بررسی میزان ایمنی واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* خوراکی و تزریقی در ماهی انگشت‌قد کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)

- **امیر آرامون***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **مجتبی علیشاهی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مسعود قربانپور**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

علی‌رغم مزیت‌های فراوان واکسن‌های خوراکی، به‌دلیل تخریب آنتی ژنی در دستگاه گوارش ماهی، این واکسن‌ها کارایی پایینی داشته و کاربرد چندانی در آبزی‌پروری نیافته‌اند. کیتین یک پلیمر طبیعی است که باکتری آئروموناس می‌تواند فیلم زیستی (Biofilm) از آن ایجاد نماید که باعث مقاومت باکتری در برابر اسید معده و سیستم آنزیمی روده می‌گردد. ابتدا واکسن بیوفیلم آئروموناس هیدروفیلا تولید گردید و سپس کارایی واکسن تجویز خوراکی و تزریقی آن در ماهی کپورمعمولی ارزیابی گردید. به‌این منظور، ۷۰۰ عدد ماهی کپور ۱۴±۴۶ گرمی، به ۹ تیمار مساوی در سه تکرار به‌صورتی تقسیم گردید که تیمار اول تا چهارم به‌ترتیب با واکسن بایوفیلم، باکترین، کیتین+ محیط کشت و کیتین، به‌روش خوراکی ایمن شدند، تیمار پنجم تا هشتم به‌همین صورت به‌روش تزریقی ایمن شدند، تیمار نهم بدون تجویز واکسن به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ماهیان هر تیمار در روز ۶۰ با غلظت مک فارلند ۸ (۲/۴×۱۰۹CFU/mL) LD50 باکتری آئروموناس هیدروفیلا تزریق گردیدند. میزان تلفات در مدت ۱۰روز ثبت گردید و درصد بقای نسبی (RPS) هر تیمار مشخص گردید. نتایج حاصل نشان داد که بالاترین میزان RPS به‌ترتیب مربوط به بایوفیلم تزریقی، بایوفیلم خوراکی و باکترین تزریقی بود که به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بودند (P<۰/۰۵). در واکسن تزیقی RPS تحت تاثیر بایوفیلم قرار نگرفت و هر دو تیمار باکترین و بایوفیلم معنی‌دار بودند (P=۰/۰۸۹)، هر چند در واکسن خوراکی RPS به‌طور معنی داری تحت تاثیر بایوفیلم قرارگرفت و تیماربایوفیلم نسبت به بقیه تیمارها بازماندگی بیش‌تری داشت (P<۰/۰۵).

کلمات کلیدی: واکسن بایوفیلم، ماهی کپورمعمولی *Cyprinus carpio*، *آئروموناس هیدروفیلا*، ایمنی‌زایی

