دانشگاه شهید چمران اهواز
دانشکده دامپزشکی

۹۳۵۸۹۷۶

پایان‌نامه دکتری (**PhD**) بهداشت آبزیان

عنوان:

نقش *آئرومونـاس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی باکترین جدایه‌ی (های) حاد آن

اساتید راهنما:

دکتر رحیم پیغان
دکتر مسعود قربانپور

اساتید مشاور:

دکتر مصطفی شریف روحانی
دکتر مهدی سلطانی

نگارش:

دکتر مینا آهنگر زاده

بهمن ۱۳۹۳

بسمه‌تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

(نتیجه ارزشیابی پایان‌نامه‌ی دکتری PhD)

پایان‌نامه‌ی خانم **مینا آهنگرزاده** دانشجوی رشته: **بهداشت آبزیان** از دانشکده **دامپزشکی** به شماره دانشجویی **۹۰۵۸۹۰۲** تحت عنوان: **نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی باکترین جدایه‌ی (های) حاد آن** جهت اخذ مدرک: **دکتری (PhD) بهداشت آبزیان** در تاریخ: ۱۳۹۳/۱۱/۰۴ توسط هیئت محترم داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه: عالی به تصویب رسید.

	اعضای هیئت‌داوران	مرتبه علمی	سمت	امضاء
	دکتر رحیم پیغان	استاد	استاد راهنمای اول	
	دکتر مسعود قربانپور نجف‌آبادی	استاد	استاد راهنمای دوم	
	دکتر مصطفی شریف روحانی	دانشیار	استاد مشاور	
	دکتر مهدی سلطانی	استاد	استاد مشاور	
	دکتر مهرزاد مصباح	دانشیار	استاد داور	
	دکتر مجتبی علیشاهی	دانشیار	استاد داور	
	دکتر نغمه موری بختیاری	استادیار	استاد داور	
	دکتر ابراهیم رجب زاده‌قطرمی	استادیار	استاد داور	
۲	دکتر محمدحسین راضی جلالی	دانشیار	استاد ناظر	
۳	دکتر مهرزاد مصباح	دانشیار	مدیر گروه	
۴	دکتر محمدحسین راضی جلالی	دانشیار	معاون پژوهشی دانشکده	
۵	دکتر عبدالرحمن راسخ	استاد	مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه	

گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: **نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی باکترین جدایه‌ی (های) حاد آن.**

این‌جانب **مینا آهنگرزاده** دانشجوی **دکتری (PhD)** رشته‌ی **بهداشت آبزیان** دانشکده **دامپزشکی** دانشگاه شهید چمران به شماره دانشجویی **۹۰۵۸۹۰۲** تحت راهنمایی **دکتر رحیم پیغان** و **دکتر مسعود قربانپور نجف‌آبادی** و مشاوره **دکتر مصطفی شریف روحانی** و **دکتر مهدی سلطانی** گواهی می‌دهم که:

۱- تحقیقات ارائه‌شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص این‌جانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تأیید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج‌شده در این پایان‌نامه، توسط این‌جانب یا شخص دیگری به‌منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعدازاین نیز نخواهد شد.

۴- در تدوین متن پایان‌نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

۶- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هرگونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده این‌جانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت. همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و این‌جانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

مینا آهنگرزاده

۱۳۹۳/۱۱/۴

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته‌شده) به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل‌واگذاری به غیر نیست. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

این پایان نامه را در کمال افتخار تقدیم می نمایم به:

پدر و مادر عزیزم

به پاس ایثار و از خودگذشتگی، مهر و محبت بی انتهایشان، که اگر حضور این دو عزیز نبود هیچگاه من توانایی ایستادن نداشتم و دستان پر مهرشان را می بوسم.

همسر گرامیم جناب آقای دکتر حسین هوشمند

که در طول زندگیمان و دوران تحصیل با عشق و محبت یار و یاورم بوده و از تجربیات علمی ایشان کمال بهره را بردم.

به معنا بخش زندگیم، دختر عزیز و مهربانم، تانیا

که خستگی ها و مشغله های مادر را صبورانه تحمل کرد.

خواهر و برادر مهربانم

که همواره پشتیبان و مایه دلگرمی من بوده اند و سختی راه را برایم آسان نمودند.

سپاس خدای را

وباسپاس از:

از اساتید راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر پیغان و جناب آقای دکتر قربانپور که همواره با راهنمایی های ارزنده‌شان مرا مرهون لطف و محبت خود قرار داده اند و در تمامی مراحل انجام این تحقیق صبورانه از هیچ تلاشی فروگذار نبوده اند.

از اساتید مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر شریف روحانی و جناب اقای دکتر سلطانی که از مشاوره و یاری هایشان در طول انجام این پایان نامه بهره بردم.

سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر مصباح، جناب آقای دکتر علیشاهی، جناب آقای دکتر رجب‌زاده و سرکار خانم دکتر بختیاری به جهت قبول داوری این پایان نامه و جناب آقای دکتر راضی جلالی به عنوان استاد محترم ناظر.

سپاس فراوان از: جناب آقای دکتر پیغان، جناب آقای دکتر مصباح و جناب آقای دکتر علیشاهی به خاطر زحماتی که در طول مدت تحصیل متقبل شدند.

باتشکر از:

جناب آقای دکتر مرتضی رئیس محترم پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور.

جناب آقای دکتر اسکندری معاون محترم پژوهشی و قت پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور.

جناب آقای دکتر سید مرتضایی معاون محترم پژوهشی پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور.

همکارانم در بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، آبزی پروری و دیگر بخش های پژوهشکده.

وکارشناسان و تکنسین های محترم بخش های آبزیان و میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی.

و سپاس فراوان از همکلاسیهای عزیزم که لحضات خوبی را در کنار آنها سپری کردم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده..... ۱

فصل اول: مقدمه و هدف..... ۴

فصل دوم: مروری بر منابع..... ۱۰

الف – آشنایی با ماهی کپور..... ۱۰

الف–۱– طبقه‌بندی ماهی کپور معمولی..... ۱۰

الف–۲– پراکنش کپور ماهیان..... ۱۲

الف–۳– ویژگی‌های ظاهری، فیزیولوژی و پرورشی خانواده‌ی کپور ماهیان..... ۱۳

الف–۴– ارزش اقتصادی ماهی کپور..... ۱۵

الف–۵– تاریخچه پرورش ماهی در ایران و استان خوزستان..... ۱۷

الف– ۶– بیماری‌های عفونی کپور ماهیان..... ۲۰

الف– ۶–۱– بیماری‌های باکتریایی..... ۲۲

الف– ۶– ۱– ۱– تاکسونومی و طبقه‌بندی آئروموناس‌ها..... ۲۳

الف –۶–۱–۲– ویژگی‌های باکتری‌شناسی آئروموناس‌ها و آئروموناس هیدروفیلا..... ۲۵

الف – ۶–۱–۳– پراکندگی و همه‌گیرشناسی آئروموناس‌ها..... ۲۶

الف – ۶–۱–۴– علائم بالینی و آسیب‌شناسی *آئروموناس هیدروفیلا*..... ۲۸

الف– ۶–۱–۵– بیماریزایی و فاکتورهای حدت *آئروموناس هیدروفیلا*..... ۳۱

ب– سیستم ایمنی ماهی..... ۳۶

ب–۱– اجزای اصلی تشکیل‌دهنده‌ی سیستم ایمنی..... ۳۶

ب–۲– بافت های دخیل در سیستم ایمنی ماهی..... ۳۶

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

ب-۲-۱- ارگان های لنفاوی اولیه..... ۳۶

ب-۲-۲- ارگان‌های لنفاوی ثانویه..... ۳۷

ب-۳- سیستم ایمنی غیراختصاصی..... ۳۷

ب-۴- سیستم ایمنی اختصاصی..... ۳۸

ب-۴-۱- دفاع اختصاصی با واسطه‌ی سلولی..... ۳۹

ب-۴-۲- دفاع اختصاصی هومورال..... ۴۰

ب-۵- آشنایی با پادگن‌ها و واکنش بدن در مقابل آن‌ها..... ۴۱

ب-۵-۱- ویژگی‌های پادگن‌ها..... ۴۲

ب-۵-۱-۱- بیگانگی..... ۴۲

ب-۵-۱-۲- اندازه‌ی مولکولی..... ۴۲

ب-۵-۱-۳- پیچیدگی ساختمان شیمیایی..... ۴۳

ب-۵-۱-۴- شکل مولکولی و تجزیه‌پذیری..... ۴۳

ب-۶- همکاری سلول‌ها..... ۴۳

ب-۶-۱- عرضه‌ی پادگن..... ۴۴

ب-۷- سلول‌های T..... ۴۵

ب-۷-۱- تشکیل و انتشار سلول‌های T..... ۴۵

ب-۷-۲- فعالیت عملیاتی سلول‌های T..... ۴۶

ب-۸- سلول‌های B..... ۴۷

ب-۸-۱- فعال‌سازی سلول‌های B..... ۴۷

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

ب-۹- خلاصه‌ای از اعمال و مکانیسم‌های سیستم ایمنی ۴۸

ج- آشنایی با واکسیناسیون در آبزی‌پروری ۴۹

ج-۱- واکسیناسیون ۴۹

ج -۱-۱- فاکتورهای اولیه مؤثر بر کارایی واکسیناسیون ۵۰

ج-۱-۱-۱- نوع فرمولاسیون واکسن ۵۰

ج-۱-۱-۱-۱- باکترین‌ها ۵۰

ج-۱-۱-۱-۲- واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته ۵۰

ج-۱-۱-۱-۳- DNA واکسن‌ها ۵۰

ج-۱-۱-۱-۴- واکسن‌های پلی والان و مونووالان ۵۱

ج-۱-۱-۲- روش و استراتژی استفاده از واکسن ۵۱

ج-۱-۱-۲-۱- روش خوراکی ۵۱

ج-۱-۱-۲-۲- روش غوطه‌وری در محلول واکسن به‌صورت حمام طولانی‌مدت یا کوتاه‌مدت ۵۲

ج-۱-۱-۲-۳- روش تزریقی ۵۳

ج-۲- ادجوانت‌ها ۵۳

ج-۲-۱- انواع و دسته‌بندی ادجوانت‌ها ۵۴

ج-۲-۱-۱- مواد با منشأ میکروبی و زیست شناسی ۵۴

ج-۲-۱-۲- مواد استحصال شده از دستگاه ایمنی ۵۵

ج-۲-۱-۳- مواد سنتزی مشابه مواد زیست شناختی ۵۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

ج-۲-۱-۴- محصولات شیمیایی ۵۵

ج-۲-۲- مکانیسم اثر ادجوانت‌ها و چگونگی اثر آنها بر سیستم ایمنی ۵۵

ج- ۲-۳- ادجوانت فروند ۵۶

ج – ۲-۳-۱- ادجوانت کامل فروند ۵۶

ج-۲-۳-۲- ادجوانت ناقص فروند ۵۷

ج-۳- وضعیت رایج توسعه واکسیناسیون برای جلوگیری از بیماری‌های باکتریایی ۵۸

فصل سوم: مواد و روش کار ۶۱

الف- مواد و روش کار ۶۱

الف- ۱- وسایل و مواد مورد نیاز ۶۱

الف-۱-۱- وسایل مورد استفاده ۶۱

الف-۱-۲- مواد مورد استفاده ۶۲

الف-۲- روش تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده و مواد تشکیل دهنده آن‌ها ۶۳

الف-۲-۱- روش تهیه بافر بارگذاری برای ژل آگارز ۶۳

الف-۲-۲- روش تهیه بافر TAE ۶۳

الف-۲-۳- روش تهیه آب DEPC ۶۴

الف-۲-۴- روش تهیه PBS(1X) ۶۴

الف-۲-۵- روش تهیه Skim milk ده درصد برای نگهداری باکتری در فریزر ۶۴

الف-۲-۶- روش تهیه بافر پوشاننده ۶۵

الف-۲-۷- روش تهیه BSA یک درصد در PBS به عنوان مسدود کننده ۶۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

الف- ۲-۸- روش تهیه محلول PBS- T (PBS به همراه توئین ۲۰).....۶۵

الف ۲ -۹- روش تهیه استوک سوبسترا تترا متیل بنزیدین.....۶۵

الف-۲-۱۰- روش تهیه سوبسترا کروموژن.....۶۶

الف-۲-۱۱- روش تهیه بافر استات سدیم ۰/۱ مولار.....۶۶

الف-۲-۱۲- روش تهیه استوک آب اکسیژنه ۳٪.....۶۶

الف- ۲ – ۱۳- تهیه‌ی ژل ۱/۵ درصد آگارز.....۶۶

ب - روش کار.....۶۷

ب -۱- نمونه‌برداری و تهیه ماهی.....۶۷

ب-۲- جداسازی و خالص‌سازی.....۶۷

ب- ۳- تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها.....۶۸

ب-۴- تشخیص به روش مولکولی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.....۷۰

ب-۴-۱ - استخراج DNA از باکتری.....۷۰

ب-۴-۲ - PCR تعیین جنس آئروموناس.....۷۰

ب- ۴-۳- ارزیابی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز.....۷۱

ب – ۴- ۴- PCR تعیین گونه *آئروموناس هیدروفیلا*.....۷۱

ب- ۵- ردیابی فاکتورهای حدت.....۷۳

ب-۵- ۱- ردیابی فاکتورهای حدت به روش فنوتیپی.....۷۳

ب-۵-۱-۱- تعیین همولیزβ در جدایه‌ها.....۷۳

ب-۵-۱-۲- بررسی فعالیت نوکلئاز.....۷۴

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

ب-۵-۱-۳- ارزیابی فعالیت پروتئولیتیکی..... ۷۴

ب-۵-۱-۴- توانایی جذب رنگ کونگورد..... ۷۵

ب-۵-۲- ردیابی ژن‌های حدت به روش مولکولی..... ۷۵

ب-۵-۲-۱- طراحی پرایمر..... ۷۵

ب-۵-۲-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... ۷۶

ب-۵-۲-۳- برنامه حرارتی PCR..... ۷۷

ب-۵-۲-۴- ارزیابی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز..... ۷۹

ب-۶- تهیه ماهی جهت تعیین LD50 و ایمن‌سازی..... ۷۹

ب- ۷- کشت باکتری حاد جهت چالش و اندازه‌گیری LD50..... ۷۹

ب- ۸- ایمن‌سازی..... ۸۱

ب-۸-۱- تهیه باکترین از جدایه‌ی حاد به‌وسیله UV..... ۸۱

ب- ۸- ۲ – آزمون استریل بودن..... ۸۳

ب -۸-۳ – آزمون ایمن بودن..... ۸۳

ب-۸-۴- آماده‌سازی و افزودن ادجوانت به واکسن..... ۸۳

ب – ۹ – تیمار بندی و ایمن‌سازی ماهی‌ها..... ۸۴

ب-۹-۱- تیمار بندی ماهی‌ها..... ۸۴

ب-۹-۲- ایمن‌سازی ماهی‌ها..... ۸۵

ب-۱۰- چالش و نمونه‌گیری..... ۸۷

ب-۱۰-۱- چالش..... ۸۷

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

ب-۱۰-۱-۱- تزریق باکترین دارای بالاترین حدت ۸۷

ب-۱۰-۱-۲- بررسی حضور باکتری در ماهیان چالش یافته ۸۷

ب-۱۰-۱-۳- تعیین درصد محافظت ۸۸

ب-۱۰-۲- نمونه‌گیری ۸۸

ب-۱۱- بررسی سطح آنتی‌بادی در تیمارهای مورد آزمایش ۹۰

ب-۱۱-۱- استخراج ایمونوگلوبولین‌های سرم ماهی کپور ۹۰

ب-۱۱-۲- تهیه آنتی سرم خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین ماهی ۹۲

ب-۱۱-۳- انجام آزمایش الایزای غیرمستقیم ۹۲

ب-۱۱-۳-۱- تهیه آنتی‌ژن سونیکه ۹۲

ب-۱۱-۳-۲- به‌دست آوردن رقت‌های مناسب از آنتی‌ژن، سرم ماهی، سرم خرگوش و کونژوگه در آزمایش الایزا ۹۳

ب-۱۱-۳-۳- انجام آزمایش الایزا برای نمونه‌های موردبررسی ۹۴

ب-۱۲- آنالیز آماری ۹۷

فصل چهارم: نتایج ۱۰۰

الف- علائم ماهیان بیمار ۱۰۰

ب- جداسازی و خالص‌سازی باکتری ۱۰۲

ج- تشخیص جنس آئروموناس ۱۰۲

ج- ۱- تشخیص به روش بیوشیمیایی ۱۰۲

ج-۲- تشخیص به‌وسیلهPCR ۱۰۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

د- تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* ۱۰۴

د-۱- تشخیص به روش بیوشیمیایی ۱۰۴

د-۲- نتایج تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* به‌روشPCR ۱۰۵

هـ-تعیین حدت جدایه‌ها ۱۱۰

هـ -۱- ردیابی ژن‌های حدت با استفاده از PCR ۱۱۰

هـ -۱-۱- PCR ژن همولایزین ۱۱۰

هـ -۱-۲- PCR ژن ایرولایزین ۱۱۱

هـ -۱-۳- نتایجPCR ژن سایتولیتیک انتروتوکسین (*act*) ۱۱۲

هـ -۲- ردیابی فاکتورهای حدت به روش فنوتیپی ۱۱۶

هـ -۲-۱- ایجاد همولیز β بر روی آگار خون‌دار ۱۱۶

هـ -۲-۲- تولید نوکلئاز ۱۱۷

هـ -۲-۳- فعالیت پروتئولیتیکی ۱۱۷

هـ -۲-۴- توانایی جذب رنگ کونگورد ۱۱۸

هـ -۳- مقایسه جدایه‌ها ازنظر فاکتورهای حدت ژنوتیپی و فنوتیپی ۱۱۹

هـ -۴- تعیین LD_{50} ۱۲۱

و- تهیه باکترین ۱۲۴

و- ۱- بررسی استریل بودن باکترین آماده‌شده ۱۲۵

و-۲- بی‌خطر بودن باکترین ۱۲۵

ز- چالش و عیار آنتی بادی ۱۲۵

ز- ۱- چالش ۱۲۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

ز-۲- عیار آنتی‌بادی ضد*آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان گروه‌های مختلف ۱۲۹

فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری ۱۳۶

الف- نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان..... ۱۳۷

ب- فراوانی عوامل حدت در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلای* جدا شده از سپتی‌سمی کپورماهیان..... ۱۴۲

ب – ۱- فراوانی ژن‌های همولایزین و ایرولایزین..... ۱۴۲

ب-۲- فراوانی ژن سایتولیتیک انتروتوکسین..... ۱۴۵

ب- ۳ – فاکتورهای حدت فنوتیپی و LD_{50}..... ۱۴۶

ج – ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی..... ۱۴۸

ج – ۱- ایمنی‌زایی..... ۱۴۹

ج – ۲- میزان محافظت‌کنندگی..... ۱۵۰

پیشنهادها..... ۱۵۶

منابع..... ۱۵۷

چکیده انگلیسی ۱۷۵

فهرست جداول

جدول **صفحه**

جدول ۲-۱- رده‌بندی ماهی کپور معمولی..... ۱۱

جدول ۲-۲- بیماری‌های عفونی کپور ماهیان..... ۲۱

جدول ۲-۳- نقش برخی ادجوانت ها (محرکهای ایمنی) در ماهی..... ۵۷

جدول ۳-۱- پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص جنس آئروموناس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا*..... ۷۲

جدول ۳-۲- برنامه دمایی PCR جهت تشخیص جنس آئروموناس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا* ۷۳

جدول ۳- ۳- پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص ژن‌های حدت..... ۷۶

جدول ۳-۴- مواد و مقادیر استفاده شده در برنامه تکثیر ژن های حدت..... ۷۷

جدول ۳-۵- برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده در PCR بااستفاده از پرایمرهای طراحی شده..... ۷۸

جدول ۳-۶ - تیمار بندی ماهیان مورد چالش..... ۸۵

جدول ۴-۱- تعداد جدایه‌های مظنون و تأیید شده جنس آئروموناس به تفکیک اندام‌های مختلف ۱۰۴

جدول ۴-۲- تعداد جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از کپورماهیان به تفکیک اندام‌های مختلف و روش تشخیص..... ۱۰۵

جدول ۴-۳ - تعداد جدایه‌های باکتری جدا شده از کپورماهیان مظنون به سپتی سمی به تفکیک اندام‌های مختلف..... ۱۰۶

جدول ۴-۴ – ویژگی‌های بیوشیمیایی ۳۱ جدایه‌ی تأییدشده *آئروموناس هیدروفیلا* جداشده از کپور ماهیان استان خوزستان..... ۱۰۸

جدول ۴-۵ – ویژگی‌های بیوشیمیایی ۲۸ جدایه‌ی دارای مشخصات بیوشیمیایی *آئروموناس هیدروفیلا* که در آزمایش PCR تأیید نشدند..... ۱۰۹

جدول ۴-۶ – فراوانی ژن‌های حدت در ۳۱ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا*..... ۱۱۴

جدول ۴-۷ - فاکتورهای فنوتیپی مرتبط با حدت در ۳۱ جدایه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا*..... ۱۲۰

فهرست جداول

جدول **صفحه**

جدول ۴-۸ – مقایسه ۱۲ جدایه‌ای *آئرومونـاس هیدروفیلا* واجد ۳ ژن حدت..... ۱۲۱

جدول ۴-۹ – نتایج تلفات تجمعی و درصد تلفات در جدایه شماره ۳ *آئرومونـاس هیدروفیلا*.

..... ۱۲۳

جدول ۴-۱۰ – نتایج تلفات تجمعی و درصد تلفات در جدایه شماره ۴ *آئرومونـاس هیدروفیلا*.

..... ۱۲۳

فهرست اشکال

شکل **صفحه**

شکل ۲-۱- ارتباط سلول‌های ایمنی با یکدیگر ۳۹

شکل ۲-۲- واکنش بین سلول عرضه‌کننده‌ی پادگن، سلول B و سلول T یاریگر..... ۴۵

شکل ۳-۱- آزمون‌های بیوشیمیایی برای تشخیص آئروموناس هیدروفیلا..... ۶۹

شکل ۳-۲- مراحل تهیه باکترین ۸۲

شکل ۳-۳- دستگاه سه‌راهی جهت مخلوط کردن باکترین با ادجوانت..... ۸۴

شکل ۳-۴- تانک‌های فایبر گلاس ۳۰۰ لیتری جهت نگهداری ماهی‌ها در تیمار بندی..... ۸۵

شکل ۳-۵ - ایمن‌سازی به روش تزریق داخل صفاقی..... ۸۶

شکل ۳-۶ - نمونه تلف‌شده از چالش..... ۸۸

شکل ۳-۷ - مراحل بی‌هوشی ۸۹

شکل ۳-۸ - اضافه نمودن سولفات آمونیوم اشباع به سرم ماهی..... ۹۰

شکل ۳-۹ - ایمونوگلوبولین رسوب کرده پس از اضافه کردن سولفات آمونیوم اشباع..... ۹۱

شکل ۳-۱۰ - دیالیز ایمونوگلوبولین محتوی سولفات آمونیوم در PBS..... ۹۱

شکل ۳-۱۱- دستگاه سونیکاتور جهت سونیکه کردن باکتری..... ۹۳

شکل ۳-۱۲ - مراحل کوت کردن آنتی‌ژن در پلیت الایزا..... ۹۵

شکل ۴-۱- علائم ماهیان بیمار مورد مطالعه..... ۱۰۱

شکل ۴-۲ - الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی جنس آئروموناس بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد..... ۱۰۳

شکل ۴-۳- الکتروفورز محصول PCR ژن srRNA ۱۶ گونه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪..... ۱۰۶

فهرست اشکال

شکل **صفحه**

شکل ۴- ۴ – الکتروفورز محصول PCR ژن لیپاز *Aeromonas hydrophila* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۱۰۷

شکل ۴-۵ – الکتروفورز محصول PCR ژن همولایزین (hlyA) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۱۱۱

شکل ۴-۶ – الکتروفورز محصول PCR ژن ایرولایزین (*aerA*) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۱۱۲

شکل ۴-۷ – الکتروفورز محصول PCR ژن سایتولیتیک انتروتوکسین (*act*) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۱۱۳

شکل ۴-۸- جدایه ایجادکننده‌ی همولیز β در آگار خوندار ۱۱۶

شکل ۴-۱۰ – هاله ایجادشده اطراف کلونی‌های تولید کننده نوکلئاز ۱۱۷

شکل ۴-۱۱- تولید کازئیناز ۱۱۸

شکل ۴-۱۲- برآمدگی شکم و پرولاپس و قرمزی مخرج ناشی از تزریق داخل صفاقی باکتری ۱۲۲

شکل ۴-۱۳- آسیت و پرخونی اندام‌های داخلی ناشی از تزریق داخل صفاقی باکتری ۱۲۲

شکل ۴-۱۵ – تعیین میزان دوز LD_{50} ۱۲۴

فهرست نمودارها

نمودار **صفحه**

نمودار ۲-۱- تولید آبزی‌پروری ماهیان آب شیرین و کپور معمولی در دنیا..... ۱۶

نمودار ۲-۲- میزان تولید ماهیان گرم‌آبی ایران..... ۱۸

نمودار ۲-۳- میزان تولید آبزی‌پروری در استان خوزستان..... ۲۰

نمودار ۲-۴- میزان تولید ماهیان گرم‌آبی در استان خوزستان..... ۲۰

نمودار ۴-۱ - مقایسه تلفات تجمعی روزانه گروه‌های مختلف مورد آزمایش در چالش ۱۲۶

نمودار ۴-۲- نمودار ستونی میانگین تلفات تجمعی± خطای استاندارد ماهیان گروه‌های مختلف مورد چالش قرار گرفته با *آئروموناس هیدروفیلا*..... ۱۲۷

نمودار ۴-۳- نمودار ستونی میانگین درصد بازماندگی ± خطای استاندارد در ماهیان گروه‌های مختلف مورد چالش قرار گرفته با *آئروموناس هیدروفیلا*..... ۱۲۸

نمودار ۴-۴-عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا ماهیان*گروه‌های مختلف در روز صفر (قبل از ایمن‌سازی) بر اساس S/P%..... ۱۳۰

نمودار ۴-۵- عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا ماهیان*گروه‌های مختلف، ۴ هفته پس از ایمن‌سازی بر اساس S/P%..... ۱۳۰

نمودار ۴-۶- عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا ماهیان*گروه‌های مختلف، ۸ هفته پس از ایمن‌سازی بر اساس S/P%..... ۱۳۱

نمودار ۴-۷- عیار آنتی‌بادی ضد آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان گروه‌های مختلف..... ۱۳۱

چکیده

نام خانوادگی: آهنگرزاده	**نام:** مینا	**شماره دانشجویی:** ۹۰۵۸۹۰۲

عنوان پایان‌نامه: نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی باکترین جدایه‌ی (های) حاد آن

اساتید راهنما: دکتر رحیم پیغان و دکتر مسعود قربانپور نجف‌آبادی

اساتید مشاور: دکتر مصطفی شریف‌روحانی و دکتر مهدی سلطانی

درجه تحصیلی: PhD	**رشته:** بهداشت آبزیان
دانشگاه: شهید چمران اهواز	**دانشکده:** دامپزشکی **گروه:** علوم درمانگاهی
تاریخ فراغت از تحصیل: ۱۳۹۳/۱۱/۴	**تعداد صفحه:**۱۷۶

کلیدواژه‌ها: *آئروموناس هیدروفیلا*، کپور ماهیان پرورشی، استان خوزستان، همولایزین، ایرولایزین، سایتولیتیک انتروتوکسین، PCR، ایمن‌سازی

آئروموناس‌های متحرک معمول‌ترین باکتری‌های موجودات آب شیرین در جهان بوده و باعث بیماری‌هایی در ماهیان و سایر میزبان‌های خونسرد و خونگرم می‌شوند. از بین این دسته از باکتری‌ها، *آئروموناس هیدروفیلا* با ایجاد عوارضی همچون پوسیدگی باله‌ها، زخم‌های پوستی و سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده‌ی کشنده در ماهی‌ها حائز اهمیت است. فاکتورهای حدت مختلفی از *آئروموناس هیدروفیلا* در مراحل بیماری‌زایی نقش دارند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای خارج سلولی مانند آنزیم‌ها (پروتئاز، لیپاز، الاستاز، ژلاتیناز و نوکلئاز) و توکسین‌ها اشاره کرد. در بین اگزوتوکسین‌ها به نظر می‌رسد که همولایزین، آئرولایزین و سایتولیتیک انتروتوکسین نقش مهمی را در بیماری‌زایی ایفا می‌کنند. ردیابی و تشخیص مارکرهای حدت به‌وسیله PCR به‌عنوان یک جزء کلیدی در تعیین بیماری‌زایی این باکتری به‌حساب می‌آید و استفاده از واکسن‌های بومی منطقه جهت ایمن‌سازی هرچه بهتر در مقابل این بیماری حائز اهمیت می‌باشد. بدین منظور در این مطالعه از تعداد ۲۰۰ قطعه کپور ماهیان پرورشی (۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه آمور) مشکوک به سپتی‌سمی آئروموناسی استان خوزستان نمونه‌برداری شد، که از این

مدیریت تحصیلات تکمیلی

تعداد، ۱۲۵ باکتری متعلق به جنس آئروموناس به روش بیوشیمیایی و PCR شناسایی شد که ۳۱ جدایه از ۱۲۵ جدایه با روش‌های بیوشیمیایی و ردیابی ژن‌های ۱۶ s rRNA و لیپاز به‌عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* شناسایی گردیدند. نتایج نشان داد که میزان نقش آئروموناس‌ها و *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی ماهیان دارای علائم بررسی‌شده به ترتیب معادل ۶۲/۵٪ و ۱۵/۵٪ است. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، سه ژن حدت همولایزین، ایرولایزین و سایتولیتیک انتروتوکسین در این جدایه‌های تأییدشده، ردیابی گردید که مشخص شد ۱۸ جدایه (۵۸/۰۶٪) همولایزین مثبت ($hiyA^+$)، ۱۶ جدایه (۵۱/۶۱٪) ایرولایزین مثبت ($aerA^+$) و ۲۳ جدایه (۷۴/۱۹٪) ازنظر حضور ژن سایتولیتیک انتروتوکسین (act^+) مثبت هستند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که بیشترین ژنوتایپ در بین جدایه‌های تأییدشده، ژنوتایپ $hlyA^+$ act^+ با فراوانی معادل ۵۱/۶۱٪ می‌باشد. جهت بررسی محافظت‌کنندگی جدایه حاد از باکترین غیرفعال شده به‌وسیله UV استفاده گردید. تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی با وزن متوسط ۱۰/۶۵ ± ۸۱/۱۶، به ۴ گروه (تیمار) و هر گروه به ۳ تکرار ۲۵ قطعه‌ای تقسیم شدند. گروه‌های ۱ تا ۴ به ترتیب با PBS، PBS همراه با ادجوانت کامل فروند، باکترین و باکترین همراه با ادجوانت کامل فروند به‌صورت داخل صفاقی ایمن گردیدند. در ۴ هفته پس از ایمن‌سازی هر چهار گروه با دوز معادل دو برابر LD_{50} از *آئروموناس هیدروفیلا* حاد چالش داده شدند. میزان محافظت و عیار آنتی‌بادی در گروه‌های ایمن شده اندازه‌گیری گردید و نتایج نشان داد که میزان محافظت پس از چالش و عیار آنتی‌بادی در ۴ هفته و ۸ هفته پس از ایمن‌سازی در گروه‌های ایمن شده با باکترین چه با ادجوانت و چه بدون ادجوانت به‌صورت معنی‌داری بالاتر از گروه‌های دریافت‌کننده PBS است ($P<۰/۰۵$). ولی بین گروه‌های ایمن شده با باکترین به همراه ادجوانت و بدون ادجوانت اختلاف معنی‌داری در میزان محافظت و عیار آنتی‌بادی مشاهده نگردید ($P<۰/۰۵$).

فصل اول

مقدمه وهدف

فصل اول: مقدمه و هدف

طی دو دهه گذشته تکثیر و پرورش آبزیان توسعه زیادی یافته است، به‌طوری‌که بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی سازمان ملل متحد (فائو[1]) تولید آبزیان در سال ۲۰۱۰ بالغبر ۱۶۵ میلیون تن بوده است. این میزان در ۱۵ سال گذشته حدود ۴۰۰٪ رشد داشته است. در سال ۲۰۱۰ تولیدات ماهیان آب شیرین ۳۷ میلیون تن گزارش‌شده که بیش از ۵۰٪ آن مربوط به پرورش کپور ماهیان است (FAO، ۲۰۱۲). بیماری‌های ماهی به‌عنوان بزرگ‌ترین عامل خطر در آبزی‌پروری تجاری است، بنابراین شناخت اکولوژی و اپیدمیولوژی عوامل عفونی خسارت زا در سیستم آبزی‌پروری واجد اهمیت است. باکتری‌ها، عامل مرگ‌ومیر و بسیاری از تلفات در ماهی‌های پرورشی و وحشی می‌باشند. بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای ماهی جزء عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب هستند. این عوامل در صورت مهیا شدن شرایط (مانند وارد آمدن استرس‌های مختلف) قادر به ایجاد عفونت می‌باشند. شاخص‌ترین گروه از این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، آئروموناس‌های متحرک و به‌خصوص *آئروموناس‌هیدروفیلا* می‌باشد

1 .FAO

(پیغان و مشایی، ۱۳۸۸). آئروموناس‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبتی هستند که در خانواده آئروموناداسه قرار داشته و به دودسته‌ی متحرک و غیر متحرک تقسیم می‌شوند (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۵؛ Kingombe و همکاران، ۱۹۹۹). آئروموناس‌های متحرک معمول‌ترین باکتری‌های جانوران آب شیرین در جهان بوده و باعث بیماری‌هایی در ماهیان و سایر میزبان‌های خونسرد و خونگرم می‌شوند (Cipriano و همکاران، ۲۰۰۱). نامگذاری این جنس پیچیده است و در بین گونه‌های آئروموناس‌های متحرک، *آئروموناس هیدروفیلا*، *آئروموناس کاویا* و *آئروموناس ورونی* بیووار سوبریا شناخته‌شده‌تر هستند (Ottaviani و همکاران، ۲۰۱۱). در ماهی این باکتری‌ها باعث سپتی‌سمی هموراژیک، پوسیدگی باله، پوسیدگی بافت نرم و فرونکلوزیس می‌شوند (Nayak و همکاران، ۱۹۹۹). بیماری‌های ایجادشده به‌وسیله *آئروموناس هیدروفیلا* از فرم حاد سریعاً کشنده تا عفونت پنهان متغیر هستند (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰). این باکتری در چین، از سال ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۳، هر تابستان، به‌عنوان عامل عفونی سپتی‌سمی‌های ماهی در سیستم پرورش آب شیرین و خانواده کپور ماهیان خصوصاً ماهی کاراس[1] و فیتوفاگ بوده و ضرر و زیان‌های اقتصادی شدیدی را باعث گردیده است (Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱).

بیماری‌زایی گونه‌های آئروموناس به عوامل متعددی مربوط است و فاکتورهای حدت بالقوه بسیاری در آئروموناس‌ها از جمله: LPS، پروتئین غشاء خارجی، مژه و تاژک، سیستم ترشحی تیپ ۳ و فاکتورهای خارج سلولی شناسایی‌شده است. فاکتورهای خارج سلولی از آنزیم‌ها (آمیلاز، کتیناز، الاستاز، پروتئاز، لیپاز و...) و اگزوتوکسین‌ها (آنتروتوکسین‌های مقاوم و

1 . *Crucian carp*

حساس به حرارت، همولایزین[1]، ایرولایزین[2] و سایتولیتیک انتروتوکسین[3]) تشکیل‌شده‌اند (Yogananth و همکاران، ۲۰۰۹؛ Nam و همکاران، ۲۰۰۷؛ Ottaviani و همکاران، ۲۰۱۱).

ازجمله روش‌های ارزیابی بیماری‌زایی گونه‌های آئروموناس، تعیین ژن‌های عوامل حدت مثل ژن‌های ایرولایزین و همولایزین در *آئروموناس هیدروفیلا*، *آئروموناس سوبریا* و *آئروموناس سالمونیسیدا* و *آئروموناس کاویا* و ژن‌های لیپاز خارج سلولی[4] و سایتولیتیک انتروتوکسین در *آئروموناس هیدروفیلا* است (Kingombe و همکاران، ۱۹۹۹).

جداسازی و تشخیص آئروموناس‌ها از منابع مختلف، به علت تنوع زیاد سوش‌های موجود و عدم وجود یک روش مطمئن و قراردادی برای تشخیص این اجرام، چالش‌های جدی برای میکروبیولوژیست‌ها ایجاد کرده است. تشخیص بر اساس جداسازی پاتوژن نه‌تنها وقت‌گیر است بلکه، در مواقعی گیج‌کننده نیز می‌باشد، درنتیجه ردیابی و تشخیص مارکرهای حدت به‌وسیله PCR به‌عنوان یک جزء کلیدی در تعیین بیماری‌زایی این باکتری‌ها به‌حساب می‌آید و نتیجه خوب این روش و صرفه‌جویی در هزینه، ارجحیت آن را بر روش‌های سنتی نشان داده است (Shome و همکاران، ۲۰۰۵؛ Yousr و همکاران، ۲۰۰۷؛ Nam و همکاران، ۲۰۰۷).

در حال حاضر راه اصلی کنترل بیماری‌های باکتریایی آبزیان، درمان آنتی‌بیوتیکی و اعمال اصول مدیریتی است (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰؛ Peyghan و همکاران، ۲۰۱۰). اگرچه درمان با داروهای شیمیایی به‌خصوص در مراحل اولیه‌ی بیماری، می‌تواند طیف وسیعی از پاتوژن‌ها را کنترل کند، ولی هزینه‌بر بوده و ممکن است به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن به دارو، بی‌اثر

1 . Hemolysin
2 . Aerolysin
3 . Cytolytic enteroroxin
4 . Exteracellular Lipase

باشد. علاوه بر این نیاز به تکرار مجدد درمان در زمان شیوع بیماری، میزان محدود آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس و مشکلات زیست‌محیطی ناشی از باقی ماندن دارو در بدن ماهی استفاده از این روش را محدود و احساس نیاز به معرفی روش‌های جایگزین همچون واکسیناسیون را بارزتر می‌نماید (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰؛ Peyghan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Osman و همکاران،۲۰۰۹). واکسیناسیون علیرغم هزینه‌بر بودن، بسیار مؤثر بوده و در حال حاضر یک بخش مهم از آبزی‌پروری شده است (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹). ماهی‌ها مانند مهره‌داران عالی (پرندگان و پستانداران) دارای سیستم ایمنی اختصاصی (البته از نوع ساده‌تر) هستند و بنابراین انجام واکسیناسیون در ماهی‌ها امکان‌پذیر است. متأسفانه تمامی واکسن‌های تجاری موجود در بازار، در برابر سویه‌های رایج در مناطق جغرافیایی و کشورهای خاصی ساخته‌شده و در برابر سویه‌های مناطق دیگر کارآیی مناسبی ندارند، بنابراین لازم است در هر منطقه واکسن‌هایی از جدایه‌های بومی ساخته شود (علیشاهی، ۱۳۸۸).

با توجه به اهمیت پرورش کپور ماهیان در استان خوزستان و ضرورت شناسایی آئروموناس‌های موجود در منطقه به‌عنوان عامل بیماری‌زای مهم در این دسته از ماهیان، مطالعه‌ی حاضر به‌منظور نیل به اهداف زیر طراحی‌شد:

۱- تعیین نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی های باکتریایی در کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان، با جداسازی و تعیین هویت بیوشیمیایی و مولکولی (PCR).

۲- تعیین حدت *آئروموناس‌هیدروفیلا*های جداشده با استفاده از فراوانی برخی از ژن‌های حدت متداول.

۳- بررسی میزان محافظت‌کنندگی باکترین حاصل از جدایه (های) با بالاترین حدت.

مینا آهنگرزاده

۱۳۹۳/۱۱/۴

فصل دوم

مروری بر منابع

فصل دوم: مروری بر منابع

الف – آشنایی با ماهی کپور

الف-۱- طبقه‌بندی ماهی کپور معمولی

ماهی کپور معمولی[۱] با نام علمی (*Cyprinus carpio*) از گروه مهره‌داران[۲]، رده ماهیان استخوانی[۳]، زیررده ماهیان استخوانی دیرینه[۴]، راسته استاریوفیزی[۵]، زیر راسته کپور سانان[۶]، خانواده کپور ماهیان[۷] و جنس و گونه‌ی کپور معمولی[۸] است (Nelson، ۲۰۰۶)(جدول ۲-۱).

1. Common carp
2 .Group Vertebrata
3 .Class Osteichthyes
4 .Subclass Actinoptergii
5 .Order Ostariophysi
6 .Suborder Cyprinoidei
7. Family Cyprinidae
8 .Genus and species *Cyprinus carpio*

جدول ۲-۱- رده‌بندی ماهی کپور معمولی

رده	نام فارسی	نام لاتین	طبقه‌بندی
شاخه	طناب داران	Chordata	Phylum
زیرشاخه	مهره‌داران	Vertebrata	Subphylum
فوق رده	آرواره‌داران	Gnathostomata	Superclass
طبقه	ماهیان	Pisces	Grade
رده	ماهیان استخوانی	Osteichthyes	Class
زیررده	ماهیان شعاع باله	Actinoptergii	Subclass
تحت زیررده	نئوپترجی	Neoptergii	Infraorder
گروه	ماهیان استخوانی حقیقی	Teleosti	Group
فوق راسته	استاریو فیزی	Ostariophysi	Superorder
راسته	کپور ماهی شکلان	Cypriniformes	Order
زیر راسته	سیپرینوئید	Cyprinoidei	Suborder
خانواده	کپور ماهیان	Cyprinidae	Family
جنس	کپور	Cyprinus	Genus
گونه	کپور معمولی	*Cyprinus carpio*	Species

کپور معمولی ابتدا بومی آسیای مرکزی بوده است و طی قرن‌های متمادی به نواحی مختلف جهان گسترش طبیعی پیداکرده و یا توسط انسان منتقل‌شده است (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷). گسترش طبیعی ماهی کپور معمولی ابتدا از اروپا تا چین بوده و در طی قرون متمادی به‌منظور پرورش و برطرف نمودن بخشی از نیازهای غذایی انسان به نواحی مختلف جهان منتقل گردیده و اکنون در بسیاری از محیط‌های طبیعی نیز یافت می‌شود (فریدپاک، ۱۳۸۵).

