15(4) 65-74, Winter 2024

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effect of S*treptocucus agalactiae* oral vaccine encapsulated with Alginate/chitosan on growth indices, hematological parameters and immune response of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Parisa Alizadeniya [1*], Mojtaba Alishahi [2], Mohammad Khosravi [3], Takavar Mohammadian [2]

[1] *Department of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, 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

Streptococcus agalactiae
Nile tilapia
Oreochromis niloticus
Microencapsulation
Alginate
Chitosan
Oral Vaccine

Abstract

Introduction: Vaccination is the best strategy agaist streptococosis in tilapia. In this study the effect of microencapsulation of *Streptocuccus agalactiae* vaccine with alginate/chitosan on some growth indices, hematological parameters and immunogenicity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus)* was investigated.

Materials & Methods: Three hundred and sixty juvenile Tilapia (30±2.32 g) were randomely divided into four equal groups in triplicates: groups 1 and 2 were immunized with microencapsulated *S. agalactiae* and naked vaccine respectively, group 3 was treated with Alginate /chitosan and group 4 was fed with basal food without additive as control. Fishes were reared for two months in similar situation and biometrical measurement recorded every month, then blood samples were taken from each group at days zero, 30 and 60 of experiment. Growth indices and hematological parameters were measured and compared among the groups. Remained fish in each group were challenged with *S. agalactiae* in day 60 0f experiment and cumulative mortality were recorded for 14 days.

Results: Results showed that growth performance indices including FCR, SGR, FER and PGR were significantly improved in group 1 which orally vaccinated with microencapsulated vaccine compare to control group ($P<0.05$). Among the hematological parameters, just WBC value significantly increased in microencapsulated vaccine treated group ($P<0.05$). other hematological parameters didn't show any significant difference among the experimental groups ($P>0.05$). The lowest mortality after challenge with *S. agalactiae* was recorded in group 1 with 50% cumulative mortality which is significantly ($P<0.01$) different with mortality in control group (95%).

Conclusion: Then it can be concluded that microencapsulation of *S. agalactiae* oral vaccine with Alginate/chitosan, not only stimulate growth indices, but also increase resistance against bacterial infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

* Corresponding Author's email: parisa_alizadeniya@yahoo.com
Received: 8 September 2021; Reviewed: 10 October 2021; Revised: 15 December 2021; Accepted: 15 January 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.315952.2690

مقاله پژوهشی

تاثیر واکسن خوراکی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان/آلژینات بر برخی شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی تیلاپیا

***پریسا علیزاده‌نیا*[1]*، مجتبی علیشاهی[2]، محمد خسروی[3]، تکاور محمدیان[2]**

[1] گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

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

[3] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

استرپتوکوکوس اگالاکتیه
ماهی تیلاپیا
ریزپوشانی آلژینات
کیتوزان
واکسن خوراکی

چکیده

مقدمه: واکسیناسیون بهترین روش مقابله با بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهی تیلاپیا می‌باشد. در این تحقیق اثر ریزپوشانی واکسن استرپتوکوکوس آگالاکتیه با ریزذرات آلژینات/کیتوزان بر میزان محافظت و برخی شاخص‌های خونی و رشد ماهی تیلاپیای نایل *Oreochromis niloticus* ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها: به این منظور۳٦۰قطعه ماهی تیلاپیای نایل (وزن ۲/۳۲±۳۰ گرم) به چهار گروه، هر گروه در سه تکرار به‌صورت زیر تقسیم گردیدند: تیمار اول و دوم به‌ترتیب با واکسن ریزپوشانی‌شده و بدون‌ریزپوشانی باکتری استرپتوکوکوس‌آگالاکتیه به‌روش‌خوراکی ایمن شدند، به تیمار سوم فقط آلژینات/کیتوزان خوراکی تجویز گردید، تیمار چهارم نیز به‌عنوان تیمار شاهد فقط خوراک پایه دریافت کرد. ماهی‌ها به‌مدت دو ماه در شرایط مشابه تغذیه و نگه‌داری شدند و در روزهای صفر، ۳۰ و ٦۰ ماهی‌ها صید و زیست‌سنجی شده و خونگیری از ماهی‌ها انجام شد. شاخص‌های رشد و برخی شاخص‌های خونی ماهی بین تیمارها مقایسه گردید. سپس ماهیان هر گروه با باکتری زنده استرپتوکوکوس اگالاکتیه چالش داده شدند و تلفات بین تیمارها تا ١٤ روز ثبت و بین تیمارها مقایسه گردید.

نتایج: نتایج نشان دادشاخص‌های رشد تحت تاثیر ایمن‌سازی‌قرار گرفته و شاخص‌های‌رشد شامل ضریب تبدیل‌غذایی، ضریب‌رشد ویژه، درصد افزایش وزن در گروه واکسن‌ریزپوشانی شده به‌طورمعنی‌داری‌نسبت به تیمارشاهد بهبود یافته بود($P<۰/۰۵$). دربین شاخص‌های خونی فقط تعداد گلبول‌های سفید خونی در تیمار ریزپوشانی شده افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت ($P<۰/۰۵$) و بقیه شاخص‌های خونی فاقد تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای تحقیق بودند ($P>۰/۰۵$). نتایج چالش نشان داد که تیمار واکسینه با واکسن خوراکی ریزپوشانی شده با تلفات ۵۰٪ تلفات کم‌تری نسبت به تیمار شاهد (۹۵٪) داشت ($P<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که این روش‌ریزپوشانی واکسن خوراکی استرپتوکوکوس آگالاکتیه علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد، باعث بهبود کارایی واکسن در ماهی تیلاپیا نیز شده است.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: parisa_alizadeniya@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۷ شهریور ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۸ مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲٤ آذر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۵ دی ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.315952.2690

