Archive of SID

تغییرات شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus frisii kutum*) در مواجهه با رابدو ویروس کارپیو

صادق امیدوار[۱]، محدث قاسمی*[۱]، زینب امیدوار[۲]، سمیه حقیقی کارسیدانی[۳]، کامران زلفی نژاد[۱]

۱- پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

۲- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران، صندوق پستی: ۱۶۳

۳- گروه شیلات، واحد بندرانزلی، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرانزلی، ایران، صندوق پستی: ۸۸۶۹۳-۴۳۱۶۹

تاریخ دریافت: ۲۲ تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۹ آذر ۱۳۹۵

چکیده

مطالعه حاضر به بررسی تأثیر رابدو ویروس کارپیو عامل ویرمی بهاره کپور (SVC) بر شاخص‌های خونی و ایمنی ۱۳۵ قطعه بچه ماهی سفید در سه تیمار شاهد، حمام و تزریق صفاقی، به مدت چهار هفته پرداخته است. شاخص‌های خونی شامل تعداد گلبول قرمز (RBC)، تعداد گلبول سفید (WBC) و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، لنفوسیت، منوسیت و ائوزینوفیل)، غلظت هموگلوبین (HB)، درصد هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط یاخته‌ای (MCV)، میانگین هموگلوبین یاخته‌ای (MCH)، میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای (MCHC) و شاخص‌های ایمنی شامل کورتیزول، لیزوزیم، کمپلمان و ایمونوگلوبولین اندازه‌گیری شد. در این بررسی اولین علائم بالینی و بروز تلفات بچه ماهیان در تیمار تزریق صفاقی و تیمار حمام به ترتیب در روز ۱۳ و روز۱۶ پس از مواجه‌سازی با ویروس مشاهده شد. شاخص‌های خونی (گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط یاخته‌ای، میانگین هموگلوبین یاخته‌ای، میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید) در تیمارهای حمام و تزریق صفاقی نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. تیمار حمام بالاترین میزان افزایش پارامترها، به جز فاکتور میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای را در مقایسه با تیمار تزریق صفاقی به خود اختصاص داد ($P<۰/۰۵$). شمارش تفریقی گلبول‌های سفید، درصد نوتروفیل، منوسیت و ائوزینوفیل تیمارهای حمام و تزریق صفاقی نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. بالاترین میزان افزایش را تیمار حمام در مقایسه با تیمار تزریق صفاقی داشت ($P<۰/۰۵$). درصد لنفوسیت دو تیمار حمام و تزریق صفاقی از تیمار شاهد کم‌تر بود. کم‌ترین مقدار در تیمار حمام نسبت به تیمار تزریق صفاقی مشاهده شد. پارامترهای ایمنی کورتیزول، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و کمپلمان افزایش معنی‌داری را در تیمار حمام و تزریق صفاقی نسبت به تیمار شاهد نشان داد. بیشترین میزان افزایش به جز سیستم کمپلمان در تیمار تزریق صفاقی نسبت به تیمار حمام مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج حاصل مشخص گردید که ویروسSVCV قادر به ایجاد تغییرات در تعدادگلبول قرمز، تعداد گلبول سفید و سایر شاخص‌های خونی، ایمنی و ایجاد علائم بالینی و به دنبال آن بروز تلفات در بچه ماهی سفید می‌باشد.

کلمات کلیدی: رابدو ویروس کارپیو، ویرمی بهاره کپور، شاخص‌های خونی، شاخص‌های ایمنی، ماهی سفید.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). mohades@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

خانواده کپور ماهیان بزرگ‌ترین خانواده ماهیان استخوانی را با بیش از ۲۴۰۰ گونه و ۲۲۰ جنس تشکیل می‌دهند (Sanderse *et al*., 2003). یکی از گونه‌های با ارزش و اقتصادی حوزه جنوبی دریای خزر و مناطق آبی اطراف آن که سالانه بخش عمده‌ای از جمعیت صید ماهیان خزری را به خود اختصاص می‌دهد، ماهی سفید (*Rutilus frisiikutum*) می‌باشد که از لحاظ فیلوژنی در خانواده کپور ماهیان قرار دارد (رضوی، ۱۳۷۴). علم خون شناسی در زمینه ماهیان حدوداً از دهه ۸۰ میلادی کار خود را آغاز کرده و روند رو به پیشرفت سریعی داشته است و از آن جایی که هر گونه ماهی دارای الگوی خونی خاصی است این امر به مشکلات خون شناسی آن‌ها افزوده است (جمال زاده و همکاران، ۱۳۸۱). با توجه به این که تعیین شاخص‌های خونی و توجه به تغییرات گلبول‌های قرمز و سفید یک شاخص مهم سلامت موجودات مختلف است لذا آزمایشات خون شناسی نظیر شمارش گلبول‌های سفید می‌تواند برای تشخیص برخی از بیماری‌ها به کار رود. گلبول‌های سفید از نظر شکل ظاهری و عملکرد متنوع ترین اجزای خونی هستند که به دوگروه تقسیم می شوند: گروه اول گلبول‌های سفید تک هسته‌ای (لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها) و گروه دوم گلبول‌های سفید چند هسته‌ای (نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها) می‌باشند (شاهسونی و همکاران، ۱۳۷۸). گلبول قرمز خون یکی دیگر از عوامل فیزیولوژیک خون است که به عنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston, 1990). شاخص‌های خون شناسی در ماهیان ممکن است تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیکی مانند جنسیت، مراحل تولید مثل، سن، اندازه و سلامتی آن‌ها تغییر کند (Luskova,1995). این پارامترها همچنین تحت تأثیر عوامل خارجی نظیر فصل، دمای آب، کیفیت‌های زیست محیطی، غذا، استرس‌ها، انواع آلودگی‌ها و بیماری‌ها دچار تغییر می‌شوند (Sharma and shi, 1985). بررسی خون از نظر شاخص‌های و ایمنی در تشخیص بیماری‌های عفونی ماهی، مسمومیت با فلزات سنگین و یا مواد سمی و به طور کلی روند زیستی موجود موثر است. به علت مشخص شدن اهمیت زیاد علم هماتولوژی در ماهی شناسی، امروز پژوهش‌های بیشتری در این زمینه انجام گرفته که برای پیشرفت و توسعه کاربردی این علم باید تحقیقات اساسی‌تری انجام شود (Stoskof, 1993). جهت پیشگیری از بیماری‌های ماهی، آزمایشات خون شناسی و سنجش شاخص‌های ایمنی ضروری به نظر می‌رسد. عوامل عفونی موجب تغییر در این پارامترها می گردند به عنوان مثال سیستم کمپلمان نقش کلیدی در ایمنی غیر اختصاصی داشته و در فاگوسیتوز و تخریب سلولی دخالت دارد و در فرآیندهای التهابی حاد به شدت میزان آن افزایش می‌یابد (Magnadottir *et al*., 2005). ایمنی در ماهیان مانند سایر مهره داران به دو صورت غیر اختصاصی و اختصاصی تظاهر می‌یابد که مزیت شکل دوم، دوام و استمرار و اختصاصی بودن آن نسبت به عوامل خاص عفونی است اما ایمنی غیر اختصاصی دامنه‌ی وسیعی از عوامل بیماری‌زا را در بر گرفته ولی موقتی و اندام‌های مختلفی در ایجاد آن نقش دارد (Andersn, 1974). مکانیسم‌های ایمنی ذاتی به عنوان اولین زنجیره دفاعی علیه عفونت با تحریک التهابات به عنوان پاسخ اولیه ایمنی عمل می‌کنند، در حالی که تعداد زیادی از انواع سلول‌ها و میانجی گرها

