فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال ششم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۷

اثرات ویروس ویرمی بهاره کپور (*Carp sprivivirus*) بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون و آنزیم‌های کبدی بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*)

صادق امیدوار[۱]، محدث قاسمی[۲]*، زینب امیدوار[۳]، سمیه حقیقی کارسیدانی[۴]، منیره فئید[۵]، سید فخرالدین میرهاشمی‌نسب[۶]

تاریخ دریافت: آذر ۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۶

چکیده

در این مطالعه اثرات ویروس *Carp sprivivirus* عامل بیماری ویرمی بهاره کپور (SVC) بر آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز، لاکتات دهیدروژناز، آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز و شاخص‌های بیوشیمیایی خون بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) مانند آلبومین، اوره، چربی، کلسترول، پروتئین و گلوکز بررسی شد. پس از مواجه‌سازی بچه ماهیان با ویروس با تیتر $۶/۵ \times ۱۰^{۴}$ TCID50/mL، اولین علائم بالینی و تلفات در تیمار تزریق صفاقی و حمام با آب حاوی ویروس به ترتیب در روزهای ۱۳ و ۱۶ مشاهده شد. آنزیم‌های کبدی در تیمارهای حمام و تزریق صفاقی نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<۰/۰۵$). بیشترین افزایش آنزیم‌های کبدی به جز شاخص آلانین آمینوترانسفراز در تیمار حمام مشاهده شد. میزان آلبومین و چربی در تیمار تزریق صفاقی تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد ($P<۰/۰۵$). اوره، پروتئین و گلوکز با بالاترین میزان در تیمار تزریق صفاقی تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند ($P<۰/۰۵$). کلسترول در تیمارهای مختلف تقاوت معنی‌داری داشت. بیشترین افزایش شاخص‌های بیوشیمیایی در تیمار تزریق صفاقی مشاهده شد. در نتیجه ویروس عامل SVC موجب آسیب کبدی و تغییر در شاخص‌های بیوشیمیایی خون بچه ماهی سفید می‌شود.

واژگان کلیدی: *ویروس ویرمی بهاره کپور، آنزیم کبدی، شاخص بیوشیمیایی، ماهی سفید.*

۱- کارشناس ارشد شیلات، پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.

۲- استادیار پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.

۳- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، واحد بندر انزلی، دانشگاه پیام نور، بندر انزلی، ایران.

۴- استادیارگروه شیلات، واحد بندر انزلی، دانشگاه آزاد اسلامی، بندر انزلی، ایران.

۵- دکتری میکروبیولوژی، پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.

۶- مربی پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.

* نویسنده مسئول: mohades@yahoo.com

مقدمه

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*, Kamensky 1901) از خانواده کپورماهیان، یکی از ماهیان با ارزش و منحصر به فرد در دریای خزر است که به دلیل طعم خوب و کیفیت مناسب گوشت آن، مصرف زیادی داشته، در میان ایرانیان به خصوص ساکنین نواحی شمالی طرفداران بی‌شماری دارد (Emadi, 1979).

به طور کلی اهمیت علم خون‌شناسی علاوه بر مشخص کردن وضعیت فیزیولوژیکی سلول‌های خونی بیشتر در امر تشخیص بیماری‌ها است که در آن با خون‌گیری از ماهی و تعیین شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خونی و مقایسه با شرایط طبیعی می‌توان تا حدی از آن به عنوان یک ابزار پاراکلینیکی در تشخیص بیماری استفاده کرد (خواجه و همکاران، ۱۳۸۶). هنگامی که بافتی بر اثر عوامل عفونی یا غیرعفونی دچار اختلال می‌شود برخی از ترکیبات به مایعات بین بافتی و از آنجا به سرم خون وارد می‌شوند که باعث افزایش آن‌ها در سرم خون می‌شود. در نتیجه سنجش این ترکیبات در سرم خون می‌تواند آسیب‌های احتمالی بافت‌ها و اوضاع مختلف بدن جاندار را به ما نشان دهد (شاهسونی و همکاران، ۱۳۷۷). بررسی شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی می‌تواند نقش مهمی در تشخیص بیماری‌های عفونی، خونی و مسمومیت‌های آبزیان ایفا کند (آذری تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۷۳). به علت مشخص شدن اهمیت زیاد علم خون‌شناسی در ماهی‌شناسی، امروزه پژوهش‌های زیادی در این زمینه انجام گرفته است. با این وجود، برای پیشرفت و توسعه کاربردی این علم باید پژوهش‌های اساسی‌تری انجام شود. سلامت ماهیان برای دستیابی به رشد مطلوب در آبزی‌پروری ضروری است. یکی از راه‌های پایش سلامت ماهیان انجام آزمایش‌های خون‌شناسی و سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی خون در طول دوره پرورش است زیرا عوامل عفونی مختلف موجب تغییرات شاخص‌های خون می‌شود و اطلاع از وضعیت این شاخص‌ها می‌تواند به تصمیم‌گیری سریع برای پیشگیری از شیوع بیماری کمک کرد.

ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV)[1] با نام علمی *Carp sprivivirus* از اعضای خانواده Rhabdoviridae و جنس *Sprivivirus* است و معمولا در کپورماهیان بیماری ایجاد می‌کند (Walker et al., 2000; Ahne et al., 2002;

1- Spring Viremia of Carp Virus

(ICTV, 2012). بیماری ویرمی بهاره کپور یکی از مهم‌ترین عوامل خسارات اقتصادی در مزارع پرورش کپور معمولی است ولی سایر گونه‌های کپورماهیان نیز تا حدی نسبت به این بیماری حساس هستند (Wolf, 1988). به طور کلی ماهیان جوان حساسیت بیشتری در مقابل عفونت SVCV از خود نشان می‌دهند. این ویژگی علاوه بر سن، تحت تاثیر عواملی همچون شرایط فیزیولوژیکی و به ویژه وضعیت سیستم ایمنی ماهی میزبان است. بیشترین تجمع ویروس اغلب در بافت‌های کبد و کلیه ماهیان آلوده گزارش شده است. انتقال افقی ویروس (از طریق ماهی آلوده به ماهی سالم) اصلی‌ترین مکانیسم سرایت بیماری است (OIE, 2017). ویروس‌ها چون معمولا بافت خون‌ساز را تحت اثر قرار می‌دهند سبب کاهش هماتوکریت می‌شوند که منجر به آنمی شدید می‌شود (Van Ginneken et al., 2005). ماهیان بیمار معمولا طیف متنوعی از علائم بالینی و رفتاری همچون عدم تعادل و وارونگی، تورم شکمی، خونریزی آبشش و چشم را از خود نشان می‌دهند. عمده‌ترین تغییرات بافتی در ماهیان بیمار نیز شامل تغییرات عروق خونی کبد، پرخونی، جمع شدگی و چسبندگی تیغه‌های ثانویه آبشش‌ها است (Ahne et al., 2002).

با توجه به این که روش‌های ویروس‌شناسی هزینه‌بردار و وقت‌گیر است و باید نمونه‌برداری از اندام‌های داخلی پس از کشتن موجود صورت پذیرد. از این رو، به کارگیری روش‌های خون‌شناسی و ایمونولوژیکی به ویژه در ماهیان با ارزش از طریق خون‌گیری از ساقه دمی، بدون کشتن جاندار، کم هزینه‌تر و بسیار سریع‌تر است و امکان تهیه استانداردهای تشخیص در این زمینه وجود دارد. نظر به این که ماهی سفید مهمترین ماهی استخوانی دریای خزر است، نسبت به ویروس ویرمی بهاره کپور حساس است (Ghasemi et al., 2014; Zamani et al., 2014) و در صورت آلودگی به این ویروس می‌تواند آن را در سطح وسیعی از دریای خزر گسترش دهد. از طرفی با توجه به رویکرد شیلات ایران به پرورش این گونه در قفس و ورود آن به صنعت آبزی‌پروری، در صورت ابتلا به این ویروس ضررهای اقتصادی زیادی به صنعت پرورش آن وارد خواهد شد. به جای روش‌های گران و زمان‌بر ویروس‌شناسی و از آنجا که تاکنون اثرات ویروس ویرمی بهاره کپور بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون و

آنزیم‌های کبدی این گونه مورد بررسی قرار نگرفته است، شناسایی و ثبت تغییرات خونی ناشی از مواجه‌سازی این ویروس در ایجاد استاندارد تشخیصی ضروری است و مطالعه حاضر به این موضوع پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی ویروس

در مطالعه حاضر از سویه استاندارد ویروس ویرمی بهاره کپور، سویه شماره ۵۶/۷۰ با شماره ثبت ژن (S۳۰) Z۳۷۵۰۵/۱ (Stone et al., 2003) که از آزمایشگاه مرجع بیماری‌های ماهیان اتحادیه اروپا (دانمارک) تهیه شد، استفاده شد. به منظور تکثیر ویروس، پس از ذوب کردن ویال حاوی نمونه لیوفیلیزه SVCV با استفاده از آب مقطر استریل، محلول آماده ویروسی با استفاده از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵µm فیلتر شد و به میزان ۱/۵-۲mL به فلاسک‌های حاوی سلول‌های رشد یافته EPC[1] اضافه شد. تمامی فلاسک‌ها در دمای ۱۵°C گرماگذاری شدند و به مدت هفت روز جهت مشاهده آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل تلقیح ویروس به سلول‌های EPC با رعایت اصول امنیت زیستی و در زیر هود میکروبیولوژی کلاس II انجام پذیرفت.