مقدمه

ماهی تیلاپیا یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی در جهان است (۱). با توجه به مزیت‌های پرورشی این گونه در کشور نیز در سال‌های اخیر توجه به پرروش این ماهی در کشور نیز محل مناقشه بوده است و علی‌رغم مزیت‌های پرورشی مناسب این گونه مثل رشد خوب، تراکم پذیری بالا، توقع کیفیت غذایی پایین، مقاومت بالا به کمبود اکسیژن و مسمومیت با ترکیبات ازته، تکثیر ساده و سریع (۲)، مشکلات زیست محیطی این گونه در منابع آبی کشور باعث نگرانی برخی محققین و متولیان زیست محیطی کشور گردد. تکثیر سریع و خارج از کنترل، مقاومت بالا به شرایط محیطی و سازش‌پذیری بالا به شرایط محیطی بیش‌تر باعث نگرانی زیست محیطی این گونه است. امروزه پرورش این گونه در برخی استان‌های داخلی که ارتباط آبی با منابع آبی کشور ندارند مجاز و در حال توسعه است (۳). بیماری استرپتوکوکوزیس ایجاد شده توسط استرپتوکوکوس آگالاکتیه در ماهی تیلاپیا مهم‌ترین بیماری باکتریایی این گونه می‌باشد (۱). این بیماری خطرناک با ایجاد عفونت سیستمیک باعث مرگ و میر بالا در ماهی تیلاپیا شده و این بیماری معمولاً با علائم عصبی مننگوآنسفالیت، لاغری، زخم جلدی، اگزوفتالمی، خونریزی پتشی و تاخیر رشد همراه است. این بیماری منجر به خسارت‌های شدید اقتصادی در صنعت پرورش این گونه شده است (۴). هرچند آنتی‌بیوتیک درمانی، استفاده از محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک‌ها در درمان و کنترل این بیماری نقش دارند، ولی مناسب‌ترین روش پیشگیری از بیماری استفاده از واکسیناسیون است (۵). چرا که کنترل و درمان استرپتوکوکوزیس بعد از وقوع مشکل است، استرس‌های محیطی بیماری را تشدید می‌کند. استفاده از آنتی‌بیوتیک در شرایط پرورشی بعضی محدودیت‌ها و نگرانی‌ها از قبیل: ایجاد باکتری‌های مقاوم، معضلات زیست‌محیطی و هزینه بالای اقتصادی تجویز و برهم خوردن فلور روده را دارد (۶). موارد فوق باعث گرایش بیش‌تر به استفاده از واکسن‌ها برای مبارزه با این بیماری شده است. در بین روش‌های مختلف تجویز واکسن در ماهی، تجویز تزریقی از همه روش‌ها کارایی و ایمنی‌زایی بالاتری دارد، ولی به‌دلیل استرس زیاد صید و بی‌هوشی و تزریق، تلفات بعد از تجویز، هزینه بالا، عدم امکان تجویز در سنین پایین، پرورش‌دهندگان به این روش تجویز گرایش چندانی ندارند. واکسیناسیون غوطه‌وری هم به‌دلیل کارایی نسبتاً پایین، عدم امکان استفاده در سنین بالا و استرس نسبتاً بالای صید و بی‌هوشی نتوانسته جایگاه خود را در روش‌های واکسیناسیون در آبزیان حفظ کند (۷). واکسیناسیون خوراکی به‌طورکلی به‌دلیل سهولت تجویز، استرس‌زا نبودن و امکان تجویز در جمعیت‌های بالا و مناسب بودن برای واکسیناسیون در تمام سنین، بهترین روش تجویز واکسن است (۸). اصلی‌ترین مشکل تجویز خوراکی واکسن میزان کارایی محافظتی کم آن نسبت به‌روش تزریقی است. رفع مشکل کارائی محافظتی پایین این روش، کاهش تجزیه آنتی‌ژن و حفظ بهتر آنتی‌ژن در معده و قسمت قدامی لوله گوارش است. پتانسیل نانو و میکرو ذرات برای انتقال خوراکی آنتی‌ژن‌ها در چندین گونه ماهی با استفاده از انواع مختلف پلیمرهای طبیعی و سنتزی مطالعه شده است. آنتی ژن‌ها معمولاً درون ذرات کپسوله شده، ولی گاهی ممکن است با پیوندهای کووالانسی نیز به آن‌ها متصل شوند. به‌طورکلی ذرات استفاده شده در ریزپوشانی آنتی‌ژن واکسنی غیرسمی، با قابلیت تخریب زیستی (تجزیه پذیری زیستی) بوده و برای انتقال خوراکی آنتی‌ژن مناسب هستند. اغلب مطالعات، جذب خوب در انتهای لوله گوارشی، افزایش تولید پادتن اختصاصی و هم‌چنین محافظت بهتر با استفاده از ذرات میکروسکوپی آلژینات، لیپوزوم‌ها، پلی دی ال لاکتید کو گلایکولیک اسید (PLGA) و کیتوزان را گزارش کرده‌اند (۹، ۱۰). کیتوزان و آلژینات دو پلیمر طبیعی زیست تخریب‌پذیر هستند که علاوه بر محافظت آنتی‌ژن در شرایط لوله گوارش ارزان‌قیمت و در دسترس هستند (۱۱، ۱۲) و در تحقیقات مختلف از آن‌ها برای پوشش دادن واکسن‌های خوراکی استفاده شده است (۱۳، ۱۴). پلیمرهای طبیعی کیتوزان و الژینات به‌دلیل ارزان و در دسترس بودن در بسیاری از تحقیقات مربوط به ریزپوشانی مواد موثره دارویی، پروبیوتیک‌ها و واکسن‌ها استفاده شده‌اند. ولی در مورد کاربرد واکسن‌های ریزپوشانی شده با این مواد در ماهی تیلاپیا تحقیقی در منابع گزارش نشده است. لذا با توجه به اهمیت بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهی تیلاپیا در کشور و ضرورت واکسیناسیون ماهی در برابر این بیماری در برنامه پرورش این ماهی، و با عنایت به مزایای واکسیناسیون خوراکی نسبت به سایر روش‌های واکسیناسیون، در این تحقیق سعی شد با استفاده از ریزپوشانی آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زای استرپتوکوکوس اگالاکتیه با نانوذرات آلژینات/کیتوزان، کارایی تجویز خوراکی این واکسن و اثر روی شاخص‌های رشد و ریزسنجه‌های خونی ماهی تیلاپیا ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

باکتری بذر واکسن: باکتری استرپتوکوکوس اگالاکتیه جداسازی شده از ماهی تلاپیای دارای علائم سپتی سمی شدید در آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز در تحقیق جاری مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری علاوه بر روش‌های روتین بیوشیمیایی، با روش مولکولی با استفاده از PCR و پرایمرهای مخصوص 16S RNA تایید گردید. برای اطمینان استخراج DNA از ژل اگارز حاوی باند مربوط به ژن 16sRNA باکتری استخراج و برای

توالی‌یابی ارسال گردید. نتیجه توالی‌یابی، جنس و گونه باکتری را کاملاً تایید نمود.

تهیه واکسن استرپتوکوکوس آگالاکتیه: پس از کشت باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در محیط کشت TSB به‌مدت ۴۸ ساعت، باکتری‌ها از محیط با سانتریفیوژ جداسازی شده و در مجاورت فرمالین ۱درصد به‌مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس باکتری‌ها با سرم فیزیولوژی سه بار شستشو شدند. به منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن کامل باکتری‌ها، از باکتری غیرفعال شده کشت مجدد تهیه شد (۱۵). قبل از غیرفعال نمودن باکتری‌ها، با استفاده از رقت‌سازی متوالی و کشت در محیط جامد تعداد باکتری‌ها با غلظت 10^{10} باکتری در میلی‌لیتر تنظیم گردید. در انتهای کار، باکتری‌های غیرفعال‌شده در سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون در آمده و با غلظت مورد نیاز برای ریزپوشانی تنظیم و استفاده شدند.

