مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۱ شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۲-۱

ارزیابی اثر محافظتی واکسن کشته شده علیه ویروس نکروز عصبی (Nervous Necrosis Virus) با استفاده از سنجش فراسنجه‌های لیزوزیم و سوپراکسید دیسموتاز سرم ماهی اوزون برون *Acipenser Stellatus* Pallas 1771

الهه افشاری پور[۱]، قباد آذری تاکامی[۱]، سید محمد جلیل ذریه زهرا[۲]*، عباسعلی مطلبی[۱]، شاپور کاکولکی[۳]

۱- دپارتمان بهداشت و مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- مدیریت اطلاعات و ارتباطات علمی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳- بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

چکـــیده

در این تحقیق اثربخشی ۴ نوع واکسن کشته شده ضد ویروس نکروز عصبی (VNN) همراه با سه نوع ادجوانت به دو روش غوطه وری و تزریقی مورد ارزیابی قرار گرفت. ۵۴۰ ماهی ۱۰-۷ گرمی ازون برون *Acipenser Stellatus* Pallas 1771 برای انجام آزمایش تهیه شد. واکسیناسیون در دو مرحله به فاصله یک ماه انجام شد که پس از یک ماه از دومین تکرار، مواجهه سازی با ویروس زنده حاد انجام پذیرفت. در طی این مدت میزان مرگ و میر گروه‌های غوطه وری و تزریقی به ترتیب ۱۲/۹ درصد و ۱۹/۸ درصد در مقایسه با ۱۰۰ درصد مرگ و میر در گروه کنترل بود. خون گیری جهت ارزیابی فاکتورهای ایمنی (سوپراکسید دیسموتاز، لیزوزیم) در چهار مرحله به ترتیب قبل از واکسیناسیون اول در دوره آداپتاسیون، بعد از واکسیناسیون اول، بعد از واکسیناسیون دوم به فاصله یک ماه از اولین واکسیناسیون و بعد از مواجهه سازی با ویروس زنده حاد انجام شد تا تغییرات در زمان قبل و بعد از مواجهه سازی با ویروس مشخص گردد. نتایج نشان داد که واکسیناسیون به روش غوطه وری در گروه واکسینه شده با واکسن حاوی ادجوانت IMS 1312 SEPPIC به طور قابل توجهی سطوح بالاتری از میزان سوپراکسید دیسموتاز ۱۷۴۵IU/MI ($p<0.05$) و لیزوزیم ۶/۴۰ $g\ dl^{-1}$ ($p<0.05$) را نسبت به بقیه گروه‌ها نشان داد که کارایی بهتر آنرا در مقایسه با سایر واکسن‌های دیگر نشان می دهد. لذا می‌توان واکسن کشته با ۷۵٪ ادجوانت IMS 1312 SEPPIC جهت واکسیناسیون علیه بیماری نکروز عصبی ویروسی را در ماهیان خاویاری توصیه نمود.

کـــلید واژه‌ها: اوزون برون، نوداویروس، VNN، واکسیناسیون، ، ایمنی زایی، فاکتورهای خونی

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۵
تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

***نویسنده مسول:**
m.zorriehzahra@areeo.ac.ir

مقدمه

نکروز عصبی ویروسی [۱] که به نام‌های مختلفی شناخته می‌شود از ۱۷۷گونه از ماهیان سرتاسر جهان گزارش شده است که در ۶۲ گونه از آنها همه گیری بوده است [۲]. نظر به خسارات اقتصادی که بیماری‌های عفونی ماهی به صنعت آبزی پروری وارد می‌کنند، واکسیناسیون یک راه عملی در کنترل و پیشگیری از بیماری‌های عفونی ماهیان می‌باشد [۳]. نکروز عصبی ویروسی به عنوان یک بیماری عفونی جهان گستر، مهمترین تهدید برای سلامتی گونه‌های محتلف ماهی می‌باشد که ماهی خاویاری یکی از گونه‌های اقتصادی باارزش و حساس به بیماری نکروز عصبی ویروسی می‌باشد [۲]. ماهی خاویاری(*Acipenser stellatus*) یکی از با ارزش ترین گونه‌های اقتصادی دنیا و بخصوص دریای خزر می‌باشد. حفظ و بازسازی ذخائر ماهیان به ویژه ماهیان استراتژیک یکی از مهمترین وظایف نهادهای مسئول است [۴].

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

متاسفانه همچون سایر بیماری‌های ویروسی، درمانی جدی برای این بیماری در آبزیان وجود ندارد اما تاکنون در مقیاس آزمایشگاهی واکسن هایی از جمله واکسن غیر فعال شده با فرمالین، پارتیکل غیرویروسی در Baculovirus ، پروتئینc Recombinant ، synthetic peptides ، Betanodavirus recombinant coat protein که در E.coli تلقیح شده است و نیز واکسن DNA گزارش شده اند [۵۶].

نظر به غیرقابل درمان بودن بیماری نکروز عصبی ویروسی همچون سایر بیماری‌های ویروسی آبزیان و عدم تاثیر داروها و مواد شیمیایی در درمان موثر آن، بهره گیری از واکسیناسیون علیه این بیماری در کشور می‌تواند به عنوان یک محرک سیستم ایمنی کارامد، در مزارع بازسازی ذخائر کشور که به تکثیر و رهاسازی ماهیان دریایی می‌پردازند در کنترل و پیشگیری از این بیماری در صنعت شیلاتی کشور مورد توجه ویژه همگان قرار گیرد [۷].

