

Imunologie ryb

Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, Brno 61137, Česká republika

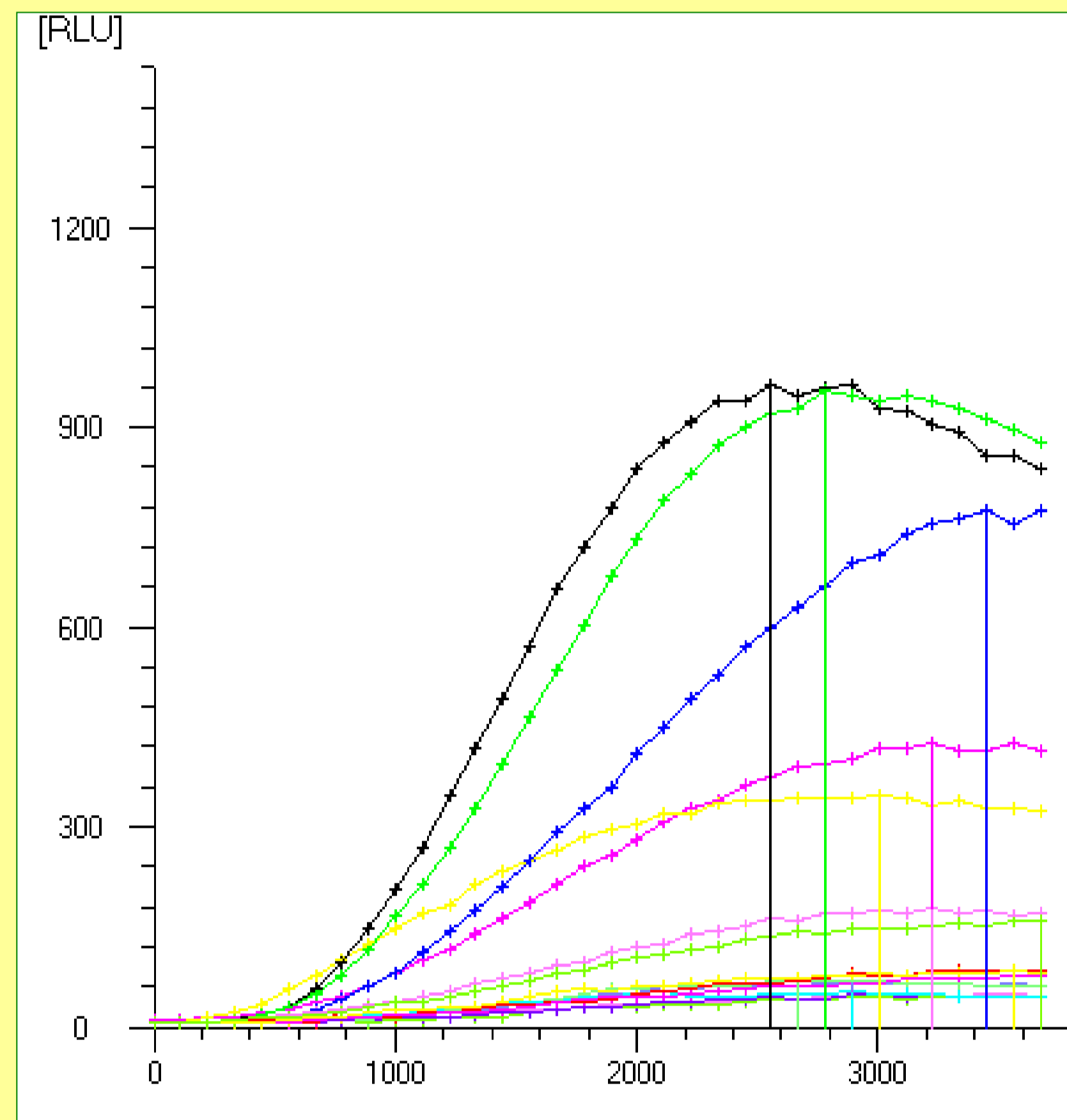
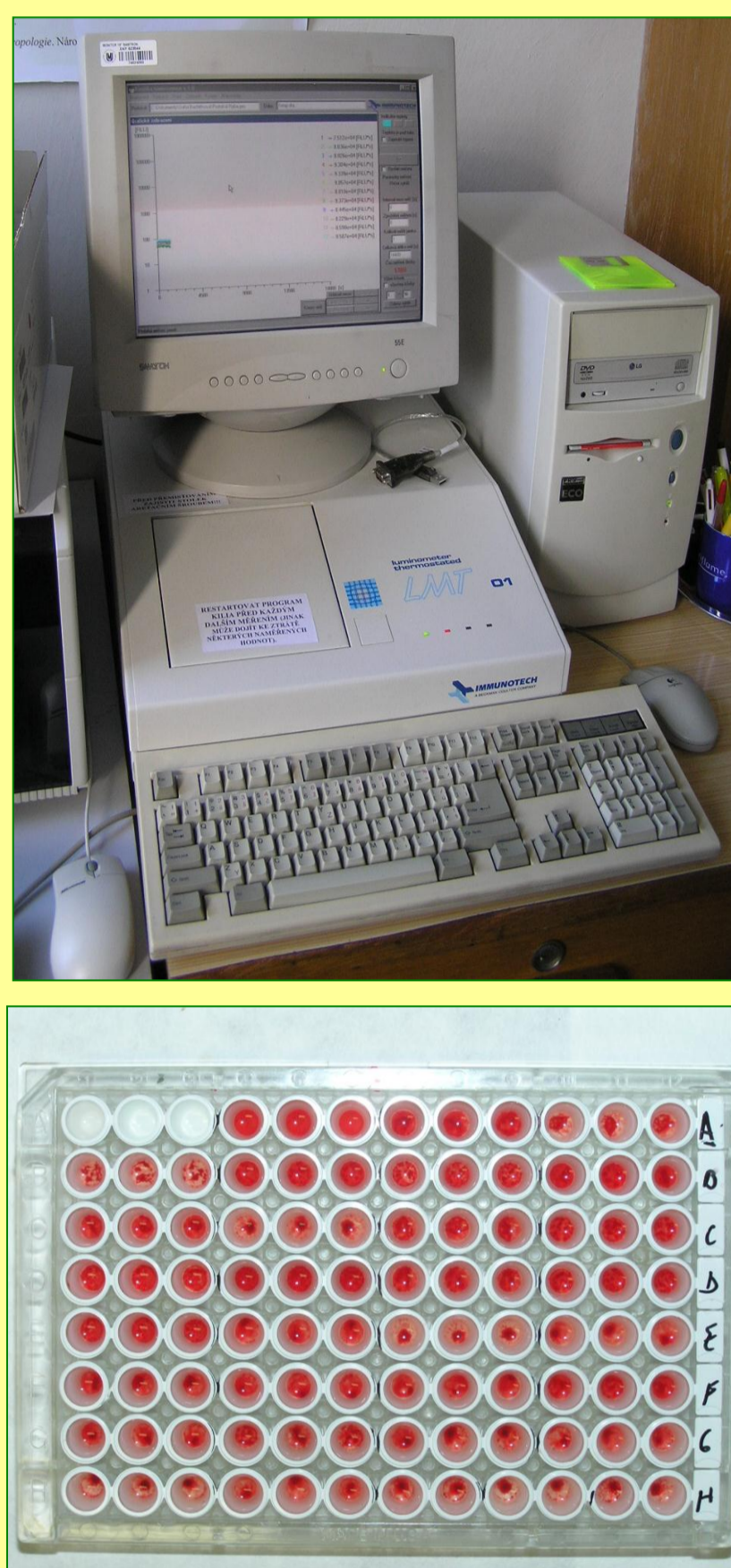
www.sci.muni.cz/ofiz



