مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۱، ۶۳- ۵۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,1:57-63, 2014

ارزیابی کارایی واکسن ضد یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از سویه‌های منطقه‌ای یرسینیا راکری

مهدی سلطانی* شفیق شفیعی سید سعید میرزرگر حسینعلی ابراهیم زاده موسوی مریم قدرت نما
گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۲۳ مرداد ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۱ آبان ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: بروز و توسعه بیماری یرسینوزیس در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان کشور طی سال‌های اخیر موجب نگرانی پرورش دهندگان ماهی گردیده است، لذا تولید دانش فنی واکسن یرسینوزیس با استفاده از سویه‌های بومی جهت خودکفایی داخلی ضروری به نظر می‌رسد. **هدف:** این مطالعه به منظور ارزیابی کارایی واکسن حمام ضد این بیماری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. **روش کار:** در این مطالعه ابتدا نسبت به مطالعه خواص فنوتایپینگ، سرولوژیک و مولکولار تعدادی از ایزوله‌های باکتریایی یرسینیا راکری بدست‌آمده از تلفات مزارع قزل‌آلای کشور اقدام و میزان حدت این ایزوله‌ها از طریق تزریق داخل صفاقی مطالعه گردید. در ادامه ماهیان با استفاده از آنتی ژن سلول کشته حادترین ایزوله‌های باکتریایی به روش حمام واکسینه شدند. سپس کارایی واکسن و میزان تیترآنتی بادی در طی ۱۰ هفته پس از واکسیناسیون ارزیابی گردید. **نتایج:** نتایج حاصل از مطالعه فنوتایپینگ، سرولوژیک و مولکولی منجر به شناسایی ۸ ایزوله یرسینیا راکری گردید و همگی این ایزوله‌ها تولید باند ۴۰۹bp نموده که بیانگر گونه یرسینیا راکری است. طی دوره بیماریزایی ۳ ایزوله موجب تلفات بالای ۵۰٪ و ۵ ایزوله به میزان ۱۶٪ شدند. میزان درصد بقای نسبی (RPS) طی هفته‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ پس از واکسیناسیون به ترتیب ۷۲/۷، ۸۰، ۸۰، ۸۲/۲ و ۸۳/۳٪ برآورد شد. به عبارت دیگر میزان درصد تلفات در گروه‌های واکسینه طی زمان مذکور در دامنه ۲۰-۱۰٪ بوده در حالی که در گروه شاهد این میزان در دامنه ۷۳/۳-۵۶/۷٪ بوده است که از تفاوت کاملاً معنی داری برخوردار بود ($p<0/05$). نتایج تیترآنتی بادی در گروه واکسینه نیز نشان داد که کمترین و بیشترین تیترآنتی بادی به ترتیب برابر ۴/۵۰±۳۲ و ۹/۳۷±۱۶۴/۵۷ بوده که مربوط به هفته‌های ۴ و ۱۰ پس از واکسیناسیون بوده است در حالی که تیترآنتی بادی گروه شاهد غیر قابل سنجش بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به مطالعات به عمل آمده و تفاوت قابل توجه بین میزان درصد بقا در گروه‌های واکسینه و غیر واکسینه استفاده از این واکسن می‌تواند موجب پیشگیری از بروز بیماری یرسینیوزیس در مزارع قزل‌آلای کشور شود.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلا، واکسیناسیون، یرسینیا راکری

