

Wpływ immunostymulacji karpia LPS *Aeromonas hydrophila* na odporność nieswoistą i wrażliwość na zakażenie w teście challenge

ANNA GROCHOŁA, ANTONINA Sopińska, KRZYSZTOF PUK

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

Otrzymano 15.04.2014

Zaakceptowano 05.08.2014

Grochoła A., Sopińska A., Puk K.

Effect of LPS from *Aeromonas hydrophila* on non-specific immune parameters and survival of carp (*Cyprinus carpio* L.) infected with *Aeromonas hydrophila*

Summary

Bacterial infections are a serious problem for commercial farms of carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. Given the absence of efficient vaccines, it is crucial to search for new agents enhancing the non-specific immune response of the fish.

In the present study, immunomodulating effects of lipopolysaccharide extracted from the virulent (LPS-P) and non-virulent (LPS-NP) strains of *Aeromonas hydrophila* were studied. For that purpose, different concentrations of LPS-P and LPS-NP (25, 50, and 75 µg/100 g body weight) were administered to test animals through intraperitoneal injection. The non-specific immune response of the fish were studied at days 7, 14, 21, 28, and 60 after vaccination. Immunostimulated fish showed an increase in total leukocyte count, in the population of monocytes and neutrophils, and in immature cell count in the whole blood. Phagocytic activity and the production of reactive oxygen species were also elevated after vaccination. Moreover, vaccinated fish showed a significant increase in serum lysozyme.

The results of the present study show that LPS-NP has a greater immunostimulatory effect than LPS-P at doses of 50 and 75 µg/100 g body weight.

In addition, 7 days after vaccination with LPS-NP (50 µg/100 g body weight), fish were challenged with the virulent strain of *A. hydrophila*. The relative percentage of survival in groups 1 and 2 was 58.82% and 76.47%, respectively, which indicates that the administration of LPS-NP makes *C. carpio* more resistant to infection by *A. hydrophila*.

Keywords: carp, LPS, *A. hydrophila*, non-specific response

Choroby bakteryjne ryb znacznie częściej występują w warunkach hodowlanych niż naturalnych. W zbiornikach naturalnych, rzekach i jeziorach utrzymuje się zwykle równowaga biologiczna pomiędzy potencjalnymi czynnikami chorobotwórczymi a organizmem ryby, natomiast w stawach hodowlanych zbyt duże zagęszczenie ryb usposabia do rozprzestrzeniania się tych czynników, a zabiegi manipulacyjne, takie jak odłowy i transport, okresowo obniżają odporność organizmu. W warunkach intensywnej hodowli powszechnie występujące w wodzie bakterie mogą stać się przyczyną dużej śmiertelności ryb. Wiadomo, że najskuteczniejszym zabiegiem w walce z chorobami ryb jest stosowanie szczepień. U pstrągów immunoprofilaktyka swoista odgrywa istotną rolę przy takich chorobach bakteryjnych, jak: wrzodzienica, jersinioza, bakteryjna choroba nerek i wibriozy, natomiast u karpia

brak dotychczas skutecznych szczepionek, a badania są ciągle na etapie eksperymentów (8, 10, 13, 14, 16, 28). Z tego powodu od wielu lat trwają badania nad stosowaniem preparatów pobudzających nieswoiste mechanizmy układu odpornościowego, które mogłyby być wykorzystywane w okresie niekorzystnie działających czynników stresowych czy środowiskowych (6, 9, 22, 29). Do grupy immunostymulatorów testowanych u ryb dołączyły w ostatnich latach lipopolisacharydy pozyskiwane z różnych bakterii patogennych dla ryb (3, 9, 11, 16, 24-27, 30). Pod względem budowy chemicznej lipopolisacharydy, składniki ścian bakterii Gram-ujemnych, pochodzące z różnych gatunków bakterii chorobotwórczych dla ryb, charakteryzują się wspólnym planem budowy, którego zasadniczymi elementami są: hydrofilny heteropolisacharyd oraz połączony z nim składnik lipidowy nazywany lipidem A

oraz obecnością substruktur aktywnych biologicznie o właściwościach antygenowych, których obecność powoduje znaczne różnice we właściwościach immunostymulujących nie tylko między gatunkami bakterii, ale i pomiędzy szczepami (7, 21, 26).

Do bakterii, które najczęściej powodują choroby u karpia, należą drobnoustroje z rodzaju *Aeromonas*, komórki Gram-ujemne, posiadające zdolność ruchu. Poza wspólnymi cechami posiadają liczne, różniące je cechy biochemiczne i fizjologiczne, różnią się także pod względem patogenności dla ryb. Izolaty patogenne cechuje przede wszystkim zdolność adhezji do powłok skórnych ryb oraz duża aktywność hemolityczna, proteolityczna i lipolityczna (12, 15).

