مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۲، ۱۶۲-۱۵۷

بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمنوگلبولین، گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا

هادی توکلی[۱] مصطفی اخلاقی[۲]*

۱) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

۲) بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

(دریافت مقاله: ۳ تیر ماه ۱۳۸۶ ، پذیرش نهایی: ۱۸ آبان ماه ۱۳۸۷)

چکیده

بمنظور بررسی میزان تغییرات اجزای سرم و خون ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با باکتری آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا، عامل بیماری سپتی سمی هموراژیک در ماهیها، تعداد 10^5، 10^6، 10^7 از این باکتری به ترتیب به سه گروه آزمایشی مجزا که هرگروه شامل ۱۰ ماهی قزل آلای رنگین کمان بود به روش داخل صفاقی تزریق شد. یک گروه بعنوان شاهد با همان تعداد ماهی با تزریق سرم فیزیولوژی مورد استفاده قرارگرفت. پس از ظاهر شدن علائم بیماری در ماهی ها، نمونه گیری از مخاط پوست و خون انجام شد. میزان لیزوزیم و ایمنوگلبولین های ضد آئروموناس هیدروفیلا در پوست و سرم خون بترتیب بروش الیزا و پلیت همچنین میزان هماتوکریت وشمارش کل گلبول های سفید / قرمز خون مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج بدست آمده نشان داد میزان لیزوزیم موجود در مخاط پوست و سرم خون در مقایسه با گروه شاهد از تفاوت معنی داری برخوردار می باشد($p<0/05$). میزان لیزوزیم سرم بطور معنی داری در گروه شاهد و گروه های آزمایشی از لیزوزیم مخاط بیشتر بود. در مقایسه میزان ایمنوگلبولین های مخاط پوست با شاهد اختلاف معنی دار مشاهده نگردید لیکن ایمنوگلبولین گروه های ۲ و ۳ بطور معنی داری از گروه شاهد بیشتر بود. اختلاف معنی داری در تعداد گلبولهای قرمز و گلبول های سفید بین گروه های آزمایشی و شاهد مشاهده شد. همچنین در صد هماتوکریت بین گروه های آزمایشی و گروه شاهد دارای تفاوت معنی داری بود. عفونت ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلای رنگین کمان باعث افزایش لیزوزیم سرم و مخاط، افزایش ایمنوگلبولین های سرم، کاهش هماتوکریت و گلبول های قرمز خون می شود.

واژه‌های کلیدی: لیزوزیم، ایمنوگلوبولین، سلول های خون، آئروموناس هیدروفیلا، قزل آلای رنگین کمان.

مقدمه

از اصول اولیه در پرورش آبزیان، تولید زیاد درحداقل زمان و در کمترین مساحت است که این امر خود زمینه ساز بروز بسیاری از بیماری ها می باشد. عوامل عفونی که شامل انگل ها، باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها می باشند همواره مزارع پرورش ماهی را مورد تهدید قرار می دهند. پرورش دهندگان ماهی عموماً شناخت کمی از بیماری های ماهی و راه های کنترل آنها دارند و در موقع برخورد با تلفات ماهی ها گاهی آنها را عادی تلقی نموده و تلاشی در جهت کنترل آنها نمی نمایند. یکی از باکتری های مهم در صنعت پرورش ماهی ها، باکتری آئروموناس هیدروفیلا می باشد. این باکتری از آئروموناس های متحرک به عنوان یک عامل بیماریزا برای بسیاری از گونه های مختلف ماهیان آب شیرین و گاهی ماهیان آب شور محسوب می شود(۹). باکتری آئروموناس هیدروفیلا درکپور، مارماهی، شیرماهی، گربه ماهی، تیلاپیا و قزل آلای رنگین کمان باعث ایجاد سپتی سمی هموراژیک می شود و بیماری حاصله از این باکتری در سراسر دنیا گسترش دارد(۲). برخی از محققین معتقدند که آئروموناس هیدروفیلا یک بیماریزای فرصت طلب است که باعث سپتی سمی هموراژیک در ماهی می شود و به عنوان یک ارگانیزم همه جایی و نامتجانس می باشد که باعث ایجاد بیماری در شرایط استرس زا و یا در ارتباط با عفونت سایر پاتوژن ها می شود در حالی که گروهی دیگر معتقدند که آئروموناس هیدروفیلا یک بیماریزای اولیه است(۹). در طبیعت آئروموناس هیدروفیلا بطور گسترده در آب های شیرین در قسمت رسوبات و همچنین در دستگاه گوارش ماهی ها قرار دارد (۱۶). تحقیقات انجام شده در این زمینه در ایران آئروموناس هیدروفیلا را به عنوان عامل بیماریزای کپور ماهیان پرورشی(۱۳) و آئروموناس های متحرک بصورت عامل ثانویه یا اولیه در مرگ و میر ماهی آمور در استان خوزستان(۶) معرفی می کند. این باکتری همچنین از کپور ماهیان پرورش داده شده در فارس شناسایی شده است(۹). اخیراً جداسازی این باکتری از ماهی های قزل آلای بیمار بیشتر صورت می گیرد. در خصوص بیماریزایی و پاتوفیزیولوژی سپتی سمی هموراژیک ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلای رنگین کمان تحقیقات اندکی موجود است. در تحقیقی دربررسی آزمایشگاهی عفونت سیستمیک آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلای رنگین کمان نشان داده شد که تغییرات آسیب شناسی در آبشش ها، مغز، قلب، کلیه، کبد و روده این ماهی اتفاق می افتد و آنزیم گلوتامیت اگزالاستات ترانس آمیناز و بیلی روبین در سرم خون ماهی های بیمار بطور معنی داری نسبت به گروه شاهد افزایش می یابد(۵). مطالعه فاکتورهای خونی قزل الای رنگین کمان زمانی که بصورت تجربی درگیر ضایعات جلدی ناشی از آئروموناس هیدروفیلا شد کاهش معنی دار گلبول های قرمز، هماتوکریت، هموگلبولین و فاکتورهای بیوشیمیایی خون را نشان داد(۱۴). در تحقیق

