ارزیابی تکنیک آنتی‌بادی درخشان به روش غیرمستقیم برای تشخیص ویبریو آنگوئیلاروم (Vibrio anguillarum) و آئروموناس هیدروفیلا(Aeromonas hydrophila) در کارگاههای پرورش ماهی و میگو

دکتر مهدی سلطانی[1] دکتر محمد ربّانی خوراسگانی[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۲ ، ۸۷ ـ ۷۳، (۱۳۷۸)

تکنیک آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم برای تشخیص سریع عفونتهای باکتریایی ماهی و میگو مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این مطالعه تعداد ۱۰۷ نمونه باکتریایی اکسید از مثبت به دست آمده از کارگاههای پرورش ماهی و میگو مناطق مختلف کشور مورد آزمایشهای آنتی بادی درخشان به روش غیرمستقیم (IDFAT, Indirect fluorescent antibody test) واگلوتیناسیون قرار گرفتند و در نتیجه تعداد ۲۰ نمونه باکتریایی از گونه‌های ویبریو آنگوئیلاروم (Vibrio anguillarum) (۱۱ نمونه)، و آئروموناس هایدروفیلا (Aeromonas hydrophila) (۹ نمونه) و تعداد ۶ نمونه باکتریایی دیگر به آنتی‌سرمهای ضد هر دوگونه باکتریایی مذکور واکنش مثبت نشان دادند. مطالعه خواص بیوشیمیایی ارگانیسم‌های مذکور همخوانی زیاد (بیش از ۷۰ درصد) با نتایج سرولوژیکی داشته است. از آنجایی که بسیاری از عوامل باکتریایی و ویروسی ماهی و میگو دیر رشد بوده و بعضاً نیاز به زمانهای قابل توجه برای رشد و جداسازی دارند با به کارگیری این گونه روشهای سرولوژیک می‌توان در فاصله زمانی کوتاهی نسبت به تعیین وضعیت بهداشتی کارگاهها و تشخیص به موقع این گونه عفونتها اقدام و از بروز خسارات احتمالی جلوگیری نمود.

واژه‌های‌کلیدی: آنتی بادی، ویبریو آنگوئیلاروم، آئروموناس هیدروفیلا، ماهی میگو

تشخیص به موقع و صحیح عفونتهای با اهمیت اقتصادی در کارگاههای پرورش ماهی و میگو می‌تواند کمک زیادی به امر پیشگیری و کنترل آنها و جلوگیری از بروز خسارات اقتصادی نماید. این امر به ویژه در خصوص عوامل عفونی باکتریایی و ویروسی ماهی و سخت پوستان خوراکی که دیر رشد بوده و روشهای مرسوم میکروبیولوژی برای جداسازی و شناسایی آنها مسلتزم زمان قابل توجه بوده و در برخی موارد تا چندین هفته طول می‌کشد، صادق است. در میان روشهای تشخیصی آنهایی کاربرد زیادتری دارند که از ویژگیهایی چون سرعت در انجام (زمان کوتاه)، سادگی در اجراء، حساسیت قابل قبول و ارزان بودن برخوردار باشند. تکنیک آنتی‌بادی درخشان (Fluorescent antibody test / technique ,FAT) از جمله روشهای دارای خصوصیات مذکور بوده و تاکنون توسط تعدادی از محققین برای این منظور مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است (۹، ۱۵ و ۱۶).

حتی امروزه در مورد برخی عفونتهای باکتریایی مانند بیماری باکتریایی کلیه، یرسینیوزیس و فرونکولوزیس استفاده از این روش جهت تشخیص سریع این عفونتها در برخی مناطق به صورت رایج در آمده است. با توجه به توسعه سریع و قابل توجه صنعت آبزی‌پروری در کشور به ویژه در چند سال گذشته و پیدایش برخی مشکلات ناشی از عوامل بیماریزای باکتریایی و احتمالاً ویروسی (۱، ۲، ۴، ۵، ۶، ۲۰ و ۲۱) مطالعه و به کارگیری این گونه روشهای تشخیصی سریع و آسان می‌تواند کمک قابل توجهی به اقدامات کنترلی و پیشگیری و نهایتاً جلوگیری از بروز خسارات اقتصادی نماید.

هدف از این مطالعه ارزیابی تکنیک آنتی‌بادی درخشان به روش غیر مستقیم (IDFAT) جهت تشخیص عفونتهای ویبریوزیس (ناشی از ویبریو آنگوئیلاروم) در کارگاههای پرورش میگو و سپتی سمی آئروموناسی (ناشی از آئروموناس هایدروفیلا) در کارگاههای پرورش ماهی کشور می‌باشد.

مواد و روش کار

الف. مواد:

ماهی: جهت ارزیابی اولیه میزان حدت سویه باکتریایی مورد استفاده جهت تهیه آنتی‌ژن، از کپور معمولی (میانگین وزن ۷۰۰گرم)، فیتوفاگ (میانگین وزن ۵۰ گرم)، آمور (میانگین وزن ۳۰ گرم) و قزل آلای رنگین کمان (میانگین وزن ۴۰ گرم)، استفاده گردید. کپور ماهیان از کارگاه پرورش ماهی جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی واقع در مؤسسه تحقیقاتی امین آباد و قزل آلا از کارگاه آکروماهی فیروزکوه تهیه گردیدند. ماهیان پس از انتقال به آکواریوم‌های ۲۰۰۰ لیتری گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده و حدود دو هفته سازگاری با شرایط جدید مورد استفاده قرار گرفتند.

