Archive of SID

بررسی اثر ماکروگارد بر کارایی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس (*Streptococcus iniae*) و برخی شاخص‌های خونی و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سجاد پورمظفر[۱*]، مهدی سلطانی[۲]، محمود نفیسی‌بهابادی[۳]، ژاله مهاجری[۴]، مهرزاد محمدی[۵] و خلیل پذیر[۶]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۳

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر تجویز خوراکی بتاگلوکان (ماکروگارد) (۱ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۵ روز) و واکسن ضد استرپتوکوکوزیس بر عوامل رشد و پارامترهای خونی شامل میزان هماتوکریت، هموگلوبین، MCV ، MCH ، MCHC و تعداد کلی گویچه‌های قرمز و سفید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. تیمارها شامل ۴ تیمار شاهد، واکسن، واکسن به همراه ماکروگارد و ماکروگارد بود، که در یک دوره ۴۵ روزه بررسی شدند. واکسیناسیون به روش حمام و در یک نوبت انجام شد. نتایج حاصله نشان داد که وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی در تیمار حاوی ماکروگارد نسبت به تیمار شاهد اثر مثبت و معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). افزایش معنی‌دار تعداد کل گویچه‌های سفید در تیمارهای واکسن و ماکروگارد به همراه واکسن نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در شمارش افتراقی گویچه‌های سفید، تعداد لنفوسیت‌ها در تیمارهای ماکروگارد، واکسن و واکسن به همراه ماکروگارد اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد ($p<۰/۰۵$). نتایج بقا در حمام باکتریایی با عامل حاد *استرپتوکوکوزیس اینیایی* در تیمار شاهد ۴۶/۷۵ درصد، در حالی که در تیمارهای واکسن، واکسن به همراه ماکروگارد و ماکروگارد به ترتیب ۶۸/۱۸، ۸۳/۹۵ و ۵۰/۹۱ درصد بود. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن بتاگلوکان به غذا تأثیر مثبتی بر رشد و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین دارد و می‌تواند کارایی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: رشد، قزل‌آلای رنگین‌کمان، لنفوسیت، ماکروگارد

مقدمه

رشد چشم‌گیر و روزافزون صنعت آبزی‌پروری در افزایش تولید در واحد سطح موجب ایجاد مشکلاتی برای این صنعت شده است که از آن جمله می‌توان به بروز بیماری‌های عفونی و خسارات ناشی از آن‌ها، استفاده مکرر از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی و در نتیجه به خطر افتادن سلامت مصرف‌کنندگان اشاره نمود (Chang et al. 2000). این گونه مشکلات موجب شده تا طی سال‌های اخیر به روش‌های پیشگیری مانند واکسیناسیون و اقدامات قرنطینه‌ای و نیز استفاده از مواد محرک ایمنی برای ارتقای واکنش‌های ایمنی ماهیان و سخت‌پوستان پرورشی برضد بیماری‌های عفونی توجه جدی شود (Chang et al. 2000). در این میان استفاده از برخی از مواد محرک ایمنی در غذای آبزیان پرورشی متداول شده است. می‌توان به ترکیبات حاوی گلوکان‌ها

[۱*] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر E-mail: sajjad5550@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۳] دانشیار گروه شیلات، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر

[۴] استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد عالی شهر بوشهر

[۵] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

[۶] استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده میگو بوشهر

www.SID.ir

Archive of SID

اشاره نمود که شامل پلی‌مرهای از گلوکز هستند که به عنوان ترکیبات ساختاری در غشای سلولی باکتری‌ها، گیاهان و مخمرها مطرح هستند و با تحریک واکنش‌های ایمنی موجب کاهش استرس و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و اوضاع نامساعد محیطی می‌شوند (Vetvicka and Yvin 2004, Whittington et al. 2005). علی‌رغم رشد قابل توجه صنعت آبزی‌پروری در ایران، هنوز استفاده از روش‌های پیشگیری و کنترلی مانند واکسن‌ها و مواد محرک ایمنی عملیاتی نشده است. در حالی که بیماری‌های عفونی همچون استرپتوکوکوزیس هر ساله خسارات فراوانی به صنعت قزل‌آلای وارد می‌سازد (Haghihgi-Karsidani et al. 2010). استرپتوکوکوزیس، بیماری ناشی از گونه‌های مختلف باکتری استرپتوکوک است. این بیماری نخستین بار در قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی از ژاپن گزارش شد که موجب بروز تلفات به میزان ۹۰ درصد گردید. بعد از آن، این بیماری در قزل‌آلای رنگین‌کمان در آفریقای جنوبی، آمریکا، بریتانیا و نروژ هم رخ داد (Aakre et al. 1994). خسارت ناشی از بروز این بیماری در ایران حدود ۴۵ میلیارد تومان در سال برآورد می‌شود (Haghihgi-Karsidani et al. 2010). از آن جایی که برخی بیماری‌ها مانند استرپتوکوکوزیس به درمان آنتی‌بیوتیک‌ها به خوبی پاسخ نمی‌دهند، توجه به اقدامات پیش‌گیری و کنترلی برای کاهش خسارت اقتصادی امری ضروری است (Russo et al. 2006, Vetvicka and Yvin 2004, Whittington et al. 2005). از طرف دیگر بیش‌ترین خسارات مراکز تکثیر و پرورش قزل‌آلا عمدتاً در مرحله‌ی لاروی و بچه ماهی اتفاق می‌افتد که ناشی از عدم تکامل سیستم‌های ایمنی ماهیان در این دوره از رشد است. با توجه به ساخت واکسن ضد استرپتوکوکوزیس در کشور، ضرورت مطالعه و یافتن روش‌هایی جهت ارتقای کارایی آن در جهت پیشگیری از این بیماری در بین ماهیان قزل‌آلا به خوبی احساس می‌شود. در این راستا، هدف از مطالعه بررسی همزمان واکسن استرپتوکوکوزیس و تجویز غذایی بتاگلوکان بر رشد و عوامل خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش کار