از این رو در این تحقیق، تلاش بر تهیه و طراحی واکسن موثر و کارامد بوده که ماهی خاویاری (*Acipenser stellatus*) به عنوان مدل آزمایشگاهی انتخاب شد. فاکتورهای ایمنی و خون شناسی و آسیب شناسی و IHC (Immunohistochemistry) نیز مورد بررسی قرار گرفتند. این واکسن که در ساخت آن از سه نوع ادجوانت (یاور) استفاده شد و از لحاظ مرگ و میر نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی ماهیان مورد آزمایش

تعداد ۵۴۰ عدد ماهی خاویاری ازون برون (*Acipenser stellatus*) به وزن ۱۰-۷ گرم از مرکز پرورش ماهیان خاویاری در استان گیلان تهیه گردید و با استفاده از ماشین حمل ماهی مجهز به هواده به محل نگهداری ماهیان در تهران با سیستم گردش باز با آب ۰/۲۰ درصد شوری و pH برابر ۷/۳۸ انتقال داده شدند. توضیحات بیشتر در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱- جزئیات تیمارهای آزمایشی و خصوصیات کامل هر یک از آنها از نقطه نظر میران درصد ویروس، ادجوانت مصرفی و نسبت های گوناگون بکار رفته در واکسن های مختلف مورد آزمون

شماره تیمار	محتوی واکسن	روش مصرف
تیمار یک (T1)	۵۰٪ ویروس + ۵۰٪ ادجوانت Seppic® 1312	غوطه وری
تیمار دو (T2)	۲۵٪ ویروس + ۷۵٪ ادجوانت Seppic® 1312	غوطه وری
تیمار سه(T3)	۳۰ ٪ ویروس + ۷۰٪ ادجوانت IPA® ساخت موسسه پاستور	تزریقی
تیمار چهار(T4)	۷۰٪ ویروس + ۳۰٪ آلومینیوم هیدروکسید $AL(OH)_3$	تزریقی
تیمار پنج(T5)	۱۰۰٪ ویروس غیر فعال شده خالص بدون ادجوانت	کنترل غوطه وری
تیمار شش(T6)	۱۰۰٪ ادجوانت Seppic® 1312	کنترل غوطه وری
تیمار هفت(T7)	۱۰۰٪ ویروس غیر فعال شده خالص بدون ادجوانت	کنترل تزریقی
تیمار هشتم(T8)	۱۰۰٪ ادجوانت IPA® ساخت موسسه پاستور ایران	کنترل تزریقی
تیمار نهم(T9)	گروه شاهد مثبت (استفاده از Phosphate- buffered Saline)	
تیمار دهم(T10)	گروه شاهد منفی (بدون هیچگونه ویروس یا ادجوانت)	
تیمار یازده (T11)	گروه شاهد مثبتی که با ویروس زنده مواجه سازی شد.	
تیمار دوازده (T12)	گروه شاهد منفی که با ویروس زنده مواجه سازی شد.	

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

نمونه برداری از ماهیان مورد آزمایش مطابق با جدول ۲ انجام شد.

جدول ۲- روزهای نمونه برداری جهت انجام آزمایش های تکمیلی مورد نظر

روز نمونه برداری	سی ام	هفتادم	صدم	صد و سی ام
میانگین وزن بچه ماهیان (گرم)	۷	۱۰	۱۴	۱۷
زمان نمونه برداری	اولین نمونه برداری (انتهای دوره سازگاری)	دومین نمونه برداری (۱۰ روز بعد از اولین واکسیناسیون)	سومین نمونه برداری (۱۰ روز بعد از واکسیناسیون دوم)	چهارمین نمونه برداری (۱۰ روز بعد از مواجهه سازی)

***۳۰ روز بعد از مواجهه سازی (تا روز ۱۵۰) آمار مرگ و میر ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت.**

واکسن‌های پیشنهادی با سه ادجوانت مختلف با درصدهای متفاوت از جمله ادجوانت Montanide IMS 1312 VG شرکت Seppic فرانسه (پایه آبی)، هیدروکسید آلومینیوم و IPA70 (پایه روغنی ساخت موسسه پاستور ایران) ساخته شد. که واکسن ساخته شده با ادجوانت Montanide IMS 1312 VG سپیک فرانسه به شکل غوطه وری و واکسن ساخته شده با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم و IPA70 پاستور به شکل تزریقی مورد استفاده قرار گرفت.

سه هفته بعد از اولین نمونه گیری که در دوره سازگاری صورت گرفت، اولین واکسیناسیون انجام شد که در گروههای تزریقی واکسن به میزان یک دهم سی سی در زیر باله سمت راست در محوطه بطنی تزریق شد (IP) [۸] و در گروههای غوطه وری، ۳۰ عدد ماهی خاویاری به مدت یک ساعت در معرض واکسن به میزان ۱۰ سی سی در ۵ لیتر آب به همراه اکسیژن رسانی قرار گرفتند. به این ترتیب که در روش غوطه وری تمام ماهیان یک آکواریوم به طشت گردی انتقال و در معرض واکسن به شکل غوطه وری قرار گرفتند و بعد از گذشت یک ساعت به آکواریوم خود انتقال داده شدند. در مورد گروههایی که واکسن به شکل تزریقی انجام شد قبل از واکسیناسیون ماهی‌ها به کمک عصاره گل میخک بیهوش شدند.

