ایمنی‌زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی

دکتر مصطفی اخلاقی[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه‌تهران، دوره ۵۵، شماره ۱، ۶۲-۵۷، (۱۳۷۹)

به منظور بررسی ایمنی زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا، عامل سپتی سمی هموراژیک در ماهیان کپور استان فارس و تعیین پاسخ ایمنی هومورال ماهی کپور معمولی سه نوع آنتی‌ژن مختلف از این باکتری تهیه شد که شامل باکتری غیرفعال شده با فرمالین (یک درصد) و حرارت دیده (۶۰ درجه به‌مدت ۴ ساعت) و باکتری زنده بود. ۴۵ ماهی کپور معمولی در ۹گروه ۵ تایی به سه روش متفاوت خوراکی با دوز 10^9 سلول /میلی‌لیتر /ماهی، غوطه‌ور سازی با دوز 10^7 سلول /میلی‌لیتر /ماهی و تزریق داخل صفاقی با دوز 10^5 سلول /میلی‌لیتر /ماهی در روزهای صفر و ۲۰ آزمایش در معرض آنتی‌ژنها قرار گرفتند. برای گروه کنترل ۱۵ ماهی در ۳گروه مذکور از بافر فسفات سیلین استفاده گردید. در روزهای ۴۵ و ۶۰ پس از ایمن سازی از سیاهرگ دمی ماهی، خون جمع‌آوری و سرم آن جهت آزمایشهای ایمنی‌شناسی مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین پاسخ ایمنی هومورال به آنتی‌ژنها از آزمایش حساس و دقیق الیزا استفاده گردید. نتایج آزمایش که توسط آزمایش الیزا صورت گرفت نشان داد که باکتری کشته شده با فرمالین دارای نتایج بهتری است و روش خوراکی تجویز آنتی‌ژن نسبت به سایر روشهای تجویز دارای اثرات بهتری می‌باشد. همچنین تیتر آنتی‌بادی تا روز ۶۰ پس از تجویز آنتی‌ژن روند افزایشی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ایمنی‌زایی، آئروموناس هیدروفیلا، کپور ماهی، الایزا.

یکی از باکتریهای مهم در صنعت پرورش ماهیان گرم آبی، باکتری آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. این میکرب به عنوان یک پاتوژن برای بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیهای آب شیرین وگاهی ماهیهای آب شور محسوب می‌شود (Austin and Austin, 1993). باکتری آئروموناس هیدروفیلا در کپور، مار ماهی، شیرماهی، گربه‌ماهی کانال، تیلاپیا و آیو باعث ایجاد بیماری می‌شود و بیماری حاصل از این باکتری در سراسر دنیا گسترش دارد(Stevenson, 1989). اما عفونتهای ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در پرورش کپور ماهیان از اهمیت زیادی برخوردار است (Jeny and Jeny, 1995). بعضی از محققین معتقدند که آئروموناس هیدروفیلا یک پاتوژن فرصت طلب است که باعث سپتی سمی هموراژیک در ماهی می‌شود و به عنوان یک ارگانیسم همه جایی و نامتجانس می‌باشد که باعث ایجاد بیماری در شرایط استرس زا و یا در ارتباط با عفونت سایر پاتوژن‌ها می‌شود (Amin et al, 1985). در حالی که گروهی دیگر معتقدند که آئروموناس هیدروفیلا یک پاتوژن اولیه است (Austin and Austin, 1993). تحقیقات انجام شده در این زمینه در ایران آئروموناس هیدروفیلا را به‌عنوان عامل بیماریزای کپور ماهیان پرورشی (رضویلر و همکاران، ۱۳۶۰)، به‌صورت عامل ثانویه یا اولیه در مرگ و میر ماهی آمور در استان خوزستان (پیغان و همکاران، ۱۳۷۳)، و باکتریهای شبیه آئروموناس‌های متحرک از کلیه، کبد و بافت آبششی ماهیان با علایم سپتی سمی هموراژیک که حدس زده می‌شود موجب بروز برخی تلفات در کارگاههای پرورش امور باشند (اسماعیلی و پیغان، ۱۳۷۶). باکتری آئروموناس هیدروفیلا از کپور معمولی پرورش داده شده در فارس جدا گردیده و مورد تائید قرار گرفته است (اخلاقی، ۱۳۷۷) به منظور کنترل و پیشگیری بیماری سپتی‌سمی هموراژیک امروزه توجه زیادی روی ساخت واکسن معطوف شده است ولی تا کنون هیچ واکسنی به‌صورت تجارتی در دسترس نیست (Austin and Austian, 1993). در تحقیقات انجام شده توسط بابا و همکاران، (۱۹۸۸) آنتی‌بادی علیه لیپوپلی‌ساکارید ناخالص آئروموناس هیدروفیلا به‌صورت حمام و تزریق و با استفاده از آزمایشهای رسوبی در سرم ماهی کپور نشان داده نشد. لیکن لامرز و همکاران (۱۹۸۵) با روش حمام و تکرار آن پس از یک ماه و همچنین تزریق ماهیان حمام داده شده در آنتی‌ژن کشته شده با حرارت افزایش تیتر آنتی‌بادی در سرم را گزارش نمودند. لامرز و دی‌هاس (۱۹۸۳) نتیجه گرفتند که واکسن غیرفعال شده با حرارت (۶۰ درجه یک ساعت) دارای نتایج بهتری با واکسن غیرفعال شده با فرمالین ۰/۳ درصد می‌باشد. آنها مشابه چنین نتایجی را در سال ۱۹۸۶ هم گزارش کردند. ولی لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) نتیجه گرفتند که بالاترین تیتر به‌دست آمده ناشی از واکسن فرمالینه می‌باشد و واکسن حرارت دیده دارای پایین‌ترین تیتر می‌باشد. آنها در مطالعه دیگری (۱۹۹۶) نتیجه گرفتند که سرم ماهیهای ایمن شده باعث آگلوتیناسیون باکتری آئروموناس هیدروفیلا فرمالینه و زنده می‌شود. در حالی که سلول آئروموناس هیدروفیلای کشته شده با حرارت و یا فاقد لیپوپلی‌ساکارید دارای واکنش ضعیف آگلوتیناسیون می‌باشد.

