Archive of SID.ir

مقاله کامل

دوره بیستم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۴۰۳

DOI: 10.22055/IVJ.2023.415944.2636

ارزیابی ایمنی‌زایی اختصاصی واکسن خوراکی بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی

امیر آرامون[1*]، مجتبی علیشاهی[2]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[3] و مسعود قربانپور[4]

[1] دانش آموخته دکترای تخصصی بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[2] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[3] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[4] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران و گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۵

چکیده

یکی از روش‌های محافظت و آهسته رهش نمودن آنتی‌ژن‌های واکسنی استفاده از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب‌پذیر مثل کیتین در بستر بایوفیلم باکتریایی می‌باشد. باکتری به صورت مجتمع در آمده و توسط بستر پلیمری در شرایط دستگاه گوارش محافظت می‌شود و نهایتاً آنتی‌ژن‌های واکسنی سالم‌تر و با توان ایمنی‌زایی بهتر در اختیار سیستم ایمنی مخاطی ماهی قرار داده می‌شود. در این روش واکسن بایوفیلم باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*، با کشت باکتری در محیط کشت TSB (۰/۲۲۵ درصد W/V) به همراه کیتین (۰/۳ درصد W/V) به مدت چهار روز در انکوباتور شیکر دار قرار داده شد. باکتری سپس با PBS استریل شستشو گردیده و با حرارت غیرفعال شد. تعدادی ماهی کپور معمولی ۱۱±۳۲ گرمی، به ۵ تیمار مساوی و هر تیمار در سه تکرار به صورت زیر تقسیم شدند: تیمار اول تا چهارم به ترتیب با واکسن بایوفیلم، باکترین، کیتین+ محیط کشت و کیتین، به روش خوراکی طی ده روز ایمن شدند، تیمار پنجم بدون تجویز واکسن به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری از سرم ماهیان در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ صورت گرفت. عیار آنتی‌بادی ضد باکتری در نمونه‌ها با آزمایش الایزا و توسط آنتی‌بادی مونوکلونال ارزیابی گردید. نتایج نشان داد عیار آنتی‌بادی ضد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در تیمار بایوفیلم خوراکی در روز ۲۰ نسبت به بقیه تیمارها معنی‌دار بوده است اما در روز ۴۰ و ۶۰ معنی‌دار نبوده است.

کلمات کلیدی: واکسن خوراکی، بایوفیلم، *آئروموناس هیدروفیلا*، کپور معمولی

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل مهم تلفات در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شود و آئروموناس هیدروفیلا یکی از مهم‌ترین عامل بیماری‌زا در ماهی کپور می‌باشد (Tavakoli et al, 2015). آئروموناس‌ها بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتلاز مثبت هستند که در خانواده آئروموناداسه قرار داشته و از دو گروه مجزای غیرمتحرک سرمادوست و گروه متحرک مزوفیلیک تشکیل شده‌اند (Swaminathan et al, 2004). این باکتری عامل

* نویسنده مسئول: امیر آرامون، دانش آموخته دکترای تخصصی بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: aramoon.haser@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

بیماری‌زا در ماهیان آب شیرین و گاهی آب شور است و در کپور ماهیان، مارماهی، شیر ماهی، گربه ماهی، تیلاپیا، قزل آلای رنگین کمان، سپتی سمی هموراژیک ایجاد می‌کند (Vijavabaskar et al, 2012; Tokmechi et al, 2008). با توجه به نتایج Ahangarzadeh و همکاران (۲۰۱۵)، که در مجموع ۱۵/۵ درصد از سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان را سپتی‌سمی ناشی از *آئرومونا‌س هیدروفیلا* شناسایی کردند و همچنین ۶۲/۵ درصد نقش آئرومونا‌س‌ها در بیماری‌زایی کپور ماهیان استان خوزستان را تشکیل داده‌اند، به همین دلیل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های شایع در ماهیان بیماری با کتریایی *آئرومونا‌س هیدروفیلا* در این استان می‌باشد.

