مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۳، ۱۳۹۹، ۳۲۷-۳۲۰
مقاله پژوهشی

# اثرات تجویز فلورفنیکل خوراکی روی برخی شاخص‌های خون‌شناختی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت چالش با عوامل استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس

نیما شیری[۱]، سیاوش سلطانیان[۱]، طهورا شمالی[۲]، رضا سلیقه زاده[۱]

[۱] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۲] گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

10.22059/jvr.2019.273876.2890
**تاریخ دریافت:** ۲۰ اسفند ماه ۱۳۹۸، **تاریخ پذیرش:** ۳۰ اردیبهشت ماه ۱۳۹۹

## چکیده

**زمینهٔ مطالعه:** آنتی بیوتیک‌ها می‌توانند وضعیت فیزیولوژیک و سیستم ایمنی میزبان را دستخوش تغییر نمایند و بکارگیری شاخص‌های خونی نشانگر مناسبی برای پایش آن‌هاست.

**هدف:** مطالعه تغییرات شاخص‌های خون‌شناختی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تحت چالش با عوامل استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در پی مصرف فلورفنیکل خوراکی.

**روش‌کار:** بدین منظور، تعدادی ماهی (۷/۵ ± ۵۵ گرم) در یک بلوک کاملاً تصادفی در ۶ تیمار و ۳ تکرار شامل گروه‌های بدون/ با چالش عفونی هر پاتوژن به طور جداگانه و بدون/ با دارودرمانی در دوزاژ ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن برای ۱۰ روز متوالی، مورد آزمایش قرار گرفتند. دوزهای باکتری‌های *Streptococcus iniae* ($۲/۸۷\times۱۰^{۷}$) و *Lactococcus garvieae* ($۶/۸\times۱۰^{۵}$) واحد تشکیل پرگنه بر میلی‌لیتر) به مقدار ۳۰ درصد LD50 در آزمایش اصلی بکار گرفته شدند. در پایان دوره آزمایشی، از سیاهرگ ساقه دمی ماهی‌ها خونگیری انجام شد. اندازه‌گیری هماتوکریت و هموگلوبین با استفاده از روش‌های استاندارد و شمارش یاخته‌های خونی پس از تهیه گسترش و با بکارگیری هماتوسایتومتر صورت گرفت.

**نتایج:** یافته‌ها نشان داد که درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین و تعداد گویچه‌های سرخ خون ماهیان در گروه‌های دریافت کننده دارو نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P<۰/۰۵$). مصرف روزانه فلورفنیکل به مدت ۱۰ روز متوالی در دوز اشاره شده، توانسته سبب کاهش معنی‌دار تعداد لنفوسیت‌های خون شود ($P<۰/۰۵$). از سوی دیگر به نظر می‌رسد که تعداد مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سایر یاخته‌های خونی در پی دریافت دوزاژ دارویی به طور معنی‌داری افزایش یافتند ($P<۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری نهایی:** به نظر می‌رسد که مصرف خوراکی فلورفنیکل توانسته است سبب بهبود ایمنی ذاتی از طریق افزایش یاخته‌های خونی شود. گرچه با توجه به کاهش فراوانی لنفوسیت‌های خون و اینکه مسئله ایجاد آنمی در ماهی به دنبال مصرف فلورفنیکل کماکان وجود دارد، توصیه می‌شود در صورت کاهش تلفات و بهبود علائم درمانگاهی از سطوح پائین‌تر دامنه مجاز مصرفی آنتی بیوتیک از نظر FDA برای درمان استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** خون‌شناسی، قزل‌آلای رنگین کمان، فلورفنیکل، *Streptococcus iniae*، *Lactococcus garvieae*.

**کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.**

*نویسنده مسئول: سیاوش سلطانیان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران*
*پست الکترونیکی: siyavashsoltanian@gmail.com*

## مقدمه

فلورفنیکل یکی از ترکیبات ضد باکتری کاربردی در زمینه دامپزشکی است که دارای طیف اثر گسترده بوده و در درمان بیماری تنفسی گاوی، خوکی و همچنین عفونت‌های مزمن تنفسی و گوارشی در طیور کاربرد دارد (۲۸). برای نخستین بار در آبزی‌پروری، برای درمان و جلوگیری از گسترش عوارض بیماری‌های ناشی از *Vibrio anguillarum*، *Edwardsiella tarda* و *Photobacterium damselae piscicida* استفاده شد و مشخص گردید که کارایی بهتری نسبت به کلرامفنیکل دارد (۱۰). همچنین در درمان فرونکولوزیس در آزاد ماهی اقیانوس

اطلس به صورت خوراکی بکار گرفته شده و تجویز مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز و درمان به مدت ۱۰ روز سبب کاهش تلفات و بهبود علائم درمانگاهی گردید (۱۴). این دارو سبب کنترل تلفات ناشی از سندرم بچه‌ماهی نورس قزل‌آلای رنگین کمان (RTFS) و بیماری باکتریایی آب‌های سرد شده است (۶،۲۳). حتی برخی پاتوژن‌های درون سلولی نظیر *Piscirickettsia salmonis* که قادر به ایجاد بیماری و عفونت در آزاد ماهیان هستند نیز، در آزمایشگاه و در مزرعه به فلورفنیکل پاسخ می‌دهند (۳۹). هم اکنون، فلورفنیکل خوراکی با برند تجاری Aquaflor® و در دامنه دوزاژ مصرفی تشریح شده در دستورالعمل سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برای درمان بیماری‌های باکتریایی در ماهیان گرمابی نظیر سپتی سمی ادواردزیلایی و کولومناریس و همچنین کنترل مرگ و میر ناشی از فرونکولوزیس و بیماری باکتریایی کلیه در ماهیان سردابی پرورشی مورد تأیید این سازمان است (۸،۲۸).

