

بررسی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی خون ماهیان قزل آلائی رنگین کمان فاقد و واجد عفونت باکتریایی (در مزارع پرورشی استان مازندران)

حسین خارا^{۱*}، ولی الله محمد زاده^۲، مریم قیاسی^۳، مینا رهبر^۴

۱ و ۲- دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران، صندوق پستی: ۹۶۱

۴- دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، باشگاه پژوهشگران جوان، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳ دی ۱۳۹۱

تاریخ پذیرش: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

ماهی قزل آلائی رنگین کمان تنها گونه از آزاد ماهیان است که در مزارع کشور پرورش داده می شود و میزان تولید ماهی قزل آلائی رنگین کمان در استان مازندران قابل توجه می باشد. امروزه میزان شیوع بیماری های مختلف در مزارع ماهی قزل آلائی رنگین کمان در حال افزایش است. از این رو در سال ۱۳۸۷ به بررسی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی ماهیان قزل آلائی رنگین کمان فاقد و واجد عفونت باکتریایی در مزارع پرورشی استان مازندران پرداخته شد. بدین منظور ۱۸ مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلائی رنگین کمان برای نمونه برداری انتخاب گردید. ماهیان ابتدا زیست سنجی و سپس خونگیری از آنها انجام شد و از کلیه آنها در محیط کشت TSA و Blood agar نمونه برداری و کشت داده شد. سرم خون ماهیان پس از سانتریفوژ جداسازی گردید و فاکتورهای آلبومین، پروتئین تام، C3، C4 و IgM و نیز آنزیم های SGPT و SGOT مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که از تعداد کل ماهیان، کشت باکتریایی در ۶۰/۵٪ موارد مثبت و در ۳۹/۵٪ منفی بود. در بین فاکتورهای سرمی و بیوشیمیایی میانگین مقادیر پروتئین تام، آلبومین و آنزیم SGOT در ماهیان فاقد عفونت باکتریایی به طور معنی داری بیشتر از ماهیان واجد عفونت باکتریایی بوده، اختلاف ها از نظر آماری معنی دار بودند ($p < 0.05$). میانگین C4 و آنزیم SGPT در ماهیان فاقد عفونت بیشتر از ماهیان واجد عفونت بود ولی از نظر آماری این اختلاف نیز معنی دار نبود ($p > 0.05$). میانگین IgM و C3 در ماهیان واجد عفونت باکتریایی بیشتر از ماهیان فاقد عفونت بود لیکن این اختلاف معنی دار نبود ($p < 0.05$).

کلمات کلیدی: مازندران، قزل آلائی رنگین کمان، عفونت باکتریایی، فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی خون.

مقدمه

امروزه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به صورت ماهی شماره یک اکثر مزارع پرورش ماهیان سردآبی در بیشتر نقاط جهان از جمله ایران درآمده است. در این میان استان مازندران هم با وجود شرایط آب و هوایی مناسب و وجود رودخانه‌های دائمی کوهستانی از قبیل هراز، تجن، دوهزار، سه هزار و غیره از استان‌های مستعد بخش آبرزی پروری محسوب می‌شود.

از سوی دیگر شیوع بیماری‌های مختلف در جمعیت آبریان کشور و تلفات متعدد در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان پرورش همواره تهدید گرسرمایه‌های عظیم زیر بخش می‌باشد. در آبریان ابزار اندکی جهت تشخیص و پایش بیماری وجود دارد. در این بین، آنالیز خون به عنوان یک ابزار می‌تواند تغییرات پاتولوژیک حاد و مزمن ناشی از کیفیت آب، سموم، بدی تغذیه، انواع استرس‌ها و بیماری را نشان دهد. متأسفانه به دلیل نبود منابع مرجع استاندارد برای گونه‌های مختلف ماهیان در این دسته از موجودات کمتر آنالیز بیوشیمیایی و سرمی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

با توجه به این که اخیراً شیوع بیماری‌های باکتریایی در استان مازندران موجب بروز مشکلات متعددی در مسیر تولید این صنعت در استان گردیده و از آنجایی که بروز علائم بالینی در ماهی تعیین کننده شناخت نوع عامل مشکل ساز نمی‌باشد و از روی این علائم نوع عامل (میکروبی، محیطی و تغذیه‌ای) قابل شناخت نیست و از طرفی تشخیص به موقع و تجویز به هنگام آنتی‌بیوتیک عامل تعیین کننده‌ای در کاهش خسارات می‌باشد لذا به نظر می‌رسد استفاده از ابزارهای تشخیص پاراکلینیکی بتواند متصدیان بهداشتی را به سوی روش‌های نوین تشخیص بیماری رهنمون کند.

