**ارزیابی محیط هایپراسموتیک بر عملکرد واکسن یرسینیا راکری " *Yersinia ruckeri*"به روش حمام در فیل ماهی جوان (Huso huso)**

**حمید رضا طبیبی1، رضا افشار مقدم1، عبداسلام حاتمی ژارآباد1، سیامک یوسفی سیاه­کلرودی2، سمیه نمرودی3، محمد مازندرانی1\***

1. گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
2. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
3. گروه محیط زیست - دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان- ایران

mazandarani57@gmail.com

**چكيده**

در این بررسی وضعیت عملکرد واکسن *یرسینیا راکری* (*Yersina* *ruckeri*) در روش حمام و تزریق در فیل ماهی (*Huso* *huso*) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا شش گروه آزمایشی شامل گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق (تیمار1)، گروه ماهیان دو مرحله واکسینه شده به روش محیط هایپر اسموتیک + حمام (تیمار2)، گروه ماهیان دو مرحله واکسینه شده (تیمار3)، گروه ماهیان یک مرحله واکسینه شده به روش محیط هایپر اسموتیک + حمام (تیمار4)، گروه ماهیان یک مرحله واکسینه شده به روش حمام (تیمار5) و ماهیان گروه شاهد (تیمار6) مهیا گردید. برای هر گروه از ماهیان دو تکرار و برای هر تکرار 10 عدد ماهی نظر گرفته شد. بچه ماهیان مورد بررسی با میانگین وزن اولیه 5/1 ± 6/24 در تانک های فایبرگلاس با حجم آب حدود 140 لیتر معرفی شدند. در این بررسی واکسیناسیون مرحله دوم برای ماهیان گروه واکسینه دومرحله‌ای21 روز پس از واکسیناسیون دوره اول صورت گرفت و نمونه برداری‌ها و نیز مواجهه باکتریایی 42 روز پس از اولین واکسیناسیون صورت گرفت. بر اساس نتایج مقادیر پروتئین کل و ایمنوگلوبولین سرم تیتر آنتی بادی سرمی بر علیه *یرسینیا راکری* در ماهیان واکسینه شده به روش تزریق بالاتر از سایر تیمارها اندازه گیری شد(05/0 ≥ *P*)، اما در ماهیان واکسینه شده به روش حمام اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت(05/0 ˃ *P*). بالاترین میزان تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) در ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و سپس در ماهیان واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای مشاهده شد (05/0 ≥ *P*)، در ماهیانی که یک مرحله واکسن به روش حمام دریافت نمودند اختلاف معنی‌دار با ماهیان گروه شاهد مشاهده نگردید(05/0 ˃ *P*). در مواجهه باکتریایی بالاترین میزان تلفات مربوط به ماهیان گروه شاهد (8/77 %) و پایین ترین میزان تلفات مربوط به ماهیان واکسینه شده به روش تزریق (33 %) ثبت گردید. در بررسی آنزیم‌های کبدی آلکالاین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) هیچ اختلاف معنی داری در تمامی گروه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. در این بررسی یک مرحله واکسن به روش حمام ایمنی مناسبی در فیل ماهیان ایجاد نکرد و در عین حال بهترین کارآیی برای این واکسن بدون عوارض ناشی از تزریق مربوط به واکسیناسیون به روش تزریق می‌باشد.

***کلمات کلیدی*:** *یرسینیا راکری*، *Huso* *huso*، واکسیناسیون، مواجهه باکتریایی، تیتر آنتی­بادی

**مقدمه:**

ماهیان خاویاری از جمله با ارزشترین ماهیان اقتصادی در دنیا محسوب می‌شوند که گذشته سهم بسیار بالایی را به لحاظ اقتصادی در صنعت شیلات کشور دارا بوده است، البته این مبحث بیشتر مربوط به صید ماهیان خاویاری از دریای خزر و صادرات خاویار دریایی بود اما به دلایل مختلف ازجمله فروپاشی شوروی و عدم رعایت اصول صید توسط کشورهای حاشیه خزر، آلودگی دریا، از بین رفتن منابع طبیعی بازسازی ذخایر و .... روند صید از دریا به شدت کاهش یافت به گونه ای که میزان صید از 1789 تن ماهی خاویاری در سال 1370 به 13 تن در سال 1400 رسیده است (سالنامه آماری شیلات ایران 1401). به همین دلیل در سالهای اخیر پرورش ماهی خاویاری در کشور در اولویت قرار گرفته و همه ساله آمار تواید رو به افزایش بوده است بر اساس آمار شیلات ایران میزان استحصال ماهیان خاویاری پرورشی در کشور از 2146 تن در سال 1395 به 3145 تن در سال 1400 رسیده است و در 21 استان کشور در حال حاضر پرورش ماهیان خاویاری صورت می‌گیرد (سالنامه آماری شیلات ایران 1401). فیل ماهی یکی از از با ارزشترین و بزرگترین گونه پرورشی در کشور است که از اقبال بیشتری در بین پرورش‌دهندگان برخوردار است. آنچه مسلم است محیط‌های پرورش و بخصوص پرورش متراکم محیطی بسیار استرس‌زا برای ماهی است و این استرس باعث کاهش عملکرد سیستم ایمنی ماهی می‌شود که با بروز بیماری‌های مختلف ویروسی، قارچی و باکتریایی همراه است (Elnoby et al., 2021).

