

بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمونوگلوبولین، گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلابی رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدروفیلا بیماری‌زا

هادی توکلی^۱ مصطفی اخلاقی^{۲*}

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

(۲) بخش بهداشت و بیماری‌های 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 آلابی رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا بیماری‌زا، عامل بیماری سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیها، تعداد 10^6 ، 10^7 ، 10^8 از این باکتری به ترتیب به سه گروه آزمایشی مجزا که هر گروه شامل ۱۰ ماهی قزل آلابی رنگین کمان بود به روش داخل صفاق تزریق شد. یک گروه بعنوان شاهد با همان تعداد ماهی با تزریق سرم فیزیولوژی مورد استفاده قرار گرفت. پس از ظاهر شدن علائم بیماری در ماهیها، نمونه‌گیری از مخاط پوست و خون انجام شد. میزان لیزوزیم و ایمونوگلوبولین‌های ضد آئروموناس هیدروفیلا در پوست و سرم خون بترتیب بر روش الیزا و پلیت‌همچنین میزان هماتوکریت و شمارش کل گلبول‌های سفید / قرمز خون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد میزان لیزوزیم موجود در مخاط پوست و سرم خون در مقایسه با گروه شاهد از تفاوت معنی‌داری برخوردار می‌باشد ($P < 0.05$). میزان لیزوزیم سرم بطور معنی‌داری در گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی از لیزوزیم مخاط بیشتر بود. در مقایسه میزان ایمونوگلوبولین‌های مخاط پوست با شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید لیکن ایمونوگلوبولین‌های ۲ و ۳ بطور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود. اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید بین گروه‌های آزمایشی و شاهد مشاهده شد. همچنین در صد هماتوکریت بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بود. عفونت ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلابی رنگین کمان باعث افزایش لیزوزیم سرم و مخاط، افزایش ایمونوگلوبولین‌های سرم، کاهش هماتوکریت و گلبول‌های قرمز خون می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لیزوزیم، ایمونوگلوبولین، سلول‌های خون، آئروموناس هیدروفیلا، قزل آلابی رنگین کمان.

مقدمه

از اصول اولیه در پرورش آبزیان، تولید زیاد در حداقل زمان و در کمترین مساحت است که این امر خود زمینه‌ساز بروز بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد. عوامل عفونی که شامل انگل‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها می‌باشند همواره مزارع پرورش ماهی را مورد تهدید قرار می‌دهند. پرورش دهندگان ماهی عموماً شناخت کمی از بیماری‌های ماهی و راه‌های کنترل آنها دارند و در موقع برخورد با تلفات ماهی‌ها گاهی آنها را عادی تلقی نموده و تلاشی در جهت کنترل آنها نمی‌نمایند. یکی از باکتری‌های مهم در صنعت پرورش ماهی‌ها، باکتری آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. این باکتری از آئروموناس‌های متحرک به عنوان یک عامل بیماری‌زا برای بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین و گاهی ماهیان آب شور محسوب می‌شود (۹). باکتری آئروموناس هیدروفیلا در کپور، مارماهی، شیرماهی، گربه ماهی، تیلاپیا و قزل آلابی رنگین کمان باعث ایجاد سپتی‌سمی هموراژیک می‌شود و بیماری حاصله از این باکتری در سراسر دنیا گسترش دارد (۲). برخی از محققین معتقدند که آئروموناس هیدروفیلا یک بیماری‌زا فرصت طلب است که باعث سپتی‌سمی هموراژیک در ماهی می‌شود و به عنوان یک ارگانیزم همه‌جایی و نامتجانس می‌باشد که باعث ایجاد بیماری در شرایط استرس‌زا و یا در ارتباط با عفونت سایر پاتوژن‌ها می‌شود در حالی که