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۷۱۱-۶۱۳۸۷۳۷ نمابر: ۰۷۱۱-۲۲۸۶۹۴۰ Email: akhlaghi@shirazu.ac.ir

دیگری مشخص گردید گربه ماهی‌های روگاهی که در معرض استرس حمل و نقل و خونگیری قرار گرفته بودند کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و افزایش هتروفیل‌ها داشتند(۱). هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییرات لیزوزیم و ایمنوگلوبولین‌ها در مخاط و سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان همچنین تغییر در میزان گلبول‌ها و هماتوکریت خون بمنظور آگاهی از شاخص‌های ایمنی و آسیب شناسی درمانگاهی این ماهی در مواجهه با بیماری پس از تزریق داخل صفاقی با دامنه 10^5، 10^6، 10^7 باکتری آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا به گروه‌های مجزا و مقایسه نتایج با گروه شاهد بود.

مواد و روش کار

باکتری: باکتری آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا که از موارد سپتی سی هموراژیک ماهی قزل آلای رنگین کمان در بخش آبزیان بروش‌های بیوشیمیایی قرار گرفته بود(۴) متعاقباً در آزمایش‌های انجام شده تعیین بیماریزایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان برای این ماهی بیماریزا شناخته شد. این باکتری روی محیط آگار خوندار کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. به منظور تهیهٔ رقت مشخصی از باکتری جهت تزریق به ماهی‌ها، از روش تهیه منحنی استاندارد جذب نوری/ غلظت استفاده گردید. جهت تهیه یک سوسپانسیون پایه از باکتری تازه تعداد ۲-۳ لوپ باکتری از محیط جامد انفوزیون مغز و قلب برداشته و در ۱۰ میلی لیتر محیط استریل سه قندی آهن دارکشت داده می‌شد. به منظور اینکه در نهایت سوسپانسیون نهایی حاوی بیشترین باکتری زنده باشد انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت. از محیط بدست آمده رقت‌های متوالی تهیه شد و تعداد واحد مولد پرگنه از رقت‌ها بدست آمد. جهت تهیهٔ منحنی استاندارد جذب نوری غلظت از چهار نقطه بدست آمده در مرحلهٔ قبل مربوط به تعداد واحد مولد پرگنه و جذب نوری تا بیست برابر رقت برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد بطوریکه تعداد واحد مولد پرگنه روی محور طول‌ها و جذب نوری روی محور عرض‌ها نمایش داده شد. مقدار $R=0/96$ بدست آمد. برای تهیه غلظت معین باکتری در هر بار اقدام به تهیه سوسپانسیون پایه نموده، سپس جذب نوری سوسپانسیون مذکور با استفاده از دستگاه مربوطه قرائت شد و با قرار دادن جذب نوری سوسپانسیون مورد نظر در منحنی استاندارد تهیه شده غلظت باکتری در محلول بدست آمد(۸).