در تحقیق جاری، روش غیرفعال سازی برای تهیه واکسن کشته شده توسط فرمالین و توسط حرارت و همچنین سلول زنده باکتری و سه روش تجویز واکسن خوراکی، غوطه‌ور سازی و تزریقی در برانگیختن پاسخ ایمنی هومورال به‌کار گرفته شد و با استفاده از آزمایش الیزا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش کار

ماهی: در این تحقیق از ۷۵ ماهی کپور معمولی که از کارگاه کپور مرودشت تهیه شده بود، استفاده گردید. ماهیها پس از صید، در درون ۴ آکواریم ۱۲۰ لیتری نگهدارش شدند. تعویض آب آکواریمها، غذادهی به ماهیها و ثبت درجه حرارت و اکسیژن آب آکواریمها روزانه انجام می‌شد. ماهیها به ۴گروه و در هر گروه نیز به ۳گروه کوچکتر تقسیم شدند (جمعاً ۱۲گروه) جداسازی ماهیها با استفاده از یک سری تقسیمهایی انجام شد که این تقسیم در درون هر آکواریم قرار می‌گرفت و هر آکواریم را به سه قسمت، تقسیم می‌کرد (جدول ۱).

باکتری: باکتری مورد استفاده در این تحقیق، باکتری آئروموناس هیدروفیلای جدا شده از کپور ماهیان بیمار در استان فارس بود که به تأیید آزمایشگاه میکروبیولوژی ماهی دانمارک رسیده بود.

تهیه آنتی‌ژن از باکتری: آنتی‌ژن فرمالینه: به منظور جداکردن از محیط کشت ((Brain heart infusion agar(BHI))، توده باکتری برداشته شده از محیط کشت و رقیق شده در ((Phosphate-buffered saline (PBS)) با دوز ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شد و رسوب باقیمانده دوبار با PBS شستشو می‌شد و بعد از آن عمل شمارش باکتریها با استفاده از هموسیتومتر انجام می‌شد. فرمالین به میزان ۰/۳ درصد حجم به محلول حاوی باکتری اضافه شده و ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده می‌شد. پس از آن یک بار دیگر هم عمل

۱) گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز ، شیراز - ایران.

جدول ۱ - گروه‌بندی ماهیها در طول آزمایش

شمارهٔ آکواریمها	نوع آنتی‌ژن دریافتی	روش تجویز واکسن	تعداد ماهیها در روز شروع آزمایش	تعداد ماهیها زمان تجویز یادآور	تعداد ماهیها در زمان خون‌گیری اول	تعداد ماهیها در زمان خون‌گیری دوم (پایان آزمایش)
آکواریم شماره ۱	دریافت‌کننده سلول باکتری کشته‌شده با فرمالین (۱ درصد)	FO خوراکی 10^9 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۵	۵
		FM غوطه‌ورسازی 10^7 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۴**	۴
		FN تزریقی 10^5 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۵	۵
آکواریم شماره ۲	دریافت‌کننده سلول باکتری کشته‌شده باحرارت (۲ ساعت / ۶۰°C)	HO خوراکی 10^9 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۴***	۴
		HM غوطه‌ورسازی 10^7 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۳**	۳
		HN تزریقی 10^5 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۴***	۴
آکواریم شماره ۳	دریافت‌کننده سلول باکتری به‌صورت زنده	LO خوراکی 10^9 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۵	۵
		LM غوطه‌ورسازی 10^7 سلول/میلی‌لیتر	۵	۵	۵	۴*
		LN تزریقی 10^5 سلول/میلی‌لیتر	۵	۴*	۴	۴
آکواریم شماره ۴	دریافت کنندهٔ PBS (کنترل)	خوراکی	۵	۵	۴***	۴
		غوطه‌ورسازی	۵	۵	۴***	۴
		تزریقی	۵	۵	۵	۵
تعداد کل ماهی			۶۰	۵۹	۵۲	۵۱

۱ - دوزها به ازای هر ماهی می‌باشد، * با نشان دادن علایم سپتی سمی هموراژیک تلف شد، ** قطع هوا، *** مرگ بدون پی‌بردن به علت خاص.

شستشو انجام می‌شد و رسوب حاصله در مقدار کافی PBS حل می‌شد و تا زمان استفاده در یخچال ۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد.

آنتی‌ژن حرارت دیده: محلول حاوی باکتری پس از شمارش توسط هموسیتومتر در درون حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار می‌گرفت و پس از آن محلول حاوی باکتری تا زمان استفاده در یخچال نگهداری می‌شد.

آنتی‌ژن باکتری زنده: محلول باکتری از کشت تازه پس از شمارش تا زمان استفاده در یخچال نگهداری می‌شد.

