Archive of SID

بررسی تغییرات پادتن و پروتئین‌های سرمی ماهی کپور معمولی پس از تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی باکتری کشتهٔ آئروموناس هایدروفیلا

رحیم پیغان[۱]*، مسعود قربانپور[۲]، غلامحسین خواجه[۱]، زهرا بصیر[۳]، مریم دادار[۳]

۱- استاد دانشکده دامپزشکی- دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
۲- دانشیار دانشکده دامپزشکی- دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

* **نویسنده مسئول :** *Peyghan_r@scu.ac.ir*

خلاصه

آئروموناس هایدروفیلا یکی از مهمترین باکتریهای بیماریزای ماهیان پرورشی آب شیرین از جمله کپور ماهیان است که باعث سپتی‌سمی باکتریایی در ماهیان می‌گردد. در این تحقیق ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی ۷۰-۳۰ گرمی به ۵ گروه (۲گروه ۳۰ تائی و ۳ گروه ۲۰ تائی) تقسیم گردیدند. به یک گروه۳۰ تائی باکتری آئروموناس هایدروفیلای کشته شده با فرمالین به صورت داخل عضلانی و به گروه ۳۰ تائی دیگر باکترین مذکور به روش داخل صفاقی تزریق شد (۰/۵ میلی لیتر به ازاء هر ماهی، حاوی ۴۵۰×۱۰^{۶} باکتری). به ۲ گروه ۲۰ تائی بعنوان شاهد به صورت داخل صفاقی و داخل عضلانی سرم نمکی به همان میزان تزریق گردید. یک گروه ۲۰ تایی نیز تحت هیچ گونه تزریقی قرار نگرفتند. دو هفته پس از تزریق از تمامی ۱۲۰ قطعه ماهی خونگیری بعمل آمد و عیار سرمی پادتن اختصاصی ضد این باکتری در گروههای مختلف به روش آگلوتیناسیون داخل لوله تعیین گردید همچنین به روش الکتروفورز قسمتهای مختلف سرم تفکیک گردید. در مقایسه تیتر آنتی‌بادی سرم در گروه تزریق داخل صفاقی باکتری با گروه تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژی میزان عیار سرم در تزریق باکتری به طور معنی‌داری بیشتر از گروه تزریق سرم نمکی بوده است ($P<۰/۰۱$). در مقایسه تیتر آنتی‌بادی در گروههای تزریق داخل عضلانی نیز، عیار سرم در گروه تزریق باکتری با ۹۹ درصد اطمینان از گروه سرم نمکی بیشتر بوده است ($P<۰/۰۱$). در مقایسه بین گروههای شاهد بدون تزریق وگروههای تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی سرم نمکی نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). اختلاف معنی داری بین تزریق داخل عضلانی باکترین با تزریق داخل صفاقی آن مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). در تزریق داخل صفاقی، آلفا-۲-گلوبولین، گاما-۱ گلوبولین و گلوبولین تام به طور معنی‌داری از گروه تزریق داخل عضلانی بیشتر بوده است ($P< ۰/۰۵$) ولی بقیه فراکسیونها تفاوت معنی‌داری نداشتند.

واژه‌های کلیدی: پادتن، آئروموناس هایدروفیلا، ماهی کپور، آلبومین، گلوبولین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نیازهای تغذیه‌ای انسان، بخصوص نیاز به پروتئین باعث شده که انسان از دیرباز به اهلی نمودن حیوانات و ازدیاد و پرورش آنها همت گمارد. در این میان ماهی و میگو از سهم بسزایی برخوردار بوده و پرورش آنها بخصوص در سالهای اخیر رونق چشمگیری داشته است. از اصول اولیه در اهداف سیستم پرورش آبزیان، تولید بالا در حداقل زمان و در کمترین مساحت است که این امر خود زمینه ساز بسیاری از بیماریها است. عوامل عفونی که شامل انگل‌ها، باکتریها، ویروس‌ها، قارچها می‌باشند همواره مزارع پرورش ماهی را مورد تهدید قرار می‌دهند. یکی از این بیماریها سپتی سمی آئروموناس‌های متحرک[1] است که عامل آن باکتری آئروموناس هایدرروفیلا[2] و گاهی دیگر گونه های آئروموناس می‌باشد. این بیماری گسترش جهانی دارد و در پرورش ماهیان گرم آبی یک مشکل اقتصادی مهم است (۱۸). از بیماری فوق موارد متعددی در ایران گزارش شده است و به نظر می‌رسد که یک مشکل بالقوه برای سیستم های پرورش ماهی بخصوص گرم آبی باشد (۵، ۶ و ۷). در ارتباط با باکتری آئروموناس هایدروفیلا در ایران و جهان تحقیقات متعددی صورت گرفته است و این باکتری در موارد متعددی از ماهیان پرورشی و حتی انسان گزارش شده است (۲، ۱۰، ۱۳، ۱۹ و ۲۰).