مقدمه

بیماری یرسینیوزیس یا بیماری دهان قرمز انترو باکتریایی از جمله بیماریهای باکتریایی است که خسارات اقتصادی قابل توجهی را در آزاد ماهیان پرورشی ایجاد می‌کند. عامل مولد بیماری یرسینیا راکری است که عبارت است از اجرام گرم منفی، میله‌ای با انتهای گرد، فاقد هاگ، متحرک به واسطه تاژک‌های اطرافی (سویه‌های غیر متحرک نیز وجود دارد) و بدون کپسول می‌باشد(۲۱). از نظر خواص بیوشیمیایی باکتری شامل دو بیوتیپ ۱ و ۲ می‌باشد به طوری که بیوتیپ ۱ شامل سویه‌های متحرک و دارای فعالیت فسفولیپاز؛ در حالی که سویه‌های مربوط به بیوتیپ ۲ برای دو آزمایش مذکور منفی می‌باشند(۶). اگرچه بیشترین موارد بیماریزایی مربوط به بیوتیپ ۱ می‌باشد اما در سال‌های اخیر گزارش‌های مربوط به بیوتیپ ۲ نیز در برخی از کشورهای اروپایی در حال افزایش است (۲۲). بیماری در هر دو محیط‌های آب شیرین و شور اتفاق می‌افتد و ماهی قزل‌آلا به ویژه در آب شیرین یکی از حساس‌ترین گونه‌ها محسوب می‌شود (۱۰). به علاوه بیماری در تمام رده‌های سنی از ماهیان اتفاق می‌افتد گرچه در ماهیان بزرگتر عمدتاً به صورت فرم مزمن و در نوزادان و انگشت قدها بیشتر به فرم حاد ظاهر می‌شود. برای کنترل و پیشگیری از بیماری راهکارهای متفاوتی ارائه شده است که از آن جمله می‌توان به استفاده از ترکیبات ضد میکروبی (آنتی بیوتیک‌ها)، پروبیوتیک‌ها، مواد محرک ایمنی و واکسیناسیون اشاره نمود که در میان این روش‌ها استفاده از واکسن دارای کارایی بالاتری نسبت به دیگر روش‌های توصیف شده دارد (۱۷). پیشگیری از بیماری با استفاده از واکسیناسیون اولین بار در سال ۱۹۷۶ شروع که با استفاده از باکتری کشته شده با فرمالین (سویه هگرمن) تهیه شده بود(۱۳). با توجه به منابع متعدد باکتری عامل بیماری، پراکنش جهانی آن و همچنین توسعه بیماری در دهه اخیر در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان کشور و اولین گزارش بیماری در سال ۱۹۹۹ که طی آن ۶ ایزوله باکتری از برخی مزارع قزل‌آلای کشور جداسازی گردید(۱۹) لزوم اتخاذ روش‌های پیش گیری و کنترل بیماری امری ضروری است. با توجه به اینکه در خصوص ساخت واکسن با استفاده از سویه‌های موجود در کشور تاکنون هیچگونه اقدامی صورت نگرفته است، لذا تولید دانش فنی برای ساخت واکسن یرسینیوزیس با استفاده از سویه‌های بومی جهت خودکفایی داخلی ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق ارزیابی کارایی واکسن یرسینیوزیس (فرم غوطه وری) در ماهی قزل‌آلا می‌باشد.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۹۴-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: msoltani@ut.ac.ir

مواد و روش کار

مطالعات فنوتایپینگ، سرولوژیک و مولکولی(PCR): خواص فنوتایپی ۸ ایزوله باکتریایی بدست آمده از تلفات مزارع قزل‌آلای کشور به روش‌های روتین باکتری شناسی مورد مطالعه قرار گرفت (۳). از پاساژهای سوم و یا چهارم این ایزوله‌ها نیز تعدادی نمونه لیوفیلیزه تهیه تا از کاهش میزان حدت آنها طی پاساژهای متوالی جلوگیری شود. برای تأیید تشخیص این ایزوله‌های باکتریایی از روش آزمایش آگلوتیناسیون باکتریایی (روش لاتکس) با استفاده از آنتی بادی مونوکلنال ضد یرسینیا راکری (Bionor Lab. AS, Norway) حاوی هر دو نمونه مثبت (آنتی بادی مونوکلنال ضد یرسینیا راکری) و کنترل منفی (فاقد آنتی بادی) استفاده گردید. هچنین تأیید تشخیص نهایی با استفاده از روش‌های ملکولی (PCR) و استفاده از یک جفت پرایمر شامل (′3---TG TTA ACA CTT AA-3′ و FP: 5′ -CAG CGG AAA GTA GCT RP: 5′ -TGT TCA GTG CTA) انجام شد(۱۲). این پرایمرها موجب شناسایی کلیه ایزوله‌های یرسینیا راکری با وزن مولکولی ۴۰۹ bp می‌شوند. مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش‌های PCR شامل buffer (۲/۵μL) Dream *Taq* Mix dNTPs (۰/۲۵μL)، primer Forward (۱μL)، Reverse primer (۱μL)، Template DNA (۰/۵μL)، Dream Taq (۰/۲۵μL)، DNase free water (تا حجم نهایی ۲۵μL) و سیکل حرارتی برای انجام واکنش‌ها شامل بسط اولیه (۹۴°C سه دقیقه)، غیر فعال‌سازی (۹۴°C یک دقیقه)، Anneling (۵۶°C یک دقیقه)، بسط (۷۲°C؛ ۱/۵ دقیقه)، بسط نهایی (۷۲°C ده دقیقه) بوده است. قبل از انجام آزمایشات PCR نسبت به استخراج DNA باکتریایی از ایزوله‌ها و با استفاده از کیت استخراج DNA (Bio Flux, Gapan Biopsin Bacteria Genomic DNA Extraction kit) اقدام و کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج روی ژل الکتروفورز کنترل گردید. سپس محصول PCR الکتروفورز و از ژل‌های رنگ‌آمیزی شده (biosafe stain, Germany) عکس تهیه و سایزباندهای ایجاده شده تعیین شد.

