

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور

عنوان:

**تهیه و بررسی اثر بخشی واکنش‌های مونووآلان و بی‌ریو آلجینولیتیکوس، دی‌آلان  
و بی‌ریو آلجینولیتیکوس+ استرپتوکوکوس و پلی‌آلان و بی‌ریو- استرپتوکوکوس  
اینیایی در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی**

مجری:

مینا آهنگرزاده

شماره ثبت

۶۱۸۶۳

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور

عنوان طرح/پروژه: تهیه و بررسی اثر بخشی واکنش‌های مونووالان و بی‌ریو آلجینولیتیکوس، دی والان و بی‌ریو آلجینو لیتیکوس + استرپتوکوکوس و پلی والان و بی‌ریو - استرپتوکوکوس اینیایی در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی

کد مصوب: ۹۸۱۱۶۴-۹۸۱-۰۲۹-۱۲-۷۴-۲۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: مینا آهنگرزاده

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد): -

نام و نام خانوادگی مجری: مینا آهنگرزاده

نام و نام خانوادگی همکار(ان): حسین هوشمند، مجتبی ذبایح نجف آبادی، منصور طرفی موزان زاده، اشکان اژدری، سیدمحمدابراهیم جلیل ذریه زهرا، سمیرا ناظم رعایا، رحیم پیغان، عبدالرحیم اصولی، لفته محسنی نژاد، عیسی شریف پور، ابوالفضل سپهداری، شاپور کاکولکی، محمدرضا مهرابی، آیه سادات صدر، سیدرضا سیدمرتضائی، فرخ امیری، ابراهیم بمانی لیرگشاسی، شاپور مهرجویان، بهاره خرمی نیا

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): - مسعود قربانپور نجف آبادی، مریم دادار

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان خوزستان

تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۰۷/۱

مدت اجرا: ۲ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۱

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

**«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»**

طرح/پروژه: تهیه و بررسی اثر بخشی واکنش‌های مونووالان  
ویبریو آلجینولیتیکوس، دی والان ویبریو آلجینو لیتیکوس +  
استرپتوکوکوس و پلی والان ویبریو - استرپتوکوکوس اینیایی در  
ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی

کد مصوب: ۹۸۱۱۶۴-۰۲۹-۱۲-۷۴-۲۴

شماره ثبت (فروست): ۶۱۸۶۳ تاریخ: ۱۴۰۱/۴/۲۱

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مینا آهنگرزاده دارای مدرک  
تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت آبزیان می‌باشد.

**پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان**

**در تاریخ ۱۴۰۱/۰۴/۰۶ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.**

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد  پژوهشکده  مرکز  ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبی پروری آبهای

جنوب کشور مشغول بوده است.

| عنوان   | «فهرست مندرجات» | صفحه |
|---|-----------------|------|
| چکیده   |                 | ۱    |
| ۱. مقدمه  |                 | ۳    |
| ۱.۱. آبی پروری ماهیان دریایی                                |                 | ۳    |
| ۱.۲. تولید جهانی پرورش ماهی در قفس                          |                 | ۳    |
| ۱.۳. آبی پروری و پرورش در قفس ماهیان دریایی در ایران        |                 | ۴    |
| ۱.۴. بیماری‌های عفونی در ماهیان دریایی گرمابی               |                 | ۵    |
| ۱.۴.۱. بیماری‌های باکتریایی                                 |                 | ۵    |
| ۱.۵. گونه‌های مهم و بیماری‌زا خانواده ویبریوناسه            |                 | ۱۳   |
| ۱.۵.۱. ویبریو هاروی ( <i>V. harveyi</i> )                   |                 | ۱۳   |
| ۱.۵.۲. ویبریو آلجینولیتیکوس ( <i>Vibrio alginolyticus</i> ) |                 | ۱۶   |
| ۱.۶. استرپتوکوکوزیس   |                 | ۱۷   |
| ۱.۶.۱. بیماری‌زایی و حدت در استرپتوکوکوس اینیایی            |                 | ۱۹   |
| ۱.۷. سیستم ایمنی ماهی                                       |                 | ۲۰   |
| ۱.۷.۱. سیستم ایمنی اختصاصی                                  |                 | ۲۰   |
| ۱.۷.۲. دفاع اختصاصی همورال                                  |                 | ۲۰   |
| ۱.۷.۳. آشنایی با پادگنها و واکنش بدن در مقابل آنها          |                 | ۲۰   |
| ۱.۸. آشنایی با واکسیناسیون در آبی پروری                     |                 | ۲۱   |
| ۱.۸.۱. تاریخچه‌ی واکسیناسیون ماهی                           |                 | ۲۲   |
| ۱.۸.۲. سابقه واکسن آبیان در ایران                           |                 | ۲۴   |
| ۱.۹. انواع واکسن در آبی پروری                               |                 | ۲۶   |
| ۱.۹.۱. واکسنهای غیر فعال شده                                |                 | ۲۶   |
| ۱.۹.۲. واکسنهای زنده تخفیف حدت یافته                        |                 | ۲۷   |
| ۱.۹.۳. واکسنهای نوترکیب                                     |                 | ۲۸   |
| ۱.۹.۴. واکسن‌های اتورژن (بومی منطقه‌ای)                     |                 | ۲۹   |
| ۱.۱۰. روش‌های واکسیناسیون در آبیان                          |                 | ۳۰   |
| ۱.۱۰.۱. واکسیناسیون به روش خوراکی                           |                 | ۳۰   |

