Archive of SID

بررسی اثر نانوکیتوزان بر ایمنی‌زایی واکسن خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی

مجتبی علیشاهی[۱*]، مانا سعیدی‌منش[۲]، مهرزاد مصباح[۳] و مهدی زارعی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۹

خلاصه

هرچند واکسن‌های خوراکی مزایای زیادی نسبت به سایر روش‌های واکسیناسیون در آبزیان دارند، ولی به دلیل تخریب آنتی‌ژن‌های واکسنی در روده و جذب کم این آنتی‌ژن‌ها در سیستم لمفوئید روده، این روش توسعه‌ی زیادی نداشته است. کیتوزان اخیراً در سیستم تجویز خوراکی داروها کاربرد یافته است. در این تحقیق نانوکیتوزان از پوسته‌ی میگو استحصال شده و پس از کنترل کیفی، اثر این ماده به عنوان ادجوان خوراکی به همراه واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی ارزیابی گردید. ۳۶۰ قطعه ماهی کپور معمولی (۴۶/۵±۴/۶۷ گرم) به ۴ گروه در سه تکرار تقسیم شدند. تیمار اول و دوم به ترتیب با واکسن خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* و واکسن خوراکی به همراه نانوکیتوزان ایمن شدند، تیمار ۳ خوراک حاوی نانوکیتوزان دریافت نمود و تیمار ۴ فقط خوراک معمولی دریافت کرد. تغذیه با خوراک‌های تجربی (واکسن خوراکی) در روزهای ۱ تا ۵ و ۲۰ تا ۲۵ انجام گرفت. از ماهی‌ها در روزهای ۲۵، ۴۰ و ۵۵ خون‌گیری انجام شده و برخی پاسخ‌های ایمنی شامل عیار آنتی‌بادی، فعالیت لایزوزیم سرم، قدرت باکتری‌کشی سرم، میزان IgM، فعالیت کمپلمان و فعالیت نیتروبلوتترازولیوم (NBT) بین تیمارها مقایسه گردید. بعد از آخرین مرحله‌ی نمونه‌گیری ماهی‌های هر تیمار با باکتری بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا* چالش داده شدند. نتایج نشان داد برخی شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی در بین تیمارها بهبود معنی‌داری داشته است، به طوری که فعالیت لایزوزیم، قدرت باکتری‌کشی سرم، NBT و میزان IgM در تیمار ۲ (واکسن + نانوکیتوزان) در هر سه مرحله نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد ($P<۰/۰۵$). در تیمار یک (واکسن) و تیمار سه (نانوکیتوزان) افزایش نسبی مشاهده شد. فعالیت کمپلمان در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). تیتر آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در مرحله‌ی اول و دوم نمونه‌گیری در تیمارهای ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل داشت ($P<۰/۰۵$). تلفات بعد از چالش تحت تأثیر ایمن‌سازی خوراکی ماهی‌ها با واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* و نانوکیتوزان قرار نگرفت ($P>۰/۰۵$). لذا می‌توان نتیجه گرفت که ایمن‌سازی خوراکی ماهی کپور معمولی با واکسن خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* به همراه نانوکیتوزان هر چند بهبود برخی شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی ماهی کپور معمولی را باعث می‌شود، ولی در میزان محافظت ماهی و عیار آنتی‌بادی سرمی ضد آئرمونواس هیدروفیلا تأثیر معنی‌داری ندارد.

کلمات کلیدی: کپور معمولی، واکسن *آئروموناس هیدروفیلا*، واکسن خوراکی، نانوکیتوزان، پاسخ ایمنی

مقدمه

افزایش تراکم در آبزی‌پروری از اهداف اصلی آبزی‌پروری بوده، ولی همزمان با بالارفتن تراکم ماهی، افزایش شیوع بیماری‌ها گریزناپذیر است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم شیمیایی برای درمان بیماری‌ها، یکی از روش‌های سنتی و معمول مبارزه با بیماری‌هاست (Harikrishnan et al. 2010, Raa et al. 1992)، ولی تمایل شدید به حذف آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به علت هزینه‌ی بالا، ایجاد مقاومت‌های دارویی، مشکلات زیست‌محیطی، پایین

[۱*] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: alishahim@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

www.SID.ir

Archive of SID

آوردن کیفیت گوشت و مشکلات اجرایی تجویز، باعث شده است که استفاده از واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی به عنوان جایگزینی برای درمان آنتی‌بیوتیکی، بیشتر مورد توجه قرار گیرند (Harikrishnan et al. 2012).

استفاده از واکسن‌های خوراکی در آبزیان، به دلیل سهولت تجویز، هزینه و استرس کم تجویز و امکان استفاده در دوره‌های مختلف زندگی ماهی، مزیت بالایی نسبت به سایر روش‌های تجویز دارند، ولی مهم‌ترین مشکل این روش، کارایی کم واکسن‌ها می‌باشد. یکی از دلایل اصلی کارایی پایین این روش، تخریب آنتی‌ژن در لوله‌ی گوارش، قبل از جذب شدن در روده می‌باشد (Azad et al. 2000)، لذا استفاده از موادی که قابلیت محافظت آنتی‌ژن در فضای لوله‌ی گوارش تا قبل از جذب را داشته باشند، به افزایش کارایی واکسن‌های خوراکی کمک می‌کند. موادی که به عنوان ادجوان واکسن‌های خوراکی مصرف می‌شوند، هم در عرضه‌ی آنتی‌ژن و هم در محافظت آنتی‌ژن در محوطه‌ی لوله‌ی گوارش نقش ایفا می‌نمایند (Bowman et al. 2006).

