مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۲، ۱۹۷-۱۹۱

مطالعه ایمونوسیتوشیمی کبد، طحال و روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ایمن شده با آنتی ژن ویبریو آنگوئیلاروم

مصطفی اخلاقی [1*] زهرا مینوش سیاوش حقیقی [2] هادی منصوری [3]

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

۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی، کرمانشاه - ایران.

۳) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۳ آذر ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری ویبریوزیس یکی از بیماری‌های مهم در صنعت آبزی‌پروری است که با واکسیناسیون قابل پیشگیری می‌باشد. **هدف:** در این تحقیق بمنظور بررسی موقعیت قرارگرفتن لیپوپلی‌ساکارید دیواره سلولی باکتری ویبریو آنگوئیلاروم به عنوان آنتی‌ژن تزریقی در سطح سلولی بافت‌های کبد، طحال و قسمت قدامی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایمن‌شده مورد مطالعه ایمونوسیتوشیمی در سطح میکروسکپ الکترونی قرار گرفت. **روش کار:** یک‌ساعت پس از تزریق آنتی‌ژن فوق به روش داخل صفاقی، از بافت‌های مورد نظر نمونه‌گیری و مقاطع آماده شده به روش رنگ‌آمیزی ایمنی غیرمستقیم با استفاده از آنتی بادی پلی‌کلونال خرگوش علیه لیپوپلی‌ساکارید باکتری، نشاندارشده با پروتئین A متصل به طلا تهیه شدند. مقاطع بوسیله میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفته و محل تلاقی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی نشاندار شده بعنوان مکان‌های انتشار لیپوپلی‌ساکارید در سطح سلول مشخص گردید. در کنترل نوع اول از آنتی بادی خرگوش متصل به آنتی ژن ویبریو آنگوئیلاروم (ترکیب آنتی ژن و آنتی بادی) و در کنترل نوع دوم از سرم پیش ایمن خرگوش که فاقد آنتی بادی بر علیه آنتی ژن‌های مورد نظر بود بعنوان کنترل‌های منفی استفاده شد. **نتایج:** در بررسی مقاطع تهیه‌شده به روش ایمونوسیتوشیمی، مشخص شد که نشان‌ها در سرتاسر سطوح سلولی بافت‌های مذکور اعم از سیتوپلاسم، هسته، فضای بین سلولی، غشاء پایه و بافت همبند توزیع یافته‌اند. در اکثر موارد تراکم نشان‌ها در سیتوپلاسم بیشتر از هسته بود. در مورد کنترل‌های منفی نیز همچنان که انتظار می‌رفت، هیچ گونه نشانی در سطح سلول مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** در این مطالعه نشان داده شد که لیپوپلی‌ساکارید ویبریو آنگوئیلاروم در تمامی سطوح سلولی کبد، طحال و روده قدامی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایمن‌شده گسترش یافته بود.

واژه‌های کلیدی: ایمونوسیتوشیمی، قزل‌آلای رنگین‌کمان، ایمن‌سازی، ویبریو آنگوئیلاروم.

مقدمه

توسعه آبزی پروری، نقش عمده‌ای را در تأمین غذای بشر و اقتصاد کشورهای جهان به‌عهده دارد. در مزارع پرورشی ماهی‌ها بواسطه تراکم، بروز و شیوع بیماری‌ها با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد. از آنجا که محیط آبی مورد استفاده سایر موجودات آبزی، جانوران اهلی، وحشی و حتی انسان قرار می‌گیرد، استفاده از ترکیبات دارویی را در درمان بیماری‌های آبزیان با محدودیت‌هایی مواجه کرده است. از این رو واکسیناسیون بعنوان یک راه مناسب برای پیشگیری از شیوع و گسترش بیماری‌ها در محیط آبی پیشنهاد می‌شود(۱). از جمله این واکسن‌ها، واکسن ضد ویبریوزیس است که در پرورش ماهی‌های دریایی در قفس کاربرد فراوان دارد (۱۲).