لذا تلاش‌های متعددی برای تولید واکسن (به ویژه واکسن‌های منطقه‌ای[1]) برای جلوگیری از این عفونت آئرومونا‌سی در کپور ماهیان صورت گرفته است (Azad et al, 2000). به طور قطع کم استرس‌ترین روش تجویز واکسن، تجویز خوراکی است، ولی تغییرات آنتی‌ژن‌های واکسن در لوله گوراش ماهی به خاطر ترشحات آن‌ها باعث کارایی پایین این روش تجویز شده است. لذا تجویز با این روش کم هزینه و بدون عوارض جانبی است (Plant and LaPatra, 2011). به خاطر وجود این مزایا، در حال حاضر چندین واکسن خوراکی برای استفاده در صنعت آبزی‌پروری ثبت شده‌اند. به عنوان مثال، ۱۷ واکسن موجود به صورت تجاری در برابر ویروس‌ها ساخته شده است که ۲ مورد آن در مورد واکسن خوراکی می‌باشد (Dhar et al, 2014). یکی از روش‌های محافظت از آنتی‌ژن‌های واکسنی در شرایط دستگاه گوارش ماهی، استفاده از تکنیک بایوفیلم می‌باشد. همچنین جذب واکسن بیوفیلم *آئرومونا‌س هیدروفیلا* در مقایسه با واکسن معمولی راحت‌تر جذب می‌شوند و احتمالاً به دلیل پوشش گلیکوکالیکس بایوفیلم می‌باشد (Azad et al, 2000). در این روش با استفاده از یک بستر مناسب که معمولاً از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب‌پذیر[2] می‌باشد، باکتری به صورت مجتمع در آمده و توسط بستر پلیمری در شرایط دستگاه گوارش محافظت می‌شود و نهایتاً آنتی‌ژن‌های واکسنی سالم‌تر و با توان ایمنی‌زایی بهتر در اختیار سیستم ایمنی مخاطی ماهی قرار داده می‌شود. در تشکیل بایوفیلم علاوه بر این که یک لایه گلیکوکالیکس در اطراف باکتری را فرا می‌گیرد، باعث تجمع لایه‌های متعدد باکتری در یک پارانشیم کیتینی می‌گردد که عوامل تخریب آنتی‌ژنی، به ویژه اسید معده و آنزیم‌های گوارشی فقط توانایی تأثیر بر لایه یا لایه‌های سطحی بایوفیلم را داشته و لایه‌های میانی با عبور از معده و ابتدای روده، با حفظ ویژگی آنتی‌ژنیک به محل جذب آنتی‌ژن‌های روده می‌رسند. لذا در روده توسط سلول‌های فاگوسیت کننده سیستم ایمنی جذب شده و باعث القای ایمنی مؤثرتری نسبت به واکسن‌های معمولی خوراکی می‌شوند (Nayak et al, 2004; Siriyappagouder et al, 2014). چسبندگی باکتری‌ها به سطوح به حالت برگشت‌ناپذیر با تولید مواد خارج سلولی پلیمریک یا EPS[3] همراه است، که این حالت باعث تحریک پروتئین‌های حسی سلول‌های غشاء باکتریایی می‌شود (Chakrabarty and Boyd, 1995)، که اجازه می‌دهد برای توسعه ارتباط سلول به سلول پل ایجاد شود که به نوبه خود، باکتری‌ها را به سطح می‌چسباند. به عنوان مثال Landry و همکاران (۲۰۰۶)، نشان دادند که بایوفیلم‌های باکتری *Pseudomonas aeruginosa* که به صورت اجتماع بزرگ سلولی روی سطوح با موکوز گلیکوپروتئین رشد کرده‌اند، در مقایسه با بایوفیلم‌های روی شیشه و پوشش داده شده با اکتین و DNA تحمل‌شان به آنتی‌بیوتیک توبرامایسین بیش‌تر شده است. علاوه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتری‌های بایوفیلم در برابر قرار گرفتن در معرض نور ماوراء بنفش، سمیت فلزی، تماس با اسید، کمبود آب و فاگوسیتوز نیز بسیار

1- Local
2- Biodegradable
3- Extracellular Polymeric Substances

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مقاوم هستند (Hall-Stoodley et al, 2004). کیتین علاوه بر ایجاد بستر برای بایوفیلم خاصیت ادجوانی نیز دارد. Dong و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که کیتین باعث افزایش سیتوکنین‌هایی از قبیل: IL-1, IL-12, IL-18 ، TNFα و IFNα به صورت مستقیم و افزایش سلول‌های کشنده طبیعی (NK cells) به صورت غیر مستقیم می‌گردد.

علاوه بر این، تغییرات در فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند تحت تأثیر رفتار تغذیه، ترکیب بیوشیمیایی غذا، سن میزبان، دما و فصل باشد (Kuzmina et al, 1996; Zambonino Infante and cahu, 2001). به طور کلی واکسن خوراکی بایوفیلم در ماهیان علف‌خوار و همه‌چیز خوار تیتر آنتی‌بادی بیش‌تری نسبت به گوشت‌خواران دارد زیرا ترشحات معده حاصل از فعالیت پپسی‌ناژ گسترده‌تر است که باعث تخریب آنتی‌ژنی بیش‌تری می‌گردد (Manjakasy et al, 2011; Siriyappagouder et al, 2014). لذا در این تحقیق سعی بر آن بود با تولید واکسن بایوفیلم خوراکی و تجویز آن به ماهی کپور تیتر آنتی‌بادی و میزان ایمنی آن‌ها به دست آید.

مواد و روش کار

جهت تهیه واکسن بایوفیلم ابتدا استوک باکتریایی جدا شده از منطقه خوزستان و آزمایشگاه بهداشت و بیماری آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران اهواز تهیه شد. همچنین کیتین از شرکت تولید و فرآوری کیتین و کیتوزان گلمکانی در مشهد خریداری شد. آماده‌سازی واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* بر طبق روش Azad و همکاران (۱۹۹۹) صورت گرفت. به طور خلاصه در این روش باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* بر روی سوبسترای کیتین (۰/۳w/v درصد) در محیط TSB (۰/۲۲۵w/v درصد) اتوکلاو شده کشت گردید. باکتری‌های بایوفیلمی به مدت ۴ روز و هر روز ۶ ساعت در دستگاه شیکر[1] با دور ۱۲۰ بار در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا باکتری روی بایوفیلم کیتین کاملاً مستقر گردد. سپس این بایوفیلم با سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور به مدت ده دقیقه از محیط کشت جدا شده و با بافر نمک فسفات (PBS 0.1 M, pH 7.2) شستشو و ترکیب گردید. بعد از شمارش باکتری در بایوفیلم، کیفیت بایوفیلم واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* با میکروسکوپ فازکنتراست بررسی گردید.

