# بررسی ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی لیپوپلی‌ساکارید یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) در برابر یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*)


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


تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۸

## چکیده

**با توجه به اهمیت یرسینیوزیس در کشور و ضرورت واکسیناسیون ماهی در این تحقیق اثر لیپوپلی ساکارید باکتری یرسینیا راکری بر کارایی و ایمنی‌زایی باکترین یرسینیا راکری در تجویز تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری ارزیابی گردید. ٤٨٠ قطعه ماهی (۱/۲±۷ گرم) به‌صورت تصادفی به ۸ گروه مساوی، هر گروه در سه تکرار (هر تکرار ۲۰ ماهی) تقسیم گردیدند. گروه A، B و C به‌ترتیب با خوراک حاوی LPS (۳۰۰ میکروگرم/کیلوگرم/وزن بدن)، LPS+باکترین (۱۰۹ cfu/گرم) و باکترین در هفته اول و سوم تحقیق تغذیه شدند. در گروه غوطه‌وری (D) ماهی‌ها به‌مدت ۲ دقیقه در روز صفر و ١٤ در سوسپانسیون باکترین (۱۰۹ cfu/میلی‌لیتر) غوطه‌ور شدند. گروه‌های تزریقی (F،E و G) به‌ترتیب با باکترین (۱۰۱۰cfu/میلی‌لیتر)، LPS (۳۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) و باکترین+LPS به‌روش داخل صفاقی ایمن شدند و در روزهای صفر، ۳۰، ٦٠ نمونه خون و سرم تهیه‌شده و شاخص‌های خونی و ایمنی بین ماهیان تیمارها مقایسه گردیدند. نتایج نشان داد که تزریق باکترین+ LPS تحریک شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی را به‌طور معنی‌داری در اکثر گروه‌ها بهبود بخشید (P<۰/۰۵). میزان کارایی تجویز باکترین+LPS درروش خوراکی با روش غوطه‌وری مشابه بوده و به‌طور معنی‌داری کم‌تر از روش تزریقی بود (P<۰/۰۵). نتایج تحقیق جاری نشان داد که اضافه نمودن LPS به باکترین علاوه بر بهبود کارایی واکسن به‌روش تزریقی و خوراکی، ایمنی‌زایی آن‌ها را هم افزایش داد. لذا می‌توان بعد از مطالعات تکمیلی از آن به‌عنوان یک کاندید مناسب و اقتصادی در تهیه واکسن یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلا استفاده کرد.**

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



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: alishahimoj@gmail.com

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247



## مقدمه

یرسینیوزیس در ماهیان توسط باکتری *یرسینیا راکری* از خانواده *انتروباکتریاسه* ایجاد می‌شود. واژه «یرسینیوزیس» مترادف با بیماری دهان قرمز روده‌ای (ERM) بوده که در اثر عفونت با باکتری *یرسینیا راکری* ایجاد می‌گردد. ERM اولین‌بار در اواخر دهه ۱۹۵۰ وقتی‌که ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در دره هاگرمن ایداهوی آمریکا مبتلا شده بودند، توصیف گردید (Rucker، ۱۹۶۶). یرسینیوزیس در تمام کشورها منجر به خسارات اقتصادی قابل‌توجهی در صنعت پرورش آزادماهیان می‌گردد. علی‌رغم این موضوع فقدان اطلاعات مناسب در مورد یرسینیوزیس مشهود است و بیماری‌زایی آن به‌خوبی درک نشده است (Tobback و همکاران، ۲۰۰۹). این باکتری می‌تواند در ماهیان عفونت تحت درمانگاهی (حاملان بدون علامت) ایجاد نموده، در صورت بروز هرگونه استرس، منجر به ایجاد عفونت درمانگاهی در یک جمعیت شود (Ghosh و همکاران، ۲۰۱۶). *یرسینیا راکری* یک پاتوژن درون سلولی اختیاری است و می‌تواند درون ماکروفاژها زنده بماند (Ryckaert و همکاران، ۲۰۱۰). در ماهیان جوان سیستم کمپلمان، لایزوزیم، پپتیدهای ضدمیکروبی، MHC I، CD-8 به‌همراه سیستم ایمنی هومورال وابسته و غیر وابسته به آنتی‌ژن‌های T نقش مهمی در حفاظت ماهیان علیه پاتوژن‌ها ایفا می‌کنند (Chettri و همکاران، ۲۰۱۲). غشای سلول باکتری‌های گرم منفی شامل دولایه داخلی و خارجی است. غشای خارجی شامل لیپوپلی ساکارید (LPS)، فسفو لیپیدها، پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپروتئین‌هاست. لیپوپلی ساکارید بخش عمده غشای خارجی را تشکیل می‌دهد که علاوه بر نقش ساختاری، غشای سلول را در برابر انواع خاصی از مواد شیمیایی محافظت می‌نماید (Altinok و همکاران، ۲۰۱۶). آنتی‌ژن O لیپوپلی ساکارید یک ترکیب ایمنی‌زای شناخته‌شده است و وقتی همراه دیگر اجزای سلولی استفاده می‌گردد، توانایی القای محافظت خوبی در برابر عفونت *یرسینیا راکری* خواهد داشت، حتی اگر آنتی‌ژن O استفاده‌شده از گونه‌های دیگر شامل پربیوتیک‌ها مثل *آئروموناس سوبریا* و *باسیلوس سوبتیلیس* باشد (Abbass و همکاران، ۲۰۱۰). اولین گزارش از واکسیناسیون موفق قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر یرسینیوزیس توسط Klontz (۱۹۶۳) با استفاده از باکترین تهیه شده از *یرسینیا راکری* و تجویز خوراکی آن بود. به‌دلیل اهمیت بیماری یرسینیوزیس در تفریخگاه (کارگاه تکثیر) آزادماهیان و مزایای واکسیناسیون به روش غوطه‌وری، به‌دلیل کاربرد آسان برای نوزادان و نیز ماهیان جوان، باعث شده است روش غوطه‌وری به‌عنوان روش انتخابی تجویز واکسن باقی بماند، هرچند روش تزریق داخل صفاقی مؤثرترین حفاظت را بر اساس درصد بقای نسبی و هم طول مدت محافظت، تأمین می‌نماید (Anderson و Nelson، ۱۹۷۴)، ولی برای ماهیان کوچک (ماهیان با وزن کم‌تر از ۲۰ گرم) کاربردی نیست و علاوه بر هزینه بالا، استرس زیادی به ماهی وارد می‌کند). در واکسیناسیون مخاطی (غوطه‌وری، خوراکی) آنتی‌ژن‌ها توسط سطوح مخاطی (آبشش، پوست، دستگاه گوارش) جذب می‌شوند و علاوه بر ایمنی مخاطی، پاسخ عمومی را به‌منظور حفاظت در برابر برخورد با عوامل بیماری‌زا تحریک می‌کنند. گزارشات مکتوب این بیماری در ایران محدود است، اولین گزارشات مربوط به به جداسازی تعدادی از جدایه های باکتری عامل بیماری از استان چهار محال بختیاری (Soltani و همکاران، ۱۹۹۹) و فارس (Akhlaghi و Sharifi، ۲۰۰۸) برمی‌گردد. سلطانی و همکاران(۱۳۹۳) با بررسی ۵ استان اصلی پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور علاوه بر گزارش بیماری یرسینیوزیس حاد، همه ایزوله‌های جداشده را از بیوتیپ ۱ دانستند. تجویز خوراکی آنتی‌ژن‌ها برای ایمن‌سازی ماهیان کوچک آسان‌تر و کاربردی‌تر است. هم‌چنین واکسیناسیون به این روش منجر به تحریک ایمنی مخاطی که به‌عنوان اولین خط دفاعی در برابر اکثر پاتوژن‌ها محسوب می‌شود، می‌گردد(Gomez و همکاران، ۲۰۱۳). واکسیناسیون خوراکی به‌طورکلی به‌دلیل سهولت تجویز، استرس‌زا نبودن، هزینه پایین و امکان تجویز در جمعیت‌های بالا و تمام‌سنین بهترین‌روش تجویز واکسن است(Plant و LaPatra، ۲۰۱۱). البته مهم‌ترین مشکل این روش میزان محافظت پایین در مقایسه با روش تزریقی است. با توجه به اهمیت یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلا در کشور و ضرورت واکسیناسیون ماهی در برابر این بیماری و با عنایت به‌مزایای واکسیناسیون خوراکی نسبت به سایر روش‌ها به‌ویژه در مراحل اولیه رشد ماهی، در این تحقیق با استفاده از آنتی‌ژن (لیپوپلی ساکارید) ایمنی‌زای *یرسینیا راکری* کارایی تجویز خوراکی این آنتی‌ژن در ایمن سازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

**ماهی و شرایط تحقیق:** تعداد ۴۸۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن حدود ۵ گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی در لرستان در دی‌ماه سال ۹۶ تهیه و با مراعات شرایط انتقال به دانشکده دامپزشکی، بخش بهداشت آبزیان منتقل شدند. بعد از بررسی اولیه از نظر ظاهری و بیماری‌های انگلی و باکتریایی، ماهی‌ها به‌مدت ۱۰ روز با خوراک پایه جهت سازش‌یابی با محیط و اطمینان از عدم بیماری در مخازن ۱۰۰۰ لیتری پرورش داده شدند و قبل از شروع تحقیق به‌منظور اطمینان از سلامت ماهیان از بافت‌های مختلف کشت باکتریایی تهیه شد (Kadowaki و همکاران، ۲۰۱۳).