نگهداری و گروه بندی ماهی‌ها: ابتدا سیستم مدار بسته موجود در بخش آبزیان توسط فرمالین با غلظت ۲۰۰۰ قسمت در میلیون به مدت ۱۲ ساعت ضد عفونی، شستشو و سپس آبگیری گردید. تعداد ۵۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن ۶/۳۵±۴۹/۶ گرم از کارگاه پرورش ماهی چشمه بناب تهیه شد. جهت انتقال ماهی‌ها از ظروف پلاستیکی آب با حجم ۱۰۰ لیتر و یک عدد کپسول اکسیژن با وسایل جانبی استفاده گردید. ماهی‌ها پس از انتقال ابتدا بلحاظ عدم وجود انگل‌های خارجی مورد ارزیابی قرار گرفته و روزانه به میزان ۳ درصد وزن آنها غذا دهی شدند. در طول آزمایش درجه متوسط آب ۲ درجه

تصویر ۱- سپتی سمی هموراژیک ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلای رنگین کمان، خونریزی شدید در پایه باله‌ها، سر پوش آبششی و اطراف دهان مشاهده می‌شود.

سانتیگراد ±۱۵ تنظیم گردید.

ماهی‌ها در ۴ گروه با تعداد ۱۸-۱۶ بنحوی تقسیم شدند که با در نظر گرفتن تلفات حداقل در هر گروه از تعداد ۱۰ ماهی در تانکرهای جداگانه نمونه برداری شود. گروه شاهد توسط سرم فیزیولوژی و دیگر گروه‌های آزمایشی به ترتیب گروه ۱ تعداد 2×10^5، گروه ۲، 4×10^6 و به گروه ۳، 3×10^7 باکتری آئروموناس هیدروفیلا و در حجم یکدهم میلی لیتر بصورت داخل صفاقی تزریق گردید(۹).

جمع آوری مخاط سطح بدن و خونگیری: پس از ظاهر شدن علائم بیماری از جمله سیاه شدن رنگ ماهی، کم تحرکی، بیرون زدگی چشم و بعضاً خونریزی در پایه باله‌ها (حداقل ۵ روز و حداکثر ۲۱ روز پس از تزریق باکتری)، ابتدا ماهی‌های هر گروه بیهوش شدند. سپس از سیاهرگ دمی خونگیری گردید. خون گرفته شده در دو لوله آزمایش یکی حاوی ماده ضد انعقاد هپارین بمیزان ۱۵ میکرولیتر برای هر میلی لیتر و دیگری بدون ماده ضد انعقاد ریخته شد. خون حاوی ماده ضد انعقاد جهت انجام آزمایش‌های خونی به آزمایشگاه ارسال گردید و نمونه‌های خون بدون ماده ضد انعقاد به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و سرم‌ها جمع آوری شدند. جهت جمع آوری مخاط سطح پوست، یک عدد لام روی سطح بدن ماهی و در جهت خواب فلس‌ها کشیده شد(۱۲). نمونه‌های بدست آمده در ۲۰- درجه سانتیگراد منجمد گردید.

اندازه گیری میزان لیزوزیم سرم خون و مخاط پوست: برای تعیین فعالیت لیزوزیم سرم‌ها و مخاط های جمع آوری شده از روش پلیت استفاده گردید. باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (Micrococcus lysodeikticus) روی پلیت آگارز ۱/۱ درصد کشت داده شد بطوری که تمام سطح پلیت را بپوشاند. از رقت‌های نمونه‌های مخاط و سرم در حفره‌های ایجاد شده ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها از گرمخانه خارج گردید و قطر مناطق عدم رشد اندازه گیری شد و نتایج با هم مقایسه گردید. به منظور تعیین مقدار لیزوزیم موجود

جدول۱- میانگین و انحراف معیار فاکتورهای اندازه‌گیری شده در مخاط پوست و خون ماهی قزل آلای رنگین‌کمان بدنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا در گروه‌های مورد آزمایش. حروف مشابه در هر ردیف اختلاف معنی‌داری ندارند ($p > ۰/۰۵$).