تأمین ماهی

در این مطالعه از بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به ظاهر سالم با وزن تقریبی ۰/۸۱±۲۸/۳۷ گرم که از مزارع تکثیر و پرورش استان اصفهان خریداری و در تانک‌های پلی‌اتیلن مخصوص حمل ماهی با تزریق اکسیژن خالص و با توجه به دستورالعمل‌های عنوان شده توسط (نفیسی ۱۳۸۵) به محل اجرای پروژه، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر، انتقال داده شد. بعد از انتقال و انجام عمل هم دمایی در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، برای جلوگیری از وارد آمدن استرس، غذادهی به مدت ۲۴ ساعت قطع شد. ماهیان در آکواریوم‌های ۶۴ لیتری (با ابعاد ۴۰×۴۰ سانتی‌متر طول و عرض و ارتفاع آبگیری ۴۰ سانتی‌متر) نگهداری شدند؛ به طوری که ۱۸۰ قطعه ماهی در ۱۲ آکواریوم و هر آکواریوم ۱۵ قطعه ماهی بعد از زیست‌سنجی اولیه نگهداری شد. چیدمان آکواریوم‌ها به صورت تصادفی انتخاب شده تا تیمارها و تکرارهای مختلف در وضعیت یکسان محیط آزمایشگاهی قرار گیرند.

عوامل کیفی آب

عوامل فیزیکی و شیمیایی آب شامل درجه‌ی حرارت، اکسیژن محلول و pH همه روزه با دستگاه‌های دیجیتال قابل حمل مارک WTW با دقت اندازه‌گیری ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد. اکسیژن محلول بین ۹- ۷ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد. pH آب حدود ۸/۱۵- ۷/۲۵ قرار داشت. دامنه‌ی تغییرات درجه‌ی حرارت آب نیز بین ۴±۱۵ سانتی‌گراد ثبت گردید.

غذادهی

جیره‌ی غذایی به صورت اکسترودر (Extruder) با علامت اختصاری (EX-TG) از شرکت تعاونی ۲۱ بیضا

www.SID.ir

Archive of SID

خریداری شد. متوسط تجزیه‌ی غذایی، پروتئین خام ۴۵ درصد، چربی خام ۱۴ درصد، فیبر خام ۲ درصد، رطوبت ۱۰ درصد و قطر خوراک ۲/۲-۲/۴ میلی‌متر بود و به ماهیان ۱/۵ درصد وزن توده زنده (Biomass) در دو نوبت صبح و بعد از ظهر به مدت ۴۵ روز به ماهیان خورانده شد (Whittington et al. 2005). بتاگلوکان (محرک ایمنی) استفاده شده در این پژوهش از مخمر *ساکارومایسس سروزیه* (*Saccharomyces cerevisia*) با نام تجاری ماکروگارد® (Macrogard) ساخت شرکت (Biotec pharmacon ASA, Troms, Norway) بود، که به روش خوراکی تجویز شد. مواد تشکیل دهنده‌ی ماکرووگارد شامل مخمر ۶۰ درصد بتاگلوکان (β-1,3/1,6-glucan)، ۸ درصد پروتئین، ۱۲ درصد خاکستر و ۹ درصد رطوبت بود. ۱ گرم مخمر به ازای هر کیلوگرم غذا (بر اساس توصیه‌ی شرکت سازنده) با روغن ماهی کاد (۳۲ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم غذا) پوشش‌دار شد و سپس سوسپانسیون مخمر و روغن به غذا اسپری گردید (Couso et al. 2003, Misra et al. 2006, Waché et al. 2006). تیمار شاهد و تیمار واکسن توسط غذای بدون ماروگارد تغذیه شدند. روغن ماهی به عنوان پوشش روی غذا اسپری شد.

واکسیناسیون

واکسیناسیون ماهی‌ها برضد بیماری استرپتوکوکوزیس در یک مرحله انجام شد. واکسن تک ظرفیتی (حاوی سوش *Streptococcus iniae*) غیرفعال (کشته شده) از جهاد دانشگاهی با سری ساخت (۹۰۰۶) تهیه شد، که در هر میلی‌لیتر آن تعداد سلول غیرفعال برابر با 10^9 بود. واکسیناسیون به صورت غوطه‌وری (حمام) استفاده شد؛ به این صورت که ماهیان در ۸ لیتر از آب تیمارها و ۹۰۰ میلی‌لیتر واکسن به مدت ۶۰ ثانیه ماهیان واکسینه شدند و سپس به تانک‌های مربوطه انتقال داده شدند (سلطانی و همکاران ۱۳۸۶).