ریزپوشانی باکتری به‌روش Internal Emulsification: در این تحقیق از روش مایع سازی داخلی توصیه شده توسط Huiyi و همکاران، استفاده شد (۱۶). به‌طور خلاصه در یک بشر حاوی ۵۵ سی‌سی محلول آلژینات سدیم ۲٪ به‌میزان ۳/۵ سی‌سی سوسپانسیون کربنات کلسیم ۵۰۰ میلی‌مولار اضافه شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی مخلوط شد. در بشر دیگری ۳۵ میلی‌لیتر روغن زیتون ریخته شده و ۰/۵ گرم Span 80 به آن اضافه گردید. محلول حاصل با محلول بالا مخلوط شده و ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰ rpm هم‌زده شد. در ظرف دیگری ۱۰ میلی‌لیتر روغن زیتون و ۰/۵ سی‌سی اسید استیک با هم مخلوط شده و این محلول قطره قطره تا ایجاد pH ۳/۵ به محلول اول اضافه شده و ۳۰ دقیقه هم‌زده شد. روغن زیتون با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه جدا شده و در مرحله نهایی ۱۵ سی‌سی محلول کیتوزان ۰/۴ درصد قطره قطره با دور ۸۰۰ rpm به محلول اضافه شده و بعد به مدت یک‌ساعت کاملاً به هم زده شد. نهایتاً محلول به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و میکروسفرهای تولید شده از محیط آبی جدا گردید. در تیمار ریزپوشانی از محصول فوق میزانی مشخص که در خوراک ایجاد تراکم 10^{8} باکتری در گرم نماید، استفاده شد.

بررسی کیفیت آنتی‌ژن‌های ریزپوشانی شده

ویژگی‌های باکتری ریزپوشانی شده با کیتوزان/آلژینات به شرح زیر انجام گرفت: اندازه ذرات با استفاده از دستگاه Particle Analyser ذره مدل Scatterscope I qudix تعیین گردید. به این منظور ۵۰ میکرولیتر از محصول ریزپوشانی شده در یک میلی‌لیتر آب مقطر سوسپانسیون گردیده و در دستگاه آنالیز اندازه ذرات قرار داده شد. برای اندازه‌گیری پتانسیل زتای محصول، ابتدا محصول در آب مقطر رقیق گردید به‌طوری‌که جذب نوری محصول در طول موج ۶۰۰ انگستروم بین ۱-۲ باشد، سپس پتانسیل زتای نمونه توسط دستگاه زتا آنالایزر تعیین گردید.

شرایط تحقیق و تیماربندی ماهی‌ها: شرایط آب تحقیق: دمای آب ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد، pH بین ۷/۸ تا ۸/۴، سختی بر اساس کربنات کلسیم= ۸۵۰ میلی‌گرم در لیتر، نیتریت و آمونیاک کم‌تر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و نیترات کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر. اکسیژن محلول ۱/۳±۷/۴ میلی‌گرم در لیتر، مخازن ۳۰۰ لیتری پلاستیکی برای نگه‌داری تیمارها در نظر گرفته شد. خوراک ماهی تیلاپیا با ویژگی‌های زیر در تحقیق جاری استفاده شد: پروتئین ۳۳٪، میزان چربی ۱۱٪، میزان فیبر ۵٪، کلسیم ۳٪ و میزان خاکستر ۱۳٪ تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی با وزن ۲/۳۲±۳۰ گرم (میانگین±انحراف معیار) به ۴ تیمار (هر تیمار در سه تکرار ۳۰ قطعه‌ای) به‌صورت تصادفی طبق جدول ۱ تقسیم گردیدند.

جدول ۱: تیماربندی ماهیان تحقیق (نام تیمار و نوع خوراک استفاده شده برای ایمن‌سازی)

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
تیمار A	ایمن شده به‌روش خوراکی ریزپوشانی شده	۳۰ قطعه (در ۳ تکرار)
تیمار B	ایمن شده به‌روش خوراکی بدون ریزپوشانی	۳۰ قطعه (در ۳ تکرار)
تیمار C	تجویز آلژینات- کیتوزان بدون واکسن	۳۰ قطعه (در۳ تکرار)
تیمار D	خوراک پایه فاقد واکسن	۳۰ قطعه (در۳ تکرار)

در تیمارهای A و B، ماهی‌ها به‌مدت ۱۰ روز با خوراک حاوی 10^{9} باکتری در گرم خوراک تغذیه شدند. در تیمار C به ریزپوشانی همانند تیمار A ولی بدون اضافه نمودن باکتری انجام شد. و تیمار D به‌عنوان گروه شاهد با خوراک فاقد واکسن تغذیه شدند. در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ تحقیق، ماهی‌ها با داروی بی‌هوشی فنوکسی اتانول با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌هوش شده و زیست‌سنجی ماهی‌ها برای مقایسه شاخص‌های رشد بین گروه‌ها به شرح زیر انجام شد.

میزان افزایش وزن (BWI: Body Weight Increase) در میان‌دوره (روز ۳۰) و پایان دوره (روز ۶۰) اندازه‌گیری شد از فرمول زیر استفاده شد که در این فرمول BWi متوسط وزن اولیه (گرم) و BWf متوسط وزن نهایی(گرم) است (۱۷):

$$BWI=BWf-BWi$$

ضریب تبدیل غذایی(FCR: Feed Conversation Ratio) با استفاده از فرمول زیر، برای کل دوره محاسبه شد.

$$FCR=$$ افزایش وزن بدن (گرم) / غذای خورده شده (گرم)

ضریب رشد ویژه (SGR: Specific Growth Ratio): افزایش رشد روزانه را به درصد بیان می‌کند که توسط فرمول زیر محاسبه شد:

دوره پرورش به روز/ (Ln w2 – Ln w1) ۱۰۰ =SGR

Lnw1= لگاریتم وزن اولیه، Lnw2= لگاریتم وزن نهایی

نسبت بازده پروتئین (PER: Protein Efficiency Ratio) و نسبت بازده غذایی یا کارایی خوراک (FER: Food Efficiency Ratio)، این شاخص‌ها توسط فرمول‌های زیر محاسبه گردیدند (۱۷):

مقدار پروتئین مصرفی(گرم)/ افزایش وزن بدن (گرم) = PER

مقدار غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن بدن (گرم) = FER

آزمایشات هماتولوژی: خونگیری از ورید ساقه دمی ماهی‌ها بعد از بی‌هوشی ماهی‌ها با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس گل میخک با سرنگ انسولین با سوزن گیج ۲۱ و به‌همراه ۲۰ میکرولیتر هپارین در میلی‌لیتر خون به‌عنوان ضدانعقاد انجام گرفت. خونگیری در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ تحقیق از ۴ ماهی از هر تکرار تهیه شده شاخص‌های خونی به شرح زیر ارزیابی گردید.

هماتوکریت: حجم فشرده گلبولی یا PCV به‌روش معمول و متداول برای پستانداران و پرندگان یعنی روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ خون به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه توسط سانتریفوژ میکروهماتوکریت صورت گرفت.

هموگلوبین (Hb): هموگلوبین به‌روش استاندارد سیانومت‌هموگلوبین انجام می‌گیرد. پس از مخلوط کردن ۰/۰۲ میلی‌لیتر خون با ۵ سی‌سی محلول تجارتی درابکین (معرف سیانومت‌هموگلوبین) و پس از گذشت ۱۰ دقیقه، نمونه مخلوط شده به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور رسوب ذرات هسته با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین برحسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه گردید (۱۸).