|    |  |
|----|--|
| ۳۱ | ۱. ۱۰. ۲. واکسیناسیون به روش تزریقی.....   |
| ۳۲ | ۱. ۱۰. ۳. واکسیناسیون به روش غوطه وری.....                                       |
| ۳۲ | ۱. ۱۱. ظرفیت واکسن.....  |
| ۳۳ | ۱. ۱۲. ادجوانتها.....  |
| ۳۳ | ۱. ۱۲. ۱. انواع و دسته‌بندی ادجوانتها.....                                       |
| ۳۴ | ۱. ۱۲. ۲. مکانیسم اثر ادجوانتها و چگونگی اثر آنها بر سیستم ایمنی.....            |
| ۳۵ | ۱. ۱۲. ۳. ادجوانتهای سیگنال ۱ در واکسیناسیون ماهی یا امولسیونهای روغنی.....      |
| ۳۶ | ۱. ۱۲. ۴. ادجوانت فروند.....   |
| ۳۷ | ۱. ۱۳. واکسیناسیون علیه ویبریورس.....  |
| ۳۸ | ۱. ۱۴. واکسیناسیون علیه استرپتوکوکوزیس.....                                      |
| ۳۹ | ۱. ۱۵. مروری بر واکسن‌های ماهی باس دریایی آسیایی.....                            |
| ۴۰ | ۱. ۱۵. ۱. عوامل موثر در توفیق واکسیناسیون ماهیان.....                            |
| ۴۱ | ۲. مواد و روش کار.....   |
| ۴۱ | ۲. ۱. روش تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده.....                              |
| ۴۱ | ۲. ۱. ۱. روش تهیه (IX) PBS.....  |
| ۴۱ | ۲. ۱. ۲. روش تهیه محیط‌های کشت باکتری.....                                       |
| ۴۱ | ۲. ۱. ۳. روش تهیه محیط آگار خون.....   |
| ۴۱ | ۲. ۱. ۴. روش تهیه Skim milk ده درصد برای نگهداری باکتری در فریزر.....            |
| ۴۱ | ۲. ۱. ۵. روش تهیه گلیسرول ۳۰٪ برای نگهداری باکتری.....                           |
| ۴۲ | ۲. ۲. روش تهیه محلول‌های لازم جهت آزمایش الیزا.....                              |
| ۴۲ | ۲. ۲. ۱. روش تهیه بافر پوشاننده.....   |
| ۴۲ | ۲. ۲. ۲. روش تهیه PBST (PBS-Tween).....  |
| ۴۲ | ۲. ۲. ۳. روش تهیه بافر استات سدیم.....   |
| ۴۲ | ۲. ۲. ۴. روش تهیه TMB (۱ درصد).....  |
| ۴۲ | ۲. ۲. ۵. روش تهیه محلول سوبسترا - کروموژن برای الیزا.....                        |
| ۴۲ | ۲. ۲. ۶. روش تهیه BSA یک درصد در PBS به عنوان مسدود کننده.....                   |
| ۴۳ | ۲. ۳. روش کار.....   |
| ۴۳ | ۲. ۳. ۱. جداسازی و شناسایی باکتری.....   |
| ۴۳ | ۲. ۳. ۲. بررسی ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی باکترین تهیه‌شده از جدایه‌های حاد..... |

