تاثیر روند بیماری‌زایی حاد و تحت حاد لاکتوکوکوزیس بر فاکتورهای خونی و برخی فاکتورهای ایمنی ذاتی در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان

تکاور محمدیان[1*]
مینا طهماسبی[2]
محمد خسروی[3]
مهدی پور مهدی بروجنی[4]

۱. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲. دانش آموخته‌ی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

***مسئول مکاتبات:**
tak.mohammadian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۴
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

خلاصه

هدف این مطالعه ارزیابی علائم بیماری، تغییر فاکتورهای خون‌شناسی و برخی از فاکتورهای ایمنی ذاتی در عفونت *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است. تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی در ۳ گروه شامل عفونت حاد لاکتوکوکوس گارویه، عفونت مزمن لاکتوکوکوس گارویه و یک گروه کنترل بدون آلودگی تقسیم‌بندی شدند. گروه عفونت حاد با ۸۰ درصد میزان LD50 و گروه مزمن با ۴۰ درصد میزان LD50 به‌صورت تزریق داخل صفاقی در یک نوبت آلوده شدند. در روزهای ۰، ۱، ۳، ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق، نمونه خون و بافت (مغز، کلیه قدامی و طحال) از هر گروه (هر مرحله ۶ ماهی) اخذ گردید. در بررسی بالینی، بی‌حالی، اگزوفتالمی و آسیب و تلفات بالا در گروه غلظت بالا به‌صورت واضح‌تری مشاهده شد. فعالیت لایزوزیم سرم و مایلوپرواکسیداز در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل به شکل معنی‌داری افزایش‌یافته بود ($P<0/05$). نتایج نشان‌دهنده کاهش سطح هماتوکریت و هموگلوبین در تیمارها بود ($P<0/05$). گلبول‌های سفید در گروه‌های تیمار در روز ۳ به شکل واضحی افزایش پیداکرده بودند ($P\leq0/05$). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، عفونت حاد قزل‌آلای رنگین‌کمان با *لاکتوکوکوس گارویه* در مقایسه با عفونت مزمن سبب تغییر بیشتر فاکتورهای خونی و ایمنی‌شناسی شد. اگرچه در گروه مزمن نیز نشانه‌های بیماری و همچنین تغییر در فاکتورهای ذکرشده ثبت شد.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، لاکتوکوکوس گارویه، بررسی بالینی، ایمنی ذاتی.

مقدمه

بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* سبب بروز خسارت‌های اقتصادی فراوان در صنعت آبزی‌پروری در جهان شده و از چندین گونه ماهیان آب شیرین، شور و لب‌شور گزارش‌شده است (Akhlaghi and Mahjoor, 2000). قزل‌آلای رنگین‌کمان از همه ماهیان به این بیماری حساس‌تر بوده و تلفات بیشتری می‌دهد. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز در تمامی سنین و اندازه‌ها یعنی از بچه ماهی تا بالغ‌های بزرگ‌تر از یک کیلوگرم می‌تواند به این بیماری مبتلا شود. این باکتری میزبان‌های متعددی دارد و فقط به جانوران آبزی محدود نمی‌شود. این پاتوژن از عفونت پستان گاو، تورم پستانی گاومیش، گوشت مرغ، شیر گاو، فرآورده‌های گوشتی به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب جداسازی شده است. *لاکتوکوکوس گارویه* عامل عفونی‌زای مشترک در ماهیان و انسان می‌باشد.

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019

لاکتوکوکوس گارویه یک باکتری بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک، بدون اسپور، کوکسی گرم مثبت و به‌صورت جفتی با زنجیره‌های کوتاه دیده‌شده و در آگار خون، همولیز آلفا تولید می‌کند. *لاکتوکوکوس گارویه* اسکولین و آرژنین را هیدرولیز کرده، اما کازئین، ژلاتین و هیپورات سدیم را هیدرولیز نمی‌کند و کاتالاز و اکسیداز منفی است. بسیاری از قندها مثل گالاکتوز، دی‌فروکتوز، دی‌مانوز، سلوبیوز، مانیتول، اسکولین، دی‌گلوکز، مالتوز، سوربیتول و ترهالوز را تخمیر و تولید اسید می‌نماید، ولی بقیه قندها مانند اینوزیتول، گلیکوژن، گلیسرول، نشاسته، لاکتوز، آدنیتول، دی‌آرابینوز، رافینوز و زایلوز را تخمیر نمی‌کند.

بیماری استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس ایجاد شده توسط *استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه* از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور می‌باشد (Soltani *et al.*, 2015) که سبب بروز خسارت‌های اقتصادی فراوان در صنعت آبزی-پروری در جهان شده و از چندین گونه ماهیان آب شیرین، شور و لب‌شور گزارش‌شده است (اخلاقی وهمکاران، ۱۳۸۱). تزریق درون صفاقی این باکتری به قزل‌آلای رنگین‌کمان هم موجب بروز علائم بیماری و سپس مرگ ماهی چند روز پس از تزریق می‌شود. لاکتوکوکوزیس معمولاً به‌صورت حاد بروز پیدا می‌کند و تعداد زیادی از ماهی‌ها را درگیر می‌سازد و گاهی اوقات موجب مرگ ۱۰۰-۸۰ درصدی ماهی‌ها می‌شود. در مطالعه‌ای Ghittino و Prearo (۱۹۹۲) علائم درمانگاهی این بیماری را بی‌حالی، بی‌اشتهایی، ملانوزیس، شنای تشنجی، اگزوفتالمی یک‌طرفه یا دوطرفه، خونریزی در اطراف چشم، باله‌ها و مقعد و درنهایت بیرون‌زدگی مقعد بیان نمودند. علائم هیستوپاتولوژی هم اغلب موارد در چشم‌ها و سایر اندام‌های داخلی دیده می‌شود. در مغز هم ضایعاتی در قسمت‌های مغز و مخچه دیده می‌شود که با تجمع ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها همراه است. در ماهیان بیمار معمولاً منتژیت حاد که به‌صورت یک‌لایه پرخون پوشاننده مغز نمایان می‌شود هم دیده می‌شود (Pereira *et al.*, 2004).

