16(3) 77-82, Autumn 2024

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Evaluation of Specific Immunogenicity of *Aeromonas Hydrophila* Injection Biofilm Vaccine in Common Carp

Amir Aramoon [1*], Mojtaba Alishahi [2], Masoudreza Seifi Abad Shapoori [3], Masoud Ghorbanpoor [2]

[1]Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Iran
[2] Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Key Words

Vaccine
Biofilm
Aeromonas hydrophila
Common carp
Immune

Abstract

Introduction: Common carp is considered one of the most important hydrothermal fishes in the world, and in Iran, hydrothermal fish has the highest production of cultured fish, and in this regard, Khuzestan has a high potential for hydrothermal fish breeding. One of the methods of protection and slow release of vaccine antigens is the use of biodegradable natural polymers such as chitin in the bacterial biofilm substrate.

Meterials & Methods: In this study, biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* bacteria was carried out by culturing the bacteria in Trypticase Soya Broth media (0.225% W/V) along with chitin (0.3% W/V) for 4 days in a shaker incubator. Then the bacteria were washed with sterile phosphate buffer and inactivated by heat. A number of common carp weighing 33±6.8 g was randomly divided into 5 equal treatments and each treatment was replicated as follows: the first to fourth treatments were respectively biofilm vaccine, bacterin, chitin and chitin + Trypticase Soya Broth media. The intra peritoneal injection method was done, the 5th treatment without vaccine administration was considered as the control group. Samplings of fish serum were done on days 0, 20, 40 and 60.

Results: The anti-*Aeromonas hydrophila* antibody level in the samples was evaluated by ELISA method and by monoclonal antibody ($P<0.05$).

Conclusion: The results showed that biofilm and bacterin vaccine had a significant increase in antibody titer compared to other treatments in all days, although the antibody titer of Biofilm vaccine was higher than bacterin in all days, and on the 60th day, biofilm vaccine has been significant increase rather than bacterin and other treatments.

* Corresponding Author's email: aramoon.haser@gmail.com
Received: 11 August 2023; Reviewed: 16 September 2023; Revised: 24 October 2023; Accepted: 26 November 2023
(DOI): 10.70102/AEJ.2025.16.3.10

مقاله پژوهشی

ارزیابی ایمنی‌زایی اختصاصی واکسن تزریقی بایوفیلم آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپورمعمولی

امیر آرامون[1]، مجتبی علیشاهی[2]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[3]، مسعود قربانپور[3]*

[1] مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

[2] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[3] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

واکسن
بایوفیلم
آئروموناس هیدروفیلا
کپور معمولی
ایمنی

چکیده

مقدمه: ماهی کپورمعمولی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی گرمابی جهان به‌شمار می‌رود که در ایران نیز ماهیان گرمابی بیش‌ترین تولید ماهیان پرورشی را داراست و در این رابطه خوزستان از پتانسیل بالایی برای پرورش ماهیان گرمابی برخوردار است. یکی از روش‌های محافظت و آهسته رهش نمودن آنتی‌ژن‌های واکسنی استفاده از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر مثل کیتین در بستر بایوفیلم باکتریایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق واکسن بایوفیلم باکتری آئروموناس هیدروفیلا، با کشت باکتری در محیط کشت تریپتیکاز سویا براث (۰/۲۲۵٪ W/V) به‌همراه کیتین (۰/۳٪ W/V) به‌مدت چهار روز در انکوباتور شیکر دار انجام شد. سپس باکتری با بافر فسفات استریل شستشو گردیده و با حرارت غیرفعال شد. تعدادی ماهی کپورمعمولی به وزن ۶/۸±۳۳ گرمی به‌طور تصادفی به ۵ تیمار مساوی و هر تیمار در سه تکرار به‌صورت زیر تقسیم شدند: تیمار اول تا چهارم به‌ترتیب با واکسن بایوفیلم، باکترین، کیتین و کیتین+ محیط کشت، به‌روش تزریق داخل صفاقی ایمن شدند، تیمار پنجم بدون تجویز واکسن به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری از سرم ماهیان در روزهای ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ صورت گرفت.

نتایج: عیار آنتی‌بادی ضدباکتریآئروموناس هیدروفیلا در نمونه‌ها به‌روش الایزا و توسط آنتی‌بادی مونوکلونال ارزیابی گردید ($P<0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد واکسن بایوفیلم و باکترین نسبت به سایر تیمارها در تمام روزها افزایش معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی داشته است، اگرچه تیتر آنتی‌بادی واکسن بایوفیلم نسبت به باکترین در تمام روزها بیش‌تر بوده است و در روز ۶۰ نیز واکسن بایوفیلم نسبت به باکترین و سایر تیمارها افزایش معنی‌دار داشته است.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: aramoon.haser@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲۰ مرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۲۵ شهریور ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۲ آبان ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۵ آذر ۱۴۰۲
(DOI): 10.70102/AEJ.2025.16.3.10