یکی از بیماری‌های شایع در کشور که بطور گسترده مزارع ماهیان سردابی دچار مشکل نموده است بیماری ناشی از باکتری *Yersinia ruckeri* بوده و معمولاً به صورت عمومی و سیستماتیک با علایم کلینیکی گسترده ماهیان رادرگیر نموده و خسارات فراوانی به این مزارع وارد می‌سازد (Tobback et al., 2009). این بیماری در طیف وسیعی از ماهیان پرورشی و غیرپرورشی در نقاط مختلف دنیا گزارش گردید (,Bøgwald and Dalmo, 2019). برخی از محققین بر این باور هستند که آزادماهیان حساسیت بالاتری نسبت به سایر گونه‌ها به این بیماری دارند (Furones et al., 1993). در ایران این بیماری این بیماری برای در سال 1999 از مزارع ماهیان سردابی رویت و گزارش شد (Soltani, et al., 1999)، پس از آن از از نقاط مختلف کشور برای مزارع سردابی گزارش شد (فریدفرد و سیمین، 2014; سلطانی و همکاران، 2014). با توجه به حساسیت ماهیان خاویاری و حضور بیماری در منطقه، بروز این بیماری در مزارع خاویاری در صورت عدم مدیریت بهداشتی اجتناب ناپذیر است، در این راستا واکسیناسیون یکی از مناسب‌ترین و به‌صرفه ترین روش در کنترل بیماری‌ها محسوب می‌شود که در تمام مزارع پرورشی مدرن در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. واکسیناسیون برای آبزیان عمدتاَ به سه روش خوراکی، حمام و تزریق بکار گرفته می‌شود که بالاترین کارآیی مربوط به روش تزریق است اما به دلیل عوارض ناشی از تزریق و استرس وارده به مزارع و نیز لزوم حضور نیروی متخصص سایر روش‌ها از اقبال بیشتری برخوردار است در این راستا بررسی‌های متعددی برای افزایش کارآیی واکسیناسیون به این روش‌ها پیشنهاد شده است که یکی از این پیشنهادات استفاده از محیط هایپراسموتیک پیش از واکسیناسیون در محیط آب شیرین است (Du et al., 2017).

با توجه به شیوع بالای یرسینیوزیس در مزارع ماهیان پرورشی در کشور و اهمیت بالای پرورش ماهیان خاویاری و نیز لزوم کنترل بیماری‌های شایع در واکسیناسیون امری اجتناب ناپذیر است لذا در این راستا پیشنهاد نحوه بکارگیری واکسن در مزارع ماهیان خاویاری می‌تواند مفید واقع گردد در این بررسی عملکرد واکسن یرسینیا راکری در بچه ماهیان خاویاری فیل ماهی در دو روش حمام و تزریقی و تاثیر بکارگیری محیط هایپراسموتیک بر عملکرد آن مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش کار:**

**تهیه بچه ماهی و شرایط پرورش**

به منظور انجام آزمایش 120 بچه فیل ماهی پرورشی با میانگین وزنی 5/1 ± 6/24 از یکی از مزارع پرورشی استان مازندران تهیه گردیده و با ماشین حمل ماهی به همراه هواده به محل آزمایش منتقل گردید ماهیان مذکور پس از هم‌دمایی در یک تانک فایبرگلاس با ابعاد 2 × 2 با ارتفاع آبگیری 45 سانتی‌متر منتقل شده و به مدت 48 ساعت نگهداری شدند سپس در 12 تانک فایبرگلاس 200 لیتری با حجم آب 140 لیتر تقسیم شده و به مدت یک هفته به منظور سازگاری با شرایط آزمایش مورد پرورش قرار گرفتند سپس ماهیان تیماربندی شده و بررسی‌های تکمیلی ص.رت پذیرفت. در این دوره ماهیان 2 بار در روز غذادهی شده و 80 درصد آب هر تانک نیز بطور روزانه تعویض گردید

دمای آب در طی دوره آزمایش 5/3 ± 4/21 درجه سانتی‌گراد، سختی آب برابر با .33/0 ± 2/186 میلی­گرم/لیتر، pHبرابر 3/0±1/7 اندازه‌گیری گردید.