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247



**شرایط آب تحقیق:** دمای آب ۱±۱۴ درجه سانتی‌گراد، pH بین ۷/۸ تا ۸/۵، سختی براساس 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.

***تهیه باکترین یرسینیا راکری:*** در این تحقیق از باکتری *یرسینیا راکری* (KCW 291153) جداسازی شده از ماهیان بیمار قزل‌آلای مزارع کشور ایران که با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی تأییدشده بود، استفاده شد. *یرسینیا راکری* با استفاده از فرمالین ۱ درصدو انکوبه کردن به‌مدت ۲ ساعت،غیرفعال و ۳ مرتبه با بافر فسفات استریل شسته شده و به‌منظور اطمینان از غیرفعال شدن، باکترین قبل از استفاده در محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. به‌منظور افزودن باکترین به غذا از روش(Villumsen وهمکاران، ۲۰۱۴) استفاده گردید.

**روش استخراج لیپوپلی‌ساکارید (LPS):** جداسازی لیپوپلی ساکارید براساس روش توصیه‌شده توسط Apicella (۲۰۰۸) به‌شرح زیر انجام گرفت:

ابتدا سلول‌های کشت داده‌شده در محیط کشت مغذی سانتریفیوژ شدند و رسوب ایجادشده، به لوله جدید انتقال داده شد. سپس بافر تریس- کلر ۱۰ میلی‌مول (pH: 8) شامل SDS (۲ درصد)، ۲-ME (۴ درصد)، Mgcl (۲ میلی‌مول) به لوله حاوی باکتری افزوده و در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا سلول‌های باکتریایی حل شدند. پروتئیناز K به ترکیبات فوق افزوده شد و ۱ ساعت در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. استات سدیم و اتانول سرد به ترکیبات فوق افزوده‌شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک‌شب نگه‌داری می‌شود. سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ می‌گردد. مایع رویی دور ریخته شده و آب مقطر استریل، سدیم استات و اتانول خالص و سرد به رسوب اضافه شده و به‌خوبی ورتکس می‌شود. سوسپانسیون یک‌شب در ۲۰- درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از آخرین سانتریفیوژ، به رسوب حاصل، تریس- کلر ۱۰ میلی‌مول (pH: ۷/۴)، DNase و RNase اضافه‌شده و محلول در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک‌شب انکوبه می‌گردد. ترکیب حاصل در حمام آب ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و برابر حجمش فنل ۶۵ درجه سانتی‌گراد ۹۰ درصد، اضافه می‌گردد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته، سپس به‌وسیلهٔ حمام یخ سریعاً تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرد گردیده و در مرحله بعد سانتریفیوژ می‌شود. پس از سانتریفیوژ، در لولهٔ آزمایش ۳ فاز تشکیل می‌شود که شامل فاز آبی، فاز فنلی و رسوب است که فاز آبی جمع‌آوری می‌شود. فاز آبی جداشده از مرحلهٔ قبلی به همراه فاز آبی جداشده از مرحلهٔ دوم، به کیسهٔ دیالیز با محدوده عبور ذرات تا ۱۴۰۰۰ دالتون به‌مدت ۳ روز منتقل گردید.

**اندازه میزان لیپوپلی‌ساکارید (LPS) استخراج‌شده به‌روش فنل سولفوریک اسید:** میزان کربوهیدرات در LPS استخراج‌شده به روش Dubois (۱۹۵۶) باکمی تغییرات در میکروپلیت اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۳۰ میکرولیتر فنل ۵ درصد به ۵۰ میکرولیتر نمونه LPS اضافه گردید و بلافاصله پس‌ازآن، ۱۰۰ میکرولیتر سولفوریک اسید خالص اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد و محل تاریک‌قرارداده شد.جذب‌نوری‌در ۴۸۵ نانومتر قرائت گردید (BioTek، آمریکا). میزان کربوهیدرات (گلیکان) پس از رسم نمودار استاندارد (گلوکز به‌عنوان قند مرجع) تخمین زده شد. به‌منظور اطمینان از خلوص LPS استخراج‌شده، میزان پروتئین آن نیز به‌روش برادفورد اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است به‌منظور تزریق LPS به ماهیان، میزان موردنظر از محصول با استفاده از گاز ازت تغلیظ گردید.

**طراحی تحقیق:** ۴۸۰ قطعه ماهی (۱/۲±۷ گرم) به‌صورت تصادفی به ۸ گروه مساوی، هر گروه در سه تکرار (هر تکرار ۲۰ ماهی) تقسیم گردیدند. گروه A، B و C به‌ترتیب با خوراک حاوی LPS (۳۰۰ میکروگرم/کیلوگرم/وزن‌بدن)، LPS+باکترین ($10^9$ cfu/گرم) و باکترین در هفته اول و سوم تحقیق تغذیه شدند (Ghosh. و همکاران، ۲۰۱۶). گروه غوطه‌وری (D) ماهی‌ها به‌مدت ۲ دقیقه در روز صفر و ۱۴ در باکترین ($10^9$ cfu/میلی‌لیتر) غوطه‌ور شدند. گروه‌های تزریقی (F،E و G) به‌ترتیب ۰/۱ میلی‌لیتر باکترین ($10^{10}$ cfu/میلی‌لیتر)، LPS (۳۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) و باکترین+LPS به‌روش داخل صفاقی دریافت کردند. به ماهیان گروه شاهد نیز ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات استریل تزریق شد (جدول ۱). طول دوره تحقیق دو ماه بوده و در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ از ۳ ماهی از هر تکرار (۹ ماهی از هر تیمار) نمونه خون و سرم تهیه‌شده و شاخص‌های خونی و ایمنی ماهیان تیمارها (جدول ۲) مقایسه گردید.

**جدول ۱: اسامی و مخفف گروه‌های دریافت‌کننده واکسن**

| گروه‌ها | مخفف گروه‌ها |
|---|---|
| LPS خوراکی (۳۰۰ میکروگرم/کیلوگرم/زن بدن) | A |
| LPS به همراه باکترین خوراکی ($10^9$ cfu/گرم) | B |
| باکترین خوراکی | C |
| غوطه‌وری با باکترین | D |
| باکترین تزریقی ($1\times10^{10}$ cfu/میلی‌لیتر) | E |
| LPS تزریقی (۳۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) | F |
| LPS به‌همراه باکترین تزریقی | G |
| شاهد | H |

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247



**اندازه‌گیری لایزوزیم سرم:** فعالیت لایزوزیم سرم به‌روش توربیدومتری با استفاده از روش توصیه‌شده توسط Ellis و همکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا ۲ میکرو لیتر از سرم نمونه با ۱۱۰/۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *میکروکوکوس لیزودایکتیکوس* (سیگما) در بافر فسفات‌سیترات ۰/۰۵ مولار (pH=۵/۸) در گودهای پلیت‌الایزا مخلوط شدو جذب نوری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱ و ۳۰ دقیقه بعد در طول موج ۴۵۰ نانومتر در دستگاه Elisa reader (Accureader، تایوان) اندازه‌گیری شد. هر ۰/۰۰۱ کاهش جذب نوری در دقیقه معادل یک واحد لایزوزیم در نظر گرفته شد.

