

بررسی ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی لیپوپلی ساکارید یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) در برابر یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- زهرا طولابی‌دزفولی: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- مجتبی علیشاهی*: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- مسعود قربانپور: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- مهرزاد مصباح: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- محمدرضا تابنده: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۸

چکیده

با توجه به اهمیت یرسینیوزیس در کشور و ضرورت واکسیناسیون ماهی در این تحقیق اثر لیپوپلی ساکارید باکتری یرسینیا راکری بر کارایی و ایمنی‌زایی باکترین یرسینیا راکری در تجویز تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری ارزیابی گردید. ۴۸۰ قطعه ماهی ($7 \pm 1/2$ گرم) به صورت تصادفی به ۸ گروه مساوی، هر گروه در سه تکرار (هر تکرار ۲۰ ماهی) تقسیم گردیدند. گروه A، B و C به ترتیب با خوراک حاوی LPS (۳۰۰ میکروگرم/کیلوگرم/وزن بدن)، LPS+باکترین (۱۰۹ cfu/گرم) و باکترین در هفته اول و سوم تحقیق تغذیه شدند. در گروه غوطه‌وری (D) ماهی‌ها به مدت ۲ دقیقه در روز صفر و ۱۴ در سوسپانسیون باکترین (۱۰۹ میلی‌لیتر) غوطه‌ور شدند. گروه‌های تزریقی (E و F) به ترتیب با باکترین (۱۰۱۰ cfu/میلی‌لیتر)، LPS (۳۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) و باکترین+LPS به روش داخل صفاقی ایمن شدند و در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ نمونه خون و سرم تهیه شده و شاخص‌های خونی و ایمنی بین ماهیان تیمارها مقایسه گردیدند. نتایج نشان داد که تزریق باکترین+LPS تحریک شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی را به طور معنی‌داری در اکثر گروه‌ها بهبود بخشید ($P < 0/05$). میزان کارایی تجویز باکترین+LPS در روش خوراکی با روش غوطه‌وری مشابه بوده و به طور معنی‌داری کمتر از روش تزریقی بود ($P < 0/05$). نتایج تحقیق جاری نشان داد که اضافه نمودن LPS به باکترین علاوه بر بهبود کارایی واکسن به روش تزریقی و خوراکی، ایمنی‌زایی آن‌ها را هم افزایش داد. لذا می‌توان بعد از مطالعات تکمیلی از آن به عنوان یک کاندید مناسب و اقتصادی در تهیه واکسن یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلا استفاده کرد.

کلمات کلیدی: ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، یرسینیوزیس، LPS، ایمنی‌زایی



مقدمه

یرسینیوزیس در ماهیان توسط باکتری یرسینیا راکری از خانواده *اِنتروباکتریاسه* ایجاد می شود. واژه «یرسینیوزیس» مترادف با بیماری دهان قرمز روده ای (ERM) بوده که در اثر عفونت با باکتری یرسینیا راکری ایجاد می گردد. ERM اولین بار در اواخر دهه ۱۹۵۰ وقتی که ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در دره هاگرمین ایداهوی آمریکا مبتلا شده بودند، توصیف گردید (Rucker, ۱۹۶۶). یرسینیوزیس در تمام کشورها منجر به خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت پرورش آزادماهیان می گردد. علی رغم این موضوع فقدان اطلاعات مناسب در مورد یرسینیوزیس مشهود است و بیماری زایی آن به خوبی درک نشده است (Tobback و همکاران، ۲۰۰۹). این باکتری می تواند در ماهیان عفونت تحت درمانگاهی (حاملان بدون علامت) ایجاد نموده، در صورت بروز هرگونه استرس، منجر به ایجاد عفونت درمانگاهی در یک جمعیت شود (Ghosh و همکاران، ۲۰۱۶). یرسینیا راکری یک پاتوژن درون سلولی اختیاری است و می تواند درون ماکروفاژها زنده بماند (Ryckaert و همکاران، ۲۰۱۰). در ماهیان جوان سیستم کمپلمان، لایزوزیم، پپتیدهای ضد میکروبی، MHC I، CD-8 به همراه سیستم ایمنی هومورال وابسته و غیر وابسته به آنتی ژن های T نقش مهمی در حفاظت ماهیان علیه پاتوژن ها ایفا می کنند (Chettri و همکاران، ۲۰۱۲). غشای سلول باکتری های گرم منفی شامل دولایه داخلی و خارجی است. غشای خارجی شامل لیپوپلی ساکارید (LPS)، فسفو لیپیدها، پروتئین های غشای خارجی و لیپوپروتئین هاست. لیپوپلی ساکارید بخش عمده غشای خارجی را تشکیل می دهد که علاوه بر نقش ساختاری، غشای سلول را در برابر انواع خاصی از مواد شیمیایی محافظت می نماید (Altinok و همکاران، ۲۰۱۶). آنتی ژن O لیپوپلی ساکارید یک ترکیب ایمنی زای شناخته شده است و وقتی همراه دیگر اجزای سلولی استفاده می گردد، توانایی القای محافظت خوبی در برابر عفونت یرسینیا راکری خواهد داشت، حتی اگر آنتی ژن O استفاده شده از گونه های دیگر شامل پرپیوتیک ها مثل *اِئروموناس سوبریا* و *باسیلوس سوبتیلیس* باشد (Abbass و همکاران، ۲۰۱۰). اولین گزارش از واکسیناسیون موفق قزل آلائی رنگین کمان در برابر یرسینیوزیس توسط Klotz (۱۹۶۳) با استفاده از باکترین تهیه شده از یرسینیا راکری و تجویز خوراکی آن بود. به دلیل اهمیت بیماری یرسینیوزیس در تفریخگاه (کارگاه تکثیر) آزادماهیان و مزایای واکسیناسیون به روش غوطه وری، به دلیل کاربرد آسان برای نوزادان و نیز ماهیان جوان، باعث شده است روش غوطه وری به عنوان روش انتخابی تجویز واکسن باقی بماند، هرچند روش تزریق داخل صفاقی مؤثرترین حفاظت را بر اساس درصد بقای نسبی و هم طول مدت محافظت، تأمین می نماید

(Anderson و Nelson، ۱۹۷۴)، ولی برای ماهیان کوچک (ماهیان با وزن کم تر از ۲۰ گرم) کاربردی نیست و علاوه بر هزینه بالا، استرس زیادی به ماهی وارد می کند. در واکسیناسیون مخاطی (غوطه وری، خوراکی) آنتی ژن ها توسط سطوح مخاطی (آبشش، پوست، دستگاه گوارش) جذب می شوند و علاوه بر ایمنی مخاطی، پاسخ عمومی را به منظور حفاظت در برابر برخورد با عوامل بیماری زا تحریک می کنند. گزارشات مکتوب این بیماری در ایران محدود است، اولین گزارشات مربوط به به جداسازی تعدادی از جدایه های باکتری عامل بیماری از استان چهار محال بختیاری (Soltani و همکاران، ۱۹۹۹) و فارس (Sharifi و Akhlaghi، ۲۰۰۸) برمی گردد. سلطانی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی ۵ استان اصلی پرورش ماهی قزل آلا در کشور علاوه بر گزارش بیماری یرسینیوزیس حاد، همه ایزوله های جدا شده را از بیوتیپ ۱ دانستند. تجویز خوراکی آنتی ژن ها برای ایمن سازی ماهیان کوچک آسان تر و کاربردی تر است. هم چنین واکسیناسیون به این روش منجر به تحریک ایمنی مخاطی که به عنوان اولین خط دفاعی در برابر اکثر پاتوژن ها محسوب می شود، می گردد (Gomez و همکاران، ۲۰۱۳). واکسیناسیون خوراکی به طور کلی به دلیل سهولت تجویز، استرس زا نبودن، هزینه پایین و امکان تجویز در جمعیت های بالا و تمام سنین بهترین روش تجویز واکسن است (LaPatra و Plant، ۲۰۱۱). البته مهم ترین مشکل این روش میزان محافظت پایین در مقایسه با روش تزریقی است. با توجه به اهمیت یرسینیوزیس در ماهی قزل آلا در کشور و ضرورت واکسیناسیون ماهی در برابر این بیماری و با عنایت به مزایای واکسیناسیون خوراکی نسبت به سایر روش ها به ویژه در مراحل اولیه رشد ماهی، در این تحقیق با استفاده از آنتی ژن (لیپوپلی ساکارید) ایمنی زای یرسینیا راکری کارایی تجویز خوراکی این آنتی ژن در ایمن سازی ماهی قزل آلائی رنگین کمان ارزیابی شد.