کیتوزان از مشتقات کیتین بوده و با فرآیند د-استیلاسیون کیتین به دست می‌آید (Abdou et al. 2008). چندین پارامتر در تولید و ویژگی‌های کیتوزان مؤثر است که عبارتند از منبع پوسته، تیمار حرارتی، مدت زمان اعمال حرارت، شرایط پیش تیمار و غلظت و میزان اسید و قلیای استفاده شده، که همگی در میزان داستیلاسیون کیتوزان و کیفیت آن تأثیر گذارند.

کیتوزان به علت ویژگی‌های خاص، از جمله تحریک مناسب ایمنی، مقاومت در برابر شرایط معده و نقش محافظتی بالا در صنایع غذایی، توانایی استفاده به عنوان ادجوان واکسن خوارکی در ماهی را داراست (Alishahi et al. 2014, Azad et al. 2000). استخراج کیتین و کیتوزان از پوسته‌ی میگو در کشورهای مختلفی که دارای صنعت میگوپروری می‌باشند، معمول است. زیرا این عمل دارای توجیه اقتصادی بالایی می‌باشد. میزان تولید میگو در سال ۹۲ بیش از ده هزار تن بوده است که حدود ۳۵ درصد آن ضایعات بوده و در صورت ورود به محیط زیست به عنوان آلاینده محسوب می‌گردند، لذا فرآوری این ماده و تبدیل آن به کیتین و کیتوزان نوعی بازیافت مواد آلاینده‌ی محیط زیست محسوب می‌گردد. استفاده از نانوذرات در تحقیقات دهه‌ی اخیر جایگاه ویژه‌ای یافته است. کوچک نمودن اندازه‌ی اجزای مواد بیولوژیک در حد نانو، توان زیستی آن‌ها را به صورت فزاینده‌ای افزایش می‌دهد که این اثر در مورد مواد بیولوژیک پلی مری مثل کیتین و کیتوزان قابل توجه است و در بعضی تحقیقات کاهش اندازه‌ی ذرات در حد نانو افزایش معنی‌دار اثر بیولوژیک آن‌ها را باعث شده است (Bar-Ilan 2009, Sharifzadeh et al. 2012).

استفاده از نانوکیتوزان به عنوان محافظت‌کننده‌ی مواد مغذی مثل ویتامین C در شرایط معده ماهی (Alishahi and Aider 2012)، محافظت و تشدید اثرات آنتی‌باکتریال در مواد غذایی (Li et al. 2012) و محافظت از واکسن‌های DNA و پروتئین‌های نوترکیب در روش تجویز خوراکی (Kumar et al. 2008, Sonia and Sharma 2011) اخیراً رایج شده است. علی‌رغم تحقیقات نسبتاً زیاد روی استفاده از نانوکیتوزان در حیوانات خون‌گرم، در مورد امکان استفاده از نانوکیتوزان به عنوان ادجوان خوراکی در ماهی گزارشی یافت نشد، لذا در این تحقیق تأثیر استفاده از نانوکیتوزان بر برخی پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی، و کارایی واکسن خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی بررسی گردید.

مواد و روش کار

برای استخراج کیتین از پوسته‌های جمع‌آوری شده از میگوی پاسفید غربی پرورش داده شده در منطقه‌ی چوئبده‌ی آبادان استفاده گردید. ابتدا پوسته‌ها با آب تمیز شسته و در آون با دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک و سپس در هاون خرد شدند. سپس به منظور کانی‌زدایی و حذف مواد معدنی از پوسته‌ی میگو از اسیدکلریدریک ۰/۲۵ نرمال در دو مرحله استفاده گردید. سپس با

www.SID.ir

Archive of SID

شستشو pH به حد ۷ رسانده شده و در آون خشک گردید نهایتاً با استفاده از محلول سود یک نرمال پروتئین‌ها حذف و رنگبری کیتین حاصل با اتانول ۹۶ درجه انجام شد (Abdou et al. 2008, Rodde et al. 2008).

جهت داستیله کردن کیتین و تبدیل آن به کیتوزان از محلول غلیظ سود استفاده گردید. بدین منظور هر گرم از کیتین با ۱۵ میلی‌لیتر محلول سود ۵۰ درصد مخلوط گردید و به مدت ۲۰ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس کیتوزان تهیه شده با مقدار کافی آب مقطر شستشو شده تا pH آن به حد خنثی برسد. کیتوزان حاصل در آون خشک و سپس به وسیله‌ی آسیاب پودر گردید (Abdou et al. 2008, Rodde et al. 2008). درصد داستیلاسیون کیتوزان تهیه شده با استفاده از دستگاه آنالیز عناصر (Elemental analyzer) و اندازه‌گیری میزان کربن و نیتروژن موجود در نمونه مشخص گردید. همچنین جهت تعیین وزن مولکولی کیتوزان از ارتباط بین ویسکوزیته‌ی ذاتی محلول کیتوزان و وزن مولکولی استفاده گردید.

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان به روش آیونوتروپیک ژلیشن[1] انجام گردید. بدین منظور ابتدا پودر کیتوزان در بافر استات (pH=5) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شد. ۴ میلی‌لیتر محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات دو درصد به تدریج به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان که روی همزن مغناطیسی در حال هم زدن بود، افزوده شد و عمل هم زدن به مدت دو ساعت ادامه یافت (Du et al. 2009). شکسته شدن پیوندهای بین واحدهای پلی‌مر کیتوزان باعث تبدیل این ماده به واحدهای در حد نانو می‌گردد.