این آنتی بیوتیک دارای خاصیت باکتریواستات وابسته به دوز بوده و با پیوستن به زیرواحد ۵۰S ریبوزوم‌های باکتری‌های حساس موجب مهار آنزیم پپتیدیل ترانسفراز گشته، در نتیجه باعث توقف انتقال اسید آمینه به زنجیره‌های پپتیدی در حال شکل‌گیری می‌گردد. بنابراین جزء گروه آنتی بیوتیک‌های مهارکننده سنتز پروتئین به شمار می‌رود (۳۱). با توجه به اینکه، اثرات دارو به طور مستقیم به غلظت آن در محل ایجاد عفونت بستگی دارد و با توجه به نفوذ قابل قبول این آنتی بیوتیک به بافت‌های هدف و در نتیجه رسیدن به دوز اثر گذار این دارو در محل آسیب به‌وسیله گردش خون، عملکرد بسیار مناسبی دارد (۳۸). ماهیت شیمیایی دارو به صورت محلول در چربی و دارای pH اسیدی است. زیست فراهمی آن نظیر کلرامفنیکل بسیار بالا و معادل ۹۶/۵ درصد تعیین شده است. بنابراین برای رسیدن به اهداف بالینی، انتشار دارو رضایت بخش بوده و با توجه به حجم انتشار قابل توجه، مقدار بافتی آن با مقدار پلاسمایی‌اش برابر است. نیمه عمر حذفی برابر با ۱۲/۲ ساعت حاکی از این است که نیاز به تجویز روزانه دارد (۷،۳۶). با توجه به اینکه فلورفنیکل و تیامفنیکل در مقایسه با آنالوگ بنیادین خود به نام کلرامفنیکل، در ساختمان ملکولی به جای نیترو ($NO_2$) دارای متیل سولفانات ($SO_2$-$CH_3$) هستند، این برتری را دارند که خطراتی مانند نارسایی مغز استخوان (Myelosuppresion) و آنمی آپلاستیک در انسان ناشی از باقیمانده دارویی را ایجاد نکنند. مورد اخیر به عنوان جدی‌ترین عارضه مصرف کلرامفنیکل مطرح بوده و ضمن نادر بودن رخداد آن، با توقف مصرف دارو کاملاً برگشت پذیر است (۷،۱۸). گفته شده که این آنتی بیوتیک دارای اثر ضد میکروبی نیرومندی بوده و فاقد مهارکنندگی تولید یاخته‌های خونی برخلاف همتایان خود است (۳۸).

با اینکه دلایل زیادی برای مصرف کلینیکی فلورفنیکل وجود دارد، تاکنون اثرات سرکوب‌گر/ القایی آن بر یاخته‌های سلولی در خون پستانداران (۱۲،۲۱)، طیور (۱۳،۱۵) و ماهیان (۲۲،۲۶) گزارش شده است. برای نمونه درصد تیموسیت‌های $CD4^-$ و $CD8^-$ و تعداد مطلق $CD4^+$ و $CD8^+$ خون موش در پی مصرف فلورفنیکل طی ۷ روز مصرف خوراکی این آنتی بیوتیک افزایش و همچنین درصد لنفوسیت‌های B کاهش یافتند (۲۱). به نظر می‌رسد سطح سرکوب شدگی فراسنجه‌های ایمنی سلولی در موش‌های آزمایشگاهی وابسته به دوز مصرفی این آنتی بیوتیک باشد (۱۲). علی رغم اینکه فلورفنیکل اثرات مثبتی بر پاسخ‌های سلولی ایمنی طیور از خود نشان داده است (۱۵). در خصوص مدیریت بهداشتی بیماری‌های عفونی در آبزی پروری، آنتی بیوتیک‌های مصرفی می‌توانند سبب نوتروپنی و حذف آلبومین در خون ماهیان شوند (۲۲). در تیلاپیای تحت درمان با فلورفنیکل نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌دار مقدار هموگلوبین، درصد هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز و همچنین لوکوسیتوز (نوتروفیلی) به وجود آمده است (۴). سطوح کاهش یافته فعالیت فاگوسیتوزی در این گونه ماهی تحت درمان با همین آنتی بیوتیک مشاهده شد، که البته معنی‌دار نبوده است (۲۶). با توجه به اطلاعات ناقص و ناسازگار تحقیقات پیشین، بر آن شدیم تا اطلاعات کامل‌تری را در مورد درصد هماتوکریت، هموگلوبین، فراوانی یاخته‌های خونی به همراه شمارش افتراقی گویچه‌های سفید ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان تحت چالش عفونی با باکتری‌های *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* تحت دوره درمانی ۱۰ روزه با دوز ۱۵ میلی‌گرم فلورفنیکل خوراکی بر کیلوگرم (وزن بدن) ارائه دهیم.