بررسی تغییرات در تابلوی خونی و سرمی ماهیان امروزه در بعضی نقاط دنیا به عنوان یکی از راه‌های تشخیص عامل بیماری در حداقل زمان ممکن مورد استفاده قرار گرفته است (Sahu, et al., 2007; Shariffi, et al., 2001; Chen, at al., 2004; Gonzalez, et al., 2007). در این مطالعه با توجه به روش و فاکتورهای مورد سنجش تلاش شده که امکان استفاده از عوامل سرمی دخیل در ایمنی غیر اختصاصی (C4-C3) و اختصاصی IgM، پروتئین تام و نیز بعضی از فاکتورهای بیوشیمیایی جهت ابزار پایش و پیش بینی سلامت ماهیان مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ابتدا در سطح استان مازندران ۱۸ مزرعه انتخاب گردید. مزارع انتخاب شده شامل ۱۱ مزرعه در منطقه هراز شهرستان آمل، ۴ مزرعه در منطقه دو هزار شهرستان تنکابن و ۳ مزرعه در منطقه سه هزار شهرستان تنکابن بوده‌اند. در اوایل خرداد تا اواخر مرداد سال ۱۳۸۷ با مراجعه به هر مزرعه ۶ عدد ماهی از ماهیان پرورشی (حداقل ۷۰ و حداکثر ۲۶۰ گرم) انتخاب گردیدند. ماهیان منتخب واجد علائم بالینی به صورت اگزوفتالمی، تیرگی رنگ، شنای غیر عادی، وجود زخم در سطح بدن، خونریزی در سطح بدن و قاعده باله‌ها و پر خونی و خونریزی در اطراف کره چشم، بیرون زدگی و پر خونی مخرج بودند.

پس از انتخاب ماهیان طول کل و وزن ماهیان به ترتیب با تخته بیومتری (با دقت ۱ میلی‌متر) و ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱ گرم) اندازه‌گیری و ثبت شدند. سپس از ماهیان خون‌گیری به عمل آمد (Blaxhall, 1972).

و آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. نمودارها نیز به وسیله برنامه Excel 2003 رسم شدند.

نتایج

در مجموع ۱۰۴ عدد ماهی مورد بررسی قرار گرفتند که دارای میانگین وزن ۱۶۵ گرم (حداقل ۷۰ گرم و حداکثر ۲۶۰ گرم) و میانگین طول کل ۲۴ سانتیمتر (حداقل ۱۴ سانتی‌متر و حداکثر ۳۰ سانتی‌متر) بودند. به طوری که ماهیان رودخانه هراز دارای میانگین وزن ۱۶۸ گرم و میانگین طول ۲۴ سانتی‌متر و ماهیان رودخانه‌های دوهزار و سه هزار دارای میانگین وزن ۱۶۱ گرم و میانگین طول ۲۳/۴ سانتی‌متر بوده‌اند. میزان دمای آب رودخانه هراز ۱۵ درجه سانتی‌گراد و در رودخانه‌های دو هزار و سه هزار ۱۹ درجه سانتی‌گراد بوده است که دمای آب رودخانه‌های دوهزار و سه هزار ۴ درجه سانتی‌گراد گرمتر از رودخانه هراز بوده است.