شمارش کلی گلبول‌های قرمز (TRBC): شمارش کلی گلبول‌های قرمز ماهی به‌روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت. برای این‌کار و برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق‌کننده نات- هریک استفاده شد. برای شمارش گلبول‌های قرمز تا درجه ۰/۵ پی‌پت ملانژور قرمز خون کشیده شد و سپس تا درجه ۱۰۱ با محلول رقیق‌کننده نات- هریک رقیق گردید (نسبت رقت ۱ به ۲۰۰) و سپس نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر نئوبار منتقل و پس از صرف زمان ۵ دقیقه برای ته‌نشین شدن گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های قرمز با بزرگ‌نمایی ۴۰ در ۵مربع ثانوی از مربع اولیه مرکزی شمارش و تعداد سلول شمارش شده در ضریب رقت یعنی عدد ۱۰۰۰۰ ضرب گردید و تعداد گلبول‌های قرمز در میلی‌لیتر مکعب خون محاسبه شد (۱۸).

چالش باکتریایی: ۱۰ قطعه ماهی از هر تکرار به‌طور جداگانه با باکتری‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه به‌میزان دوز ایجادکننده ۵۰٪ تلفات (به‌دست آمده در تحقیقات قبلی تیم تحقیق $LD50=1.75\times10^6$)، به‌صورت داخل صفاقی، چالش داده شدند. هم‌زمان گروه شاهد (غیر واکسینه) نیز با LD50 باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. به یک گروه از ماهیان گروه شاهد نیز فقط PBS به‌همان روش تزریق شد. در طی دوره چالش، روزانه ماهی بررسی شده و میزان تلفات در طی ۱۴ روز ثبت شد. درصد تلفات در تیمارها مقایسه گردید. از آن‌جاکه ماهیان تزریق شده با PBS هیچ‌گونه تلفاتی در طول دوره چالش نداشتند در نمودارهای چالش این گروه آورده نشده است (۱۹).

آزمون آماری: برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون استاتیستیک تست برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از ANOVA یک‌طرفه برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی در تیمارها استفاده گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. کلیه داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید.

نتایج

نتایج کیفیت محصول ریزپوشانی شده: نتایج آنالیز اندازه و پراکنش ذرات محصول ریزپوشانی شده با دستگاه سایز انالایزر نشان داد که اندازه متوسط ذرات برابر ۵۷۴ نانومتر بود. هم‌چنین پتانسیل زتا که یک شاخص مهم در میکرو و نانوذرات کلوئیدی است و نشان‌دهنده میزان ثبات کلوئید تولید شده می باشد در محصول برابر ۴۴/۵ بود.

شاخص‌های رشد: نتایج بررسی شاخص‌های رشد گروه‌های چهارگانه تحقیق در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طورکه در جدول مشخص است همه شاخص‌های رشد مورد ارزیابی هم در میان‌دوره و هم در پایان دوره تحت تاثیر ایمن‌سازی با واکسن ریزپوشانی شده با ریزذرات کیتوزان/آلژینات قرار گرفته است. به‌طوری‌که ضریب رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، کارایی خوراک (FER)، درصد افزایش وزن (PGR) در هر دو مرحله میان‌دوره (روز ۳۰) و هم در پایان دوره (روز ۶۰) بهبود معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داده‌اند ($P<0/05$). علی‌رغم بهبود برخی شاخص‌های رشد در گروه ایمن شده با واکسن خوراکی بدون ریزپوشانی، این بهبود شاخص در سطحی نبوده که نسبت به تیمار شاهد بهبود معنی‌دار شاخص ها را باعث شود ($P>0/05$).

جدول ۲: مقایسه برخی شاخص‌های رشد بین گروه‌های ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوس آگالاکتیه ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی تیلاپیا (A: گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه ریزپوشانی شده با آلژینات /کیتوزان، B: A: گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه بدون ریزپوشانی، C: A: گروه بدون ایمن‌سازی و تغذیه شده باخوراک حاوی آلژینات /کیتوزان، D: گروه شاهد بدون ایمن‌سازی و افزودنی خوراکی)

شاخص‌های رشد/ تیمارها	A	B	C	D
افزایش وزن میان دوره (گرم)	۱۸/۸۳±۰/۷۲^{a}	۱۸/۰۳±۰/۹۲ ^{a}	۱۷/۱۹±۱/۱۸ ^{a}	۱۷/۴۶±۱/۰۵ ^{a}
افزایش وزن کل دوره (گرم)	۴۱/۱۴±۱/۴۴^{a}	۳۸/۸۹±۰/۲۴^{b}	۳۸/۵۳±۰/۷۲^{b}	۳۸/۰۳±۰/۳۹^{b}
ضریب رشد ویژه میان‌دوره	۰/۶۰±۰/۰۲^{a}	۰/۵۸±۰/۰۳^{b}	۰/۵۶±۰/۰۴ ^{b}	۰/۵۶±۰/۰۳ ^{b}
ضریب تبدیل غذایی میان‌دوره	۱/۶۵±۰/۰۶^{a}	۱/۷۲±۰/۰۹^{b}	۱/۷۵±۰/۰۴^{b}	۱/۷۲±۰/۰۱^{b}
بازده غذایی میان‌دوره	۶۰/۷۵±۲/۳۳^{a}	۵۸/۱۵±۲/۹۶^{b}	۵۷/۳۰±۱/۴۰^{b}	۵۸/۲۰±۰/۲۶^{b}
ضریب رشد ویژه کل دوره	۰/۶۶±۰/۰۱^{a}	۰/۶۳±۰/۰۱^{b}	۰/۶۲±۰/۰۲^{b}	۰/۶۱±۰/۰۱^{b}
ضریب تبدیل غذایی کل دوره	۱/۷۰±۰/۰۶^{a}	۱/۷۸±۰/۰۳^{b}	۱/۸۲±۰/۰۳^{b}	۱/۸۴±۰/۰۲^{b}
بازده غذایی کل دوره	۵۸/۷۷±۲/۰۵^{a}	۵۶/۰۹±۰/۱۲^{b}	۵۵/۰۴±۱/۰۳^{b}	۵۴/۳۳±۰/۵۶^{b}
درصد افزایش وزن میان‌دوره	۵۱/۷۶±۱/۸۹^{a}	۴۹/۷۵±۲/۷۸^{b}	۴۶/۸۳±۴/۰۰ ^{b}	۴۶/۸۰±۳/۳۳^{b}
درصد افزایش وزن کل	۱۱۳/۰۴±۲/۶۶^{a}	۱۰۷/۳۲±۲/۶۲^{b}	۱۰۴/۸۸±۳/۷۴^{b}	۱۰۱/۸۷±۱/۵۱^{b}

حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

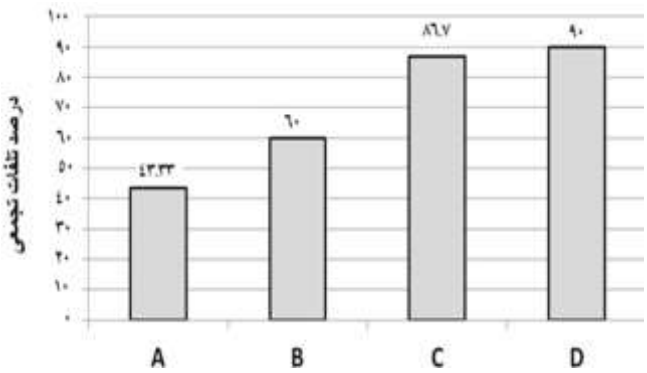
نتایج مربوط به مقایسه شاخص‌های خونی بین گروه‌های تحقیق نشان داد که شاخص‌های خونی وابسته به گلبول‌های قرمز شامل: تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین تحت تاثیر روش ایمن‌سازی خوراکی قرار نگرفته بود، به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری بین شاخص‌های فوق در بین تیمار شاهد و گروه‌های ایمن شده با واکسن خوراکی ریزپوشانی شده و غیرریزپوشانی شده مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). هرچند تعداد گلبول‌های سفیدخونی در ماهیان واکسینه شده‌باواکسن خوراکی استرپتوکوکوس آگالاکتیه ریزپوشانی شده‌به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود (P<۰/۰۵). نتایج مربوط به مقایسه تعداد گلبول‌های سفید خونی بین گروه‌های تحقیق نشان داد که این شاخص تحت تاثیر واکسیناسیون قرار گرفته است. به‌طوری‌که تعداد گلبول‌های سفیدخونی (WBC) در گروه ایمن شده با واکسن خوراکی ریزپوشانی شده با ریزذرات آلژینات/کیتوزان در هر دو مرحله نمونه‌گیری، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد (P<۰/۰۵)، علی‌رغم بهبود نسبی این شاخص در ماهیان ایمن شده با واکسن خوراکی بدون ریزپوشانی، این میزان از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵).

جدول ۳ : مقایسه برخی شاخص‌های خونی بین گروه‌های ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوس آگالاکتیه ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی تیلاپیا (گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه ریزپوشانی شده با آلژینات /کیتوزان، B: A: گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه بدون ریزپوشانی، C: A: گروه بدون ایمن‌سازی و تغذیه شده باخوراک حاوی آلژینات /کیتوزان، D: گروه شاهد بدون ایمن‌سازی و افزودنی خوراکی)

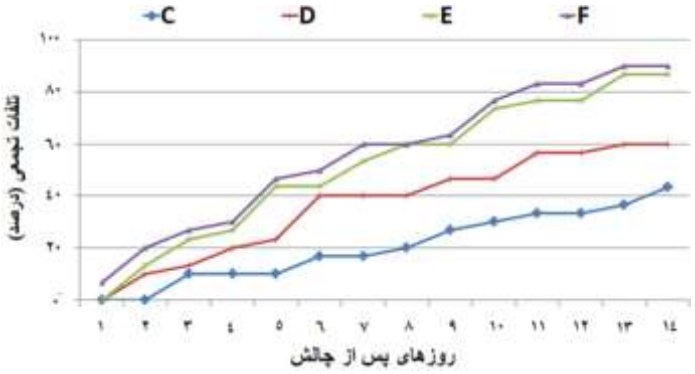
زمان	تیمارهای تحقیق	هماتوکریت ٪	هموگلوبین g/dl	گلبول های قرمز(10^{6}×	گلبول های سفید 10^{3}×
روز صفر		۲۹/۷۵ ± ۱/۶۷ ^{a}	۵/۰۱ ± ۱/۱۰ ^{a}	۱/۵۵ ± ۰/۲۳ ^{a}	۱۶/۰۷ ± ۱/۵۷
روز ۳۰	A	۲۶/۳۵ ± ۳/۵۰ ^{a}	۵/۵۴ ± ۱/۱۵ ^{a}	۱/۵۸ ± ۰/۱۶ ^{a}	۲۲/۱۷ ± ۳/۸۷ ^{a}
	B	۲۶/۷۵ ± ۴/۵۰ ^{a}	۵/۶۵ ± ۱/۵۰ ^{a}	۱/۵۴ ± ۰/۱۴ ^{a}	۱۵/۴۷ ± ۲/۷۵ ^{b}
	C	۲۷/۲۵ ± ۵/۲۵ ^{a}	۵/۶۲ ± ۱/۸۷ ^{a}	۱/۵۷ ± ۰/۴۰ ^{a}	۱۷/۱۵ ± ۲/۷۵ ^{b}
	D	۲۹/۰۰ ± ۱/۱۵ ^{a}	۵/۰۸ ± ۱/۲۱ ^{a}	۱/۵۷ ± ۰/۲۳ ^{a}	۱۶/۶۴ ± ۱/۵۶ ^{b}
روز ۶۰	A	۲۶/۷۵ ± ۷/۱۴ ^{a}	۵/۴۵ ± ۰/۷۳ ^{a}	۱/۷۲ ± ۰/۱۹ ^{a}	۲۱/۰۲ ± ۴/۰۳ ^{a}
	B	۲۷/۵۰ ± ۴/۰۴ ^{a}	۵/۴۵ ± ۱/۵۹ ^{a}	۱/۵۱ ± ۰/۱۵ ^{a}	۱۵/۳۲ ± ۲/۳۱ ^{b}
	C	۲۸/۲۵ ± ۵/۲۵ ^{a}	۵/۳۷ ± ۱/۸۷ ^{a}	۱/۶۹ ± ۰/۱۵ ^{a}	۱۶/۰۰ ± ۲/۷۵ ^{b}
	D	۳۰/۵۰±۱/۹۱ ^{a}	۴/۹۳ ±۱/۱۵ ^{a}	۱/۵۶ ± ۰/۳۴^{a}	۱۵/۴۰±۱/۵۶^{b}

حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

نتایج مربوط به درصد تلفات بعد از چالش با باکتری حاد استرپتوکوکوس آگالاکتیه در گروه‌های تحقیق در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است. درصد تلفات در تیمارهای ایمن شده با واکسن ریزپوشانی‌شده به‌طور معنی‌داری‌نسبت به سایر تیمارها کاهش داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که تلفات بعد از چالش با استرپتوکوکوس آگالاکتیه در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده ۴۳/۳۳ درصد، و در تیمار ایمن‌سازی با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس آگالاکتیه بدون ریزپوشانی ۶۰ درصد و در تیمار شاهد ۹۰ درصد و در تیمار تجویز آلژینات/کیتوزان ۸۶/۷ درصد بود.



شکل ۱: مقایسه تلفات بعد از چالش با باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس آگالاکتیه بین تیمارهای ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی تیلاپیا. (گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان، B: A: گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه بدون ریزپوشانی، C: A: گروه بدون ایمن‌سازی و تغذیه شده باخوراک حاوی آلژینات/کیتوزان، D: گروه شاهد بدون ایمن‌سازی و افزودنی خوراکی)



شکل ۲: مقایسه روند تلفات بعد از چالش با باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه بین تیمارهای ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی تیلاپیا. (گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان، B: A: گروه ایمن شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه بدون ریزپوشانی، C: A: گروه بدون ایمن‌سازی و تغذیه شده باخوراک حاوی آلژینات/کیتوزان، D: گروه شاهد بدون ایمن‌سازی و افزودنی خوراکی)