ردیف	گروه‌های آزمایشی	شاهد	گروه۱	گروه۲	گروه۳
	تعداد باکتری تزریق شده	۰	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۶}$	$۱۰^{۷}$
	فاکتورهای اندازه گیری شده	میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار
۱	لیزوزیم مخاط در روش پلیت (بدون رقت)، قطر (سانتیمتر) (رقت ۱:۱۰)، قطر (سانتیمتر) (رقت ۱:۳۰)، قطر (سانتیمتر) (رقت ۱:۵۰)، قطر (سانتیمتر)	$۰/۴۸۳^{a} \pm ۰/۱۹۰$ $۰/۲۸۳^{c} \pm ۰/۲۷۱$ ۰ ± ۰ ۰ ± ۰	$۰/۹۷^{b} \pm ۰/۱۰۷$ $۰/ ۵۲۰^{d} \pm ۰/۱۸۸$ $۰/۰۷۱^{e} \pm ۰/۲۴۱$ ۰ ± ۰	$۱/۰۶^{b} \pm ۰/۹۶۱$ $۰/۵۸۰^{d} \pm ۰/۱۳۶$ $۰/۱۲۵^{e} \pm ۰/۲۳۱$ ۰ ± ۰	$۱/۱۲^{b} \pm ۰/۱۲۸$ $۰/۵۷۰^{d} \pm ۰/۲۸۱$ $۰/۳۰۷^{c} \pm ۰/۲۸۹$ ۰ ± ۰
۲	لیزوزیم سرم در روش پلیت (بدون رقت)، قطر (سانتیمتر) (رقت ۱:۱۰)، قطر (سانتیمتر) (رقت ۱:۳۰)، قطر (سانتیمتر) (رقت ۱:۵۰)، قطر (سانتیمتر)	$۰/۷۵۵^{c} \pm ۰/۱۱۸$ $۰/ ۵۲۲^{c} \pm ۰/۲۱۰$ $۰/۱۶۶^{g} \pm ۰/۲۵۰$ ۰ ± ۰	$۱/۵۲^{d} \pm ۰/۰۹۹۴$ $۱/۰۹^{f} \pm ۰/۱۳۶$ $۰/۶۸^{h} \pm ۰/۱۳۴$ $۰/۲۰^{i} \pm ۰/۲۵۰$	$۱/۶۹^{e} \pm ۰/۱۳۲$ $۱/۱۰^{f} \pm ۰/۱۱۴$ $۰/۶۶^{h} \pm ۰/۰۹۵$ $۰/۲۴^{i} \pm ۰/۲۶۷$	$۱/۸۱^{e} \pm ۰/۸۹۹$ $۱/۱۴^{f} \pm ۰/۰۹۷$ $۰/۷۱^{h} \pm ۰/۰۵۵$ $۰/۲۸^{i} \pm ۰/۲۶۷$
۳	ایمنوگلبولین مخاط در روش الیزا (جذب نوری در ۴۹۰ نانومتر)	$۰/۰۴۷^{a} \pm ۰/۰۰۵$	$۰/۰۵۱^{a} \pm ۰/۰۰۶$	۰/۰۴۸a ± ۰/۰۰۷۰	$۰/۰۵۲^{a} \pm ۰/۰۰۶$
۴	ایمنوگلبولین سرم در روش الیزا (جذب نوری در ۴۹۰ نانومتر)	$۰/۰۵۱^{a} \pm ۰/۰۰۸$	$۰/۰۵۷^{a} \pm ۰$	۰/۰۶۳b ± ۰/۰۰۵	$۰/۰۶۴^{b} \pm ۰/۰۱۱$
۵	هماتوکریت (درصد)	$۴۰/۰۸^{a} \pm ۱/۸۰۴$	$۳۳/ ۹۵^{b} \pm ۰/۹۶۹$	۲۹/۶۶± b ۱/۷۹۹	$۲۶/۸۰^{b} \pm ۱/۲۲۸$
۶	گلبول قرمز (میلی لیتر / $۱۰^{۶}$)	$۱۲۰^{a} \pm ۷/۸۸۹$	$۹۸/۸۹^{b} \pm ۹/۶۶۸$	۸۰/۸۷± c ۱۳/۴۴۸	$۶۰/۷۱^{d} \pm ۸/۹۲۰$
۷	گلبول سفید (میلی لیتر / $۱۰^{۳}$)	$۷۵/۴۴^{a} \pm ۸/۲۷۸$	$۱۰۵^{b} \pm ۱۱/۵۷۵$	۱۳۱/۶۲c ± ۱۴/۵۴۹	$۱۴۱/۰۷^{d} \pm ۷/۴۸۰$

در مخاط و سرم، از لیزوزیم تجاری (سیگما) بدست آمده از سفیده تخم مرغ رقت‌های مختلف تهیه شده است استفاده گردید. با توجه به مشخص بودن میزان لیزوزیم استاندارد مورد استفاده و موجود در آن رقت و قطر منطقه عدم رشد ناشی از لیزوزیم استاندارد، مقدار لیزوزیم بر اساس قطر منطقه عدم رشد باکتری بدست آمد (۱۱).