تهیه ویروس غیر فعال شده

از آنجا که بدلایل مختلف از جمله سازگاری ویروس با محیط دریای خزر و فقدان تلفات گسترده طی سالهای اخیر در کفال ماهیان دریای خزر، امکان دسترسی به ویروس حاد منطقه وجود نداشت با هماهنگی‌های انجام شده قبلی، ویروس غیرفعال شده مورد نیاز با همان سروتیپ موجود در منطقه (بتانوداویروس غیرفعال ARG/VIR/2016-01) متعلق به ژنوتیپ RGNNV و کاملا شبیه سویه داخل ایران، از انگلستان (موسسه تحقیقاتی Moredun Research Institute) از طریق خانم Dr. Kim D Thompson با رعایت کلیه ضوابط قانونی تهیه و وارد کشور شد. نحوه تهیه ویروس غیر فعال در این پژوهش به این صورت بود که ویروس در محیط کشت سلولی SSN-1 کشت داده شد [۹]. ویروس از طریق انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتیگراد برای سه ساعت غیرفعال شد. این غیرفعال سازی توسط کشت مجدد ویروس بر روی محیط کشت سلولی SSN-1 تایید گردید. $TCID_{50}$ ویروس ۷/۴۴- بود که برابر با ۱۰ به توان ۸/۴۴ در هر میلی لیتر می‌باشد [۱۰]. غلظت ویروس با استفاده از (median Tissue Culture Infectious Dose) $TCID_{50}$ و محاسبه تیتر ویروس اندازه گیری شد (تعداد واحدهای عفونی در هر حجم). عیار سنجی ویروس با روش Spearman-Karber [۱۱] صورت گرفت.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

ویروس به دلیل غیر فعال بودن، توانایی ایجاد بیماری نداشته و جهت اطمینان از عدم ایجاد آلودگی در کشور بعد از مواجه سازی با ویروس زنده، تمام تلفات در طی انجام آزمایش معدوم و امحا گردیدند.

تهیه واکسن علیه بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN)

این واکسن به دو فرم غوطه وری (Immersion) و تزریقی (Injection) طراحی، آماده سازی و تهیه شد. در فرم غوطه وری واکسن با دو درصد متفاوت از ویروس و ادجوانت ®Seppic1312 ساخته شد. ابتدا واکسن حاوی ۵۰ درصد ویروس به همراه ۵۰ درصد ادجوانت مونتاناید مخصوص آبزیان ®Seppic1312 تهیه شد. این واکسن برای پنج لیتر آب آکواریوم به میزان ده سی سی در حضور ۳۰ عدد ماهی تجویز شد. نوع دوم فرم غوطه وری واکسن حاوی ۲۵ درصد ویروس به همراه ۷۵ درصد ادجوانت ®Seppic1312 ساخته شد. دز مصرف این نوع واکسن غوطه وری ۱۰ سی سی به ازای پنج لیتر آب در حضور ۳۰ عدد ماهی در نظر گرفته شد.

در فرم تزریقی، واکسن با دو ادجوانت متفاوت ساخته شد. نوع اول واکسن حاوی ۳۰ درصد ویروس به همراه ۷۰ درصد ادجوانت ۷۰ IPA ساخته شده توسط موسسه پاستور ایران بود. یک دهم سی سی از این واکسن جهت تزریق در محوطه بطنی در زیر باله سمت چپ به ازای هر قطعه ماهی در نظر گرفته شد. نوع دوم واکسن فرم تزریقی واکسن حاوی ۷۰ درصد ویروس به همراه ۳۰ درصد ادجوانت آلومینیوم هیدروکسید $Al(OH)_3$ (آلوم) بوده است. یک دهم سی سی از این واکسن جهت تزریق در محوطه بطنی در زیر باله سمت چپ به ازای هر قطعه ماهی در نظر گرفته شد. تکرار استفاده از واکسن (راپل) ۳۰ روز بعد از اولین استفاده، صورت گرفت [۱۲].

تیمارهای ۵ و ۶ در این تحقیق کنترل‌های غوطه وری و تیمارهای ۷ و ۸ کنترل‌های تزریقی بودند که هر کدام با یک تکرار در نظر گرفته شدند. گروه کنترل مثبت با استفاده از ۱۰ سی سی PBS بصورت غوطه وری و گروه شاهد منفی بدون استفاده از واکسن یا ادجوانت در نظر گرفته شد.

بررسی بیماری زایی نمونه ویروسی (سوپرناتانتSupernatant) تهیه شده (مواجه سازی اولیه) در ماهیان گوپی:

برای مواجهه سازی (Challenge) در ماهیان خاویاری مورد نظر در این تحقیق، از (Supernatant) حاوی ویروس زنده (بتانوداویروس غیرفعال ARG/VIR/2016-01 متعلق به ژنوتیپ RGNNV) استفاده شد. برای اطمینان از فعال و حاد بودن ویروس، تعدادی ماهی گوپی در معرض این ویروس قرار گرفتند. بعد از گذشت یک ماه و تلفات صد در صدی ماهیان گوپی طی این مدت، سوپرناتانت جدیدی از این تلفات تهیه و در نهایت این سوپرناتانت جهت تزریق و مواجهه سازی با ماهیان خاویاری آماده شد. سوپرناتانت بدست آمده به نسبت ۵ سی سی در ۴۵ سی سی PBS رقیق و به اندازه یک دهم سی سی به همه بچه ماهیان خاویاری تزریق گردید [۱۳].

خونگیری و اندازه گیری فاکتورهای خونی و سرمی

خونگیری از بچه ماهیان خاویاری در چهار مرحله (جدول۲) انجام شد. غذادهی در ماهیان یک روز قبل از خونگیری متوقف شد و سپس از سیاهرگ ساقه دمی(Caudal Vein) بر اساس پروتکل مربوطه [۱۴] خونگیری انجام شد [۱۵].

فاکتورهای ایمنی مورد بررسی شامل آنتی بادی، سوپراکسید دیسموتاز و لیزوزیم بودند که جهت سنجش آنها از کیت‌های آزمایشگاهی (پارس آزمون تهران، ایران و ZellBio آلمان ZB-10025C-F9648) استفاده شد .

آزمون سنجش میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و لیزوزیم (Lysozyme)

سرم هایی که در طی ۴ سری نمونه گیری خون از ماهیان ازون برون در زمان‌های مشخص (جدول ۲) اخذ و در فریزر منفی ۲۰ درجه نگه داری شده بودند به کمک کیت اندازه گیری سوپراکسید دیسموتاز از شرکت ZELLBIO آلمان، مورد آزمایش قرار گرفتند.