اندازه‌ی نانوذرات تولید شده به وسیله‌ی دستگاه سایز آنالایزر و میزان پتانسیل زتای نانوذرات به وسیله‌ی دستگاه زتاسایزر (Zetasizer, Nano-ZS-90, Malvern Instruments) اندازه‌گیری گردید.

برای افزایش pH محصول، نانوکیتوزان تولید شده دو بار در ۱۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و در هر مرحله اسید جدا شده از نانوکیتوزان از فاز بالایی جداسازی و با PBS استریل جایگزین شد و نهایتاً pH نانوکیتوزان به بالای ۵ رسید (Altun et al. 2010).

جهت تهیه واکسن، ابتدا باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در محیط TSB کشت گردیده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با حداقل دوز غیرفعال کننده‌ی فرمالین (۰/۱ درصد به مدت ۱ ساعت) غیرفعال شده و بعد از شستشوی فرمالین با تراکم 10^{10} در PBS استریل رقیق گردید (Alishahi and Aider 2012).

برای تیمار واکسن به همراه نانوکیتوزان، ابتدا واکسن تهیه شده به میزان 10^{10} سلول در میلی‌لیتر در نانوکیتوزان آماده شد. برای تیمار واکسن، از واکسن با همان غلظت در PBS و در تیمار نانوکیتوزان، از نانوکیتوزان فاقد واکسن استفاده گردید. واکسن با نانوکیتوزان تهیه شده ترکیب شده و بعد از ۱۵ دقیقه ورتکس و سپس در ۱۰ هزار دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید (Gonzalez-Ferreiro et al. 2002). برای تهیه‌ی خوراک‌های تجربی تحقیق، ۵۰ میلی‌لیتر از افزودنی‌های خوراکی تهیه شده در بالا، روی یک کیلوگرم خوراک به صورت همگن اسپری گردید. نهایتاً میزان باکتری وارد شده به خوراک 5×10^{8} باکتری در هر گرم خوراک و میزان نانوکیتوزان ۵ درصد خوراک بود. در تیمار نانوکیتوزان، واکسن اضافه نگردید و در تیمار کنترل نیز فقط PBS با همان روش سایر تیمارها به خوراک اضافه گردید. سپس، غذاها به مدت یک شب در محیط آزمایشگاه باقی ماندند تا به خوبی مواد اسپری شده جذب غذاها شوند. سپس، هر چهار گروه غذا در ظروف جداگانه به داخل یخچال چهار درجه‌ی سانتی‌گراد تا هنگام مصرف منتقل گردیدند.

1- Ionotropic gelation

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی کپور معمولی سالم با وزن ۱۳±۵۰ گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی مجتمع آزادگان اهواز تهیه و به دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. ماهی‌ها به مدت یک هفته به منظور سازش‌یابی با شرایط در مخازن ۳۰۰ لیتری با خوراک معمولی تغذیه گردیدند. ماهی‌ها به ۴ تیمار مساوی (هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار ۳۰ قطعه ماهی)، به صورت زیر تقسیم شدند: تیمار ۱: ماهیان ایمن شده با واکسن خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا*، تیمار ۲: ماهیان ایمن شده با واکسن خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* + نانو کیتوزان، تیمار ۳: ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی نانوکیتوزان فاقد واکسن و تیمار ۴: ماهیان تغذیه شده با خوراک فاقد نانوکیتوزان و واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* (تیمار شاهد). ماهی‌ها دو دوره‌ی ۵ روزه، به فاصله‌ی ۲ هفته (روز صفر تا ۵ و روز ۲۰ تا ۲۵) با خوراک‌های تجربی ساخته شده تغذیه شدند. تغذیه دوبار در روز و به میزان ۳ درصد وزن زنده بدن انجام گرفت.

خون‌گیری پس از بیهوش نمودن ماهی توسط ماده‌ی بیهوشی MS222 با دوز ۳۰ میلی‌گرم در لیتر به وسیله‌ی سرنگ انسولین آغشته به ماده‌ی ضد انعقاد هپارین از ورید ساقه‌ی دمی انجام شد. سپس سرم آن با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی گردید. سرم‌ها در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش توصیه شده توسط Ellis در سال ۱۹۹۰و Obach و همکاران در سال ۱۹۹۳ با اندکی تغییرات استفاده گردید. در این روش از قدرت لایزوزیم در لیز باکتری گرام مثبت *میکروکوکوس لیزودایکتیکوس* (سیگما) استفاده می‌گردد.

برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران در سال ۱۹۹۰ با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و به غلظت 10^5 باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH=۷/۵)، حاوی ۰/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و یون منیزیم تهیه گردید. نمونه‌های سرمی به نسبت (بافر : سرم) ۱:۳ با بافر فوق رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی به نسبت ۱:۱ با سرم رقیق شده ترکیب شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه گردیدند. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج به صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش گردید.

جهت بررسی فعالیت نیتروبلو تترازولیوم NBT ، ۱۰ میکرولیتر از ماده نیتروبلو تترازولیوم (مرک) ۰/۲ درصد به لوله‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر خون تازه اضافه شد و بعد از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵۰ میکرولیتر از محلول فوق داخل لوله‌های شیشه‌ای حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول دی‌متیل فرمامید (سیگما) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون، لوله در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس، میزان جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Perkin-Elmer, Lamda 12 ، ساخت آلمان) ثبت گردید (Anderson et al. 1997, Sahoo et al. 2005).