اندازه‌گیری عوامل خونی

نمونه‌گیری از خون ماهیان بی‌هوش شده (از هر تکرار ۴ عدد) با عصاره‌ی گل میخک بعد از زیست‌سنجی با فروبردن سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری آغشته به ماده ضدانعقاد هپارین در سیاهرگ دمی (Caudal vein) به روش حذفی (پس از بیهوشی با عصاره‌ی گل میخک با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و ۴۵ روز بعد از تجویز واکسن و ماکروگارد انجام شد. شمارش گلبول‌های سفید و گلبول-های قرمز با استفاده از محلول دایسیس اصلاح شده از طریق لام هموسیتومتر انجام شد (Roberts 1989). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید با تهیه گستره‌ی خونی و با استفاده از گیمسا ۵ درصد (ARJ:1013) انجام گرفت. هماتوکریت به روش میکروسانتریفیوژ و با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت هپارینه اندازه‌گیری شد (Firouzbakhsh et al. 2011). میزان هموگلوبین خون نیز بر اساس روش سیانومت هموگلوبین اندازه‌گیری شد، همچنین اندیس‌های گلبولی شامل MCV، MCH و MCHC محاسبه گردید (Campbell and Ellia 2007).

بیماری‌زایی و تعیین درصد بقا

جهت تعیین دوز چالش، قبل از چالش بر روی تعدادی از ماهیان LD_{50} محاسبه شد. غلظت سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۱۰ نانومتر محاسبه گردید. به منظور ارزیابی میزان مقاومت ماهیان و تأثیر ماکروگارد بر کارایی واکسن تیمارها (از هر تکرار ۱۱ عدد) به طور جداگانه به مدت ۵ دقیقه در حمام باکتریایی *استرپتوکوکوس اینیایی* با غلظت 10^8 سلول به ازای هر میلی‌لیتر قرار داده شدند؛ سپس ماهیان به مدت ۱۰ روز نگهداری و تلفات روزانه ثبت شد. به منظور بررسی تأیید علت تلفات از بافت کلیه ماهیان تلف شده روی محیط ژلوز خون نیز کشت باکتریایی داده شد. برای تعیین میزان بازماندگی ماهیان در مواجه با باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس از فرمول زیر محاسبه گردید (Amend 1981):

www.SID.ir

Archive of SID

بازماندگی (درصد) = (تعداد ماهیان باقیمانده / تعداد ماهیان ذخیره شده) ×۱۰۰

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

وزن و شاخص‌های رشد هر ماهی با استفاده از ترازوی دیجیتال AND مدل C0006 با دقت ۰/۰۱ گرم ساخت کشور ژاپن هر هفته مورد اندازه‌گیری گرفت. طول متوسط، وزن متوسط، میزان رشد روزانه، ضریب رشد ویژه (Specific Growth Rate) و ضریب تبدیل غذایی (Feed Conversion Rate) از جمله مهم‌ترین عواملی بودند که بررسی شدند. هم‌چنین میزان تلفات، به صورت روزانه ثبت شد.

تعداد ماهی‌ها / وزن کل ماهی‌ها= وزن متوسط

تعداد روزهای پرورش / افزایش وزن متوسط ماهیها= میزان رشد یا افزایش وزن روزانه

۱۰۰× [تعداد روزهای پرورش / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن نهایی)]= ضریب رشد ویژه

افزایش وزن توده زنده / مقدار غذای مصرفی = ضریب تبدیل غذایی (Misra et al. 2006).

روش آماری مورد استفاده

نرمال بودن پراکنش داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف–اسمیرنوف سنجیده شد. اختلاف موجود بین تیمارها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار تعیین شد و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بازماندگی در طول دوره رویارویی سوش حاد باکتریایی با استفاده از روش Kaplan-Meier محاسبه شد. جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها از تست چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از رشد بچه ماهیان در تیمارهای مختلف در طی یک دوره‌ی ۴۵ روزه در جدول ۱ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج مذکور بیش‌ترین رشد ثانویه در تیمار ماکروگارد و واکسن به همراه ماکروگارد روی داد که به ترتیب برابر با ۰/۳۸±۴۹/۲۴ و ۰/۰۵±۴۸/۰۷ گرم بود که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها به ثبت رسید ($p<0/05$). بیش‌ترین افزایش رشد روزانه نیز در تیمار ماکروگارد ثبت گردید ($p<0/05$). از نظر ضریب رشد ویژه تفاوت معنی‌داری میان تیمارها مشاهده شد، به طوری که بیش‌ترین ضریب رشد ویژه در تیمار ماکروگارد ۰/۰۴±۱/۲۸ و کم‌ترین ضریب رشد ویژه در تیمار واکسن ۰/۰۴±۱/۰۱ مشاهده گردید ($p<0/05$). کاهش معنی‌داری از لحاظ ضریب تبدیل غذایی در تیمار حاوی ماکروگارد نسبت به تیمار شاهد ثبت شد ($p<0/05$).