به منظور خالص‌سازی ویروس از تیره سلولی EPC آلوده به ویروس که دارای میزان زیادی آثار آسیب سلولی (CPE)[2] بود استفاده شد. پس از جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک و افزودن EMEM[3]، محیط کشت حاوی ویروس سه مرتبه منجمد و ذوب شد تا در اثر تخریب مکانیکی سلول‌ها، ویروس‌ها به درون محیط کشت آزاد شوند. سپس محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴°C با دور ۲۰۰۰g سانتریفوژ (5810R، Eppendorf، آلمان) شد. محلول رویی (سوپرناتانت) که حاوی ویروس‌های جداسازی شده بود با استفاده از فیلتر ۰/۴۵µm سر سرنگی فیلتر و تا زمان مواجه‌سازی در دمای ۸۰°C- نگهداری شد (Haenen and Davidse, 1993).

تیتراسیون ویروس طبق روش پیشنهادی Reed و Muench (۱۹۳۸) انجام پذیرفت و تیتر ویروسی به صورت TCID50/mL بیان شد که نشان دهنده غلظتی از ویروس است که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰٪ از خانه‌های پلیت کشت سلولی

1- Epithelioma Papulosum Cyprini

2- Cytopathic Effects

3- Eagle's Minimum Essential Medium

شود. ویروس خالص‌سازی شده برای انجام مواجه‌سازی استفاده شد.

تهیه و نگهداری بچه ماهیان

در مطالعه حاضر، ۱۳۵ قطعه بچه ماهی سفید (*Rutilus kutum*) با میانگین وزنی ۱۵-۱۳ گرم از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت تهیه شد. بچه ماهیان پس از انتقال به آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی ایران (انزلی)، به منظور سازگاری محیطی در آکواریوم‌های ۸۰ لیتری به همراه هوادهی ممتد نگه‌داری شدند. روزانه ۳۰-۲۰ درصد حجم آب آکواریوم‌ها تعویض می‌شد. در این مدت تغذیه بچه ماهیان با استفاده از گرانول‌های غذایی (بیومار، فرانسه) به صورت روزانه یک وعده به میزان ۱ درصد وزن بدن انجام پذیرفت. پس از طی دوران سازگاری، برای مواجه‌سازی بچه ماهیان با ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) از ۹ آکواریوم‌های ۱۶ لیتری مجهز به پمپ‌های هواده، با تراکم ۱۵ قطعه بچه ماهی سفید در هر آکواریوم استفاده شد.

مواجه‌سازی با ویروس

مواجه‌سازی بچه ماهیان با ویروس در سه تیمار شامل حمام آبی، تزریق صفاقی و شاهد، هر یک با سه تکرار انجام شد. غذادهی بچه ماهیان ۲۴ ساعت پیش از مواجه‌سازی به منظور کاهش استرس ناشی از مواجهه با ویروس، متوقف شد و پس از مواجه‌سازی مجددا ادامه یافت.

در مواجه‌سازی با ویروس به روش حمام آبی، بچه ماهیان در ظروف ۵ لیتری دارای هواده با تیتر $۶/۵ \times ۱۰^{۴}$ TCID50/mL به مدت ۴ ساعت در آب حاوی ویروس قرار داده شدند. در روش تزریق صفاقی، با استفاده از سرنگ انسولین و با حجم ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی با تیتر $۶/۵ \times ۱۰^{۴}$ TCID50/mL به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. سپس بچه ماهیان به آکواریوم‌های حاوی آب تازه منتقل شدند. در طول مدت آزمایش بروز علائمی مانند بی‌حالی، برجستگی فلس‌ها، اتساع محوطه شکمی و خونریزی‌های پوستی نقطه‌ای یا عمومی در سرپوش آبششی، پوست و باله‌ها بررسی شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی

با بروز علائم بافتی و تلفات در تیمارهای تزریق صفاقی و حمام، به وسیله سرنگ ۲ میلی‌لیتری و سرنگ انسولین و در ماهیان کوچک‌تر با استفاده از لوله موئینه از ساقه دمی بچه ماهیان خون‌گیری شد. از تیمار شاهد نیز به همان طریق از ماهیان خون‌گیری به عمل آمد. از هر تیمار ۲۷ ماهی به طور تصادفی نمونه‌برداری شد. پس از خون‌گیری، بخشی از خون برای تهیه سرم به لوله‌های فاقد هپارین منتقل شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۴۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس سرم به داخل میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل (جمالزاد، ۱۳۸۰) و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای انجام آزمایش‌های بیوشیمایی شامل سنجش مقدار آلبومین، اوره، چربی، کلسترول، پروتئین و گلوکز و اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی مانند آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز مورد استفاده قرار گرفت (Houston, 1990).

آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، اسپارتات آمینوترانسفراز و آنزیم آلکالین فسفاتاز با سنجش در محدوده UV به روش IFCC (فدراسیون شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) اندازه‌گیری و بر اساس واحد IU بر لیتر گزارش شدند. آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز به وسیله دستگاه بیوشیمی آنالیزر (Elan، Eppendorf، آلمان) به روش فتومتری سنجش و با واحد IU بر لیتر گزارش شد.

