"مقاله پژوهشی"

مقایسه تاثیر ادجوانت مونتانايد (Montanide™ ISA 763 AVG) و عصاره شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) واکسینه شده با واکسن لاکتوکوکوزیس

لادن ظاهری عبده‌وند[۱]، مهدی سلطانی*[۲]، شفیق شفیعی[۳]

۱. گروه شیلات، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۳

چکیده

هدف از این مطالعه مقایسه تأثیر ادجوانت مونتانايد (Montanide™ ISA 763 AVG) و عصاره شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر شاخص‌های رشد و میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان واکسینه شده با واکسن لاکتوکوکوزیس بود. به این منظور ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن اولیه ۳±۷۲ گرم در چهار تیمار آزمایشی شامل شاهد، واکسن، واکسن همراه با کمک ایمنی مونتانايد و واکسن همراه با عصاره شیرین بیان تقسیم شدند. هر تیمار حاوی ۶۰ قطعه ماهی در ۳ تکرار در ۱۲ مخزن ۱۰۰۰ لیتری در یک سیستم پرورش مدار بسته طراحی شد. پس از سازگاری با شرایط جدید ابتدا ماهیان برای ۲۴ ساعت قطع غذا و پس از بیهوشی با اسانس گل میخک به روش داخل صفاقی واکسن یا واکسن حاوی کمک ایمنی و عصاره گیاهی دریافت نمودند. سپس ماهیان برای ۸ هفته مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان دوره با ایجاد بیهوشی و بیومتری شاخص‌های رشد مورد آنالیز قرار گرفت و میزان بقا نیز تعیین شد. نتایج نشان داد که بیشترین افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، رشد روزانه، نسبت کارایی تبدیل غذا، پروتئین، چربی و کاهش ضریب تبدیل غذا به‌ترتیب در تیمارهای واکسن حاوی مونتانايد، واکسن حاوی عصاره و واکسن به‌دست آمد (P<۰/۰۵). همچنین بالاترین میزان درصد بازماندگی در گروه واکسن حاوی ادجوانت مونتانايد (۳/۳۳±۹۶/۶۶ درصد) و کمترین میزان هم در گروه شاهد (۲±۲۰ درصد) بود. نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن ادجوانت مونتانايد و عصاره شیرین متعاقب استفاده از واکسن لاکتوکوکوزیس موجب بهبود برخی از شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، واکسن لاکتوکوکوزیس، مونتانايد، عصاره شیرین بیان، رشد

*عهده دار مکاتبات msoltani@ut.ac.ir

مقدمه

لاکتوکوکوس گارویه یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی در آزاد ماهیان پرورشی به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده که هر ساله خسارات زیادی به این صنعت وارد می‌نماید (Vendrell *et al*., 2006). در ایران نیز این بیماری طی دهه‌های گذشته موجب خسارت فراوانی به مزارع قزل‌آلای کشور گردیده است (Soltani *et al*., 2008). یکی از موضوعات مطرح در ارتباط با واکسن‌ها، موضوع تأثیر ادجوانت‌های همراه واکسن بر شاخص‌های رشد است (Valdez *et al*., 2014). به عبارت دیگر گاهی یک ماده کمک ایمنی موجب بهبود کارایی (افزایش بقا در مواجهه با عامل بیماری‌زا) یک واکسن می‌شود، اما ممکن است بر شاخص‌های رشد بی تأثیر یا حتی اثر منفی داشته باشد. به همین دلیل تحقیقات بالینی مانند بررسی شاخص‌های رشد مرتبط با یک ادجوانت از اهمیت بالایی برخوردار است. نتایج تحقیقات سال‌های اخیر نشان داده که ترکیب واکسیناسیون و محرک‌های ایمنی در کنار هم می‌تواند توانایی واکسن را در رابطه با پیشگیری از ابتلا به بیماری‌ها در ماهیان افزایش دهد (Soltani *et al*., 2018). استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی علاوه بر افزایش راندمان رشد ماهیان و کاهش زمان دوره پرورش موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی و در نتیجه باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا و افزایش میزان ماندگاری آن‌ها می‌شوند (Alishahi *et al*., 2011; Soltani *et al*., 2018; Austin *et al*., 2012). به‌علاوه فاکتورهای متعددی در انتخاب یک ادجوانت تأثیر گذار است که می‌توان به گونه حیوان، نوع آنتی ژن و مسیر ایمن سازی اشاره نمود. به همین دلیل طی سال‌های اخیر مطالعات وسیعی پیرامون اثرات ادجوانت‌های مختلف از جمله مواد مؤثره گیاهان دارویی انجام شده است (Soltani *et al*., 2018؛2013 Tafalla *et al*.,). محرک ایمنی مونتاناید Montanide™ ISA 763 AVG یک ادجوانت تجاری سنتتیک (شرکت Seppic فرانسه) بوده که حاوی مخلوطی از مانیتول و اسید اولئیک خالص است و همراه با یک امولسیفایر دارویی به‌صورت قابل تزریق دردسترس است (Tepparin *et al*., 2018). مطالعه اثر ادجوانت مونتاناید ISA 763 AVG) در غلظت‌های مختلف همراه با واکسن استرپتوکوکوزیس در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) نشان داد که استفاده از آن در مقادیر ۲۰ و ۵۰ درصد باعث افزایش مقاومت ماهیان به استرپتوکوکوزیس نسبت به کنترل شد (Tepparin *et al*., 2018). Xu و همکاران (۲۰۱۹) کارایی واکسن *ویبریو هاروی* همراه این کمک ایمنی در کفشک ماهی *Scophthalmus maximus* را بررسی و نشان داد که درصد زنده‌مانی نسبی بالایی (بیش از ۷۵٪) در ماهیان مشاهده شد. نتایج مشابهی توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از ادجوانت مونتاناید به روش تزریقی مشاهده شد.

