Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

Evaluation of *Yersinia ruckeri* vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Zeinab Reza Gholitebar[1] ,Mohammad Mazandarani[*2], Seyed Hosein Hoseinifar[*3], Mohammad Soudagar[4], Roghieh Safari[5]

1. Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: z_rgt@yahoo.com
2. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mazandarani57@gmail.com
3. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hossein.hoseinifar@gmail.com
4. Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sudagar_m@yahoo.com
5. Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 05.07.2022
Revised: 06.01.2022
Accepted: 05.24.2022

Keywords:
Antibody titer,
Bacterial exposure,
Rainbow trout,
Vaccination,
Yersiniosis

ABSTRACT

Yersiniosis is one of the most important bacterial diseases that cause a lot of economic losses to cold-water fish farms in the country. Therefore, the use of effective vaccination is one of the best ways to control this disease. In this study, the vaccine efficacy of different methods of bathing in these fish has been evaluated. In this regard, 300 fish with an average weight of 3 ± 0.35 were divided into 12 tanks after adaptation. In this study, 6 experimental groups including a positive control group, negative control group, single dose vaccinated fish group, two-dose vaccinated fish group, hyperosmotic environment + single dose vaccinated fish group, and hyperosmotic environment + two-dose vaccinated fish group. Fish from different groups were exposed to 4.3 10 107 bacteria intraperitoneally after vaccination and the survival rates of the fish was evaluated. Based on the results, the white blood cells counts (WBC) in the vaccinated groups were significantly higher than the control group. *Yersinia ruckeri* antibody titers by microagglutination method were also measured significantly higher in the vaccinated groups compare to the control, in the other hand, in the fish that received the vaccine twice, this titer was significantly higher than the other groups. According to the bacterial exposure results, 100% of the fish in the control group died during 5 days. In all vaccinated groups, the mortality rate was significantly lower than the control group, while the lowest mortality rate was recorded for fish in the hyperosmotic environment + twice vaccine. In this study, vaccination significantly reduced fish mortality after exposure to *Yersinia rockeri* bacterium, and based on this study, the use of hyperosmotic environments with vaccination is recommended to increase vaccine efficacy.

Cite this article: Reza Gholitebar, Zeinab, Mazandarani, Mohammad, Hoseinifar, Seyed Hosein, Soudagar, Mohammad, Safari, Roghieh. 2022. Evaluation of *Yersinia ruckeri* vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (2), 37-48.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20190.1652
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

ارزیابی عملکرد واکسن آنتی‌پرسینیا "*Yersinia ruckeri*" در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

زینب رضا قلی‌تبار[۱]، محمد مازندرانی*[۲]، سید حسین حسینی‌فر*[۳]، ، محمد سوداگر[۴]، رقیه صفری[۵]

۱. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: z_rgt@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: mazandarani57@gmail.com
۳.نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: hossein.hoseinifar@gmail.com
۴. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: sudagar_m@yahoo.com
۵. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۷
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳

واژه‌های کلیدی:
تیتر آنتی‌بادی،
قزل‌آلای رنگین‌کمان،
مواجهه باکتریایی،
واکسیناسیون،
پرسینیوزیس

چکیده

پرسینیوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی است که خسارات اقتصادی فراوانی به مزارع ماهیان سردابی کشور وارد می‌سازد به همین دلیل استفاده از روش‌های واکسیناسیون کارآمد یکی از بهترین راه‌های کنترل این بیماری می‌باشد. در این بررسی کارآیی روش‌های مختلف واکسیناسیون به‌روش حمام در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزیابی قرار گرفته است. به این منظور تعداد۳۰۰ عدد ماهی با میانگین وزنی ۰/۳۵± ۳ گرم پس از سازگاری در ۱۲ مخزن تقسیم شدند. در این بررسی ۶ گروه آزمایشی شامل یک گروه کنترل مثبت، گروه کنترل منفی، گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای به روش حمام، گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای به روش حمام، گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسن یک مرحله‌ای به روش حمام و گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسن دو مرحله‌ای به‌روش حمام درنظر گرفته خواهد شد. ماهیان گروه‌های مختلف پس از واکسیناسیون به روش‌های مختلف با $۴/۳ \times ۱۰^{۷}$ باکتری به‌صورت داخل صفاقی مواجهه داده شدند و روند زنده‌مانی ماهیان مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج در ماهیان گروه واکسینه شده به‌طور معنی‌داری تعداد گلبول‌های سفید بالاتر از گروه شاهد ثبت گردید. تیتر آنتی‌بادی ضد باکتری پرسینیا راکری به روش میکروآگلوتیناسیون نیز در ماهیان گروه واکسینه شده بالاتر از گروه کنترل بود در عین‌حال در ماهیانی که دوبار واکسینه شده بودند این تیتر به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها ثبت گردید. براساس نتایج بررسی مواجهه با باکتری، ۱۰۰ درصد ماهیان گروه شاهد تلف شدند. در تمامی گروه‌های واکسینه شده روند تلفات به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود در عین‌حال کم‌ترین میزان تلفات مربوط به ماهیان گروه محیط هایپراسمزتیک

+ واکسن دو مرحله‌ای ثبت گردید. در این پژوهش واکسیناسیون به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تلفات ماهیان پس از مواجهه با باکتری یرسینیا راکری گردید و بر اساس این بررسی به‌کارگیری محیط هایپراسموتیک به همراه واکسیناسیون برای افزایش کارآیی واکسن پیشنهاد می‌گردد.