Cyprinus carpio
http://www.naturfoto.cz/kapri-obecny-fotografie-1073.htm

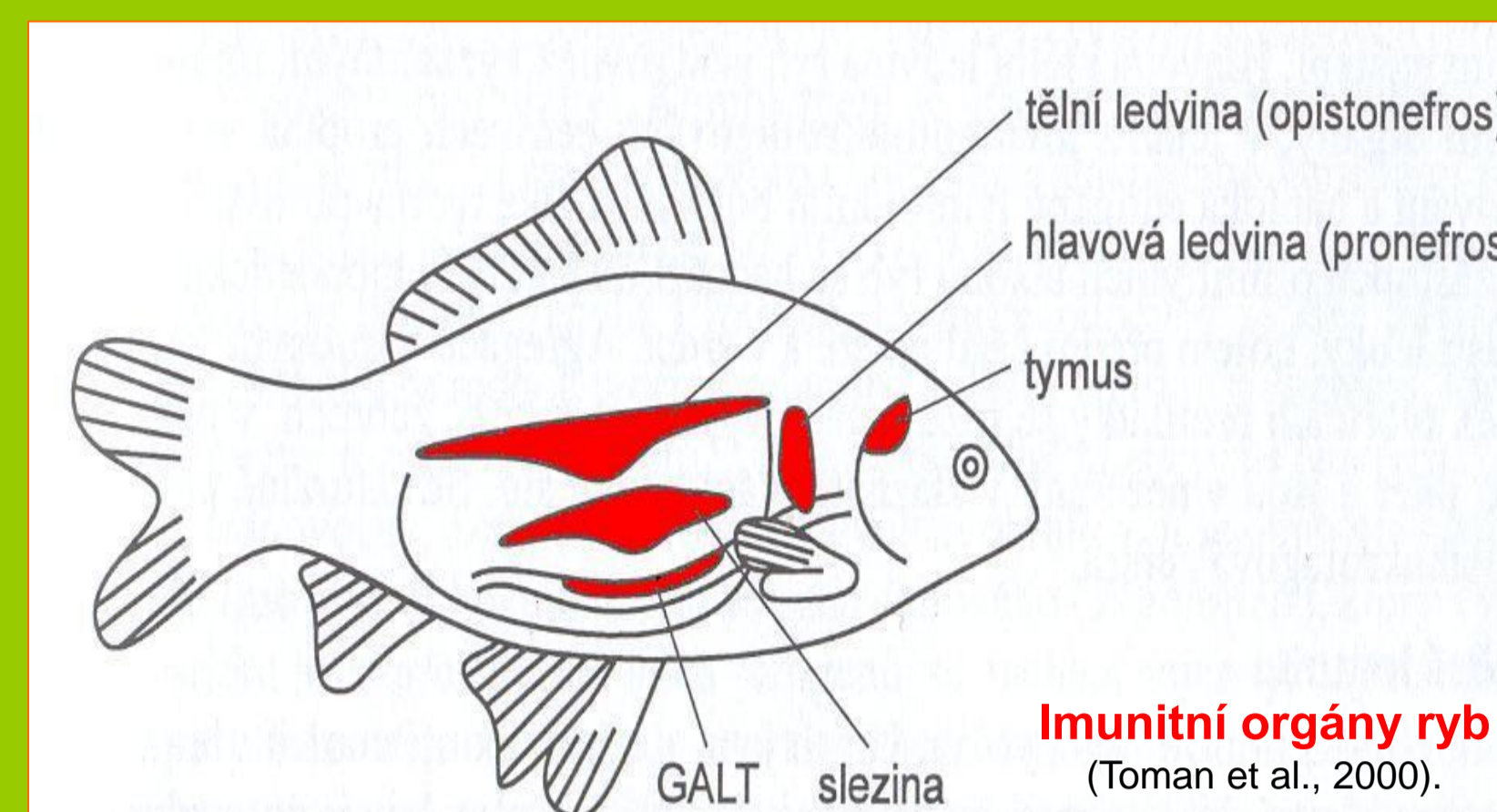
Luminiscenční analýza oxidativního vzplanutí fagocytů v plné rybí krvi