جهت مطالعه استقرار ترکیب آنتی‌ژن - آنتی بادی در بافت‌ها می‌توان به مطالعه ایمنوسیتوشیمی قرار گرفتن موقعیت پروتیئن‌های غنی از پرولین در غدد بزاقی پاروتید (۵) همچنین از سلول‌های آندوکرین معده‌ای - روده‌ای (۶،۷) و موقعیت قرارگرفتن آنتی‌ژن پپتیدهای سنتزی در ماهی‌های شعاع باله (۸) اشاره داشت. بهمین ترتیب در خصوص موقعیت آنتی ژن‌ها در بافت‌های انسانی (۳)، متعاقب آلودگی با بیماری‌های انگلی (۲،۱۰) بروش ایمونوسیتوشیمی و بیماری‌های ویروسی طیور (۹) بروش ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار گرفته است. در یک بررسی بوسیله میکروسکوپ الکترونی محل جذب واکسن خوراکی ویبریوانگوئیلاروم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مخاط روده بخصوص روده خلفی گزارش شده است (۱۱) و گزارشی در خصوص استقرار آنتی ژن‌های تزریقی در بافت کبد و طحال در فاصله کمی پس از تزریق آنتی‌ژن وجود ندارد. روش تزریق آنتی‌ژن‌های باکتریایی و ویروسی از معمول‌ترین و موثرترین روش‌های واکسیناسیون علیه بیماری‌های عفونی ماهی بشمار می‌رود.

در اجرای پروژه تحقیقاتی مطالعه روش‌های ایمن سازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، با توجه به وضعیت خون‌رسانی اندام‌هایی همچون کبد، طحال و روده و همچنین نقش آنها در سیستم ایمنی ماهی و از طرفی حساس بودن این اعضا در تهاجم طبیعی بیماری ویبریوزیس، این سه عضو بعنوان بافت‌های مورد مطالعه در این تحقیق انتخاب شدند. لازم به ذکر است که در این مطالعه ردیابی آنتی‌ژن در سطح بافت، توسط آنتی بادی تهیه شده علیه آنتی ژن لیپوپلی ساکارید ویبریو متصل به طلا

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

(pAg) صورت گرفته و وضعیت گسترش و پراکندگی آنتی ژن در سطح سلول به روش ایمنوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین A توسط بیشتر سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس تولید شده و به پپتیدوگلیکان دیواره سلولی متصل است. ساختار اصلی این مولکول نسبت به گرما بسیار پایدار است. ویژگی این پروتئین توانایی واکنش اختصاصی با قسمت Fc تعداد زیادی از ایمونوگلوبولین‌های پستانداران بخصوص از نوع G و ایمنوگلوبولین‌های ماهی از نوع M می‌باشد. بنابراین می‌توان از این پروتئین بجای آنتی بادی ثانویه استفاده کرد. یک مولکول پروتئین A قادر به واکنش با تمایل پائین با قسمت Fab مولکول آنتی بادی هم می‌باشد. پروتئین آ را می توان با تعداد زیادی از مارکرها مثل طلای کلوئیدی، فریتین و آنزیمها برای تعیین موقعیت آنتی ژن‌های مختلف داخل بافتی در سطح میکروسکوپ نوری و الکترونی بکار برد (۵).

مواد و روش کار

ماهی: ده قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی سالم با وزن متوسط ۱۰۰g از یک کارگاه پرورش ماهی منطقه کهمره سرخی استان فارس بدون داشتن سابقه بیماری، تهیه و سلامتی آنها پس از آزمایش‌های باکتریایی و انگلی مورد تائید قرار گرفت. ۵ قطعه از این ماهی‌ها با تزریق ۰/۱cc معادل ۱۰µg از لیپوپلی ساکارید (LPS) تهیه شده از دیواره سلولی باکتری ویبریو آنگوئیلاروم بصورت تزریق داخل صفاقی ایمن سازی شدند (۴). پس از گذشت یک ساعت از زمان تزریق آنتی ژن و اطمینان از مدت زمان لازم جهت گردش کامل آنتی ژن توسط جریان خون، ماهی‌ها از آب خارج شده و سپس دو قطعه از ماهی‌های ایمن شده و دو قطعه از ماهی‌های ایمن نشده کالبد گشایی و از اندام‌های کبد، طحال و بخش قدامی روده، نمونه‌هایی به ابعاد تقریبی ۰/۵cm انجام شد.

مراحل تهیه مقاطع بسیار نازک جهت مطالعه در سطح میکروسکوپ الکترونی: **الف)** جداسازی نمونه: قطعاتی با ابعاد ۰/۵cm مکعب از بافت‌های کبد، طحال و روده ماهی قزل آلای رنگین کمان جدا شده بعد از سه بار شستشو در محلول سرم فیزیولوژی، در محلول پایدارکننده گلوتار آلدهید ۴٪ قرار گرفته و به آزمایشگاه بافت شناسی جهت تهیه مقاطع بسیار نازک میکروسکوپ الکترونی به روش استاندارد ذکر شده توسط بتزولا و راسل منتقل گردید (۳).