www.SID.ir

Archive of SID

مسئول واکنش‌های التهابی هستند (Secombes *et al*., 2001).

رابدوویروس کارپیو عامل ویرمی بهاره کپور (SVCV)، از اعضاء خانواده ویروسی رابدوویریده[1] بوده و در جنس وزیکولوویروس[2] قرار دارد و معمولا در کپور ماهیان دیده می‌شود (Walker *et al*., 2000; Ahne, 1978). بیماری ویرمی بهاره کپور یکی از مهم‌ترین عوامل خسارات اقتصادی در مزارع پرورش کپور معمولی است ولی سایر گونه‌های کپور ماهیان نیز تا حدی نسبت به این بیماری حساس می‌باشند (Wolf, 1988). تغییرات بافتی متعدد در ماهیان بیمار مشاهده می‌شود که عمده‌ترین این تغییرات شامل تغییرات عروق خونی کبد، مهاجرت لنفوسیت‌ها و ملانوماکروفاژها به اندام‌ها، پرخونی و تجمع گلبول‌های قرمز در اندام‌ها و چسبندگی تیغه‌های ثانویه آبشش ها می‌باشد (Ahne , 1978). با توجه به این که روش‌های ویروس شناسی هزینه بردار و وقت‌گیر می‌باشد و بایستی نمونه برداری از اندام‌های داخلی پس از کشتن موجود صورت پذیرد لذا به کارگیری روش‌های خون شناسی و ایمنی به ویژه در ماهیان با ارزش از طریق خون‌گیری از ساقه دمی بدون کشتن موجود کم‌هزینه تر و بسیار سریعتر بوده و از آنجا که در مطالعات گذشته حساسیت ماهی سفید به رابدوویروس عامل ویرمی بهاره اثبات گردیده و چنین پژوهشی در کشور ما سابقه‌ای نداشته، لذا در این راستا مطالعه حاضر به بررسی تأثیرات ویروس کارپیو (SVCV) بر پارامترهای خونی و ایمنی بچه ماهیان سفید، از طریق روش‌های مواجه‌سازی تجربی حمام آبی و تزریق صفاقی می‌پردازد، که نتایج آن در جهت کاهش خسارات اقتصادی و افزایش میزان تولید مورد استفاده خواهد بود و به منظور به کارگیری استراتژی پیشگیرانه و درمانی مؤثر در پرورش ماهی سفید منطقی به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این مطالعه ۱۳۵ قطعه بچه ماهی سفید با میانگین وزنی ۵- ۳ گرم از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت تهیه شد. بچه ماهیان با استفاده از پلاستیک‌های حمل بچه ماهی به آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی ایران در انزلی انتقال داده شدند. بچه ماهیان در آزمایشگاه به منظور آداپتاسیون در آکواریوم‌های ۸۰ لیتری به همراه هوادهی ممتد نگهداری شدند. روزانه ۳۰-۲۰ درصد حجم آب آکواریوم‌ها تعویض شد. همچنین، تغذیه بچه ماهیان با استفاده از گرانول‌های غذایی ریز ساخت شرکت بیومار به صورت روزانه یک وعده به میزان ۱ درصد وزن بدن انجام پذیرفت. وضعیت ظاهری ماهیان، نحوه شنا و تغذیه ماهیان نیز روزانه بررسی شد.