کلسترول با استفاده از کیت (Man، ایران) به روش رنگ سنجی به وسیله فتومتر (UV-2100، Unico، آمریکا) اندازه‌گیری و گزارش شد. گلوکز با روش رنگ سنجی به وسیله فتومتر اندازه‌گیری و گزارش شد. اوره به روش آنزیمی اوره‌آز با استفاده از کیت (پارس آزمون، ایران) مورد سنجش قرار گرفت.

چربی بر اساس روش سوکسله تعیین شد. پروتئین و آلبومین بر اساس شیوه رنگ‌سنجی در ۶۲۰ نانومتر به روش فتومتری تعیین شد (Thomas, 1998; Johnson et al., 1999).

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها از پس‌آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد و

وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ٪۹۵ (P<۰/۰۵) تعیین شد. کلیه آزمون‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 17 انجام شد. میانگین‌ها به همراه انحراف معیار آورده شدند (M ± SD).

نتایج

در بچه ماهیان سفید مواجه‌سازی شده با ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV)، بروز علائم بالینی و تلفات در تیمار تزریق صفاقی در روز ۱۳ و زودتر از تیمار حمام با آب حاوی ویروس (روز ۱۶) اتفاق افتاد. تا پایان دوره مواجه سازی ٪۸۵ از ماهیان تیمار حمام تلف شدند. در حالی که میزان تلفات ماهیان تیمار تزریق صفاقی ٪۷۵ محاسبه شد. از مهم‌ترین علائم بالینی مشاهده شده در تیمارهای مواجه‌سازی تجربی کندی شنا، کاهش حساسیت به عوامل محرک محیطی، شنای نامتعادل و خونریزی زیر پوستی به ویژه در ناحیه شکمی بود. علائم بالینی مشاهده شده در همه تیمارها یکسان نبود و تنها برخی از علائم در هر تیمار مشاهده شدند. طی دوران مواجه‌سازی هیچ گونه تغییرات رفتاری و علائم بالینی در بچه ماهیان تیمار شاهد مشاهده نشد.

بر اساس نتایج به دست آمده از اثرات مواجه‌سازی بچه ماهی سفید با SVCV بر آنزیم‌های کبدی در جدول ۱، بالاترین میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (۲۶۰/۰±۹/۵۷ IU) و اسپارتات آمینوترانسفراز (۹۰۳/۱±۳۲/۰۶ IU) در تیمار حمام مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها داشتند (P<۰/۰۵). آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز که در تیمار حمام بالاترین میزان را داشت (۹۰۶۶±۱۲۹/۹ IU) تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). اما آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در تیمار تزریق صفاقی بالاترین میزان را داشت (۱۱/۶۷±۲/۶۹ IU) که تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول ۲، اثرات مواجه‌سازی بچه ماهی سفید با SVCV بر تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی خون بچه ماهیان سفید در تیمارهای مختلف نشان داد که بالاترین میزان آلبومین (۱/۴۷±۰/۲۵ گرم در دسی‌لیتر) و چربی (۷۵۹/۶±۴۵/۹۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار تزریق صفاقی مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها داشت (P<۰/۰۵). اوره (۷/۰۰±۱/۵۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و گلوکز (۸۸۳۳±۸/۱۷

میلی‌گرم در دسی‌لیتر) بالاترین میزان را در تیمار تزریق صفاقی داشتند و اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵). بالاترین میزان کلسترول (۲۵۱/۵±۱۰/۶۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار تزریق صفاقی مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای مختلف با هم نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین میزان پروتئین (۳/۷۳±۰/۲۰ گرم در دسی‌لیتر) نیز در تیمار تزریق صفاقی مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول ۱: تغییرات آنزیم‌های کبدی بچه ماهیان سفید در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارها / آنزیم‌های کبدی	شاهد	حمام با آب حاوی SVCV	تزریق صفاقی SVCV
آلکالین فسفاتاز (IU)	۱۳۵/۱±۲۳/۰۸^{b}	۲۶۰/۰±۹/۵۷^{a}	۱۴۵/۴±۲۳/۹۲^{b}
لاکتات دهیدروژناز (IU)	۴۹۰۹±۱۱۷۹/۰^{b}	۹۰۶۶±۱۲۹/۹^{a}	۸۶۳۳±۷۰۷/۱^{a}
آلانین آمینوترانسفراز (IU)	۹/۱۱±۱/۹۶^{b}	۱۰/۰۰±۰/۸۶^{ab}	۱۱/۶۷±۲/۶۹^{a}
اسپارتات آمینوترانسفراز (IU)	۳۸۶/۰±۳۶/۱۵^{c}	۹۰۳/۱±۳۲/۰۶^{a}	۵۲۹/۵±۴۴/۴۳^{b}

حروف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).
SVCV: ویروس ویرمی بهاره کپور.