Mając na uwadze obecność w wodzie patogennych i niepatogennych szczepów *Aeromonas hydrophila* oraz ich zasadniczą rolę jako czynnika chorobotwórczego dla karpia, celem pracy było poznanie i porównanie wpływu LPS uzyskanego ze szczepu patogennego i niepatogennego na odporność nieswoistą karpia oraz określenie najbardziej optymalnej dawki pobudzającej mechanizmy tej odporności, a także ocena wrażliwości karpia na eksperymentalne zakażenie bakteriami *A. hydrophila* po uprzedniej stymulacji wybranym lipopolisacharydem.

Materiał i metody

Badanie wykonano u 230 sztuk karpia o masie ciała (m.c.) 200-300 g, które na podstawie badań klinicznych i anatomicznych uznano za zdrowe. Ryby adaptowano do warunków akwariowych przez okres 2 tygodni, podnosząc temperaturę wody od 12°C aż do osiągnięcia temperatury 20°C, w której przeprowadzono doświadczenie. Podczas okresu adaptacyjnego i doświadczalnego ryby przetrzymywano w akwariach o pojemności 100 l (w zagęszczeniu 1 kg ryb/100 l wody), wyposażonych w termoregulację z ciągłym przepływem wody i stałym napowietrzaniem. Ryby karmiono codziennie paszą granulowaną.

Do immunostymulacji ryb zastosowano LPS pozyskany ze szczepów bakteryjnych *A. hydrophila* patogennych (LPS-P) i niepatogennych (LPS-NP), według metody Boivina (4). Bakterie pochodziły ze zbioru szczepów bakteryjnych Zakładu Chorób Ryb PIWet-PIB w Puławach, które na podstawie ich patogenności dla karpia (12) zakwalifikowano jako patogenne, szczep F6/95 i niepatogenne, szczep F1/95. Opierając się na dotychczasowych doświadczeniach u ryb łososiowatych i nielicznych u karpia (26, 28, 31), wybrano do badań następujące dawki lipopolisacharydów: 25 µg, 50 µg, 75 µg/100 g m.c.

Immunizację przeprowadzono jednorazowo, podając LPS w iniekcji dootrzewnowej w roztworze płynu fizjologicznego w ilości 100 µl/rybę. Rybom kontrolnym podano dootrzewnowo 100 µl płynu fizjologicznego.

Badania wykonano w dwóch etapach. W pierwszym określono rodzaj i dawkę LPS, która najlepiej stymuluje odpowiedź immunologiczną ryb, w drugim określono wrażliwość karpia na zakażenie bakteriami *A. hydrophila* w teście *challenge* po uprzedniej stymulacji dawką najbardziej efektywną i rodzajem LPS.

Poziom odpowiedzi immunologicznej ryb po podaniu LPS oceniano na podstawie: liczby leukocytów (WBC), neutrofilii (PMN) i monocytów (MN) w 1 µl krwi obwodowej, aktywności metabolicznej fagocytów krwi obwodowej, aktywności pinocytarnej i fagocytarnej neutrofilii i makrofagów izolowanych z nerki przedniej. W surowicy krwi oznaczano poziom lizozymu. Każdorazowo po 7, 14, 21, 28 i 60 dniach po podaniu LPS pobierano krew i nerki przednie od 10 ryb doświadczalnych, u ryb kontrolnych jednorazowo w 7. dniu doświadczenia.

Liczbę leukocytów (WBC) określano przy użyciu hematocytometru, neutrofilii (PMN) i monocytów (MN) na podstawie rozmazów krwi barwionych metodą May-Grunwalda Giemsa. Aktywność metaboliczną neutrofilii i monocytów krwi obwodowej wykonano metodą cytochemiczną – spontanicznej redukcji błękitu nitrotetrazoliowego NBT (33) adaptowaną dla ryb (30). W teście tym wykorzystano właściwości redukcyjno-utleniające jednego z toksycznych metabolitów tlenowych, anionu nadtlenkowego, który jest uwalniany podczas wzmożonego metabolizmu komórek fagocytujących zwanego wybuchem tlenowym. Zasada metody polega na ekstrakcji formazanu NBT powstałego po redukcji błękitu nitrotetrazoliowego NBT pod wpływem NN-dwumetyloformamidu. Wynik reakcji barwnej odczytywano na spekulu (długość fali 540 nm) i podano w postaci pomiaru gęstości optycznej.

Aktywność pinocytarną i fagocytarną oceniano w komórkach żernych izolowanych z nerek przednich na Gradi-solu (Aqua-Med, Łódź, Polska) o gęstości 1,115 g/ml (23, 31). Do określenia liczby wyizolowanych komórek i ich żywotności zastosowano roztwór 0,6% błękitu trypanu. Do dalszych badań stosowano takie izolaty komórkowe, w których odsetek martwych komórek nie przekraczał 5%. Izolowane komórki zawieszano w płynie odżywczym RPMI 1640 (Biomed, Lublin, Polska) w stężeniu 1×10^6 z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i 100 U/ml penicyliny i streptomycyny.