پس از طی سه هفته دوران آداپتاسیون، برای مواجه‌سازی بچه ماهیان با رابدوویروس کارپیو از آکواریوم‌های ۱۶ لیتری به تعداد ۹ عدد مجهز به پمپ‌های هواده، با تراکم ۱۵ قطعه بچه ماهی در هر آکواریوم استفاده شد. میانگین دمای آب در تمام مدت ۱۸/۵ درجه سانتی‌گراد بود. مواجهه‌سازی بچه ماهیان با ویروس در سه تیمار شامل حمام آبی، تزریق صفاقی و شاهد، هر کدام با سه تکرار انجام شد. غذادهی بچه ماهیان ۲۴ ساعت پیش از مواجهه‌سازی به منظور کاهش استرس ناشی از مواجهه‌سازی متوقف و پس از

[1] Rhabdoviridae
[2] Vesiculovirus

www.SID.ir

Archive of SID

انجام مواجه‌سازی مجدداً ادامه یافت. ویروس خالص سازی شده جهت انجام مواجهه‌سازی استفاده شد. به منظور تهیه محلول تزریق محیط حاوی SVCV از سلول های تیره EPC آلوده به ویروس که دارای میزان زیادآثار آسیب سلولی بود استفاده گردید. پس از جدا سازی سلول‌ها از بستر محیط کشت و افزودن EMEM به آنان، محیط کشت حاوی ویروس سه مرتبه منجمد و ذوب گردید تا در اثر تخریب میکانیکی سلول‌ها، ویروس‌ها به درون محیط کشت آزاد شوند. پس از مشاهده اثرات آسیب سلولی (CPE) در زیرمیکروسکوپ معکوس، محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ در سانتریفیوژ یخچال‌دار اپندروف، سانتریفیوژ گردید و محلول رویی (سوپر ناتانت) که حاوی ویروس‌های جدا سازی شده بود با استفاده ازفیلترهای سرسرنگی µm ۰/۴۵ فیلتر گردیده وتا زمان مواجه‌سازی در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد (Haenen and Davidse, 1993) در مواجه‌سازی با ویروس به روش حمام آبی، بچه ماهیان در ظروف ۵ لیتری و هواده با تیتر TCID50 ml /$۱۰^{۴}$× ۶/۵ به مدت ۴ ساعت در آب حاوی ویروس قرار گرفتند، در روش تزریق صفاقی بچه ماهیان، با استفاده از میکرو سرنگ و با حجم ۵ میکرو لیتر از نمونه ویروسی با تیتر TCID50 /ml $۱۰^{۴}$× ۵/ ۶ تزریق شدند (Reed and Muench, 1938). TCID50/ml غلظتی از ویروس است که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰ درصد از خانه‌های پلیت کشت سلولی گردد. سپس بچه ماهیان به آکواریوم‌های حاوی آب تازه منتقل شدند. در طول مدت آزمایش بروز علائمی مانند بی حالی، برجستگی فلس‌ها، اتساع محوطه شکمی و خونریزی‌های پوستی نقطه‌ای یا عمومی در سرپوش آبششی و پوست و باله‌ها بررسی شد. با بروز علائم بافتی و تلفات در تیمارهای تزریق صفاقی و حمام به ترتیب در روز ۱۳ و روز۱۶ پس از مواجه‌سازی ، به وسیله سرنگ انسولین و در ماهیان کوچک‌تر با استفاده از لوله موئینه از ساقه دمی بچه ماهیان خون‌گیری شد. از تیمار شاهد نیز به همان طریق از ماهیان خون‌گیری به عمل آمد. ۹ عدد ماهی از هر تکرار و در مجموع ۲۷ ماهی از هر تیمار پس از pool نمودن نمونه‌ها به طور تصادفی جهت شمارش گلبول قرمز (RBC) (Klontz, 1994)، شمارش گلبول‌های سفید (WBC)، تعیین مقدار هماتوکریت (HCT)، غلظت هموگلوبین (HB) (Houston, 1990)، حجم متوسط یاخته‌ای (MCV)، میانگین هموگلوبین یاخته‌ای (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای (MCHC) و پارامترهای ایمنی نمونه برداری شدند. تعیین شاخص‌های خونی به روش استاندارد در آزمایشگاه بر روی نمونه خون آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین صورت گرفت (Houston, 1990; Haghighi *et al*., 2008). گلبول‌های سفید و قرمز با محلول Lewis و لام نئوبار شمارش شد. اندازه‌گیری هموگلوبین بر حسب واحد گرم در دسی لیتر با روش سیانومت هموگلوبین با استفاده از محلول درابکلین در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد. برای اندازه‌گیری هماتوکریت (درصد) از روش میکرو هماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور (RPM) ۷۵۰۰ استفاده شد (Rehulka, 2000). فعالیت لیزوزیم با روش Clerton و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم، یعنی Micrococcus Lysodeikticus اندازه‌گیری شد. فعالیت همولیتیک مسیر فرعی کمپلمان (ACH50)، بر اساس همولیز

www.SID.ir

Archive of SID

گلبول‌های قرمز خرگوش با روش Waley و North در سال ۱۹۹۷ اندازه‌گیری شد. مقدار IgM تام سرم براساس کدورت سنجی و به روش ایمونوتوربیدی متریک بر مبنای کدورت حاصل از ایمونوگلوبولین نمونه و آنتی بادی ضد آن سنجش شد (Thomas, 1998). کورتیزول با روش الایزا و بر حسب نانو گرم در میلی‌لیتر با دستگاه الایزا ریدر BioTek ساخت آمریکا سنجش شد.

برای محاسبه شاخص‌های خونی شامل MCV، MCH، MCHC از روابط زیر استفاده شد.