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

مقدمه

پیشگیری از بیماری‌ها در بحث آبزیان اهمیت فراوانی دارد، از طرفی استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها نیز باعث آلودگی محیط و مقاومت باکتریایی می‌گردد، لذا بهترین روش، تولید واکسن برای آبزیان به‌شمار می‌آید (Schjørring وKrogfelt، ۲۰۱۱). استفاده از واکسن‌های خوراکی در آبزیان، به‌دلیل سهولت تجویز، هزینه و استرس کم تجویز و امکان استفاده در دوره‌های مختلف زندگی ماهی، مزیت بالایی نسبت به سایر روش‌های تجویز دارند، ولی مهم‌ترین مشکل این روش، کارایی کم واکسن‌ها می‌باشد. یکی از دلایل اصلی کارایی پایین این روش، تخریب آنتی‌ژن در لوله گوارش، قبل از جذب شدن در روده می‌باشد (Azad و همکاران، ۲۰۰۰) ، لذا استفاده از موادی که قابلیت محافظت آنتی‌ژن در فضای لوله گوارش تا قبل از جذب را داشته باشند، به افزایش کارایی واکسن‌های خوراکی کمک می‌کند. واکسن‌های خوراکی تحت تأثیر آنزیم‌های گوارشی و شرایط اسیدی معده قرار می‌گیرند و تخریب می‌گردند که این آنزیم‌های گوارشی تحت تأثیر دما، ترکیبات بیوشیمیایی غذا، سن، گونه ماهی و فصل هستند (Kuz'mina، ۱۹۹۶ و ZamboninoInfante و Cahu، ۲۰۰۱). کیتین از مواد استحصال شده از پوسته میگو و سایر سخت پوستان می‌باشد، که در تحریک سیستم ایمنی دخالت دارد و به‌عنوان یک یاور واکسن (Adjuvant) عمل می‌نماید (Kawakami و همکاران، ۱۹۹۸). Nishimuraوهمکاران (۱۹۸۶) و Tokura و همکاران (۱۹۹۹) بیان کردند که کیتین در غذا باعث افزایش سیتوکنین‌هایی (که در فرایند فراخوانی سیستم ایمنی ماهی می‌شوند) از قبیل IL-1, IL-12, IL-18، TNFα و IFNα به‌صورت مستقیم و افزایش NF سلول‌ها به‌صورت غیرمستقیم شده است. از طرفی *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در ماهیان پرورشی ایران است. مطالعه اخیر آهنگرزاده و همکاران (۱۳۹۴) روی ۲۰۰ قطعه کپور ماهیان پرورشی (۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه آمور) ۳۱ جدایه از ۱۲۵ جدایه با روش‌های بیوشیمیایی و ردیابی ژن‌های PCR هیدروفیلا شناسایی گردیدند. نتایج نشان داد که میزان نقش آئروموناس‌ها و *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان دارای علایم بررسی ۱۵ درصد بود. علیشاهی و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه باکتریایی آئروموناس‌ها بر کپور علف‌خوار در استان خوزستان میزان آلودگی به ۱۱ درصد (*آئروموناس هیدروفیلا*) و ۴ درصد (*آئروموناس ورونی*) و ۲/۵ درصد (*آئروموناس سوبریا*) گزارش کردند. لذا تلاش‌های متعددی برای تولید واکسن (به‌ویژه واکسن‌های منطقه‌ای (Local)) برای جلوگیری از این عفونت آئروموناسی در کپور ماهیان ارائه شده است. مناسب‌ترین روش تجویز واکسن (در صورت کارایی بالا) تجویز خوراکی است، ولی تغییرات آنتی‌ژن‌های واکسن در لوله گوراش ماهی باعث کارایی پایین این روش تجویز شده‌است. یکی از روش‌های محافظت آنتی‌ژن‌های واکسنی در شرایط دستگاه گوارش ماهی، استفاده از تکنیک بایوفیلم می‌باشد (Azad و همکاران، ۲۰۰۰). در این روش با استفاده از یک بستر مناسب که معمولاً از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب‌پذیر (Biodegradable) هستند، باکتری به‌صورت مجتمع درآمده و توسط بستر پلیمری در شرایط دستگاه گوارش محافظت می‌شود و نهایتاً آنتی‌ژن‌های واکسنی سالم‌تر و با توان ایمنی‌زایی بهتر در اختیار سیستم ایمنی مخاطی ماهی قرار داده می‌شوند. لذا در این تحقیق تأثیر تشکیل بایوفیلم کیتین بر کارایی واکسن خوراکی و تزریقی *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپورمعمولی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه واکسن: آماده‌سازی بایوفیلم واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* طبق روش Azad و همکاران (۱۹۹۹) صورت گرفت. به‌طور خلاصه در این روش بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* روی سوبسترای کیتین (٪۰/۳w/v) در محیط TSB (٪۰/۲۲۵w/v) ایجاد گردید. کیتین از شرکت تولید و فراوری کیتین و کیتوزان گلمکانی در مشهد خریداری و همراه باکتری‌های بایوفیلمی به‌مدت ۴ روز و هر روز ۶ ساعت در دستگاه شیکر (shaker) با دور ۱۲۰ بار در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا باکتری روی بایوفیلم کیتین کاملاً مستقر گردد، سپس این بایوفیلم با سانتریفیوژ g ۳۰۰۰ به‌مدت ده دقیقه از محیط کشت جدا شده و دوباره با بافر نمک فسفات (۰/۱M PBS، PH= ۷/۲) شستشو گردید. بعد از شمارش باکتری در بایوفیلم، برای غیرفعال کردن باکتری به‌مدت ۵۰ دقیقه در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به‌مدت ده دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محصول نهایی به‌عنوان واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* در واکسن خوراکی و تزریقی (تیمار اول و پنجم) مورد استفاده قرار گرفت. برای اطمینان از تاثیر بایوفیلم کیتین در کارایی باکترین، محیط کشت و کیتین بدون اضافه نمودن باکتری به‌مدت ۴ روز با شرایط مشابه انکوبه گردیدند و تمام روند آماده‌سازی واکسن بایوفیلم هم در مورد آن‌ها اعمال گردید (تیمارهای ۳ و ۷). برای تهیه واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* بدون بایوفیلم نیز، ابتدا باکتری‌ها به‌مدت ۱ روز در محیط TSB کشت داده شد و با دور g ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس با بافر نمک فسفات (PH=۷/۲, ۰/۱M PBS) سه بار شستشو گردید. سپس دوباره در PBS محلول می‌گردد و تا به غلظت مورد نیاز (۱۰۱۰ml-1) آماده گردد. باکتری‌های آزاد به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد

غیرفعال گردید (تیمارهای ۲ و ۶). در تجویز تزریقی واکسن‌ها (سرنگ ۱میلی‌لیتر)، غلظت واکسن ۱۰۱۰باکتری در هر میلی‌لیتر (باکتری و PBS استریل) تنظیم و به هر ماهی ۲۰۰ میکرولیتر میانگین به‌روش داخل صفاقی تزریق گردید، برای تجویز خوراکی واکسن‌ها، تعداد باکتری براساس ۱۰۱۰CFU/g تنظیم گردیدو به‌مدت ۱۰روز به‌ماهی‌ها تجویز شد. کیفیت بایوفیلم واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* بررسی گردید. واکسن بایوفیلم و واکسن معمولی به‌صورت یکنواخت با خوراک ماهی مخلوط شده و در طی دوره واکسیناسیون استفاده گردید.

نحوه ایمن‌سازی: تعداد ۷۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن ۳۲±۱۱ گرم در دمای۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد و شوری ۰/۱±۰/۸ گرم برلیترو ۱تا۲٪ غذادهی‌روزانه (شرکت کیمیاگران تغذیه)به‌وزن ۱۴±۴۶ گرم در مدت ۶۰ روز رسید و سپس به‌صورت زیر به ۹ تیمار در ۳ تکرار ۲۰ عددی در شرایط مشابه به‌شرح زیر تیماربندی شد:

تیمار	روش تجویز واکسن	نوع واکسن	تعداد تکرار و تعدادماهی
اول	خوراکی	بایوفیلم	۳ تکرار ۶۰ ماهی
دوم	خوراکی	باکترین (بدون بایوفیلم)	۳ تکرار ۶۰ ماهی
سوم	خوراکی	کیتین و محیط کشت فاقد بایوفیلم	۳ تکرار ۶۰ ماهی
چهارم	خوراکی	کیتین	۳ تکرار ۶۰ ماهی
پنجم	تزریقی	بایوفیلم	۳ تکرار ۶۰ ماهی
ششم	تزریقی	باکترین (بدون بایوفیلم)	۳ تکرار ۶۰ ماهی
هفتم	تزریقی	کیتین و محیط کشت فاقد بایوفیلم	۳ تکرار ۶۰ ماهی
هشتم	تزریقی	کیتین	۳ تکرار ۶۰ ماهی
نهم	کنترل	بدون تجویز واکسن	۳ تکرار ۶۰ ماهی

در روش خوراکی ماهی‌ها به‌مدت ۱۰ روز خوراک حاوی واکسن (۱۰۱۰ CFU/g) تغذیه شدند، در روش تزریقی، میانگین ۲۰۰ میکرو لیتر از غلظت ۱۰۱۰ باکتری به‌ازای هر ماهی بدون بی‌هوشی ماهی و به‌صورت‌داخل‌صفاقی‌تزریق‌گردید(Abhiman، ۲۰۱۴).(تیمار باکترین نیز به‌همین میزان تجویز گردید و تیمارهای کیتین و بایوفیلم تشکیل نشده نیز کیتین به‌همان میزان استفاده شده در واکسن تجویر گردید).

محاسبه LD۵۰ (Lethal Dose %۵۰): قبل از انجام مطالعه اصلی طی مراحل زیر میزان کشندگی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* برای ماهی کپورمعمولی محاسبه گردید. برای این‌کار *آئروموناس هیدروفیلا* به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TSB کشت داده شد. پس از آن محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ و رسوب ته لوله سه بار با سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد شست‌وشو داده شد. پس از آن به باکتری‌ها آن‌قدر سرم فیزیولوژیک اضافه گردید تا کدورتی معادل لوله شماره ۱۰ مک‌فارلند (۳×۱۰۹ CFU/ml) حاصل شود. سوسپانسیون حاصل به‌نحوی رقیق گردید تا ۵ گروه سوسپانسیون‌های ۱×۱۰۵ تا ۱×۱۰۹ به‌دست آمد. از هر رقت از باکتری به ۱۰ قطعه ماهی کپور با وزن حدود ۶±۳۸ گرم به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید، به گروهی نیز به‌عنوان شاهد تنها سرم فیزیولوژیک استریل تزریق شد. تلفات هر رقت به‌مدت سه روز ثبت وپس از مرگ ماهی‌ها، سریعاً با کشت اندام‌های داخلی، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی(*آئروموناس هیدروفیلایی*) اطمینان حاصل شد. نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار Probit analysis، اقدام به محاسبه LD۵۰ گردید (Alishahi و همکاران ۲۰۱۰).