## مواد و روش کار

**ماهیان و شرایط سازگاری:** تعداد ۳۰۰ قطعه قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزن ۷/۵ ± ۵۵ گرم از مزارع پرورشی در استان فارس (شهرستان سپیدان) خریداری شده و در تانک‌های ونیرو ۵۰۰ لیتری موجود در بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز برای ۲ هفته دوره سازگاری نگهداری شدند. تعویض آب روزانه در طی این دوره به مقدار ۲۰ درصد حجم هر تانک صورت می‌گرفت و هوا دهی از طریق یک هواده مرکزی انجام می‌شد. خوراک‌دهی با پلت‌های تجاری شرکتی بایومار (دانمارک) دو بار در روز و به مقدار ۲ درصد وزن بدن آن‌ها بوده است. منبع آب یک حلقه چاه با دبی ۳-۱ لیتر در ثانیه بوده که سختی کل آن معادل ۳۴۴/۵۵ میلی‌گرم کربنات کلیسم در لیتر سنجیده شد. به علاوه، دمای آب و

اکسیژن محلول در طول دوره آزمایش به ترتیب بر روی مقادیر (۰±۵/۵)۱۶/۵ درجه سانتی‌گراد و ۵/۵۷ میلی‌گرم بر لیتر تنظیم شدند.

**طرح آزمایشی:** آزمایش در یک بلوک کاملاً تصادفی طراحی شده و دارای ۶ تیمار (با ۳ تکرار) به شرح: ۱) بدون چالش عفونی/ بدون دارودرمانی (C-/T-)، ۲) بدون چالش عفونی/ تحت دارودرمانی (C-/T+)، ۳) چالش داده شده با *L. garvieae*/ بدون دارودرمانی (*L. g* C+/T-)، ۴) چالش داده شده با *S. iniae*/ بدون دارودرمانی (*S. i* C+/T-)، ۵) چالش داده شده با *L. garvieae*/ تحت دارودرمانی (*L. g* C+/T+)، ۶) چالش داده شده با *S. iniae*/ تحت دارودرمانی (*S. i* C+/T+) بودند. چالش عفونی از طریق تزریق صفاقی (IP) نسبتی از دوزهای LD50 پاتوژن‌ها به صورت جداگانه که پیش‌تر توسط یک پایلوت مشخص شده بود، صورت گرفت. دوره درمانی در گروه‌های چالش داده شده، با استفاده از خوراک آغشته به فلورفنیکل (به مقدار ۲/۵ درصد وزن بدن و یک بار در روز) با نام تجاری آکوافلور (Aquaflor® 50%, Rooyan Darou, Iran) صورت گرفت. دوز مصرفی ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن برای ۱۰ روز متوالی تعیین شد که در دامنه مجاز FDA قرار دارد (۹).

**پاتوژن‌ها و تعیین LD50:** دوزهای مورد استفاده در چالش عفونی از طریق تعیین میانه دوز کشنده (LD50) باکتری‌ها بدست آمدند. بدین منظور، از منبع باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* که پیش‌تر از ماهیان پرورشی بیمار ارسال شده به بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز جداسازی و شناسایی شده بودند (۲،۲۹) برداشت شده و در محیط BHA به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس باکتری‌های رقیق شده در محلول PBS استریل، از طریق لام نئوبار (هموسایتومتر) زیر میکروسکوپ نوری (۴۰×) شمرده شدند و رقت‌های متوالی از $۱۰^{۲}$الی $۱۰^{۹}$ واحد تشکیل پرگنه بر میلی‌لیتر تهیه گردید (۲). تلقیح ماهیان از طریق تزریق صفاقی به حجم ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف باکتری‌ها و ۲۰۰ میکرولیتر PBS استریل (گروه شاهد) و بعد از اعمال بیهوشی به روش غوطه وری، با استفاده از غلظت ۳۰ قسمت در میلیون تریکائین متان سولفونات (MS-222) انجام شد. در طی دوره آزمایش پایلوت میزان تلفات ماهیان در ۴ روز متوالی ثبت شدند و محاسبه LD50 هر یک از پاتوژن‌ها از طریق رگرسیون پروبیت انجام شد. بر اساس نتایج این پایلوت، دوزهای تزریقی مناسب پاتوژن‌ها در آزمایش اصلی برای گروه‌های چالش داده شده با باکتری‌های لاکتوکوکوس گارویه (*L. g* C+) و استرپتوکوکوس اینیایی (*S. i* C+) معادل ۳۰ درصد میزان LD50 ۹۶ ساعته به ترتیب $۶/۸\times۱۰^{۵}$ و $۲/۸۷\times۱۰^{۷}$ واحد تشکیل پرگنه بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شدند. همچنین زمان آغاز دوره درمانی، در پی مشاهده علائم بالینی و همچنین تشخیص باکتری از کلیه ماهیان چالش داده شده، در پایان روز سوم برای تیمارهای C+/T+ مقرر گردید.

**نمونه‌برداری:** پس از پایان دوره آزمایش، ماهیان با استفاده از دوز ۱۰۰ قسمت در میلیون از ماده MS-222 بیهوش شده و خون‌گیری با استفاده از سرنگ‌های ۲ میلی‌لیتر از سیاهرگ ساقه دمی آن‌ها انجام شد. بخشی از نمونه خونی توسط لوله‌های مویینه برداشت شده که با استفاده از خمیر هماتوکریت (Labteron) ته لوله‌ها بسته شد و بلافاصله برای اندازه گیری هماتوکریت بکار رفتند. بخش عمده نمونه خونی در تیوب‌های محتوی EDTA ریخته شده و برای اندازه‌گیری سایر شاخص‌های خونی مورد استفاده قرار گرفت.