الف-۲- پراکنش کپور ماهیان

این خانواده بزرگ‌ترین خانواده‌ی ماهیان استخوانی می‌باشد و بیشترین پراکندگی را در سطح جهان دارند. نزدیک به ۲۰۰ جنس و ۲۰۷۰ گونه از این ماهی‌ها وجود دارد. ولی به‌طورکلی در کپور ماهیان دو جنس باربوس و کوپوتا، به ترتیب با ۶۱ و ۸ گونه فراوان‌ترین کپور ماهیان هستند (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷). اعضای مختلف این خانواده به‌عنوان ماهی‌های خوراکی، آکواریومی و مدل برای تحقیقات حائز اهمیت هستند. از گونه‌های مهم این خانواده می‌توان به کپور معمولی[1]، ماهی طلایی[2] و ماهی گورخری[3]، اشاره کرد. این خانواده شامل کپورها، سر مخروطی‌ها، چشم‌قرمزها و ماهیان قنات می‌باشند (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷؛ Nelson، ۲۰۰۶).

معمولاً آسیای جنوب شرقی به‌عنوان مرکز تکامل کپور ماهیان در نظر گرفته‌شده است، زیرا کپور ماهیان به‌طور خارق‌العاده‌ای در آسیای جنوب شرقی و شبه‌قاره هند دارای تنوع و گوناگونی هستند. بیشتر کپور ماهیان آفریقا به همان جنس‌هایی تعلق دارند که در آسیا یافت می‌شوند و مشخصاً از آن‌ها انشقاق یافته‌اند. قاره آسیا حدود ۹۱٪ تولید ماهیان آب شیرین را به خود اختصاص داده است. کشور چین به‌عنوان بزرگ‌ترین تولیدکننده ۷۴٪ و به دنبال آن هند، بنگلادش، ویتنام، اندونزی، تایلند و فیلیپین به ترتیب کشورهای اصلی تولیدکننده ماهیان آب شیرین هستند (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷).

1. Common carp
2. Gold fish
3. Zebra fish

الف-۳- ویژگی‌های ظاهری، فیزیولوژی و پرورشی خانواده‌ی کپور ماهیان

اعضای این خانواده را می‌توان بر اساس داشتن دندان حلقی (یک تا سه ردیف اما هرگز تعداد آن‌ها در هر ردیف از هشت عدد تجاوز نمی‌کند) و لب‌های نازک (معمولاً در مرز آرواره‌ی فوقانی تنها استخوان پیش فکی دیده می‌شود) تشخیص داد. اگرچه بیشتر آن‌ها تنها دارای شعاع‌های نرم در باله‌های خود هستند اما شعاع‌هایی که تغییر شکل یافته و به خار تبدیل‌شده‌اند، در بعضی از اشکال وجود دارد که جالب‌توجه‌ترین آن‌ها کپور معمولی[1] و ماهی طلایی[2] هستند. تعداد کروموزوم‌های کپور ماهیان (2n) ۵۰ عدد (گاهی اوقات ۴۸ عدد) است. کپور ماهیان با در نظر گرفتن تعداد گونه‌ها همگی دارای طرح و شکل متفاوت هستند که این تفاوت عمدتاً مربوط به طرح و زمینه کلاسیک این ماهیان است. به‌طورکلی بدن دوکی‌شکل تا نسبتاً بلند، چشم‌های بزرگ، فلس‌های واضح، باله‌های لگنی در موقعیت شکمی و دهان کوچک انتهایی یا نیمه تحتانی از مشخصات بارز این ماهیان است (ستاری، ۱۳۸۲).

در اکثر آن‌ها فلس از نوع دایره‌ای روی بدن را پوشانده است و سر فاقد فلس است. اکثراً دارای سبیلک می‌باشند که نقش حسی داشته و در پیدا کردن غذا به ماهی کمک می‌کند؛ فک آن‌ها فاقد دندان است و غذا توسط دندان‌های حلقی که بر روی پنجمین کمان آبششی قرار دارند له می‌شود. این دندان‌ها ازنظر تعداد و شکل و نحوه‌ی قرارگیری در گونه‌های مختلف باهم متفاوت می‌باشند، ولی معمولاً در ۱ تا ۳ ردیف قرار می‌گیرند. دستگاه گوارش این خانواده فاقد معده است و مری مستقیم به روده وصل می‌گردد، روده لوله‌ای ساده و اکثراً مارپیچ و با اتساع ابتدایی و با

1. *Cyprinus Carpio*
2. *Carasisius auratus*

طول‌های مختلف می‌باشد. کیسه‌ی شنا در این ماهی‌ها دو بخش قدامی و خلفی دارد که به‌وسیله‌ی یک مجرای تنگ دائماً به روده‌ی باریک متصل است، کیسه‌ی شنا توسط دستگاه وبر به گوش داخلی متصل است و در شناور نگه‌داشتن ماهی در آب و تولید و شنیدن صدا نقش دارد (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷؛ Nelson، ۲۰۰۶). باله‌های فرد و زوج وجود دارد که باله‌های فرد شامل پشتی، دمی و مخرجی و باله‌های زوج شامل شکمی و سینه‌ای می‌باشند. کلیه دارای دو بخش قدامی یا اصلی و خلفی یا دفعی هست که در زیر ستون مهره و در سطح شکمی آئورت پشتی قرارگرفته است که در این خانواده از بافت‌های خون‌ساز و رتیکلوآندوتلیال، درون‌ریز و دفعی تشکیل‌شده است (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷). در سیستم قلب و عروقی، قلب در وضعیت قدامی- شکمی بوده و دارای کیسه‌ی پریکارد قرار دارد و تعداد ضربان آن برحسب فعالیت، حرارت و تحریک عصب واگ تغییر می‌کند (شاهسونی و موثقی، ۱۳۸۱). کبد در این ماهیان اندامی نسبتاً بزرگ، متصل به پانکراس و در قدام شکم واقع است و در ذخیره‌ی گلیکوژن، چربی و ویتامین‌ها نقش دارد و سم‌زدایی، تخریب سلول‌های خونی و کنترل شیمیایی خون از کارهای این اندام می‌باشد (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷).

این ماهیان همه‌چیزخوار هستند و از موجودات ریز بستر آب، کرم‌ها، سخت‌پوستان، نوزاد حشرات و حتی فضولات حیوانی و گیاهی، لاشه حیوانات، تخم ماهیان و نوزادان خود تغذیه می‌کنند (فرخ‌فر، ۱۳۸۷؛ معینیان میحه‌ای، ۱۳۷۱).

شرایط محیطی موردنیاز برای رشد ماهیان گرمابی مانند کپور ماهیان شامل دما و pH و قلیائیت و اکسیژن محلول و سختی مناسب می‌باشد؛ در مورد دما، دمای مناسب ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد ولی محدوده‌ی قابل‌تحمل برای آن‌ها ۳۵-۰/۵ درجه می‌باشد (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷).

pH مناسب برای پرورش کپور ماهیان ۹-۶/۵ است؛ تغییرات شدید این فاکتور اثرات مستقیم مثل قرمز شدن پوست و باله‌ها در اثر پاره شدن مویرگ‌های سطحی، عطسه کردن (آبشش را بازکرده و مواد غذایی را خارج می‌کند.)، بی‌قراری ماهی و التهاب و ضایعات پوستی و اثرات غیرمستقیم مانند افزایش سمیت برخی مواد مثل برخی فلزات سنگین موجود در آب را در پی دارد (مخیر، ۱۳۸۹؛ پیغان، ۱۳۸۲).

اکسیژن محلول نیز از مهم‌ترین فاکتورها می‌باشد که به‌صورت میلی‌گرم در لیتر[1] یا قسمت در میلیون[2] و یا درصد بیان می‌شود. اکسیژن محلول قابل‌قبول برای پرورش بیش از ۵ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (پیغان، ۱۳۸۲). از اثرات کاهش اکسیژن تجمع ماهی در سطح آب، سستی، بی‌حالی، عدم اشتها و تلفات با دهان باز و سرپوش آبششی بیرون زده می‌باشد (ستاری، ۱۳۸۷).

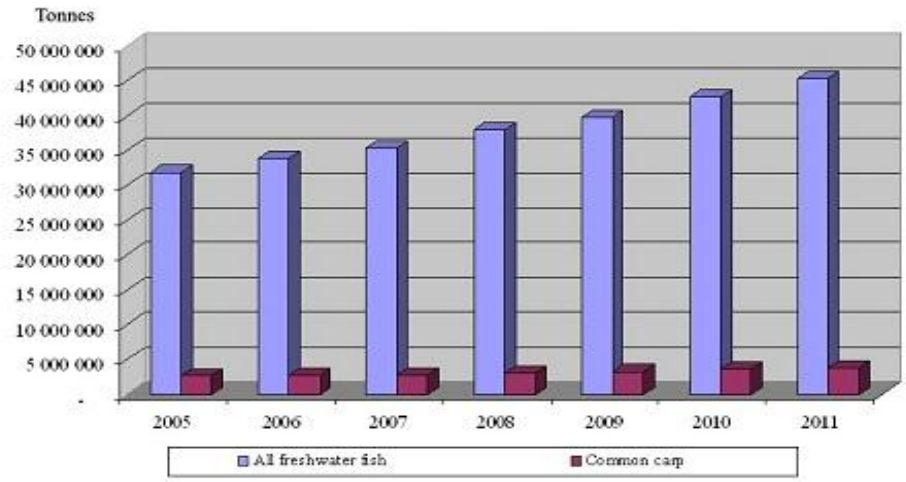
سختی آب بر اساس غلظت کربنات کلسیم آب تعیین می‌شود. پرورش ماهی در محدوده‌ی وسیعی از سختی قابل انجام است (۴۰۰-۱۰ میلی‌گرم در لیتر) اما به‌طورکلی آب سخت ترجیح داده می‌شود چون هرچه آب سخت‌تر باشد، تغییرات pH و احتمال مسمومیت با فلزات سنگین کم‌تر است (پیغان و مشایی، ۱۳۸۷)

الف-۴- ارزش اقتصادی ماهی کپور

تعدادی از کپور ماهیان آسیایی مانند کپور معمولی، کپور علفخوار و کپور نقره‌ای به‌خاطر رشد سریع در استخرها برای رسیدن به‌اندازه بازاری و تغذیه از شیره آلی گیاهان و بی‌مهرگان کوچک جز مهم‌ترین آبزیان برای پرورش در جهان هستند (ستاری، ۱۳۸۲) که ازاین‌بین، ماهی

1. Miligrams per Litre or mg/L
2. Parts Per Milion or ppm

کپور یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی بشمار می‌رود و صید سالانه آن تقریباً ۲۰۰ هزار تن بالغ می‌گردد. پرورش ماهی کپور به علت صرفه اقتصادی و گوشت خوش‌طعم آن در اغلب کشورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (وثوقی و مستجیر، ۱۳۸۵). میزان تولید آن در جهان در سال ۲۰۱۱ به بیش از ۳/۷۰۰ میلیون تن رسید. بیش از نیمی از تولیدات کپور ماهیان متعلق به آسیا بوده است (Fao، ۲۰۱۲) (نمودار ۲-۱).



نمودار ۲-۱- تولید آبزی‌پروری ماهیان آب شیرین و کپور معمولی در دنیا (FAO، ۲۰۱۲)

در اروپا گونه‌های غالب صیدشده از رودخانه‌ها، ماهی سیم و ماهی کلمه می‌باشد، درحالی‌که گونه‌های تجاری کپور معمولی و کاراس ازنظر اقتصادی ارزش بیشتری دارند. کپور ماهیان بخش مهمی از اقتصاد بسیاری از کشورها، مثل کشورهای مرکزی، شرقی و جنوبی اروپا و کشورهای تازه استقلال‌یافته شوروی سابق را تشکیل می‌دهد. تعدادی از کشورها با رهاسازی کپور ماهیان وحشی در منابع آبی، به‌منظور صید ورزشی، سود مناسبی ایجاد نموده‌اند (علیشاهی و پیغان،۱۳۸۹).

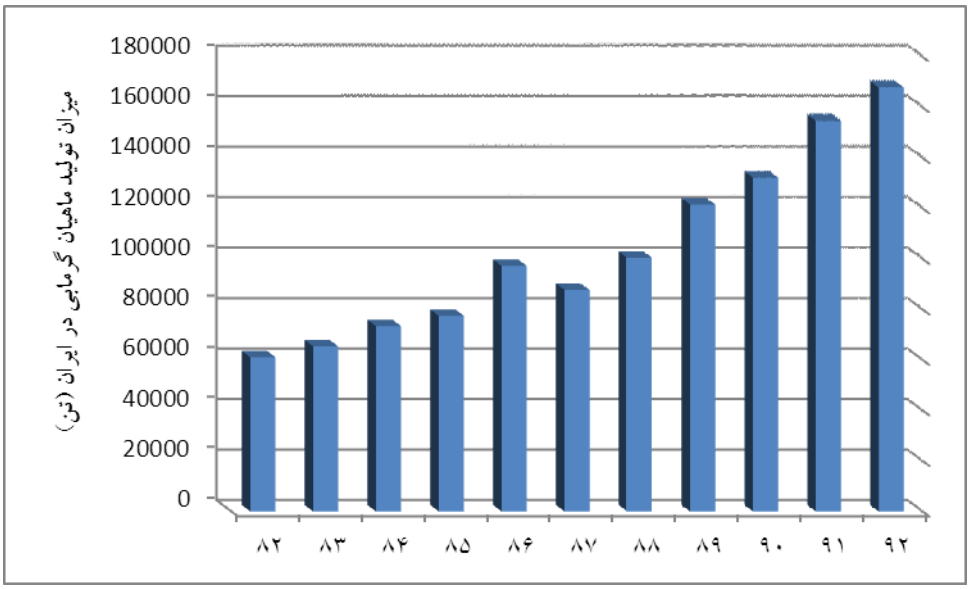
الف-۵- تاریخچه پرورش ماهی در ایران و استان خوزستان

علی‌رغم داشتن بیش از ۲۷۰۰ کیلومتر مرز آبی در شمال و جنوب کشور و وجود منابع آبی فراوان در قسمت‌های مختلف کشور، پرورش آبزیان در ایران تاریخچه‌ای بسیار کوتاه دارد. اگرچه اقداماتی در دهه دوم قرن اخیر برای تکثیر ماهیان خاویاری به‌صورت ابتدایی و توسط کارشناسان روسی انجام‌گرفته است، با وجود این احداث یک کارگاه مستقل تکثیر و پرورش ماهی، به سال ۱۳۴۱ برمی‌گردد. در این سال اولین کارگاه تکثیر و پرورش ماهی ایران در کرج احداث شد. این کارگاه از همان ابتدا، به کار پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخت. اولین کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرم‌آبی (شامل انواع ماهیان کپور، علف خوار، کپور نقره‌ای و کپور سر گنده) در سال ۱۳۵۱ در جنوب رشت تأسیس شد. این کارگاه که متعلق به شرکت سهامی دام‌پروری سفیدرود است، در حال حاضر بزرگ‌ترین واحد تکثیر و پرورش ماهی کشور است و بالغبر ۱۰۰۰ هکتار استخر پرورش ماهی دارد. اولین کارگاه تکثیر و پرورش ماهی وابسته به شیلات که به‌منظور افزایش ذخایر ماهیان خاویاری دریای مازندران احداث شد، کارگاه شهید بهشتی (سد سنگر سابق) است که احداث آن در سال ۱۳۴۸ شروع و در سال ۱۳۵۰ بهره‌برداری از آن آغاز گردید.

در ایران پرورش کپور ماهیان یکی از فعالیت‌های قدیمی و از زیر بخش‌های مهم شیلات ایران است که به‌صورت کشت چندگونه‌ای (پلی کالچر) به‌طور وسیعی در استخرهای پرورش ماهی استان‌های مختلف بخصوص گیلان، مازندران و خوزستان انجام می‌شود. پرورش ماهیان

گرم‌آبی در ایران روی کپور ماهیان چینی بنام‌های کپور معمولی، کپور نقره‌ای[1]، کپور علفخوار[2] و کپور سر گنده[3] متمرکزشده است. اولین پرورش کپور ماهیان در استان گیلان در سال ۱۹۷۹ توسط متخصصین رومانی انجام‌شده است.

تعداد مزارع فعال پرورش ماهیان گرم آبی در کشور در سال ۱۳۸۱ معادل ۳۸۰۲ باب با مساحت مفید ۲۳۲۴۷ هکتار بوده که در سال ۹۲ به ۱۴۶۱۵ باب با مساحت مفید ۴۸۶۹۷ هکتار رسیده و تولید ماهیان گرم آبی از ۵۴۸۰۱ تن در سال ۱۳۸۱ به بیش از ۱۶۷۸۸۳ تن در سال ۱۳۹۲ رسیده است (نمودار ۲-۲) (آمارنامه شیلات ایران، ۱۳۹۲).



نمودار ۲-۲- میزان تولید ماهیان گرم‌آبی ایران

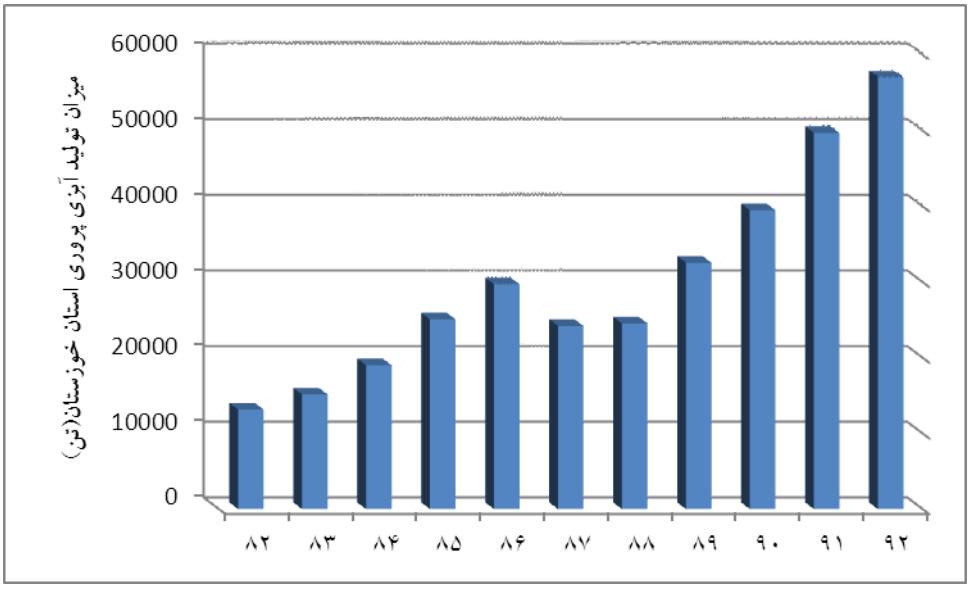
استان خوزستان به دلیل شرایط اقلیمی ازنظر آب‌وهوا و رودخانه‌هایی که در آن جاری می‌باشند و همچنین داشتن اراضی مستعد فراوان جهت پرورش ماهی، یکی از قطب‌های پرورش

1. *Hypophthalmichthys molitrix*
2 .*Ctenophryngodon idella*
3.*Aristichthys nobilis*

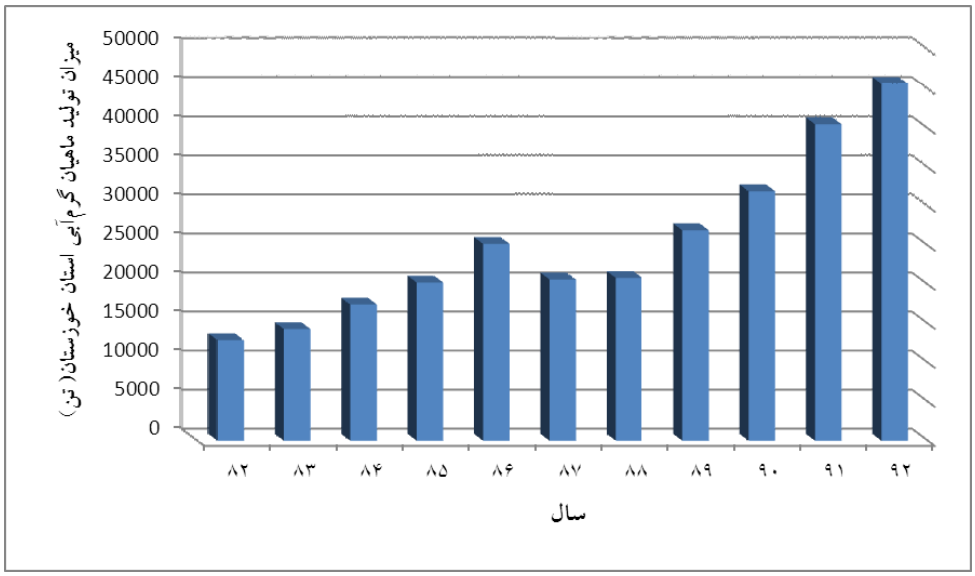
ماهی کشور است که هم شرایط برای پرورش ماهیان سرد آبی در مناطقی از شمال خوزستان و هم پرورش ماهیان گرم‌آبی در همه جای استان وجود دارد.

در این استان بعد از انقلاب اسلامی (سال ۵۹-۵۸) پرورش ماهی به‌صورت رسمی با تأسیس دو شرکت بزرگ پرورش ماهی بنام شرکت ماهی کارون (۴۲۴ هکتار) و شرکت آبزی (۲۰۰ هکتار) آغاز و بچه ماهی موردنیاز آن‌ها با واردکردن لارو از کشور مجارستان تأمین گردید و پس‌ازآن مزارع ماهی یکی پس از دیگری به بهره‌برداری رسید و این روند در ده سال اخیر با احداث سه مجتمع بزرگ پرورش ماهی (فاز اول) در جنوب استان رشد چشمگیری پیداکرده است.

در حال حاضر حدود ۷۲۰ مزرعه فعال با مساحت مفید حدود ۱۲۰۰۰ هکتار در استان خوزستان در حال بهره‌برداری می‌باشد. میزان تولید آبزی‌پروری در استان خوزستان از ۱۳۱۳۸ تن در سال ۱۳۸۲ به ۵۷۰۱۳ تن در سال ۱۳۹۲ رسیده است که، میزان سهم تولید ماهیان گرم‌آبی استان از ۱۲۸۷۵/۸ تن در سال ۱۳۸۲ به ۴۵۶۸۲ تن در سال ۱۳۹۲ افزایش داشته‌است (نمودار ۲-۳ و ۲-۴) (آمارنامه شیلات ایران، ۱۳۹۲).



نمودار ۲-۳- میزان تولید آبزی‌پروری در استان خوزستان



نمودار ۲-۴- میزان تولید ماهیان گرم‌آبی در استان خوزستان

الف– ۶- بیماری‌های عفونی کپور ماهیان

بیماری‌های عفونی کپور ماهیان به‌طورکلی از سه دسته بیماری‌های ویروسی، باکتریایی ، قارچی و انگلی تشکیل‌شده است (جدول ۲-۲) (عبدی، ۱۳۹۰).

جدول ۲-۲- بیماری‌های عفونی کپور ماهیان (عبدی، ۱۳۹۰)

بیماری‌های عفونی کپور ماهیان			
عوامل بیماری‌زا و بیماری‌های ویروسی	**عوامل بیماری‌زا و بیماری‌های باکتریایی**	**عوامل بیماری‌زا و بیماری‌های قارچی**	**انگل‌ها**
ویرمی بهاره کپور	فلاووباکترها	ساپرولگنیا	انگل‌های تک یاخته‌ای (رایزوپودا، مژه‌داران، آپی کامپلسکا، میکسوزوآ، میکروسپورا،...)
بیماری خونریزی دهنده کپور علفخوار یا بیماری کاد	آئروموناس و سودوموناس‌ها	برانشیومایسس	ترماتودهای منوژن (داکتیلوژیرویده، ژایروداکتیلیده، پلی‌اوپیستوکوتیلیدا)
آبله ماهی	مایکوباکتریوزیس	–	ترماتودهای دی‌ژن
بیماری‌های ویروسی نوظهور	ادواردزیلا	–	سستودها
عفونت ناشی از کوی هرپس ویروس	پروتئوس رتگری	–	نماتدها
عفونت‌های ناشی از رابدو ویروس‌های غیر SVC	عوامل بیماری‌زای باکتریایی نوظهور	–	آکانتوسفال‌ها
–	–	–	نرم‌تنان
–	–	–	کرم‌های حلقوی(زالو)
–	–	–	سخت‌پوستان

الف- ۶-۱- بیماری‌های باکتریایی

در همه جمعیت‌های جانوری ازجمله آبزیان، موجودات یک اکوسیستم، معمولاً به‌وسیله بیماری‌ها محدود می‌شوند (IBrahem و همکاران، ۲۰۰۸). شیوع بیماری‌ها در اکوسیستم تحت تأثیر فاکتورهای محیطی شامل عوامل عفونی و استرس‌ها قرار می‌گیرد (kautsky و همکاران، ۲۰۰۰). شیوع پاتوژن‌ها، خصوصاً آن‌هایی که با منشأ باکتریایی هستند، از فاکتورهای مهمی هستند که، ماهیان پرورشی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Zorrilla و همکاران، ۲۰۰۳).

ماهی‌ها همیشه در تماس با باکتری‌ها هستند و معمولاً زمانی از پای درمی‌آیند که تحت شرایط استرس‌زا قرار گیرند. فاکتورهای محیطی ممکن است به‌عنوان عوامل استرس‌زا عمل کنند و می‌توانند ماهی را مستعد ابتلا به بیماری‌های باکتریایی کنند (IBrahem و همکاران، ۲۰۰۸). عفونت‌های باکتریایی باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی شده و خسارات اقتصادی شدیدی را به صنعت آبزی‌پروری وارد می‌کند (Austin و Austin، ۲۰۰۷).

باکتری‌ها عامل مرگ‌ومیر و بسیاری از تلفات در ماهی‌های پرورشی و وحشی می‌باشند. بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای ماهی در گروه عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب قرار می‌گیرند. باکتری‌های فرصت‌طلب به دسته‌ای از باکتری‌ها گفته می‌شود که در شرایط عادی به‌صورت همزیست و بخشی از فلور هستند و یا نیازهای خود را از طریق تجزیه مواد آلی غیرزنده (ساپروفیت) تأمین می‌کنند، اما در صورت مهیا شدن شرایط مانند وارد آمدن استرس‌های مختلف محیطی مانند تغییرات شدید دما ، فقر غذایی و یا درگیر شدن موجود زنده با یک عامل بیماری-زای دیگر قادر به ایجاد عفونت می‌باشند. شاخص‌ترین گروه از این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا آئروموناس‌های متحرک و بخصوص *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد (پیغان و مشایی، ۱۳۸۸).

آئروموناس هیدروفیلا یک بیماری‌زای مهم ماهی در سیستم آبزی‌پروری است و تخمین زده می‌شود که سالانه میلیون‌ها دلار ضرر اقتصادی ناشی از این باکتری به سیستم آبزی‌پروری زده می‌شود (Fang و همکاران، ۲۰۰۴).

الف- ۶- ۱- ۱- تاکسونومی و طبقه‌بندی آئروموناس‌ها

تاکسونومی جنس آئروموناس در سال ۱۹۴۳ انجام شد. این نامگذاری در طی سال‌های بعد به‌طور کامل و مستمر دچار تغییر شده است. در ابتدا این جنس به همراه *ویبریو*[1] و *پلزیوموناس*[2] در خانواده‌ی *ویبریوناسه*[3] قرار داشت اما با انجام مطالعات ژنتیکی مشخص گردید که این باکتری‌ها باید در یک خانواده جدیدی به‌نام آئروموناداسه قرار گیرند (Montet و Ray، ۲۰۰۹ –Tomas، ۲۰۱۲– Ghenghesh، ۲۰۰۸).

ابتدا در سال ۱۹۳۶ همه ارگانیسم‌هایی که وابسته به سپتی‌سمی هموراژیک در ماهی بوده و قبلاً درون جنس‌های باسیلوس و سودوموناس و پروتئوس بودند در جنس جدیدی تحت عنوان آئروموناس‌ها قرار گرفتند. سپس در سال ۱۹۶۷ بعداً این جنس را به ۳ گونه *آئروموناس هیدروفیلا*، *آئروموناس پونکتاتا*[4] و *آئروموناس لیکیوفاسینس*[5] تقسیم‌بندی کردند (Cipriano، ۲۰۰۱).

1. *Vibrio*
2. *Plesiomonas*
3. *Vibrionacea*
4. *Aeromonas Punctata*
5. *Aeromonas Liquefaciens*

تا سال ۱۹۸۴ فقط چهار گونه از آئروموناس‌ها شناخته‌شده بودند که شامل: *آئروموناس هیدروفیلا*، *آئروموناس کاویه*[۱]، *آئروموناس سوبریا*[۲] (که گاهی اوقات تحت عنوان *A.veronii* biovar *sobria* نیز نامیده می‌شد) و *آئروموناس سالمونیسیدا*[۳] بودند (Ghenghesh، ۲۰۰۸).

در باکتری‌شناسی عمومی برگی[۴] خانواده آئروموناداسه تنها از یک جنس آئروموناس تشکیل‌شده است و به دو زیرگروه اصلی تقسیم می‌شود:

باکتری‌های غیر متحرک مانند *آئروموناس سالمونیسیدا*.

باکتری‌های متحرک مانند *آئروموناس هیدروفیلا*، *آئروموناس کاویه* و *آئروموناس سوبریا*.

Tomas و همکاران عنوان کردند که بر اساس ویرایش جدید کتاب برگی ۱۷ گونه شامل: *آئروموناس هیدروفیلا*(HG1)، *آئروموناس بستیاروم*[۵] (HG2)، *آئروموناس سالمونیسیدا*(HG3)، *آئروموناس کاویه*(HG4)، *آئروموناس مدیا*[۶] (HG5)، *آئروموناس اکرینوفیلا*[۷] (HG6)، *آئروموناس سوبریا* (HG7)، *آئروموناس ورونی بیووار سوبریا*[۸] (FG7) و *بیووار ورونی*[۹] (HG10)، *آئروموناس جاندیه*[۱۰] (HG9)، *آئروموناس اسکوبرتی*[۱۱] (HG12)، *آئروموناس تروتا*[۱۲] (HG14)، *آئروموناس آلوساکاروفیلا*[۱۳](HG15)، *آئروموناس انچلیا*[۱۴] (HG16)،

1 . *Aeromonas Cavia*
2. *Aeromonas Caviae*
3. *Aeromonas Salmonicida*
4 . Bergey
5. *A. bestiarum*
6. *A. media*
7. *A. eucrenophila*
8. *A. veronii* bv. sobria
9. *A. veronii* bv. *veronii*
10. *A. jandaei*
11. *A. schubertii*
12. *A. trota*
13. *A. allosaccharophila*
14. *A. encheleia*

آئرومونـاس پوپوفی[1] (HG17)، *آئرومونـاس کولیسیکولا*[2]، *آئرومونـاس سیمیاند*[3] و *آئرومونـاس مولوسکروم*[4] درون جنس آئرومونـاس قرارگرفته‌اند (To m´as، ۲۰۱۲).

الف -۶-۱-۲- ویژگی‌های باکتری‌شناسی آئرومونـاس‌ها و *آئرومونـاس هیدروفیلا*

به‌طورکلی اعضای جنس آئرومونـاس فاقد اسپور با اندازه‌ی ۱/۵-۱ در ۳-۱ میکرومتر هستند که در رنگ‌آمیزی به‌صورت باسیل‌های کوتاه گرم منفی با انتهای گرد و به‌صورت تکی، دوتایی و یا زنجیره‌های کوتاه مشاهده می‌شوند. این باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز و اکسیداز مثبت، تولیدکننده‌ی اسید و گاز، احیا کننده نیترات به نیتریت و به عامل مهارکننده‌ی ویبریو[5] O/۱۲۹ مقاوم هستند.

آئرومونـاس‌های متحرک دارای یک تاژک قطبی تکی هستند، البته گاهی اوقات تاژک جانبی نیز در بعضی از گونه‌ها تشکیل می‌شود. این باکتری‌ها در طیف دمایی وسیعی از صفر تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند ولی دمای مناسب برای رشد آن‌ها ۲۲ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد است. همچنین pH مناسب جهت رشد آن‌ها بین ۵/۵ تا ۹ می‌باشد (Kirove و همکاران، ۲۰۰۲؛Mateos و همکاران، ۱۹۹۳؛ سلطانی، ۱۳۸۰؛ سلطانی، ۱۳۷۵؛ Montet و Ray، ۲۰۰۹) کلنی‌های باکتری سفیدرنگ بوده و در دمای آزمایشگاه در طی ۲۴ ساعت رشد می‌نمایند. جهت تفریق این باکتری از سایر باکتری‌ها می‌توان از محیط کشت انتخابی ریملر- شوت[6] استفاده نمود (سلطانی، ۱۳۸۰؛ Montet و Ray، ۲۰۰۹). تشخیص *آئرومونـاس هیدروفیلا* بر اساس شکل کلونی، آزمون‌های

1. *A. popoffii*
2. *A. culicicola*
3. *A. simiaeand*
4. *A. molluscorum*
5. Vibriostate
6. Rimler-Shotts or R-S

بیوشیمیایی، سیستم Api 20E و تشخیص مولکولی است. کلونی‌های *آئروموناس هیدروفیلا* حدود ۲ الی ۳ میلی‌متر قطر دارند و در محیط کشت آگار خون‌دار ظاهر گرد، محدب و صاف دارند. *آئروموناس هیدروفیلا* باکتری گرم منفی کوکو باسیل تا باسیلی با انتهای گرد است که معمولاً به‌صورت تکی یا زنجیره کوتاه دیده می‌شود (AL-Fatlawy و همکاران، ۲۰۱۳).

الف – ۶-۱-۳- پراکندگی و همه‌گیرشناسی آئروموناس‌ها

آئروموناس‌ها و خصوصاً *آئروموناس هیدروفیلا* باکتری‌های همه‌جا حاضر و فرصت‌طلب هستند که با عفونت‌های زخم، گاستروانتریت، سپتی‌سمی و اسهال مسافرتی در انسان‌ها و سپتی‌سمی خونریزی دهنده در ماهی مرتبط است (Yogananth و همکاران، ۲۰۰۹).

آئروموناس هیدروفیلا مسئول تعدادی از بیماری‌ها بوده است که، تحت عنوان سپتی‌سمی آئروموناس‌های متحرک شناخته می‌شوند و می‌تواند گونه‌هایی از قبیل کپور معمولی، گربه‌ماهی، تیلاپیا، مارماهیان و ماهی قرمز را درگیر کند (Esteve و همکاران، ۱۹۹۵ Esteve و همکاران ۱۹۹۳؛ Pobalane و همکاران، ۲۰۱۰؛ Maji و همکاران، ۲۰۰۶).

این ارگانیسم به‌صورت اولیه مربوط به محیط‌های آبزی هستند و در آب‌های شیرین مثل رودخانه‌ها، آبشارها، دریاچه‌ها و همچنین در آب‌های لب‌شور و ساحل دریاها نیز دیده می‌شوند. به‌هرحال این باکتری‌ها در آب‌های با شوری بالا و درجه حرارت‌های خیلی بالا فعالیت ندارند (Ghenghesh و همکاران، ۲۰۰۸؛ Janda و همکاران، ۲۰۱۰).

آئروموناس هیدروفیلا و سایر آئروموناس‌های متحرک معمول‌ترین باکتری‌ها در محل زندگی ماهیان آب شیرین هستند و این باکتری‌ها مکرراً باعث بیماری در بین ماهیان می‌شوند (Cipriano، ۲۰۰۱).

اگرچه *آئروموناس*ها به‌طورکلی ازجمله عوامل پاتوژن فرصت‌طلب محسوب می‌شوند اما از میان آن‌ها گونه‌ی *سالمونیسیدا*، بیماری‌زای اولیه و عامل بیماری معروف فورونکلوز[1] در آزادماهیان و گاهی سایر گونه‌ها (به‌صورت غیرتیپیک) است. البته در مورد گونه‌ی اخیر نیز وجود شرایط بد محیطی و استرس باعث تشدید علائم و افزایش تلفات می‌گردد. همچنین گزارش‌هایی از ایجاد بیماری توسط *آئروموناس هیدروفیلا* به‌صورت اولیه هم در دسترس است (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹؛ Santos و همکاران، ۱۹۹۱). آئروموناس‌ها در فلور نرمال ماهی حضور دارند ولی باعث مشکلاتی در ماهیان پرورشی و وحشی می‌شوند (Ibrahem و همکاران، ۲۰۰۸). این باکتری‌ها مسئول مرگ‌ومیر بالا و فساد مواد غذایی و به دنبال آن ضرر اقتصادی شدیدی هستند (karunasagar و همکاران، ۲۰۰۳؛Groff و همکاران، ۲۰۰۰).

فرم شاخص بیماری حاصل از این باکتری را سپتی‌سمی[2] *آئروموناسی* یا طاعون قرمز[3] می‌گویند که نوعی سپتی‌سمی باکتریایی خونریزی‌دهنده می‌باشد. با توجه به گسترش وسیع این باکتری، ماهی‌ها می‌توانند در هر زمان درخطر باشند، اما همه‌گیری حاصل از این باکتری در فصل بهار همراه با افزایش دمای آب و ضعف بدنی ماهی در پی زمستان‌گذرانی بیشتر مشاهده می‌شود. همچنین استرس حاصل از تراکم بالا و حمل‌ونقل را نیز در این میان دخیل دانسته‌اند (پیغان و

1. Furunclosis
2. Septicemia
3. Red Pest

مشایی، ۱۳۸۸). این بیماری معمولاً حالت فصلی دارد و با افزایش دمای آب در فصول بهار و تابستان ظاهر می‌گردد. در بیشتر موارد، وقوع بیماری باوجود یک عامل استرس‌زای مشخص و یا یک عامل اولیه ویروسی همراه است که در این شرایط باکتری بر ماهی غلبه کرده و ایجاد سپتی‌سمی می‌کند. محل تکثیر و فزونی باکتری معمولاً روده ماهی می‌باشد که ازآنجا هجوم باکتری به خون و اندام‌های داخلی صورت می‌گیرد. علاوه بر آن ممکن است تکثیر در ضایعات جلدی و آبشش شروع‌شده و به بافت‌های دیگر هجوم ببرد (پیغان ۱۳۸۲).

در بین عوامل مسبب بیماری‌های باکتریایی، گروه آئروموناس‌های متحرک خصوصاً آئروموناس هیدروفیلا بسیار موردتوجه است. این باکتری یک پاتوژن مهم اولیه ایجادکننده عفونت‌ها در زخم است و یا به‌طور ثانویه بعد از مشکلاتی از قبیل استرس‌های تغییرات دما، دست‌کاری یا کاهش کیفیت آب ایجاد می‌شود. این باکتری باعث سپتی‌سمی هموراژیک به‌طور وسیع در ماهیان آب شیرین و گاهی در ماهیان دریایی می‌شود. همچنین عامل عفونت‌های گوارشی ازجمله گاستروانتریت و سپتی‌سمی در انسان می‌شوند (Salyers و همکاران، ۱۹۹۴؛ Palumbo و همکاران، ۱۹۸۹؛ Inglis و همکاران، ۱۹۹۳؛ Chopra و همکاران، ۱۹۹۹).

الف – ۶-۱-۴- علائم بالینی و آسیب‌شناسی *آئروموناس هیدروفیلا*

اغلب به نظر می‌رسد که بیماری‌زایی *آئروموناس هیدروفیلا* در میزبان‌های دارای استرس دیده می‌شود. شکل اساسی بیماری‌زایی، انتشار گسترده باکتری در خون است که متعاقب آن تولید توکسین می‌کند. نکروز بافت‌ها و سپتی‌سمی هموراژیک باکتریایی متعاقباً ایجاد می‌شود (Jeney و همکاران، ۱۹۹۵).

ماهی‌های بیمار دارای علائم تیرگی پوست، خونریزی‌های سرسوزنی تا بزرگ نامنظم در سطح بدن و پایه‌ی باله‌ها و گاهی زخم‌های جلدی سطحی تا عمیق با اندازه‌های مختلف هستند. همچنین فساد باله دمی، آسیب به چشم به‌صورت اگزوفتالمی، اریترودرماتیت، تجمع مایع در زیر جیب‌های فلسی و برآمدگی فلس‌ها نیز مشاهده می‌گردد. شکم ممکن است برآمده باشد که بیانگر وجود مایع خونابه‌ای سیال در شکم می‌باشد و هنگام شکافتن شکم خارج می‌شود که این، نتیجه یک ادم در محوطه بطنی است و برآمدگی فلس‌ها یک ظاهر برس مانند به ماهی می‌دهد. آبشش‌ها پرخون دیده می‌شوند و زخم‌ها نیز تا ناحیه درم توسعه می‌یابند. در بسیاری از موارد همکاری تک‌یاخته‌ی اپیستیلیس[1] با *آئروموناس هیدروفیلا* باعث تشدید جراحات همه‌گیر پوستی و ایجاد بیماری معروف به جراحات قرمز[2] می‌گردد (علیشاهی و پیغان ۱۳۸۹؛ ستاری، ۱۳۸۷؛Cipriano ، ۲۰۰۱). به‌طورکلی این باکتری، باعث سپتی‌سمی هموراژیک، پوسیدگی باله و زخم‌های جلدی می‌شود (Nayak و همکاران، ۱۹۹۹). به‌طورکلی علائم سپتی‌سمی‌های آئروموناسی شامل تورم بافت‌ها، آب‌آوردگی شکم، زخم‌های قرمز، نکروز، سپتی‌سمی همراه با زخم و خونریزی می‌باشد (Azadو همکاران، ۲۰۰۱).

بیماری معمولاً به‌صورت حاد دیده می‌شود و در صورت عمومی شدن، مرگ در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت رخ می‌دهد. در انواع فرم‌های مزمن بیماری، خوردگی باله‌ها، همچنین زخم‌های پوستی و شنای کند دیده می‌شود. فصل و دمای آب از مهم‌ترین فاکتورهای خطر این بیماری محسوب می‌شود و تلفات در بین ماهیان تحت استرس دمای بالا به میزان ۸۰ درصد به علت

1. Epistylis
2. Red-Sore Disease

عفونت آئروموناسی است. در سیستم پرورش ماهی تلفات وابسته به عفونت *آئروموناس هیدروفیلا* در اواخر فصل بهار و اوایل تابستان افزایش می‌یابد (Noga، ۱۹۹۵؛ Ortega، ۱۹۹۵).

علائم کالبدگشایی این بیماری شامل پرخونی اندام‌های داخلی و خونریزی بر روی اندام‌های احشایی است. خونریزی و قرمز شدن دستگاه گوارش، بزرگ شدن طحال و لکه‌دار شدن کبد از دیگر علائم این بیماری هستند. اندام‌های بدن مانند کلیه و طحال قوام نرم و آبکی پیداکرده و در هنگام برش از آن‌ها مایع خارج می‌شود، به همین دلیل در گذشته، *آئروموناس هیدروفیلا*، *آئروموناس لیکوئیفسینس* نامیده می‌شد. گاهی اوقات روده انتهایی و مخرج از بدن بیرون زده و اغلب متورم، ملتهب و پرخون است. درمجموع روده خالی از غذا و ممکن است پر از مواد موکوسی زردرنگ باشد (پیغان و مشایی، ۱۳۸۸؛ علیشاهی و پیغان ۱۳۸۹).