گیاه شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بومی ایران است که به میزان قابل توجهی از آن سالیانه صادر می‌شود (خان‌احمدی و همکاران، ۱۳۹۲). این گیاه کاربردهای درمانی مختلفی داشته و از ریشه آن در طب سنتی به طور عمده برای درمان زخم معده استفاده می‌شود (Kumar *et al*., 2018). ترکیبات فعال این گیاه شامل ساپونین ها، فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها، کومارین ها، استیل بنوئیدها و سایر ترکیبات مانند اسیدهای چرب، فتول‌ها، اسپاراژین، گلوکز، ساکارز و استرون می‌باشند.

اصلی‌ترین مواد مؤثر آن *glycyrrhizinic acid* (جزء ساپونین‌ها) *glabridin* (جزء ایزوفلاونوئیدها) و *Isoliquiritigenin* (جزء فلاونوئیدها) است. (Asl and Hosseinzadeh., 2008). گلابریدین موجود در شیرین بیان دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی می‌باشد (Tamir *et al., 2000*). با توجه به این‌که تا کنون مطالعه‌ای بر روی عصاره شیرین بیان به عنوان کمک ایمنی همراه با واکسن روی رشد ماهی انجام نشده است؛ لذا هدف از این تحقیق ارزیابی اثر احتمالی مونتاناید به عنوان یک کمک ایمنی سنتتیک و مقایسه آن با عصاره شیرین بیان بر برخی شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

مواد و روش‌ها

این بررسی در پاییز سال ۱۳۹۸ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد واقع در استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت. ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۳±۷۲ گرم سالم از یکی از مزارع استان چهار محال و بختیاری واجد پروانه بهداشتی از سازمان دامپزشکی خریداری و به آزمایشگاه دانشگاه شهرکرد (سیستم پرورش مدار بسته کاملاً ایزوله در دانشکده دامپزشکی) انتقال داده شد. ماهیان پس از انتقال ۲۴ ساعت قطع غذا و بعد از آن طی دو هفته جهت آداپتاسیون با محیط پرورش جدید نگهداری و با خوراک تجاری اکسترود فرادانه (شهرکرد، ایران) تغذیه شدند (Mohseni *et al.*, 2014). ماهیان در چهار تیمار آزمایشی شاهد، واکسن، واکسن همراه با کمک ایمنی مونتاناید و واکسن همراه با عصاره شیرین بیان و ۳ تکرار برای مدت ۵۶ روز در ۱۲ مخزن ۱۰۰۰ لیتری نگهداری و به‌صورت تزریق داخل صفاقی مورد تغذیه قرار گرفتند (Shafiei et al., 2018). غذا دهی متناسب با سایز ماهی و دمای آب برای ماهیان سردابی بر اساس درصد وزن بدن استفاده شد(NRC, 1993). فرمولاسیون جیره مصرفی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: میانگین ترکیبات تقریبی خوراک مورد استفاده در طول آزمایش

ترکیب	مقدار (درصد در وزن خشک)
پروتئین	۳۸
چربی	۱۴
فیبر	۳
خاکستر	۹
رطوبت	۸

مواد کمک ایمنی

ادجوانت مونتاناید Montanide™ ISA 763 AVG Effective materials از نمایندگی شرکت Seppic فرانسه (Paris, France) در ایران تهیه شد.

عصاره گیاه شیرین بیان

برای تهیه عصاره الکلی گیاه شیرین بیان، ابتدا ریشه‌های بریده و خشک گیاه کاملاً شسته و خشک شده و توسط آسیاب تبدیل به پودر شد، سپس آن را در الکل با خلوص بالا (۱ گرم پودر به ازای یک لیتر الکل مطلق) در یخچال خیسانده و هر ۸ ساعت توسط یه همزن شیشه‌ای هم زده شد. پس از ۷۲ ساعت عصاره حاصل با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه حلال (اتانول) به کمک دستگاه تقطیر در خلاء دوار با دور ۹۰ دور در دقیقه و درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد انجام شد و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری تلغیظ شد (Gupta *et al*., 2008).

واکسن مورد استفاده

واکسن مورد استفاده در این مطالعه بر اساس روش بیان شده توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۴) و Zahrei-Abdevand و همکاران (2021) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. بطور خلاصه از کشت ۴۸ ساعته لاکتوکوکوس گارویه (جدا سازی شده از ماهیان قزل الای بیمار) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در محیط تریپتیک سویا براث استفاده شدکه پس از غیر فعال سازی سلول ها و فرمولاسیون مورد استفاده قرار گرفت.

واکسیناسیون ماهیان

عملیات واکسیناسیون به روش تزریق داخل صفاقی انجام شد؛ به طوری که ابتدا ماهیان برای ۲۴ ساعت قطع غذا شده سپس و با استفاده از اسانس گل میخک بیهوش و به هر ماهی میزان ۰/۲ میلی لیتر تزریق شد. پروتکل مقادیر تزریقی در جدول ۲ آمده است. قبل از تزریق مقادیر مورد نیاز از هر یک از واکسن و کمک ایمنی‌ها با نسبت بیان شده مخلوط و سپس تزریق می‌گردید.

جدول ۲: گروه‌های آزمایشی دریافت کننده واکسن بصورت تزریق داخل صفاقی

گروه آزمایشی	غلظت به ازای هر ماهی
کنترل	۰/۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل
واکسن به تنهایی	۰/۲ میلی‌لیتر واکسن
واکسن حاوی کمک ایمنی مونتاناید	۰/۲ میلی‌لیترواکسن + ۰/۱ میلی‌لیتر مونتاناید
واکسن حاوی عصاره شیرین بیان	۰/۲ میلی‌لیتر واکسن + ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان

شاخص‌های رشد و بازماندگی

ماهیان ۸ هفته پس از تزریق قطع غذا و بیهوش شده و سپس توسط ترازو (دقت ۰/۱ گرم) بیومتری شدند و فاکتورهای رشد طبق فرمول‌های ارائه شده اندازه‌گیری شد (Turker and Yıldırım, 2011).