ب) پایدارسازی بافت: نمونه‌ها در ظرف حاوی گلوتارآلدهید ۴٪ قرار گرفته و پس از دو ساعت محلول پایدارکننده اولیه خارج و گلوتارآلدهید تازه به نمونه‌ها اضافه شد. در نهایت محلول پایدارکننده خارج گردیده و چهار بار، هر بار بمدت نیم ساعت نمونه‌ها با بافر شستشو شده و سپس به آنها محلول تتراکسید اسمیوم ۲٪ اضافه گردید. تتراکسید اسمیوم علاوه بر خاصیت پایدارسازی قوی موجب رنگ پذیری غشاء سلولی نیز می‌گردد.

ج) آبگیری: ابتدا جهت پاک شدن نمونه‌ها از تتراکسید اسمیوم، آنها را به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر شستشو داده و سپس با اتانول 70^{o} و ۹۵ سه بار و با اتانول 100^{o} یکبار هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه آبگیری شدند.

د) شفاف سازی: در این مرحله دو بار به نمونه‌های بافتی اکسید پروپیلن ۱۰۰٪ اضافه شده و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه نمونه‌ها در محلول فوق قرار داده شدند.

ذ) نفوذ دادن: در این مرحله مخلوطی از اکسید پروپیلن و رزین به میزان مساوی تهیه و به نمونه‌ها اضافه گردید، سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شدند. بعد از این مدت محلول تخلیه شده و رزین خالص به نمونه‌ها اضافه گردید.

ر) قالب گیری: در این مرحله قطعات بافتی در ته کپسول‌های پلاستیکی گذاشته و بر روی آنها رزین ریخته شد و سپس کپسول‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در آون 60^{o} قرار گرفتند تا رزین پلی مریزه و سخت گردد.

ز) مقطع گیری: شامل تهیه مقاطع نازک به ضخامت ۶۰nm بوسیله دستگاه اولترا میکروتوم جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی بود. در این مرحله مقاطع نازک بافت‌های نرمال کبد، طحال و روده ماهی روی گریدهای مسی ۱۰۰ مش قرار داده شده و آماده رنگ‌آمیزی گردیدند.

و) رنگ‌آمیزی (رنگ‌آمیزی مقاطع نازک): مقاطع نازک تهیه شده ابتدا بوسیله یورانیل استات (۳۰ دقیقه) و سپس توسط سیترات سرب (۵ دقیقه) مورد رنگ آمیزی قرار گرفته، با آب مقطر شستشو و پس از خشک شدن کامل در جعبه‌های مخصوص قرار گرفتند. مقاطع آماده شده، توسط میکروسکوپ الکترونی فیلیپس مدل CM10-TEM ساخت کشور هلند مورد بررسی و عکس برداری قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی به روش غیر مستقیم (رنگ‌آمیزی مقاطع نازک با استفاده از آنتی بادی و pAg): ابتدا مقاطع نازک بافت بر روی گریدهای نیکل قرار گرفته و سپس عملیات ذیل بر روی آنها صورت پذیرفت. ۱- گریدها از طرفی که مقاطع به آنها چسبیده بود بر روی یک قطره PBS به حجم ۴۰µL و حاوی ۰/۱٪ او آلبومین به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شدند. ۲- در مرحله بعد قطرات آنتی بادی اولیه یعنی آنتی بادی ضد LPS ویبریو آنگوئیلاروم رقیق شده با سرم فیزیولوژی به نسبت حجمی ۱:۲۰ (V/V) که در آزمایشات اولیه بعنوان رقت مناسب این آزمایش تعیین گردیده بود) بر روی مقاطع قرار داده شده و گریدها به مدت ۳ تا ۴ ساعت در حرارت اتاق قرار گرفتند. سپس گریدها با سرم فیزیولوژی به آرامی شستشو داده شده و بر روی قطرات pAg منتقل گردیدند و به مدت ۲ ساعت در حرارت اتاق نگهداری و سپس شستشو شدند. در خاتمه مقاطع با محلول استات یورانیل اشباع شده در آب و سیترات سرب، رنگ آمیزی شده و بوسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

کنترل‌های ایمونوسیتوشیمی: هم‌زمان با رنگ آمیزی ایمنی مقاطع کبد، روده و طحال ماهیان ایمن شده با آنتی ژن ویبریو، دو نوع کنترل، جهت بررسی صحت روش رنگ‌آمیزی ایمنی و نشاندار شدن مقاطع انجام گرفت.