برای غیرفعال کردن باکتری بایوفیلم به مدت ۵۰ دقیقه در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محصول نهایی به عنوان واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* در خوراک ماهی کپور (خریداری شده از شرکت کیمیاگران تغذیه) مورد استفاده قرار گرفت. به علت این که کیتین مانع اسپری شدن واکسن روی غذا می‌شد، واکسن بایوفیلم به صورت یکنواخت روی غذا ریخته و مخلوط شد تا یکنواخت گردد و با روغن خوراکی پوشش‌دار شد. برای تهیه واکسن *آئروموناس هیدروفیلای* بدون بایوفیلم (بایوفیلم تشکیل نشده) به این صورت که محیط کشت و کیتین بدون اضافه نمودن باکتری به مدت ۴ روز با شرایط مشابه انکوبه گردید و تمام روند آماده‌سازی واکسن بایوفیلم هم در مورد آن‌ها اعمال گردید. برای تهیه باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* نیز، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۱ روز در محیط TSB کشت شده و با دور g ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد با بافر استریل PBS 0.1 M, pH 7.2 سه بار شستشو شده و نهایتاً در غلظت $10^{10}ml^{-1}$ در PBS استریل آماده گردید. باکتری‌های آزاد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال گردیدند (Azad et al, 1999; 2000).

کیفیت واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* قبل از غیر فعال شدن باکتری‌ها با دما با میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی گردید. واکسن بایوفیلم و واکسن معمولی به صورت یکنواخت روی خوراک ریخته (ذکر شده در موارد بالا) و در طی دوره واکسیناسیون استفاده گردید.

1- Shaker

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جهت تیماربندی ماهی‌ها، تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۱۱±۳۲ گرم به صورت زیر به ۵ تیمار در سه تکرار ۲۵ تایی تقسیم‌بندی شدند:

۱- تیمار ایمن شده با واکسن بایوفیلم (کیتین+باکتری)

۲- تیمار ایمن شده با باکترین (بدون کیتین)

۳- تیمار ایمن شده با کیتین

۴- تیمار ایمن شده با کیتین و محیط کشت TSB (بدون تشکیل بایوفیلم)

۵- تیمار کنترل غیر ایمن (کنترل)

ماهی‌های کپور از مرکز پرورش آبزیان شوشتر در استان خوزستان خریداری گردید و با رعایت شرایط انتقال با استفاده از وانت مخصوص انتقال بچه ماهی به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل شد. بعد از انتقال ماهی و ضدعفونی ماهیان با فرمالین ppm ۱۰۰ به مدت یک ساعت، ۱۰ روز سازگاری ماهیان به آب کارگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز انجام شد. شرایط فیزیکوشیمیایی آب محل تحقیق به شرح زیر بود: منبع آب کارگاه از آب لوله کشی شهری به مدت یک هفته هوادهی شده با دمای۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد و شوری ۰/۱±۰/۸ گرم بر لیتر، میزان نیتریت و آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و نیترات کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، pH بین ۷/۸ تا ۸/۴ و میزان غذادهی بین ۲ تا ۳ درصد بایومس، روزی دو بار و بر اساس اشتهای ماهی با خوراک تجاری (شرکت کیمیاگران تغذیه)، میزان ۱۲ ساعت روشنایی و تعویض آب به صورت سیفون ۶۰ تا ۸۰ درصد آب آکواریوم و هر سه روز یک بار انجام شد.

بعد از سازگاری ماهیان به آب کارگاه، ایمن‌سازی ماهی‌ها با خوراک حاوی واکسن بایوفیلم (10^{10} باکتری به ازای هر گرم ماهی در روز) باکترین با همین غلظت، تیمار کیتین و بایوفیلم تشکیل نشده هم به میزان کیتین استفاده شده در واکسن بایوفیلم به مدت ۱۰ روز انجام شد (Abhiman, 2014; Azad et al, 1999; 2000).

جهت نمونه‌گیری، تیمارها به مدت ۶۰ روز پرورش داده شدند و در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ سه نمونه از هر تکرار ماهیان بیهوش شده با ppm ۳۰ ماده تریکائین متان سولفانات (MS222) و خون‌گیری انجام شد. سرم ماهی‌ها جدا شده و به روش الایزا با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال (تهیه شده در بخش ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در نمونه‌های سرمی مشخص گردید.

اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی به روش الایزای غیرمستقیم

۱- فرآینده سونیکاسیون باکتری آئروموناس هیدروفیلا

برای کوت آنتی‌ژن باکتری کف گودهای الایزا، ابتدا باکتری با کشت در محیط TSA خالص گردید و سه کلنی خالص شده به ۱ سی‌سی آب مقطر اضافه گردید و ۶ بار فریز دفراست روی آن صورت گرفت. بعد از این مرحله با دستگاه سونیکاتور و سیکل ۱۰ بار سونیکیشن (دو دقیقه سونیکاسیون با فاصله زمانی دو دقیقه) صورت گرفت. سپس با دور ۳۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و برای ایجاد غلظت مناسب آنتی‌ژن (در هر ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شده در پلیت الایزا ۰/۱ میکروگرم دیواره باکتری) با آب مقطر به نسبت ۱ به ۲۵ رقیق گردید (Kaur et al, 2021).

۲- آزمون نهایی الایزا برای تست سرم‌های ماهی

بعد از سونیکه کردن باکتری آزمایشات پایلوت انجام شد و مقادیر بهینه آنتی‌ژن، بلاکر، سرم، پادتن مونوکلونال و کونژوگه، مشخص گردید.