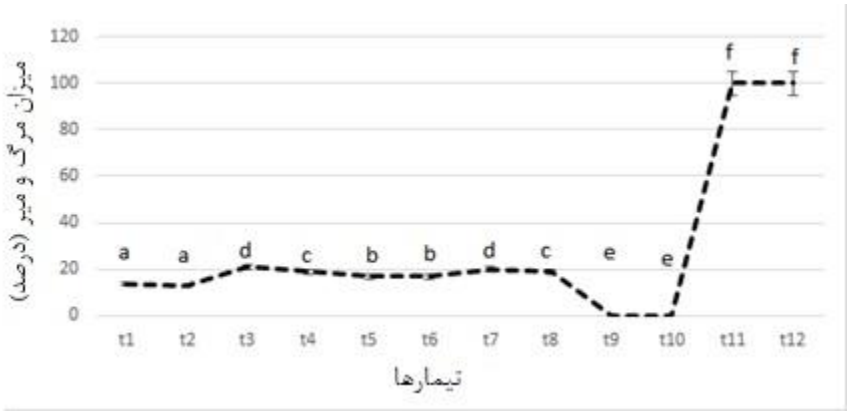
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها در رابطه با مقایسه تاثیر انواع مختلف واکسن بر فاکتورهای خونی، ایمنی از مدل تحلیل واریانس با اندازه‌های مکرر (Repeated Measures ANOVA)و نرم افزار SPSS ویرایش ۲۶ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) استفاده شد. مقادیر به صورت میانگین (Mean _+SE) بیان گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق شامل نتایج بررسی نرخ مرگ و میر پس از تزریق نمونه ویروسی (سوپرناتانت) و نتایج بررسی فاکتورهای ایمنی در همه تیمارها جهت بررسی تغییرات ایجاد شده قبل و بعد از استفاده از واکسن و پس از مواجهه سازی با ویروس زنده می‌باشد که در ادامه به تفکیک ارائه می‌گردند.



شکل شماره -۱ درصد مرگ و میر گروهای مورد آزمایش. مقادیر با حروف غیر مشابه به معنی اختلاف معنی دار در گروه واکسینه شده ($p<0.05$) و مقادیر با حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در گروهها می‌باشد ($p<0.05$) .

براساس شکل شماره ۱ درصد مرگ و میر گروههای ۱ و ۲ پایین ترین درصد را در بین گروهها داشته اند.
بر اساس علائم بارز بیماری در گروه شاهد و عدم مشاهده بیماری در گروه‌های واکسینه می‌توان به بیماری زایی نمونه ویروسی و کارایی واکسن پی برد.

عدم مشاهده علائم بیماری و مرگ و میر گسترده در بین ماهیان خاویاری گروههای واکسینه شده، یک ماه پس از مواجهه سازی با ویروس زنده که در پی دو سری واکسیناسیون انجام شد، و مشاهده علائم تیپیک بیماری و مرگ و میر صددرصدی در گروه کنترل، همگی نشان دهنده کارایی واکسن می‌باشد که با توجه به نتایج سایر بررسی هایی که در ادامه بیان می‌گردد، صحت این گفته به طور دقیق تر اثبات شد.

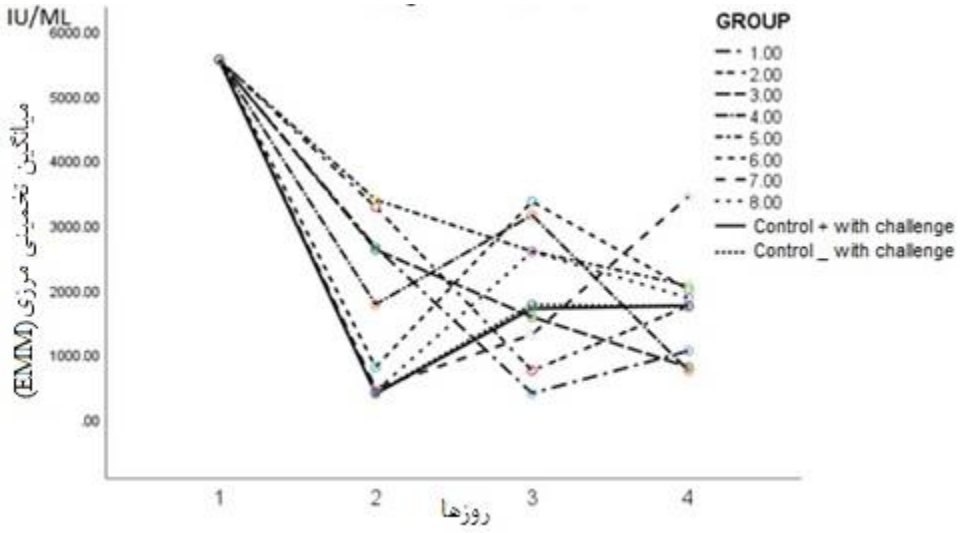
با بررسی‌های آماری اثر متقابل متغیر زمان بر گروههای واکسیناسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس داده‌های حاصله اثر روزهای نمونه گیری بر میانگین سوپر اکسید دیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون حتی بدون در نظر گرفتن فاکتور گروه بندی‌های واکسیناسیون اثبات می‌گردد و تقابل فاکتورهای روزهای نمونه گیری (زمان) و گروههای واکسیناسیون ($p<0.001$) بر تغییرات میانگین سوپر اکسید دیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون معنی دار بود.