گروهی دیگر معتقدند که آئروموناس هیدروفیلا یک بیماری‌زا اولیه است (۹). در طبیعت آئروموناس هیدروفیلا بطور گسترده در آب‌های شیرین در قسمت رسوبات و همچنین در دستگاه گوارش ماهی‌ها قرار دارد (۱۶). تحقیقات انجام شده در این زمینه در ایران آئروموناس هیدروفیلا را به عنوان عامل بیماری‌زا کپور ماهیان پرورشی (۱۳) و آئروموناس‌های متحرک بصورت عامل ثانویه یا اولیه در مرگ و میر ماهی‌های آمور در استان خوزستان (۶) معرفی می‌کند. این باکتری همچنین از کپور ماهیان پرورش داده شده در فارس شناسایی شده است (۹). اخیراً جداسازی این باکتری از ماهی‌های قزل آلابی بیمار بیشتر صورت می‌گیرد. در خصوص بیماری‌زایی و پاتوفیزیولوژی سپتی‌سمی هموراژیک ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلابی رنگین کمان تحقیقات اندکی موجود است. در تحقیقی در بررسی آزمایشگاهی عفونت سیستمیک آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلابی رنگین کمان نشان داده شد که تغییرات آسیب‌شناسی در آبشش‌ها، مغز، قلب، کلیه، کبد و روده این ماهی اتفاق می‌افتد و آنزیم گلوتامینت‌اگزالات ترانس آمیناز و بیلی روبین در سرم خون ماهی‌های بیمار بطور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش می‌یابد (۵). مطالعه فاکتورهای خونی قزل آلابی رنگین کمان زمانی که بصورت تجربی درگیر ضایعات جلدی ناشی از آئروموناس هیدروفیلا شد کاهش معنی‌دار گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبولین و فاکتورهای بیوشیمیایی خون را نشان داد (۱۴). در تحقیق





تصویر ۱- سیتی سمی هموراژیک ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلابی رنگین کمان، خونریزی شدید در پایه باله‌ها، سرپوش آبخشی و اطراف دهان مشاهده می‌شود.

سانتیگراد $15 \pm$ 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 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.

اندازه‌گیری میزان لیزوزیم سرم خون و مخاط پوست: برای تعیین فعالیت لیزوزیم سرم‌ها و مخاط‌های جمع آوری شده از روش پلیت استفاده گردید. باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) روی پلیت آگار 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

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 آلابی رنگین کمان همچنین تغییر در میزان گلبول‌ها و هماتوکریت خون بمنظور آگاهی از شاخص‌های ایمنی و آسیب شناسی در مانگاهی این ماهی در مواجهه با بیماری پس از تزریق داخل صفاقی با دامنه 10^5 ، 10^6 ، 10^7 باکتری آئروموناس هیدروفیلا به بیماریزایه گروه‌های مجزا و مقایسه نتایج با گروه شاهد بود.

مواد و روش کار

باکتری: باکتری آئروموناس هیدروفیلا بیماریزایه که از موارد سپتی سمی هموراژیک ماهی قزل آلابی رنگین کمان در بخش آبیان بروش‌های بیوشیمیایی قرار گرفته بود (۴) متعاقباً در آزمایش‌های انجام شده تعیین بیماریزایی در ماهی قزل آلابی رنگین کمان برای این ماهی بیماریزایه 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 تهیه 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 دار کشت 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 تهیه منحنی استاندارد جذب نوری غلظت از چهار نقطه بدست آمده در مرحله قبل مربوط به تعداد واحد مولد پرگنه و جذب نوری تایید برابری جهت 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 آبیان توسط فرمالین با غلظت ۲۰۰ قسمت در میلیون به مدت ۱۲ ساعت ضد عفونی، شستشو و سپس آبیگری گردید. تعداد ۵۰ قطعه ماهی قزل آلابی رنگین کمان با وزن $49/6 \pm 6/35$ 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 غذای شدند. در طول آزمایش درجه متوسط آب ۲۲ درجه



جدول ۱- میانگین و انحراف معیار فاکتورهای اندازه گیری شده در مخاط پوست و خون ماهی قزل آلابی رنگین کمان بدنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدروفیلای بیمار یازاد در گروه های مورد آزمایش. حروف مشابه در هر ردیف اختلاف معنی داری ندارند ($p > 0.05$).