چالش باکتریایی: بعد از پایان روز ۶۰ (با احتساب ۱۰روزه تجویز خوراکی)، سی ماهی از هر تیمار (ده ماهی از هر تکرار) با غلظت LD۵۰ سه روزه (که معادل ۸ مک فارلند (۲/۴×۱۰۹CFU/mL) به‌دست آمد) از *آئروموناس هیدروفیلا* که در بند پیش محاسبه گردید به‌روش داخل صفاقی و در دمای ۱±۲۸درجه سانتی‌گراد مورد چالش قرار گرفت (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰) و به‌مدت ده روز تلفات در تیمارها ثبت گردید، براساس نسبت تلفات در تیمارها به تیمار شاهد درصد بقای نسبی (RPS) با استفاده از فرمول زیر برای هر تیمار محاسبه گردید:

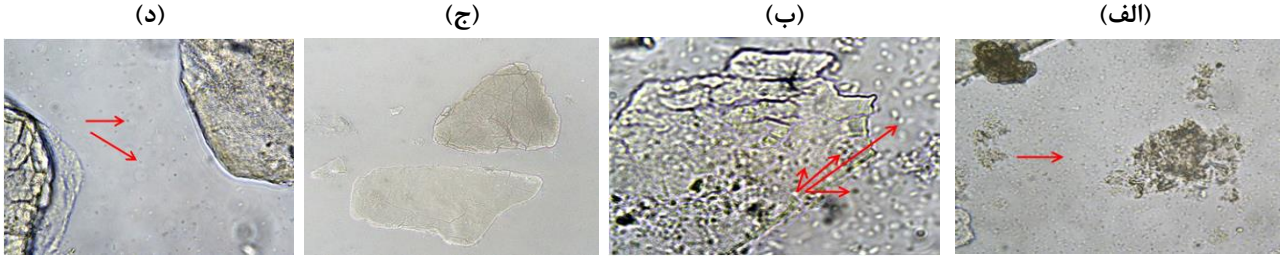
$$RPS = ۱ - \frac{\text{\%تلفات تیمار مورد نظر}}{\text{\%تلفات ماهی شاهد}} * ۱۰۰$$

آنالیز آماری: برای محاسبه LD۵۰ از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۹و برنامه Probit استفاده گردید، در این برنامه با توجه به همبستگی بین لگاریتم غلظت باکتری و تلفات در هر غلظت، تخیمنی (با ضریب اطمینان ۹۵٪) از غلظتی که ایجاد ۵۰٪ تلفات در ماهی‌ها را می‌نماید، داده می‌شود. تفاوت RPS تیمارها (میانگین سه تکرار) با نرم‌افزار SPSS و روش ANOVA یک‌طرفه بررسی شد. هم‌چنین از آزمون دانکن برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها استفاده گردید (P<۰/۰۵).

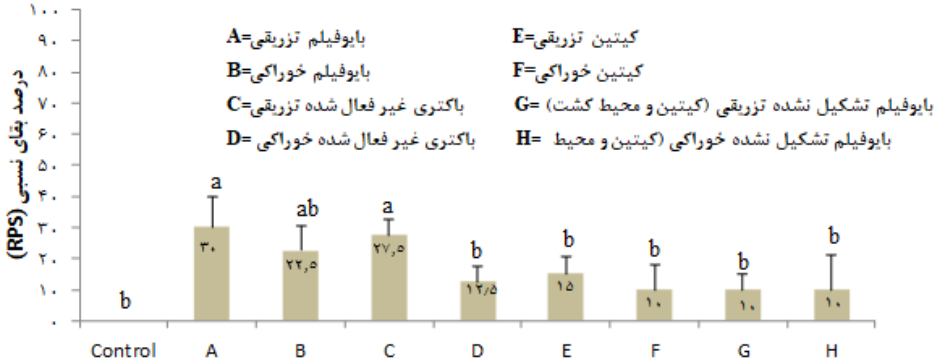
نتایج

بعد از کشت باکتری در محیط کشت به‌همراه کیتین، از تمام مراحل قبل از شستشو، بعد شستشو و ورتکس شدید (Vortex) با میکروسکوپ فازکنتراست عکس‌برداری صورت گرفت(شکل ۱). (نتایج مربوط به درصد بقای نسبی ماهی‌ها در تیمارهای تحقیق در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طورکه در شکل مشاهده می‌گردد، درصد بقای