در بین تیمارهای مورد مطالعه، میانگین مقادیر بدست آمده سوپراکسید دیسموتاز از تیمار ۲ چنین استنباط می‌شود که تجویز واکسن در اولین واکسیناسیون به روش غوطه وری که مشتمل بر ۲۵٪ یاور Sepic 1312 و ۷۵٪ ویروس بوده است، مقدار میانگین سوپر اکسید دیسموتاز

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

ماهیان جوان اوزون برون افت قابل توجهی کرده بطوریکه مقدار آن نسبت به مقدار روز صفر نگهداری (5550 IU/MI) تقریبا به دو سوم(3276 IU/MI) کاهش یافته است ($p<0.001$) پس از واکسیناسیون دوم مقدار میانگین سوپر اکسید دیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون مجددا با افت بسیار شدیدی روبرو شده است ($p<0.001$) و به سطح 745 IU/MI رسید که نشانه افزایش فعالیت و مصرف شدید SOD پس از واکسیناسیون اول تا واکسیناسیون دوم بوده است که بالا بودن حجم ساختارهای اکسیژن واکنشی و سوپراکسید تولید شده در این فاصله بوده است. در هر حال پس از مواجهه با ویروس زنده ، مقدار میانگین سوپر اکسید دیسموتاز علیرغم مواجهه با ویروس زنده با افزایش صد در صدی1745 IU/MI نسبت به میزان آن در نمونه گیری سوم روبرو شده ($p<0.001$) که حاکی از تقویت عملکرد سیستم ایمنی و افزایش میزان IgM در کاهش بار آلودگی ناشی از ورود عامل بیگانه در مقایسه با بقیه گروهها بوده است.

در شکل شماره ۲ نتیجه تاثیر زمان‌های متفاوت نمونه برداری (محور افقی) بر تغییر میانگین سوپر اکسید دیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون بدست آمده بر حسب IU/ML (محور عمودی) نشان داده شده است. تنوع تیمارها نیز با خطوط مختلف مشخص شده اند. تفسیر نمودار به تفضیل در بحث آورده شده است.



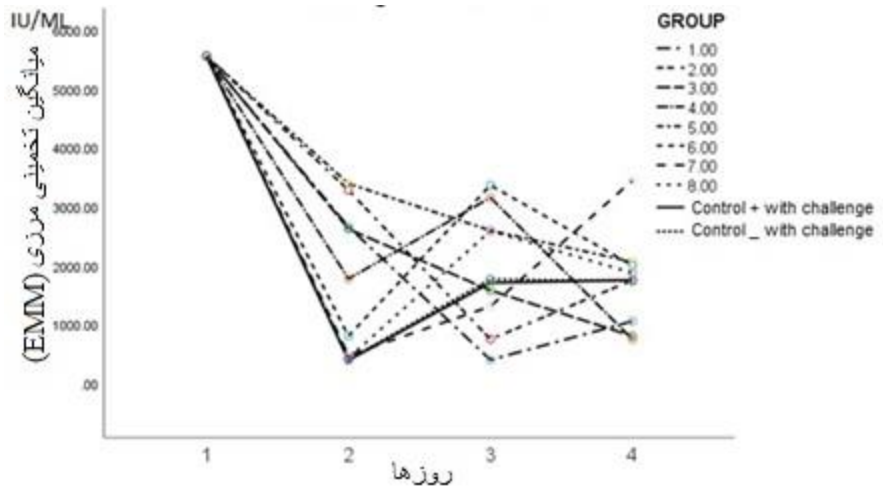
شکل شماره ۲- روند تاثیر اثر متقابل گروههای واکسیناسیون و زمان‌های طی شده بر تغییر میانگین سوپر اکسید دیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون ؛ کنترل‌ها با ویروس مواجهه نشدند

با بررسی‌های آماری اثر متقابل متغیر زمان بر گروههای واکسیناسیون انجام گردید. براساس داده‌های حاصله اثر اصلی روزهای نمونه گیری بر میانگین لیزوزیم ماهیان جوان اوزون برون حتی بدون در نظر گرفتن فاکتور گروه بندی‌های واکسیناسیون اثبات می‌گردد($p<0.001$). تقابل فاکتورهای روزهای نمونه گیری (زمان) و گروههای واکسیناسیون بر تغییرات میانگین لیزوزیم ماهیان جوان اوزون برون معنی دار بود.

در شکل شماره ۳ نتیجه تاثیر زمان‌های متفاوت نمونه برداری (محور افقی) بر تغییر میانگین لیزوزیم ماهیان جوان اوزون برون بدست آمده بر حسبIU/ML (محور عمودی) نشان داده شده است. تنوع تیمارها نیز با خطوط مختلف مشخص شده اند. تفسیر نیز به تفضیل در بحث آورده شده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]



شکل شماره ۳- روند تاثیر اثر متقابل گروههای واکسیناسیون و زمان‌های طی شده بر تغییر میانگین لیزوزیم ماهیان جوان اوزون برون ؛ گروه‌های کنترل با ویروس مواجهه نشدند.

بحث

علیرغم آنکه حدود ۳۰ سال پیش برای اولین بار بیماری نکروز عصبی ویروسی در ماهی شناسایی شد [۱۶]، لیکن تحقیقات انجام شده در جهان در رابطه با این بیماری در جهان جدید است و اغلب تحقیقات به شناسایی و بررسی احتمال بیماری زایی ویروس نکروز عصبی در گونه‌های مختلف ماهی پرداخته اند. با این حال در زمینه شناسایی دقیق تر جنبه‌های مختلف بیماری از نقطه نظر پیشگیری، ساخت واکسن و استفاده از ترکیبات طبیعی، مطالعاتی در حال انجام است. از این رو با توجه به وقوع بیماری نکروز عصبی ویروسی در ماهی کفال طلایی در دریای خزر [۱۷] و نیز اثبات قابلیت بیماریزایی ویروس نکروز عصبی در تاس ماهی روس [۱۸، ۱۹]، نگرانی هایی در رابطه با انتقال بیماری از کفال ماهیان آلوده دریای خزر به سایر گونه‌های بومی ایجاد شده است. بر این اساس، در این بررسی قابلیت بیماریزایی ویروس مسبب بیماری نکروز عصبی در ماهی خاویاری *Acipenser stellatus* نیز مورد بررسی قرار گرفته است زیرا این ماهی هم از جنبه زیست محیطی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و هم به عنوان یکی از کاندیداهای مناسب جهت تکثیر و پرورش در آبهای داخلی ایران درآمده است و از این رو بررسی شرایط بیماری آن برای مدیریت بهتر مزارع تکثیر و پرورش این گونه ماهی اهمیت دارد [۴].