عفونت‌های عمومی به‌وسیله نکروز منتشر در چندین اندام داخلی و حضور ملانوماکروفاژها (ماکروفاژهای حاوی ملانین) در خون مشخص می‌شود. اندام‌های کبد و کلیه اندام‌های هدف در سپتی‌سمی حاد هستند. کبد رنگ‌پریده یا متمایل به خاکستری و کلیه ترد و شکننده می‌شود (Cipriano، ۲۰۰۱). در بررسی هیستوپاتولوژی، بافت خون‌ساز کلیه و طحال تحلیل رفته و نمای نکروز مشاهده می‌شود. در طحال الیپسوئیدهای طحالی اغلب مرکز فعالیت‌های فاگوسیتوزی ماکروفاژها می‌شوند. به‌علاوه نکروز در قلب، گنادها، پانکراس و ... نیز قابل‌مشاهده است همچنین ممکن است نفوذ لکوسیت‌ها به همراه اتساع سینوس وریدی مرکزی ایجاد شود. ضایعات پوست شامل ادم شدید درم، پرخونی لایه‌ی رتیکولر و نهایتاً اسفنجی شدن اپیدرم و نکروز همراه با خونریزی شدید دیده می‌شود (علیشاهی و پیغان، ۱۳۸۹).

درم و اپیدرم دچار ساییدگی می‌شوند و عضلات زیر آن‌ها دچار نکروز شدید می‌گردند. سلول‌های التهابی معمولاً در ساختار عضلات نکروز شده حضور ندارند ولی اپیدرم مجاور آن دستخوش یک هیپرپلازی شده که نتیجه آن برآمده شدن حاشیه‌ها است در این مرحله عفونت در حال عمومی شدن است و خونریزی‌های سرسوزنی یا پتشی ممکن است در سراسر پریوستوم و ساختار عضلات رخ دهد. در برانش‌ها یک التهاب شدید و افزایش اندازه هسته در سلول‌های اپی‌تلیال برانش دیده می‌شود (Grizzle و Kiryu، ۱۹۹۳).

الف- ۶-۱-۵- بیماری‌زایی و فاکتورهای حدت *آئروموناس هیدروفیلا*

بیماری‌زایی *آئروموناس هیدروفیلا* پیچیده است و چندعاملی[1] است که شامل تعدادی از فاکتورهای حدت می‌باشد (Aslani و همکاران، ۲۰۰۴). حدس زده می‌شود که توانایی *آئروموناس هیدروفیلا* برای ایجاد یک محدوده وسیعی از عفونت‌ها در انسان و حیوان ناشی از کمپلکسی از مکانیسم‌های پاتوژنیک است (Paniagua و همکاران، ۱۹۹۰؛ Vadivelu و همکاران، ۱۹۹۱).

فاکتورهای حدت مختلفی از *آئروموناس هیدروفیلا* در مراحل بیماری‌زایی نقش دارند، ولی فاکتورهای بیماری‌زای اصلی شامل: پلی‌ساکاریدهای سطحی (کپسول، لیپوپلی‌ساکارید و گلوکان)، پروتئین غشا خارجی[2]، لایه S، سیستم متصل شونده به آهن، سیستم ترشحی تیپ ۳[3]، مژه و تاژک، فاکتورهای خارج‌سلولی مانند آنزیم‌ها ازجمله پروتئاز، لیپاز، الاستاز، ژلاتیناز و نوکلئاز و توکسین‌ها می‌باشند. در بین اگزوتوکسین‌ها به نظر می‌رسد که سایتولیتیک انتروتوکسین، همولایزین، آئرولایزین و انتروتوکسین‌های حساس و مقاوم به حرارت نقش مهمی را در

1. Multifactorial
2. OMP
3. T_3SS

بیماری‌زایی ایفا می‌کنند (Kawula و همکاران، ۱۹۹۶؛ Vadivelu و همکاران، ۱۹۹۵؛ Paniagua و همکاران، ۱۹۹۰؛ Ottaviani و همکاران، ۲۰۱۱؛ Janda و Abbott، ۲۰۱۰؛ Tom´ as، ۲۰۱۲؛ Montet و Ray، ۲۰۰۹؛ Nam و همکاران، ۲۰۰۷).

همچنین اهمیت توانایی چسبیدن باکتری به گلبول‌های قرمز نیز به‌عنوان عامل حدت موردبررسی و اثبات قرارگرفته است و از آن به‌عنوان یکی از نیازهای اولیه‌ی باکتری جهت بیماری‌زایی نیز یادشده است، این چسبندگی می‌تواند به‌واسطه‌ی تاژک قطبی باکتری انجام پذیرد (سلطانی، ۱۳۸۰؛ ستاری، ۱۳۸۷؛ Montet و Ray، ۲۰۰۹). به‌طورکلی ژن‌های حدت *آئرومونا‌س هیدروفیلا* به سه گروه اصلی همولایزین، ایرولایزین، سایتولیتیک انتروتوکسین و سایتوتونیک انتروتوکسین دسته‌بندی می‌شوند (Kingombe و همکاران، ۱۹۹۹). تشخیص فاکتورهای حدت *آئرومونا‌س هیدروفیلا* یک کلید مهم در تشخیص بیماری‌زایی آن است (Yogananth و همکاران، ۲۰۰۹).

دو توکسین همولایتیک شامل همولایزین و ایرولایزین در *آئرومونا‌س هیدروفیلا* مشخص‌شده است. در مقالات متعددی از همولایزین به‌عنوان یک کاندید خوب به‌عنوان مهم‌ترین انتروتوکسین نام‌برده‌اند (Yousrو همکاران، ۲۰۰۷). همچنین Chopra و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که ایرولایزین خاصیت سمیت در تیره‌های سلولی Caco-2 cells را دارد و مسئول اکثر فعالیت‌های سایتوتوکسیکی است. البته باید این موضوع را در نظر گرفت که هر فاکتور حدت، تحت شرایط خاصی اهمیت پیدا می‌کند (yousr و همکاران، ۲۰۰۷). توکسین‌هایی با فعالیت همولیتیک، سایتوتوکسیک و انتروتوکسیک در بسیاری از گونه‌های جنس آئرومونا‌س توضیح داده‌شده است (Chopra و همکاران، ۱۹۹۹).

ژن‌های همولایزین و ایرولایزین از توکسین‌های همولیز کننده هستند و سویه‌های حاد *آئرومونـاس هیدروفیلا* هر دو همولایزین را تولید می‌کنند. ترکیب اثرات این توکسین‌ها باعث همولیز و سمیت سلولی می‌شود. (Wong و همکاران، ۱۹۹۶).

غیرفعال کردن هر یک از این توکسین‌ها (همولایزین و ایرولایزین) به‌تنهایی باعث حذف فعالیت همولیتیک و سیتوتوکسیک جدایه‌های حاد *آئرومونـاس هیدروفیلا* نمی‌شود. این فعالیت‌ها فقط زمانی که هر دو ژن همولایزین و ایرولایزین حذف شوند غیرفعال می‌شوند (Wong و همکاران، ۱۹۹۸).

ایرولایزین یک پروتئین آب‌دوست، حلال و خارج سلولی است که به‌وسیله تعدادی از سویه‌های *آئرومونـاس هیدروفیلا* تولیدشده است. این پروتئین‌ها خواص همولیتیکی و سایتولیتیکی را نشان می‌دهد. ایرولایزین‌ها متصل به رسپتورهای گلیکوپروتئینی خاصی بر روی سطح سلول‌های یوکاریوت هستند. همولایزین‌ها نیز سم‌های خارجی پروتئینی هستند که به‌وسیله باکتری‌ها تولیدشده و فعالیت لیز کننده دارند. (Uma و همکاران، ۲۰۱۰).

بعضی از جدایه‌های *آئرومونـاس هیدروفیلا*، به سلول‌های اپی‌تلیالی هجوم می‌برند و مهم‌ترین فاکتور حدت در ایجاد گاستروانتریت ناشی از این باکتری ژن ایرولایزین است (Chu و همکاران، ۲۰۰۵). اولین مطالعه‌ای که در آن از روش PCR برای ردیابی ژن حدت در *آئرومونـاس هیدروفیلا* استفاده شد در سال ۱۹۸۷ توسط Howard و همکاران انجام شد که حضور توکسین‌های همولیتیک شامل همولایزین و ایرولایزین را در باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* مشخص کرد و این کار توسط Pollared و همکاران در سال ۱۹۹۹ در کانادا کامل گردید. در

تحقیق ایشان، از یک جفت پرایمر طراحی‌شده بر اساس سکانس ژن شناخته‌شده استفاده گردید و توانست یک *آئروموناس هیدروفیلای* همولایتیک مثبت را در بیماران دارای علائم اسهال شناسایی کند و سویه‌های همولیتیک *آئروموناس سوبریا* و غیر همولیتیک جنس آئروموناس و *آئروموناس کاویه* با این پرایمر واکنش ندادند (Kingombe و همکاران، ۱۹۹۹). Yogananth و همکاران در سال ۲۰۰۹ عنوان کردند، چون نقش بیماری‌زایی دو ژن همولایزین و ایرولایزین در بیماری‌زا بودن آئروموناس‌ها قبلاً مشخص‌شده است، روش PCR برای ردیابی این ژن‌ها و به دنبال آن ردیابی *آئروموناس هیدروفیلا*های حاد به‌عنوان مارکرهای ژنتیکی روش بسیار مناسبی است.

توانایی ردیابی ژن‌های حدت آئروموناس‌ها به‌وسیله ردیابی سه گروه از مارکرهای حدت ازجمله ایرولایزین‌ها، همولایزین‌ها و انتروتوکسین‌ها به‌وسیله آزمایش PCR توسط Kingombe و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد. در این مطالعه کاربرد این روش برای تشخیص ژن‌های حدت *آئروموناس هیدروفیلا* به‌عنوان غربالگری سریع آئروموناس‌های حاد مطرح است. ردیابی این ژن‌ها راه مؤثری برای تشخیص و تعیین هویت فاکتورهای حدت *آئروموناس هیدروفیلا* است. نتیجه مناسب کار و صرفه‌جویی در هزینه ارجحیت این روش را بر روش‌های قراردادی تعیین حدت نشان می‌دهد (Kingombe و همکاران، ۱۹۹۹).

به علت پیچیده و کمپلکس بودن بیماری‌زایی آئروموناس‌ها، هیچ‌یک از فاکتورهای حدت به‌تنهایی نمی‌توانند مسئول ایجاد بیماری باشند (Albert و همکاران، ۲۰۰۰).

روش‌های سنتی برای تشخیص خواص حدت در آئروموناس‌ها بر اساس روش‌های بیولوژیک در شرایط درون‌تنی[1] و برون‌تنی[1] و یا با استفاده از تیره‌های سلولی و حیوانات

1. invivo

آزمایشگاهی صورت می‌گیرد (Heuzenroerderو همکاران، ۱۹۹۹). این روش‌ها تنها خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها را آشکار می‌کند، درحالی‌که بیان این فاکتورها در آئروموناس‌ها تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Merino و همکاران، ۱۹۹۸). به‌همین دلیل این روش‌ها در بعضی از موارد در نشان دادن و تعیین کردن میزان بیماری‌زایی دچار مشکل می‌شوند (Ottaviani و همکاران، ۲۰۱۱).

چون تشخیص یک عامل بیماری‌زا نیازمند روش‌های سریع و دقیق جداسازی است، این‌چنین روش‌هایی در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای بالقوه کمک شایانی می‌کند. یک‌راه جالب برای تشخیص مستقیم خاصیت بیماری‌زایی آئروموناس‌های جداشده، استفاده از تعیین حدت به‌وسیله مارکرهای ژنتیکی حدت است (Kingombe و همکاران، ۱۹۹۹).

در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی مختلفی خصوصاً روش PCR برای تشخیص گونه‌های آئروموناس و تشخیص ژن‌های حدت غالب بناشده است (Sen و همکاران، ۲۰۰۵؛ chang و همکاران، ۲۰۰۸).

1. invitro

ب- سیستم ایمنی ماهی

ب-۱- اجزای اصلی تشکیل‌دهنده‌ی سیستم ایمنی

پاسخ ایمنی در حیوانات و ماهی‌ها شامل ایمنی ذاتی، طبیعی یا غیراختصاصی[1] و ایمنی اکتسابی، آداپتیو یا اختصاصی[2] می‌باشد. ایمنی ذاتی شامل دو قسمت دفاع سلولی و دفاع هومورال و ایمنی اکتسابی نیز شامل دو قسمت دفاع سلولی[3] و دفاع هومورال[4] می‌باشد که هر یک در ادامه به‌اختصار توضیح داده خواهند شد (قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰؛ علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۲- بافت‌های دخیل در سیستم ایمنی ماهی

ارگان‌های سیستم لنفاوی به دو صورت وجود دارند: سیستم لنفاوی اولیه[5] و ثانویه[6].

ب-۲-۱- ارگان‌های لنفاوی اولیه

ارگان‌های لنفاوی اولیه، شامل اندام‌های معادل مغزاستخوان و تیموس هستند؛ اندام‌های معادل مغزاستخوان در ماهیان مختلف ارگان‌های مختلفی می‌باشند. در ماهیان استخوانی کلیه، مخصوصاً قسمت جلویی آن بیشتر نقش لنفاوی دارد تا دفعی (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). این قسمت محل تولید، تکامل و بلوغ لنفوسیت‌های B می‌باشد. تیموس اندامی است زوج و در موقعیت پشتی- جانبی فضای آبششی و مجاور حفره‌ی بیرونی آبششی قرارگرفته است و محلی برای تکامل و بلوغ لنفوسیت‌های T می‌باشد (علیشاهی، ۱۳۸۸).

1. Non-specific or Natural
2. Adaptive or Specific
3. Cellular
4. Humoral
5. Primary
6. Secondary

ب-۲-۲- ارگان‌های لنفاوی ثانویه

ارگان‌هایی می‌باشند که تشکیلات ساختاری برای به‌دام انداختن پادگن‌ها، پردازش و عرضه به سلول‌های واکنش‌دهنده به آن‌ها را دارند و شامل طحال، بافت لنفاوی وابسته به روده، سیستم ایمنی مخاطی و برخی اندام‌های لنفاوی اولیه می‌باشند. طحال که در ماهی‌های مختلف اندازه و شکل مختلفی دارد، شامل پولپ‌های سفید و قرمز می‌باشد. بافت لنفاوی طحال، در ماهیان استخوانی حقیقی حاوی لکوسیت مخصوصاً لنفوسیت‌های کوچک، متوسط و بزرگ می‌باشد و اساساً در طحال حالت پراکنده دارد. بافت لنفاوی وابسته به روده در ماهیان استخوانی حقیقی، در طول روده و به‌صورت تجمعات پراکنده‌ای از بافت لنفاوی بوده و معادل پلاک‌های پایر در پستانداران می‌باشد (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶).

ب-۳- سیستم ایمنی غیراختصاصی

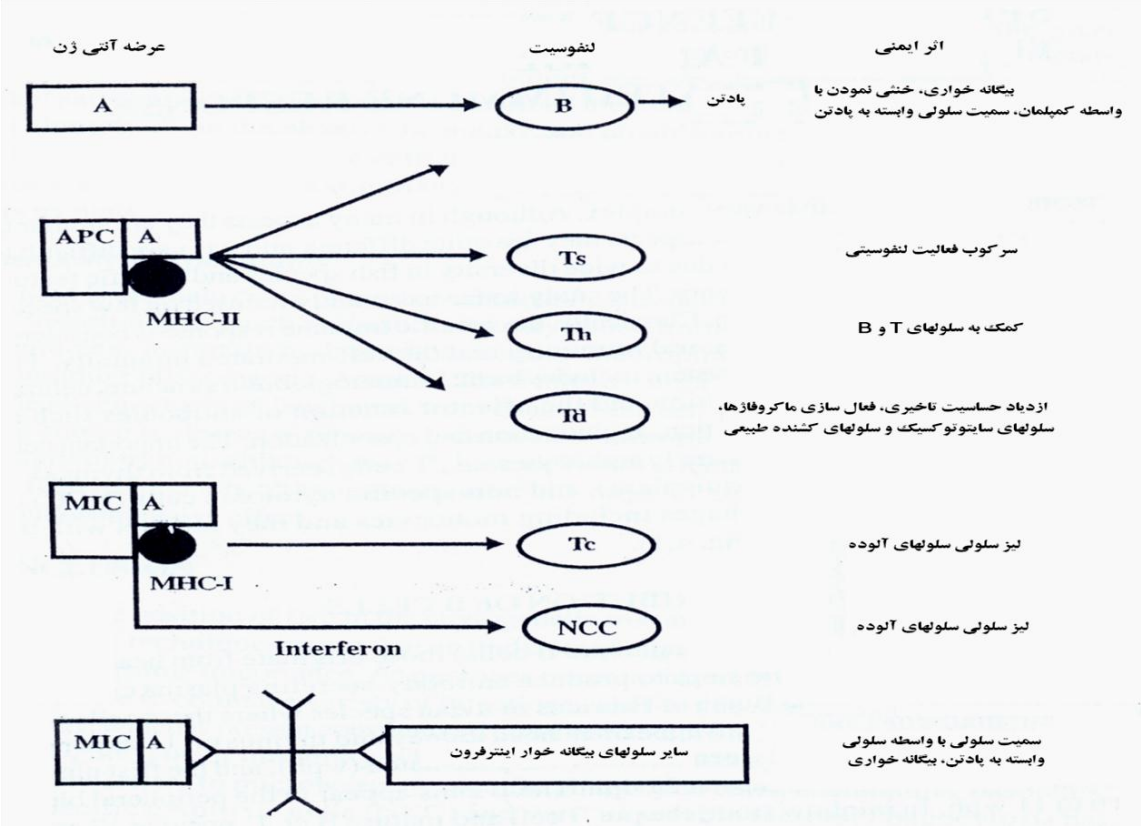
تیپ‌های مختلفی از لکوسیت‌ها در دفاع سلولی غیراختصاصی ماهی‌ها شرکت می‌کنند که شامل مونوسیت/ ماکروفاژ، گرانولوسیت‌ها و سلول‌های سایتوتوکسیک طبیعی[1] (غیراختصاصی) می‌باشند. ماکروفاژها و گرانولوسیت‌ها سلول‌های فاگوسیت‌کننده متحرک در خون و بافت‌های لنفاوی ثانویه هستند و در التهاب خیلی تأثیرگذار می‌باشند. یک ویژگی مهم در همه‌ی اعمال این نوع سیستم، فقدان اختصاصی بودن برخورد و عدم ایجاد ترکیبات خاطره‌ای می‌باشد؛ بنابراین برخورد مجدد با پادگن قبلی پاسخ سریع‌تر و قوی‌تری را سبب نمی‌شود(علیشاهی، ۱۳۸۸).

1. Natural Cytotoxic Cells or NCCs

ب-۴- سیستم ایمنی اختصاصی

سیستم ایمنی اختصاصی دو بازو دارد که شامل ایمنی هومورال[1] و ایمنی باواسطه‌ی سلولی[2] است. موارد مشابه سیستم ایمنی در بین ماهی‌ها شامل ساختمان ابتدایی ایمونوگلوبولین، سلول‌های موردنیاز برای تولید آن‌ها و عملکرد آنتی‌بادی‌ها مثل خنثی‌سازی، تثبیت عناصر مکمل، آگلوتیناسیون و اپسونیزه نمودن[3] (مشهی‌گری) می‌باشد. سلول‌های مهمی که در این پاسخ نقش ایفا می‌نمایند شامل انواعی از لنفوسیت‌های T (مشتق شده از تیموس)، لنفوسیت‌های B (مشتق شده از اندام‌های معادل بورس)، سلول‌های سایتوتوکسیک طبیعی (غیراختصاصی) یا سلول‌های مشابه آن‌ها، ماکروفاژها (و مونوسیت‌ها) می‌باشند. این سلول‌ها با پادگن‌ها و عوامل عفونی واکنش می‌دهند. یک پاسخ اختصاصی مناسب، حاصل ارتباط و همکاری پیچیده‌ای میان این سلول‌ها می-باشد (شکل ۲-۱) (علیشاهی، ۱۳۸۸).

1. Humoral
2. Cell Mediated
3. Opsonization



شکل ۲-۱- ارتباط سلول‌های ایمنی با یکدیگر(علیشاهی، ۱۳۸۸)

ب-۴-۱- دفاع اختصاصی با واسطه‌ی سلولی

در ماهی، سلول‌های T از سلول‌های بنیادی کلیه منشأ گرفته و در تیموس بالغ می‌شوند. در ماهی کپور، سلول‌های T در روز هفتم بعد از تخم‌گشایی در تیموس قابل‌تشخیص هستند. این سلول‌ها در ماهی کپور در بافت‌ها به ترتیب در کلیه، خون، طحال، روده و آبشش‌ها منتشر می-شوند. سلول‌های T به ۴ دسته‌ی یاریگر[1]، سایتوتوکسیک[2]، سرکوب‌کننده‌ی ایمنی[3] و دارای فعالیت ازدیاد حساسیت تأخیری[4] تقسیم می‌شوند (علیشاهی، ۱۳۸۸؛ قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰).

1. Helper
2. Cytotoxic
3. Immunosuppressors
4. Delayed Hypersensitivity

ب-۴-۲- دفاع اختصاصی هومورال

پاسخ هومورال اختصاصی درواقع همان تحریک تولید مولکول‌های پروتئینی سرم می‌باشد که به‌طور اختصاصی در پاسخ به تحریک حاصل از پادگن‌ها[1] ساخته می‌شوند. این مولکول‌های پروتئینی (ایمنوگلوبولین‌ها) که پادتن[2] (مولکول‌های پروتئینی بزرگ که فقط با پادگن خاصی واکنش می‌دهند) نام دارند، درون بدن پیوسته در گردش‌اند و ایمنی هومورال را شکل می‌دهند. پاسخ سلولی در برابر تحریک پادگن‌ها، عبارت است از سلول‌های متعلق به دستگاه رتیکلوآندوتلیال و سلول‌های بیگانه‌خوار که برای پادگن‌ها حالت اختصاصی دارند (ستاری، ۱۳۸۷؛ قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰؛ Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶).

سلول‌های B از سلول‌های بنیادی پیش‌ساز سلول B که از کلیه‌ی قدامی منشأ می‌گیرند، تولید می‌شوند و نقش اصلی را در ایمنی هومورال بر عهده دارند. اولین این نوع سلول در کلیه‌ی قدامی و تیموس ۲ هفته، در طحال ۲-۴ هفته و ۱۱ هفته بعد از تخم‌گشایی در خون ظاهر می‌شوند. بیشترین پراکنش این سلول‌ها در کلیه‌ی قدامی، طحال، خون محیطی، تیموس، آبشش‌ها و روده می‌باشد. پس از برخورد با پادگن، این سلول‌ها، تکثیر شده و به سلول‌های اجرایی یا پلاسماسل و سلول‌های خاطره‌ای تمایز می‌یابند. پلاسماسل‌ها، سلول‌هایی‌اند که پادتن ترشح می‌کنند.

اگر سرم خون الکتروفورز[3] گردد، چهار ناحیه دیده می‌شود که شامل آلبومین، آلفا، بتا و گاما گلوبولین‌ها می‌باشد. گاماگلوبولین‌ها بیشتر پادتن‌ها را شامل می‌شوند و برخی پادتن‌ها هم

1. Antigen
2. Antibody
3. Electrophoresis

جزء آلفا و بتاگلوبولین‌ها می‌باشند؛ به همین خاطر به پادتن ایمنوگلوبولین نیز می‌گویند. ماهی‌ها عموماً یک پادتن چند واحدی با وزن مولکولی بالا (که شبیه IgM پستانداران می‌باشد) را تولید می‌کنند. در ماهیان استخوانی این پادتن ۴ واحدی و در ماهیان غضروفی ۵ واحدی است، البته نوع تک‌واحدی آن نیز در ماهیان غضروفی و استخوانی گزارش‌شده است. ازنظر عملکرد، پادتن‌های ماهی شبیه پادتن‌های پستانداران ولی با میل پیوندی کمتر است. در برخورد ثانویه، ماهیان نیز مانند پستانداران در صورت درگیری این نوع ایمنی با همان پادگن، پاسخی قوی‌تر و سریع‌تر نسبت به برخورد اول را در پی دارد که وجود سلول‌های خاطره‌ای را تأیید می‌کند (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۵- آشنایی با پادگن‌ها و واکنش بدن در مقابل آن‌ها

به هر مولکولی که باعث تحریک پاسخ ایمنی در میزبان گردیده و به‌طور اختصاصی با پادتن‌ها یا سلول‌های T تولیدشده در برابر آن مولکول واکنش دهد، پادگن اطلاق می‌گردد. به عبارت ساده‌تر وقتی پادگن به بدن میزبان وارد می‌گردد باعث تحریک لنفوسیت‌های T یا B که حاصل واسطه‌های پاسخ ایمنی اختصاصی بوده و حامل اپیتوپ‌های آن پادگن خاص هستند، می‌گردد. هرگاه سلول T فعال گردد، به دنبال تقسیمات متوالی دوتایی، تشکیل کلونی از سلول‌های اجرایی را می‌دهد که مستقیماً با پادگن القاء شده واکنش می‌دهد (ایمنی با واسطه‌ی سلولی). مشابه فرآیند فوق، سلول B نیز پس از فعال شدن، تقسیم‌شده و تشکیل پلاسماسل‌های اختصاصی داده که تولید پادتن می‌کنند. این فرآیند به نام ایمنی هومورال معروف است (علیشاهی، ۱۳۸۸؛ قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰).

در پاسخ ایمنی هومورال ممکن است پادگن مستقیماً سلول‌های B را تحریک کرده و آن‌ها را وادار به سنتز پادتن اختصاصی نماید و یا نیاز به کمک گرفتن از سلول‌های T یاریگر (زیرمجموعه‌ای از لنفوسیت‌های T) داشته باشد. بر این اساس پادگن‌ها به ترتیب به دودسته‌ی مستقل از T و وابسته به T تقسیم‌بندی می‌شوند. به‌عنوان‌مثال پادگن لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌ها جزء گروه مستقل از T و بیشتر پادگن‌های پروتئینی وابسته به T هستند (علیشاهی، ۱۳۸۸؛ قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰).

ب-۵-۱- ویژگی‌های پادگن‌ها

ب-۵-۱-۱- بیگانگی

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های پادگن شدن، میزان بیگانگی آن‌هاست. عموماً مواد بیگانه، به موادی اطلاق می‌شود که جزئی از بدن جانور شناخته نمی‌شوند. معمولاً حیوان در برابر پادگن‌های بدن خود ایجاد پاسخ ایمنی نمی‌نماید، پس سیستم ایمنی میزبان دارای توانایی تشخیص خودی و غیرخودی است. عدم پاسخ و تحمل ایمنی دائمی به پادگن‌های خودی در اثر مواجهه‌ی سلول‌های حساس به پادگن با پادگن‌های میزبان در طول تکامل سیستم ایمنی است (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۵-۱-۲- اندازه‌ی مولکولی

به‌طورکلی مواد با وزن مولکولی بالا پادگن‌های بهتری نسبت به مواد با وزن مولکولی پائین (کم‌تر از ۵ کیلو دالتون) هستند (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۵-۱-۳- پیچیدگی ساختمان شیمیایی

خاصیت پادگنی مواد با افزایش پیچیدگی ساختمان شیمیایی آن‌ها افزایش می‌یابد. این پیچیدگی شامل تنوع واحدهای سازنده و نیز وجود ساختارهای ثانویه در ساختمان سه‌بعدی آنتی-ژن است، به همین دلیل در بین مولکول‌های درشت، پروتئین‌ها پادگن‌های بهتری نسبت به کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۵-۱-۴- شکل مولکولی و تجزیه‌پذیری[1]

سیستم ایمنی بر اساس خصوصیات ساختمان سه‌بعدی و شکل شیمیایی پادگن‌ها نسبت به آن‌ها پاسخ می‌دهد. ازاین‌رو ترکیباتی که شکل ساختمانی ثابتی ندارند، به‌طور ضعیفی توسط سیستم ایمنی شناسایی می‌گردند و درنتیجه پادگن‌های ضعیفی هستند، مانند ژلاتین. همچنین ترکیباتی که در بدن به‌سرعت تجزیه می‌گردند سریعاً از دسترس سیستم ایمنی خارج می‌گردند و ازاین‌رو پادگن‌های ضعیفی می‌باشند. برعکس، موادی که ازنظر متابولیسم خنثی هستند و امکان متابولیزه شدن را ندارند، مثل پلاستیک‌ها، در داخل بدن تجزیه‌پذیر نبوده و لذا امکان پردازش توسط ماکروفاژها برای شروع پاسخ ایمنی را ندارند (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۶- همکاری سلول‌ها

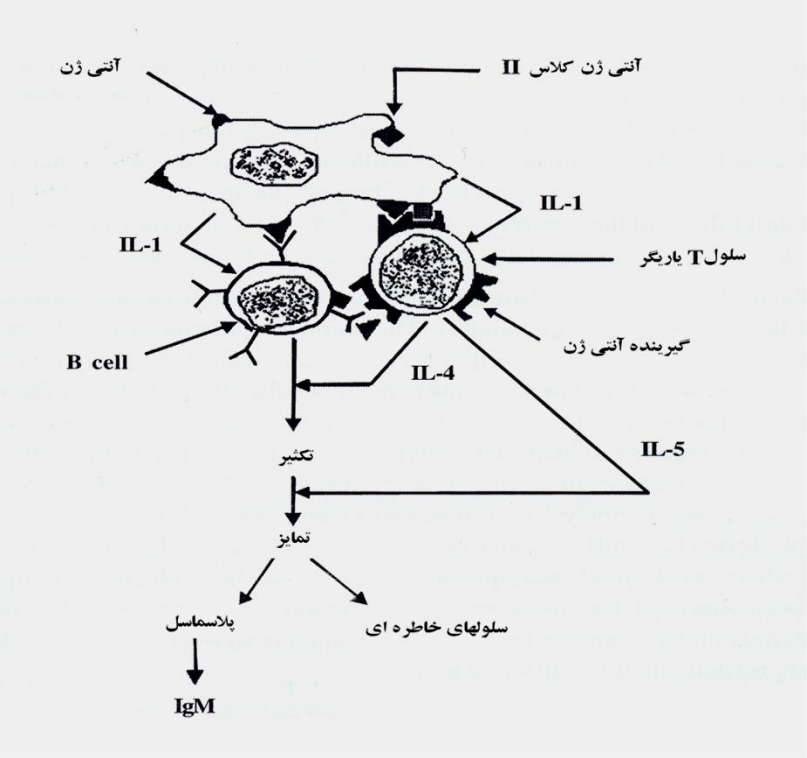
باوجوداین که سلول‌های B به‌تنهایی توانایی پاسخ دادن به برخی پادگن‌های خارجی مثل لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌ها را دارند، در برخی موارد پاسخ سلول‌های B به یک پادگن با تولید پادتن، در شرایط ویژه که مستلزم همکاری سلول‌های مختلف می‌باشد، نیاز دارد. این سلول‌ها

1. Deuradabitity

شامل سلول‌های پردازش‌کننده و ارائه‌کننده‌ی پادگن، مانند ماکروفاژها و سلول‌های T یاریگر که سلول‌های B و فاکتورهای کمک‌کننده را ترشح می‌کنند، می‌باشد (قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰؛ علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۶-۱- عرضه‌ی پادگن

اصلی‌ترین سلول‌های دخیل در این فرآیند، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتی هستند. ماکروفاژها، نه‌تنها پردازش و آماده‌سازی پادگن را به عهده دارند، بلکه ارائه‌ی پادگن‌ها به سلول-های دیگر در شرایط مناسب را نیز انجام می‌دهند. ماکروفاژهای عرضه‌کننده‌ی پادگن، با دارا بودن پروتئینی به نام پادگن MHC نوع II در سطح خود، مشخص می‌گردند. فرآیند پردازش شامل تجزیه‌ی پروتئینی پادگن و تثبیت ذرات خارجی بر روی سطح ماکروفاژ است که از این طریق تا ۱۰ برابر تحریک پاسخ ایمنی را نسبت به پادگن آزاد بیشتر می‌نمایند. ماکروفاژها همچنین دسته‌ای از پروتئین‌ها به نام اینترلوکین-۱ که سلول‌های T یاریگر را فعال می‌نمایند، ترشح می‌کنند. علاوه بر ماکروفاژها سلول‌های B نیز به‌عنوان سلول ارائه‌دهنده‌ی پادگن عمل می‌نمایند (قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰؛ علیشاهی، ۱۳۸۸) (شکل ۲-۲).



شکل ۲-۲- واکنش بین سلول عرضه‌کننده‌ی پادگن، سلول B و سلول T یاریگر که منجر به تشکیل سلول-های تولیدکننده‌ی پادتن می‌گردد (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۷- سلول‌های T

ب-۷-۱- تشکیل و انتشار سلول‌های T

توافق کلی بر این است که در ماهی‌ها سلول‌های T از سلول‌های بنیادی کلیه منشأ گرفته و در تیموس بالغ می‌گردند. به همین دلیل به آن‌ها سلول‌های T گفته می‌شود. در ماهی کپور سلول‌های T در روز هفتم بعد از تخم‌گشایی در تیموس و در روز ۱۶ در کلیه قدامی

قابل‌تشخیص می‌باشند. در بافت‌ها به ترتیب در ماهی کپور ۳۷٪ در کلیه، ۱۵٪ در طحال، ۱۰٪ در روده، ۲۶٪ در خون و ۱۲٪ در آبشش‌ها منتشر می‌شوند (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۷-۲- فعالیت عملیاتی سلول‌های T

همکاری بین ماکروفاژها، سلول‌های T یاریگر و سایتوکسیک، باعث آغاز پاسخ ایمنی با واسطه‌ی سلولی می‌گردد. طی این مراحل شناسایی، ماکروفاژهای ارائه‌دهنده‌ی پادگن اینترلوکین I و سلول‌های T یاریگر، اینترلوکین II آزاد می‌نمایند، درنتیجه‌ی این عمل، سلول‌های T اجرایی فعال شده و جمعیت هر دو نوع سلول خاطره‌ای و اجرایی را افزایش می‌دهند. این سلول‌های اثر-کننده به نام لنفوبلاست[1] نیز نامیده می‌شوند و گلیکوپروتئین‌های متعددی به نام لنفوکین‌ها را ترشح می‌کنند که فعالیت باکتری‌کشی سلول‌های بیگانه‌خوار را افزایش می‌دهد. این سلول‌ها همچنین در واکنش مستقیم سایتوتوکسیک مشارکت می‌نمایند. در مهره‌داران پست‌تر حضور ایمنی با واسطه سلولی با آزمایش‌های انتقال پیوند بافتی از موجودی به موجود دیگر ثابت‌شده است که نتیجه آن رد پیوند توسط سیستم‌های ایمنی گیرنده‌ی پیوند، واکنش پیچیده لکوسیتی، تولید مواد رابط بین سلول‌ها یا همان سایتوکین‌ها[2] و تکثیر سلولی القاشده می‌باشد (علیشاهی، ۱۳۸۸).

1. Lymphoblast
2. Cytokines

ب-۸- سلول‌های B

ب-۸-۱- فعال‌سازی سلول‌های B

به‌محض این‌که مولکول‌های گیرنده‌ی شبیه ایمونوگلوبولینی سطح سلول B با پادگن بیگانه پیوند می‌گردند و گیرنده‌های اینترلوکین آن تحریک‌شده، به‌صورت متوالی تقسیم‌شده و سلول‌های ترشح‌کننده‌ی آنتی‌بادی مثل پلاسماسل و سلول‌های خاطره‌ای را ایجاد می‌کنند.

پلاسماسل‌های تولیدکننده‌ی پادتن ضد یک پادگن خاص، پس از تولید، در سرتاسر بدن منتشر می‌گردند، ولی بیشتر در کلیه‌ی قدامی و طحال تجمع می‌یابند. این سلول‌ها در پستانداران به‌خوبی موردمطالعه قرارگرفته‌اند و توانایی تولید بیش از ۳۰۰ مولکول آنتی‌بادی در ثانیه را دارا می‌باشند. پلاسماسل‌ها معمولاً بعد از ۳ تا ۶ روز ایمونوگلوبولین سرم به‌تدریج کاهش می‌یابد (علیشاهی، ۱۳۸۸).

برخی فاکتورهای مهم، میزان تولید پادتن را کنترل می‌نمایند. این فاکتورها شامل سن میزبان، ماهیت پادگن و نحوه‌ی تجویز پادگن می‌باشد. تولید آنتی‌بادی در برابر پادگن‌های مستقل از تیموس (پادگن‌های ذره‌ای) مقدم بر پادگن‌های وابسته به تیموس (پادگن‌های محلول) می‌باشند. واکسیناسیون به روش غوطه‌ورسازی با سوسپانسیون باکتریایی در سنین بسیار پایین در ماهی قزل‌آلا و ماهی کپور ایجاد پاسخ پادتنی نمی‌نماید ولی همین واکسیناسیون در سن ۴ هفتگی ایجاد آنتی‌بادی مناسبی در ماهی فوق می‌نماید. همچنین واکسیناسیون به روش تزریقی تولید پاسخ آنتی‌بادی بهتری نسبت به روش‌های دیگر می‌نماید (علیشاهی، ۱۳۸۸).

دومین جمعیت سلولی مشتق از سلول‌های B حساس به پادگن که ازنظر ظاهری قابل‌تشخیص از سلول‌های مولدشان نیستند، به نام سلول‌های خاطره‌ای معروف هستند. اگرچه تداوم و بقای این سلول‌های خاطره‌ای در ماهی به‌صورت واضح مطالعه نگردیده است، ولی به‌طورکلی خاطره‌ی ایمنی در ماهی ضعیف‌تر از پستانداران می‌باشد. مواجهه‌ی مجدد سیستم ایمنی با یک ماده‌ی تحریک‌کننده‌ی سیستم ایمنی به دلیل حضور خاطره ایمنی، باعث ایجاد پاسخ ایمنی ثانویه می‌گردد (قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰؛ علیشاهی، ۱۳۸۸).

ب-۹- خلاصه‌ای از اعمال و مکانیسم‌های سیستم ایمنی

بنا بر مطالب ذکرشده، به‌طور خلاصه می‌توان گفت که سیستم ایمنی مهره‌داران آرواره‌دار، ازجمله ماهی به دو قسمت عمده تقسیم می‌گردد: ۱- ایمنی هومورال که مولکول مؤثر آن پادتن-های مشتق از پلاسماسل‌ها هستند. ۲- ایمنی وابسته به سلول که سلول‌های مشتق از تیموس و واسطه‌های آن‌ها در آن نقش ایفا می‌نمایند. لنفوسیت‌ها و گیرنده‌های اختصاصی سطحی آن‌ها نقش کلیدی در ایمنی اختصاصی دارند. هر لنفوسیت B یا T مشخص، دارای گیرنده‌های اختصاصی به اپی‌توپ خاصی است. وقتی‌که پادگن با گیرنده‌های سلول‌های B و T باند می‌شود، این سلول‌ها با تمایز یافتن به لنفوبلاست به پادگن پاسخ می‌دهند. سپس این سلول‌ها با تقسیم سلولی متوالی یک مجموعه سلولی گسترده از کلون خاص را تولید کرده که هدف نهایی آن‌ها حذف اجرام بیماری‌زا و سلول‌های آلوده‌شده‌ی بدن میزبان است. برخی از سلول‌ها به لنفوسیت-های کوچک تبدیل‌شده و اجزای خاطره‌ی ایمنی با طول عمر بالا را تشکیل می‌دهند. (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ج- آشنایی با واکسیناسیون در آبزی‌پروری

ج-۱- واکسیناسیون

بیماری‌های عفونی ماهی که توسط باکتری‌ها ایجاد می‌شود، اگرچه تعداد کمی از باکتری‌ها مسئول تلفات هستند ولی همین تعداد کم هم باعث ضررهای اقتصادی بزرگی در سیستم پرورش متراکم می‌شوند. واکسیناسیون یک بخش مهم در آبزی‌پروری است که امروزه بسیار رو به گسترش می‌باشد (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹). واکسن‌ها در آبزی‌پروری با هدف کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود و برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها که بیماری‌های با منشأ باکتریایی را از بین می‌برند، واکسن‌ها سیستم ایمنی ماهی را برای تولید آنتی‌بادی تحریک می‌کنند و ماهی را در برابر بیماری‌ها محافظت می‌کند (Osman و همکاران، ۲۰۰۹). استراتژی واکسیناسیون بر اساس مواردی شامل: تصمیم برای محافظت در برابر بیماری که می‌خواهیم علیه آن واکسیناسیون انجام دهیم، نوع واکسن، روش واکسیناسیون، زمان واکسیناسیون و احتیاج به تکرار مجدد واکسیناسیون تعیین می‌شود. یک نکته مهم و قابل‌توجه برای توسعه و تجاری کردن یک واکسن این‌است که روش‌های استفاده‌شده برای گونه ماهی مورد هدف مناسب شرایط اکولوژی و اپیدمیولوژی بیماری باشد مثل فصل شیوع بیماری، سایز و اندازه ماهی و منطقه جغرافیایی که بیماری در آن بروز می‌کند. نکته دیگر که باید مدنظر قرار گیرد این است که، در زمان واکسیناسیون سیستم ایمنی ماهی هم ازنظر ظاهری و هم ازنظر عملکردی باید توسعه کامل پیداکرده باشد (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹). امروزه به‌منظور کنترل و پیشگیری از بیماری سپتی‌سمی توجه زیادی روی ساخت واکسن معطوف شده است ولی تاکنون هیچ واکسنی

به‌صورت تجاری در دسترس نیست (Austin و Austin ، ۲۰۰۷). انواع مختلفی از واکسن‌ها اعم از: باکتری کشته کامل، پروتئین غشا خارجی (OMP)، محصولات خارج سلولی (ECP)، لیپوپلی ساکارید (LPS) علیه *آئروموناس هیدروفیلا* برای استفاده در ماهی ساخته شده است (Karunasagar و همکاران، ۱۹۹۷؛ Poobalane و همکاران، ۲۰۱۰؛ Loghothetis و همکاران، ۱۹۹۴).

ج -۱-۱- فاکتورهای اولیه مؤثر بر کارایی واکسیناسیون

ج-۱-۱-۱- نوع فرمولاسیون واکسن

ج-۱-۱-۱-۱- باکترین‌ها

بیشتر واکسن‌های باکتریایی استفاده‌شده در آبزی‌پروری، واکسن‌های غیرفعال شده هستند و چون همه سلول‌های باکتری به همراه محصولات خارج سلولی باهم استفاده می‌شوند نتایج خوبی را به‌دنبال دارد.

ج-۱-۱-۱-۲- واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته

از مزایای این واکسن‌ها تحریک ایمنی سلولی است و از معایب آن ماندگاری عامل بیماری‌زا در ماهی و محیط، برگشت حدت و عدم اطمینان کامل از بی‌خطر بودن آن‌ها می‌باشد.

ج-۱-۱-۱-۳- DNA واکسن‌ها

این واکسن‌ها ایمنی غیراختصاصی مانند تولید آنتی‌بادی، تحریک سلول‌های کمک‌کننده T و سلول‌های سایتوتوکسیک را افزایش می‌دهند.

ج-۱-۱-۱-۴- واکسن‌های پلی والان و مونووالان

ایده‌آل‌ترین فرمولاسیون واکسن، پلی والان است. البته این نکته مهم است که گاهی رقابت آنتی‌ژنی خصوصاً زمانی که واکسن به‌روش تزریقی تجویز می‌شود اتفاق می‌افتد (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹).