وزن اولیه- وزن نهایی= افزایش وزن بدن

۱۰۰× (وزن اولیه / وزن اولیه- وزن نهایی) = (%) افزایش وزن بدن

طول دوره پرورش(روز) / وزن اولیه- وزن نهایی) =نرخ رشد ویژه

۱۰۰ × افزایش وزن بدن (گرم) /مقدار غذای مصرف شده= ضریب تبدیل غذایی

تعداد اولیه /تعداد نهایی -تعداد اولیه = درصد بازماندگی

ضریب تبدیل غذایی/۱۰۰= نسبت کارایی غذا

گرم پروتئین خورده شده (گرم) / وزن به‌دست‌آمده (گرم) = نسبت کارایی پروتئین

چربی خورده شده (گرم) / وزن به‌دست‌آمده (گرم) = نسبت کارایی چربی

تجزیه و تحلیل آماری

برای اطمینان از نرمال بودن داده‌ها ابتدا آزمون Shapiro wilk انجام شد و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین داده‌های آزمایشی (SD ± Mean)، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و توکی استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام گرفت.

نتایج

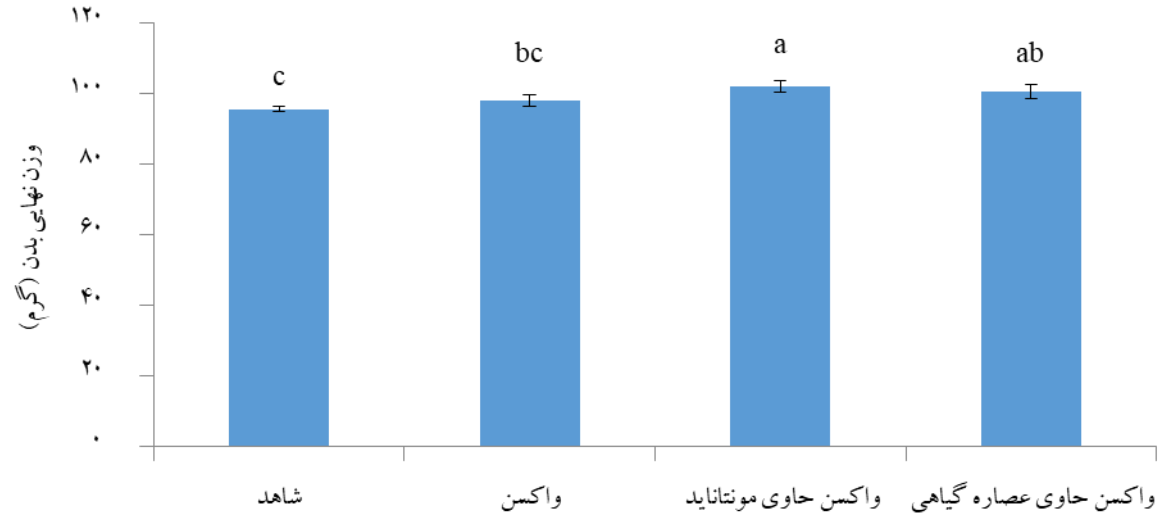
شرایط کیفی آب

میانگین دما توسط دماسنج به صورت روزانه ثبت گردید، میزان pH توسط دستگاه pH متر دیجیتال و اکسیژن محلول در آب با دستگاه اکسیژن متر دیجیتال هر دو هفته یک بار اندازه گیری شد .که شامل درجه حرارتبرابر ۱۲درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۸,۵ میلی گرم در لیتر و برابر pH با۰,۵± ۷ بود.

فاکتورهای رشد و بازماندگی

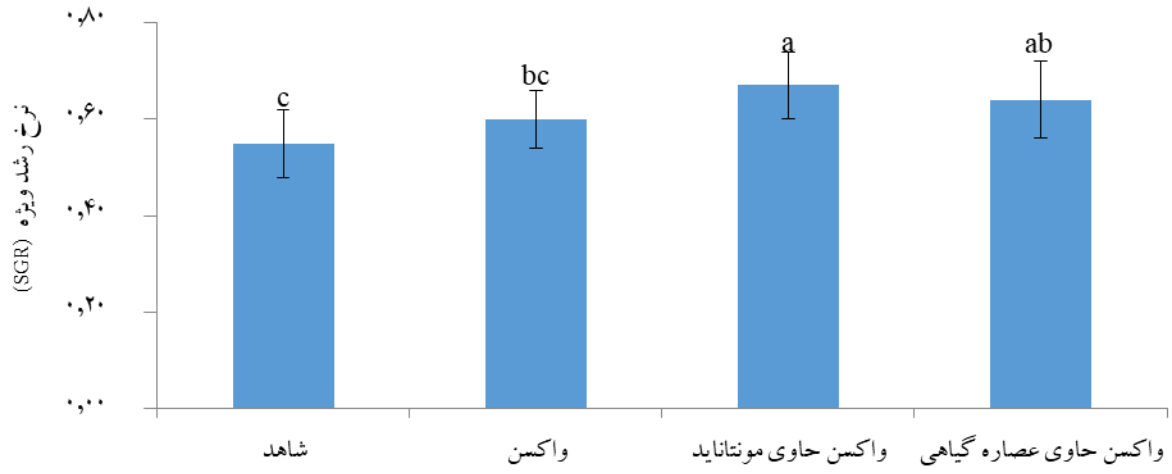
تزریق داخل صفاقی گروه‌های آزمایشی دریافت کننده مواد مختلف در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان اثر معنی‌داری را در شاخص‌های رشد از جمله وزن‌نهایی بدن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و درصد زنده‌مانی داشت ($P<۰/۰۵$). شکل ۱ نتایج وزن بدن حاصل از معنی‌دار بودن تغییرات وزن نهایی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ناشی از تزریق واکسن، مونتانایدو عصاره گیاهی به ماهیان را نشان داد ($P<۰/۰۵$). بیشترین وزن نهایی بدن مربوط به تیمارهای واکسن

حاوی ادجوانت مونتاناید و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۲/۴۹±۱۰۲/۰۷ و ۳/۲۷±۱۰۰/۴۷ گرم) بود و کمترین وزن نهایی مربوط به تیمار شاهد (۶/۲۹±۹۵/۵۳ گرم) بود.