گروه های آزمایشی	شاهد	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳
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)	۰/۹۷ ^b ± ۰/۱۰۷ ۰/۵۲ ^d ± ۰/۱۸۸ ۰/۰۷۱ ^e ± ۰/۲۴۱ ± ۰	۱/۰۶ ^b ± ۰/۹۶۱ ۰/۵۸ ^d ± ۰/۱۳۶ ۰/۱۲۵ ^e ± ۰/۲۳۱ ± ۰	۱/۱۲ ^b ± ۰/۱۲۸ ۰/۵۷ ^d ± ۰/۲۸۱ ۰/۲۰۷ ^e ± ۰/۲۸۹ ± 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)	۱/۵۲ ^d ± ۰/۹۹۴ ۱/۰۹ ^f ± ۰/۱۳۶ ۰/۶۸ ^h ± ۰/۱۳۴ ۰/۲۰ ± ۰/۲۵۰	۱/۶۹ ^e ± ۰/۱۳۲ ۱/۱۰ ^f ± ۰/۱۱۴ ۰/۶۶ ⁱ ± ۰/۰۹۵ ۰/۲۴ ± ۰/۲۶۷	۱/۸۱ ^e ± ۰/۸۹۹ ۱/۱۴ ^f ± ۰/۰۹۷ ۰/۷۱ ^h ± ۰/۰۵۵ ۰/۲۸ ± ۰/۲۶۷
۳	ایمنوگلوبولین مخاط در روش الیزا (جذب نوری در ۴۹۰ نانومتر)	۰/۰۵۱ ^a ± ۰/۰۰۶	۰/۰۴۸ ^a ± ۰/۰۰۷۰	۰/۰۵۲ ^a ± ۰/۰۰۶
۴	ایمنوگلوبولین سرم در روش الیزا (جذب نوری در ۴۹۰ نانومتر)	۰/۰۵۱ ^a ± ۰	۰/۰۶۳ ^b ± ۰/۰۰۵	۰/۰۶۴ ^b ± ۰/۰۱۱
۵	هماتوکریت (درصد)	۳۳/۹۵ ^b ± ۰/۹۶۹	۲۹/۶۶ ± b ۱/۷۹۹	۲۶/۸۰ ^b ± ۱/۲۲۸
۶	گلبول قرمز (میلی لیتر / ۱۰ ^۶)	۹۸/۸۹ ^b ± ۹/۶۶۸	۸۰/۸۷ ± c ۱۳/۴۴۸	۶۰/۷۱ ^d ± ۸/۹۲۰
۷	گلبول سفید (میلی لیتر / ۱۰ ^۳)	۱۰۵ ^b ± ۱۱/۵۷۵	۱۳۱/۶۲ ± c ۱۴/۵۴۹	۱۴۱/۰۷ ^d ± ۷/۴۸۰

نسخه ۱۱/۵ و تست آماری آنوای یک طرفه (Scheffe) استفاده گردید. در تمام موارد در فرض $p < 0.05$ وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها را مشخص می نمود.

نتایج

نتایج بدست آمده از بیمار یزایی آئروموناس هیدروفیلای پس از تزریق داخل صفاقی به ماهی های قزل آلابی 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 ماهی های قزل آلابی رنگین کمان ایجاد نمودند که از تمامی تعداد تلفات بجز یک مورد باکتری تزریق شده جدا سازی شد. شروع علائم بالینی در گروه های تزریقی با ۱۰^۵، ۱۰^۶ و ۱۰^۷ باکتری به ترتیب ۱۶-، ۱۱-، ۱۰- و ۸-۷ روز پس از تزریق اتفاق افتاد. در گروه شاهد تلفاتی مشاهده نگردید. تصویر ۱ ماهی های مبتلا به عفونت سپتی سمی هموراژیک ناشی از آئروموناس هیدروفیلای را ۹ روز بعد از تزریق نشان می دهد.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد لیزوزیم موجود در مخاط بدون رقیق کردن و با رقت ده برابر اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و گروه های آزمایشی مشاهده می شود ($p < 0.05$). در رقتی برابر اختلاف معنی دار بین گروه های ۱، ۲ و ۳ مشاهده گردید. در رقت ۵۰ برابر میزان لیزوزیم قابل اندازه گیری نبود (جدول ۱).