آنتی ژن(پادگن): سویه‌هایی از آئروموناس هایدروفیلا (به دست آمده از کارگاههای پرورش ماهی کپور) و ویبریوآنگوئیلاروم (به دست آمده از کارگاههای پرورش میگو خوزستان) به عنوان آنتی ژن جهت تولید آنتی بادی مورد استفاده قرار گرفتند. این باکتریها قبلاً از ماهی / میگو بیمار در آزمایشگاه میکروبیولوژی آبزیان دانشکده جداسازی و شناسایی گردیده و جهت تأیید تشخیص با آزمایشگاه میکروبیولوژی آبزیان مؤسسه تحقیقات آبزیان دانشگاه استرلینگ نیز کنترل شده‌اند.

خرگوش: از خرگوشهای سفید خریداری شده از مؤسسه سرم سازی رازی (دو سر برای تزریق آنتی ژن‌ها و یک سر به عنوان کنترل) جهت تولید آنتی سرم استفاده شد. حیوانات مذکور پس از خریداری در بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به صورت مجزا نگهداری و تا مدتی قبل از شروع تزریق آنتی ژن از نظر وضع سلامتی و بهداشت عمومی به مدت ۱۰ روز کنترل گردیدند.

نمونه‌های باکتریایی مورد آزمایش: تعداد ۱۰۷ نمونه باکتریایی به دست آمده از کارگاههای پرورش میگو (خوزستان) و ماهیان خوزستان، چهار محال و بختیاری، گیلان، فیروز کوه و امین آباد تهران مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های باکتریایی مذکور طی مراجعات به آزمایشگاه میکروبیولوژی آبزیان دانشکده و یا در جریان نمونه برداری از کارگاههای مذکور، پس از جدا سازی، خالص سازی در مرکز ملی ژنتیک ایران لیوفیلیزه و در مواقع نیاز مورد استفاده قرار گرفتند.

۱) گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

ب. روش کار:

تهیه آنتی ژن و تولید آنتی بادی: به منظور تهیه آنتی ژن ابتدا یک آمپول لیوفیلیزه از آئروموناس هایدروفیلا را در محیط آگار مغذی در ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده، سپس کشت ثانویه در محیط آبگوشت مغذی (۵۰۰ میلی‌لیتر در ارلن یک لیتری) در در جه حرارت اتاق (۲۵ـ ۲۰ درجه سانتی‌گراد) و با استفاده از تکان دهنده (شیکر) با دور پایین به مدت ۴۸ ساعت فراهم گردید. سلولهای باکتریایی رشد یافته را سه مرتبه سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور به مدت ۲۵ دقیقه) نموده و در فواصل هر سانتریفوژ سلولها را با استفاده از محلول فسفات بافر (PBS با pH = ۷/۴) استریل شستشو داده می‌شد. پس از آخرین سانتریفوژ، سلولهای باکتریایی را در PBS رقیق نموده و با استفاده از فرمالین خالص (۳۷ درصد) به میزان ۰/۷ - ۰/۵ درصد یاخته‌ها را غیر فعال نموده، به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری نموده، سلولهای غیر فعال شده را سپس یک بار دیگر با PBS شستشو و سپس رقیق نموده تا رقتی برابر مک فارلند شماره یک (حدود ۳×۱۰^{۸} cells/ml) به دست آید. آنتی‌ژن را سپس تا زمان تزریق در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. روش تهیه آنتی ژن از ویبریو آنگوئیلاروم مشابه روش بیان شده برای آئروموناس هایدروفیلا بود با این تفاوت که جهت کشت این باکتری از محیط حاوی ۲ - ۰/۵ درصد نمک طعام استفاده می‌شد (آگار خون حاوی ۰/۵ درصد نمک و آگار مغذی و محیط آبگوشت مغذی حاوی ۲ درصد نمک).

آنتی‌ژن‌های تهیه شده را به روش بیان شده توسط Carson و همکاران (۱۹۹۲) از طریق سیاهرگ مارژینال گوش به خرگوش تزریق نموده به گونه‌ای که میزان‌های تزریقی هر یک از آنتی ژن‌ها با میزان ۰/۱ml شروع و با فواصل یک روز در میان میزان‌های تزریقی دو برابر تا روز هیجدهم که میزان تزریق به ۱ml رسید. در روز ۲۲ با انجام خونگیری آزمایشی و انجام آزمایش آگلوتیناسیون روی لام نسبت به ارزیابی میزان تیتر آنتی بادی اقدام و در همین روز میزان ۱ml دیگر از آنتی ژن‌ها تزریق و در روز ۲۴ با خونگیری مجدد وکنترل تیتر آنتی‌بادی اقدام شد. با توجه به نمایان بودن تیتر مناسب آنتی بادی در این زمان، عمل خونگیری اصلی ۶ روز بعد (روز ۳۰) انجام شد.لوله‌های حاوی خون را ابتدا در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری، آنتی سرم را جدا نموده و در تیوب‌های استریل اپندرف توزیع و تا زمان استفاده در ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری می‌شدند. همزمان از خرگوش شاهد (کنترل) نیز خونگیری و سرم به دست آمده به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش حدت:

آئروموناس هایدروفیلا: ابتدا یک آمپول لیوفیلیزه از باکتری را در کپور معمولی یک بار پاساژ داده (به ترتیب کشت باکتری در محیط جامد آگار مغذی در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت، کشت ثانویه در محیط آبگوشت مغذی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، سانتریفوژ محیط کشت باکتریایی با ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، شستشوی سلولها در PBS استریل، سانتریفوژ مجدد و شستشو در PBS و تزریق داخل صفاقی به میزان ۰/۱ml از سلولهای رقیق شده در PBS استریل به کپور بیهوش شده با MS_{222} (به میزان ۴۰ mg/lit - ۳۵ در ۲۳ درجه سانتی‌گراد) و با جداسازی مجدد آن از کلیه ماهی برای آزمایش حدت به کار گرفته شد. سلولهای باکتریایی پاساژ داده شده را در محیط آبگوشت مغذی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده، سلولها را سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) نموده، در PBS استریل شستشو داده وبا سانتریفوژ مجدد در PBS رقیق نموده و از آن برای تزریق و حمام باکتریایی استفاده شد.

در روش تزریقی، تعداد ۱۰ قطعه از هر یک از گونه‌های کپور معمولی و آمور را پس از بیهوشی به میزان ۰/۲ ml از تعلیق باکتریایی با جذب نوری ۱ در طول موج ۵۶۰ نانومتر به صورت داخل صفاقی تزریق نموده و تعداد ۱۰ قطعه از هر گونه ماهی را تنها با PBS استریل تزریق نموده (گروههای کنترل) و به طور جداگانه تا یک هفته نگهداری شدند.

در روش حمام، تعداد ۱۰۰ قطعه آمور و ۲۰ قطعه فیتوفاگ را در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت با تعلیق باکتریایی دارای جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۳۶۰ نانومتر حمام باکتریایی داده و تعداد ۴۰ قطعه آمور و ۱۰ قطعه فیتوفاگ را به عنوان گروههای کنترل به صورت جداگانه تا دو هفته نگهداری شدند. انجام آزمایشها در آکواریوم‌های ۲۰۰۰ لیتری و یا ۱۰۰ لیتری همراه با هواده و آب لوله صورت گرفته، در طول دوره آزمایش ماهیان به صورت روزانه ۴ - ۲ بار کنترل و ضمن کنترل فاکتورهای آب شامل اکسیژن، pH، درجه حرارت و تعویض روزانه ۵ درصد آب آکواریوم‌ها، نسبت به ثبت علائم بالینی اقدام واز کلیه یا کبد ماهیان در حال مرگ و یا بیمار کشت باکتریایی به عمل می‌آمد.

ویبریوآنگوئیلاروم: ارزیابی حدّت اولیه ویبریو آنگوئیلاروم به علت تلف شدن ماهیان انتقالی قزل آلا و مشکلات آب مورد نیاز جهت نگهداری ماهیان عملی نشد. با این حال این باکتری به روش بیان شده در مورد آئروموناس به صورت داخل صفاقی به تعدادی کپور معمولی تزریق گردید.

آگلوتیناسیون باکتریایی: ابتدا از نمونه‌های باکتریایی مورد آزمایش (لیوفیلیزه) در محیط‌های کشت جامد مانند ژلوز خون، آگار قلب - مغز، آگار مغذی و TSA در ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۶ ـ ۲۰ ساعت کشت داده، سپس از پرگنه‌های رشد یافته و یا کشتهای ثانویه جهت انجام آزمایشهای آگلوتیناسیون روی لام و همچنین تکنیک آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم استفاده گردید.

آزمایش آگلوتیناسیون روی لام به روش بیان شده توسط Roberson (1990) انجام گردید. به طور خلاصه در این روش ابتدا با استفاده از آنس تلقیح استریل مقداری از پرگنه‌های باکتریایی مورد آزمایش را برداشت نموده و در مقداری سرم فیزیولوژی (۰/۸۵ درصد نمک طعام) استریل به صورت تعلیق یکنواخت درآورده، سپس دو قطره از سوسپانسیون باکتریایی را در دو گوشه یک لام تمیز میکروسکوپی قرار داده و به هر کدام یک قطره (میزان مساوی) از هر یک از آنتی سرم‌های رقیق شده (به نسبت ۱ به ۵۰ در PBS استریل) و رقیق نشده اضافه نموده و لام را به آرامی تکان داده تا سلولهای باکتریایی به خوبی با آنتی سرم مخلوط شود. سپس طی حداکثر ۵ دقیقه نتایج آگلوتیناسیون را با چشم غیر مسلح مشاهده و موارد مثبت و منفی یادداشت می‌گردید. قرائت نتایج بر حسب شدت آگلوتیناسیون از ۱ + تا ۴ + صورت می‌گرفت. در موارد مشکوک نتایج با استفاده از بزرگنمایی پایین میکروسکوپ قرائت می‌گردید. به علاوه در طول آزمایش از نمونه‌های باکتریایی استاندارد (آئروموناس هایدروفیلا و ویبریو آنگوئیلاروم) و آنتی سرم‌های مربوطه به عنوان کنترل مثبت و نمونه‌های باکتریایی مذکور و سرم معمولی به عنوان کنترل منفی استفاده می‌شد.

آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم (IDFAT): اجراء این آزمایش بر اساس روش بیان شده توسط Carson و همکاران (۱۹۹۲) صورت گرفت. ابتدا از تعلیقهای باکتریایی مورد استفاده برای آزمایش آگلوتیناسیون میزان ۵۰μl در مناطق کروی لامهای تفلون‌دار قرار داده، گسترشها را در هوای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه خشک نموده، مقدار ۴۰μl از آنتی‌بادی رقیق نشده مربوطه به هر گسترش اضافه نموده، گسترشها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ دقیقه و به روش اسلاید کالچر قرار داده و سپس در ظرف حاوی PBS

استریل به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری نموده، پس از آبکشی ملایم لامها در PBS استریل و آبگیری ملایم آنها با نگهداشتن آنها به صورت مایل، سپس ۲۰μl از کونژوگه رقیق شده (به نسبت $\frac{۱}{۴۰}$ در PBS استریل) حاوی آنتی ایمونوگلوبولین ضد خرگوش (IgGگوسفندی) (FITC, Silenus) اضافه گردید. آنگاه گسترشها را به روش اسلاید کالچر به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از انتقال آنها به ظرف حاوی PBS (به مدت ۱۵ دقیقه)، آبگیری از گسترشها به روش فوق الاشاره و عمل مونته کردن آنها با استفاده از بافر گلیسرول آلکالین‌دار ($NaHCO_3$ ۰/۷۲۹g، Na_2CO_3 ۰/۰۱۶g، آب مقطر استریل ۱۰ml، گلیسرول ۹۰ml، pH = ۹) انجام شد.

مطالعه گسترشها پس از قرار دادن لامل برروی آنها با میکروسکوپ فلورسنس و بزرگنمایی ۲۰۰ ×، ۴۰۰ × و یا ۱۰۰۰ × (با استفاده از PBS مخصوص) در گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام می‌شد. نتایج حاصله بر اساس توصیه Anderson (1990) قرائت و ضمناً نمونه‌های کنترل منفی و مثبت به روش بیان شده در مورد آزمایش آگلوتیناسیون نیز در نظر گرفته شد.

به منظور صرفه جویی در میزان کونژوگه مصرفی و مقایسه اجمالی آن با رقتهای کمتر، در مورد نمونه‌های باکتریایی مثبت، از رقتهای بالاتر آنتی سرم (رقتهای $\frac{۱}{۵۰}$ و $\frac{۱}{۱۰۰}$) کونژوگه (رقتهای $\frac{۱}{۶۰}$ و $\frac{۱}{۱۰۰}$) استفاده شد.

مطالعه باکتری‌شناسی (خواص بیوشیمیایی نمونه‌های باکتریایی مورد آزمایش): از آنجایی که عمدتاً خواص بیوشیمیایی نمونه‌های باکتریایی مورد آزمایش ناشناخته بود، به منظور مقایسه نتایج سرولوژیک با خواص بیوشیمیایی و فنوتیپی، مطالعات باکتری‌شناسی نیز در خصوص نمونه‌های باکتریایی (به استثناء تعدادی از نمونه‌ها که به هر دو آنتی‌سرم واکنش مثبت نشان دادند، این نمونه‌ها در ضمن کار و به علت تراکم کار و بعضاً دیر رشد بودن از بین رفتند) که در آزمایشهای سرولوژیک به عنوان آئروموناس هایدروفیلا و ویبریو آنگوئیلاروم شناسایی شده بودند، انجام گردید (جدول ۲) (۳، ۸، ۱۴ و ۱۸).

به منظور بهبود در کیفیت نتایج آزمایشها، آزمایشهای مذکور در شرایط یکسان آزمایشگاهی همراه با به کارگیری نمونه‌های استاندارد آئروموناس هایدروفیلا و ویبریوآنگوئیلاروم انجام شد.

جدول ۱ـ نتایج آزمایش آگلوتیناسیون روی لام و آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم (IDFAT) در مورد نمونه‌های باکتریایی به دست آمده از کارگاههای پرورش ماهی و میگو (تعداد ۶ نمونه به هر دو نوع آنتی سرم واکنش مثبت نشان داده که در داده‌ها نیامده است).