شکل ۱. مقایسه میزان وزن نهایی بدن میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها و آزمون دانکن مقایسه میانگین نرخ رشد ویژه (SGR) تیمارهای مختلف بیانگر تفاوت معناداری میان تیمارها بود (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بیشترین میزان در واکسن حاوی ادجوانت مونتاناید و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۰/۰۷±۰/۶۷ و ۰/۰۶±۰/۶۴) و کمترین در تیمار شاهد (۰/۰۸±۰/۵۵) مشاهده شد (شکل ۲) (P<۰/۰۵).

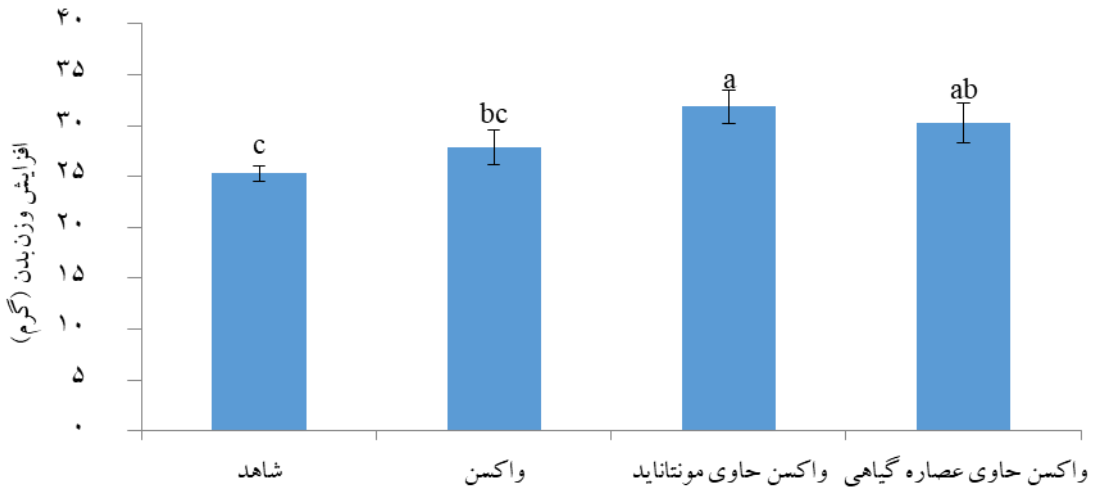


شکل ۲. مقایسه میزان نرخ رشد ویژه میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

بررسی انجام شده در رابطه با میزان ضریب تبدیل غذایی نیز بیانگر وجود اختلاف معناداری میان تیمارهای مختلف بود (P<۰/۰۵). طی این زیست سنجی تیمار شاهد بیشترین میزان ضریب تبدیل غذایی را داشت (۱/۳۰±۰/۰۹) و کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای واکسن حاوی ادجوانت مونتاناید و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۱/۱۳±۰/۰۴ و ۱/۱۴±۰/۰۸) دیده شد. همچنین تیمارهای واکسن حاوی ادجوانت مونتاناید و واکسن حاوی عصاره گیاهی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

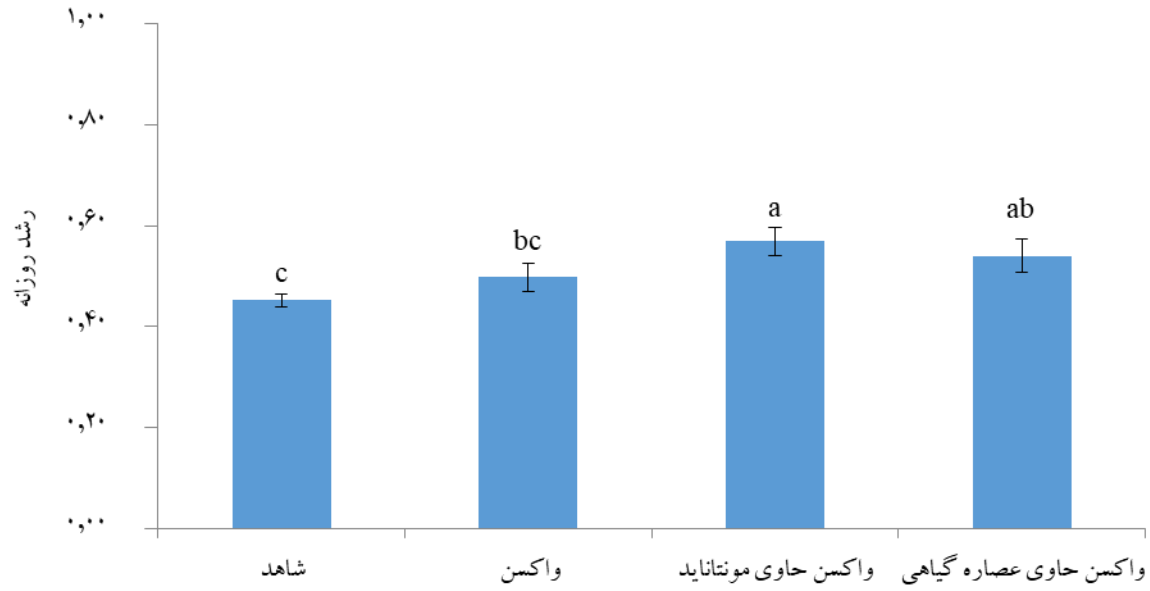
شکل ۳. نمودار مقایسه میزان ضریب تبدیل غذایی میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

بیشترین افزایش وزن بدن مربوط به تیمارهای واکسن حاوی ادجوانت مونتاناید و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۳۱/۸۷±۲/۹۰ و ۳۰/۲۷±۲/۶۳ گرم) بود و کمترین افزایش وزن مربوط به تیمار شاهد (۲۵/۳۳±۴/۵۰ گرم) بود. بطوریکه افزایش وزن بدن تفاوت معنی‌داری را در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ناشی از تزریق واکسن، مونتاناید و عصاره گیاهی به ماهیان را نشان داد (شکل ۴) (P<۰/۰۵).