درصد بقا بعد از مقابله با بیماری

بعد از حمام باکتریایی و نگهداری ماهیان به میزان ۱۰ روز، میزان بقا در تیمار شاهد ۴۶/۷۵ درصد بود، در حالی که در تیمارهای واکسن به همراه ماکروگارد و واکسن به ترتیب ۸۳/۹۵ درصد و ۶۸/۱۸ درصد به ثبت رسید که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت ($p<0/05$). هم‌چنین میزان مرگ و میر در تیمار حاوی ماکروگارد بیش‌تر از تیمار واکسن و واکسن به همراه ماکروگارد بود ولی فاقد اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد بود ($p>0/05$) (نمودار ۱).

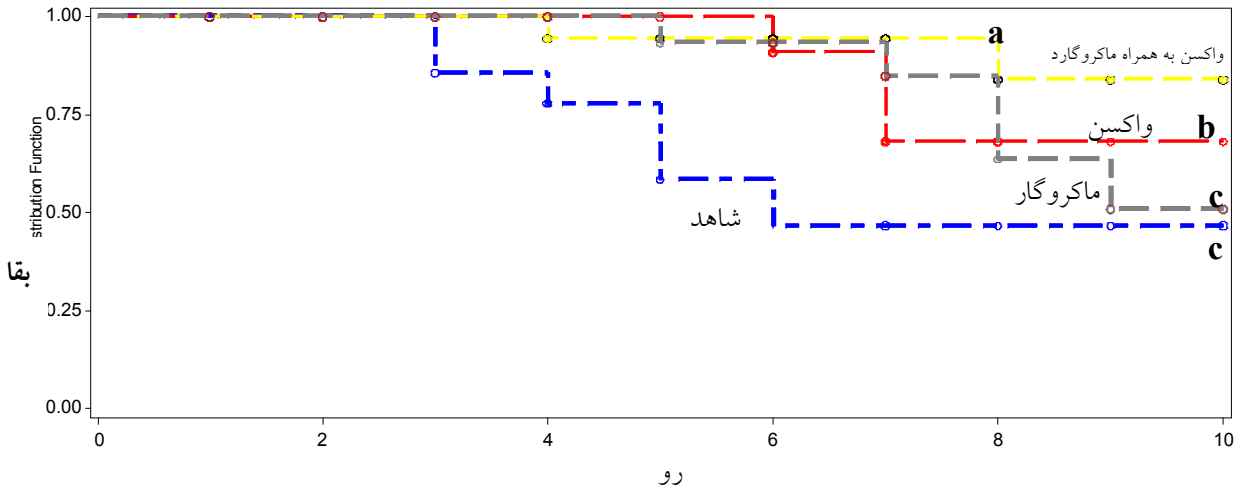
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مقایسه میانگین (± انحراف معیار) برخی از شاخص‌های رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره‌ی پرورش (n=۱۵)

شاخص رشد / تیمار	تیمار شاهد	تیمار واکسن	تیمار واکسن همراه ماکروگارد	تیمار ماکروگارد
وزن اولیه (gr)	۲۸/۵۶±۰/۱۲ ^{a}	۲۸/۷۷±۰/۵۴ ^{a}	۲۸/۵۳±۱/۲۴ ^{a}	۲۷/۶۳±۰/۵۴ ^{a}
وزن نهایی (gr)	۴۶/۵۵±۰/۸۷^{c}	۴۵/۴۳±۰/۶۵^{d}	۴۸/۰۷±۰/۰۵^{b}	۴۹/۲۴±۰/۳۸^{a}
افزایش وزن (gr)	۱۸/۰۰±۰/۷۸^{c}	۱۶/۶۶±۰/۶۶^{c}	۱۹/۵۳±۱/۱۹^{b}	۲۱/۶۱±۰/۳۸^{a}
رشد روزانه (gr)	۰/۴۰±۰/۰۱^{b}	۰/۴۰±۰/۰۱^{b}	۰/۴۳±۰/۰۲^{b}	۰/۴۸±۰/۰۰^{a}
ضریب رشد ویژه	۱/۰۸±۰/۰۳ ^{bc}	۱/۰۱±۰/۰۴ ^{c}	۱/۱۶±۰/۰۹ ^{b}	۱/۲۸±۰/۰۴ ^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۱۳±۰/۰۴^{ab}	۱/۲۱±۰/۰۴^{a}	۱/۰۴±۰/۰۶^{b}	۰/۹۴±۰/۰۱^{c}

وجود حروف غیر همسان در هر ردیف نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).