کنترل ۱: مقادیر مساوی از LPS بدست آمده از باکتری ویبریو با آنتی بادی ضد LPS بدست آمده از خرگوش تهیه و به مدت ۴۸ ساعت در یخچال $4^{o}C$ قرار داده شد. سپس این محلول بر روی گریدهای حاوی مقاطع نازک قرار داده شده و ب روش شرح داده شده مورد رنگ آمیزی ایمنی قرار گرفتند.

کنترل ۲: در کنترل نوع دوم از سرم پیش ایمن خرگوش استفاده شده و گریدها به روش شرح داده شده مورد رنگ‌آمیزی ایمنی قرار گرفتند.

آزمایش الیزا: اختصاصی بودن سرم ایمن شده علیه آنتی ژن ویبریو انگوئیلاروم با استفاده از روش الیزای غیر مستقیم و استفاده از کانژوگه HRP^{o} خوک علیه خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. همچنین عکس العمل ایمنی هومورال تعداد باقی مانده از ماهی های ایمن شده پس از ۲۱ روز بروش الیزا بررسی گردید (۴).

نتایج

طحال: مطالعه مقاطع تهیه شده از طحال ماهی ایمن شده با استفاده از تزریق داخل صفاقی LPS نشان داد که آنتی بادی‌های ضد LPS تهیه شده در خرگوش که بوسیله pAg نشاندار شده بودند در قسمت‌های مختلف سلول شامل سیتوپلاسم و هسته به آنتی ژن‌های باکتری متصل شدند. بعلاوه در فضاهای بین سلولی هم تراکم نشان‌ها قابل مشاهده بود. در اکثر موارد سیتولاسم سلول نسبت به هسته دارای نشان‌های بیشتری بود (تصویر ۱). بررسی مقاطع حاصل از هر دو نوع کنترل با استفاده از سرم پیش ایمن خرگوش (تصویر ۲) و مخلوط آنتی ژن و آنتی بادی فاقد نشان حاصل از واکنش آنتی ژن - آنتی بادی در سطح بافت بودند.

کبد: در بررسی مقاطع تهیه شده از کبد براساس روش ایمن سازی نتایج زیر به دست آمد: نشان‌ها در تمام سطح سلول، فضاهای بین سلولی، روی غشاء پایه و بافت همبند زیر آن داخل مویینه‌های صفراوی دیده شدند (تصویر ۳).

در بررسی مقاطع کنترل از بافت کبد با استفاده از سرم پیش ایمن خرگوش و مخلوط آنتی ژن و آنتی بادی هیچگونه نشانی در سطح سلول‌ها و بین آنها نشان داده نشد (تصویر ۴).

روده قدامی: مقاطع تهیه شده از روده قدامی با روش ایمن سازی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و نتایج زیر حاصل شد: در این مقاطع نشان‌ها بر روی ارگانل‌های سیتوپلاسمی سلولهای جذبی روده، روی گرانول‌های ترشحی سلول‌های گابلت، میکروویلی، روی اندوتلیوم عروق خونی و فیبرو بلاست‌ها در بافت پیوندی مشاهده شدند (تصویر ۵) بررسی مقاطع کنترل با استفاده از سرم پیش ایمن خرگوش و مخلوط آنتی ژن و آنتی بادی مجدداً هیچگونه نشانی را در سطح سلول نشان نداد (تصویر ۶).

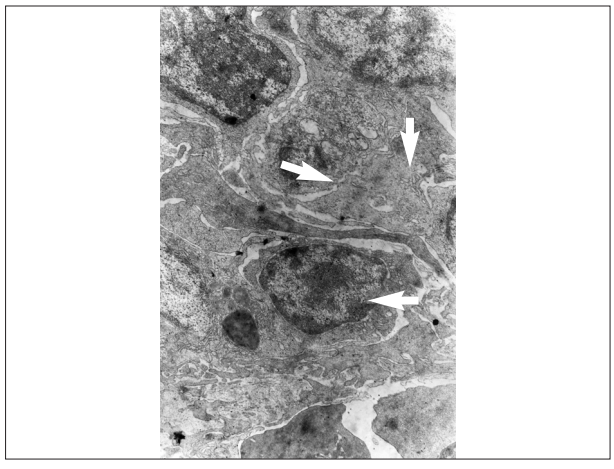
آزمایش الیزا: سرم ایمن تهیه شده در خرگوش و ماهی قزل آلای رنگین‌کمان علیه آنتی ژن‌های ویبریو آنگوئیلاروم تیتر بسیار خوبی (بترتیب میانگین جذب نوری ۲/۱۳ و ۱/۲۸ در مقایسه با کنترل ۰/۱۵۸nm و ۰/۱۶۲ در ۴۹۰) نشان دادند.