در کف گودهای پلیت الایزا (Nunc-Immuno MicroWell 96 well solid plates) آنتی‌ژن (باکتری سونیکه شده)، به میزان ۱ به ۲۰ با کوتینگ بافر رقیق شد و به میزان ۵۰ میکرولیتر کف گودها کوت گردید. بعد از یک روز در یخچال نگهداری شد و سپس محلول رویی پلیت‌های الایزا دور ریخته و ۳ بار با PBS توئین شستشو گردید. سپس با شیر خشک پس چرخ ۱ درصد حاوی PBS توئین به میزان ۳۰۰ میکرولیتر جایگاه‌هایی که آنتی‌ژن نچسبیده بود بلاک گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۳ بار شستشو با بافر شستشو انجام شد و سرم‌های ماهی از هر تیمار به میزان ۱ به ۴۰۰ در PBS توئین و شیر ۰/۵ درصد رقیق و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر قرار گرفت و سپس محلول دور ریخته و ۴ بار شستشو گردید و آنتی-بادی مونوکلونال ضد زنجیره سنگین IgM تولید شده در موش به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه در دمای اتاق، محلول دور ریخته و سه بار شستشو گردید و آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی تولید شده در بز (Goat anti mouse) به صورت کنژوگه (Bio-Rad, USA, 170-6516)، رقیق شده به نسبت ۱ به ۳۰۰۰ به میزان ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک اضافه گردید. بعد از ۴۰ دقیقه محلول دور ریخته و ۳ بار شستشو گردید. سوبسترای کروموژن ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه محلول متوقف کننده اضافه گردید. OD مربوط به هر چاهک در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد (Kaur et al, 2021).

برای آنالیز نتایج عیار آنتی‌بادی در بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ استفاده شد و جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون کلوموگروف- اسمیرنوف و برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید ($P<0.05$).

نتایج

بررسی بایوفیلم در زیر میکروسکوپ

بعد از تولید بایوفیلم (کشت باکتری در محیط TSB به همراه کیتین)، از تمام مراحل قبل شستشو بایوفیلم، بعد شستشو بایوفیلم و ورتکس شدید[1] با میکروسکوپ فاز کنتراست عکس‌برداری صورت گرفت (Figure 1).

نتایج تیتر آنتی‌بادی سرم ماهی‌های تیمار شده

سرم ماهیان تمام تیمارهای واکسن خوراکی در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ جدا گردید و با آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد زنجیره سنگین IgM ماهی کپور معمولی (تولید شده در بخش ویروس‌شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)، مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در Figure 2 مشاهده می‌گردد واکسن‌های خوراکی موفقیت نسبی داشته‌اند. عیار آنتی-بادی فقط در تیمار بایوفیلم روز ۲۰ افزایش معنی‌داری داشته است. ولی در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری با تیمار کنترل مشاهده نگردید ($P<0.05$).

1 Vortex

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

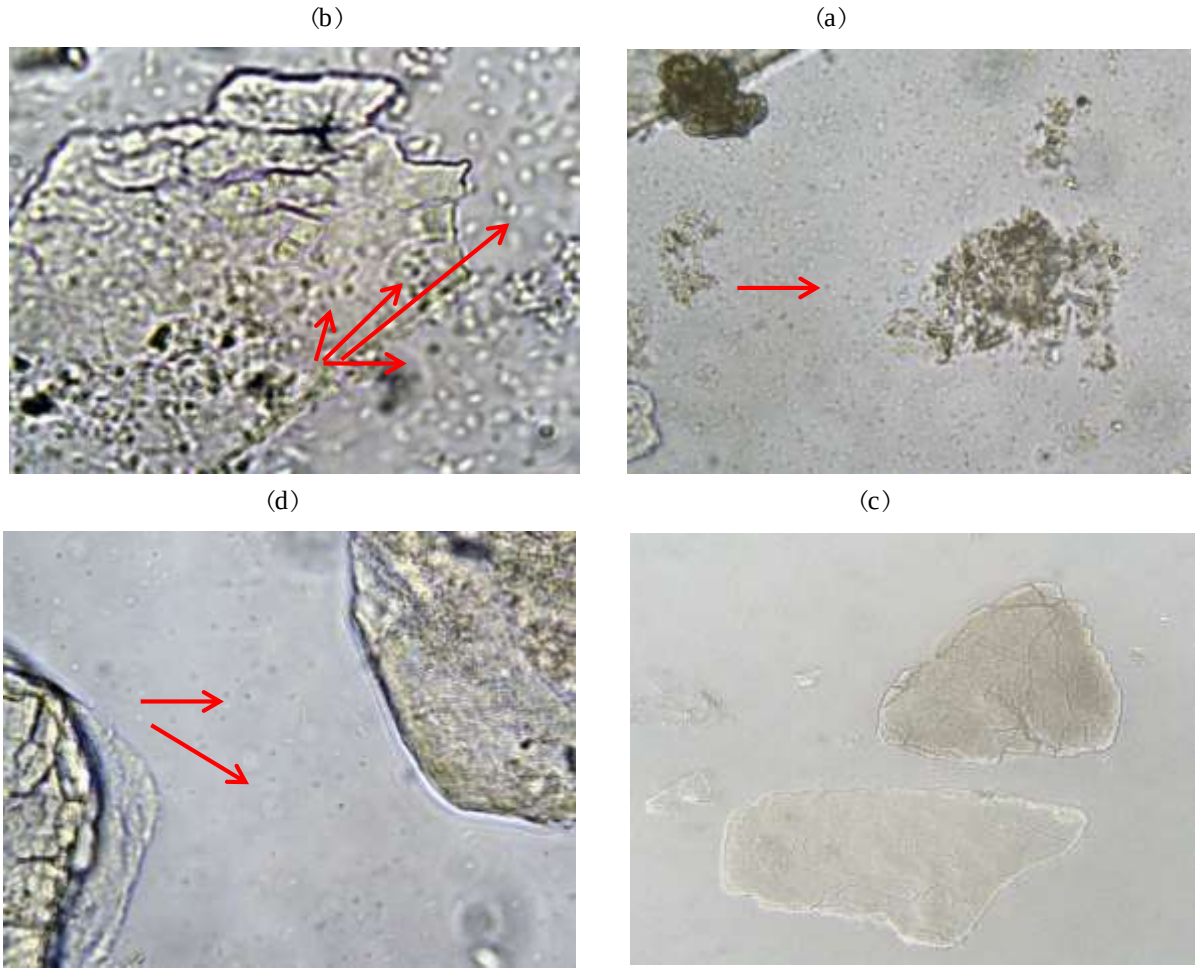

Figure 1: a) X400 phase contrast microscope of bacteria and chitin in the culture medium before the washing process. b) Phase contrast microscope X1000 of bacteria and chitin in the culture medium before the washing process. c) X100 phase contrast microscope of chitin flakes. d) Phase contrast microscope. (Arrowhead X400 bacteria and chitin in the culture medium after washing and vigorous vortexing indicates of the bacteria).