بحث

گرایش به سمت استفاده از واکسن‌های خوراکی در آبزیان به دلیل مزیت‌های خاص مثل سهولت تجویز، عدم القای استرس، هزینه پایین تجویز و عدم نیاز به صید و بی‌هوش نمودن ماهی برای تجویز، افزایش یافته است (۲۰). محدودیت واکسن‌های خوراکی کارایی پایین آن‌هاست که برای غلبه بر این مشکل استفاده از محافظت‌کننده‌های آنتی‌ژن در شرایط گوارشی توصیه شده است (۱۴). در این تحقیق نیز با پوشش دادن آنتی‌ژن‌های واکسن استرپتوکوکوس اگالاکتیه با ریزذرات کیتوزان و الژینات کارایی واکسن خوراکی به میزان زیادی بهبود بخشیده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز خوراکی واکسن استرپتوکوکوس اگلالاکتیه ریزپوشانی شده با ریزذرات آلژینات/ کیتوزان در ماهی تیلاپیا بهبود معنی‌دار کارایی واکسن را باعث شده است، به‌طوری‌که در تیمار واکسیناسیون خوراکی بدون ریزپوشانی تلفات بعد از چالش ۶۰٪، درصورتی‌که تلفات در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده ۴۳/۳۳٪ و در تیمار شاهد ۹۰٪ بود. با توجه به‌میزان تلفات بعد از چالش، در مقایسه با گزارشات مشابه کارایی واکسن ریزپوشانی شده قابل قبول می‌باشد، به‌طوری‌که در مطالعه Eldar و Ghittino، در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان تلفات ۱۱ درصد (۲۱)، و در مطالعه Altun و همکاران، نیز تلفات ۱۰درصد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دنبال چالش باکتریایی ماهیان واکسن در برابر لاکتوکوکوس گارویه به‌روش تزریقی را گزارش کردند (۲۲). هم‌چنین Soltani و همکاران،در واکسن غوطه‌وری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلفات حدود ۷۰ درصد را در تیمار غوطه‌وری گزارش کردند (۲۳). در تحقیقی مشابه Prabhugouda و همکاران،در ماهی *Channa striatus* از پوشش کیتینی برای باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تجویز تزریقی استفاده کردند و بهبود کارایی واکسن‌از ۴۹٪ در تیمار واکسن‌بدون کیتین به ۹۲٪ در تیمار واکسن پوشش‌داده‌شده باکیتین را گزارش‌نموده‌اند(۲). Halimi و همکاران، کارایی واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اینیه‌ریزپوشانی شده به‌روش مشابه این تحقیق را حدود ۶۵٪ در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش کردند (۱۳). هم‌چنین Tulaby Dezfuly و همکاران، نیز با استفاده از روش‌مشابه تحقیق جاری برای ریزپوشانی واکسن یرسینیا راکری‌در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان محافظت ۴۲٪ راگزارش

کردند (۱۲). Ballesteros و همکاران، واکسن DNA انکپسوله شده با آلژینات را جهت مقابله با بیماری ویروسی نکروز عفونی پانکراس (IPNV) در ماهی قزل‌آلا استفاده نموده‌اند و محافظت قوی با درصد بقای نسبی (RPS) بیش از ۸۰٪ در ماهی واکسینه را گزارش کردند (۲۴). در ماهی فلاندر ژاپنی تجویز واکسن DNA ویروس بیماری لیمفوسیتوز (LCDV) با ادجوان ریز ذرات آلژینات انجام شد و علاوه بر بیان پروتئین ویروسی در بافت‌های مختلف ماهی افزایش مقاومت قابل ملاحظه در برابر چالش ویروسی گزارش گردید. مهم‌ترین شاخصه واکسن میزان کارایی آن در برابر چالش با بذر واکسنی است. پلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر آلژینات و کیتوزان (به‌صورت ریزذرات پوششی) با تاثیر بر ایمنی و کارایی این واکسن‌ها گزینه مناسبی برای تولید واکسن‌های تجاری می‌باشند. آنتی‌ژن‌های واکسنی در تجویز خوراکی توسط سلول‌های پوششی در بخش دوم دستگاه گوارش (ناحیه خلفی) دریافت و سپس وارد ماکروفاژهای مستقر درون بافت پوششی می‌شوند (۲۵). محققان مشاهده کردند که فرایند اندوسیتوز در قزل‌آلای رنگین‌کمان در قسمت دوم روده انجام می‌شود. آنتی‌ژن‌های پروتئینی محافظت شده و سایر ماکرومولکول‌ها توسط فاگوسایتوزیس انتروسیت‌ها جذب می‌شوند و برخی نیز مستقیم توسط سلول‌های لنفاوی داخل اپی تلیالی یا GALT جذب و به سیستم ایمنی معرفی می‌گردند (۲۶). ریزپوشانی آنتی‌ژن‌ها با استفاده از پلیمرهای زیستی و تجویز خوراکی آن‌ها علاوه بر محافظت از آنتی ژن‌ها در برابر تجزیه شدن در سیستم گوارشی، منجر به افزایش دسترسی زیستی آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا به‌دلیل پراکندگی ذره‌ای و رهاسازی کنترل شده آنتی‌ژن‌ها می‌گردد (۱۳). تحقیقات موفقیت‌آمیز متعددی استفاده از ریزپوشانی با پلیمرهای زیستی برای ایمن‌سازی خوراکی و مصونیت در برابر مواد آنتی‌ژنی مختلف ازجمله باکترین‌ها، سلول‌های زنده، آنتی‌ژن‌های محلول و DNA واکسن‌ها در ماهیان را گزارش کرده‌اند (۲۷). برخی پلیمرهای زیستی استفاده شده در ریز پوشانی آنتی‌ژن‌ها اثرات ادجوانتی ذاتی نیز دارند که این عامل در ایمن‌سازی ماهیان یک مزیت محسوب می‌گردد (۲۸). پتانسیل نانو و میکرو ذرات برای انتقال خوراکی آنتی‌ژن‌های واکسنی در چندین گونه ماهی با استفاده از انواع مختلف پلیمرهای طبیعی و سنتزی مطالعه شده است. آنتی‌ژن‌ها معمولاً درون ذرات کپسوله شده، و گاهی نیز با پیوندهای کووالانسی به آن‌ها متصل می‌شوند. به‌طورکلی ذرات استفاده شده در این روش‌ها غیرسمی، با قابلیت تخریب زیستی (تجزیه‌پذیری زیستی) بوده و بنابراین برای انتقال خوراکی مناسب هستند (۱۰). Dezfuly و همکاران، نیز با استفاده از واکسن ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان/آلژینات بهبود کارایی واکسن خوراکی یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را گزارش نمودند (۲۹).