حجم متوسط یاخته‌ای (فمتولیتر)

$$MCV = \frac{HCT}{RBC} \times 100 \quad (۱)$$

MCV حجم متوسط یاخته‌ای؛ HCT مقدار هماتوکریت؛ RBC تعداد گلبول قرمز

میانگین هموگلوبین یاخته‌ای (پیکوگرم)

$$MCH = \frac{HB}{RBC} \times 10 \quad (۲)$$

MCH میانگین هموگلوبین یاخته‌ای؛ HB غلظت همگلوبین؛ RBC تعداد گلبول قرمز

میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای (MCHC) (گرم در دسی لیتر)

$$MCHC = \frac{HB}{HCT} \times 100 \quad (۳)$$

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، تجزیه و تحلیل آن‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه – One Way ANOVA صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن (Duncan) در سطح ۰/۰۵ درصد استفاده شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (V17) انجام شد. در این مطالعه میانگین‌ها به همراه انحراف معیار به صورت (M±Sd) آورده شدند.

نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که عفونت ویروسی ویرمی بهاره کپور سبب ایجاد علائم بالینی، تغییرات در پارامترهای خونی و ایمنی و به دنبال آن بروز تلفات در بچه ماهی سفید دریای خزر بود. بروز علائم بالینی و تلفات در تیمار تزریق صفاقی زودتر از تیمار حمام و در روز ۱۳ اتفاق افتاد و در تیمار حمام در روز ۱۶ مشاهده شد. در بررسی پارامترهای خونی (گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط یاخته‌ای و میانگین هموگلوبین یاخته‌ای) هر دو تیمار حمام و تزریق صفاقی نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد، که تیمارحمام بالاترین میزان افزایش پارامترهای مذکور به جز فاکتور میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای را در مقایسه با تیمار تزریق صفاقی به خود اختصاص داد ($P<۰/۰۵$).

از مهم‌ترین علائم بالینی مشاهده شده در تیمارهای مواجه‌سازی تجربی کندی شنا، کاهش حساسیت به عوامل محرک محیطی، شنای نامتعادل وخونریزی زیر پوستی به ویژه در ناحیه شکمی بود. علائم بالینی مشاهده شده در همه تیمارها یکسان نبود و تنها برخی از علائم در هر تیمار مشاهده شدند. طی دوران مواجه‌سازی هیچ گونه تغییرات رفتاری و علائم بالینی در بچه ماهیان تیمار شاهد مشاهده نشد.

به طوری که بر اساس نتایج جدول ۱، تأثیر ویروس ویرمی بهاره کپور بر تعداد گلبول قرمز (میلیون متر مکعب) در خون بچه ماهیان سفید در تیمارهای حمام و تزریق صفاقی افزایش معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). بالاترین تعداد گلبول قرمز در تیمار حمام مشاهده شد. غلظت هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) خون بچه ماهیان سفید در تیمارهای حمام و تزریق

www.SID.ir

Archive of SID

صفاقی افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵). همچنین این شاخص در تیمار حمام نسبت به تیمار تزریق صفاقی افزایش معنی‌داری را نشان داد. مقدار هماتوکریت (درصد) در تیمار حمام افزایش معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار حجم متوسط یاخته‌ای (فمتولیتر) در تیمار حمام تفاوت معنی‌داری را با تیمار تزریق صفاقی نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). مقدار میانگین هموگلوبین یاخته‌ای (پیکوگرم) در تیمار حمام تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی با تیمار تزریق صفاقی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). مقدار میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای (گرم در دسی لیتر) در تیمار تزریق صفاقی تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی با تیمار حمام تقاوت معنی‌داری را نشان نداد (P >۰/۰۵).

جدول ۱: مقایسه میانگین شاخص‌های خونی بچه ماهیان سفید در تیمارهای مختلف

تیمارها / پارامترهای خونی	شاهد	حمام	تزریق صفاقی
گلبول قرمز (میلیون متر مکعب)	۵۹۳۰۰۰±۷۶۴۴ ^{b}	۹۸۴۶۶۶±۷۴۳۳ ^{a}	۸۸۴۲۲۲±۴۲۶۹ ^{a}
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۶/۷۵±۰/۱۹ ^{c}	۸/۱۰±۰/۳۲ ^{a}	۷/۱۳±۰/۲۰ ^{b}
هماتوکریت (درصد)	۲۸/۵۶±۱/۱۳ ^{b}	۳۴/۱۱±۱/۵۳ ^{a}	۲۹/۲۲±۱/۰۹ ^{b}
حجم متوسط یاخته‌ای (فمتولیتر)	۳۳۷/۵±۱/۲۳ ^{ab}	۳۴۶/۱±۲/۴۱ ^{a}	۳۲۹/۵±۱/۵۱ ^{b}
میانگین هموگلوبین یاخته‌ای (پیکوگرم)	۷۹/۵۶±۰/۱۷ ^{b}	۸۲/۱۱±۰/۵۷ ^{a}	۸۰/۳۳±۰/۲۶ ^{ab}
میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای (گرم در دسی لیتر)	۲۳/۴۴±۰/۱۰ ^{b}	۲۳/۵۶±۰/۱۴ ^{ab}	۲۴/۲۲±۰/۱۶ ^{a}

حروف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ می باشد.

براساس نتایج جدول ۲، تأثیر ویروس ویرمی بهاره کپور بر تعداد گلبول‌های سفید خون بچه ماهیان سفید، تفاوت معنی‌داری را در تیمارهای مختلف نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین تعداد گلبول‌های سفید (میلیون متر مکعب) در تیمار حمام مشاهده شد. درصد نوتروفیل در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را با هم نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین مقدار درصد نوتروفیل در تیمار حمام مشاهده شد. درصد لنفوسیت در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را با هم نشان داد (P<۰/۰۵). درصد منوسیت با بالاترین مقدار در تیمار حمام تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). درصد ائوزینوفیل با بالاترین مقدار در تیمار حمام تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵).