ج-۱-۱-۲- روش و استراتژی استفاده از واکسن

به‌طورکلی سه روش برای واکسیناسیون در ماهی وجود دارد:

ج-۱-۱-۲-۱- روش خوراکی

ساده‌ترین روش جهت واکسیناسیون ماهی‌ها در تعداد زیاد، روش خوراکی است. تحقیقات نشان داده‌اند که گلبول‌های سفید ماهی‌ها قادرند مواد لیپیدی و پلی پپتیدی را از لومن دستگاه گوارش بیگانه‌خواری کرده و سپس در سیستم لنفاوی بدن رها نمایند. باکترین‌ها و سایر پادگن‌ها نیز احتمالاً به همین طریق می‌توانند از طریق خوراکی استفاده‌شده و به سیستم ایمنی بدن عرضه شوند. از سال ۱۹۴۲ تاکنون واکسن‌هایی بر ضد عوامل پاتوژن ازجمله *آئروموناس‌ها* و *ویبریو*ها با استفاده از روش خوراکی با موفقیت مورداستفاده قرارگرفته‌اند (ستاری، ۱۳۸۷).

همچنین با استفاده از روش حامل‌سازی می‌توان کارایی این روش را افزایش داد که در آن با پوشاندن پادگن‌ها توسط مواد مختلف (ازجمله مواد لیپیدی) و یا قرار دادن آن‌ها در دستگاه گوارش موجوداتی همچون آرتمیا (نوعی میگوی آب‌شور که استفاده از آن به‌عنوان غذای زنده در پرورش آبزیان رایج است)، پادگن‌ها را از اثر مخرب اسید و آنزیم‌های ترشح‌شده در قسمت‌های ابتدایی دستگاه گوارش حفظ نموده و انتقال پادگن‌ها به روده‌ی تحتانی (محل اصلی تجمع

گلبول‌های سفید در دستگاه گوارش جهت انجام واکنش‌های ایمنی) را بهبود بخشیده‌اند. ایراد اصلی واکسیناسیون به روش خوراکی، درصد بالای خطای آن می‌باشد (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹؛ ستاری، ۱۳۸۷). Esteve و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشخص کردند که تولید آنتی‌بادی بعد از واکسیناسیون خوراکی ابتدا در سطح موکوس و سپس در کلیه و طحال تولید می‌شود. بنابراین لنفوسیت‌های کلیه و طحال مسئول بالا بودن سطح آنتی‌بادی در سرم خون در طی دوره ایمن‌سازی هستند.

از دیدگاه اقتصادی روش خوراکی ایده‌آل‌ترین روش برای واکسیناسیون ماهی است، ولی احتیاج به دوز یادآور یا بوستر دارد (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹).

ج-۱-۱-۲-۲- روش غوطه‌وری در محلول واکسن به‌صورت حمام طولانی‌مدت یا کوتاه‌مدت

شیوه‌ی دیگری از واکسیناسیون مناسب استفاده در سطح وسیع که اولین بار در سال ۱۹۷۶ توصیف شد، غوطه‌وری است. در این روش ماهی‌ها برای مدت‌زمان مشخصی در محلول حاوی پادگن موردنظر قرار داده می‌شوند تا عمل واکسیناسیون انجام گیرد. تاکنون واکسن‌های متنوعی از عوامل بیماری‌زای مختلف توسط این روش مورداستفاده قرارگرفته‌اند. همچنین جهت بهبود راندمان روش غوطه‌وری شیوه‌های مختلفی مانند استفاده از محلول‌های دارای فشار اسمزی بالا (به‌خصوص در گونه‌های دارای قابلیت تحمل شوری بالا مانند آزادماهیان)، حمام در شرایط خلأ و... مورد آزمایش و بررسی قرارگرفته‌اند (ستاری، ۱۳۸۷).

ج-۱-۱-۲-۳- روش تزریقی

درروش تزریقی از انواع روش‌های تزریق ازجمله داخل صفاقی، داخل عضلانی، زیر جلدی و... می‌توان بهره برد. که از بین این روش‌ها روش تزریق داخل صفاقی رایج‌تر است (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹). اگرچه استفاده از روش تزریقی در سطح وسیع با مشکلات اجرایی همچون صید و تزریق تک‌تک ماهی‌ها (و طبیعتاً استرس، صرف وقت و هزینه‌ی بیشتر) همراه است، اما به دلیل رساندن مستقیم و مطمئن مقادیر کافی پادگن به هر ماهی، ازنظر کارایی همواره بر سایر روش‌ها ارجحیت دارد، به همین دلیل در مطالعات و تحقیقات، از این روش بیشتر جهت واکسیناسیون با درصد اطمینان مناسب استفاده می‌شود (ستاری، ۱۳۸۷). محققین عنوان کرده‌اند سطح آنتی‌بادی سرمی در روش تزریق داخل صفاقی بالاتر و سطح آنتی‌بادی موکوس پوست بعد از ایمن‌سازی به‌روش خوراکی در مقایسه با روش داخل صفاقی بالاتر بوده است (Stefaan و همکاران، ۲۰۰۴).

ج-۲- ادجوانت‌ها

از سال‌های گذشته به‌موازات تلاش برای ساخت واکسن علیه بیماری‌های مختلف، استفاده از مواد معروف به ادجوانت (کلمه‌ی Adjuvant از ریشه‌ی لاتین Adjuvare به معنی کمک گرفته‌شده است، بنابراین معادل فارسی آن را کمک واکسن و یا یاور ایمنی ذکر نموده‌اند) در جهت بهبود تأثیر و عملکرد واکسن‌ها موردتوجه و استفاده قرارگرفته‌اند (علیشاهی، ۱۳۸۸). تلاش‌های زیادی برای افزایش تولید آنتی‌بادی و طولانی شدن حضور آنتی‌بادی در خون به‌وسیله حل کردن آنتی‌ژن در ادجوانت‌های مختلف شده است به‌طوری‌که Krantz و همکاران در سال

۱۹۶۳ از روغن‌های معدنی و Collins و همکاران در سال ۱۹۷۶ از ادجوانت ناقص فروند و Badran و همکاران در سال ۱۹۹۰ از ادجوانت ناقص و کامل فروند استفاده کردند (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰). به‌طورکلی محرک‌های سیستم ایمنی، هم به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی و هم به‌عنوان ادجوانت در واکسن، جهت فعال‌سازی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و همچنین تحریک گروهی از لنفوسیت‌های تولیدکننده‌ی آنتی‌بادی اختصاصی برای تولید سیتوکین‌ها، استفاده می‌شوند (Chu و همکاران، ۲۰۰۶).

ج-۲-۱- انواع و دسته‌بندی ادجوانت‌ها

ادجوانت‌های مورداستفاده در موجودات زنده و آبزیان، خود شامل موارد بسیار مختلفی هستند که می‌توانند به‌عنوان ادجوانت در واکسن‌ها به‌کاربرده شوند که به برخی از این مواد اشاره می‌شود.

ج-۲-۱-۱- مواد با منشأ میکروبی و زیست‌شناسی

گونه‌های مختلف باکتری‌ها مانند *مایکوباکتریوم*، *ویبریو*، *کلستریدیوم* و ...، سموم باکتری-ها، ساپونین حاوی کوایل A و ترکیبات محرک ایمنی، همین و هموگلوبین، ویتامین‌های A، C و E، لانولین، کیتین و کیتوزان (پلی ساکارید استخراج‌شده از اسکلت خارجی سخت‌پوستان، حشرات و دیواره‌ی سلولی برخی قارچ‌ها)، پروتئین‌های مختلف استخراج‌شده از منابع مختلف، ترکیبات باکتریایی و مخمری دیگر مانند لیپوپلی‌ساکاریدهای گوناگون، پپتیدوگلیکان و ... (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ج-۲-۱-۲- مواد استحصال‌شده از دستگاه ایمنی

لمفوکین‌ها، سایتوکین‌ها، لاکتوفرین‌ها، هورمون‌های رشد و پرولاکتین و ... .

ج-۲-۱-۳- مواد سنتزی مشابه مواد زیست‌شناختی

پلیمرهای مکمل RNA دورشته‌ای، لایزوزیم دایمر شده، پپتیدهای کوتاه زنجیر و ... .

ج-۲-۱-۴- محصولات شیمیایی

ترکیبات آلومینیوم (هیدروکسید آلومینیوم، سولفات آلومینیوم و فسفات آلومینیوم)، فسفات کلسیم، امولسیون‌های روغنی شامل روغن‌های معدنی و شیمیایی و گیاهی، موم‌های صنعتی، داروهایی مانند لوامیزول و ... (علیشاهی، ۱۳۸۸).

ج-۲-۲- مکانیسم اثر ادجوانت‌ها و چگونگی اثر آن‌ها بر سیستم ایمنی

ادجوانت‌های مختلف با مکانیسم‌های متنوعی باعث یاری‌رساندن به سیستم ایمنی بدن در تولید یک پاسخ مؤثرتر می‌شوند، اما به‌طورکلی، اثرات ادجوانت‌ها را می‌توان به دو دسته اثرات ادجوانت بر پادگن و اثرات ادجوانت بر سیستم ایمنی تقسیم نمود. ادجوانت‌ها می‌توانند با اثر بر روی پادگن و اعمال تغییراتی در ساختار پادگن و شارژ الکتریکی آن باعث بهبود کیفیت پادگن و با کمک به افزایش خاصیت آب‌گریزی واکسن (مانند آنچه که روغن‌ها انجام می‌دهند) یا ایفا نمودن نقش حامل، عرضه‌ی پادگن به سیستم ایمنی بدن را بهتر نمایند. این اثرات همگی در سطح پادگن محسوب می‌شوند، اما اثرات ادجوانت بر سیستم ایمنی میزبان نیز شامل مواردی مانند تحریک سیستم ایمنی برای مدت بیشتر با آزادسازی و عرضه آهسته پادگن، به دام انداختن لنفوسیت‌ها در موضع حضور پادگن‌ها (درنتیجه افزایش مواجه سلول‌های سیستم ایمنی و پادگن)،

تغییر در غشاء سلول‌ها و تسهیل ایجاد ارتباط میان آن‌ها، محافظت از پادگن در مقابل آنزیم‌های بدن موجود زنده، تحریک مستقیم سلول‌هایی مانند ماکروفاژها به بیگانه‌خواری و فعالیت آنزیمی بیشتر، فعال‌سازی سلول‌های T، کاهش و افزایش مولکول‌های واسط التهابی مانند پروستاگلاندین-ها، اینترلوکین‌ها و ...، افزایش فعالیت سیستم کمپلمان و موارد مشابه می‌باشد (قربانپور و معتمدی، ۱۳۹۰؛ علیشاهی، ۱۳۸۸).

ج- ۲-۳- ادجوانت فروند

ادجوانت فروند از معروف‌ترین و متداول‌ترین ادجوانت‌های مورداستفاده در واکسن‌های آبزیان است (ستاری، ۱۳۸۷؛ علیشاهی، ۱۳۸۸) که به دو فرم مورداستفاده قرار می‌گیرد.

ج – ۲-۳-۱- ادجوانت کامل فروند[1]

به‌عنوان یک ادجوانت با کارایی مناسب و اثبات‌شده در حیوانات مختلف و انسان می‌باشد. ترکیب ادجوانت فروند یک امولسیون آب در چربی شامل روغن پارافین، ترکیبات شبه لانولین و باکتری کشته از گونه‌های مایکوباکتریوم است. این ادجوانت هم از طریق عرضه‌ی آهسته پادگن (با توجه به حضور بخش روغنی) و هم از طریق تحریک اجزای سیستم ایمنی مانند ماکروفاژها و لکوسیت‌های دیگر به‌خصوص افزایش سلول‌های T یاریگر (با توجه به بخش باکتریایی) باعث بهبود پاسخ به واکسن می‌گردد (Freund، ۱۹۵۶). از معایب این ادجوانت اثرات توکسیک، تحریک بافتی، ایجاد درد، گرانولوما و... می‌باشد. حتی اثرات سرطان‌زایی در موش نیز

1. Freund’s Complete Adjuant or FCA

گزارش‌شده‌اند (Byars و Alison، ۱۹۹۰؛ Gupta و همکاران، ۱۹۹۳؛ Petrovsky و Aguilar، ۲۰۰۴؛ Evensen و همکاران، ۲۰۰۵؛ Sivakumar و همکاران، ۲۰۱۱).

ج-۲-۳-۲- ادجوانت ناقص فروند[1]

این ادجوانت نیز از جمله ادجوانت‌های پرکاربرد بوده و تفاوت آن با نوع کامل، فقدان بخش باکتریایی می‌باشد. مزیت نوع ناقص عوارض جانبی کم‌تر در مقایسه با نوع کامل است (هرچند فاقد عوارض نیست)، البته اثر کمک ایمنی نوع ناقص ضعیف‌تر از نوع کامل است (Sivakumar و همکاران، ۲۰۱۱).

جدول ۲-۳- نقش برخی ادجوانت‌ها (محرک‌های ایمنی) در ماهی (علیشاهی، ۱۳۸۸)

ادجوانت	فعالیت
لوامیزول، FK-565، MDP، لیپوپلی ساکارید، ادجوانت کامل فروند، کیتین، کیتوازان، EF-230، پروتئین سویا، PS-K، گلوکان، پپتیدوگلیکان، لنتینان، ویتامین C، لاکتوفرین	افزایش بیگانه‌خواری
گلوکان، شیزوفیلان، ویتامین C	افزایش میزان کمپلمان
ادجوانت ناقص فروند، نمک‌های آلومینوم، FK-565، لیپوپلی‌ساکارید، گلوکان	افزایش تولید پادتن
گلوکان، شیزوفیلان، لوامیزول	افزایش تولید لایزوزیم
ساپونین کوئیل A، گلوکان	افزایش مهاجرت لکوسیت‌ها
لیپوپلی‌ساکارید	افزایش تولید اینترلوکین ۱

1. Freund's Incomplete Adjuant or FIA

ج-۳- وضعیت رایج توسعه واکسیناسیون برای جلوگیری از بیماری‌های باکتریایی

بیماری‌های باکتریایی که در حال حاضر بر علیه آن‌ها واکسن تهیه شده است شامل:

ویبریوزیز، پاستورلوزیس، فورنکلوزیس، یرسینیوزیس، سپتی‌سمی روده‌ایی گربه‌ماهی، بیماری آب‌های سرد ناشی از *سیتوفاگا سایکروفیلا*[1]، فلکسی باکتریوزیز دریایی[2]، کلومناریس[3]، سودوموئیازیس[4]، استرپتوکوکوزیس[5]، بیماری B.K.D ناشی از *رنی‌باکتریوم سالمونینارم*[6] و مایکوباکتریوزیس[7].

همچنین برای سپتی‌سمی آئروموناس‌های متحرک نیز واکسن تهیه شده است البته اگرچه واکسیناسیون آزمایشی برای جلوگیری از *آئروموناس هیدروفیلا* در گونه‌های مختلف ماهی انجام شده است ولی به علت تفاوت‌های سرولوژی و فنوتیپی در بین آئروموناس‌های متحرک واکسن مناسبی وجود ندارد. به‌طوری‌که محققین تا کنون تقریبا ۱۰۰ سروتایپ در بین آئروموناس‌های متحرک گزارش کرده‌اند (Aoki و همکاران، ۱۹۹۹؛ Newman و همکاران، ۱۹۹۳؛ Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱؛ Janda و همکاران، ۱۹۹۶؛ Shimadaو Kosako، ۱۹۹۱).

1. *Cytophaga Psychrophila*
2. Marin *Flexibacteriosis*
3. *Columnaris*
4. *Pseudomonas*
5. *Streptococcusis*
6. *Renibacterium Salmoninarum*
7. *Mycobacteriosis*

فصل سوم

مواد و روش کار

فصل سوم: مواد و روش کار

الف- مواد و روش کار

الف- ۱- وسایل و مواد مورد نیاز

الف-۱-۱- وسایل مورد استفاده

تجهیزات نگهداری ماهی (مخازن پلاستیکی، آکواریوم‌های شیشه‌ای، دستگاه‌های هواده، فیلتر)، یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد(یخساران، ایران)، فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد (U410، آمریکا)، ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم(AND، ژاپن)، حمام آب‌گرم یا بن ماری (Julabo، آلمان)، ورتکس (اختریان، ایران)، میکروسانتریفوژ (اپندروف، آلمان)، سانتریفوژ یخچال‌دار (Kokusan، ژاپن)، انکوباتور شیکردار(فن‌آزما، ایران)، اتوکلاو (Astell، انگلستان) مایکروویو (LG، کره)، منبع تغذیه و تانک الکتروفورز (Jencons،

آلمان)، دوربین و دستگاه تصویربرداری از ژل (Uvitec، انگلستان)، دستگاه ترموسایکلر (کوربت، استرالیا)، دستگاه سونیکاتور (Bandelin، آلمان)، الایزا ریدر یا خوانشگر الایزا (Dynatech MR5000، هلند)، سمپلر تک در حجم‌های مختلف و سمپلر ۸ کاناله (Brand، آلمان)، وسایل مصرفی آزمایشگاه (پلیت ۹۶ خانه (نانک Nunc، دانمارک) سرنگ، سرسمپلر، لوله‌ی آزمایش، پارافیلم، میکروتیوب، پیپت پاستور، لام، رک سرماساز و...).

الف-۱-۲- مواد مورد استفاده

آب مقطر (داروسازی جابربن حیان، ایران)، آگارز (سیناژن، ایران)، اتانول (مرک، آلمان)، سیف استین (گیبکو، اسکاتلند)، استات سدیم (مرک، آلمان)، اسید استیک گلاسیال (مرک، آلمان)، بروموفنل بلو (مرک، آلمان)، تریس (سیناژن، ایران)، روغن معدنی (سیگما، آمریکا)، کلرید سدیم (مرک، آلمان)، کلرید پتاسیم (مرک، آلمان)، فسفات دی سدیک (مرک، آلمان)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (مرک، آلمان)، گلوکز (مرک، آلمان)، گلیسرین (مرک، آلمان)، EDTA (سیناژن، ایران)، مستر میکس (سیناژن، ایران)، سدیم بی کربنات (مرک، آلمان)، کربنات سدیم (مرک، آلمان)، پودر شیر پس چرخ (مرک، آلمان)، مارکر وزنی DNA (فرمنتاز، لیتوانی)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، دی اتیل پیروکربنات (سیگما، آمریکا)، توئین ۸۰ (مرک، آلمان)، تترامتیل بنزیدین (سیگما، آمریکا)، دی‌متیل‌سولفوکساید (مرک، آلمان)، آب اکسیژنه (مرک، آلمان)، اسید کلریدریک (مرک، آلمان)، کونژوگه ضد ایمونوگلوبولین G خرگوشی (سیگما، آمریکا)، محیط کشت SIM[1] (مرک، آلمان)، سیمون سیترات (مرک، آلمان)، اوره (مرک، آلمان)، TSI[2] (مرک، آلمان)، TSA[3]

1 . Sulfide Indole Motility
2. Triple Suger Iron Agar
3 . Trypticase Soy Agar

(مرک، آلمان)، TSB[1] (مرک، آلمان)، آرژی‌نین دهیدرولاز (مرک، آلمان)، لایزین دکربوکسیلاز (مرک، آلمان)، ارنیتین دکربوکسیلاز (مرک، آلمان)، نیترات (مرک، آلمان)، MR-VP[2] (مرک، آلمان)، TCBS agar[3] (مرک، آلمان)، معرف کواکس (مرک، آلمان)، گلوکز (مرک، آلمان)، سالیسین (مرک، آلمان)، سوربیتول (مرک، آلمان)، سوکروز (مرک، آلمان)، مالتوز (مرک، آلمان)، اینوزیتول (مرک، آلمان)، لاکتوز (مرک، آلمان)، فنل‌رد (مرک، آلمان)، گلیسیرین (مرک، آلمان)، ۲ فنوکسی اتانول.

الف-۲- روش تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده و مواد تشکیل دهنده آن‌ها

الف-۲-۱- روش تهیه بافر بارگذاری برای ژل آگارز

برای تهیه بافر بارگذاری، ۹ میلی‌گرم رنگ بروموفنل بلو به ۶ میلی لیتر گلیسیرین استریل افزوده گردید وحجم نهایی با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. گلیسرین موجود در بافر بارگذاری موجب سنگینی نمونه می‌شود تا در ته چاهک قرار گیرد. حرکت رنگ بروموفنل بلو روی ژل مبین حرکت نمونه می‌باشد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف-۲-۲- روش تهیه بافر TAE[4]

بافر TAE به صورت محلول ذخیره[5] X ۵۰ تهیه شده و دردمای اتاق نگهداری و سپس با غلظت X ۱ مصرف می گردید. بافر ۱X آن محلول ۱ میلی مولار EDTA، ۴۰ میلی مولار تریس و ۲۰ میلی مولار اسید استیک است. برای تهیه محلول ذخیره X ۵۰، ۲۴۲ گرم تریس

1 . Tryptic Soy Broth
2. Methyl Red and Voges-Proskauer
3 . Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar
4 . Tris- Acetate- EDTA
5.Stock solution

(MW=۱۲۱/۱۱۴g/mol) با ۵۷/۱ میلی لیتر اسید استیک (MW=۶۰/۰۵g/mol) و ۱۸/۶ گرم EDTA (MW=۳۷۲/۲۴g/mol) مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف-۲-۳- روش تهیه آب DEPC[1]

به میزان ۰/۱ درصد DEPC به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تزریقی افزوده شد و به خوبی مخلوط گردید، سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم‌خانه‌گذاری شد و در نهایت به منظور غیرفعال کردن DEPC، محلول به‌دست آمده اتوکلاو شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف-۲-۴- روش تهیه PBS[2](1X)

بافر نمکی فسفات (PBS)، محلول ۱۳۷ میلی‌مولار نمک طعام، ۲/۷ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۴/۳ میلی‌مولار فسفات دی سدیک و ۱/۴ میلی‌مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات است. به منظور تهیه‌ی این محلول، ۸ گرم نمک طعام (MW=۵۸/۴۴ g/mol)، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم (MW=۷۴/۵۶ g/mol)، ۴۴/۱ گرم فسفات دی سدیک (MW=۱۴۱/۹۶ g/mol) و ۰/۲۴ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات (MW=۱۳۶/۰۹ g/mol)، به مقداری آب اضافه و حجم نهایی به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف-۲-۵- روش تهیه Skim milk ده درصد برای نگهداری باکتری در فریزر

جهت تهیه این محلول، ۱۰ گرم پودر Skim milk با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد به‌وسیله دستگاه اتوکلاو، استرلیزه گردید.

1 . Diethylpyrocarbonate
2. Phosphate Buffered Saline

الف-۲-۶- روش تهیه بافر پوشاننده[1]

برای تهیه این محلول ۱/۷ گرم کربنات سدیم (Na_2Co_3) و ۲/۸۶ گرم بی‌کربنات سدیم ($NaHCo_3$) در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و پس ار تنظیم pH بر روی ۹/۶ حجم آن به یک لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف-۲-۷- روش تهیه BSA[2] یک درصد در PBS به عنوان مسدود کننده[3]

۱ گرم از پودر BSA در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS به خوبی حل شد تا محلول BSA یک درصد تهیه گردد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف- ۲-۸- روش تهیه محلول PBS- T (PBS به همراه توئین ۲۰)

جهت تهیه این محلول ۰/۵ میلی‌لیتر توئین ۲۰ به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر PBS اضافه گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف ۲ -۹- روش تهیه استوک سوبسترا ترا متیل بنزیدین[4]

مقدار ۱۰ میلی‌گرم پودر TMB به ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) اضافه شد و با ورتکس به‌خوبی حل گردید. سپس دور ظرف حاوی استوک، فویل آلومینیومی پیچیده شد و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

1 . Coating Buffer
2 . Bovine Serum Albomin
3 . Blocking Buffer
4 . Tetra Methyl Benzidine Substrate

الف-۲-۱۰- روش تهیه سوبسترا کروموژن

جهت تهیه سوبسترا کروموژن، ۲۰ میکرولیتر تترا متیل بنزیدین ۱ درصد با ۹۸۰ میکرولیتر استات سدیم ۰/۱ مولار و ۱/۶ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳٪ ترکیب گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف-۲-۱۱- روش تهیه بافر استات سدیم ۰/۱ مولار

برای تهیه این محلول ۸/۲۰۳ گرم از استات سدیم با وزن ملکولی ۸۲/۰۳ در یک لیتر آب مقطر حل شد و pH آن بر روی ۵/۶ تنظیم گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف-۲-۱۲- روش تهیه استوک آب اکسیژنه ۳٪

مقدار ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر با ۱۰ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ (تجاری) مخلوط گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

الف- ۲ – ۱۳- تهیه‌ی ژل ۱/۵ درصد آگارز

مقدار ۰/۷۲ گرم از پودر آگارز وزن شده و در ۴۸ میلی‌لیتر بافر TAE (1X) در یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حل و جوشانده شد. پس از رسیدن دمای ژل به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۲ میکرولیتر از رنگ سیف استین به محلول اضافه و سپس ژل در قالب مخصوص از پیش آماده شده ریخته شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

ب - روش کار

ب -۱- نمونه‌برداری و تهیه ماهی

نمونه‌برداری از مزارع کپور ماهیان واجد تلفات مشکوک به سپتی‌سمی آئروموناسی صورت گرفت. برای این کار در طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ از تعداد ۳۰ کارگاه واجد تلفات ۲۶۰ قطعه ماهی (به تفکیک شامل: ۱۶۷ قطعه کپور معمولی، ۵۰ قطعه کپور نقره‌ای، ۳۹ قطعه کپور علفخوار و ۴ قطعه سرگنده) با متوسط وزن ۴۶۵/۴±۶۷۳ گرم که از این تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی دارای علائم (شامل: ۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه آمور) و ۶۰ قطعه ماهی به ظاهر سالم بودند نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌ها با رعایت شرایط استاندارد و با استفاده از کیسه‌های حمل ماهی و با تعبیه اکسیژن کافی در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شدند.

ب-۲- جداسازی و خالص‌سازی

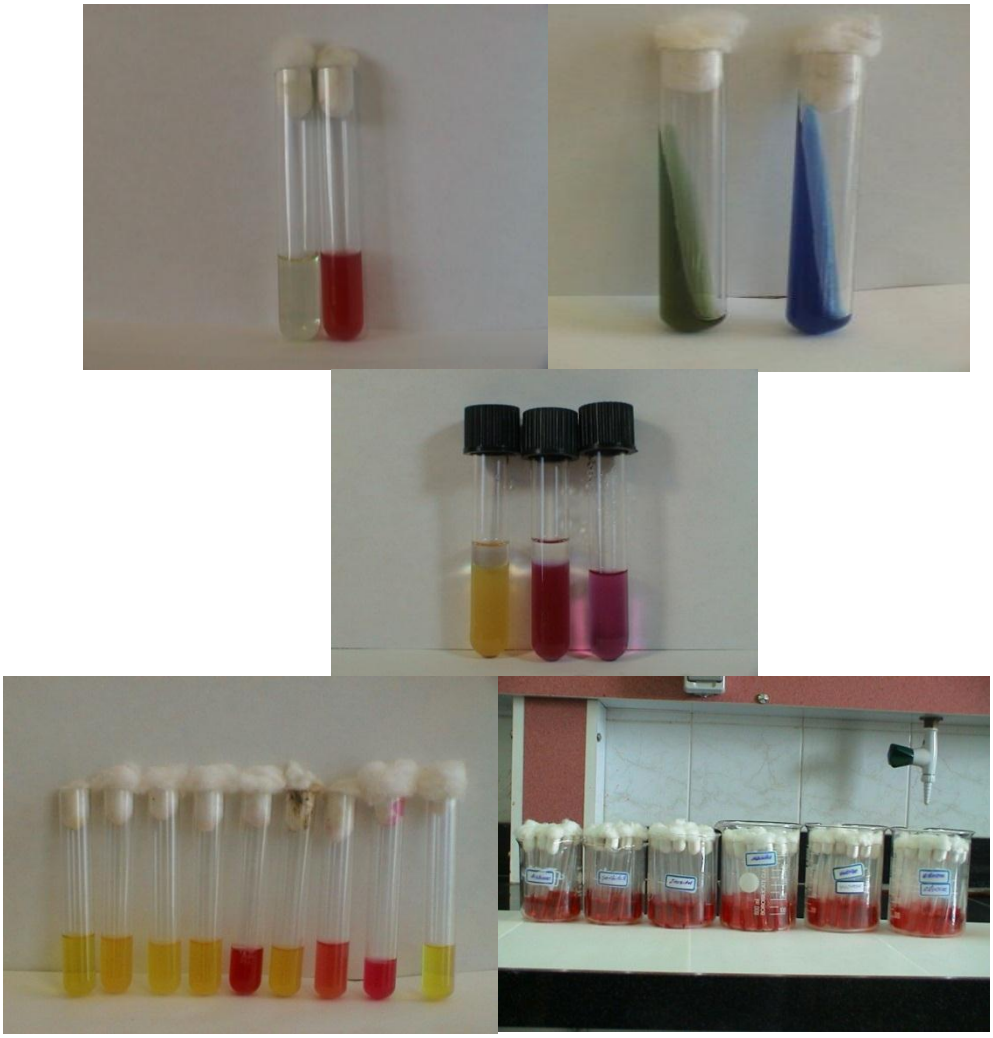
ماهی‌ها با بی‌هوش کننده ۲ فنوکسی اتانول به میزان ppm ۱ (عبدی، ۱۳۸۵) آسان کشی شده، وزن، طول کل آنها اندازه‌گیری شده و علائم بالینی آن‌ها، ثبت گردید. سطح بدن ماهی‌ها به‌وسیله مالیدن پنبه حاوی الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد و سپس با استفاده از یک اسکالپل استریل و در شرایط استریل، در کنار شعله کالبدگشایی صورت گرفت و از اندام‌های داخلی (کلیه، کبد و طحال) و ضایعات جلدی احتمالی نمونه برداری شد.

نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی (TSA) تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری کلونی‌های

مشکوک به آئرومونـاس (کلونی‌های سفید تا خاکستری رنگ محدب و نیمه شفاف با قطر حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر) انتخاب و بر روی محیط TSA جدید خالص‌سازی گردیدند.

ب- ۳- تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های خالص‌سازی شده جهت شناسایی جنس آئرومونـاس و گونه *آئرومونـاس هیدروفیلا* مورد بررسی‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. جدایه‌های گرم منفی که اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند به عنوان مظنون به جنس آئرومونـاس در نظر گرفته شدند و جهت تشخیص دقیق‌تر از آزمایش‌های حرکت، تولید ایندول، مصرف سیترات، تولید اوره‌آز، واکنش در TSI، تحمل نمک، تولید آرژینین دهیدرولاز، تولید لایزین دکربوکسیلاز، تولید اورنیتین دکربوکسیلاز، واکنش در محیط MR-VP، احیای نیترات و تخمیر قندهای گلوکز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، مالتوز، اینوزیتول و لاکتوز (تمامی محیط‌ها مربوط به شرکت مرک آلمان) طبق روش علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸؛ Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱؛Porteen و همکاران، ۲۰۰۶استفاده گردید (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱- آزمون‌های بیوشیمیایی برای تشخیص آئروموناس هیدروفیلا

ب-۴- تشخیص به روش مولکولی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز:

ب-۴-۱ - استخراج DNA از باکتری

برای جداسازی و استخراج DNA باکتری‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد. برای این کار، یک کلونی از باکتری در ۱ میلی‌لیتر محیط آبگوشت TSA تلقیح شده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی در ظرف ضد عفونی ریخته شد و سپس ۱ سی‌سی PBS به رسوب تشکیل شده اضافه شد و مجددا به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. در نهایت پس از تخلیه مایع رویی، ۲۵۰ ماکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب اضافه و سوسپانسیون حاصل در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در نهایت سوسپانسیون در دور ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی در میکروتیوب‌های استریل جهت انجام PCR در دمای ۲۰- سانتی گراد نگهداری شد (Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱؛ Porteen و همکاران، ۲۰۰۶).

ب-۴-۲ - PCR تعیین جنس آئروموناس

جهت تشخیص جنس آئروموناس از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۳-۱) ژن 16s rRNA آئروموناس (Porteen و همکاران، ۲۰۰۶) پس از مورد بلاست قرار دادن، استفاده شد. انجام PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری استریل و فاقد DNAse و در دستگاه ترموسایکلر Corbet (استرالیا) انجام گرفت.

برای این کار، در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۸/۵ میکرولیتر آب DEPS، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید. جهت تکثیر ژن هدف پس از بهینه سازی از برنامه دمایی درج شده در جدول ۳-۲ و ترمال سایکلر Corbet (استرالیا) استفاده شد.

ب- ۴-۳- ارزیابی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز

پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن مورد هدف در نهایت ۸ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی bp ۱۰۰ (فرمنتاس، لیتوانی) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داکیومنت (Uvitec، انگلستان) با نور UV باندهای تشکیل شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند مورد نظر (۵۹۹ bp) جدایه مورد نظر آئروموناس در نظر گرفته می‌شد.

ب – ۴- ۴- PCR تعیین گونه *آئروموناس هیدروفیلا*

جهت تشخیص گونه *آئروموناس هیدروفیلا* از پرایمرهای اختصاصی گونه (جدول ۳-۱) ژن 16s rRNA و ژن لیپاز که به ترتیب توسط Dorsch و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Cascon و همکاران در سال ۱۹۹۶ طراحی شده بودند، استفاده شد. شرایط PCR به جز چرخه‌های دمایی (جدول ۳-۲) و پرایمرهای مورد استفاده، دقیقا مشابه شرایط PCR تشخیص جنس آئروموناس

بود. در این مرحله، در صورت مشاهده باند ۶۸۵ bp برای ژن 16srRNA و ۷۶۳ bp برای ژن لیپاز جدایه مورد نظر *آئروموناس هیدروفیلا* در نظر گرفته می‌شد.

جدول ۳-۱- پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص جنس آئروموناس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا*

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار	منبع
16 S rRNA F	5′-TCA TGG CTC AGA TTG AAC GCT-3′	*Aeromonas sp.*	۵۹۹	Porteen et al, 2006
16 S rRNA R	5′-CGG GGC TTT CAC ATC TAA CTT ATC-3′	*Aeromonas sp.*	۵۹۹	
16 SrRNA F	5′-GAA AGG TTG ATG CCT AAT ACG TA-3′	*A. hydrophila*	۶۸۵	Dorsch et al, 1994
16 SrRNA R	5′-CGT GCT GGC AAC AAA GGA CAG-3′	*A. hydrophila*	۶۸۵	
Lipase F	5′-AAC CTG GTT CCG CTC AAG CCG TTG-3′	*A. hydrophila*	۷۶۳	Cascon et al, 1996
Lipase R	5′-TTG CTC GCC TCG GCC CAG CAG CT-3′	*A. hydrophila*	۷۶۳	

جدول ۳-۲- برنامه دمایی PCR جهت تشخیص جنس آئروموناس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا*

ژن	سیکل‌ها		دما (°C)	زمان	تعداد سیکل‌ها
16S(*Aeromonas* sp.) **16S(*A. hydrophila*)**	واسرشته سازی اولیه		۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		اتصال پرایمرها	۵۵	۳۰ ثانیه	
		تکثیر	۷۲	۴۵ ثانیه	
	تکثیر نهایی		۷۲	۵ دقیقه	۱
Lipase	واسرشته سازی اولیه		۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		اتصال پرایمرها	۶۵	۳۰ ثانیه	
		تکثیر	۷۲	۴۵ ثانیه	
	تکثیر نهایی		۷۲	۵ دقیقه	۱

ب- ۵- ردیابی فاکتورهای حدت

ب-۵- ۱- ردیابی فاکتورهای حدت به روش فنوتیپی

ب-۵-۱-۱- تعیین همولیزβ در جدایه‌ها

تعیین همولیزβ بوسیله کشت جدایه ها بر روی محیط TSA غنی شده با ۵٪ خون گوسفند و ماهی آزمایش شدند. بدین صورت که ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی بر روی پلیت

های غنی شده تلقیح گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. حضور منطقه شفاف اطراف کلونی‌ها نشان دهنده همولیز β در نظر گرفته می‌شد (Wong و همکاران، ۱۹۹۶؛ Castro-Escarpulli و همکاران، ۲۰۰۳)

ب-۵-۱-۲- بررسی فعالیت نوکلئاز

نوکلئازهای خارج‌سلولی (DNAse) با تلقیح ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی بر روی پلیت DNAse agar (Difco) تعیین می‌شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند، سپس اسید کلریدریک خالص بر روی پلیت ریخته و هاله شفاف اطراف کلونی نشان دهنده فعالیت نوکلئازی در نظر گرفته می‌شد (Castro-Escarpulli و همکاران، ۲۰۰۳).

ب-۵-۱-۳- ارزیابی فعالیت پروتئولیتیکی

ارزیابی فعالیت پروتئولیتیکی بر اساس فعالیت کازئیناز و ژلاتیناز مشخص شد. جهت بررسی فعالیت کازئیناز، ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۱۰٪ شیر بدون چربی (Skimmed milk) تلقیح گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. حضور منطقه شفاف اطراف کلونی‌ها نشان دهنده فعالیت کازئیناز در نظر گرفته می‌شد(Castro-Escarpulli و همکاران، ۲۰۰۳).

به منظور تعیین فعالیت ژلاتیناز باکتری، ابتدا ژلاتین آگار ۱۰٪ تهیه شد، سپس هر جدایه به روش کشت خنجری درون لوله‌های جداگانه تلقیح شد. به‌حالت مایع درآمدن محیط پس از ۲۴

ساعت گرمخانه‌گذاری و قرار گرفتن در یخچال نشان دهنده فعالیت ژلاتینازدر نظر گرفته می‌شد (Pandey و همکاران، ۲۰۱۰؛ Gudmundsdo و همکاران، ۱۹۹۶).

ب-۵-۱-۴- توانایی جذب رنگ کونگورد[1]

جذب رنگ کونگورد نیز به‌عنوان یک فاکتور حدت در *آئروموناس هیدروفیلا* مطرح است. توانایی جذب رنگ به وسیله پلیت آگار حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر (µg/ml) از رنگ کونگورد تعیین شد. مقدار ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی بر روی پلیت‌ها تلقیح گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. کلونی‌های نارنجی به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شدند. تفاوت در میزان رنگ به صورت نیمه کمی (+، ++، ...) ثبت گردید (Paniagua و همکاران، ۱۹۹۰).

ب-۵-۲- ردیابی ژن‌های حدت به روش مولکولی

ب-۵-۲-۱- انتخاب پرایمر

پرایمرهای اختصاصی ژن‌های کد کننده همولایزین، ایرولایزین و سایتولیتیک انتروتوکسین به‌ترتیب بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Aslani و همکاران (۲۰۰۴) برای ژن همولایزین، Porteen و همکاران (۲۰۰۶) برای ژن ایرولایزین و Granum و همکاران (۱۹۹۸) برای ژن سایتولیتیک انتروتوکسین انتخاب و پس از مورد بلاست قرار دادن، استفاده گردید (جدول ۳-۳).

1 . Congo Red Uptake

جدول ۳- ۳- پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص ژن‌های حدت

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار	منبع
hlyA F	5′- GGC CGG TGG CCC GAA GAT GCA GG -3′	***Hemolysin***	۵۹۷	Aslani et al., 2004
hlyA R	5′- GGC GGC GCC GGA CGA GAC GGG -3′			
aerA F	5′- GCA GAA CCC ATC TAT CCA G -3′	***Aerolysin***	۲۵۲	Porteen et al., 2006
aerA R	5′- TTT CTC CGG TAA CAG GAT TG -3′			
act F	5′- ATG ACC CAG TCC TGG CAC GG -3′	***Cytolytic enterotoxin***	۴۸۲	Granum et al., 1998
act R	5′- GCC GCT CAG GGC GAA GCC GC -3′			

ب-۵-۲-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

کلیه مراحل PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر استریل و فاقد DNAse و در دستگاه ترموسایکلر مارک Corbet انجام گردید. تکثیر ژن‌ها با PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (که شامل آنزیم Tag، dNTP و $MgCl_2$ است)، ۸/۵ میکرولیتر آب DEPS، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده انجام شد (جدول ۳-۴).

جدول ۳-۴- مواد و مقادیر استفاده شده در برنامه تکثیر ژن های حدت

DNA	۲ µl
مستر میکس	۱۲ µ
پرایمرF(۱۰ pmoL/µl)	۱ µl
پرایمرR(۱۰ pmoL/µl)	۱ µl
آبDEPC	۸/۵ µl
حجم نهایی	۲۵ µl

ب-۵-۲-۳- برنامه حرارتی PCR

PCR برای هر ژن با کمی تغییرات برای رسیدن به شرایط بهینه انجام گردید. این برنامه‌ها به تفکیک برای هر ژن، نشان داده شده‌اند (جدول ۳-۵).

جدول ۳-۵- برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده در PCR بااستفاده از پرایمرهای طراحی شده

ژن	سیکل‌ها	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل‌ها
Hemolysin (*hlyA*)	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
	اتصال پرایمرها	۶۸	۳۰ ثانیه	
	تکثیر	۷۲	۲ دقیقه	
	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱
Aerolysin (*aerA*)	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
	اتصال پرایمرها	۵۵	۳۰ ثانیه	
	تکثیر	۷۲	۳۰ ثانیه	
	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱
Cytolytic enterotoxin (*act*)	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
	اتصال پرایمرها	۵۸	۳۰ ثانیه	
	تکثیر	۷۲	۳۰ ثانیه	
	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

ب-۵-۲-۴- ارزیابی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز

درنهایت ۸ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی bp ۱۰۰ (فرمنتاس) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داکیومنت (Uvitec، انگلستان) با نور UV باندهای تشکیل‌شده مشاهده گردید.

ب-۶- تهیه ماهی جهت تعیین LD_{50}[1] و ایمن‌سازی

تعداد ۴۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۱۲/۴۳ ± ۷۹/۵ گرم از یکی از مزارع پرورش در شمال اهواز خریداری و با استفاده از کپسول اکسیژن و مخازن مخصوص حمل ماهی به پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب اهواز منتقل شد و جهت آزمایشات تعیین LD_{50} و ایمن‌سازی استفاده گردید. ماهی‌ها به‌ظاهر سالم بودند و به مدت دو هفته به‌منظور سازش‌پذیری با شرایط در مخازن بزرگ پلاستیکی نگهداری و تغذیه گردیدند.