مقدمه

باکتری آئروموناس هیدروفیلا میله‌ای، بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، متحرک و عامل سپتی سمی و سندرم زخم همه‌گیر (EUS) در ماهیان می‌باشد (۱۹). باتوجه به نتایج Ahangarzadeh و همکاران، در مجموع ۱۵/۵ درصد از سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان را سپتیسمی‌ناشی از آئروموناس هیدروفیلا شناسایی کردند و هم‌چنین ۶۲/۵ درصد نقش آئروموناس‌ها در بیماری‌زایی کپورماهیان استان خوزستان را تشکیل داده‌اند به‌همین دلیل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های شایع در ماهیان بیماری باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. باکتری‌ها بهترین گزینه میکروارگانیسم‌ها برای تشکیل کلنی در سطوح و شکل‌گیری بایوفیلم می‌باشند، هر چند قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها، پروتوزوها و ویروس‌ها هم امکان تولید بایوفیلم‌ها در صنعت پزشکی را دارند. یکی از روش‌های محافظت آنتی‌ژن‌های واکسنی در شرایط دستگاه گوارش ماهی، استفاده از تکنیک بایوفیلم می‌باشد (۷). در این روش از یک بستر مناسب که معمولاً از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر می‌باشند، استفاده می‌شود. متأسفانه، واکسن‌ها معمولاً به تنهایی قادر به ایجاد محافظت نیستند، به‌ویژه واکسن‌هایی که مبتنی بر آن هستند مانند آنتی‌ژن‌های نوترکیب یا پاتوژن‌های غیرفعال شده، بنابراین استفاده از ادجوانت یا محرک‌های ایمنی اغلب برای افزایش کارایی واکسن ضروری هستند (۱۲). کیتین علاوه بر این‌که به‌عنوان یک محرک ایمنی و ادجوانت در واکسن عمل می‌کند، در واکسن‌های خوراکی نیز استفاده می‌گردد. به این صورت که باکتری در کیتین به‌صورت مجتمع در آمده و توسط این بستر پلیمری در شرایط دستگاه گوارش محافظت می‌شود و نهایتاً آنتی‌ژن‌های واکسنی سالم‌تر و با توان ایمنی‌زایی بهتر در اختیار سیستم ایمنی مخاطی ماهی قرار داده می‌شود. باکتری‌ها بهترین گزینه میکروارگانیسم‌ها برای تشکیل کلنی در سطوح و شکل‌گیری بایوفیلم می‌باشند. مواد پلیمری خارج سلولی بایوفیلم بسیار هیدراته بوده و بافت شیمیایی پیچیده‌ای است که به‌عنوان یک ذخیره‌ساز مواد مغذی برای باکتری عمل کرده و می‌تواند میکروب‌ها، مواد غیرسلولی مانند: مواد معدنی، کریستال، محصولات خورده شده و در حال فساد را به دام اندازند (۱۰، ۱۳). هم‌چنین جذب واکسن بیوفیلم آئروموناس هیدروفیلا در مقایسه با واکسن معمولی راحت‌تر جذب می‌شوند و احتمالاً به‌دلیل پوشش گلیکوکالیکس بایوفیلم می‌باشد (۷). واکسن‌های بایوفیلمی با بستر کیتینی، علاوه بر تأثیر مثبت در تثبیت شکل سه بعدی پروتئین‌های آنتی‌ژنی باکتری، در افزایش کارایی واکسن با عرضه بهتر آنتی‌ژن و هم‌چنین آهسته رهش نمودن آنتی‌ژن‌ها نقش دارند و با مکانیسم‌های چندگانه به ایمنی‌زایی بهتر واکسن کمک می‌نمایند. Landry و همکاران، نشان دادند که بایوفیلم‌های باکتری پزودوموناس آئروژینوزا که به‌صورت اجتماع بزرگ سلولی روی سطوح با موکوز گلیکوپروتئین رشد کرده‌اند، درمقایسه با بایوفیلم‌های روی شیشه و پوشش داده شده با آکتین و DNA تحملشان به آنتی‌بیوتیک افزایش داشته است. علاوه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتری‌های بایوفیلم در برابر قرار گرفتن در معرض نور ماوراء بنفش، سمیت فلزی، تماس با اسید، کمبود آب و فاگوسیتوز نیز بسیار مقاوم هستند (۱۸). لذا در این تحقیق ابتدا اقدام به تولید واکسن بایوفیلم آئروموناس هیدروفیلا شده و سپس ماهی‌های کپور به‌روش تزریقی با واکسن تولیدی ایمن شدند تا تأثیر بایوفیلم کیتینی بر کارایی و ایمنی‌زایی واکسن تزریقی سنجیده شود.