به منظور کنترل این بیماری امروزه توجه زیادی به ساختن واکسن شده است، که برای این منظور سلول باکتری غیرفعال شده به روش‌های مختلف اعم از غوطه‌وری، تزریقی و یا خوراکی به عنوان واکسن مصرف می‌شود و این روش یعنی استفاده از باکتری کامل به عنوان آنتی‌ژن، به دلیل سادگی و اقتصادی بودن تهیه واکسن هنوز بسیار متداول است (۴، ۱۲ و ۱۷). با اینحال آنتی ژن خالص با روشهای جدیدتری نیز تهیه می شود که معمولا هنوز در مرحله تحقیقاتی هستند (۱۱ و ۲۴). قاجاری (۱۳۷۶) برای اولین بار در ایران امکان ایمن‌سازی ماهی کپور را با استفاده از باکتری کشته شده آئروموناس هایدروفیلا به وسیلهٔ حرارت و فرمالین مورد بررسی قرار داد. کلباسی و همکاران (۱۹۹۹) و سلطانی و کلباسی (۲۰۰۱) ایمن-سازی ماهیان خاویاری را بر علیه آئروموناسها بررسی نمودند. لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) و (۱۹۹۶) نیز چند گونه باکتری و روش‌های مختلف تزریق آنها را مورد بررسی قرار دادند. ولی تاکنون هیچ واکسنی به صورت تجارتی علیه این بیماری در دسترس نیست. هدف از این تحقیق تعیین کارآیی تزریق باکتری کشته آئروموناس و مقایسهٔ روش‌های مختلف تزریق در برانگیختن پاسخ ایمنی در ماهی کپور معمولی و ارزیابی نتایج امر با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون می‌باشد. همچنین تأثیر تزریق باکتری کشته بر پروتئین‌های سرم نیز سنجیده می‌شود. این تحقیق می‌تواند مقدمه‌ای در جهت ساختن واکسنی مؤثر و مفید جهت کنترل بیماری ناشی از آئروموناسها در کپور معمولی باشد.

روش کار

- تهیهٔ ماهی

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی پرورشی با استفاده از تور پره از یکی از مزارع پرورش ماهی اطراف اهواز صید شدند. ماهیهای صید شده در محدودهٔ وزنی ۷۰-۳۰ گرم و سن حدود ۱ سال بودند. ماهیها بلافاصله پس از صید به وسیلهٔ تانک مخصوص حمل ماهی، به آکواریوم‌هایی با حجم تقریبی ۱۰۰ لیتر که قبلاً آب آنها به وسیلهٔ تیوسولفات سدیم کلر زدایی شده بود به آزمایشگاه بیماریهای ماهی دانشکده دامپزشکی اهواز منتقل و نگهداری شدند. برای کلرزدایی آب لوله کشی به ازاء هر ۱۰۰ لیتر آب ۱۰ گرم تیوسولفات سدیم به کار برده شد.

شوری آب آکواریوم‌ها ppt ۰/۵، PH آن ۷/۸، دمای آب در محدودهٔ ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد بود. ماهیان صید شده را ابتدا به مدت چهار روز در آکواریوم نگه داشته تا با شرایط جدید سازگار شوند. سپس آنها را به دو گروه ۳۰ تایی (جمعاً ۶۰ قطعه) تقسیم کرده و هر کدام از گروهها به عنوان یک گروه آزمایشی (گروه

1 - Motile Aeromonas Disease
2 - Aeromonas hydrophila

www.SID.ir

Archive of SID

تزریق داخل عضلانی و گروه تزریق داخل صفاقی) در نظر گرفته شدند. ۲ گروه ۲۰ تایی (۴۰ قطعه) ماهی نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که به آنها به دو روش فوق فقط سرم فیزیولوژی تزریق گردید. میزان حجم باکتری کشته و سرم نمکی تزریقی به هر ماهی حدود ۰/۵ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. به منظور اطمینان از عدم وجود پادتن ضد آئروموناس هایدروفیلا در سرم ماهیهای مورد مطالعه۲۰ قطعه ماهی نیز بدون هیچگونه تزریقی نگهداری گردیدند و تست سرولوژی آگلوتیناسیون در لوله، روی آنها انجام گردید که همگی از نظر عیار آنتی‌بادی سرم نسبت به آئروموناس هایدروفیلا منفی بودند. در طی مراحل کار به طور روزانه حدود نیمی از حجم آب ماهی‌ها تعویض و سیفون می‌شد و غذادهی به ماهی‌ها با استفاده از پلت‌های آماده صورت می‌گرفت.

- تهیه باکتری کشته آئروموناس هایدروفیلا

باکتری آئروموناس هایدروفیلای استفاده شده در این تحقیق از یک نمونه مرضی ماهی جداسازی و توسط بخش باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز مورد تایید قرار گرفت. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی موید آن بود که این باکتری گرم منفی و میله‌ای کوتاه، اکسیداز مثبت، متحرک، ایندول مثبت، اوره آز منفی، سیترات مثبت و واکنش در محیط TSI به صورت اسید/اسید، گاز مثبت و H2S منفی بوده است.

باکتری فوق در محیط آگار مغذی و در ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد.