Do testu pinocytarnego użyto mieszaniny zawierającej w równych proporcjach zawiesinę komórek w stężeniu 1×10^6 w 1 ml oraz 0,05% roztwór czerwieni obojętnej (20). Każdorazowo wykonywano dla 1 próby 5 rozmazów, w każdym z nich obliczano odsetek komórek barwiących się pozytywnie (aktywnych pinocytarne).

Aktywność fagocytarną neutrofilii i makrofagów nerek oceniano przy użyciu wzorcowego szczepu bakteryjnego *Staphylococcus aureus* 209P (1). Obliczano liczbę komórek fagocytujących (b) oraz liczbę bakterii sfagocytowanych przez te komórki (a) w celu określenia indeksu fagocytarnego (IF) według wzoru: $IF = \frac{a}{b}$.

Poziom lizozymu w surowicy krwi określano metodą spektrofotometryczną adaptowaną dla ryb (32).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu T-studenta, określając istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$. Porównano wyniki grup doświadczalnych z grupą kontrolną oraz wyniki uzyskane po stymulacji LPS-P i LPS-NP.

W drugim etapie badań ryby w liczbie 60 sztuk podzielono na 3 grupy. Ryby grupy 1 i 2 stymulowano LPS-NP w dawce 50 µg/100 g masy ciała, która okazała się w pierwszym etapie badań najbardziej efektywna. Do zakażenia ryb

grupy 1, 2 i 3, poprzez iniekcję dootrzewnową, użyto bakterii silnie patogennych dla karpia w stężeniu 4×10^8 CFU w 1 ml. Ryby grupy 1 zakażano zawiesiną komórek patogennego szczepu bakterii w ilości 0,1 ml po 7 dniach od stymulacji LPS-NP, ryby grupy 2 zakażano tą samą zawiesiną komórek patogennego szczepu bakterii po 21 dniach od stymulacji LPS-NP, ryby grupy 3 – zakażano zawiesiną komórek patogennego szczepu bakterii bez uprzedniej stymulacji. Obserwację ryb przeprowadzano przez okres 14 dni po zakażeniu. Wrażliwość ryb na zakażenie w poszczególnych grupach wyrażano odsetkiem ryb chorych i odsetkiem śniętych. Efekt immunizacji karpia określono na podstawie względnego procentu przeżywalności (WPP), wg

wzoru: $WPP = \left(1 - \frac{a}{b}\right) \times 100$, gdzie

a – % śmiertelności w grupie ryb immunizowanej, b – % śmiertelności w grupie kontrolnej.

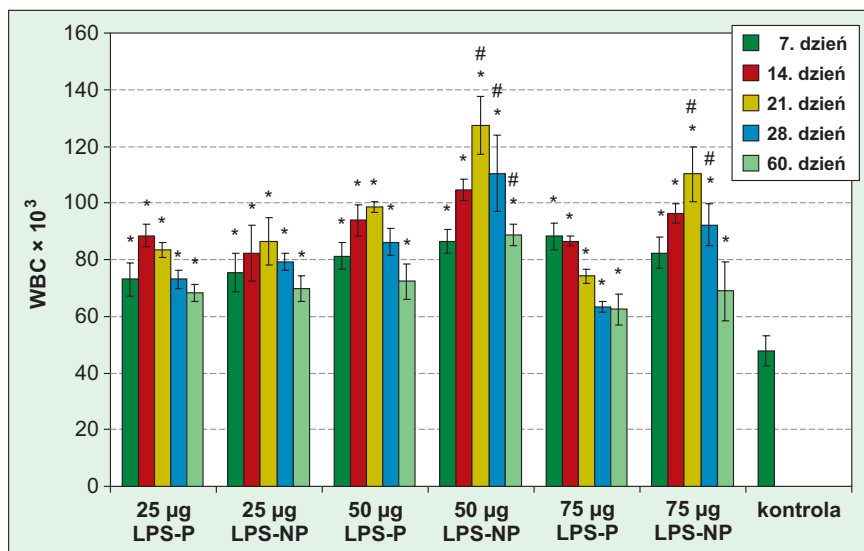
Wszystkie manipulacje z rybami podczas pierwszego i drugiego etapu badań były wykonywane przy zastosowaniu anestetyku MS-222 w dawce 50 mg/l wody.