در تحقیق جاری بهبود شاخص‌های رشد تحت تاثیر واکسیناسیون ماهی تیلاپیا با واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه قرار گرفتند و تقریباً تمام شاخص‌های رشد مورد ارزیابی در تیمار واکسینه با واکسن خوراکی ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بهبود یافته بود. در مطالعات مشابه بهبود شاخص‌های رشد بعد از تجویز واکسن خوراکی باکتریایی گزارش شده است. Mamun و همکاران، از واکسن خوراکی آئروموناس هیدروفیلا به‌صورت بایوفیلم کیتوزان در گربه ماهی مخطط *Pangasianodon hypophthalmus* استفاده کردند. آن‌ها از غلظت 10^{10} باکتری به‌ازای هر ماهی (تقریباً ده برابر غلظت مورد استفاده تحقیق جاری) در روز استفاده کردند و به‌مدت ۲۰ روز (دوبرابر تحقیق جاری) واکسیناسیون امتداد داشت. آن‌ها نتیجه گرفتند که شاخص‌های رشد در تیمار واکسینه شده با واکسن بایوفیلم ائروموناس هیدروفیلا به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد و واکسن بدون ریزپوشانی بهبود یافته است. البته دوز واکسن و دوره زمان تجویز بیش‌تر از استاندارد واکسن‌های خوراکی بوده است (۳۰). البته افزایش طول دوره تجویز که به‌دلیل اطمینان از رسیدن آنتی‌ژن کافی به همه جمعیت است، با توجه به نیاز به‌میزان بسیار زیادی از واکسن، مقرون به‌صرفه نیست، و محققان گرایشی به استفاده از این روش پرهزینه ندارند. از سوی دیگر نشان داده شده است که تکرار تجویز آنتی‌ژن‌های پروتئینی باعث سرکوب ایمنی و یا ایجاد تحمل ایمنی در پستانداران می‌شود (۳۱). مشابه همین حالت، نوعی سرکوب ایمنی وابسته به دوزهای بالای انتی‌ژن نیز در کپور گزارش گردیده است. Vinay و همکاران، با استفاده از ریزپوشانی باکتری ویبریو و واکسیناسیون خوراکی میگوی پاسفید غربی *Penaeus vannamei* با این محصول، بهبود تمام شاخص‌های رشد را گزارش نمودند (۳۲). در تحقیقی دیگر Kitiyodom و همکاران، با استفاده از واکسن کلومناریس در ماهی تیلاپیای نایل بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی را گزارش نمودند (۳۳). در برخی تحقیقات عدم تاثیر واکسن خوراکی بر شاخص‌های رشد ماهی گزارش شده است. در تحقیق Monir و همکاران، نشان دادند که رشد ماهی تیلاپیای قرمز واکسینه شده با واکسن خوراکی استرپتوکوکوزیس نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشته است. آن‌ها این عدم تاثیر در رشد را هم‌زمان با بهبود بازماندگی و کاهش تلفات در چالش باکتریایی دلیلی بر تجویز این واکسن دانسته‌اند (۵). Tobar و همکاران، واکسن خوراکی سپتیسمی ریکتزیایی آزادماهی (SRS) و ماهی آزاد آتلانتیک ۳۰ گرمی را نیز عدم تغییر شاخص‌های رشد در ماهی واکسینه و غیر واکسینه را گزارش نمودند. این محققین با توجه به این‌که محل جذب آنتی‌ژن‌های واکسنی منطبق بر محل جذب ماکروالمان‌های غذایی است، برای رفع احتمال تداخل عمل این دو واکنش تحقیقی را طراحی کردند

و نتیجه گرفتند که جذب آنتی‌ژن‌ها و روند جذب در روده تاثیری در جذب مواد غذایی به‌ویژه مواد ماکروالمان نداشته و تاثیر منفی بر رشد ماهی متصور نیست (۳۴). در تحقیق جاری اثر کیتوزان و الژینات (بدون واکسن) بر هیچ‌کدام از شاخص‌های رشد و خونی مورد بررسی از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). احتمالاً با توجه به‌میزان بسیار کم کیتوزان و آلژینات استفاده شده در ریزپوشانی واکسن، تاثیر فیزیولوژیک آن‌ها بر شاخص‌های رشد و خونی قابل اغماض باشد. البته دوزهای بالاتر این مواد (۵گرم در کیلوگرم خوراک) در تحقیقات تیم تحقیق اثرات تحریک رشد و ایمنی داشته است (۱۹). در بین شاخص‌های خونی، میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحقیق در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقایسه شمارش تعداد گلبول‌های سفید خونی بین تیمارهای تحقیق نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید خونی در تیمار واکسینه شده با واکسن ریزپوشانی شده با آلژینات-کیتوزان در روز ۳۰ و ۶۰ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشته است (P<۰/۰۵). هر چند بررسی هماتوگرام (تابلوی خونی) حیوانات در بررسی وضعیت سلامتی مهم است، ولی در ماهی تابلوی خونی شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت سلامت و ایمنی ماهی نیست، چراکه این شاخص‌ها به‌دلیل خونسرد بودن ماهی، به‌عوامل فیزیولوژیک و شرایط محیطی بستگی دارند به‌طوری‌که حتی تغییر فصل یا تغییر دما و استرس جابجایی می‌تواند شاخص‌های خونی ماهی را تحت تاثیر قرار دهد. ولی در مطالعات متعددی بهبود شاخص‌های خونی به‌دنبال ایمن‌سازی ماهی و تجویز محرک‌های ایمنی گزارش شده است (۳۵). احتمالاً تجویز خوراکی واکسن استرپتوکوکوزیس و ریزپوشانی واکسن با ریزذرات کیتوزان/ آلژینات تاثیری بر شاخص‌های خونی وابسته به گلبول‌های قرمز ماهی نداشته است. اگرچه در تحقیقاتی مشابه، Chang و همکاران، در ماهی *Lateolabrax japonicus* (۳۶) و هم‌چنین Gopalakannan و Arul، در ماهی کپور معمولی (۳۷) عدم تغییر شاخص‌های خونی به‌دنبال تجویز محرک‌های ایمنی و واکسن‌ها را گزارش کردند؛ ولی برخی تحقیقات تاثیر معنی‌دار ایمن‌سازی بر شاخص‌های خونی و تعداد و نسبت گلبول‌های سفید ماهی، را گزارش نموده‌اند (۲۶). گلبول‌های سفید ماهیان درعمل بیگانه‌خواری و پاسخ ایمنی بدن نسبت به عوامل بیماری‌زای انگلی، باکتریایی، ویروسی و کمک به ترمیم بافت‌های صدمه دیده نقش مهمی ایفا می‌کنند. اندازه‌گیری گلبول‌های سفید، درصد و نوع آن‌ها در تعیین وضعیت عمومی ماهی کاربرد فراوانی دارد. از آن‌جا که افزایش ایمنی تحت تاثیر تعداد و فعالیت گلبول‌های سفید خونی می‌باشد، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی احتمالاً یکی از عوامل بهبود بازماندگی بعد از چالش باکتریایی می‌باشد. ریزپوشانی واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگالاکتیه در ماهی تیلاپیای نایل علاوه بر بهبود کارایی واکسن، تحریک شاخص‌های رشد و برخی شاخص‌های خونی را باعث شده است. لذا از آن‌جا که این روش ریزپوشانی با آلژینات و کیتوزان ارزان و در دسترس است، تحقیق بیش‌تر در امکان کاربرد آن در سطح صنعتی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی و معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسید.