استناد: رضا قلی‌تبار، زینب، مازندرانی، محمد، حسینی‌فر، سید حسین، سوداگر، محمد، صفری، رقیه (۱۴۰۱). ارزیابی عملکرد واکسن آنتی‌یرسینیا "*Yersinia ruckeri*" در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۲)، ۴۸-۳۷.

DOI: 10.22069/japu.2022.20190.1652

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های باکتریایی بسیار شایع در آبزیان است که همه ساله خسارات اقتصادی فراوانی به این صنعت در دنیا وارد می‌سازد، عامل این بیماری باکتری *Yersinia ruckeri* بوده و معمولاً به‌صورت عمومی و سیستمیک ماهیان را درگیر کرده و علایم بسیار گسترده‌ای می‌تواند ایجاد کند (۱). اولین بار این بیماری توسط راکر در سال ۱۹۶۶ با علایم خونریزی گسترده در اندام مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و تلفات بالا در آمریکا گزارش گردید (۲). پس از آن نیز یرسینیوزیس از گونه‌های مختلف ماهیان با علایم بسیار گسترده در نقاط مختلف دنیا گزارش گردید (۳). علی‌رغم بیماری‌زایی در گونه‌های مختلف ماهیان، به گمان برخی پژوهش‌گران قزل‌آلای رنگین‌کمان از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به سایر گونه‌های ماهیان در مواجهه با این بیماری برخوردار است (۴). معمولاً این بیماری با خونریزی گسترده در اندام داخلی، به‌خصوص قسمت‌های انتهایی روده‌ها و تجمع مایعات در محوطه شکمی همراه است، در عین خونریزی در چشم و محوطه دهانی و فکین ماهی نیز از علایم تیپیک این بیماری می‌باشد به همین دلیل به بیماری دهان قرمز ماهی (Enteric red mouth disease) نیز معروف است، تمام یا برخی از علایم یاد شده ممکن است در یک بیماری مشاهده شود اما در عین‌حال برخی ماهیان از جمله ماهیان بهبود یافته از بیماری قادرند بدون بروز علایم تا مدت‌ها باکتری عامل بیماری را در محیط پخش کنند (۱). این بیماری در کشور برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ از مزارع ماهیان سردابی در جنوب‌غربی کشور گزارش گردید (۵). طولی نکشید که عفونت باکتریایی مذکور از نقاط مختلف کشور گزارش گردید به گونه‌ای که امروزه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتری مزارع ماهیان سردابی کشور محسوب شده و سالیانه خسارات اقتصادی بسیار بالایی به این صنعت در کشور وارد می‌سازد (۶، ۷).

در هنگام بروز بیماری معمولاً به‌دلیل عدم تغذیه ماهیان و شرایط سخت درمان استخرها معمولاً هزینه بالایی به مزارع وارد می‌شود به همین دلیل در مدیریت بهداشتی مزارع همواره پیشگیری کم‌هزینه‌ترین و کارآمدترین راه کنترل بیماری‌ها محسوب می‌شود که یکی از بهترین روش‌ها در این راستا واکسیناسیون ماهیان بر علیه بیماری‌های شایع در منطقه است. واکسیناسیون یکی از اقتصادی‌ترین راه‌های کنترل بیماری در ماهیان است درمان آبزیان در بسیاری از موارد خسارات متعددی به محیط زیست و سلامت مصرف‌کنندگان وارد می‌سازد (۳). واکسن‌های غیرفعال شده عمدتاً براساس پاتوژن کشته شده و یا استخراج قسمت‌هایی از عامل پاتوژن که سیستم ایمنی ماهیان را فعال نماید پایه‌گذاری شده است در بسیاری از موارد واکسن‌های تزریقی کارآیی بیش‌تری دارند اما بنا به سختی کار و مشکلات استفاده از این روش، واکسن‌های مورد استفاده به روش حمام اقبال بیش‌تری دارند (۳). در این راستا اطمینان از وضعیت عملکرد و کارآیی واکسن مورد استفاده بسیار دارای اهمیت و مفید خواهد بود. در به‌کارگیری واکسن‌هایی که به‌صورت حمام مورد استفاده قرار می‌گیرند زمان حمام‌دهی و دوز واکسن بسیار مهم است به گونه‌ای که هر کدام از موارد یاد شده رعایت نشوند کارآیی واکسن دچار اختلال می‌شود (۸). برای افزایش دریافت واکسن به‌صورت حمام، روش‌ها مختلفی به‌کار گرفته شده است از جمله استفاده از محیط هایپراسموتیک و سپس انجام واکسناسیون (۹) و یا استفاده از ادجوانت‌های مختلف که جذب واکسن را افزایش دهند (۱۰).