مواد و روش‌ها

تهیه واکسن بایوفیلم: آماده‌سازی بایوفیلم واکسن آئروموناس هیدروفیلا به‌روش Azad و همکاران انجام شد (۸). به‌طور خلاصه در این روش بایوفیلم آئروموناس هیدروفیلا بر روی سوبسترای کیتین (w/v3/0%) در محیط TSB (w/v225/0%) ایجاد گردید. استوک باکتریایی از دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز جداسازی شده از مزارع پرورش گرمابی دشت آزادگان و کیتین از شرکت دانش بنیان تولید و فراوری کیتین و کیتوزان گلمکانی در مشهد خریداری شد. باکتری‌های بایوفیلمی به‌مدت ۴ روز و هر روز ۶ ساعت در دستگاه شیکر با دور ۱۲۰ در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا باکتری روی بایوفیلم کیتین کاملاً مستقر گردد، سپس این بایوفیلم با سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت جدا شده و دوباره با بافر نمک فسفات (pH 2/7M, 1/0PBS) شستشو گردید. بعداز شمارش باکتری در بایوفیلم، کیفیت بایوفیلم واکسن آئروموناس هیدروفیلا با میکروسکوپ فازکنتراست بررسی گردید. واکسن بایوفیلم و واکسن معمولی (باکترین) با تراکم 10^{10} در میلی‌لیتر تنظیم شده و برای غیرفعال کردن باکتری بایوفیلم به مدت ۵۰ دقیقه در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و باکتری‌های آزاد نیز به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال گردیدند. محصول نهایی به عنوان واکسن بایوفیلم آئروموناس هیدروفیلا مورداستفاده قرار گرفت. برای اطمینان از تأثیر بایوفیلم کیتین در کارایی باکترین، تیمار کیتین به‌اندازه میزان استفاده‌شده در واکسن بایوفیلم و تیمار کیتین+محیط کشت (بایوفیلم تشکیل نشده) به‌اندازه میزان استفاده‌شده در واکسن بایوفیلم بدون اضافه نمودن باکتری به‌مدت ۴ روز با شرایط مشابه انکوبه گردید و تمام روند آماده‌سازی واکسن بایوفیلم هم در مورد آن‌ها اعمال گردید (۸،۷). وضعیت واکسن بایوفیلم آئروموناس هیدروفیلا به‌صورت اجتماع باکتری در کیتین قبل از غیرفعال شدن باکتری‌ها با حرارت، با میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی گردید.

تیماربندی ماهی‌ها: تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی کپورمعمولی با وزن حدود ۶/۸±۳۳ گرم به‌صورت زیر به ۵ تیمار در ۳ تکرار ۲۵ در شرایط مشابه به‌شرح زیر تیماربندی گردید: تیمار ایمن‌شده با واکسن بایوفیلم (کیتین+باکتری)، تیمار ایمن شده با باکترین (بدون کیتین)، تیمار ایمن‌شده با کیتین، تیمار ایمن‌شده با کیتین و محیط کشت (TSB بدون تشکیل بایوفیلم) و تیمار کنترل غیرایمن.

نحوه ایمن‌سازی: باکتری‌ها قبل از حرارت‌دادن و تولید واکسن از طریق رقت‌سازی در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد استریل و کشت و شمارش باکتری در محیط کشت TSA از سه رقت بالاتر انجام شد. بعد از حرارت دادن باکتری و تولید واکسن، صد میکرولیتر از غلظت 10^{10} باکتری به‌ازای هر ماهی به‌صورت تزریق داخل صفاقی انجام شد. برای تیمارهای کیتین و کیتین و محیط کشت نیز به‌میزان استفاده شده در واکسن بایوفیلم مورد استفاده تزریق شد (۱، ۷، ۸).

شرایط نگه‌داری ماهیان: ماهی‌های کپور از مرکز پرورش آبزیان شوشتر در استان خوزستان خریداری گردید و با رعایت شرایط انتقال با استفاده از وانت مخصوص انتقال بچه‌ماهی به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهیدچمران منتقل گردید. شرایط فیزیکوشیمیایی آب محل تحقیق به‌شرح زیر بود: دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد، شوری ۰/۱±۰/۸ گرم بر لیتر، میزان نیتریت و آمونیاک کم‌تر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و نیترات کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، pH بین ۷/۸ تا ۸/۴ و میزان غذادهی بین ۲ تا ۳٪ بایومس، روزی دو بار و براساس اشتهای ماهی با خوراک تجاری (شرکت کیمیاگران تغذیه) انجام شد.

نمونه‌گیری: تیمارها به‌مدت ۶۰ روز پرورش داده شدند و در روزهای ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ سه نمونه از هر تکرار با بی‌هوشی ماهی با ماده 30 ppm تریکائین متان سولفانات (MS222) خونگیری شده و سرم ماهی‌ها جدا شده و به‌روش الایزا با استفاده از آنتی‌بادی مونو کلونال (تهیه‌شده در بخش ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) عیار آنتی‌بادی ضدآئروموناس هیدروفیلا در نمونه‌های سرمی مشخص گردید. تولید آنتی‌بادی مونوکلونال استفاده شده در این تحقیق به‌روش زیر تولید شده است. سرم ماهیان کپور معمولی به‌روش نیمه خالص‌سازی با سولفات آمونیوم انجام شد و سپس به موش Balb/C ۶ تا ۸ هفته تزریق شد و بعد از آن سلوهای لنفوسیت B طحال موش استحصال شد و با سلول‌های میلوما با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ادغام گردید. سلول‌ها در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در انکوباتور CO2دار نگه‌داری شد. بعداز ۳ دوره غربالگری، آنتی‌بادی مونوکلونال ضدزنجیره سنگین IgM کپورمعمولی با آزمون page SDS و وسترن بلات بررسی و تأیید شد. علاوه بر این آنتی‌ژن‌هایی از قبیل آلبومین سرم گاوی و خون استریل گوسفندی تزریق شده به ماهی کپورمعمولی به‌عنوان توانایی آنتی‌بادی مونوکلونال در شناسایی این آنتی‌ژن‌ها بررسی گردید که این آنتی‌بادی مونوکلونال توانسته‌است این آنتی‌ژن‌ها را شناسایی کند (۵).

اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی به‌روش الایزای غیرمستقیم

سونیکاسیون باکتری آئروموناس هیدروفیلا: برای کوت آنتی‌ژن باکتری کف گوده‌های الایزا، ابتدا باکتری با کشت در محیط TSA خالص گردید و سه کلنی خالص شده به ۱ سی‌سی آب مقطر اضافه گردید و ۶ بار فریز دفراست روی آن صورت گرفت. بعد از این مرحله با دستگاه سونیکاتور و سیکل ده بار سونیکیشن (۲ دقیقه سونیکاسیون با فاصله زمانی ۲ دقیقه) صورت گرفت. سپس با دور ۳۵۰۰ در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. برای ایجاد غلظت مناسب آنتی‌ژن با آب مقطر به نسبت ۱ به ۲۵ رقیق گردید به طوری که غلظت مناسب آنتی‌ژن (در هر صد میکرولیتر استفاده شده در پلیت الایزا ۰/۱ میکروگرم دیواره باکتری) ایجاد گردد (۲۱).

آزمون نهایی الایزا برای تست سرم‌های ماهی: بعد از سونیکه کردن باکتری آزمایشات پایلوت انجام شد و مقادیر بهینه آنتی‌ژن، بلاکر، سرم، پادتن مونوکلونال و کونژوگه، مشخص گردید. در کف گوده‌های پلیت الایزا (Nunc-Immuno MicroWell 96 well solid plates) آنتی‌ژن (باکتری سونیکه شده)، به‌میزان ۱ به ۲۰ با کوتینگ بافر رقیق شد و به میزان پنجاه میکرولیتر کف گوده¬ها کوت گردید. بعد از ۱ روز در یخچال نگه‌داری شد و سپس محلول رویی پلیت‌های الایزا دور ریخته و ۳ بار با PBS توئین شستشو گردید. سپس با شیر خشک پس‌چرخ ۱ درصد حاوی PBS توئین به‌میزان ۳۰۰ میکرولیتر جایگاه‌هایی که آنتی‌ژن نچسبیده بود بلاک گردید و به‌مدت سه ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سه بار شستشو با بافر شستشو انجام شد و سرم‌های ماهی از هر تیمار به میزان ۱ به ۴۰۰ در PBS توئین و شیر ۰/۵ درصد رقیق و به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر قرار گرفت و سپس محلول دور ریخته و ۴ بار شستشو گردید و آنتی‌بادی مونوکلونال ضدزنجیره سنگین IgM تولید شده در موش به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شده و به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه در دمای اتاق، محلول دور ریخته و ۳ بار شستشو گردید و آنتی‌بادی ثانویه ضدموشی تولید شده در بز (Goat anti mouse) به‌صورت کنژوگه (Bio-Rad, USA, 170-6516)، رقیق شده به نسبت ۱ به ۳۰۰۰ به‌میزان ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک اضافه گردید. بعد از ۴۰ دقیقه محلول دور ریخته و ۳ بار شستشو گردید. سوبسترای کروموژن ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه محلول متوقف‌کننده اضافه شد. OD مربوط به هر چاهک در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۴۵۰ نانومترخوانده شد و اعداد مربوطه به نرم‌افزار Excel منتقل شد (۲۱).

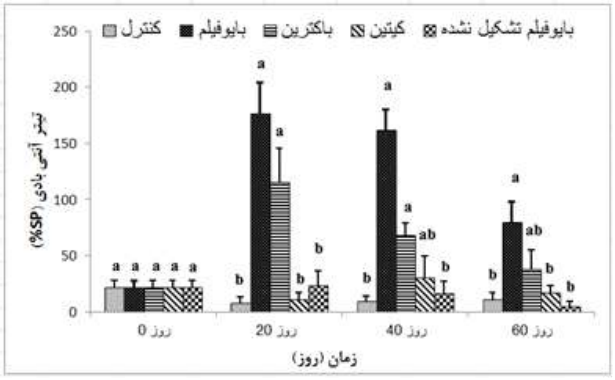
آنالیز آماری: برای آنالیز نتایج عیار آنتی‌بادی در بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ استفاده شد و جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون کلوموگروف اسمیرنوف و برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید ($P<0/05$).