**گروه بندی و انجام آزمایش:**

به منظور انجام آزمایش 6 گروه آزمایشی در نظر گرفته شد در این راستا برای هر تیمار نیز دو تکرار تعیین گردید. که به ترتیب شامل گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار1: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق، تیمار2: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای محیط هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام ، تیمار3: گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام ، تیمار4: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام و تیمار5: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای به روش حمام. واکسن مورد استفاده در این بررسی واکسن غیر فعال شده *یرسینیا راکری* ساخت شرکت بوژان تک فارمد بود. این واکسن بصورت سوسپانسیون باکتری غیر فعال بوده بر اساس دستورالعمل شرکت تولید کننده، واکسن به میزان 1/0 با آب پرورش رقیق شده (یک لیتر واکسن در 9 لیتر آب) و به مدت دو دقیقه برای روش حمام مورد استفاده قرار گرفت. .در گروه‌ واکسیناسیون به روش هایپراسمتیک + واکسن ماهیان پیش از واکسیناسیون به مدت 8 دقیقه در محیط آب نمک 15 گرم/لیتر قرار داده شده و بلافاصله بعد از آن واکسیناسیون به روش حمام صورت گرفت. در ماهیام گروه واکسیناسیون به روش تزریق به هر کدام از ماهیان 1/0 سی سی از واکسن را به روش تزریق داخل صفاقی تزریق شد.. در ماهیان گروه واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای 21 روز پس از مرحله اول، واکسن یادآور به روش حمام تکرار گردید. چهار هفته بعد از مرحله دوم واکسیناسیون از 6 عدد ماهی از هر تکرار (12 ماهی از هر تیمار) خونگیری صورت پذیرفت. ببرای بیهوشی ماهیان از محلول یوجینول ببا غلظت 100 (میلی‌گرم/لیتر) استفاده شد و خونگیری با سرسوزن گیج 23 از ساقه دمی انجام گرفت.

### نحوه ارزیابی مواجهه باکتریایی و روند تلفات:

به منظور ارزیابی عملکرد واکسن در مواجهه مستقیم، سویه باکتری *Yersina* *ruckeri* با کد PTCC 1888 (Mazandarani) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بصورت لیوفیلیزه تهیه گردید.

پس از آماده سازی باکتری به روش استاندارد،. بار باکتریایی سوسپاسپانسون بدست آمده به روش کدورت سنجی و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 640 نانومتر و OD برابر با یک تنظیم گردید. که با کشت سطحی در رقت‌های سریالی بر مبنای تشکیل CFUرقت سلول‌های زنده به میران 108 × 1/7 سلول باکتری در هر سی‌سی از سوسپانسیون برای باکتری *یرسینیا راکری* محاسبه شد.. در این راستا 9 ماهی برای هر تیمار در نظر گرفته شد سوسپانسون‌های باکتریایی مذکور به میزان یک دهم با سرم فیزیولوژی رقیق شده و از هر استوک 1/0 سی سی به هر ماهی تزریق گردید. به این منظور ماهیان با داروی بیهوشی یوجینول (100 میلیگرم در لیتر) بیهوش شده و با سرنگ انسولینی و سر سوزن گیج 30 به روش تزریق داخل صفاقی مورد مواجهه قرار گرفته شده و بصورت روزانه مورد مانیتورینگ قرار گرفته شده و تلفات ثبت گردید (مازندرانی و طاهری میرقائد، 1395). 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 به عنوان عامل بیماری جداسازی و تایید گردید.

**تیتر آنتی بادی در برابر باکتری *یرسینیا راکری* به روش میکرواگلوتیناسیون**

تیتر آنتی بادی براساس روش توضیح داده شده توسط Swain و همکاران (2007) انجام شد. به این منظور از پلیت‌های 96 گوده‌ای استفاده گردیدو و رقت سوسپانسیون باکتریایی در این آزمایش CFU/ml108×8 /3 بوده و پس از اضافه شدن این سوسپانسیون پلیت ها به مدت 24 ساعت در دمای اطاق انکوبه شدند. عدد نهایی به به صورت لگاریتم در مبنای 2 عکس بالاترین رقتی که آگلوتیناسیون در آن مشاهده گردید ثبت شد (Swainet al., 2007).