لاکتوکوکوزیس بسته به نوع میزبانی که آلوده می‌کند، بیماری‌های مختلفی ایجاد می‌نماید. پیشرفت بیماری در ماهی تا حدی متغیر بوده و نشان داده‌شده است که به حدت سویه جداسازی شده، میزبان مبتلا، مسیر ابتلا به بیماری، سن ماهی و دیگر فاکتورهای محیطی و کیفیت آب بستگی دارد. ازآنجاکه تابه‌حال تحقیق مستقلی بر روند بیماری‌زایی باکتری لاکتوکوکوس گارویه در ایران صورت نگرفته است، لذا در این مطالعه نشانه‌های بالینی، بیماری‌زایی و تغییرات فاکتورهای خونی و ایمنی در دو وضعیت عفونت حاد و مزمن با *لاکتوکوکوس گارویه* در سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هدف این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن حدود ۲۰ تا ۳۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش درود در استان لرستان تهیه گردید و تحت شرایط مناسب به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال یافت. برای انجام این مطالعه ماهیان به‌صورت تصادفی به ۳ گروه: ماهیان با آلودگی غلظت بالا، ماهیان با آلودگی غلظت پایین (مزمن) و گروه بدون آلودگی که هر گروه شامل ۳ تکرار (هر تکرار ۳۰ قطعه ماهی) بود در آکواریوم ۱۰۰ لیتری مجزا با شرایط مناسب (نزدیک به شرایط طبیعی پرورش ماهی) تقسیم و به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. روش ایجاد آلودگی در روز اول به‌صورت تزریق داخل صفاقی بود. گروه عفونت حاد با میزان ۳×۱۰^{۸} CFU/ml از باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* (جداسازی شده از ماهیان بیمار) و گروه عفونت مزمن با میزان (۳×۱۰^{۷}CFU/ml) از این باکتری با روش تزریق داخل صفاقی چالش داده شدند. برای این منظور باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* (جداسازی شده از ماهیان بیمار و تعیین هویت شده به روش مولکولی) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت آگار خون‌دار و محیط کشت مایع TSB کشت داده شدند. پس‌ازآن محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب انتهای لوله سه بار با سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد. پس‌ازاین

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019

مراحل، باکتری‌های رسوب یافته دوباره با استفاده ازسرم فیزیولوژی در حدود تراکم کدورت سنج مک‌فارلند شماره‌ی ۷ تنظیم ($۲/۱\times۱۰^{۹}$) و سپس با انجام رقیق‌سازی تراکم به $۱۰^{۹}$ باکتری در میلی‌لیتر به‌عنوان محلول ذخیره‌ی اصلی رسانده شد (Sun *et al.*, 2011) و با استفاده از رقت‌های متوالی از این محلول ($۱۰^{۵}$ الی $۱۰^{۹}$) و تزریق آن به‌صورت داخل صفاقی تلفات هر رقت به مدت ۴ روز ثبت و پس از مرگ ماهی‌ها، با کشت مجدد باکتری از اندام‌های داخلی، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی اطمینان حاصل گردید. نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار Probit، LD50 اندازه‌گیری گردید. در هر مرحله از نمونه‌برداری تمامی نمونه‌ها به‌صورت استریل کالبدگشایی شده و از کلیه قدامی، مغز و طحال ماهیان کشت داده شد. نمونه‌ها در محیط کشت آگار خون‌دار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و کشت‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوبه شدن موردبررسی قرار گرفتند و جدایه‌های کشت‌شده بر اساس شکل کلونی و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند.

به‌منظور ارزیابی اثر عفونت بر فاکتورهای خونی، مایلو پراکسیداز و میزان لایزوزیم سرم، از تعداد ۶ قطعه ماهی از هر تکرار در روزهای صفر، ۱، ۳، ۱۴ و ۲۱ روز پس از ایجاد عفونت، خون‌گیری و جداسازی سرم صورت گرفته و جهت آزمایشات مذکور در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تعداد گلبول‌های قرمز موجود در نمونه اولیه خون برحسب تعداد در هر میکرو لیتر، شاخص رقت و اندازه محفظه شمارش باید موردتوجه قرار گیرد. تعداد گلبول‌ها از رابطه زیر به دست می‌آید (Blaxhall and Daisley, 1973)

$$X\times 5 \times 200 \times 10 = X \times 10000 \text{ RBC/}\mu L$$

X = تعداد اریتروسیت‌های شمارش‌شده در ۵ خانه

هماتوکریت بیانگر تفکیک یا جداسازی گلبول‌های قرمز بر اساس جاذبه زمین می‌باشد. برای تعیین درصد هماتوکریت از روش میکرو هماتوکریت استفاده شد (Sahoo *et al.*, 1998). اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین و با استفاده از محلول درابکین انجام گرفت.