نتایج

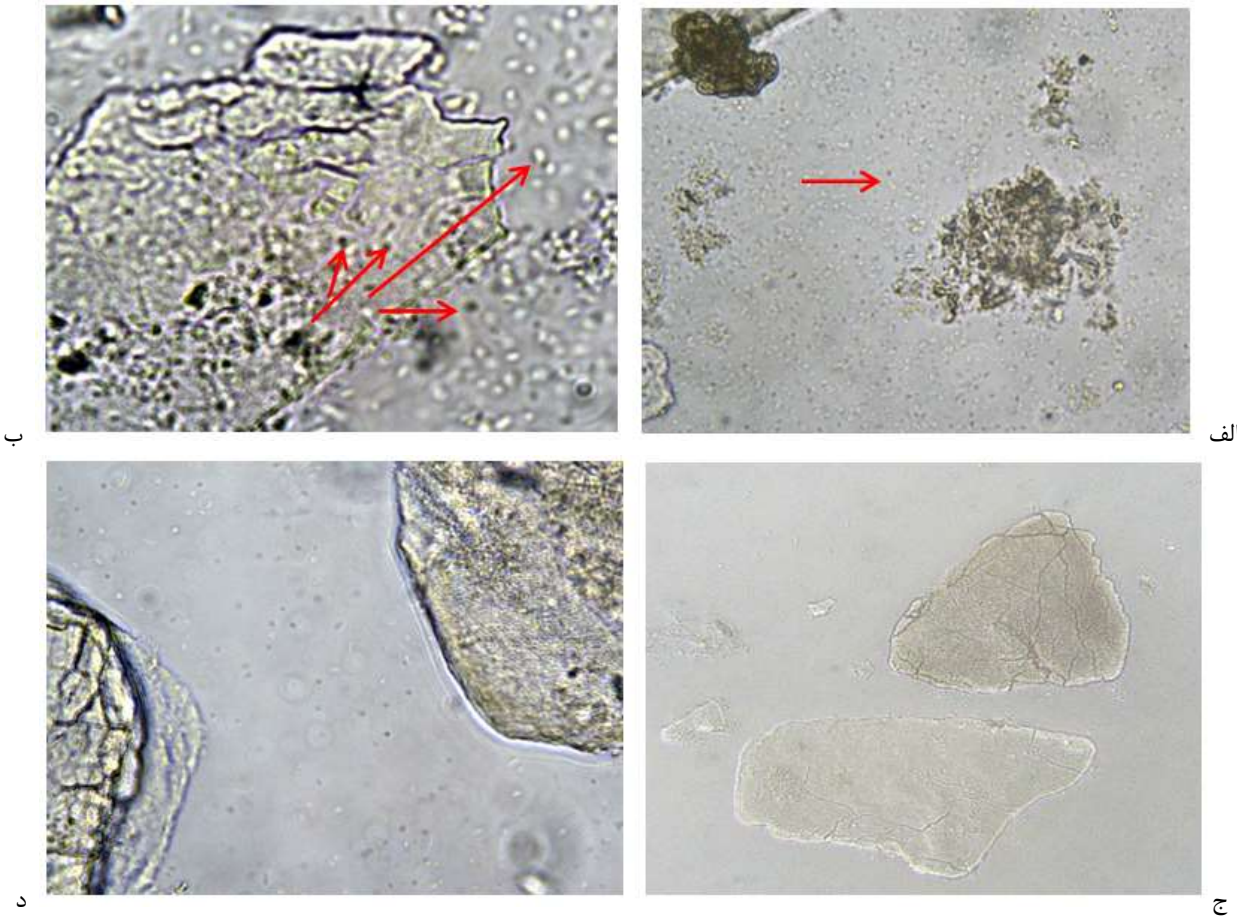
در مرحله تولید بایوفیلم بعد از کشت باکتری در محیط کشت به‌همراه کیتین، از تمام مراحل قبل شستشو، بعد شستشو و ورتکس شدید با میکروسکوپ فازکنتراست عکس‌برداری صورت گرفت (شکل ۱). همان‌طور که مشاهده می‌گردد واکسن‌های تزریقی موفقیت بالایی در تحریک تولید آنتی‌بادی اختصاصی داشته‌اند. بیش‌ترین ایمنی مربوط به واکسن بایوفیلم و بعد از آن واکسن باکترین بود و افزایش عیار

آنتی‌بادی در تیمار ایمن‌شده با واکسن بایوفیلم در روز ۲۰، ۴۰ و ۶۰ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، واکسن بایوفیلم و باکترین نسبت به سایر تیمارها در تمام روزها افزایش معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی داشته است، اگرچه تیتر آنتی‌بادی واکسن بایوفیلم نسبت به باکترین در تمام روزها بیش‌تر بوده است. در روز ۶۰ نیز واکسن بایوفیلم نسبت به باکترین و سایر تیمارها افزایش معنی‌دار داشته است (شکل ۲) (P<۰/۰۵).
درصد SP براساس فرمول زیر در الایزا محاسبه گردید:

$$SP\% = \frac{\text{میانگین } OD \text{ کنترل منفی} - OD \text{جامک مربوطه}}{\text{میانگین } OD \text{ کنترل منفی} - \text{میانگین } OD \text{ کنترل مثبت}} \times 100$$



شکل ۲: نمودار مقایسه عیار آنتی‌بادی (درصد SP) در تیمارهای تجویز تزریقی تحقیق



الف ب ج د

شکل ۱: الف) میکروسکوپ فاز کنتراست x400 باکتری و کیتین در محیط کشت قبل از فرآیند شستشو. ب) میکروسکوپ فاز کنتراست x1000 باکتری و کیتین در محیط کشت قبل از فرآیند شستشو. ج) میکروسکوپ فاز کنتراست x100 فلاک‌های کیتین. د) میکروسکوپ فاز کنتراست. x400 باکتری و کیتین در محیط کشت بعد از شستشو و ورتکس شدید.