|    |  |
|----|--|
| ۴۵ | ۲. ۴. محل انجام آزمایش   |
| ۴۶ | ۲. ۵. تیمار بندی و ایمن سازی ماهی ها   |
| ۴۷ | ۲. ۶. تهیه واکسن خوراکی  |
| ۴۸ | ۲. ۷. بررسی کارایی واکسن   |
|    | ۲. ۷. ۱. نمونه گیری جهت اندازه گیری پادتن ضد ویبریو هارویی، ویبریو آلیگینولیتیکوس و            |
| ۴۸ | استرپتوکوکوس اینیایی   |
| ۴۹ | ۲. ۷. ۲. مواجهه با باکتری دارای بالاترین حدت   |
|    | ۲. ۸. بررسی ایمنی زایی (تیترا آنتی بادی) باکترینهای استفاده شده در تیمارهای مورد آزمایش با روش |
| ۵۰ | الایزا   |
| ۵۰ | ۲. ۸. ۱. خالص سازی ایمونوگلوبولین های سرم ماهی باس دریایی آسیایی                               |
| ۵۱ | ۲. ۸. ۲. تهیه آنتی سرم خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین ماهی   |
| ۵۱ | ۲. ۹. انجام آزمایش الایزای غیرمستقیم   |
| ۵۱ | ۲. ۹. ۱. تهیه آنتی ژن سونیکه   |
|    | ۲. ۹. ۲. دستیابی به رقت های مناسب از آنتی ژن، سرم ماهی، سرم خرگوش و کونژوگه در آزمایش          |
| ۵۲ | الایزا   |
| ۵۳ | ۲. ۹. ۳. انجام آزمایش الایزا برای نمونه های مورد بررسی   |
| ۵۵ | ۲. ۱۰. ۱. ارزیابی شاخصهای سرمی ماهیان  |
| ۵۵ | ۲. ۱۰. ۱. اندازه گیری میزان فعالیت کمپلمان سرم   |
| ۵۵ | ۲. ۱۰. ۲. اندازه گیری لیزوزیم سرم  |
| ۵۵ | ۲. ۱۰. ۳. اندازه گیری پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین   |
| ۵۶ | ۲. ۱۱. آنالیز آماری  |
| ۵۷ | ۳. نتایج   |
| ۵۷ | ۳. ۱. تهیه باکترینها   |
| ۵۷ | ۳. ۲. بررسی استریل بودن باکترینها  |
| ۵۷ | ۳. ۳. بی خطر بودن باکترینها  |
| ۵۷ | ۳. ۴. محافظت کنندگی و ایمنی زایی باکترینها   |
| ۵۷ | ۳. ۴. ۱. محافظت کنندگی بعد از مواجهه با باکتریهای بیماریزا                                     |
| ۶۲ | ۳. ۵. نتایج میزان بازماندگی بعد از مواجهه با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی                       |

|    |   |
|----|---|
| ۶۵ | ۳.۶. ایمنی زایی.....  |
|    | ۳.۶.۱. عیار آنتی‌بادی روز صفر قبل از ایمن سازی ضد ویبریو هاروی، ویبریو آلجینولیتیکوس و        |
| ۶۵ | استرپتوکوکوس اینیایی.....   |
| ۶۵ | ۳.۶.۲. عیار آنتی‌بادی ضد ویبریو هاروی در ماهیان واکسینه شده با باکترین حاوی ویبریو هاروی..... |
|    | ۳.۶.۳. عیار آنتی‌بادی ضد ویبریو آلجینولیتیکوس در ماهیان واکسینه شده با باکترین حاوی ویبریو    |
| ۶۷ | آلجینولیتیکوس.....  |
|    | ۳.۶.۴. عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیایی در ماهیان واکسینه شده با باکترین حاوی           |
| ۶۸ | استرپتوکوکوس اینیایی.....   |
| ۶۹ | ۳.۷. نتایج ارزیابی شاخصهای ایمنی و سرمی ماهیان.....   |
| ۶۹ | ۳.۷.۱. فعالیت لیزوزیم سرم.....  |
| ۷۰ | ۳.۷.۲. فعالیت کمپلمان سرم.....  |
| ۷۰ | ۳.۷.۳. گلوبولین سرم.....  |
| ۷۱ | ۳.۷.۴. پروتئین تام سرم.....   |
| ۷۲ | ۳.۷.۵. آلبومین.....   |
| ۷۳ | ۴. بحث.....   |
| ۷۴ | ۴.۱. میزان محافظت‌کنندگی.....   |
| ۷۷ | ۴.۲. ایمنی‌زایی.....  |
| ۸۰ | ۴.۳. فاکتورهای ایمنی و سرمی غیر اختصاصی.....  |
| ۸۴ | ۴.۴. مزیت واکسن‌های پلی‌والان.....  |
| ۸۵ | ۵. نتیجه‌گیری نهایی.....  |
| ۸۶ | منابع.....  |
| ۹۹ | چکیده انگلیسی.....  |