هموگلوبین (گرم درصد) = ۳۶/۸ × میزان جذب تست

در این آزمایش به دلیل اینکه از رقت ۱:۲۰ استفاده می‌گردد ۴ مربع شمارش می‌شوند و با توجه به اینکه فاصله لام و لامل نیز ۱/. میلی‌متر می‌باشد، تعداد گلبول‌های سفید از فرمول زیر به دست می‌آید (Sahoo *et al.*, 1998).

$$X \times 0/25 \times 10 \times 20 = X \times 50 \text{ WBC/}\mu L$$

X = تعداد لکوسیت‌های شمارش‌شده

برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید ابتدا از نمونه‌های خونی گسترش تهیه شد. پس‌ازآن لام‌ها را با قرار دادن در هوای آزاد خشک و با متانول تثبیت کرده و برای رنگ‌آمیزی آماده شدند. رنگ‌آمیزی به روش گیمسا انجام گرفت. بعد از ۱۵ دقیقه لام‌ها با آب مقطر و پس از ۵ دقیقه با آب معمولی شستشو داده شدند. لام‌ها در مجاورت هوا خشک‌شده و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید با شمارش حداقل ۱۰۰ سلول انجام و درنهایت تعداد هر یک از گلبول‌های سفید به‌صورت درصد بیان گردید (Blaxhall and Daisley, 1973).

میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز با اندکی تغییرات درروش Shahoo و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد؛ بدین منظور ۱۵ میکرو لیتر سرم به ۱۳۵ میکرو لیتر بافر HBSS اضافه شد، ۲۵ میکرو لیتر TMB20 میلی مولار و ۲۵ میکرو لیتر H2O220 میلی مولار با این مخلوط ترکیب شد و پس از ۲ دقیقه ۵۰ میکرو لیتر H_2SO_4 (۴ مولار) به محتویات میکرو تیوب‌ها اضافه گردید و سپس میکرو تیوب‌ها سانتریفیوژ شدند (۵ دقیقه با سرعت ۸ هزار دور در دقیقه) و درنهایت جذب نوری مایع رویی در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

۲۰ میکرو لیتر ازسرم در میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد، سپس ۸۰ میکرو لیتر از مخلوط باکتری میکرو کوک و بافر استات سدیم (۲۰ میلی‌گرم از باکتری در ۱۰۰ میلی‌لیتر از استات بافر با pH 6) به گودها اضافه شد و در گودهای یک ستون هم به عنوان کنترل فقط ۱۰۰ میکرو لیتر از مخلوط باکتری و بافر لیزوزیم اضافه گردید و در انتها جذب نوری نمونه‌ها پس از پنج دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد

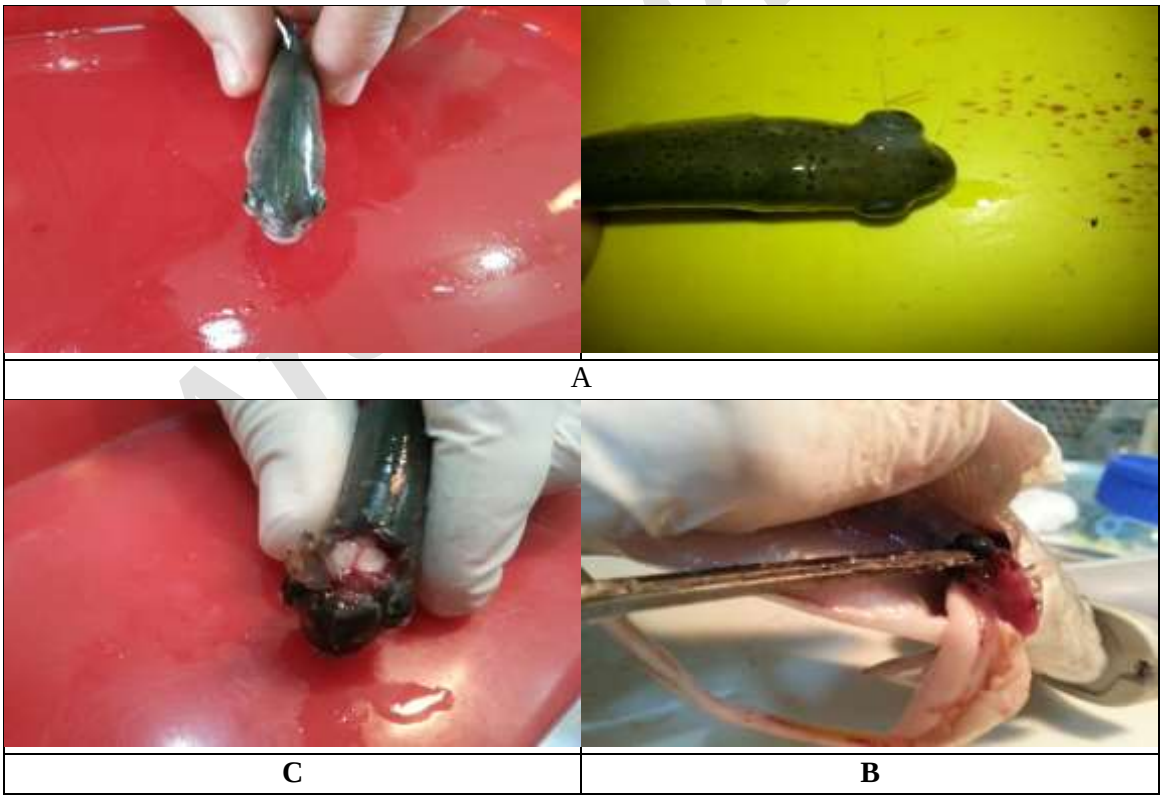
Archive of SID

www.SID.ir

(Ellis, 1990). بررسی توصیفی و تحلیلی داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت، تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس دوطرفه و تحلیل همبستگی و رگرسیون خطی انجام شد.

نتایج

پس از تزریق باکتری جهت تعیین LD50، به مدت یک هفته تلفات ثبت گردید شروع تلفات از ۴۸ ساعت بعد از تزریق باکتری به ماهی اتفاق افتاد. بیش‌ترین تلفات ۹۶ ساعت بعد از تزریق بود که مربوط به رقت 10^{9} باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* می‌شد. در نهایت LD50 برای عفونت مزمن به میزان 3×10^{7}CFU/ml و برای عفونت حاد، میزان 3×10^{8}CFU/ml به دست آمد. در این مطالعه بی‌حالی، شنای عصبی، اگزوفتالمی یا بیرون‌زدگی یک یا دو طرفه چشم، آسیت (شکل ۱) و تلفات بالا (۶۰ درصد) مشاهده شد و همه ماهیان در دو گروه حدت بالا و پایین سیاه شدند. زخم‌هایی در کلیه و طحال نیز دیده شد. علائم دیگری همچون بزرگ شدن طحال و زخم‌های کانونی در کبد و طحال و قلب و تجمع مایع هموراژیک در روده و پر خونی در سطح مغز نیز از دیگر علائم مشاهده شده بود، هرچند این علائم در ماهیان گروه با حدت بالا به صورت بارزتر نمایان بود. ماهیان تلف شده در این مطالعه به صورت استریل کالبدگشایی شدند و از کلیه قدامی، مغز و طحال ماهیان، کشت باکتریایی انجام شد. جدایه‌های کشت شده براساس شکل کلونی (کلونی‌های کوچک و سفید رنگ و دارای حالت موکوئیدی) و ویژگی‌های بیو-شیمیایی (تست کاتالاز و تست اکسیداز) شناسایی شدند. نتیجه آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز منفی شد و پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی، کوکسی‌های گرم مثبت مشاهده شدند.



شکل ۱: علائم کلینیکی بارز مانند بیرون زدگی چشم‌های دوطرف سر (A)، خونریزی در احشا (B)، پرخونی در مغز (C) مشاهده شده در ماهیان بیمار در مطالعه حاضر.

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019

www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019

نتایج حاصل از مقایسه تأثیر حدت باکتری لاکتوکوکوس گارویه بر برخی شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی روزهای صفر، یک، سه، چهارده و بیست و یک روز پس از تزریق باکتری در جدول ۱ نمایش داده شده است.

مطابق جدول ۱ آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که حدت، زمان و اثر متقابل این دو تاثیر معنی‌داری بر گلبول‌های قرمز ندارند (۰/۰۵ ≤P). در روز صفر آزمایش، بین مقدار گلبول‌های قرمز بین دو گروه غلظت بالا و پایین با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P≥۰/۰۵). در روز ۱، روز ۳، روز ۱۴ و روز ۲۱ آزمایش، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P≥۰/۰۵).

مطابق جدول ۱ آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که حدت بیماری، زمان و اثر متقابل این دو، تاثیر معنی‌داری بر میزان هماتوکریت دارند (P≤۰/۰۰۱). در روز صفر در بین سه گروه (کنترل، گروه غلظت بالا و گروه غلظت پایین) اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در روز ۱ آزمایش، بین دو گروه غلظت بالا و غلظت پایین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری دیده شد (P≤۰/۰۵). در روز ۳ آزمایش، بین گروه غلظت بالا و دو گروه دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و هماتوکریت در گروه غلظت بالا کاهش داشت (P≤۰/۰۵). در روز ۱۴ آزمایش، هماتوکریت در بین دو گروه غلظت بالا و غلظت پایین کاهش یافته و باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند اما بین این دو گروه و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P≤ ۰/۰۵). در روز ۲۱ نیز بین سه گروه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P≤۰/۰۵).

مطابق جدول ۱ آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که حدت بیماری (P≤۰/۰۰۱)، زمان (P≤۰/۰۱) و اثر متقابل این دو (P≥ ۰/۰۵) تاثیر معنی‌داری بر میزان هموگلوبین دارند. میزان هموگلوبین در روز صفر آزمایش، بین سه گروه کنترل و غلظت بالا و پایین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P≥ ۰/۰۵). در روز ۱ آزمایش، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجود داشت و در گروه غلظت بالا از بقیه گروه‌ها کمتر بود. در روز ۳ آزمایش، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P≥ ۰/۰۵). در روز ۱۴ آزمایش، بین دو گروه غلظت بالا و پایین با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود داشت و در گروه کنترل بیشتر از بقیه گروه‌ها بود (P≤۰/۰۵). در روز ۲۱ آزمایش، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P≥/۰۵).