برای اندازه‌گیری گلوبولین سرم، ابتدا میزان پروتئین کل سرم با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی اندازه-گیری گردید. سپس ۵۰µL محلول سولفات آمونیوم اشباع به صورت قطره قطره به ۵۰µL سرم اضافه شد. سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس ۲۰µL از این نمونه با ۸۰µL بافر بیکربنات-کربنات (pH=۹/۳) مخلوط شد و میزان پروتئین با کیت تخمین پروتئین استاندارد تعیین گردید. میزان گلوبولین سرم با کم کردن میزان پروتئین به دست آمده ثانویه از پروتئین کل سرم محاسبه گردید (Swain 2007).

www.SID.ir

Archive of SID

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز بهره‌گیری شد (Brata et al. 1993). ابتدا آگارز ۱/۵ درصد در بافر فسفات (pH=۷/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلریدکلسیم) تهیه شد. در دمای ۵۵°c–۵۰ به میزان ۱/۵ درصد از گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات (با تراکم ۱×۱۰^{۸} سلول در هر میلی‌لیتر) به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت توزیع گردید. پلیت‌ها به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله‌ی ۲ سانتی‌متر از هم در پلیت‌ها ایجاد شد و به هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه اضافه شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و قطر هاله لیز گلبولی اندازه‌گیری شد.

تعیین عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در سرم‌های اخذ شده از نمونه‌ها بر اساس روش MAT انجام گرفت (Soltani et al. 2007). ابتدا سرم‌ها در میکروپلیت‌های ته گرد بر مبنای دو با PBS (pH=۷/۲) استریل رقیق گردیدند. به این منظور به گوده‌ی اول ۲۰۰ میکرولیتر سرم اضافه شد. به بقیه‌ی گوده‌ها (تا گوده ۸) ۱۰۰ میکرولیتر PBS استریل اضافه شد، سپس از گوده‌ی اول ۱۰۰ میکرولیتر سرم به گوده‌ی دوم اضافه و بعد از میکس کردن، ۱۰۰ میکرولیتر به گوده‌ی بعدی منتقل و تا انتها این رقیق‌سازی ادامه یافت. سپس۱۰۰ میکرولیتر باکتری *آئروموناس هیدروفیلای* غیرفعال شده با فرمالین با غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر به هر گوده اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه گردیده و تیتر آنتی‌بادی بر اساس آخرین غلظت ایجاد کننده‌ی آگلوتیناسیون باکتریایی، گزارش گردید. از سرم ماهی فوق ایمن به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید، نتایج به صورت لگاریتم بر مبنای دو عیار گزارش شد.

بعد از پایان دوره، تعداد ۱۰ قطعه ماهی در هر تکرار انتخاب و برای چالش آماده شدند. قبلاً دوز کشنده باکتری *آئروموناس هیدروفیلای* به کار رفته در تحقیق در ماهی کپور معمولی اندازه‌گیری شده بود. در هر تیمار باکتری زنده *آئروموناس هیدروفیلا* به طریق داخل صفاقی، به میزان دو برابر LD50 تزریق گردیدند. تعداد تلفات روزانه به مدت ده روز ثبت شد (و با کشت از کلیه‌ی قدامی باکتری مجدداً جداسازی گردید) و در انتهای دوره تلفات تجمعی در هر تیمار مشخص و نمودار تلفات تجمعی رسم گردید (Alishahi and Abdy 2013).

برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون استاتیستیک تست[1] برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از ANOVA یک طرفه[2] برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی در تیمارها استفاده گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی دانکن[3] در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

مشخصات کیتوزان و نانوکیتوزان تولیدی در تحقیق

وزن مولکولی کیتوزان تهیه شده ۸۵۰ کیلودالتون و درصد داستیلاسیون آن ۸۳ درصد بود. اندازه‌ی نانوذرات تهیه شده بر اساس ارزیابی با دستگاه زتا آنالایزر به طور متوسط ۹۸/۶ نانومتر و میزان پتانسیل زتا آن‌ها ۴۹/۵+ میلی ولت بود. نانوکیتوزان تولیدی ژله‌ای شکل و نیمه شفاف با pH=۴/۶ ، بعد از سانتریفوژ و جایگزینی بافر pH=۵/۲ بود.

بر اساس نظر Muller و همکاران در سال ۲۰۰۱، حداقل پتانسیل زتا جهت پایداری یک نانوسوسپانسیون ۳۰± میلی ولت می‌باشد. بنابراین سوسپانسیون نانوذرات کیتوزان تهیه شده در این تحقیق یک سوسپانسیون پایدار بوده است.

1- Leven statistic test
2- One way ANOVA
3- Duncan

www.SID.ir

Archive of SID

شاخص‌های ایمنی

نتایج مربوط به مقایسه شاخص‌های ایمنی بین تیمارهای تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: مقایسه‌ی شاخص‌های ایمنی (فعالیت لایزوزیم سرم، توان ضد باکتریایی، فعالیت NBT، میزان IgM و فعالیت کمپلمان) بین تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری (نتایج بر اساس میانگین ± خطای معیار بیان شده است)