نتایج نشان داد که از تعداد کل ماهیان مورد بررسی، کشت باکتریایی در ۶۰/۵ درصد موارد مثبت و در ۳۹/۵ درصد منفی بود. به طور کلی از ۱۰۴ نمونه انتخاب شده ۶۱ نمونه مربوط به رودخانه هراز و ۴۳ نمونه از رودخانه‌های دو هزار و سه هزار بوده است. از ۶۱ نمونه انتخاب شده در رودخانه هراز ۳۱ نمونه (۵۱ درصد) از نظر عفونت باکتریایی مثبت بوده و از ۴۳ نمونه انتخاب شده در رودخانه‌های دو هزار و سه هزار ۳۲ عدد از نمونه‌ها (۷۴ درصد) واجد عفونت باکتریایی بوده‌اند، که بیان‌گر آن است که ۵۰/۸ درصد ماهیان واجد عفونت باکتریایی از رودخانه‌های دو هزار و سه هزار شهرستان تنکابن و همچنین ۴۹/۲ درصد باقیمانده از رودخانه هراز هستند.

جهت خونگیری پس از بیهوش نمودن ماهیان با استفاده از اسانس گل میخک، با سرنگ استریل از رگ ساقه دمی نمونه خون به میزان ۲ سی‌سی اخذ گردید و پس از آن خون به لوله‌های همولیز فاقد هپارین منتقل گردید. بر روی هر لوله بر چسب حاوی کد نمونه که شامل مشخصات مزرعه و شماره ماهی بود قرار می‌گرفت تا پیگیری بعدی نمونه‌ها به آسانی صورت گیرد. جهت تهیه سرم لوله‌های همولیز در داخل سانتریفوژ قرار داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. سپس با استفاده از سمپلر سرم‌ها از داخل لوله همولیز برداشت شده به داخل میکروتیوپ‌های ۲ سی‌سی منتقل گردید (جمالزاده، ۱۳۸۰).

پس از خونگیری در شرایط استریل محوطه شکمی ماهی باز گردید تا وضعیت اندام‌های داخلی ماهی از نظر وجود تغییرات غیر عادی شامل بزرگی، خونریزی و پرخونی در سطح کبد و طحال، خونریزی در سطح احشاء، بیرون زدگی مخرج، تورم و پرخونی و یا رنگ پریدگی کلیه مورد بازبینی قرار گیرد. سپس با استفاده از آنس از بخش قدامی کلیه ماهیان نمونه‌برداری شد و در سطح محیط کشت‌های BHI (عصاره قلب و مغز) و Blood agar (آگار خون دار) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در حرارت ۲۵ - ۲۲ درجه سانتی‌گراد در انکوباسیون قرار گرفت تا باکتری‌ها رشد نمایند (عامری مهابادی، ۱۳۷۸). فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی شامل آل‌بو‌مین، پروتئین تام، آنزیم SGOT و SGPT و فاکتورهای ایمنی مورد بررسی شامل C3، C4 و IgM تام بودند که با استفاده از کیت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر (Eurolyser) مورد سنجش قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها نرم افزار SPSS 13

در بررسی انجام شده میزان آنزیم گلوتامیک اکسالواستیک ترانس آمیناز (SGOT)، آلبومین، پروتئین تام و کمپلمان C4 در ماهیان فاقد عفونت باکتریایی بیشتر از ماهیان واجد عفونت باکتریایی بوده و از نظر آماری این اختلاف معنی دار می باشد ($P \leq 0/05$). طبق نتایج بدست آمده میزان آنزیم گلوتامیک پیرووات ترانس آمیناز (SGPT) در ماهیان فاقد عفونت

باکتریایی بیشتر از ماهیان واجد عفونت بود ولی از نظر آماری این اختلاف معنی دار نبود ($P > 0/05$). بر اساس بررسی های انجام شده میزان IgM و کمپلمان C3 در ماهیان واجد عفونت باکتریایی ($31/3 \text{ mg/l}$) بیشتر از ماهیان فاقد عفونت باکتریایی ($31/2 \text{ mg/l}$) بود ولی از نظر آماری این اختلاف معنی دار نمی باشد ($P > 0/05$) (جدول ۱).