بحث

نتایج ایمنی‌زایی ایجاد شده توسط واکسن تزریقی نشان داد که واکسن تزریقی بایوفیلم عیار بالایی ایجاد کرده و بیش‌ترین میزان در تیمار ایمن شده با واکسن بایوفیلم مشاهده شد. واکسن تزریقی باکترین با غلظت مشابه تیمار بایوفیلم میزان عیار کم‌تری را نشان داد که احتمالاً اثر مثبت کیتین به‌عنوان یک ادجوانت دلیل این تفاوت بوده است. واکسن تزریقی بایوفیلم و باکترین از روز ۲۰ تا روز ۶۰ کاهش داشته‌اند. هم‌چنین عیار آنتی‌بادی ضدآئروموناس هیدروفیلا در ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریقی (باکترین معمولی و بایوفیلم) به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل بالاتر بود (P<۰/۰۵). در مطالعه

Vinay و همکاران، واکسن بایوفیلم بر طبق روش حاضر (۰/۳٪ کیتین و ۰/۲۲۵٪ محیط کشت TSB) تولید گردید. تشکیل بایوفیلم باعث تجمع لایه‌های متعدد باکتری در یک پارانشیم کیتینی می‌گردد که علاوه بر محافظت در برابر عوامل ضدباکتریایی، در عرضه بهتر آنتی ژن‌های واکسنی در مجاورت پلیمر طبیعی کیتین نیز نقش دارد، هم چنین آزادسازی تدریجی آنتی‌ژن در محل تزریق و تحریک طولانی تر سیستم ایمنی ماهی نیز دلیل دیگر افزایش عیار آنتی‌بادی در این تیمار است. در تحقیقی مشابه Hajipour و همکاران، با تزریق 10^{10} باکتری غیرفعال شده با فرمالین (۰/۲۵ درصد) به ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۵/۶±۵۱ گرم تیتر آنتی‌بادی نشان دادند که در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ تیتر آنتی‌بادی در دو تیمار نانوکیتوزان و ادجوانت فروند افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (۱۷)، که باتوجه به افزایش معنی‌دار بایوفیلم (کیتین و باکتری) روش تزریقی مطالعه حاضر در روز ۲۰ و ۴۰ هم‌خوانی دارد. از طرفی در این تحقیق اثر محافظتی بایوفیلمی کیتین نیز برای تولید بایوفیلم باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا مورد تأیید قرار گرفته است. در مورد افزایش عیار آنتی‌بادی به‌دنبال ایمن‌سازی تزریق با واکسن بایوفیلم گزارشاتی دیده نشد، اما واکسن معمولی غیرفعال شده تزریقی متعددی در ماهیان گرمابی صورت گرفته است به‌طوری که براساس مقایسه میزان ایمنی و چالش باکتریایی در مطالعه Karunasagar و همکاران، واکسن تزریقی و غوطه‌وری آئروموناس هیدروفیلا در کپور ماهیان هندی ۸ گرمی مریگال (*Cirrhinus mrigala*) و روهو (*Labeo rohita*) با دوز واکسن تزریقی ۰/۱ میلی‌لیتر 10^{8} باکتری و غیرفعال کردن باکتری با ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و واکسن غوطه‌وری به‌میزان نگه‌داری ماهیان در ۳ دقیقه با 10^{11} باکتری در میلی‌لیتر و ۳ درصد نمک انجام شد. نتایج حاصل از تیتر آنتی‌بادی نشان داد که واکسن تزریقی زنده 10^{24} و واکسن غیرفعال 10^{24} و واکسن زنده غوطه‌وری 10^{24} و واکسن غوطه‌وری غیرفعال شده با دما ۰/۵۱۲ بود و ماهیان شاهد تیتر ۰/۰۰۸ داشتند (۲۰) که در مقایسه با تیتر آنتی‌بادی نتایج حاضر تیمار شاهد در میزان ۰/۱ و تیمار باکترین با مقدار بین ۰/۹ تا ۱/۱ داشتند که تا حدود زیادی با نتایج این دو تحقیق مطابقت دارد. در تحقیق Abhiman (۱) و Azad و همکاران (۷) نیز روش تولید واکسن بایوفیلم باکتری آئروموناس هیدروفیلا با استفاده از کیتین مشابه تحقیق حاضر انجام شد، آن‌ها نیز با تولید واکسن بایوفیلم باکتری آئروموناس هیدروفیلا کارایی مناسب این روش پوشش دهی واکسن را گزارش نمودند. هم چنین Alishahi و همکاران، با تجویز خوراکی کیتوزان که نوعی کیتین داستیله است در ماهی کپور معمولی بهبود پاسخ ایمنی غیراختصاصی ماهی را گزارش نمودند (۳). هم‌چنین Alishahi و همکاران، بهبود کارایی واکسن خوراکی آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی را به‌دنبال تجویز نانوکیتوزان گزارش نمودند، که همه گزارشات فوق حاکی از اثر مناسب ترکیبات پلیمریک طبیعی مشتق از کیتین در بهبود پاسخ ایمنی مخاطی ماهی است، که مطمئنا در کارایی واکسن نیز تأثیر خواهد داشت (۴). البته Nishimura و همکاران (۲۳) و Tokura و همکاران (۲۴) بیان کردند که کیتین باعث افزایش سیتوکنین‌هایی از قبیل IL-1, IL-12, IL-18، TNFα و IFNα به صورت مستقیم و افزایش سلول‌های کشنده طبیعی NK cells به صورت غیرمستقیم می‌گردند. علاوه بر این در تحقیق Gopalakannan و Arul با بررسی کیتین و کیتوزان در غذای ماهی کپورمعمولی این دو ماده را محرک ایمنی ذاتی معرفی نمودند که به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت لایزوزیم می‌گردند و در طی چالش ماهی‌ها با باکتری آئروموناس هیدروفیلا میزان بازماندگی (RPS) در روز ۴۵ در گروه تغذیه با کیتوزان (۱ درصد وزن ماهی) ۸۰ درصد و با کیتین (۱ درصد وزن ماهی) ۴۰ درصد گزارش کردند. هم‌چنین گلبول‌های سفید(WBC) به‌طور معنی‌داری در گروه کیتین بیش‌تر از گروه کیتوزان و شاهد بود (۱۶). همان‌طور که در گزارشات فوق مشخص است، تولید بایوفیلم کیتین علاوه بر محافظت واکسن در تجویز خوراکی، تأثیر این پلیمر طبیعی زیست تخریب‌پذیر بر بیان سایتوکین‌های گوارشی نیز در بهبود ایمنی مخاطی ماهی مؤثر بوده و نقش ادجوانی برای آنتی‌ژن واکسنی دارد. البته با توجه به در نظر گرفتن یک گروه کنترل کیتین بدون آنتی‌ژن باکتریایی در تیمارها، و عدم تغییر محافظت در برابر چالش باکتریایی در این تیمار، بهبود کارایی واکسن به بایوفیلم کیتینی واکسن نسبت داده می‌شود نه کیتین به تنهایی، یعنی کیتین و واکسن اثر سینرژیسمی در ایمنی زایی در برابر عفونت تجربی با آئروموناس حاد دارند. Esteban و همکاران، با تزریق ۰/۱ میلی‌گرم کیتین به ماهی gilthead (*Sparus aurata* L.) و نمونه‌گیری سرم در روز ۳، ۵ و ۱۰ به این نتیجه رسیدند که فعالیت کمپلمان از روز ۵ افزایش یافته است و انفجار تنفسی و فعالیت فاگوسیت در روز ۳ و ۵ به حداکثر رسیده است (۱۴). هم‌چنین Alishahi و همکاران، با تجویز تزریقی نانوکیتوزان به ماهی کپورمعمولی به‌عنوان ادجوان واکسن باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا، افزایش عیار آنتی‌بادی و محافظت در برابر چالش باکتریایی را گزارش نمودند (۴). به‌نظر می‌رسد که کیتین علاوه بر نقش ذکر شده در واکسن‌های خوراکی (محافظت آنتی‌ژن در روده) به‌عنوان ادجوانت و محرک ایمنی عمل کرده است. با توجه به مکانیسم ایمنی زایی آنتی‌ژن واکسنی در روش تزریقی می‌توان چنین نتیجه گرفت که در تحقیق حاضر میزان عرضه آنتی‌ژن و ایمنی زایی آنتی‌ژن تحت تأثیر تشکیل بایوفیلم واکسنی قرار نگرفته است یا حداقل اگر تأثیر داشته به اندازه‌ای نبوده که از نظر آماری معنی‌دار باشد. هر چند اثرات ایمنی‌زایی کیتین (۱۶) و کیتوزان (که از مشتقات کیتین می‌باشد) (۳) اثر ادجوانی آن در ماهی گزارش شده است. شاید با افزایش نسبت کیتین در تهیه بایوفیلم، افزایش دفعات تزریق یا دوز آنتی‌ژن کارایی واکسن بهبود یابد. در مطالعه Esteban و همکاران، با خوراندن کیتین به‌مدت ۲ هفته به ماهی باس دریایی نشان داد که کیتین بر روی ایمنی غیر