نسبی (RPS) در تیمار واکسن تزریقی همراه بایوفیلم بالاترین میزان را داشت، که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) هر چند تفاوت معنی‌داری با تیمار باکترین تزریقی (بدون بایوفیلم) نداشت (P=۰/۰۸۹). در بین تیمارهای خوراکی فقط تیمار خوراکی همراه بایوفیلم، بهبود RPS نسبت به تیمار شاهد را نشان داد (P<۰/۰۵). سایر تیمارهای خوراکی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (P=۰/۰۸۹). در مقایسه تیمارهای تزریقی و خوراکی، تیمار واکسینه شده با واکسن بایوفیلم به‌روش خوراکی باعث ایجاد محافظت (RPS=۲۲/۵٪) قابل مقایسه با روش تزریقی (باکترین RPS=۲۷/۵٪ و بایوفیلم RPS=۳۰٪) شده است.



شکل۱: الف) میکروسکوپ فاز کنتراست ۴۰X باکتری و کیتین در محیط کشت قبل از فرآیند شستشو. ب) میکروسکوپ فاز کنتراست ۱۰۰X باکتری و کیتین در محیط کشت قبل از فرآیند شستشو. ج) میکروسکوپ فاز کنتراست ۱۰X فلاک‌های کیتین. د) میکروسکوپ فاز کنتراست ۴۰X باکتری و کیتین در محیط کشت بعد از شستشو و ورتکس شدید



شکل ۲: نمودار درصد بقای نسبی (RPS) در چالش باکتریای *آئروموناس هیدروفیلا* به‌مدت ده روز در تیمارهای تزریقی و خوراکی در ماهی کپورمعمولی

شکل ۳: ماهی‌های کپور در معرض چالش باکتریایی *آئروموناس هیدروفیلا* به‌روش داخل صفاقی همراه با خونریزی و پتشی در نواحی شکم

بحث

نتایج تحقیق جاری نشان داد که روش به‌کار رفته در تحقیق برای تولید بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* کاملاً موفق بوده و با بررسی میکروسکوپی مراحل مختلف تشکیل بایوفیلم مشخص شد که علاوه بر تشکیل بایوفیلم کیتین، باکتری به‌خوبی در بایوفیلم مستقر گردیده است. که وضعیت باکتری‌های زنده در بایوفیلم کیتین به‌خوبی زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مشخص بود (شکل۱(ب)). در تحقیق Abhiman (۲۰۱۴) و Azad و همکاران (۲۰۰۰) نیز روش تولید واکسن بایوفیلم باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از کیتین مشابه تحقیق حاضر انجام شد، آن‌ها نیز با تولید واکسن بایوفیلم باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* کارایی مناسب این روش در تهیه بایوفیلم را گزارش نمودند. در مورد مقایسه کارایی واکسن‌های به‌کار رفته در تحقیق همان‌طورکه در شکل۲ مشخص است بالاترین درصد بقای