منابع

1. **Kahiesh Esfandiari, M., Ina-Salwany, M.Y., Aslah, M., Soltani, M., Sabili, A., Karimi, M. and Muthukrishnan, S., 2019.** Growth Performance, Palatability, and Water Stability of Oral Feed Based Vaccines Against Streptococcus Agalactiae in Red Tilapia (*Oreochromis* sp.). J. Biochem. Tech. 10(2): 106-115.
2. **Prabhugouda, S.K.M., Shankar, B.T., Naveen, K., Rajreddy, P. and Omkar, V.B., 2014.** Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Channa striatus*. Fish & Shellfish Immunology. 41: 581-585.
3. **Vazirzadeh, A., 2017.** Tilapia Farming in Iran: Savior of Aquaculture or Destroyer of Environment. Shil. 5(3): 104-110. (In Persian)
4. **Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J., 2008.** Streptococcus: A worldwide fish health problem. In Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egypt, 12-14 October 2008, Central Laboratory for Aquaculture Research: Tall AlKabir, Ismailia Governorate, Egypt. 83-107.
5. **Laith, A.A. and Ambak, M.A., 2017.** Molecular identification and histopathological study of natural Streptococcus agalactiae infection in hybrid tilapia Vet World. 10(1): 101-111.
6. **Yuan, K., Wang, X., Chen, X., Zhao, Z., Fang, L., Chen, B. and Chen, B., 2019.** Occurrence of antibiotic resistance genes in extracellular and intracellular DNA from sediments collected from two types of aquaculture farms. Chemosphere. 234: 520-527.
7. **Monir, M.S., Yusoff, M.S., Zulperi, Z.M., Hassim, H.A., Zamri-Saad, M., Amal, M.N.A. and Ina-Salwany, M.Y., 2021.** Immuno-protective efficiency of feed-based whole-cell inactivated bivalent vaccine against Streptococcus and Aeromonas infections in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*× *Oreochromis*

18. **Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R.W. and Campbell, T.W., 2012.** Veterinary hematology and clinical chemistry. John Wiley & Sons.

19. **Alishahi, M., Esmaeili Rad, A., Zarei, M. and Ghorbanpour, M., 2014.** Effect of dietary chitosan on immune response and disease resistance in *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 8(2): 125-133.

20. **Giacomello, E., Sava, G., Vita, F., Delhom, N., Mahl, P. and Bergamo, A., 2020.** Chitosan-coated alginate micro-particles delivery of active principles through conventional pelleted food-A study in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Biological Macromolecules. 165: 82-92.

21 **Eldar, A. and Ghittino, C., 1999.** *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar but different diseases. Diseases of Aquatic Organisms. 36(3): 227-231.

22. **Altun, S., Kubilay, A., Ekici, S., Didinen, B.I. and Diler, O., 2010.** Oral vaccination against lactococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 16: 211-217.

23. **Soltani, M., Alishahi, M., Mirzargar, S. and Nikbakht, G., 2007.** Vaccination of rainbow trout against *Streptococcusiniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 7: 129-140.

24. **Ballesteros, N.A., Saint-Jean, S.R. and Perez-Prieto, S.I., 2014.** Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & shellfish immunology. 37(2): 220-228.

25. **Rombout, J.H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G. and Kiron, V., 2011.** Teleost intestinal immunology. Fish & shellfish immunology. 31(5): 616-626.

26. **Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L. and Pan, Y., 2012.** Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi). Aquaculture. 342-343: 36-41.

27. **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 yersiniosis than immersion vaccination. Vaccine. 34(5): 599-608.

28. **De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. and Sikkema, J., 2010.** Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. International Dairy Journal. 20(4): 292-302.

29. **Dezfuly, Z.T., Alishahi, M., Ghorbanpoor, M., Tabandeh, M.R. and Mesbah, M., 2020.** Immunogenicity and protective efficacy of Yersinia ruckeri lipopolysaccharide (LPS), encapsulated by alginate-chitosan micro/nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). Fish & shellfish immunology. 104: 25-35.

mossambicus). Fish & Shellfish Immunology. 113: 162-175.

8. **Plant, K.P., LaPatra, S.E. and Cain, K.D., 2009.** Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. Journal of fish diseases. 32(6): 521-534.

9. **Behera, T., Nanda, P.K., Mohanty, C., Mohapatra, D., Swain, P., Das, B.K. and Sahoo, S.K., 2010.** Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. Fish & shellfish immunology. 28(2): 320-325.

10. **Kumar, S.R., Ahmed, V.I., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Babu, V.S. and Hameed, A.S., 2008.** Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. Fish & Shellfish Immunology. 25(1-2): 47-56.

11. **AbdelAllah, N.H., Abdeltawab, N.F., Boseila, A.A. and Amin, M.A., 2016.** Chitosan and sodium alginate combinations are alternative, efficient, and safe natural adjuvant systems for hepatitis B vaccine in mouse model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 7659684: 1-8. http://dx.doi.org/10.1155/2016/7659684

12. **Tulaby Dezfuly, Z., Alishahi, M., Ghorbanpour, M., Masbah, M. and Tabandeh, M.R., 2020.** Survey on Immunogenicity and protective efficacy of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide (LPS) against yersiniosis disease in Rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). Journal of Animal Environment. 12(3): 293-304. (In Persian)

13. **Halimi, M., Mojtaba, A., Abbaspour, M.R., Ghorbanpoor, M. and Tabandeh, M.R., 2019.** High efficacy and economical procedure of oral vaccination against *Lactococcus garvieae/Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology. 99: 505-513.

14. **Alishahi, M., Halimi, M., Ghorbanpoor, M. and Erfanmanesh, A., 2019.** Comparison of efficacy and immunogenicity of three administration routs of *Streptococosis*/*lactococosis* vaccine in rainbow trout. Journal of Animal Environment. 11(4): 187-196. (In Persian)

15. **Alishahi, M., Ranjbar, M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R. and Mesbah, M., 2010.** Effects of dietary on some specific and nonspecific immunity in the common carp. International Journal of Veterinary Research. 4: 189-195.

16. **Huiyi, S., Weiting, Y., Meng, G., Xiudong, L. and Xiaojun, M., 2013.** Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohudrate polymers. 96: 181-189.

17. **Tacon, A.G., 1995.** Feed formulation and on-farm feed management. FAO Fisheries Technical Paper. 61-74.

30. **Mamun, M.A.A., Nasren. S., Rathore. S.S., Sidiq. M.J., Dharmakar. P. and Anjusha, K.V., 2019.** Assessment of probiotic in aquaculture: functional changes and impact on fish gut. Microbiol Res Int. 29: 1-10.

31. **Brandtzaeg, P. and Pabst, R., 2004.** Let's go mucosal: communication on slippery ground. Trends in immunology. 25(11): 570-577.

32. **Vinay, T.N., Ray, A.K., Avunje, S., Thangaraj, S.K., Krishnappa, H., Viswanathan, B. and Patil, P. K., 2019.** Vibrio harveyi biofilm as immunostimulant candidate for high-health pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* farming. Fish & shellfish immunology. 95: 498-505.

33. **Kitiyodom, S., Yata, T., Yostawornkul, J., Kaewmalun, S., Nittayasut, N., Suktham, K. and Pirarat, N., 2019.** Enhanced efficacy of immersion vaccination in tilapia against columnaris disease by chitosan-coated "pathogen-like" mucoadhesive nanovaccines. Fish & shellfish immunology. 95: 213-219.

34. **Tobar, J.A., Jerez, S., Caruffo, M., Bravo, C., Contreras, F., Bucarey, S.A. and Harel, M., 2011.** Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia. Vaccine. 29(12): 2336-2340. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.107.

35. **Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K. and Jani-Khalili, K., 2011.** Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry. 37: 833-842.

36. **Chang, Q., Liang, M.Q. and Wang J.L. 2010.** Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). Acta Hydrobiologica Sinica. 29(2): 172-176.

37. **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.