شکل ۴. مقایسه میزان افزایش وزن بدن میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

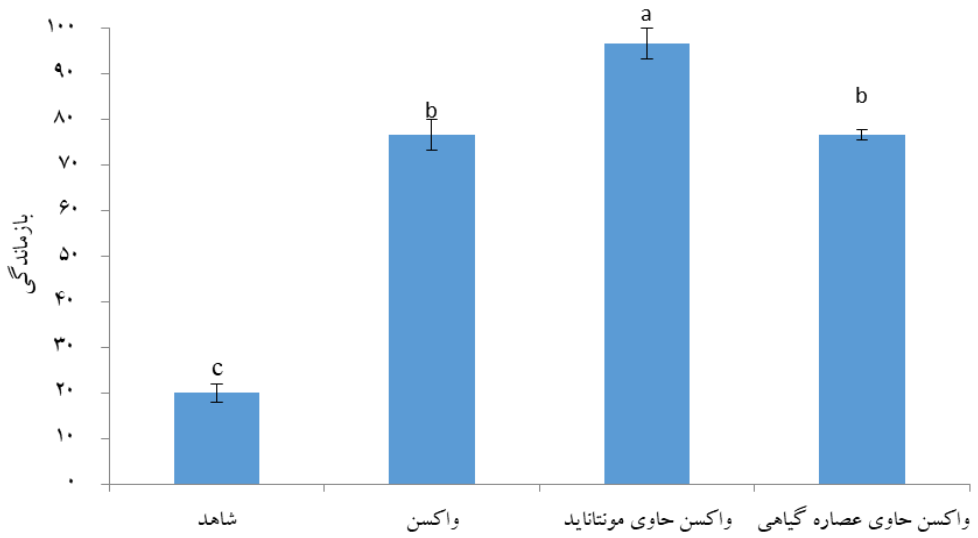
بیشترین درصد افزایش وزن بدن مربوط به تیمارهای واکسن حاوی ادجوانت مونتاناید و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۰/۵۷±۰/۰۷ و ۰/۵۴±۰/۰۵ گرم) بود و کمترین درصد افزایش وزن مربوط به تیمار شاهد (۰/۴۵±۰/۰۸ گرم) بود (شکل ۵) (P<۰/۰۵).



شکل ۵. مقایسه میزان رشد روزانه میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

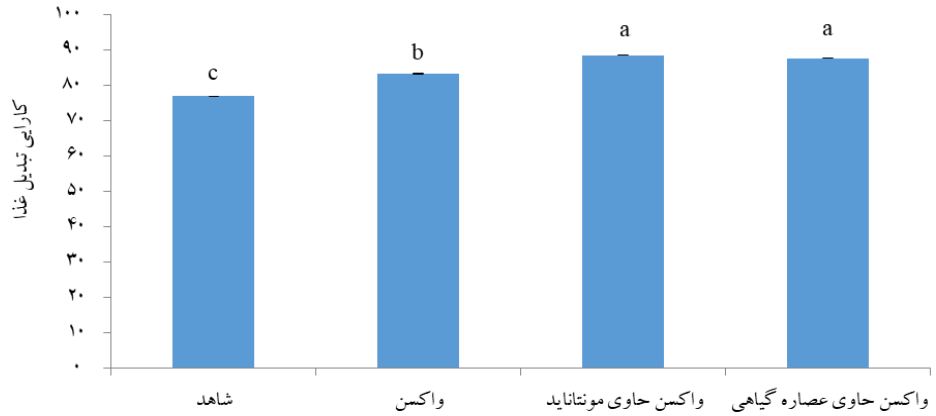
نتایج میزان درصد بقاء و بازماندگی در پایان هفته هشتم مطالعه در شکل ۶ آمده است. بر اساس این نتایج درصد بقاء و بازماندگی بین گروه‌ها از اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش برخوردار بود به گونه که بیشترین درصد بقاء در گروه واکسن حاوی ادجوانت مونتاناید (۹۶/۶۶±۳/۳۳ درصد) برآورد شد و

کمترین میزان هم در گروه شاهد (۲±۲۰ درصد) برآورد شد (P<۰/۰۵). همچنین بین گروه‌های واکسن و واکسن حاوی عصاره گیاهی تفاوت معناداری مشاهده نگردید (شکل ۶).