**سنجش شاخص‌های خونی:** به‌منظور اندازه‌گیری میزان هماتوکریت (PVC) لوله‌های مویینه محتوی خون به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ گرم (۳۰) با میکروهماتوکریت سانتریفیوژ شدند، سپس این شاخص با استفاده از صفحه مدرج اندازه گیری گردیده و به صورت درصد بیان گردید (۱۹). اندازه گیری هموگلوبین به روش Cyanmethemoglobin (۵) و با استفاده از یک کیت تجاری (پارس آزمون، ایران) انجام شد. به طور خلاصه، مقدار ۲۰ میکرولیتر خون دارای ضد انعقاد با ۵۰ میلی‌لیتر محلول درابکین مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در شرایطی که از برخورد نور محافظت می‌شد، قرار داده شد. در نهایت مقادیر تراکم نوری (OD) در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS (مدل ۷۰۴، شرکت Hitachi، ساخت ژاپن) خوانده شد. شمارش یاخته‌های خونی پس از تهیه گسترش خونی با بکارگیری روش هماتوسایتومتر نئوبار بر مبنای روش استاندارد آسیب شناسی درمانگاهی (۳۴) انجام شد. سایر شاخص‌های گویچه‌های سرخ نظیر هموگلوبین متوسط آن‌ها (MCH)، حجم متوسط گلبولی (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC) نیز بر اساس معادلات ارائه شده توسط Grant در سال ۲۰۱۵ بدست آمدند (۱۱):

$$MCH\ (pg) = [Hb/RBC\ (per\ million)] \times 10 \quad \text{(معادله ۱)}$$

$$MCV\ (fl) = [PVC/\ RBC\ (per\ million)] \times 10 \quad \text{(معادله ۲)}$$

$$MCHC\ (\%) = (MCH/MCV) \times 100 \quad \text{(معادله ۳)}$$

**آنالیز آماری داده‌ها:** جهت آنالیز آماری نتایج بدست آمده از سنجش پارامترهای هماتولوژیک ماهی قزل آلای رنگین کمان در پی عفونت تجربی و دارودرمانی، از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) بهره گرفته

شد. برای پی بردن به وجود اختلاف آماری بین گروه‌های آزمایشی از تجزیه واریانس استفاده شده و برای یافتن تفاوت‌های موجود بین میانگین‌های هر یک از پارامترهای خونی در تیمارها، تست تعقیبی دانکن بکار گرفته شد.

## نتایج

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین خون ماهیان در گروه‌های دریافت کننده دارو نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P<۰/۰۵$). از سوی دیگر، هیچ تفاوت آماری بین گروه‌های چالش‌داده شده با پاتوژن‌های مختلف وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). از نظر تعداد گویچه‌های سرخ مشاهده شده، مصرف خوراکی فلورفنیکل سبب شده تا میزان این شاخص نسبت به کنترل به طور معنی‌داری کمتر باشد. عفونت ناشی از عوامل استرپتوکوکوسی و لاکتوکوکوسی نیز سبب کاهش معنی‌دار تعداد این گویچه‌ها شده و یک اثر هم افزایی نیز در اثر مصرف دارو در ماهیان تحت چالش عفونی دیده شد ($P<۰/۰۵$). این در حالی است که نتایج مربوط به نسبت‌های مبتنی بر گویچه‌های سرخ حاکی از این بودند که شاخص‌های MCH و MCV در گروه‌های مصرف‌کننده آنتی بیوتیک به طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$). در مورد شاخص MCHC هیچ تفاوت آماری بین گروه‌های مختلف آزمایشی مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$) (جدول ۱).

یافته‌های مربوط به شمارش کلی و افتراقی گویچه‌های سفید نشانگر این بود که تعداد کل این گویچه‌ها به ازای یک میلی‌لیتر خون جانوران آزمایشی تحت چالش عفونی افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$). اثر سرکوبی آنتی بیوتیک در تولید یاخته‌های ایمنی در مقایسه آماری گروه‌های بیمار شده تجربی که دارودرمانی شدند با آن‌هایی که فلورفنیکل دریافت نکردند، قابل مشاهده است ($P<۰/۰۵$)، ولی در تیمارهای ماهیان سالم تفاوتی بین دریافت‌کنندگان دارو با شاهد وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). از منظر شمارش افتراقی این یاخته‌ها، این نکته قابل دریافت است که مصرف روزانه فلورفنیکل به مدت ۱۰ روز متوالی در دوز اشاره شده، توانسته سبب کاهش معنی‌دار تعداد لنفوسیت‌های خون شود ($P<۰/۰۵$). بررسی یاخته‌های نارس آن‌ها (لنفوبلاست‌ها) سبب تائید این فرضیه شده است. از سوی دیگر به نظر می‌رسد که تعداد مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سایر یاخته‌های مربوط به ایمنی ذاتی در پی دریافت دوزاژ دارویی به طور معنی‌داری افزایش یافتند ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲).