تعیین حدت سویه‌های (ایزوله‌های) باکتریایی: برای این کار ابتدا سویه‌های باکتریایی از حالت لیوفیلیزه خارج و در آبگوشت TSB (Tryptic soya broth) در دمای ۲۲°C به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس از پاساژ ثانویه سوسپانسیون باکتریایی در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. از سوسپانسیون هر سویه باکتریایی میزان ۰/۱ mL (از رقت 10^{8} cells/mL باکتری درسرم فیزیولوژی استریل) به ماهیان با وزن ۱۵۰g-۱۰۰ و به روش داخل صفاقی تزریق گردید. به ازای هر ماهی گروه کنترل نیز میزان ۰/۱ mL به ازای هر ماهی سرم فیزیولوژی استریل تزریق داخل صفاقی شد(پس از ایجاد بیهوشی با اسانس میخک). سپس میزان تلفات طی یک دوره ۲۰روزه ثبت و تأیید تلفات نیز با کشت و جداسازی باکتری از بافت کلیه ماهیان تلف شده انجام گردید. به ازای هر سویه باکتریایی از ۱۰ ماهی در ۲ تکرار استفاده شد. شرایط کیفی آب شامل آب چاه (مرکز تحقیقات بهداشت و بیماریهای آبزیان بیمارستان تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، کرج) که با هوادهی کامل نسبت به حذف گازهای آن اقدام و اکسیژن آن تأمین می گردید. اکسیژن، دما، pH و سختی آب (کربنات کلسیم) نیز به ترتیب بالاتر از ۷m/L، ۱/۶۲±۱۳/۶°C، ۷/۸ و ۱۸۰ mg/L بود. این آزمایشات در شرایط ایزوله و با استفاده از سیستم نیمه مدار بسته انجام گرفت.

انتخاب ایزوله با حدت بالاتر برای تولید آنتی ژن(واکسن): با توجه به نتایج بیماریزایی حادترین ایزوله برای تهیه آنتی ژن مورد نیاز انتخاب گردید.

تهیه آنتی ژن: برای تهیه آنتی ژن ابتدا با کشت باکتری در فلاسک‌های دو لیتری در دمای ۲۲°C به مدت ۴۸ ساعت در TSB اقدام شد. سپس سلول‌های باکتریایی در سرم فیزیولوژی استریل جمع آوری (سانتریفیوژ در دمای یخچالی) و تعداد سلول زنده در هر میلی‌لیتر از طریق کشت (Viable Count) تعیین شد. در مرحله بعدی به روش توصیه شده توسط Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۷ نسبت به غیر فعال کردن سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده در سرم فیزیولوژی استریل اقدام گردید (۱۸). به علاوه از واکسن تولیدی روی محیط TSA کشت داده تا عدم وجود رشد باکتری تأیید شود. تعداد سلول آنتی ژن در میلی لیتر واکسن تهیه شده برابر 10^{9}×cells/mL لحاظ گردید. واکسن تهیه شده در شرایط استریل به داخل بطری‌های درب پیچدار استریل منتقل و بسته بندی گردید.

ارزیابی سلامت واکسن: برای ارزیابی سلامت واکسن (آنتی ژن) تهیه شده از روش تزریق داخل صفاقی آنتی ژن (۰/۱mL واکسن به ازای هر ماهی) به تعدادی (۲۰ ماهی) قزل آلای ۱۵۰ گرمی (پس از ایجاد بیهوشی با اسانس میخک) اقدام و ماهیان پس از ۳ هفته از نظر علائم رفتاری، تغذیه‌ای و تلفات کنترل شدند.

ایمن سازی ماهیان(واکسیناسیون): برای ایمن سازی ماهیان در مرحله اول نیاز به ماهیان سالم و شرایط کیفی آب مطلوب می‌باشد. لذا با انجام مطالعات و بررسی‌های بعمل آمده و با جلب رضایت یکی از مزرعه‌داران قزل آلا که دارای منبع آبی چشمه و با کیفیت مطلوب برای قزل آلا می‌باشد (در استان چهار محال بختیاری) و با در اختیار قرار دادن تعدادی از تراف‌های مزرعه شرایط ایزوله فراهم و نسبت به انتقال تعداد ۶۵۰ ماهی سالم با محدوده وزنی ۱۵۰g-۱۰۰ اقدام گردید. ماهیان در ۲ تیمار (واکسینه و کنترل) لحاظ و برای مدت ۳ هفته از نظر سلامت و سازگاری به شرایط جدید نگهداری و تغذیه شدند. سپس با استفاده از واکسن تهیه شده و به روش غوطه‌وری (۱L واکسن در ۹L آب برای واکسینه کردن حدود ۱۰۰kg ماهی) به مدت ۳ دقیقه حمام واکسن داده شدند (با هواده مطلوب) (۷). شرایط کیفی آب شامل دمای ۱/۳°C±۱۲/۴، PH برابر ۷/۲ و اکسیژن ۱۰mg/L بوده است. گروه کنترل نیز با سرم فیزیولوژی استریل به مدت ۳

دقیقه حمام داده شدند.