ب- ۷- کشت باکتری حاد جهت چالش و اندازه‌گیری LD_{50}

برای این منظور جدایه‌ایی که ازنظر فاکتورهای حدت فنوتیپی و حضور ژن‌های حدت دارای بالاترین فراوانی بود، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TSB کشت داده شد. پس‌ازآن محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله سه بار با سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد و در نهایت سوسپانسیونی از این باکتری با کدورتی بین ۹ و ۱۰ مک فارلند تهیه گردید. این سوسپانسیون به منظور شمارش تعداد

1 . Lethal Dose 50%

باکتری مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون فوق به گونه‌ای رقیق شد که در دستگاه خواننده‌ی الیزا درطول موج ۵۶۰ nm جذب نوری معادل ۱ داشته باشد. از این سوسپانسیون رقت‌های 10^{-6}، 10^{-7} و 10^{-8} تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به سه پلیت آگار خون‌دار منتقل و کشت سفره‌ای داده شد. سپس پلیت‌های کشت داده شده، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از ۴۸ ساعت، تعداد کلونی موجود در هر محیط کشت با دقت و به کمک دستگاه شمارنده کلونی[1] شمارش و ثبت گردید. میانگین تعداد کلونی شمارش شده از هر رقت محاسبه گردید. هنگام چالش نیز از رسوب کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیونی با کدرورت معادل ۱ در طول موج nm ۵۶۰ تهیه گردید و از آن چهار غلظت شامل غلظت‌های 10^{7}، 10^{8}، 10^{9} و 10^{10} واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر با PBS استریل تهیه شد.

ابتدا ماهی‌های هر تیمار به‌وسیله ماده بی‌هوشی ۲ فنوکسی اتانل بی‌هوش شده، سپس از هر رقت از باکتری به ۷ قطعه ماهی کپور به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. به یک گروه از ماهی‌ها نیز به‌عنوان شاهد سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. قبل از تزریق جهت اطمینان از زنده و فعال بودن باکتری‌ها، از هر رقت در محیط TSA کشت داده شد. تلفات هر رقت به مدت دو هفته ثبت و پس از مرگ ماهی‌ها، با کشت اندام‌های داخلی، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی (*آئروموناس هیدروفیلایی*) اطمینان حاصل شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار Probit program مورد بررسی قرار می‌گرفت نهایتاً با استفاده از روش Reed and Muench(1938) و بر اساس فرمول زیر LD_{50} محاسبه گردید (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Pathania و همکاران، ۲۰۰۷؛ علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸) .

1 .Colony counter

$$\text{فاصله مناسب} = \frac{(50\% - (\text{درصد تلفات بالای } 50\%))}{((\text{درصد تلفات زیر } 50\%) - (\text{درصد تلفات بالای } 50\%))}$$

ب- ۸- ایمن‌سازی

ب-۸-۱- تهیه باکترین از جدایه‌ی حاد به‌وسیله UV

جدایه‌ی موردنظر در محیط کشت TSB به مدت یک‌شب (Over night) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری گردید. پس‌ازآن محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب ته لوله سه بار با سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد. پس‌ازاین مراحل، باکتری‌های رسوب یافته با PBS و با استفاده از لوله‌های مک فارلند (McFarland) و اندازه‌گیری میزان جذب نوری سوسپانسیون طوری تنظیم شد که در هر میلی‌لیتر از آن حدود 10^9 CFU/ml باکتری وجود داشته باشد (Osman و همکاران، ۲۰۰۹؛Bailonea و همکاران، ۲۰۱۰؛Peyghan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Sun و همکاران، ۲۰۱۱). سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آن درون پلیت استریل ریخته شد و در زیر لامپ UV زیر هود قرار داده شد و هر ۱۵ دقیقه یک‌بار از سوسپانسیون تحت اشعه UV کشت داده شد تا کوتاه‌ترین زمانی که باعث غیرفعال کردن باکتری شود به دست آید (شکل ۳-۲). بعد از آن مجددا از باکتری کشت تازه داده شد و با شرایط مناسب به‌دست آمده از بالا با UV غیرفعال شد و تا تزریق به ماهی در دمای یخچال نگهداری گردید (Sharif yazdi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Gailunas و همکاران، ۲۰۰۳).

شکل ۳-۲- مراحل تهیه باکترین (الف- سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتری، ب- تهیه سوسپانسیون نهایی از باکتری، ج- کشت باکترین حاصل برای اطمینان از عدم حضور باکتری زنده)

ب- ۸- ۲ – آزمون استریل بودن[1]

این آزمون به‌وسیله کشت باکترین‌های تهیه‌شده قبل از استفاده در ایمن‌سازی بر روی یک محیط جامد آگار دار مانند TSA و یا BHI agar انجام شد. هدف از انجام این آزمون اطمینان از عدم حضور باکتری زنده در باکترین بود (Aly و همکاران، ۲۰۰۰).

ب -۸-۳ – آزمون ایمن بودن[2]

این آزمون مطابق روش اندرسون و همکاران در سال ۱۹۷۰ انجام گردید. برای این کار باکترین تهیه‌شده به‌صورت تلقیح داخل صفاقی به چند ماهی تلقیح شد تا اطمینان حاصل شود که هیچ‌گونه عفونت یا بیماری به‌دنبال تزریق باکتری زنده ایجاد نمی‌شود (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰).

ب-۸-۴- آماده‌سازی و افزودن ادجوانت به واکسن

در مرحله‌ی بعد باکترین با ادجوانت کامل فروند به نسبت ۱:۱ و با استفاده از دوسرنگ متصل به یک دستگاه سه راهی مخلوط شده و کاملاً یکنواخت شد تا خمیر یک‌دست و سفیدرنگی به دست آید (Habeeb و همکاران، ۲۰۰۷) (شکل ۳-۳).

1 . Sterility test
2. Innocuity test

شکل ۳-۳- دستگاه سه‌راهی جهت مخلوط کردن باکترین با ادجوانت

ب – ۹ – تیمار بندی و ایمن‌سازی ماهی‌ها

ب-۹-۱- تیمار بندی ماهی‌ها

برای انجام این مطالعه از ۳۰۰ قطعه بچه ماهی کپور با وزن متوسط ۱۰/۶۵ ± ۸۱/۱۶ گرم استفاده گردید. ماهیان در تانک‌های فایبرگلاس همراه با هواده مناسب و تعویض مرتب آب نگهداری و با پلیت مخصوص بچه ماهی کپور تغذیه شدند؛ و جهت سازگاری با محیط دو هفته قبل از شروع آزمایش نگهداری شدند و ماهی‌ها فاقد علائم بیماری و از نظر ظاهری سالم بودند. تیمار بندی ماهیان مطابق جدول ۳-۶ انجام گرفت. ماهی‌ها به ۴ گروه (تیمار) ۷۵ قطعه‌ای (شامل ۲۵ قطعه ماهی در سه تکرار) مساوی تقسیم‌بندی شدند (شکل ۳-۴).

جدول ۳-۶ - تیمار بندی ماهیان مورد چالش

نام گروه	تزریقات انجام‌شده	تعداد ماهی
تیمار ۱	تزریق PBS	۲۵ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۲	تزریق PBS با ادجوانت کامل فروند	۲۵ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۳	تزریق باکترین	۲۵ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۴	تزریق باکترین با ادجوانت کامل فروند	۲۵ قطعه (در سه تکرار)

شکل ۳-۴- تانک‌های فایبر گلاس ۳۰۰ لیتری جهت نگهداری ماهی‌ها در تیمار بندی

ب-۹-۲- ایمن‌سازی ماهی‌ها

قبل از شروع ایمن‌سازی از هر تکرار ۵ قطعه ماهی جهت اندازه‌گیری پادتن ضد *آئروموناس هیدروفیلا* مورد خون‌گیری قرار گرفتند.

روش ایمن‌سازی برای همه‌ی ماهی‌ها به‌صورت داخل صفاقی[1] بود (Evensen و همکاران، ۲۰۰۵؛ Fang و همکاران، ۲۰۰۴؛ Peyghan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Ibrahem و همکاران، ۲۰۰۸؛ Shome و همکاران، ۱۹۹۹). ماهی‌ها قبل از تزریق با استفاده از ۲ فنوکسی اتانل با دوزی معادل ppm ۰/۴ در ظروف مجهز به هواده بی‌هوش شدند(عبدی، ۱۳۸۵) . سپس با سرنگ انسولینی و به روش داخل صفاقی ایمن شدند (شکل ۳-۵).

شکل ۳-۵ - ایمن‌سازی به روش تزریق داخل صفاقی

1. Intra Peritoneal or IP

ب-۱۰- چالش و نمونه‌گیری

ب-۱۰-۱- چالش

ب-۱۰-۱-۱- تزریق باکترین دارای بالاترین حدت

برای ارزیابی کارایی واکسن کشته مورداستفاده، در روز ۲۸ (چهار هفته بعد از ایمن‌سازی) تعداد ۱۰ قطعه ماهی از هر تکرار با سوسپانسیون زنده جدایه‌ی *آئرومونـاس هیدروفیلای* دارای بیشترین حدت با دوز معادل دو برابر میزان LD_{50} به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردیدند.

ب-۱۰-۱-۲- بررسی حضور باکتری در ماهیان چالش یافته

هر علائمی شامل آب‌آوردگی، زخم و تلفات در گروه‌های واکسینه و غیر واکسینه به مدت ۲ هفته پس از چالش ثبت گردید. جهت تأیید حضور باکتری از ارگان‌های داخلی ماهیان تلف‌شده که دارای علائمی از قبیل آب‌آوردگی و پرخونی بودند، خصوصاً بافت کلیه نمونه‌برداری گردید و بر روی محیط کشت مغذی اولیه تلقیح شد (شکل ۳-۶).

شکل ۳-۶ - نمونه تلف‌شده از چالش

ب-۱۰-۱-۳- تعیین درصد محافظت

میزان محافظت ایجادشده به‌صورت درصد بقا[1] و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Amend و همکاران، ۱۹۸۱).

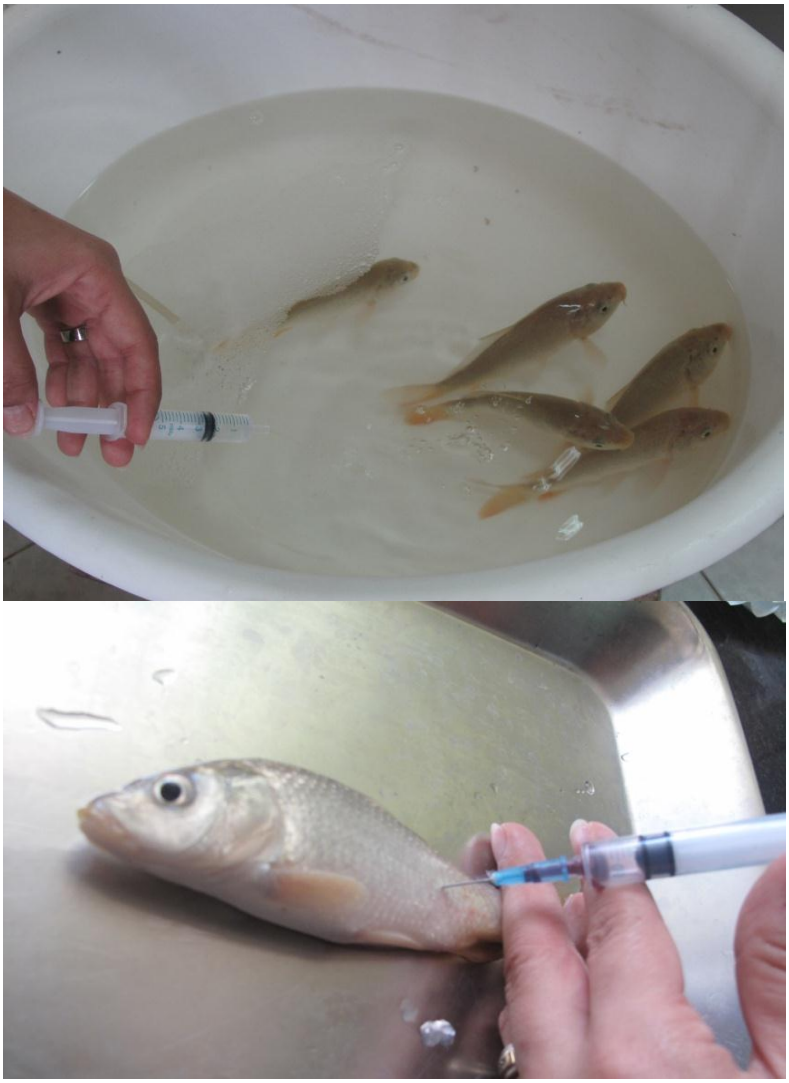
RPS = [1-(% تلفات گروه واکسیناسیون/ % تلفات گروه شاهد)] × 100

ب-۱۰-۲- نمونه‌گیری

از ۱۰ قطعه بچه ماهی باقی‌مانده در هر تکرار ۵ قطعه در روز ۲۸ (۴ هفته) پس از ایمن‌سازی و ۵ قطعه دیگر در روز ۵۶ (۸ هفته) پس از ایمن‌سازی جهت بررسی عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* خون‌گیری شدند. برای این کار ابتدا ماهیان با ماده بی‌هوش کننده ۲ فنوکسی اتانل بی‌هوش شدند و سپس با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتر با سرسوزن شماره ۲۲ از ورید دمی و از محل ساقه دمی اقدام به خون‌گیری گردید. خون گرفته‌شده به‌آرامی در لوله‌های آزمایش استریل بدون ماده ضد انعقاد که قبلاً شماره‌گذاری شده بودند، ریخته شد. لوله‌ها به مدت

1 . Relative Percent Survival(RPS)

۱ ساعت به‌طور مایل در یخچال قرار داده شد و پس از منعقد شدن خون، لخته آن با اپلیکاتور استریل جدا گردید و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا سرم خون به‌خوبی جدا شود. سرم جداشده توسط سمپلر برداشته شد و به میکروتیوب‌هایی که قبلاً شماره‌گذاری شده بودند، منتقل گردید. سرم‌ها تا زمان آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (شکل ۳-۷).



شکل ۳-۷ - مراحل بی‌هوشی(تصویر بالا) و خون‌گیری از ورید ساقه دمی ماهیان (تصویر پائین) .

ب-۱۱- بررسی سطح آنتی‌بادی در تیمارهای مورد آزمایش

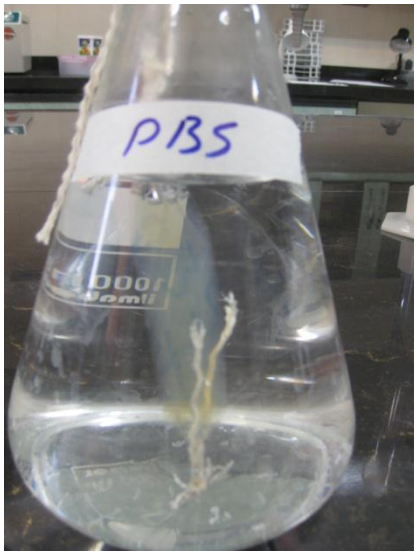
برای بررسی عیار آنتی‌بادی ضد *آئرومونـاس هیدروفیلا* سرم از روش الایزای غیرمستقیم استفاده گردید.

ب-۱۱-۱- خالص‌سازی ایمونوگلوبولین‌های سرم ماهی کپور

سرم چند ماهی کپور جمع‌آوری گردید و هم حجم سرم قطره قطره سولفات آمونیوم اشباع به آن اضافه و همزده شد. مخلوط سرم و سولفات آمونیوم اشباع به مدت یک‌شب در یخچال قرار داده شد تا ایمونوگلوبولین‌ها رسوب کنند. محلول فوق با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب حاصل به‌وسیله PBS به حجم اولیه سرم رسانده شد. محلول به‌دست‌آمده درون کیسه دیالیز فعال‌شده در محلول EDTA بی‌کربنات ریخته شد و به مدت یک‌شب دیالیز گردید. ایمونوگلوبولین‌های به‌دست‌آمده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (شکل ۳-۸، ۳-۹ و ۳-۱۰).

شکل ۳-۸ - اضافه نمودن سولفات آمونیوم اشباع به سرم ماهی

شکل ۳-۹ - ایمونوگلوبولین رسوب کرده پس از اضافه کردن سولفات آمونیوم اشباع.



شکل ۳-۱۰ - دیالیز ایمونوگلوبولین محتوی سولفات آمونیوم در PBS.

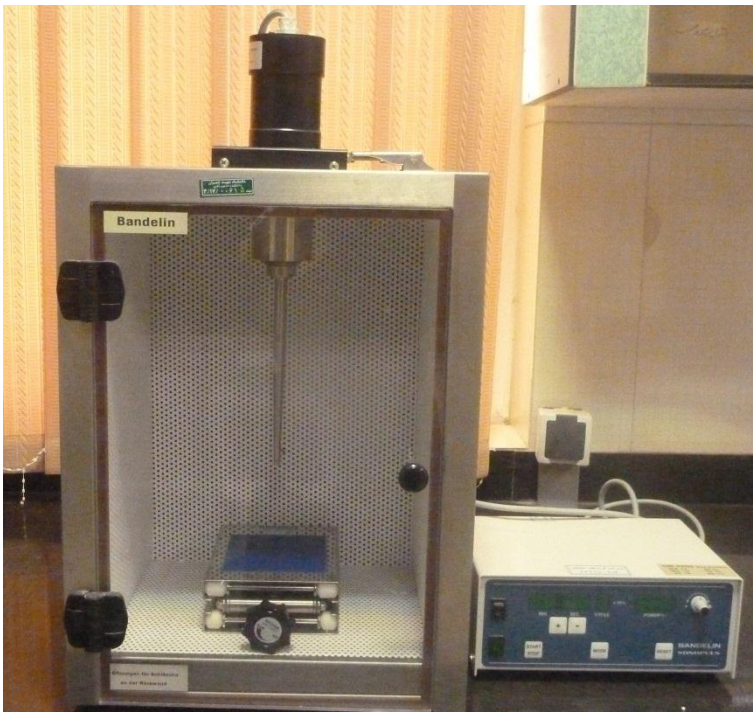
ب-۱۱-۲- تهیه آنتی‌سرم خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین ماهی

مقدار ۱۰ میلی‌گرم از ایمونوگلوبولین‌های به‌دست‌آمده از ماهی در دو نوبت به فاصله‌ی دو هفته ابتدا با ادجوانت کامل فروند و سپس با ادجوانت ناقص فروند به‌صورت عضلانی به دو عدد خرگوش جوان عاری از هرگونه بیماری تزریق گردید. خرگوش‌ها در محلی به‌صورت جداگانه تا زمان خونگیری نگهداری شدند و روزانه با غذای مناسب تغذیه شدند. دو هفته پس از تزریق دوم، از قلب خرگوش‌ها خون‌گیری شد و سرم خون، که حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین ماهی بود، جدا گردید.

ب-۱۱-۳- انجام آزمایش الایزای غیرمستقیم

ب-۱۱-۳-۱- تهیه آنتی‌ژن سونیکه

ابتدا یک کشت شبانه از باکتری در محیط آبگوشت TSB تهیه شد و لوله حاوی محیط کشت سانتریفوژ گردید. رسوب باکتری با PBS سه بار شستشو شد و با لوله‌های استاندارد مک‌فارلند معادل‌سازی گردید. جهت تهیه باکترین این سوسپانسیون تا زمان غیرفعال شدن باکتری‌ها در زیر نور UV قرار داده شد. جهت اطمینان از کشته شدن باکتری‌ها یک کشت بر روی محیط جامد TSA انجام گردید. باکترین حاصله با سونیکاتور سونیکه گردید (شکل ۳-۱۱). بدین‌صورت که ۲۰ پالس ۱۵ ثانیه‌ای با قدرت ۸۰ وات جهت سونیکه کردن به باکتری داده شد. سپس باکترین سونیکه شده سانتریفیوژ گردید و از مایع رویی به‌عنوان آنتی‌ژن سونیکه در الایزا استفاده گردید.



شکل ۳-۱۱- دستگاه سونیکاتور جهت سونیکه کردن باکتری

ب-۱۱-۳-۲- به‌دست آوردن رقت‌های مناسب از آنتی‌ژن، سرم ماهی، سرم خرگوش و کونژوگه در آزمایش الایزا

برای تعیین بهترین رقت آنتی‌ژن برای پوشش دهی، از رقت‌های ۱:۲۰، ۱:۴۰ و ۱:۸۰ از آنتی‌ژن سونیکه استفاده گردید. که رقت ۱:۴۰ به‌عنوان بهترین رقت تشخیص داده شد.

همچنین ۵ رقت ۱:۵۰۰۰، ۱:۸۰۰۰، ۱:۱۰۰۰۰، ۱:۱۲۰۰۰ و ۱:۱۵۰۰۰۰ از کونژوگه ضد ایمونوگلوبولین G خرگوشی مورد ارزیابی قرار گرفتند که رقت ۱:۱۰۰۰۰ مناسب تشخیص داده شد.

در آزمایش الایزا رقت‌های مختلف از سرم ماهی مثبت و منفی با رقت ۱:۲۵، ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ با رقت ثابت کونژوگه مورد آزمایش قرار گرفت که بهترین رقت برای سرم ماهی در مورد آنتی‌ژن سونیکه، رقت ۱:۱۰۰ بود.

جهت بهینه کردن رقت مناسب از سرم خرگوش ضد ایمونوگلوبولین ماهی از رقت‌های ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰ و ۱:۸۰۰ آن استفاده گردید که نتیجه کار نشان داد که رقت ۱:۴۰۰ بهترین رقت است.

برای تعیین بهترین بلوک کننده از شیر خشک چربی گرفته ۵ و ۷/۵ درصد، آلبومین سرم گاوی ۱درصد، سرم موش ۱درصد و سرم جنین گاوی ۱درصد استفاده گردید که در نهایت آلبومین سرم گاوی ۱٪ به‌عنوان بهترین بلوک کننده به‌دست آمد.

ب-۱۱-۳-۳- انجام آزمایش الایزا برای نمونه‌های موردبررسی

ابتدا رقت ۱:۴۰ آنتی‌ژن سونیکه در بافر پوشاننده تهیه و در پلیت ۹۶ خانه‌ایی کوت گردید. بدین منظور در هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن رقیق‌شده به‌وسیله سمپلر ۸ کاناله اضافه گردید. پلیت‌ها با پارافیلم پوشانده شد و درب پلیت بسته شد. پلیت به مدت ۱۸ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (شکل ۳-۱۲).

شکل ۳-۱۲ - مراحل کوت کردن آنتی‌ژن در پلیت الایزا

بعد از گذشت ۱۸ ساعت، محتویات پلیت تخلیه‌شده و ۳ مرتبه با PBS مورد شستشو قرار گرفت.

برای بلوک کردن چاهک‌های پلیت به هر چاهک میزان ۲۵۰ میکرولیتر از بلوک کننده که BSA۱درصد است اضافه شد. پلیت در دمای آزمایشگاه به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. مجدداً محتویات پلیت تخلیه‌شده و سه بار با PBS شستشو گردید.

در مرحله بعدی، سرم‌های شاهد مثبت و منفی و همچنین سرم‌های مورد آزمایش، به نسبت ۱:۱۰۰ با رقیق‌کننده BSA ۱٪ رقیق‌سازی گردید و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرو لیتر سرم رقیق‌شده اضافه گردید. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، محتویات پلیت تخلیه‌شده و ۲ مرتبه با PBS+Tween و ۳ مرتبه با PBS مورد شستشو قرار گرفت.

پس از شستشوی کامل پلیت سرم خرگوش به نسبت ۱:۴۰۰ در BSA ۱٪ رقیق‌شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. بعد از طی زمان انکوباسیون، محتویات پلیت تخلیه‌شده و مانند مرحله قبل ۲ مرتبه با PBS+Tween و ۳ مرتبه با PBS شسته شد.

در این مرحله کونژوگه ضد ایمونوگلوبولین G خرگوشی به میزان ۱:۱۰۰۰۰ در BSA ۱٪ رقیق شد و به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به ۹۶ چاهک پلیت اضافه گردید. در این مرحله نیز پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. پس از یک ساعت، محتویات پلیت تخلیه و مانند مرحله قبل شسته شد.

در مرحله بعد محلول کروموژن – سوبسترا (تترامتیل بنزیدین+ آب‌اکسیژنه) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به تمامی چاهک‌ها اضافه‌شده و واکنش بعد از ۱۵ دقیقه با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال به‌عنوان متوقف کننده، متوقف گردید.

جهت خواندن پلیت الایزا، کف پلیت توسط تامپون و یا پنبه آغشته به الکل تمیز گردید و پلیت با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر مورد قرائت قرار گرفت.

ب-۱۲- آنالیز آماری

آنالیزهای آماری در گروه‌های مختلف مورد مطالعه به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد با ۹۵٪ اطمینان برآورد گردید و اختلاف آماری در بین این گروه‌ها، با استفاده از نرم افزار SPSS version 16 و آزمون مربع کای تجزیه و تحلیل شد.

فصل چهارم

نتایج

فصل چهارم: نتایج

الف- علائم ماهیان بیمار

تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی (شامل ۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه آمور) بیمار دارای علائم بالینی مختلفی همچون خونریزی جلدی، خونریزی و تورم در اندام‌های داخلی، آسیت، اگزوفتالمی، بی‌حالی و بی‌اشتهایی، چسبندگی احشا، رنگ‌پریدگی کبد و بیرون‌زدگی مقعد بودند (شکل ۴-۱)؛ و ۶۰ قطعه بدون علائم و به‌ظاهر سالم بودند.

شکل ۴-۱- علائم ماهیان بیمار مورد مطالعه:

الف- خوردگی باله، ب- خونریزی در زیر فلس‌ها، ج- برآمدگی شکم و تورم مخرج، د- چسبندگی اندام‌های داخلی.

ب- جداسازی و خالص‌سازی باکتری

تعداد ۲۱۳ جدایه‌ی باکتری از اندام‌های نمونه‌برداری شده جدا گردید. کلونی‌های سفید تا خاکستری رنگ محدب و نیمه شفاف با قطر حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر که مشکوک به آئروموناس بودند، انتخاب و ذخیره شدند.

ج- تشخیص جنس آئروموناس

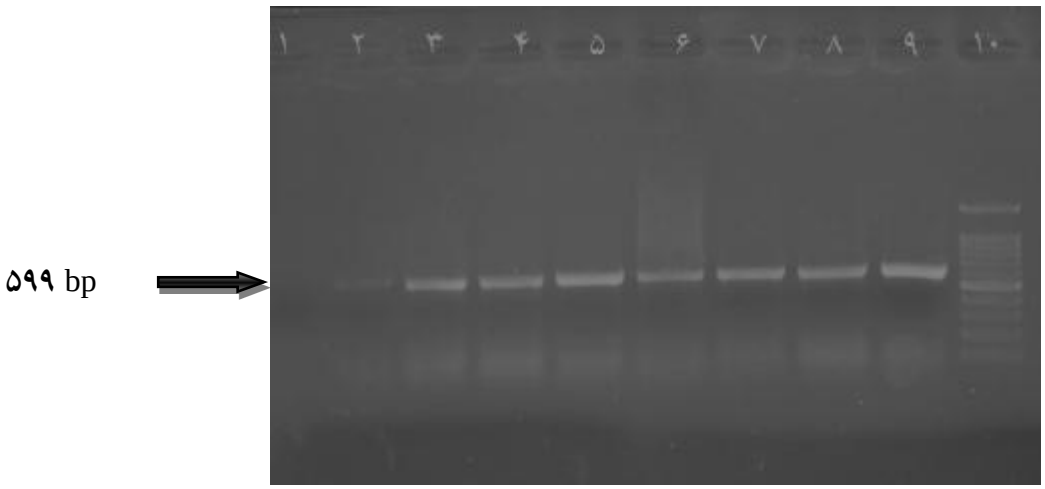
ج- ۱- تشخیص به روش بیوشیمیایی

پس از اطمینان از خالص بودن جدایه‌ها، جهت شناسایی اولیه، اقدام به تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم گردید. آزمون‌های متداول توصیه‌شده توسط سلطانی (۱۳۷۵)، Austin, Austin (۲۰۰۷) و Buller (۲۰۰۴) انجام گردید. در مجموع ۱۷۱ جدایه مظنون به جنس آئروموناس از ۲۰۰ قطعه ماهی دارای علائم، جداسازی شد. که از این ۱۷۱ جدایه تعداد ۹۱ جدایه از کلیه، ۳۹ جدایه از کبد، ۲ جدایه از طحال، ۱۸ جدایه از پوست و ۲۱ جدایه از آبشش بودند. به عبارتی حدود ۷۷/۱۹٪ جدایه‌ها از اندام‌های داخلی و ۲۲/۸۰٪ جدایه‌ها از ضایعات پوستی و آبشش جمع‌آوری شد. ولی از اندام‌های داخلی هیچ‌یک از ۶۰ قطعه ماهی سالم، باکتری مظنون به جنس آئروموناس جدا نشد.

ج-۲- تشخیص به‌وسیلهPCR

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن 16s rRNA آئروموناس (Porteen و همکاران، ۲۰۰۶) سویه‌ی استاندارد منجر به ساخت محصولی به‌اندازه ۵۹۹ جفت باز شد (شکل

۴-۲). این پرایمرها با DNA باکتری‌های غیر آئروموناس (*اشرشیا کلی* و *پاستورلا مولتوسیدا*) واکنش نداشتند. از ۱۷۱ جدایه مظنون به جنس آئروموناس تعداد ۱۲۵ جدایه در آزمایش PCR باند اختصاصی جنس آئروموناس (۵۹۹ bp) را نشان دادند که این معادل ۷۳ درصد از کل نمونه‌های مظنون به جنس آئروموناس و ۶۲/۵ درصد از کل ماهیان دارای علائم بود (جدول ۴-۱).



شکل ۴-۲ – الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی جنس آئروموناس بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸: جدایه‌های متعلق به جنس آئروموناس (واجد باند bp ۵۹۹) ستون ۹: کنترل مثبت و ستون ۱۰: نردبان ژنی bp ۱۰۰ (M).

جدول ۴-۱- تعداد جدایه‌های مظنون و تأیید شده جنس آئروموناس به تفکیک اندام‌های مختلف

تعداد جدایه / اندام / آزمایشات	تعدادکل	کلیه	کبد	طحال	پوست	آبشش
بیوشیمیایی	۱۷۱	۹۱	۳۹	۲	۱۸	۲۱
PCR	۱۲۵	۷۷	۳۰	۲	۱۲	۴

د- تشخیص آئروموناس هیدروفیلا

د-۱- تشخیص به روش بیوشیمیایی

جدایه‌هایی که گرم منفی و اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند به‌عنوان مظنون به جنس آئروموناس در نظر گرفته شدند که همان‌طور که ذکر گردید تعداد ۱۷۱ جدایه بودند. که از این ۱۷۱ جدایه با PCR تعداد ۱۲۵ جدایه به‌عنوان جنس آئروموناس تأیید گردیدند. در این مرحله این ۱۲۵ جدایه مورد آزمون‌های بیوشیمیایی کامل‌تر جهت شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* قرار گرفتند. جهت تشخیص از آزمایش‌های حرکت، تولید ایندول، مصرف سیترات، تولید اوره‌آز، واکنش در TSI، تحمل نمک، تولید آرژینین دهیدرولاز، تولید لایزین دکربوکسیلاز، تولید اورنیتین دکربوکسیلاز، واکنش در محیط MR-VP، احیای نیترات، آزمون حساسیت به نوبیوسین و تخمیر قندهای گلوکز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، مالتوز، اینوزیتول و لاکتوز استفاده گردید. نتایج نشان داد که تعداد ۵۹ جدایه از بین ۱۲۵ جدایه تأییدشده مربوط به جنس، با آزمون‌های بیوشیمیایی *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشند. از تعداد ۵۹ جدایه تشخیص داده شده تعداد ۴۹

جدایه(معادل ۸۳/۰۵٪) از اندام‌های داخلی و تعداد ۱۰ جدایه (معادل ۱۶/۹۴٪) از ضایعات پوستی و آبشش بودند.

د-۲- نتایج تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* به‌روشPCR

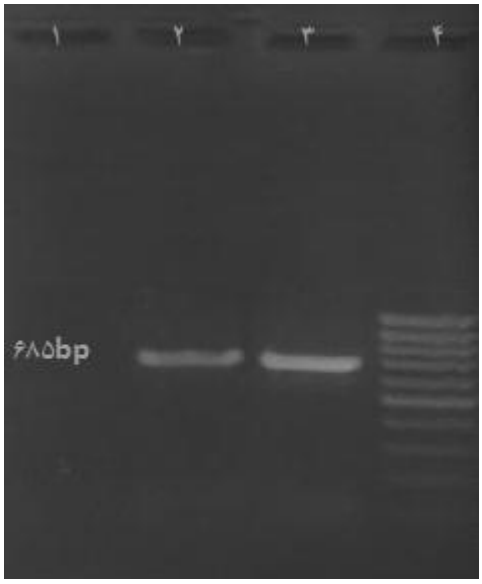
جهت تشخیص قطعی *آئروموناس هیدروفیلا*، تعداد ۱۲۵ جدایه‌ای که ازنظر جنس آئروموناس تأیید شده بودند با پرایمرهای اختصاصی *آئروموناس هیدروفیلا* (ژن‌های لیپاز و 16s rRNA) مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. از تعداد ۱۲۵ جدایه‌ای که از نظرجنس آئروموناس تأیید شده بودند با پرایمرهای اختصاصی *آئروموناس هیدروفیلا* (ژن‌های لیپاز و srRNA ۱۶) تعداد ۲۱ جدایه باندbp ۶۸۵ (srRNA ۱۶) و ۳۱ جدایه باند bp ۷۶۳ (ژن لیپاز) را نشان دادند، که مجموعاً ۳۱ جدایه به‌عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* در نظر گرفته شدند. از این ۳۱ جدایه، تعداد ۲۱ جدایه هر دو ژن را دارا بودند و ۱۰ جدایه فقط ژن لیپاز را داشتند (شکل ۴-۳ و ۴-۴) (جدول ۴-۲ و ۴-۳).

جدول ۴-۲- تعداد *آئروموناس هیدروفیلا*های جدا شده از کپورماهیان به تفکیک اندام‌های مختلف و روش تشخیص.

تعداد جدایه / اندام / روش تشخیص	تعدادکل	کلیه	کبد	طحال	پوست	آبشش
بیوشیمیایی	۵۹	۳۸	۱۱	۰	۵	۵
PCR	۳۱	۲۲	۵	۰	۳	۱

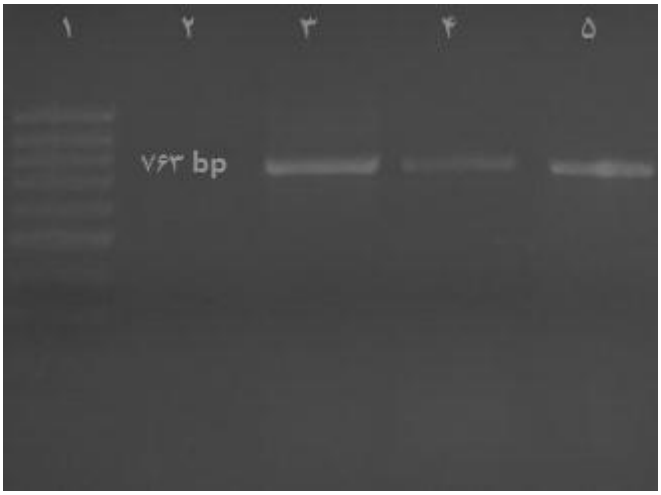
جدول ۴-۳ - تعداد جدایه‌های باکتری جدا شده از کپورماهیان مظنون به سپتی‌سمی به تفکیک اندام‌های مختلف

تعداد / نوع جدایه	کلیه	کبد	طحال	پوست	آبشش	تعداد کل
کل جدایه‌ها	۱۱۶	۴۴	۴	۱۹	۳۰	۲۱۳
مظنون به جنس آئروموناس	۹۱	۳۹	۲	۱۸	۲۱	۱۷۱
تأیید شده جنس آئروموناس	۷۷	۳۰	۲	۱۲	۴	۱۲۵
مظنون به گونه *آئروموناس هیدروفیلا*	۳۸	۱۱	۰	۵	۵	۵۹
تأیید شده *آئروموناس هیدروفیلا*	۲۲	۵	۰	۳	۱	۳۱



شکل ۴-۳- الکتروفورز محصول PCR ژن srRNA ۱۶ گونه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: جدایه‌ی مظنون به *آئروموناس هیدروفیلا* (۶۸۵bp) ستون ۳: کنترل مثبت و ستون ۴: نردبان ژنی bp ۱۰۰(M)



شکل ۴- ۴ - الکتروفورز محصول PCR ژن لیپاز *Aeromonas hydrophila* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

ستون ۱: نردبان ژنی bp ۱۰۰(M)، ستون ۲: کنترل منفی، ستون‌های ۳ و ۴: جدایه‌های دارای ژن لیپاز (bp۷۶۳) و ستون ۵: کنترل مثبت.

با توجه به نتایج، مشخص شد که ۲۴/۸ درصد از جدایه‌های تأییدشده جنس آئروموناس متعلق به گونه هیدروفیلا می‌باشند و همچنین از ۵۹ جدایه‌ای که توسط آزمون‌های بیوشیمیایی *آئروموناس هیدروفیلا* تشخیص داده شد، ۳۱ جدایه (معادل ۵۲/۵۴٪) توسط آزمایش PCR تأیید شده و ۲۸ جدایه (۴۵/۴۷٪) تأیید نشدند. نتایج بیوشیمیایی ۳۱ جدایه تأییدشده و ۲۸ جدایه تأیید نشده با PCR با یکدیگر مقایسه شدند (جدول ۴-۴ و ۴-۵).

با PCR نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در حداقل ۱۵/۵٪ از سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان مورد اثبات قرار گرفت.

جدول ۴-۴ - ویژگی‌های بیوشیمیایی ۳۱ جدایه‌ی تأییدشده *آئروموناس هیدروفیلا* جداشده از کپور ماهیان استان خوزستان

آزمون	از مجموع ۳۱ جدایه		
	تعداد و درصد جدایه‌های مثبت	تعداد و درصد جدایه‌های منفی	وضعیت کلی آزمون
اکسیداز	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
کاتالاز	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
حرکت	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
اندول	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	۴ (٪۱۲/۹)	±
تولید H_2S	۵ (٪۱۶/۱۲)	۲۶ (٪۸۳/۸۷)	±
آرژینین دکربوکسیلاز	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
لایزین دکربوکسیلاز	۲۵ (٪۸۰/۶۴)	۶ (٪۱۹/۳۵)	±
اورنیتین دهیدرولاز	۱۰ (٪۳۲/۲۵)	۲۱ (٪۶۷/۷۴)	±
اوره	۱ (٪۳/۲۲)	۳۰ (٪۹۶/۷۷)	±
سیمون سیترات	۲۶ (٪۸۳/۸۷)	۵ (٪۱۶/۱۲)	±
وگس پراسکور	۱۱ (٪۳۵/۴۸)	۲۰ (٪۶۴/۵۱)	±
متیل رد	۷ (٪۲۲/۵۸)	۲۴ (٪۷۷/۴۱)	±
O/F	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
احیای نیترات	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
تحمل نمک ۳٪	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
تحمل نمک ۴٪	۸ (٪۲۵/۸۰)	۲۳ (٪۷۴/۱۹)	±
تحمل نمک ۶٪	۱ (٪۳/۲۲)	۳۰ (٪۹۶/۷۷)	±
رشد در دمای ۴°C	۴ (٪۱۲/۹)	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	±
رشد در دمای ۳۷°C	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
رشد در دمای ۴۲°C	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
تخمیر گلوکز	۳۱ (٪۱۰۰)	–	+
تخمیر اینوزیتول	۱۰ (٪۳۲/۲۵)	۲۱ (٪۶۷/۷۴)	±
تخمیر سوکروز	۲۹ (٪۹۳/۵۴)	۲ (٪۶/۴۵)	±
تخمیر سوربیتول	۷ (٪۲۲/۵۸)	۲۴ (٪۷۷/۴۱)	±
تخمیر لاکتوز	۴ (٪۱۲/۹)	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	±

تخمیر سالیسین	۸ (٪۲۵/۸۰)	۲۳ (٪۷۴/۱۹)	±
تخمیر مانیتول	۳۰ (٪۹۶/۷۷)	۱ (٪۳/۲۲)	±
تخمیر مالتوز	۹ (٪۲۹/۰۳)	۲۲ (٪۷۰/۹۶)	±
تخمیر آرابینوز	۱۵ (٪۴۸/۳۸)	۱۶ (٪۵۱/۶۱)	±
تولید گاز از گلوکز	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	۴ (٪۱۲/۹)	±

جدول ۴-۵ - ویژگی‌های بیوشیمیایی ۲۸ جدایه‌ی دارای مشخصات بیوشیمیایی *آئروموناس هیدروفیلا* که در آزمایش PCR تأیید نشدند.

آزمون	از مجموع ۲۸ جدایه		
	تعداد و درصد جدایه‌های مثبت	تعداد و درصد جدایه‌های منفی	وضعیت کلی آزمون
اکسیداز	۲۸ (٪۱۰۰)	-	+
کاتالاز	۲۸ (٪۱۰۰)	-	+
حرکت	۳ (٪۸۲/۱۴)	۵ (٪۱۷/۸۵)	±
اندول	۱۴ (٪۵۰)	۱۴ (٪۵۰)	±
تولید H_2S	۱۵ (٪۵۳/۵۷)	۱۳ (٪۴۶/۴۲)	±
آرژینین دکربوکسیلاز	۲۱ (٪۷۵)	۷(٪۲۵)	±
لایزین دکربوکسیلاز	۲۰(٪۷۱/۴۲)	۸ (٪۲۸/۵۷)	±
اورنیتین دهیدرولاز	۸ (٪۶۴/۲۸)	۱۰ (٪۳۵/۷۱)	±
اوره	۴ (٪۱۴/۲۸)	۲۴ (٪۸۵/۷۱)	±
سیمون سیترات	۲۱ (٪۷۵)	۷(٪۲۵)	±
وگس پراسکور	۸ (٪۲۸/۵۷)	۲۰ (٪۷۱/۴۲)	±
متیل رد	۳ (٪۱۰/۷۱)	۲۵ (٪۸۹/۲۸)	±
O/F	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
احیای نیترات	۲۵(٪۸۹/۲۸)	۳(٪۱۰/۷۱)	±
تحمل نمک ۳٪	۱۸ (٪۶۴/۲۸)	۱۰ (٪۳۵/۷۱)	±
تحمل نمک ۴٪	۱۱ (٪۳۹/۲۸)	۱۷ (٪۶۰/۷۱)	±
تحمل نمک ۶٪	۵ (٪۱۷/۸۵)	۲۳ (٪۸۲/۱۴)	±
رشد در دمای ۴°C	-	۲۸ (٪۱۰۰)	±

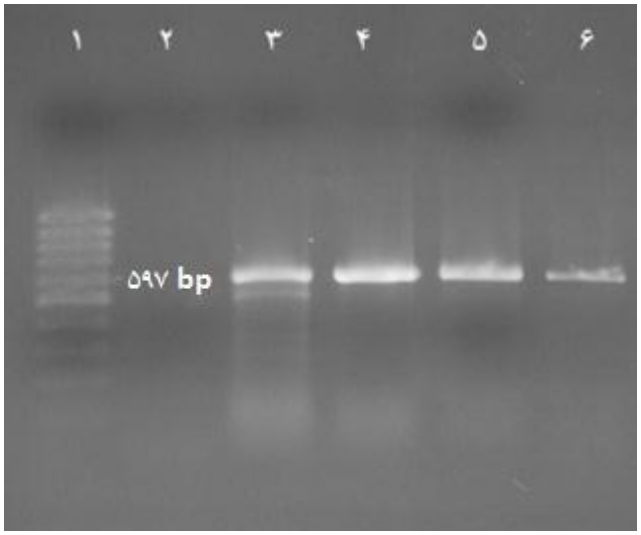
رشد در دمای ۳۷°C	۲۸ (٪۱۰۰)	-	+
رشد در دمای ۴۲°C	۸ (٪۲۸/۵۷)	۲۰ (٪۷۱/۴۲)	±
تخمیر گلوکز	۲۱ (٪۷۵)	۷(٪۲۵)	±
تخمیر اینوزیتول	۶ (٪۲۱/۴۲)	۲۲ (٪۷۸/۵۷)	±
تخمیر سوکروز	۱۸ (٪۶۴/۲۸)	۱۰ (٪۳۵/۷۱)	±
تخمیر سوربیتول	۱۲ (٪۴۲/۸۵)	۱۶ (٪۵۷/۱۴)	±
تخمیر لاکتوز	۸ (٪۲۸/۵۷)	۲۰ (٪۷۱/۴۲)	±
تخمیر سالیسین	۵ (٪۱۷/۵۸)	۲۳(٪۸۲/۱۴)	±
تخمیر مانیتول	۲۰(٪۷۱/۴۲)	۸ (٪۲۸/۵۷)	±
تخمیر مالتوز	۹ (٪۲۹/۰۳)	۲۲ (٪۷۰/۹۶)	±
تخمیر آرابینوز	۵ (٪۱۷/۵۸)	۲۳ (٪۸۲/۱۴)	±
تولید گاز از گلوکز	۱۲ (٪۴۲/۸۵)	۱۶ (٪۵۷/۱۴)	±

هـ-تعیین حدت جدایه‌ها

هـ -۱- ردیابی ژن‌های حدت با استفاده از PCR

هـ -۱-۱- PCR ژن همولایزین

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده همولایزین طراحی‌شده توسط Aslani و همکاران (۲۰۰۴)، بر روی ۳۱ جدایه *آئرومونـاس هیدروفیلا* نشان داد که ۱۸ جدایه ازنظر حضور ژن *همولایزین* (+A *hly*)مثبت می‌باشند؛ که فراوانی آن معادل ۵۸/۰۶٪ از کل نمونه‌های *آئرومونـاس هیدروفیلا* بود (شکل۴-۵ وجدول ۴-۶).