Heparinovaná krev je po naředění v HBSS smíchána s luminolem a aktivátorem (OZP - opsonizovaný zymozan). Prostřednictvím opsoninů navázaných na zymosanové částice se OZP váže na komplementové a imunoglobulinové receptory fagocytů. Tím spouští signální dráhu vedoucí k aktivaci proteinkinasy C, která katalyzuje fosforylaci endogenních proteinů a následnou aktivaci NADPH-oxidasy, klíčového enzymu respiračního vzplanutí. Aktivita plné krve se měří do dvou hodin po odběru. Luminolem zesílená luminiscence je analyzována v mikrotitračních destičkách v luminometru při 20-25°C. Kinetika luminiscenční odpovědi každého vzorku je sledována po dobu maximálně 60 min. Nejdůležitějšími ukazateli oxidativního vzplanutí fagocytů jsou vrchol luminiscenční odpovědi, čas jeho dosažení a celkové vyprodukované množství reaktivních metabolitů kyslíku (integrál plochy pod naměřenou křivkou). Spontánní respirační vzplanutí fagocytů bývá obvykle na úrovni pozadí luminometru.



Obr.: Typická křivka oxidačního vzplanutí fagocytů (délka měření 3600s), luminometr a mikrotitrační destička ze vzorky.

Imunitní systém ryb



Imunitní orgány ryb
(Toman et al., 2000).

BUNĚČNÁ IMUNITA

NESPECIFICKÁ

Fagocyty - fagocytóza, oxidativní vzplanutí → **luminiscenční metoda**
- monocyty
- makrofágy
- neutrofilny
- retikulární buňky
Cytotoxické buňky – obdoba savčích NK buněk

SPECIFICKÁ

T lymfocyty
B lymfocyty – produkce specifických protilátek IgM

HUMORÁLNÍ IMUNITA

NESPECIFICKÁ

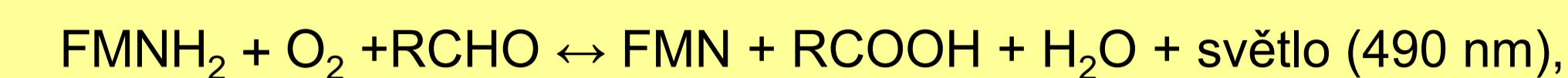
Lektiny
C-reaktivní protein
Lytické enzymy – např. lysozym → **difúzní metoda**
Komplement – bakteriolytická aktivita → **luminiscenční metoda**