**اندازه‌گیری گلبول‌های‌سفید، پروتئین کل و گلوبولین پلاسما:** شمارش کلی گلبول‌های سفید ماهی به‌روش‌دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت، برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق‌کننده نات هریک استفاده شد (Thrall، ۲۰۰۴).

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

**بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم:** برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه‌شده توسط Budino و همکاران (۲۰۰۶)، باکمی تغییرات استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باکتری *پرسینیا راکری* به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و پس از آن محیط سانتریفیوژ گردید و سپس دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد، در ادامه از رسوب سوسپانسیونی با غلظت $۲\times۱۰^{۷}$ cfu/میلی‌لیتر در محیط TSB تهیه گردید و مقدار ۱۳۳ میکرو لیتر از آن در ۲ تکرار در گودهای پلیت استریل کشت‌سلول ۹۶ تایی ریخته شد. در یک حفره نیز به‌عنوان شاهد ۱۳۳ میکرولیتر PBS استریل ریخته شد. در ادامه به هر سه گوده ۳۳ میکرولیتر از سرم ماهی مورد آزمایش ریخته شد و پلیت برای مدت ۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان زمان انکوباسیون به همه گودها به‌میزان ۸۶ میکرولیتر محلول MTT ( diphenyltetrazolium bromide) با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد و دوباره به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدندو درنهایت تغییر رنگ ناشی از احیای MTT توسط باکتری‌های زنده در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد و درصد باکتری‌کشی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

[جذب گوده شاهد (باکتری+PBS)/میانگین جذب دو تکرار سرم نمونه حاوی باکتری] ×۱۰۰

**اندازه‌گیری احیاء NBT (Nitro Blue Tetrazolium):** برای ارزیابی احیاء **NBT** از نمونه خون تازه و روش (Siwicki و همکاران، ۱۹۹۴) استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر خون هپارینه با ۱۰۰ میکرولیتر محلول زردرنگ NBT دو درصد ترکیب شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. سپس در لوله آزمایش جداگانه ۲۰۰۰ میکرولیتر دی متیل فرمامید ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب خون و NBT به آن اضافه گردید و سپس در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.درنهایت میزان جذب نوری مایع رویی در دستگاه اسپکتروفتومتری و در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد.

**اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی ضد پرسینیا راکری:** اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی ضد پرسینیا راکری به روش الایزا (طبق روش Shelby و همکاران، ۲۰۰۴) با کمی تغییرات انجام گرفت. در کف گودهای پلیت الایزا آنتی‌ژن (باکتری سونیکه‌شده)، در کف گوده‌ها کوت و به‌مدت یک روز در یخچال نگه‌داری شد و سپس محلول رویی پلیت‌های الایزا دور ریخته و ۳ بار با PBS توئین شست‌وشو گردید. سرم و موکوس‌های ماهی از هر تیمار به‌میزان ۱ به ۲۰ و ۱ به ۱ در PBS توئین و شیر ۰/۱ درصد رقیق و به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گرادو روی شیکر قرار گرفت و سپس محلول دور ریخته و ۴ بار شستشو گردید و آنتی‌بادی مونوکلونال ضدزنجیره سنگین IgM قزل‌آلا تولید شده در موش (تهیه شده توسط دکتر صیفی) به نسبت ۱ به ۷۵۰۰ رقیق شده و به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه سه بار شستشو گردید و آنتی‌بادی ثانویه ضدموشی تولید شده در بز (IgG HRP) (Sigma-Aldrich) به‌صورت کنژوگه، در هر چاهک اضافه شد. بعد از ۶۰ دقیقه محلول دور ریخته و ۳ بار شستشو گردید. سوبسترای کروموژن به هر چاهک اضافه گردید، پس از ۱۰ دقیقه ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده $H_2SO_4$ ۲ نرمال اضافه گردید. جذب نوری مربوط به هر چاهک در دستگاه الایزا ریدر (Accu Reader, Taiwan) با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

**مواجهه‌سازی باکتریایی:** بعد از ۲ ماه ماهی‌های تیمارهای ۸ گانه با باکتری زنده به‌روش تزریق داخل صفاقی مواجهه‌سازی داده شدند. به این منظور ۱۲ ماهی در هر تیمار به‌صورت داخل صفاقی با غلظت LD50 باکتری که قبلاً محاسبه شده بود (دوز $۲/۵\times۱۰^{۷}$ CFU) مواجهه داده شدند. به‌مدت ده روز علائم بیماری و تلفات روزانه ثبت گردید. برای اطمینان از نقش باکتری در تلفات ایجاد شده در طول مدت مواجهه‌سازی از تلفات روزانه (ماهیان در حال مرگ) در هر گروه نمونه‌برداری باکتریایی انجام شده و از بافت کلیه آن‌ها کشت داده شد. نتایج براساس نرم‌افزار probit آنالیز گردید و نهایتاً از فرمول زیر درصد بقای نسبی یا RPS محاسبه شد (Villumsen و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ghosh و همکاران، ۲۰۱۶):

$$RPS = ۱ - \frac{\text{Percent mortality in treated group}}{\text{Percent mortality in control group}} x\ ۱۰۰$$

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247



**تجزیه‌وتحلیل آماری:** جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPPS (نسخه ۲۲) استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده و برای تعیین معنی‌داری تفاوت میانگین تیمارها از پس ازمون دانکن در سطح معنی‌داری (۰/۰۵) استفاده گردید.

## نتایج

**میزان LPS استخراج‌شده:** میزان LPS استخراج‌شده به‌روش فنل‌سولفوریک‌اسید ۳۰۰ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر محصول استخراج شده تخمین زده شد. هم‌چنین میزان پروتئین اندازه‌گیری‌شده به‌روش برادفورد در محصول صفر بود.

**فعالیت باکتری‌کشی سرم:** میزان قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمارهای مختلف و در دو زمان ۳۰ و ۶۰ تحقیق تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵).

**میزان فعالیت لایزوزیم سرم:** فعالیت لایزوزیم سرم در تیمار ایمن شده با باکترین+LPS در مقایسه با گروه شاهد و LPS خوراکی افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

**آزمون احیای NBT: فعال**یت NBT گلبول‌های سفید در تیمار تجویز باکترین+LPS افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای A،B و C در روز ۶۰ نمونه‌گیری نشان داد (P<۰/۰۵).

**مقایسه میزان گلبول‌های سفید، پروتئین، گلوبولین و آلبومین سرم بین تیمارها:** بیش‌ترین گلبول‌های سفید در گروه‌های G و E ۳۰ روز پس از نمونه‌برداری و در مرحله دوم نمونه‌برداری بالاترین میزان در گروه G مشاهده شد (P<۰/۰۵). پروتئین تام و آلبومین سرم در تیمارهای واکسینه افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشتند (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان IgM در گروه G و در روز ۳۰ اندازه‌گیری شد که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵).

**عیار پادتن مخاط روده ضد *یرسینیا راکری*( روش سنجش مشخص نیست):** عیار پادتن در روز ۶۰ بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد ولی در روز ۳۰ بیش‌ترین عیار پادتنی مخاط روده به‌ترتیب در گروه‌های B، E، G و C دیده شد (P<۰/۰۵).

**عیار پادتنی سرم ضد *یرسینیا راکری*(روش سنجش مشخص نیست):** بالاترین میزان پادتن سرمی در روز ۳۰ به‌ترتیب مربوط به گروه‌های E،G و F بود که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵) و در روز ۶۰، گروه G بیش‌ترین عیار پادتنی را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان داد (P<۰/۰۵).

**تلفات پس از مواجهه‌سازی:** تلفات بعد از تزریق باکتری زنده *یرسینیا راکری* به‌ترتیب در گروه‌های G،E،F،B،D، C و A کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). تمام ماهیان گروه شاهد(H) در طی سه روز پس از چالش تلف شدند.