Wyniki i omówienie

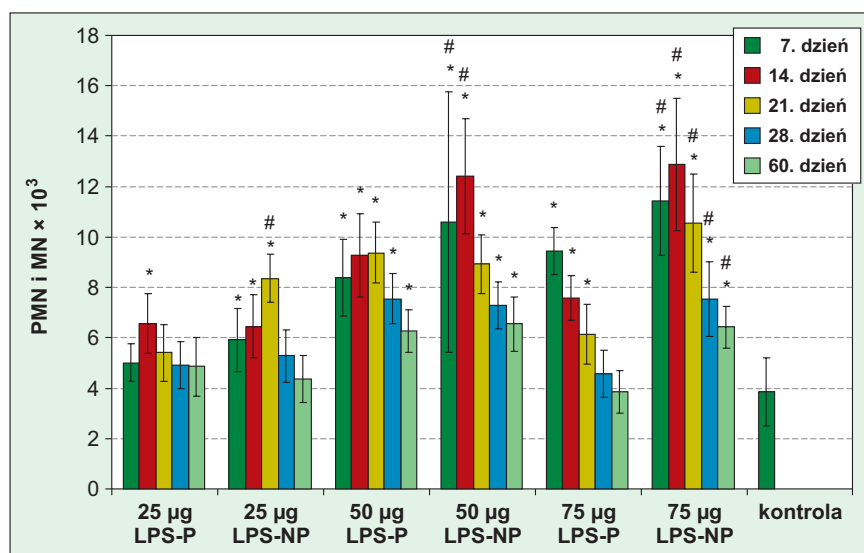
Wyniki badań hematologicznych wskazują na wystąpienie leukocytozy i wzrost komórek fagocytujących po stymulacji lipopolisacharydami pochodzącymi z patogennego i niepatogennego szczepu *A. hydrophila* (ryc. 1 i 2). Najwyższą liczbę leukocytów w 1 μ l krwi stwierdzono u ryb w 21. dniu badania po podaniu dawki 50 μ g/ml LPS-NP ($127,38 \times 10^3$). Statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną utrzymywały się do 60. dnia po stymulacji (ryc. 1).

Liczba komórek fagocytujących w 1 μ l krwi obwodowej (PMN i MN) osiągnęła najwyższe wartości w 14. dniu badania, szczególnie wysokie po podaniu 50 i 75 μ g LPS-NP (ryc. 2). Po 60 dniach obserwacji nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w dawkach 25 μ g obu lipopolisacharydów i 75 μ g LPS-P. W obrazie krwi w 7. dniu obserwacji stwierdzono zwiększoną

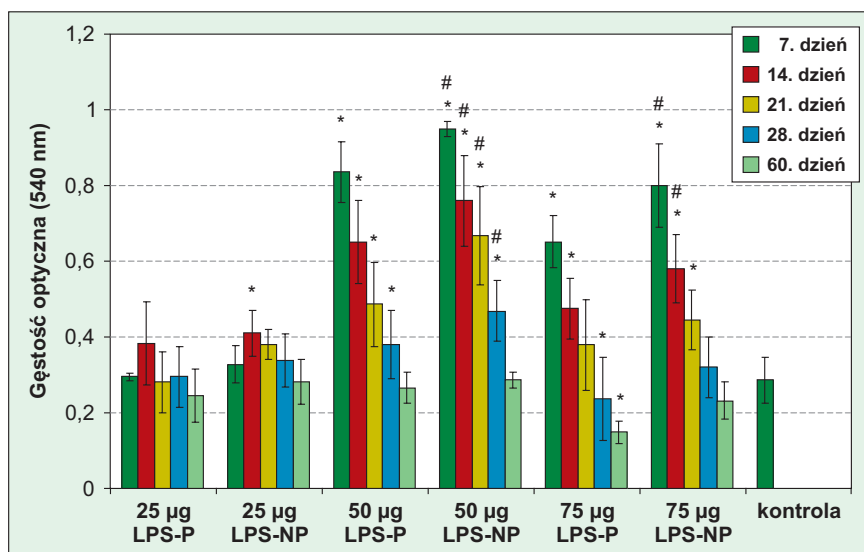
Objaśnienia do rycin 1-6: * – istotność różnic w porównaniu z grupą kontrolną $p \leq 0,05$; # – istotność różnic w porównaniach LPS-P i LPS-NP (w każdej dawce, w tym samym dniu badania, $p \leq 0,05$)