مطابق جدول ۱ آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که حدت، زمان و اثر متقابل این دو تاثیر معنی‌داری بر گلبول‌های سفید ندارند (۰/۰۵ ≤P). در روز صفر آزمایش، تعداد گلبول‌های سفید بین سه گروه اختلاف معنی داری نداشت (P≥۰/۰۵). در روز ۱ آزمایش، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری دیده نشد (P≥۰/۰۵). در روز ۳ آزمایش، بین گروه غلظت بالا با گروه غلظت پایین و کنترل تفاوت معنی داری وجود داشت و در غلظت بالا افزایش مشاهده شد (P≤۰/۰۵). در روز ۱۴ و ۲۱ آزمایش، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P≥۰/۰۵).

جدول ۱: مقایسه (میانگین± انحراف معیار) برخی از شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره‌ی بیماری به‌دنبال دریافت غلظت بالا و پایین لاکتوکوکوس گارویه (n=۳۰).

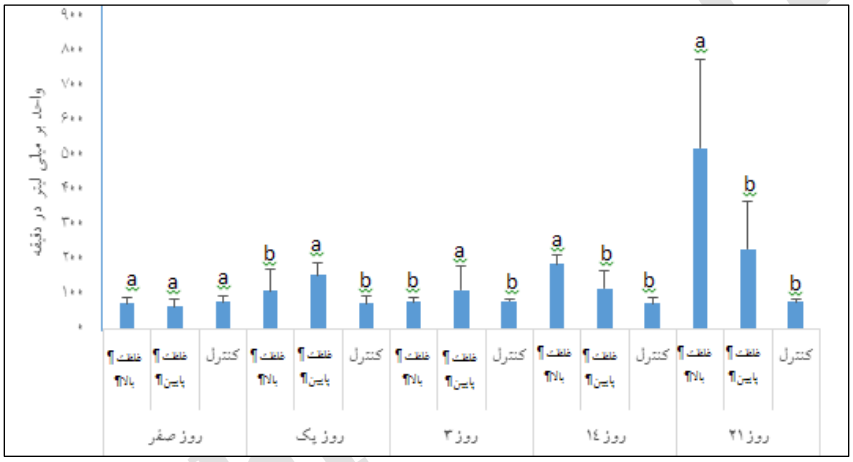
فاکتور	گروه	روز ۰	روز ۱	روز ۳	روز ۱۴	روز ۲۱
PCV (درصد)	غلظت بالا	۳۹/۸۳±۲/۵۶^{aA}	۲۹±۶/۱۴^{bB}	۲۴/۸۳±۳/۶^{bB}	۲۷/۱۶±۶/۲۴^{bB}	۲۴/۱۶±۴/۰۲^{cB}
	غلظت پایین	۴۰/۸۳±۲/۸۵^{aA}	۲۹/۸±۴/۸۶^{bB}	۳۷/۱۶±۲/۷۱^{aA}	۳۰/۶۶±۰/۵۷^{bB}	۲۹/۶±۱/۱۴^{bB}
	کنترل	۴۰/۶۶±۳/۰۱^{aA}	۴۱±۳/۰۹ ^{aA}	۳۹/۶۶±۲/۱۶ ^{aA}	۳۹/۸۳±۲/۵۶ ^{aA}	۴۱/۸۳±۳/۱۲ ^{aA}
Hb (g/dl)	غلظت بالا	۶/۸۹±۰/۶۴^{aA}	۵/۵۷±۱/۲۹^{bAB}	۶/۵۱±۱/۳۲^{aA}	۴/۹۹±۱^{bB}	۶/۳۰±۱/۲۱^{aAB}
	غلظت پایین	۷/۵۹±۰/۸۰ ^{aA}	۶/۰۳±۱/۰۴^{abABC}	۷/۱۵±۱/۰۶^{aAB}	۴/۷۳±۰/۶۳^{bC}	۵/۶۶±۲/۴۱^{aBC}
	کنترل	۷/۴۷±۱/۰۱ ^{aA}	۷/۳۷±۱^{bA}	۷/۵۹±۰/۸۰ ^{aA}	۷/۹۵±۰/۹۶ ^{aA}	۷/۶۱±۰/۸۲ ^{aA}
WBC ($\times10^3$)	غلظت بالا	۴۸±۱۴/۲۱^{aAB}	۵۶/۶۶±۱۵/۶۲^{aAB}	۵۶/۶±۵۰/۷۹ ^{aA}	۲۴/۳۳±۶/۲۵ ^{aA}	۱۹/۶±۳/۸۴^{aB}
	غلظت پایین	۴۷/۶۶±۳۱/۹۱^{aBC}	۵۰/۵±۲۶/۸۶^{aAB}	۵۰/۵±۵/۲۵^{bA}	۳۲/۳۳±۱۲/۵۰^{aC}	۳۰/۴±۱۲/۱۹^{aC}
	کنترل	۴۴/۴±۲۵/۷۸ ^{aA}	۳۵/۶±۱۳/۴۴ ^{aA}	۳۵/۶±۳۱/۹۱^{abA}	۳۶/۳۳±۱۲/۱۶ ^{aA}	۳۸±۱۳/۵۵ ^{aA}