**اندازه‌گیری پارامترهای سرمی**

برای بررسی های سرولوژیکی و خون‌شناسی در ابتدا ماهیان با غلظت 100 (میلی‌گرم/لیتر) یوجینول بیهوش شده و خومگیری از ساقه دمی با سرسوزن گیج 23 و سرنگ‌های 5/2 سی‌سی صورت گرفت. قسمتی از خون به منظور بررسی‌های هماتولوژی در اپندروف‌های حاوی 50 میکرولیتر هپارین منتقل شده و 1‌ سی‌سی از خون نیز به منظور جداسازی سرم در لوله های 2 سی‌سی غیر هپارینه منتقل شد. سرم خون نمونه­ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (15 دقیقه با سرعت 6000 rpm) جدا سازی گردید و اندازه گیری مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی گلوکز، پروتئین، آلبومین، ALP، AST و ALT توسط کیت­های شرکت پارس آزمون صورت گرفت. به این منظور اندازه گیری مقادیر ایمنوگولوبولین کل در ابتدا مقادیر پروتئین کل با استفاده از کیت‌های پارس آزمون و به روش Johnson و همکاران (1999) تعیین شد سپس به سرم پلی‌اتیلن گلیکول اضافه گردید و از اختلاف میزان پروتئین سرم قبل و بعد از ته­نشینی با پلی‌اتیلن‌گلیکول به روش Siwicki و همکاران (1993) مقدار ایمنوگولوبولین محاسبه گردید.

**اندازه­گیری تعداد گلبول‌های سفید (WBC)**

برای اندازه­گیری تعداد گلبول­های سفید (WBC) قسمتی از خون هپارینه شده با محلول دایس به میزان 100 برابر رقیق شد و کمک لام نئوبار و براساس روش استاندارد تعداد گلبول‌های سفید خون در هر میلیمتر مکعب محاسبه شد (Dacie and Lewis, 2001).

**بررسی‌های آماری**

برای تجزیه و تحلیل داده­ها از نرم­افزارهای SPSS18 وExcell 2010 استفاده شد. در این راستا برای تعیین سطوح معنی­داری از آزمون آماری Duncan با درصد اطمینان 95 و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One – Way ANOVA) استفاده گردید.

**نتایج:**

وضعیت زنده‌مانی ماهیان گروه‌های مختلف واکسینه شده به روش تزریق و حمام در مقایسه با ماهیان گروه شاهد در مواجهه با سویه بیماری‌زای باکتری *یرسینیا راکری* در نمودار 1 آورده شده اشت. همانگونه که مشاهده می‌شود 48 ساعت اول پس از مواجهه هیچ تلفاتی در گروه‌های مختلف ماهیان مورد بررسی ثبت نگردید، اولین تلفات در ماهیان گروه شاهد و گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای در محیط هایپراسموتیک + واکسن به روش حمام مشاهده شد. تلفات در تمامی گروه‌های مورد بررسی در طی روزهای بعدی ثبت گردیده و تا روز هفتم پس از مواجهه باکتریایی روند تلفات ادامه داشته و پس از آن تا روز 14 پس از مواجهه این روند تغییری نداشت. همانگونه که مشاهده می‌شود در این بررسی در نهایت پس از مواجهه باکتریایی 8/77 درصد از ماهیان گروه شاهد، 5/55 درصد از ماهیان واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای، 7/66 درصد از ماهیان واکسینه شده در محیط هایپراسموتیک + واکسن به روش حمام، 5/55 درصد از ماهیان هر دو گروه واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای و نیز 33 درصد از ماهیان واکسینه شده به روش تزریق تلف شدند (نمودار1).

**گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار1: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق، تیمار2: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای محیط هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام ، تیمار3: گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام ، تیمار4: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام و تیمار5: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای به روش حمام.**

در بررسی سرولوژی، مقادیر آنزیم آلکالاین فسفاتاز (ALP) در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده به روش حمام و تزریق و نیز ماهیان غیر واکسینه اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (05/0 ≤ P) (نمودار2). در بررسی مقادیر اندازه گیری شده آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) نیز هیچ اختلاف معنی‌داری (05/0 ≤ P) در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده (به روش حمام و تزریق) و نیز ماهیانی که واکسن دریافت نکردند ثبت نشد (نمودار3). همچنین بر اساس نتایج قابل مشاهده در نمودار3، مقادیر آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تماهی ماهیان گروه‌های مختلف واکسینه شده و غیر واکسینه فاقد اختلاف معنی دار بود (نمودار4).

**گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار1: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق، تیمار2: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای محیط هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام ، تیمار3: گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام ، تیمار4: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام و تیمار5: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای به روش حمام**

همچنین در ادامه بررسی‌های سرولوؤی، بالاترین مقادیر پروتئین تام به ترتیب در ماهیان گروه واکسینه شده به روش تزریق و سپس در ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای در محیط هایپراسموتیک + واکسن به روش حمام اندازه‌گیری شد (05/0 ≥ P)، در سایر ماهیان گروه‌های واکسینه شده و ماهیان گروه شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (نمودار5). در بررسی مقادیر ایمنونوگلوبولین سرم خون ماهیان مورد بررسی بالاترین مقدار مربوط به ماهیان گروه واکسینه شده به روش تزریق بود (05/0 ≥ P) در سایر ماهیان گروه‌های واکسینه شده و گروه شاهد اختلاف معنی دار ثبت نشد (نمودار6). همچنین هیچ اختلاف معنی داری در سطح گلوکز خون در گروه‌های مختلف ماهیان در این بررسی اندازه‌گیری نشد (نمودار7)

در بررسی‌های خون‌شناسی تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) در ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و هر دو گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام بطور معنی‌داری بالاتر از سایر ماهیان مورد بررسی بود در این راستا بالاترین میزان در گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و سپس در ماهیان واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای مشاهده شد (05/0 ≥ P) در ماهیان گروه‌های واکسینه شده یک مرحله‌ای و نیز ماهیان گروه شاهد اختلاف معنی‌دار ثبت نشد (نمودار8).

همچنین در بررسی تیتر آنتی بادی سرمی، در تمامی ماهیان واکسینه شده آگلوتیناسیون باکتری *یرسینیا* *راکری* مشاهده شد، در عین حال هیچ تیتری در ماهیان گروه شاهد ثبت نگردید بر اساس این نتایج بالاترین میزان تیتر مربوط به ماهیان گروه واکسینه شده به روش تزریق برای باکتری *یرسینا* *راکری* بوده است (05/0 ≥ P)، پس از آن ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام بالاترین تیتر را داشتند (نمودار9). تیتر آنتی بادی برای ماهیان گروه‌های واکسینه یک مرحله‌ای (تیمار4 و تیمار5) آنقدر کم بوده است که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند (05/0 ˃ P) (نمودار9).

**گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار1: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق، تیمار2: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای محیط هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام ، تیمار3: گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام ، تیمار4: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام و تیمار5: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای به روش حمام.**

**بحث:**

برای واکسیناسیون ماهیان بالاترین کارآیی واکسن مربوط به روش تزریق عنوان شده است اما مشکلات فراوانی برای استفاده از این روش وجود دارد به همین دلیل در بسیاری از موارد پرورش دهندگان، روش حمام یا خوراکی را ترجیح می‌دهند، متاسفانه این روش‌ها کارآیی روش تزریق را ندارد (Bogwald and Dalmo, 2019). در عین حال عوامل همچون زمان حمام دهی و دوز واکسن، سن ماهی و نیز وضعیت ایمنی ماهیان می‌تواند بر روی کارآیی واکسیناسیون می‌تواند تاثیر بگذارند (Du et al., 2017). برای افزایش کارآیی واکسیناسیون پیشنهاداتی توسط برخی محققین عنوان شده است که یکی از این موارد بکارگیری محیط‌های هایپر اسموتیک پیش از واکسیناسیون به منظور افزایش جذب آنتی‌ژن‌ها توسط میزبان است (Gao et al., 2016). در بررسی حاضر بکارگیری محیط نمکی 15 گرم درلیتر باعث افزایش مقادیر پروتئین تام و ایمنوگلوبولین سرمی در ماهیان گردید (نمودارهای 5 و 6) اما در سایر پارامترهای مورد ارزیابی اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید، بنابراین می‌توان عنوان نمود بکارگیری محیط هایپراسموتیک قطعاً نه تنها تاثیر منفی بر روی واکسیناسیون بررسی حاضر نگذاشته است بلکه احتمال زیاد تا حدودی نیز منجر به افزلیش کارآیی آن شده اشت هرچند که برای نتیجه گیری قاطع در این زمینه بررسی‌های تکمیلی بیشتری نیاز است. در بررسی‌های متعدد تاثیر مثبت برای بکار گیری محیط هایپراسموتیک پیش از واکسیناسیون گزارش شده است (Huising et al., 2003). بکارگیری محیط هایپر اسموتیک در ماهی فلاندر (*Paralichthys* *olivaceus*) منجر به افزایش معنی‌دار کارآیی واکسن *Edwardseilla tarda* گردید (Gao et al., 2016).