نسبی را تیمار واکسینه شده با واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* به‌روش تزریقی (۳۰٪) و خوراکی (۲۲/۵٪) و باکترین تزریقی (۲۷/۵٪) داشت (P=۰/۰۸۳). با توجه به معنی‌داری واکسن بایوفیلم که باکتری و کیتین می‌باشد در مقایسه با باکترین که کیتین ندارد هر دو تیمار معنی‌دار بوده‌اند (شکل۲) لذا نشان می‌دهد که تشکیل بایوفیلم کیتین در کارایی واکسن تزریقی تاثیری نداشته است (P=۰/۰۸۹). با توجه به مکانیسم ایمنی‌زایی آنتی‌ژن واکسنی در روش تزریقی می‌توان چنین نتیجه گرفت که در تحقیق حاضر میزان عرضه آنتی‌ژن و ایمنی‌زایی آنتی‌ژن تحت تاثیر بایوفیلم قرار نگرفته است. هرچند اثرات ایمنی‌زایی کیتوزان (که از مشتقات کیتین است) اثر ادجوانی آن در ماهی گزارش شده است (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۴). ولی به‌نظر می‌رسد با یک بار تجویز تزریقی در ماهی کپور این اثر معنی‌دار نبوده است. شاید با افزایش دفعات تزریق یا دوز آنتی‌ژن و دوز بایوفیلم کارایی واکسن بهبود یابد. در تجویز خوراکی واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپورمعمولی نتایج به‌روش تزریقی متفاوت بود، به‌طوری‌که تجویز خوراکی واکسن بایوفیلم این باکتری باعث افزایش معنی‌دار RPS در گروه بایوفلیم (RPS=٪۲۲/۵) نسبت به تیمار واکسن خوراکی معمولی (RPS=٪۱۰) و نیز گروه شاهد گردید (P<۰/۰۵). در مطالعات Abhiman (۲۰۱۴) میزان RPS در ماهی کپور معمولی و روش واکسن بایوفیلم خوراکی ۸۳/۳۳ درصد و گروه شاهد ۲۰٪ بوده‌است، که به‌نظر می‌رسد از نظر چالش باکتریایی واکسن کارایی بالایی داشته است. هم‌چنین ماهی کاتلا ایمنی بیش‌تری نسبت به کپورمعمولی و روهو داشته است. علاوه بر این براساس درصد بازماندگی در گروه کیتین خوراکی و کیتین و محیط کشت خوراکی با یکدیگر برابر بوده‌اند و اما از گروه شاهد میزان بازماندگی بالاتر بوده است، که به‌نظر می‌رسد کیتین نیز در ایمنی و سلامت ماهی موثر بوده باشد. در مطالعه Esteban و همکاران (۲۰۰۱) با خوراندن به‌مدت دو هفته کیتین به ماهی سی‌باس ((Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) نشان داد که کیتین بر ایمنی غیراختصاصی ماهی اثر مثبت داشته است به‌صورتی که باعث افزایش فعالیت لایزوزیم و فعالیت فاگوسیتوزی و سایتوتوکسیک نشده است اما باعث افزایش معنی‌دار سطح کمپلمان همولیتیک طبیعی شده است. در مطالعه Cuesta و همکاران (۲۰۰۳) با خوراندن ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کیتین به ماهی سی‌باس باعث افزایش معنی‌دار فعالیت فاگوسیتی باکتری *Vibrio anguillarum* شد، اما میزان ۱۰ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر کیتین فعالیت فاگوسیتی معنی‌دار نبود. Nishimura و همکاران (۱۹۸۶) و Tokura و همکاران (۱۹۹۹) بیان کردند که کیتین باعث افزایش سیتوکنین‌هایی از قبیل: IL-1, IL-12, IL-18، TNFα و IFNα به‌صورت مستقیم و افزایش NF سلول‌ها به‌صورت غیرمستقیم شده است. برطبق شکل۲، درصد بازماندگی (RPS) در گروه‌های باکترین خوراکی ۱۲/۵ درصد و بایوفیلم خوراکی ۲۲/۵ درصد به‌دست آمد، که نشان از اثر مثبت کیتین بر ایمنی ماهی و هم‌چنین وجود بایوفیم واثر محافظتی از آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری دارد. Azad و همکاران (۱۹۹۷) میزان ایمنی‌زایی واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* را در ماهی کپور بررسی کردند و بیان کردند که میزان آنتی‌بادی بالا بوده است. Azad و همکاران (۱۹۹۹) میزان RPS در ماهی روهو در دوره ۲۰ روزه واکسن بایوفیلم خوراکی CFU/g ۱۰۱۰ به‌میزان ۶۸/۳ درصد و باکترین به‌میزان ۵۳/۶۶ درصد بود. براساس یک مطالعه دیگر Nayak و همکاران (۲۰۰۴) روی ماهی *Clarias batrachus* که یک ماهی گوشت‌خوار است، با تغذیه ۲۰ روزه ماهی با واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* میزان ضریب بازماندگی ۱۰۰ درصد و باکترین ۳۳/۳۳ درصد به‌دست آمد. در مطالعه حاضر با خوراندن دوره ۱۰ روزه کیتین به‌میزان برابر با تمام گروه‌های واکسن ۰/۳ درصد محیط کشت CFU/g به ماهی کپورمعمولی، با نتایج حاصل هم‌خوانی داشته است و به‌میزان ۲۲/۵ درصد بازماندگی در واکسن خوراکی و ۳۰ درصد بازماندگی در واکسن تزریقی و ۲۷/۵ درصد بازماندگی نیز در گروه باکترین تزریقی بوده است (شکل ۲). Azad و همکاران (۱۹۹۹) با خوراندن واکسن بایوفیلم به ماهیان کاتلا، روهو و کپور معمولی در طی دوره واکسیناسیون ۱۰ روزه و چالش ۲۰، ۴۰، ۶۰ روز بعد از واکسیناسیون با غلظت‌های ۱۰۷، ۱۰۱۰ و ۱۰۱۳ به این نتایج دست یافتند که، میزان درصد بازماندگی بین ماهی کاتلا و کپورمعمولی در روزهای ۱۵ تا ۲۰ تفاوتی وجود ندارد. علاوه بر این، به‌طورکلی هر چه میزان غلظت واکسن و چالش روزهای بعد از خوراندن واکسن افزایش می‌یابد، ایمنی و درصد بازماندگی افزایش می‌یابد. به‌طوری که بیش‌ترین میزان بازماندگی در روز ۶۰ بود و در ماهی کپور بازماندگی در زمان ۴۰ و ۶۰ روز بود. هم‌چنین میزان ایمنی آنتی‌بادی کاتلا و روهو نیز از کپورمعمولی بیش‌تر بوده است و با درصد بازماندگی رابطه مستقیم دارد و هرچه تیتر آنتی‌بادی بالاتر باشد بازماندگی ماهیان بالاتر بوده است. در مطالعه حاضر نیز روز ۶۰ برای چالش باکتریایی و بررسی میزان بازماندگی ماهیان و کارایی واکسن انتخاب گردید. علاوه بر این در این مطالعه براساس درصد بازماندگی ماهیان کارایی واکسن تزریقی بایوفیلم به‌علت عدم تخریب آنتی‌ژنی بالاتر از واکسن خوراکی بوده‌است که با مشاهدات Lamers و همکاران (۱۹۸۵) هم‌خوانی دارد. در مطالعه Prabhugouda و همکاران (۲۰۱۴) در ماهی *Channa striatus* مرگ و میر واکسن بایوفیلم خوراکی CFU/g ۱۰۹ به‌مدت ۲۰ روز خوراندن در طی دو و سه روز به ۵۰ درصد می‌رسد که در مطالعه Lio-po و همکاران (۱۹۹۸) با همین دوز واکسن ۳ تا ۴ روز به این میزان تلفات رسیده است. هم‌چنین در مطالعه Prabhugouda و همکاران