مواد و روش ها

ماهی و شرایط تحقیق: تعداد ۴۸۰ قطعه بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با وزن حدود ۵ گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی در لرستان در دی ماه سال ۹۶ تهیه و با مراعات شرایط انتقال به دانشکده دامپزشکی، بخش بهداشت آبزیان منتقل شدند. بعد از بررسی اولیه از نظر ظاهری و بیماری های انگلی و باکتریایی، ماهی ها به مدت ۱۰ روز با خوراک پایه جهت سازش یابی با محیط و اطمینان از عدم بیماری در مخازن ۱۰۰۰ لیتری پرورش داده شدند و قبل از شروع تحقیق به منظور اطمینان از سلامت ماهیان از بافت های مختلف کشت باکتریایی تهیه شد (Kadowaki و همکاران، ۲۰۱۳).

فاز آبی جدا شده از مرحله دوم، به کیسه دیالیز با محدوده عبور ذرات تا ۱۴۰۰۰ دالتون به مدت ۳ روز منتقل گردید.

اندازه میزان لیپوپلی ساکارید (LPS) استخراج شده به روش فنل سولفوریک اسید: میزان کربوهیدرات در LPS استخراج شده به روش Dubois (۱۹۵۶) با کمی تغییرات در میکروپلیت اندازه گیری شد. برای این منظور ۳۰ میکرولیتر فنل ۵ درصد به ۵۰ میکرولیتر نمونه LPS اضافه گردید و بلافاصله پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر سولفوریک اسید خالص اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد و محل تاریک قرار داده شد. جذب نوری در ۴۸۵ نانومتر قرائت گردید (BioTek، آمریکا). میزان کربوهیدرات (گلیکان) پس از رسم نمودار استاندارد (گلوکز به عنوان قند مرجع) تخمین زده شد. به منظور اطمینان از خلوص LPS استخراج شده، میزان پروتئین آن نیز به روش برادفورد اندازه گیری شد. لازم به ذکر است به منظور تزریق LPS به ماهیان، میزان مورد نظر از محصول با استفاده از گاز ازت تغلیظ گردید.

طراحی تحقیق: ۴۸۰ قطعه ماهی (۷±۱ گرم) به صورت تصادفی به ۸ گروه مساوی، هر گروه در سه تکرار (هر تکرار ۲۰ ماهی) تقسیم گردیدند. گروه A، B و C به ترتیب با خوراک حاوی LPS (۳۰۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن)، LPS+باکترین (۱۰^۹ cfu/گرم) و باکترین در هفته اول و سوم تحقیق تغذیه شدند (Ghosh و همکاران، ۲۰۱۶). گروه غوطه وری (D) ماهی ها به مدت ۲ دقیقه در روز صفر و ۱۴ در باکترین (۱۰^۹ cfu/میلی لیتر) غوطه وری شدند. گروه های تزریقی (F، E و G) به ترتیب ۰/۱ میلی لیتر باکترین (۱۰^{۱۰} cfu/میلی لیتر)، LPS (۳۰۰ میکروگرم/میلی لیتر) و باکترین+LPS به روش داخل صفاقی دریافت کردند. به ماهیان گروه شاهد نیز ۰/۱ میلی لیتر بافر فسفات استریل تزریق شد (جدول ۱). طول دوره تحقیق دو ماه بوده و در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ از هر تکرار (۹ ماهی از هر تیمار) نمونه خون و سرم تهیه شده و شاخص های خونی و ایمنی ماهیان تیمارها (جدول ۲) مقایسه گردید.

جدول ۱: اسامی و مخفف گروه های دریافت کننده واکسن

مخفف گروه ها	گروه ها
A	LPS خوراکی (۳۰۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن)
B	LPS به همراه باکترین خوراکی (۱۰ ^۹ cfu/گرم)
C	باکترین خوراکی
D	غوطه وری با باکترین
E	باکترین تزریقی (۱×۱۰ ^{۱۰} cfu/میلی لیتر)
F	LPS تزریقی (۳۰۰ میکروگرم/میلی لیتر)
G	LPS به همراه باکترین تزریقی
H	شاهد

شرایط آب تحقیق: دمای آب ۱۴±۱ درجه سانتی گراد، pH بین ۷/۸ تا ۸/۵، سختی براساس کربنات کلسیم = ۸۵۰ میلی گرم در لیتر، نیتريت و آمونیاک کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر و نیترات کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر.

تهیه باکترین یرسینیا راکری: در این تحقیق از باکتری یرسینیا راکری (KCW 291153) جداسازی شده از ماهیان بیمار قزل آلا میزارع کشور ایران که با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی تأیید شده بود، استفاده شد. یرسینیا راکری با استفاده از فرمالین ۱ درصد و انکوبه کردن به مدت ۲ ساعت، غیرفعال و ۳ مرتبه با بافر فسفات استریل شسته شده و به منظور اطمینان از غیرفعال شدن، باکترین قبل از استفاده در محیط آگار خون دار کشت داده شد. به منظور افزودن باکترین به غذا از روش Villumsen و همکاران، (۲۰۱۴) استفاده گردید.

روش استخراج لیپوپلی ساکارید (LPS): جداسازی لیپوپلی ساکارید براساس روش توصیه شده توسط Apicella (۲۰۰۸) به شرح زیر انجام گرفت:

ابتدا سلول های کشت داده شده در محیط کشت مغذی سانتریفیوژ شدند و رسوب ایجاد شده، به لوله جدید انتقال داده شد. سپس بافر تریس- کلر ۱۰ میلی مول (pH: 8) شامل SDS (۲ درصد)، ۲-ME (۴ درصد)، MgCl (۲ میلی مول) به لوله حاوی باکتری افزوده و در بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا سلول های باکتریایی حل شدند. پروتئیناز K به ترکیبات فوق افزوده شد و ۱ ساعت در بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. استات سدیم و اتانول سرد به ترکیبات فوق افزوده شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت یک شب نگهداری می شود. سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ می گردد. مایع رویی دور ریخته شده و آب مقطر استریل، سدیم استات و اتانول خالص و سرد به رسوب اضافه شده و به خوبی ورتکس می شود. سوسپانسیون یک شب در ۲۰- درجه سانتی گراد گذاشته شد. پس از آخرین سانتریفیوژ، به رسوب حاصل، تریس- کلر ۱۰ میلی مول (pH: ۷/۴)، DNase و RNase اضافه شده و محلول در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه می گردد. ترکیب حاصل در حمام آب ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته و برابر حجمش فنل ۶۵ درجه سانتی گراد ۹۰ درصد، اضافه می گردد. سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته، سپس به وسیله حمام یخ سریعاً در دمای ۴ درجه سانتی گراد سرد گردیده و در مرحله بعد سانتریفیوژ می شود. پس از سانتریفیوژ، در لوله آزمایش ۳ فاز تشکیل می شود که شامل فاز آبی، فاز فنلی و رسوب است که فاز آبی جمع آوری می شود. فاز آبی جدا شده از مرحله قبلی به همراه



(۱۹۹۴) استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر خون هیارینه با ۱۰۰ میکرولیتر محلول زرد رنگ NBT دو درصد ترکیب شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. سپس در لوله آزمایش جداگانه ۲۰۰۰ میکرولیتر دی متیل فرامید ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب خون و NBT به آن اضافه گردید و سپس در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت میزان جذب نوری مایع رویی در دستگاه اسپکتروفتومتری و در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی ضد یرسینیا راکری: اندازه‌گیری

