مطالعه تغییرات تیتر پادتن سرمی پس از تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی باکتری کشته شده به روش شیمیایی آئرومونـاس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)

زهرا بصیر*: گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

رحیم پیغان: گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

مسعود قربانپور: گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

رحیم عبدی: دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر،صندوق پستی: ٦٦٩

تاریخ دریافت: اردیبهشت ١٣٨٩ تاریخ پذیرش: آبان ١٣٨٩

چکیده

آئرومونـاس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) یکی از مهمترین باکتری‌های بیماریزای ماهیان پرورشی آب شیرین از جمله کپور ماهیان است که باعث عفونت‌های عمومی باکتریایی در ماهیان می‌گردد. در این تحقیق ١٢٠ عدد ماهی کپور معمولی ٣٠ تا ٧٠ گرمی به ٥ گروه (٢گروه ٣٠ تایی و٣ گروه ٢٠ تایی) تقسیم گردیدند. به یک گـروه ٣٠ تـایی بـاکتری آئرومونـاس هیدروفیلای کشته شده با فرمالین با رقت مختلف بصورت داخل عضلانی و به گروه ٣٠ تایی دیگر باکتری مذکور به روش داخل صفاقی تزریق شد. به ٢ گروه ٢٠ تابی بعنوان شاهد بصورت داخل صفاقی و داخل عضلانی سرم نمکی تزریق گردید. یک گروه ٢٠ تایی نیز تحت هیچگونه تزریقی قرار نگرفتند. دو هفته پس از تزریق از تمامی ١٢٠ عدد ماهی خونگیری بعمل آمد و عیـار سرمی پادتن اختصاصی ضد این باکتری در گروه‌های مختلف به روش آگلوتیناسیون داخل لولـه‌ای تعیـین گردیـد. در مقایسـه تیترپادتن سرم در گروه تزریق داخل صفاقی باکتری با گروه تزریق داخل صفاقی سرم نمکی، میزان عیار سرم بطـور معنـی‌داری بیشتر از گروه تزریق سرم نمکی بود (P<٠/٠٥). در مقایسه تیتر پادتن در گروههای تزریق داخل عضلانی نیز، میزان عیار سرم در گروه تزریق بوسیله باکتری از گروه تزریق با سرم نمکی بطور معنی‌داری بیشتر بود (P<٠/٠٥). در مقایسه بین گروههـای شـاهد بـدون تزریق و گروههای تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی سرم نمکی هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>٠/٠٥). نتایج نشان داد گه اختلاف معنی‌دار بین عیار سرمی ماهیان دریافت کننده باکتری نسبت به گروههای شاهد وجـود داشـت (P<٠/٠٥). ولـی اختلاف معنی‌داری بین تزریق داخل عضلانی باکتری با تزریق داخل صفاقی آن مشاهده نشد (P> ٠/٠٥). با توجه به نتایج بدست آمده تزریق باکتری کشته شده در هر دو روش تزریقی، عیار سرمی پادتن اختصاصی را بطور قابل توجهی افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: پادتن، آئرومونـاس هیدروفیلا، ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio*

*پست الکترونیکی نویسندهٔ مسئول: basirzahra@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

نیاز به پروتئین سبب شده تا از دیرباز انسان به اهلی نمودن حیوانات و ازدیاد و پرورش آنها همت گمارد. در این میان آبزیان از سهم قابل توجهی برخوردارست و پرورش آنها بخصوص در سالهای اخیر رونق چشمگیری داشته است. در حال حاضر حجم بالایی از فرآورده‌های خوراکی از ماهی تهیه می‌شود (۲). خصوصیات منحصر بفرد ماهی و تکثیر و پرورش آن، بشر را بسوی تولید بیشتر آن سوق داد. از اصول اولیه در اهداف سیستم پرورش آبزیان، تولید بالا در حداقل زمان و در کمترین تولید متراکم است که این امر خود زمینه‌ساز بسیاری از بیماریهاست. عوامل عفونی که شامل باکتریها، ویروس‌ها، قارچها می‌باشند همواره مزارع پرورش ماهی را مورد تهدید قرار می‌دهند (۱). یکی از این بیماریها سپتی سمی آئروموناس‌های متحرک است که عامل آن باکتری آئروموناس هیدرروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) و گاهی دیگر گونه‌های آئروموناس می‌باشند (۷ و ۸). این بیماری گسترش جهانی دارد و در پرورش ماهیان سردآبی مانند قزل‌آلای رنگین کمان یک مشکل اقتصادی مهم است (۵ و ۹). بیماری فوق در ایران گزارش شده است و به نظر می‌رسد که یک مشکل بالقوه برای سیستم های پرورش ماهی بخصوص گرم آبی باشد (۱، ۲ و ۳).

