w centrach melanomakrofagowych.

W śledzionie ryb grupy II po 12 godzinach i 3 dniach po immunizacji przez kąpiel nie stwierdzono obecności immunozabarwienia w śledzionie. W następnych

Ryc. 1. Nerka tulowiowa; a – kontrola; b – 12 godzin po immunizacji dootrzewnowej IP; c – 7 dni po immunizacji dootrzewnowej IP. Pow. $\times 1000$

terminach badań stwierdzono słabe zabarwienie w komórkach głównie w pobliżu zatok sinusoidalnych narządu oraz w centrach melanomakrofagowych.

Efektom interakcji antygeny bakteryjnego *Aeromonas hydrophila* z komórkami układu odpornościowego karpi była wykazana aktywacja komórek fagocytarnych nerek. Na rolę fagocytozy jako podstawowego mechanizmu obronnego ryb wskazują wiele badań (2, 6-9, 11, 14, 31, 32). U obu grup doświadczalnych, we wszystkich terminach badań wystąpiły wyższe wartości: PK%, IB i CL niż w grupie kontrolnej, jednak na zróżnicowanym poziomie. U ryb grupy II w porównaniu z grupą I badane parametry były znacznie niższe. Wynik ten mógł być następstwem zarówno mniejszego stężenia antygeny, który dostał się do organizmu ryb, jak i drogi antygeny po immunizacji w kąpeli. Niektóre badania wskazują, że podczas tego sposobu immunizacji wnika 0,01-0,2% antygeny przez skórę i skrzel (19), a także na długotrwałe przetrzymywanie antygeny w tych miejscach (22). Badania różnych autorów nad aktywnością fagocytarną leukocytów ryb

Ryc. 2. Śledziona; a – kontrola; b – 12 godzin po immunizacji w kąpieli; c – 7 dni po immunizacji w kąpieli; d – 3 miesiące po immunizacji w kąpieli. Pow. $\times 1000$

immunizowanych są czasami sprzeczne z wynikami badań własnych, niektórzy twierdzą, że wzrost aktywności bójczej można uzyskać tylko przez kilkakrotną iniekcję dootrzewnową antygeny bakteryjnego (31), inni wskazują na wyższy wpływ temperatury niż sposobu immunizacji (15). Antychowicz i Kozińska (15) stwierdzili również, że w niższej temperaturze odsetek fagocytów krwi pochłaniających bakterie był wyższy u ryb immunizowanych w kąpieli niż przez iniekcję dootrzewnową. Wpływ niskich temperatur na aktyw-

ność fagocytarną leukocytów ryb był celem licznych badań wielu uczonych (2, 7, 15, 23, 25). W niektórych pracach wykazano wyższą zdolność żerną komórek w temperaturze 10°C-15°C niż 20°C-30°C (2, 7, 23). Uzyskane w badaniach własnych wysokie wartości luminescencyjne leukocytów nerek w temperaturze 12°C mogły być wynikiem obecności w tych komórkach (szczególnie granulocytach) aktywnego systemu mieloperoksydazy (MPO) i obniżonej aktywności enzymów działających inhibicyjnie, tj.: katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy glutationu. Wielu autorów w pracach badawczych zwraca uwagę na korelację chemiluminescencji zależnej od luminolu ze stanem funkcjonalnym komórek fagocytujących posiadających aktywny system mieloperoksydazy (3, 16, 19, 21, 30).

Obserwacje mikroskopowe nad lokalizacją antygeny bakteryjnego w narządach limfoidalnych po immunizacji w iniekcji dootrzewnowej wskazują, że w pierwszych terminach badań (12 godz. i 3 dni) główną rolę w transporcie antygeny do nerek pełniły komórki dendrytyczne, które przyczyniły się do jego równomiernego rozprzestrzenienia, a po prezentacji limfocytom T w krótkim okresie doszło do aktywacji komórek fagocytarnych wykazanej w pierwszej części pracy. Wydaje się, że skuteczność prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne jest większa niż przez makrofagi, które zajmują się głównie degradacją pochłoniętego antygeny i kompleksów immunologicznych. Rola makrofagów jako komórek przechwytyjących i magazynujących antygen uwiadcza się w późniejszych terminach badań. Makrofagi skupiające się w centrach melanomakrofagowych nerek i wątroby pochodzą z makrofagów lokalnych, które w sąsiedztwie sinusoidalnych i elipsoidalnych naczyń krwionośnych wychwytyują przedostające się do krwi antygeny z przekształconych aktywnych komórek dendrytycznych, a także z makrofagów wędrujących, wywodzących się z innych miejsc organizmu (10, 19, 33, 37). W badaniach nad lokalizacją antygeny w tkankach immunizowanych ryb, podobnie jak w badaniach własnych, wykazano zależność ilości zgromadzonego antygeny od czasu po immunizacji. U dorsza atlantyckiego po immunizacji dootrzewnowej bakteriami *Vibrio anguillarum* po 1 godz. obserwowano jego obecność w nielicznych miejscach, a po 24 godz. w znacznej części badanego narządu (4). Wyniki badań własnych wskazują ponadto, że nie tylko czas upływający po immunizacji ma wpływ na zwiększoną ilość antygeny w narządach, ale także sposób immunizacji. Obserwowana mniejsza obecność antygeny w nerce i śledzionie u ryb grupy II niż u ryb grupy I jest prawdopodobnie wynikiem długotrwałego utrzymywania się antygeny w skórze i w skrzelach. Na rolę skóry i skrzel biorących udział w odpowiedzi lokalnej podczas podania antygeny w kąpieli zwracają uwagę Ototake i wsp. (26) oraz Moorea i wsp. (22). Po 3-minutowej kąpieli Ototake i wsp. (26) stwierdzali