اختصاصی ماهی اثر مثبت داشته است به‌صورتی که باعث افزایش لایزوزیم و فعالیت فاگوسیت و سایتوتوکسیک نشده است، اما باعث افزایش معنی‌دار سطح کمپلمان همولیتیک طبیعی شده است (۱۵). در مطالعه Cuesta و همکاران، با خوراندن ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کیتین به ماهی باس دریایی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت فاگوسیتی باکتری ویبریو آنگوئیلاروم شدند، اما میزان ۱۰ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر کیتین فعالیت فاگوسیتی را تحت تاثیر قرار نداد (۱۱). Azad و همکاران، میزان ایمنی‌زایی واکسن بایوفیلم خوراکی آئروموناس هیدروفیلا را در ماهی کپور بررسی کردند و بیان کردند که میزان تیتر آنتی‌بادی بالا بوده است (۸). Aramoon و همکاران، با نتایج چالش باکتریایی واکسن تزریقی یایوفیلم در ادامه این تحقیق بعد از روز ۶۰ تزریق آئروموناس هیدروفیلا با دوز ۸ مک فارلند (با غلظت $4/2\times10^{9}$ CFU/mg) به ماهی کپور معمولی میزان بقای (۳۰٪) و تیمار واکسن باکتری معمولی (باکترین) (۲۷/۵٪) را داشته است که افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل با درصد بقای صفر را نشان داده است (۶). هم‌چنین واکسن بایوفیلم اثر مثبتی بر ایمنی ماهی کپور داشته‌است. علاوه بر این براساس درصد بازماندگی در گروه کیتین و کیتین+محیط کشت تزریقی از گروه شاهد میزان بازماندگی بالاتر بوده است که به‌نظر می‌رسد کیتین نیز در ایمنی و سلامت ماهی مؤثر بوده هرچند این تأثیر از نظر آماری معنی‌دار نبود. در این تحقیق هم در ایمنی اختصاصی ماهی واکسن تزریقی بایوفیلم در تمام روزها بالاتر از واکسن معمولی بوده است و در روز ۶۰ هم نشان داد که واکسن بایوفیلم تفاوت معنی‌داری با واکسن معمولی داشته است و لذا می‌توان نتیجه گرفت که واکسن بایوفیلم ایمنی اختصاصی بیش‌تری نسبت به واکسن معمولی داشته است و مدت زمان ایمنی بیش‌تری را هم ایجاد می‌نماید و لذا کیتین علاوه بر این که در ایمنی غیراختصاصی ذکر شده در پژوهش‌های متعدد نقش دارد در ایمنی اختصاصی نیز نقش مؤثری داشته است. هم‌چنین پیشنهاد می‌گردد از کیتین در خوراک ماهیان و تولید واکسن تزریقی به‌عنوان ادجوانت استفاده گردد.