از طرفی طی تحقیق حاضر تلاش گردیده است تا تاثیر مدل‌های واکسن ساخته شده به عنوان محرک سیستم ایمنی که در برخی مطالعات [۵، ۶] به اثبات رسیده است، در ماهی خاویاری *Acipenser stellatus* نیز مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان از این پتانسیل به صورت مناسب در جهت ارتقاء شرایط پرورش و کنترل بیماری در ماهی خاویاری و یا سایر ماهیان استفاده نمود. بنابراین پژوهش حاضر به گونه‌ای طراحی شد تا با مواجهه سازی ویروس زنده با ماهی خاویاری حساس و بررسی فاکتورهای خونی، ایمنی، مولکولی و آسیب شناسی دقیق، حضور احتمالی این ویروس در بافت‌های هدف ماهی مورد مطالعه قرار گیرد و در نهایت به یک ترکیب واکسن کارامد دسترسی پیدا کرد.

نتایج این تحقیق نشان داد که ویروس نکروز عصبی قابلیت ایجاد بیماری در بچه ماهیان خاویاری*Acipenser Stellatus* را دارد. از طرفی واکسیناسیون با دز مناسب ویروس غیرفعال (۷۵٪ ویروس) و ادجوانت پیشنهادی (۲۵٪ یاور Sepic 1312) این تحقیق سبب بهبود و ارتقای سطح ایمنی این ماهی می‌گردد که در ادامه نتایج بدست آمده در تحقیق به تفکیک مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

بالاترین درصد بقای بچه ماهیان خاویاری (۸۷/۵٪) بعد از مواجه سازی با ویروس زنده در گروه ۲ واکسینه شده با ادجوانت ۱۳۱۲ سپیک فرانسه بوده و با توجه به تلفات صد در صدی جمعیت گروه کنترل بعد از مواجهه سازی، چنین بنظر می‌رسد که واکسن ساخته شده توانایی ایجاد ایمنی مناسب بر علیه ویروس نکروز عصبی را داشته است (نمودار ۱).

بنابراین واکسیناسیون سبب افزایش بقاء و ماندگاری بچه ماهیان خاویاری ازون برون(*Acipenser Stellatus*) بعد از مواجه شدن با ویروس زنده می‌گردد.

اهمیت بررسی وضعیت خونی و بیوشیمیایی سرم خون، به عنوان تابلویی از وضعیت سلامت یا بیماری در ماهیان بسیار روشن است و تغییر فاکتورهای خونی می‌تواند علامتی از پاسخ‌های فیزیولوژیک در برابر استرس هایی همچون بیماری باشد [۱۸، ۲۰].

نتایج مقادیر سوپراکسید دیسموتاز نیز در تایید نتیجه حاصل شده از نتایج قبلی [۲۱] مبنی بر بهتر عملکرد واکسن ساخته شده با ادجوانت سپیک IMS 1312 نسبت به سایر ادجوانت‌های مورد آزمایش در این تحقیق می‌باشد. بدین ترتیب که با مطالعه تیمار ۲ چنین استنباط می‌شود که تجویز واکسن در اولین واکسیناسیون به روش غوطه وری که مشتمل بر ۲۵٪ ویروس و ۷۵٪ یاور Seppic 1312 بوده است، باعث افت قابل توجه در مقدار میانگین سوپر اکسید دیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون شده است بطوریکه مقدار آن نسبت به مقدار روز صفر نگهداری، تقریبا به دو سوم کاهش یافته است($p<0.05$) 3276 IU/MI. میزان کاهش مقدار میانگین سوپر اکسیدادیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون در تیمار ۲ و پس از اولین واکسیناسیون در مقایسه با تیمار ۱ که میزان ادجوانت کمتری دریافت کرده افت کمتری را نشان می‌دهد که می‌تواند دلالت بر این نکته داشته باشد که کاهش ویروس کشته شده بر تولید عوامل سوپراکسید دیسموتاز و ساختارهای اکسیژن واکنشی در طی ۷۰ روز اول تاثیر مستقیم داشته است. پس از تکرار واکسیناسیون مقدار میانگین سوپر اکسید دیسموتاز ماهیان جوان اوزون برون مجددا با افت بسیار شدیدی روبرو شده است 745 IU/MI ($p<0.05$) که نشانه افزایش فعالیت و مصرف شدید SOD پس از واکسیناسیون اول تا واکسیناسیون دوم بوده است. در هر حال در نمونه گیری چهارم ، مقدار میانگین سوپر اکسید دیسموتاز علیرغم مواجهه با ویروس زنده با افزایش صد در صدی روبرو شده 1745 IU/MI ($p<0.05$) که حاکی از تقویت عملکرد سیستم ایمنی و کاهش بار آلودگی ناشی از ورود عامل بیگانه در مقایسه با تیمار ۱ بوده است. لیزوزیم یک مولکول دفاعی مهم در سیستم ایمنی ذاتی ماهی است که به عنوان یک واسطه مناسب به محافظت در برابر هجوم میکروب‌ها می پردازد [۲۲].