جدول ۱: فاکتورهای سرمی و بیوشیمیایی ماهیان قزل آلائی رنگین کمان واجد و فاقد عفونت باکتریایی

فاکتور نمونه	SGOT U/I	SGPT U/I	Alb mg/L	Total pro g/l	IgM mg/l	C3 mg/l	C4 mg/l
واجد عفونت	$162/9 \pm 10$	$8/1 \pm 1/1$	$2/1 \pm 0/1$	$3/2 \pm 0/2$	$105 \pm 7/3$	$31/3 \pm 1/5$	$14/2 \pm 1/3$
فاقد عفونت	$215/5 \pm 16/6$	$8/6 \pm 1/1$	$2/8 \pm 0/1$	$5/1 \pm 0/6$	$90/9 \pm 9/2$	$31/2 \pm 2$	$18/2 \pm 2/4$

طبق نتایج بدست آمده، مقایسه میانگین آنزیم SGOT، آنزیم SGPT، آلبومین و پروتئین تام در نمونه های انتخاب شده از رودخانه هراز و رودخانه های دوهزار و سه هزار مشخص گردید که این فاکتور ها در نمونه های هراز بیشتر از نمونه های رودخانه های دو هزار و سه هزار بوده است و این اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0/05$). همچنین کمپلمان C4 نیز در نمونه های هراز

بیشتر از نمونه های رودخانه های دو هزار و سه هزار بوده است ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($P > 0/05$). نتایج نشان داد که میانگین IgM، کمپلمان C3 در نمونه های هراز کمتر از نمونه های رودخانه های دو هزار و سه هزار بوده است و این اختلاف معنی دار نمی باشد ($P > 0/05$) (جدول ۲).

جدول ۲: فاکتورهای سرمی و بیوشیمیایی ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در رودخانه های هراز، دوهزار و سه هزار

فاکتور منطقه	SGOT U/I	SGPT U/I	Alb mg/L	Total pro g/l	IgM mg/l	C3 mg/l	C4 mg/l
رودخانه هراز	$206/2$	10	$2/9$	$4/5$	$99/8$	$30/5$	$18/06$
رودخانه های دو هزار و سه هزار	$140/9$	$5/1$	$1/45$	$2/8$	$100/2$	$32/6$	$11/6$

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده، آنزیم گلوتامیک پیرووات ترانس آمیناز و آنزیم گلوتامیک اکسالواستیک

ترانس آمیناز در ماهیان واجد عفونت باکتریایی کاهش یافته است. مشابه این نتیجه در بررسی Shariffi و همکاران (۲۰۰۱) بدست آمد. این دو آنزیم نقش بسیار

مهمی در ختنی سازی عوامل سمی و نیز فعالیت‌های متابولیکی کبد داشته و دو آنزیم کلیدی برای تعیین عملکرد کبد می‌باشند. اصولاً کاهش این عوامل نشان دهنده ضایعات کبدی و بروز اختلال در عملکرد این عضو مهم است. فرایند سم‌زدایی و نیز دفع عوامل مضر از جمله مایکوتوکسین‌ها، توکسین‌های میکروبی و نیز عوامل پروتئینی مخرب سلولی مثل کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به عهده این عضو می‌باشد. افزایش این آنزیم‌ها خصوصاً در گلوتامیک اکسالواستیک ترانس آمیناز (SGOT) یکی از فاکتورهای مهم در بررسی‌های پاراکلینیکی کبد است که سطح کارایی آن را نشان می‌دهد. در عفونت‌هایی که آسیب کبدی را با خود به همراه دارند مقدار این آنزیم کاهش می‌یابد (Shariffi, et al, 2001). با توجه به کاهش این آنزیم در ماهیان واجد عفونت به نظر می‌رسد بدون در نظر گرفتن نوع عامل باکتریایی که در ماهی ایجاد بیماری نموده است، تمامی این عوامل قادر به ایجاد آسیب کبدی در ماهی شده‌اند و با توجه به این‌که بسیاری از ترکیبات پروتئینی سرم توسط این عضو ساخته می‌شود باید انتظار کاهش این عوامل را در سرم ماهیان داشته باشیم.