بحث

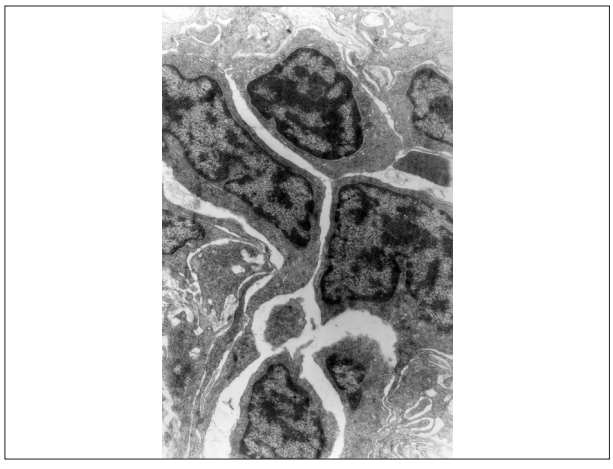
این تحقیق به منظور بررسی وضعیت کیفی پاسخ ایمنی بافت‌های کبد، طحال و روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان علیه باکتری ویبریو آنگوئیلاروم انجام گرفت. هدف از ایمن سازی ایجاد محافظت در برابر این باکتری با تحریک سیستم ایمنی به روش‌های واکسیناسیون می‌باشد که در مواجهه با ارگانیسم عامل بیماری روش کارآمدی ارزیابی گردیده و موجب ایجاد حفاظت در سطح قابل قبولی می‌شود (۱). ایمونوسیتوشیمی تکنیکی بافت شناسی برای شناسایی محل قرار گرفتن آنتی ژن‌ها در سطح بافت بکار گرفته می‌شود. این مطالعه که به شیوه غیرمستقیم که حساسیت بیشتری نسبت به روش مستقیم دارد با استفاده از pAg انجام شد، ابتدا آنتی بادی علیه آنتی ژن ویبریو در خرگوش تهیه و در سطح بافت‌های مورد نظر به آنتی ژن اختصاصی آن اتصال یافته و سپس با pAg پوشش داده شد که قسمت پروتئین A آن به قسمت ثابت زنجیرهٔ سنگین ایمونوگلوبولین G پلی کلونال بدست آمده از خرگوش متصل می‌گردد و قسمت طلای کلوئیدی بعلت الکترون دنس بودن، امکان مشاهدهٔ محل اتصال آنتی ژن و آنتی بادی را در سطح میکروسکوپ الکترونی فراهم می‌آورد. این ذرات طلای کلوئیدی آب گریز بوده و در سطح مولکول ایجاد بار منفی می‌نمایند. استفاده از اوالبومین در تکنیک ایمونوسیتوشیمی برای حذف پروتئین‌های غیراختصاصی موجود در سرم خرگوش که آنتی‌بادی از آن گرفته شده و همچنین پروتئین‌های غیراختصاصی موجود در سطح بافت و جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی pAg با سایر پروتئین‌های سرم یا بافت و جلوگیری از ایجاد واکنش‌های مثبت کاذب می‌باشد (۵). غلظت آنتی بادی‌های اولیه بسیار مهم هستند زیرا غلظت بالای آن موجب رنگ پذیری بیش از حد زمینه و سیگنال‌های غیراختصاصی می‌گردد. تراکم آنتی ژنها در سطح بافت، غلظت آنتی بادی، نوع مادهٔ پایدارکننده و نوع آنتی بادی مورد استفاده در روش تشخیص همگی در نتیجهٔ نهایی مطالعهٔ ایمیونوسیتوشیمی تأثیرگذار هستند (۲).

بررسی میکروگراف‌های طحال در سطح میکروسکوپ الکترونی با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی در نمونه‌های ایمن سازی شده پراکندگی نشان‌ها در سرتاسر سلول از جمله سیتوپلاسم و هسته و حتی فضاهای بین سلولی را مشخص نمود. این امر مبین آن است که پس از تزریق به حفرهٔ صفاقی ماهی، آنتی ژن از طریق جریان خون به طحال وارد شده و در سرتاسر بافت گسترش یافته‌اند.