بر اساس نتایج جدول ۳، تأثیر مواجه‌سازی ویروس بر تغییرات پارامترهای ایمنی بچه ماهیان سفید در تیمارهای مختلف نشان داد که، تغییرات کورتیزول (نانو گرم در میلی‌لیتر) در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را با هم نشان داد (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه میانگین گلبول‌های سفید و شمارش تفریقی آن در بچه ماهیان سفید در تیمارهای مختلف

تیمارها / پارامترهای خونی	شاهد	حمام	تزریق صفاقی
گلبول سفید (میلیون مترمکعب)	۴۴۸۳±۲۸۵ ^{c}	۸۲۳۳±۷۱۴ ^{a}	۶۱۸۸±۵۳۰ ^{b}
نوتروفیل (درصد)	۲۳/۳۳±۱/۱۱ ^{c}	۳۳/۴۴±۱/۳۳ ^{a}	۲۸/۷۸±۲/۲۷ ^{b}
لنفوسیت (درصد)	۷۳/۳۳±۲/۱۲ ^{a}	۶۰/۴۴±۲/۱۸ ^{c}	۶۷/۱۱±۳/۷۲ ^{b}
منوسیت (درصد)	۲/۱۱±۰/۱۸ ^{b}	۳/۳۳±۰/۱۷ ^{a}	۲/۸۹±۰/۲۷ ^{ab}
ائوزینوفیل (درصد)	۱/۲۲±۰/۱۶ ^{b}	۲/۷۸±۰/۱۹ ^{a}	۱/۲۲±۰/۱۶ ^{b}

حروف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ می باشد.

بالاترین مقدار کورتیزول در تیمارتزریق صفاقی مشاهده شد. تغییرات لیزوزیم (u در میلی‌لیتر در دقیقه) با بالاترین مقدار در تیمار تزریق صفاقی تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). تغییرات کمپلمان (u درصد) با بالاترین مقدار در تیمار حمام تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). تغییرات ایمونوگلوبولین (میلی گرم در دسی لیتر) با بالاترین مقدار در تیمار تزریق صفاقی تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول ۳: مقایسه میانگین شاخص‌های ایمنی بچه ماهیان سفید در تیمارهای مختلف

تیمارها / پارامترهای ایمنی	شاهد	حمام	تزریق صفاقی
کورتیزول (نانو گرم در میلی‌لیتر)	۱۴۴/۷±۱۰/۲۳ ^{c}	۲۸۹/۴±۳/۸۷ ^{b}	۳۵۶/۳±۴۴/۴۰ ^{a}
لیزوزیم (u در میلی‌لیتر در دقیقه)	۳۹/۰۰±۴/۵۵ ^{b}	۵۹/۷۸±۲/۶۳ ^{a}	۶۷/۴۴±۱۲/۶۶ ^{a}
کمپلمان (u درصد)	۱۲۰/۷±۶/۵۱ ^{b}	۱۵۴/۰±۳/۴۶ ^{a}	۱۲۶/۷±۱۰/۳۴ ^{b}
IgMتام سرم (میلی گرم در دسی لیتر)	۴۸/۰۰±۱/۳۲ ^{b}	۶۳/۵۶±۰/۷۲ ^{a}	۶۷/۱۱±۲/۸۷ ^{a}

حروف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ می باشد.

بحث

پژوهش حاضر به بررسی اثر رابدویروس کارپیو بر روی شاخص‌های خونی و فاکتورهای ایمنی بچه ماهیان سفید پرداخته است. پارامترهای خونی ماهیان به دلیل آگاهی یافتن از ظرفیت فیزیولوژیک آن‌ها اهمیت دارد همچنین در برخی از بیماری‌های عفونی (باکتریایی، ویروسی و کم‌تر انگلی) شاخص‌های خون شناسی دستخوش تغییرات کمی و کیفی می‌شوند و غالباً بعضی از آن‌ها مثل تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین به شدت کاهش پیدا می‌کند (جلالی جعفری، ۱۳۷۷). اولین واکنش ایمنی پس از ورود عوامل عفونی باکتریایی و ویروسی به بدن ماهی مربوط به ایمنی غیر اختصاصی سلولی است در واقع افزایش لوکوسیت‌ها به منظور تقویت قدرت بیگانه خواری و

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین تولید ترکیبات ضد باکتریایی و ضد ویروسی صورت می‌پذیرد (Zorriehzahra *et al*., 2010). تاکنون مطالعات خون شناسی و ایمنی شناسی معدودی بر روی ویروس‌های ماهیان صورت گرفته ولی میزان تأثیر عوامل باکتریایی، انگلی و قارچی بر روی این فاکتورها قابل ملاحظه و مقایسه می‌باشد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که مواجه‌سازی بچه ماهیان با ویروس SVCV به روش حمام آبی اصلی‌ترین روش سرایت ویروس به ماهیان سالم می‌باشد که با مطالعات زمانی (۱۳۹۳) و Ahne (۱۹۷۸) مشابهت داشت.

در بسیاری از بیماری‌های باکتریایی و ویروسی از جمله IHN و VEN سپتی سمی اتفاق می‌افتد و آسیب شدیدی به قسمت قدامی کلیه ماهیان مبتلا که نقش کلیدی در تولید سلول‌های خونی دارد وارد می‌گردد. بنابراین کاهش چشمگیری در تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین پدیدار می‌شود(Haley and Weiser, 1985).

Haney و همکاران (۱۹۹۲) مشاهده کردند که میزان هماتوکریت و هموگلوبین در ماهی آزاد چوم (*Oncorhynchus keta*) مبتلا به بیماری نکروز ویروسی گلبول‌های قرمز (VEN[1])، کاهش یافت در حالی‌که تعداد کل گلبول‌های سفید افزایش پیدا کرد. همچنین در مطالعه Wedemeyer و همکاران (۱۹۷۸) بر روی تغییرات خونی ماهیان مبتلا به IHN میانگین میزان هموگلوبین و هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز کاهش چشمگیری نسبت به گروه کنترل نشان داد.