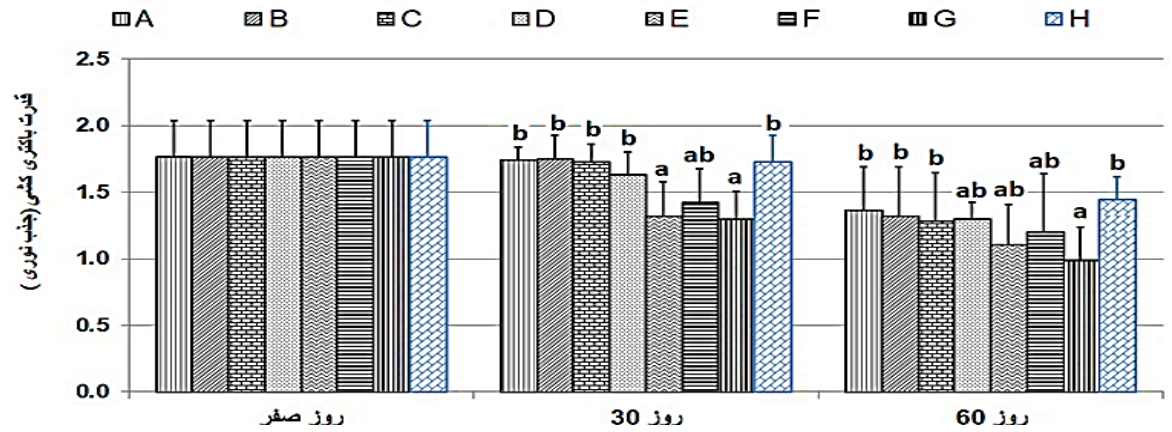
**جدول ۲: میانگین فاکتورهای خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره ایمن‌سازی. A: LPS خوراکی، B: LPS به‌همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد**

| فاکتور روزها | تیمارهای تحقیق | پروتئین تام (گرم/دسی‌لیتر) | آلبومین (گرم/دسی‌لیتر) | ایمیونوگلوبولین (گرم/دسی‌لیتر) | تعداد گلبول‌های سفید ($\times 10^3$) |
|---|---|---|---|---|---|
| روز صفر | | ۴/۰±۴۳/۳۶ | ۲/۰±۶۲/۴۴ | ۱/۰±۸۱/۶۳ | ۱۲/۳±۵۰/۰۸ |
| روز ۳۰ | A | ۴/۰±۳۵/۵۳ | ۲/۰±۵۵/۵۱ | ۲/۰±۰۵/۱۶ b | ۱۳/۱±۵۰/۵۰ b |
| | B | ۴/۰±۶۸/۵۰ | ۲/۰±۷۱/۳۹ | ۱/۰±۹۷/۵۳ b | ۱±۱۴/۷۳ b |
| | C | ۴/۰±۴۴/۴۱ | ۲/۰±۶۱/۵۷ | ۱/۰±۸۳/۴۵ b | ۱۳/۴±۳۳/۵۱ b |
| | D | ۴/۰±۵۹/۴۰ | ۲/۰±۷۳/۱۲ | ۱/۰±۸۶/۵۱ b | ۵±۱۲/۲۹ b |
| | E | ۴/۰±۶۱/۳۱ | ۲/۰±۵۷/۵۸ | ۲/۰±۰۴/۷۶ b | ۲۰/۴±۲۵/۹۹ a |
| | F | ۴/۰±۷۴/۳۰ | ۲/۰±۶۱/۱۸ | ۲/۰±۱۳/۲۴ ab | ۵±۱۳/۳۵ b |
| | G | ۴/۰±۹۲/۷۲ | ۲/۰±۵۱/۴۲ | ۲/۰±۴۱/۴۱ a | ۲۵/۸±۲۵/۷۷ a |
| | H | ۴/۰±۴۸/۴۲ | ۲/۰±۵۶/۴۷ | ۱/۰±۹۱/۳۶ | ۲±۱۲ b |
| روز ۶۰ | A | ۴/۰±۵۲/۷۸ | ۲/۰±۵۷/۶۳ | ۱/۰±۹۵/۵۸ | ۱۲/۳±۳۳/۲۱ b |
| | B | ۴/۰±۹۷/۷۳ | ۲/۰±۵۸/۳۶ | ۲/۰±۲۹/۶۰ | ۱۴/۰±۶۷/۵۸ ab |
| | C | ۴/۰±۵۹/۳۰ | ۲/۰±۵۲/۳۱ | ۲/۰±۰۷/۳۳ | ۱۲/۴±۳۳/۱۶ b |
| | D | ۴/۰±۸۳/۱۳ | ۲/۰±۶۳/۳۸ | ۲/۰±۲۰/۴۲ | ۱۳/۴±۶۷/۵۱ b |
| | E | ۴/۰±۵۶/۲۹ | ۲/۰±۶۶/۴۸ | ۱/۰±۹۰/۴۸ | ۳±۱۱/۶۱ b |
| | F | ۴/۰±۷۲/۸۲ | ۲/۰±۶۳/۴۰ | ۲/۰±۰۹/۵۳ | ۱۲/۳±۳۳/۲۱ b |
| | G | ۴/۰±۷۵/۴۷ | ۲/۰±۵۳/۲۹ | ۲/۰±۲۲/۶۶ | ۱۶/۷±۶۷/۶۴ a |
| | H | ۴/۰±۴۵/۲۸ | ۲/۰±۷۲/۴۰ | ۱/۰±۷۷/۴۵ | ۱۱/۶±۳۳/۱۱ b |

میانگین ± انحراف معیار با حروف متفاوت در ردیف‌های یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در تیمارها می‌باشند (p<۰/۰۵)

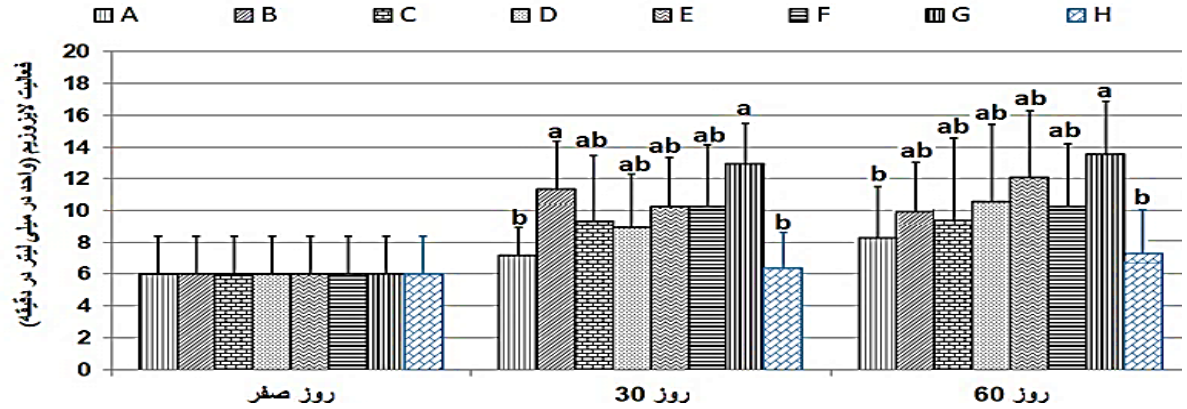
(DOI): 10.22034/aej.2020.119247





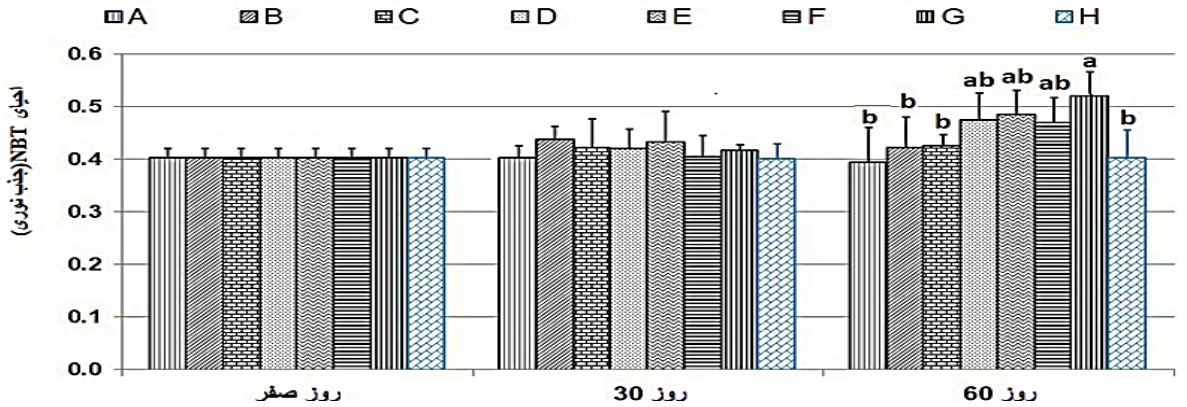

**شکل ۱: A: LPS خوراکی، B: LPS به‌همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد**

مقایسه (میانگین±انحراف معیار) میزان قدرت باکتری‌کشی سرم ضد *پرسینیا راکری* (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).




