

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان:

**دستیابی به دانش فنی تولید واکسن کشته دوگانه
یرسینیوزیسی - استرپتوکوکوزیسی در
ماهیان قزل آلالی پرورشی**

مجری:

مریم قیاسی

شماره ثبت

۶۱۵۱۲

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان طرح/پروژه: دستیابی به دانش فنی تولید واکسن کشته دوگانه یرسینیوزیس - استرپتوکوکوزیس در

ماهیان قزل آلاهی پرورشی

کد مصوب: ۹۷۱۳۹۶-۰۵۰-۱۲-۷۶-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: مریم قیاسی

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

نام و نام خانوادگی مجری: مریم قیاسی

نام و نام خانوادگی همکار(ان): مینا آهنگر زاده، رضا صفری، محمد بینائی، رامک یحیی رعیت، ایرج اشرفی

تمای، عبدالله جعفری، فرشیده حبیبی کوتنایی، محمد رضا محرابی، فرهاد عقلمندی، سید حسین رضوانی،

اشرف محمدی، نوشین زمان نژاد، زهرا یعقوب زاده، عباس جمالی، حسین حسن نیا، رضا گشتاسبی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان مازندران

تاریخ شروع: ۱۳۹۷/۱۱/۱

مدت اجرا: ۱ سال و ۶ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۱

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

بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: دستیابی به دانش فنی تولید واکسن کشته دوگانه

یرسینیوزیس - استرپتوکوکوزیس در ماهیان قزل آلالی پرورشی

کد مصوب: ۹۷۱۳۹۶-۰۵۰-۱۲-۷۶-۲

شماره ثبت (فروست): ۶۱۵۱۲ تاریخ: ۱۴۰۱/۲/۲۵

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مریم قیاسی دارای مدرک

تحصیلی دکتری تخصصی در رشته قارچ‌شناسی دامپزشکی

می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان

در تاریخ ۱۴۰۱/۱/۲۹ 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 اکولوژی دریای خزر

مشغول بوده است.

صفحه	عنوان
۱	چکیده
۴	۱- مقدمه
۶	۱- ۲- اهمیت تولید قزل آلابی رنگین کمان در جهان و ایران
۷	۱- ۳- بیماری دهان قرمز (یرسینیوزیس)
۱۳	۱- ۴- استرپتوکوکوزیس
۱۸	۱- ۵- تاریخچه و جایگاه تولید واکسن آبزیان در دنیا
۲۱	۱- ۶- سابقه واکسن آبزیان در ایران
۲۲	۱- ۷- انواع واکسن
۲۷	۱- ۸- آدجوانها یا یاورها
۲۹	۱- ۹- آدجوانهای سیگنال ۱ در واکسیناسیون ماهی یا امولسیونهای روغنی
۳۱	۱- ۱۰- آدجوانهای سیگنال ۲ و لیگاند های TLR در واکسیناسیون ماهی
۳۴	۱- ۱۱- واکسن و واکنش ایمنی ذاتی در ماهیان
۳۵	۱- ۱۲- واکسن و واکنش ایمنی اکتسابی در ماهیان
۳۷	۱- ۱۳- روشهای تجویز واکسن در ماهیان
۴۲	۱- ۱۴- ظرفیت واکسن
۴۳	۱- ۱۵- عوامل موثر در توفیق واکسیناسیون ماهیان
۴۴	۲- مواد و روش کار
۴۴	۲- ۱- تهیه نمونه باکتری یرسینا راگری و استرپتوکوکوس اینیایی
۴۶	۲- ۲- انجام تست آنتی بیوگرام
۴۶	۲- ۳- شناسایی مولکولی نمونه های باکتری
۴۷	۲- ۴- انجام تست حدت
۴۸	۲- ۵- تهیه باکترین از ایزوله های بدست آمده با بالاترین حدت
۵۰	۲- ۶- افزودن ادجوان به باکترین تهیه شده
۵۱	۲- ۷- تیمار بندی و تزریق واکسن
۵۲	۲- ۸- مواجهه با باکتری بیماریزا و خونگیری
۵۳	۲- ۹- ارزیابی بازماندگی ماهیان در مواجهه با باکتری بیماریزا
۵۷	۲- ۱۱- آنالیز آماری

۵۸	۳- نتایج.....
۵۸	۳- ۱- نتایج ثبت باکتریها در بانک جهانی ژن.....
۵۸	۳- ۲- نتایج تست آنتی بیوگرام.....
۵۹	۳- ۳- نتایج تست سنجش حدت.....
۵۹	۳- ۴- نتایج میزان بازماندگی بعد از مواجهه با باکتریهای بیماریزا.....
۶۴	۳- ۵- نتایج ارزیابی شاخصهای ایمنی و سرمی ماهیان.....
۷۳	۴- بحث.....
۸۲	پیشنهادها.....
۸۳	منابع.....
۹۲	چکیده انگلیسی.....