در بررسی وضعیت تلفات ماهیان پس از مواجهه مستقیم با باکتری *یرسینیا راکری* همان‌گونه که مشاهده می‌شود 8/77 درصد از ماهیان شاهد تلفات ثبت گردید و این در حالی است که میزان تلفات در ماهیان واکسینه شده به روش تزرریق 33 درصد تلفات ثبت گردید که عملاً نشان دهنده تاثیر مثبت این روش واکسیناسیون برای بیماری مورد بررسی است. در بررسی وضعیت تلفات به روش حمام میزان تلفات تلفات 5/55 و 7/66 درصد ثبت گردید که اگر پایین‌تر از شاهد بوده است اما اختلاف زیادی نداشت و این موضوع نشان دهنده کارآیی متوسط واکسیناسیون روش حمام در مقایسه با روش تزریقی در فیل‌ماهیان 30 گرمی است (نمودار1). در مطالعه مازندرانی و همکاران (1401) در مواجهه باکتریایی پس از واکسیناسیون *یرسینیا راکری* به روش تزریق و حمام تلفات 4/36 تا 5/61 درصد تلفات ثبت گردید و این در حالی بوده است که 100 درصد ماهیان گروه شاهد تلف شدند (مازندرانی و همکاران، 1401). سلطانی و همکاران در سال 1393 در ارزیابی واکسن *یرسینیا راکری* در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان میزان زنده مانی را 10 هفته پس از مواجهه برای ماهیان غیر واکسینه کمتر از 10 درصد (تلفات بیش از 90 درصد) و برای ماهیان واکسینه کمتر از 60 درصد (تلفاتی حدود 40 درصد) گزارش کردند (سلطانی و همکاران 1393). در گزارش Alishahi و همکاران (2019) در واکسیناسیون به روش تزریقی برای باکتری عفونی *Aeromonas hydrophila* میزان تلفات پس از مواجهه در گروه شاهد حدود 65 درصد و در گروه‌های مختلف واکسینه شده تقریبا بین 20 تا 40 درصد گزارش گردید (Alishahi et al., 2019). Chu در سال 2006 میزان زنده مانی در ماهیان قرمز (*Carassrus auratus gibelio*) واکسینه شده با باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا را پس از مواجهه با باکتری عفونی بین 2/32 تا 1/50 درصد گزارش کرد (Chu., 2006).

در بررسی تیتر آنتی بادی به روش میکروآگلوتیناسیون همان‌گونه که مشاهده می‌شود تمامی ماهیان واکسینه شده دارای تیر بودند و عملاً هیچ تیتری در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد (نمودا9) بر اساس نتایج بالاترین تیتر مربوط به ماهیان واکسینه شده به روش تزریق بوده و سپس ماهیان واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای تیتر بالاتری نسبت به ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای به روش حمام داشتند (05/0 ≥ P) در عین حال اگرچه در ماهیان واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای تیترآنتی بادی ثبت شد اما به لحاظ آماری فاقد اختلاف معنی‌دار با ماهیان گروه شاهد بودند (05/0 ˃ P). نتایج بررسی حاضر حاکی از این موضوع است که واکسیناسیون به روش حمام در ماهی خاویاری فیل‌ماهی نیاز به دوزهای یادآور دارد و عملاً یک مرحله واکسیناسیون به روش حمام تیتر قابل قبولی برای ماهیان 30 گرمی به همراه ندارد درعین حال لازم است که این نکته در نظر گرفته شود که تیتر آنتی بادی و نیز پارامترهای ایمنی در ماهیان مختلف و نیز تحت تاثیر فاکتورهای متعدد ممکن است تغییر کند، در بررسی صورت گرفته توسط Ma و همکاران (2022) واکسن غیر فعال *یرسینیا راکری* و نیز واکسن تخفیف حدت یافته عامل بیماری ویروس نکروز خونریزی دهنده عفونی (IHN ) در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان جوان مورد ارزیابی قرار گرفتند در این بررسی واکسیناسیون *یرسینیا* *راکری* به دو روش تزریق داخل صفاقی (IP) و تلقیح داخل بینی (IN) و واکسیناسیون IHN نیز به دو روش تلقیح داخل بینی و تزریق عضلانی صورت گرفت، در ماهیانی که با *یرسینیا راکری* واکسینه شده بودمد 6 ماه پس از واکسن تیتر آنتی بادی قابل ردیابی بود و ماهیان واکسینه شده به روش تزریق در مقایسه با ماهیان واکسینه شده به روش IN تیتر بالاتری اندازه گیری شد و 12 ماه پس از واکسیناسیون تیتر آنتی بادی در تمام ماهیان فاقد اختلاف معنی دار بود در ماهیانی که واکسن IHN در یافت کردند در هر دو گروه IM و IN 6 ماه پس از واکسیناسون اختلاف معنی‌داری در تیتر آنتی بادی برای تمامی تیمارها مشاهده نشد اما در مواجهه باکتریایی نتایج متفاوتی بدست آمد بطوری‌که 6 ماه پس از واکسیناسیون به روش IN ماهیانی که واکسن *یرسینیا راکری* دریافت کرده بودند در مواجهه باکتریایی تلفات کمتری نسبت به گروه شاهد نداشتند ولی در ماهیانی که واکسن IHN دریافت کردند تلفات کمتری ثبت شد (Ma et al., 2022). بنابراین ممکن است تیتر فعال از بین برود اما سلولهای خاطره در زمان مواجهه با عامل پاتوژن آن را خنثی سازند.