**شکل ۲: A: LPS خوراکی، B: LPS به‌همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به‌همراه باکترین تزریقی، H: شاهد**

مقایسه (میانگین±انحراف معیار) فعالیت لایزوزیم سرم ضد *پرسینیا راکری* (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).

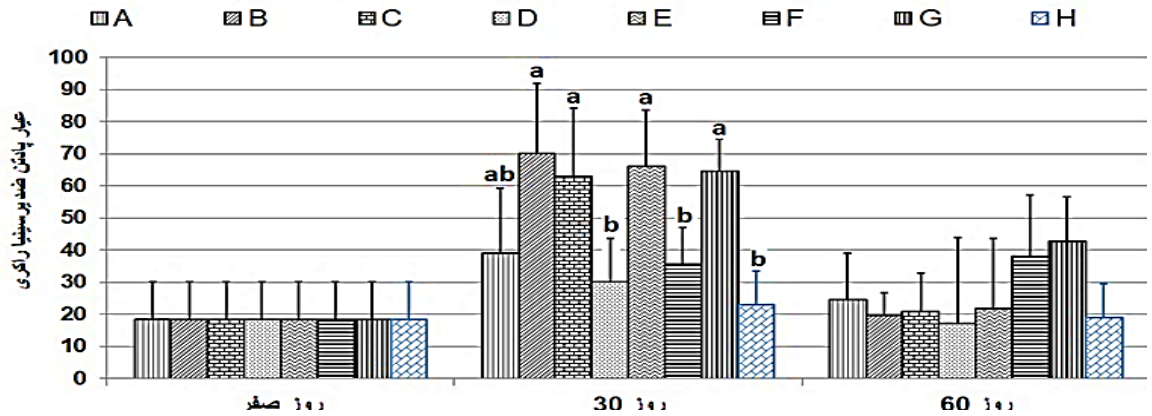



**شکل ۳: A: LPS خوراکی، B: LPS به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد**

مقایسه (میانگین±انحراف معیار) احیای NBT سرم ضد *پرسینیا راکری* (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است).

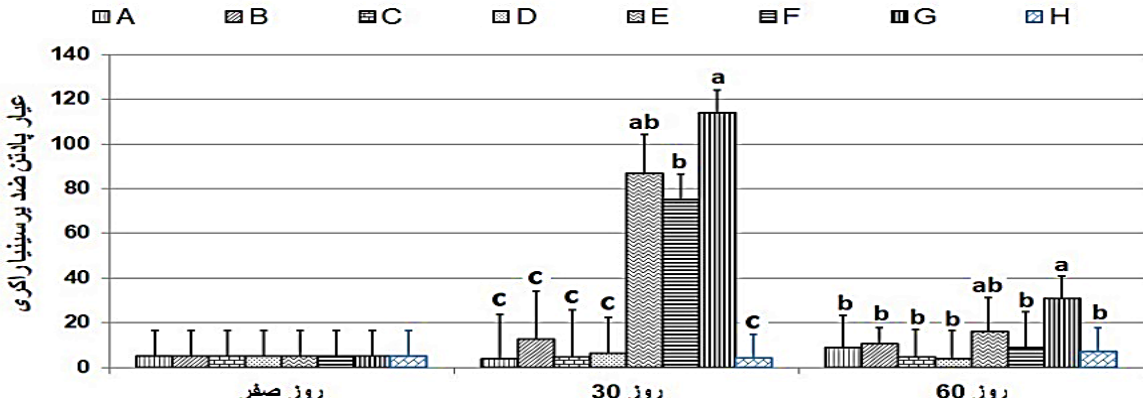
(DOI): 10.22034/aej.2020.119247





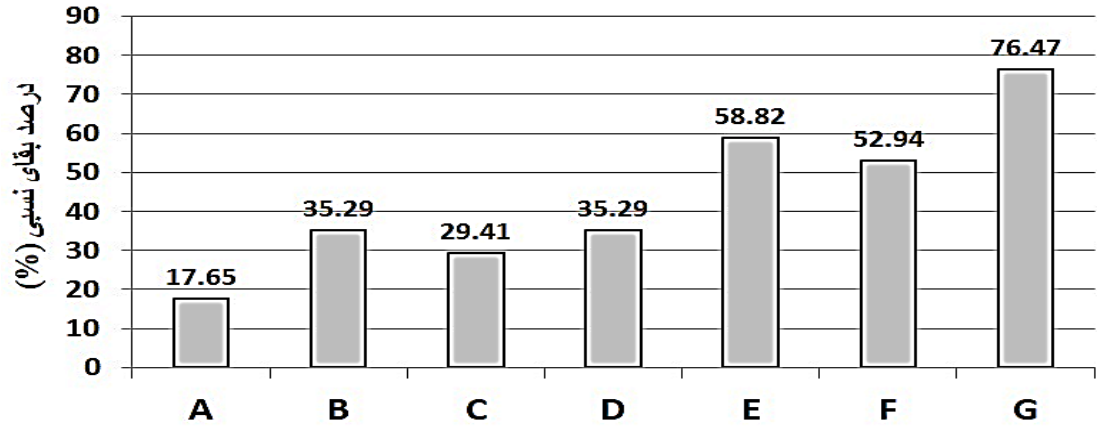

**شکل ۴: A: LPS خوراکی، B: LPS به همراه باکترین خوراکی، C: باکترین خوراکی، D: غوطه‌وری با باکترین، E: باکترین تزریقی، F: LPS تزریقی، G: LPS به همراه باکترین تزریقی، H: شاهد**

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




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

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




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

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247



## بحث

اولین تجربیات روی واکسیناسیون روی ماهی از واکسیناسیون ماهی در برابر بیماری دهان قرمز (یرسینیوزیس) آغاز شد (Klontz، ۱۹۶۳)، لذا تحقیق روی انواع واکسن و روش‌های مختلف تجویز در جهان به‌کرات صورت گرفته است. علی‌رغم حضور بیماری در صنعت آبزی‌پروری کشور تابه‌حال مطالعه جامعی در مورد این واکسن در کشور انجام‌نشده است. در تحقیق جاری از باکترین فرمالینه و LPS به‌صورت تکی و توام به‌روش تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری استفاده گردید.نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تزریق باکترین+LPS تحریک ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی را به‌طور قابل‌توجهی بهبود بخشید درحالی‌که میزان کارایی تجویز باکترین+LPS در روش خوراکی با روش غوطه‌وری مشابه و کم‌تر از روش تزریقی بود. تحقیقات مختلف درمورد کارایی‌واکسن‌های تزریقی و خوراکی‌همراه،یا بدون‌محرک‌های ایمنی در ماهی، نتایج متفاوتی در برداشته‌اند و یکی از ویژگی‌های اصلی واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی، افزایش بقای ماهی‌ها پس از چالش مواجهه‌سازی با عوامل بیماری‌زا است. به‌عنوان‌مثال Selvaraj و همکاران (۲۰۰۶) اثرات ایمنی‌زای بتاگلوکان و لیپوپلی ساکارید را با روش‌های مختلف تزریقی، حمام و خوراکی مورد بررسی قراردادند. آن‌ها غلظت‌های مختلف از ترکیب بتاگلوکان و لیپوپلی ساکارید را در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ استفاده کرده و در روز ۱۶ مواجهه‌سازی با *آئروموناس هیدروفیلا* انجام دادند. درصد نسبی بقا (RPS) در گروه تزریقی (۱۰۰ میکروگرم بتاگلوکان+ ۱۰ میکروگرم لیپوپلی ساکارید) ۱۰۰ درصد و در گروه خوراکی (۱ درصد بتاگلوکان+ ۰/۲۵ درصد لیپوپلی ساکارید) ۷۱/۴ درصد گزارش گردید و در گروه غوطه‌وری (۱۰۰ میکروگرم بتاگلوکان+ ۱۰ میکروگرم لیپوپلی ساکارید) بهبود RPS مشاهده نگردید. میزان نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها، تولید آنیون سوپراکسید توسط ماکروفاژها درگروه تزریقی و خوراکی افزایش یافت. همانند تحقیق حاضر بیش‌ترین تیتر آنتی‌بادی سرمی در گروه تزریقی مشاهده گردید. آن‌ها تزریق داخل صفاقی و تجویز خوراکی بتاگلوکان+لیپوپلی‌ساکاریدرا باعث افزایش مقاومت در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به گروه ایمن شده به‌روش حمام و گروه شاهد دانستند. در تحقیقی مشابه Deshmukh و همکاران (۲۰۱۲) از دو واکسن AquaVac ERM (*یرسینیا راکری* بیوتیپ ۱ غیرفعال شده با فرمالین با غلظت $5\times10^{9}$ cells/ml) و AquaVac RELERA (*یرسینیا راکری* بیوتیپ ۱ و ۲ غیرفعال شده با فرمالین) در ماهیان قزل‌آلای رنگین به‌روش غوطه‌وری استفاده کردند. چالش با بیوتیپ ۲ باکتری به‌روش داخل صفاقی صورت گرفت. درصد نسبی بقا (RPS) در گروه واکسینه شده با AquaVac ERM بعد از شش ماه ۲۹/۵ درصد بود که حفاظت متقاطع اندکی در برابر بیوتیپ ۲ را نشان داد درحالی‌که RPS در گروه واکسینه شده با AquaVac RELERA ۴۲/۵ و ۵۲ درصد بود. در تحقیق حاضر غوطه‌وری با باکترین توانست پس از گذشت ۲ ماه حفاظت ۳۵/۲۹ درصدی ایجاد کند و کم‌ترین تلفات در تیمار تزریق‌شده با باکترین+LPS مشاهده گردیدکه‌به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارهاکم‌تر بود($p<0/05$).در تحقیقی دیگر Pridgeon و همکاران (۲۰۱۳) بهبود کارایی واکسن با استفاده از تولیدات خارج سلولی باکتری یرسینیا راکری را گزارش نمودند.