باکتری های رشد کرده با استفاده از گلوله های شیشه ای استریل و محلول بافر فسفات از سطح محیط کشت جدا گردید و سوسپانسیون غلیظی از باکتری فوق به دست آمد. سوسپانسیون حاصله با استفاده از محلول بافر فسفات رقیق گردید که کدورتی معادل لوله ۳ مک فارلند تهیه گردد (مطابق با روش چاندران و همکاران، ۲۰۰۲). بدین ترتیب در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون نهایی تقریباً ۹۰۰×۱۰^{۶} باکتری وجود داشت. سپس برای کشتن باکتری ها فرمالین در چهار رقت (۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۶ و۰/۳ درصد) تهیه و هم حجم سوسپانسیون تهیه شده سرم فیزیولوژی فرمالینه ریخته شده و مجموعه حاصل به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از این مدت سوسپانسیون های مذکور با سرعت g ۱۰۰۶ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل دو مرتبه با محلول بافر فسفات طبق شرایط بالا شستشو داده شد و سوسپانسیونی معادل لوله شماره سه مک فارلند تهیه گردید. برای اطمینان از کشته شدن باکتری ها و عدم رشد آنها از هر لوله در محیط آگار خون دار کشت داده شد که پلیت ها ی مربوط به سوسپانسیون های ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵ درصد رشد کردند اما پلیت های مربوط به ۰/۶ و ۰/۳ درصد رشد نکردند و مشخص شد در این رقت‌ها فرمالین باعث کشته شدن باکتری‌ها گردیده است و چون رقت ۰/۳ درصد فرمالین ساختار آنتی‌ژنی باکتری را کمتر تحت تاثیر قرار می‌دهد به عنوان رقت موردنظر جهت تهیه باکترین انتخاب شد. نهایتاً حجم زیادی از سوسپانسیون باکترین تهیه و تا زمان تزریق به ماهی‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد .

- تزریق باکتری کشته به ماهی به روش داخل صفاقی و داخل عضلانی

به ۳۰ قطعه ماهی باکتری کشته به صورت داخل صفاقی تزریق شد و یک گروه شاهد هم برای آن در نظر گرفته شد که بدین منظور به ۲۰ قطعه ماهی، بصورت داخل صفاقی سرم نمکی تزریق گردید. محل تزریق داخل صفاقی، خط میانی شکم و حد فاصل بین باله های شکمی سینه ای بوده است. به ۳۰ قطعه ماهی دیگر نیز باکتری کشته به صورت داخل عضلانی تزریق گردید و یک گروه شاهد نیز برای آن در نظر گرفته شد، بدین ترتیب که به۲۰ قطعه ماهی به صورت داخل عضلانی سرم نمکی تزریق شد. محل تزریق عضلات ناحیه پشتی (حدفاصل بین باله پشتی و خط جانبی) بوده است. ۲۰ قطعه ماهی نیز بدون تزریق باکتری بعنوان شاهد بدون تزریق نگهداری شدند .

- خونگیری و جدا کردن سرم خون

تمامی ۱۲۰ قطعهٔ ماهی دو هفته پس از تزریق از طریق ورید دمی خونگیری شدند. برای این کار با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از سرنگ ۵ میلی لیتری با سر سوزن شمارهٔ ۲۲ از محل ساقهٔ دمی اقدام به خونگیری گردید. خون اخذ شده به آرامی در لوله‌های آزمایش استریل که قبلاً شماره گذاری شده بود، ریخته شد. لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه به طور مایل در دمای اتاق قرار داده شد و پس از منعقد شدن خون فیبرین آن با سواپ استریل جدا گردید و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۱۱۱g قرار داده شد تا سرم خون به خوبی جدا شود. سرم جدا شده توسط سمپلر برداشته شـــد و به میکروتیوب‌هایی که قبلاً شماره‌گذاری شده بودند منتقل گردید و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

- اندازه‌گیری عیارآنتی‌بادی به روش آگلوتیناسیون

براساس روش رقت متوالـــی، ابتدا ۰/۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی در لولهٔ اول و ۰/۵ میلی‌لیتر در هر یک از لوله‌های بعدی ریخته می‌شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سرم مورد آزمایش به لولهٔ اول اضافه شده و کاملاً مخلوط می‌گردید در مـــرحلهٔ بعد از لولـــه اول ۰/۵ میلی‌لیتر به لولهٔ دوم و از لولهٔ دوم به لوله سوم به همین ترتیب تا لولهٔ آخر ادامه داده می‌شد و ۰/۵ میلی‌لیتر از لولهٔ ششم دور ریخته می‌شد تا حجم همه لوله‌ها یکسان (۰/۵ میلی‌لیتر) گردد (جدول شماره ۱). سپس ۰/۵ میلی لیتر از آنتی‌ژن (سوسپانسیون باکترین معادل لوله۳ مک‌فارلند) به تمام لوله‌ها اضافه می‌گردید در نهایت با افزودن آنتی‌ژن رقت نهایی به ترتیب از لولهٔ اول تا ششم ۱:۲۰، ۱:۱۶۰، ۱:۸۰، ۱:۴۰، ۱:۳۲۰، ۱:۶۴۰ بدست آمد.

جدول ۱. نحوه انجام آزمایش سروآگلوتیناسیون در لوله

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	لوله‌شاهد
سرم فیزیولوژی(ml)	۰/۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۷۵
سرم ماهی(ml)	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	حذف شد	-
آنتی‌ژن(ml)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵
رقت نهایی	۱:۲۰	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰	۱:۶۴۰	-

- اندازه‌گیری پروتئین تام سرم خونی

اصول آزمایش: اندازه‌گیری پروتئین تام به روش بیوره (براساس کیت پارس آزمون) انجام گردید. در این روش پروتئین‌ها با محلول قلیایی مس تشکیل کمپلکس آبی متمایل به بنفش می‌دهد که شدت رنگ تولید شده نسبت مستقیم با مقدار پروتئین تام در نمونه دارد. برای اینکار شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر سنجیده شده و جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Roy spectronic- 2OD ساخت آمریکا) سنجیده شد (۳).