در نهایت پس از به‌کارگیری روش‌های مختلف برای افزایش کارآیی واکسن، لازم است ارزیابی درستی از واکسن‌های به‌کار گرفته شده صورت پذیرد. دقیق‌ترین روش در این راستا مواجهه مستقیم پس از واکسیناسیون با پاتوژن مورد نظر است. در این بررسی وضعیت کارآیی واکسن آنتی‌یرسین (شرکت بوژان تک فارمد) پس از یک دوره و دو دوره واکسیناسیون و تأثیر به‌کارگیری محیط هایپراسموتیک بر آن مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه ماهی و شرایط پرورش: برای انجام آزمایش تعداد ۳۰۰ عدد بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۳۵±۳ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش استان تهیه گردید. ماهیان در پلاستیک حمل بچه‌ماهی به همراه اکسیژن به سالن ونیرو دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت در مخزن ۱۰۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شده و پس از ۲۴ ساعت در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری (حاوی ۸۰ لیتر آب) تقسیم شدند (۲۵ ماهی در هر تکرار). ماهیان قبل از تقسیم به‌مدت ۱۵ دقیقه در فرمالین ۴۰۰۰/۱ ضدعفونی گردیدند. ماهیان در طی این دوره ۵ درصد وزن بدن ۴ بار در روز مورد تغذیه قرار گرفتند. غذای مورد استفاده در این دوره مربوط به شرکت بود. در طی دوره آزمایش دمای آب ۱/۲۲± ۱۴ درجه سانتی‌گراد، سختی آب برابر با ۲ ± ۱۸۸/۳ میلی‌گرم/لیتر، pH برابر ۰/۲±۷/۷ اندازه‌گیری گردید. در طی این دوره تعویض آب به‌صورت روزانه و به‌میزان حدود ۸۰ درصد حجم آب ونیرو صورت گرفت.

تیماربندی و طرح آزمایش: در این بررسی ۶ گروه آزمایشی شامل یک گروه کنترل مثبت، گروه کنترل منفی، گروه ماهیان واکسینه یک‌مرحله‌ای به روش حمام، گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای به روش حمام، گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه یک‌مرحله‌ای به روش حمام و گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه دو مرحله‌ای به روش حمام در نظر گرفته خواهد شد. واکسن مورد استفاده در آزمایش با عنوان واکسن آنتی‌یرسین از "شرکت دانش بنیان بوژان تک فارمد" تهیه گردید. این واکسن به‌صورت سوسپانسیون باکتری غیرفعال بوده و به‌صورت حمام مورد استفاده قرار گرفت. در این راستا براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده، واکسن به‌میزان ۰/۱ با آب پرورش رقیق شده (یک لیتر واکسن در ۹ لیتر آب) و مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور پس از آماده‌سازی، واکسیناسیون به همراه هواده برای تیمارهای مختلف به‌مدت ۳ دقیقه صورت پذیرفت. در گروه‌های حاوی محیط هایپراسمتیک و واکسن در ابتدا ماهیان هر تیمار به‌مدت ۱۳ دقیقه در محیط آب نمک ۱۳ گرم/لیتر قرار داده شده و بلافاصله بعد از آن به‌مدت ۳ دقیقه به ظرف حاوی واکسن منتقل شدند. به‌منظور آماده‌سازی محیط هایپراسمتیک از نمک دریایی استفاده گردید. براساس طرح اولیه ۱۰ روز پس از سازگاری ماهیان گروه‌های تیمار مورد آزمایش با کیفیت یادشده واکسینه شدند. این واکسیناسیون در ماهیان دومرحله‌ای واکسن ۲۱ روز بعد مجدداً تکرار گردید. سه هفته پس از واکسیناسیون مرحله دوم از ماهیان خونگیری شد در عین‌حال تعداد ۱۲ تا ۱۴ عدد ماهی از هر تیمار مورد مواجهه با باکتری یرسینیا راکری عفونی قرار گرفتند تا وضعیت مقاومت و زنده‌مانی ماهیان مورد ارزیابی قرار گرفت.