در همین راستا Chettri و همکاران (۲۰۱۷)، اثرات ایمنی‌زایی پپتید ضدمیکروبی CAP 18 (سنتزی) در برابر *یرسینیا راکری* در قزل‌آلای رنگین‌کمان به دو روش تزریقی و خوراکی را مورد ارزیابی قراردادند. آن‌ها دریافتند که روش تزریقی در ماهیان ۵-۲ گرم به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش مرگ و میر پس از مواجهه با باکتری گردید درحالی‌که تجویز خوراکی آن به‌مدت ۱ یا ۳ هفته باعث بهبود بازماندگی در ماهیان پس از چالش به‌روش حمام نگردید. این محققان بیان کردند که اثر پروتئولیتیکی ترشحات دستگاه گوارش ماهی بر روی این ماده منجر به کاهش اثرات خوراکی آن شده، لذا باید از این پپتید همراه با ترکیبات مقاوم به اسید و آنزیمی مانند آلژینات و کیتوزان استفاده نمود تا در دستگاه گوارش بهتر حفظ گردد. اغلب اثرات زیست‌شناختی LPS مانند کاهش فشارخون، انعقاد داخل عروقی منتشر،شوک و مرگ‌که در پستانداران مشاهده‌شده است به‌دلیل وجود بخش لیپید A این مولکول محسوب می‌شود. با این وجود مهره‌داران پست‌تر مانند قورباغه‌ها و ماهیان در برابر اثرات نامطلوب LPS مقاومت بالایی‌دارندو LPS درمیزان ۳۰۰ میکروگرم‌می‌تواند اثرات مفیدی برای ماهیان ازجمله فعال‌سازی سیستم ایمنی غیراختصاصی (ماکروفاژها) داشته باشد و مصونیت در برابر برخی بیماری‌ها در ماهیان را افزایش دهد. Guttvik و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که تجویز LPS ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به ماهیان به‌روش تزریق داخل صفاقی منجر به بروز علائم بالینی نگردید، اگرچه اغلب LPS وارد جریان خون شده بود. Zhang و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که آزادماهی کوهو و قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر اندوتوکسین (LPS) *اشرشیاکلای* و *آئروموناس سالمونیسیدا* حساسیتی نشان ندادند. نتیجه دیگر تحقیق جاری کارایی کم LPS خوراکی در دوز و دوره مورداستفاده بود. لذا با توجه به روند نسبتاً پرهزینه و زمان‌بر تولید LPS باکتری و کارایی کم آن، تجویز خوراکی به‌تنهایی به‌عنوان واکسن یرسینیا منطقی به‌نظر نمی‌رسد. البته تحقیقات بیش‌تری برای پی بردن به دوز و دوره بهینه تجویز ضروری است چراکه تفاوت فیزیولوژیک و آناتومیک لوله گوارش گونه‌های‌مختلف‌ماهیان پرورشی نیز بر روی اثربخشی واکسن خوراکی مؤثر است. وجود تفاوت‌های آناتومی در گونه‌های مختلف

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247



ماهیان که شامل گونه‌های دارای معده و فاقد معده، گونه‌های دارای روده کوتاه و دارای روده طویل و حتی گونه‌های فاقد قسمت دوم لوله گوارش می‌باشند، توسعه واکسیناسیون خوراکی در ماهی را مشکل می‌کنند. مطالعات نشان داده است که میزان حفاظت، حتی وقتی تجویز روزانه برای مدت طولانی ادامه داشته باشد به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر از روش تزریق یا غوطه‌وری است. 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 (Brandtzaeg و Pabst، ۲۰۰۴). به‌منظور بهبود کارایی این روش، باید تجزیه آنتی‌ژن در معده و قسمت قدامی لوله گوارش کاهش یابد و دوره تجویز واکسن نیز به حداقل برسد. در پژوهش دیگری به‌منظور بررسی اهمیت LPS و محل اثرگذاری آن Guttvik و همکاران (۲۰۰۲) از LPS *آئروموناس سالمونیسیدا* به‌مدت دو ماه در جیره غذایی نوزاد آزادماهی اطلس استفاده کردند. تغییرات قابل‌توجهی در میزان پادتن اختصاصی علیه مواجهه‌سازی با *آئروموناس سالمونیسیدا* در ماهیان واکسینه شده یافت نشد. مطالعات ایمیونوهیستوشیمی و رادیوایمنواسی نشان داد که بیش‌ترین میزان LPS در سلول‌های پوششی روده قرار داشتند و کلیه قدامی، کبد و قلب میزان کم‌تری از LPS را نشان دادند. هم‌چنین گروه واکسینه شده با LPS پس از مواجهه‌سازی در مقایسه با گروه شاهد مرگ و میر بالاتری را نشان دادند. آن‌ها دوره طولانی‌مدت تغذیه با LPS و ایجاد تحمل ایمنی را دلیل نتایج ذکر کردند. در مطالعه حاضر نیز بیش‌ترین عیار پادتنی در مخاط روده مربوط به تیمار ایمن شده با باکترین+LPS به‌روش خوراکی بود. القای پاسخ ایمنی پس از ایمن‌سازی مخاطی وابسته به پاسخ‌های موضعی در مخاطات یا جذب آنتی‌ژن‌ها از سطوح خارجی و یا دستگاه گوارش و انتشار آن‌ها به کلیه قدامی یا طحال است. در مهره‌داران پیشرفته‌تر عوامل زنده یا مرده (محلول) توسط فولیکول‌های تخصص‌یافته مرتبط با بافت پوششی که دارای سلول‌های غشایی (M) هستند دریافت می‌شوند و سپس به بافت لنفاوی (پلاک‌های پایر) در زیر بافت پوششی منتقل می‌شوند (Brandtzaeg و همکاران، ۱۹۸۷). سلول‌های M در ماهیان یافت نمی‌شوند، اما سلول‌هایی با کارایی مشابه در بافت پوششی دستگاه گوارش ماهی شناسایی‌شده است (Fuglem و همکاران، ۲۰۱۰). با این وجود تحقیقی درخصوص تأثیر ماهیت آنتی‌ژن (محلول یا ذره‌ای بودن) بر دریافت آنتی‌ژن صورت نگرفته است، بنابراین نمی‌توان در مورد چگونگی نحوه انتقال آن‌ها از طریق سلول‌های پوششی نتیجه‌گیری کرد (Zhang و همکاران ، ۲۰۱۴). در تحقیق جاری در گروه واکسن خوراکی آنتی‌بادی اختصاصی ضد *یرسینیا راکری* در سرم یافت نشد ولی در گروه واکسن تزریقی آنتی‌بادی ۳۰ روز بعد از تزریق افزایش داشته و تا روز ۶۰ وجود داشت. احتمالاً دوز و دوره تجویز می‌تواند در عدم ایجاد ایمنی کافی دخیل باشند، اگرچه میزان باکترین دریافت شده توسط هر ماهی در روش خوراکی به‌طور دقیق مشخص نیست. از دلایل دیگر که برای عدم ردیابی آنتی‌بادی در واکسیناسیون خوراکی بیان می‌گردد می‌توان به تفاوت ایمنوگلوبولین‌های سرمی و ایمنوگلوبولین‌های مخاطی در ماهی قزل‌آلا اشاره کرد. در ماهی قزل‌آلا ایمنوگلوبولین سرمی از نوع IgM است ولی ایمنوگلوبولین مخاطی بیش‌تر از نوع IgT است (Munang'andu و Evensen، ۲۰۱۹؛ علیشاهی و طولابی، ۱۳۹۶) احتمالاً منوکلونال آنتی‌بادی ضدزنجیره سنگین IgM به‌کار رفته در این تحقیق نسبت به IgT مخاطی قزل‌آلا هم‌پوشانی بالایی نداشته و علی‌رغم این‌که در تیمار خوراکی محافظت نسبی مشاهده‌شده است (احتمالاًتحت‌تأثیر IgT) ولی تیتری آنتی‌بادی در سرم اندازه‌گیری نشد. این یافته‌ها در مطالعه Ghosh و همکاران (۲۰۱۵ و ۲۰۱۶) نیز ذکرشده است. یکی از ویژگی‌های واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی، بهبود شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهیان تیمار شده است. براساس نتایج این تحقیق برخی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی شامل فعالیت لایزوزیم سرم، میزان احیای NBT و تعداد گلبول‌های سفید در تیمار واکسینه شده با باکترین+LPS نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشتند ($p<0/05$).