به منظور کنترل این بیماری امروزه به ساخت واکسن توجه بیشتری شده است که برای این منظور باکتری غیرفعال شده به روش‌های مختلف مانند غوطه‌وری، تزریقی یا خوراکی بعنوان واکسن مصرف می‌شود. همچنین در یک کار تحقیقی برای اولین بار در ایران امکان ایمنی‌سازی ماهی کپور با استفاده از باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا بوسیلهٔ حرارت و فرمالین مورد بررسی قرار گرفت (۱). Ardo و همکاران (۲۰۱۰) پیشنهاد کردند که آماده‌سازی با فرمالین ساختمان آنتی‌ژنیکی آئروموتاس هیدروفیلا را بنحوی تغییر می‌دهد که مهار شدن آنتی‌ژن‌ها با ماکروفاژها بهتر صورت می‌گیرد. در حالیکه روش حرارت دادن و شکستن باکتری‌ها، قادر به آزادسازی ماده ژنتیکی زیادی برای ایمنی‌زایی نیست (۶). Loghothetis و Austin (۱۹۹۴ و ۱۹۹۶) نیز چند گونه باکتری و روش‌های مختلف تزریق آنها را مورد بررسی قرار دادند. همچنین مطالعاتی درخصوص تهیه واکسن بصورت تجاری علیه این بیماری صورت گرفته است.

هدف از این تحقیق تعیین کارایی تزریق باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا و مقایسهٔ روش‌های مختلف تزریق در برانگیختن پاسخ ایمنی در ماهی کپور معمولی با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون داخل لوله‌ای می‌باشد که این کار می‌تواند مقدمه‌ای برای امکان ساخت واکسنی جهت کنترل این بیماری باشد.

مواد و روشها

تعداد ۱۲۰ عدد ماهی کپور معمولی پرورشی توسط تور پره از یکی از مزارع پرورش ماهی اطراف اهواز بطور تصادفی صید گردید. ماهیهای صید شده در محدودهٔ وزنی ۷۰-۳۰ گرم و سن حدود ۱ سال بودند. ماهیها بلافاصله پس از صید بوسیلهٔ تانک مخصوص حمل ماهی، به آکواریوم‌هایی با حجم تقریبی ۱۰۰ لیتر که قبلاً آب آنها با تیوسولفات سدیم کلرزدایی شده بود به آزمایشگاه بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل و نگهداری شدند. برای کلرزدایی آب لوله‌کشی به ازاء هر ۱۰۰ لیتر آب ۱۰ گرم تیوسولفات سدیم بکار برده شد (۴). شوری آب آکواریوم‌ها ۰/۵ppt، pH آن ۷/۸، دمای آب در حدود ۲۲ تا ۲۴ 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 عدد) تقسیم و هر کدام از گروهها بعنوان یک گروه آزمایشی (گروه تزریق داخل عضلانی و گروه تزریق داخل صفاقی) در نظر گرفته شدند. ۲ گروه ۲۰ تایی (۴۰ عدد) ماهی نیز بعنوان شاهد در نظر گرفته شد که به آنها به دو روش فوق فقط سرم نمکی تزریق گردید. به منظور مطمئن شدن از عدم وجود پادتن ضد آئروموناس هیدروفیلا در سرم ماهیهای مورد مطالعه ۲۰ عدد ماهی نیز بدون هیچگونه تزریقی نگهداری گردیدند و تست سرولوژی آگلوتیناسیون در لوله، روی آنها انجام شد که تعدادی از آنها از نظر عیار آنتی‌بادی سرم نسبت به آئروموناس هیدروفیلا منفی بودند. میزان حجم باکتری کشته و سرم نمکی تزریقی به هر ماهی حدود ۰/۵ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (۱۲). طی مراحل کار بطور روزانه حدود نیمی از حجم آب ماهی‌ها تعویض و سیفون شد و غذادهی به ماهی‌ها با استفاده از پلت‌های آماده صورت گرفت. باکتری آئروموناس هیدروفیلای استفاده شده در این تحقیق از یک نمونه ماهی بیمار جدا شده بود. باکتری مذکور دارای خصوصیات بیوشیمیایی و مرفولوژیک شامل: گرم منفی و میله‌ای کوتاه‌ت اکسیداز مثبت‌ت متحرک - ایندول مثبت - اوره آز منفی - سیترات مثبت و واکنش در محیط TSI به صورت اسید/اسید، گاز مثبت، H2S منفی بود.