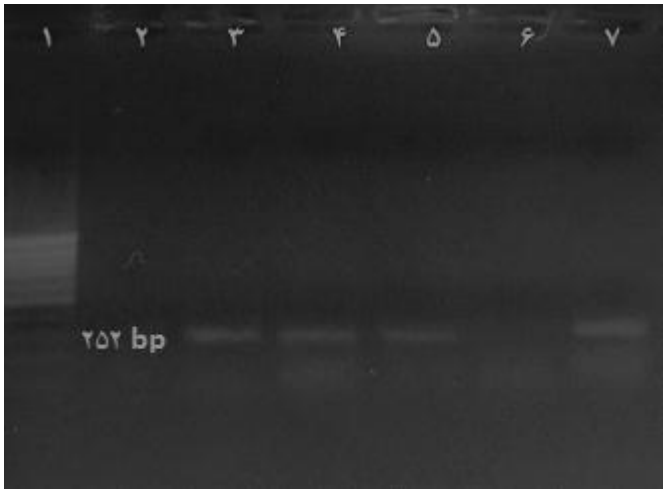


شکل ۴-۵ - الکتروفورز محصول PCR ژن همولایزین (hlyA) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

ستون ۱: نردبان ژنی bp ۱۰۰(M)، ستون ۲: کنترل منفی (N)، ستون ۶: کنترل مثبت (P)
ستون ۳، ۴ و ۵: جدایه‌های دارای ژن همولایزین (واجد باند bp ۵۹۷)

ه -۱-۲- PCR ژن ایرولایزین

نتایج آزمایش PCR جهت تکثیر ژن ایرولایزین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده توسط Porteen و همکاران (۲۰۰۶)، بر روی ۳۱ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* نشان داد که ۱۶ جدایه (۵۱/۶۱٪) ازنظر حضور این ژن **(*aerA*)** مثبت می‌باشند چون محصولی به‌اندازه ۲۵۲ جفت باز تولید کردند (شکل ۴-۶).

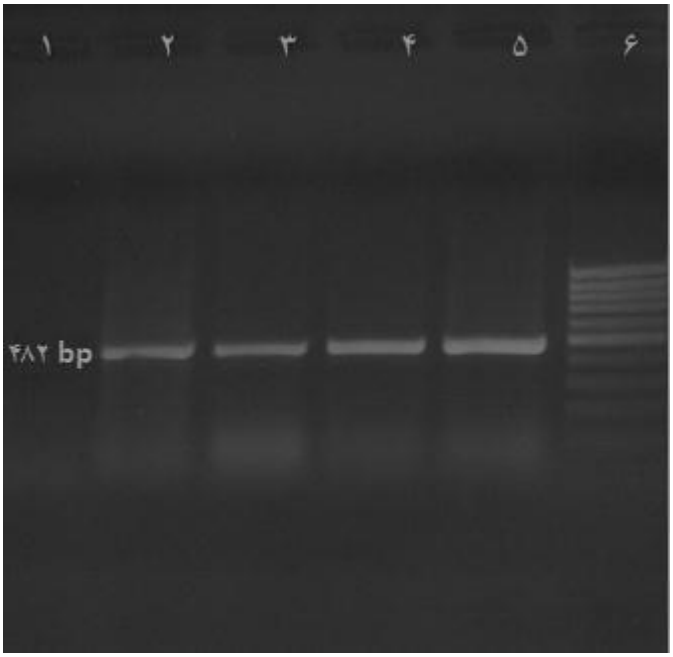


شکل ۴-۶ - الکتروفورز محصول PCR ژن ایرولایزین (*aerA*) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

ستون ۱: نردبان ژنی bp ۱۰۰(M)، ستون ۲: کنترل منفی (N)، ستون ۷: کنترل مثبت (P)
ستون ۳، ۴ و ۵: جدایه‌های دارای ژن ایرولایزین (واجد باند bp۲۵۲)

ه -۱-۳- نتایج PCR ژن سایتولیتیک انتروتوکسین (*act*)

نتایج این مطالعه نشان داد که ۲۳ جدایه (۷۴/۱۹٪) از ۳۱ جدایه *آئرومونا‌س هیدروفیلا* ازنظر حضور ژن سایتولیتیک انتروتوکسین (act^+) مثبت می‌باشند. این جدایه‌ها با پرایمر اختصاصی ژن سایتولیتیک انتروتوکسین، تولید محصولی به‌اندازه ۴۸۲ جفت باز کردند (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷ – الکتروفورز محصول PCR ژن سایتولیتیک انتروتوکسین (*act*) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

ستون ۶: نردبان ژنی bp ۱۰۰(M)، ستون ۱: کنترل منفی (N)، ستون ۵: کنترل مثبت (P)

ستون ۲، ۳ و ۴: جدایه‌های دارای ژن سایتولیتیک انتروتوکسین (واجد باند bp ۴۸۲)

جدول ۴-۶ – فراوانی ژن‌های حدت در ۳۱ جدایه *آئرومونـاس هیدروفیلا*.

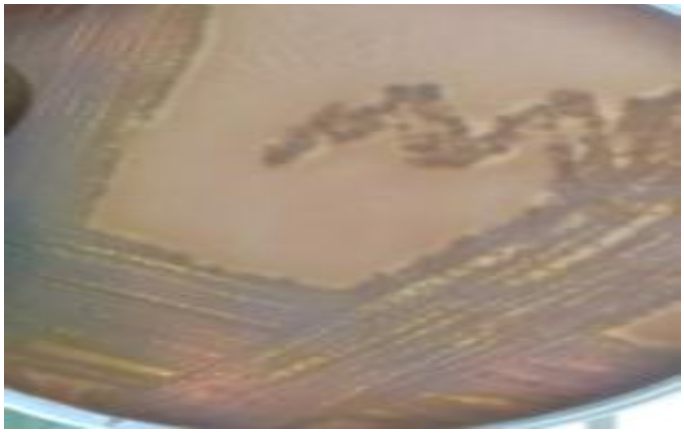
شماره جدایه	ژن همولایزین	ژن ایرولایزین	ژن سایتولیتیک انترتوکسین	جمع سه ژن
۱	+	+	+	۳(٪۱۰۰)
۲	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۳	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۴	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۵	–	–	+	۱ (٪۳۳/۳۳)
۶	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۷	+	–	+	۲ (٪۶۶/۶۶)
۸	+	–	–	۱ (٪۳۳/۳۳)
۹	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۱۰	–	+	+	۲ (٪۶۶/۶۶)
۱۱	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۱۲	–	+	–	۱ (٪۳۳/۳۳)
۱۳	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۱۴	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۱۵	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۱۶	–	–	+	۱ (٪۳۳/۳۳)
۱۷	+	–	+	۲ (٪۶۶/۶۶)

۱۸	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۱۹	+	−	+	۲ (٪۶۶/۶۶)
۲۰	+	−	−	۱ (٪۳۳/۳۳)
۲۱	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)
۲۲	−	+	−	۱ (٪۳۳/۳۳)
۲۳	−	−	−	−
۲۴	−	−	−	−
۲۵	−	−	−	−
۲۶	−	−	+	۱ (٪۳۳/۳۳)
۲۷	−	−	+	۱ (٪۳۳/۳۳)
۲۸	−	−	−	−
۲۹	−	−	+	۱ (٪۳۳/۳۳)
۳۰	−	−	+	۱ (٪۳۳/۳۳)
۳۱	+	+	+	۳ (٪۱۰۰)

ه -۲- ردیابی فاکتورهای حدت به روش فنوتیپی

ه -۲-۱- ایجاد همولیز β بر روی آگار خون‌دار

ایجاد همولیزβ بر روی محیط TSA غنی‌شده با ۵٪ خون گوسفند نشان داد که ۱۹ جدایه از ۳۱ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* (معادل ۶۱/۲۹٪) دارای توانایی ایجاد همولیز بتا بر روی آگار خون‌دار هستند (شکل ۴-۸ و ۴-۹).

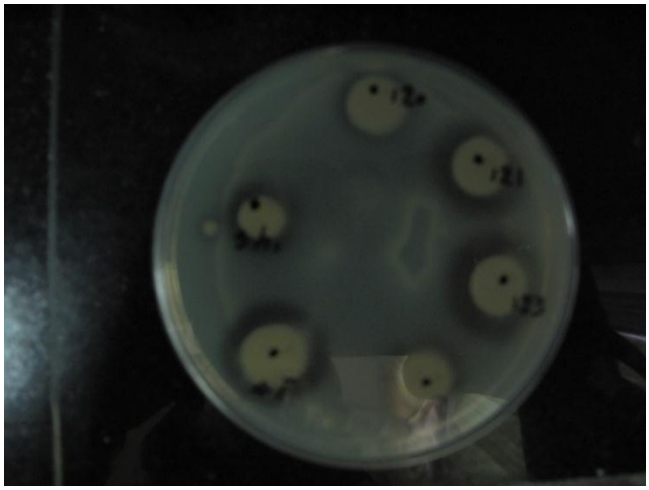


شکل ۴-۸- جدایه ایجادکننده‌ی همولیز β در آگار خوندار.

شکل ۴-۹ - ایجاد همولیز β در آگار خوندار: جدایه سمت راست دارای همولیز β و جدایه سمت چپ فاقد همولیزβ است.

ه -۲-۲- تولید نوکلئاز

کشت جدایه‌ها بر روی محیط DNAse نشان داد که از ۳۱ جدایه *آئرومونـاس هیدروفیلا* ۲۴ جدایه (با فراوانی معادل ۷۷/۴۱٪) فعالیت نوکلئازی مثبت داشته‌اند. البته میزان این فعالیت بر اساس قطر هاله ایجادشده اطراف کلونی به‌صورت نیمه کمی از + تا +++ درجه‌بندی گردیدند. این معیار به‌صورت قراردادی بود، به‌طوری‌که، قطر هاله ایجادشده اگر زیر ۱۰ میلی‌متر بود به‌صورت +، اگر بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر بود ++ و اگر بالای ۲۰ میلی‌متر بود +++ درنظر گرفته شد (شکل ۴-۱۰).

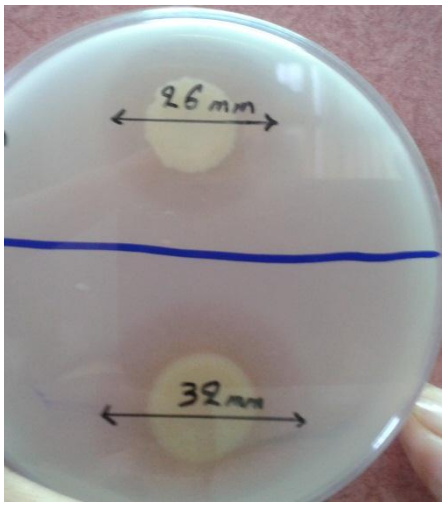


شکل ۴-۱۰ - هاله ایجادشده اطراف کلونی‌های تولید کننده نوکلئاز

ه -۲-۳- فعالیت پروتئولیتیکی

فعالیت پروتئولیتیکی بر اساس ارزیابی با تجزیه‌ی کازئین و هضم ژلاتین ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ۲۶ جدایه از ۳۱ جدایه *آئرومونـاس هیدروفیلا* (۸۳/۸۷٪) ازنظر توانایی کازئیناز

و ۱۷ جدایه (۵۴/۸۳٪) ازنظر فعالیت ژلاتیناز مثبت بوده‌اند. البته میزان توانایی هضم کازئین در بین جدایه‌های مختلف متفاوت بود به‌طوری‌که قطر هاله ایجاد شده اطراف محل کشت باکتری از ۱۰ میلی‌متر تا ۳۲ میلی‌متر متغیر بود (شکل ۴-۱۱ و جدول ۴-۷).



شکل ۴-۱۱- تولید کازئیناز: هاله ایجادشده اطراف کلونی باکتری نشان دهنده‌ی تولید کازئیناز است.

هـ -۲-۴- توانایی جذب رنگ کونگورد

با تلقیح ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی در محیط کشت حاوی رنگ کونگورد، مشخص شد، از ۳۱ جدایه *آئرومونـاس هیدروفیلا*، تعداد ۲۲ جدایه دارای توانایی جذب کونگورد (Congo red uptake) هستند؛ به‌عبارتی فراوانی جدایه‌های دارای این توانایی۷۰/۹۶٪ بود. این جدایه‌های مثبت در میزان شدت رنگ با هم تفاوت داشتند و طبق روش Paniagua وهمکاران (۱۹۹۰) شدت جذب رنگ به‌صورت + و یا ++ درجه‌بندی شدند (جدول ۴-۷).

ه -۳- مقایسه جدایه‌ها ازنظر فاکتورهای حدت ژنوتیپی و فنوتیپی

بر اساس نتایج ردیابی ژن‌های حدت، ابتدا جدایه‌هایی که هر سه ژن حدت موردنظر را دارا بودند، انتخاب گردید و مشخص شد که تعداد ۱۳ جدایه دارای ژنوتیپ $hly\ A^{+}aer\ A^{+}act^{+}$ هستند (جدول ۴-۸).

در مقایسه فاکتورهای فنوتیپی حدت ۱۳ جدایه‌ای‌که دارای هر سه ژن حدت بودند، مشخص شد که تعداد ۵ جدایه (جدایه‌های ۱، ۳، ۴، ۱۳ و ۲۱) ازنظر تمام فاکتورهای حدت مثبت بودند ولی شدت واکنش در بین این جدایه‌ها که بر اساس + تا +++ ثبت گردید، متفاوت بود و جدایه‌های شماره ۳ و ۴ بالاترین میزان فاکتورهای حدت را دارا بودند.

جدول ۴-۷ - فاکتورهای فنوتیپی مرتبط با حدت در ۳۱ جدایه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا*.

شماره جدایه	ایجاد همولیز β	نوکلئاز	کازئیناز	ژلاتیناز	جذب کونگورد
۱	+	+	+	+	++
۲	-	++	+	+	++
۳	+	+++	+	+	++
۴	+	+++	+	+	+
۵	-	+	+	-	+
۶	+	-	+	-	+
۷	+	++	+	-	++
۸	+	-	-	+	-
۹	+	-	+	+	-
۱۰	+	++	+	+	+
۱۱	-	++	+	+	++
۱۲	+	+++	+	+	-
۱۳	+	+	+	+	++
۱۴	+	+	+	-	++
۱۵	+	+	+	-	++
۱۶	-	+	+	+	+
۱۷	+	+	+	+	++
۱۸	+	+	+	+	-
۱۹	+	++	+	-	+
۲۰	+	+++	+	+	-
۲۱	+	+	+	+	++
۲۲	+	+++	+	-	+
۲۳	-	+++	+	-	+
۲۴	-	-	+	-	-
۲۵	-	+++	+	-	+
۲۶	-	+	+	-	++
۲۷	-	-	+	-	-
۲۸	-	+	-	+	+
۲۹	-	-	-	-	-
۳۰	-	-	-	-	-
۳۱	+	++	-	+	++

جدول ۴-۸ - مقایسه ۱۳ جدایه‌ای *آئروموناس هیدروفیلا* واجد ۳ ژن حدت

شماره جدایه	ایجاد همولیز β	نوکلئاز	کازئیناز	ژلاتیناز	جذب کونگورد
۱	+	+	+	+	++
۲	-	++	+	+	++
۳	+	++	+	+	++
۴	+	+++	+	+	+
۶	+	-	+	-	+
۹	+	-	+	+	-
۱۱	-	++	+	+	++
۱۳	+	+	+	+	++
۱۴	+	+	+	-	++
۱۵	+	+	+	-	++
۱۸	+	+	+	+	-
۲۱	+	+	+	+	++
۳۱	+	++	-	+	++

ه -۴- تعیین LD_{50}

جهت تعیین LD_{50}، رقت‌های متوالی بر مبنای ۱۰(10^{4} تا 10^{10}) از جدایه‌های شماره ۳ و ۴ تهیه گردید و جداگانه از هرکدام به ۷ قطعه ماهی کپور به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید، به گروهی نیز به‌عنوان شاهد سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. ماهیان تلف شده دارای علائم: شکم برآمده، آسیت، بیرون‌زدگی و قرمز رنگ بودن مخرج، پرخونی و خونریزی اندام‌های داخلی و تورم کلیه بودند(شکل ۴-۱۳و ۴-۱۴). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که میزان ۵۰٪ تلفات تجمعی در جدایه شماره ۳ بین رقت‌های 10^{8} و 10^{9} است و میزان LD_{50} در این

جدایه بر اساس فرمول تقریباً معادل با $10^{8/5}$ است (شکل ۴-۱۵)؛ اما ۵۰٪ تلفات تجمعی در جدایه شماره ۴ بین رقت‌های 10^{10} و 10^{11} بود و میزان LD_{50} در این جدایه بر اساس فرمول تقریباً معادل با $10^{10/5}$ محاسبه گردید (جدول ۴-۹ و ۴-۱۰).

شکل ۴-۱۲- برآمدگی شکم و پرولاپس و قرمزی مخرج ناشی از تزریق داخل صفاقی باکتری.

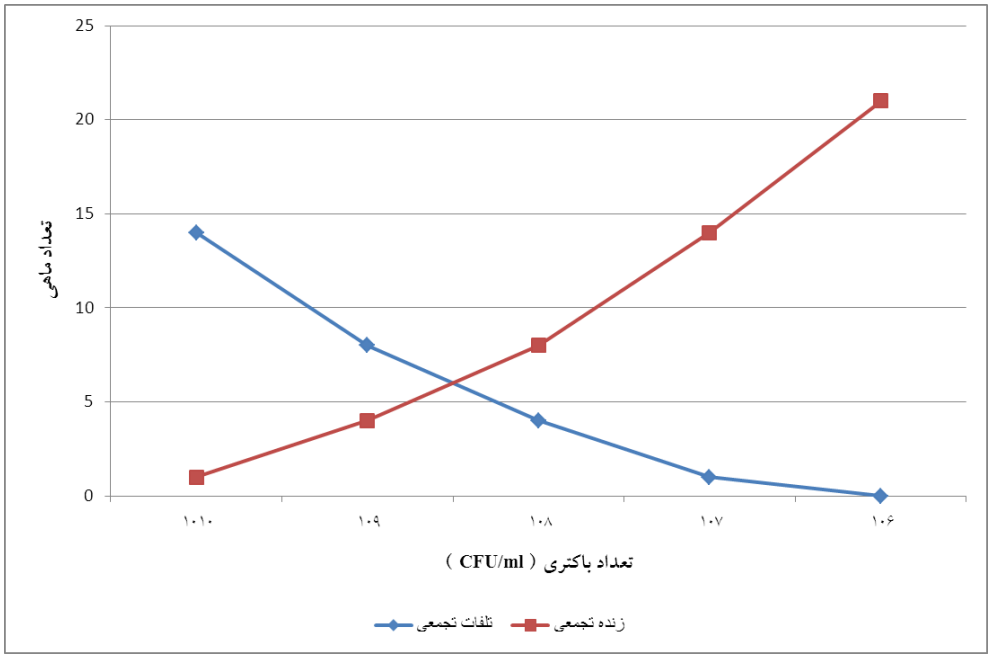
شکل ۴-۱۳- آسیت و پرخونی اندام‌های داخلی ناشی از تزریق داخل صفاقی باکتری.

جدول ۴-۹ - نتایج تلفات تجمعی و درصد تلفات در جدایه شماره ۳ *آئروموناس هیدروفیلا*.

A/(A+B) × 100	A+B	زنده تجمعی (B)	تلفات تجمعی (A)	تعداد نمونه‌های زنده	تعداد نمونه‌های تلفاتی	رقت (CFU/ml)
۹۳/۳۳	۱۵	۱	۱۴	۱	۶	$۱۰^{۱۰}$
۶۶/۶۶	۱۲	۴	۸	۳	۴	$۱۰^{۹}$
۳۳/۳۳	۱۲	۸	۴	۴	۳	$۱۰^{۸}$
۶/۶۶	۱۵	۱۴	۱	۶	۱	$۱۰^{۷}$
۰	۲۱	۲۱	۰	۷	۰	$۱۰^{۶}$

جدول ۴-۱۰ - نتایج تلفات تجمعی و درصد تلفات در جدایه شماره ۴ *آئروموناس هیدروفیلا*.

A/(A+B) × 100	A+B	زنده تجمعی (B)	تلفات تجمعی (A)	تعداد نمونه‌های زنده	تعداد نمونه‌های تلفاتی	رقت (CFU/ml)
۷۲/۷۲	۱۱	۳	۸	۳	۴	$۱۰^{۱۱}$
۳۳/۳۳	۱۲	۸	۴	۵	۲	$۱۰^{۱۰}$
۱۳/۳۳	۱۵	۱۳	۲	۵	۲	$۱۰^{۹}$
۰	۲۰	۲۰	۰	۷	۰	$۱۰^{۸}$
۰	۲۷	۲۷	۰	۷	۰	$۱۰^{۷}$
۰	۳۴	۳۴	۰	۷	۰	$۱۰^{۶}$



شکل ۴-۱۵ - تعیین میزان دوز LD_{50}

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از فاکتورهای حدت و آزمایش آلوده‌سازی جدایه شماره ۳ به‌عنوان حادترین جدایه در بین سایر جدایه‌ها شناخته شد که متعاقباً در آزمایش ایمن‌سازی از آن استفاده گردید.

و- تهیه باکترین

جهت تهیه باکترین از لامپ UV استفاده گردید که نتایج نشان داد، کوتاه‌ترین زمانی که باکتری غیرفعال می‌گردد ۲۰ دقیقه می‌باشد.

و- ۱- بررسی استریل بودن باکترین آماده‌شده

در پلیت‌های کشت داده‌شده از باکترین هیچ‌گونه رشدی (نه از باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و نه از هیچ باکتری دیگری) بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری مشاهده نشد.

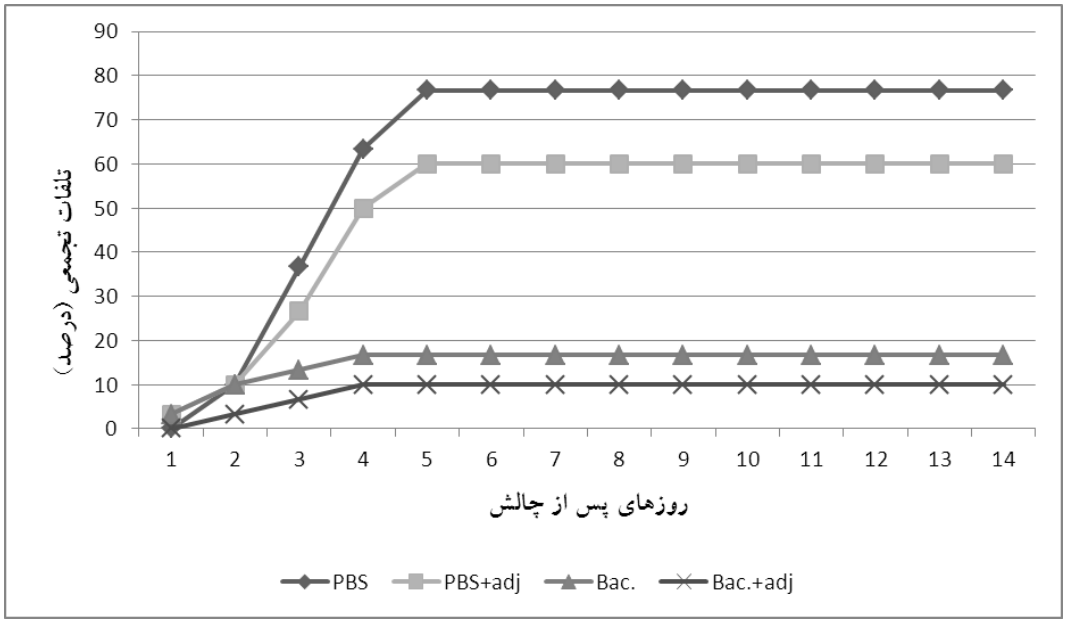
و-۲- بی‌خطر بودن باکترین

این آزمون جهت اطمینان از عدم وجود عوارض جانبی ناشی از عفونت و یا ایجاد بیماری متعاقب تزریق باکترین انجام شد و نتایج نشان داد که در ماهیان تزریق‌شده هیچ علائمی از عفونت ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* و تغییرات پس از مرگ مشاهده نمی‌شود. همچنین کشت از اندام‌های ماهی تزریق‌شده در محیط کشت هیچ‌گونه رشدی را نشان نداد.

ز- چالش و عیار آنتی‌بادی

ز- ۱- چالش

چالش ۱۰ قطعه از ماهیان هر تکرار با دوزی معادل ۲ برابر میزان LD_{50} در روز ۲۸ پس از ایمن‌سازی مشخص کرد که میانگین درصد تلفات در گروه غیر واکسینه‌ای که فقط PBS دریافت کردند معادل ۷۶/۶۶٪ بود. همچنین در این گروه در تکرارهای مختلف درصد تلفات از ۷۰ تا ۸۰ متغیر بود (نمودار ۴-۱).



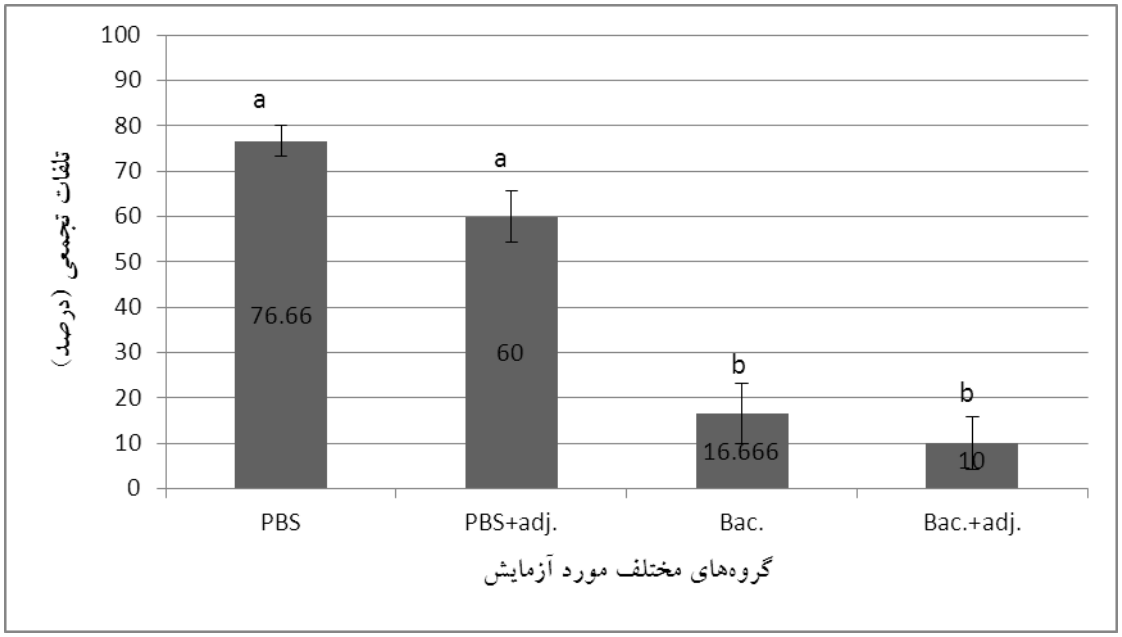
نمودار ۴-۱ – مقایسه تلفات تجمعی روزانه گروه‌های مختلف مورد آزمایش در چالش

در گروه غیر واکسینه‌ای‌که PBS را همراه با ادجوانت کامل فروند دریافت کرده بودند، میانگین درصد تلفات معادل ۶۰٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی در این گروه ۲۱/۷۳٪ بود. همچنین در این گروه در تکرارهای مختلف درصد تلفات از ۵۰ تا ۷۰ و میزان بازماندگی نسبی از ۸/۶۹ تا ۲۱/۷۳ درصد متغیر بود.

میانگین درصد تلفات در گروه واکسینه با باکترین بدون استفاده از ادجوانت معادل ۱۶/۶۶٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۷۸/۲۶٪ بود. درصد تلفات در تکرارهای مختلف این گروه از ۱۰ تا ۳۰ درصد و میزان بازماندگی نسبی از ۶۰/۸۶ تا ۸۶/۹۵ درصد متغیر بود. .

در گروهی که با باکترین به همراه ادجوانت کامل فروند واکسینه شده بودند میانگین درصد تلفات معادل ۱۰ درصد و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۸۶/۹۵٪ بود، همچنین درصد تلفات در تکرارهای مختلف این گروه از ۰ تا ۲۰ درصد و میزان بازماندگی نسبی از ۷۳/۹۱ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود.

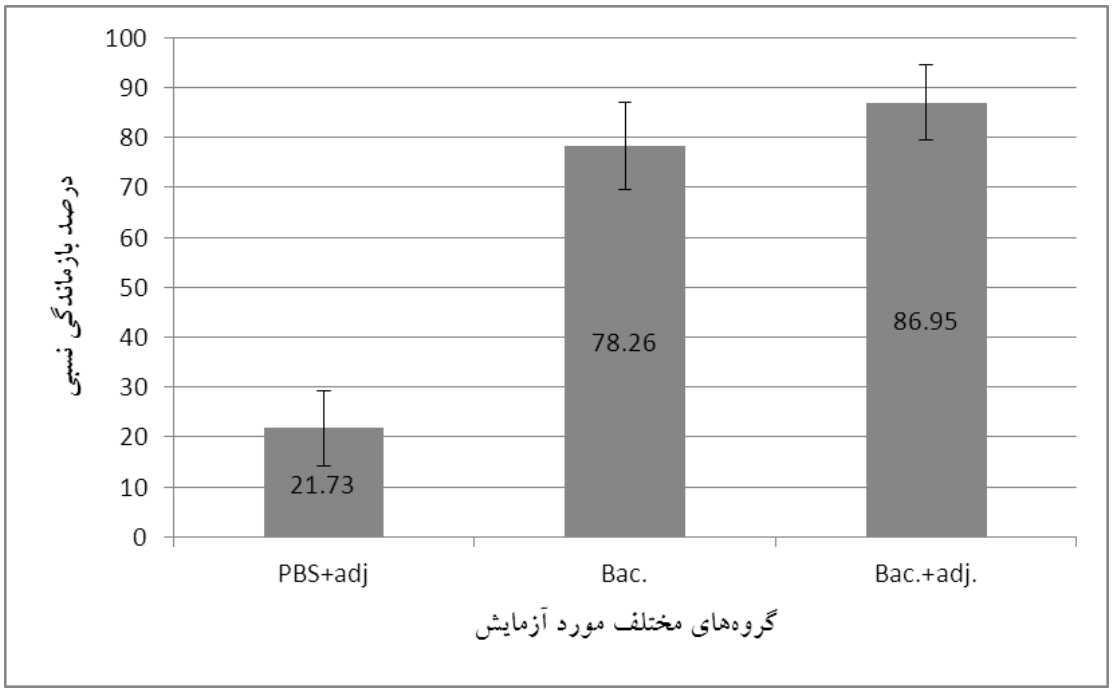
به‌طورکلی نتایج تلفات تجمعی در طول مدت چالش در گروه‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان تلفات تجمعی در گروه تزریق‌شده با PBS بوده است که میانگینی معادل ۳/۳۳ ± ۷۶/۶۶ (Mean ± SE) دارد و کمترین میزان تلفات تجمعی در گروه واکسینه با باکترین به همراه ادجوانت بوده است که معادل ۵/۷۷ ± ۱۰ می‌باشد. این تلفات در گروه‌های دریافت‌کننده PBS همراه با ادجوانت و گروه دریافت‌کننده باکترین به‌ترتیب ۵/۸ ± ۶۰ و ۶/۶۶ ± ۱۶/۶۶ می‌باشد (نمودار ۴-۲).



نمودار ۴-۲- نمودار ستونی میانگین تلفات تجمعی± خطای استاندارد ماهیان گروه‌های مختلف مورد چالش قرار گرفته با *آئروموناس هیدروفیلا*.

نتایج درصد بازماندگی در گروه‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان درصد بازماندگی در گروه دریافت‌کننده باکترین به همراه ادجوانت بوده است که میانگینی معادل ۷/۵۳ ± ۸۶/۹۵ (Mean ± SE) دارد و کمترین میزان درصد بازماندگی در گروه دریافت‌کننده PBS به

همراه ادجوانت است که معادل ۷/۵۳ ± ۲۱/۷۳ می‌باشد. این میزان درصد بازماندگی در گروه دریافت‌کننده باکترین ۸/۷۰ ± ۷۸/۲۶ بود (نمودار ۴-۳).



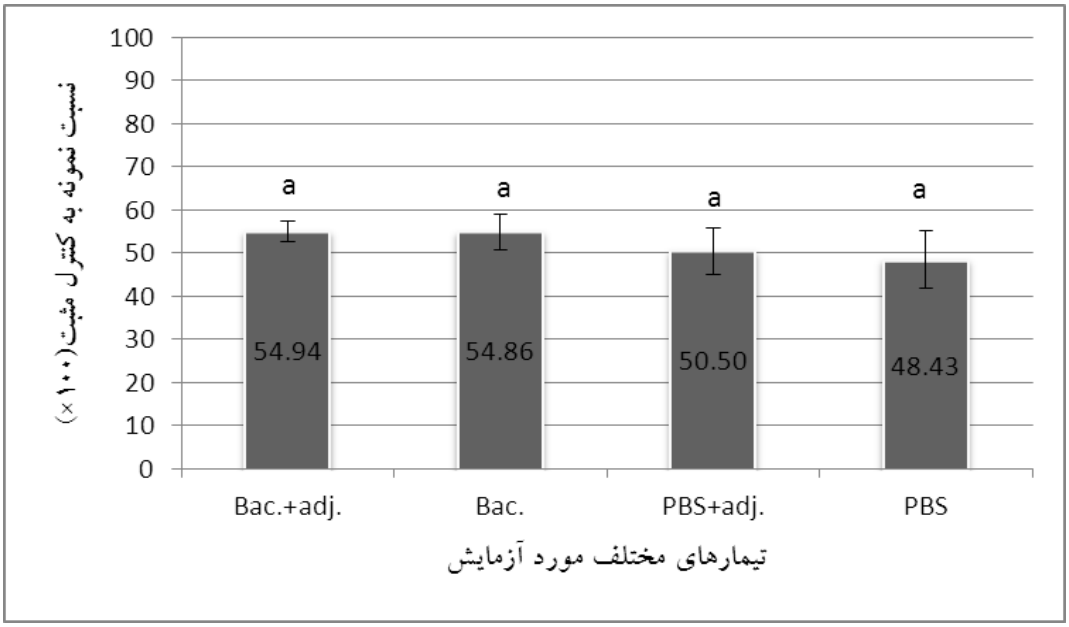
نمودار ۴-۳- نمودار ستونی میانگین درصد بازماندگی ± خطای استاندارد در ماهیان گروه‌های مختلف مورد چالش قرار گرفته با *آئروموناس هیدروفیلا*.

بررسی آماری اختلاف بین تلفات تجمعی با آزمون مربع کای در گروه‌های مختلف نشان داد که بین گروهی که PBS دریافت کرده و گروهی که PBS را همراه با ادجوانت دریافت کرده است اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P=۰/۰۸). همچنین بین گروهی که به‌وسیله باکترین واکسینه شده‌اند و گروهی که از باکترین به همراه ادجوانت استفاده شده است نیز اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P=۰/۲۲۶)

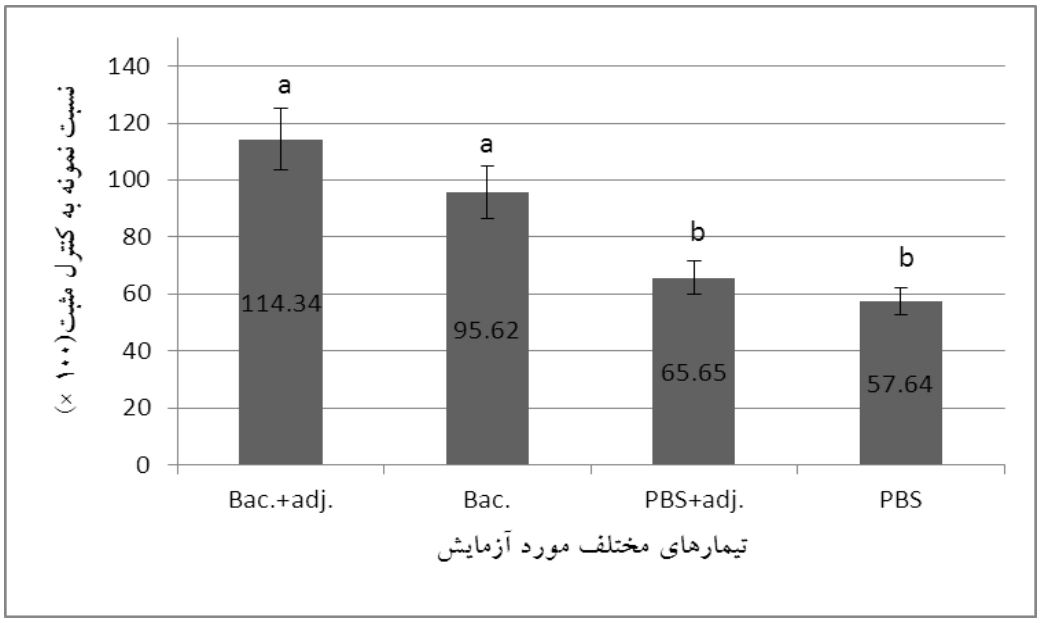
درحالی‌که بین گروهی که PBS دریافت کرده است با گروه‌های ایمن شده با باکترین به تنهایی و باکترین به همراه ادجوانت اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین بین گروهی که از PBS به همراه با ادجوانت استفاده شده است با گروه‌های ایمن شده با باکترین به تنهایی و باکترین به همراه ادجوانت اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

ز-۲- عیار آنتی‌بادی *ضدآئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان گروه‌های مختلف

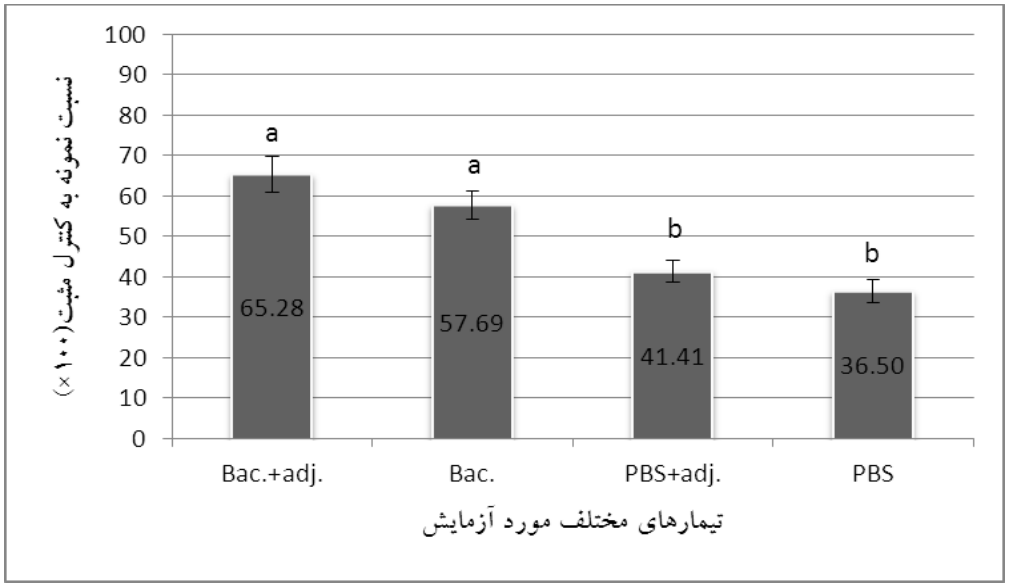
همان‌طور که در روش کار ذکر شد، ۴ هفته و ۸ هفته پس از ایمن‌سازی و همچنین در روز صفر، جهت بررسی سطح آنتی‌بادی سرم، از ماهیان خون‌گیری به عمل آمد. نتایج درصد S/P نمونه‌های سرمی ماهیان گروه‌های مختلف در الایزای غیرمستقیم در نمودارهای ۴-۴، ۴-۵، ۴-۶ و ۴-۷ خلاصه شده است.