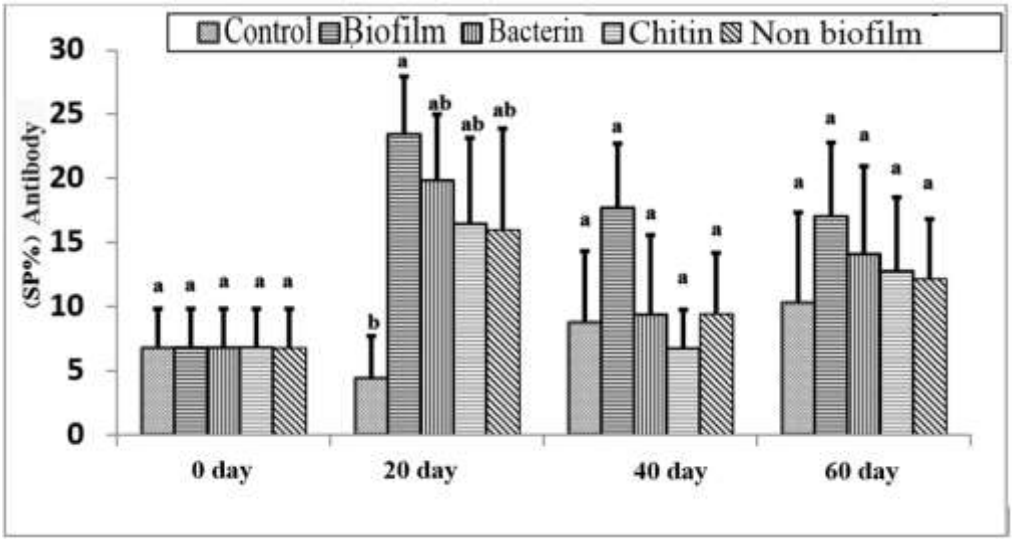

Figure 2: Comparison of antibody titer (based on SP percentage) of Biofilm, Bacterin, Chitin and Non biofim in the common carp.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

بحث

سلول‌های بایوفیلم در برابر قرار گرفتن در معرض نور ماوراء بنفش، سمیت فلزی، تماس با اسید، کمبود آب و فاگوسیتوزیس نیز بسیار مقاوم است (Hall-Stoodley et al, 2004). همچنین بایوفیلم در صنعت پزشکی و داروسازی به عنوان مقاومت دهنده به باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به کار می‌روند. همچنین برای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در استفاده از داروها از بایوفیلم استفاده می‌گردد (Lindsay and von Holy, 2006). استفاده از بایوفیلم باکتریایی برای تولید واکسن خوراکی توسط برخی محققین استفاده شده است (Abhiman, 2014; Azad et al, 1999; 2000; Siriyappagouder et al, 2014). به عنوان مثال Azad و همکاران (۱۹۹۹) از بایوفیلم باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* برای ایمنی‌سازی ماهی کپور معمولی استفاده کردند. به غیر از بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* بایوفیلم برخی باکتری‌ها نیز برای تولید واکسن خوراکی استفاده گردیده است. در مطالعه‌ای مشابه از بایوفیلم باکتری *Vibrio alginolyticus* روی میگو برای تولید واکسن خوراکی استفاده گردید که باعث افزایش ایمنی شد (Sharma et al, 2010a). همچنین بایوفیلم *Vibrio alginolyticus* روی میگوی *Penaeus monodon* باعث افزایش مقاومت به بیماری و ایمنی میگو شد (Sharma et al, 2010b). Azad و همکاران (۱۹۹۹ و ۲۰۰۰) در مورد بایوفیلم نیز از همین روش برای غیر فعال نمودن واکسن بایوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده کردند. ولی در تحقیقات دیگر از روش‌های متفاوت استفاده شده است، مثلا Lee و همکاران (۲۰۱۷) از یون‌ها برای غیرفعال نمودن بایوفیلم *Pseudomonas aeruginosa* استفاده کردند. به نظر می‌رسد روش حرارت دادن، علاوه بر کارایی مناسب و کم هزینه بودن، در تسهیل عرضه آنتی‌ژن در روده نیز مؤثر باشد (Azad et al, 1999; 2000). همچنین به نظر می‌رسد روش به کار رفته در این تحقیق برای تولید بایوفیلم باکتریایی، علاوه بر مؤثر و کارا بودن، روشی ساده، ارزان و قابل انجام در سطح صنعتی بوده و می‌توان از آن به عنوان گزینه‌ای برای تولید واکسن بایوفیلم استفاده کرد. نتایج مربوط به عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان ایمن شده با واکسن بایوفیلم و واکسن معمولی (باکترین) به روش خوراکی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در تیتر آنتی‌بادی ماهیان ایمن شده با تیمار کنترل به جز روز ۲۰ مشاهده نگردید ($P>0.05$). هر چند گزارشاتی از افزایش عیار آنتی‌بادی بعد از تجویز واکسن خوراکی وجود دارد (Nayak et al, 2004). ولی برخی گزارشات نیز حاکی از عدم تغییر عیار آنتی‌بادی در ماهیان واکسینه شده به روش خوراکی است که تا روز ۴۰ هیچ تیتر آنتی‌بادی مشاهده نشد (Azad et al, 1999). اما در مطالعه Abhiman (۲۰۱۴) واکسن بایوفیلم خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* را با روش مشابه مطالعه حاضر (۰/۳ درصد کیتین و ۰/۲۲۵ درصد محیط کشت TSB) تولید نمود و در ماهی کپور معمولی حدود ۴۰ گرم و دوز باکتری 10^{10} CFU/g و به مدت ۱۰ روز خوراکی واکسن، همانند مطالعه حاضر تجویز شد. در مطالعه Azad و همکاران (۱۹۹۹) نیز واکسن بایوفیلم خوراکی (۰/۳ درصد کیتین و ۰/۲۲۵ درصد محیط کشت TSB) به روش مشابه مطالعه حاضر تولید گردید و بر روی بچه ماهی‌های روهو (*Labeo rohita* Ham.) و ماهی کاتلا (*Catla catla* Ham.) و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* Lin.) با وزن‌های ۳ تا حدود ۵ گرم با دوز باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* 10^{7}، 10^{10}، 10^{13} (CFU/g) و به مدت ۱۵ روز غذادهی و ۵ درصد وزن بدن صورت گرفت. تیر آنتی‌بادی در این سه گونه در دوز 10^{10} CFU/g و 10^{13} به طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار 10^{7}CFU/g بود. هرچند که تیتر آنتی‌بادی تیمار 10^{13} CFU/g تفاوت چندانی با 10^{10} CFU/g نداشته است. با افزایش روزها میزان تیتر آنتی‌بادی افزایش پیدا کرده است و این میزان افزایش در ماهی کاتلا تا روز ۹۰، در روهو تا روز ۵۰ و در کپور معمولی تا روز ۶۰ بوده است. در ماهی کاتلا تیتر آنتی