نمونه باکتریایی	آنتی سرم ضد ویبریو آنگوئیلاروم		آنتی سرم ضد آئروموناس هایدروفیلا		سرم کنترل منفی	
	A	B	A	B	A	B
۰۴*	—	—	+۴	+۴	—	—
۰۱۱**	+۴	+۴	—	—	—	—
۱۰S	-	—	+۲	+۳	—	—
۰۴/۱	—	—	+۲	+۴	—	—
۵S	—	—	+۱	+۲	—	—
۱/۳۸	—	—	+۳	+۴	—	—
۱/۱۳	—	—	+۱	+۲	—	—
۰۲۳	—	—	+۳	+۳		
۱/۳۰	—	—	+۳	+۴	—	—
۱/۳۲	—	—	+۲	+۳	—	—
۰۹	—	—	+۲	+۳	—	—
۱/۹	+۱	+۲	—	—	—	—
۳S	+۳	+۳	—	—	—	—
۱S	+۳	+۳	—	—	—	—
۰۱۴	+۲	+۲	—	—	—	—
۲	+۲	+۴	—	—	—	—
۰۰۷	+۳	+۴	—	—	—	—
۰۰۸	+۴	+۴	—	—	—	—
۰۰۹	+۴	+۴	—	—	—	—
۰۰۱۰	+۴	+۴	—	—	—	—
۰۰۱۱	+۴	+۴	—	—	—	—
۰۱۱/۱	+۳	+۳	—	—	—	—

A = آگلوتیناسیون روی لام

B = آنتی بادی درخشان

* = آئروموناس هایدروفیلا (نژاد استاندارد استفاده شده برای تولید آنتی بادی)=کنترل مثبت

** = ویبریو آنگوئیلاروم (نژاد استاندارد استفاده شده برای تولید آنتی بادی) =کنترل مثبت

ـــ = عدم واکنش آگلوتیناسیون یا فلورسنس

+۱ = آگلوتیناسیون یا فلورسنس ضعیف

+۲ = آگلوتیناسیون یا فلورسنس واضح

+۳ = آگلوتیناسیون یا فلورسنس با تراکم متوسط

+۴ = آگلوتیناسیون یا فلورسنس متراکم

نتایج

آزمایش حدت: تلفات در ماهیان گروه تزریق شده با آئروموناس هایدروفیلا پس از ۲۴ ساعت و در ماهیان گروه حمام داده شده با آئروموناس هایدروفیلا پس از ۷۲ ساعت شروع و تا پایان دوره تمامی ماهیان هر گروه تلف شدند، در حالی که ماهیان گروههای کنترل به جز دو ماهی (گروه تزریقی) تلفاتی نداشتند. به طور کلی از نظر بالینی علائم خارجی و کالبدگشایی در هر دو گروه مشابه بود (البته شدت تلفات و علائم بیشتر در گروههای تزریق شده مشاهده گردید و شامل بیحالی، آمدن به سطح آب، تورم شکم، بیرون زدگی مخرج همراه با خونریزی و پرخونی اطراف مخرج، خونریزی در قاعده بالهها، سرپوش آبششی، ناحیه شکم و گاهی در حدقه چشم همراه با اگزوفتالمی و در کالبد گشایی خونریزی و پرخونی عمومی در اندامهای داخلی بویژه بافتهای خونساز کلیه و کبد و نیز در چربی احشاء، تیره شدن و آبکی شدن کلیه و لجنی شدن طحال بود. آزمایشهای کشت باکتریایی، باکتریشناسی و سرولوژیک (آگلوتیناسیون باکتریایی و IDFAT) جداسازی مجدد آئروموناس هایدروفیلا از کلیه، کبد و طحال ماهیان تلف شده و بیمار را تایید نمود. کپور معمولی تزریق شده با ویبریو آنگوئیلاروم هیچ گونه علامت بیماری تا پایان دوره آزمایش نشان نداد.

آگلوتیناسیون باکتریایی: همچنانکه نتایج آزمایش در جدول ۱ آمده است، مجموعاً تعداد ۱۱ نمونه باکتریایی به آنتی سرم ضد ویبریو آنگوئیلاروم، تعداد ۹ نمونه باکتریایی به آنتی سرم ضد آئروموناس هایدروفیلا و تعداد ۶ نمونه باکتریایی به هر دو آنتی سرم واکنش نشان دادند. سایر نمونههای باکتریایی به هیچ یک از آنتیسرمها واکنش مثبت نشان ندادند.

آنتیبادی درخشان (IDFAT): نتایج حاصل از این روش نیز تقریباً مشابه آگلوتیناسیون باکتریایی بوده، با این حال درجه تفسیر نتایج قدری با هم تفاوت دارد به طوری که معمولاً موارد مثبت در این روش بهتر و واضحتر بوده است (جدول ۱). در به کارگیری رقتهای بالاتر از آنتی سرمها (رقتهای $\frac{1}{50}$ و $\frac{1}{100}$) و کونژوگه (رقت $\frac{1}{60}$ و $\frac{1}{100}$) و نیز با کاهش زمانهای ۳۰ دقیقهای به ۱۵ دقیقه (روش انجام آزمایش) باز هم نتایج حاصله از مشابهت یکسانی برخوردار بوده است.