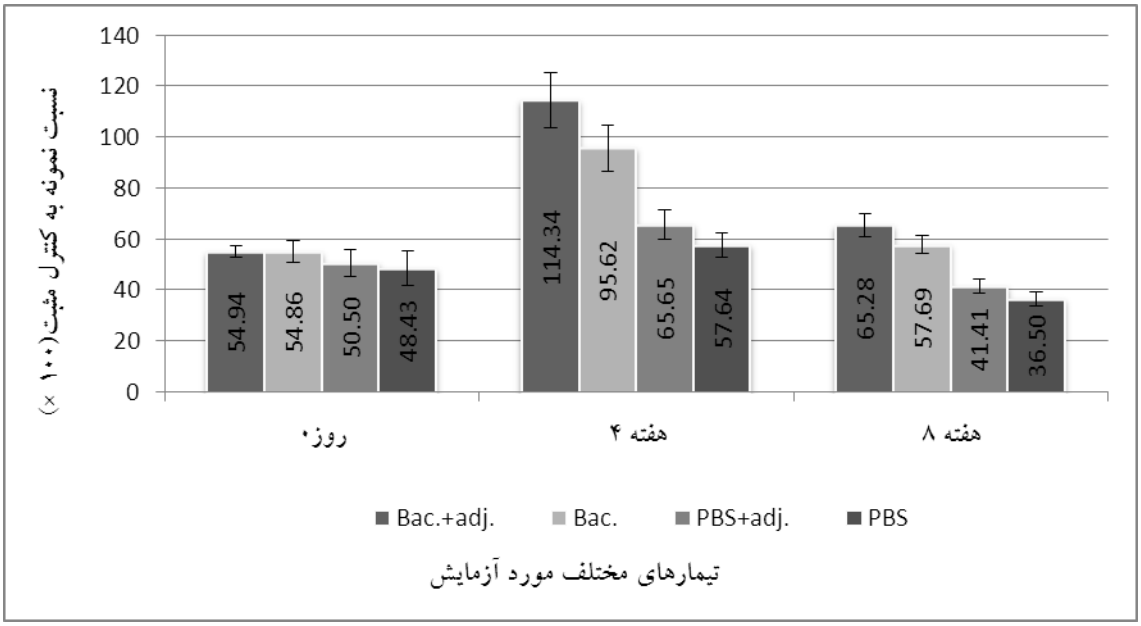
نمودار ۴-۴-عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا ماهیان* گروه‌های مختلف در روز صفر (قبل از ایمن‌سازی) بر اساس S/P%



نمودار ۴-۵- عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا ماهیان* گروه‌های مختلف، ۴ هفته پس از ایمن‌سازی بر اساس S/P%



نمودار ۴-۶- عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا ماهیان* گروه‌های مختلف، ۸ هفته پس از ایمن‌سازی بر اساس S/P%



نمودار ۴-۷ - عیار آنتی‌بادی ضد آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان گروه‌های مختلف، روزهای صفر، ۴ هفته و ۸ هفته پس از ایمن‌سازی بر اساس S/P%

نتایج نشان داد بالاترین میانگین نسبت نمونه به کنترل مثبت سرم ماهیان تلقیح شده برای گروه تلقیح شده با باکترین و ادجوانت کامل فروند در روز ۲۸ (۴ هفته پس از ایمن‌سازی) بود که معادل ۱۰/۹۱ ± ۱۱۴/۳۴ بود.

همچنین همان‌طور که نمودارها نشان می‌دهند در روز صفر قبل از ایمن‌سازی تقریباً تمامی گروه‌ها میزان نسبت S/P نزدیک به هم داشته‌اند و بررسی آماری نشان داد که بین گروه‌های مختلف در روز صفر قبل از ایمن‌سازی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P<۰/۰۵$).

آنالیز آماری نشان داد بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش در ۴ هفته پس از ایمن‌سازی، میزان آنتی‌بادی در گروه‌های واکسینه با باکترین به‌همراه ادجوانت و واکسینه با باکترین به‌تنهایی دارای اختلاف معنی‌داری با گروه‌های دریافت‌کننده PBS با و بدون ادجوانت است ($P<۰/۰۵$).

مقایسه‌ای بین گروه واکسینه با باکترین و ادجوانت و باکترین نشان داد که میزان آنتی‌بادی در گروه واکسینه با باکترین و ادجوانت بیشتر از گروه واکسینه با باکترین است ولی این اختلاف معنی‌دار نیست ($P<۰/۰۵$). همچنین در مقایسه بین دو گروه شاهد یعنی گروه دریافت‌کننده PBS به‌همراه ادجوانت و گروه دریافت‌کننده PBS نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$).

نتایج نشان داد که میزان آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در سرم ماهیان تلقیح شده مورد آزمایش بر اساس نسبت S/P در ۸ هفته پس از ایمن‌سازی در گروه واکسینه با باکترین به همراه ادجوانت بالاترین میزان را در بین سه گروه دیگر داشته است که معادل ۴/۵۳ ± ۶۵/۲۸ بود که دارای اختلاف معنی‌داری با گروه‌های شاهد یعنی گروه PBS با و بدون ادجوانت بود

(P<۰/۰۵)، ولی با گروه واکسینه شده با باکترین به‌تنهایی اختلاف معنی‌داری نداشت (P<۰/۰۵). میزان آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* سرم در ۸ هفته پس از ایمن‌سازی بین گروه‌های دریافت‌کننده PBS با و بدون ادجوانت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P<۰/۰۵).

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر تلفات زیادی در کپور ماهیان پرورشی در سطح استان خوزستان گزارش‌شده است. سپتی‌سمی‌های باکتریایی سالانه مسئول میلیون‌ها دلار ضرر اقتصادی در کشورهای پرورش‌دهنده ماهیان آب شیرین مانند آمریکا و چین هستند(Chen و همکاران، ۲۰۱۱ و Shoemaker و همکاران، ۲۰۰۲)، بنابراین باید توجه زیادی به پاتوژن‌های عامل بیماری و کنترل آن‌ها مبذول شود (Zheng و همکاران، ۲۰۱۲). از آنجائی که ارائه راهکارهای کنترلی و پیشگیری از بروز بیماری‌های عفونی مستلزم مطالعات تشخیصی دقیق می‌باشد با توجه به اهمیت *آئرومونـاس هیدروفیلا* در ایجاد سپتی‌سمی در ماهیان گرمابی، مطالعه حاضر در چند مرحله با هدف بررسی نقش این باکتری در سپتی‌سمی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان، شناسایی دقیق جدایه‌های بومی باکتری، تعیین فراوانی فاکتورهای حدت این باکتری در جدایه‌های بومی و بررسی محافظت کنندگی باکترین تهیه شده از یک جدایه‌ی حاد صورت گرفت که بحث در خصوص نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز در چند قسمت مجزا ارائه می‌گردد.

الف- نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان

تلفات ماهیان گرم‌آبی پرورشی در کشور به‌عنوان یکی از معضلات بهداشتی مهم صنعت پرورش ماهیان گرم‌آبی به‌خصوص در دو دهه اخیر شناخته شده است و اگر چه علل متفاوتی از قبیل عفونت‌های ویروسی، عوامل محیطی، تغذیه‌ای و باکتریایی به عنوان عوامل احتمالی آن ذکر شده‌اند (پیغان و اسماعیلی، ۱۳۷۲، سلطانی و ابراهیم زاده موسوی، ۱۳۷۵، غواص، ۱۳۸۱، کارگر و همکاران، ۱۳۷۵)، ولی در برخی از مطالعات (پیغان و اسماعیلی، ۱۳۷۲، رضویلر و همکاران، ۱۳۶۰، سلطانی و ابراهیم زاده موسوی، ۱۳۷۵) نقش آئروموناس‌های متحرک (عفونت باکتریایی) در این تلفات برجسته بوده است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

عفونت‌های باکتریایی باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی شده و خسارات اقتصاصی شدیدی را به صنعت آبزی‌پروری وارد می‌کند. تاکنون باکتری‌های متعددی مانند *ادواردزیلا ایکتالوری*[1]، *ادواردزیلا تاردا*[2] و *آئروموناس هیدروفیلا* به‌عنوان عامل سپتی‌سمی گزارش شده‌اند. در بین عوامل باکتریایی آبزیان، خصوصاً در ماهیان آب‌شیرین *آئروموناس هیدروفیلا* بسیار موردتوجه بوده است (Cao و همکاران، ۲۰۱۰؛ Piratate و همکاران، ۲۰۰۷). این باکتری باعث سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین و گاهی دریایی می‌شود (Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱). Nielsen وهمکاران در سال ۲۰۰۱ عنوان کردند که شیوع بیماری ناشی از آئروموناس‌های متحرک بیشتر در تابستان به علت وجود استرس‌هایی از قبیل عفونت‌های بالای انگلی، دمای بالا و اکسیژن پایین آب است. همچنین در تحقیقی که در سال ۱۹۹۴ انجام‌شده است، نشان داده‌شده که

1. *Edwardsiella Ictaluri*
2. *Edwardsiella Tarda*

شیوع سپتی‌سمی‌های آئروموناس‌های متحرک در بین تیلاپیاهای پرورشی و وحشی به ترتیب ۱۰ و ۲/۵٪ و در گربه‌ماهیان پرورشی و وحشی ۱۸/۷۵ و ۶/۲۵٪ می‌باشد که این نشان‌دهنده تأثیر استرس در بروز این بیماری است (Eissa و همکاران، ۱۹۹۴).

در بخشی از این تحقیق که به منظور تعیین نقش سپتی‌سمی ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان صورت گرفت، با PCR نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در حداقل ۱۵/۵٪ از سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان مورد اثبات قرار گرفت و در مجموع نقش آئروموناس‌ها در سپتی‌سمی‌ها، در مطالعه حاضر ۶۲/۵٪ (۱۲۵ مورد از ۲۰۰ مورد) برآورد گردید. Nilsen و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه خود بر روی تلفات ماهیان گرمابی و خرچنگ‌ها چنین گزارش نموده‌اند که آئروموناس‌ها در ۷۲/۶٪ و *آئروموناس هیدروفیلا* در ۳۰/۵٪ موارد حضور داشته‌اند، که اگرچه مطالعه‌ی فوق از نظر شرایط پرورش و موقعیت جغرافیایی با مطالعه حاضر تفاوت دارد ولی از نظر برآورد نقش آئروموناس‌ها و *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان دارای علائم تقریبا هم‌خوانی دارد. علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) در مطالعه خود بر روی بررسی علت تلفات ماهی آمور در استان خوزستان نتیجه‌گیری نموده‌اند که ۱۱٪ تلفات، ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* و در مجموع ۱۷/۶٪ تلفات، ناشی از آئروموناس‌ها بوده که باز تا حدود زیادی با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Ye و همکاران در سال ۲۰۱۳، ۲۰ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* از تعداد۶۰ قطعه کپور ماهی بیمار با علائم سپتی‌سمی هموراژیک جدا نموده‌اند و عنوان کرده‌اند که ۳۳/۳٪ از سپتی‌سمی‌ها ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* بوده است.

مقایسه‌ی ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های مطالعه‌ی حاضر با منابع موجود (Buller و همکاران، ۲۰۰۴؛ Austin و Austin، ۲۰۰۷)، نشان داد که آزمایش‌های حرکت، تولید اندول،

آرژنین دکربوکسیلاز، لایزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دهیدرولاز، اوره‌آز، مصرف سیترات، احیای نیترات، تحمل نمک تا ۳٪ و تخمیر قندهایی مانند گلوکز، سوکروز، مانیتول، اینوزیتول در ۳۱ جدایه تأییدشده با PCR با جداول معتبر همخوانی دارد، اما در ۲۸ جدایه تأیید نشده با PCR در برخی ویژگی‌ها با جداول موجود در منابع تطابق دیده نمی‌شود. بنابراین توصیه می‌گردد از ویژگی‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی یاد شده برای تشخیص باکتریولوژیک باکتری فوق بهره گیری شود .Nielsen و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز به‌منظور تعیین حضور *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان بیمار در چین گزارش نموده‌اند که از ۳۵ جدایه مظنون بعد از انجام PCR تعداد ۶ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* نبوده‌اند. علت این اختلافات ممکن است به این حقیقت برگردد که تشخیص‌های بیوشیمیایی بیشتر بر اساس آنالیز جدایه‌های انسانی بنا شده است و جدایه‌های متعلق به ماهی ممکن است در چند مشخصه بیوشیمیایی متفاوت باشند (Haenninen و همکاران، ۱۹۹۴). در تحقیق Castro-Escarpulli و همکاران در سال ۲۰۰۳، نیز از تعداد ۸۲ جدایه متعلق به جنس آئروموناس، تعداد ۱۷ جدایه با آزمایشات بیوشیمیایی به عنوان گونه *آئروموناس هیدروفیلا* بوده‌اند که پس از انجام آزمایش مولکولی فقط تعداد ۲ جدایه (معادل ۲/۵٪ از کل موارد) به‌عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* تأیید شده‌اند.

در مطالعه حاضر تمامی ۳۱ جدایه تأییدشده ازنظر آزمون آرژینین دکربوکسیلاز مثبت و ۸۰ درصد نمونه‌ها لایزین دکربوکسیلاز مثبت بودند که این نتایج نیز با تحقیق Nielsen و همکاران (۲۰۰۱) و علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) مطابقت دارد، اما در ۲۸ جدایه تأیید نشده ازنظر *آئروموناس هیدروفیلا*، ۷۵٪ جدایه‌ها ازنظر آرژنین دکربوکسیلاز و ۷۱/۴۲٪ جدایه‌ها ازنظر لایزین دکربوکسیلاز مثبت بودند. در تحقیقات انجام‌شده معمولاً *آئروموناس هیدروفیلا* به‌عنوان یک

لایزین دکربوکسیلاز و آرژینین دکربوکسیلاز مثبت معرفی می‌شود و این ویژگی معمولاً به‌عنوان مشخصه بیوشیمیایی در تشخیص این باکتری است (Qian و همکاران، ۱۹۹۷؛ Millership و همکاران، ۱۹۹۶). Austin و Austin در سال ۲۰۰۷ و Buller در سال ۲۰۰۴ عنوان کردند که ۱۰۰ درصد جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* ازنظر آزمون آرژنین دکربوکسیلاز و ۵۵ تا ۹۶ درصد جدایه‌ها ازنظر آزمایش توانایی دکربوکسیلاسیون لایزین مثبت هستند.

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که حتی در بین جدایه‌های تایید شده از نظر بعضی از آزمایش‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندها تفاوت‌هایی وجود دارد به‌طوری‌که ۱۳ جدایه از نظر حداقل ۸ آزمایش اصلی شامل: حرکت(+)، تولید ایندول (+)، مصرف سیترات (+)، تولید اوره‌آز (−)، تحمل نمک (تا ۳٪)، تولید آرژینین دهیدرولاز (+)، تولید لایزین دکربوکسیلاز (+)، تولید اورنیتین دکربوکسیلاز(−) و احیای نیترات (+) کاملا مشابه بودند. همانگونه که مشخص شد جدایه‌ها از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی دارای تنوع هستند که خود چالش بزرگی در تشخیص‌های باکتریولوژیکی معمول می‌باشد.

از آنجایی‌که تشخیص سریع باکتری‌های بیماریزا در تشخیص به موقع بیماری‌ها اهمیت فراوان دارد و روش‌های معمول جداسازی و شناسایی در تشخیص باکتری‌ها خسته کننده و وقت گیر است، تکثیر ردیف نوکلئوتیدی اختصاصی DNA بوسیله آزمایش PCR یک روش حساس و دقیق و اختصاصی جهت تشخیص میکروارگانیسم‌ها فراهم آورده است (Swaminathan و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو ژن لیپاز و 16S rRNA در تشخیص باهم تطابق کامل ندارند. همان‌طور که از نتایج مشخص است همه ۳۱ جدایه دارای ژن لیپاز (۱۰۰٪) ولی در ۲۱ جدایه از ۳۱ جدایه (معادل ۶۷/۷۴٪) هر دو ژن حضور داشتند که احتمالاً با شرایط

آزمایش PCR که در این مطالعه استفاده گردید، پرایمرهای مربوط به ژن لیپاز حساسیت بیشتری برای تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا*دارد، که این نتیجه با نتایج تحقیقی که Lee و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر روی شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* در قزل‌آلای رنگین‌کمان در کره انجام داده‌اند مطابقت دارد. این محققین نیز بعد از استفاده از دو پرایمر ژن لیپاز و ۱۶S rRNA جهت شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* نشان داده‌اند که حساسیت ژن لیپاز بالاتر می‌باشد. Cascon و همکاران در سال ۱۹۹۶ از ژن لیپاز برای تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا*استفاده نموده و عنوان کرده‌اند که یک قطعه bp ۷۶۰ فقط در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* مربوط به تکثیر ژن لیپاز می‌باشد، شناسایی می‌شود. Swaminathan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ از همین زوج پرایمر ژن لیپاز که توسط Cascon طراحی‌شده بود جهت تشخیص و ردیابی *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده نموده‌اند و این پرایمرها را برای ردیابی اختصاصی *آئروموناس هیدروفیلا* موفقیت‌آمیز دانسته‌اند. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر، تطابق دارد. Castro-Escarpulli و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز نشان داده‌اند که در همه جدایه‌های تایید شده *آئروموناس هیدروفیلا*، ژن لیپاز نیز حضور دارد.

در مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران برای تعیین هویت جدایه‌های مظنون به *آئروموناس هیدروفیلا* از دو زوج پرایمر و PCR استفاده گردید. نتایج PCR برای تشخیص جنس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا* نشان داد که پرایمرهای استفاده‌شده با سایر باکتری‌های گرم منفی که به‌عنوان کنترل منفی استفاده شدند، هیچ‌گونه واکنش ندارند و این اطمینان حاصل گردید که، روش فوق روشی سریع، دقیق و حساس است که قابل جایگزین شدن به جای روش‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی است.

با توجه به رشد سریع آبزی پروری در کشور به خصوص سیستم پرورش گرم‌آبی و همچنین گسترش بیماری‌های عفونی از جمله سپتی‌سمی‌های آئروموناسی دست‌یابی به روش‌های سریع و دقیق شناسایی عوامل بیماریزا کمک شایانی به پیاده‌سازی پروتکل‌های درمانی و پیشگیرانه مناسب دارد، بنابراین در تشخیص بیماری‌های عفونی آبزیان، توصیه به استفاده از روش‌های مولکولی سریع از جمله PCR است. در مجموع با توجه به نقش قابل توجه آئروموناس‌ها و *آئروموناس هیدروفیلا* در تلفات کپورماهیان استان خوزستان توصیه به اقدام‌های پیشگیرانه این خصوص می‌گردد.

ب- فراوانی عوامل حدت در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلای* جدا شده از سپتی‌سمی کپورماهیان

ب – ۱- فراوانی ژن‌های همولایزین و ایرولایزین

بیماری‌زایی *آئروموناس هیدروفیلا به عوامل* حدت مختلفی از جمله همولایزین، ایرولایزین، سایتوتوکسین، هماگلوتینین، پروتئین غشای سطحی و آنزیم‌هایی مانند پروتئاز و الاستاز وابسته است (Lee و همکاران، ۲۰۰۰؛ Aslani و همکاران، ۲۰۰۴). ردیابی و تشخیص مارکرهای حدت به‌وسیله PCR به‌عنوان یک جزء کلیدی در تعیین بیماری‌زایی باکتری‌ها به‌حساب می‌آید و نتیجه خوب این روش و صرفه‌جویی در هزینه ارجحیت آن را بر روش‌های سنتی تعیین حدت (تعیین LD_{50}) نشان داده است (Nam و همکاران، ۲۰۰۷؛ Yousr و همکاران، ۲۰۰۷؛ Shome و همکاران، ۲۰۰۵). توانایی ردیابی ژن‌های حدت آئروموناس‌ها به‌وسیله ردیابی سه گروه

از مارکرهای حدت ازجمله ایرولایزین‌ها، همولایزین‌ها و انتروتوکسین‌ها با PCR را یک راه جالب برای تشخیص مستقیم بیماری‌زایی آئروموناس‌های جداشده، دانسته‌اند (Kingombe و همکاران، ۱۹۹۹). Yousr و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز عنوان کرده‌اند که غربالگری ژن‌های سایتوتوکسین و همولایزین بهترین راه برای تشخیص آئروموناس‌های حاد است. عنوان کرده‌اند که روش غربالگری ژن‌های ایرولایزین، همولایزین و سایتوتوکسین‌های اختصاصی با PCR یک روش مطمئن برای تعیین بیماری‌زایی بالقوه گونه‌های آئروموناس است (Aslani و همکاران، ۲۰۰۴؛ Kingombee و همکاران، ۱۹۹۹ ؛ Uma و همکاران، ۲۰۱۰). ژن‌های ایرولایزین و همولایزین به‌عنوان ژن‌های غالب در *آئروموناس هیدروفیلا* گزارش‌شده‌اند (shome و همکاران، ۲۰۰۵). این دو ژن مسئول توکسین‌های همولیتیک هستند و سویه‌های حاد *آئروموناس هیدروفیلا* هر دو همولایزین را تولید می‌کنند. این توکسین‌ها با هم باعث همولیز و کشندگی سلولی می‌شوند (Wong و همکاران، ۱۹۹۶؛ Erova و همکاران، ۲۰۰۷؛ Aoki و Hirono، ۲۰۰۶).

با توجه به مطالعات یاد شده، در مطالعه حاضر نیز از این ژن‌ها جهت تشخیص سریع آئروموناس‌های حاد استفاده گردید. بررسی حضور ژن‌های همولایزین و ایرولایزین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای این ژن‌ها، در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* با PCR نشان داد که، به‌ترتیب ۵۸/۰۶٪ و ۵۱/۶۱٪ از جدایه‌ها از نظر حضور ژن‌های فوق مثبت بوده و ۴۱/۹۳٪ از جدایه‌های دخیل در سپتی‌سمی آئروموناسی از نظر هر دو ژن همولایزین و ایرولایزین مثبت می‌باشند. در مطالعات مشابه صورت گرفته درصدهای متفاوتی از فراوانی این ژن‌ها در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* ذکر شده است که علت تفاوت می‌تواند به موقعیت زمانی و مکانی جدایه‌های مورد مطالعه و تفاوت در نوع پرایمرهای مورد استفاده مربوط باشد. Yogananthو

همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده‌اند که ۵۰٪ از جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* آزمایش‌شده حاوی ژن‌های همولایزین و ایرولایزین بوده‌اند که تقریبا با مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین Yousrو همکاران در سال ۲۰۰۷ ژن‌های ایرولایزین و همولایزین را در *آئروموناس هیدروفیلا*های جداشده بررسی کرده‌اند و دریافته‌اند که ۵۲/۶۳٪ از جدایه‌ها دارای ژن‌های همولایزین و ایرولایزین بوده‌اند. Ye و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که ۸۵ درصد از جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلای* جدا شده از کپورماهیان دارای سپتی‌سمی هموراژیک از نظر حضور ژن ایرولایزین مثبت بوده‌اند. که نسبت به مطالعه حاضر فراوانی بیشتری برای این ژن را گزارش نموده‌است. در تحقیقی کهCastro-Escarpulli و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام داده‌اند مشخص شده است که ۱۰۰ درصد جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلای* جدا شده از ماهیان تیلاپیای بیمار دارای ژن همولایزین و ایرولایزین می‌باشند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، از ۳۱ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* تعداد ۱۹ (۶۱/۲۹٪) جدایه همولیز بتا دارند که از بین این ۱۹ جدایه، تعداد ۱۱ جدایه (۵۷/۸۹٪)، دارای هردو ژن همولایزین و ایرولایزین و تعداد ۸ جدایه حداقل یکی از دو ژن را دارا بودند. در توافق با مطالعه حاضر Wongو همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش نموده‌اند که غیرفعال کردن هر یک از توکسین‌های همولایزین ایرولایزین به‌تنهایی باعث حذف فعالیت همولیتیکی و سمیت سلولی نمی‌شود و این فعالیت‌ها فقط هنگامی‌که هر دو ژن حذف شوند، غیرفعال می‌گردد. Aslani و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داده‌اند که ۸۹ درصد از جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* جداشده از موارد اسهال در انسان همولیز بتا را بر روی محیط آگار خون‌دار نشان می‌دهند ولی ۷۸/۶٪ درصد از جدایه‌ها هر دو ژن را دارا می‌باشند. به‌طوریکه ۸۵/۷٪ درصد از نظر حضور ژن

ایرولایزین و ۹۲/۸٪ از نظر ژن همولایزین مثبت بوده‌اند. ممکن است، تفاوت در منشا جدایه‌ها علت تفاوت مطالعه حاضر با مطالعه یاد شده باشد. در مطالعه Aslani و همکاران جدایه‌هایی گزارش گردیده است که فاقد فعالیت همولیتیکی بوده اما واجد حداقل یکی از ژن‌های همولایزین و ایرولایزین بوده‌اند که در مطالعه حاضر نیز دو جدایه دارای چنین خصوصیتی بودند.

ب-۲- فراوانی ژن سایتولیتیک انتروتوکسین

فراوانی حضور ژن سایتولیتیک انتروتوکسین در مطالعه حاضر ۷۴/۱۹٪ برآورد گردید. تعداد ۲۳ جدایه از ۳۱ جدایه تأیید شده، تولید باندی با وزن مولکولی bp ۴۸۲ کردند که نشان‌دهنده‌ی حضور ژن سایتولیتیک انتروتوکسین بود. Ye و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص نموده‌اند که ۳۵ درصد جدایه‌های *آئرومونـاس هیدروفیلا* جدا شده از موارد سپتی‌سمی در کپورماهیان دارای ژن سایتولیتیک انتروتوکسین می‌باشند که شاید تفاوت میزان فراوانی ژن فوق در دو مطالعه، بخاطر موقعیت متفاوت زمانی و مکانی تحقیق یاد شده و تفاوت در نوع پرایمرهای مورد استفاده باشد.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر مشخص شد که تعداد ۱۳ جدایه (معادل ۴۱/۹۳٪) دارای ژنوتیپ $hlyA^+\ aerA^+\ act^+$، ۱۳ جدایه (معادل ۴۱/۹۳٪) $hlyA^+\ aerA^+$، ۱۶ جدایه (۵۱/۶۱٪) $hlyA^+\ act^+$ و تعداد ۱۴ جدایه (۴۵/۱۶٪) $aerA^+\ act^+$ هستند یعنی بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ $hlyA^+\ act^+$ بود. Aslani و همکاران در سال ۲۰۰۴ در تحقیقی که بر روی موارد انسانی انجام داده‌اند گزارش کرده‌اند که بیشترین ژنوتیپ در بین جدایه‌های منجر به اسهال در انسان مربوط به ژنوتیپ $hlyA^+\ aerA^+$ با فراوانی ۷۸/۶٪ است، که این میزان از نتیجه

به‌دست آمده از مطالعه حاضر بیشتر است که احتمالا به‌دلیل تفاوت در منشا جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* باشد.

ب- ۳ – فاکتورهای حدت فنوتیپی و LD_{50}

فعالیت پروتئولیتیکی *آئروموناس هیدروفیلا* با توانایی آن برای تحریک بیماری‌زایی در ماهی ارتباط دارد (Austin و Adams، ۱۹۹۶). حدس زده می‌شود که آنزیم‌های پروتئولیتیک پاتوژن‌های ماهی مانند *آئروموناس هیدروفیلا* یک نقش مهمی در ایجاد تخریب بافتی در میزبان و تسهیل استقرار عامل عفونی دارند. وجود توام فعالیت پروتئازی و فعالیت همولیتیکی در *آئروموناس هیدروفیلا* باعث افزایش قدرت بیماری‌زایی آن می‌شود (Pandy و همکاران، ۲۰۱۰).

در بررسی فاکتورهای حدت به‌روش فنوتیپی، فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها به‌وسیله روش تعیین توانایی هضم کازئین و ژلاتین ارزیابی گردید. میزان ۵۴/۸۳٪ از جدایه‌ها ازنظر ژلاتیناز مثبت و ۸۳/۸۷٪ از جدایه‌ها ازنظر کازئیناز مثبت بودند. Castro-Escarpulli و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داده‌اند که ۶۱٪ از جدایه‌های جنس آئروموناس تولید کازئیناز و ۹۶٪ تولید ژلاتیناز می‌نمایند و نتیجه‌گیری کرده‌اند که بررسی وجود ژلاتیناز برای ارزیابی فعالیت پروتئولیتیکی بهتر است.

در مطالعه حاضر در ۷۷/۴۱٪ جدایه‌های موردمطالعه فعالیت نوکلئازی مشاهده شد. Castro-Escarpulli و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ نشان داده‌اند که ژن‌های کد کننده نوکلئاز در ۸۳٪ از جدایه‌ها وجود دارد، اگرچه ممکن است فعالیت نوکلئازی در تمام جدایه‌ها مشاهده نگردد.

در تحقیق حاضر بیش از نیمی از جدایه‌ها (۷۰/۹۶٪) دارای توانایی جذب رنگ کونگورد بودند که با تحقیقی که Castro-Escarpulli و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام داده‌اند، مطابقت دارد. محققین نشان داده‌اند که حدت باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ایی مانند یرسینیا، ادواردزیلا، شیگلا، *ویبریو کلرا* و... به علت توانایی آن‌ها برای جذب رنگ کونگورد است (Nataro و Kaper، ۱۹۹۸؛ Ling و همکاران، ۲۰۰۰). در باکتری شیگلا و یرسینیا توانایی جذب رنگ وابسته به حضور پلاسمید حدت است. Statner و همکاران در سال ۱۹۸۷ نشان داده‌اند که تمامی جدایه‌های متحرک آئروموناس که از منابع مختلف جمع‌آوری‌شده بودند، دارای توانایی جذب رنگ کونگورد بوده‌اند که به دنبال این نتیجه دو فرضیه را عنوان نموده‌اند که شاید تمام این جدایه‌ها بیماری‌زای روده‌ای هستند و یا این‌که این فاکتور نشانگر حدت مناسبی برای این گروه از باکتری‌ها نیست (Statner و همکاران، ۱۹۷۸).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده LD_{50} جدایه انتخاب‌شده که دارای بیشترین فاکتور حدت بود معادل CFU/ml $^{۸/۵}$ ۱۰ × ۱ بود. ازآنجایی‌که LD_{50} *آئروموناس هیدروفیلا* بالا است و این باکتری به‌طورمعمول در محیط‌های آبی وجود دارد، می‌توان نتیجه گرفت که تلفات ناشی از این باکتری به‌وسیله استرس‌های شدیدی مانند تراکم بالا و کاهش کیفیت آب ایجاد می‌شود. این یافته‌ها یک زنگ خطر برای پرورش‌دهنده است که ممکن است باکتری‌های فرصت‌طلب مانند *آئروموناس هیدروفیلا* فعال شده و باعث ایجاد تلفات شدید و ضرر و زیان اقتصادی جبران‌ناپذیری شوند (Sundus و همکاران، ۲۰۱۲).

ج – ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی

در حال حاضر راه اصلی کنترل بیماری‌های باکتریایی آبزیان درمان آنتی‌بیوتیکی با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل سولفانامیدها، نیتروفوران‌ها و اعمال اصول مدیریتی است (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰؛ Peyghan و همکاران، ۲۰۱۰). در سیستم پرورش، عفونت‌های ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* به‌علت مقاومت این پاتوژن به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌سختی درمان می‌شود و نیاز به یک روش جایگزین دارد (Shariff و همکاران، ۱۹۹۸).

واکسیناسیون علیرغم هزینه‌بر بودن، بسیار مؤثر بوده و در حال حاضر یک بخش مهمی از فعالیت‌های آبزی‌پروری شده است (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹). متأسفانه تمامی واکسن‌های تجاری موجود در بازار، در برابر سویه‌های رایج در مناطق جغرافیایی و کشورهای خاصی ساخته‌شده و در برابر سویه‌های مناطق دیگر کارایی مناسبی ندارند، بنابراین لازم است در هر منطقه واکسن‌هایی از جدایه‌های بومی ساخته شود (علیشاهی، ۱۳۸۸). اگرچه واکسیناسیون آزمایشی برای جلوگیری از *آئروموناس هیدروفیلا* در گونه‌های مختلف آزمایش‌شده است (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹)، ولی در مورد *آئروموناس هیدروفیلا*، هنوز یک واکسن مناسب تجاری به علت تفاوت‌های سرولوژی و فنوتیپی ساخته نشده است (Cascon و همکاران، ۱۹۹۶؛ Poobalane و همکاران، ۲۰۱۰؛ Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹).

در تحقیق حاضر ایمن‌سازی با باکترین تهیه شده از یک جدایه‌ی محلی حاد انجام شد و سپس عیار آنتی‌بادی موجود در خون توسط روش الایزا و میزان محافظت به‌وسیله روش چالش ارزیابی گردید.

ج – ۱- ایمنی‌زایی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان عیار آنتی‌بادی در ۴ هفته پس از ایمن‌سازی به بالاترین میزان خود می‌رسد و بیشترین عیار آنتی‌بادی مربوط به گروه ایمن شده با باکترین به‌همراه ادجوانت است. بررسی‌های آماری نشان داد که میزان آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در سرم ماهیان تلقیح شده مورد آزمایش بر اساس نسبت S/P چه در هفته چهارم و چه در هفته هشتم پس از ایمن‌سازی در گروه ایمن شده با باکترین به همراه ادجوانت بالاترین میزان را در بین تیمارها داشته است که البته با گروه ایمن شده با باکترین به‌تنهایی اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). Ismail و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز نشان داده‌اند که میزان عیار آنتی‌بادی ماهیان ایمن شده با باکترین حاصل از *آئروموناس هیدروفیلا* در هفته سوم و چهارم بعد از ایمن‌سازی به بالاترین میزان خود می‌رسد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در توافق با نتایج مطالعه حاضر می‌توان به تحقیقی که توسط Osman و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شده است نیز اشاره کرد؛ این محققین نشان داده‌اند که، در ۴ هفته پس از ایمن‌سازی عیار آنتی‌بادی به بالاترین میزان خود می‌رسد و در هفته ۶ پس از ایمن‌سازی پایین‌ترین عیار آنتی‌بادی مشاهده می‌گردد. محققین دیگری ازجمله Shome و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Lamers و همکاران در سال ۱۹۸۵ نیز نشان داده‌اند که میزان عیار آنتی‌بادی در ۴ هفته پس از ایمن‌سازی به بالاترین میزان می‌رسد که نتایج این محققین نیز در راستای مطالعه حاضر می‌باشد.

در مطالعه‌ی بر روی ایمن‌سازی ماهی تیلاپیا، بعد از ایمن‌سازی ماهیان تیلاپیا با CFU/ml ۱×۱۰^{۸} از باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش عیار آنتی‌بادی در ۲ الی ۳ هفته بعد از واکسیناسیون به روش داخل صفاقی مشاهده شده است (Bailone و همکاران، ۲۰۱۰). Swain و

همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز افزایش عیار آنتی‌بادی را ۴ هفته پس از ایمن‌سازی در کپور ماهی هندی روهو مشاهده کرده‌اند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد؛ اما در تحقیقی که توسط اخلاقی در سال ۱۳۷۹ انجام گرفته، میزان آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی بالاتر از روز ۴۵ گزارش شده است که با مطالعه‌ی جاضر هم‌خوانی ندارد.

نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر مشخص کرد که ماهیان قبل از ایمن‌سازی هم دارای مقداری آنتی‌بادی اختصاصی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* هستند که احتمالاً به دلیل حضور دائم باکتری در محیط‌های آبزی باشد. این نتایج با نتایج Ismail و همکاران در سال ۲۰۱۰ و Badran و همکاران در سال ۱۹۹۱ مطابقت دارد. ایشان عنوان کرده‌اند که آنتی‌بادی طبیعی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* درنتیجه برخورد ماهیان سالم با این باکتری حاضر در محیط زندگی ماهی است و اگر این میزان خیلی بالا باشد، می‌تواند به علت تماس‌های طولانی‌مدت ماهی با این باکتری باشد که نشانگر کیفیت پایین آب سیستم پرورشی است (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰).

ج – ۲- میزان محافظت‌کنندگی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد تلفات در گروه ایمن شده با باکترین به‌همراه ادجوانت معادل ۱۰٪ و در گروه ایمن شده با باکترین به‌تنهایی معادل ۱۶/۶۶٪ است. همچنین میزان محافظت ناشی از باکترین به‌همراه ادجوانت ۸۶/۹۵٪ و ناشی از باکترین به‌تنهایی ۷۸/۲۶٪ بود. از آنجا که محافظت (RPS) بالای ۶۰٪ را می‌توان محافظت قابل قبول دانست (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰) نتیجه‌گیری می‌شود، محافظت قابل قبولی ایجاد شده است. بررسی‌های آماری نشان داد که بین دو گروه ایمن شده با باکترین و باکترین به‌همراه ادجوانت در درصد تلفات و

میزان محافظت اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P<۰/۰۵) هرچند که میزان محافظت در گروهی که باکترین به‌همراه ادجوانت دریافت کرده بودند بالاتر از گروه ایمن شده با باکترین به‌تنهایی بود. تحلیل آماری نشان داد، بین گروه‌های ایمن شده با باکترین چه همراه با ادجوانت و چه بدون ادجوانت با گروه‌های دریافت‌کننده PBS همراه با ادجوانت و بدون ادجوانت، اختلاف معنی‌داری در درصد تلفات تجمعی و میزان محافظت (RPS) وجود دارد (P<۰/۰۵). Dehghani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده‌اند که میزان محافظت در قزل‌آلاهای ایمن شده با *آئروموناس هیدروفیلا* کشته شده با حرارت، معادل ۸۴٪ است که به‌طور معنی‌داری بالاتر از باکترین غیرفعال شده با فرمالین و واکسن تهیه‌شده از لیپوپلی‌ساکارید باکتری بوده است. به‌طوری‌که میزان محافظت در گروه ایمن شده با باکترین فرمالینه و لیپوپلی‌ساکارید به‌ترتیب معادل ۶۷٪ و ۳۴٪ بوده است. Ibrahim و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده‌اند که میزان محافظت باکترین تهیه‌شده از *آئروموناس هیدروفیلا* درصورتی‌که به‌تنهایی و به روش داخل عضلانی استفاده شود حدود ۸۸/۸٪ و اگر همراه با ادجوانت استفاده گردد این میزان به ۹۱/۱٪ افزایش می‌یابد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Ismail و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ میزان محافظت باکترین فرمالینه *آئروموناس هیدروفیلا* را در ماهی تیلاپیا به روش تزریقی، غوطه‌وری و خوراکی به‌ترتیب معادل ۹۰/۲٪، ۸۶/۸٪ و ۸۶/۸٪ گزارش کرده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین میزان محافظت در بین روش‌های مختلف واکسیناسیون وجود ندارد. در تحقیق دیگری که از واکسن مونووالان *آئروموناس هیدروفیلا* به روش غیرفعال سازی با فرمالین استفاده کرده‌اند، میزان محافظت حدود ۸۹٪ گزارش شده و عنوان گردیده که میزان محافظت در این روش بالاتر از زمانی است که از واکسن پلی والان ضد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده می‌شود (Osman و

همکاران، ۲۰۰۹). در توافق با نتایج مطالعه حاضر می‌توان به نتایج تحقیق Shome و همکاران در سال ۱۹۹۹ اشاره کرد که نشان داده‌اند که میزان محافظت باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* در سه گونه ماهی مریگال[1]، کاتلا[2] و گربه‌ماهی روگاهی[3] به روش غوطه‌وری به‌ترتیب ۴۰٪، ۲۵٪ و ۲۰٪ و در روش داخل صفاقی به‌ترتیب ۶۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ بوده است؛ و عنوان شده است که اگر واکسن کشته به‌روش داخل صفاقی تزریق شود، محافظت کافی و خوبی ایجاد می‌گردد.

نتایج حاصل از تحقیقات Paterson و Fryer، Olivier و همکاران به ترتیب در سال‌های ۱۹۷۴ و ۱۹۸۵ مبنی بر بهبود پاسخ ایمنی در اثر استفاده از ادجوانت کامل فروند همراه با واکسن *آئروموناس سالمونیسیدا* در ماهی آزاد، از اولین گزارش‌ها در رابطه با تأثیر ادجوانت فروند در ماهی می‌باشند. Gelderen و همکاران در سال ۲۰۰۹، واکسنی را جهت حفاظت ماهی آزاد اصیل در مقابل *تناسیباکولوم ماریتیموم*[4] مورد آزمایش قرار دادند و بهترین نتایج را از تیمار دریافت-کننده‌ی واکسن به همراه ادجوانت ناقص فروند به دست آوردند، البته اثرات جانبی مضر مانند التهاب موضعی نیز برای این ادجوانت گزارش گردید. Sun و همکاران در سال ۲۰۱۱، بیشترین حفاظت ماهی کفشک در مقابل بیماری را توسط واکسن دوگانه‌ی *ادواردزیلا تاردا*[5] و *ویبریو آنگوئیلاروم* به همراه ادجوانت ناقص فروند گزارش کرده‌اند. Jiao و همکاران در سال ۲۰۱۰ عملکرد مثبت ادجوانت فروند را در ماهی کفشک ژاپنی تائید نموده و در مقایسه‌ی آن با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، عملکرد ادجوانت فروند را مؤثرتر گزارش نموده‌اند. در تحقیقی که توسط Ibrahim و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شده است، نتایج نشان داده که در ماهیان تیلاپیایی که با

1. *Merigal*
2. *Catla*
3. *Channel Catfish*
4. *Tenacibaculum maritimum*
5. *Edwardsiella tarda*

باکترین به همراه ادجوانت کامل فروند به روش زیرپوستی و داخل عضلانی ایمن شوند، زخم‌ها و جراحاتی در محل تزریق ایجاد می‌شود که این جراحات در گروه‌های کنترلی هم که سرم فیزیولوژی به همراه ادجوانت کامل فروند دریافت کنند هم مشاهده می‌شود؛ و عنوان کرده‌اند که ادجوانت فروند دارای آثار تخریبی در ماهی فوق است که این یافته با نتایج Press و همکاران در سال ۱۹۹۵ مطابقت دارد. همچنین Smith در سال ۱۹۹۰ یکی از اثرات منفی ادجوانت کامل فروند را دشواری در مخلوط کردن آن با ماده ایمونوژن مطرح کرده است و عنوان شده است که این آجوانت باعث نکروز بافتی در محل تزریق می‌شود، اما در مطالعه حاضر هیچ‌گونه آثار تخریبی و جراحت و زخم در ناحیه تزریق مشاهده نشد که این نتیجه با نتایج تحقیق Thune و همکاران در سال ۱۹۸۲ هنگامی‌که از باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* به همراه ادجوانت کامل فروند به روش داخل صفاقی استفاده کرده‌اند، مطابقت دارد. Abdel fatah در سال ۱۹۹۱، ماهیان تیلاپیا را با باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* به همراه ادجوانت کامل و ناقص فروند ایمن کرده و هیچ آثار تخریبی در ناحیه تزریق مشاهده نکرده‌اند. Yin و همکاران نیز در سال ۱۹۹۶ گربه‌ماهیان را به روش داخل صفاقی با ادجوانت مذکور واکسینه کرده و نتایج مشابهی گرفته‌اند. بهر حال تفاوت در شرکت تولید کننده‌ی آجوانت، راه ایمن‌سازی، میزان آجوانت مصرفی، گونه‌ی ماهی و غیره ممکن است باعث این مشاهدات متفاوت باشد.