	تیمارها	لایزوزیم (واحد در میلی‌لیتر در دقیقه)	قدرت ضدباکتریایی (تعداد باکتری)	NBT (جذب نوری)	IgM (گرم در دسی‌لیتر)	کمپلمان (واحد در میلی‌لیتر)
مرحله اول	نانو + واکسن	۱۳۲/۵±۱۲^{b}	۶۹/۷±۶/۲۷ ^{b}	۰/۴۷±۰/۰۳۶ ^{b}	۲/۱۵±۰/۲ ^{b}	۵/۳۲±۰/۵۲ ^{a}
	نانو	۱۲۰/۳±۱۳/۲^{a}	۸۶/۹±۸/۸۳ ^{a}	۰/۳۷±۰/۰۶۸ ^{a}	۱/۷۶±۰/۱۷ ^{a}	۵/۲۲±۰/۵۴ ^{a}
	واکسن	۱۲۵/۷±۱۱/۳۶^{a}	۸۴/۵±۶/۶۴ ^{a}	۰/۴۳±۰/۰۶۱^{ab}	۱/۹۴±۰/۱۸^{ab}	۵/۲±۰/۴۳ ^{a}
	شاهد	۱۱۵/۶± ۹ ^{a}	۹۲/۷±۸/۶۷ ^{a}	۰/۳۵±۰/۰۳۸ ^{a}	۱/۵±۰/۱۴ ^{a}	۵/۲۳±۰/۵۷ ^{a}
مرحله دوم	نانو + واکسن	۱۵۵/۵±۱۵/۶ ^{b}	۶۲/۷±۵/۹ ^{b}	۰/۵۳±۰/۰۴۸ ^{b}	۲/۴۵±۰/۲۳ ^{a}	۵/۴۳±۰/۷۵ ^{a}
	نانو	۱۲۷/۳±۹/۴^{ab}	۷۹/۵±۱۱/۸۳ ^{a}	۰/۳۶±۰/۰۴۱ ^{a}	۱/۶۵±۰/۱۷ ^{a}	۴/۹±۰/۶۵ ^{a}
	واکسن	۱۳۰/۷±۱۵/۳۶^{ab}	۸۵/۵±۱۲/۳ ^{ab}	۰/۴۱±۰/۰۳۹ ^{a}	۱/۹۸±۰/۲۴ ^{b}	۵/۲±۰/۴۳ ^{a}
	شاهد	۱۱۲/۸± ۱۳ ^{a}	۹۵/۷±۱۰/۴ ^{a}	۰/۳۸±۰/۰۳۶ ^{a}	۱/۵۵±۰/۱۵ ^{a}	۴/۶±۰/۶۸ ^{a}
مرحله سوم	نانو + واکسن	۱۵۱/۶±۱۷/۸^{b}	۶۱/۷±۶/۲ ^{b}	۰/۴۸±۰/۰۵۴ ^{b}	۱/۹±۰/۲۹ ^{b}	۶/۱±۰/۷۳ ^{a}
	نانو	۱۱۵/۳±۱۵/۶^{a}	۷۷/۶±۹/۸۳ ^{ab}	۰/۳۹±۰/۰۴۹ ^{a}	۱/۷۱±۰/۱۴ ^{a}	۵/۱۵±۰/۶ ^{a}
	واکسن	۱۳۲/۴±۲۱/۱^{ab}	۸۱/۵±۱۰/۳ ^{a}	۰/۴۱±۰/۰۵۴ ^{a}	۱/۷۹±۰/۵۴^{ab}	۵/۲±۰/۵۶ ^{a}
	شاهد	۱۱۷/۸± ۱۲/۳ ^{a}	۹۰/۸±۱۲/۴ ^{a}	۰/۳۶±۰/۰۲۶ ^{a}	۱/۶±۰/۱۸ ^{a}	۴/۹±۰/۶۳ ^{a}

حروف کوچک لاتین غیر همنام نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.

میزان فعالیت لایزوزیم سرم در هر سه مرحله‌ی نمونه‌گیری در تیمار تغذیه شده با نانو + واکسن افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل داشت (P<۰/۰۵). البته در تیمارهای واکسن و نانو به تنهایی نیز افزایش نسبی فعالیت لایزوزیم مشاهده گردید.

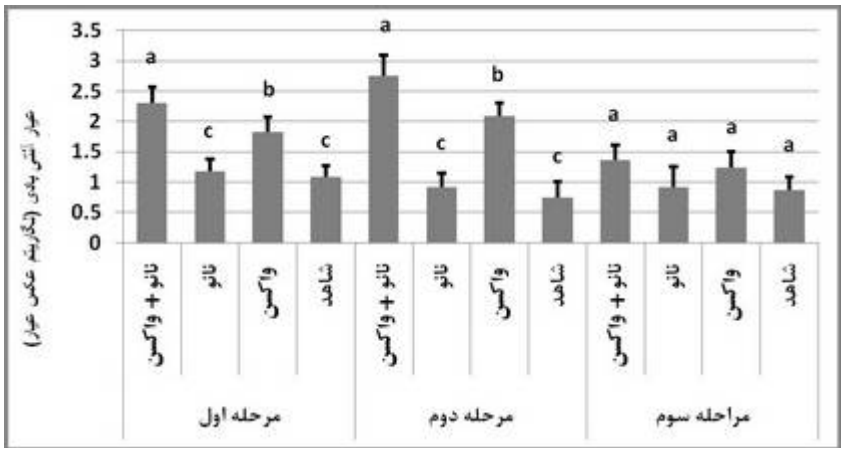
قدرت ضد باکتریایی سرم در هر سه مرحله‌ی نمونه‌گیری در تیمار تغذیه شده با نانو + واکسن افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در تیمار واکسن در مرحله‌ی دوم و در تیمار نانو در مرحله‌ی سوم افزایش نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۰۶۱).

میزان فعالیت NBT فقط در تیمار تغذیه شده با نانو + واکسن در هر سه مرحله‌ی نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).