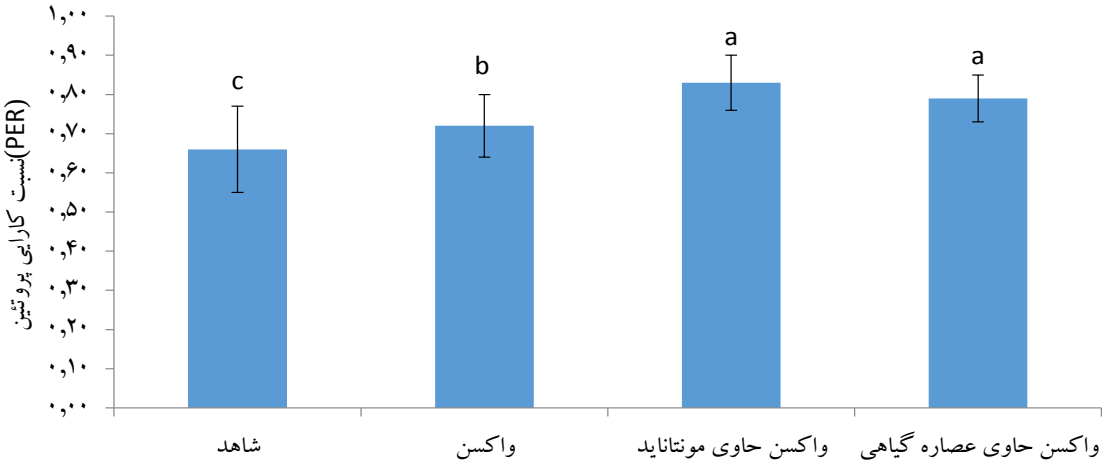
شکل ۶. درصد بازماندگی میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

براساس نتایج حاصله نسبت کارایی غذا نشان از معنی دار بودن در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ناشی از تزریق واکسن، مونتانایید و عصاره گیاهی به ماهیان را نشان داد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بالاترین میزان نسبت کارایی غذا مربوط به تیمارهای واکسن حاوی ادجوانت مونتانایید و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۸۸/۵۰±۰/۰۳) و (۸۷/۷۲±۰/۰۵) بود و کمترین مربوط به تیمار شاهد (۷۶/۹۲±۰/۰۹) بود (شکل ۷).



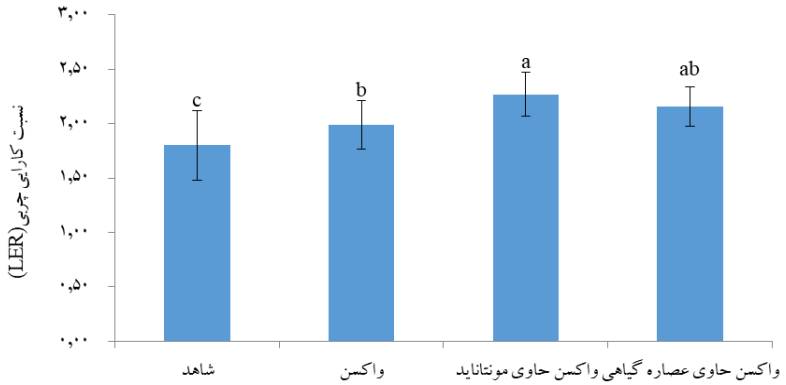
شکل ۷. نسبت کارایی غذا میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

طبق شکل ۸ نتایج نسبت کارایی پروتئین نشان از معنی دار بودن در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ناشی از تزریق واکسن، مونتانايد و عصاره گیاهی به ماهیان را نشان داد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بالاترین میزان نسبت کارایی پروتئین مربوط به تیمارهای واکسن حاوی ادجوانت مونتانايد و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۰/۸۳±۰/۰۷ و ۰/۷۹±۰/۰۶) بود و کمترین مربوط به تیمار شاهد (۰/۶۶±۰/۱۱) بود.



شکل ۸. نسبت کارایی پروتئین میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

نتایج نشان داد که نسبت کارایی چربی اختلاف معنی داری در ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان ناشی از تزریق واکسن، مونتانايد و عصاره گیاهی به ماهیان داشت (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بالاترین میزان نسبت کارایی چربی مربوط به تیمارهای واکسن حاوی ادجوانت مونتانايد و واکسن حاوی عصاره گیاهی (۲/۲۷±۰/۲۰ و ۲/۱۶±۰/۱۸) بود و کمترین مربوط به تیمار شاهد (۱/۸۰±۰/۳۲) بود (شکل ۹).



شکل ۹. نسبت کارایی چربی میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

بحث

بیماری لاکتوکوکوزیس از جمله بیماری‌های عفونی باکتریایی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بوده که همه‌گیری بالای آن خسارات اقتصادی قابل توجهی را به صنعت آبزی پروری ماهیان سردآبی ایران وارد نموده است (کرمی و همکاران، ۱۳۹۶). به علت تلفات شدید ناشی از این بیماری استفاده از واکسن علیه این بیماری آغاز و توسعه داده شد که اثرات مثبتی بر کاهش این بیماری داشته است (Bachrach *et al.*, 2001) و امروزه جهت پیشگیری از بروز این بیماری در صنعت آبزی پروری به‌طور گسترده استفاده می‌شود (فقانی و آذری تاکامی، ۱۳۸۸). امروزه پیش‌گیری از بروز بیماری های با اهمیت اقتصادی در ماهیان به روش واکسیناسیون و نیز استفاده از مواد محرک ایمنی برای ارتقاء ایمنی و بهبود فاکتورهای رشد از اهمیت خاصی برخوردار شده است. به طوری که استفاده از مواد محرک ایمنی در جیره غذایی ماهیان به امری رایج تبدیل شده است. بسته به گونه ماهی، سن ماهی، شرایط کیفیت آب و ویژگی های محرک ایمنی مورد استفاده نتایج حاصله می تواند کاملا متغیر باشد. از عوامل موثر دیگر در افزایش میزان اثربخشی یک واکسن می توان به استفاده از ادجوانت ها به همراه واکسن اشاره کرد. برای مثال Shafiei و همکاران (۲۰۱۸) اثر کمک ایمنی G2 (عصاره طحال گاومیش) را در ماهی قزل آلای رنگین کمان رنگین کمان واکسینه شده با واکسن یرسینیوزیس بررسی و افزایش بقاء ماهی‌های واکسینه شده با واکسن حاوی کمک ایمنی G2 و عدم تأثیر منفی آن بر رشد ماهیان را نشان دادند. به‌علاوه در مطالعه Russo و همکاران (۲۰۰۶) کمک ایمنی ماکروگارد موجب بهبود رشد و افزایش کارایی واکسن استرپتوکوکوزیس در ماهی زینتی *Epalzeorhynchos bicolor* شد. از طرفی رشد به عنوان یکی از فاکتورهای سنجش سلامت ماهی محسوب می شود. نتایج حاصل از این مطالعه در مورد تأثیر تجویز واکسن لاکتوکوکوس با ادجوانت‌های مذکور بر روی رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که تیمار واکسن حاوی ادجوانت مونتانایید و عصاره گیاهی تأثیر بهتری نسبت به استفاده تنهایی از واکسن لاکتوکوکوس بر عوامل رشد و بازماندگی ماهی داشته است. نتایج نشان دادند که بیشترین میزان رشد و کمترین ضریب تبدیل غذایی به طور معناداری مربوط به تیمار واکسن حاوی ادجوانت مونتانایید و عصاره گیاهی بود. نتایج این تحقیق با پژوهش Xu و همکاران (۲۰۱۹) در زمینه کارایی واکسن *Vibrio harveyi* حاوی کمک ایمنی تجاری Montanide™ ISA 763 AVG در کفشک ماهی، مطالعه Russo و همکاران (۲۰۰۶) در ارتباط با تاثیر کمک ایمنی سنتتیک ماکروگارد بر افزایش کارایی واکسن ضد استرپتوکوکوس اینیایی در ماهی زینتی (*Epalzeorhynchos bicolor*) و مطالعه سلطانی و همکاران (۱۳۹۵) در زمینه تأثیر محرک ایمنی سنتتیک ماکروگاد بر واکسن لاکتوکوکوزیس دربچه ماهی قزل آلای رنگین کمان مطابقت دارد. بنابراین نتایج این مطالعه نشان می دهد که استفاده خوراکی مواد محرک ایمنی نه تنها در طول دوره پرورش مفید است؛ بلکه در ماهیان واکسینه موجب ارتقاء کارآیی واکسن‌ها نیز می شود.