**جدول ۱.** مقادیر شاخص‌های خونی مبتنی بر گویچه‌های سرخ در قزل‌آلای رنگین کمان تحت درمان خوراکی فلورفنیکل.

| تیمار | هماتوکریت (درصد) | هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) | گویچه سرخ (۱۰^۶ در میلی‌لیتر) | MCH (پیکوگرم) | MCV (فمتولیتر) | MCHC (درصد) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C-/T- | ۳۲/۳۳±۲/۰۸ a | ۵/۹۴±۰/۵۳a | ۱/۷۰±۰/۰۶a | ۳۴/۹۹±۲/۰۸ c | ۱۹۰/۶۱±۱/۸۳ d | ۱۸/۵±۲/۷a |
| C-/T+ | ۲۷/۳۳±۱/۱۵ b | ۴/۷۳±۰/۴۷ b | ۰/۸۹±۰/۱۱ c | ۵۳/۱۳±۱/۵۰ a | ۳۰۸/۳۵±۸/۵۶ a | ۱۷/۳±۱/۲ a |
| *L. g* C+/T- | ۲۳/۳۳±۱/۵۲ c | ۴/۸۳±۰/۸۵ b | ۱/۱۰±۰/۶۶ b | ۴۳/۴۹±۵/۱۲ b | ۲۱۱/۸۰±۲/۵۸ cd | ۲۰/۸±۴/۸ a |
| *S. i* C+/T- | ۲۵/۰۰±۱/۷۳ bc | ۴/۸۰±۰/۲۱ b | ۰/۹۹±۰/۰۹ bc | ۴۸/۷۵±۵/۷۳ ab | ۲۵۳/۸۶±۳/۷۸ bc | ۱۹/۳±۱/۷ a |
| *L. g* C+/T+ | ۲۳/۳۳±۱/۱۵ c | ۳/۹۱±۰/۳۰ b | ۰/۷۳±۰/۰۶ d | ۵۳/۵۷±۵/۲۴ a | ۳۱۹/۰۸±۱۴/۷۹ a | ۱۶/۸±۱/۵ a |
| *S. i* C+/T+ | ۲۵/۰۰±۱/۰۰ bc | ۴/۰۶±۰/۱۳ b | ۰/۸۶±۰/۰۶ cd | ۴۶/۹۸±۳/۱۲ ab | ۲۸۹/۹±۱۰/۳۱ ab | ۱۶/۳±۰/۶ a |

* حروف مختلف (a، b، c و ...) در هر ستون نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی است ($P<۰/۰۵$).

**جدول ۲.** تعداد کل و افتراقی گویچه‌های سفید در قزل‌آلای رنگین کمان تحت درمان خوراکی فلورفنیکل.

| تیمار | گویچه سفید (۱۰^۳ در میلی‌لیتر) | لنفوسیت/ لنفوبلاست (درصد) | نوتروفیل (درصد) | مونوسیت (درصد) | سایر (درصد) |
|---|---|---|---|---|---|
| C-/T- | ۲/۸۱±۰/۵ c | ۷۱/۸۸±۰/۶۶ a | ۲۵/۱±۵/۴۵ c | ۲/۳۵±۰/۰۷ c | ۰/۶۱۶±۰/۱۳ b |
| C-/T+ | ۲/۸۵±۰/۴۵ c | ۵۴/۸۴±۱/۲۵ c | ۳۹/۷۷±۱۲/۳۴ a | ۴/۳۷±۰/۸ a | ۰/۹۴۲±۰/۰۶ a |
| *L. g* C+/T- | ۶/۰۰±۳/۷۷ a | ۷۱/۷۸±۱/۰۵ a | ۲۴/۴۶±۷/۰۴ c | ۳/۱۳±۰/۰۵ b | ۰/۵۹۶±۰/۰۴ b |
| *S. i* C+/T- | ۶/۳۰±۱/۵۲ a | ۶۵/۴۷±۱/۶۰ b | ۳۰/۴۳±۱۲/۱۳ b | ۳/۵۵±۰/۵۸ b | ۰/۵۰۳±۰/۰۲ b |
| *L. g* C+/T+ | ۴/۵۳±۲/۸۴ b | ۵۸/۲۳±۱/۸۰ c | ۳۵/۵۳±۱۰/۷۰ a | ۵/۱۴±۱/۴۸ a | ۱/۰۷۵±۰/۳۹ a |
| *S. i* C+/T+ | ۴/۱۱±۰/۸۸ b | ۵۷/۳۵±۰/۷۰ c | ۳۶/۸۵±۱۱/۳۵ a | ۴/۹۱±۰/۹۶ a | ۰/۸۴۵±۰/۲۵ ab |

* حروف مختلف (a، b، c و ...) در هر ستون نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی است ($P<۰/۰۵$).

## بحث

یافته‌های تحقیق مبین کاهش معنی‌دار درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین و همچنین تعداد گویچه‌های سرخ خون ماهیان در گروه‌های دریافت کننده دارو نسبت به گروه شاهد بودند. این نتایج مطابقت زیادی با یافته‌های تحقیق Badr در سال ۲۰۱۲ دارد، به طوری که شاخص‌های وابسته به گویچه‌های سرخ تیلاپیای نیل در پی مصرف فلورفنیکل کاهش یافتند (۴). اثبات شده است که مصرف کلرامفنیکل می‌تواند سبب بروز نارسایی مغز استخوان در انسان و مدل‌های جانوری گردد و خود منجر به سرکوب تولید همه یاخته‌های خونی از جمله گویچه‌های سرخ می‌شود (۳۶). همانطور که گفته شد تغییر در ساختار شیمیایی کلرامفنیکل، از این عارضه جلوگیری کرده و باعث شد مصرف فلورفنیکل در مدل‌های جانوری خطر کمتری برای آن‌ها و همچنین مصرف کننده به دنبال داشته باشد (۱۸). از سوی دیگر، با توجه به اینکه در ماهیان استخوانی جایگاه تولید یاخته‌های خونی همانند نوادگان فرگشتی خود همچون پستانداران، در مغز استخوان نبوده و عمدتاً در راس کلیه و طحال است (۳۳)، بر اساس نتایج تحقیق پیش رو، احتمالاً فلورفنیکل از طریق مکانیسم جداگانه‌ای نسبت به کلرامفنیکل سبب سرکوب تولید گویچه‌های سرخ و در نتیجه کاهش تعداد آن‌ها در خون شده است. متیل سولفانات اثر منفی بر روی رشد اریتروبلاست‌های هسته‌دار در پستانداران داشته و روند تکوینی آن‌ها را به تأخیر می‌اندازد (۳۲). اما واجد هسته بودن گویچه‌های سرخ بالغ ماهیان در خون محیطی سبب می‌شود تا تکوین اریتروبلاست ماهیان به نحوی دیگری باشد (۳۷). بنابراین ممکن است جایگزینی نیترو در ساختار شیمیایی این رده از آنتی بیوتیک‌ها (فنیکل‌ها) تغییری در اثرپذیری اریتروبلاست‌ها ایجاد نکند. همچنین به نظر می‌رسد که افزایش شاخص‌های MCH و MCV حاکی از یک مکانیسم جبرانی در جهت حفظ بقا در ماهیانی که دچار کم خونی ناشی از مصرف این آنتی بیوتیک شده‌اند، باشد.