چکیده

براساس آمار FAO در سال ۲۰۱۸ ایران با تولید حدود ۱۸۰ هزار تن قزل آلالی رنگین کمان (سایز کوچک) بیش از ۳۰٪ تولید جهانی این ماهی را به خود اختصاص داده است. متاسفانه استرپتوکوکوزیس و یرسینوزیس دو بیماری مهم عفونی در ماهیان قزل آلالی رنگین کمان است که با ایجاد تلفات شدید (بسته به سن ماهی و سویه باکتری تلفات ۸۰-۳۰ درصد) و مصرف شدید آنتی بیوتیکها (با عوارض زیست محیط و بهداشتی) سبب خسارات اقتصادی و به خطر انداختن بهداشت عمومی می شوند. لذا استفاده از ماهیان مقاوم شده می تواند بهترین راهکار برای این امر باشد. این پروژه با هدف پیشگیری و به حداقل رساندن تلفات ناشی از این دو بیماری و ارتقا مقاومت ماهیان تهیه گردید. ابتدا از ماهیان بیمار مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل آلالی رنگین کمان در استان مازندران (هراز) و تهران (فیروزکوه) نمونه برداری و در نهایت ۷ نمونه باکتری شامل ۵ نمونه مشکوک به یرسینیا راکری و ۲ نمونه مشکوک به استرپتوکوکوس اینیایی جداسازی و پس از آزمایش PCR و تعیین توالی، هویت آنها تایید و در بانک جهانی ژن ثبت گردید. جهت انتخاب باکتری برای تولید واکسن، آزمایش تعیین حدت براساس تزریق به ماهیان قزل آلالی انجام و براساس میزان تلفات طی ۹۶ ساعت دو نمونه یرسینیا راکری (MT968736) و استرپتوکوکوس اینیایی (MT968734) انتخاب شدند. برای تهیه واکسن، باکترین باکتریهای فوق تهیه گردید. باکترین تهیه شده به نسبت ۵۰:۵۰ با ادجوان مونتانااید Vax-Orient IPA50 (واکسن روغنی) و ادجوان آلوم (واکسن آبی) مخلوط گردید. حجم نهایی واکسن تزریقی ۰/۲ میلی لیتر بود که حاوی ۰/۱ باکترین (واجد غلظت $10^8 \times 1$ از هر باکتری) و ۰/۱ میلی لیتر ادجوان در گروه های مونتانااید و آلوم و سرم فیزیولوژی در گروه باکترین بود. در این مطالعه ۳۶۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی $110/22 \pm 7/55$ گرم در ۴ تیمار ۹۰ قطعه ای (هر تیمار واجد سه تکرار و هر تکرار شامل ۳۰ قطعه ماهی) بصورت داخل صفاقی (۰/۲ میلی لیتر) مورد تزریق باکترین تنها، باکترین + مونتانااید، باکترین + آلوم و گروه شاهد (سرم فیزیولوژی) قرار گرفتند. جهت تعیین اثر گذاری واکسن، ۶۰ عدد ماهی (از هر تیمار) یک ماه پس از دریافت واکسن با باکتریهای بیماریزا یرسینیا راکری (MT968736) (۳۰ ماهی) و استرپتوکوکوس اینیایی (MT968734) (۳۰ ماهی) با دوز دو برابر ($10^8 \times 2$) بصورت داخل صفاقی مواجهه داده شدند و گروه دیگری از ماهیان تا سه ماه پس از واکسیناسیون نگهداری شده و طی ماه اول، دوم و سوم از آنها خونگیری و شاخصهای ایمنی و سرمی شامل تولید رادیکال آزاد اکسیژن، لیزوزیم، IgM تام سرم، پروتئین تام سرم، آلبومین و تیترا آنتی بادی اختصاصی به روش میکرواگلوتیناسیون انجام گردید. نتایج این بررسی نشان داد که میزان بازماندگی ماهیان در مواجهه با یرسینیا راکری در گروه باکترین + ادجوان بیش از ۸۰٪ و در گروه باکترین بیش از ۶۰٪ و در مواجهه با استرپتوکوکوس اینیایی در در گروه باکترین + ادجوان بیش از ۸۶٪ و در گروه باکترین بیش از ۸۰٪ در مقایسه با گروه های شاهد که صفر درصد بازماندگی داشتند. طی سه ماه بررسی مشخص گردید که میزان رادیکال آزاد اکسیژن در ماه اول در گروه های حاوی ادجوان + باکترین و باکترین بطور معنی دار بیشتر از شاهد بود. در