فعالیت کمپلمان سرم تحت تأثیر ایمن‌سازی به روش خوراکی قرار نگرفت.

www.SID.ir

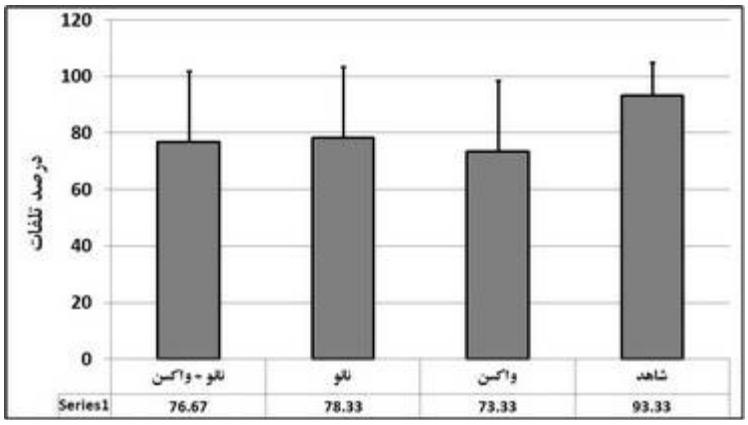
Archive of SID



نمودار ۱: مقایسه‌ی عیار آنتی‌بادی ضد آئروموناس هیدروفیلا بین تیمارهای تحقیق در سه مرحله‌ی نمونه‌گیری (نتایج بر اساس میانگین ± خطای معیار بیان شده است)

تجویز خوراکی واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* (با یا بدون نانوکیتوزان) در دو مرحله‌ی اول نمونه‌گیری افزایش معنی‌دار عیار آنتی‌بادی ضد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* را باعث گردید (P<۰/۰۵). در تیمار واکسن نیز افزایش معنی‌دار عیار آنتی‌بادی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). در مرحله‌ی دوم نمونه‌گیری نیز نتایج مشابه مرحله‌ی اول بود، ولی در مرحله‌ی سوم تغییر معنی‌داری در تیتر آنتی‌بادی مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

تلفات پس از چالش



نمودار ۴-۱ مقایسه‌ی درصد تلفات متعاقب چالش با باکتری زنده‌ی *آئروموناس هیدروفیلای* زنده بین تیمارهای تحقیق (نتایج بر اساس میانگین ± خطای معیار بیان شده است)

بحث

تفاوت معنی‌داری بین تلفات پس از چالش با باکتری زنده‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* بین تیمارهای تحقیق مشاهده نگردید (P>۰/۰۵)، هرچند بیشترین تلفات در تیمار شاهد مشاهده شد و تلفات در سایر تیمارها کمتر از تیمار شاهد بود.

در بین روش‌های تجویز واکسن در آبزیان، روش خوراکی مزیت‌های متعددی، از جمله استرس حداقل، سهولت تجویز و هزینه‌ی پایین تجویز دارد. یکی از مشکلات واکسن‌های خوراکی، تجزیه‌ی آنتی‌ژن در لوله‌ی گوارش، قبل از جذب در روده می‌باشد. برای حل این

www.SID.ir

Archive of SID

مشکل از مواد محافظت‌کننده‌ی مختلف استفاده می‌شود. کیتوزان یکی از این مواد محافظ می‌باشد که علاوه بر اثرات محافظت‌کنندگی، گزارشاتی از تحریک ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی در جانوران مختلف نیز از آن گزارش گردیده است (Alishahi et al. 2014, Harikrishnan et al. 2012). گزارش‌هایی از افزایش فعالیت بیولوژیک کیتوزان بعد از تبدیل آن به اندازه‌ی نانو ارائه شده است (Bowman and Leong 2006, Jain et al. 2006). در تحقیق جاری اثر تحریک پاسخ ایمنی نانوکیتوزان به تنهایی و همراه با واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی مشاهده گردید. هر چند نانوکیتوزان به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر این شاخص‌های ایمنی نداشت.