اما در مطالعه حاضر پس از مواجه‌سازی بچه ماهیان سفید با ویروس SVCV شاخص‌های خونی شامل تعداد گلبول قرمز، تعداد گلبول سفید، غلظت هموگلوبین (HB)، درصد هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط یاخته‌ای (MCV) و میانگین هموگلوبین یاخته‌ای (MCH) در هر دو گروه حمام و تزریق صفاقی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد و تیمار حمام در مقایسه با تیمار تزریق صفاقی نیز بالاترین میزان افزایش شاخص‌ها، به جز فاکتور میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای به خود اختصاص داد ($P<۰/۰۵$).

در بیماری ویرمی بهاره کپور آسیب گسترده به بافت‌های خون‌ساز منجر به کم خونی، لکوپنی و ترومبوسیتوپنی می‌شود ولی در مراحل پایانی بیماری یک افزایش جبرانی در تعداد و حجم گلبول‌های قرمز آسیب دیده مشاهده می‌شود که ناشی از افزایش تعداد و حجم گلبول‌های قرمز نابالغ است (Wolf, 1988). افزایش پارامترهای خونی شامل هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط یاخته ای و میانگین هموگلوبین یاخته‌ای در مطالعه حاضر نیز می‌تواند وابسته به گونه بوده و به دلیل واکنش جبرانی دستگاه خونساز ماهی در مراحل پایانی و تخلیه سریع گلبول‌های قرمز نابالغ به خون باشد.

در مقایسه بین گروه‌های حمام و تزریق صفاقی علی رغم این که میزان هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط یاخته ای و میانگین هموگلوبین یاخته‌ای در تیمار حمام بالاتر است اما میانگین غلظت هموگلوبین یاخته‌ای در تیمار تزریق به طور معنی‌داری بالاتر است که نشان دهنده نوعی کم خونی ماکروسیتوزی در تیمار حمام نسبت به گروه‌های دیگر به دنبال مهاجرت گلبول‌های قرمز نابالغ بزرگ حاوی غلظت کم‌تری از هموگلوبین به جریان خون ماهی بیمار است (Rehulka *et al*., 2005; Sovlo and Nikinmaa, 1981).

[1] Viral erythrocytic necrosis

www.SID.ir

Archive of SID

Martis و همکاران (۲۰۰۸) نیز در تحقیقی روی تغییرات هماتولوژی ماهی تیلاپیای نیل و تأثیر عفونت باکتریایی *Enterococcus sp.* مشاهده نمودند که در ماهیان آلوده تعداد گلبول سفید، نوتروفیل و هماتوکریت به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت که با نتایج مطالعه حاضر همسو بود. اما در مطالعه Barham و همکاران (۱۹۸۰) بر روی ماهی آزاد چام آلوده به *باکتری V. anguillarum* تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت کاهش یافت، که با نتایج این مطالعه مغایرت داشت.

نتایج حاصل از مطالعه خارا و همکاران (۱۳۹۰) روی بررسی تأثیر آلودگی‌های انگلی بر پارامترهای خونی ماهی سفید مهاجر به رودخانه تجن نشان داد که در ماهیان با آلودگی بیشتر، مقدار هماتوکریت و هموگلوبین کاهش و متوسط حجم یاخته‌ای افزایش یافته بود. در مطالعه Pathiratne and Rajapakshe (۱۹۹۸) روی قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به باکتری آئروموناس/ استرپتوکوکوس تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت کاهش داشت که با نتایج حاصل از این پژوهش مغایرت نشان داد.

تغییرات اساسی گلبول‌های سفید در بیماری ویرمی بهاره کپور شامل افزایش قابل ملاحظه سلول‌های بیگانه خوار به صورت نوتروفیلی و مونوسیتوز است (Egusa, 1992)، که در نتیجه درصد لنفوسیت‌ها کاهش می‌یابد. در مطالعه حاضر نیز در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، درصد نوتروفیل، منوسیت و ائوزینوفیل در تیمارهای حمام وتزریق صفاقی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و بالاترین مقدار افزایش را تیمار حمام در مقایسه با تیمار تزریق صفاقی به خود اختصاص داد. اما درصد لنفوسیت در دو تیمار حمام و تزریق صفاقی از تیمار شاهد کمتر بوده و لنفوپنی ناشی از تاثیر ویروس اتفاق افتاد. شدت لنفوپنی در تیمار حمام بیشتر از تیمار تزریق صفاقی بود که نشان دهنده شدت تاثیر ویروس در مواجهه از راه طبیعی بیماری‌زایی ویروس می‌باشد.

در پژوهشی مشابه Campbell در سال ۱۹۸۸ بیان نمودکه میزان پارامترهای خونی ممکن است در اثر بیماری و یا عوامل فیزیولوژیک تغییر کند ماهیانی که دارای بیماری‌های عفونی می‌شوند ممکن است میزان لنفوسیت کم‌تری داشته باشند و نوتروفیل‌ها در خون افزایش یابندکه با نتایج تحقیق حاضر نیز هم‌خوانی دارد.

تقویت سیستم ایمنی ذاتی یا غیراختصاصی برای ماهیان پرورشی بسیارحائزاهمیت است،چراکه ماهی‌هاتحت شرایط پرورشی دربرابربسیاری ازعوامل باکتریایی فرصت طلب ودیگر استرس‌هاآسیب پذیرهستند. همچنین بیماری‌زایی یک عامل بیماری‌زای مهاجم، به قابلیت سیستم ایمنی میزبان برای مبارزه با آن بستگی دارد (Dixon and Stet, 2001).