جدول ۲: تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی خون بچه ماهیان سفید در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارها / شاخص‌های بیوشیمیایی	شاهد	حمام با آب حاوی SVCV	تزریق صفاقی SVCV
آلبومین (گرم در دسی لیتر)	۱/۲۶±۰/۲۰^{b}	۱/۲۳±۰/۰۷^{b}	۱/۴۷±۰/۲۵^{a}
اوره (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۵/۵۶±۱/۱۳^{b}	۷/۰۰±۰/۸۶^{a}	۷/۰۰±۱/۵۸^{a}
چربی (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۵۳۴/۰±۱۵۳/۳۰^{b}	۴۵۳/۸±۱۸/۳۸^{b}	۷۵۹/۶±۴۵/۹۶^{a}
کلسترول (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۱۹۸/۵±۱۲/۱۹^{b}	۱۵۸/۱±۹/۹۳^{c}	۲۵۱/۵±۱۰/۶۰^{a}
پروتئین (گرم در دسی لیتر)	۳/۲۱±۰/۱۵^{b}	۳/۶۳±۰/۲۰^{a}	۳/۷۳±۰/۲۰^{a}
گلوکز (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۶۹/۷۸±۵/۸۲^{b}	۸۷/۲۲±۲/۳۳^{a}	۸۸/۳۳±۸/۱۷^{a}

حروف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).
SVCV: ویروس ویرمی بهاره کپور.

بحث

تغییرات بیوشیمیایی بافت‌های مختلف بدن، بازگو کننده تغییرات در متابولیسم و فرآیندهای بیوشیمیایی موجودات زنده است (Wells et al., 1986). از این رو، از اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی به طور عمده در تشخیص وضعیت فیزیولوژیک و تعیین حالت عمومی سلامتی ماهی استفاده می‌شود. عوامل عفونی نیز بر مقادیر شاخص‌های بیوشیمیایی خون موثر هستند (Stoskopf, 1988). در مطالعه حاضر مشاهده شد که در مواجه‌سازی بچه ماهیان با ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) به روش حمام آبی با وجود بروز دیرتر تلفات در مقایسه با تزریق صفاقی، درصد تلفات بیشتری را نشان داد که می‌تواند به دلیل مشابهت آن به راه طبیعی سرایت بیماری یعنی انتقال افقی باشد. در حالی که در روش تزریق صفاقی به دلیل روش تهاجمی و در اختیار قرار گرفتن میزان بیشتر ذرات ویروسی تلفات سریع‌تر و تغییرات خونی بیشتر دیده شد. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده در مطالعات زمانی (١٣٩٣) و Ahne (١٩٧٨) بود.

زمانی در سال ١٣٩٣ بیان کرد که ماهی سفید دریای خزر نسبت به ویروس SVCV دارای حساسیت است. ردیابی ویروس در ماهیان تلف شده نشان داد که حساسیت ماهی سفید نسبت به این ویروس به روش مواجه‌سازی و مسیر ورود ویروس به ماهی بستگی دارد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

با آسیب سلول‌ها آنزیم‌هایی به خون ترشح می‌شود که با اندازه‌گیری آن‌ها به عنوان شاخص‌های آسیب سلولی می‌توان به شدت آسیب پی برد. یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم آلانین آمینوترانسفراز است که به طور مشخص در آسیب‌های کبدی افزایش می‌یابد. آنزیم دیگر آسپارتات آمینوترانسفراز است که نقش مشابهی را در سایر بافت‌ها ایفا می‌کند ولی مختص به کبد نیست. در هنگام آسیب‌های سلولی میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز خون قبل از بروز نشانه‌های بالینی و علائم ظاهری افزایش می‌یابد (Dufour et al., 2000). Racicot و همکاران (١٩٧٥) نیز افزایش آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در عفونت ناشی از *Aeromonas* در قزل‌آلای رنگین‌کمان را گزارش کردند. در مطالعه حاضر هم نتایج مشابهی به دست آمد.

Chen و همکاران (۲۰۰۴) نیز افزایش معنی‌داری آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز را در ضایعات شدید کبد، روده و کلیه در اثر بعضی عوامل عفونی و شیمیایی در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) گزارش کردند.

آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سیتوپلاسم تمام سلول‌های بدن ماهی‌ها مانند بافت عضله اسکلتی، قلب، کبد و کلیه یافت می‌شود که در اثر بروز هر گونه آسیب به غشای سلولی، آزاد شده، سطح آن در خون افزایش می‌یابد. در شرایطی که ماهی‌ها در معرض یک عامل استرس‌زا همچون بیماری قرار می‌گیرند، روند کاتابولیسم گلیکوژن و گلوکز به سمت تشکیل لاکتات در عضلات پیش می‌رود که این امر می‌تواند افزایش سطح آنزیم لاکتات دهیدروژناز را در پی داشته باشد (Velisek et al., 2006). افزایش معنی‌داری سطح این آنزیم در بافت کبد ماهیان در تیمارهای این مطالعه هم به خوبی گویای بروز چنین وضعیتی است.

Zorriehzahra و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه بر آنزیم‌های کبدی خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه اجزای سرم خون، در سطح لاکتات دهیدروژناز و آسپارات آمینوترانسفراز تفاوت معنی‌داری را مشاهده کردند.