## چکیده

در حال حاضر آبی پروری سریع ترین رشد را در تولید غذا داشته و تقریباً نیمی از پروتئین با منشا آبیان مورد نیاز انسان را در دنیا تأمین می کند. گزارش های فراوان، از بروز بیماری ها و تلفات ناشی از آن ها و در نتیجه خسارت اقتصادی در آبی پروری ماهیان دریایی، نشان می دهد که بیماری ها خصوصاً بیماری های باکتریایی چالش بزرگ پیش روی توسعه آبی پروری در بیشتر کشورهای پیشگام این صنعت خواهند بود و به عنوان یک هشدار برای پرورش دهندگان و برنامه ریزان شیلاتی در این کشورها محسوب می شوند. باکتری ها از جمله پاتوژن های بیماریزای جدی آبی پروری دریایی می باشند که از آن جمله، می توان به بیماری و بیبریو سیس ناشی از باکتری های جنس و بیبریو به ویژه و بیبریو هاروی و و بیبریو آلجینولیتیکوس در مناطق گرم و معتدله و استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* اشاره کرد که هر ساله خسارت سنگینی به اقتصاد تولید ماهیان دریایی وارد می کنند. واکسن به عنوان اقتصادی ترین، کارآمدترین و روشی با کمترین آسیب به محیط زیست برای محافظت از میزبان در برابر عفونت های باکتریایی مطرح می باشد. این پروژه با هدف توسعه ایمنی زایی برای پیشگیری از بروز تلفات ناشی از عفونت های باکتریایی با استفاده از انواع واکسن- های کشته طراحی گردید. جهت انجام کار از جدایه های و بیبریو هاروی، و بیبریو آلجینولیتیکوس و *استرپتوکوکوس اینیایی*، بدست آمده از ماهیان دریایی دارای علائم در پروژه "جداسازی و شناسایی گونه های دخیل در سپتی سمی باکتریایی ماهیان دریایی با تأکید بر سه گونه ی و بیبریو هاروی، و بیبریو آلجینولیتیکوس و *استرپتوکوکوس اینیایی* و تعیین حدت و بیماری زایی آنها در ماهی باس دریایی آسیایی" که به روش ژنوتیپی و فنوتیپی تعیین حدت و نهایتاً در بانک ژن جهانی ثبت شدند، به عنوان بذر واکسن استفاده گردید. واکسن به ۳ روش مونو والان و بیبریو آلجینولیتیکوس، دی والان و بیبریو آلجینولیتیکوس + *استرپتوکوکوس اینیایی* و پلی- والان و بیبریو آلجینولیتیکوس + *استرپتوکوکوس اینیایی* + و بیبریو هاروی به صورت سلول کامل کشته شده با فرمالین تهیه شد. در واکسن های دی والان و پلی والان، حجم مساوی از هر باکترین (شامل  $10^{11}$  CFU/ml سلول) با هم ترکیب شدند. پس از انجام آزمایشات استریل و ایمن بودن باکترین های تهیه شده، ماهیان باس دریایی آسیایی به ۷ تیمار با سه تکرار، (هر تکرار ۲۰ قطعه ماهی) مساوی تقسیم بندی شده و هر ماهی به صورت داخل صفاقی ایمن شدند. همچنین جهت بررسی میزان تأثیر دوز بوستر به روش خوراکی، ماهیان تیمارهای دریافت کننده واکسن مونووالان + بوستر خوراکی، واکسن دی والان + بوستر خوراکی و واکسن پلی والان + بوستر خوراکی در هفته سوم پس از ایمن سازی، به به مدت ۵ روز با دوز بوستر به روش خوراکی مجدداً ایمن شدند. جهت ارزیابی میزان آنتی بادی ضد و بیبریو هاروی، و بیبریو آلجینولیتیکوس و *استرپتوکوکوس اینیایی* با استفاده از روش الایزا در هفته ۳، ۵ و ۸ پس از ایمن سازی از ماهیان هر گروه نمونه خون گرفته شد. همچنین در همین زمان ها فاکتورهای سرمی شامل: کمپلمان، لیزوزیم، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین نیز اندازه گیری گردید.