اختلاف معنی داری بین گروه کنترل و گروه های آزمایشی و همچنین گروه های 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 معنی داری بین شاهد و گروه های آزمایشی مشاهده شد لیکن گروه های آزمایشی با هم

در مخاط و سرم، از لیزوزیم تجاری (سیگما) بدست آمده از سفیده تخم مرغ رقت های 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 پلیت ها ریخته شد. پلیت ها 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، پلیت ها شسته شدند. در مراحل بعد بترتیب با اضافه نمودن سرم ماهی ها، آنتی بادی سرم موش علیه آنتی بادی های ماهی قزل آلابی رنگین کمان و آنتی سرم کونژوگه خرگوش علیه موش (شرکت داکو، دانمارک) با رقت های مناسب و پس از شستشودر هر مرحله بمیزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. در هر یک از مراحل ذکر شده پلیت ها به مدت ۱/۵ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در مرحله نهایی با اضافه کردن سوبسترای آب 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 گلبول های قرمز و سفید بروش هموسیئومتر نوپار انجام شد (۱۵).

روش آماری مورد استفاده: جهت مقایسه نتایج از برنامه آماری SPSS



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 غیر اختصاصی ماهیان را تشکیل می دهد. در آزاد ماهیان لیزوزیم در بافت های لنفومیلوئیدی مانند کبد، کلیه، طحال، ترشحات موکوسی، سرم، لکوسیت ها، روده، مثانه، کلیه و لوله گوارش یافت شده است. لیزوزیم در این بافت ها توسط سلول های ویژه ای بنام ائوزینوفیلیک گرانول سل تولید و ترشح می شود. ابتدا این سلول ها در بافت روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان شناسایی و گزارش شدند، سپس وجود آنها در بافت پیوندی، پوست، آبشش، مثانه و قلب به اثبات رسید. لیزوزیم همچنین توسط لکوسیت ها که در بافت های مختلف و خون توزیع شده اند ترشح می شود (۱۷). نقش لیزوزیم در عفونت به عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آنها همچنین تحریک فاگوسیتوز می باشد. لیزوزیم قادر است پیوندهای گلیکوزیدی را در لایه های پپتیدوگلیکان باکتریها بشکند. Grinde (۷) قدرت نابودسازی لیزوزیم بر باکتری آئروموناس سالمونیسیدا را در ماهی قزل آلائی رنگین کمان اثبات کرد. افزایش مشاهده شده در سطح لیزوزیم در مطالعه حاضر به علل زیر اتفاق می افتد:

افزایش تعداد و فعالیت لکوسیت ها در خون و در نتیجه افزایش ترشح لیزوزیم در خون ماهی.

افزایش تعداد و فعالیت ماکروفاژها در بافت های ماهی آلوده از جمله پوست و بدنبال آن افزایش ترشح لیزوزیم در موکوس سطحی بدن ماهی. افزایش تعداد و فعالیت ائوزینوفیلیک گرانول سل ها در بافت های ماهی و در نتیجه افزایش ترشح لیزوزیم در خون و موکوس سطحی بدن ماهی.