تیتر آنتی‌بادی در برابر باکتری یرسینیا راکری به روش میکرواگلوتیناسیون: خونگیری از ماهیان ۲۱ روز پس از دومین واکسیناسون صورت گرفت به این

منظور ماهیان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر محلول یوجینول بی‌هوش شده و خونگیری با سرسوزن گیج ۲۵ از ساقه دمی صورت گرفت. تیتر آنتی‌بادی براساس روش توضیح داده شده توسط ساوین و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد (۱۱). بدین‌ترتیب که ابتدا به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم به تمام گوده‌های پلیت میکرو آگلوتیناسیون اضافه شد. سپس به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از سرم به اولین گوده اضافه شده و رقت‌هایی بر مبنای دو از گوده اول تا آخرین گوده هر سری ساخته شد. رقت سوسپانسیون باکتریایی در این آزمایش $۱/۵\times۱۰^{۹}$ CFU/ml بوده و پس از اضافه شدن این سوسپانسیون پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اطاق انکوبه شدند. عدد نهایی به‌صورت لگاریتم در مبنای ۲ عکس بالاترین رقتی که آگلوتیناسیون داده بود بیان گردید (۱۱).

نحوه آماده‌سازی و مواجهه باکتریایی: برای ارزیابی مقاومت گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده و غیرواکسینه از سویه باکتری *Yersinia ruckeri* با کد PTCC 1888 (Mazandarani) سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده گردید.

باکتری مذکور در محیط کشت نوترینت براس به‌مدت ۴۸ ساعت غنی‌سازی گردیده و سپس به‌صورت سطحی بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) تلقیح گردید. ۴۸ ساعت پس از کشت، باکتری‌ها از سطح محیط کشت جمع‌آوری شده از آن سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید. بار باکتریایی سوسپاسپانسیون به‌روش کدورت‌سنجی و براساس جدول استاندارد مک‌فارلند و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۴۰ نانومتر و OD برابر با یک تنظیم گردید. در عین حال پس از تهیه رقت‌های سریالی جهت تعیین بار باکتری‌های زنده در هر سی‌سی از سوسپانسیون به روش کشت سطحی بر مبنای تشکیل CFU به‌طور دقیق محاسبه گردید که بر این اساس رقت سلول‌های زنده به‌میزان $۱۰^{۸}\times ۴/۳$ سلول باکتری در هر سی‌سی از سوسپانسیون ثبت شد. در این راستا تعداد ۱۲ تا ۱۴ ماهی از هر تیمار در آکواریوم‌های شیشه‌ای با ابعاد ۴۰ ×۳۰ سانتی‌متری با ارتفاع آب‌گیری ۳۰ سانتی‌متر تقسیم شدند هر کدام از ماهیان ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون مذکور را معادل $۱۰^{۷}\times ۴/۳$ دریافت نمودند. به‌منظور بررسی تأثیر تزریق، به ۱۲ عدد از ماهیان به‌صورت داخل صفاقی ۰/۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی تزریق گردید. ماهیان به‌مدت ۱۴ روز پس از مواجهه مورد بررسی و مانیتورینگ روزانه قرار گرفتند و علایم کلینیکی و تلفات به‌صورت روزانه ثبت گردید. به‌منظور تأیید علت مرگ ماهیان از کلیه ماهیان در حال مرگ و یا تازه تلف شده کشت باکتریایی در محیط نوترینت آگار صورت گرفته و باکتری *یرسینیا راکری* به‌عنوان عامل بیماری جداسازی و تأیید گردید.

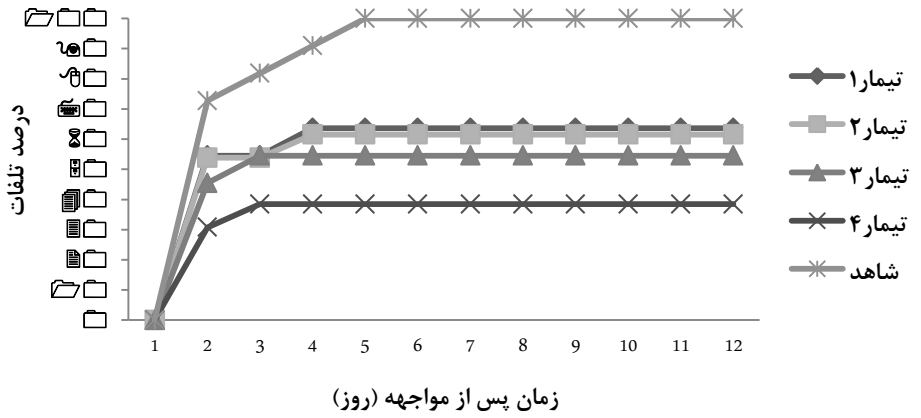
اندازه‌گیری شاخص‌های خون‌شناسی: برای اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید (WBC) از محلول رقیق‌سازی و لام هموسیتومتر استفاده شد، در این روش نمونه‌های خونی توسط محلول دایس ۱۰۰ برابر رقیق شده و براساس رو استاندارد شمارش گلبول‌های سفید و قرمز خون توسط لام نئوبار صورت پذیرفت (۱۲).

بررسی‌های آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای SPSS18 و Excel 2010 استفاده شد. در این راستا برای تعیین سطوح معنی‌داری از آزمون آماری Duncan با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One – Way ANOVA) استفاده گردید.