مقدار میانگین لیزوزیم ماهیان جوان اوزون برون تیمار دوم به نسبت بقیه گروهها افزایش چشمگیری نسبت به روز صفر حتی بیشتر از تیمار اول داشته است 65/3 IU/MI ($p<0.05$) . این افزایش پس از تزریق دوم واکسن نیز ادامه داشته که با توجه به انتقال عامل ویروسی کشته شده منطقی بنظر می‌رسد. مقدار میانگین لیزوزیم ماهیان جوان اوزون برون همچون تیمار اول، پس از مواجهه با ویروس زنده کاهش یافته است که نشان دهنده مصرف سریع لیزوزیم‌ها در برابر یک پاتوژن ورودی است ($p<0.05$) 33/2 IU/MI.

تاثیر واکسیناسیون بر افزایش میزان لیزوزیم و SOD طی بررسی‌های محققین دیگر نیز به اثبات رسیده است به طوری که در اثر تحریک سیستم ایمنی میزان لیزوزیم و SOD نیز به طور معنی داری افزایش یافت [۱۶].

Xu et al., 2014 و Kim et al., 2013 [۲۳، ۲۴] اثر کلرلا در غذای *Carassius auratus gibelio* و جلبک اسپیرولینا در کفشک زیتونی بر افزایش میزان لیزوزیم دلالت بر تاثیر محرک‌های سیستم ایمنی بر افزایش آن داشته که با نتایج حاصل از این تحقیق همسو می‌باشد.

در این تحقیق مشخص شد که بچه ماهی خاویاری (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) نسبت به نمونه ویروسی (سوپرناتانت) جداسازی شده از ماهی کفال طلایی آلوده به ویروس نکروز عصبی که در ماهی گوپی فعال سازی شده بود حساس است و سروتیپ RGNNV این ویروس که در دریای خزر موجود است قابلیت بیماری زایی در بچه ماهی خاویاری را دارد. از طرفی نمونه واکسن ساخته شده با ۲۵٪ ویروس و ۷۵٪ یاور Seppic 1312 به روش غوطه وری به میزان ۱۰ سی سی در ۵ لیتر آب هوادهی شده بهترین واکسن در جهت پیشگیری از بیماری نکروز

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

عصبی ویروسی توصیه می‌شود. همچنین نظر به اینکه لاروهای ماهیها در ابتدای زندگی از نظر شاخص‌های ایمنی هنوز تکامل پیدا نکرده اند می توان این واکسن را همراه با مواد محرک ایمنی در این مراحل بکار گرفت و از تلفات عمده آنها پیشگیری کرد.

در آینده بهتر است واکسن مورد نظر بر اساس شرایط هر مزرعه و در محل ساخته شود. براساس یافته‌های خون شناسی این تحقیق فراسنجه‌های خونی هر ماهی و گروهها به دلیل تفاوت در شرایط آب و هوایی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. بنابراین مطالعات بیشتری از قبیل روشهای تجویز، دوز موثر و طول دوره ایمنی را می‌توان در گونه‌های دیگر ماهیان و همچنین بررسی تغییرات فاکتورهای خونی، فاکتورهای ایمنی و آسیب شناسی در تحقیقی مشابه اما در طول مدت زمان بیشتری بعد از مواجهه سازی با ویروس زنده انجام داد. همچنین با توجه به آلودگی دریا و گسترش و توسعه برنامه‌های پرورش ماهی در قفس بهتر است قبل از معرفی ماهی‌ها به قفس، ابتدا واکسیناسیون انجام شود تا به دلیل افزایش و ارتقای سیستم ایمنی برعلیه ویروس نکروز عصبی، درصد زنده مانی ماهی‌ها افزایش یابد و سپس به عرصه قفس رها شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله وظیفه خود می دانند از جناب آقای دکتر سید مسعود حسینی و سرکار خانم دکتر ندا سلیمانی از دانشگاه شهید بهشتی، سرکار خانم دکتر خواجه نصیر از آزمایشگاه پاستور، سرکار خانم دکتر قربانی از دانشگاه علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، سرکار خانم دکتر کیم تامپسون از Moredun Research Institute انگلستان و جناب آقای مهندس ضرابی از استان گیلان برای در اختیار قرار دادن بچه ماهیان خاویاری، قدردانی نموده و سپاس ویژه داریم.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، برای قبول بخشی از هزینه‌ها تحت پروژه با کد ۹۰۰۰۳۴۹۰ سپاسگزاری می شود.

منابع

1. Yoshikoshi, K., & Inoue, K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, *13*(1), 69-77. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00758.x
2. Bandín, I., & Souto, S. (2020). Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*, *9*(2), 106. https://doi.org/10.3390/pathogens9020106
3. Buonocore, F., Nuñez-Ortiz, N., Picchietti, S., Randelli, E., Stocchi, V., Guerra, L., ... & Scapigliati, G. (2019). Vaccination and immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) against betanodavirus. *Fish & shellfish immunology*, *85*, 78-84. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.039
4. Azari Takami, Ghobad. 2009. Acipenseridae breeding: Sturgeon. University of Tehran Press, Second Edition (In Persian).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