SPECIFICKÁ

Protilátky – pouze třída IgM (tetramer) → **metoda ELISA**

Stanovení bakteriolytické aktivity komplementu v séru ryb

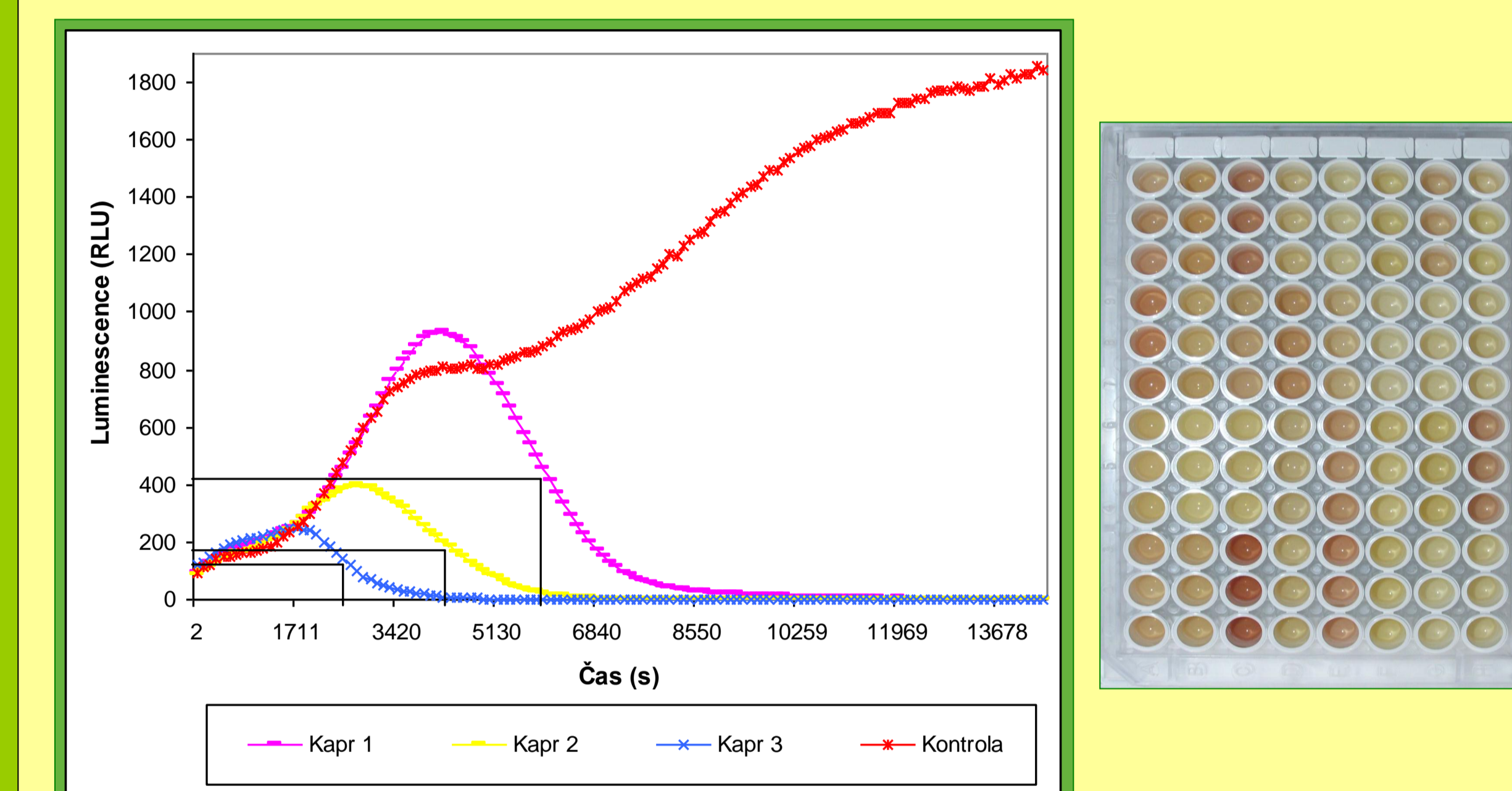
Tato luminiscenční metoda založená na principu bioluminiscence využívá rekombinantní bakteriální kmen *Escherichia coli* (K12pGFPluxBAmp), jehož plasmid obsahuje gen pro enzym luciferázu a její substrát aldehyd (Nikoskelainen et al., 2002). Světelná emise je výsledkem následující reakce (Hakkila et al., 2002):



kteřá je katalyzována enzymem luciferázou a vyžaduje přítomnost ATP, ten je produkován pouze živými buňkami. Intenzita produkovaného světla odpovídá viabilitě bakterií. Kinetika reakce je měřena po dobu 3 hodin v laboratorní teplotě. Z grafu znázorňujícího závislost luminiscence na čase je odečtena doba potřebná pro usmrcení 50% bakterií. Tato hodnota je použita jako parametr pro srovnání aktivity komplementu jednotlivých vzorků rybího séra (popř. plasmy) o stejné koncentraci.

Hodnocení výsledků:

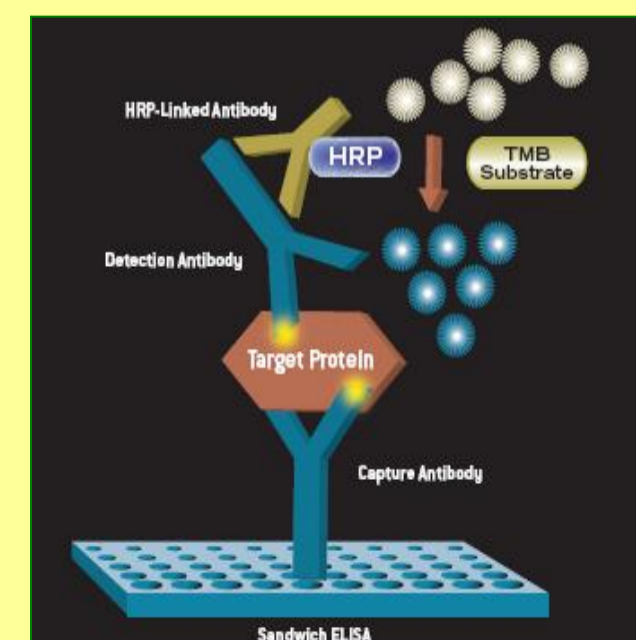
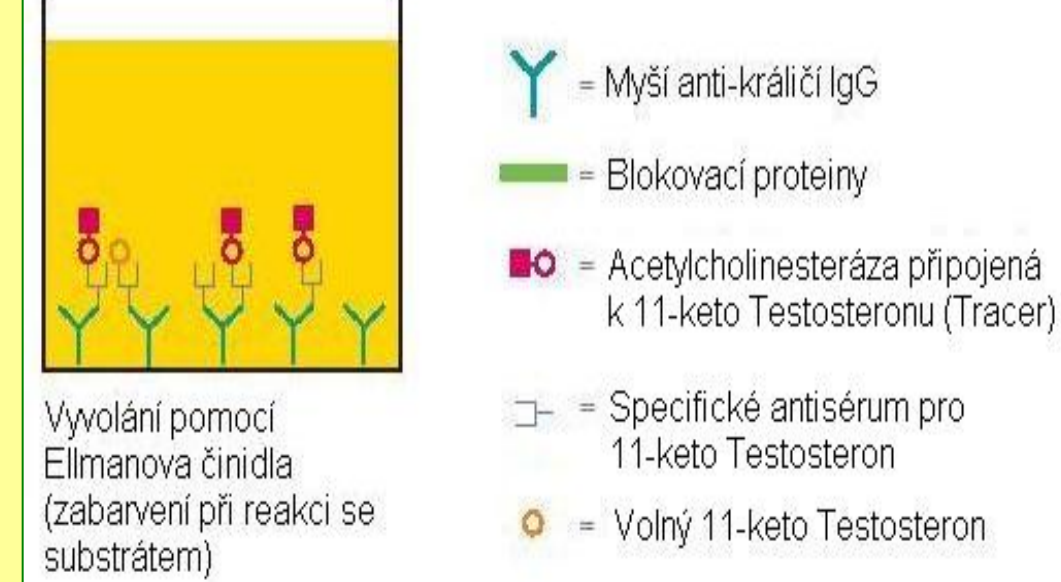
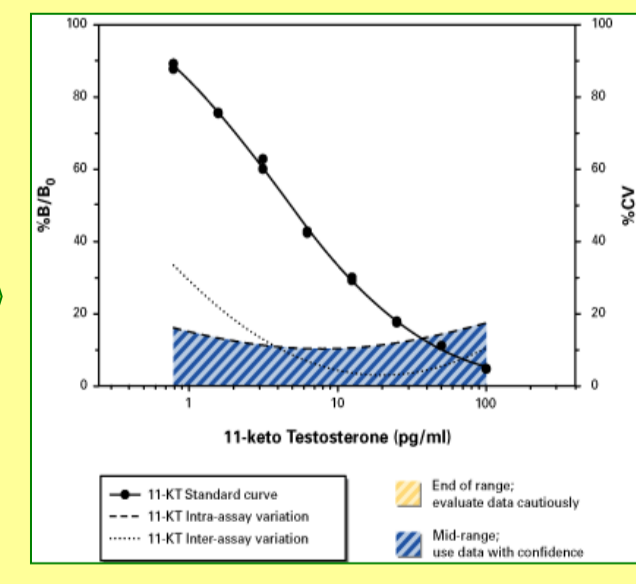
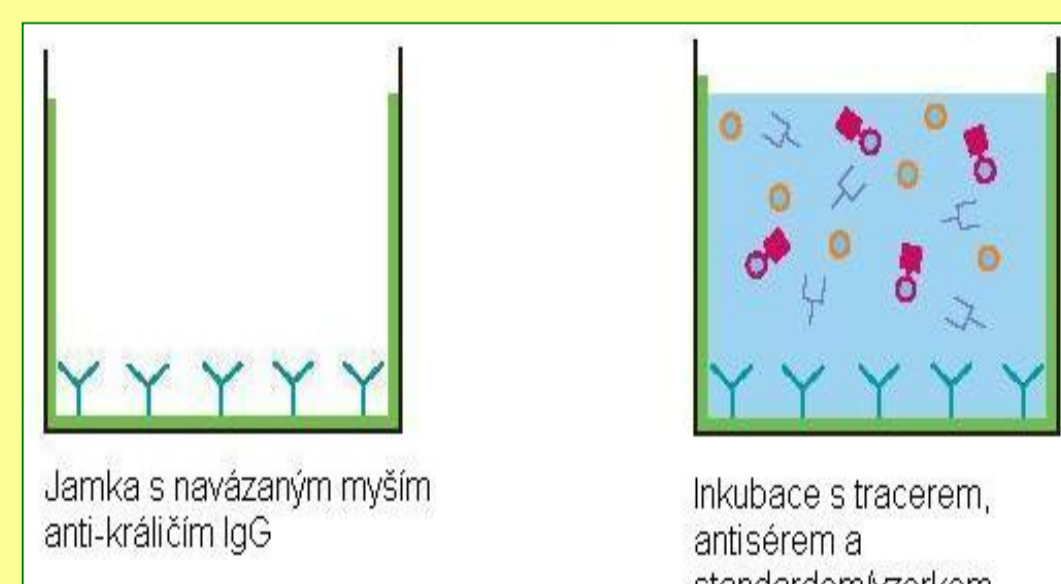
Na ukázkovém grafu byla nejvyšší aktivita komplementu u kapra č. 3 (2592 sekund), nižší u kapra č. 2 (4284 sekund) a nejnižší u kapra č. 1 (6012 sekund).



Obr.: Graf závislosti luminiscence (tj. viability bakterií) na čase. Červená křivka – kontrola viability bakterií. Mikrotitrační destička s nanesenými vzorky (triplikáty).