در رابطه با واکسیناسیون همواره بکارگیری روش واکسیناسیون موثر بسیار مورد بحث و تبادل نظر مزرعه داران بوده است، بطور معمول سه روش تزریق، حمام و خوراکی برای واکسیناسیون مزارع آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد که روش تزریق بالاترین کارآیی و عملکرد را دارد که در بررسی حاضر این موضوع نیز در عمل قابل مشاهده است اما در بسیاری از موارد بنا به دلایل متعدد مزرعه داران از بکار گیری واکسیناسیون به روش تزریق استقبال نمی‌کنند از جمل این دلایل می‌توان به استرس بالای ناشی از دستکاری، لزوم بیهوش نمودن ماهیان، لزوم نیروی متخصص جهت تزریق، عوارض ناشی از تزریق نادرست در ماهیان و .... اشاره نمود (Du et al., 2017) در بررسی حاضر سعی گردید تا عوارض تزریق داخل صفاقی ماهیان خاویاری فیل ماهی با ارزیابی آنزیم‌های ALP، AST و ALT مورد بررسی قرار گرفته است آنزیم‌های یاد شده بطور غالب در سلول‌های هپاتوسیت کبدی و نیز تا حدی در برخی سلول‌های عضلانی و کلیوی یافت می‌شوند و افزایش سطح آنها در سرم خون، نشان دهنده آسیب به این سلول‌ها است (Giannini et al., 2005). در بررسی حاضر تزریق داخل صفاقی واکسن تزریقی به فیل‌ماهیان حدود 30 گرم منجر به افزایش یا کاهش آنزیم‌های ALP، AST و ALT نگردید که این امر نشان دهنده عدم آسیب‌ها ناشی از تزریق داخل صفاقی در ماهیان یاد شده است (نمودارهای 1 تا 3(. و این در حالی است که در تحقیقاتی مشابه تزریق داخل صفاقی واکسن *یرسینیا راکری* در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان منجر به افزایش معنی‌دار در سطوح آنزیم‌های یاد شده در سرم خون گردید (مازندرانی و همکاران، 1401). همچنین تزریق داخل صفاقی واکسن دو گانه استرپتوکوکوس/لاکتوکوکوس نیز بطور معنی‌دار منجر به افزایش آنزیم های یاد شده (ALP، AST و ALT) در سرم خون بچه ماهیان قزللاات‌آلای رنگین کمان گردید (نمرودی و همکاران، 1402). که با توجه به این نتایج می‌توان عنوان نمود تزریق داخل صفاقی واکسن در ماهی خاویاری فیلماهی در حدود وزنی 30 گرم آسیب‌های کمتری در مقایسه با تزریق واکسن در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان با حدود وزنی 5 تا 10 گرم دارد، لذا برای این رنج وزنی فیل‌ماهیان می‌توان روش تزریقی واکسن را پیشنهاد داد.

**تشکر و قدردانی:**

این تحقیق با حمایت مالی شرکت دانش بنیان بوژان تک فارمد تولیدکننده واکسن­های ماهی در کشور به انجام رسید با تشکر و سپاسگزاری از آن مجموعه و آرزوی موفقیت روز افزون.

**منابع:**

# فدایی فرد، ف.، سیمین، س. 1393. شناسایی ژن های حدت yrp1 و yrpE در باکتری یرسینیا راکری به روش PCR در استان چهارمحال و بختیاری. [فصلنامه زیست شناسی میکروارگانیسم.](https://www.magiran.com/magazine/6662) 9(3): 74 – 65.

سالنامه آماری شیلات ایران (1400 – 1395). 1401. سازمان شيلات ايران، معاونت برنامه ريزي و مديريت منابع ، دفتر برنامه ريزي و بودجه، گروه برنامه ريزي و آمار. 58 صفحه. [www.shilat.com](http://www.shilat.com)

##### سلطانی،م.، شفیعی، ش.،میرزرگر، س.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، قدرت نما، م. 1393. [ارزیابی کارایی واکسن ضد یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از سویه‌های منطقه‌ای یرسینیا راکری](https://jvr.ut.ac.ir/article_36713.html). مجله تحقیقات دامپزشکی. 69(1): 57 – 63. Doi.[10.22059/JVR.2014.36713](https://dx.doi.org/10.22059/jvr.2014.36713)

مازندرانی، م.، حسینی فر، س.ح.، رضا قلی تبار، ز.، سوداگر، م.، صفری، . 1401 ارزیابی نحوه عملکرد واکسن آنتی یرسین در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss). نشریه بهره برداري و پرورش آبزیان. 11(2): 48-37.