نمودار۱: منحنی بقاء Kaplan-Meier قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف، تحت تأثیر سوش حاد استرپتوکوکوزیس. وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

شمارش لکوسیتی

نتایج حاصل از شمارش گویچه‌های قرمز و سفید، اندازه‌گیری هماتوکریت، هموگلوبین، متوسط حجم گلبول‌های قرمز، وزن هموگلوبین داخل گویچه، متوسط غلظت هموگلوبین سلولی و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در جدول ۲ نمایش داده شده است. نتایج به دست آمده در تیمارهای حاوی واکسن و ماکروگارد نشان می‌دهد پارامترهای خونی شامل هماتوکریت، هموگلوبین، متوسط حجم گلبول‌های قرمز، وزن هموگلوبین داخل گویچه، متوسط غلظت هموگلوبین سلولی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نداشتند (p>۰/۰۵). گویچه‌های سفید در تیمارها نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). در شمارش افتراقی گویچه‌های سفید، درصد لنفوسیت‌ها در تیمارهای ماکروگارد، واکسن به همراه ماکروگارد و واکسن افزایش و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد (p<۰/۰۵). مقدار جمعیت نوترفیلی در تیمارهای ماکروگارد، واکسن و واکسن به همراه ماکروگارد در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه میانگین(± انحراف معیار) شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره‌ی پرورش (n=۱۵).

	تیمار شاهد	تیمار واکسن	تیمار واکسن همراه ماکروگارد	تیمار ماکروگارد
RBC (k/µl)	۸۴۷±۹۲/۰۴^{b}	۸۶۳±۵۴/۰۲^{b}	۸۸۶±۴۰/۲۸^{ab}	۹۱۶/۶۷± ۲۳/۵۹^{a}
WBC (k/µl)	۱۲/۳±۰/۶۲^{b}	۱۳/۵۳±۰/۲۵^{a}	۱۳/۵۰±۰/۱۵^{a}	۱۲/۷۳±۰/۱۲^{b}
PCV (%)	۳۵/۶۶±۵/ ۲۸ ^{a}	۳۷/۹۷±۳/۲۴ ^{a}	۳۳/۵±۲/۴۱ ^{a}	۳۶±۱/۴۲ ^{a}
Hb (g/dL)	۷/۲۲±۱/۷۶ ^{a}	۹/۰۸±۱/۰۸ ^{a}	۶/۵±۰/۸۱ ^{a}	۷/۴۱±۰/۵۸ ^{a}
MCV (fl)	۳۹۶/۷۵±۲۱/۴۵ ^{a}	۴۱۱/۹۲±۱۰/۳۷^{a}	۳۵۹/۵±۳۷/۵۵ ^{a}	۳۹۴/۳۶±۵/۳۴ ^{a}
MCH (pg)	۷۹/۶۵±۱۱/۶۳ ^{a}	۹۰/۵۸±۶/۰۹ ^{a}	۷۴/۴۴±۵/۹۵ ^{a}	۸۱/۰۸±۴/۲۹ ^{a}
MCHC (%)	۲۰/۰۵±۱/۹۳ ^{a}	۲۱/۰۷±۰/۹۳ ^{a}	۱۹/۳۵±۱/۰۵ ^{a}	۲۰/۵۵±۰/۸۱ ^{a}
Lym (%)	۸۱/۳۳±۴/۰۴^{b}	۹۲/۶۶±۳/۵۱^{a}	۹۱/۶۶±۲/۵۲^{a}	۹۱/۶۶±۴/۵۱^{a}
Neu (%)	۱۶/۶۷±۲/۸۹^{a}	۵/۳۳±۱/۱۵^{b}	۶/۵۳±۲/۵۲^{b}	۷±۴/۵۸^{b}
Mon (%)	۱/۳۳±۰ ^{a}	۱/۶۷±۱/۱۵ ^{a}	۱±۰/۵۸ ^{a}	۱±۰/۷ ^{a}
Eos (%)	۱/۰۰±۰ ^{a}	۰/۶۷±۰/۵۷ ^{a}	۰/۳۳±۰/۵۷ ^{a}	۰/۳۳±۰/۵۷ ^{a}

وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز خوراکی ماکروگارد (۱ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) تأثیر قابل توجهی بر عوامل رشد و تحریک برخی از پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی (جمعیت لکوسیتی به خصوص جمعیت لنفوسیتی) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گذارد. به علاوه، استفاده از این محرک ایمنی همراه واکسن نه تنها موجب ارتقای عوامل رشد ماهی می‌گردد، بلکه موجب افزایش کارایی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس می‌شود. علت افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلا در تیمارهای واکسن و واکسن به همراه ماکروگارد در مقابل *استرپتوکوکوس اینیایی* در این مطالعه ناشی از تأثیر و تحریک سیستم غیراختصاصی ماهیان است (جدول ۲)، زیرا نتایج حاصل از شمارش لکوسیتی بیانگر افزایش معنی‌دار جمعیت لکوسیتی و جمعیت لنفوسیت‌ها در تیمارهای واکسن و واکسن به همراه ماکروگارد بود. برای مثال در مطالعه‌ای توسط Russo و همکاران در سال ۲۰۰۶ روی تأثیر ماکروگارد بر کارایی واکسن ضد *استرپتوکوکوس اینیایی* در کوسه‌ی دم قرمز (*Epalzeorhynchos bicolor*) انجام شد، نشان دادند که مصرف خوراکی ماکروگارد به میزان ۱ گرم به ازای یک کیلوگرم غذا به مدت ۲۴ روز موجب بیش از ۷۰ درصد بقاء در ماهیان دریافت کننده‌ی واکسن به همراه ماکروگارد گردید، که اختلاف معنی داری را با سایر تیمارها نشان داد (Russo et al. 2006). تجویز خوراکی بتاگلوکان با ویتامین C روی تکثیر لنفوسیت‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثر مثبت را نشان داد (Verlhac et al. 1996). هم‌چنین رژیم غذایی حاوی بتاگلوکان در پستانداران و ماهی کپور هندی به فعال‌سازی سیتوکین‌ها همچون لنفوکاین و اینترولوکین کمک می‌کند که موجب افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و تولید آنتی‌بادی‌های ویژه در خون می‌گردد (Mirsa et al. 2006, Young et al. 2001). سیتوکین‌ها پروتئین‌های پیام رسان بیولوژیک هستند که در واکنش‌های ایمنی دخیل می‌باشند و در تولید سلول‌های ایمنی همچون لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها دخیل هستند. در پستانداران، بتاگلوکان‌ها موجب فعال‌سازی انترلوکین ۶ و ۸ و در نتیجه موجب افزایش تیتر آنتی‌بادی می‌گردد