خواص بیوشیمیایی: نتایج مطالعات باکتریشناسی در جدول ۲ آمده است. به طور کلی مقایسه این نتایج با دادههای معتبر منتشره مربوط به گونههای ویبریو آنگوئیلاروم و آئروموناس هایدروفیلا همخوانی بسیار بالایی دارد. به علاوه به کارگیری سویههای شناخته شده این دوگونه باکتری در این مطالعه مؤید این مطلب است. به هر حال براساس این نتایج به نظر می رسد که از ۱۱ نمونه باکتریایی جنس ویبریو، تعداد ۹ نمونه آن در گونه آنگوئیلا روم قرار میگیرد و از ۹ نمونه باکتریایی جنس آئروموناس، تعداد ۶ نمونه آن به گونه هایدروفیلا تعلق دارد.

جدول ۲ـ خواص مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نمونههای باکتریایی مورد آزمایش

مشخصه	نتایج						مشخصه	نتایج					
	۱	۲	۳	۴	۵	۶		۱	۲	۳	۴	۵	۶
رنگآمیزی گرم	–	–	–	–	–	–	تولید اسید از:						
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	گلوکز	+	+	+	+	+	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	مانیتول	+	+	+	+	+	+
حرکت در ۲۲°C	+	+	+	–	–	+	اینوزیتول	–	+	–	–	–	+
اندل	–	+	+	+	+	+	سوکروز	+	+	+	+	+	+
متیل رد	–	–	–	–	–	+	سوربیتول	–	+	+	+	+	+
VP	+	–	+	+	–	+	آرابینوز	+	+	+	+	+	+
نیترات	+	–	+	+	+	+	ترهالوز	–	+	+	+	+	+
سیمون سیترات	–	+	–	–	+	–	سالیسین	–	+	+	+	+	+
SH_2	–	–	–	–	–	–	لاکتوز	–	+	+	+	+	+
اسکولین	–	–	+	+	+	+	رشد در[d]:						
O/F	+	+	+	+	+	+	۴ درجه سانتیگراد	–	–	+	+	+	+
هیدرولیز:							۲۲ درجه سانتیگراد	+	+	+	+	+	+
ژلاتین	+	+	+	+	+	+	۳۷ درجه سانتیگراد	–/+	–/+	+/–	–	–	+
اوره	–	–	–	–	–	–	۴۲ درجه سانتیگراد	–	–	–	–	–	–
دکربوکسیلاسیون:							رشد در (%NaCl)[d]:						
لیزین	+	–	–	–	–	+	٪۰	–	–	+	–	+	+
آرژنین	–	+	+	+	+	–	٪۱	+	+	–	–	–	–
ONPG	+	+	+	+	+	–	٪۲	+	+	–	–	–	–
TST	AA	AA	AA	AA	AA	–	٪۴	–/+	+/–	–	–	–	–
ویبریوستاتیک ۰/۱۲۹	+ba	+c	–	–	–	–	٪۶	–	–	–	–	–	–
همولیز (خون گوسفند)	α	β	α	β	α	–	٪۸	–	–	–	–	–	–

۱ـ ویبریو آنگوئیلاروم (۸ نمونه)
۲ـ ویبریو کلرا (۳ نمونه)
۳ـ آئروموناس هایدروفیلا (۶ نمونه)
۴ـ آئروموناس سالمونیسیدا (۱ نمونه)
۵ـ آئروموناس سالمونیسیدا (۱ نمونه)
۶ـ آئروموناس کاویا (۱ نمونه)

a - ازدیسکهای حاوی ۱۵۰ میکروگرم ویبریوستاتیک استفاده گردید (Sigma):
b - قطر ممانعت کنندگی = ۲۲mm
c - قطر ممانعت کنندگی = ۲۰mm
d - نتایج رشد باکتریها در درجه حرارتهای مختلف و درصد شوریهای مختلف پس از ۴۸ ساعت قرائت گردید.

بحث

تکنیک آنتی بادی درخشان به عنوان یک روش سریع و مؤثر برای تشخیص عفونتهای باکتریایی و ویروسی در گونه‌های ماهیان دریایی و آب شیرین گزارش شده است.

Kawahara و همکاران (۱۹۸۶) گزارش کردند که FAT برای تشخیص تعداد خیلی کم از عوامل بیماریزای باکتریایی که توسط سایر عوامل بیماریزای غالب، رشد شان متوقف می‌شود، یک روش کاملاً مناسب، سریع و حساس است. Baxa و همکاران (۱۹۸۸) در مطالعه خود متوجه شدند که استفاده از این روش برای تعیین فلکسی باکتر مریتیموس (Flexibacter maritimus) در مقایسه با روشهای مرسوم باکتری‌شناسی (کشت وجداسازی) از حساسیت کاملاً بیشتری برخوردار است. به علاوه Carson و همکاران (۱۹۹۲) طی مطالعه‌ای نشان دادند که به کارگیری آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم برای تشخیص عفونت مذکور در مقایسه با روش کشت و جداسازی حتی با به کارگیری محیط‌های اختصاصی مورد نیاز به مراتب از حساسیت بالاتری برخوردار است. همچنین در مطالعه‌ای توسط Lorenzen (1992) و Karas نشان داده شد که این روش برای تشخیص سریع عامل باکتریایی (فلکسی باکتر سایکروفیلوس F. Psychrophilus) سندرم تلفات نوزادان قزل آلا کاملاً مفید و حساس است.