ارزیابی کارایی واکسن (تعیین درصد بقاء نسبی): برای ارزیابی میزان کارآیی واکسن در زمان های ۲، ۴، ۶، ۸و۱۰ هفته پس از واکسیناسیون و در هر مرحله تعداد ۲۵ ماهی (در دو تکرار) از مخزن ماهیان واکسینه برداشته و به روش تزریق داخل صفاقی مورد تزریق دوز باکتری ($1/2\times10^{7}$ LD50 cells/mL) قرار گرفتند. سپس ماهیان تا ۳ هفته در شرایط ایزوله و قرنطینه نگهداری و نسبت به ثبت تلفات روزانه اقدام می شد. همزمان گروه های کنترل (غیرواکسینه) نیز مورد تزریق دز LD50 قرار گرفتند. علت تلفات نیز با کشت از بافت کلیه آنها و جداسازی باکتری روی محیط TSA حاوی ژلوز خون مورد تأیید قرارگرفت. سپس میزان کارایی واکسن براساس فرمول تعیین درصد بقای نسبی (RPS) در هر مرحله بدست آمد (۷).

RPS =(۱ـ درصد تلفات واکسینه / درصد تلفات غیرواکسینه)×۱۰۰

تعیین تیترآنتی بادی: همزمان با مراحل زمانی تعیین درصد بقاء نسبی از تعدادی از ماهیان واکسینه و غیر واکسینه به صورت تصادفی خون گیری و نسبت به تعیین تیترآنتی بادی آنها به روش آگلوتیناسیون با کتریایی ارائه شده توسط Roberson در سال ۱۹۹۰ اقدام گردید (۱۵). بعلاوه برای تولید سرم هایپرایمن با تزریق داخل صفاقی آنتی ژن (واکسن) به تعدادی از ماهیان به صورت هفتگی تا ۵ هفته اقدام و در پایان هفته پنجم نسبت به جمع آوری آنتی سرم و ذخیره سازی آن در ۷۰°C- تا زمان استفاده به عنوان کنترل مثبت اقدام شد.

آنالیز آماری: تحلیل آماری داده های حاصل از مطالعه درصد بقای نسبی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و نرم افزار SPSS ویرایش شماره ۱۹ صورت گرفت.

نتایج

نتایج مطالعات فنوتایپینگ، سرولوژیک و مولکولی (PCR): در مطالعات فنوتایپینگ این ایزوله ها شامل باکتری های گرم منفی، اکسیداز منفی، متحرک و کاتالاز مثبت بودند. براساس بررسی خواص بیوشیمیایی این ایزوله ها متعلق به بیوتیپ I یرسینیا راکری تشخیص داده شدند (جدول ۱).

در مطالعات سرولوژیک و با استفاده از آنتی بادی منوکلنال این ایزوله ها بشدت با آنتی بادی ضد یرسینیا راکری واکنش آگلوتیناسیون نشان دادند. در مطالعات PCR نیز این ایزوله ها با استفاده از پرایمر مورد استفاده تولید باند 409bp نموده و به عنوان یرسینیا راکری تشخیص داده شدند (تصویر ۱).

نتایج مطالعات بیماریزایی (تعیین حدت): نتایج مطالعات بیماریزایی تجربی بر روی ۸ ایزوله مورد استفاده در قزل آلای رنگین کمان طی یک دوره ۲۰ روزه نشان داد که بیشترین حدت مربوط به سویه های جداسازی شده از آمل، فیروزکوه و میانرود با میزان تلفات بالای ۵۰٪ و کمترین میزان

جدول ۱. خواص بیوشیمیایی ایزوله های باکتریایی (۸ ایزوله) یرسینیا راکری بدست آمده از مزارع قزل آلای مبتلا.(*) (Austin et al. 2007).

مشخصه	نتیجه	رفرنس(*)	مشخصه	نتیجه	رفرنس(*)
گرم	-	-	ساکارز	(+)	(+)
تحرک ۲۳°C	+	+	مانیتول	+	+
تحرک ۳۷°C	-	-	اینوزیتول	-	-
اکسیداز	-	-	ارابیتوز	+	+
کاتالاز	+	+	رامنوز	-	-
اندول	-	-	H2S	-	-
MR	-	-	سیترات سیمون	+	+
VP	+	+	قابلیت رشد در محیط مکانکی	+	+
0/F	+/+	+	قابلیت رشد در محیط شاتس	+	+
ژلاتین	+	+	قابلیت رشد در محیط اختصاصی یرسینیا	+	+
آرژنین	-	-	ONPG	+	+
لیزین	+	+	O /F(تولید گاز)	-	-
ارنیتین	-	-	آگلوتیناسیون	+۴	+۴
تریپتوفان	-	-			
گلوکز	+	+	اوره	-	-

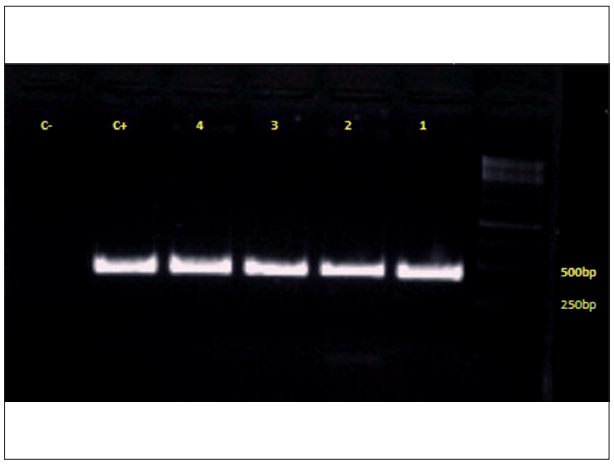
جدول ۲. میزان بقا در تیمارهای واکسینه و غیر واکسینه و نیز درصد بقا نسبی ماهی قزل آلا طی ۱۰ هفته پس از واکسیناسیون با واکسن ضد یرسینیوزیس در دمای ۱۲/۴±۱/۳°C.