هرچند شاخص‌هایی مثل فعالیت باکتری‌کشی و پروتئین کل و آلبومین در تیمارهای واکسینه تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان نداد ($p>0/05$). بررسی میزان بیگانه‌خواری و انفجار تنفسی در سلول‌های بیگانه‌خوار یکی از شاخص‌های مهم ایمنی غیراختصاصی در ماهی است (Matsuura و همکاران، ۲۰۱۷). احیای NBT توسط رادیکال‌های آزاد تولیدشده درروند فاگوسایتوزیس صورت گرفته و افزایش احیای NBT نشان‌دهنده افزایش توان بیگانه‌خواری میزبان است. افزایش احیای NBT در این تحقیق در تیمارهای ایمن شده را می‌توان به‌دلیل افزایش تعداد و فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار سیستم دفاعی ماهی نسبت داد. در تحقیقات مشابه، Skalli و همکاران (۲۰۱۳) تجویز خوراکی طولانی‌مدت (۹۳ روز) لیپوپلی ساکارید استخراج‌شده از دیواره سلولی باکتری گرم منفی *Pantoea agglomerans* باعث بهبود رشد، افزایش تراکم سلول‌های جامی روده و فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی سرم (لایزوزیم، فعالیت باکتری‌کشی، میزان فعالیت کمپلمان، انفجار تنفسی) گردید.

لایزوزیم پروتئینی باارزش و یکی از اجزای مهم ایمنی غیراختصاصی ماهی بوده و به‌عنوان اپسونین، باعث تخریب جدار باکتری‌ها و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری می‌گردد (Esteban و Cerezuela، ۲۰۱۵). در تیمار باکترین+LPS پژوهش جاری فعالیت آن به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش داشت ($P<0/05$). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247



از تجویز محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی ادجوانت‌ها در ماهی گزارش‌شده است. از آن‌جاکه منبع اصلی این پروتئین، سرم سلول‌های مونوسیت‌ها/ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها می‌باشند، افزایش سطح سرمی تعداد گلبول‌های سفید در تیمار G در هردو مرحله‌نمونه‌گیری می‌تواند به‌دلیل افزایش تعداد و درصد سلول‌های تولیدکننده لایزوزیم ازجمله هتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در خون باشد (Soltani و همکاران، ۲۰۱۳؛ Giri و همکاران، ۲۰۱۸؛Wang و همکاران، ۲۰۱۶).درآزمایش دیگری توسط Kadowakiوهمکاران(۲۰۱۳)فاکتورهای‌ایمنی‌درکپور معمولی (۲۰ گرم) پس از تجویز خوراکی LPS (۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم برای هر کیلوگرم وزن ماهی در روز) به‌مدت ۳۰ و ۶۰ روز بررسی شدند. فعالیت فاگوسیتوزی و باکتری‌کشی ماکروفاژهای کلیه‌قدامی و فعالیت لایزوزیم سرم در تمام گروه‌ها افزایش یافت.در تحقیق Nya و Austin (۲۰۱۰) اثرات تجویز خوراکی LPS در پیشگیری از عفونت توسط *آئروموناس هیدروفیلا* در قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد (۱۰ گرم) ارزیابی گردید. ماهیان به‌مدت ۱۴ روز با خوراک حاوی LPS تغذیه شدند. در ماهیان ایمن شده با LPS، فعالیت لایزوزیم، باکتری‌کشی، انفجار تنفسی، پروتئین تام و آنتی‌پروتئاز افزایش نشان‌داد. ایمن‌سازی ماهی‌قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با باکترین+LPS به‌روش‌داخل‌صفاقی باعث محافظت بالای ماهیان در برابر مواجهه‌سازی باکتریایی شده و بهبود شاخص‌های ایمنی را باعث شد. با توجه به نتایج تحقیق جاری می‌توان نتایج تحقیق جاری نشان داد که اضافه نمودن LPS به باکترین علاوه بر بهبود کارایی واکسن در روش تزریقی و خوراکی، ایمنی‌زایی آن‌ها را هم به‌طور معنی‌داری افزایش داد. لذا براساس نتایج تحقیق جاری می‌توان بعد از مطالعات تکمیلی از LPS به‌عنوان یک گزینه مناسب و اقتصادی در تهیه واکسن یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلا استفاده کرد.

## منابع


۱. **سلطانی، م.؛ موسوی، ش.؛ ابراهیم‌زاده‌موسوی، ح. و میرزرگر، س.، ۱۳۹۳.** مطالعه مولکولی یرسینیا راکری، عامل یرسینیوزیس در برخی مزارع قزل‌آلای کشور. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۰، شماره ۱، صفحات ۵۹ تا ۶۷.

۲. **علیشاهی، م. و طولابی‌دزفولی، ز.، ۱۳۹۶.** واکسیناسیون ماهی. دانشگاه شهید چمران اهواز، فصل ۶، صفحات ۱۲۳ تا ۱۳۷.

۳. **Abbass, A.; Sharifuzzaman, S.M. and Austin, B., 2010.** Cellular components of probiotics control Yersinia ruckeri infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish diseases. Vol. 33, No. 1, pp: 31-37.

۴. **Altinok, I.; Capkin, E. and Boran, H., 2016.** Comparison of molecular and biochemical heterogeneity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from Turkey and the USA. Aquaculture. Vol. 450, pp: 80-88.

۵. **Apicella, M.A., 2008.** Isolation and characterization of lipopolysaccharides. In Bacterial Pathogenesis. Humana Press. pp: 3-13.

۶. **Brandtzaeg, P. and Pabst, R., 2004.** Let's go mucosal: communication on slippery ground. Trends in immunology. Vol. 25, No. 11, pp: 570-577.

۷. **Chettri, J.K.; Mehrdana, F.; Hansen, E.B.; Ebbensgaard, A.; Overgaard, M.T.; Lauritsen, A.H. and Buchmann, K., 2017.** Antimicrobial peptide CAP18 and its effect on *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): comparing administration by injection and oral routes. Journal of fish diseases. Vol. 40, No. 1, pp: 97-104.

۸. **Chettri, J.K.; Raida, M.K.; Kania, P.W. and Buchmann, K., 2012.** Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 36, No. 2, pp: 463-474.