آزمایشهای ایمنی‌زایی: ماهیها در روزهای ۰ و ۲۰ در معرض آنتی‌ژنهای فوق قرار گرفتند. آنتی‌ژنها به‌صورت خوراکی، غوطه‌ور سازی، تزریقی در اختیار ماهیها قرار گرفتند. در روش خوراکی یک محلول حاوی 10^9 سلول/میلی‌لیتر تهیه شده و با استفاده از سرنگهای انسولینی به ماهی خورانده می‌شد. در روش غوطه‌ور سازی یک محلول حاوی 10^{10} سلول/میلی‌لیتر تهیه شده و در آکواریوم دیگری به نحوی ریخته شد تا غلظت نهایی 10^7 سلول/میلی‌لیتر به‌دست آید. ماهیها در این محلول به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور و پس از شستشو در آب تازه به آکواریوم خود برگردانیده شدند. در روش تزریقی محلول حاوی 10^5 سلول/میلی‌لیتر تهیه شده و به هر ماهی در محوطه صفاقی آن بین باله شکمی و باله سینه‌ای تزریق می‌شد. پس در روزهای ۴۵ و ۶۰ از محل سیاهرگ دمی ماهیها خون جمع‌آوری و سرم آن جداگردید و تا زمان انجام آزمایشات ایمنی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج ایمنوگلوبولین‌ها از سرم ماهی: بدین منظور از محلول سولفات آمونیم اشباع استفاده شد پس از ۲۴ ساعت در یخچال سانتریفوژ شده و رسوب در حجم اولیه سرم در مقابل PBS دیالیز شد و سپس توسط ستون کروماتوگرافی سفادکس G-200 وارد شد و پس از خروج در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه آنتی‌بادی خرگوش ضد ایمنوگلوبولین‌های ماهی: با تزریق داخل عضلانی ایمنوگلبولین‌های ماهی در ۳ هفته متوالی با آدجوانت کامل فروندز و سپس با آدجوانت غیر کامل فروندز و پس از ۵ هفته خونگیری از قلب خرگوش و جدا نمودن سرم و سپس استخراج با استفاده از سولفات آمونیوم اشباع (روش فوق‌الذکر) و نگهداری در یخچال تا زمان استفاده، آنتی بادی خرگوش ضد ایمنوگلوبولین‌های ماهی تهیه شد.

آزمایش الیزا: الیزای مورد استفاده در این تحقیق، الیزای غیرمستقیم بود (Akhlaghi et al. 1996). به‌طور خلاصه، آنتی‌ژن استفاده شده در این آزمایش باکتری آئروموناس هیدروفیلای کشته شده با فنل (۵ در هزار) بود که تعداد سلول

کشته شده در هر میلی‌لیتر آن $۱۰^۹ \times ۵/۸$ بود و به‌وسیله بافر پوشاننده کربنات - بیکربنات ۰/۵ مولار pH = ۹/۶ با رقت ۱/۱۵۰۰ درخواست قرار می‌گرفت و پس از یک شب انکوباسیون در ۲۴ درجه سانتی‌گراد عمل شستشو با بافر PBS + ۰/۰۵ درصد توئین انجام می‌شد و پس از آن سرم ماهی با رقت ۱/۱۰ که در بافر رقیق کننده PBS + ۰/۰۵ توئین + ۳ درصد BSA بود در حفره‌ها ریخته می‌شد و پس از ۱/۵ ساعت انکوباسیون و شستشو به ترتیب آنتی‌بادی خرگوش ضد ماهی با رقت ۱/۱۰۰ و آنتی سرم کونژوگه خوک ضد خرگوش متصل به Horse radish peroxidase (شرکت Dako) به حفرات اضافه می‌شد. در نهایت پس از اضافه کردن محلول سوبسترای حاوی (ABTS) 2, 2'- azino - bis diammonium salt به حفرات و انکوباسیون در تاریکی به مدت ۰/۵ ساعت نتایج با استفاده از طول موج ۴۵۰ نانومتری در دستگاه خواننده پلیت الیزا به نحوی که جذب نوری سرمهای کنترل در هر بار آزمایش معادل صفر قرار داده شدند، قرائت شد.

تجزیه و تحلیل آماری: میزان جذب نوری به‌دست آمده از گروه‌های مختلف ماهیهای ایمن شده که هر کدام در دو زمان متفاوت، زمان الف و زمان ب به‌دست آمده بود با استفاده از آزمون فریدمن (Friedman) بر روی نرم‌افزار statistic3.1 منتقل و تجزیه و تحلیل آماری بر روی آنها صورت گرفت. در این روش مقادیر شاخص فریدمن و p براساس مجذور کای تعیین و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج حاصله از میانگین جذب نوری در آزمایش الیزا در گروه‌های مختلف به‌تفکیک برای نمونه‌های روزهای ۴۵ و ۶۰ در جداول ۲ و ۳ مشخص شده و پس از تجزیه آماری به درجه فریدمن تبدیل و در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند.

جدول ۲ و ۳ میانگین جذب نوری در آزمایش الیزا بر روی سرمهای ماهیهای ایمن شده به ترتیب ۴۵ روزه و ۶۰ روز پس از ایمن سازی را نشان می‌دهد.