- تفکیک پروتئین‌های سرم

تفکیک پروتئین‌های سرم به روش الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ (با کیت الکتروفورز Sebia ساخت فرانسه) انجام گردید. برای اینکار در تانک الکتروفورز ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر ریخته شد بطوریکه در هر سمت تانک به طور مساوی ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر قرار گرفت. ابتدا ژل از جعبه مربوطه خارج و بر روی یک سطح صاف قرار داده می‌شد، سپس ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در محل حفره‌های تعبیه شده برای نمونه، بر روی اپلیکاتور قرار داده می‌شد. پس از نفوذ نمونه در حفره‌ها (۲ دقیقه) دندانهٔ اپلیکاتور را جدا کرده و در محل مناسب روی دستگاه اپلیکاتور پایه قرار داده می‌شد. بعد اهرم سمت راست اپلیکاتور را چرخانده و بدون وارد آوردن فشار برای۴۰ ثانیه پائین آورده می‌شد. پس از ۴۰ ثانیه اپلیکاتور از روی ژل برداشته می‌شد و ژل به تانک الکتروفورز منتقل می‌گردید. قسمت نمونه‌گذاری شده ژل در سمت کاتدی تانک الکتروفورز، در حالیکه سطح ژل به سمت پائین بود، قرار داده می‌شد و لبهٔ دیگر ژل در سمت آندی تانک الکتروفورز قرار می‌گرفت. سپس تانک به منبع الکتریکی متصل و به مدت ۲۲ دقیقه در ولتاژ ۹۰ و شدت جریان ۳±۱۲ میلی‌آمپر الکتروفورز نمونه‌ها صورت می‌گرفت و سپس ژل از تانک الکتروفورز خارج و در قالب مخصوص نگهداری ژل قرار داده می‌شد. برای انجام عمل فیکساسیون به مدت ۱۵ دقیقه در جای حاوی محلول فیکساتیو قرار داده می‌شد، آنگاه از محلول فیکساتیو خارج و در اتوکلاو $80^{\circ}c$ به مدت ۴۵ دقیقه خشک می‌گردید. مرحله بعد از خشک کردن، رنگ‌آمیزی ژل و رنگ‌زدایی از آن بود، برای این کار ژل در محلول رنگ‌آمیزی

www.SID.ir

Archive of SID

آمیدوبلاک به مدت ۴ دقیقه قرار داده شد و بعد از آن در سه ظرف متوالی رنگ‌زدایی می‌گردید تا زمانی که زمینه ژل بی‌رنگ گردد. مایع اضافه ژل با کاغذ صافی گرفته می‌شد و مجدداً در اتوکلاو ۸۰ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت تا خشک شود (۳).

- بررسی آماری

متوسط عیارها و میانگین مقادیر پروتئین ها به روش آنالیز واریانس یک طرفه موردمقایسه قرار گرفتند و p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار بحساب آمد.

نتایج

الف – گروه شاهد بدون تزریق

گروه شاهد بدون تزریق شامل ۲۰ عدد ماهی بود. همانطوریکه در جدول شمارهٔ ۲ و ۳ دیده می‌شود فقط ۶ قطعه از این ماهی‌ها دارای عیار پادتن ضدآئروموناس بوده‌اند.

ب- گروه تزریق داخل صفاقی

همانطوری که در جداول ۲ و ۳ دیده می‌شود، میانگین عیار و تعداد ماهیهای دارای عیار در گروههایی که به آنها باکتر تزریق شده است بیشتر از گروههای شاهد بوده است. در گروه تزریق داخل صفاقی سرم نمکی از تعداد ۲۰ عدد ماهی ۷۵٪ موارد آنها منفی بوده است در حالی که در گروه با تزریق باکتری به روش داخل صفاقی از ۳۰ عدد ماهی مورد بررسی ۴۰٪ موارد فاقد عیار ضد آئروموناس بوده اند .

ج- گروه تزریق داخل عضلانی

همانطوریکه در جدول ۳ دیده می‌شود در گروه تزریق داخل عضلانی سرم نمکی از تعداد ۲۰ عدد ماهی ۷۵٪ موارد فاقد عیار سرمی بوده است. در گروه تزریق باکتری به روش داخل عضلانی از ۳۰ ماهی مورد بررسی فقط ۳۶٪ موارد فاقد عیار سرمی بوده اند.

د- مقایسهٔ آماری گروهها

در مقایسه تیتر آنتی‌بادی سرم در گروه تزریق داخل صفاقی باکتری با گروه تزریق داخل صفاقی سرم نمکی میزان عیار سرم در تزریق باکتری به طور معنی‌داری بیشتر از گروه تزریق سرم نمکی بوده است ($P<0/01$). در مقایسه تیتر آنتی‌بادی در گروههای تزریق داخل عضلانی نیز، عیار سرم در گروه تزریق باکتری با ۹۹٪ اطمینان از گروه تزریق سرم نمکی بیشتر بوده است ($P<0/01$). در مقایسه بین گروههای شاهد بدون تزریق و گروههای تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی سرم نمکی نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P> 0/05$).