تیتر آنتی‌بادی ضد یرسینیا راکری به روش الایزا (طبق روش Shelby و همکاران، ۲۰۰۴) با کمی تغییرات انجام گرفت. در کف گوددهای پلیت الایزا آنتی‌ژن (باکتری سونیکه‌شده)، در کف گوددها کوت و به مدت یک روز در یخچال نگهداری شد و سپس محلول رویی پلیت‌های الایزا دور ریخته و ۳ بار با PBS توئین شست‌وشو گردید. سرم و موکوس‌های ماهی از هر تیمار به میزان ۱ به ۲۰ و ۱ به ۱ در PBS توئین و شیر ۰/۱ درصد رقیق و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار گرفت و سپس محلول دور ریخته و ۴ بار شست‌وشو گردید و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد زنجیره سنگین IgM قزل‌آلا تولید شده در موش (تهیه شده توسط دکتر صیفی) به نسبت ۱ به ۷۵۰۰ رقیق شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه سه بار شست‌وشو گردید و آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی تولید شده در بز (IgG HRP) (Sigma-Aldrich) به صورت کنژوگه، در هر چاهک اضافه شد. بعد از ۶۰ دقیقه محلول دور ریخته و ۳ بار شست‌وشو گردید. سوبسترای کروموزن به هر چاهک اضافه گردید، پس از ۱۰ دقیقه ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده H₂SO₄ ۲ نرمال اضافه گردید. جذب نوری مربوط به هر چاهک در دستگاه الایزا ریدر (Accu Reader, Taiwan) با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

مواجهه‌سازی باکتریایی: بعد از ۲ ماه ماهی‌های تیمارهای ۸ گانه

با باکتری زنده به روش تزریق داخل صفاقی مواجهه‌سازی داده شدند. به این منظور ۱۲ ماهی در هر تیمار به صورت داخل صفاقی با غلظت LD₅₀ باکتری که قبلاً محاسبه شده بود (دوز ۵×۱۰^۷ CFU) مواجهه داده شدند. به مدت ده روز علائم بیماری و تلفات روزانه ثبت گردید. برای اطمینان از نقش باکتری در تلفات ایجاد شده در طول مدت مواجهه‌سازی از تلفات روزانه (ماهیان در حال مرگ) در هر گروه نمونه برداری باکتریایی انجام شده و از بافت کلیه آن‌ها کشت داده شد. نتایج براساس نرم‌افزار probit آنالیز گردید و نهایتاً از فرمول زیر درصد بقای نسبی یا RPS محاسبه شد (Villumsen و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ghosh و همکاران، ۲۰۱۶):

$$RPS = 1 - \frac{\text{Percent mortality in treated group}}{\text{Percent mortality in control group}} \times 100$$

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم: فعالیت لایزوزیم سرم به روش

توربیدومتری با استفاده از روش توصیه شده توسط Ellis و همکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا ۲ میکرو لیتر از سرم نمونه با ۱۱۰/۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر باکتری میکروکوکوس لیزودا/یکتیکوس (سیگما) در بافر فسفات سیترات ۰/۰۵ مولار (pH=۵/۸) در گوددهای پلیت الایزا مخلوط شد و جذب نوری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱ و ۳۰ دقیقه بعد در طول موج ۴۵۰ نانومتر در دستگاه Elisa reader (Accureader، تایوان) اندازه‌گیری شد. هر ۰/۰۰۱ کاهش جذب نوری در دقیقه معادل یک واحد لایزوزیم در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری گلبول‌های سفید، پروتئین کل و گلوبولین پلاسما:

شمارش کلی گلبول‌های سفید ماهی به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت، برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق‌کننده نات هریک استفاده شد (Thrall، ۲۰۰۴).

غلظت ایمونوگلوبولین کل براساس روش شرح داده شده توسط Swain و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد. به این منظور ابتدا میزان پروتئین کل و آلبومین سرم توسط کیت‌های زیست‌شیمی (ایران) اندازه‌گیری شده و میزان گلوبولین سرم با تفریق میزان آلبومین از میزان پروتئین کل تخمین زده شد.

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم: برای اندازه‌گیری قدرت

باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط Budino و همکاران (۲۰۰۶)، با کمی تغییرات استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باکتری یرسینیا راکری به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و پس از آن محیط سانتریفیوژ گردید و سپس دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو داده شد، در ادامه از رسوب سوسپانسیونی با غلظت 2×10^7 cfu/میلی‌لیتر در محیط TSB تهیه گردید و مقدار ۱۳۳ میکرو لیتر از آن در ۲ تکرار در گوددهای پلیت استریل کشت سلول ۹۶ تایی ریخته شد. در یک حفره نیز به عنوان شاهد ۱۳۳ میکرولیتر PBS استریل ریخته شد. در ادامه به هر سه گودده ۳۳ میکرولیتر از سرم ماهی مورد آزمایش ریخته شد و پلیت برای مدت ۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان زمان انکوباسیون به همه گوددها به میزان ۸۶ میکرولیتر محلول MTT (diphenyltetrazolium bromide) با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند و در نهایت تغییر رنگ ناشی از احیای MTT توسط باکتری‌های زنده در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد و درصد باکتری‌کشی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$100 \times [\text{جذب گوددها (باکتری+PBS)} / \text{میانگین جذب دو تکرار سرم نمونه حاوی باکتری}]$

اندازه‌گیری احیاء NBT (Nitro Blue Tetrazolium): برای

ارزیابی احیاء NBT از نمونه خون تازه و روش (Siwicki و همکاران،



مقایسه میزان گلبول‌های سفید، پروتئین، گلوبولین و آلبومین سرم بین تیمارها: بیش‌ترین گلبول‌های سفید در گروه‌های E و G ۳۰ روز پس از نمونه‌برداری و در مرحله دوم نمونه‌برداری بالاترین میزان در گروه G مشاهده شد ($P < 0.05$). پروتئین تام و آلبومین سرم در تیمارهای واکسینه افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشتند ($P > 0.05$). بیش‌ترین میزان IgM در گروه G و در روز ۳۰ اندازه‌گیری شد که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$).

عیار پادتن مخاط روده ضد یرسینیا راکری (روش سنجش مشخص نیست): عیار پادتن در روز ۶۰ بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد ولی در روز ۳۰ بیش‌ترین عیار پادتنی مخاط روده به‌ترتیب در گروه‌های B، E، G و C دیده شد ($P < 0.05$).

عیار پادتنی سرم ضد یرسینیا راکری (روش سنجش مشخص نیست): بالاترین میزان پادتن سرمی در روز ۳۰ به‌ترتیب مربوط به گروه‌های E، G و F بود که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود ($P < 0.05$) و در روز ۶۰، گروه G بیش‌ترین عیار پادتنی را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان داد ($P < 0.05$).

تلفات پس از مواجهه‌سازی: تلفات بعد از تزریق باکتری زنده یرسینیا راکری به‌ترتیب در گروه‌های C، D، B، E، G و A کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). تمام ماهیان گروه شاهد (H) در طی سه روز پس از چالش تلف شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار آورده شده و برای تعیین معنی‌داری تفاوت میانگین تیمارها از پس از مون دانکن در سطح معنی‌داری (0.05) استفاده گردید.

نتایج

میزان LPS استخراج شده: میزان LPS استخراج شده به‌روش فنل سولفوریک اسید ۳۰۰ میکرولیتر در هر میلی لیتر محصول استخراج شده تخمین زده شد. هم‌چنین میزان پروتئین اندازه‌گیری شده به‌روش برادفورد در محصول صفر بود.

فعالیت باکتری کشی سرم: میزان قدرت باکتری کشی سرم در تیمارهای مختلف و در دو زمان ۳۰ و ۶۰ تحقیق تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$).

میزان فعالیت لایزوزیم سرم: فعالیت لایزوزیم سرم در تیمار ایمن شده با باکترین LPS+ در مقایسه با گروه شاهد و LPS خوراکی افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$).

آزمون احیای NBT: فعالیت NBT گلبول‌های سفید در تیمار تجویز باکترین LPS+ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای B، A و C در روز ۶۰ نمونه‌گیری نشان داد ($P < 0.05$).