5. Kai, Y. H., & Chi, S. C. (2008). Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, *26*(11), 1450-1457. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.043
6. Doan QK, Vandeputte M, Chatain B, Morin T, Allal F. (2016). Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. Journal of Fish Diseases, DOI: 10.1111/jfd.12541.
7. Zorriehzahra, M.J., Ghasemi, M., Koohkan, A., 2012. Viral necrosis disease (VNN) in aquatic animals: past, present, future. Journal of Aquaculture Development, Islamic Azad University (Lahijan Unit), 1st year, No. 1, Autumn 2012, page 53-17. (In Persian).
8. Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms, 7(11), 569.
9. Frerichs, G. N., Rodger, H. D., & Peric, Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology*, *77*(9), 2067-2071. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2067.
10. Kim, J. O., Kim, S. J., Kim, J. O., Kim, W. S., & Oh, M. J. (2018). Distribution of nervous necrosis virus (NNV) in infected sevenband grouper, *Hyporthodus septemfasciatus* by intramuscular injection or immersion challenge. *Aquaculture*, *489*, 1-8.
11. Spearman, C. (1908). The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae. British Journal of Psychology, 1904-1920, 2(3), 227-242.
12. Hazreen-Nita, M., Azila, A., Mukai, Y., Firdaus-Nawi, M., & Nur-Nazifah, M. (2019). A review of betanodavirus vaccination as preventive strategy to viral nervous necrosis (VNN) disease in grouper. Aquaculture International, 27(5), 1565-1577.
13. Nazari, A., Hassan, M. D., Bovo, G., Zorriehzahra, M. J., Azmi, T. I., & Arshad, S. S. (2014). Pathogenicity of viral nervous necrosis virus for Guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *13*(1), 168-177.
14. Torfi Moazenzadeh, M., Yaghoubi, M., Yavari, V., Agh, N., Marammazi, J.G. and Popovic, N. T. 2015. Reference intervals for haematological and plasma biochemical parameters in Sobaity sea bream juveniles (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). Comparative Clinical Pathology.DOI: 10.1007/s00580-015-2017-y.
15. Haghighi, M. 2009. Laboratory methods of fish hematology. Published in Fisheries Research Institute of Iran. Publication of Aquaculture Scientific Publications. 83 pages (In Persian).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

16. Miccoli, A., Saraceni, P. R., & Scapigliati, G. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish & Shellfish Immunology*, *94*, 800-809. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.065
17. Zorriehzahra, M. J., (2004). Technical report on the occurrence of the first case of Viral Nervous Necrosis in the Golden Mullet fish of the Caspian Sea. Fisheries Research Institute. 45 pages. (In Persian).
18. Austin, B., Austin, D. A., Austin, B., & Austin, D. A. (2012). *Bacterial fish pathogens* (Vol. 481, p. 482). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
19. Xylouri, E., Kotzamanis, Y. R., Athanassopoulou, F., Dong, L., Pappas, L. S., Argyrokastritis, A., & Fragkiadaki, E. (2007). Isolation, characterization, and sequencing of nodavirus in sturgeon (*Acipenser gueldestaedi* L.) reared in freshwater facilities.
20. Chen, Y. E., Jin, S., & Wang, G. L. (2005). Study on blood physiological and biochemical indices of *Vibrio alginilyticus* disease of *Lateolabrax japonicas*. *J Oceanogr Taiwan Strait*, *24*, 104-108.
21. Afsharipour E., Zorriehzahra M.J., Azari Takami Gh., Kakoolaki Sh., Motallebi A.A., Sharifpour I., Faggio C., Filippo Peritore A., Di Paola D. (2021). An investigation on protective effects of the new killed vaccine against nervous necrosis virus (NNV) using histopathology and immunohistochemistry approach on the brain and eye tissues of *Acipenser stellatus* Pallas 1771. *Fish and Shellfish Immunology*. 116 (2021) 91-97.
22. Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, *39*(3), 223-239. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x
23. Kim, S. S., Rahimnejad, S., Kim, K. W., & Lee, K. J. (2013). Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for Parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *13*(2), 197-204. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13_2_01
24. Xu, W., Gao, Z., Qi, Z., Qiu, M., Peng, J. Q., & Shao, R. (2014). Effect of dietary Chlorella on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus* gibelio. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *14*(1), 53-57. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_07

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume11, Issue 1, Winter 2022
Pages: 1-12

Evaluation of killed vaccine potency against Nervous Necrosis Virus (NNV) using superoxide dismutase and lysozyme parameters of *Acipenser stellatus* Pallas, 1771 serum assay

Elahe Afsharipour[1], Ghobad Azari Takami[1], Mohammad Jalil Zorriehzahra[2*], Abbas Ali Motallebi1 and Shapour Kakoolaki[3]

1- Department of Basic Science and Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Scientific Information and Communication, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI) Agricultural research education and extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
3- Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI) Agricultural research education and extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

A B S T R A C T

In this study, the effectiveness of 4 killed VNN vaccines along with three types of adjuvants was evaluated by both immersion and injection methods. About 540 fish weighing 7-10 g of ozone (*Acipenser stellatus* Pallas 1771) were considered. Vaccination was performed in two stages one month apart, and one month after the second recurrence, exposure to the acute live virus was performed. During this period, the mortality rate of immersion and injection groups was 12.9% and 19.8%, respectively, compared to 100% mortality in the control group. Blood sampling was performed to assess immune factors (superoxide dismutase, lysozyme) in four stages before the first vaccination in the adaptation period, after the first vaccination, after the second vaccination one month and after exposure to live virus Acute was performed to identify changes before and after exposure to the virus. The results of the present study showed that immunization vaccination in the vaccinated group with the vaccine containing IMS 1312 SEPPIC adjuvant significantly higher levels of superoxide dismutase 1745 IU / MI ($p<0.05$) and lysozyme 40.6 ($p<0.05$). Compared to other groups, which proves its better efficacy compared to other vaccines. Therefore, a vaccine killed with 75% IMS 1312 SEPPIC adjuvant can be recommended for vaccination against VNN.

KEYWORDS: Sturgeon, Nodavirous, VNN, Vaccination, immunization, Hematologic factors

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 23 Sept 2021
Accepted: 4 Feb 2022
ePublished: 20 Feb 2022

* Corresponding Author:
Email address: m.zorriehzahra@areeo.ac.ir
Tel: +(98) 9121075728
© Published by Tarbiat Modares University
eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.11.1.7.0]