www.SID.ir

RBC ($\times 10^4$)	غلظت بالا	۱۵/۵۵±۹/۲۳^{aAB}	۲۰/۵۶±۱۲/۸۴^{aA}	۲۰/۱۸±۹/۷۱^{aA}	۱۶/۲۵±۵/۹۵^{aAB}	۱۵/۵ ±۲/۰۴^{aB}
	غلظت پایین	۱۴/۶۴±۸/۴۲^{aAB}	۱۵/۲۵±۱۶/۰۸^{aA}	۱۴/۳۷±۴/۱۶^{aAB}	۹/۰۶±۴/۲۵^{aB}	۱۳/۶۶±۳/۶۷^{aAB}
	کنترل	۱۲/۳۲±۹/۶۳^{aA}	۱۲/۰۵±۵/۰۳^{aA}	۱۴/۶۴±۸/۴۲^{aA}	۱۲/۴۳±۴/۴۹^{aA}	۱۹/۷۵±۸/۲^{aA}

*حروف لاتین کوچک غیر مشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. و حروف لاتین بزرگ غیر مشابه در هر سطر به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد حدت بیماری، زمان و اثر متقابل این دو تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت لیزوزیم دارند (P≤۰/۰۰۱). در روز صفر بین گروه کنترل و گروه‌های غلظت بالا و غلظت پایین از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). در روز یک و سه آزمایش، در بین سه گروه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت و در گروه غلظت پایین بیش‌تر از گروه کنترل و غلظت بالا بود (P≤۰/۰۵). در روز ۱۴ و ۲۱ آزمایش، بین سه گروه کنترل و غلظت بالا و غلظت پایین از نظر آماری اختلاف وجود داشت و در گروه غلظت بالا بیش‌تر از دو گروه دیگر بود (P≤۰/۰۵).



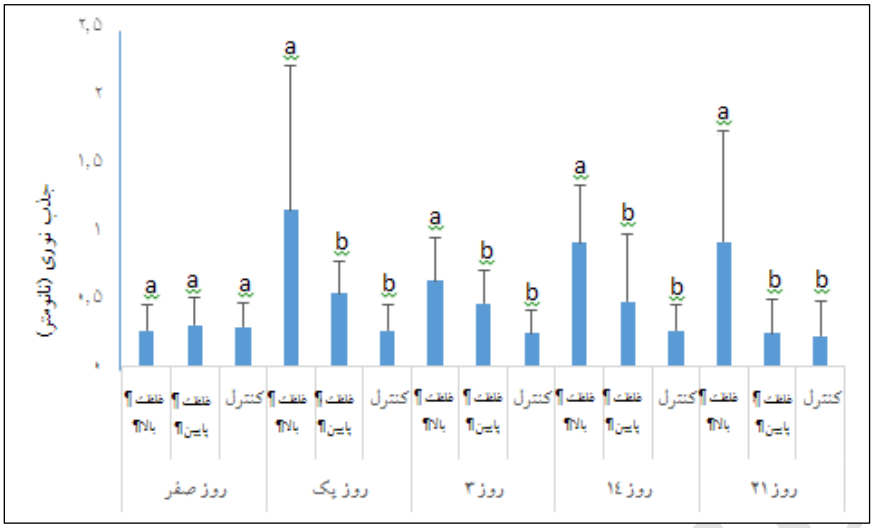
شکل ۲: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت لیزوزیم در تیمارهای آزمایشی.

حروف لاتین کوچک غیر مشابه در هر روز نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که حدت بیماری (P≤۰/۰۱)، زمان (P≤۰/۰۱) و اثر متقابل این دو (P≤۰/۰۰۱) تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت مایلوپراکسیداز دارند. در روز صفر آزمایش، بین سه گروه غلظت بالا و غلظت پایین و گروه کنترل از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). در روز ۱، ۳، ۱۴ و ۲۱ آزمایش، بین سه گروه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت و در گروه غلظت بالا بیش‌تر از دو گروه دیگر بود (P≤۰/۰۵).

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019

www.SID.ir



شکل ۳: بررسی میزان فعالیت مایلوپراکسیداز در تیمارهای آزمایشی.

حروف لاتین کوچک غیر مشابه در هر روز نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

بحث و نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های مطالعات صورت گرفته در این زمینه و تحقیقات تکمیلی در فاز تجاری، واکسن‌های تجاری بر اساس سویه‌های بومی بیماری تولید شده که سال‌هاست در سطح مزارع پرورش قزل‌آلای کشور استفاده می‌گردد، اما کارایی بالایی ندارند. تا به حال تحقیق مستقلی بر ایمنی‌زایی این این باکتری به عنوان یک سویه‌ی بیماری‌زا صورت نگرفته است. با اطلاع از گونه‌ی بیماری‌زا و مکانیسم ایمنی‌زایی آن می‌توان درک بهتری از مصونیت ماهی قزل‌آلا در برابر این بیماری را داشت.