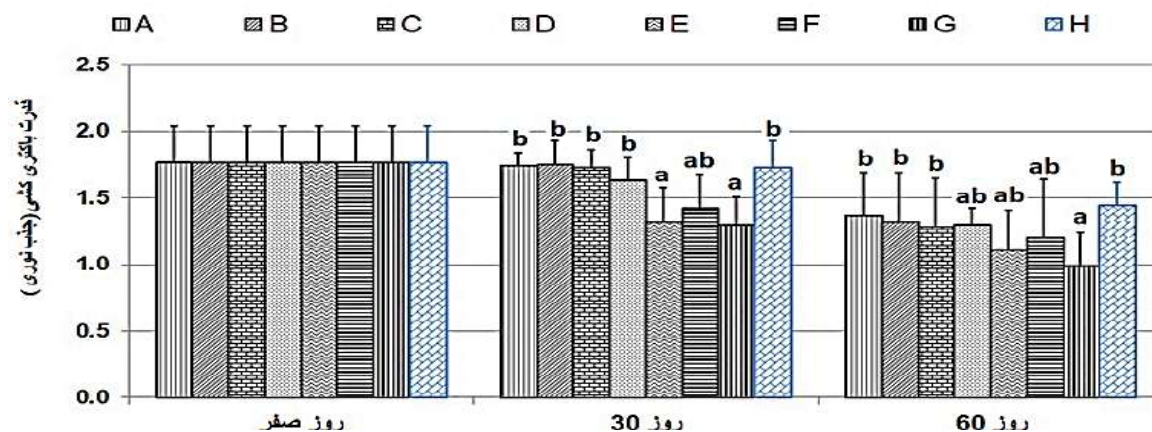
جدول ۲: میانگین فاکتورهای خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره ایمن‌سازی. A: LPS خوراکی، B: LPS به‌همراه باکترین خوراکی،

C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به‌همراه باکترین تزریقی، H: شاهد

فاکتور روزها	تیمارهای تحقیق	پروتئین تام (گرم/دسی لیتر)	آلبومین (گرم/دسی لیتر)	ایمونوگلوبولین (گرم/دسی لیتر)	تعداد گلبول‌های سفید ($\times 10^3$)
روز صفر		$4/0 \pm 43/36$	$2/0 \pm 62/44$	$1/0 \pm 81/63$	$12/3 \pm 50/08$
روز ۳۰	A	$4/0 \pm 35/53$	$2/0 \pm 55/51$	$2/0 \pm 5/16^b$	$13/1 \pm 50/58^b$
	B	$4/0 \pm 68/50$	$2/0 \pm 71/39$	$1/0 \pm 97/53^b$	$1 \pm 14/73^b$
	C	$4/0 \pm 44/41$	$2/0 \pm 61/57$	$1/0 \pm 82/45^b$	$13/4 \pm 33/51^b$
	D	$4/0 \pm 59/40$	$2/0 \pm 73/12$	$1/0 \pm 86/51^b$	$5 \pm 12/29^b$
	E	$4/0 \pm 61/31$	$2/0 \pm 57/58$	$2/0 \pm 04/76^b$	$20/4 \pm 25/99^a$
	F	$4/0 \pm 74/30$	$2/0 \pm 61/18$	$2/0 \pm 13/24^{ab}$	$5 \pm 13/35^b$
	G	$4/0 \pm 92/72$	$2/0 \pm 51/42$	$2/0 \pm 41/41^a$	$25/8 \pm 25/77^a$
	H	$4/0 \pm 48/42$	$2/0 \pm 56/47$	$1/0 \pm 91/36$	2 ± 12^b
روز ۶۰	A	$4/0 \pm 52/78$	$2/0 \pm 57/63$	$1/0 \pm 95/58$	$12/3 \pm 33/21^b$
	B	$4/0 \pm 97/73$	$2/0 \pm 58/36$	$2/0 \pm 29/60$	$14/0 \pm 67/58^{ab}$
	C	$4/0 \pm 59/30$	$2/0 \pm 52/31$	$2/0 \pm 07/33$	$12/4 \pm 33/16^b$
	D	$4/0 \pm 83/13$	$2/0 \pm 63/38$	$2/0 \pm 20/42$	$13/4 \pm 67/51^b$
	E	$4/0 \pm 56/29$	$2/0 \pm 66/48$	$1/0 \pm 90/48$	$3 \pm 11/61^b$
	F	$4/0 \pm 72/82$	$2/0 \pm 63/40$	$2/0 \pm 09/53$	$12/3 \pm 33/21^b$
	G	$4/0 \pm 75/47$	$2/0 \pm 53/29$	$2/0 \pm 22/66$	$16/7 \pm 67/64^a$
	H	$4/0 \pm 45/28$	$2/0 \pm 72/40$	$1/0 \pm 77/45$	$11/6 \pm 33/11^b$

میانگین $\pm$ انحراف معیار با حروف متفاوت در ردیف‌های یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در تیمارها می‌باشند ($p < 0.05$)

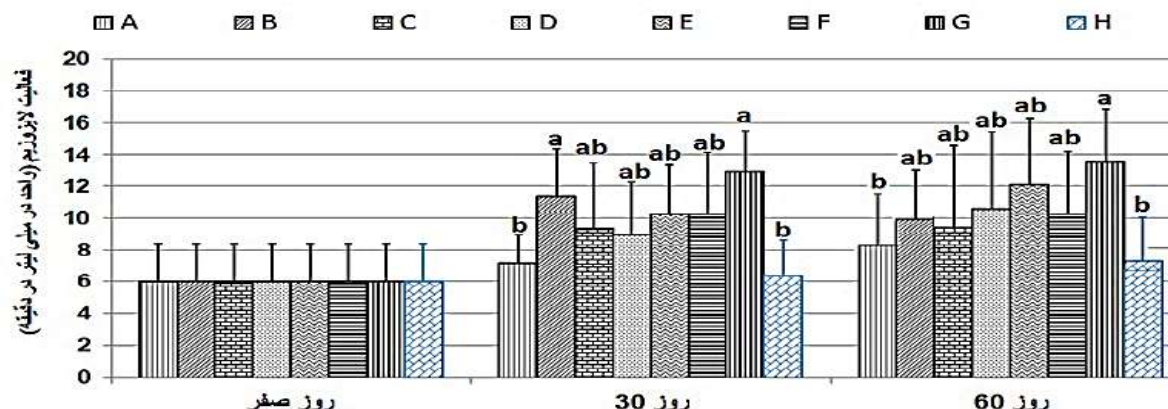




شکل ۱: A: LPS خوراکی، B: LPS به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS

تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد

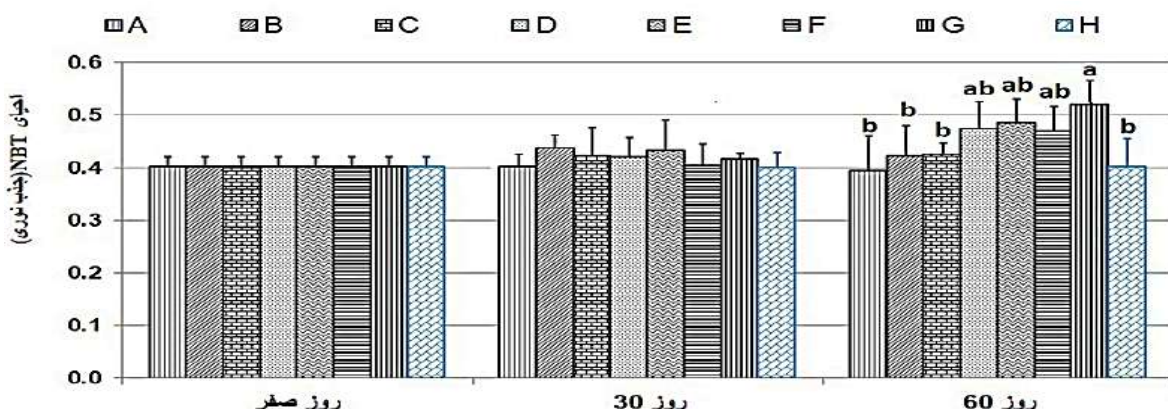
مقایسه (میانگین $\pm$ انحراف معیار) میزان قدرت باکتری‌کشی سرم ضد یرسینیا راگری (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).



شکل ۲: A: LPS خوراکی، B: LPS به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS

تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد

مقایسه (میانگین $\pm$ انحراف معیار) فعالیت لایزوزیم سرم ضد یرسینیا راگری (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).