بررسی مقاطع هر دو نوع کنترل در روش‌های ایمن سازی فعال و غیر فعال همانطور که انتظار میرفت فاقد هر گونه نشانی بود زیرا در این موارد کنترل منفی، تمامی محل‌های اتصال آنتی بادی با آنتی ژن اشغال شده و

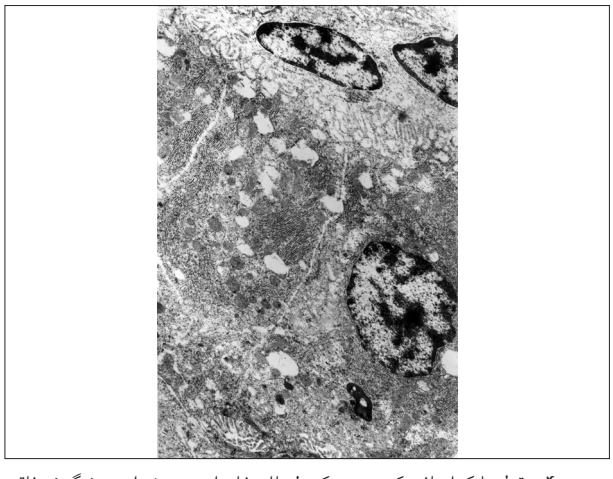


تصویر ۱- مقطع نازک از بافت طحال، پراکندگی نشان‌ها در روش ایمن سازی را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب، بزرگنمایی ۶۶۰۰X).



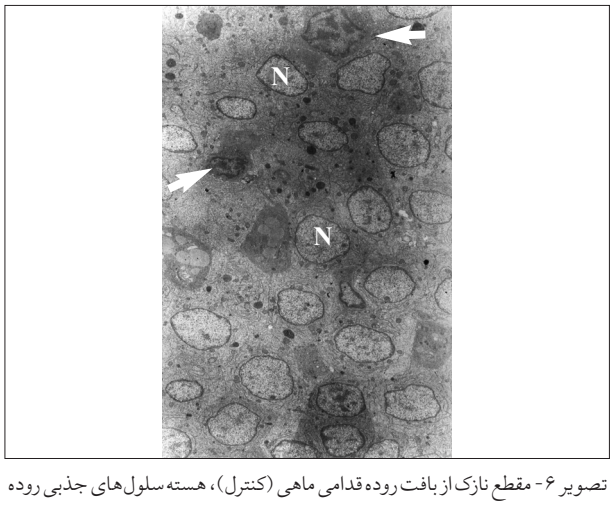
تصویر ۲- مقطع نازک از بافت طحال، نمونه‌کنترل با استفاده از سرم پیش ایمن خرگوش فاقد نشان‌ها می‌باشد (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب، بزرگنمایی ۵۲۰۰X).

تصویر ۳ ـ مقطع نازک از بافت کبد، پراکندگی نشان‌ها در روش ایمن سازی را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب، بزرگنمایی ۶۶۰۰X).



تصویر ۴- مقطع نازک از بافت کبد، نمونه‌کنترل با استفاده از سرم پیش ایمن خرگوش فاقد هرگونه نشان می‌باشد (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب، بزرگنمایی ۸۲۰۰X).

تصویر ۵- مقطع نازک از بافت روده قدامی ماهی در روش ایمن سازی، وجود نشان‌ها در سراسر پارانشیم و فضای بین سلولی قابل مشاهده هستند (رنگ آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب، بزرگنمایی ۶۶۰۰X).



تصویر ۶- مقطع نازک از بافت روده قدامی ماهی (کنترل)، هسته سلول‌های جذبی روده (N) و سلول‌های دفاعی در بافت مخاطی نفوذ کرده اند (نوک پیکان‌ها)، هیچ نشانی مشاهده نمی شود (رنگ آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب، بزرگنمایی ۲۲۰۰X).

اجازهٔ اتصال به آنتی ژن‌های بافتی و در نتیجه پوشش با pAg داده نمی‌شود و در کنترل دیگر نیز که از سرم فاقد آنتی بادی استفاده شده بود آنتی ژن ویبریو اتصال نمی یابد پس محلی برای پوشش با pAg و ردیابی در سطح میکروسکوپ الکترونی وجود ندارد.

براساس نتایج ایمیونوسیتوشیمی در کبد، گسترش نشان‌ها در سرتاسر سطح سلول‌ها از جمله بر روی شبکهٔ اندوپلاسمی خشن، میتوکندری‌ها، گرانول‌های ترشحی، داخل مویینه‌های صفراوی و غشاء پایه دیده شد که مجدداً می‌توان نتیجه گیری نمود که لیپوپلی ساکارید باکتری ویبریو آنگوئیلاروم پس از تزریق از طریق عروق خونی صفاقی در فرصت یک ساعته به تمامی نقاط کبد گسترش می‌یابند. بررسی مقاطع کنترل نیز به دلایل ذکر شده فاقد هرگونه نشانی بود.