www.SID.ir

Archive of SID

(Kim et al. 2009). سیستم ایمنی اختصاصی با تجویز خوراکی بتاگلوکان‌ها به طور غیرمستقیم موجب تحریک فعالیت‌های لنفوسیتی در ماهی توربت و قزل‌آلای رنگین‌کمان شد (Debaulny et al. 1996, Verlhac et al. 1998b).

با توجه به نتایج به دست آمده، ماکروگارد تأثیر چندانی بر هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH و MCHC نداشت ($p>0/05$) و افزایش تعداد گویچه‌های قرمز در تیمار ماکروگارد مشاهده گردید (جدول ۲) ($p<0/05$). این فرضیه مطرح است که پروبیوتیک‌ها موجب افزایش متابولیسم در ماهی می‌شود، در نتیجه تعداد و ظرفیت حمل اکسیژن در گویچه‌های قرمز افزایش می‌یابد (Irianto and Austin 2002). تغذیه‌ی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) با مخمر موجب افزایش معنی‌داری در تعداد گویچه‌های قرمز گردید ($p<0/05$) (Firouzbakhsh et al. 2011).

در این مطالعه درصد بازماندگی ماهیان پس از آلودگی به بیماری استرپتوکوکوزیس با استفاده از آزمون بقا (Kaplan-Meier) اختلاف معنی‌داری را نشان داد، به طوری که تیمار واکسن به همراه ماکروگارد با داشتن ۸۳/۹۵ درصد بیش‌ترین بازماندگی را داشت (نمودار ۱). Russo و همکاران در سال ۲۰۰۶ با مطالعه روی کوسه‌ی دم قرمز نشان دادند که در تیمار واکسن به همراه بتاگلوکان درصد بقا به ۷۰ درصد می‌رسد. در مواجه با عامل بیماری‌زای *استرپتوکوکوس اینیایی* (Russo et al. 2006). مطالعه‌ی دیگر توسط Couso و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که کم‌ترین میزان مرگ و میر ماهی سیم دریایی در مقابل بیماری پاستورلوز با اضافه کردن یک گرم بتاگلوکان در جیره‌ی غذایی به دست می‌آید. هم‌چنین در سایر مطالعات انجام شده مصرف خوراکی گلوکان‌ها در ماهیان واکسینه شده برضد برخی بیماری‌ها نظیر ویبریوانگولاریوم، *آئروموناس سالمونیسیدا* و استرپتوکوکوزیس منجر به افزایش بقا و مقاومت در برابر بیماری شد (Aakre et al. 1994, Couso et al. 2003, Whittington et al. 2005). اما در برخی از موارد، مصرف گلوکان به تنهایی کمک چندانی به افزایش بقا نداشته است. به طور مثال Wache و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که جیره‌ی غذایی حاوی مخمر *ساکارومایسس سروزیه* تأثیر معنی‌داری بر مرگ و میر بچه‌های نورس ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت (Waché et al. 2006). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر توسط Debaunlny و همکاران در سال ۱۹۹۶، مصرف گلوکان‌ها در گربه ماهی موجب افزایش واکنش‌های ایمنی غیراختصاصی گردید، اما بر میزان بقا ماهیان در برابر آلودگی با *ادواردزیلا تاردا* تأثیری نداشت (Debaulny et al. 1996). از طرفی Whittington و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان داشتند که بتاگلوکان به تنهایی در بهبود پاسخ‌های ایمنی و مقاومت ماهی تیلاپیا در برابر آلودگی با استرپتوکوکوزیس مفید نیست بلکه بهترین مکمل واکسن استرپتوکوکوزیس در افزایش واکنش‌های ایمنی در تیلاپیا در مقابل آلودگی باکتریایی است (Whittington et al. 2005).