ماه دوم و سوم میزان این شاخص در گروه‌های حاوی ادجوان بطور معنی داری بیشتر از شاهد بود. در مقایسه این شاخص در هر گروه طی دوره سه ماهه تنها در گروه حاوی مونتانااید تفاوت معنی دار در میزان این شاخص طی دوره سه ماهه وجود نداشت ولی در گروه باکترین و باکترین + آلوم بتدریج از ماه دوم میزان این شاخص کاهش معنی داری را نشان داد. میزان لیزوزیم در ماه اول در گروه‌های تیمار افزایش معنی دار در مقایسه با شاهد داشت. در ماه دوم افزایش معنی دار در گروه باکترین + ادجوان در مقایسه با شاهد همچنان وجود داشت ولی در ماه سوم تنها افزایش معنی دار در تیمارهای ادجوان + باکترین در مقایسه با شاهد و باکترین بود. تغییرات این شاخص در هر گروه تفاوت معنی داری را طی ماه اول تا سوم پس از واکسیناسیون در گروه باکترین و شاهد نشان نداد ولی در گروه باکترین + مونتانااید افزایش معنی دار این شاخص از ماه اول تا سوم و در گروه باکترین + آلوم افزایش معنی دار این شاخص در ماه سوم در مقایسه با ماه اول و دوم دیده شد. در ماه اول و دوم پس از واکسیناسیون میزان IgM تام سرم در گروه‌های تیمار در مقایسه با شاهد از افزایش معنی داری برخوردار بود ولی در ماه سوم و تنها تیمارهای باکترین + ادجوان افزایش معنی دار در مقایسه با شاهد و باکترین داشتند. در مقایسه خود تیمارهای طی ماه‌های مختلف میزان آنتی بادی در ماه دوم و سوم در مقایسه با ماه اول در تیمارهای باکترین + ادجوان تفاوت معنی داری با ماه اول داشت و در تیمار باکترین نیز تنها افزایش معنی دار در ماه دوم نسبت به ماه اول و سوم مشاهده شد. میزان پروتئین تام سرم در این بررسی در ماه‌های اول، دوم و سوم پس از واکسیناسیون در گروه‌های دریافت کننده باکترین + ادجوان افزایش معنی داری با شاهد داشت. ولی در گروه باکترین این افزایش معنی دار تنها در ماه اول و دوم پس از واکسیناسیون مشاهده شد. در ارزیابی این شاخص در هر گروه و طی ماه‌های مختلف نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در خصوص آلبومین نیز در بین تیمارهای مختلف و نیز در هر تیمار در ماه‌های مختلف تفاوت معنی داری مشاهده نشد. میزان تیتراژ آنتی بادی اختصاصی علیه دو باکتری یرسینیا راکری و استرپتوکوکوس اینیایی که به روش میکروآگلوتیناسیون (MAT) بدست آمد نشان داد که تیتراژ آنتی بادی اختصاصی در گروه‌های دریافت کننده باکترین + ادجوان در ماه‌های اول، دوم و سوم پس از واکسیناسیون بطور معنی داری بیشتر از گروه باکترین است. همچنین در مقایسه هر گروه طی ماه‌های مختلف در گروه مواجهه داده شده با یرسینیا راکری تیتراژ آنتی بادی اختصاصی در ماه سوم کاهش معنی داری در مقایسه با ماه اول دوم داشت در حالیکه در گروه‌های دریافت کننده ادجوان افزایش معنی دار تیتراژ اختصاصی آنتی بادی در ماه دوم در مقایسه با ماه اول و سوم دیده شد. در همین شرایط در ماه دوم بیشترین میزان تیتراژ آنتی بادی در تمام تیمارها در برابر استرپتوکوکوس اینیایی به ترتیب در ماه دوم و اول و کمترین آن در ماه سوم مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق کاهش میزان مرگ و میر تجمعی و افزایش درصد بازماندگی در گروه‌های دریافت کننده ادجوان + باکترین در مقایسه با گروه‌های باکترین و شاهد پس از مواجهه با باکتری بیماریزا کاملاً مشهود است. همچنین بهبود و افزایش عملکرد شاخصهای ایمنی ذاتی (تولید رادیکال آزاد اکسیژن و لیزوزیم) در گروه‌های دریافت کننده باکترین + ادجوان در مقایسه با گروه باکترین و شاهد تا سه ماه بعد از

تزریق نشان از عملکرد خوب ایمنی ذاتی ماهیان دارد. در کنار همه اینها افزایش ماندگاری تیتراژ آنتی بادی اختصاصی در گروه‌های دریافت کننده باکترین + ادجوان در مقایسه با گروه باکترین و شاهد تا سه ماه بعد از تزریق نشان از عملکرد خوب ایمنی هومورال اکتسابی دارد. بر اساس آنچه گفته شد به نظر می‌رسد واکسن کشته دوگانه یرسینیوزیس – استرپتوکوکوزیس که باکتریهای مورد استفاده در آن بر اساس انجام تست حدت انتخاب شده‌اند قابلیت ایمنی زایی مناسبی را تا ۳ ماه بعد از تزریق داشته است و ادجوانهای استفاده شده در این تحقیق کفایت عملکرد این واکسن را به خوبی افزایش داده‌اند.

کلمات کلیدی: یرسینیوزیس، استرپتوکوکوزیس، قزل آلاهی رنگین کمان، واکسن کشته، مونتاناید، آلوم