نتایج

وضعیت تلفات در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام در شکل ۱ قابل مشاهده

است. تمامی ماهیان پس از مواجهه به روش تزریق داخل صفاقی از غذاگیری اجتناب کردند و تلفات ماهیان ۴۸ ساعت پس از مواجهه آغاز گردید براساس نتایج این بررسی ۷۲ درصد ماهیان گروه شاهد ۴۸ ساعت پس از مواجهه تلف شدند و پس از ۵ روز این تلفات به ۱۰۰ درصد رسید. برای گروه ماهیان تیمار ۱ (واکسینه یک مرحله‌ای) این تلفات پس از ۴۸ ساعت ۵۴/۵ درصد ثبت شد این روند در روز ۴ به ۶۳/۶ درصد رسید و تا روز ۱۲ تغییری نداشت. در ماهیان تیمار ۲ (دو مرحله واکسیناسیون) ۴۸ ساعت پس از مواجهه ۵۳/۸ درصد تلف شدند این روند در روز ۴ به ۶۱/۵ درصد رسید و تا پایان دوره تلفاتی ثبت نگردید. تلفات در ماهیان تیمار ۳ (محیط هایپراسموتیک + یک مرحله واکسیناسیون) ۴۸ ساعت پس از مواجهه ۴۵/۴ درصد ثبت گردید این روند در روز ۳ به ۵۴/۵ درصد رسید و تا پایان دوره این روند ثابت ماند. در ماهیان تیمار ۴ (محیط هایپراسموتیک + دو مرحله واکسیناسیون) ۳۸/۴۶ درصد از ماهیان ۴۸ ساعت پس از مواجهه تلف شدند در روز ۳ این روند به ۳۸/۴ رسید و تا پایان دوره تغییری نداشت (شکل ۱). ماهیانی که تلف نشدند از روز پنجم و ششم پس از مواجهه به غذا تمایل نشان دادند و تقریباً از روز ۷ اشتهای ماهیان برای غذاگیری به حد نرمال رسید و پس از آن هیچ تلفاتی تا پایان دوره مانیتورینگ ثبت نگردید (شکل ۱). در این مواجهه ماهیانی که تلف شدند علایم مختلفی از خود نشان دادند که در جدول ۱ آورده شده است عمده‌ترین علایم ثبت شده در این بررسی خونریزی در قسمت انتهایی روده‌ها، خونریزی در اندام محوطه شکمی، خونریزی‌های سرسوزنی در پوست و چشم‌ها بود (جدول ۱).



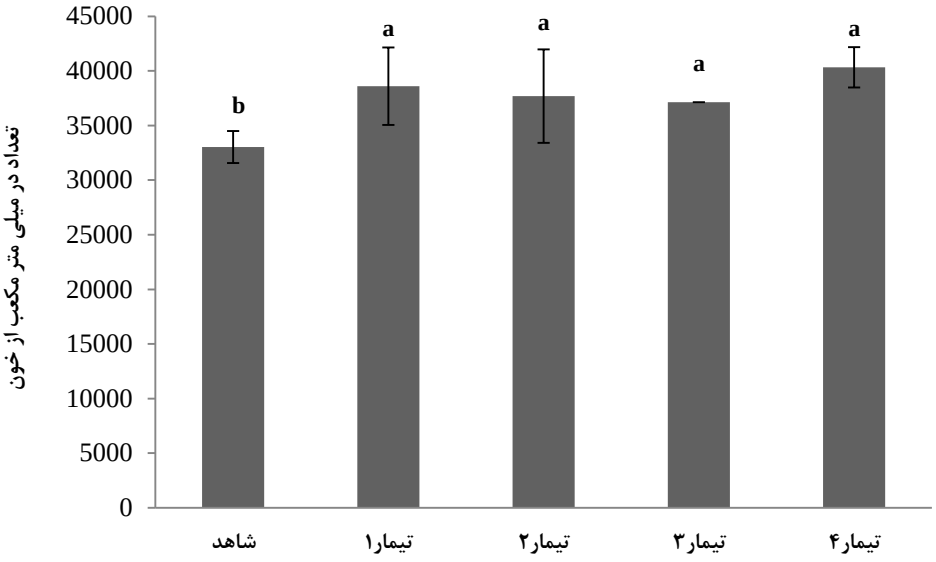
شکل ۱- نمودار روند تلفات ماهیان در مواجهه با *Yersinia ruckeri* به روش تزریق داخل صفاقی.
گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار ۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار ۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای، تیمار ۳: گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه یک مرحله‌ای و تیمار ۴: گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه دو مرحله‌ای

جدول ۱- علائم بالینی ثبت شده در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مواجهه شده با $۴/۳ \times ۱۰^{۷}$ باکتری *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*) در مواجهه به روش تزریق داخل صفاقی