کپور ماهیان می‌توانند نسبت به SVCV پاسخ ایمنی نشان دهند اما پاسخ ایمنی در این بیماری وابسته به درجه حرارت، روش مواجه‌سازی، میزان و سویه ویروس، سن و شرایط میزبان است (Wolf, 1988).

در مطالعه Sulimanovic (۱۹۷۳)، پس از تزریق ویروس SVCV در درجه حرارت ۱۲ – ۱۰ درجه سانتی‌گراد به ماهی کپور هیچ‌گونه آنتی بادی تولید نشد و میزان تلفات ۹۰٪ بود در حالی که در درجه حرارت ۲۲ – ۲۰ درجه سانتی‌گراد به دلیل افزایش آنتی بادی‌های هومورال هیچ‌گونه تلفاتی اتفاق نیفتاد. به همین دلیل در این مطالعه به منظور بررسی پارامترهای

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف خونی و ایمنی درجه حرارت ۱۸/۵ درجه به عنوان دمای اپتیمم در نظر گرفته شد.

در این بررسی پارامترهای ایمنی کورتیزول، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و کمپلمان افزایش معنی‌داری در دو تیمار حمام و تزریق صفاقی نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. بیشترین میزان افزایش پارامترهای ایمنی به استثنای سیستم کمپلمان درتیمار تزریق صفاقی نسبت به تیمار حمام مشاهده شد. سیستم کمپلمان نقش کلیدی در ایمنی غیر اختصاصی دارد و در فاگوسیتوزیس، کموتاکسی و لیز سلولی دخالت دارد (Magnadottir *et al*., 2005). خنثی سازی رابدوویروس‌ها وابسته به سیستم کمپلمان است (Lorenzen *et al*., 1999).

لیزوزیم که یک پلی پپتید با وزن مولکولی ۱۸ – ۱۴ دالتون است یکی از فاکتورهای مهم ایمنی غیر اختصاصی هومورال در مهره داران می باشد که از گرانول‌های گلبول‌های سفید به ویژه نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها ترشح می‌شود و نشانگر فعالیت لوکوسیتی است که همزمان با افزایش فعالیت بیگانه خواری لوکوسیت‌ها افزایش می‌یابد (Sheikhzadeh, 2013; Yano, 1996; Itami *et al*., 1992).

کورتیزول به عنوان فاکتور استرس در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را با هم نشان داد و بالاترین مقدار کورتیزول در تیمار تزریق صفاقی مشاهده شد.

امروزه مشخص شده که ماهیان ۳ نوع ایمونوگلوبولین IgM، IgD و IgT را تولید می‌کنند (Hansen *et al*., 2005; Hordvik *et al*., 2002). لنفوسیت‌های B، IgM را در پاسخ به محرک‌های آنتی ژنیک سیستمی تولید می‌کنند در حالی که IgT را در پاسخ‌های سیستم ایمنی موکوسی ایجاد می‌کنند (Zhang *et al*., 2010). بنابراین در خصوص بیماری ویروسی بررسی میزان IgM و فعالیت سیستم کمپلمان ضروری می‌باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ویروس SVCV قادر به ایجاد تغییرات در تعداد گلبول‌های قرمز، تعدادگلبول‌های سفید، درصد نوتروفیل، درصد لنفوسیت، درصد منوسیت، درصد ائوزینوفیل و سایر پارامترهای خونی (هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط یاخته‌ای، میانگین هموگلوبین یاخته‌ای و غلظت میانگین هموگلوبین یاخته‌ای) و پارامترهای ایمنی، ایجاد علائم بالینی و به دنبال آن بروز تلفات در ماهی سفید دریای خزر می‌باشد، لذا استفاده از پارامترهای هماتولوژی در تشخیص زود هنگام بیماری به ویژه در ماهیان ارزشمند مانند مولدین قابل استفاده و توصیه است.

منابع

۱. جلالی جعفری، ب.، ۱۳۷۷. انگل‌ها و بیماری‌های انگلی ماهیان آب شیرین. انتشارات معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج، ۵۶۴.

۲. جمال زاده، ح.، کیوان، ا.، جمیلی، ش.، عریان، ش و سعیدی، ع.، ۱۳۸۱. بررسی فاکتورهای خونی آزاد ماهی دریای خزر، مجله علمی شیلات، ۱، ۲۶-۲۵.

۳. رضوی، ب.، ۱۳۷۴. زندگی ماهی سفید. سازمان تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۴ صفحه.

۴. زمانی، ح.، ۱۳۹۳. ارزیابی حساسیت به رابدو ویروس عامل ویرمی بهاره کپور ماهیان (SVCV) در ماهی سفید خزری (*Rutilus frisii kutum*) با بکارگیری روش‌های تشخیصی رایج و مولکولی. پایان نامه دکتری تخصصی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، ۹۷.

www.SID.ir

Archive of SID

۵. شاهسونی، د.، وثوقی، ع و خضرائی نیا، پ.، ۱۳۷۸. تعیین برخی از فاکتورهای خونی ازون برون در سواحل جنوب شرقی دریای خزر، مجله پژوهش و سازندگی وابسته به جهاد سازندگی، ۴۴، ۱۳۰-۱۲۶.