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

در تحقیق انجام شده میزان ایمونوگلوبولین های سرم خون پس از آلودگی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا و ظهور علائم سپتی سمی هموراژیک در مقایسه با ماهی های قزل آلائی رنگین کمان سالم بطور معنی داری افزایش نشان داد. روند تولید ایمونوگلوبولین ها در ماهی وقوع مجموعه ای از واکنش ها بین سلول های ارائه دهنده آنتی ژن، سلول های T کمک کننده فعال شده و اینترلوکین ها سبب تحریک لنفوسیت های B می شود. این لنفوسیت ها در اثر تحریک پلازما سل ها را تولید می کنند که قادر به ترشح ایمونوگلوبولین می باشند (۱۵). به همین دلیل در تحقیق جاری آنتی بادی های

تفاوت معنی داری نشان ندادند. در رقت ۵۰ برابر مقدار لیزوزیم در گروه کنترل قابل اندازه گیری نبود و در گروه های آزمایشی میزان های ۰/۲۰-۰/۲۸ سانتیمتر عدم رشد تعیین گردید که با هم اختلاف معنی داری 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 ایمونوگلوبولین های ضد آئروموناس هیدروفیلا در مخاط بین گروه شاهد و گروه های آزمایشی اختلاف معنی داری نداشتند لیکن مقدار آنها در سرم بین گروه کنترل و گروه های آزمایشی ۲ و ۳ اختلاف معنی دار مشاهده شد. اختلاف معنی دار در تعداد گلبول های قرمز و درصد هماتوکریت بین گروه کنترل و آزمایش همچنین بین گروه های مورد آزمایش وجود داشت. در تعداد کل گلبول های سفید بین گروه کنترل و آزمایش همچنین گروه های آزمایش ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی دار مشاهده شد (جدول ۱)

بحث

گونه باکتری آئروموناس هیدروفیلا مربوط به جنس آئروموناس می باشد. این باکتری از سپتی سمی های هموراژیک ماهیان ناشی از استرس های ایجاد شده بوسیله عوامل مختلف جدا می شود. علائم کلینیکی و آسیب شناسی آن بسیار شبیه سپتی سمی های سودوموناسی است. آئروموناس هیدروفیلا به عنوان عامل بیماریزا در تعداد زیادی از ماهی های 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 می آید از جمله تغییرات آسیب شناسی فراوان در اندام های ماهی و آنزیم ها را در ماهی قزل آلائی رنگین کمان را نام برد (۵).

در این تحقیق ابتدا تعداد 10^6 و 10^5 باکتری آئروموناس هیدروفیلا بیماری زا به ۳ گروه مجزا در هر گروه ۱۰ ماهی از ماهیان قزل آلائی 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 ایمونوگلوبولین های سرم و مخاط به روش الیزا و میزان هماتوکریت، گلبول های سفید و قرمز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده پس از آلودگی تجربی ماهی قزل آلائی 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 مطالعه ای در ماهی آتلانتیک سالمون توسط Moyner و همکاران (۱۱) که



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) Lysozyme from rainbow trout Richardson as an 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 Lipopolysaccharide 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

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

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

تعداد کل گلبول های سفید در هنگام آلودگی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا افزایش یافت که این افزایش در فاگوسیتوز میکروارگانیزم های خارجی و فعالیت کیموتاکتیک نقش دارد و در این تحقیق از نقطه نظر نقش آنها در از بین بردن باکتری های تزریق شده به ماهی قابل توجهی می باشد. به عنوان نتیجه گیری کلی می توان بیان کرد که عفونت ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا باعث افزایش لیزوزیم سرم و مخاط، افزایش ایمنوگلوبولین سرم، کاهش هماتوکریت و گلبول های قرمز خون و افزایش تعداد گلبول های سفید خون ماهی قزل آلا ی رنگین کمان می شود.



- activity in the serum and mucus of rainbow trout, *Oncorhynchus 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. 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 aeromonas 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.



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*}

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

²Department 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 significantly higher than the control group ($p < 0.05$) while the immunoglobulin level of skin mucus of experimentally challenged fish was not significantly 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 significantly 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 hematocrit 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