جدول ۲ - میانگین جذب نوری در سری الف و ب۴۵ روز پس از ایمن سازی

گروه‌های مختلف	سری الف	سری ب	میانگین الف + ب
F.M.	۰/۹۹۸	۰/۹۵۸	۰/۹۲۸
F.N.	۰/۹۶۶	۰/۹۱	۰/۹۷۳
F.O.	۰/۹۶۸	۰/۹۸	۰/۹۲۶۲
H.M.	۰/۹۵	۰/۶۲۲۵	۰/۸۷۶۸
H.N.	۰/۹۶۲	۰/۹۲۲	۰/۹۳۵
H.O	۰/۹۹۸	۰/۹۰۶	۰/۹۲۶
L.N.	۱/۰۰	۰/۹۴۵	۰/۹۰۴۲
L.M.	۰/۹۴۴	۰/۸۶	۰/۸۴۹
L.O.	۱۰/۸۴	۰/۹۶۲	۰/۹۲
میانگین کلی	۰/۹۸۳۵	۰/۹۱۵۲	۰/۹۴۹۲

F.M. = آنتی‌ژن سلول کشته شده فرمالینه به‌روش غوطه‌ور سازی، F.N. = آنتی‌ژن سلول کشته فرمالینه به‌روش تزریقی، F.O. = آنتی‌ژن سلول کشته فرمالینه به روش خوراکی، H.M. = آنتی‌ژن = سلول کشته یا حرارت به‌روش غوطه‌ور سازی، H.N. = آنتی‌ژن سلول کشته به‌وسیله حرارت = به‌روش تزریقی، H.O. = آنتی‌ژن سلول کشته شده به‌وسیله حرارت به‌روش خوراکی، L.N. سلول زنده آنتی‌ژن به‌روش تزریقی، آنتی‌ژن L.M. = آنتی‌ژن سلول زنده به‌روش غوطه‌ور سازی، L.O. سلول زنده به‌روش خوراکی.

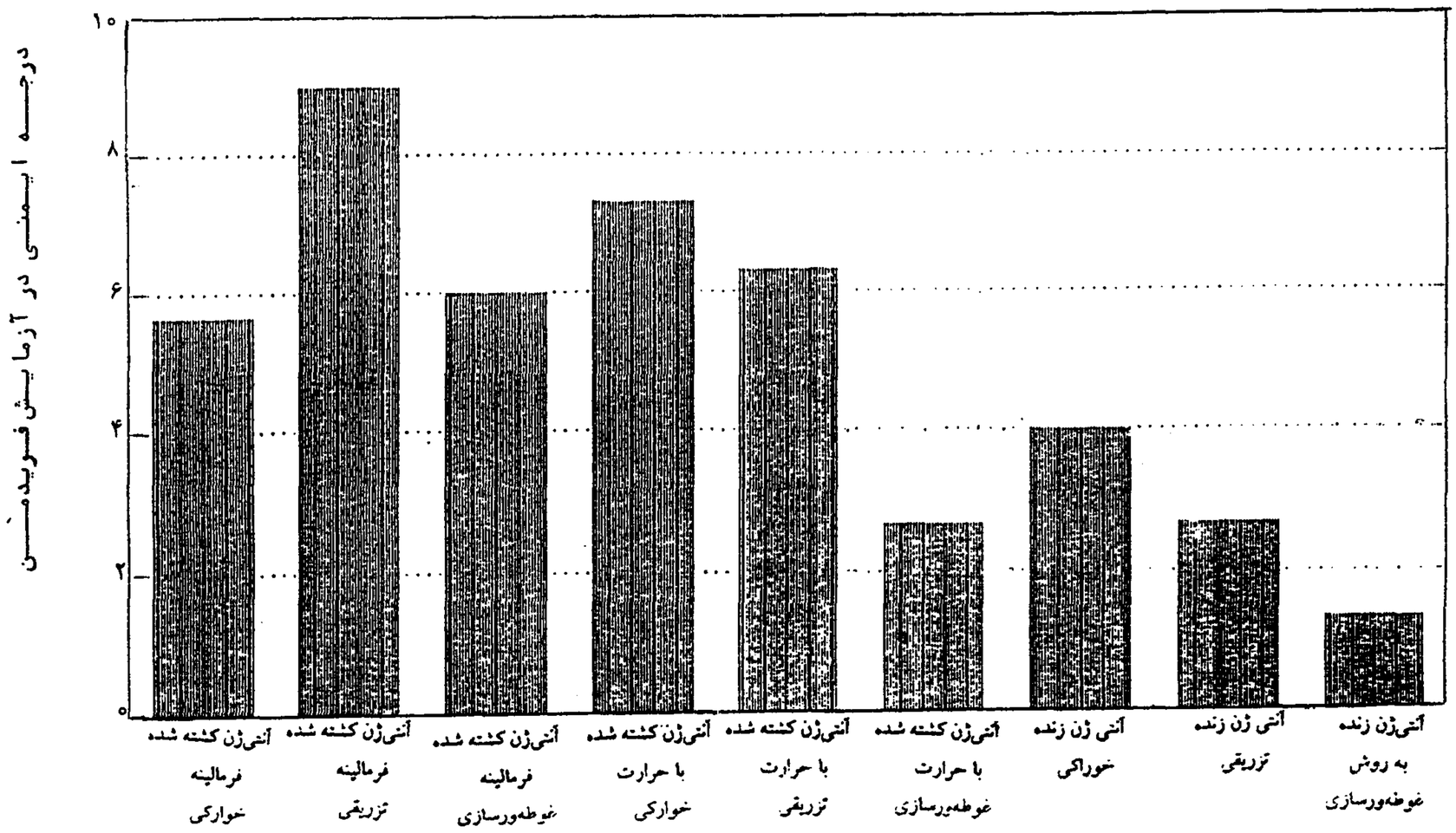
ایمنی‌زایی آنتی‌ژنهای مختلف استفاده شده ۴۵ روز پس از ایمن سازی به ترتیب: آنتی‌ژنهای فرمالینه تزریقی (FN) بالاترین درجه ایمنی را به‌دنبال داشت و در مرحله بعدی آنتی‌ژن کشته شده با حرارت (HN) به‌صورت خوراکی تجویز شده بود. در مراحل بعدی آنتی‌ژنهای کشته شده با حرارت به‌صورت تزریقی (HN) آنتی‌ژنهای کشته شده فرمالینه به‌صورت غوطه‌ور سازی (FN) و به‌صورت خوراکی (FO) ایمنی زایی قابل قبولی را برای ماهیها داشتند. آنتی‌ژنهای زنده به‌صورت خوراکی و (LO) ایمنی هومرال بهتری را نسبت به آنتی‌ژن زنده تزریقی (LN) و آنتی‌ژن کشته شده با حرارت به‌صورت غوطه‌ور سازی (HM) و آنتی‌ژن زنده به روش غوطه‌ور سازی (LM) از خود نشان دادند. در مقایسه آماری اختلاف معنی‌داری بین درجه ایمنی حاصل از آنتی‌ژن کشته شده فرمالینه تزریقی با ایمنی حاصل از آنتی‌ژن کشته شده با حرارت به‌صورت خوراکی مشاهده نشد ($p<0.005$). لیکن با سایر گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار بین درجه‌های ایمنی حاصل از آنتی‌ژنهای مختلف در نمودار ۱ با اعداد متفاوت نشان داده شده است ($p<0.005$).