زمان (هفته)	میانگین درصد بقا درگروه واکسینه	میانگین درصد بقا درگروه غیر واکسینه	درصد بقای نسبی(RPS)
۲	۸۰	۲۶/۷	۷۲/۷
۴	۸۶/۷	۳۳/۴	۸۰
۶	۸۶/۷	۳۳/۴	۸۰
۸	۹۰	۴۳/۳	۸۲/۲
۱۰	۹۰	۴۰	۸۳/۳

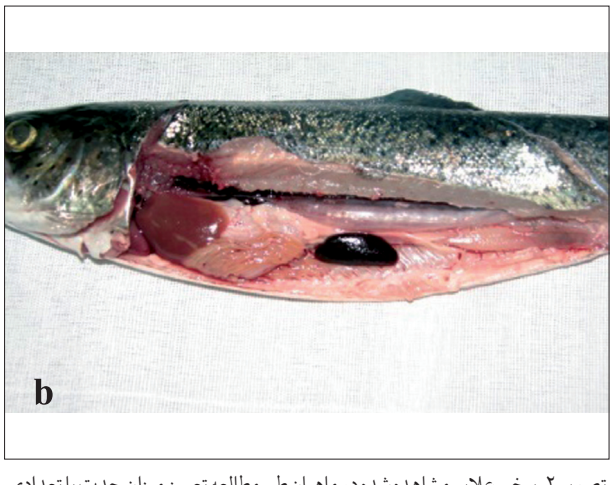
تلفات مربوط به سویه های جداسازی شده از استان تهران با میزان تلفات ۱۶٪ بوده است. ماهیان مبتلا علائمی از قبیل تیرگی پوست، اگزوفتالمی، طحال بزرگ، تجمع مایع در محوطه شکمی و پرخونی و خونریزی در اندام های داخلی را از خود نشان دادند (تصویر ۲).

نتایج سلامت واکسن (Safety): تجویز آنتی ژن (واکسن) به ماهیان و نگهداری آنها طی مدت ۳ هفته هیچگونه علائم غیر طبیعی، تغذیه ای و تلفاتی در بر نداشت. به علاوه از نظر کالبد گشایی نیز ضایعات غیر طبیعی در اندام های داخلی مشاهده نگردید.

کارایی واکسن (درصد بقاء نسبی): نتایج درصد بقاء در گروه های واکسینه و غیر واکسینه و نیز میزان درصد بقا نسبی طی هفته های ۲، ۴، ۶، ۸و۱۰ پس از واکسیناسیون در جدول ۲ نشان داده شده است. براساس این نتایج میانگین میزان درصد بقا در گروه واکسینه به ترتیب ۸۰، ۸۶/۷، ۸۶/۷، ۹۰ و ۹۰٪ برآورد شد در حالیکه این میزان برای گروه کنترل (غیر واکسینه) به ترتیب ۲۶/۷، ۳۳/۴، ۳۳/۴، ۴۳/۳ و ۴۰٪ برآورد شد. بعلاوه نتایج درصد بقاء نسبی طی هفته های ۲، ۴، ۶، ۸و۱۰ پس از واکسیناسیون به ترتیب ۷۲/۷، ۸۰، ۸۰، ۸۲/۲ و ۸۳/۳٪ برآورد شد. مقایسه آماری این نتایج بیانگر اختلاف معنی دار بین همه نتایج گروه واکسینه با



تصویر ۱. ژل حاصل از PCR رنگ‌آمیزی شده با (Nanolytic.Germany) stain Biosafe. ستون۱- ۴: نمونه‌های ایزوله‌های باکتریایی مورد آزمایش، ستون C^+: کنترل مثبت(یرسینیا راکری ایزوله رفرنس آزمایشگاه بخش بیماریهای ماهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه‌کپنهاگ) ستون C^-: کنترل منفی.



تصویر ۲. برخی علایم مشاهده شده در ماهیان طی مطالعه تعیین میزان حدت با تعدادی از ایزوله‌های یرسینیا راکری. [a] تیره‌شدن پوست در مقایسه با گروه‌کنترل، [b] بزرگ‌شدن طحال و کبد همراه با پرخونی و خونریزی در اندام‌های داخلی.

گروه غیرواکسینه بود (p<۰/۰۵).