(۲۰۱۴) بازماندگی در گروه‌های شاهد ۲۸ درصد و گروه واکسن بایوفیلم ۹۲ درصد و گروه باکترین ۴۹/۳ درصد بوده است. به نظر می‌رسد میزان بازماندگی ماهیان مختلف با خوراندن واکسن بایوفیلم بیش‌تر از مطالعات حاضر می‌باشد که می‌تواند از دلایل آن سویه باکتریایی و حدت آن، بیش‌تر بودن دوره خوراندن واکسن یعنی ۲۰ روز و نوع ماهی و دوز واکسن و نوع و حدت و غلظت بالاتر باکتری برای چالش در نظر گرفت. در مورد افزایش کارایی واکسن بایوفیلم خوراکی می‌توان علت افزایش کارایی واکسن بایوفیلم را در حفظ بهتر ماهیت آنتی‌ژنیک باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در طول دستگاه گوارش دانست. تشکیل بایوفیلم باعث تجمع لایه‌های متعدد باکتری در یک پارانشیم کیتینی می‌گردد که عوامل ضدباکتریایی، به‌ویژه اسید معده و آنزیم‌های گوارشی فقط توانایی تاثیر بر لایه یا لایه‌های سطحی بایوفیلم را دارد و لایه‌های میانی با عبور از معده و ابتدای روده، با حفظ ویژگی آنتی‌ژنیک به‌محل جذب آنتی‌ژن‌های روده می‌رسند. لذا با کارایی بهتر در روده توسط سلول‌های فاگوسیت کننده سیستم ایمنی جذب شده و باعث القای ایمنی موثرتری می‌شوند. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که واکسن بایوفیلم خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* (تیمار B) میزان محافظت بیش‌تری نسبت به واکسن خوراکی معمولی (تیمار D) این باکتری در برابر چالش با باکتری حاد *آئروموناس هیدروفیلا* داشته است و می‌توان از این روش برای افزایش کارایی واکسن خوراکی این باکتری بهره برد. هرچند واکسن بایوفیلم در روش تزریقی تاثیری در کارایی واکسن نداشته و واکسن بایوفیلم روش مناسبی برای افزایش کارایی واکسن تزریقی نیست.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل پژوهانه نگارندگان مقاله انجام گرفت.