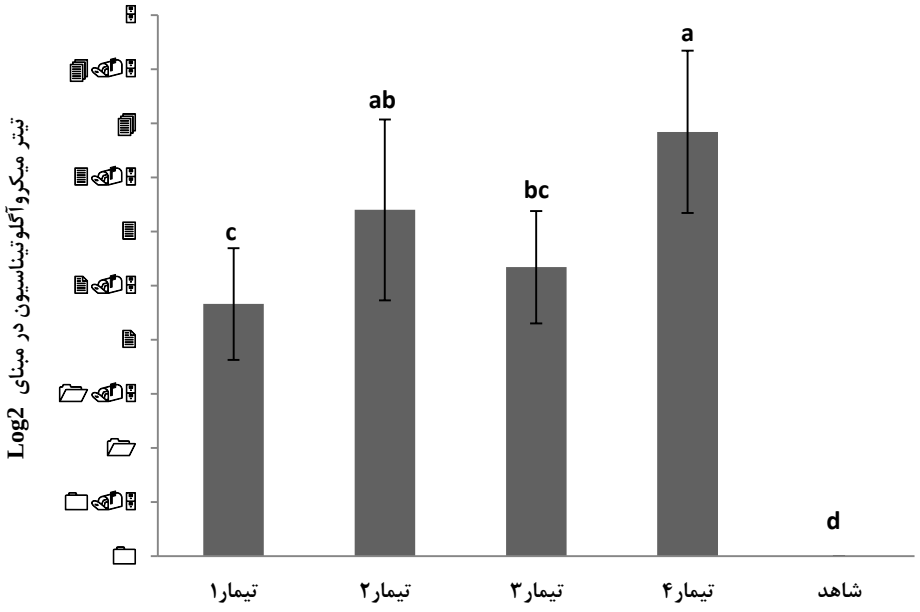
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
خونریزی در اطراف مخرج	√	√	√	√	√
خونریزی در قاعده باله‌ها	–	–	–	–	–
خونریزی قسمت‌های انتهایی روده	√	√	√	√	√
خونریزی در قسمت پایینی چشم	√	√	√	√	√
خونریزی گسترده در سطح پوست	–	–	–	–	–
خونریزی در اندام داخلی محوطه شکمی	√	√	√	√	√
خونریزی پتشیا (سرسوزنی) در سطح پوست	√	√	√	√	√
خونریزی در اطراف دهان و فکین	–	–	–	–	–

گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار ۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار ۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای، تیمار ۳: گروه محیط هایپراسمزتیک+ واکسینه یک مرحله‌ای و تیمار ۴: گروه محیط هایپراسمزتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای

براساس نتایج تعداد گلبول‌های سفید در تمام ماهیان واکسینه شده به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت ($P\leq ۰/۰۵$) در عین‌حال تعداد گلبول‌های سفید در ماهیان واکسینه شده گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (شکل ۲). در همین راستا تیتر آنتی‌بادی ماهیان گروه‌های مختلف براساس میکروآگلوتیناسیون در شکل ۳ آورده شده است در این بررسی هیچ تیتری برای ماهیان گروه شاهد مشاهده نگردید. ماهیان گروه‌هایی که دوبار واکسینه شدند به‌طور معنی‌داری در مقایسه با ماهیان گروهی که یک بار واکسینه شدند به‌طور معنی‌داری بالاتر ثبت گردید ($P\leq ۰/۰۵$)، در ماهیانی که از هحیط هایپراسموتیک و یک مرحله واکسیناسیون استفاده شده بود علی‌رغم اختلاف ظاهری در تیر آنتی‌بادی، اختلاف معنی‌داری در مقایسه با ماهیانی که دو بار واکسینه شده بودند محاسبه نشد (شکل ۳).



شکل ۲- نمودار تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه به روش حمام.
گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار ۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار ۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای، تیمار ۳: گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه یک مرحله‌ای و تیمار ۴: گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه دو مرحله‌ای



شکل ۳- نمودار تیتر آنتی‌بادی در برابر باکتری *یرسینیا راکری* به روش میکرواگلوتیناسیون در ماهیان واکسینه به روش حمام.
گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار ۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار ۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای، تیمار ۳: گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه یک مرحله‌ای و تیمار ۴: گروه محیط هایپراسمزتیک + واکسینه دو مرحله‌ای