نمرودی، س.، یوسفی سیاهکلرودی، س.، حاجی‌بگلو، ع.، مازندرانی، م. 1402. اثرات واکسن دو سویه استرپتوکوکوزیس (*Streptococcus iniae / Lactococcus garvieae*)در بچه­ماهیان قزل‌آلای رنگین­کمان (Oncorhynchus mykiss) بر برخی شاخص‌های ایمنی سرمی. فصلنامه علمی محیطزیست جانوری. 15(2): 212 -205

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

Bøgwald, J. and Dalmo, R.A. 2019. Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. Microorganisms. 7(12): 627. doi:10.3390/microorganisms7120627

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.

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

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.

El-Noby, G.A., Hassanin, M., El-Hady and M., Aboshabana, Sh. 2021. *Streptococcus*: A review article on an emerging pathogen of farmed fishes. Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries. 25(1): 123 – 139..

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.

Gao, Y.; Tang, X.; Sheng, X.; Xing, J.; Zhan,W. 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 Immun. 2016, 55, 274–280.

Giannini, E.G., Testa, R. and Savarino, V. 2005. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. Canadian Medical Association Journal. 172(3): 376 – 379. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1040752>

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.

Johnson, M.A., Rohlfs E.M. and Silverman L.M. 1999. Determination of proteins in urine. Burtis CA, Ashwood ER, Teitz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd Ed, Philadelphia: WB Saunders. pp.525-6.

Ma, J., Casadei, E., Bruce, T.J., Sepahi, A., Cain, K.D. Salinas, I. 2022. Long-term efficacy of nasal vaccination against enteric red mouth (ERM) disease and infectious hematopoietic necrosis (IHN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vaccine. 40(2): 229-238

Siwicki, A.K. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego. Pp: 105 -111.

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 Pathologists. 9: 173-177.

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.

**Evaluation of using the hyperosmotic environment on the *Yersinia ruckeri* vaccine efficacy by bath method in juvenile great sturgeon (*Huso huso*)**

**Hamidreza Tabibi, Reza Afshar Moghaddam, Abdosalam Hatami Zharabad, Siamak Yousefi Siahkalroodi, Somayeh Namrudi, Mohammad Mazandarani**

1. Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran

3. Department of environmental sciences, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan Iran

**Abstract**:

In this study, the effectiveness of *Yersinia ruckeri* vaccine was assessed using both the bath and injection methods on great sturgeon (*Huso huso*). Six experimental groups were formed, including a group of fish vaccinated by injection method (treatment 1), group of fish vaccinated in two stages using the hyperosmotic solution + vaccine by bath method (treatment 2), a group of fish vaccinated in two stages using the vaccine by bath method (treatment 3), a group of fish vaccinated in one stage using the hyperosmotic solution + vaccine (treatment 4), a group of fish vaccinated in one stage by the bath method (treatment 5), and a control group (treatment 6). For each group, 20 fish were used in two replications, totaling 120 fish with an average weight of 24.6 ± 1.5, which were distributed across 12 fiberglass tanks with a water volume of 140 liters. In this experiment, the second stage of vaccination for the two-stage vaccinated fish was administered 21 days after the first stage, and sampling and bacterial exposure were conducted 42 days after the first vaccination. Based on the results the total protein and serum immunoglobulin levels and the serum antibody titer against *Yersinia rockeri* was higher in fish vaccinated by injection method compared to other treatments (P≥0.05). On the other hand, in fish vaccinated by bath method, there was no significant difference in these parameters compared to the control (P<0.05). The highest number of white blood cells (WBC) was observed in fish vaccinated by injection method, followed by fish vaccinated by two-step bath method (P≥0.05). No significant difference was recorded between the fish that received one-step vaccine by bath method and the control (P˃0.05). After the bacterial challenge, the control group had the highest mortality rate (77.8%), while the lowest mortality rate was recorded in the fish vaccinated by injection method (33%). In the analysis of serum alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) levels, no significant differences were observed in all the studied groups. In conclusion, the one-step vaccination by bath method did not provide adequate immunity in great sturgeon. Therefore, it seems that vaccination by injection method has good efficacy with no side effects in this fish.

***Keywords*:** *Yersinia ruckeri*, *Huso huso*,vaccination, bacterial challenge, antibody titer