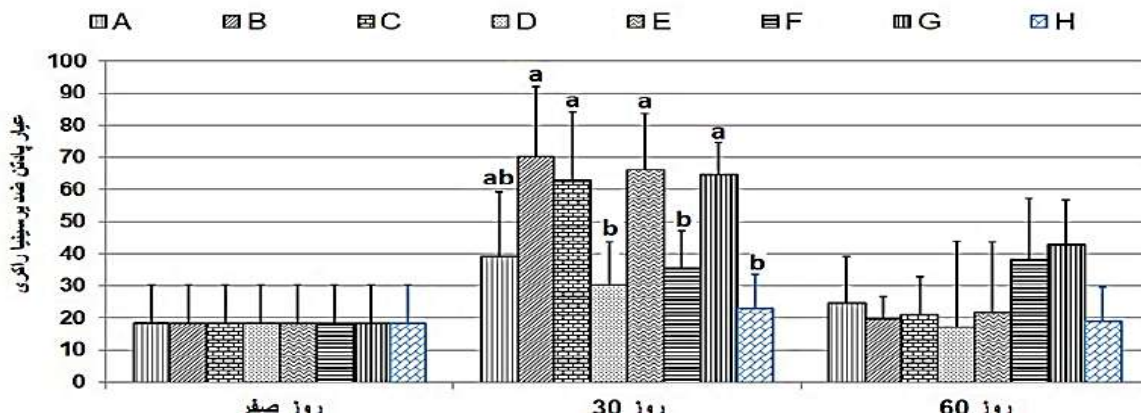


شکل ۳: A: LPS خوراکی، B: LPS به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS

تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد

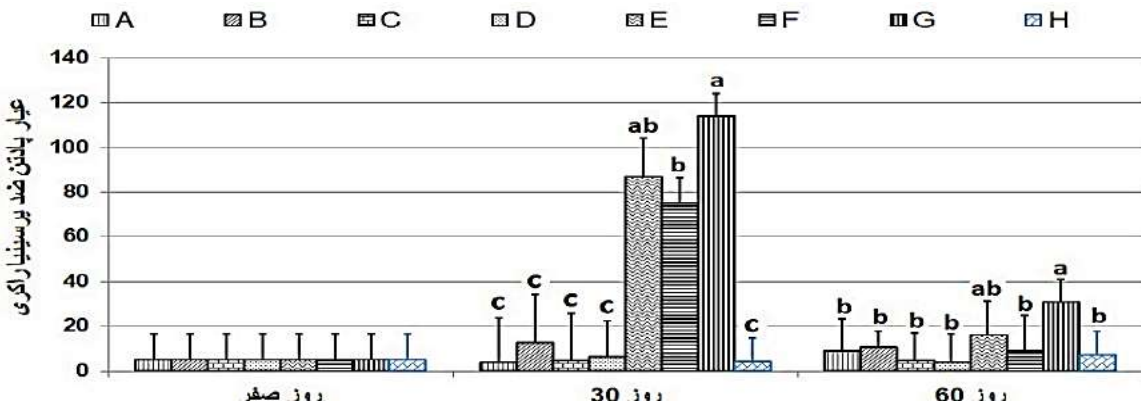
مقایسه (میانگین $\pm$ انحراف معیار) NBT سرم ضد یرسینیا راگری (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).





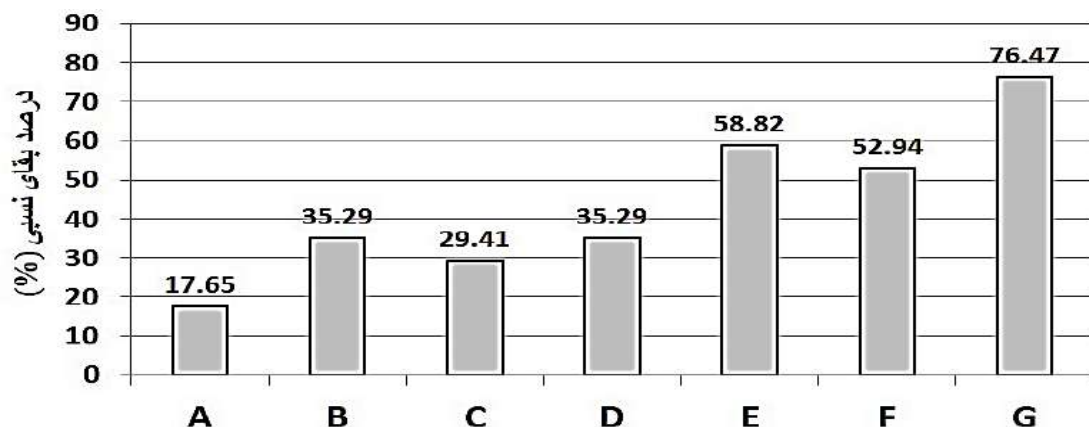
شکل ۴: A: LPS خوراکی، B: LPS به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد

مقایسه (میانگین ± انحراف معیار) عیار پادتن مخاط روده ضد پرئسینیا راگری (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).



شکل ۵: A: LPS خوراکی، B: LP به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد

مقایسه (میانگین ± انحراف معیار) عیار پادتنی سرم ضد پرئسینیا راگری (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).



شکل ۶: مقایسه درصد بازماندگی ماهیان پس از چالش به روش تزریق داخل صفاقی. A: LPS خوراکی، B: LPS به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی



بحث

اولین تجربیات روی واکسیناسیون روی ماهی از واکسیناسیون ماهی در برابر بیماری دهان قرمز (یرسینیوزیس) آغاز شد (Klontz, ۱۹۶۳)، لذا تحقیق روی انواع واکسن و روش های مختلف تجویز در جهان به کرات صورت گرفته است. علی رغم حضور بیماری در صنعت آبی پروری کشور تا به حال مطالعه جامعی در مورد این واکسن در کشور انجام نشده است. در تحقیق جاری از باکترین فرمالینه و LPS به صورت تکی و توأم به روش تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری استفاده گردید. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تزریق باکترین+LPS تحریک ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی را به طور قابل توجهی بهبود بخشید در حالی که میزان کارایی تجویز باکترین+LPS در روش خوراکی با روش غوطه‌وری مشابه و کم تر از روش تزریقی بود. تحقیقات مختلف در مورد کارایی واکسن های تزریقی و خوراکی همراه، یا بدون محرک های ایمنی در ماهی، نتایج متفاوتی در برداشته‌اند و یکی از ویژگی های اصلی واکسن ها و محرک های ایمنی، افزایش بقای ماهی ها پس از چالش مواجهه سازی با عوامل بیماری‌زا است. به عنوان مثال Selvaraj و همکاران (۲۰۰۶) اثرات ایمنی‌زای بتاگلوکان و لیپوپلی ساکارید را با روش های مختلف تزریقی، حمام و خوراکی مورد بررسی قرار دادند. آن ها غلظت های مختلف از ترکیب بتاگلوکان و لیپوپلی ساکارید را در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ استفاده کرده و در روز ۱۶ مواجهه سازی با *آئروموناس هیدروفیلا* انجام دادند. درصد نسبی بقا (RPS) در گروه تزریقی (۱۰۰ میکروگرم بتاگلوکان + ۱۰ میکروگرم لیپوپلی ساکارید) ۱۰۰ درصد و در گروه خوراکی (۱ درصد بتاگلوکان + ۰/۲۵ درصد لیپوپلی ساکارید) ۷۱/۴ درصد گزارش گردید و در گروه غوطه‌وری (۱۰۰ میکروگرم بتاگلوکان + ۱۰ میکروگرم لیپوپلی ساکارید) بهبود RPS مشاهده نگردید. میزان نوتروفیل ها و مونوسیت ها، تولید آنیون سوپراکسید توسط ماکروفاژها در گروه تزریقی و خوراکی افزایش یافت. همانند تحقیق حاضر بیش ترین تیتراژ آنتی بادی سرمی در گروه تزریقی مشاهده گردید. آن ها تزریق داخل صفاقی و تجویز خوراکی بتاگلوکان+لیپوپلی ساکارید را باعث افزایش مقاومت در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به گروه ایمن شده به روش حمام و گروه شاهد دانستند. در تحقیقی مشابه Deshmukh و همکاران (۲۰۱۲) از دو واکسن AquaVac ERM (یرسینیا راکری بیوتیپ ۱ غیرفعال شده با 5×10^9 cells/ml) و AquaVac RELERA (یرسینیا راکری بیوتیپ ۱ و ۲ غیرفعال شده با فرمالین) در ماهیان قزل آلا رنگین به روش غوطه‌وری استفاده کردند. چالش با بیوتیپ ۲ باکتری به روش داخل صفاقی صورت گرفت. درصد نسبی بقا (RPS) در گروه واکسینه شده با AquaVac ERM بعد از شش ماه ۲۹/۵ درصد بود