در مطالعه مقایسه‌ای برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) و کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*) توسط خواجه و همکاران (۱۳۸۶) مشاهده شد که گلوکز در ماهی کپور علف‌خوار و پروتئین و آلبومین در ماهی بنی به طور معنی‌داری افزایش یافت که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت.

در مطالعات Rehulka (۲۰۰۲) بر قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به باکتری *Aeromonas* کاهش پروتئین، کلسترول، آلبومین و افزایش میزان اوره را گزارش شد که با نتایج مطالعه حاضر در خصوص اوره مشابهت و در شاخص‌های پروتئین، کلسترول و آلبومین مغایرت نشان داد.

پروتئین‌ها نقش کلیدی در سیستم‌های فیزیولوژیک دارند و جزئی با اهمیت از ترکیب سرم ماهیان هستند (Kumar et al., 2005). سنجش سطح پروتئین‌های سرم خون شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت ایمنی ماهیان نیز به شمار می‌آید (رضایی و همکاران، ۱۳۹۱).

در مطالعه حاضر پس از مواجه‌سازی بچه ماهیان سفید با ویروس SVCV میزان گلوکز و پروتئین در تیمارهای حمام و تزریق صفاقی افزایش یافت. این نتایج با نتایج مطالعات Tavares-Dias و همکاران (٢٠٠٧) بر شاخص‌های خونی ماهی هیبرید Tambacu آلوده شده به گونه سخت‌پوست *Dolops carvalhoi* مشابه بود. افزایش قابل توجه پروتئین کل نشان دهنده افزایش فعالیت تولید آنتی‌بادی در ماهیان بیمار است (Rehulka et al., 2005).

وقتی که ماهی در معرض عوامل استرس‌زا همچون بیماری قرار می‌گیرد، پاسخ اولیه سبب تحریک محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- فوق‌کلیه (HPI) و ترشح هورمون آدرنوکورتیکوئید می‌شود که به دنبال آن کاتکول‌آمین‌ها به داخل جریان خون آزاد می‌شوند و سطح کورتیزول افزایش می‌یابد (Barton, 2002). سطوح بالای کاتکول‌آمین در پلاسما سبب تحریک تبدیل گلیکوژن ذخیره شده به گلوکز از طریق گلیکوژنز می‌شود. از این رو سطوح بالاتر گلوکز به عنوان پاسخ استرسی ثانویه به شمار می‌آید (Mazeaud et al., 1977).

به طور کلی، افزایش میزان گلوکز پلاسما را می‌توان به فرآیند گلیکوژنز کبد یا عضلات نسبت داد (Milligan, 1996). بنابراین، مقادیر بالای گلوکز به مدت طولانی در این مطالعه را می‌توان به موجودی بالای گلوکز در بافت‌ها و پاسخ به آزادسازی کاتکول‌آمین‌ها و تقاضای زیاد انرژی در ماهیانی که در معرض عفونت ویروسی قرار گرفته‌اند، نسبت داد.

آلبومین نیز پروتئینی است که در کبد سنتز می‌شود و اندازه‌گیری آن معیار قابل اطمینانی برای پیش‌بینی و تعیین شدت بیماری‌های مزمن کبدی است. آلبومین نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کند (Hernandez et al., 2007). در ماهیان واجد عفونت میزان این شاخص پایین‌تر از ماهیان فاقد عفونت است. این وضعیت می‌تواند به دلیل آسیب کبدی باشد. همچنین ممکن است کاهش آلبومین با سایر پروتئین‌ها در سرم جبران شود (Densmore et al., 2001). در مطالعه حاضر کاهش آلبومین در تیمارهای حمام نسبت به گروه شاهد اتفاق افتاد در حالی که در تیمار تزریق صفاقی افزایش مشاهده شد که می‌تواند به دلیل شدت بیشتر عفونت در روش حمام که راه اصلی سرایت بیماری است،