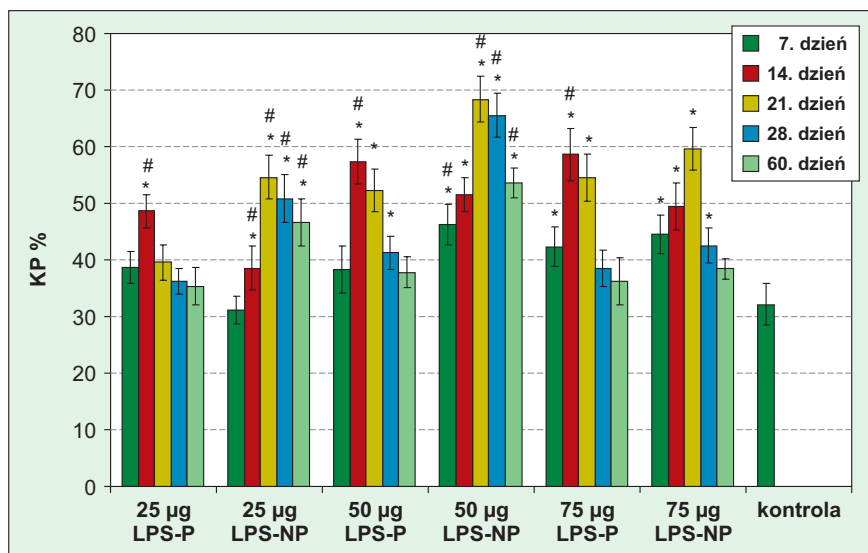
Ryc. 1. Liczba leukocytów ($WBC \times 10^3 \mu l^{-1}$) w krwi obwodowej karpia po stymulacji LPS-P i LPS-NP ($SD \pm n = 10$)



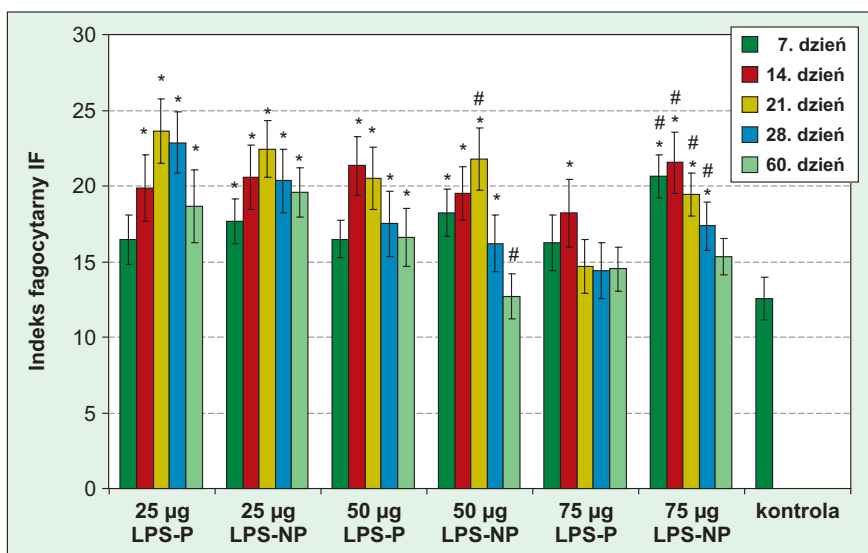
Ryc. 2. Liczba neutrofilii i monocytów (PMN i $MN \times 10^3 \mu l^{-1}$) w krwi obwodowej karpia po stymulacji LPS-P i LPS-NP ($SD \pm n = 10$)



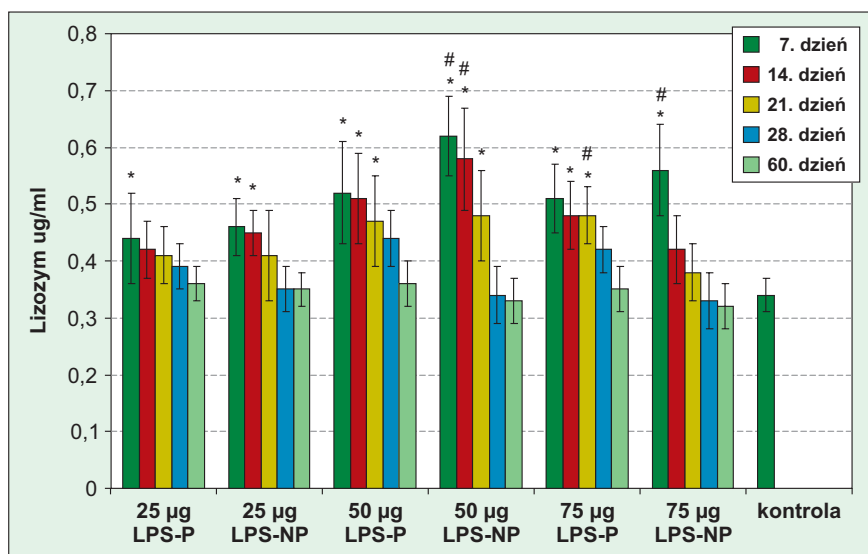
Ryc. 3. Aktywność metaboliczna neutrofilii i monocytów krwi obwodowej karpia (wybuch tlenowy) po stymulacji LPS-P i LPS-NP ($SD \pm n = 10$)



Ryc. 4. Odsetek neutrofilii i makrofagów nerek karpi wykazujących aktywność pinocytarną (KP%) po stymulacji LPS-P i LPS-NP (SD \pm n = 10)



Ryc. 5. Aktywność fagocytna neutrofilii i makrofagów nerek karpi (indeks fagocytny IF) po stymulacji LPS-P i LPS-NP (SD \pm n = 20)



Ryc. 6. Poziom lizozymu µg/ml w surowicy karpi po stymulacji LPS-P i LPS-NP (SD \pm n = 10)

liczbę form młodocianych neutrofilów szczególnie mielocytów.