śladowe obecności antygeny w nerkach i śledzionie. Niektórzy autorzy zwracają uwagę na zależność wyniku immunizacji od czasu trwania kąpieli. Podczas długotrwałej kąpieli w skórze i skrzelach immunizowanych ryb stwierdzono obecność przeważającej ilości antygeny, który utrzymywał się w tych miejscach do 24 dni po immunizacji (22).

Wyniki badań własnych, które wskazują na długotrwałe utrzymywanie się antygeny bakteryjnego w narządach limfoidalnych (do 3 miesięcy po immunizacji) i pobudzenie aktywności fagocytarnej leukocytów nerek świadczą o silnej immunogenności użytego do immunizacji antygeny bakteryjnego zarówno w iniekcji dootrzewnowej, jak i w kąpieli. Uzyskanie niższej aktywności komórek po podaniu antygeny w kąpieli nie powinno zniechęcać do tego sposobu immunizacji. Immunizacja poprzez kąpiel jest nie tylko wygodna, ale – jak się okazuje – również skuteczna i trwała. Rozciągające się w czasie immunostymulujące działanie antygeny jest bardzo korzystne dla ryb, daje możliwość połączenia zabiegu immunizacji z odłowem ryb po okresie zimowania. Uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość wykonania immunizacji wiosną i ochronę zdrowia ryb w okresie wiosenno-letnim przed infekcją spowodowaną bakteriami *Aeromonas hydrophila*.