که حفاظت متقاطع اندکی در برابر بیوتیپ ۲ را نشان داد در حالی که RPS در گروه واکسینه شده با AquaVac RELERA ۴۲/۵ و ۵۲ درصد بود. در تحقیق حاضر غوطه‌وری با باکترین توانست پس از گذشت ۲ ماه حفاظت ۳۵/۲۹ درصدی ایجاد کند و کم ترین تلفات در تیمار تزریق شده با باکترین+LPS مشاهده گردید که به طور معنی داری نسبت به سایر تیمارها کم تر بود ($p < 0.05$). در تحقیقی دیگر Pridgeon و همکاران (۲۰۱۳) بهبود کارایی واکسن با استفاده از تولیدات خارج سلولی باکتری یرسینیا راکری را گزارش نمودند.

در همین راستا Chettri و همکاران (۲۰۱۷)، اثرات ایمنی‌زایی پپتید ضد میکروبی CAP ۱۸ (سنتزی) در برابر یرسینیا راکری در قزل آلا رنگین کمان به دو روش تزریقی و خوراکی را مورد ارزیابی قرار دادند. آن ها دریافتند که روش تزریقی در ماهیان ۵-۲ گرم به طور قابل توجهی باعث کاهش مرگ و میر پس از مواجهه با باکتری گردید در حالی که تجویز خوراکی آن به مدت ۱ یا ۳ هفته باعث بهبود بازماندگی در ماهیان پس از چالش به روش حمام نگردید. این محققان بیان کردند که اثر پروتئولیتیکی ترشحات دستگاه گوارش ماهی بر روی این ماده منجر به کاهش اثرات خوراکی آن شده، لذا باید از این پپتید همراه با ترکیبات مقاوم به اسید و آنزیمی مانند آلزینات و کیتوزان استفاده نمود تا در دستگاه گوارش بهتر حفظ گردد. اغلب اثرات زیست شناختی LPS مانند کاهش فشارخون، انعقاد داخل عروقی منتشر، شوک و مرگ که در پستانداران مشاهده شده است به دلیل وجود بخش لیپید A این مولکول محسوب می شود. با این وجود مهره داران پست تر مانند قورباغه ها و ماهیان در برابر اثرات نامطلوب LPS مقاومت بالایی دارند و LPS در میزان ۳۰۰ میکروگرم می تواند اثرات مفیدی برای ماهیان از جمله فعال سازی سیستم ایمنی غیر اختصاصی (ماکروفاژها) داشته باشد و مصونیت در برابر برخی بیماری ها در ماهیان را افزایش دهد. Guttvik و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که تجویز LPS ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن به ماهیان به روش تزریق داخل صفاقی منجر به بروز علائم بالینی نگردید، اگر چه اغلب LPS وارد جریان خون شده بود. Zhang و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که آزاد مایه کوهو و قزل آلا رنگین کمان در برابر اندوتوکسین (LPS) /شرشیا کلاسی و *آئروموناس سالمونیسیدا* حساسیتی نشان ندادند. نتیجه دیگر تحقیق جاری کارایی کم LPS خوراکی در دوز و دوره مورد استفاده بود. لذا با توجه به روند نسبتاً پرهزینه و زمان بر تولید LPS باکتری و کارایی کم آن، تجویز خوراکی به تنهایی به عنوان واکسن یرسینیا منطقی به نظر نمی رسد. البته تحقیقات بیش تری برای پی بردن به دوز و دوره بهینه تجویز ضروری است چرا که تفاوت فیزیولوژیک و آناتومیک لوله گوارش گونه های مختلف ماهیان پرورشی نیز بر روی اثربخشی واکسن خوراکی مؤثر است. وجود تفاوت های آناتومی در گونه های مختلف



از تزریق افزایش داشته و تا روز ۶۰ وجود داشت. احتمالاً دوز و دوره تجویز می‌تواند در عدم ایجاد ایمنی کافی دخیل باشند، اگرچه میزان باکترین دریافت شده توسط هر ماهی در روش خوراکی به‌طور دقیق مشخص نیست. از دلایل دیگر که برای عدم ردیابی آنتی‌بادی در واکسیناسیون خوراکی بیان می‌گردد می‌توان به تفاوت ایمنوگلوبولین‌های سرمی و ایمنوگلوبولین‌های مخاطی در ماهی قزل‌آلا اشاره کرد. در ماهی قزل‌آلا ایمنوگلوبولین سرمی از نوع IgM است ولی ایمنوگلوبولین مخاطی بیش‌تر از نوع IgT است (Munang'andu و Evensen, ۲۰۱۹؛ علیشاهی و طولابی، ۱۳۹۶) احتمالاً منوکلونال آنتی‌بادی ضدزنجیره سنگین IgM به‌کار رفته در این تحقیق نسبت به IgT مخاطی قزل‌آلا هم‌پوشانی بالایی نداشته و علی‌رغم این‌که در تیمار خوراکی محافظت نسبی مشاهده شده است (احتمالاً تحت تأثیر IgT) ولی تیتري آنتی‌بادی در سرم اندازه‌گیری نشد. این یافته‌ها در مطالعه Ghosh و همکاران (۲۰۱۵ و ۲۰۱۶) نیز ذکر شده است. یکی از ویژگی‌های واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی، بهبود شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهیان بیمار شده است. براساس نتایج این تحقیق برخی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی شامل فعالیت لایزوزیم سرم، میزان احیای NBT و تعداد گلبول‌های سفید در تیمار واکسینه شده با باکترین+LPS نسبت به تیمار شاهدافزایش معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).

هرچند شاخص‌هایی مثل فعالیت باکتری‌کشی و پروتئین کل و آلبومین در تیمارهای واکسینه تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان نداد ($p > 0.05$). بررسی میزان بیگانه‌خواری و انفجار تنفسی در سلول‌های بیگانه‌خوار یکی از شاخص‌های مهم ایمنی غیراختصاصی در ماهی است (Matsuura و همکاران، ۲۰۱۷). احیای NBT توسط رادیکال‌های آزاد تولیدشده در روند فاگوسایتوزیس صورت گرفته و افزایش احیای NBT نشان‌دهنده افزایش توان بیگانه‌خواری میزبان است. افزایش احیای NBT در این تحقیق در تیمارهای ایمن شده را می‌توان به دلیل افزایش تعداد و فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار سیستم دفاعی ماهی نسبت داد. در تحقیقات مشابه، Skalli و همکاران (۲۰۱۳) تجویز خوراکی طولانی‌مدت (۹۳ روز) لیپوپلی ساکارید استخراج‌شده از دیواره سلولی باکتری گرم منفی *Pantoea agglomerans* باعث بهبود رشد، افزایش تراکم سلول‌های جامی روده و فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی سرم (لایزوزیم، فعالیت باکتری‌کشی، میزان فعالیت کمپلمان، انفجار تنفسی) گردید.