جدول ۲. میانگین و خطای معیار ($M \pm SE$) و حداکثر عیار آنتی بادی ضد آئروموناس هایدروفیلا در گروههای ماهی کپور مورد مطالعه

گروهها	تعداد ماهی	تعداد ماهی دارای عیار	میانگین عیار ± خطای معیار	حداکثر عیار
شاهد بدون تزریق	۲۰	۶	۷ ∓ ۲/۶۳	۱:۴۰
تزریق IP سرم نمکی	۲۰	۵	۶ ∓ ۲/۵۵	۱:۴۰
تزریق IM سرم نمکی	۲۰	۵	۸ ∓ ۳/۳۷	۱:۴۰
تزریق IP باکتری	۳۰	۱۸	۱۶ ∓ ۲/۸۹	۱:۴۰
تزریق IM باکتری	۳۰	۱۹	۲۸ ∓ ۶/۴۱	۱:۱۶۰

I.P. : تزریق داخل عضلانی .I.M : تزریق داخل صفاقی

جدول ۳. تیمارهای دارای عیار و درصد عیارهای مختلف آنتی بادی ضد آئروموناس هایدروفیلا در گروههای ماهی کپور مورد مطالعه

عیار / گروه	صفر		۱:۲۰		۱:۴۰		۱:۸۰		۱:۱۶۰		تعداد کل مثبت ها	
	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد
شاهد بدون تزریق	۱۴	۷۰	۵	۲۵	۱	۵	۰	۰	۰	۰	۶	۳۰
تزریق IP سرم نمکی	۱۵	۷۵	۴	۲۰	۱	۵	۰	۰	۰	۰	۵	۲۵
تزریقIM سرم نمکی	۱۵	۷۵	۲	۱۰	۳	۱۵	۰	۰	۰	۰	۵	۲۵
تزریق IP باکتری	۱۲	۴۰	۱۱	۳۶	۷	۲۳	۰	۰	۰	۰	۱۸	۶۰
تزریق IM باکتری	۱۱	۳۶	۷	۲۳	۸	۲۶	۳	۱۰	۱	۳/۳	۱۹	۶۳

I.P. : تزریق داخل عضلانی .I.M : تزریق داخل صفاقی

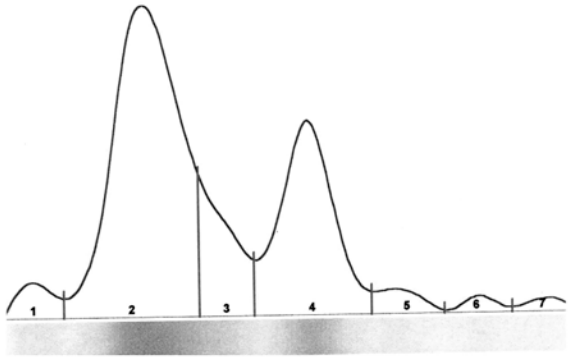
ذ- مقایسه فراکسیونها در بین دو گروه تزریق باکتری و سرم فیزیولوژی

منحنی الکتروفورز پروتئینهای سرم خون ماهی کپور معمولی در حالت طبیعی در شکل ۱ نشان داده شده است. مقادیر فراکسیونهای پروتئینی سرم در جدول ۴ آورده شده است. همانطوریکه در جدول دیده می‌شود آلفا-۲ گلوبولین، گاما-۱ گلوبولین و گلوبولین تام در گروه تزریق داخل صفاقی به طور معنی‌داری

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر از گروه تزریق داخل عضلانی باکتری بود (P<۰/۰۵). در بقیه فراکسیونها تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت (P>۰/۰۵).



شکل ۱: منحنی الکتروفورز پروتئینهای سرم خون ماهی کپور معمولی در حالت طبیعی

۱- پری‌آلبومین،۲- آلبومین، ۳-آلفا-۱گلوبولین،۴- آلفا-۲گلوبولین،۵-بتا گلوبولین، ۶-گاما-۱ گلوبولین، ۷- گاما-۲ گلوبولین

جدول ۴. مقایسه آماری فراکسیونهای مختلف در گروه‌های مورد مطالعه

گروهها / پارامترها[1]	گروه تزریق داخل‌صفاقی باکتری	گروه تزریق داخل‌صفاقی نرمال سالین	گروه تزریق داخل‌عضلانی باکتری کشته	گروه تزریق داخل‌عضلانی نرمال سالین
پروتئین تام	۳/۷۶±۰/۴۹	۳/۶۳±۰/۳۶	۳/۵۷±۰/۳۵	۳/۸۸±۰/۷۵
پری آلبومین	۰/۲۳±۰/۱۲	۰/۱۹±۰/۰۹	۰/۲۱±۰/۰۷	۰/۲۸±۰/۱۲
آلبومین	۱/۹۷±۰/۳۷	۱/۸۱±۰/۳۲	۱/۹۲±۰/۳۱	۱/۹۸±۰/۴۸
آلفا-۱- گلوبولین	۰/۵±۰/۲	۰/۴۸±۰/۱۵	۰/۴۷±۰/۰۹	۰/۵۹±۰/۱۷
آلفا-۲-گلوبولین*	۰/۶۷±۰/۱۶	۰/۵۵±۰/۳	۰/۶±۰/۱	۰/۶±۰/۱۳
بتا- گلوبولین	۰/۲۱±۰/۱۷	۰/۲۷±۰/۳۱	۰/۲۷±۰/۱۱	۰/۲۲±۰/۱
گاما-۱گلوبولین*	۰/۲۱±۰/۲۰	۰/۳۳±۰/۲۵	۰/۱۱±۰/۰۶	۰/۱۵±۰/۱
گاما- دوگلوبولین	۰/۰۰۳±۰/۰۱	۰/۰۱±۰/۰۳	۰/۰۰۳±۰/۰۱	—
آلبومین کل	۲/۲۲±۰/۴۳	۲±۰/۳۵	۲/۱۳±۰/۳۱	۲/۲۴±۰/۵۲
گلوبولین کل*	۱/۶۰±۰/۳۳	۱/۶۹±۰/۳۶	۱/۴۴±۰/۲۳	۱/۶۲±۰/۳۵
گلوبولین/آلبومین	۱/۴۹±۰/۵۳	۱/۱۵±۰/۴۹	۱/۵۱±۰/۳۵	۱/۴۱±۰/۳۳

[1] مقادیر بصورت (انحراف‌معیار ± میانگین) بیان شده است.
*اختلاف بین میانگین‌ها معنی‌دار بوده است.