آزمایش الیزا: آزمایش الیزا بر اساس روش الیزای غیرمستقیم به روش ایمانی و اخلاقی (۹) با بکارگیری آنتی ژن محلول استفاده گردید بدین ترتیب که باکتری آئروموناس هیدروفیلای مورد آزمایش سونیکیت شده و پس از فیلتر با کاغذ صافی ۴۵ میکرونی با رقت مناسب بمیزان ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از خارج نمودن آنتی ژن و مسدود کردن با ژلاتین یک درصد به مدت نیم ساعت، پلیت‌ها شسته شدند. در مراحل بعد بترتیب با اضافه نمودن سرم ماهی‌ها، آنتی بادی سرم موش علیه آنتی بادی‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان و آنتی سرم کونژوگه خرگوش علیه موش (شرکت داکو، دانمارک) با رقت‌های مناسب و پس از شستشو در هر مرحله بمیزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. در هر یک از مراحل ذکر شده پلیت‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در مرحله نهایی با اضافه کردن سوبسترای آ ب تی اس، رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید.

اندازه گیری پارامترهای خون: میزان هماتوکریت خون با استفاده از روش میکرو هماتوکریت و شمارش گلبول‌های قرمز و سفید بروش هموسیتومتر نوبار انجام شد (۱۵).

روش آماری مورد استفاده: جهت مقایسه نتایج از برنامه آماری SPSS نسخه۱۱/۵ و تست آماری آنوای یک طرفه (Scheffe) استفاده گردید. در تمام موارد در فرض $p<۰/۰۵$ وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها را مشخص می‌نمود.

نتایج

نتایج بدست آمده از بیماریزایی آئروموناس هیدروفیلا پس از تزریق داخل صفاقی به ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان (در هر گروه ۱۰ ماهی) با تعداد مختلف باکتری نشان داد تعداد $۱۰^{۵}$ باکتری ۴۰ درصد، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ باکتری ۵۰ درصد تلفات را در ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان ایجاد نمودند که از تمامی تعداد تلفات بجز یک مورد باکتری تزریق شده جداسازی شد. شروع علائم بالینی در گروه‌های تزریقی با $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ باکتری به ترتیب ۱۶ - ۱۱، ۱۰ - ۸ و ۷ - ۵ روز پس از تزریق اتفاق افتاد. در گروه شاهد تلفاتی مشاهده نگردید. تصویر ۱ ماهی‌های مبتلا به عفونت سپتی سمی هموراژیک ناشی از آئروموناس هیدروفیلا را ۹ روز بعد از تزریق نشان می‌دهد.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد لیزوزیم موجود در مخاط بدون رقیق کردن و با رقت ده برابر اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$). در رقت سی برابر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های ۱، ۲ و گروه ۳ مشاهده گردید. در رقت ۵۰ برابر میزان لیزوزیم قابل اندازه گیری نبود (جدول ۱).

اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی و همچنین گروه‌های آزمایش ۱ با ۲ و ۱ با ۳ در میزان لیزوزیم موجود در سرم بدون رقیق کردن وجود داشت (جدول ۱). در رقت ۱۰ و ۳۰ برابر اختلاف معنی‌داری بین شاهد و گروه‌های آزمایشی مشاهده شد لیکن گروه‌های آزمایشی با هم

تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در رقت ۵۰ برابر مقدار لیزوزیم در گروه کنترل قابل اندازه گیری نبود و در گروه‌های آزمایشی میزان‌های ۰/۲۸-۰/۲۰ سانتیمتر عدم رشد تعیین گردید که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. لیزوزیم موجود در مخاط و سرم خون با استفاده از لیزوزیم سفیده تخم مرغ (سیگما) اندازه گیری شد، این مقدار برابر با ۰/۰۴۶ میلی گرم لیزوزیم به ازاء هر میلی متر قطر منطقه عدم رشد باکتری بدست آمد.