باکتری فوق در محیط آگار مغذی و در ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. باکتری‌های رشد کرده با استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای استریل و محلول بافر فسفات از سطح محیط جدا گردیدند و سوسپانسیون غلیظی از باکتری فوق بدست آمد. سوسپانسیون حاصله با استفاده از محلول بافر فسفات رقیق شد که کدورتی معادل لوله ۳ مک فارلند تهیه گردد. بدین ترتیب در هر میلی لیتر سوسپانسیون نهایی تقریباً ۹۰۰×۱۰^{۶} باکتری وجود داشت. سپس برای کشتن باکتری‌ها فرمالین در چهار رقت (۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۶ و ۰/۳ درصد) تهیه و

Archive of SID
www.SID.ir

هم حجم سوسپانسیون تهیه شده سرم فیزیولوژی فرمالینه ریخته شد و مجموعه حاصل به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از این مدت سوسپانسیون‌های مذکور با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه 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 (۱). برای اطمینان از کشته شدن باکتری‌ها و عدم رشد آنها از هر لوله در محیط آگار خون‌دار کشت داده شد که پلیت‌های مربوط به سوسپانسیون‌های ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵ درصد رشد کردند اما پلیت‌های 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 آنتی ژنی باکتری را کمتر تحت تاثیر قرار می‌دهد بعنوان رقت مورد نظر جهت تهیه باکتری انتخاب شد (۱۲). در نهایت حجم زیادی از سوسپانسیون باکتری تهیه و تا زمان تزریق به ماهی‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به ۳۰ عدد ماهی باکتری کشته بصورت داخل صفاقی تزریق شد و یک گروه شاهد هم برای آن در نظر گرفته شد که بدین منظور به ۲۰ عدد ماهی، بصورت داخل صفاقی سرم نمکی تزریق شد. محل تزریق داخل صفاقی، خط میانی شکم و حد فاصل بین باله‌های شکمی سینه‌ای بود. به ۳۰ عدد ماهی دیگر نیز باکتری کشته بصورت داخل عضلانی تزریق گردید و یک گروه شاهد نیز برای آن در نظر گرفته شد بدین ترتیب که به ۲۰ عدد ماهی به صورت داخل عضلانی سرم نمکی تزریق شد. محل تزریق عضلات ناحیه پشتی (حدفاصل بین باله پشتی و خط جانبی) بود. ۲۰ عدد ماهی نیز بدون تزریق باکتری بعنوان شاهد بدون تزریق نگهداری شدند. تمامی ۱۲۰ عدد ماهی دو هفته پس از تزریق از طریق ورید دمی خونگیری شدند. برای این کار با استفاده از سرنگ ۵ میلی لیتری با سر سوزن شمارهٔ ۲۲ از محل ساقهٔ دمی اقدام به خونگیری گردید. خون گرفته شده به آرامی در لوله‌های آزمایش استریل بدون ماده ضد انعقاد که قبلاً شماره‌گذاری شده بودند، 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 ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا سرم خون به خوبی جدا شود. سرم جدا شده توسط سمپلر برداشته شد و به میکروتیوب‌هایی که قبلاً شماره‌گذاری شده بودند، منتقل گردیدند و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند. طبق جدول شماره ۱ ابتدا ۰/۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی در لولهٔ اول و ۰/۵ سی‌سی در هر یک از لوله‌های بعدی ریخته شد. سپس ۰/۱ سی‌سی از سرم مورد آزمایش به لولهٔ اول اضافه شده و کاملاً مخلوط گردید. در مرحلهٔ بعد از لوله اول ۰/۵ سی‌سی به لولهٔ دوم و از لولهٔ دوم به لوله سوم به همین ترتیب تا لولهٔ آخر ادامه داده شد و ۰/۵ سی‌سی از لولهٔ ششم دور ریخته شد تا حجم همه لوله‌ها یکسان (۰/۵ سی‌سی) گردد. سپس ۰/۵ سی‌سی از آنتی‌ژن (سوسپانسیون باکتری معادل لوله ۳ مک‌فارلند) به تمام لوله‌ها اضافه گردید در نهایت با افزودن آنتی‌ژن رقت نهایی بترتیب از لولهٔ اول تا ششم ۱:۲۰، ۱:۴۰، ۱:۸۰، ۱:۱۶۰، ۱:۳۲۰ و ۱:۶۴۰ بدست آمد (۱۳).