در بین پاسخ‌های ایمنی میزان فعالیت لایزوزیم سرم، قدرت باکتری کشی سرم، میزان IgM و فعالیت NBT در هر سه مرحله‌ی نمونه‌گیری در تیمار ایمن شده با واکسن آئروموناس به همراه نانوکیتوزان افزایش معنی‌داری داشت. افزایش فعالیت لایزوزیم و قدرت باکتری کشی سرم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی طبیعی (Alishahi and Abdy 2013)، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است (Swain et al. 2007, Alvarez Pellitero et al. 2006). در تحقیقات مشابه نیز عدم تأثیر کیتوزان به تنهایی بر شاخص‌های ایمنی ماهی گزارش گردیده است، به طوری که Alishahi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ماهی کپور معمولی و Lin و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ماهی کپور زینتی کوی، تجویز کیتوزان تولید شده از پوسته‌ی میگو را فاقد تأثیر بر میزان فعالیت لایزوزیم و باکتری کشی سرم دانستند. همچنین Cha و همکاران در سال ۲۰۰۸ عدم تأثیر کپسوله کردن خوراک با کیتوزان را بر فعالیت لایزوزیم و قدرت باکتری کشی سرم گزارش نمودند. لذا می‌توان ادعا نمود که همراه نمودن نانوکیتوزان با واکسن خوراکی *آئروموناس هیدروفیلا* باعث کارایی مناسب پاسخ ایمنی ماهی شده است به طوری که فعالیت ضد باکتریایی و فعالیت لایزوزیم سرم و فعالیت NBT در تیمار ایمن شده با واکسن همراه نانوکیتوزان افزایش یافته، در حالی که در تیمار نانوکیتوزان و تیمار واکسینه شده (بدون کیتوزان) افزایش معنی‌داری مشاهده نگردید. افزایش فعالیت لایزوزیم و قدرت ضد باکتریایی سرم به دنبال تحریک ایمنی ماهی در تحقیقات مختلف گزارش شده است (Ellis 1990). در مورد استفاده از نانوکیتوزان در واکسن‌های خوراکی آبزیان گزارش‌هایی وجود دارد (Bowman and Leong 2006, Chaudhury and Das 2011) ولی اکثراً این محافظت همراه تحریک ایمنی غیراختصاصی نبوده است. به نظر می‌رسد نانوکیتوزان با اثر سینرژیستی اثر تحریک ایمنی واکسن خوراکی را به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داده است. در توجیه این نتایج می‌توان گفت اولاً همان طور که در تیمار خوراکی نانوکیتوزان نیز قابل مشاهده است، خود نانوکیتوزان اثرات نسبی تحریک ایمنی دارد و ثانیاً احتمالاً نانوکیتوزان توانسته باعث کپسوله نمودن و محافظت واکسن شده و جذب آنتی‌ژن در روده و اثرات تحریک ایمنی آن را افزایش دهد (Jain et al. 2006). البته فقط افزایش شاخص‌های اندازه‌گیری شده را نمی‌توان به کل توان ایمنی ماهی نسبت داد، زیرا گزارشاتی از افزایش مقاومت ماهی در برابر عفونت‌های باکتریایی به دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی علی‌رغم عدم تأثیر بر قدرت ضد باکتریایی، پروتئین‌های سرم و فعالیت لایزوزیم سرم نیز وجود دارد، به طوری که Kajita و همکاران در سال ۱۹۹۰ و Divyagnaneswari و همکاران در سال ۲۰۰۷ به ترتیب در ماهی تیلاپیا و قزل‌آلا، عدم تأثیر محرک‌های ایمنی بر شاخص‌های فوق را گزارش نمودند.

فعالیت سیستم کمپلمان یکی از شاخص‌های مهم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی می‌باشد. گزارش‌هایی از تأثیر محرک‌های ایمنی بر افزایش میزان فعالیت کمپلمان سرم وجود دارد (Cheng et al. 2007)، هر چند برخی گزارش‌ها نیز حاکی از عدم تأثیر محرک‌های ایمنی در میزان فعالیت کمپلمان می‌باشد (Alishahi and Abdy

www.SID.ir

Archive of SID

2013) عدم تأثیر ایمن‌سازی خوراکی به همراه نانوکیتوزان بر فعالیت کمپلمان سرم را می‌توان به عدم تأثیر ایمن‌سازی خوراکی بر میزان تولید اجزای کمپلمان نسبت داد، البته پروتئین‌های کمپلمان بسیار حساس بوده و تخریب آن‌ها بلافاصله بعد از خون‌گیری و تهیه‌ی سرم آغاز می‌شود و در نگهداری سرم در فریزر نیز دمای $-20^{\circ}c$ فقط سرعت تخریب اجزای کمپلمان را کم می‌نماید. از این رو احتمال کاهش میزان فعالیت کمپلمان در زمان نگهداری نمونه‌ها در فریزر وجود دارد.

آزمایش احیای NBT یک آزمایش سریع برای تشخیص توانایی سلول‌های بیگانه خوار خون ماهی در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در روند انفجار تنفسی می‌باشد. لذا افزایش فعالیت NBT یکی از شاخص‌های عمده‌ی ایمنی غیر اختصاصی بوده که تحت تأثیر واکسیناسیون خوراکی با واکسن آئروموناس و نانوکیتوزان قرار گرفته است. Geng و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز تجویز کیتوزان خوراکی را باعث افزایش فعالیت NBT در ماهی *Rachycentron canadum* دانستند. Lin و همکاران در سال ۲۰۱۲ و همچنین Gopalakannan و Arul در سال ۲۰۰۶ نیز افزایش میزان انفجار تنفسی را به دنبال تجویز کیتوزان خوراکی گزارش نمودند. افزایش قدرت انفجار تنفسی در لکوسیت‌ها تحت تأثیر سایتوکین‌های سیستم ایمنی که میانجی‌های ایمنی هستند، ایجاد می‌شود. نانوکیتوزان موجب افزایش توان پاسخ ایمنی از طریق سایتوکین‌ها شده و ایمنی غیراختصاصی، بیگانه خواری و حذف جرم خارجی را به دنبال دارد.