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

بادی تمام تیمارها (10^{7}، 10^{10}، 10^{13} (CFU/g) به جز گروه شاهد از روز ۱۰ شروع گردید، همچنین در ماهی روهو تیتر آنتی‌بادی همه تیمارها به جز گروه شاهد از روز ۲۰ شروع گردید به جز تیمار واکسن بایوفیلم با غلظت 10^{7} CFU/g که از روز ۳۰ شروع شد. همچنین ماهی کپور معمولی به طور تعجب‌آوری تیتر آنتی‌بادی تیمار (CFU/g) 10^{10}، 10^{13} از روز ۴۰ شروع به افزایش کرد به جز تیمار 10^{7} CFU/g که از روز ۳۰ افزایش داشت. همچنین در روز ۱۵۰ در ماهیان کاهش تیتر آنتی‌بادی داشت و در کپور تیتر آنتی‌بادی به صفر رسید. از آن جا که در مطالعه حاضر افزایش تیتر معنی‌دار فقط در روز ۲۰ مشاهده شد، با نتایج تحقیق فوق هم‌خوانی ندارند. با توجه به این که وزن ماهیان این تحقیق حاضر به جای ۴ گرم ۳۲ گرم بوده است به نظر می‌رسد تأثیر وزن ماهیان بر روی تیتر آنتی‌بادی تأثیرگذار بوده است. علاوه بر این در مطالعه Siriyappagouder و همکاران (۲۰۱۴)، واکسن خوراکی بایوفیلم در ماهی *Channa striatus* به روش مشابه مطالعه حاضر (۰/۳ درصد کیتین و ۰/۲۲۵ درصد محیط کشت TSB) تولید گردید. در این تحقیق وزن ماهی ۰/۳۵ ± ۱۵ گرم با دوز باکتری *آئرومونا هیدروفیلا* 10^{10} CFU/g و به مدت ۲۰ روز غذادهی و ۵ درصد وزن بدن صورت گرفت. نتایج عیار آنتی‌بادی نشان داد که تیمار بایوفیلم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشته است، میزان OD خوانده شده از دستگاه الایزا در واکسن خوراکی بایوفیلم از روز ۱۰ تا ۶۰ معنی‌دار بوده است، لذا از این نظر با نتایج حاضر که در روز ۲۰ تیتر آنتی‌بادی معنی‌دار بوده است هم‌خوانی دارد.