با به کارگیری همین روش و آنتی بادی مونوکلنال توسط Chen (1996) و Hanna نشان داده شد که بعضی گونه‌های ویبریو از جمله ویبریو آنگوئیلاروم، ویبریو پاراهمولیتیکوس (V. parahaemolyticus) و ویبریو آلجینولیتیکوس (V. alginolyticus) بخوبی به بافتهای میگو (آبشش، روده وعضلات) چسبیده و قابل تعیین هستند. در همین مطالعه نامبردگان پیشنهاد دادند که احتمالاً بیشترین مشکل ناشی از ویبریوزیس در میگوهای پرورشی گونه‌های باکتریایی مذکور است.

در مطالعه حاضر به کارگیری آنتی بادی‌های ضد ویبریو آنگوئیلاروم و آئروموناس هایدروفیلا، از تعداد ۱۰۷ نمونه باکتریایی مورد استفاده، تنها تعداد ۲۶ نمونه آن در این دو جنس باکتریایی (ویبریو و آئروموناس) قرار گرفتند. به علاوه مقایسه خواص بیوشیمیایی این ارگانیسم‌ها با آزمایشهای سرولوژیک همخوانی بالایی (بالای ۷۰ درصد) را نشان می‌دهد. به هر حال یکی از معایب مترتب به روش آنتی‌بادی درخشان و سایر روشهای تشخیصی ایمونولوژیکی بروز واکنشهای متقاطع است. همچنانکه در این مطالعه تعدادی (۶ نمونه) از نژادهای باکتریایی مورد آزمایش به آنتی سرم‌های ضد هر دو گونه باکتریایی واکنش مثبت نشان دادند. با این حال این گونه معایب را می‌توان با بهبود روشهای آزمایشی، مثلاً استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلنال ویژه گونه، تا حد زیادی مرتفع نمود. استفاده از این گونه روشهای تشخیص سریع به ویژه در خصوص مراحل اولیه بروز عفونتهای باکتریایی ماهی می‌تواند کار آمد باشد زیرا این عفونتها در فاصله زمانی کوتاهی پس از ایجاد با سایر عوامل و عفونتهای ثانویه مخلوط شده به طوری که تشخیص عامل اولیه و آغازگر با روشهای مرسوم باکتری‌شناسی (کشت و جداسازی) در اکثر مواقع ناموفق و یا گمراه کننده خواهد بود. به علاوه تعداد زیادی از عوامل میکروبی ماهیان و سایر آبزیان دارای اهمیت اقتصادی، دیر رشد بوده و لذا تشخیص عفونتهای ناشی از آنها مستلزم استفاده از روشهای آسان، قابل دسترس و نسبتاً حساس می‌باشد. به طوری که امروزه از تکنیک آنتی بادی درخشان برای تشخیص فرونکولوزیس، بیماری باکتریایی کلیه و یریسینیوزیس به صورت رایج در مناطق مبتلا به استفاده می‌شود (۷).

مطالعات بعدی نیاز است تا ضمن شناسایی دقیق‌تر عوامل باکتریایی به دست آمده از کارگاههای ماهیان و میگوهای بیمار کشور، نسبت به شناسایی سایر عوامل احتمالی بیماریزا و ارزیابی میزان بیماریزایی آنها اقدام شود.

تشکر و قدردانی

مؤلفین لازم می‌دانند تا از زحمات آقای دکتر علیرضا رفیعی‌پور، شبکه دامپزشکی زاهدان، جناب آقای دکتر سید سعید میرزرگر، گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، جناب آقای دکتر صادق رهبری، جناب آقای دکتر سید حسین حسینی، جناب آقای دکتر حمید رضا حداد زاده، گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بخاطر همکاری در استفاده از میکروسکوپ فلورسنس، تهیه ماهی و حیوانات آزمایشگاهی (خرگوش) مورد نیاز، آقای مهندس انوشیروان محمدی، کارگاه آکروماهی بخاطر در اختیار گذاشتن ماهیان مورد نیاز، آقای هادی باقری، تکنسین بخش میکروبیولوژی آبزیان دانشکده، جناب آقای مجید یوسفی، واحد سمعی و بصری دانشکده، آقای سید عباس چهره آزاد، بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی و همکاری بخش بافت‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بخاطر تهیه عکس‌های مورد نیاز فلورسنس تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

۱. اسماعیلی، ف.، پیغان، ر. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسم‌های شبیه به آئروموناس‌های متحرک، مجله علمی شیلات، شماره ۲، صفحه: ۸ - ۱، (۱۳۷۶).

۲. پیغان، ر.، اسماعیلی، ف. مطالعه مقدماتی جراحات پوستی ماهی هامور نگهداری شده در قفسهای شناور. مجله علمی شیلات، شماره ۲، صفحهٔ ۴۲ - ۳۷، (۱۳۷۵).

۳. سلطانی، م. بیماریهای باکتریایی ماهی، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری مؤسسه نشر جهاددانشگاهی دانشگاه تهران، (۱۳۷۵).

۴. سلطانی، م.، رستمی، م. عفونت ناشی از ارگانیسهای شبیه فلکسی باکتر سایتوفاگا در کارگاههای پرورش قزل آلای رنگین کمان، مجله دانشکده دامپزشکی دوره ۵۲ (۲)، (۱۳۷۵).