در ارتباط با تأثیر بتاگلوکان بر عوامل رشدی نتایج این مطالعه با نتایج سایر پژوهشگران تطابق دارد. Misra و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که تجویز خوراکی بتاگلوکان به میزان ۵۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا به مدت ۵۶ روز اثر مثبتی بر عوامل رشدی، ایمنی و بقای بچه ماهی کپور هندی در برابر *اواردزیلا* تاردا (*Edwardsiella tarda*) و *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) دارد (Mirsa et al. 2006). هم‌چنین افزایش معنی‌دار فاکتورهای رشد با تجویز خوراکی بتاگلوکان در ماهی اسنپر (*Pagrus auratus*) و ماهی هیبرید ماهی باس راه راه (*Morone chrysops* * *M. saxatilis*) گزارش شده است (Cook et al. 2003, Jaramillo and Gatlin 2004). در این مطالعه افزایش معنی‌داری در وزن نهایی در تیمارهای ماکروگارد و واکسن به همراه ماکروگارد مشاهده شد. به نظر می‌رسد، بتاگلوکان‌ها در روده به وسیله‌ی آنزیم بتاگلوکوناز برای

www.SID.ir

Archive of SID

رشد باکتری‌های استفاده کننده از اسیدآمینه تجزیه می‌شوند، که افزایش این دسته از باکتری‌ها منجر به استفاده بیش‌تر از پروتئین‌ها برای رشد می‌شود (Lopez et al. 2003). در تحقیقی دیگر، افزایش رشد میگوی مونودون تغذیه شده با بتاگلوکان به ثبت رسید (Chang et al. 2000). هم‌چنین نتایج سایر مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که رژیم‌های غذایی حاوی مواد محرک ایمنی (نظیر ویتامین C و بتاگلوکان) در پارامترهای رشد ماهی شانک (*Dentex dentex*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) افزایش معنی‌داری نداشته است (Efthimiou 1996, Hardie et al. 1990).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز خوراکی ماکروگارد به میزان ۱ گرم در هر کیلوگرم غذا و واکسیناسیون ماهیان با واکسن ضد بیماری استرپتوکوکوزیس، موجب تحریک سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. افزایش تعداد سلول‌های دفاعی در دوره‌ی پرورشی با افزایش سیستم دفاعی، موجب افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و استرس‌ها می‌شود، که این خود می‌تواند بهبود رشد، کاهش میزان مرگ و میر و افزایش میزان بقا را به دنبال داشته باشد. به هر حال میزان این تأثیرات بستگی به وضعیت پرورشی و نگهداری ماهیان دارد، زیرا عوامل زیادی از جمله کیفیت آب، تغذیه، مدیریت پرورشی و عوامل استرس‌زا در کارایی واکسن و مواد محرک ایمنی اثرات قابل توجهی دارند. بنابراین، توصیه می‌شود تا در مزارعی که با بروز بیماری استرپتوکوکوزیس مواجه هستند، علاوه بر واکسیناسیون به موقع از مواد محرک ایمنی نظیر ماکروگارد نیز برای تقویت ایمنی غیر اختصاصی و کمک به کارایی واکسن استفاده شود. حتی تجویز ماده‌ی محرک بدون استفاده از واکسینایسون نیز از تأثیرات قابل توجهی بر رشد ماهیان برخوردار بوده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ریاست محترم دانشکده‌ی کشاورزی تقدیر و تشکر می‌شود و هم‌چنین از جناب آقای دکتر داوودی برای همکاری صمیمانه ایشان در اجرای این طرح کمال تشکر و قدردانی داریم.

منابع

سلطانی، مهدی؛ علیشاهی، مجتبی؛ خضرائی‌نیا، پروانه و ربانی، محمد و ستاری، امیر (۱۳۸۶). مطالعه برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به برخی آنتی‌ژن‌های استرپتوکوکوس اینیایی، مجله تحقیقات دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۶۲، شماره ۱، صفحات ۹-۱.

نفیسی‌بهابادی، محمود (۱۳۸۵). راهنمای عملی پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، انتشارات دانشگاه هرمزگان، ویرایش اول، صفحات ۱۶۷- ۱۶۱.

Aakre, R.; Wergeland, H.I.; Aasjord, P.M.; and Endresen, C. (1994). Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β-1,3-glucan as adjuvant. Journal Fish Shellfish Immunology, 4: 47-61.

Amend, F. (1981). Potency testing of fish vaccine, Developments in Biological Standardization, 49: 447-457.

Campbell, T.W. and Ellia, C.K. (2007). Avian and exotic animal hematology and cytology. 3rd ed. Blackwell Puplishing, Iowa, pp: 93-112.

www.SID.ir

Archive of SID

Chang, C.; Chen, H.Y.; Su, M.S. and Liao, I.C. (2000). Immunomodulation by dietary beta-1,3-glucan in the brooders of the grass prawn (*Penaeus monodon*). Fish and Shellfish Immunology, 10: 505-514.

Cook, M.T.; Hayball, P.J.; Hutchinson, W.; Nowak, B.F. and Hayball, J.D. (2003). Administration of a commercial immunostimulant preparation, Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. Fish and Shellfish Immunology, 14: 333-345.