در این مطالعه بعد از ۲۴ ساعت از تزریق علائم بیماری پدیدار شد. حدود ۶۰ درصد از ماهیان بعد از ۷۲ ساعت در حدت بالا و ۲۵ درصد در حدت پایین تلف شدند. در مقایسه با سایر مطالعات، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سویه مورد مطالعه در این تحقیق حدت بالایی ندارد، چرا که ۳×۱۰^{۸} CFU/ml به عنوان حدت بالا و ۳×۱۰^{۷} CFU/ml به عنوان غلظت پایین در نظر گرفته شد، در صورتی که در مطالعه Pretto-Giordano و همکاران (۲۰۱۰) غلظت $۱۰^{۶}\times ۴/۵$ CFU/ml استرپتوکوکوس اینیه باعث ایجاد تلفات ۵۰ درصدی شد. Pasnik و همکاران (۲۰۰۵)، تلفات ۸۴ تا ۹۶ درصدی در گروه کنترل چالش شده با *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* با غلظت $۱/۸۹\times۱۰^{۴}$ CFU/ml تا $۲/۱۱\times۱۰^{۴}$ CFU/ml مشاهده نمودند (Pasnik *et al.*, 2005; Pretto-Giordano *et al.*, 2010).

علائم کلینیکی مشاهده شده در این مطالعه، مشابه مطالعه Salvador و همکاران (۲۰۰۳) و Figueiredo و همکاران (۲۰۰۶) در تیلاپیای پرورشی بود.

طحال، کبد، مغز، روده و قلب از مهم‌ترین اندام‌هایی هستند که در این بیماری درگیر می‌شوند. در این مطالعه زخم‌های کلیه و طحال دیده شد و علائم دیگری همچون بزرگ شدن طحال و زخم‌های کانونی در کبد و طحال و قلب و تجمع مایع هموراژیک در روده و پوشانده شدن سطح مغز با مایع چرکی نیز از دیگر علائم این بیماری می‌باشند. در مغز هم ضایعاتی در قسمت‌های مغز و مخچه دیده می‌شود که با تجمع ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها همراه است. در ماهیان بیمار این مطالعه معمولاً منتژیت حاد که به صورت یک لایه چرکی پوشاننده مغز نمایان می‌شود هم دیده شد. در این مطالعه تشخیص لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر اساس علام بالینی، زخم‌ها و جداسازی باکتری گرم مثبت کوکسی از اندام‌های داخلی ماهی و تأیید گونه باکتری با سایر روش‌های آزمایشگاهی انجام شد. این پاتوژن از طحال، کلیه، چشم ها

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019

و مغز با کشت در محیط کشت آگار خون‌دار از همه ماهیان تزریق شده با حدت بالا و ۶۰ درصد ماهیان با حدت پایین جداسازی گردید. تشخیص بیماری‌های استرپتوکوکی در ماهی پیچیده است زیرا علائم کلینیکی مشابهی در گونه‌های مختلف ماهیان ناشی از باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت دیده می‌شود. کوکسی‌های گرم مثبت نزدیک به این گونه وجود دارند که علائم مشابهی را ایجاد می‌نمایند؛ بنابراین شناسایی *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوس گارویه* به عنوان باکتری‌های مسبب این بیماری باید ترکیبی از روش‌های استاندارد رایج، روش‌های سرولوژیک، تکنیک‌های هیستولوژی، مشخصه‌های بیوشیمیایی و مطالعات مولکولی باشد.

با توجه به این که تعیین فاکتورهای خونی و توجه به تغییرات گلبول‌های سفید و قرمز یک شاخص مهم سلامت موجودات مختلف است، لذا آزمایش‌های خون‌شناسی نظیر شمارش گلبول‌های سفیدو قرمز می‌تواند برای تشخیص برخی از بیماری‌ها به کار رود. بر اساس نتایج این مطالعه ماهیان تحت چالش با دوز بالا (عفونت حاد) در صورت زنده ماندن دچار کاهش خون بودند به طوری که میزان هموگلوبین و هماتوکریت به میزان معنی‌داری تا روز ۲۱ پایین بود. تعداد گلوبول‌های سفید در دو تیمار آلوده شده تا روز سوم نمونه‌برداری به میزان معنی‌داری افزایش یافت؛ اما در روز چهارده در گروه ماهیان آلوده شده با حدت پایین، تعداد گلبول‌های سفید به حالت نرمال و همتراز با گروه کنترل درآمد؛ اما در گروه حدت بالا حالت لنفوپنیا همچنان تا روز ۲۱ آزمایش مشاهده شد. این روند در مورد میزان لایزوزیم و مایلوپراکسیداز نیز مشاهده شد. در گروه غلظت بالا میزان آنزیم مایلوپراکسیداز در روزهای ۱، ۳، ۱۴ و ۲۱ آزمایش، در گروه حدت بالا بیش‌تر از دو گروه دیگر بود. دلیل افزایش میزان لیزوزیم و مایلوپراکسیداز، احتمالاً به دلیل تحریک سیستم ایمنی به‌واسطه عامل بیماری است. McNulty و همکاران (۲۰۰۳) در ماهی تیلاپیا به دنبال بررسی جمعیت لوکوسیتی ماهیان ایمن شده بر علیه *استرپتوکوکوس اینیه* نشان دادند که در ایام نمونه‌برداری پس از واکسیناسیون در مقایسه با گروه شاهد، جمعیت گلبول‌های سفید (شمارش کلی) و جمعیت لنفوسیتی از افزایش قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده است (Nulty *et al.*, 2003). نتایج مطالعه فوق با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد که دلیل آن می‌تواند مربوط به نقش عفونت در افزایش قدرت سیستم ایمنی در ماهیان واکسینه و غیر واکسینه باشد. MacArthur و همکاران (۱۹۸۴) نشان دادند که معمولاً افزایش فعالیت بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها همراه افزایش تعداد لکوسیت‌های با هسته چند قسمتی بوده است. در برخی مطالعات همبستگی نیز در مطالعات مربوط به بیماری استرپتوکوکوز در ماهی گزارش شده و تائید شده است که ایمنی علیه باکتری *لاکتوکوس گارویه* ناشی از تولید آنتی‌بادی اختصاصی ضد آن‌ها در میزبان است (Eldar *et al.*, 1997; Shelby *et al.*, 2002). هم‌چنین در مطالعه دیگر عنوان شده است که پروتئین‌ها و فراورده‌های خارج سلولی و کربوهیدرات‌های باکتری‌های مذکور خاصیت ایمنوژنیک دارند و قادر به تحریک سیستم ایمنی بدن میزبان می‌باشند (Shoemaker *et al.*, 2010). این پروتئین‌ها علاوه بر اینکه در ساختار دیواره سلولی مشارکت دارند و نیز به عنوان پروتئین‌های اصلی سیتوپلاسمیک در نظر گرفته شده‌اند، نقش فاکتورهای حدت در باکتری شامل چسبندگی، تشکیل کلونی و نیز حمله به نسوج میزبان را نیز دارا می‌باشند؛ بنابراین مکانیسم مقاومت آنتی‌بادی علیه این پروتئین‌ها شامل بلاک کردن توانایی چسبندگی، تشکیل کلونی و مورد حمله قرار دادن بافت‌های میزبان است (Kim *et al.*, 2007). پروتئین‌های باکتری توانایی القا سیستم ایمنی و نیز سرکوب آن را دارند. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، باکتری *لاکتوکوکوس گارویه*، به صورت مزمن و حاد موجب بروز علائم درمانگاهی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد. همچنین شکل حاد بیماری در مقایسه با شکل مزمن، تأثیرات شدیدتری بر سلول‌های خونی و همچنین سیستم ایمنی می‌گذارد.