ایمنی‌زایی آنتی‌ژنهای مختلف استفاده شده ۶۰ روز پس از ایمن سازی به ترتیب: آنتی‌ژنهای زنده خوراکی (LO) بالاترین درجه ایمنی را به‌دنبال داشت و در مرحله بعدی آنتی‌ژن کشته شده فرمالینه (FO) که به‌صورت خوراکی تجویز شده بود. در مراحل بعدی آنتی‌ژنهای کشته شده با فرمالین به‌صورت تزریقی (HN) آنتی‌ژنهای کشته شده فرمالینه به‌صورت غوطه‌ور سازی (FN) ایمنی زایی قابل قبولی را برای ماهیها داشتند. آنتی‌ژن کشته شده با حرارت (HO) ایمنی هومرال بهتری را نسبت به همین آنتی‌ژن که به‌صورت تزریقی (HN) و به‌صورت غوطه‌ور سازی (HM) نشان داد. آنتی‌ژن زنده به‌روش تزریقی (LM) از قدرت کمتری در برانگیختن پاسخ ایمنی هومرال ماهی برخوردار بود. در مقایسه آماری اختلاف معنی‌داری بین درجه ایمنی حاصل از آنتی‌ژن زنده به‌صورت خوراکی، فرمالینه خوراکی و فرمالینه تزریقی مشاهده نشد ($p < 0.005$). لیکن با سایر گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار بین درجه‌های ایمنی حاصل از آنتی‌ژنهای مختلف در نمودار ۲ با اعداد متفاوت نشان داده شده است ($p<0.005$).

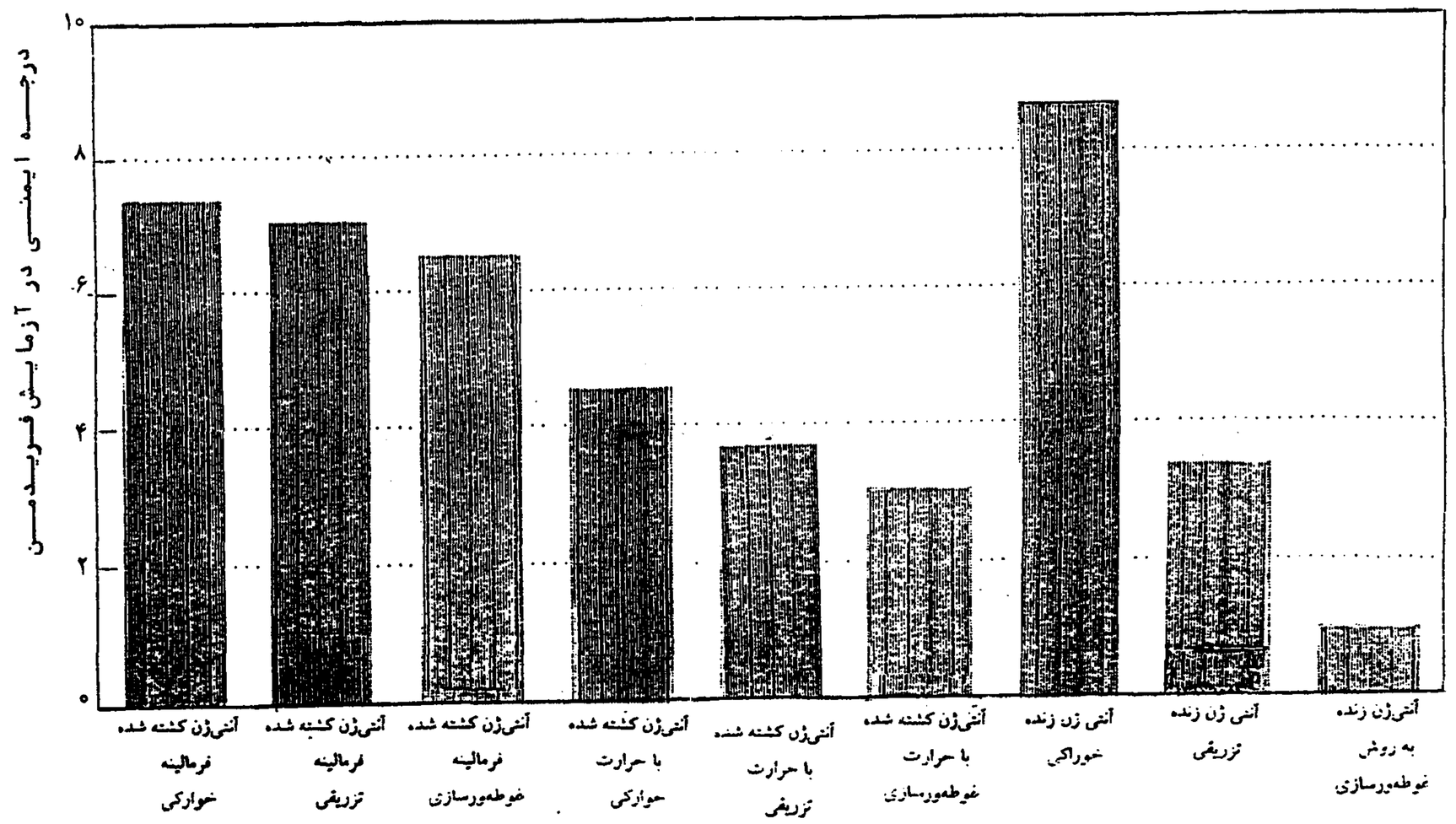
جدول ۳ - میانگین جذب نوری در سری الف و ب ۶۰ روز پس از ایمن سازی