منابع

1. **Abhiman, M.F.S., 2014**. Effect of *Aeromonas hydrophila* biofilm oral vaccine on gut immunity of carps. PhD Thesis, Karnataka Veterinary Animal and Fisheries Sciences University, Bidar. 86 p.
2. **Ahangarzadeh, M., Gurbanpour, M., Peyghan, R., Sharif Rouhani, M. and Soltani, M., 2014**. The role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of farmed carp in Khuzestan province. 11(3): 5-16. (In Persian)
3. **Alishahi, M., Saidi Menesh, M., Mesbah, M. and Zarei, M., 2015**. Effect of nanochitosan on the immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* oral vaccine in common carp. Iranian Veterinary Journal. 12(1): 53-65. (In Persian)
4. **Alishahi, M., Hajipour, O., Gorbanpoor, M. and Mesbah, M., 2017**. Investigating the effect of nanochitosan adjuvant on the immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* vaccine in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research. 73(1): 72-81. (In Persian)
5. **Aramoon, A., Alishahi, M., Seifi Abad Shapouri, M.R. and Ghorbanpoor, M., 2024**. Production of anti-IgM heavy chain monoclonal antibody of common carp. Journal of Animal Environment. 3(16). (In Persian)
6. **Aramoon, A., Alishahi, M., Seifi Abad Shapouri, M.R. and Ghorbanpoor, M., 2018**. Immunogenicity evaluation of *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine on the fingerling common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Environment. 10(3): 207-212. (In Persian)
7. **Azad, I.S., Shankar, K.M., Mohan, C.V. and Kalita, B., 2000**. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination antigen localization by a monoclonal antibody. Disease of aquatic Organisms. 43: 103-108.
8. **Azad, I.S., Shankar, K.M., Mohan, C.V. and Kalita, B., 1999**. Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. Fish and Shellfish Immunology. 519-528.
9. **Azad, I.S., Shankar, K.M. and Mohan, C.V., 1997**. Evaluation of an *Aeromonas hydrophila* biofilm for oral vaccination of carps. In: Flegel, T.W. and McRae, I.H., (eds) Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. 519-528.
10. **Costerton, J.W., Irvin, R.T. and Cheng, K.J., 1981**. The bacterial glycocalyx in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 35: 299-324.
11. **Cuesta, A.M., Esteban, A. and Meseguer, J., 2003**. In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish Immunology. 1: 1-11.
12. **Dalmo, R., Bogwald, J. and Tafalla, C., 2016**. Adjuvants and delivery methods: current and novel. Fish Vaccines. 75-103.
13. **Donlan, R.M., 2002**. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 8: 881-890.
14. **Esteban, M.A., Mulero, V., Cuesta, A., Ortuno, J. and Meseguer, J., 2000**. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream. Fish & Shellfish Immunology. 10(6): 543-554.
15. **Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuno, J. and Meseguer, J., 2001**. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream innate immune system. Fish & Shellfish Immunology. 11(4): 303-315.
16. **Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006**. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture. 255: 179-187.
17. **Hajipour, O., Alishahi, M., Mesbah, M. and Gorbanpoor, M., 2013**. Investigating the effect of nanochitosan adjuvant on the immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* bacteria in common carp. Professional doctorate certificate, Shahid Chamran University, Ahvaz. (In Persian)
18. **Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P., 2004**. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2: 95-108.
19. **Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R., 1993**. Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publications, Wiley.
20. **Karunasagar, G., Rosalinda, I. and Karvn, A.S., 1991**. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. Journal of Fish Disease. 14: 413-417.
21. **Kaur, B., Kumar, B.N., Tyagi, A., Holeyappa, S.A. and Singh, N.K., 2021**. Identification of novel vaccine candidates in the whole-cell *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine through reverse vaccinology approach. Fish & Shellfish Immunology. 114, 132-141.
22. **Landry, R.M., An, D. and Hupp, J.T., 2006**. Mucin *Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. Mol Microbiol. 59: 142-151.
23. **Nishimura, K., Ishihara, C., Ukei, S., Tokura, S. and Azuma, I., 1986**. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. Vaccine. 4: 151-156.
24. **Tokura, S., Tamura, H. and Azuma, I., 1999**. Immunological aspects of chitin and chitin derivatives administered to animals. In: Jolles. 87: 279-292.
25. **Vinay, T.N., Rajreddy, P., Suresh Babu, P.P., Rajesh, R. and Shankar, K.M., 2013**. Evaluation of the efficiency of *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine in Labeo rohita employing monoclonal antibody-based ELISA. Open Access Scientific Reports. 1-4.