منابع

اخلاقی، م. و کشاورز،م، ۱۳۸۱ .وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان .مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره سوم، صفحات ۱۸۶-۲.

Blaxhall, P. and Daisley, K., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. Journal Fish Biology. 5: 771-781

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:39 +0430 on Sunday May 12th 2019

Eldar, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H., 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology, 56(1-2):175-183.

Figueiredo, H. P. C., Carneiro, D. O., Faria, F. C. and Costa, G. M., 2006. *Streptococcus agalactiae* associado a meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 58: 678-680.

Ghittino, P. and Prearo, M., 1992. Report of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: Preliminary note. Bollettino Societa Italiana di Patologia Ittica, (8): 4-9.

Kim, M. S., Choi, S. H., Lee, E. H., Nam, Y. K., Kim, S. K. and Kim, K. H., 2007. α-enolase, a plasmin (ogen) binding and cell wall associating protein from a fish pathogenic *Streptococcus iniae* strain. Aquaculture. 265(1):55-60.

McNulty, S. T., Klesius, P. H. and Shoemaker, C. A., 2003. Hematological Changes in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae* by nare inoculation. Journal of the World Aquaculture Society. 34(3): 418-422.

MacArthur, J. I., Fletcher, T. C., Pirie, B. J. S., Davidson, R. J. L. and Thomson, A. W., 1984. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. Journal of Fish Biology. 25(1): 69-81.

Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M. and Rohanizade, S., 2016. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. bulguricus on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. Aquaculture International, 24 (1):225-242.

Pasnik, D. J., Evans, J. J. and Klesius, P. H., 2005. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. Diseases of aquatic organisms. 66 (2): 129-134.

Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A. E. and Romalde, J. L., 2004. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24 (8): 274-279.

Pretto-Giordano, L. G., Müller, E. E., Freitas, J.C.D. and Silva, V. G. D. 2010. "Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(1): 87-92.

Sahoo, P., Mukherjee, S. and Sahoo, S., 1998. *Aeromonas hydrophila* versus *Edwardsiella tarda*: a pathoanatomical study in *Clarias batrachus*. Aquaculture. 6 :57-66.

Salvador, R., Müller, E. E., Leonhardt, J. H., Pretto-Giordano, L. G., Dias, J. A., Freitas, J. C. and Moreno, A. M., 2003. Isolamento de *Streptococcus* spp de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, 24, 35-42.

Shahoo, P. K., Kumari, J. and Mishra, B. K., 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. Journal Apply. Ichthyology. 21: 151–155.

Shelby, R. A., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Evans, J. J., 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. Journal of fish diseases, *25*(1):pp.1-6.

Shoemaker, C. A., Klesius, P. H. and Evans, J. J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. American journal of veterinary research, *62*(2): 174-177.

Soltani, M., Pirali Kheirabadi, E., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A., Mohamadian, S., Roohollahi, Sh. and Zakian, M., 2015. Study on Streptococcosis and Lactococcosis Outbreaks in Rainbow Trout Farms in Fars and Lorestan Provinces. Journal of Veterinary Microbiology, Volume. 30: 49-58.

Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., Song, K. and Li, J. S., 2011. Effect of *Lactococcuslactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinepheluscoioides*. Aquaculture Nutrition, 165:1-9.

Archive of SID

www.SID.ir