کاهش معنی‌دار در میزان هماتوکریت و تعداد گویچه‌های سرخ خون در هنگام آلودگی با پاتوژن‌ها به ویژه در مورد لاکتوکوکوس گارویه مشاهده شد که در مطابقت با تحقیق Tavakoli و Akhlaghi در سال ۲۰۰۹ است، که پیش‌تر اثرات عفونت تجربی باکتری گرم منفی *Aeromonas hydrophila* روی شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را بررسی کرده بود (۳۵). کاهش این شاخص‌ها در اثر عفونت می‌تواند ناشی از دلایل مختلفی از جمله افزایش نفوذپذیری مویرگی و افزایش نرخ فاگوسیتوز لوکوسیت‌ها روی گویچه‌های سرخ باشد. به علاوه، القای عفونت پاتوژن‌های مورد بررسی (*S. iniae* و *L. garvieae*) به ماهیان آزمایشی سبب شد تا گویچه‌های سفید نیز به شکل کلی و نیز افتراقی افزایش معنی‌داری داشته باشند، که تحقیقات زیادی می‌توانند این یافته‌ها را پشتیبانی کنند. به طوری که بازتولید گرانولوسیت‌ها در خون به افزایش نرخ فاگوسیتوزی و کموتاکسی در استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس شده است (۱،۲۰،۲۵).

بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها بر فراوانی و عملکرد لوکوسیت‌ها اثرگذار هستند و برخی از این داروها مستقیما سبب رفع التهاب تجربی در جانوران می‌شوند. تاکنون بیشترین تحقیقات بر روی ماکرولیدها، کینولون‌ها و سایکلین‌ها انجام شده است (۲۴). یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که مصرف روزانه فلورفنیکل (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به مدت ۱۰ روز متوالی، منجر به کاهش لوکوسیت‌های خون (شمارش کلی)، لنفوسیت‌ها و لنفوبلاست‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌شود. تحقیقات نشان داده است که رفتار لنفوسیت‌ها بسته به منشأ آن‌ها می‌تواند در مواجهه با آنتی بیوتیک فلورفنیکل اثرپذیری متفاوتی داشته باشد. به‌طوری‌که لنفوسیت‌های T در خون موش‌ها دریافت‌کننده دارو افزایش یافته ولی لنفوسیت‌های تکوین یافته از سلول‌های بنیادین مغز استخوان روند کاهشی را با افزوده شدن به دوز مصرفی آنتی بیوتیک تجربه کردند (۱۲،۲۱). به نظر می‌رسد که نویا یاخته-های (Progenitor cell) لنفوسیت‌ها در مغز استخوان پستانداران و یا راس کلیه (و طحال) ماهیان استخوانی به طور غیرمستقیم تحت تاثیر بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل و داپسون قرار می‌گیرند و تولید لنفوبلاست‌ها را محدود می‌کنند، که کاهش تولید یاخته‌های بالغ را در پی دارد (۲۷).

نتایج تحقیق حاضر نشان از افزایش فراوانی مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سایر گرانولوسیت‌ها به دنبال مصرف فلورفنیکل با دوزاژ اشاره شده داشت. در مورد نوتروفیل‌ها، کاهش تعداد این سلول‌ها در پی مصرف ۱۰ روزه دوز بالاتر (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) این آنتی بیوتیک را در قزل‌آلا (۲۲) و تیلاپیا (۴) گزارش شده است که با نتایج تحقیق ما مغایرت دارد که شاید به دلیل تفاوت در دوزاژ مصرفی باشد. در واقع مطالعات اشاره شده تلویحا اثرات ضد التهابی فلورفنیکل را نشان می‌دهند به طوریکه نوتروفیل‌ها در دفاع از بدن به ویژه علیه باکتری‌ها یک عنصر حیاتی

هستند و انتشار آن‌ها همراه با دیگر میانجی‌های التهاب سبب می‌شود تا تولید اکسیدانت‌ها نظیر هیدروژن پروکساید نیز افزایش یابد (۱۶). این در حالی است که تحقیقات نشان داده بتالاکتام‌ها و تتراسیایکلین‌ها می‌توانند عوامل ایجادکننده انفجار تنفسی را در گرانولوسیت‌های چندهسته‌ای مهار کنند ولی فنیکل‌ها اینگونه نیستند. کلرامفنیکل و تیامفنیکل با افزایش فراوانی این یاخته‌های فاگوسیت کننده و تولید HOCl در آن‌ها به ارتقاء دفاع ذاتی کمک می‌کنند (۱۷). این بهبود عملکرد می‌تواند از طریق اوپسونیزاسیون بواسطه کمپلمان و یا ایمونوگلوبولین و سپس فاگوسیت شدن باکتری‌های اوپسونیزه شده منجر به تحریک انفجار تنفسی ناشی از تولید اکسیدانت‌ها شود (۱۷،۲۴). این در حالی است که سایر رده-های عوامل ضد باکتریایی نظیر ماکرولیدها و کینولون‌ها با استفاده از کاهش تولید گرانولوسیت‌ها رفع التهاب طولانی مدت را تسهیل می‌نمایند (۲۴،۲۷).