Wzmożony metabolizm komórek fagocytycznych z krwi obwodowej stwierdzono u karpi po podaniu 50 µg i 75 µg obu rodzajów lipopolisacharydów w 7., 14. i 21. dniu obserwacji (ryc. 3). Porównując wartości uzyskane po zastosowaniu LPS-P i LPS-NP statystycznie istotne wyższe wartości w tych terminach badania wystąpiły po stymulacji LPS-NP niż LPS-P w dawce 50 µg. Po 60 dniach badania wartości te były na ogół zbliżone do grupy kontrolnej (ryc. 3).

Aktywność pinocytarną i fagocytarną komórek żernych nerek przednich karpi przedstawiono na ryc. 4 i 5. W 14. dniu badania stwierdzono wzrost aktywności pinocytarnej komórek w porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich okresach doświadczenia po podaniu obu rodzajów lipopolisacharydów, najwyższy odsetek komórek pinocytarnych wystąpił po 21 i 28 dniach w dawce 50 µg LPS-NP. W 28. i 60. dniu badania wyniki były na ogół zbliżone do grupy kontrolnej (ryc. 4). Aktywność fagocytarna mierzona wartością indeksu fagocytnego (IF) w 7., 21. i 28. dniu badania była statystycznie istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej po podaniu wszystkich badanych dawek LPS-NP, w 14. dniu badania wartość ta była statystycznie istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej po podaniu wszystkich dawek i rodzajów LPS (najwyższe wartości wystąpiły w dawce 50 µg i 75 µg LPS-NP). Po 60 dniach badania stwierdzano na ogół wartości zbliżone do grupy kontrolnej (ryc. 5).

Poziom lizozymu w surowicy krwi ryb był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną w 7. dniu badania we wszystkich grupach doświadczalnych, w 14. dniu badania w grupie ryb stymulowanych dawką 25 µg LPS-NP i 50 µg LPS-NP i LPS-P, w 21. dniu w grupie ryb, którym podano 50 µg LPS-NP i LPS-P oraz 75 µg LPS-P. W pozostałych okresach badania (28. i 60. dniu) poziom lizozymu w surowicy ryb był na ogół zbliżony do grupy kontrolnej (ryc. 6).

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że silniejsze właściwości pobudzające odporność nieswoistą

u karpia wykazał LPS izolowany z niepatogennego szczepu bakteryjnego (LPS-NP) niż patogennego (LPS-P) szczególnie w dawce 50 µg/100 g m.c.

Wyniki testu *challenge* wskazują na wyraźne różnice między grupami. Odsetek ryb chorych w grupie 1 i 2 wynosił, odpowiednio, 60% i 30%, zaś u ryb niestymulowanych 100% (grupa 3). U chorych ryb pojawiły się na powierzchni ciała zmiany w postaci ubytków skóry i mięśni, płytsze w 1 i 2 grupie ryb, głębsze i odsłaniające układ kostny w 3 grupie ryb. Po 10 dniach obserwacji u ryb grupy 1 i 2 rozpoczął się proces gojenia się wrzodów. Po 14 dniach ogółem usnęło w 1 grupie 35% ryb (7 ryb), w 2 grupie 20% (4 ryby), zaś w 3 grupie 85% (17 ryb). Efekt stymulacji określony na podstawie względnego procentu przeżywalności wyniósł, odpowiednio: u ryb grupy 1 – 58,82%; u ryb grupy 2 – 76,47%.

Obserwowany wzrost liczby leukocytów, neutrofilii i monocytów po stymulacji LPS-NP był na ogół zgodny z obserwowanymi wynikami innych autorów (3, 16, 26). Różnice w liczbie i czasie utrzymywania się podwyższonych wartości wynikają zwykle z różnych warunków, w których przeprowadzono doświadczenie. Wartości tych parametrów w dużym stopniu zależą od temperatury wody, w której przebywają ryby podczas badania (2, 19), parametry te są zwykle niższe w temperaturach niższych niż 20°C. W badaniach własnych zastosowano temperaturę wody 20°C, optymalną dla karpia, stąd uzyskano wyższe wartości badanych parametrów. Badania dotyczące aktywności makrofagów w zwalczaniu patogenów były prowadzone przez wielu autorów, wszystkie potwierdzają ich zdolności bojowe i główną rolę w mechanizmach obronnych ryb oraz uzależnienie ich aktywności również od temperatury (5, 16, 19, 20, 25, 27). Do oceny poziomu wybuchu tlenowego w komórkach fagocytarnych dość powszechne zastosowanie znalazł test NBT, który jest czułym wskaźnikiem działania supresyjnego lub stymulującego badanych preparatów. Wyniki testu NBT uzyskane po stymulacji ryb beta-glukanem, lewami-zolem, laminaryną i LPS są zbliżone do uzyskanych w badaniach własnych i potwierdzają obserwowaną w badaniach własnych podwyższoną aktywność metaboliczną komórek fagocytarnych (9, 16, 27, 29, 30). Uzyskane wyniki badań własnych wskazują na wyższe właściwości stymulujące LPS pozyskanego z niepatogennego szczepu *A. hydrophila*.