در مورد رودهٔ قدامی هم نشان‌ها در سطح سیتوپلاسم سلولی، هسته، ارگانل‌های سلولی، سلول‌های گابلت، بر روی اندوتلیوم و گلبولهای قرمز موجود در بافت همبند و روی میکروویلی روده دیده شد که باز هم نشان‌دهندهٔ گسترش نشان‌ها از طریق خون به داخل بافت پیوندی روده و از آنجا در سطح آنتروسیت‌ها و میکروویلی روده می‌باشد. بررسی مقاطع کنترل نیز مجدداً فاقد نشان بود. از آنجا که هر سه این ارگان‌ها (کبد، طحال و روده) در محوطهٔ صفاقی قرار دارند با تزریق آنتی بادی ضد لیپوپلی ساکارایدویبریو آنگوئیلاروم به محوطهٔ صفاقی، آنتی ژن بلافاصله از طریق عروق خونی به یک میزان وارد این اعضا شده و در سطح بافت گسترش می‌یابد. از طرفی این سه ارگان در تهاجم طبیعی باکتری عامل بیماری نیز بعنوان سه ناحیهٔ هدف، محسوب می‌شوند. در یک بررسی محل جذب واکسن خوراکی ویبریو آنگوئیلاروم در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مخاط روده بخصوص رودهٔ خلفی گزارش شده است (۱۱). در این مطالعه گسترش نشان‌های حاصل از ایمن‌سازی بخوبی در سطح بافت‌های کبد، طحال و روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با روش ایمونوسیتوشیمی مشخص گردید. با توجه به مدت زمان یک ساعته از تزریق تا خارج کردن این سه عضو در تحقیق جاری بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میتوان بیان داشت که در این زمان آنتی‌ژنها در سطوح بافتی بخوبی گسترش یافته‌اند. واکسیناسیون علیه ویبریوزیس با استفاده از آنتی ژن‌های مختلف معمولاً از سن سه هفتگی به بعد در آزاد ماهی‌ها انجام می‌گیرد (۱۳،۱۴). روش ایمن سازی بایستی توانایی حفاظت از ماهی‌ها را در مواجهه با عامل بیماری در تمام طول دورهٔ پرورش داشته و بتواند سریعاً تیتر آنتی بادیهای خنثی کننده در سرم را برای مقابله با باکتری افزایش دهد. مطالعه استقرار آنتی ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه در بافت‌های ماهی پس از استفاده بر وش خوراکی و غوطه‌ورسازی مطالعات بعدی را تشکیل می‌دهند.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز برای تأمین هزینه‌های این تحقیق، از کارشناسان محترم بخش‌های آبزیان، میکروسکوپ الکترونی و بافت شناسی دانشکده که در این تحقیق همکاری داشتند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Austin, B., Austin, D.A. (2007) Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish. (4th ed.) Springer Praxis Publishing, Chichester, UK.
2. Alves, L.C, Brayner, F.A, Silva, L.F, Pimentel, R.C, Rocha, A., Peixoto, CA. (2002) Immunocytochemical localization of antigens recognised by tropical pulmonary eosinophilia and individuals with intestinal helminths antisera in microfilaria of *Wuchereria bancrofti*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 34: 211-216.
3. Bozzola, J.J., Russell, L.D. (1999) Electron microscopy: principles and techniques for biologists. (2nd ed.). Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA.
4. Ghazi, S., Akhlaghi, M. (1998) Serum antibodies against *Vibrio anguillarum* in cultured rainbow trout. Iran. J. Fish. Sci.(In Persian). 6: 47-58.
5. Kleinz, M.J., Davenport, A.P. (2004) Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. Regul. Pept. 118:119-125.
6. Nascimento, AA., Sales, A., Cardoso, TRD., Pinheiro, NL., Mendes, RMM. (2007) Immunocytochemical study of the distribuition of endocrine cells in the pancreas of the brazilian sparrow species *Zonotrichia capensis subtorquata* (Swaison, 1837). Braz. J. Biol. 67: 132-139.
7. Santos, C.M., Nascimento, A.A., Peracchi, A.L., Sales, A., Mikalauskas, J.S., Gouveia, SF. (2008) Immunocytochemical study of gastrintestinal endocrine cells in insectivorous bats (Mammalia: Chiroptera). Braz. J. Biol. 68: 68-79.