بحث

در سال‌های اخیر صنعت پرورش قزل‌آلای

رنگین‌کمان در کشور به سرعت توسعه یافته است و بیماری ناشی از *یرسینیا راکری* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی است که همه ساله خسارات اقتصادی فراوانی به این صنعت وارد ساخته است (۷) با توجه به شیوع بالای این بیماری در کشور همواره احتمال آلودگی مزارع وجود دارد بنابراین یکی از بهترین راه‌ها در مدیریت بهداشتی در این زمینه استفاده از واکسیناسیون برای جلوگیری و یا حداقل کاهش شیوع بیماری در مزارع است. به عبارت دیگر واکسیناسیون قادر خواهد بود تا هزینه‌های بالای درمان و نیز خسارات ناشی از تلفات را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد، روش‌های متعددی برای واکسیناسیون ماهیان پیشنهاد شده است. واکسن‌های غیرفعال شده عمدتاً براساس پاتوژن کشته شده و یا استخراج قسمت‌هایی از عامل پاتوژن که سیستم ایمنی ماهیان را فعال نماید پایه‌گذاری شده است در بسیاری از موارد واکسن‌های تزریقی کارآیی بیش‌تری دارند اما مشکلاتی هم‌چون سختی کار، نیاز استفاده از نیروی متخصص و استرس ناشی از تزریق سبب شده تا واکسیناسیون به‌روش حمام بیش‌ترین اقبال را در میان پرورش‌دهندگان داشته باشد (۳). در هنگام انتخاب نوع و روش به‌کارگیری واکسن اطمینان از کارآیی و عملکرد آن بسیار دارای اهمیت است بهترین روش بررسی عملکرد واکسن مواجهه با عامل بیماری‌زا است در بررسی حاضر ۱۰۰ درصد ماهیان واکسینه نشده پس از ۵ روز تلف شدند و این در حالی است که نرخ زنده‌مانی ماهیان واکسینه شده بین ۳۶/۴ تا ۶۱/۵ درصد زنده‌مانی در گروه‌های مختلف داشتند، بنابراین براساس نتایج می‌توان با اطمینان عنوان نمود واکسن حاضر با روش به‌کار گرفته شده از کارآیی قابل‌قبولی برخوردار است. سلطانی و همکاران (۲۰۱۴) در ارزیابی واکسن یرسینیا راکری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان زنده‌مانی را ۱۰ هفته پس از مواجهه برای ماهیان غیر واکسینه کم‌تر از ۱۰ درصد و برای ماهیان واکسینه کم‌تر از ۶۰ درصد گزارش کردند (۷). در گزارش علیشاهی و همکاران (۲۰۱۹) در واکسیناسیون به‌روش تزریقی برای باکتری عفونی *Aeromonas hydrophila* میزان تلفات پس از مواجهه در گروه شاهد حدود ۷۰ درصد و در گروه‌های مختلف واکسینه شده بین ۶۰/۳ تا ۸۳/۳ درصد گزارش گردید (۱۳). چو در سال ۲۰۰۶ میزان زنده‌مانی در ماهیان قرمز (*Carassrus auratus gibelio*) واکسینه شده با باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا را پس از مواجهه با باکتری عفونی بین ۳۲/۲ تا ۵۰/۱ درصد گزارش کرد (۱۴). شایان ذکر است در گزارش‌های مذکور در تمامی موارد میزان تلفات در گروه شاهد ۱۰۰ درصد نبوده است بنابراین در مقایسه تلفات ۱۰۰ درصدی گروه شاهد می‌توان گفت حدت و شدت بیماری در بررسی حاضر بسیار بالا بوده است با این حال گروه‌های واکسینه شده زنده‌مانی قابل‌قبولی داشته‌اند که نشان‌دهنده عملکرد نسبتاً خوب واکسیناسیون است. در عین‌حال در این بررسی اختلاف معنی‌داری در میزان تلفات ماهیانی که به روش محیط هایپراسموتیک + واکسن دو مرحله‌ای واکسینه شدند نسبت به سایر گروه‌های واکسینه شده وجود داشت که این امر نشان‌دهنده تأثیر مثبت محیط هایپراسموتیک بر کارآیی واکسن حاضر بوده است به احتمال زیاد محیط هایپراسموتیک باعث جذب بیش‌تر آنتی‌ژن باکتریایی واکسن گردیده است و در نتیجه سیستم ایمنی ماهیان بر علیه باکتری *یرسینیا راکری* عملکرد بالاتری داشته است بررسی تیتر

آنتی‌بادی سرمی نیز کم و بیش دلیلی بر این ادعا می‌باشد. به‌کارگیری روش‌های مختلف برای افزایش عملکرد واکسیناسیون همواره مدنظر پژوهش‌گران مختلف بوده است به عبارت دیگر کارآیی واکسیناسیون تحت‌تأثیر عوامل مختلف می‌تواند متفاوت باشد که از آن جمله می‌توان به دوز واکسن، زمان واکسیناسیون، دمای محیط واکسیناسیون، میزان فشار اسمزی محیط، نوع ادجوانت به‌کار گرفته شده به همراه واکسن و سایز ماهی اشاره نمود (۳). در بررسی دو و همکاران (۲۰۱۷) مدت زمان واکسیناسیون و دوز واکسن بر علیه باکتری *Edwardseilla tarda* به‌طور معنی‌داری بر عملکرد واکسن تأثیر داشته است (۸). به‌کارگیری عصاره گیاه *Aloe vera* به‌عنوان عنوان ادجوانت منجر به افزایش معنی‌دار کارآیی واکسن آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گردید (۱۵)، در بررسی دیگری به‌کار گیری ادجوانت‌های propolis و Freund کارایی واکسن آئروموناس هیدروفیلا را در کپور معمولی به‌طور معنی‌داری افزایش داد (۱۳).