Fodey و همکاران (۲۰۰۸) اثر سه ادجوانت Montanide ISA 50V، Gerbu LQ 3000 و فرم کامل Freund بر تولید آنتی بادی پلی کلنال در

دامپزشکی را با یکدیگر مقایسه کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تیتر آنتی بادی در هر دو تیمارMontanide و Freund با گذشت زمان به بیشترین میزان خود رسیده است؛ حال آن‌که که در بین این دو تیمار مونتاناید تیتر آنتی بادی بالاتری داشته است. در ضمن این محقق نشان داد ادجوانت مونتاناید عوارض جانبی کمتری نسبت به Freund دارد. به‌طوری که مونتاناید در هیچ یک از تیمارها عوارض موضعی ایجاد نکرد؛ در صورتی که دو ادجوانت دیگر باعث ایجاد تورم و التهاب قابل توجه در موضع شدند.

Ravelo و همکاران (2006) تحقیقی مبنی بر مقایسه اثرات ادجوانت‌های مختلف بر کارایی واکسن ضد لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام دادند. آن‌ها چهار هفته پس از ایمن سازی درصد بقا نسبی ۸۴/۴ را برای واکسن حاوی ادجوانت MONTANIDTM ISA 763 VGو درصد بقا نسبی 82.6را برای واکسن بدون ادجوانت گزارش کردند. میزان درصد بقاء نسبی طی یک دوره ۱۰ هفته پس از واکسیناسیون در تیمار واکسن+مونتاناید برابر ۹۶/۶۶٪ بوده که بیانگر کارایی این واکسن به روش تزریق می باشد. بررسی روند بقا نشان داد که با گذشت زمان بر میزان بقا و در نتیجه کارایی واکسن تا ۱۰هفته پس از واکسیناسیون افزوده گردیده است که این امر خود به عنوان یکی از مزیت های یک واکسن با کارایی مطلوب محسوب می شود. از جمله دلایل احتمالی این موضوع می تواند ناشی از انتخاب ایزوله باکتری، شرایط مطلوب کیفیت آب دوران ایمن سازی و کیفیت و سلامت ماهیان مورد استفاده و نیز عوامل دیگری نظیر تغذیه و درجه حرارت مناسب دوران واکسیناسیون باشد.

نتایج بررسی ها نشان داده که استفاده از ادجوانت مونتاناید در واکسن ها از قبیل واکسن پرسینیوزیس (Soltani *et al.*, 2014)، (Jang *et al.*, 2011) از طریق بهبود ایمنی پاسخ ایمنی سلولی و همورال موجب افزایش شاخص‌های ایمنی ماهیان (لیزوزیم، کمپلمان و تیتر آنتی بادی سرم) دریافت کننده گردیده و میزان ایمنی و مقاومت ماهیان و در برابر عوامل پاتوژن افزایش یافته است. بنا براین بهبود سیستم ایمنی موجب کاهش استرس و ارتقا شرایط هضم و جذب غذا و در نهایت بهبود شاخص‌های رشد ماهیان را فراهم می‌نماید.

به طورکلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن ادجوانت (کمک ایمنی سنتتیک تجاری مونتاناید Montanide™ ISA 763 AVG و عصاره شیرین بیان) به واکسن لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیر به‌سزایی برشاخص‌های رشد و بازماندگی خواهد داشت.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. خان‌احمدی، م.، نقدی‌بادی، ح.، آخوندزاده بستی، ش.، خلیقی سیگارودی، ف.، مهرآفرین، ع.، شهریاری، س.، ۱۳۹۲. مروری بر گیاه دارویی شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*). فصلنامه گیاهان دارویی، ۲ (۴۶): ۱-۱۲.

۲. سلطانی، م.، امامی، ع.، میرقائد، ع.، ۱۳۹۵. تأثیر محرک ایمنی ماکروگارد بر کارایی واکسن دوگانه لاکتوکوکوزیس/استرپتوکوکوزیس در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان. نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۱(۱): ۶۱-۶۷.