در مطالعه Vinay و همکاران (۲۰۱۳) تحقیق بر روی واکسن خوراکی بایوفیلم *آئرومونا هیدروفیلا* بر روی ماهی ۱۵ گرمی روهو (*Labeo rohito*) را انجام دادند. واکسن بایوفیلم بر طبق روش حاضر (۰/۳ درصد کیتین و ۰/۲۲۵ درصد محیط کشت TSB) تولید گردید. دوز واکسن نیز مشابه روش مطالعه حاضر (CFU/g) 10^{10} مورد آزمایش قرار گرفت و به مدت ۲۰ روز و ۲ درصد وزن بدن ماهیان غذادهی صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ماهیان شاهد تیتر آنتی‌بادی از روز صفر تا ۶۰ به میزان متوسط ۰/۱ و ماهیان تجویز خوراکی باکترین به میزان متوسط بین ۰/۱۵ تا ۰/۲ و ماهیان واکسن خوراکی بایوفیلم تیتر بین ۰/۴ تا ۰/۷ داشته‌اند، که نشان می‌دهد تیتر آنتی‌بادی ۴ تا ۷ برابر شده است، در مقایسه با مطالعه حاضر البته بر روی ماهی کپور معمولی و ۱۰ روز تجویز واکسن خوراکی بایوفیلم تیتر آنتی‌بادی روز ۲۰ در مقایسه با گروه شاهد بیش از ۵ برابر شده است که هم‌خوانی دارد اما در روز ۴۰ و ۶۰ با این مطالعه هم‌خوانی ندارند. Aramoon و همکاران (۲۰۱۸) با نتایج چالش باکتریایی در ادامه این تحقیق بعد از روز ۶۰ و مدت زمان ۱۰ روز تجویز خوراکی واکسن بایوفیلم *آئرومونا هیدروفیلا* به ماهی کپور معمولی افزایش بقای (۲۲/۵ درصد) معنی‌داری نسبت به تیمار ایمن شده با باکتری معمولی خوراکی (۱۲/۵ درصد) نشان دادند که واکسن بایوفیلم اثر مثبتی بر ایمنی ماهی کپور داشته است. علاوه بر این بر اساس درصد بازماندگی در گروه کیتین خوراکی و کیتین+محیط کشت خوراکی با یکدیگر برابر بوده‌اند و اما از گروه شاهد میزان بازماندگی بالاتر بوده است، که به نظر می‌رسد کیتین نیز در ایمنی و سلامت ماهی مؤثر بوده هر چند این تأثیر از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین بالا بودن تیتر آنتی‌بادی و افزایش معنی‌دار عیار آنتی‌بادی در تیمار واکسن بایوفیلم در روز ۲۰ نسبت به واکسن معمولی خوراکی، نشان داد که واکسن بایوفیلم به طور مؤثری با محافظت آنتی‌ژن واکسنی در شرایط لوله گوارش، باعث تغییر کم‌تر آنتی‌ژن‌های واکسنی شده و سیستم ایمنی میزبان واکنش مناسب‌تری در برابر آنتی‌ژن نشان خواهد داد. در تحقیق Abhiman (۲۰۱۴) و Azad و همکاران (۲۰۰۰) نیز روش تولید واکسن بایوفیلم باکتری *آئرومونا هیدروفیلا* با استفاده از کیتین مشابه تحقیق حاضر انجام شد، آن‌ها نیز با تولید واکسن بایوفیلم باکتری *آئرومونا هیدروفیلا* کارایی مناسب این روش پوشش دهی واکسن را گزارش نمودند.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

در مطالعه Kaur و همکاران (۲۰۲۱) واکسن بایوفیلم خوراکی را در ماهی روهو بررسی کردند به مدت ۲۰ روز غذادهی واکسن انجام شد و همانند مطالعه حاضر از کیتین به عنوان بستر بایوفیلم استفاده کردند که از روز ۱۰ به بعد افزایش ایمنی داشته است که با روز ۲۰ تحقیق حاضر همخوانی دارد. علاوه بر این در تحقیق Gopalakannan و Arul (۲۰۰۶) با بررسی کیتین و کیتوزان در غذای ماهی کپور معمولی این دو ماده را محرک ایمنی ذاتی معرفی نمودند که به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت لیزوزیم می‌گردند. همچنین گلبول‌های سفید (WBC) به طور معنی-داری در گروه کیتین بیش‌تر از گروه کیتوزان و شاهد بود همان طور که در گزارشات فوق مشخص است، تولید بایوفیلم کیتین علاوه بر محافظت واکسن در تجویز خوراکی، تأثیر این پلیمر طبیعی زیست تخریب‌پذیر بر بیان سایتوکین‌های گوارشی نیز در بهبود ایمنی مخاطی ماهی مؤثر بوده و نقش ادجوانی برای آنتی‌ژن واکسنی دارد. همچنین ماهی کاتلا ایمنی بیش‌تری نسبت به کپور معمولی و روهو داشته است. به نظر می‌رسد تفاوت در میزان ایمنی ماهیان به واکسن بایوفیلم به نوع گونه ماهی، رژیم غذایی، دمای نگهداری ماهی، تجویز مدت زمان بیش‌تر واکسن و نوع بستر بایوفیلم یا احتمالاً سویه باکتری نقش دارد. لذا با توجه به نتایج حاضر می‌توان نتیجه گرفت که واکسن خوراکی توانایی در افزایش ایمنی در ماهی را دارد. هرچند از نظر تیتر آنتی‌بادی ایمنی بالایی مشاهده نشد اما ایمنی نسبی مشاهده شد که به نظر می‌رسد با توجه به این که در برخی مطالعات تجویز ۲۰ روز واکسن خوراکی لحاظ گردیده است و افزایش ایمنی مشاهده شده است، پیشنهاد می‌گردد دوره ۱۰ روزه تجویز خوراکی واکسن به ۲۰ روز ارتقا یابد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین آزمایشگاه بهداشت و بیماری آبزیان و مسئول آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که در انجام این تحقیق یاری رساندند صمیمانه قدردانی می‌نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصص آقای امیر آرامون بوده است و منابع مالی آن توسط گرنت اساتید راهنما و مشاور تأمین شده است.

منابع

Abhiman, *M.F.Sc*, (2014). Effect of *Aeromonas hydrophila* biofilm oral vaccine on gut immunity of carps. PhD Thesis Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar. P 86.

Ahangarzadeh, Gurbanpour Najafabadi, Massoud, Peighan, Sharif Rouhani, & Soltani. (2015). The role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of farmed carp fish in Khuzestan province. *Iranian Veterinary Journal*, *11*(3), 5-16. (In Persian)

Aramoon, A., Alishahi, M., Seifi Abad Shapouri, M. R., & Ghorbanpour, M. (2018). Immunogenicity evaluation of Aeromonas hydrophila biofilm vaccine on the fingerling Common carp (Cyprinus carpio). *Journal of Animal Environment*, *10*(3), 207-212. (In Persian)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Azad, I.S Shankar K.M, Mohan C.V And, Kalita, B. (2000). Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination antigen localization by a monoclonal antibody. *Disease of Aquatic Organisms*. 43: 103–108.