گروه‌های مختلف	سری الف	سری ب	میانگین الف + ب
F.M.	۱/۰۰۴	۰/۸۵۵	۰/۹۲۸
F.N.	۱/۰۰۸	۰/۹۳۸	۰/۹۷۳
F.O.	۰/۹۹۲۵	۰/۸۶	۰/۹۲۶۲
H.M.	۰/۹۴	۰/۸۰۲۵	۰/۷۸۶۸
H.N.	۰/۹۸	۰/۸۹	۰/۹۳۵
H.O.	۰/۹۷	۰/۸۸۸	۰/۹۲۹
L.N.	۰/۹۴۴	۰/۸۵	۰/۹۰۴۲
L.M.	۰/۹۱	۰/۷۸۸	۰/۸۴۹
L.O.	۰/۹۳۶	۰/۸۷	۰/۹۲
میانگین کلی	۰/۹۶۶۰	۰/۸۶۵۰	۰/۹۱۶۹

F.M. = آنتی‌ژن سلول کشته شده فرمالینه به‌روش غوطه‌ور سازی، F.N. = آنتی‌ژن سلول کشته فرمالینه به‌روش تزریقی، F.O. = آنتی‌ژن سلول کشته فرمالینه به روش خوراکی، H.M. = آنتی‌ژن = سلول کشته یا حرارت به‌روش غوطه‌ور سازی، H.N. = آنتی‌ژن سلول کشته به‌وسیله حرارت = به‌روش تزریقی، H.O. = آنتی‌ژن سلول کشته شده به‌وسیله حرارت به‌روش خوراکی، L.N. سلول زنده آنتی‌ژن به‌روش تزریقی، آنتی‌ژن L.M. = آنتی‌ژن سلول زنده به‌روش غوطه‌ور سازی، L.O. سلول زنده به‌روش خوراکی.



نمودار ۱ - مقایسه روشهای مختلف ایمنی‌زایی علیه آئروموناس هیدروفیلا و پاسخ ایمنی هومورال ماهی کپور معمولی (۴۵ روز پس از واکسیناسیون)



نمودار ۲ - مقایسه روشهای مختلف ایمنی‌زایی علیه آئروموناس هیدروفیلا و ایمنی هومورال ماهی کپور معمولی (۶۰ روز پس از واکسیناسیون)