باشد. در بیماری ویرمی بهاره کپور آسیب گسترده به بافت‌های خون‌ساز منجر به کم خونی می‌شود ولی در مراحل پایانی بیماری یک افزایش جبرانی در تعداد و حجم گلبول‌های قرمز آسیب دیده مشاهده می‌شود که ناشی از افزایش تعداد و حجم گلبول‌های قرمز نابالغ است (Wolf, 1988). با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، مشاهده شد که ویروس SVCV قادر به ایجاد تغییرات در آنزیم‌های کبدی (آلکالین فسفاتاز، لاکتات دهیدروژناز، آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز) و شاخص‌های بیوشیمیایی خون (آلبومین، اوره، چربی، کلسترول، گلوکز و پروتئین)، ایجاد علائم بالینی و به دنبال آن بروز تلفات در ماهی سفید دریای خزر است و از آنجایی که درمان بیماری‌های ویروسی امکان‌پذیر نیست، بنابراین شناخت به هنگام عوامل بیماری‌زای ویروسی از طریق سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی خون و آنزیم‌های کبدی به منظور پیشگیری سریع از شیوع بیماری برای ماهیان ضروری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ریاست محترم پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی کشور جناب آقای دکتر علی‌اصغر خانی‌پور و همکاران معزز آقایان مهندس کامبیز خدمتی، عادل حسینجانی، کامران زلفی‌نژاد و نیز از پرسنل زحمت‌کش و مدیریت محترم مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت آقایان مهندس درویشی ریاست محترم وقت مرکز، مهندس رضا خمیرانی، مهندس احمد قناعت‌پرست و مهندس علی علیزاده نجد به جهت همکاری و مساعدت‌های فراوان در خصوص تامین بچه ماهیان سفید نهایت تقدیر و تشکر را داریم. همچنین از پروفسور اولسن و همکاران ایشان در آزمایشگاه مرجع اتحادیه اروپا که سویه استاندارد ویروس را در اختیار نویسندگان مقاله قرار دادند قدردانی می‌گردد.

منابع

آذری تاکامی ق. و کهنه شهری م. ۱۳۷۳. تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۵۵ص.

جمالزاد ح. ۱۳۸۰. بررسی فاکتورهای خونی آزادماهیان دریای خزر. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. ۱۱۵ص.

خواجه غ.، مصباح م. و پیغان ر. ۱۳۸۶. مطالعه مقایسه‌ای برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) و کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) پرورشی. مجله دامپزشکی ایران، ۳(۴): ۲۳-۱۴.

رضایی م.، سوری‌نژاد ا.، سلطانیان س. و یوسف‌زادی م. ۱۳۹۱. مطالعه برخی پارامترهای رشد و خون‌شناسی گربه ماهی پنگوسی (*Pangasianodons hypophthalmu*) با افزودن عصاره گیاه مریم گلی *Salvia macrosiphon* به جیره. مجله بوم شناسی آبزیان، ۲(۲): ۳۹-۲۲.

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

شاهسونی د.، وثوقی ع. و خضرائی‌نیا پ. ۱۳۷۷. تعیین برخی از فاکتورهای خونی ازون‌برون در سواحل جنوب شرقی دریای خزر. مجله پژوهش و سازندگی، ۱۲(۳): ۱۳۰-۱۲۶.

Ahne W. 1978. Uptake and multiplication of spring viraemia of carp, *Cyprinus carpio*. L. Journal of Fish Diseases, 1: 265–268.

Ahne W., Bjorklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G. and Winton J.R. 2002. Spring viraemia carp (SVC). Diseases of Aquatic Organisms, 2: 261–272.

Barton B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology, 42: 517–525.

Chen C.Y., Gregory A. and Wooster P.R. 2004. Bowser comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. Aquaculture, 239: 421–443.

Densmore C.L., Blazer V.S., Waldrop T.B. and Pooler P.S. 2001. Effects of whirling disease on selected hematological parameters in rainbow trout. Journal of Wildlife Diseases, 37: 375–378.

Dufour D.R., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S. and Seeff

L.B. 2000. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. Clinical Chemistry, 46: 2050–2068.

Emadi H. 1979. The state of the fishing and reproduction of the Kutum, *Rutilus frisii kutum*, in the Caspian Sea of Iran. Journal of Ichthyology, 19: 151–154.

Ghasemi M., Zamani H., Hosseini S.M., Haghighi Karsidani S. and Bergmann S.M. 2014. Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) as a host for spring viraemia of carp virus. Veterinary Microbiology, 170(3-4): 408–413.

Haenen L.M. and Davidse A. 1993. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viraemia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms, 15: 87–92.

Hernandez L.H.H., Teshima S.I., Koshio S., Ishikawa M. and Tanaka Y.M.S. 2007. Alam effects of vitamin A on growth, serum anti-bacterial activity and transaminase activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 262: 444–450.

Houston A.H. 1990. Blood and circulation. P: 273–335. In: Schreck C.B. and Moyle P.B. (Eds.). Methods in Fish Biology. American Fisheries Society, USA.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2012. Create 1 species and 1 genus, *Sprivivirus* in the family Rhabdoviridae. Retrieved March 2, 2018, from https://ictvonline.org/proposals/2012.002a-fV.A.v3.Sprivivirus.pdf.

Johnson A.M., Rohlfs E.M. and Silvrman L.M. 1999. Proteins. P: 477–540. In: Burtis C.A. and Ashwood E.R. (Eds.). Tiets Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Kumar S., Sahu N.P., Pal A.K., Choudhury D., Yengkokpam S. and Mukherjee S.C. 2005. Effect of dietary carbohydrate on heamatology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 19: 331–334.

Mazeaud M.M., Mazeaud F. and Donaldson E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. Transactions of the American Fisheries Society, 106: 201–212.

Milligan C.L. 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. Comparative Biochemistry Physiology (A), 113: 51–60.