بحث

آئروموناس هایدروفیلا از باکتری‌هایی است که همه‌گیریهای متعددی در ماهیان پرورشی و آکواریومی ایجاد کرده است. در این تحقیق برای بررسی واکنش ایجاد آنتی‌بادی از دو روش تزریقی داخل صفاقی و داخل عضلانی باکترین استفاده گردید. روش‌های تزریقی از نظر بررسی واکسن‌ها از دیگر روش‌های متداول از قبیل خوراندن واکسن، دقیق‌تر هستند. در روشهای تزریقی، میزان باکتری کشته ورودی به بدن نیز بهتر قابل محاسبه است. بنظر می‌رسد در بین روشهای تزریقی (داخل صفاقی و داخل عضلانی) هم از نظر تاثیر و کارایی تفاوتهایی وجود داشته باشد. هر چند در تحقیق حاضر با توجه به نتایج بدست آمده تزریق باکتری کشته در هر دو روش تزریقی عیار سرمی پادتن اختصاصی را بطور قابل توجهی افزایش داده است. همانطوری که نتایج نشان می‌دهد هیچگونه مرگ و میری در ماهیان مورد آزمایش پس از تزریق مشاهده نشد که می‌تواند نشانگر بی‌خطر بودن روش تجویز تزریقی باشد. روانگاپان[1] و همکاران (۱۹۸۶) نیز با آئروموناس کشته شده در اثر فرمالین واکسیناسیون داخل صفاقی انجام دادند و یک هفته بعد از تزریق درجاتی از ایجاد ایمنی پس از تزریق را گزارش کردند. بین هفته‌های ۲ و ۵ هیچگونه مرگ و میری در گروههایی که واکسن دریافت کرده بودند دیده نشد و در هنگام مواجه شدن ماهیهای ایمن شده با باکتری بیماریزا، ۸۰-۷۳ درصد بهبودی در گروههای مورد آزمایش مشاهده گردید. در این ارتباط شواچت[2] (۱۹۸۷) نیز با اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی در گربه ماهی روگاهی ثابت کرد که پاسخ‌های ایمنی پس از تزریق آنتی ژن باکتریایی به ماهی بالا می‌رود.

در یک مطالعه که توسط تون و پلمپ (۱۹۸۲)[3] انجام شد نشان دادند که روش تزریقی صرفنظر از روش تهیه آنتی‌ژن دارای تیتر بالاتری می‌باشد در این مطالعه روش تزریقی با روش غوطه‌ورسازی و اسپری مقایسه گردیده است. لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴)[4] نیز روش تزریقی را نسبت به غوطه‌ور سازی ارجح دانستند. فانگ[5] و همکاران (۲۰۰۰) با روش آگلوتیناسیون تیتر آنتی‌بادی علیه آئروموناس هایدروفیلا را اندازه‌گیری کردند.

1- Ruangapan et al. (1986)
2- Schachte (1987)
3 - Thune and Plumb (1982)
4- Loghothetis and Austin (1994)
5- Fang et al (2000)

www.SID.ir

Archive of SID

در این تحقیق تغییرات پروتئین‌های سرم خون ماهی در برخورد با باکتری کشته آئروموناس هایدروفیلا بررسی شد که می‌تواند بعنوان یک شاخص برای بررسی تغییرات ایمنی بدن ماهی باشد (لامرز و ونمویزوینکل[1]، ۱۹۸۶). اندازه‌گیری پروتئین‌های سرم با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز انجام داده شد. در الکتروفورز ژل آگارز فراکسیون عمده پروتئینی بصورت باندهای کاملا مشخص نشان داده شد. این فراکسیون‌ها عبارت بودند از: پری‌آلبومین، آلبومین، آلفا یک گلوبولین، آلفا دو گلوبولین، بتاگلوبولین، گاما یک گلوبولین، گاما دو گلوبولین معرفی این فراکسیون‌ها در خون ماهی کپور معمولی برای اولین‌بار گزارش می‌شود و گزارش مشابهی در این ماهی مشاهده نشده است.