بحث

اگر چه بابا و همکاران (۱۹۸۸) نتوانستند هیچ گونه آنتی‌بادی علیه لیپوپلی‌ساکارید ناخالص آئروموناس هیدروفیلا به‌صورت حمام و تزریق متعاقب تجویز واکسن با استفاده از آزمایشهای رسوبی در سرم ماهی کپور نشان دهند که می‌تواند به‌دلیل نوع آنتی‌ژن، روش ایمن سازی و با احتمال زیاد حساسیت کم آزمایشهای رسوبی به‌کار گرفته باشد، لیکن لامرز و همکاران (۱۹۸۵) با روش حمام و تکرار آن پس از یک ماه و همچنین تزریق ماهیان حمام داده شده در آنتی‌ژن کشته شده با حرارت افزایش تیتر آنتی‌بادی در سرم را گزارش نمودند این تحقیق که جهت تعیین پاسخ ایمنی هومورال ماهی کپور بر علیه سه نوع آنتی‌ژن آئروموناس هیدروفیلا با استفاده از آزمایش الیزا صورت گرفت نشان داد که گروه‌های واکسن فرمالینه نسبت به گروه‌های واکسن حرارت دیده در یک دید کلی دارای نتایج بهتر و عیار بالاتری است. لامرز و دی‌هاس (۱۹۸۳) نتیجه گرفتند که واکسن غیرفعال شده با حرارت (۶۰ درجه / یک‌ساعت) دارای نتایج بهتری با واکسن غیرفعال شده با فرمالین (۰/۳ درصد) می‌باشد. آنها مشابه چنین نتایجی را در سال ۱۹۸۶ هم گزارش کردند. ولی لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) نتیجه گرفتند که بالاترین تیتر به دست آمده ناشی از واکسن فرمالینه می‌باشد و واکسن حرارت دیده دارای پایین‌ترین تیتر می‌باشد. آنها در مطالعه دیگری (۱۹۹۶) نتیجه گرفتند که سرم ماهیهای ایمن شده باعث آگلوتیناسیون باکتری آئروموناس هیدروفیلا فرمالینه و زنده می‌شود. در حالی که سلول آئروموناس هیدروفیلای کشته شده با حرارت و یا فاقد لیپوپلی ساکارید دارای واکنش ضعیف آگلوتیناسیون می‌باشد. لامرز و وان موئس ونیکل (۱۹۸۶) پیشنهاد کردند که آماده سازی با فرمالین ساختمان آنتی‌ژنتیکی آئروموناس هیدروفیلا را به نحوی تغییر می‌دهد که شناسایی آنتی‌ژنها توسط ماکروفاژها بهتر صورت بگیرد. در حالی که حرارت دادن و شکستن قادر به آزاد سازی ماده آنتی‌ژنتیکی زیادی نیست.

یکی از مسائل مهم در واکسیناسیون ماهی روش تجویز واکسن می‌باشد. به‌نظر می‌رسد ارتباط انکارپذیری بین روش تهیه آنتی‌ژن و روش تجویز آن وجود دارد. به طوری که در گروه فرمالینه هر سه روش تجویز دارای مرتبهٔ نزدیک به هم می‌باشد و تفاوت بین آنها جزیی است. در گروه سلول حرارت دیده نیز به همین شکل بود ولی در گروه سلول زنده تفاوت فاحش بود به نحوی که گروه سلول زنده به روش غوطه‌ور سازی دارای حداقل تیتر بود در حالی که گروه سلول زنده خوراکی دارای بالاترین تیتر بود. تون و پلمپ (۱۹۸۲) نشان دادند که روش تزریقی صرف‌نظر از روش تهیه آنتی‌ژن دارای تیتر بالاتری می‌باشد (در مقایسه با غوطه‌ور سازی و اسپری). روان گاپون و همکاران (۱۹۸۶) یک ایمنی کامل را در ماهی تیلاپیای نیل در عرض ۲ هفته بعد از واکسیناسیون ثبت کرد. لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) روش تزریقی را نسبت به غوطه‌ور سازی ارجح دانستند. ولی روش خوراکی را مشابه روش تزریقی گزارش کردند. درباره روش غوطه‌ور سازی اولین بار لامرز و وان موئس و نیکل در سال ۱۹۸۶ در بالا بردن تیتر آنتی‌بادی در کپور متعاقب یک غوطه‌ور سازی‌شان با سلولهای آئروموناس هیدروفیلای غیرفعال شده با حرارت نتیجه‌ای نگرفتند.

بسیاری از محققین ذکر کرده‌اند که روش غوطه‌ور سازی یک روش ضعیف در القاء پاسخ به ایمنی هومرال می‌باشد. این مشاهدات ممکن است این واقعیت را نشان دهد که ماهی واکسینه شده از راه غوطه‌ور سازی معمولاً آنتی‌ژن کمتری را نسبت به گروه همانندی که تزریق شده بودند دریافت کند. مقدار آنتی‌ژن دریافت شده توسط ماهی به روش غوطه‌ور سازی کمتر از غلظت اولیه آنتی‌ژن می‌باشد. راه جذب آنتی‌ژن در غوطه‌ور سازی عمدتاً از طریق آبششها - پوست می‌باشد.

تنها گزارشی که برتری روش غوطه‌ور سازی را نسبت به روش تزریقی نشان می‌دهد مربوط به کار بابا و همکاران (۱۹۸۸) می‌باشد. در ارتباط با واکسیناسیون خوراکی بسیاری از محققین اثرات ایمنی محافظتی را در واکسیناسیون خوراکی بدون داشتن مدرکی از وجود آنتی‌بادی سرمی نشان داده‌اند. بسیاری از محققین ذکر کرده‌اند که روش خوراکی یکی از کم اثرترین روشهای واکسیناسیون در ماهی می‌باشد. در مطالعه لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) تیتر به دست آمده در روش خوراکی را مشابه تزریقی دانسته‌اند. در تحقیق انجام شده که نتایج آن در این مقاله آمده است نشان داده شد که روش خوراکی روش مؤثری در بالا بردن تیتر آنتی‌بادی می‌باشد که این شاید ناشی از وضعیت خاص همه کپور ماهیان باشد که تخریب آنتی‌ژن به دلیل نداشتن معده آشکار و شرایط اسیدیته در آن در حداقل است.