۹. **Deshmukh, S.; Raida, M.K.; Dalsgaard, I.; Chettri, J.K.; Kania, P.W. and Buchmann, K., 2012.** Comparative protection of two different commercial vaccines against Yersinia ruckeri serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary immunology and immunopathology. Vol. 145, No. 1-2, pp: 379-385.

۱۰. **Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.T. and Smith, F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry. Vol. 28, No. 3, pp: 350-356.

۱۱. **Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assays. Techniques in fish immunology. Vol. 1, pp: 101-103.

۱۲. **Esteban, M.Á. and Cerezuela, R., 2015.** Fish mucosal immunity: skin. In Mucosal health in aquaculture. Academic Press. pp: 67-92.

۱۳. **Fuglem, B.; Jirillo, E.; Bjerkås, I.; Kiyono, H.; Nochi, T.; Yuki, Y. and Koppang, E.O., 2010.** Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 34, No. 7, pp: 768-774.

۱۴. **Ghosh, B.; Nguyen, T.D.; Crosbie, P.B.; Nowak, B.F. and Bridle, A.R., 2016.** Oral vaccination of first-feeding Atlantic salmon, Salmo salar L., confers greater protection against

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247




۱۵. **Ghosh, B.; Bridle, A.R.; Nowak, B.F. and Cain, K.D., 2015.** Assessment of immune response and protection against bacterial coldwater disease induced by a live-attenuated vaccine delivered orally or intraperitoneally to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture. Vol. 446, pp: 242-249.

۱۶. **Giri, S.S.; Chi, C.; Jun, J.W. and Park, S.C., 2018**. Use of bacterial subcellular components as immunostimulants in fish aquaculture. Reviews in Aquaculture. Vol. 10, No. 2, pp: 474-492.

۱۷. **Gomez, D.; Sunyer, J.O. and Salinas, I., 2013.** The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. Fish and shellfish immunology. Vol. 35, No. 6, pp: 1729-1739.

۱۸. **Guttvik, A.; Paulsen, B.; Dalmo, R.A.; Espelid, S.; Lund, V. and Bøgwald, J., 2002.** Oral administration of lipopolysaccharide to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. Uptake, distribution, influence on growth and immune stimulation. Aquaculture. Vol. 214, No. 1, pp: 35-53.

۱۹. **Kadowaki, T.; Yasui, Y.; Nishimiya, O.; Takahashi, Y.; Kohchi, C.; Soma, G.I. and Inagawa, H., 2013**. Orally administered LPS enhances head kidney macrophage activation with down-regulation of IL-6 in common carp (*Cyprinus carpio*). Fish and shellfish immunology. Vol. 34, No. 6, pp: 1569-1575.

۲۰. **Marsden, M.J.; Freeman, L.C.; Cox, D. and Secombes, C.J., 1996.** Non-specific immune responses in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance to furunculosis. Aquaculture. Vol. 146, No. 1, pp: 1-16.

۲۱. **Matsuura, Y.; Takaoka, N.; Miyazawa, R. and Nakanishi, T., 2017.** A simple and non-invasive method for analyzing local immune responses in vivo using fish fin. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 74, pp: 136-143.

۲۲. **Munang'andu, H.M. and Evensen, Ø., 2019.** Correlates of protective immunity for fish vaccines. Fish & shellfish immunology. Vol. 85, pp: 140-132.

۲۳. **Nya, E.J. and Austin, B., 2010.** Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of applied microbiology. Vol. 108, No. 2, pp: 686-694.

۲۴. **Plant, K.P. and LaPatra, S.E., 2011.** Advances in fish vaccine delivery. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 35, No. 12, pp:1256-1262.

۲۵. **Pridgeon, J.W.; Klesius, P.H.; Song, L.; and Zhang, D., 2013.** Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. Veterinary Microbiology. Vol. 164, pp: 336-343.

۲۶. **Rucker, R.R., 1965.** Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin-office international des epizooties. Vol. 65, No. 5, pp: 825-830.

۲۷. **Ryckaert, J.; Bossier, P.; D'Herde, K.; Diez-Fraile, A.; Sorgeloos, P.; Haesebrouck, F. and Pasmans, F., 2010.** Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 29, No. 4, pp: 648-655.

۲۸. **Selvaraj, V.; Sampath, K. and Sekar, V., 2006.** Adjuvant and immunostimulatory effects of β-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with Aeromonas hydrophila. Veterinary immunology and immunopathology. Vol. 114, No. 1, pp: 15-24.

۲۹. **Sharifi, Y. and Akhlaghi, M.H., 2008.** Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University. Vol. 9, No. 4, pp: 347-352.

۳۰. **Siwicki, A.K.; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., 1994**. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity & protection against furunculosis. Veterinary immunology & immunopathology. Vol. 41, No. 1-2, pp: 125-139.

۳۱. **Skalli, A.; Castillo, M.; Andree, K.B.; Tort, L.; Furones, D. and Gisbert, E., 2013.** The LPS derived from the cell walls of the Gram-negative bacteria Pantoea agglomerans stimulates growth and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. Aquaculture. Vol. 416, pp: 272-279.

۳۲. **Soltani, M. and Pourgholam, R., 2013.** Some hematological and biochemical changes in blood serum of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) vaccinated with *Aeromonas hydrophila* following exposure to sublethal concentration of diazinon. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 12, No. 1, pp: 12-23

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247




۳۳. **Soltani, M.; Fadaii, F. and Mehrabi, M.R., 1999**. First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. Bulletin European Association of Fish Pathology. Vol. 9, No. 4, pp: 173-176.

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

۳۵. **Thrall, M.A., 2004.** Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Whiliams& Wilkins, New York. pp: 241-402.

۳۶. **Tobback, E.; Decostere, A.; Hermans, K.; Ryckaert, J.; Duchateau, L.; Haesebrouck, F. and Chiers, K.**, **2009**. Route of entry and tissue distribution of Yersinia ruckeri in experimentally infected rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Diseases of aquatic organisms. Vol. 84, No. 3, pp: 219-228.

۳۷. **Villumsen, K.R.; Neumann, L.; Ohtani, M.; Strøm, H.K. and Raida, M.K., 2014.** Oral and anal vaccination confers full protection against enteric redmouth disease (ERM) in rainbow trout. PLoS One. Vol. 9, No. 4, pp: 938-945.

۳۸. **Wang, E.; Chen, X.; Wang, K.; Wang, J.; Chen, D.; Geng, Y.; Lai, W. and Wei, X., 2016**. Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against Aeromonas hydrophila infection in fish. Fish and shellfish immunology. Vol. 59, pp: 196-202.

۳۹. **Zhang, D.; Pridgeon, J.W. and Klesius, P.H., 2014.** Vaccination of channel catfish with extracellular products of *Aeromonas hydrophila* provides protection against infection by the pathogen. Fish and shellfish immunology. Vol. 36, No. 1, pp: 270-275.

(DOI): 10.22034/aej.2020.119247

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 3, Autumn 2020

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


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


Received: May 2019 Accepted: August 2019

**Keyword:** Rainbow trout, Yersiniosis, LPS, Immunization

# Abstract

Regarding the importance of yersiniosis in the country and the necessity of vaccination of fish, in this study, the effects of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide on the efficacy and immunity of *Yersinia ruckeri* bacterin were evaluate. 480 pieces of fish (7±1.2 g) were randomly divided into ۸equal groups, each group was divided into three replicates (20 fish/ replicate). Group A, B and C were fed with LPS (300µg/kg/Bw), LPS+bacterin ($10^9$ cfu/g) and bacterin respectively in the first and third weeks of the study. In the immersion group (D), the fish were immersed in the bacterial suspension ($10^9$ cfu/ml) for 2 minutes at 0 and 14 days. The injection groups (E, F and G) were immunized by intraperitoneal route with ($10^{10}$ cfu/ml), LPS (300 µg /ml) and bacterin+LPS respectively, and on days 0, 30 and 60 blood and serum samples were prepared then blood and immune parameters were compared between immunized fish. The results showed that injection of bacterin+LPS significantly improved the stimulation of nonspecific and specific immunity factors in most groups ($P<0.05$) The efficacy of bacterin +LPS in the oral treatment was similar to immersion immunization and was significantly lower than the injection method ($P<0.05$). The results of the current study showed that adding LPS to bacterin, in addition to improving the efficacy of the vaccine by injection and oral administration, also increased their immunization. Therefore, after supplementary studies, it can be used as an appropriate and economical candidate for the preparation of the economical vaccine in trout.

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