۵. کارگر مؤخر، روحانی، پیغان، ر.، جهانشاهی، ع.ا. جداسازی یک رئوویروس از ماهیان علفخوار در استان خوزستان، پژوهش و سازندگی ۳۳، صفحه ۱۰۵-۱۰۴، (۱۳۷۵).

۶. فدایی فرد، ف. بررسی بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی در کارگاههای پرورش قزل آلای رنگین کمان در استان چهار محال بختیاری، پایان نامه دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحه ۹۲، (۱۳۷۶)

7 . Anderson, D.P. Fluorescent antibody test. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Muiswinkel, W.B., (eds). Techniques in Fish Immunology 1, SOS Pub., PP: 1-8, (1990).

8 . Austin, D. and Austin, B., Bacterial Fish Pathogens: Diseases in farmed and wildfish. Ellis Horwood, Chichester pp: 227-252, 359-373, (1993).

9 . Baxa, D.V., Kawai, K. and Kusuda, R., Detection of Flexibacter maritimus by fluorescent antiboody technique in experimentally infected black sea bream fry. Fish Pathology. 23(1): 29-32, (1988).

10 . Bullock, G.L. and Stuckey, H.M., Fluorescent antibody identification and detection of the corynebacterium causing kidney disease of salmonids. J. Fish Res. Board. Can. 32: 2224-2227, (1975).

11 . Carson, J., McCosh, P. and Schmidtke, L. Pathogenicity of flexibacter maritimus in rainbow trout. In: Proceedings of SALTAS Research and Development Review Pub. by SALTAS, P/L. Hobart, Tasmania, pp: 89-99, (1992).

12 . Chen, D. and Hanna, P.J. Immunodetection of specific Vibrio bacteria attaching to tissues of the gaint tiger prawn (Penaeus monodon). Diseases of Aquatic Organisms. 20: 159-162,(1994).

13 . Cipriano, R.C., Starliper, C.E., and Schacte, J.H. Comparative sensitivites of diagnostic procedures uesd to detect bacterial kidney disease in salmoid fishes. Journal of Wildlife Diseases, 21: 144-148, (1985).

14 . Frerichs, G.N. Manual for the isolation and identification of bacterial fish pathogens. Pisces Press, Stirling. pp: 60, (1993).

15 . Kawahara, E., Nelson, J.S. and Kusuda, R. Fluorescent antibody technique compared to standard media culture for detection of pathogenic bacteria for yellow tail and amberjack. Fish Pathology. 21(1): 39-45, (1986).

16 . Lapatra, S.E., Roberti, K.A., Rohovec, T.S. and Fryer, T.L. Fluorescent antibody test for rapid diagnosis of infectious haematopoietic necrosis. Journal Aquatic Animal Health. 1: 29-36, (1989).

17 . Lorenzen, E. and Karas, N. Detection of Flexibacter psychrophilus by immunofluorescence in fish suffering from fry mortality syndrome: A rapid diagnostic method. Diseases of Aquatic Organisms, 13: 231-234, (1992).

18 . Reade, E., Microbiological Techniques. School of Microbiology. University of Melbourne, Australia, pp: 250, (1991)

19 . Roberson , B.S. Bacterial agglutination. In : Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson , D.P., Roberson, B.S. and Muiswinkel, W.B. (eds). Techniques in Fish Immunology 2, SOS Pub. pp: 81-86, (1990).

20 . Soltani, M. and Rostami, M. First report of flexibacteriosis like infection in farmed rainbow trout in Iran. Eighth Int. Conf. On Diseases of Fish and Shell fish. Edinburgh, Scotland, Book of Abstracts, pp:110, (1997).

21 . Soltani, M., Mirzargar, S.S. and Ebrahimzadeh Moosavi, H.A. Occurrence of a motile Aeromonas septicacemia in the imported ornamental fish, Oscar (Astronotus ocellatus): Isolation, characterization and pathogenicity. Eiohth Int. Conf, on Diseases of Fish and Shellfish. Edinburgh, Scottland. Book of Abstracts. pp:46, (1997).

22 . Toranzo, A.E., Baya, A.M., Roberson, B.S., Barja, J.L., Gyihes, D.G. and Hetrick, F.M, Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogenes. Aquaculture, 61:81-97, (1987).

Evaluation of indirect immunofluorescent antibody technique for detection of Vibrio anguillarum and Aeromonas hydrophila infections in cultured fish and prawn.

Soltani M.[1], Rabani Khorasgani M.[2]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.* [2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

Indirect immunofluorescent antibody technique (IDFAT) as a rapid tool has been evaluated to detect bacterial infections in farmed fish and prawns. Using this method 107 oxidase positive bacterial isolated obtained from different fish and prawn farmings, were studied from which 20 isolates were identified as Vibrio anguillarum and Aeromonas hydrophila using polyclonal antibodies against these bacterial species. The verification of these results was also demonstrated by studing biochemical/phenotypical characteristics of the bacterial isolates resulting in a high accuracy of IDFAT method (> 70%).

Key words: Antibody, Vibrio anguillarum, Aeromonas hydrophila, Fish, Prawn