Stanovení IgM z rybího séra/plasmy pomocí ELISA metody:

Ke stanovení imunoglobulinů ze séra či plasmy se využívá turbidimetrická nebo ELISA metoda, v případě ELISA metody se využívá dvou základních vlastností rybího IgM - vaznosti k povrchu umělých hmot a schopnosti nést na svém povrchu enzymy umožňující jejich obarvení. Metoda využívající tyto vlastnosti se nazývá ELISA (**E**zyme-**L**inked-**I**mmuno**S**orbent **A**ssay). Při standardním („sandwich“) ELISA testu je použita 96-jamková destička, na kterou je navázána neznámená monoklonální anti-rybí IgM (nejčastěji myši či králičí IgG2b). Po navázání anti IgM na stěny jamek je zbytek povrchu jamek vysycen sušeným mlékem – pro zablokování nespecificky navázaných shluků imunoglobulinů. Poté je napipetováno sérum/plasma o potřebné koncentraci. Nyní je do všech jamek přidána druhá monoklonální anti-rybí IgM značená křenuvou peroxidázou. Na závěr je přidán chromogen (např. OPD), který je oxidován kyslíkem produkovaným reakcí peroxidázy s peroxidem vodíku a mění barvu na žlutou až oranžovou. Po vyvinutí reakce je přidána 2M H₂SO₄, která reakci zastaví a celá destička je změřena na ELISA readeru při vlnové délce 450 nm (obr. 1). Existují i další typy ELISA testů, např. kompetitivní. Tato se pak liší hlavně ve složení tzv. „sendviče“ (obr. 3) v jamkách destičky. Kompetitivní ELISA se dá využít také při stanovení koncentrace hormonů v krvi ryb, např. 11-ketotestosteronu. V takovém případě mluvíme o kompetitivním EIA testu (Enzyme Immunoassay, obr. 2).



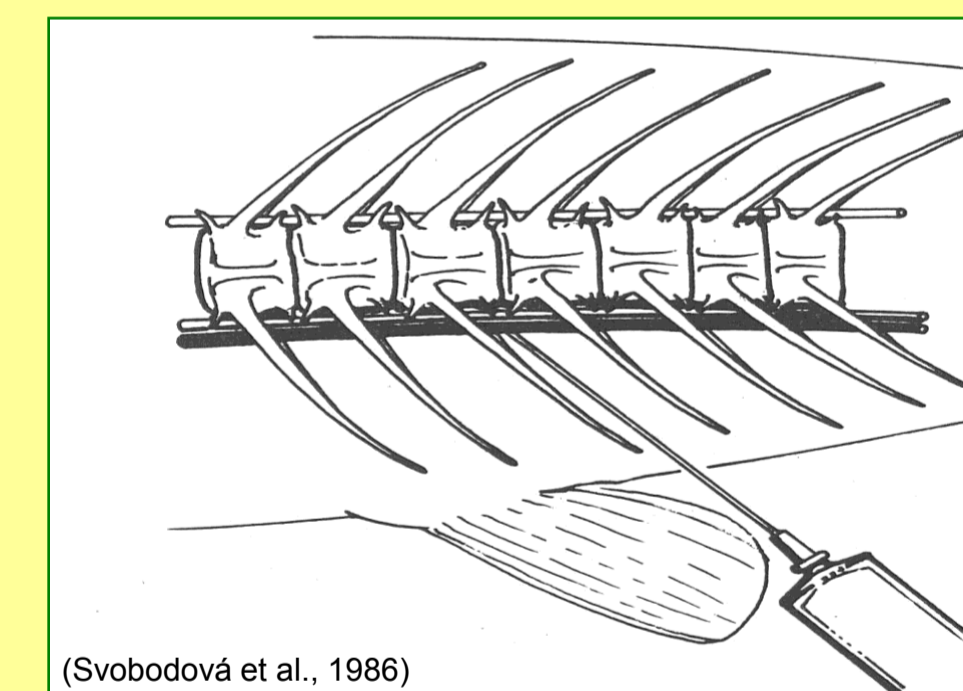
Obr. 1: ELISA reader, 96-jamková destička.

Obr. 2: Zjednodušené schéma EIA testu, vyhodnocení EIA testu.

Obr. 3: Standardní ELISA test.

Odběry vzorků:

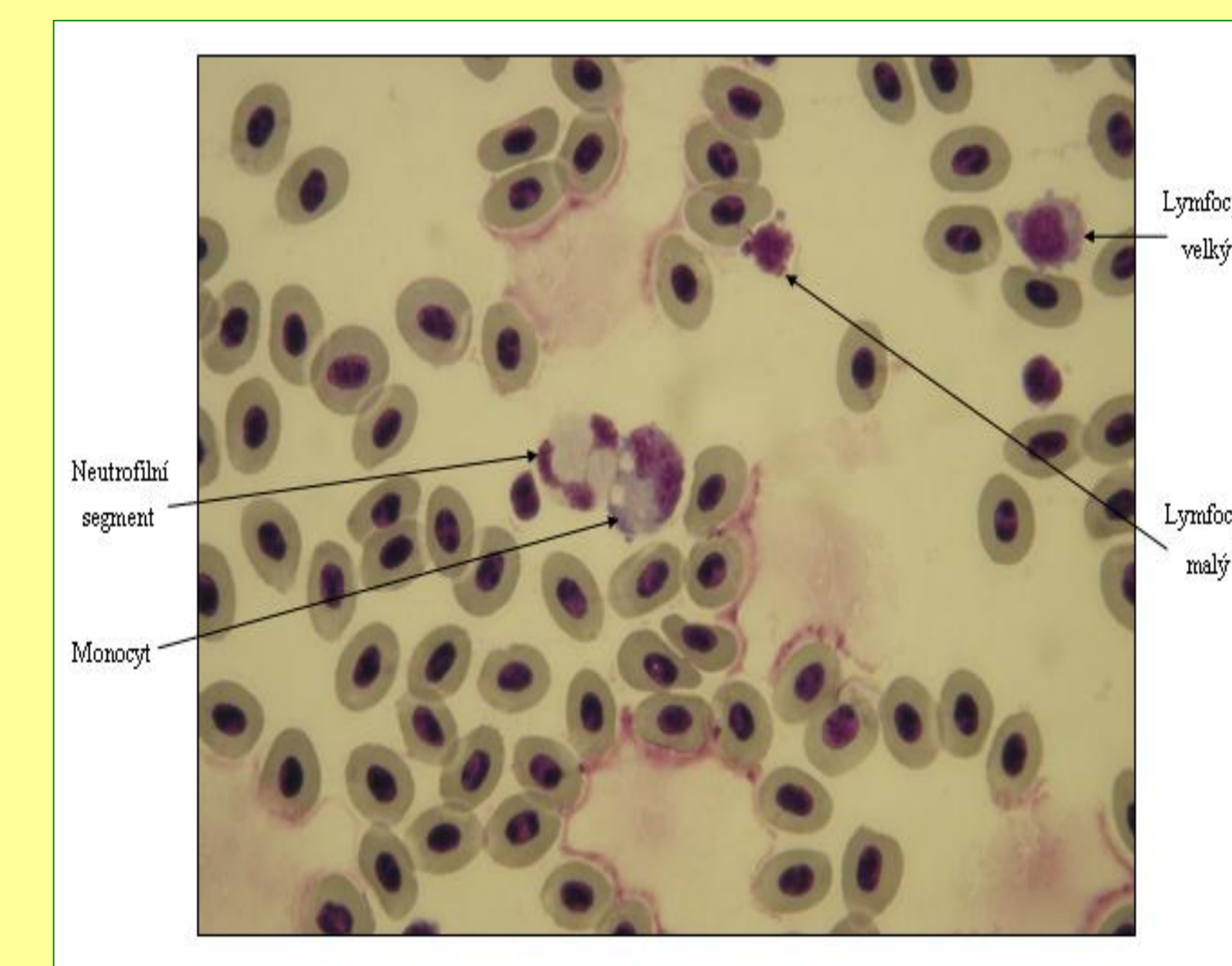
- krev je rybám odebírána z kaudální vény
- pro experimenty se používá plná heparinovaná (50 U/ml) krev
- nebo je zpracovaná na plasmu / sérum



(Svobodová et al., 1986)

Hematologické parametry:

- krevní diferenciál
- počet erytrocytů a leukocytů
- hematokrit a leukokrit



Literatura:

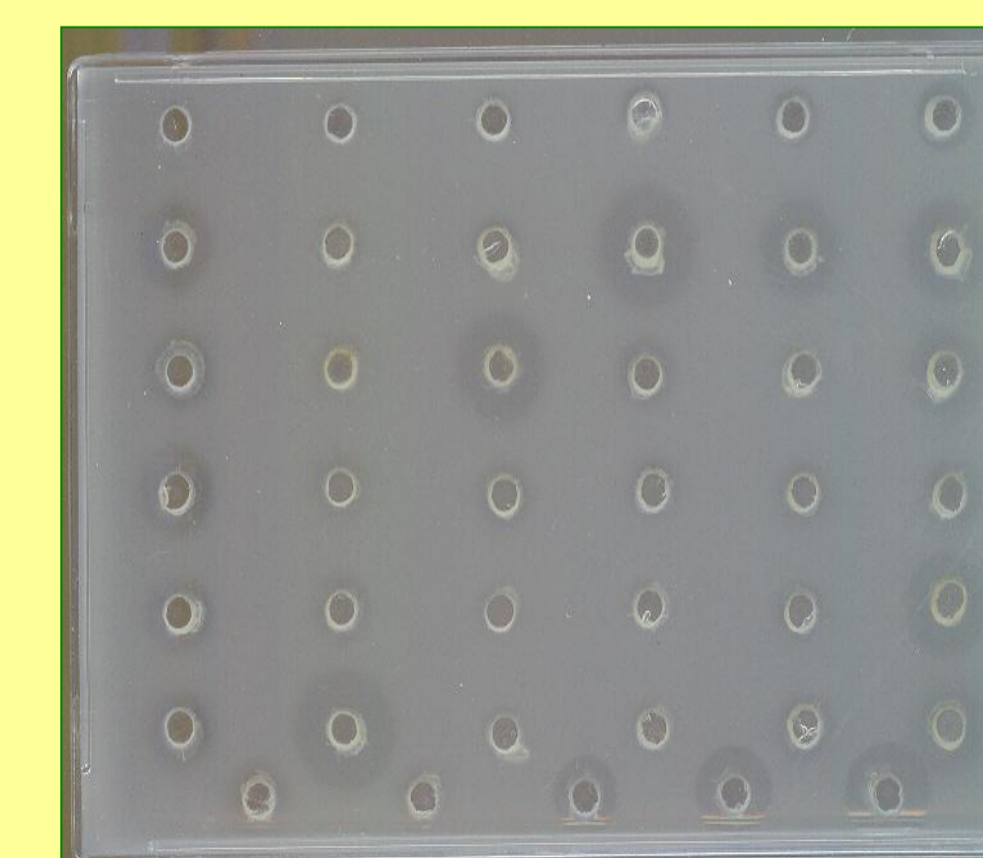
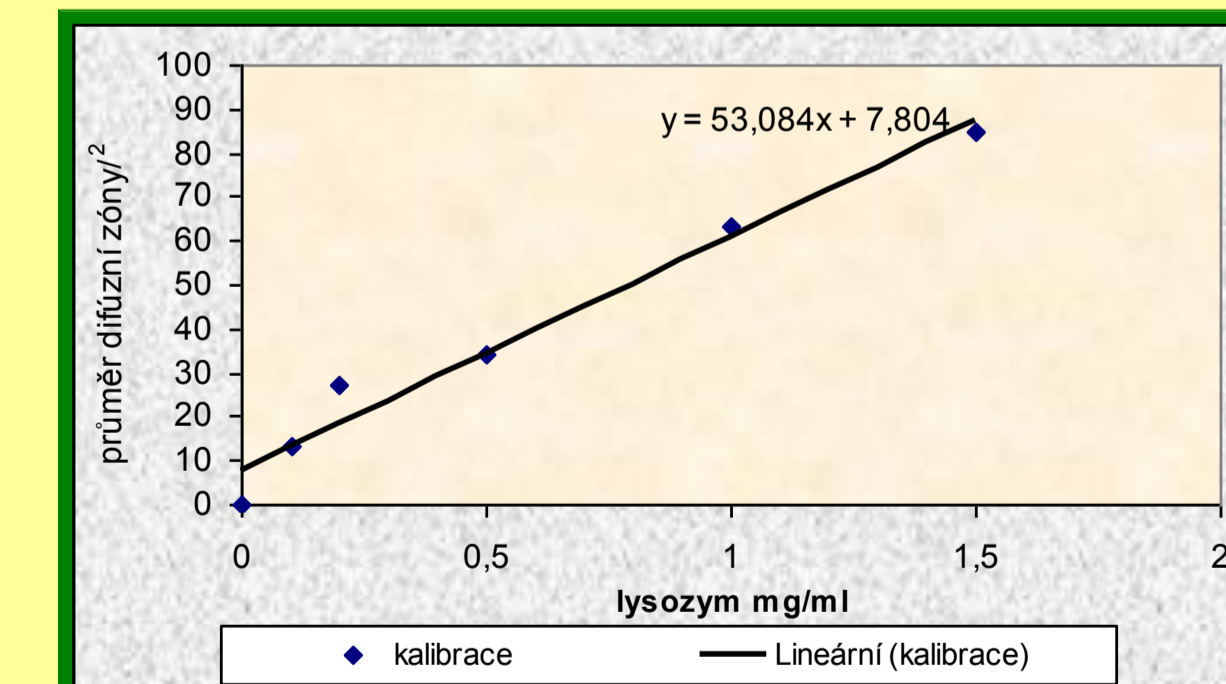
- Hakkila K., Maksimov M., Karp M., Virta M.: Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp* and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Analytical Biochemistry*, 301, 235-242, 2002.
- Nikoskelainen S., Lehtinen J., Lilius E.-M.: Bacteriolytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) complement. *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 797-804, 2002.
- Svobodová Z., Pravda D., Paláčková J. (1986): Jednotné hematologické metody hematologického vyšetřování ryb. Vodňany: Edice Metodik: 36.
- Toman a kolektiv: Veterinární imunologie. Grada, Praha, 2000.

Stanovení obsahu lysozymu v kožním mukusu ryb

Množství lysozymu lze stanovit in vitro radiální difúzí v agaróze. Metoda využívá *Micrococcus luteus* (CCM 169), který patří k nejcitlivějším mikroorganismům rozpouštěným tímto enzymem. Agaróza je ropuštěna v Brit- Robinsonově pufru (pH 7,0), dále je přidán *Micrococcus luteus* (CCM 169), vše je povařeno a nalito na skleněné nebo plastové plotny. Ke kalibraci se používá roztok lysozymu (E.C. 3.2.1.17, Sigma) o množství 2, 5, 10, 15 a 20 mg/ml. Inkubace probíhá ve vlhké komůrce za laboratorní teploty 24 hodin. Průměry projasněných difúzních zón se odečítají měřítkem IDP – SEVAC. Množství lysozymu ve vzorku se přepočítá podle kalibrační křivky na mg/ml vzorku.

Orientační srovnání některých vzorků obsahujících LSM:

- lidské sliny 0,1-0,5 mg/ml
- lidské slzy cca 6 mg/ml
- kožní mukus *Leuciscus* 8-15 mg/ml
- kožní mukus *Gobio* 5-7 mg/ml
- kožní mukus *Cyprinus* 0-2 mg/ml



Obr.: Agarózový gel obsahující *Micrococcus luteus* a difúzní zóny vytvořené v gelu po aplikaci vzorku s LSM.