سیستم کمپلمان نقش کلیدی در ایمنی غیر اختصاصی داشته و در فاگوسیتوزیس، کموتاکسی و لیز سلولی دخالت دارد. C3 ترکیب اصلی در آبشار کمپلمان است و در گروه پروتئین‌های فاز حاد جای داشته و در فرآیندهای التهابی حاد به شدت افزایش می‌یابد. کبد عمده محل تولید C3 است ولی در پستانداران مونوسیت - ماکروفاژ نیز از منابع مولد خارج کبدی آن هستند (Magnadottir, 2005). با توجه به مقایسه دو گروه از ماهیان در این بررسی تفاوتی در بین

دو گروه واجد و فاقد عفونت میکروبی مشاهده نگردید که شاید بتوان آن را به شدت روند بیماری نسبت داد. آلبومین نیز پروتئینی است که در کبد سنتز می‌شود و اندازه‌گیری آن معیار قابل اطمینانی است که در جهت پیش‌بینی و تعیین شدت بیماری‌های مزمن کبدی بکار می‌رود. امتیاز اندازه‌گیری این فاکتور آن است که پیگیری مداوم و نتیجه بخش بودن آن را نشان می‌دهد (Densmore, 2001). در ماهیان واجد عفونت میزان این فاکتور پائین‌تر از ماهیان فاقد عفونت بود که می‌توان آن را به آسیب کبدی نسبت داد.

توتال پروتئین شامل آلبومین و گلوبولین‌های سرمی است. این ترکیب مانند آلبومین در بیماری‌های حاد و مزمن کبدی و کلیوی کاهش می‌یابد. البته برای درک بهتر از وضعیت این فاکتور بررسی آن حتماً باید در کنار آلبومین باشد، زیرا ممکن است کاهش آلبومین با سایر پروتئین‌ها در سرم جبران شود (Densmore, 2001). در ماهیان واجد عفونت این فاکتور نیز به صورت معنی‌داری نسبت به ماهیان فاقد عفونت کاهش داشته است. با توجه به این‌که میزان آلبومین این گروه از ماهیان نیز کاهش داشته است میتوان چنین نتیجه گرفت که کاهش توتال پروتئین مرتبط به کاهش آلبومین می‌باشد. در زمان بروز باکتری در ماهیان جهت جداسازی باکتری، کشت از اندام‌هایی مانند کلیه، کبد و طحال صورت می‌گیرد و این عوامل با توجه به قدرت بیماری‌زایی و تهاجم خود قادر به ایجاد ضایعات در این اندام‌ها و تضعیف سیستم ایمنی و خونساز ماهی می‌شوند. در کلیه موارد کشت نیز از یک سوم قدامی کلیه ماهیان انجام شد و در مواردی که ماهی آلودگی داشت کشت به صورت پرگنه‌های خالص به دست آمد. اصولاً افزایش مقادیر کمپلمان خصوصاً C3 موجب افزایش

فعالیت فاگوسیتوزی می‌شود. حضور C3 نقش کلیدی در انفجار تنفسی لوکوسیت‌های قدامی کلیه قزل آلا دارد. لذا این قابلیت ماهی را در دفع مناسب عوامل عفونی یاری می‌دهد. نقش دیگر کمپلمان و خصوصاً C3 در افزایش جذب و عمل‌آوری آنتی‌ژن توسط APC و در مرحله بعد فعال‌سازی لنفوسیت‌های B است (Austin and Austian, 1993).

در ماهیان واجد عفونت مقادیر IgM نیز بیشتر از ماهیان گروه دیگر بود. باتوجه به مطالبی که گفته شد مشخص می‌شود که سیستم ایمنی ماهیان واکنش فعال در برابر عفونت دارد. بر خلاف مهره دارن خونگرم کمپلمان در ماهیان استخوانی در دمای پایین فعال می‌شود و فعال‌سازی آن از مسیر آلترناتیو چند برابر بیشتر از مهره‌داران خونگرم است. یکی از خصوصیات غیر معمول و مهم سیستم کمپلمان در ماهیان استخوانی این است که ترکیب کلیدی آن یعنی C3 در ایزوفرم‌های مختلف وجود دارد که از نظر عملی فعال و محصول چندین ژن هستند.