تحقیق جاری که به منظور تعقیب روند تولید آنتی‌بادی و به دست آوردن زمان مورد نیاز برای رسیدن به اوج تیتر آنتی‌بادی نتایج در دو روز متفاوت، ۴۵ و ۶۰ پس از واکسیناسیون مورد بررسی قرار گرفت نشان داد که روز ۶۰ تیتر بالاتری را نسبت به روز ۴۵ دارد و سیر تولید آنتی‌بادی رو به افزایش است. براساس نتایج حاصل از این تحقیق اولاً روش تهیه آنتی‌ژن فرمالینه بر روش آنتی‌ژن حرارت دیده ارجحیت دارد. ثانیاً برتری روشهای واکسیناسیون در ارتباط مستقیم با روش تهیه آنتی‌ژن است و ثالثاً تیتر آنتی‌بادی تا روز ۶۰ پس از آزمایش دارای یک سیر صعودی می‌باشد. این نتایج می‌تواند به صورت کاربردی مورد استفاده پرورش دهندگان ماهی قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم محترم کشاورزی کارشناس محترم دانشکده همچنین کارکنان بخش آبزیان و مدیریت کارگاه پرورش کپور ماهیان مرودشت تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. اخلاقی، م، بررسی برخی فاکتورهای استرس‌زا در ظهور عفونتهای ناشی از آئروموناس هیدروفیلا (Aeromonas hydrophila) در کپور ماهیان پرورشی مجله علمی شیلات ایران. سال هفتم. زمستان ۱۳۷۷. صفحات ۸ - ۱، (۱۳۷۷).

۲. اسماعیلی، ف. پیغان، ر. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسم شبیه آئروموناس‌های متحرک. مجله علمی شیلات ایران. سال ششم، صفحات ۸ - ۱، (۱۳۷۶).

۳. پیغان، ر. عباسی، س. اسماعیلی، ف. پروژه بررسی علل مرگ و میر ماهیان آمور در استان خوزستان. مرکز تحقیقات و آموزش شیلات ایران، (۱۳۷۳).

۴. رضویلر، و. حسنی طباطبائی، ع. آذری تاکامی، ق. بررسی نقش بیماریزایی آئروموناس هیدروفیلا در بعضی از بیماریهای ماهی، پایان‌نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۳ دوره ۳. صفحات ۳۳ - ۲۱، (۱۳۶۰).

5. Akhlaghi, M; Munday, B.L: and Whittington, R.J. Comparisonof passive and active immunisation of fish against streptococcosis(enterococcosis). J. Fish Diseases. 19: 251-258, (1996).

6. Amin, N.E; Abdallah, I.S; Elallawy, T; and Ahmed, S.M. Motile Aeromonas septicemia among Tilapia (Sarotherodon niloticus) in upper Egypt. Fish Pathol. 20: 93-97, (1985).

7. Austin, B: and Austin, D. Bacterial fish pathogens, 2nd edition,

Ellis Horwood, New York pp:172-182, (1993).

8. Baba, T., Imamura, J; and Izawa, K. Immune protection in carp (cyprinus carpio) after immunization with Aeromonas hydrophilacrude lipopolysacharide. J. Fish Diseases. 11:237-244,(1988).

9. Jeny, Z, S. and Jeny, G., Major diseases of carp. Aquaculture. 129: 397-420, (1995).

10. Lamers, C.H.L and de Hass, M.J.M. The development of immunological memory in carp to a bacterial antigen, Devel. comp. immunol. 7: 713-714, (1983).

11. Lamers, C.H.L and de Hass, M.J.M. and van Muiswinke, W.B. The reaction of the immune system of fish to vaccination: development of immunological memory in carp, Cyprimus carpio L., following direct immersion in Aeromonas hydrophila bacterin, J. Fish Diseases. 8: 253-262, (1983).

12. Lamers, C.H.J; and van Musiwinkel, W.B. Natural and aquaired agglutinins to Aeromonas hydrophila in carp (Cyprimus carpio). Can. J. Fisheries Aquatic Sci.. 43:619-624,(1986).

13. Loghothetis, P.N. and Austin, Bimmune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to Aeromonas hydrophila, Fish & shellfish immunol. 4:235-254,(1994).

14. Loghothetis, P.N. and Austin, B.. Antibody response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to live Aeromonas hydrophila as assessed by various antibody preparations. Fish & Shellfish Immunol. 6: 455-464, (1996).

15. Ruangapan L; Kitao, T. and Yoshida. T. Protective efficacy of vaccine in Nile tilapia. Vet. immunol. Immunopathol. 12: 345-350, (1986).

16. Stevenson, R.M.W. Vaccination against Aeromonas hydrophila. In: Fish vaccination (Ellis, ed), London, Academic Press, pp: 112-123,(1989).

17. Thune, R.L. and Plumb, A. Effect of delivery methode and antigen preparation on the production of antibodies against Aeromonas hydrophila in channel catfish. Prog. Fish culturist. 44: 53-54, (1982).

Immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* in common carp (cyprinus carpio, L)

Akhlaghi, M.[1]

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

In order to asses the immunogenicity of Aeromonas hydrophila, the aethiological cause of haemmorhagic septicemia in common carp in Fars province fish farms, three different preparations of antigen including formalin-killed cell (1%) heat killed cell (60°C, 4h) and live cell were studied. Fifty five common carp (Cyprinus carpio, L) in 9 groups with three routes of administration were exposed to the antigens (oral administration 10^9 cell/ml/fish, immersion 10^7 cell/ml/fish and ip injection 10^9 cell\fish) in day 0 and day 20 of the experiment. Similarly 15 fish in three groups were exposed with phosphate-buffered saline as control. Fish were bled 45 and 60 days after immunization and serum sample from each fish was collected. The fish humoral response was detected by ELISA. Results showed that the formalin-killed cell had the best response and that oral administration of antigens in comparison with other routes had the highest effect. The antibody level of fish was still increasing at day 60.

Key words: Immunogenicity, Aeromonas hydrophila, Carp, Elisa.