به‌عنوان نتیجه‌گیری، با توجه به افزایش فراوانی یاخته‌هایی نظیر نوتروفیل و مونوسیت، مصرف خوراکی فلورفنیکل توانسته است سبب بهبود ایمنی ذاتی به ویژه از طریق افزایش فاگوسیتوز شود. گرچه ظاهرا ایمنی اختصاصی (حاصل از لنفوسیت‌های B) قزل‌آلا به دنبال تجویز این دوزاژ از آنتی بیوتیک سرکوب می‌شود. بنابراین، یافتن و پیشنهاد یک دوزاژ بالینی که بتواند تمامی شاخص‌های ایمنی را در وضعیت بهینه نگهدارد، می‌تواند مفید و کاربردی باشد. به نظر می‌رسد که مسئله ایجاد آنمی در ماهی به دنبال مصرف فلورفنیکل کماکان وجود دارد. بنابراین توصیه می‌شود، مصرف این آنتی بیوتیک از نظر دوزاژ با دقت بیشتری انجام شده و در صورت کاهش تلفات و بهبود علائم درمانگاهی از سطوح پایین‌تر دامنه مجاز مصرفی از نظر FDA برای درمان استفاده شود. همچنین برای پیشگیری از تلفات ناشی از هیپوکسی و خفگی احتمالی تا پایان دوره درمان (۱۰ روزه)، هوادهی به طور ویژه برای تانک‌ها انجام شده و به جز زمان دارودرمانی از خوراک دهی به ماهیان در سایر زمان‌ها خودداری شود.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای محمد سعید فریدونی به پاس همکاری و همفکری ارزنده ایشان در این تحقیق قدردانی می‌شود.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References


1. Akbary, P., Mirvaghefi, A.R., Akhlagi, M., Fereidouni, M.S. (2015). Influence of Maternal and Larval Immunisation against Lactococcus garviae Infection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walaum) Lysozyme Activity and IgM Level. Open J Anim Sci, 5, 258-269. http://dx.doi.org/10.4236/ojas.2015.53030
2. Akhlaghi, M., Mahjor, A.A. (2004). Some histopathological aspects of streptococcusis cultured rainbow trout. B Eur Assoc Fish Path, 24, 132-136. https://doi.org/10.1111/jfd.12775
3. Alishahi, M., Soltani, M., Zargar, A. (2009). Bacteriological study of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) mortality in Khuzestan province. Iran Vet J, 5, 25-34. [In Persian]
4. Badr, M.O.T., Hashem, M.A., Elmandrawi, S.A. (2012). Clinicopathological studies on some antibiotics used in Nile tilapia with *Streptococcus iniae*. J Am Sci, 8, 1057-1070.
5. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood, J Fish Biol, 5, 771–781.
6. Branson, E.J. (1998). Rainbow trout fry syndrome: an update. Fish Vet J, 2, 63-66.
7. De Ocenda, V.R., Almeida-Prieto, S., Luzardo-Álvarez, A., Barja, J.L., OteroEspinar, F.J., Blanco-Méndez, J. (2016). Pharmacokinetic model of florfenicol in turbot (*Scophthalmus maximus*): establishment of optimal dosage and administration in medicated feed. J Fish Dis, 98, 12-20. https://doi.org/10.1111/jfd.12525 PMID: 27502011
8. Food & Drug Administration of the United States. (2011). Judicious use of Florfenicol and Other Antibiotics. (1st ed.) Aquaculture Drug Approval Coordination Workshop, New Hampshire, U.S.A.
9. Food & Drug Administration of the United States. (2014). FDA-Approved Drugs for Aquaculture in the USA. (5th ed.) US.FDA, Kenilworth N.J., U.S.A.
10. Fukui, H., Fujihara, Y., Kano, T. (1986). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. Fish Pathol, 22, 201-207. https://doi.org/10.3147/jsfp.22.201
11. Grant, K. R. (2015). Fish Hematology and associated disorders. Vet Clin Exot Anim, 18, 83–103.
12. Guan, S., Lu, J., Shen, X., Qian, W., Liu, J., Deng, X. (2011). Florfenicol impairs the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol, 33, 609–613. https://doi.org/10.3109/08820139.2010.551434
13. Hassanin, O., Abdallah, F., Awad, A. (2014). Effects of florfenicol on the immune responses and the interferon-inducible genes in broiler chickens under the impact of *E.coli* infection. Vet Res Commun, 38, 51-58. https://doi.org/10.1007/s11259-013-9585-7
14. Inglis, V., Richards, R.H., Varma, K., Sutherland, I.H., Brokken, E.S. (1991). Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, Parr: tolerance and assessment of efficacy against furunculosis. J Fish Dis, 14, 343-351. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00831.x