نتایج تیتر آنتی بادی: نتایج تیتر آنتی بادی (میانگین±خطای استاندارد) در گروه‌های واکسینه طی هفته‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ به ترتیب برابر غیر قابل سنجش، ۴/۵۰±۳۲، ۳/۴۶±۵۶، ۵/۲۶±۱۰۹/۷۱ و ۹/۳۷±۱۶۴/۵۷ بوده است؛ در حالی که تیتر آنتی بادی گروه شاهد در تمامی زمان‌های فوق الذکر غیر قابل سنجش می‌باشد. براین اساس کمترین و بیشترین تیتر آنتی بادی در گروه‌های واکسینه ۴/۵۰±۳۲ و ۹/۳۷±۱۶۴/۵۷ بوده که مربوط به هفته‌های ۴ و ۱۰ پس از واکسیناسیون می‌باشد.

بحث

صنعت پرورش قزل آلا در کشور طی سال‌های اخیر از رشد چشم‌گیری برخوردار بوده است بگونه‌ای که با تولید بیش از یکصد هزار تن در سال ۱۳۹۰ کشور به رتبه اول تولید قزل آلا در منابع آب‌های شیرین در دنیا تبدیل شده است. با این حال بروز بیماریهای عفونی طی دهه اخیر به یکی از موانع اصلی توسعه پایدار این صنعت تبدیل شده است. بنابراین اتخاذ روش‌های پیش گیری و محافظت از این منبع پروتئینی امری ضروری است. سال‌هاست که پیش‌گیری از بروز بیماری یرسینیوز به روش واکسیناسیون در مزارع آزاد ماهیان اروپا، آمریکا، ژاپن واسترالیا امری متداول می‌باشد بطوری که کشورهای درگیر عمدتاً با استفاده از ایزوله‌های بومی عامل بیماری نسبت به تهیه و عرضه واکسن‌های بومی اقدام نموده‌اند (۲۱). در ایران بروز و توسعه این بیماری طی سال‌های اخیر موجب بروز خسارت قابل توجه و بعلاوه استفاده مکرر از آنتی بیوتیک‌ها گردیده است (۱۶). در تحقیق حاضر که با استفاده از ایزوله‌های بومی یرسینیا راکری به عنوان بذر واکسن (آنتی ژن) استفاده شده است؛ میزان درصد بقاء نسبی طی یک دوره ۱۰ هفته پس از واکسیناسیون برابر ۸۳٪ بوده که بیانگر کارایی این واکسن به روش حمام می‌باشد. بررسی روند بقا نشان داد که با گذشت زمان بر میزان بقا و در نتیجه کارایی واکسن تا ۱۰ هفته پس از واکسیناسیون افزوده گردیده است که این امر خود به عنوان یکی از مزیت‌های یک واکسن با کارایی مطلوب محسوب می‌شود. از جمله دلایل احتمالی این موضوع می‌تواند ناشی از انتخاب بذر (ایزوله) مناسب باکتری، شرایط مطلوب کیفیت آب دوران ایمن سازی وکیفیت و سلامت ماهیان مورد استفاده و نیز عوامل دیگری نظیر تغذیه و درجه حرارت مناسب دوران واکسیناسیون باشد (۱۷). بطور کلی مطالعات و تحقیقات متنوعی درارتباط با پاسخ‌های ایمنی و کارایی واکسن با استفاده از ایزوله‌های باکتریایی مناطق مختلف توسط محققین مختلف انجام گرفته است که همگی آنها بیانگر مؤثر بودن واکسن‌های ضد یرسینیا راکری به روش حمام و تزریقی است که بسته به اندازه ماهی، درجه حرارت آب، رژیم غذایی، نوع و غلظت آنتی ژن مورد استفاده تفاوت‌هایی نیز در نتایج این محققین گزارش شده است. برای مثال در مطالعه Ispir و Duru در سال ۲۰۱۰ تجویز دو مرحله‌ای آنزیم‌های خارج سلولی یرسینیا راکری به روش حمام در ماهی قزل آلا منجر به درصد بقا ۸۱-۷۴٪