یکی دیگر از روش‌های مؤثر بر کارآیی واکسیناسیون به‌کارگیری محیط هایپراسموتیک است، درحقیقت این روش جذب آنتی‌ژن موجود در واکسن را افزایش می‌دهد و در نتیجه سیستم ایمنی ماهی بیش‌تر تحریک شده و عملکرد بهتری در مواجهه با عامل بیماری‌زا خواهد داشت (۱۶). در مطالعه به‌کارگیری محیط هایپراسموتیک در ماهی فلاندر (*Paralichthys olivaceus*) منجر به افزایش معنی‌دار کارآیی واکسن *Edwardseilla tarda* گردید (۹). در بررسی حاضر نیز به‌کارگیری محیط هایپراسموتیک باعث کاهش معنی‌دار تلفات در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با *یرسینیا راکری* شده است بنابراین با توجه به گزارش شیوع یرسینیوزیس از مناطق مختلف کشور، واکسیناسیون بر علیه این بیماری ضروری به‌نظر می‌رسد و در راستای افزایش کارآیی واکسن استفاده از محیط هایپر اسموتیک به همراه واکسیناسیون پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس پژوهش حاضر می‌توان بیان نمود واکسیناسیون به روش حمام قادر به کاهش تلفات ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با یرسینیوزیس است و هم‌چنین به‌کارگیری محبط هایپراسموتیک پیش از واکسیناسیون کارآیی واکسناسیون را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی شرکت دانش بنیان بوژان تک فارمد تولیدکننده واکسن‌های ماهی در کشور به انجام رسید.

منابع

1.Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Ryckaert, J., Duchateau, L., and Haesebrouck, F. 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms. 84: 219-228.

2.Rucker, R. 1966. Red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin - Office International des Epizooties. 65: 5. 825-830.

3.Bøgwald, J., and Dalmo, R.A. 2019. Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. Microorganisms. 7: 12. 627. doi:10.3390/ microorganisms 7120627.

4.Furones, M.D., Rodgers, C.J., and Munn, C.B. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric red mouth disease (ERM) in fish. Annual Review of Fish Diseases. 3: 105-125.

5.Soltani, M., Shafiei, S., Mirzargar, S.S., Musavi, H.A.E., and Ghodratnama, M. 1993. Study of efficacy of vaccination against yersinosis in rainbow trout using local strains of *Yersinia ruckeri*. Journal of Veterinary Research 69: 1. 57-63. (In Persian) Doi.10.22059/JVR.2014.36713.

6.Fadaeifard, F., and Simin, S. 2014. Detection of virulence genes (*yrp1* and yrpE) in the *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction test in Chaharmahal-Va Bakhtiary province, Iran. Biological Journal of Microorganism. 9: 1. 65-73. (In Persian)

7.Soltani, M., Shafiei, Sh., Yosefi, P., Mosavi, Sh., and Mokhtari, A. 2014. Effect of Montanide IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology, 37: 60-65. https://doi.org/10.1016/ j.fsi. 2013.12.027.

8.Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., and Zhan, W. 2017. The influence of concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin and immersion time on antigen uptake and expression of immune-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Microbial Pathogenesis. 103: 19-28.

9.Gao, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., and Zhan, W. 2016. Antigen uptake and expression of antigen presentation-related immune genes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination with an inactivated *Edwardsiella tarda* immersion vaccine, following hyperosmotic treatment. Fish Shellfish Immunology. 55: 274-280. doi: 10.1016/j.fsi. 2016. 05.042.Epub 2016 Jun 1.

10.Ji, J., Torrealba, D., Thwaite, R., Gomez, A.C., Parra, D., and Roher, N. 2019. Nanostructured TNF alpha protein targets the zebrafish (*Danio rerio*) immune system through mucosal surfaces and improves the survival after *Mycobacterium marinum* lethal infection. Aquaculture. 510: 138-149.

11.Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K., Meher, N., and Sarangi, A. 2006. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology, 22: 38-43.

12.Dacie, J.V., and Lewis, S.M. 2001. Practical Haematology. 9th, ed. Churchill Livingstone, London. 633p.

13.Alishahi, M., Tollabi, M., and Ghorbanpoor, M. 2019. Comparison of the adjuvant effect of propolis and Freund on the efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccine in common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 18: 3. 428-444. DOI: 10.22092/ijfs.2019.118393.

14.Chu, W.H. 2006. Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in *Carassrus auratus gibelio*. Fish and Shellfish Immunology. 21: 113-7.

15.Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M., and Razi Jalali, M. 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). International Journal of Veterinary Research. 4: 3. 189-195.

16.Huising, M.O., Guichelaar, T., Hoek, C., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Flik, G., Savelkoul, H.F.J., and Rombout, J.H.W.M. 2003. Increased e_cacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. Vaccine. 21: 4178-4193.