۳. فقانی، ط.، آذری تاکامی، ق.، ۱۳۸۸. ارزیابی اثر ارگوسان و واکسن ضد استرپتوکوکوزیس بر پارامترهای خونی ماهیان قزل آلای رنگین کمان. مجله شیلات، ۳(۲): ۱۱۵-۱۱۹.

۴. کرمی، ا.، علیشاهی، م.، تابنده، م.ر.، قربانپور، م.، محمدیان، ت.، ۱۳۹۶. ارزیابی ایمنی زایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله محیط زیست جانوری، ۹(۴): ۱۹۹-۲۰۶.

5. Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Esmaeilli Rad, A., ۲۰۱۱. Effect of dietary *Silybum marinum* on immune parameters of common carp. Journal of Veterinary Research, ۶۶(۳), ۲۵۵-۲۶۳.
6. Asl, M.N., Hosseinzadeh, H., 2008. Review of pharmacological effects of Glycyrihiza sp. and its bioactive compounds. Phytother Research, 22(6), 709-724.
7. Austin, B., Austin, D. A., Austin, B., Austin, D. A., 2012. Bacterial fish pathogens. Heidelberg: Springer. 652 P.
8. Bachrach, G., Zlotkin, A., Hurvitz, A., Evans, D. L., Eldar, A., 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a streptococcus vaccine. Applied and Environmental Microbiology, 67(8), 3756-3758.
9. Fodey, T. L., Delahaut, P., Charlier, C., Elliott, C. T., 2008. Comparison of three adjuvants used to produce polyclonal antibodies to veterinary drugs. Veterinary immunology and immunopathology, 122, 25-34.
10. Gupta, V. K., Fatima, A., Faridi, U., Negi, A. S., Shanker, K., Kumar, J. K., Darokar, M. P., 2008.Antimicrobial potential of Glycyrrhiza glabra roots. Journal of ethnopharmacology, 116(2), 377-380.
11. Jang, S.I., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Lee, K.W., Lillehoj, E.P., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S., 2011.Montanide TM IMS 1313 N V PR nanoparticle adjuvant enhances antigen-specific immune responses to profiling following mucosal vaccination against Eimeria acervulina. Vet Parastol, 182,163-170.
12. Kumar, S., Dora, B. B., 2018. A Critical Appraisal on Phytochemical Constituents and Therapeutic Effect of Yashtimadhu (*Glycyrrhiza glabra*). Research & Reviews: Journal of Medical Science and Technology, 6(3), 6-10.
13. Mohseni, M., Pourkazemi, M., Bai, S. C., 2014. Effects of dietary inorganic copperon growth performance and immune responses of juvenile beluga, *Huso huso*. Aquaculture Nutrition, 20(5), 547-556.
14. NRC (National Research Council), 1993. Nutrient Requirement of Fish. National Academy Press, Washington, DC, USA. 182P.
15. Ravelo, C., Magarinos, B., Herrero, M.C., Costa Llorenc, Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2006. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 251, 153-158.
16. Russo, R., Mitchell, H., & Yanong, R. P., 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture, 256(1-4), 105-110.
17. Shafiei, S., Soltani, E., Soltani, M., Hazrati, S. M., 2018. Adjuvant efficacy of G2 (buffalo spleen extraction) against Yersinia septicemia in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss)*. Fish & shellfish immunology, 82, 115-120.
18. Soltani M, Nikbakht Gh., Muosavi HAE, and Ahmadzadehe N. (2008) Epizootic outbreaks of lactococosis caused by

Lactococcus garvieae in farmed rainbow trout in Iran. Bull. Eur. Fish Patholo., 28(5); 207-212.

19. Soltani, M., Shafiei, S. H., Yosefi, P., Mosavi, S., Mokhtari, A., 2014. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & shellfish immunology, 37(1), 60-65.
20. Soltani, M., Mokhtari, A., Mirzargar, S. S., Taherimirghaed, A., Zargar, A., Shafiei, S., Hosseini-Shekarabi, S. P., 2016. Efficacy and immune response of intraperitoneal vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a *Yersinia ruckeri* bacterin formulated with Montanide™ ISA 763 AVG adjuvant. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 36(6), 225.
21. Soltani, M., Lymbery, A., Song, S. K., Hosseini Shekarabi, P., 2018. Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines. Reviews in Aquaculture, 11, 1325-1341.
22. Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R. A., 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. Fish & Shellfish Immunology, 35(6), 1740-1750.
23. Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Stern, N., Shelach, R., Kaye, A., 2000. Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice inhuman breast cancer cells. Cancer research, 60(20), 5704-5709.
24. Tepparin, S., Unajak, S., Hirono, I., Kondo, H., Areechon, N., 2018. Efficacy of Adjuvanted *Streptococcus agalactiae* Vaccine by Montanide ISA 763 A VG in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus Linn*.). Journal of Fisheries and Environment, 42(3), 26-38.
25. Turker, A., Yıldırım, Ö., 2011. Interrelationship of photoperiod with growth performance and feeding of seawater farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11(3), 393-397.
26. Valdez, Y., Brown, E. M., Finlay, B. B., 2014. Influence of the microbiota on vaccine effectiveness. Trends in immunology, 35(11), 526-537.
27. Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J. L., 2006. *(Lactococcus garvieae*) in fish: a review. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 29(4), 177-198.
28. Xu, W., Jiao, C., Bao, P., Liu, Q., Wang, P., Zhang, R., Zhang, Y., 2019. Efficacy of Montanide™ ISA 763 A VG as aquatic adjuvant administrated with an inactivated *Vibrio harveyi* vaccine in turbot (*Scophthalmus maximus L*.). Fish & shellfish immunology, 84, 56-61.
29. Zahrei-Abdevand, L., Soltani, M., Shafiei, Sh., 2021. Adjuvant effect of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract on the efficacy of lactococcosis vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 20(3), 646-662.