مقدار ایمنوگلبولین‌های ضد آئروموناس هیدروفیلا در مخاط بین گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشتند لیکن مقدار آنها در سرم بین گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. اختلاف معنی‌دار در تعداد گلبول‌های قرمز و درصد هماتوکریت بین گروه کنترل و آزمایش همچنین بین گروه‌های مورد آزمایش وجود داشت. در تعداد کل گلبول‌های سفید بین گروه کنترل و آزمایشی همچنین گروه‌های آزمایش ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۱)

بحث

گونه باکتری آئروموناس هیدروفیلا مربوط به جنس آئروموناس می‌باشد. این باکتری از سپتی سمی‌های هموراژیک ماهیان ناشی از استرس‌های ایجاد شده بوسیلهٔ عوامل مختلف جدا می‌شود. علائم کلینیکی و آسیب شناسی آن بسیار شبیه سپتی سمی‌های سودوموناسی است. آئروموناس هیدروفیلا به عنوان عامل بیماریزا در تعداد زیادی از ماهی‌های آب شیرین و گاه گاهی ماهیان آب شور، دوزیستان، خزندگان همچنین در گاو و انسان بطور گسترده در جهان مطرح بوده است(۳). تحقیقات انجام شده در این زمینه در ایران آئروموناس هیدروفیلا را به عنوان عامل بیماریزای کپور ماهیان پرورشی(۱۳) و بصورت عامل ثانویه یا اولیه در مرگ و میر ماهی آمور در استان خوزستان(۶) معرفی کرد. بدنبال عفونی شدن ماهی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا تغییراتی در سیستم ایمنی و فاکتورهای خونی بوجود می‌آید از جمله تغییرات آسیب شناسی فراوان در اندام‌های ماهی و آنزیم‌ها را در ماهی قزل آلای رنگین کمان را نام برد(۵).

در این تحقیق ابتدا تعداد 10^7، 10^6 و 10^5 باکتری آئروموناس هیدروفیلای بیماری زا به ۳ گروه مجزا در هر گروه ۱۰ ماهی از ماهیان قزل آلای رنگین کمان که در تانکرهای فایبرگلاس نگهداری شده بودند به روش داخل صفاقی تزریق شد و یک گروه به عنوان کنترل با تزریق سرم فیزیولوژی مورد استفاده قرار گرفت. پس از ظاهر شدن علائم بیماری در ماهیان نمونه گیری از خون و مخاط سطح بدن ماهی انجام گرفت. میزان لیزوزیم سرم و مخاط به روش پلیت، میزان ایمنوگلبولین‌های سرم و مخاط به روش الیزا و میزان هماتوکریت، گلبول‌های سفید و قرمز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده پس از آلودگی تجربی ماهی قزل آلای رنگین کمان با آئروموناس هیدروفیلا و اندازه گیری میزان لیزوزیم نشان داد سطح لیزوزیم سرم بطور چشمگیر و مخاط در پاسخ به عفونت افزایش داشته است. نتایج حاصله با مطالعه‌ای در ماهی آتلانتیک سالمون توسط Moyner و همکاران (۱۱) که افزایش سطح لیزوزیم را هنگام ایجاد آلودگی با باکتری آئروموناس سالمونیسیدا اثبات کرده بود و مطالعات Rainger و Rowley (۱۲) که فعالیت آنتی باکتریایی سرم و موکوس را بدنبال تزریق باکتری آئروموناس هیدروفیلا بررسی کرده بودند مطابقت داشت. در تحقیق جاری مقدار لیزوزیم موجود در مخاط و سرم خون از نظر کیفی نیز اندازه گیری شد، این مقدار برابر با ۰/۰۴۶ درصد میلی گرم لیزوزیم به ازاء هر میلی متر قطر منطقه عدم رشد باکتری بدست آمد. لیزوزیم یک پروتئین کاتیونیک با وزن ملکولی کم می باشد که بخشی از مکانیزم دفاع غیراختصاصی ماهیان را تشکیل می‌دهد. در آزاد ماهیان لیزوزیم در بافت‌های لنفومیلوئیدی مانند کبد، کلیه، طحال، ترشحات موکوسی، سرم، لکوسیت‌ها، روده، مثانه، کلیه و لوله گوارش یافت شده است. لیزوزیم در این بافت‌ها توسط سلول‌های ویژه‌ای بنام ائوزینوفیلیک گرانول سل تولید و ترشح می‌شود. ابتدا این سلول‌ها در بافت روده ماهی قزل آلای رنگین کمان شناسایی و گزارش شدند، سپس وجود آنها در بافت پیوندی، پوست، آبشش، مثانه و قلب به اثبات رسید. لیزوزیم همچنین توسط لکوسیت‌ها که در بافت‌های مختلف و خون توزیع شده‌اند ترشح می‌شود(۱۷). نقش لیزوزیم در عفونت به عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آنها همچنین تحریک فاگوسیتوز می‌باشد. لیزوزیم قادر است پیوندهای گلیکوزیدی را در لایه‌های پپتیدوگلیکان باکتریها بشکند. Grinde(۷) قدرت نابودسازی لیزوزیم بر باکتری آئروموناس سالمونیسیدا را در ماهی قزل آلای رنگین کمان اثبات کرد. افزایش مشاهده شده در سطح لیزوزیم در مطالعه حاضر به علل زیر اتفاق می‌افتد:

افزایش تعداد و فعالیت لکوسیت‌ها در خون و در نتیجه افزایش ترشح لیزوزیم در خون ماهی.