سه ایزوفرم C3-1, C3-3, C3-4 از قزل آلا جداسازی و کلون شده است. وجود این‌ها در قزل آلا اهمیت باند شدن و فعال نمودن کمپلمان را نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها در سطح باند شدن ماهی را قادر می‌سازد تا با طیف وسیعی از عوامل عفونی برخورد داشته و قابلیت شناسایی آن‌ها را داشته باشد (Sunyer, et al., 1996).

با توجه به تمامی مطالبی که در بالا گفته شد، به نظر میرسد در روند بروز بیماری‌های باکتریایی بخاطر تحت تاثیر قرار گرفتن متابولیسم ماهی و نیز کاهش اشتها در ماهی این دسته از ماهیان از رشد کمتر نسبت به سایر ماهیان همسن خود برخوردارند. مقایسه نمونه‌های

آلوده در دو منطقه هراز و تنکابن (دوهزار و سه هزار) نشان می‌دهد که میزان آلودگی در منطقه تنکابن ۷۴٪ و در هراز ۵۱٪ می‌باشد که این مهم به عواملی از جمله دمای بالای رودخانه‌های دوهزار و سه هزار در حدود ۱۹ درجه سانتی‌گراد و شیوع بیماری باکتریایی استرپتوکوکوزیس به طور وسیع در منطقه بوده است.

مقایسه پارامترهای مورد اندازه‌گیری در دو منطقه هراز و تنکابن مبین آن است که در فاکتورهای آنزیم-های SGOT و SGPT و آلبومین و همچنین پروتئین تام دارای اختلاف معنی‌داری بوده ولی در خصوص سایر پارامترها فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

باتوجه به جمیع مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد نیاز به تحقیق بیشتر در استفاده از این فاکتورها در جهت پیش بینی وضعیت سلامت جمعیت ماهیان وجود دارد. لیکن استفاده از محرکین ایمنی در کلیه مزارع پرورش ماهیان سردآبی به نظر می‌رسد گامی مهم در امر بهینه‌سازی صنعت تکثیر و پرورش ماهیان خواهد بود که نیاز به فرهنگ‌سازی از سوی ارگان‌های مسئول دارد.

سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و مسئولین مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای استان مازندران نهایت تشکر را داریم.

منابع

۱. جمالزاده، ح.، ۱۳۸۰. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، بررسی فاکتورهای خونی آزاد ماهیان دریای خزر، ۱۱۵ صفحه.
۲. عامری مهابادی، م.، ۱۳۷۸. روش‌های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۲۶ صفحه.

3. Austin, B., Austin, D., 1993. Bacterial fish pathogens diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood limited. pp.27-37 and 70-73.
4. Blaxhall, P. C., 1972. The hematological assessment of the health of fresh water fish. Journal of fish biology, pp. 593-604.
5. Chen, C. Y., Wooster, G. A., Bowser, P. R., 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. Aquaculture, Vol. 239. pp.421-443.
6. Densmore, C. L., Blazer, V. S., Waldrop, T. B., Pooler, P. S., 2001. Effects of Whirling Disease on Selected Hematological Parameters in Rainbow Trou. Journal of Wildlife Diseases, Vol. 37, pp. 375-378.
7. Gonzalez, S. F., Buchmann, K., Nielsen, M. E., 2007. Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio*) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. Development & Comparative Immunology, Vol 31, pp. 576-586.
8. Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bgwald, J., Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humeral immune parameters in fishgwald R.A. and Dalmo. Fish & Shellfish Immunology. Vol.19, pp, 429-439.
9. Sahu, S., Kumar Das, B., Pradhan, J., Mohapatra, B. C., Mishra, B. K., Sarangi, N., 2007. Effect of Magnifera indica kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Labeo rohita fingerlings. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 23, pp. 109-118.
10. Shariffi, M., Jayawardena, P. A. H. L., YusOff, F. M., Subasinghe, R., 2001. Immunological parameters of Javanese carp *Puntiusgonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challengedwith *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 11, pp.281-291.
11. Sunyer, J. O., Zarkadis, I. K., Sahu, A., Lambris, J. D., 1996. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activaters. Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 93, pp. 8546-8451.