لایزوزیم پروتئینی باارزش و یکی از اجزای مهم ایمنی غیراختصاصی ماهی بوده و به‌عنوان ایسونین، باعث تخریب جدار باکتری‌ها و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری می‌گردد (Esteban و Cerezuela, ۲۰۱۵). در تیمار باکترین+LPS پژوهش جاری فعالیت آن به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش داشت ($P < 0.05$). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد

ماهیان که شامل گونه‌های دارای معده و فاقد معده، گونه‌های دارای روده کوتاه و دارای روده طویل و حتی گونه‌های فاقد قسمت دوم لوله گوارش می‌باشند، توسعه واکسیناسیون خوراکی در ماهی را مشکل می‌کنند. مطالعات نشان داده است که میزان حفاظت، حتی وقتی تجویز روزانه برای مدت طولانی ادامه داشته باشد به‌طور قابل توجهی کم‌تر از روش تزریق یا غوطه‌وری است. افزایش طول دوره تجویز که به دلیل اطمینان از رسیدن آنتی‌ژن کافی به همه جمعیت است، با توجه به نیاز به میزان بسیار زیادی از واکسن، مقرون به‌صرفه نیست و محققان گرایشی به استفاده از این روش پرهزینه ندارند (Brandtzaeg و Pabst, ۲۰۰۴). به‌منظور بهبود کارایی این روش، باید تجزیه آنتی‌ژن در معده و قسمت قدامی لوله گوارش کاهش یابد و دوره تجویز واکسن نیز به حداقل برسد. در پژوهش دیگری به‌منظور بررسی اهمیت LPS و محل اثرگذاری آن Guttvik و همکاران (۲۰۰۲) از LPS/آئروموناس سالمونیسیدا به مدت دو ماه در جیره غذایی نوزاد آزادماهی اطلس استفاده کردند. تغییرات قابل توجهی در میزان پادتن اختصاصی علیه مواجهه‌سازی با آئروموناس سالمونیسیدا در ماهیان واکسینه شده یافت نشد. مطالعات ایمنونوهیستوشیمی و رادیوایمنواسی نشان داد که بیش‌ترین میزان LPS در سلول‌های پوششی روده قرار داشتند و کلیه قدامی، کبد و قلب میزان کم‌تری از LPS را نشان دادند. هم‌چنین گروه واکسینه شده با LPS پس از مواجهه‌سازی در مقایسه با گروه شاهد مرگ و میر بالاتری را نشان دادند. آن‌ها دوره طولانی‌مدت تغذیه با LPS و ایجاد تحمل ایمنی را دلیل نتایج ذکر کردند. در مطالعه حاضر نیز بیش‌ترین عیار پادتنی در مخاط روده مربوط به تیمار ایمن شده با باکترین+LPS به‌روش خوراکی بود. القای پاسخ ایمنی پس از ایمن‌سازی مخاطی وابسته به پاسخ‌های موضعی در مخاطات یا جذب آنتی‌ژن‌ها از سطوح خارجی و یا دستگاه گوارش و انتشار آن‌ها به کلیه قدامی یا طحال است. در مهره‌داران پیشرفته‌تر عوامل زنده یا مرده (محلول) توسط فولیکول‌های تخصص‌یافته مرتبط با بافت پوششی که دارای سلول‌های غشایی (M) هستند دریافت می‌شوند و سپس به بافت لنفاوی (پلاک‌های پاپر) در زیر بافت پوششی منتقل می‌شوند (Brandtzaeg و همکاران، ۱۹۸۷). سلول‌های M در ماهیان یافت نمی‌شوند، اما سلول‌هایی با کارایی مشابه در بافت پوششی دستگاه گوارش ماهی شناسایی شده است (Fuglem و همکاران، ۲۰۱۰). با این وجود تحقیقی درخصوص تأثیر ماهیت آنتی‌ژن (محلول یا ذره‌ای بودن) بر دریافت آنتی‌ژن صورت نگرفته است، بنابراین نمی‌توان در مورد چگونگی نحوه انتقال آن‌ها از طریق سلول‌های پوششی نتیجه‌گیری کرد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۴). در تحقیق جاری در گروه واکسن خوراکی آنتی‌بادی اختصاصی ضد یرسینیا راگری در سرم یافت نشد ولی در گروه واکسن تزریقی آنتی‌بادی ۳۰ روز بعد



۴. Altinok, I.; Capkin, E. and Boran, H., 2016. Comparison of molecular and biochemical heterogeneity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from Turkey and the USA. *Aquaculture*. Vol. 450, pp: 80-88.
۵. Apicella, M.A., 2008. Isolation and characterization of lipopolysaccharides. In *Bacterial Pathogenesis*. Humana Press. pp: 3-13.
۶. Brandtzaeg, P. and Pabst, R., 2004. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends in immunology*. Vol. 25, No. 11, pp: 570-577.
۷. Chettri, J.K.; Mehrdana, F.; Hansen, E.B.; Ebbensgaard, A.; Overgaard, M.T.; Lauritsen, A.H. and Buchmann, K., 2017. Antimicrobial peptide CAP18 and its effect on *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): comparing administration by injection and oral routes. *Journal of fish diseases*. Vol. 40, No. 1, pp: 97-104.
۸. Chettri, J.K.; Raida, M.K.; Kania, P.W. and Buchmann, K., 2012. Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol. 36, No. 2, pp: 463-474.
۹. Deshmukh, S.; Raida, M.K.; Dalsgaard, I.; Chettri, J.K.; Kania, P.W. and Buchmann, K., 2012. Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary immunology and immunopathology*. Vol. 145, No. 1-2, pp: 379-385.
۱۰. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.T. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. Vol. 28, No. 3, pp: 350-356.
۱۱. Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. *Techniques in fish immunology*. Vol. 1, pp: 101-103.
۱۲. Esteban, M.Á. and Cerezuela, R., 2015. Fish mucosal immunity: skin. In *Mucosal health in aquaculture*. Academic Press. pp: 67-92.
۱۳. Fuglem, B.; Jirillo, E.; Bjerkås, I.; Kiyono, H.; Nochi, T.; Yuki, Y. and Koppang, E.O., 2010. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol. 34, No. 7, pp: 768-774.
۱۴. Ghosh, B.; Nguyen, T.D.; Crosbie, P.B.; Nowak, B.F. and Bridle, A.R., 2016. Oral vaccination of first-feeding Atlantic salmon, *Salmo salar* L., confers greater protection against

از تجویز محرک های ایمنی، واکسن ها و برخی ادجوانت ها در ماهی گزارش شده است. از آن جاکه منبع اصلی این پروتئین، سرم سلول های مونسیت ها/ماکروفاژها و نوتروفیل ها می باشند، افزایش سطح سرمی تعداد گلبول های سفید در تیمار G در هر دو مرحله نمونه گیری می تواند به دلیل افزایش تعداد و درصد سلول های تولیدکننده لایوزیم از جمله هتروفیل ها و مونسیت ها در خون باشد (Soltani و همکاران، ۲۰۱۳؛ Giri و همکاران، ۲۰۱۸؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۶). در آزمایش دیگری توسط Kadowaki و همکاران (۲۰۱۳) فاکتورهای ایمنی در کپور معمولی (۲۰ گرم) پس از تجویز خوراکی LPS (۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم برای هر کیلوگرم وزن ماهی در روز) به مدت ۳۰ و ۶۰ روز بررسی شدند. فعالیت فاگوسیتوزی و باکتری کشی ماکروفاژهای کلیه قدامی و فعالیت لایوزیم سرم در تمام گروه ها افزایش یافت. در تحقیق Austin و Nya (۲۰۱۰) اثرات تجویز خوراکی LPS در پیشگیری از عفونت توسط *آئروموناس هیدروفیلا* در قزل آلائی رنگین کمان انگشت قد (۱۰ گرم) ارزیابی گردید. ماهیان به مدت ۱۴ روز با خوراک حاوی LPS تغذیه شدند. در ماهیان ایمن شده با LPS، فعالیت لایوزیم، باکتری کشی، انفجار تنفسی، پروتئین تام و آنتی پروتئاز افزایش نشان داد. ایمن سازی ماهی قزل آلائی رنگین کمان با باکترین+LPS به روش داخل صفاقی باعث محافظت بالای ماهیان در برابر مواجهه سازی باکتریایی شده و بهبود شاخص های ایمنی را باعث شد. با توجه به نتایج تحقیق جاری می توان نتایج تحقیق جاری نشان داد که اضافه نمودن LPS به باکترین علاوه بر بهبود کارایی واکسن در روش تزریقی و خوراکی، ایمنی زایی آن ها را هم به طور معنی داری افزایش داد. لذا براساس نتایج تحقیق جاری می توان بعد از مطالعات تکمیلی از LPS به عنوان یک گزینه مناسب و اقتصادی در تهیه واکسن یرسینیوزیس در ماهی قزل آلا استفاده کرد.