جهت ارزیابی کارایی باکترین‌های مورد استفاده، دو هفته بعد از دوز بوستر خوراکی (۵ هفته بعد از شروع ایمن‌سازی اولیه) تعداد ۹ قطعه ماهی از هر تکرار با دوزی معادل دو برابر LD50 از سوسپانسیون زنده جدایه‌های بذر واکسن (که دارای بیشترین حدت بودند)، به صورت داخل صفاقی مواجهه شدند. نتایج میزان محافظت‌کنندگی تیمارهای مورد آزمایش در مواجهه با جدایه حاد و *ویبریو هاروی*، و *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* نشان داد، بیشترین میزان محافظت در گروه پلی‌والان با بوستر به میزان ۸۵/۷۱٪ در برابر *ویبریو هاروی*، تیمار مونووالان به همراه بوستر با محافظتی معادل ۸۴/۶۲٪ و پلی‌والان با بوستر معادل ۸۰/۷۷٪ در برابر *ویبریو آلجینولیتیکوس* و تیمار دی‌والان با بوستر با میزانی معادل ۷۳/۹۱٪ در مواجهه با *استرپتوکوکوس اینیایی* را نشان دادند. نتایج آزمایش الیزا عیار آنتی‌بادی اختصاصی علیه *ویبریو هاروی* در هفته ۳، ۵ و ۸ پس از ایمن‌سازی، نشان داد که گروه‌های واکسینه با کنترل دارای اختلاف معنی‌دار بوده و بالاترین میانگین عیار آنتی‌بادی (بر اساس نسبت نمونه به کنترل مثبت) مربوط به گروه واکسینه با باکترین پلی‌والان با بوستر خوراکی در ۵ هفته پس از ایمن‌سازی (۱۴۵/۹۹ بر اساس درصد نمونه به کنترل مثبت %S/P) است. بررسی میزان آنتی‌بادی ضد *ویبریو آلجینولیتیکوس* نشان داد که میانگین عیار آنتی‌بادی مربوط به گروه واکسینه با باکترین پلی‌والان به همراه بوستر خوراکی و گروه واکسینه با باکترین مونووالان با بوستر خوراکی در ۵ هفته پس از ایمن‌سازی بطور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بوده است. همچنین بالاترین میانگین عیار آنتی‌بادی مربوط به گروه واکسینه با باکترین دی‌والان با بوستر خوراکی و بعد از آن گروه واکسینه با باکترین پلی‌والان با بوستر خوراکی در ۵ هفته پس از ایمن‌سازی است. نتایج بررسی فاکتورهای ایمنی سرم، نشان داد میزان لیزوزیم، گلوبولین، پروتئین تام سرم در تیمار پلی‌والان با بوستر در هفته ۵ پس از ایمن‌سازی بیشترین میزان را داشته ولی میزان آلبومین در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. همچنین بیشترین میزان کمپلمان، در هفته ۵ پس از ایمن‌سازی و در گروه پلی‌والان با بوستر گزارش گردید ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زای داخلی کارآمد بوده و سبب ایجاد مقاومت و کاهش تلفات در ماهیان می‌شوند و انتخاب واکسن مناسب با واکسن‌های تهیه شده از نمونه باکتری‌های بومی و داخلی ارجحیت دارد.

**کلمات کلیدی:** *ویبریوزیس*، *استرپتوکوکوزیس*، *ویبریو هاروی*، *ویبریو آلجینولیتیکوس*، *استرپتوکوکوس اینیایی*، باس دریایی آسیایی، میزان محافظت، تیر آنتی‌بادی، فاکتورهای سرمی