طی یک دوره ۲ ماهه پس از ایمنی سازی شد(۱۱). در حالی که در مطالعات Cagirgun و Tanr1kul در سال ۱۹۹۸ و Raida و Buchmann در سال ۲۰۰۸ با استفاده آنتی ژنهای سلول کامل و یا سلول های تخفیف حدت یافته موفق به ایجاد درصد بقاء نسبی اندکی بیشتر شدند(۵،۱۴). در همه مطالعات مذکور از واکسن یاد آور استفاده گردید. در حالیکه در مطالعات حاضر با واکسینه کردن ماهیان به روش حمام و برای یک مرتبه موجب درصد بقا نسبی ۸۳٪ گردید که مشابه نتایج محققان مذکور می باشد. مطالعه حاضر در دمای ۱۳/۴±۱°C و با استفاده از ماهیان با وزن ۱۵۰g-۱۰۰ و سایر شرایط آب با کیفیت مطلوب انجام گرفته است. بعلاوه غلظت آنتی ژن مورد استفاده در این تحقیق برابر $۱۰^{۹}$ سلول به ازای هر میلی لیتر بوده است که تقریباً مشابه غلظت های مورد استفاده آنتی ژن در سایر تحقیقات است. بنابراین هنگام واکسیناسیون توجه به فاکتورهای مؤثر بر کارایی واکسن شامل فاکتورهای محیطی، فاکتورهای مرتبط با واکسن و فاکتورهای میزبان ضروری است. همچنین مقایسه نتایج درصد بقاء و تیتر آنتی بادی در مطالعه حاضر نشان می دهد که ارتباط مستقیمی بین این دو وجود دارد بطوریکه با گذشت زمان تیتر آنتی بادی در گروه واکسینه افزایش یافته (۹/۳۷±۱۶۴/۵۷، ۴/۵۰±۳۲) است که با افزایش درصد بقاء نیز همراه بوده است. اگرچه برخی محققین ایمنی سلولی و مخاطی را در پیشگیری از بروز بیماری یرسینیوزیس دخیل می دانند (۹) اما نقش ایمنی هومورال (تولید آنتی بادی) در ایجاد محافظت توسط بسیاری از محققین مورد تاکید قرار گرفته است (۱،۱۰). بعلاوه نوع سروتیپ باکتریایی مورد استفاده نیز به عنوان عامل دیگری از فاکتورهای مؤثر در کارایی واکسن ضد یرسینیوزیس مورد توجه محققان واقع شده است بطوریکه از بین چهار سروتیپ شناخته شده به ترتیب سروتیپ های o_1 و o_2 بیشترین فراوانی در بروز بیماری را داشته و در نتیجه واکسن های حاصل از آنها بیشترین کارایی را نیز تاکنون داشته است(۲۰) . بنابراین انتخاب بذر مناسب در کارایی واکسن تولیدی از اهمیت خاصی برای پیشگیری از این بیماری برخوردار است. مطالعات تاکنون بعمل آمده بیانگر تشابه بالا در میان ایزوله های عامل بیماری در مزارع ایران است (NCBI) با این حال مطالعه بیشتری از جمله تعیین بیوتیپ ها مورد نیاز است تا بتوان نسبت به انتخاب بذرهای مناسب برای تولید آنتی ژن اقدام نمود زیرا برخی گزارش های اخیر از آمریکا و اروپا بیانگر نقش بیماریزایی بیوتیپ ۲ نیز می باشد(۲،۴،۸،۲۲). در این راستا مطالعات سروتایپینگ ایزوله های ایرانی توسط مولفین در حال انجام است که نتایج آن می تواند به ارتقا کارایی واکسن حاضر کمک نماید. در جمع بندی با توجه به این که بیماری یرسینیوز طی سال های اخیر موجب خسارات فراوانی به صنعت قزل آلا گردیده است لذا اتخاذ روش های پیشگیری از بروز بیماری امری ضروری است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که می توان با استفاده از واکسن مذکور نسبت به ایمن سازی ماهیان به روش حمام و با استفاده از واکسن کشته اقدام نمود زیرا موجب افزایش درصد بقاء نسبی قابل توجه و افزایش تیتر آنتی بادی در ماهیان واکسینه می شود. مطالعات بعدی به منظور شناسایی و مقایسه ایزوله های عامل بیماری در مزارع سایر استان های کشور و نیز روش های بعدی واکسیناسیون در حال انجام است که به ارتقا کارایی واکسن مذکور کمک خواهد نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب زیر پروژه، طرح کلان ملی واکسن های طیور و آبزیان مصوب شورای عالی عتف و نیز قطب علمی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشگاه تهران انجام گرفته است.

References

1. Amend, D.F., Johnson, K.A., Croy, T.R., Mccarthy, D.H.(1983) Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins. J Fish Dis. 4: 337-344.
2. Arias, C.R., Olivares-Fuster, O., Hayden, K., Shoemaker, C.A., Grizzle, J.M., Klesius, P.H. (2007) First report of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the USA. Aquat Anim Health. 19: 35-40.
3. Austin, B., Austin, D. (2007) Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. (4th ed.) Praxis Publishing Ltd. Chichester, UK.
4. Austin, D.A., Robertson, P.A.W., Austin, B. (2003) Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Sys Appl Microbiol. 26: 127-131.
5. Cagirgan, H., Tanrikul, T. (1998) Testing the effectiveness of a *Yersinia ruckeri* in infected and chemically treated juvenile rainbow torut (*Oncorhynchus mykiss*). J Appl Ichthyol. 14: 239-243.
6. Davies, R.L., Frerichs, G.N. (1989) Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. J Fish Dis. 12: 357-365.
7. Ellis, A. (1988) Fish Vaccination. (1st ed.) Academic Press. London, UK.
8. Fouz, B., Zarza, C., Amaro, C. (2006) First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. Fish Dis. 29: 339-46.
9. Gravningen, K., Kestin, S., Thorarinsson, R.,

Syvertsen, C. (1998) Oral vaccination against enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). The effect of vaccine dose rate on protection against the disease. J Appl Ichthyol. 4: 163-166.