در این تحقیق از باکتری آئرموناس هایدروفیلای جدا شده از ماهی کپور بیمار برای انجام آزمایشات ایمن‌سازی استفاده گردید و برای کشتن باکتری نیز از فرمالین استفاده گردید. فرمالین یکی از متداولترین مواردی است که برای کشتن باکتری بدون از بین بردن خاصیت ایمنی‌زایی آن استفاده می‌شود. برای تهیه باکتری کشته، آنتی‌ژنی که باید پاسخ ایمنی را تحریک کند بایستی در مرحله غیرفعال کردن باکتری، از نظر ایمنی‌زایی بدون تغییر باقی بماند. چندین تحقیق برای تهیه باکتری کشته آئروموناس هایدروفیلا بخصوص باکتری کشته مؤثر بر پاسخ ایمنی ماهیها انجام شده است. در مطالعه‌ای لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) که ایمنی زایی واکسن تهیه شده از آئروموناس هایدروفیلا را در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی نموده اند، نتیجه گرفتند که بالاترین تیتر به دست آمده ناشی از واکسن فرمالینه می‌باشد و واکسن حرارت دیده دارای پایین‌ترین تیتر می‌باشد. لامرز و وان مویس وینکل (۱۹۸۶)[2] پیشنهاد کردند که آماده‌سازی با فرمالین ساختمان آنتی‌ژنیکی آئروموناس هایدروفیلا را به نحوی تغییر می‌دهد که مهار شدن آنتی‌ژن‌ها با ماکروفاژها بهتر صورت می‌گیرد. در حالی که روش حرارت دادن و شکستن باکتریها، قادر به آزادسازی ماده ژنتیکی زیادی برای ایمنی زایی نیست. در مطالعه لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۶) نیز نتیجه گرفتند که متعاقب حرارت دادن تغییراتی در قدرت هیدروفوبی و رسوبی ایجاد می‌شود که باعث تغییرات آنتی‌ژنتیکی می‌شود.

در ارتباط با تهیه واکسن به نظر می‌رسد که تعداد سلول‌ها در برآورد پاسخ ایمنی خیلی مهم است. در مطالعه حاضر از دوز ۹۰۰×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر بصورت تزریقی استفاده گردید. لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) نیز از دوزهای ۵×۱۰^{۴}-$۱۰^{۶}$ سلول برای هر تزریق استفاده کردند. در مطالعه دیگری لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۶) از دوزهای $۱۰^{۳}$ تا ۲×۱۰^{۴}-$۱۰^{۵}$ سلول به ازای هر گرم وزن بدن ماهی استفاده کردند. دوز مورد استفاده در این تحقیق در محدوده مقادیر ارائه شده توسط لوگوتیتس و آستین (۱۹۹۴) بوده است.

قاجاری (۱۳۷۶) برای اولین بار در ایران این کار را بر روی ماهی کپور معمولی با استفاده از باکتری کشته شده آئروموناس هایدروفیلا به وسیله فرمالین و حرارت انجام داده و چنین نتیجه گرفت که روش تهیه آنتی‌ژن فرمالینه به روش تهیه آنتی‌ژن حرارت دیده ارجحیت دارد. همچنین برتری روش‌های واکسیناسیون در ارتباط مستقیم با روش تهیه آنتی ژن است و تیتر آنتی‌بادی تا روز ۶۰ پس از آزمایش دارای یک سیر صعودی است.

در بررسی تغییرات سرم ضد آئروموناس، در هر دو روش تزریق، میزان تیتر آنتی‌بادی در گروه تزریق باکتری کشته بیشتر از گروه شاهد (تزریق سرم فیزیولوژی) بوده است. هرچند طبق این نتایج تفاوت تیتر آنتی‌بادی معنی‌دار بوده است ولی واکنش قوی ضدآئروموناس در تمامی ماهیان تزریق شده ایجاد نشده است که نشانگر واکنش ضعیف ماهیها نسبت به آنتی‌ژن تزریق شده می‌باشد.

احتمالاً چند عامل در پایین بودن تیتر آنتی‌بادی گروههای آزمایشی مؤثر بوده است:

۱- زمان بررسی تیتر آنتی‌بادی. احتمالاً در صورتیکه مدت زمان بیشتری از شروع تزریق می‌گذشت مثلا یک ماه پس از تزریق احتمال اینکه تیتر آنتی‌بادی بیشتر باشد، افزایش می‌یافت.

1- Lamers and VanMuiswinkel (1986)
2 - Lamers and Van Muiswinkel (1986)

www.SID.ir

Archive of SID

۲- وجود مواد همراه یا ادجوانت می‌تواند در ارائه بهتر آنتی‌ژن به بدن ماهیها نقش مؤثری داشته باشد.

۳- دمای نگهداری ماهیها در صورتیکه به بالای ۲۵ درجه افزایش یابد احتمال اینکه واکنش قوی‌تری در ماهیها ایجاد شود افزایش می‌یافت.

پیغان و همکاران (۲۰۰۳) پس از تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی باکتری کشته آئروموناس هایدروفیلا متوجه شدند که تزریق باکتری کشته می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار لنفوسیت‌ها در کلیه قدامی ماهی کپور شود و چون لنفوسیت‌ها معمولترین و بیشترین درصد لکوسیت‌ها را در خون محیطی انواع ماهیان دارا می‌باشند در صورتی که به طور همزمان تیتر آنتی‌بادی نیز افزایش یابد می‌تواند یک یافته مهم در ایجاد ایمنی ضد باکتری باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد هر چند بالاترین عیار در گروه تزریق داخل عضلانی باکتری مشاهده شده است، اما تفاوت معنی‌داری در متوسط عیار آنتی بادی ضد آئروموناس هایدروفیلا بین دو گروه تزریق باکتری (روش تزریق داخل صفاقی و روش تزریق داخل عضلانی) وجود ندارد. با توجه به این نتیجه می‌توان پیشنهاد نمود نظر به کم‌خطر بودن و راحتر بودن روش تزریق داخل عضلانی نسبت به تزریق داخل صفاقی بهتر است از روش داخل عضلانی برای ایمن‌سازی ماهی‌ها کپور معمولی استفاده گردد.