15. Khalifeh, M.S., Amawi, M.W., Abu-Basha, E.A., Bani Yonis, I. (2009). Assessment of humoral and cellularmediated immune response in chickens treated with tilmicosin, florfenicol, or enrofloxacin at the time of Newcastle disease vaccination. Poult Sci, 88, 2118-2124. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00215
16. Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., DeLeo, F.R. (2003). Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. Microb Infect, 5, 1337–44. PMID: 14613777
17. Labro, M-T. (2005). Antimicrobial agents and oxidative burst. In: Antibiotics as Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Agents. Rubin, B.K., Tamaoki, J. (eds.). Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland. p. 87-106.
18. Labro, M-T. (2012). Immunomodulatory effects of antimicrobial agents. Part I: antibacterial and antiviral agents. Expert Rev Anti Infect Ther, 10, 319–340. https://doi.org/10.1586/eri.12.11
19. Larsen, H.N., Snieszko, S.F. (1961). Modification of the microhematocrit technique with trout blood. Trans Am Fish Soc, 90, 139–142.
20. Liaghat, M., Akhlaghi, M., Hosseini, A., Nematollahi, A., Hosseini, S.M. (2011). Humoral and non-specific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally exposed to and immunized with *Streptococcus iniae*. Int J Vet Res, 5, 218-224.
21. Lis, M., Szczypka, M., Suszko, A., Świtała, M., Obmińska-Mrukowicz, B. (2011). The effects of florfenicol on lymphocyte subsets and humoral immune response in mice. Polish J Vet Sci, 14, 191-198. PMID: 21721401
22. Maklakova, M.E., Kondratieva, I.A., Mikhailova, E.S., Stupin, R.V., Khapchaev, Sh., Kasumyan, A.O. (2011). Effect of antibiotics on immunophysiological status and their taste attractiveness for rainbow trout *Parasalmo* (=*Oncorhynchus*) *mykiss* (Salmoniformes, Salmonidae). J Ichthyol, 51, 11, 1133–1142. https://doi.org/10.1134/S0032945211110063
23. Meinertz, J.R. (2011). Depletion of florfenicol amine from the fillet tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) maintained in a recirculating aquaculture system and treated with Aquaflor® medicated feed. Online J Up Mid Environ Sci Centre, 2, 13-18.
24. Parnham, M.J. (2005). Antibiotics, Inflammation and its resolution: An overview. In: Antibiotics as Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Agents. Rubin, B.K., Tamaoki, J. (eds.). Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland. p. 27-48.
25. Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. Fish Shellfish Immunol, 31, 196-201. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.005
26. Reda, R.M., Ibrahim, R.E., Ahmed, E.N.G., El-bouhy, Z.M. (2013). Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. Egypt J Aquat Res, 39, 241-248. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.001
27. Rubin, B.K. Henke, M.O., Dalhoff, A. (2005). Anti-inflammatory properties of antibiotics other than macrolides. In: Antibiotics as Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Agents. Rubin, B.K., Tamaoki, J. (eds.). Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland. p. 247-268.
28. Schering-Plough Animal Health Corp. (2005). Freedom of Information Summary, Original New Animal Drug Application, AQUAFLOR Type A Medicated Article (florfenicol), An Antibiotic, For the Control of Mortality in Catfish Due to Enteric Septicemia of Catfish Associated with *Edwardsiella ictaluri*. (3th ed.) NADA 141-246. p. 5-16.
29. Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M., Mostafavi Zadeh, S.M. (2010). Isolation and Characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Iran. Iran J Vet Res, 11, 342-350. https://doi.org/10.22099/ijvr.2010.105
30. Shiry, N., Khoshnoodifar, K., Mirvaghefi, A.R. (2014). Toxicity and impacts of Malathion on some blood indices in Caspian common carp (*Cyprinus carpio*). J Fish Sci Technol, 3, 1-11. [In Persian]
31. Shiry, N., Shomali, T., Soltanian, S., Akhlaghi, M. (2018). Comparative single-dose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) at health and experimental infection with *Streptococcus iniae* or *Lactococcus garvieae*. J Vet Pharmacol Ther, 41, 51-64. https://doi.org/10.1111/jvp.12736
32. Shu, X., Gao, Y., Linet, M., Gao, R.N., Gao, U.T., Brinton, L.A., Jin, F., FraumeniJR, J.F. (1987). Chloramphenicol use and childhood leukaemia in Shanghai. Lancet, 8565, 934–937.
33. Soltani, M. (2009). Immunology of Fish and Crustaceans (1st ed.). University of Tehran Press, Tehran, Iran. [In Persian]
34. Stopskopf, M. (1993). Clinical Pathology. In Fish Medicine. M Stopskopf, WB. (ed.). Saunders Company, Philadelphia, USA. p. 113-131.
35. Tavakoli, H., Akhlaghi, M. (2009). Study of lysozyme, immunoglobulin, blood celland hematocrit changes following experimental infection with apathogenic *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout. J Vet Res, 64, 157-162.
36. Treves-Brown, K.M. (2000). Applied Fish Pharmacology, Aquaculture Series (volume 3) (1st ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
37. Walsh, P.J., Wood, C.M., Moon, T.W. (1990). Red blood cell metabolism. In: Fish Respiration. Perry, S.F., Tufts, B. (eds.). Academic Press. San Diago, USA. p. 41-69.
38. Wang, L., Han, Y., Jin, S., Ma, Y., Wang, G., Zhao, Q., Chen, Y. (2015). Pharmacokinetic study of florfenicol in healthy and vibriosis-infected *Pseudosciaena crocea* after oral administration. J Appl Biol Chem, 58, 363−368. https://doi.org/10.3839/jabc.2015.057
39. Yanez, A.J., Valenzuela, K., Matzner, C., Olavarria, V., Figueroa, J., Avenda~no-Herrera, R., Carcamo, J.G. (2013). Broth microdilution protocol for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* to florfenicol and oxytetracycline. J Fish Dis, 12, 1-5. https://doi.org/10.1111/jfd.12144