10. Hastein, T., gudding, R., Evensen, O. (2005) bacterial vaccines for fish: an adupte of the current situation worldwide. Dev Biol (Basel). 121: 55-74.
11. Ispir, U., Dorucu, M. (2010) Effect of immersion booster vaccination with *Yersinia ruckeri* extracellular products (ECP) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Int Aquat Res. 2: 127-130.
12. Jeffrey, T., LeJeune, F., Rurangirwa, R. (2000) Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. J Vet Diagn Invest. 12: 558-561.
13. Johnson, K.A., Flynn, J.K., Amed, D.F. (1982) Duration of immunity in salmonides vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum*. J Fish Dis. 5: 207-213.
14. Raida, M.K., Buchmann, K. (2008) Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. Vaccine. 26: 1050-1062.
15. .Roberson, B.S. (1990) Bacterial agglutination. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkle, W.B. (eds.). (1st ed.) SOS Publication. Fair Haven, New Jersey, USA. p. 81-87.
16. Soltani, M. (2012) Aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran. In:Aquaculture in Middle East and North Africa. Status and research needs. Saheb, A. (ed.). (1st ed.) Nova pub. NW, USA. p.19-30.
17. Soltani, M.(2007) Fish and Shellfish Immunology. (1st ed.) University of Tehran Publication.Tehran, Iran.
18. Soltani, M., Alishahi M., Mirzargar, S., Nikbakht, Gh. (2007) Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iran J Fish Sci. 7: 129-140.
19. Soltani, M., Fadaii, F., Mehrabi, M.R. (1999) First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. B Eur Assoc Fish Pathol. 9: 173-177.
20. Temprano, A., Riaño, J., Yugueros, J., González, P., Castro, L.de., Villena, A., Luengo, J.M., Naharro, G. (2005) potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic aroA mutant as a live attenuated vaccine. J Fih Dis. 28: 419-427.
21. Tobback, D., Ahermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K. (2007) *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis. 30: 257-68.
22. Wheeler, R.W., Davies, R.L., Dalsgaard, I., Garcia, J., Welch, T.J., Wagley, S., Bateman, K.S., Verner-Jeffreys, D.W. (2009) *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. Dis Aquat Org. 84: 25-33.

Study of efficacy of vaccination against yersinosis in rainbow trout using local strains of *Yersinia ruckeri*

Soltani, M.*, Shafiei, Sh., Mirzargar, S.S., Ebrahimzadeh Musavi, H.A., Ghodratnama, M.

Department af Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

(Received 14 August 2013 , Accepted 23 November 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Outbreak and development of yersiniosis in rainbow trout farms in Iran has caused a serious problem over the last years. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to evaluate the efficacy of immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* in rainbow trout. **METHODS:** Prior to antigen preparation, the phenotypic, molecular and serological features of a number of *Yersinia ruckeri* isolates obtained from affected trout farms were studied. The virulent of these isolates were then evaluated using intra peritoneal injection route. Trout were vaccinated by immersion route (3 min at 12 °C) using *Yersinia ruckeri* bacterin of the virulent strains. The efficacy of vaccine antibody titer within 2, 4, 6, 8 and 10 weeks post vaccination were evaluated using relative percent survival. **RESULTS:** The phenotyping, serological and molecular studies have led to identification of 8 isolates of *Yersinia ruckeri* and all the isolates produced bands 409 bp, which is indicative of *Yersinia ruckeri*. In pathogenicity test 3 isolates caused above 50% mortality, while 5 isolates reached 16%. The RPS of vaccinated fish reached 72.7, 80, 80, 82.2 and 83.3% within 2, 4, 6, 8 and 10 weeks post vaccination, respectively. In the other words, the mortality level in vaccinated groups was in range of 10-20% within 10 weeks post vaccination, while those of control group was in range 56.7 - 73.3% ($p<0.05$) .The lowest and the highest antibody titers in immunized groups were 32±4.50 and 164.57±9.37 respectively, obtained after 4 and 10 weeks of immunization, whereas the control group had no measurable titer of antibody. **CONCLUSIONS:** The results of this study clearly show that this vaccine can remarkably protect the trout from yersiniosis outbreaks inside Iran.

Key words: rainbow trout, vaccination, *Yersinia ruckeri*

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Biochemical characteristics of *Yersinia ruckeri* isolates recovered from farmed rainbow trout.

Table 2. Survival rates of vaccinated and non-vaccinated treatments and the relative percent survival of rainbow trout during 10 weeks after vaccination with a yersiniosis vaccine (temperature 12/4 ±1/3 °C).

Figure 1. Some of the signs observed in the experimentally infected fish to determine the virulence of *Yersinia ruckeri* isolates. a) dark color of the skin, b) Enlarged spleen and liver with hyperemia and hemorrhage in internal organs.

Figure 2. The agarose gel obtained of PCR stained to Biosafe stain (Nanolytic.Germany). Lane 1-4: Bacterial isolates; Lane C+: Positive control (Reference strains of *Yersinia ruckeri*: fish disease laboratory of veterinary medicine, University of Copenhagen); LaneC-: Negative control.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-61117094, Fax: 021-66933222**