منابع

۱. **آهنگرزاده م.؛ قربانپور، م.؛ پیغان، ر.؛ شریف‌روحانی، م. و سلطانی، م.**، ۱۳۹۴. نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان پرورشی استان خوزستان. دوره ۱۱، شماره۳، صفحات ۵ تا ۱۶.

۲. **علیشاهی، م.؛ سلطانی، م. و زرگر، ا.، ۱۳۸۸.** بررسی باکتریایی تلفات ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) در استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۴، شماره ۵، صفحات ۲۵ تا ۳۴.

۳. **Abhiman, M.F.S., 2014.** Effect of *Aeromonas hydrophila* biofilm oral vaccine on gut immunity of carps. Phd Thesis Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar. 86 P.

۴. **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. Vol. 8, No. 2, pp: 125-133.

۵. **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. Vol. 4, No. 3, pp: 189-195.

۶. **Azad, I.S.; Shankar, K.M.; Mohan, C.V. and Kalita, B., 2000.** Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination antigen localization by a monoclonal antibody. Disease of Aquatic Organisms. Vol. 43, pp: 103-108.

۷. **Azad, I.S.; Shankar, K.M.; Mohan, C.V. and Kalita, B., 1999.** Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. Fish and shellfish immunology. pp: 519-528.

۸. **Azad, I.S.; Shankar, K.M. and Mohan, C.V., 1997.** Evaluation of an *Aeromonas hydrophila* biofilm for oral vaccination of carps. In: Flegel TW, McRae IH (eds) Diseases in Asian aquaculture III. Fish health section, Asian Fisheries Society, Manila. pp: 519-528.

۹. **Cuesta, A.M.; Esteban, A. and Meseguer, J., 2003.** In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 1, pp: 1-11.

۱۰. **Esteban, M.A.; Cuesta, A.; Ortuno, J. and Meseguer, J., 2001.** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 11, pp: 303-315.

۱۱. **Kawakami, H.; Shinohara, N. and Sakai, M., 1998.** The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. Fish Pathology. Vol. 33, pp: 287-292.

۱۲. **Kuz'mina, V.V.; Golovanova, I.L. and Izvekova, G.I., 1996.** Influence of temperature and season on some characteristics of intestinal mucosa carbohydrates in six freshwater fishes. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 113, pp: 255-260.

۱۳. **Lamers, C.H.J.; De Haas, M.J.M. and Van Muiswinkel, W.B. 1985.** Humoral response and memory formation in carp *Cyprinus carpio* after injection of *Aeromonas hydrophila* bacterin. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 9, pp: 65-76.

۱۴. **Lio-po, G.D.; Albright, L.J.; Michel, C. and Leano, E.M., 1998.** Experimental induction of lesions in snakeheads (*Ophicephalus striatus*) and catfish (*Clarias batrachus*) with *Aeromonas hydrophila*, *Aquaspirillum sp*., *Pseudomonas* sp. and *Streptococcus* Sp. J Appl Ichthyol. Vol. 14, pp: 75-59.

۱۵. **Muzzarelli, R.A.A., 1999.** Chitin and chitinases. Switzerland: Birkha¨user Verlag Basel. pp: 279-292.

۱۶. **Nayak, D.K.; Asha, A.; Shankar, K.M. and Mohan, C.V., 2004.** Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachusda* carnivore model. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 16, pp: 613-619.

۱۷. **Nishimura, K.; Ishihara, C.; Ukei, S.; Tokura, S. and Azuma, I., 1986.** Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. Vaccine. Vol. 4, pp: 151-156.

۱۸. **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 and Shellfish Immunology. Vol. 41, pp: 581-585

۱۹. **Schjørring, S. and Krogfelt, K.A., 2011.** Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. Inter J Microbiol. pp: 1-10.

۲۰. **Tokura, S.; Tamura, H. and Azuma, I., 1999.** Immunological aspects of chitin and chitin derivatives administered to animals. In: Jolles. Vol. 87, pp: 279-292.

۲۱. **Zambonino, I.J.L. and Cahu, C.L., 2001.** Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp Biochem Physiol. Vol. 130, pp: 477-487.