Piśmiennictwo

- Adams A., de Mateo M. M.: Immunohistochemical detection of fish pathogens, [w:] Stolen J. S., Fletcher T. C., Rowley A. F., Zelikoff J. T., Kaattari S. L., Smith S. A.: Techniques in Fish Immunology – 3. SOS Publications, Fair Haven, USA 1994, s. 133-143.
- Ainsworth A. J., Dexiang C., Waterstrat P. R., Greenway T.: Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) – I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10°C. Comp. Biochem. Physiol. Part A. Physiol. 1991, 100, 907-912.
- Angelidis P., Baudin-Laurencin F., Youinou P.: Effects of temperature on chemiluminescence of phagocytes from sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Fish Shellfish Immunol. 1988, 11, 281-288.
- Arnesen S. M., Schröder M. B., Dalmo R. A., Bøgvold J.: Antigen uptake and immunoglobulin production in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum*. Fish Shellfish Immunol. 2002, 13, 159-170.
- Azad I. S., Shankar K. M., Mohan C. V., Kalita B.: Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody. Dis. Aquat. Organ. 2000, 43, 103-108.
- Baba T., Imamura J., Izawa K., Ikeda K.: Immune protection in carp, *Cyprinus carpio* L., after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. J. Fish Dis. 1988, 11, 237-244.
- Collazos M. E., Ortega E., Barriga C.: Effect of temperature on the immune system of a cyprinid fish (*Tinca tinca*, L.). Blood phagocyte function at low temperature. Fish Shellfish Immunol. 1994, 4, 231-238.
- Dalmo R. A., Seljelid R.: The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [$\beta(1,3)$ -D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages in vitro. J. Fish Dis. 1995, 18, 175-185.
- Ellis A. E., Munroe A. L. S., Roberts R. J.: Defence mechanisms in fish. 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). J. Fish Biol. 1976, 8, 67-78.
- Espenes A., Press C. McL., Reitan L. J., Landsverk T.: The trapping of intravenously injected extracellular products from *Aeromonas salmonicida* in head kidney and spleen of vaccinated and nonvaccinated Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Fish Shellfish Immunol. 1996, 6, 413-426.
- Grochola A., Sopińska A., Puk K.: Wpływ immunostymulacji karpi LPS *Aeromonas hydrophila* na odporność nieswoistą i wrażliwość na zakażenie w teście challenge. Med. Weter. 2015, 71, 176-181.
- Gudding R., Lillehaug A., Evensen Ø.: Recent developments in fish vaccinology. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999, 72, 203-212.
- Jansson E., Hongso T., Lindberg R., Ljungberg O., Svensson B. M.: Detection of *Renibacterium salmoninarum* and *Yersinia ruckeri* by the peroxidase-antiperoxidase immunohistochemical technique in melanin-containing cells of fish tissues. J. Fish Dis. 1991, 14, 689-692.
- Kodama H., Tijiwa K., Moritomo T., Nakanishi T.: Granulocyte responses to experimental injection of live and formalin-killed bacteria in carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Immunol. Immunopathol. 2002, 90, 101-105.
- Kozińska A., Antychowicz J.: Influence of an experimental *Aeromonas hydrophila* vaccine on selected haematological values and non-specific immunity in carp (*Cyprinus carpio* L.). Bull. Vet. Inst. Pulawy 2000, 44, 169-178.
- Kubala L., Lojek A., Číž M., Vondráček J., Dušková M., Slavíková H.: Determination of phagocyte activity in whole blood of carp (*Cyprinus carpio*) by luminol-enhanced chemiluminescence. Vet. Med. (Praha) 1996, 41, 323-327.
- Lamers C. H. J.: The reaction of the immune system of fish to vaccination. WAU dissertation no 1029, 1985a.
- Lamers C. H. J., de Haas M. J. H.: Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). Cell Tissue Res. 1985b, 242, 491-498.
- Lamers C. H. J., de Haas M. J. H., Van Muiswinkel W. B.: The reaction of the immune system of fish to vaccination: development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *Aeromonas hydrophila* bacterin. J. Fish Dis. 1985c, 8, 253-262.
- Mantur M., Wołosowicz N., Kemona H., Prokopowicz J.: Bactericidal activity of blood pelets: its determination and normal values. Acta. Med. Pol. 1986, 27, 3-4.
- Międzybrodzki J., Zemanek G., Baran J.: Chemiluminescencja – opis zjawiska, możliwości jego detekcji i wykorzystania. Mikrobiol. Med. 1999, 1, 41-46.
- Moore J. D., Otake M., Nakanishi T.: Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. Fish Shellfish Immunol. 1998, 8, 393-408.
- Morvan C. le, Clerton P., Deschaux P., Troutaud D.: Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp. Fish Shellfish Immunol. 1997, 7, 209-212.
- Muiswinkel W. B. van, Nakao M.: A short history of research on immunity to infectious diseases in fish. Dev. Comp. Immunol. 2014, 43, 130-150.
- O'Neil J. G.: An in vitro study of polymorphonuclear phagocytosis and the effect of temperature, [w:] Manning M. J., Tanner M. F. (eds.): Fish Immunology. New York Academic Press 1985, s. 47-55.
- Otake M., Nakanishi T.: Kinetics of bovine serum albumin in fish plasma after hyperosmotic infiltration treatment: comparison between marine and freshwater fish. Aquaculture 1992, 103, 229-240.
- Press C. McL., Evensen Ø., Reitan L. J., Landsverk T.: Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. following different routes of vaccine administration. J. Fish Dis. 1995, 19, 215-224.
- Roitt I., Brostoff J., Male D.: Immunologia. PZW, Wydawnictwo medyczne Slotwiński Verlag 2000.
- Sakai M., Miyama K., Atsuta S., Kobayashi K.: The chemiluminescent responses of phagocytic cells isolated of coho salmon, rainbow trout and carp against *Renibacterium salmoninarum*. Fish Shellfish Immunol. 1996, 6, 71-73.
- Scott A. L., Klesius P. H.: Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. Dev. Biol. Stand. 1981, 49, 243-254.
- Secombes C. J.: Enhancement of fish phagocyte activity. Fish Shellfish Immunol. 1994, 4, 421-426.
- Secombes C. J., Fletcher T. C.: The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish Dis. 1992, 2, 53-71.
- Secombes C. J., Manning M. J., Ellis A. E.: The effect of primary and secondary immunization on the lymphoid tissues of carp, *Cyprinus carpio* L. J. Exp. Zool. 1982, 220, 277-287.
- Sharp G. J. E., Secombes C. J.: The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol. 1993, 3, 119-129.
- Sopińska A., Szubstarska D.: Próba zastosowania metody immunohistochemicznej do wykrywania antygeny bakteryjnego ryb. Med. Weter. 2002, 1, 67-75.
- Stave J. W., Robertson B. S., Hetrick F. M.: Chemiluminescence of phagocytic cells isolated from the pronephros of striped bass. Dev. Comp. Immunol. 1983, 7, 269-276.
- Stensvåg K., Arnesen S. M., Bøgvold J., Jørgensen T. Ø.: Localization of purified surface molecules (lipopolysaccharide and A-protein) from *Aeromonas salmonicida* in the kidney and spleen Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 1999, 22, 337-349.
- Stevenson R. M. W.: Vaccination against *Aeromonas hydrophila*, [w:] Ellis A. E. (ed.): Fish vaccination. Academic Press 1988, s. 1-19.
- Tsujii T., Seno S.: Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function. Anat. Rec. 1990, 226, 460-470.
- Yamada F., Kodama H., Mikami T., Izawa H.: Chemiluminescence of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) phagocytes and factors affecting their response. Jpn. J. Vet. Sci. 1988, 50, 1092-1098.

Adres autora: dr Dagna Szubstarska, ul. Grunwaldzka 62, 14-100 Ostróda;
e-mail: dagna.szubstarska@biolab.pl