به‌طورکلی تکنیک‌های مختلفی برای واکسیناسیون اعم از تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری وجود دارد. روش‌های ایمن‌سازی به‌روش غوطه‌وری و خوراکی مزایایی از قبیل آسان بودن، استرس و دست‌کاری کمتر، ارزان بودن، ایده‌آل بودن برای تعداد زیاد ماهی و قابل استفاده بودن برای اندازه‌های مختلف ماهی در سیستم‌های پرورشی بزرگ دارند ولی تأثیر این دو روش بسیار

محدود است (Dehghani و همکاران، ۲۰۱۲؛ Osman و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ismail و همکاران، ۲۰۱۰). یکی از فاکتورهای مهم برای پاسخ ضعیف در واکسیناسیون خوراکی، تخریب آنتی‌ژن در قسمت قدامی دستگاه گوارش قبل از اینکه به محل‌های پاسخ‌دهنده ایمنی برسد، می‌باشد (Osman و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعات زیادی عنوان کرده‌اند که تأثیر واکسیناسیون به‌روش استفاده از واکسن بستگی دارد و بیان کرده‌اند که تأثیر چشمگیر آن زمانی است که واکسن به‌صورت تزریقی استفاده شود (Kim و همکاران، ۲۰۰۰؛ Collado و همکاران، ۲۰۰۰؛ Loghothetis و همکاران، ۱۹۹۴)؛ اما این روش نیز دارای معایبی از قبیل گران بودن، عدم توانایی استفاده در ماهیان زیر ۲۰ گرم می‌باشد (Dehghani و همکاران، ۲۰۱۲).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که میزان محافظت ماهی ایمن شده با *آئرومونا‌س هیدروفیلا* با میزان آنتی‌بادی سرم ارتباط مستقیم دارد. Dehghani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز این یافته را اثبات نموده‌اند. در تحقیقی که Estevez و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام داده‌اند، مشخص شده است که میزان آنتی‌بادی‌های آگلوتینه کننده گردش خون در توربوت‌های ایمن شده به‌روش داخل صفاقی ارتباط معنی‌داری با درجه محافظت ضد عامل بیماری‌زای *ویبریو آنگوئیلاروم* دارد. Osman و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ نشان داده‌اند که عیار آنتی‌بادی ماهیان ایمن شده به روش خوراکی با میزان محافظت این واکسن ارتباط مستقیم دارد. Yin و همکاران در سال ۱۹۹۶ نیز این ارتباط را تأیید کرده‌اند. Baba و همکاران در سال ۱۹۸۸ نتوانسته‌اند هیچ‌گونه آنتی‌بادی ضد لیپوپلی‌ساکارید ناخالص *آئرومونا‌س هیدروفیلا* را با استفاده از آزمایش‌های رسوبی در سرم ماهی نشان دهند ولی محافظت در برابر این واکسن را مشاهده کرده-اند، که این می‌تواند به دلیل نوع آنتی‌ژن، روش ایمن‌سازی و نوع آزمایش‌های رسوبی مورد

استفاده دانست. از دیگر موارد عدم ارتباط بین عیار آنتی‌بادی با میزان محافظت می‌توان به نتایج تحقیق Ismail و همکاران در سال ۲۰۱۰ اشاره کرد که نشان داده‌اند، در ایمن‌سازی به‌روش خوراکی و غوطه‌وری علی‌رغم این‌که عیار آنتی‌بادی پایین است ولی محافظت خوبی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مشاهده می‌شود.

در مجموع مطالعه حاضر مشخص کرد که جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* واجد هر سه ژن حدت، در آزمایش‌های چالشی خیلی حاد ظاهر نمی‌شوند و احتمالا عوامل مستعد کننده‌ای موجود در مزارع باعث بیماریزایی این عامل می‌گردند که ایمن‌سازی با باکترین کشته‌شده با اشعه UV به روش داخل صفاقی می‌تواند به میزان قابل قبولی از آن ممانعت نماید. مشخص شد که مصرف ادجوانت می‌تواند تا حدودی پاسخ ایمنی باکترین همراه با ادجوانت را افزایش دهد ولی این افزایش در مقایسه با باکترین بدون ادجوانت معنی‌دار نمی‌باشد و به‌طورکلی می‌توان عنوان کرد که استفاده از ادجوانت تأثیر چشمگیری در میزان محافظت و عیار آنتی‌بادی ندارد اگر چه استفاده از ادجوانت با روش داخل صفاقی در ماهی کپور با وزنی که در این مطالعه استفاده شد کاملاً بی‌خطر بوده و فاقد عوارض زخم و جراحات در ناحیه تزریق می‌باشد.

پیشنهادها:

با توجه به نتایج این پژوهش موارد زیر پیشنهاد می‌گردد:

۱- استفاده از PCR برای تشخیص سریع و مقرون به صرفه‌تر *آئروموناس هیدروفیلا* .

۲- تهیه و بررسی محافظت‌کنندگی واکسن نوترکیب ضد *آئروموناس هیدروفیلا*.

۳- مقایسه میزان محافظت ایجاد شده به وسیله‌ی واکسن تهیه شده از سلول کامل کشته و واکسن نوترکیب.

۴- بررسی اثربخشی باکترین تهیه شده در مطالعه‌ی حاضر در شرایط مزرعه.

منابع

۱. اخلاقی، مصطفی (۱۳۷۹). ایمنی‌زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ۵۵(۱)، صفحات: ۶۲-۵۵.

۲. آمارنامه شیلات ایران ۱۳۹۱-۱۳۸۱ (۱۳۹۲). روابط عمومی شیلات ایران.۶۴ ص.

۳. پیغان، رحیم (۱۳۸۲). بیماری‌های ماهی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران، اهواز، صفحات: ۱۴-۱.

۴. پیغان، رحیم؛ عبدالله مشایی، مهرداد (۱۳۸۸). پرورش و بیماری‌های ماهی و میگو. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، صفحات: ۳۲۶-۳۲۲.

۵. پیغان، رحیم؛ عبدالله مشایی، مهرداد (۱۳۸۷). مدیریت مزارع پرورشی ماهی گرمابی. چاپ دوم، انتشارات دریا سر، تهران، صفحات: ۶۲-۱۷.

۶. پیغان، رحیم و اسماعیلی، فریبا (۱۳۷۲). آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسم‌های شبیه آئروموناس‌های متحرک، مجله علمی شیلات ایران. ۶(۲)، صفحات: ۸-۱.

۷. توکلی، هادی و اخلاقی، مصطفی (۱۳۸۷). بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمنوگلبولین، گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دنبال عفونت تجربی با *آئروموناس هیدروفیلای* بیماری‌زا، مجله تحقیقات دامپزشکی. ۶۴(۲)، صفحات: ۱۵۷-۱۶۲.

۸. رضویلر، ودود؛ حسنی طباطبایی، عبدالمحمد و آذری تاکامی، قباد (۱۳۶۰). بررسی نقش بیماری‌هایی *آئروموناس هیدروفیلا* در بعضی از بیماری‌های ماهی. پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی از دانشکده دامپزشکی تهران، ۳۷(۲)، صفحات: ۲۱-۳۷.

۹. ستاری، مسعود (۱۳۸۷). بهداشت و بیماری‌های آبزیان. جلد اول، چاپ اول، انتشارات حق-شناس، رشت، صفحات: ۶۶-۶۱، ۸۷ و ۲۲۹-۲۲۳ و ۲۴۳ - ۲۵۱.

۱۰. ستاری، مسعود (۱۳۸۲). ماهی‌شناسی سیستماتیک. جلد دوم، چاپ اول، انتشارات حق-شناس، رشت، صفحات: ۱۸۸– ۱۸۷.

۱۱. سلطانی، مهدی. (۱۳۷۵). بیماری‌های باکتریایی ماهی. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد. صفحه: ۲۳۱.

۱۲. سلطانی، مهدی و ابراهیم‌زاده موسوی، حسین‌علی (۱۳۷۵). جداسازی آئروموناس ورونی و آئروموناس هیدروفیلا از تلفات آمور ماهیان پرورشی در دو کارگاه پرورش ماهی واقع در استان‌های گیلان و تهران، مجله علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز. ۳(۴)، صفحات: ۲۹–۲۴.

۱۳. سلطانی، مهدی (۱۳۸۰). بیماری‌های آزادماهیان. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحات: ۷۹–۷۸.

۱۴. شاهسونی، داور و موثقی، احمدرضا (۱۳۸۱). آسیب‌شناسی سیستمیک ماهی. تألیف: هیو، دبلیو فرگوسن، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد، صفحات: ۴۰–۲۷ و ۱۷۹–۱۷۱.

۱۵. عبدی، کاظم (۱۳۹۰). کتاب جامع بهداشت و بیماری‌های کپورماهیان. چاپ اول، انتشارات پرتو واقعه، تهران، صفحات: ۷۵–۲۱۷.

۱۶. عبدی، کاظم (۱۳۸۵). اطلاعات و کاربرد داروهای آبزیان. چاپ اول، انتشارات پرتوواقعه، تهران، صفحه: ۱۷۶.

۱۷. علیشاهی، مجتبی (۱۳۸۸). مقدمه‌ای بر ایمنی‌شناسی آبزیان. تألیف: پی. سوآین، پی کی. ساهو واس. آیاپان. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، صفحات: ۷۱–۶۱، ۸۲–۸۰، ۱۵۰–۱۴۷، ۳۰۱–۲۹۱.

۱۸. علیشاهی، مجتبی؛ سلطانی، مهدی و زرگر اشکان (۱۳۸۸). بررسی تلفات باکتریایی ماهی آمور در استان خوزستان، مجله دامپزشکی ایران. ۵(۱)، صفحات: ۳۴–۲۵.

۱۹. علیشاهی، مجتبی؛ پیغان، رحیم (۱۳۸۹). بیماری‌های ماهی کپور و سایر کپور ماهیان. تألیف: د. هول، د. بوک، پ. بارگس، ا. ولبی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، صفحات: ۱۰۰-۹۵.

۲۰. غواص علی (۱۳۸۱). بررسی دلیل تلفات ماهی آمور و فیتوفاگ در استان گیلان، دومین کنگره ملی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، اردیبهشت ۱۳۸۱.

۲۱. فرخ‌فر، سمانه (۱۳۸۷). بررسی تأثیر مصرف لوامیزول بر پروفایل‌های لیپیدی سرم خون ماهی کپور معمولی. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی از دانشگاه شهید چمران اهواز، صفحه ۶.

۲۲. فریدپاک، فرهاد (۱۳۸۵). دستورالعمل اجرایی تکثیر و پرورش ماهی‌های گرم‌آبی. چاپ پنجم، انتشارات علمی آبزیان، تهران، صفحات: ۲۶ و ۲۷۳-۲۶۹.

۲۳. قربانپور، مسعود؛ معتمدی، حسین (۱۳۹۰). ایمنی‌شناسی پایه. تألیف: ابول. ک.عباس، اندرو. اچ.لیچمن، چاپ اول، انتشارت دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، صفحات: ۵۲، ۵۴، ۵۹، ۱۲۵، ۴۶۰، ۴۷۰، ۴۷۶، ۵۴۰، ۵۴۱، ۵۴۴.

۲۴. کارگر، روحانی؛ پیغان، رحیم و جهانشاهی، علی‌اکبر (۱۳۷۵). جداسازی یک رئوویروس از ماهیان علفخوار در استان خوزستان، پژوهش و سازندگی. ۳۳، صفحات: ۱۰۴ - ۱۰۵.

۲۵. مخیر، بابا (۱۳۸۹). بیماری‌های ماهیان پرورشی. چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحات:۵۱ -۴۸، ۵۷-۵۴.

۲۶. معینیان میحه‌ای، محمدتقی (۱۳۷۱). اصول پرورشی ماهی و معالجه بیماری‌های ماهیان همراه با معرفی آبزیان تالاب هورالعظیم. چاپ اول، انتشارات گوتنبرگ، صفحات: ۱۸-۱۳.

۲۷. وثوقی، غلام‌حسین و مستجیر، بهزاد (۱۳۸۵). ماهیان آب شیرین ، چاپ هفتم، انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

28. Abdel Fatah, FMA. (1991). Immune response of Tilapia to *Aeromonas hydrophila*. M.V.Sc. Thesis Fac. of Science, Suez Canal University.

29. Albert, MJ.; Ansaruzzaman, M.; Talukder, KA.; Chopra, AK.; Kühn, I.; Rahman, M.; Faruque, ASG.; Islam, MS.; Sack, B.R. and Möllby, R. (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas spp.* isolated fromchildren with diarrhea, healthy controls, and the environment. Journal of Clinical Microbiology, 38: 3785–7790.

30. AL-Fatlawy, HNK. and AL-Ammar, MH. (2013). Molecular study of *Aeromonas hydrophila* isolated from stool samples in najaf (IRAQ). International Journal of Microbiology Research, 5(1) :363-366.

31. Alishahi, M.; Ranjbar, MM.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Razijalali, M. (2010). Effects of dietary Aloe vera on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Researches, 4 (3): 85-91.

32. Aly, SM.; Hekmat, MT.; Badran, AF. and Magda, AE. (2000). Histopathological and immunological response of *Clarias Lazera* to the injection of *Aeromonas hydrophila* vaccine. American College of Veterinary Microbiology Journal ,3(1): 133-144.

33. Amend, DF. (1981). Potency testing of fish vaccines. Developments in Biological standardization, 49: 447-454.

34. Aoki, T. (1999). Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: Woo, P.T.K. and D.W. Bruno, (eds). Fish Diseases and Disorders, 3: 427-454.

35. Aoki, T. and Hirono, I. (2006). "Cloning and characterization of the haemolysin determinants from *Aeromonas hydrophila*," Journal of Fish Diseases, 14(3): 303–312.

36. Aslani, MM.; Hamzeh, HS. (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(4): 199-203.

37. Ausbel, FM.; Brent, R.; Kingstone, RE.; Moore, DD.; Seidman, JG.; Smith, JA. and Struhl, K. (1992). Short protocols in molecular biology. 2nd edition. John Wiley and Sons,: 1-15.

38. Austin B. and Austin DA. (2007). Bacterial Fish Pathogens, 4th ed. Chichester, UK: Springer-Praxis: 81-99, 161-164.

39. Austin, B. and Adams, C. (1996). Fish Pathogens. In: Austin, B., Alt-wegg, M., Gosling, P.J., Joseph, S. (Eds.), The Genus Aeromonas. Wiley, Chichester, : 198 – 243.

40. Azad, IS.; Rajendran, KV.; Rajan, JJS.; Vijayan, KK. and Santiago, TC. (2001). Virulence and histopathology of *Aeromonas hydrophila* (Sah 93) in experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (L.). Journal of Aquaculture in the Tropics, 16:265–75.

41. Baba, T.; Imamura, J. and Lzawa, K. (1988). Immune protection in carp (*Cyprinus Caprio*) after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. Journal of Fish Disease, 11: 237-244.

42. Badran, AF. (19991 – B). Oral vaccination of freshwater fish .(B) Mechanism of protection in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*) orally vaccinated against Motile Aeromonas Septecemia .Journal of Zagazig. Veterinary, 19: 177 – 185.

43. Bailonea, RL.; Martinsa, M.L.; Mouriñoa, JLP.; Vieiraa, FN.; Pedrottia, FS.; Nunesa, GC. and Silva, BC. (2010). Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*). Archives of Medicine Veterinary, 42: 221-227.

44. Buller, NB. (2004). Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals : a practical identification manual. CABI Publishing.: 361.

45. Byars, NE. and Allison, AC. (1990). Laboratory Methods in Immunology, Vol. 1, Zola H ed. CRC Press, Boca Raton, pp:39–51.

46. Cao, HP.; HeSLu, L. and Hou, L. (2010). Characterization and phylogenetic analysis of the bitrichous pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from

diseased Siberian sturgen (*Acipenser baerii*). Journal of Aquaculture Bamidgeh, 62: 182-189.

47. Cascon, A.; Anguita, J.; Hernanz, C.; Sanchez, M.; Fernandez, M. and Naharro, G. (1996). Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. Applied and Enviromental Microbiology, 62 :1167 -1170.

48. Castro-Escarpulli, G.; Figueras, MJ.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Ferna´ ndez-Rendo´ n, E.; Aparicio, GO.; Guarro, J. and Chaco´ n, MR. (2003). Characterisation of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. International Journal of Food Microbiology, 84: 41 – 49.

49. Chacón, MR.; Figueras, MJ.; Castro-Escarpulli, G.; Soler, L. and Guarro, J. (2003). Distribution of Virulence Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Aeromonas spp.* Antonie van Leeuwenhoek.

50. Chang, YC.; Wang, JY.; Selvam, A.; Kao, SC.; Yang, SS. and Shih, DYC. (2008). Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas spp.* fromsuspect food samples in Northern Taiwan. Journal of Food Protection, 71: 2094–2099.

51. Chen, A.; Jiang, Y.; Qian, D.; Chen, C.; Li, A.; Huang, J. and Yang, B. (2011). Freshwater fish bacterial septicemia. China Fish, 3: 54-55.

52. Chopra, AK. and Houston, CW. (1999). Entero toxins in Aeromonas-associated gastroenteritis. Microbes and Infection Journal, 1: 1129-1137.

53. Chopra, AK.; Houston, CW.; Peterson, JW. and Jin, G F. (1993). Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. Canadian Journal of Microbiology, 39: 513–523.

54. Chu, W.H. (2006). A djuvant effect of propolis on immuisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish & Shellfish Immunology, 21:113-117.

55. Chu, WH. and Lu. CP. (2005). Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Journal of Fish Diseases, 28: 437– 441

56. Cipriano, RC. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile septicemias of fish. Revision of Fish Disease Leaflet 68.

57. Collado, R.; Fouz, B.; Sanjuán, E. and Amaro, C. (2000). Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels (*Anguilla anguilla*). Diseases of Aquatic Organisms, 43: 91-101.

58. Dehghani, S.; Akhlaghi, M. and Dehghani, M. (2012). Efficacy of Formalin-Killed, Heat-Killed and Lipopolysaccharide Vaccines Against Motile Aeromonads Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Global Veterinaria, 9 (4): 409-415.

59. Dorsch, M.; Ashbolt, NJ.; Cox, PT. and Goodman, AE. (1994). Rapid identification of Aeromonas species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. Journal of Applied Bacteriology, 77:722–726.

60. Eissa, I. A. M.; Badran, A. F.; Moustafa, M. and Fetaih, H. (1994). Contribution to motile Aeromonas septicaemia in some cultured and wild freshwater fish. Veterinary Medical Journal Giza, 42: 63 - 69.

61. Erova, TE.; Sha, J. and Horneman, AJ. (2007).“Identification of a new hemolysin from diarrheal isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*,” FEMS Microbiology Letters, 275(2): 301–311.

62. Esteve, C.; Amaro, C.; Garay. E.; Santos, Y. and Toranzo, AE. (1995). Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile Aeromonas isolated from eels. Journal of Applied Microbiology ,78:555–62.

63. Esteve, C.; Biosca, EG. and Amaro, C. (1993). Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water. Disease of Aquatic Organisms, 16:15–20.

64. Esteve, G.; Fouz, B. and Amaro, C. (2004). Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. Fish and Shellfish Immunology, 16: 93-105.

65. Estevez, J.; Leiro, J.; Toranzo, AE.; Barja, JL. and Ubeira, F.(1994). Role of serum antibodies in protection of vaccinated turbot (*Scophthalmus maximus*) against vibriosis. Aquaculture, 123 : 197-204.

66. Evensen, O.; Brudeseth, B. and Mutoloki, S. (2005). The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish – effects and adverse effects. Progress in Fish Vaccinology, 16: 117–125.

67. Fang, HM.; Ge, R. and Sin, YM. (2004). Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. Fish and Shellfish Immunology,16 :645–658.

68. FAO.(2012). The state of world fisheries and aquaculture 2012. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome. 197.

69. Freund, J. (1956). The mode of action of immunological adjuvants. Advance Tubercle Research, 7: 130–148.

70. Gailunas, KM. (2003). Use of ultraviolet light for inactivation of Listeria monocytogenes and Lactic acid bacteria species in recycled chill brines. Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University In partial fulfillment of the equirements for the degree of Master of Science in Food Science and Technology.

71. Gelderen, RV.; Carson, J. and Nowak, B. (2009). Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) against marine flexibacteriosis. Aquaculture, 288: 7–13.

72. Ghenghesh, KS.; Ahmed, SF. and Abdel El-Khalek, R. (2008). Aeromonas-Associated Infections in Developing Countries. The Journal of Infection in Developing Countries , 2(2):81-98.

73. Granum, PE.; O'Sullivan, K.; Tomaè s, JM. and Òrmen, Ò. (1998). Possible virulence factors of Aeromonas spp. from food and water. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 21: 131-137.

74. Grizzle, JM. and Kiryu, Y. (1993). Histopathology of gill, liver and pancreas and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. Journal of Aquatic Animal Health, 5: 36 – 50.

75. Groff, JM. and Lapatra, SR. (2000). Infectious diseases impacting the commercial salmonids. Journal of Applied Aquaculture, 10(4): 17-90.

76. Gudmundsdo ´ ttir, BK. (1996). Comparison of extracellular proteases produced by Aeromonas salmonicida strains, isolated from var- ious fish species. Journal of Applied Bacterioloy, 80: 105–113.

77. Gupta, RK.; Relyveld, EH.; Lindblad, EB.; Bizzini, B.; Ben-Efraim, S. and Gupta, CK. (1993). Adjuvants: a balance between toxicity and adjuvanticity. Vaccine, 11 (3): 293–306.

78. Habeeb, F.; Stables, G.; Bradbury, F. and Nong, S. (2007). The inner gel component of Aloe vera suppresses bacterial-induced pro-inflammatory cytokines from human immune cells. Methods, 42: 388–393.

79. Haenninen, ML. (1994). Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources. Journal of Applied Bacterioloy, 76: 455–462.

80. Heuzenroeder, MW.; Wong, CY. and Flower, RL. (1999). Distribution of two haemolytictoxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas spp*.: correlation with virulence in a suckling mouse model. FEMS Microbiological Letters, 174: 131–136.

81. Howard, SP.; Garland, WJ.; Green, MJ. and Buckley, JT. (1987). Nucle-otide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. Journal of Applied Bacterioloy, 169: 2869–2871.

82. Ibrahem, MD.; Arab, RMH.; Mostafa, MM. and Rezk, MA. (2008). Evaluation of different vaccination strategies for control of (Mas) in nile tilapia (*O. Niloticus*) In Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, :1157-1174.

83. Inglis, V.; Roberts, RJ. And Bromage, NR. (1993). Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Science Ltd., U.K.

84. Ismail, NEDA.; Sad, N.; Atta, I.; Aziz, AE. and Ahmed, M. (2010). Oral vaccination of nile tilapia (*Orechromis niloticus*) against motile aeromonas septicaemia. Nature and Science, :21-26.

85. Iwama, G. and Nakanishi, T. (1996). The fish immune system: organism, pathogen and environment. In Iwama, G. and Nakanishi, T. (Eds). Fish physiology, 15, 1st eds, Academic Press, San Diego, PP: 12-42, 64-67, 105-139.

86. Janda, JM. and Abbott, SL. (2010). "The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection," Clinical Microbiology Reviews, 23(1): 35–73.

87. Janda, JM.; Abbott, DSL.; Khashe, S.; Kellogg, GH. and Shimada, T. (1996). Further studies on biochemical characteristics and serological properties of the genus Aeromonas. Journal of Clinical Microbiology, 34: 1930-1933.

88. Jeney, ZS. and Jeney, G. (1995). motile aeromonad septicemia. aquaculture,129:404.

89. Jiao, X.; Cheng, S.; Hu, Y. and Sun, S. (2010). Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. Vaccine, 28: 1832–1837.

90. Kalbassi, MR.; Soltani, M.; Pourbakhsh, SA. and Adams, A. (2000). Humoral Immune Response of Cultured Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) to Four Different *Aeromonas hydrophila* Antigens. Archives of Razi Institute, 51: 75-84

91. Karunasagar, I.; Ali, A. and Otta, S. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with motile aeromonads. Developments in Biological Standardization, 90: 135.

92. Karunasagar, I.; Karunasagar, I. and Otta, SK. (2003). Disease problems affecting fish in tropical environments. Journal of Applied Aquaculture, 13(3/4): 231-249.

93. kautsky, N.; Romback, P.; Tedengren, M. and Troell, M. (2000). Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture ,19: 145-161.

94. Kawula, TH.; Lelivelt, MJ. and Orndorff, PE. (1996). Using a new inbred fish model and cultured fish tissue cells to study *Aeromonas hydrophila* and Yersinia ruckeri pathogenesis. Microbial Pathogenesis, 20: 119-125.

95. Kim, KH.; Hwang, YJ.; Cho, JB. and Park, S.I. (2000). Immunization of cultured juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) against *Microcotyle sebastis* (Monogenea). Diseases of Aquatic Organisms, 29: 40

96. Kingombe, CIB.; Huys, G.; Tonolla, M.; Albert, MJ.; Swings, J.; Peduzzi, R. and Jemmi, T. (1999). PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in *Aeromonas spp.* Applied and environmental microbiology, 65(12): 5293–5302

97. Kirov, SM.; Tassell, BC.; Semmler, ABT.; O'Donovan, LA.; Rabaan, AA. and Shaw, JG. (2002). Lateral flagella and swarming motility in Aeromonas species. Journal of Bacteriology, 184:547-55.

98. Lamers, C.; De Haas, M. and Van Muiswinkel, W. (1985). Humoral response and memory formation in carp after injection of *Aeromonas hydrophila* bacterin. Developmental and Comparative Immunology, 9: 65.

99. Lee, S.; Kim, S.; Oh, Y. and Lee, Y. (2000). Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Rainbow Trouts in Korea. The Journal of Microbiology, 38(1): 1-7.

100. Ling, MHS.; Wang, XH.; Xie, I.; Lim, TM. and Leung, KY. (2000). Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in vivo and in vitro fish models. Microbiology, 146:7 – 19

101. Loghothetis, P. and Austin, B. (1994). Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 4: 239-254.

102. Maji, S.; Mali, P. and Joardar, SN. (2006). Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.). Fish and Shellfish Immunology, 20: 462–73.

103. Mateos, D.; Anguita, J.; Naharro, G. and Paniagua, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. Journal of Applied Bacterioloy, 74:111-8.

104. Merino, S.; Aguillar, A.; Rubires, X. and Tomàs, JM. (1998). Mesophilic Aeromonas strains from different serogroups: the influence of growth temperature and osmolarity on lipopolysaccharide and virulence. Research in Microbiology, 149: 407–416.

105. Millership, SE. (1996). Identification. In: Austin B et al., eds. The genus Aeromonas. London, Wiley: 85–107.

106. Montet, D. and Ray, CR. (2009). Aquaculture Microbiology and Biotechnology, Vol. 1, 1st ed., Science Publisher, New York, PP: 83-85 .

107. Nam, IY. and Joh, K .(2007). Rapid Detection of Virulence Factors of Aeromonas Isolated from a Trout Farm by Hexaplex-PCR. The Journal of Microbiology, 45(4): 297-304

108. Nataro , JP. and Kaper, JB. (1998). Diarrhea genic *Escherichia coli* .Clinical Microbiology, 11: 142 – 201.

109. Nayak, KK.; Mukherjee, SC. And Das, B.K. (1999). Observation on different strains of *Aeromonas hydrophila* from various diseased fishes. The Indian Journal of Fisheries, 46(3): 245-250.

110. Nelson, JS. (2006). Fishes of The World, 4th ed., John Wiley & Sons Inc publisher, New Jersey, pp: 138-148.

111. Newman, SG. (1993). Bacterial vaccines of fish. Annual Review of fish diseaes, 3: 145-186.

112. Nielsen, MW.; Hoi, L.; Schmidt, AS.; Qian, D.; Shimada, T.; Shen, JY. and Larsen, JL. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile Aeromonas species that causes disease outbreaks in aquaculture in the Zhejiang Province of China? Disease of Aquatic Organisms, 46: 23-29.

113. Noga, EJ. (1996). Fish Disease: diagnosis and treatment. MoshyYear book, Inc, Naples, Tokyo, New York pp. 294 .

114. Olivier, G.; Evelyn, TPT. and Lallier, R. (1985). Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. Developmental and Comparative Immunology, 9: 419–432.

115. Ortega, C.; Uzquiz, J.; Docando, E.; Planas, JL.; Alonso and Simon, MC. (1995). Ecopathology in aquaculture: risk factors in infectious disease outbreak. Veterinary Research, 26 (1) : 57-62.

116. Osman, KM.; Mohamed, LA.; Abdel Rahman, EH. and Soliman, WS. (2009). Trials for vaccination of tilapia fish against Aeromonas and Pseudomonas infections using monovalent, bivalent and polyvalent vaccines. World Journal of Fish and Marine Sciences,4(1): 297-304.

117. Ottaviani, D.; Parlani, C.; Citterio, B.; Masini, L.; Leoni, F.; Canonico, C.; Sabatini, L.; Bruscolini, F. and Pianetti, A. (2011). Putative virulence properties of Aeromonas strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. International Journal of Food Microbiology ,144: 538–545.

118. Palumbo, SA.; Bencivengo, MM.; Corral, FD.; Williams, AC. and Buchanan, RL. (1989). Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. Journal of Clinical Microbiology, 27: 854-859.

119. Pandey, A.; Naik, M. and Kumar Dubey, S. (2010). Hemolysin, Protease, and EPS Producing Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Strain An4 Shows Antibacterial Activity against Marine Bacterial Fish Pathogens. Journal of Marine Biology, 2: 1-9.

120. Paniagua, C.; Rivero, O.; Anguita, J. and Naharro, G. (1990). Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas spp.* isolated from a river. Journal of Clinical Microbiology, 28: 350-355.

121. Paterson, WD. and Fryer, JL. (1974). Immune responses of juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch) to *Aeromonas salmonicida* cells administered

intraperitoneally in Freund's complete adjuvant. Journal of Fisheries Research, 31: 1751–1755.

122. Pathania, D.; Katoch, RC.; Mahajan, A.; Sharma, M. and Paul, R. (2007). Etiopathological investigations on clinical dropsy in carps (*Cyprinus carpio*) due to *Aeromonas hydrophila* in Himachal Pradesh .Journal of Fish Diseases, 30(5): 293-301.

123. Petrovsky, N. and Aguilar, JC. (2004). Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Immunology and Cell Biology, 82: 488–496.

124. Peyghan, R.; Khadjeh, GH.; 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.

125. Pirarat, N.; Maita, M.; Endo, M. and Katagiri, T. (2007). Lymphoid apoptosis in *Edwardsiella tarda* septicemia in tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology, 22: 608-616.

126. Pollard, DR.; Johnson, WM.; Lior, H.; Tyler, SD. and Rozee, KR. (1999). Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 28: 2477–2481.

127. Poobalane, S.; Thompson, KD.; Ardó, L.; Verjanc, N.; Han, HJ.; Jeney, G.; Hirono, I.; Aoki, T. and Adams, A. (2010). Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. Vaccine, 28: 3540–3547.

128. Porteen, K.; Agarwal, RK. and Bhilegaonkar, KN. (2006). PCR Based Detection of Aeromonas from Milk Samples. Journal of food Technology, 4(2): 111-115.

129. Press, C.; Llilehaugh, M. and Llilehaugh, A. (1995). Vaccination in European Salmonid Aquaculture: A review of practices and prospects. British Veterinary Journal, 151(1): 45-69.

130. Qian D, Chen Y, Shen J, Shen Z (1997) Studies on the pathogen of fish bacterial septicemia in Zhejiang Province during 1989–1992: Biochemical characteristics, virulence and serogroups of *Aeromonas hydrophila*. In: Yingqi Z, Fuyuan H, Hongqi Z, He C, Chaoqi Y, Fuhui D, Yi L (eds) Proceedings of Fourth Asian Fisheries Forum, Beijing 16–20 Oct 1995. China Ocean Press, Beijing, pp: 242–245

131. Reed, LJ. and Muench, H. (1938). A simple method of stimating fifty percent end points. American Journal of Hygiene, 27: 493-497 .

132. Salyers, AA. and Whitt, DD. (1994). Bacterial Pathogenesis. ASM Press, Washington DC, U.S.A.

133. Santos. Y.; Bandin, I.; Nunez, S.; Nieto, TP. and Toranzo AE. (1991). Serotyping of motile Aeromonas species in relation to virulence phenotype. Bulliten of European Association of Fish Pathology, 11: 153-5.

134. Sen, K. (2005). Development of a rapid identification method for Aeromonas species by multiplex-PCR. Canadian Journal of Microbiology, 51: 957–966.

135. Shariff, M. (1998). Impact of diseases on aquaculture in the Asia-Pacific region as exemplified spizootic ulcerative syndrome. Journal of Applied Ichthyology, 14: 139–44.

136. Sharifi-Yazdi, MK. and Darghahi, H. (2006). Inactivation of pathogenic bacteria using pulsed uv-light and its application in water disinfection and quality control. Acta Medica Iranica, 44(5): 305-308

137. Shimada, T. and Kosako, Y. (1991). Comparison of two O-serotyping systems for mesophilic Aeromonas spp. Journal of Clinical Microbiology, 29: 197-199.

138. Shoemaker, CA.; Klesius, PH. and Evans, JJ. (2002). In ovo methods for utilizing the modified live Edwardsiella ictaluri vaccine against enteric septicemia in channel catfish. Aquaculture, 203: 221-227.

139. shome, BR.; Shome, R.; Mazumder, Y.; Das, A.; Kumar, A.; Rahman, H. and Bujarbaruah, KM. (2005). Abdominal dropsy disease in major carps of

Meghalaya: Isolation and characterization of Aeromonas hydrophila. Current Science, 88(12): 1897-1900.

140. Shome, R. and Shome, BR. (1999). Evaluation of killed *Aeromonas hydrophila* whole cell vaccine against acute infectious abdominal dropsy in indian major carps. Indian Journal of Fisheris, 46(3): 313-317.

141. Sivakumar, SM.; Safhi, M.; Kannadasan, M. and Sukumaran, N. (2011). Revieww Article: Vaccine adjuvants, Current status and prospects on controlled release adjuvancity. Saudi Pharmaceutical Journal, 19: 197–206.

142. Smith, JW. (1990). Purification and functional characterization of Integrin avß5. Journal of Biology Chemistry, 265: 11008-11013.

143. Statner, B. and Lance George, W. (1987). Congo Red Uptake by Motile Aeromonas Species. Journal Of Clinical Microbiology, 25(5): 876-878.

144. Stefaan, V.; Frans, O.; Renaat, K. and Armand, M. (2004). Oral vaccination of African catfish with Vibrio anguillarum O2: effect on antigen uptake and immune response by absorption enhancers in lag ime coated pellets. Fish and Shellfish Immunology, 16: 407-414.

145. Sun, Y.; Liu, CS. and Sun, L. (2011). A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against Edwardsiella tarda and *Vibrio anguillarum*. Fish and Shellfish Immunology, 31: 595-599.

146. Sundus, A; Alsaphar, A.; Jamal, K. and Al-Faragi, H. (2012). Detection and study of the experimental infection of Aeromonas strain in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). The Iraqi Journal of Veterinary Medicine, 36 (2): 222–230.

147. Swain, P.; Behura, A.; Dash, S. and Naya, SK. (2007). Serum antibody response of Indian major carp, Labeo rohita to three species of pathogenic bacteria, *Aeromonas hydrophila*, Edwardsiella tarda and Pseudomonas fluorescens. Veterinary Immunology and Immunopathology, 117: 137-141.

148. Swaminathan, TR.; Rathore, G.; Abidi, R. and Kapoor, D. (2004). Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. Indian Journal Fisheris, 51(2): 251-254.

149. Thune, RL. and Plumb, JA. (1982). Effect of delivery methods and antigen preparation on the production of antibodies against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Progressive Fish Culturist, 44 (1): 53 - 54.

150. Tom´as , JM. (2012). The Main Aeromonas Pathogenic Factors. International Scholarly Research Network ISRN Microbiology, 2: 22.

151. Toranzo, AE.; Romalde, JL.; Magarinos, B. and Barja, JL. (2009). Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. Options Mediterraneennes, 86: 155-76.

152. Uma, A.; Rebecca, G.; Meena, S. and Saravanabava, K. (2010). Pcr Detection of Putative Aerolysin and Hemolysin Genes in an *Aeromonas hydrophila* Isolated from Infected Koi Carp (*Cyprinus carpio*). Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences, 6 (1): 31-33.

153. Vadivelu, J.; Puthucheary, SD. and Navaratnam, P. (1991). Exotoxin profiles of clinical isolates of *Aeromonas hydrophila*. Journal of Medical Microbiology, 34: 363-367 .

154. Vadivelu, J.; Puthucheary, SD.; Phipps, M. and Chee. YW. (1995). Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. Journal of Medical Microbiology, 42: 171-174.

155. Wong, CYF.; Heuzenroeder, MW. and Flower, RLP. (1998). Inactivation of two hemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. Microbiology, 144: 291-298 .

156. Wong, CYF.; Mayrhofer, G.; Heuzenroeder, MW.; Atkinson, HM.; Quinn, DM. and Flower, RLP. (1996). Measurement of virulence of aeromonads using a suckling mouse model of infection. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 15: 233-241.

157. Ye, Y.W.; Fan, T. F. ; Li, H. ; Lu, J. F. ; Jiang, H. ; Hu, W. and Jiang, Q. H. (2013). Characterization of Aeromonas hydrophila from hemorrhagic diseased freshwater fshes in Anhui Province, China. International Food Research Journal, 20(3): 1449-1452.

158. Yin, Z.; Lam, TJ. and Sin, KM. (1996). The role of specific antiserum of catfish (Clarias gariepinus) as a defense against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shell Fish Immunology, 6: 57 – 69.

159. Yogananth, N.; Bhakyaraj, R.; Chanthuru, A.; Anbalagan, T. and Mullai Nila, K. (2009). Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 4 (1): 51-53.

160. Yousr, AH.; Napis, S.; Rusul, GRA. and Son, R. (2007). Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in Aeromonas spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. ASEAN Food Journal, 14(2): 115-122.

161. Zheng, W.; Cao, H. and Yang, X. (2012). Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) infected with multiple strains of *Aeromonas hydrophila* . African Journal of Microbiology Research , 6(21): 4512-4520.

162. Zorrilla, IM.; Chbrillon, MS.; Diaz-Rosales, A.; Martinz-Manzanares, M.; Balebona, MC. and Marinigo, MA. (2003). Bacterial recovered from diseased cultured gilhead sea bream (*Sparus aurata L.*) in southeastern Spain. Aquaculture, 218: 112.

Abstract

Surname: Ahangarzadeh	**Name:** Mina
Title: Role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of cultured carps in khouzestan province and investigation on protectivity of bacterin(s) prepared from acute isolate(s) of it	
Supervisors: Prof. Rahim Peyghan & Prof. Masoud Ghorbanpour najafabadi	
Advisors: Dr. Mostafa Sharif rouhani & Prof. Mehdi Soltani	
Degree: PhD	**University:** Shahaid Chamran University of Ahvaz
Faculty: Veterinary Medicine	**Department:** Clinical Sciences
Keywords: *Aeromonas hydrophila,* Farmed carps, Khouzestan province, Hemolysin, Aerolysin, Cytolytic enterotoxin, PCR, Immunization, RPS	

Motile Aeromonas are the most common bacteria of freshwater in the world that cause disease in fish and other cold-blooded and warm-blooded hosts.

Among this group of bacteria, Aeromonas hydrophila is important in causing complications such as fin rot, skin ulcers and lethal hemorrhagic septicemia in fish.

Several virulence factors involved in the pathogenesis of Aeromonas hydrophila, including extracellular enzymes (protease, lipase, elastase, gelatinase and nuclease) and toxins. From the exotoxins, hemolysin, aerolysin and cytolytic enterotoxin play an important role in pathogenesis. Detection of virulence markers by PCR as a key component of determining the pathogenesis of the bacteria and using indigenous vaccines for better immunization against this disease is important.

In this study, a total of 200 farmed carps (126 common carp, 39 silver carp and 35 of grass carp) with symptoms suspected aeromonas septicemia were isolated from Khouzestan province farms. 125 bacteria belong to Aeromonas genus detected by biochemical and PCR methods. 31 of all isolates recognized as Aeromonas hydrophila with biochemical methods, 16srRNA detection and Lipase genes.

Results showed that the role of Aeromonas sp. and Aeromonas hydrophila in fish with disease symptoms were 62.5% and 15.5% respectively. By using specific primers, three virulence genes including hemolysin, aerolysine and cytolytic enterotoxin were detected in these confirmed isolates, that 18 isolates (58/06%) hemolysin positive (*hlyA* +), 16 isolates (51/61%) aerolysine positive (*aerA*+) and 23 isolates (74/19%) for cytolytic enterotoxin gene (act+) were positive.

The results of present study showed that most of the confirmed isolates genotype was *hlyA*+ *aer*+ with frequency equal to 51/61%. For investigating the protection effect of acute strains of bacteria, UV inactivated bacterin was used..

300 number of fish with an average weight of 81/16 ± 10/65, divided to the 4 groups

(treatments) with 3 replicates. Each replicate had 25 fish. Groups 1 to 4, respectively includes with PBS, PBS with Freund's complete adjuvant, bacterin and bacterin with Freund's complete adjuvant intra peritoneally were immunized. at 4 weeks after immunization, four groups were challenged with a dose of 2 LD50 of Aeromonas hydrophila and then RPS and antibody titer in challenged groups were measured.The results showed that the RPS and level of antibody at 4 and 8 weeks after immunization in groups of bacterin (with or without adjuvant) were significantly higher than the group PBS ($P<0.05$). But among immunized groups with bacterin (with or without adjuvant) a significant difference in RPS and the level of antibody titers were not observed ($P<0.05$).

Shahid Chamran University of Ahvaz
Faculty of Veterinary Medicine

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Philosophy (PhD)

In: Aquatic Animals Health

Subject:

Role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of cultured carps in khouzestan province and investigation on protectivity of bacterin (s) prepared from acute isolate(s) of it

By:

Dr. Mina Ahangarzadeh

Under Supervision of:

Prof. Rahim Peyghan

Prof. Masoud Ghorbanpour najafabadi

Advisors:

Dr. Mostafa Sharif rouhani

Prof. Mehdi Soltani

Jan, 2015

IN THE NAME OF GOD

The thesis by: Dr. Mina Ahangarzadeh

Entitled: **Role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of cultured carps in khouzestan province and investigation on protectivity of bacterin (s) prepared from acute isolate(s) of it.**

Submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree **PhD in Aquatic Animals Health** has been evaluated and approved on **24 Jan., 2015 by** thesis committee as **:**

Thesis committee

Prof. Rahim Peyghan, professor of Fish Health and Diseases (Supervisor)

Prof. Masoud Ghorbanpour najafabadi, professor of Microbiology (Supervisor)

Dr. Mostafa Sharifrouhani, Associate professor of Fish Health and Diseases (**Advisor)**

Prof. Mehdi Soltani, professor professor of Fish Health and Diseases (**Advisor)**

Dr. Mehrzad Mesbah, Associate professor of Fish Health and Diseases (Referee)

Dr. Mojtaba Alishahi, Associate professor of Fish Health and Diseases (Referee)

Dr.Naghmeh mouri bakhtiari, Assistant professor of Microbiology (Referee)

Dr. Ebrahim Rajabzadeh, Assistant professor of Biotechnology (Referee)