منابع

۱. سلطانی، م.؛ موسوی، ش.؛ ابراهیم زاده موسوی، ح. و میرزگر، س.، ۱۳۹۳. مطالعه مولکولی یرسینیا راگری، عامل یرسینیوزیس در برخی مزارع قزل آلائی کشور. *مجله دامپزشکی ایران*. دوره ۱۰، شماره ۱، صفحات ۵۹ تا ۶۷.
۲. علیشاهی، م. و طوبابی دزفولی، ز.، ۱۳۹۶. واکسناسیون ماهی. دانشگاه شهید چمران اهواز، فصل ۶، صفحات ۱۲۳ تا ۱۳۷.
۳. Abbass, A.; Sharifuzzaman, S.M. and Austin, B., 2010. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish diseases*. Vol. 33, No. 1, pp: 31-37.



۲۴. **Plant, K.P. and LaPatra, S.E., 2011.** Advances in fish vaccine delivery. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol. 35, No. 12, pp:1256-1262.
۲۵. **Pridgeon, J.W.; Klesius, P.H.; Song, L.; and Zhang, D., 2013.** Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. *Veterinary Microbiology*. Vol. 164, pp: 336-343.
۲۶. **Rucker, R.R., 1965.** Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin-office international des epizooties*. Vol. 65, No. 5, pp: 825-830.
۲۷. **Ryckaert, J.; Bossier, P.; D'Herde, K.; Diez-Fraile, A.; Sorgeloos, P.; Haesebrouck, F. and Pasmans, F., 2010.** Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 29, No. 4, pp: 648-655.
۲۸. **Selvaraj, V.; Sampath, K. and Sekar, V., 2006.** Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary immunology and immunopathology*. Vol. 114, No. 1, pp: 15-24.
۲۹. **Sharifi, Y. and Akhlaghi, M.H., 2008.** Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University*. Vol. 9, No. 4, pp: 347-352.
۳۰. **Siwicki, A.K.; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., 1994.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity & protection against furunculosis. *Veterinary immunology & immunopathology*. Vol. 41, No. 1-2, pp: 125-139.
۳۱. **Skalli, A.; Castillo, M.; Andree, K.B.; Tort, L.; Furones, D. and Gisbert, E., 2013.** The LPS derived from the cell walls of the Gram-negative bacteria *Pantoea agglomerans* stimulates growth and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture*. Vol. 416, pp: 272-279.
۳۲. **Soltani, M. and Pourgholam, R., 2013.** Some hematological and biochemical changes in blood serum of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) vaccinated with *Aeromonas hydrophila* following exposure to sublethal concentration of diazinon. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. Vol. 12, No. 1, pp: 12-23
۳۳. **Plant, K.P. and LaPatra, S.E., 2011.** Advances in fish vaccine delivery. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol. 35, No. 12, pp: 599-608.
۳۴. **Ghosh, B.; Bridle, A.R.; Nowak, B.F. and Cain, K.D., 2015.** Assessment of immune response and protection against bacterial coldwater disease induced by a live-attenuated vaccine delivered orally or intraperitoneally to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*. Vol. 446, pp: 242-249.
۳۵. **Giri, S.S.; Chi, C.; Jun, J.W. and Park, S.C., 2018.** Use of bacterial subcellular components as immunostimulants in fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. Vol. 10, No. 2, pp: 474-492.
۳۶. **Gomez, D.; Sunyer, J.O. and Salinas, I., 2013.** The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish and shellfish immunology*. Vol. 35, No. 6, pp: 1729-1739.
۳۷. **Guttvik, A.; Paulsen, B.; Dalmo, R.A.; Espelid, S.; Lund, V. and Bøgwald, J., 2002.** Oral administration of lipopolysaccharide to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. Uptake, distribution, influence on growth and immune stimulation. *Aquaculture*. Vol. 214, No. 1, pp: 35-53.
۳۸. **Kadowaki, T.; Yasui, Y.; Nishimiya, O.; Takahashi, Y.; Kohchi, C.; Soma, G.I. and Inagawa, H., 2013.** Orally administered LPS enhances head kidney macrophage activation with down-regulation of IL-6 in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and shellfish immunology*. Vol. 34, No. 6, pp: 1569-1575.
۳۹. **Marsden, M.J.; Freeman, L.C.; Cox, D. and Secombes, C.J., 1996.** Non-specific immune responses in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance to furunculosis. *Aquaculture*. Vol. 146, No. 1, pp: 1-16.
۴۰. **Matsuura, Y.; Takaoka, N.; Miyazawa, R. and Nakanishi, T., 2017.** A simple and non-invasive method for analyzing local immune responses in vivo using fish fin. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol. 74, pp: 136-143.
۴۱. **Munang'andu, H.M. and Evensen, Ø., 2019.** Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish & shellfish immunology*. Vol. 85, pp: 140-132.
۴۲. **Nya, E.J. and Austin, B., 2010.** Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of applied microbiology*. Vol. 108, No. 2, pp: 686-694.



۳۳. **Soltani, M.; Fadaii, F. and Mehrabi, M.R., 1999.** First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. Bulletin European Association of Fish Pathology. Vol. 9, No. 4, pp: 173-176.
۳۴. **Swain, P.S.; Dash, P.K.; Sahoo, P.; Routray, S.K.; Sahoo, S.D.; Gupta, P.K. and Meher, N., 2006.** Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 22, pp: 38-43.
۳۵. **Thrall, M.A., 2004.** Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, New York. pp: 241-402.
۳۶. **Tobback, E.; Decostere, A.; Hermans, K.; Ryckaert, J.; Duchateau, L.; Haesebrouck, F. and Chiers, K., 2009.** Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of aquatic organisms. Vol. 84, No. 3, pp: 219-228.
۳۷. **Villumsen, K.R.; Neumann, L.; Ohtani, M.; Strøm, H.K. and Raida, M.K., 2014.** Oral and anal vaccination confers full protection against enteric redmouth disease (ERM) in rainbow trout. PLoS One. Vol. 9, No. 4, pp: 938-945.
۳۸. **Wang, E.; Chen, X.; Wang, K.; Wang, J.; Chen, D.; Geng, Y.; Lai, W. and Wei, X., 2016.** Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish. Fish and shellfish immunology. Vol. 59, pp: 196-202.
۳۹. **Zhang, D.; Pridgeon, J.W. and Klesius, P.H., 2014.** Vaccination of channel catfish with extracellular products of *Aeromonas hydrophila* provides protection against infection by the pathogen. Fish and shellfish immunology. Vol. 36, No. 1, pp: 270-275.



Survey on Immunogenicity and protective efficacy of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide (LPS) against yersiniosis disease in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- **Zahra Tulaby Dezfuly:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Mojtaba Alishahi*:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Masoud Ghorbanpour:** Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Mehrzad Masbah:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Mohamad Reza Tabandeh:** Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: May 2019

Accepted: August 2019

Keyword: Rainbow trout, Yersiniosis, LPS, Immunization

Abstract

Regarding the importance of yersiniosis in the country and the necessity of vaccination of fish, in this study, the effects of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide on the efficacy and immunity of *Yersinia ruckeri* bacterin were evaluated. 480 pieces of fish (7 ± 1.2 g) were randomly divided into 4 equal groups, each group was divided into three replicates (20 fish/replicate). Group A, B and C were fed with LPS (300 µg/kg/Bw), LPS+bacterin (10^9 cfu/g) and bacterin respectively in the first and third weeks of the study. In the immersion group (D), the fish were immersed in the bacterial suspension (10^9 cfu/ml) for 2 minutes at 0 and 14 days. The injection groups (E, F and G) were immunized by intraperitoneal route with (10^{10} cfu/ml), LPS (300 µg/ml) and bacterin+LPS respectively, and on days 0, 30 and 60 blood and serum samples were prepared then blood and immune parameters were compared between immunized fish. The results showed that injection of bacterin+LPS significantly improved the stimulation of nonspecific and specific immunity factors in most groups ($P < 0.05$). The efficacy of bacterin+LPS in the oral treatment was similar to immersion immunization and was significantly lower than the injection method ($P < 0.05$). The results of the current study showed that adding LPS to bacterin, in addition to improving the efficacy of the vaccine by injection and oral administration, also increased their immunization. Therefore, after supplementary studies, it can be used as an appropriate and economical candidate for the preparation of the economical vaccine in trout.

* Corresponding Author's email: alishahimoj@gmail.com