به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده تزریق باکتری توانسته است واکنش تولید آنتی‌بادی را در بدن ماهی کپور معمولی پس از حدود دو هفته ایجاد نماید. اما قدرت محافظت کنندگی این تیتر آنتی‌بادی ممکن است هنوز کافی نباشد که برای اثبات این موضوع لازم است پس از ایمن سازی ، ماهیها تحت استرس در معرض باکتری زنده با حدت بالا قرار گرفته و کارایی این تزریق مورد آزمایش قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با اعتبارات دانشگاه شهید چمران انجام گردیده است. بدینوسیله از همکاری معاونت محترم آبزیان شیلات خوزستان، مسئولین و کارکنان محترم گارگاه تکثیر و پرورش ماهی شهید ملکی اهواز که در تهیه ماهی برای انجام این تحقیق ما را یاری نمودند کمال سپاس را داریم.

منابع

1. Acuigru, P., 1980. Trial vaccination of rainbow trout against *Aeromonas liquefaciens*. Fish Diseases. Ahne, W. (ed.), 3rd edition. Springer Verlag. Berlin. pp. 206-211.
2. Aslani, M.M., Hamzeh, H.S., 2004. Characterization and distribution of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from fecal samples of diarrheal and asymptomatic healthy persons, in Ilam, Iran . Iranian Biomedical Journal 8, 199-203 (In persian).
3. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 1999. Text Book of Clinical Chemistry. 3rd edition. W.B. aunders Company. Philadelphia. pp. 447-540.
4. Chandran, M.R., Aruna, B.V.; Logambal, S.M. And Dinakaran, R., 2002.
5. Ebrahimi, M., 1996. Study on the effects of oxygen deficiency, water turbidity, high temperature and intensity on *Aeromonas hydrophila* infections in cultured carps in Fars province. Doctorate of veterinary medicine thesis, Shiraz University, no. 596, 103 P. (In Persian)
6. Esmaeeli, F., Peyghan, R., 1997. Infection of grass carp to Motile Aeromonas like germs. Iranian Journal of Fisheries Science 2, 37-41. (In Persian)
7. Ghajari, A., 1997. *Immunogenicity of Aeromonas hydrophila* in common carp. Doctorate of veterinary medicine thesis, Shiraz University, no. 657, 115 P. (In Persian)
8. Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. Fish and Shellfish Immunology 13, pp. 1–9.
9. Fang, H.M., Ling, K.C., Ge. R., Sin. Y.M., 2000. Enhancement of productive immunity in blue gourami, *Tichogaster trichopterus* (Pallas), against *Aeromonas hydrophila* and V*ibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesion. Journal of Fish Diseases 23, 137-145.
10. Kalbassi, M.R., Soltani, M., Porbakhsh, A., 1999. Immune response of Iranian sturgeon to four different *Aeromonas antigens*. 9th

www.SID.ir

Archive of SID

Congress of European Association of Fish Pathologists. Greek, 19-24 Sep, pp.76.
11. Khushiramani, R., Girisha, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2007. Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish. Protein Expression and Purification 51, 303–307.
12. Kodama, H., Tijiwa, K., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2002. Granulocyte responses to experimental injection of live and formalin-killed bacteria in carp (*Cyprinus carpio*). Veterinary Immunology and Immunopathology 90, 101-105.
13. Lamers, C.H.J., VanMuiswinkel, W.B., 1986. Natural and acquired agglutinins to *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.,). Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences 43, 619-624.
14. Loghothetis, P.N., Austin, B., 1994. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 23, 239-254.
15. Loghothetis, P.N., Austin, B., 1996. Variations in antigenicity of *Aeromonas hydrophila* strains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) an association with surface characteristic. Fish and Shellfish Immunology 6, 47-55.
16. Nielsen, M. E., Schmidt, A., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L., 2001. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile Aeromonas species that causes disease out breaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China. Disease of Aquatic Organisms 46, 23-29.
17. Peyghan, R., Khajeh, G., Mozarmnia, N., 2003. Effects of intrapritoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on common carp lymphocytes. 3rd Aquarama World Conference, Singapore, pp.40.
18. Roberts, R.J., 2001. Fish Pathology. Third edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp. 297-330.
19. Ruangapan, L., Kitao, T., Yoshida, T., 1986. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccine in Nile tilapia. Veterinary Immunology and Immunopathology 12, 345-350.
20. Schachte, J.H., 1978. Immunization of channel catfish (*Ictalurus punnctatus*) against two bacterial diseases. Marine Fisheries Review 40, 18-19.
21. Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V., 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of b-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. Veterinary Immunology and Immunopathology 114,15–24.
22. Soltani, M., Kalbassi, M.R., 2001. Protection of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling against *Aeromonas hydrophila* septicemia using three different antigens . Bulletin of the European Association of fish Pathologists 21, 235-240.
23. Thune, R.L., Plumb, A., 1982. Effect of delivery method and antigen preparation on the production of antibodies against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Progressive Fish Culturist 44, 53-54.
24. Yongjie L., Zhixiang B., 2007. Potential use of a transposon Tn916-generated mutant of *Aeromonas hydrophila* J-1 defective in some exoproducts as a live attenuated vaccine. Preventive Veterinary Medicine 78, 79-84.

www.SID.ir