جدول ۱: نحوه انجام آزمایش سروآگلوتیناسیون در لوله

شماره لوله	۱	۲	۳	٤	٥	٦	لوله شاهد
سرم فیزیولوژی (میلی‌لیتر)	۰/۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۷۵
سرم ماهی (میلی لیتر)	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	دور ریخته شد	–
آنتی‌ژن (میلی‌لیتر)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵
رقت نهایی	۱:۲۰	۱:٤۰	۱:۸۰	۱:۱٦۰	۱:۳۲۰	۱:٦٤۰	–

نتایج

الف – گروه شاهد بدون تزریق

گروه شاهد بدون تزریق شامل ۲۰ عدد ماهی بود. همانطوریکه در جداول ۲ و ۳ دیده می‌شود فقط ۶ عدد ماهی دارای عیار پادتن ضد آئروموناس بودند (۵ نمونه با عیار ۱:۲۰ و یک نمونه با عیار۱:۴۰). عیار پادتن در ۱۴ نمونه منفی بدست آمد.

ب- گروه تزریق داخل صفاقی سرم نمکی و باکتری

همانطوریکه در جدول ۳ دیده می‌شود، در گروه تزریق داخل صفاقی سرم نمکی از تعداد ۲۰ عدد ماهی ۱۵ نمونه آن منفی (۷۵ درصد)، ۴ نمونه با عیار ۱:۲۰ (۲۰درصد) و یک نمونه با

Archive of SID
www.SID.ir

عیار ۱:۴۰ (۵ درصد) بوده است. در حالیکه در گروه با تزریق باکتری به روش داخل صفاقی از ۳۰ عدد ماهی مورد بررسی ۱۲ ماهی (۴۰ درصد) فاقد عیار ضد آئروموناس، ۱۱ عدد (۳۶ درصد) با عیار ۱:۲۰ و ۷ عدد بقیه (۲۳ درصد) عیار ۱:۴۰ داشتند.

ج- گروه تزریق داخل عضلانی سرم نمکی و باکتری

همانطوریکه در جدول ۳ دیده می‌شود در گروه تزریق داخل عضلانی سرم نمکی تعداد ۲۰ عدد ماهی وجود داشت که ۱۵ نمونهٔ آنها (۷۵ درصد) پس از بررسی دارای عیار منفی، ۲ نمونه (۱۰ درصد) با عیار ۱:۲۰ و ۳ نمونه (۱۵درصد) با عیار ۱:۴۰ بودند. در گروه تزریق باکتری به روش داخل عضلانی از ۳۰ ماهی مورد بررسی ۱۱ عدد آنها (۳۶ درصد) دارای عیار منفی، ۷ نمونه (۲۳ درصد) با عیار ۱:۲۰، ۸ نمونه (۲۶ درصد) با عیار ۱:۴۰، ۳ نمونه (۱۰درصد) دارای عیار ۱:۸۰ و یک نمونه (۳/۳ درصد) با عیار ۱:۱۶۰ خوانده شدند.