افزایش تعداد و فعالیت ماکروفاژها در بافت‌های ماهی آلوده از جمله پوست و بدنبال آن افزایش ترشح لیزوزیم در موکوس سطحی بدن ماهی.

افزایش تعداد و فعالیت ائوزینوفیلیک گرانول سل‌ها در بافت‌های ماهی و در نتیجه افزایش ترشح لیزوزیم در خون و موکوس سطحی بدن ماهی.

میزان ایمنوگلبولین‌های سرم در پاسخ به عفونت باکتریایی، افزایش نشان داد که نتایج بدست آمده با نتایج Loghothetis و Austin(۱۰) که با استفاده از روش الیزا به بررسی تیتر آنتی بادی علیه آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلا پرداختند مطابقت داشت.

در تحقیق انجام شده میزان ایمنوگلبولین‌های سرم خون پس از آلودگی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا و ظهور علائم سپتی سمی هموراژیک در مقایسه با ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان سالم بطور معنی‌داری افزایش نشان داد. روند تولید ایمنوگلبولین‌ها در ماهی وقوع مجموعه‌ای از واکنش‌ها بین سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن، سلول‌های T کمک کننده فعال شده و اینترلوکین‌ها سبب تحریک لنفوسیت‌های B می‌شود. این لنفوسیت‌ها در اثر تحریک پلاسما سل‌ها را تولید می‌کنند که قادر به ترشح ایمنوگلبولین می‌باشند(۱۵). به همین دلیل در تحقیق جاری آنتی بادی‌های

ایجاد شده با تست الیزا قابل اندازه گیری بودند. میزان ایمنوگلبولین‌های مخاط سطح بدن ماهی، تغییرات معنی‌دار نشان نداد از دلایل این امر می‌تواند موارد زیر را ذکر کرد: حاد بودن بیماری و نبودن زمان لازم برای تولید مقدار کافی ایمنوگلبولین و پدیدار شدن آن در موکوس سطحی، کم بودن غلظت ایمنوگلبولین ترشح شده در مخاط سطحی در هنگام ابتلا به عفونت را می‌توان نام برد.

هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز در هنگام آلودگی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا، کاهش یافت که با نتایج دیگر محققین مطابقت دارد (۱۴، ۱۱) و برای آن می‌توان دلایل زیر را ذکر کرد: رقیق شدن خون به علت افزایش نفوذپذیری مویرگی، از دست رفتن گلبول‌های قرمز به علت خونریزی، تخریب گلبول‌های قرمز توسط همولیزین باکتری، تخریب گلبول‌های قرمز توسط کمپلمان از طریق فعال شدن مسیر آلترناتیو بوسیله لیپوپلی ساکارید باکتری، افزایش فاگوسیتوز گلبول‌های قرمزی که لیپوپلی ساکارید باکتری روی آنها را پوشانده است.

تعداد کل گلبول‌های سفید در هنگام آلودگی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا افزایش یافت که این افزایش در فاگوسیتوز میکروارگانیزم‌های خارجی و فعالیت کیموتاکتیک نقش دارد و در این تحقیق از نقطه نظر نقش آنها در ازبین بردن باکتری‌های تزریق شده به ماهی قابل توجیه می‌باشد.

به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان بیان کرد که عفونت ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا باعث افزایش لیزوزیم سرم و مخاط، افزایش ایمنوگلبولین سرم، کاهش هماتوکریت و گلبول‌های قرمز خون و افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌شود.

References

1. Ainsworth, A.J., Dexiang, C., Waterstrat P.R. (1991) Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. J. Aquat. Anim. Health. 3: 41-47.
2. Aoki, T. (1999) Motile Aeromonads (Aeromonas hydrophila). In: Fish Diseases and Disorders. Edited by PTK Woo and D.W Bruno. CABI Publishing, USA. pp.427-453.
3. Amin, N.E., Abdallah, I., Elallay T., Ahmed, S.M. (1985) Motile Aeromonase septicemia among Tilapia (Sarotherodon niloticus) in upper Egypt. J. Fish Pathol. 20: 93-97.
4. Austin, B., Austin, D. (1999) Bacterial fish pathogens, disease of farm and wild fish. (3rd ed.) Springer-Praxis, Chichester, UK. pp.124-187.
5. Aydin, S., Cilta, A. (2004) Systemic Infections of Aeromonas hydrophila in rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum): Gross Pathology, Bacteriology, Clinical Pathology, Histopathology and Chemotherapy. J. Anim. Vet. Adv. 3: 810-819.
6. Esmaeli, F., Peighan, R. (1997) Infection of grass carp with the motile Aeromonas- like bacteria. Iranian Sci. Fish. J. 6: 1-8.
7. Grinde, B. (1989) Lyzozme from rainbow trout Richardson as on antibacterial agent against fish pathogens. J. Fish Dis. 12: 95-104.
8. Harrigan, W.F., McCane, M.E. (1990) Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press, London, UK.pp.146-168.
9. Imani, P., Akhlaghi, M. (2004) Immunogenicity of hemolysin, protease and Lipoplysaccharide extracted from Aeromonas hydrophila in common carp *Cyprinus carpiol*. Arch. Razi Ins. 57: 55-66.
10. Loghothetis, P. N., Austin, B. (1994) Immune response of rainbow trout (Oncorhynchus Mykiss, walbaum) to Aeromonas hydrophila. Fish Shellfish Immunol. 4: 239-254.
11. Moyner, K., Roed, K.H., Sevatdal, S., Heum, M. (1993) Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, Salmosalar L, induced by Aeromonas salmonicida infection. Fish Shellfish Immunol. 3: 253-265.
12. Rainger, G.E., Rowley, A.F. (1993) Antibacterial

activity in the serum and mucus of rainbow trout, Onorhynchus mykiss, following immunisation with Aeromonas salmonicida. Fish Shellfish Immunol. 3: 475-482.

13. Razavilar, V., Hasani, A., Azari-Takami, Gh. (1981) The role of Aeromonas hydrophila in some fish diseases.J. Fac. Vet. Vet. Med. Univ. Tehran. 27: 21-33.
14. Rehulka, J. (1998) The blood indices of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum) in aeromonas-induced ulcerous dermatitis. Acta Vet. Brno. 67: 317:322.
15. Stopskopf, M. (1993) Clinical pathology. In Fish medicine. Edited by M Stopskopf WB. Saunders Company, Philadelphia. USA, pp.113-131.
16. Sugita, H., Tanaka, K., Yoshinami, M. and Deguchi, Y. (1995) Distribution of aeromnas species in the intestinal tracts of river fish. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4128-4130.
17. Sveinbjornsson, B., Olsen, R., Paulsen, S. (1996) Immunocytochemical localization of lysozyme in eosinophilic granular cells of Atlantic salmon . J. Fish Dis. 19: 349-355.

J.Vet.Res. 64,2:157-162,2009

STUDY OF LYSOZYME, IMMUNOGLOBULIN, BLOOD CELL AND HEMATOCRIT CHANGES FOLLOWING EXPERIMENTAL INFECTION WITH A PATHOGENIC AEROMONAS HYDROPHILA IN RAINBOW TROUT

Tavakoli, H.[1], Akhlaghi, M.[2]*

[1] *Graduated from the School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.*

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

(Received 25 June 2007 , Accepted 3 November 2008)

Abstract:

In order to determine the changes in serum and blood factors of rainbow trout following experimental infection with a pathogenic Aeromonas hydrophila, the cause of haemorrhagic septicemia in fish, three groups of rainbow trout (10 fish in each group) were injected intraperitoneally with 10^5, 10^6 and 10^7 of this bacteria respectively. The same number of fish in a control group were injected similarly with physiologic saline. After the appearance of clinical symptoms of haemorrhagic septicemia in fish, samples from skin mucus and blood of the fish were collected in order to determine lysozyme, anti- Aeromonas hydrophila immunoglobulins (measured by plate method and ELISA respectively), total white and red blood cells(WBC/RBC). Results showed that the lysozyme level in skin mucus and sera was significantely higher than the control group ($p<0.05$) while the immunoglobulin level of skin mucus of experimentally challenged fish was not significantely higher than that of control group except that of the group 2 and 3 of the experimental fish. WBC/RBC and hematocrit of the experimentally challenged rainbow trout were significantely higher than the control. Thus infection of rainbow trout with Aeromonas hydrophila increases the level of mucus and serum lysozyme, serum immunoglobulins, decreases RBC count and heamatocrit percentage.

Key words: Lysozyme, immunoglobulin, blood cells, Aeromonas hydrophila, rainbow trout

***Corresponding author's email: akhlaghi@shirazu.ac.ir, Tel: 0711-6138737, Fax: 0711-2286940**