Wyniki badań nad aktywnością pinocytarną nie zawsze są zgodne z wynikami innych autorów: jedni stwierdzali obniżenie aktywności pinocytarnej makrofagów pod wpływem LPS (17), zaś inni obserwowali wzrost tej aktywności (6), natomiast wyniki badań indeksu fagocytarnego są na ogół zgodne z wynikami innych autorów, którzy obserwowali wzrost tej wartości po stymulacji ryb LPS (3, 9, 16, 27). Opisywany wzrost aktywności pinocytarnej i fagocytarnej neutrofilii i makrofagów związany jest przypuszczalnie z aktywacją komórek w sposób bezpośredni przez LPS

lub w sposób pośredni przez wytwarzanie cytokin. Na stymulujące właściwości lipopolisacharydu wskazują również wyniki badań poziomu lizozymu we krwi, który istotnie wzrasta po stymulacji LPS-NP w dawce 50 µg/100 g m.c. i utrzymuje się do 21. dnia po stymulacji. Nieliczne prace donoszą o wzroście tego parametru po zastosowaniu beta-glukanu, lewamizolu i LPS u ryb (9, 16, 29).

Lipopolisacharydy uzyskane z bakterii *A. hydrophila* okazały się przydatnymi stymulatorami komórkowych mechanizmów odpowiedzi nieswoistej u karpia; w większym stopniu LPS-NP niż LPS-P; zwiększały ich właściwości fagocytarne, stymulowały wytwarzanie przez neutrofile reaktywnych związków tlenowych, przez co wzmacniały ich siłę bakteriobójczą. Wyniki te znalazły potwierdzenie w drugim etapie badań, w którym stwierdzono mniejszą wrażliwość ryb stymulowanych LPS-NP na zakażenie bakteriami *A. hydrophila* niż niestymulowanych. Wyniki innych prac również potwierdzają wyższą odporność na zakażenie ryb stymulowanych LPS (9, 16), Baba i wsp. (3) uzyskiwali po immunizacji karpia LPS wysoki efekt ochronny w stosunku do *A. hydrophila*. Wzrost przeżywalności karpia po dootrzewnowej immunizacji LPS otrzymanym ze szczepów *A. bestiarium* obserwowali również Kozińska i Guz (16), a ze szczepów *A. hydrophila* Guz i Sopińska (9). Selvaraj i wsp. (27) uzyskali 100% względny procent przeżywalności karpia w teście challenge z użyciem *A. hydrophila*, podając β-glukan i LPS. Wyniki badań własnych, jak i innych autorów wskazują, że na wynik immunostymulacji lipopolisacharydami może mieć wpływ rodzaj LPS, który decyduje o jego immunogenności, a także okres upływający od stymulacji.

Piśmiennictwo

1. Aytalion R. R., Shahrabani R.: Studies on phagocytosis in fish. I. In vitro uptake and killing of living *Staphylococcus aureus* by peripheral leucocytes of carp (*Cyprinus carpio*). *Immunol.* 1975, 29, 1181-1187.
2. Aytalion R. R., Wojdani A., Malik Z., Shahrabani R., Duczimir M.: Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1973, 61, 1-35.
3. Baba T., Imamura J., Izawa K.: Immune protection in carp, *Cyprinus carpio* L., after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. *J. Fish Dis.* 1988, 11, 237-244.
4. Boivin A., Mesrobian L., Mesrobian L.: Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens specifique. *C. r. Seanc. Soc. Biol. Compt. rend.* 1993, 113, 490-496.
5. 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.* 1994b, 4, 231-238.
6. Dalmo R. A., Seljelid R.: The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [$\beta(1,3)$ -D-glukan] on Atlantic Salmon, *S. salar*, macrophages in vitro. *J. Fish Dis.* 1995, 18, 175-185.
7. Dooley J. S. G., Lallier R., Shaw D. H., Trust T. J.: Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 1985, 164, 263-269.
8. Guz L.: Immunogenność szczepów z rodzaju *Aeromonas*. Doświadczenialeszczepionki przeciwko MAI/MAS karpia. *Rozprawy naukowe UP w Lublinie*, ISSN 1899-2374, 2011, zeszyt 354.
9. Guz L., Sopińska A.: Wpływ $\beta(1,3)$ -D-glukanu i lipopolisacharydu na odporność karpia przeciwko *Aeromonas hydrophila*. *Med. Weter.* 2009, 65, 715-718.
10. Karunasagar I., Rosalind G., Karunasagar I.: Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *J. Fish Dis.* 1991, 14, 413-417.