8. Shimizu, A., Tanaka, H., Kagawa, H. (2003) Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. Gen. Comp. Endocrinol. 132: 35-45.
9. Siavosh Haghighi, Z.M., Tavasoly, A., Shoshtary, A., Bahmaninejad, M.A., Marjanmehr, S.H. (2008) An experimental study on early pathogenesis of a very virulent isolate of infectious bursal disease virus, employing immunohistochemistry. Iran. J. Vet. Res. 10: 125-131.
10. Silva, L.F., Alves, L.C., Brayner, F.A., Peixoto, C.A. (2003) Immunocytochemical localization of antigens recognized by human antisera in infective larvae of *Wuchereria bancrofti*. J. Parasitol. 89:501-506.
11. Suzuki, N. (1993) Electron microscopic study on intestinal epithelium of marine teleost, *Acanthogobius flavimanus*, with reference to the adaptie functions. Bull. Nanset- Natl. Fish. Res. Inst. 26: 113-132.
12. Totland, G.K., Nylund, A., Holmko, K. (1988) An ultrastructural study of morphological changes in atlantic salmon during development of cold water vibriosis. J. Fish Dis. 11:1-13.
13. Wang, S.Y., Lauritz, J., Jass, J., Debra Milton, L. (2003) Role for the major outer-membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation. Microbiol. 149: 1061-1071.
14. Welch, T.J., Crosa J.H. (2005) Novel role of the lipopolysaccharide O_1 side chain in ferric siderophore transport and virulence of *Vibrio anguillarum*. Infect. Immunity 73: 5864 - 5872.

J. Vet. Res. 67, 2:191-197, 2012

Immunocytochemical study on liver, spleen and intestine of rainbow trout immunized with *Vibrio anguillarum* lipopolysaccharide

Akhlaghi, M.[1*], Siavosh Haghighi, Z.M.[2], Mansouri, H.[3]

[1]*Aquatic Animal Health Unit, Department of Clinical Studies, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.*

[2]*Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah- Iran.*

[3]*Department of Basic Sicences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.*

(Received 4 December 2011 , Accepted 29 February 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Vibriosis has been recognized as a major bacterial disease in aquaculture industry. The development of effective vaccines has significantly reduced the impact of this disease. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to follow distribution of the antigenic *Vibrio anguillarum* cell wall lipopolysaccharide (LPS) in liver, spleen and anterior intestinal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immunocytochemistry. **METHODS:** Rainbow trout was intraperitoneally injected with *V. anguillarum* LPS. One hour later, liver, spleen and anterior intestine samples were collected to study the LPS distribution in the tissue sections using immunocytochemistry and Transmission Electron Microscope. Rabbit polyclonal antibody against the protein-A gold (pAg) labeled-LPS was applied to show electron density of the pAg using an indirect immunocytochemical method at the site of antigen- antibody interaction on the fish tissues. A pre-absorbed immune rabbit antibody and a pre-immune rabbit serum were considered as negative controls. **RESULTS:** Results showed that the labels were evenly distributed over cell cytoplasm, nucleus, intracellular spaces, basal membrane and connective tissue in the liver, spleen and anterior intestine. In most cases, more labels were detected in cytoplasm than nucleus while no label was observed in negative controls. **CONCLUSIONS:** Immunocytochemical study of tissues and cells in the immunized fish with *V. anguillarum* LPS showed extensive distribution of the antigen in hepatocytes, splenocytes and enterocytes.

Key words: immunocytochemistry, rainbow trout, immunization, *Vibrio anguillarum*.

Figure Legends and Tabel Captions

Figure 1. A thin section of the fish spleen showing distribution of the labels at the site of antigen- antibody interaction on fish tissue (Uranyl acetate and lead citrate staining 6600 X).

Figure 2. A thin section of the fish spleen with no labels (negative control) using pre- immune rabbit serum (Uranyl acetate and lead citrate staining 5200 X).

Figure 3. A thin section of the fish liver showing distribution of the labels at the site of antigen- antibody interaction on fish tissue (Uranyl acetate and lead citrate staining 6600 X).

Figure 4. A thin section of the fish liver with no label (in negative control) using pre- immune rabbit serum (Uranyl acetate and lead citrate staining 8200 X).

Figure 5. A thin section of the fish anterior intestine showing distribution of the labels over cell cytoplasm, nucleus and intracellular spaces (Uranyl acetate and lead citrate staining 6600 X).

Figure 6. A thin section of the fish anterior intestine with no label (in negative control), cell nucleus (N) and tissue macrophages (arrows) (Uranyl acetate and lead citrate staining 2200 X).

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