د-مقایسهٔ آماری گروهها

برای بررسی آماری گروهها میانگین مخرج کسر عیار پادتن‌ها در گروههای مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار مینی تب ۱۰/۵ محاسبه گردید و به روش آزمایش t-test به صورت دو به دو مقایسه بین میانگین‌ها صورت گرفت. گروههای شاهد نیز به روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. در مقایسه تیتر آنتی‌بادی سرم در گروه تزریق داخل صفاقی باکتری با گروه تزریق داخل صفاقی سرم نمکی میزان عیار سرم در تزریق باکتری بطور معنی‌داری بیشتر از گروه تزریق سرم نمکی بود ($P<0/05$). در مقایسه تیتر آنتی‌بادی در گروههای تزریق داخل عضلانی نیز، عیار سرم در گروه تزریق باکتری با ۹۹ درصد از گروه تزریق سرم نمکی بیشتر بود ($P< 0/05$). 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±SE) و حداکثر تیتر آنتی‌بادی ضد آئروموناس هیدروفیلا در گروههای مورد مطالعه

گروهها	تعداد ماهی	تعداد ماهی دارای تیتر	میانگین ±خطای معیار	حداکثر تیتر پادتن
شاهد بدون تزریق	۲۰	٦	۷±۲/٦۳	۱:٤۰
تزریق IP سرم نمکی	۲۰	٥	٦±۲/٥٥	۱:٤۰
تزریق IM سرم نمکی	۲۰	٥	۸±۳/۳۷	۱:٤۰
تزریق IP باکتری	۳۰	۱۸	۱٦±۲/۸۹	۱:٤۰
تزریق IM باکتری	۳۰	۱۹	۲۸±٦/٤۱	۱:۱٦۰

جدول ۳: موارد و درصد عیارهای مختلف پادتن ضد آئروموناس هیدروفیلا در گروههای ماهی کپور مورد مطالعه

تیتر	صفر		۱:۲۰		۱:٤۰		۱:۸۰		۱:۱٦۰		تعداد کل مثبت‌ها	
گروه	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد
شاهد بدون تزریق	۱٤	۷۰	٥	۲٥	۱	٥	۰	۰	۰	۰	٦	۳۰
تزریق IP سرم نمکی	۱٥	۷٥	٤	۲۰	۱	٥	۰	۰	۰	۰	٥	۲٥
تزریق IM سرم نمکی	۱٥	۷٥	۲	۱۰	۳	۱٥	۰	۰	۰	۰	٥	۲٥
تزریق IP باکتری	۱۲	٤۰	۱۱	۳٦	۷	۲۳	۰	۰	۰	۰	۱۸	٦۰
تزریق IM باکتری	۱۱	۳٦	۷	۲۳	۸	۲٦	۳	۱۰	۱	۳/۳	۱۹	٦۳