11. *Kawai K., Kusuda R.*: Efficacy of the lipopolysaccharide vaccine against vibriosis in cultured ayu. Bull. Japanese Soc. Scientific Fisheries 1983, 49, 511-514.
12. *Kozińska A.*: Wskaźniki patogenności *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* i *Aeromonas sobria*. Rozprawa doktorska, 1996.
13. *Kozińska A., Antychowicz J.*: Immune cross reactions in carp (*Cyprinus carpio* L.) after single or double immunization with *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* antigens. Bull. Vet. Inst. Puławy 2001, 45, 43-47.
14. *Kozińska A., Antychowicz J.*: Influence of an experimental *Aeromonas hydrophila* vaccine on selected hematological values and non-specific immunity in carp (*Cyprinus carpio* L.). Bull. Vet. Inst. Puławy 2000, 44, 169-178.
15. *Kozińska A., Figueras M.J., Chacon M.R., Soler L.*: Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Appl. Microbiol. 2002, 93, 1034-1041.
16. *Kozińska A., Guz L.*: The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Shellfish Immunol. 2004, 16, 437-445.
17. *Lauve A., Dannevig B.H.*: Fluid-phase endocytosis by rainbow trout head-kidney macrophages. Fish Shellfish Immunol. 1993, 3, 79-87.
18. *Le Morvan C., Troutaud D., Deschaux P.*: Differential effects of temperature on specific and non-specific immune defence in fish. J. Exp. Biol. 1998, 201, 165-168.
19. *Le Morvan C., Clerton P., Deschaux P., Troutaud D.*: Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp. Fish Shellfish Immunol. 1997, 7, 209-212.
20. *Matthews E. S., Warriner J. E., Weeks B. A.*: Assay of immune function in fish macrophages, techniques used as indicators of environmental stress, [w:] Stolen J. S., Fletcher T. C., Anderson D. P., Roberson B. S., Van Muiswinkel W. B. (eds.): Techniques in fish immunology 1. SOS Publications, Fair Haven, N.J. 1990.
21. *Nomura J., Aoki T.*: Morphological analysis of lipopolysaccharide from Gram-negative fish pathogenic bacteria. Fish Pathol. 1984, 9, 193-197.
22. *Raa J., Roerstad G., Engstad R., Robertsen B.*: The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. Dis. Asian Aquaculture 1992, 1, 39-50.
23. *Rowley A. F.*: Collection, separation and identification of fish leukocytes, [w:] Stolen J. S., Fletcher T. C., Anderson D. P., Roberson B. S., van Muiswinkel W. B. (eds.): Techniques in fish immunology. Fair Haven (USA): SOS Publications 1990, 113-136.
24. *Saeed M. O., Plumb J. A.*: Immune response of channel catfish to lipopolysaccharide and whole cell Edwardsiella ictaluri vaccines. Dis. Aquat. Org. 1986, 2, 21-25.
25. *Salati F., Ikeda Y., Kusuda R.*: Effect of Edwardsiella tarda lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. Nippon Suisan Gakkaishi 1987, 53, 201-204.
26. *Selvaraj V., Sampath K., Sekar V.*: Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and its effects on survival and hematology of the carp, *Cyprinus carpio*. Asian Fish. Sci. 2004, 17, 163-173.
27. *Selvaraj V., Sampath K., Vaithilingam S.*: Administration of lipopolysaccharide increases specific and non-specific immune parameters and survival in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 2009, 286, 176-183.
28. *Sinyakov M., Dror M., Margel M., Avtalion R. R.*: Immunogenicity of *Aeromonas salmonicida* A-protein in goldfish (*Carassius auratus* L.). Israeli J. Aquacult-Bamidgeh 2001, 53, 110-114.
29. *Siwicki A. K.*: Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). Dev. Comp. Immunol. 1989, 13, 87-91.
30. *Solem S. T., Jorgensen J. B., Robertsen B.*: Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) macrophages by lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immunol. 1995, 5, 475-491.
31. *Sorensen K. K., Sveinbjornsson B., Dalmo R. A., Smedsrod B., Bertheussen K.*: Isolation, cultivation and characterization of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. J. Fish Dis. 1997, 20, 93-107.
32. *Studnicka M., Siwicki A., Ryka B.*: Lysozyme level in carp (*Cyprinus carpio* L.). Bamidgeh 1986, 38, 22-25.
33. *Sychłowy A., Lukas A.*: Ocena mikroilościowej metody redukcji NBT przez granulocyty krwi obwodowej. Polski Tygodnik Lekarski 1978, 33, 45-48.

Adres autora: prof. dr hab. Antonina Sopińska, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: antonina.sopinska@up.lublin.pl