6. Ahne, W., 1978. Uptake and multiplication of spring viraemia of carp, Cyprinus carpio. L. Journal of Fish Disease, 1, 265- 268.
7. Anderson, P.O., 1974. Disease of fish. Book4, immunology T. F. H., pub.USA.
8. Barham, W.T., Smit, G.L., Schoonbee, H.J., 1980. The haematological assessment of bacterial infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology, 17(3), 275-281.
9. Campbell, T.W., 1988. Fish Cytology and hematology veterinary clinics of North America. Smail Animal Pracice, 349-364.
10. Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabraudan, J., Deschaux P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology, 11, 1-13.
11. Dixon, B., Stet, R.J.M., 2001.The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. Developmental and Comparative Immunology, 25(8-9), 683-699.
12. Egusa, S., 1992. Infectious Diseases of fish. Tokyo: Koseisha koseikasu publishing.
13. Engelhardet, A., Mirle, C., Petermann, H., 1989. Haematological studies in rainbow trout affected by *Proteocephalus neglectus*. Monatsh, Veterinaermid, 44(1), 390-393.
14. Haghighi, A., Sharrifnia, Z., Bandehpoor, M., Kazemi, B., 2008.The first Report of spring viremia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by by pathology and molecular techniques in Iran. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 3(4), 263-268.
15. Haley, P.J., Weiser, M.G., 1985. Erythrocyte volume distribution in rainbow trout. American Journal of Veterinary Research, 46, 2210-2212.
16. Haenen, O.L., Davidse, A., 1993. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms, 15(2):87-92.
17. Haney, D.C., Hursh, D.A., Mix, M.C., Winton, J.R., 1992. Physiological and hematological changes in chum salmon artificially infected with Erythrocytic Necrosis Virus. Journal of Aquatic Animal Health, 4, 48–57.
18. Hansen, J., Landis, E., Phillips, R., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102, 19, 6919-6924.
19. Hordvik, I., Berven, F.S., Solem, S.T., Hatten. F., Endresen, C., 2002. Analysis of two IgM isotypes in Atlantic salmon and brown trout. Molecular Immunology. 39. 313-321.
20. Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. In: Schreck CB, Moyle PB (eds) Methods in fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 273–335.
21. Itami T., Takehara A., Nagano Y., Suetsuna K., Mitsutani A., Takesue K., Takahashi Y. 1992. Purification and characterization of lysozyme from ayu skin mucus. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 1937-1944.
22. Klontz, G. W., 1994. Fish Hematology. In: Stolen, j.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C., Kaattari, S.L. and Smith, S.A. (Eds) Techniques in Fish Immunology, 3, SOS Publications. pp. 121 - 132.
23. Lorenzen, N., Olesen, N.J., Koch, C., 1999. Immunity to VHS virus in rainbow trout. Aquaculture, 172, 41–61.
24. Luskova, V., 1995. Determination of normal values in fish. Acta university carolinae Biological, 39, 191-200.
25. Maganadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bgwald, J., Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humeral immune Parameters in fish. fish& shellfish immunology,19, 429-439.
26. Martins, M.L. A., Mouriño, J.L.P.A,B., Amaral, G.V.A, Vieira, F.N,.B., Dotta, G.A., Jatobá, AMB.A,B., Pedrotti, F.S.A,B., Jerônimo, GT.A, Buglione-Neto, CC.B., Pereira-Jr., G.A., 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. Braz. Journal Biology, 68(3), 657-661.
27. Pathiratne, A., Rajapakshe, W., 1998. Hematological changes associated with epizootic ulcerative syndrome in theAsian cichlid fish, *Etroplus suratensis*. Asian Fisheries Science, 11(3-4), 177-316.
28. Rehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 190, 27–47.
29. Rehulka, J., Minarík, B., 2005. Blood parameters in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1815), affected by columnaris

www.SID.ir

Archive of SID

disease. Journal of Aquaculture Research, 38 (11), 1182–1197.
30. Sanders, G.E., Batts, W.N., Winton, J.R., 2003. Susceptibility of Zebra fish (Danio rerio) to a Model Pathogen, Spring Viraemia of Carp Virus. Comparative Medicine, 53(5), 21-514.
31. Secombes, C.J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K.J., Cunningham, C., Zou, J., 2001. Cytokines and innate immunity of fish. Developmental & Comparative Immunology, 25(8-9), 23-713.
32. Sheikhzadeh, N., 2013. Influence of dietary vegetable crops on Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) immune system and growth performance, Acta Scientiae veterinariae, 41, 1109.
33. Sovlo, A., Nikinmaa, M., 1981. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout *Salmo gairdnerl* Richardson. *In*: Picketing AD (ed.) Stress and fish Academic Press, London, UK, 103-119.
34. Stoskof, M.K., 1993. Clinial Pathology. Saunders Company fish me dicine, 113-131.
35. Sulimanovic, D., 1973. Immunity of carp to Rhabdovirus carpio and determination of antibodies by indirect haemagglutination. Veterinarski Arhiv, 43(5-6), 153-161.
36. Thomas, L., 1998. Clinical Laborator Diagnostics. TH. Books Verlagsgesell shaft, 794-806.
37. Waley, K., North, J., 1997. Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. In: (A.W. Dodds and R.B. Sim eds.), Complement: A Practical Approach, University Press, Oxford, Great Britain, 1, 19-47.
38. Walker, P.J., Benmansour, A., Calisher, C.H., Dietzgen, R., 2000.Family Rhabdoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and 7 others (eds) The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA, 563- 583.
39. Wedemeyer, G.A., Nelson, N.C., Smith, C.A., 1978. Survival of salmonid viruses infectious hematopoletic necrosis (IHNV) and infectious pancreatic necrosis (IPNV) in ozonated, chlorinated and untreated waters. Journal of Fish Research Board Canada, 35, 875-879.
40. Wolf, K., 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University. Zhang, Y.A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O., 2010. A primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. Nature Immunology, 11, 827-835.
41. Yano, T., 1996. Non-specific immune system: humoral defense. In: The Fish Immune System. Iwama G. and Nakanishi T. (eds). Academic Press, 106–159.
42. Zorriehzahra M.J., Hassan M.D., Gholizadeh M., Saidi A.A., 2010, Study of some hematological and biochemical parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in western part of Mazandaran province, Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9(1), 185-198.

www.SID.ir