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

آئروموناس هیدروفیلا یکی از باکتری‌هایی است که همه‌گیری‌های متعددی در ماهیان پرورشی و آکواریومی ایجاد کرده است. در این تحقیق برای بررسی واکنش ایجاد پادتن از دو روش تزریقی داخل صفاقی و داخل عضلانی باکتری استفاده گردید. روش‌های تزریقی از نظر بررسی واکسن‌ها، از دیگر روش‌های متداول از قبیل خوراندن واکسن، دقیق‌تر بود و میزان باکتری کشته ورودی به بدن نیز بهتر قابل محاسبه است (۶). بنظر می‌رسد در بین روشهای تزریقی (داخل صفاقی و داخل عضلانی) هم از نظر تاثیر و کارایی تفاوتهایی وجود داشته باشد (۶). 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. همانطوریکه نتایج نشان می‌دهد هیچگونه مرگ و میری در ماهیان مورد آزمایش پس از تزریق مشاهده نشد که احتمالا بدلیل انتخاب دوز پایین باشد. Ruangapan و همکاران (۲۰۰۲) نیز با آئروموناس کشته شده در اثر فرمالین واکسیناسیون داخل صفاقی در ماهی تیلاپیا 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 زنده و پاتوژن، ۸۰-۷۳ درصد بهبودی در گروههای مورد آزمایش مشاهده گردید.. در این ارتباط Schachte (۱۹۸۷) نیز با اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی در گربه ماهی روگاهی ثابت کرد که پاسخ‌های ایمنی پس از تزریق پادگن ژن باکتریایی به ماهی بالا می‌رود. در یک مطالعه که توسط Thune و همکاران (۱۹۸۲) روی گربه ماهی کانال انجام شد نشان دادند که روش تزریقی صرفنظر از روش تهیه آنتی‌ژن دارای تیتر بالاتری می‌باشد در این مطالعه روش تزریقی با روش غوطه‌ور سازی و اسپری مقایسه گردیده است. Loghothetis و Austin (۱۹۹۴) نیز روش تزریقی را نسبت به غوطه‌ور سازی در قزل آلای رنگین کمان ارجح دانستند. Fang و همکاران (۲۰۰۰) با روش آگلوتیناسیون تیتر پادتن علیه آئروموناس هیدروفیلا را در گورامی آبی اندازه‌گیری کردند. چندین تحقیق برای تهیه باکتری کشته آئروموناس هیدروفیلا بخصوص باکتری کشته مؤثر بر پاسخ ایمنی ماهیها انجام شده است. در مطالعه‌ای Loghothetis و Austin (۱۹۹۴) که ایمنی‌زایی واکسن تهیه شده از آئروموناس هیدروفیلا را در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که بالاترین تیتر بدست آمده ناشی از واکسن فرمالینه می‌باشد. در ارتباط با تغییر تیتر پادتن به نظر می‌رسد که تعداد سلول‌ها در برآورد پاسخ ایمنی خیلی مهم است. در مطالعه حاضر از دوز ۹×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر بصورت تزریقی استفاده گردید. Loghothetis و Austin (۱۹۹۴) نیز از دوزهای ۸×۱۰^{۶} سلول برای هر تزریق استفاده کردند. در مطالعه دیگری Loghothetis و Austin (۱۹۹۶) از دوزهای ۶×۱۰^{۶} سلول به ازای هر گرم وزن بدن ماهی استفاده کردند. دوز مورد استفاده در این پژوهش اندکی بیشتر از مقادیر ارائه شده توسط Loghothetis و Austin (۱۹۹۴) بود. قاجاری (۱۳۷۶) برای اولین بار در ایران این کار را روی ماهی کپور معمولی با استفاده از باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا بوسیله فرمالین و حرارت انجام داده و چنین نتیجه گرفت که روش تهیه پادگن فرمالینه به روش تهیه پادگن حرارت دیده ارجحیت دارد. همچنین برتری روش‌های واکسیناسیون در ارتباط مستقیم با روش تهیه پادگن است و تیتر پادتن تا روز ۶۰ پس از آزمایش دارای یک سیر صعودی است (۱). در بررسی تغییرات سرم ضد آئروموناس، در هر دو روش تزریق، میزان تیتر پادتن در گروه تزریق باکتری کشته بیشتر از گروه شاهد (تزریق با سرم نمکی) بود. هر چند طبق این نتایج تفاوت پادتن معنی‌دار بوده است ولی واکنش قوی ضد آئروموناس در تمامی ماهیان تزریق شده ایجاد نشده است. احتمالاً چند عامل در پایین بودن تیتر پادتن گروههای آزمایشی مؤثر بوده است:

۱- زمان بررسی تیتر پادتن احتمالاً در صورتیکه مدت زمان بیشتری از شروع تزریق می‌گذشت مثلا یک ماه پس از تزریق احتمال اینکه تیتر پادتن بیشتر باشد، افزایش می‌یافت که در یک تحقیق دیگر و در زمانهای متفاوت برای خونگیری قابل بررسی می‌باشد.

۲- وجود مواد همراه یا یاور (Adjuvant) می‌تواند در ارائه بهتر پادگن به بدن ماهیها نقش مؤثری داشته باشد.