Azad, I.S Shankar K.M, Mohan C.V And, Kalita, B. (1999). Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila*– standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. *Fish and shellfish immunology*, 519-528.

Boyd A, Chakrabarty AM. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J Indust Microbiol*, 15:162-168.

Dhar AK, Manna SK, Thomas Allnutt FC. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*, 25(1):1–17.

Dong, L., Wichers, H. J., & Govers, C. (2019). Beneficial health effects of chitin and chitosan. *Chitin and chitosan: Properties and applications*, 145-167.

Gopalakannan, A. and Arul, V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255,179–187.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2:95-108.

Kaur, B., Kumar, B. N., Tyagi, A., Holeyappa, S. A., & Singh, N. K. (2021). Identification of novel vaccine candidates in the whole-cell *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine through reverse vaccinology approach. *Fish & Shellfish Immunology*, *114*, 132-141.

Kuzmina, V.V., Golovanova, I.L., Izvekova, G.I. (1996). Influence of temperature and season on some characteristics of intestinal mucosa carbohydrases in six freshwater fishes. *Comp Biochem Physiol* , 113: 255-60.

Landry, R.M., An, D., Hupp, J.T., et al. (2006). Mucin–Pseudomonas aeruginosa interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol*; 59:142–151.

Lee, H.J., Seo, J., Kim, M. S., Lee, Ch. (2017). Inactivation of biofilms on RO membranes by copper ion in combination with norspermidine. *Desalination*, 424 , 95–101.

Lindsay, D., von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64, 313-325.

Manjakasy JM, Farr I, Hansen MJ, Tibbetts IR. (2011). Enzymatic digestion in stomach less fishes: how a simple gut accommodates both herbivory and carnivory. *J Comp Physiol B;*181:603e13.

Nayak DK, Asha A, Shankar KM, Mohan CV. (2004). Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachusda* carnivore model. F*ish & Shellfish Immunology*. 16, 613-619.

Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, *35*(12), 1256-1262.

Siriyappagouder, P., Shankar, K. M., Kumar, B. N., Patil, R., & Byadgi, O. V. (2014). Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Channa striatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *41*(2), 581-585.

Sharma, K.S.R., Shankar, K.M., Sathyanarayana, M.L., Patil, R.R., Swamy, N. and Rao, S. (2010a). Development of biofilm of *Vibrio alginolyticus* for oral immunostimulation of shrimp. *Aquacul. Intl.* , 19:421–430.

Sharma, K.S.R., Shankar, K.M., Sathyanarayana, M.L., Sahoo, A.K, Swamy, N. and Rao, S. (2010b). Evaluation of immune response and resistance to diseases in tiger shrimp, *Penaeus monodon* fed with biofilm of *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 29:724–732.

Swaminathan, T.R.; Rathore, G.; Abidi, R. and Kapoor, D. (2004). Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Fisheris*, 51(2): 251-254.

Tavakoli, H., Akhlaghi, M. (2015). Evaluation of changes in lysozyme, immunoglobulins, cells and blood hematocrit cultivated *rainbow trout* after experimental infection with pathogenic Aeromonas hydrophila. *Biological Journal of Microorganism*; 4(13): 93-104.

Tokmechi A., Shamci H., Meshkini S., Delshad R., Ghasemimaghanjoghi A. Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Iranian Fisheries* 2012; 21(2): 13-22.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Vijavabaskar, P., Somasundaram, S. (2008). Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic against common fresh water fish pathogen. *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology*; 7(1): 124-128.

Vinay TN, Rajreddy P, Suresh Babu PP, Rajesh R and Shankar KM. (2013). Evaluation of the Efficiency of *Aeromonas hydrophila* Biofilm Vaccine in *Labeo rohita* Employing Monoclonal Antibody based ELISA. *Open Access Scientific Reports*. 1-4.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol*; 130: 477-87.

Received: 13.09.2023
Accepted: 26.11.2023

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Vol. 20, No. 2, Summer, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2023.415944.2636

Evaluation of specific immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* biofilm oral vaccine in common carp

Amir Aramoon[1*], Mojtaba Alishahi[2], Masoudreza Seifi Abad Shapoori[3] and Masoud Ghorbanpoor[4]

[1] PhD Graduate in Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, and Department Pathbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 13.09.2023 Accepted: 26.11.2023

Abstract

One of the methods of protection and slow release of vaccine antigens is the use of biodegradable natural polymers such as chitin in the bacterial biofilm substrate. The bacterium is complex and protected by the polymer substrate in the conditions of the digestive system, and finally, healthier vaccine antigens with better immunogenicity are provided to the intestine mucosal immune system of the fish. In this method, biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* bacteria was done by culturing the bacteria in TSB medium (0.225% W/V) along with chitin (0.3% W/V) for 4 days in a shaker incubator. Afterward bacteria were washed with sterile PBS and were inactivated by heat. A number of common carp of 32 ± 11 g were divided into 5 equal treatments and each treatment was repeated three times as follows: the first to fourth treatment with biofilm vaccine, bacterin, media chitin and chitin + TSB respectively, by oral method during 10 days were immunized; the fifth treatment without vaccine administration was considered as the control group. Sampling of fish serum was done on days 0, 20, 40 and 60. Antibacterial antibody level in the samples was evaluated by ELISA test and by monoclonal antibody. The results showed that the antibody level of *Aeromonas hydrophila* in oral biofilm treatment on day 20 was significant compared to the other treatments, but it was not significant on days of 40 and 60.

Key word: Oral vaccine, Biofilm, *Aeromonas hydrophila*, Common carp

* **Corresponding Author**: Amir Aramoon, PhD Graduate in Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: aramoon.haser@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Archive of SID.ir