OIE (World Organization for Animal Health). 2017. Manual of diagnostic tests for aquatic animals: Spring Viraemia of Carp: SVC. P: 262–278. www.oie.int/standard-setting/aquatic-manual/access-online.

Racicot J.G., Gaudet M. and Leray C. 1975. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) with emphasis on their diagnostic use: Study with toxicity and a case of *Aeromonas infection*. Journal of Fish Biology, 7: 825–835.

Reed L.J. and Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Hygiene, 27: 493–497.

Rehulka J. 2002. *Aeromonas* causes server skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clinical pathology, hematology and biochemistry. Acta Veterinaria Brno Journal, 71: 351–360.

Rehulka J., Minarik B., Adamec V. and Rehulkova E.R. 2005. Investigations of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research, 36: 22–32.

Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P.F., Liu C.T.Y., Sheppard A.M., Taylor G.R. and Way K. 2003. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. Diseases of Aquatic Organisms, 53: 203–210.

Stoskopf M.K. 1988. Avian and Piscean hematology and serology proceeding of the fifth annual veterinary medical forum. American College of Veterinary Internal Medicine, 5: 608–611.

Tavares-Dias M., Moraes F.R., Onaka E.M. and Rezende P.C.B. 2007. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. Veterinarski Arhiv, 77: 355–364.

Thomas L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostics. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfort. 1527P.

Van Ginneken V., Ballieux B., Willemze R., Coldenhoff K., Lentjes E., Antonissena E., Haenenc O. and Van Den Thillart G. 2005. Hematology patterns of migrating European eels and the role of EVEX virus. Comparative Biochemistry and Physiology (C), 140: 97–102.

Velisek J., Dobsikova R., Svobodova Z., Modra H. and Luskova V. 2006. Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of Environmental

Contamination and Toxicology, 76: 992–998.

Walker P.J., Benmansour A., Calisher C.H., Dietzgen R., Fang R.X., Jackson A.O., Kurath G., Leong J.C., Nadin-Davis S.A., Tesh R.B. and Tordo N. 2000. Family Rhabdoviridae. P: 563–583. In: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. and Carstens E.B. (Eds.). The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses. Academic Press, US.

Wells R., McIntyre R., Morgan A. and Davie P. 1986. Physiological stress responses in big gamefish after capture: Observations on plasma chemistry and blood factors. Comparative Biochemistry and Physiology (A), 84: 565–571.

Wolf K. 1988. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, USA. 476P.

Zamani H., Ghasemi M., Hosseini S.M. and Haghighi Karsidani S. 2014. Experimental susceptibility of Caspian white fish, *Rutilus frisii kutum* to spring viraemia of carp virus. Virus Disease, 25(1): 57–62.

Zorriehzahra M.J., Hassan M.D., Gholizadeh M. and Saidi A.A. 2010. Study of some hematological and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in western part of Mazandaran Province, Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9(1): 185–198.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 6, No. 3, Autumn 2018

The effects of spring viremia of carp virus (*Carp sprivivirus*) on blood biochemical parameters and liver enzymes of the Caspian kutum fry (*Rutilus kutum*)

Sadegh Omidvar[1], Mohaddes Ghasemi[2]*, Zeynab Omidvar[3], Somayeh Haghighi Karsidani[4], Monireh Faeed[5], Seyed Fakhredin Mirhasheminasab[6]

Received: December 2017 Accepted: March 2018

Abstract

In this study, the effects of spring viremia of carp virus (SVCV, *Carp sprivivirus*) with 10^4 TCID50 on liver enzymes including alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and blood biochemical parameters containing albumin, urea, fat, cholesterol, protein and glucose of *Rutilus kutum* were measured. The first clinical symptoms and mortality in intraperitoneal injection and bath trials were observed in 13 and 16 days post-treatment respectively. Liver enzymes in the bath and intraperitoneal injection treatments showed significant differences compared to the control ($P<0.05$). The highest increase of the liver enzymes except alanine aminotransferase were observed in the bath treatment compared with the intraperitoneal injection. Some blood biochemical parameters including albumin and fat had significant differences in the intraperitoneal injection treatment compared with other treatments ($P<0.05$). Urea, protein and glucose in the intraperitoneal injection treatments showed significant differences compared to the control ($P<0.05$.). Cholesterol showed significant differences among different treatments. The highest level of biochemical parameters was observed in intraperitoneal injection treatment. As a result, the SVCV able to make changes in liver enzymes, biochemical parameters and clinical signs, followed by mortality in the Caspian kutum fingerlings.

Key words: *Spring Viremia of Carp Virus, Liver Enzyme, Biochemical Parameter, Caspian Kutum.*

1- M.Sc. in Fisheries, Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.
2- Assistant Professor in Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.
3- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Bandar Anzali Branch, Payame Noor University, Bandar Anzali, Iran.
4- Assistant Professor in Department of Fisheries, Bandar Anzali Branch, Islamic Azad University, Bandar Anzali, Iran.
5- Ph.D. in Microbiology, Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.
6- Scientific Member in Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.
*Corresponding Author: mohades@yahoo.com