۳- دمای نگهداری ماهیها در صورتیکه به درجات بالاتری افزایش یابد احتمال اینکه واکنش قوی‌تری در ماهیها ایجاد شود بیشتر می‌شد که در تحقیقات مشابه قابل بررسی می‌باشد.

پیغان و همکاران (۲۰۱۰) پس از تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی باکتری کشته آئروموناس هیدروفیلا متوجه شدند که تزریق باکتری کشته می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار لنفوسیت‌ها در کلیه قدامی ماهی کپور معمولی شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد هر چند بالاترین تیتر در گروه تزریق داخل عضلانی باکتری مشاهده شده است، اما تفاوت معنی‌داری در متوسط تیتر پادتن ضد آئروموناس هیدروفیلا بین دو گروه تزریق باکتری (روش تزریق داخل صفاقی و روش تزریق داخل عضلانی)

Archive of SID

www.SID.ir

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 ماهی‌های کپور استفاده گردد.

بطور کلی با توجه به نتایج بدست آمده تزریق باکتری توانسته است واکنش تولید پادتن را در بدن ماهی کپور پس از حدود دو هفته ایجاد نماید. اما قدرت محافظت‌کنندگی این تیتر پادتن هنوز ممکن است 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. پس از انجام آزمایش بیماریزایی و مواجهه ماهیان مورد آزمایش با سوش حاد باکتری مذکور می‌توان با اطمینان کامل به میزان ایمنی‌زایی این مطالعه پی برد.

منابع

۱- **پیغان، ر. و اسمائیلی، ف.، ۱۳۷۶.** آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسم‌های شبه آئرومونا‌س های متحرک. مجله علمی شیلات ایران، سال شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۷۶، صفحات ۳۷ تا ۴۱.

۲-**سلطانی، م.، ۱۳۸۰.** بیماریهای آزاد ماهیان. مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول، شماره ۲۵۴۹، تهران، ۴۴۴ صفحه.

۳- **علی‌شاهی، م.؛ سلطانی، م.؛ زرگر، ا.، ۱۳۸۸.** بررسی باکتریایی تلفات ماهی آمور در استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران. شماره ۴ ، صفحات ۲۵ تا ۳۴.

۴- **مخیر، ب.، ۱۳۷۴.** بیماریهای ماهیان پرورشی. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۱۲.

5- **Acuigru, P., 1980.** Trial vaccination of rainbow trout against *Aeromonas liquefaciens*. *In*: Fish Diseases. (W. Ahne ed.), 3rd ed. Springer تVerlag. Berlin. pp.206-211.

6- **Ardo, l.; Genes, Z.; Adams, A. and Jeney, G., 2010.** Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology., Vol. 26, No. 1, pp.111-116.

7- **Austin, B. and Austin, D.A., 2007.** Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish. 4th ed. Springer Praxis, Godalming.

8- **Austin, B., 2005.** Bacterial pathogens of marine fish. *In*: Oceans and Health, pathogens in the marine environment (Ed. Belkin and Colwell). Springer. New York, USA.

9- **Fang, H.M.; Ling, K.C.; Ge. R. and 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. J. Fish Dis., 23:137-145.

10- **Loghothetis, P.N. and Austin, B., 1996.** Variations in antigenicity of *Aeromonas hydrophila* strains in rainbow trout (O*ncorhynchus mykiss*, Walbaum) an association with surface characteristic. Fish and Shellfish Immunology, 6:47-55.

11- **Loghothetis, P.N. and Austin, B., 1994.** Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila*. Fish and ShellFish Immunology, 4:23-254 (Abs.).

12- **Peyghan, R.; Khajeh, G.; Mozarmnia, N. and Dadar M., 2010.** Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, *Cyprinus carpio*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 1:26-29.

13- **Ruangapan, L.; Kitao, T. and Yoshida, T., 2002.** Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccine in Nile tilapia. Veterinary Immunology and Immunopathology, 12:345-350.

14- **Schachte, J.H., 1978.** Immunization of channel catfish (*Ictalurus punnctatus*) against two bacterial diseases. Mar. Fisher. Rev., 40:18-19.

15- **Thune, R.L. and 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.

Archive of SID
www.SID.ir