Couso, N.; Castro, R.; Magarinos, B.; Obach, A. and Lamas, J. (2003). Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. Aquaculture, 219: 99-109.

Debaulny, M.; Quentel, C.; Fournier, V.; Lamour, F. and Le Gouvello, R. (1996). Effect of long-term oral administrationn of β-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus*). Diseases of Aquatic Organisms, 26: 139-147.

Efthimiou, S. (1996). Dietary intake of β-1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. Journal of Applied Ichthyology, 12: 1-7.

Firouzbakhsh, F.; Noori, F.; Khalesi, M.K. and Jani-Khalili, K. (2011). Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry, 37: 833-842.

Haghighi Karsidani, S.; Soltani, M.; Nikbakht-Brojeni, G.; Ghasemi, M. and Skall, H.F. (2010). Molecular epidemology of zoonotic streptococcosis/ lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. Iranian Journal Microbiology. 2(4): 198-209.

Hardie, L.; Fletcher, T.; Secombes, C. (1990). The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 87: 1-13.

Irianto, A. and Austin, B. (2002). Probiotic in aquaculture. Fish Disease, 25: 633-642.

Jaramillo, Jr.F. and Gatlin D.M. (2004). Comparison of purified and practical diets supplemented with or without β-glucan and selenium on resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. World Aquaculture Society, 35: 245-252.

Kim, Y.S.; Ki, F. and Zhang, Q.Y. (2009). Effect of β-glucan on activity of antioxidant ntioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp. Fish and Shellfish Immunology 27: 336-340.

Lopez, N.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Taboada, G.; Valenzuela, M.; Pascual, C. et al. (2003). Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β-1,3- glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. Aquaculture, 224: 223-243.

Misra, C.K.; Das, B.K.; Mukherjee, S.C. and Pattnaik, P. (2006). Effect of multiple injections of β-glucan on non-specifc immune response and disease resistance in (*Labeo rohita*) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology, 20: 305-319.

Roberts, R.G. (1989). Fish pathology. Second ed. Bailliere Tindall, London, pp: 402.

Russo, R.; Mitchell, H.; Roy, P. and Yanong, R.P.E. (2006). Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture, 256: 105-110.

Verlhac, V.; Gabaudan, J.; Obach, A.; Schuep, W. and Hole, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 143: 123-133.

Verlhac, V.; Obach, A.; Gabaudan, J.; Schuep, W. and Hole, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 8: 409-424.

Vetvicka, V. and Yvin, J.C. (2004). Effects of marine β-1,3 glucan on immune reactions. International Immunopharmacology, 4: 721-730.

Waché, Y.; Auffray, F.; Gatesoupe, F.J.; Zambonino, J.; Gayet, V.; Labbé, L. and Quentel, C. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, (*Onchorhynchus mykiss*), fry. Aquaculture, 258: 470-478.

www.SID.ir

Archive of SID

Whittington, R.; Lim, C. and Klesius, P.H. (2005). Effect of dietary β-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine *in Nile tilapia*, (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 248: 217-225.

Young, S.H.; Ye, J.; Frazer, D.G.; Shi, X. and Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1→3-β-glucan (zymosan) activated macrophages. Biological Chemistry, 276: 20781-20787.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 11, No. 2, Summer, 2015

Study effect of Macrogard on efficacy of *Anti-streptococcus iniae* vaccine and some haematological and growth parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Pourmozaffar, S.[1]; Soltani, M.[2]; Nafisi Bahabadi, M.[3]; Mohajeri, J.[4]; Mohammady, M.[1] and Pazir, Kh.[5]

Received: 06.03.2014 Accepted: 03.01.2015

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of orally administered β-glucan (Macrogard) (1 g/kg food/day for 45 days) and Streptococcus vaccines on growth and hematological parameters (including hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC and total red and white blood cells) of rainbow trout. Treatments of control, vaccine, vaccines to Macrogard and Macrogard were examined in a 45 days period. Vaccination was performed once using the immersion. The results showed that the fish growth and FCR in Macrogard treatment significant effect compared to control ($p<0.05$). Significant increase observed with total numbers of white blood cells in vaccine treatment and Macrogard plus vaccine compared to control. ($p<0.05$). The white cell differential and lymphocyte counts showed significant difference in Macrogard, vaccine and vaccine plus Macrogard treatments in comparison with control ($p<0.05$). The result of survival of fish challenged with *Streptococcus iniae* via bath route was 46.75%, while those for vaccine treatment, Macrogard plus vaccine and Macrogard were 68.18, 83.95 and 50.91%, respectively. The results of this study showed that supplement of Macrogard has positive effect on growth and viability of rainbow trout and can enhance efficacy of anti- *streptococcus iniae* vaccine.

Key words: Growth, Rainbow trout, Lymphocyte, Macrogard

1-MSc Graduated of Fishery Produces Production, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
2- Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
3-Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries Agricultural and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
4-Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Fisheries Agricultural and Natural Resources, Islamic Azad University, Alishahr, Bushehr, Iran
5- Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health, Shrimp Research Center, Bushehr, Iran
Corresponding Author: Pourmozaffar, S., E-mail: sajjad5550@gmail.com

www.SID.ir