یکی از ویژگی‌های اصلی واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی، افزایش بقای ماهی‌ها پس از چالش با عوامل بیماری‌زا می‌باشد. بر اساس نتایج این تحقیق ایمن‌سازی ماهی کپور معمولی به روش خوراکی با واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* به همراه نانوکیتوزان، و بدون نانوکیتوزان و نیز تجویز نانوکیتوزان به تنهایی تأثیر معنی‌داری در تلفات بعد از چالش با باکتری زنده‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* نداشت ($P>0/05$). هر چند کاهش تلفات در تیمارهای واکسینه نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید. نتایج تحقیقات روی واکسن‌های خوراکی در آبزیان نتایج متفاوتی دربرداشته است، به طوری که Altun و همکاران در سال ۲۰۱۰ از واکسن کشته خوراکی لاکتوکوکوس به همراه دو ادجوان آلژینات سدیم و پلی لاکتید گلکولید در قزل آلای رنگین کمان استفاده نمودند و افزایش بازماندگی را بعد از چالش گزارش نمودند. همچنین Romalde و همکاران در سال ۲۰۰۴ در ماهی قزل آلا با استفاده از میکروذرات آلژینات به همراه باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به صورت واکسن خوراکی کارایی تا حد ۷۸ درصد را گزارش نمودند. بر خلاف یافته‌های فوق، Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Romalde و همکاران در سال ۲۰۰۴ در ماهی قزل آلا، عدم محافظت واکسن خوراکی استرپتوکوکوس را گزارش نمودند. یکی از دلایل اصلی عدم تأثیر واکسن‌های خوراکی، تخریب آنتی‌ژن‌های واکسنی در دستگاه گوارش ماهی ذکر شده است. لذا استفاده از ترکیبات محافظ همراه واکسن می‌تواند راه حل مناسبی به نظر برسد (Jain et al. 2006). نانوکیتوزان به عنوان محافظ واکسن و دارو در دستگاه گوارش در تحقیقات متعددی بررسی شده است. Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۸ از نانوکیتوزان به عنوان حامل و محافظ واکسن DNA ویبریو به صورت خوراکی در ماهی باس دریایی استفاده نمودند و محافظت نسبتاً مناسبی را گزارش کردند. Chaudhury و Das در سال ۲۰۱۱ و Bowman و Leong در سال ۲۰۰۶ اثر مثبت نانوذرات کیتوزان در محافظت واکسن و داروها هنگام عبور از دستگاه گوارش به ویژه محیط معده را گزارش نمودند. Maghsoud و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ماهی کپور معمولی و Harikrishnan و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ماهی *Epinephelus bruneus* بهبود بقاء در پی عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* و *ویبریو آلجینولیتیکوس* به دنبال تجویز خوراکی کیتوزان را گزارش نمودند. محققینی که افزایش کارایی واکسن همراه شده با کیتوزان یا نانوکیتوزان را ناشی از نقش نانوذرات کیتوزان در تحویل

www.SID.ir

Archive of SID

دارو در دستگاه گوارش موجودات مختلف دانستند، معتقدند که شارژ مثبتی که از کیتوزان تحت شرایط فیزیولوژیکی ایجاد می‌شود مسئول چسبندگی زیستی بیش‌تر و قوی‌تر واکسن تجویز شده به روش خوراکی می‌باشد. البته این ویژگی فقط در مورد لوله‌ی گوارش نیست و تجویز آنتی‌ژن‌ها از طریق مخاط بینی نیز تحت تأثیر مثبت نانوکیتوزان قرار می‌گیرد (Jain et al. 2006). از آنجا که نانوکیتوزان تولید شده به روش آیونوتروپیک ژلیشن در pH اسیدی پایدار بوده و در شرایط قلیایی ساختار خود را از دست می‌دهد، احتمالاً ماهیانی که دارای معده هستند (مثل آزاد ماهیان از جمله قزل‌آلا) به علت اسیدی بودن شرایط معده، تجویز واکسن خوراکی حاوی نانوکیتوزان کارایی بهتری نشان خواهد داد. زیرا، در شرایط اسیدی نانوکیتوزان ثبات داشته و آنتی‌ژن داخل خود را به خوبی در برابر اسید معده محافظت می‌نماید و وقتی واکسن همراه نانوکیتوزان وارد روده شد، در شرایط قلیایی روده ساختار نانوکیتوزان به هم ریخته و آنتی‌ژن آزاد می‌شود. در کپور ماهیان فقدان معده و شرایط قلیایی ابتدای روده (حباب روده‌ای) چنین شرایطی را ایجاد نمی‌کند، لذا احتمال دارد عدم محافظت مناسب واکسن در تحقیق حاضر ناشی از این امر باشد.

نتایج متفاوت به دنبال استفاده از نانوکیتوزان در حیوانات مختلف تحت تأثیر اختلاف گونه‌ای، اندازه‌ی ذرات نانوکیتوزان، میزان و مدت استفاده از آن و همچنین شرایط محیطی متفاوت انجام تحقیق می‌باشد. عدم محافظت مناسب واکسن حاوی نانوکیتوزان در تحقیق فعلی می‌تواند به دلیل شرایط ویژه‌ی دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی (فقدان معده) و نیز مدت تجویز و میزان تجویز نانوکیتوزان باشد.

عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در تمام مراحل نمونه‌گیری در تیمار ایمن شده با واکسن و واکسن+ نانوکیتوزان افزایش نشان داد، که این افزایش در مرحله‌ی اول و دوم نمونه‌گیری از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$). تأثیر ایمن‌سازی ماهی به روش خوراکی با عوامل بیماریزای باکتریایی در عیار آنتی‌بادی در تحقیقات مختلف گزارش شده است. O'Donnell و همکاران در سال ۱۹۹۶ برای اولین بار توانستند تیتر آنتی‌بادی ضدآنتی‌ژن پروتئینی را بعد از تجویز خوراکی آنتی‌ژن به همراه نوعی پلی‌مر بیولوژیک (D,L-lactide-co-glycolide) در ماهی آزاد اطلس را گزارش نمایند. Harikrishnan و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز کیتین و کیتوزان خوراکی را باعث افزایش عیار آنتی‌بادی بعد از تزریق باکتری *Vibrio alginolyticus* در ماهی *Epinephelus bruneus* دانستند. در تحقیق فعلی علی‌رغم افزایش تیتر آنتی‌بادی در تیمار واکسن و واکسن+ نانوکیتوزان، ارتباطی بین محافظت واکسن و تیتر آنتی‌بادی مشاهده نگردید. در تحقیقی مشابه Shelby و همکاران در سال ۲۰۰۴ افزایش تیتر آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس اینیایی* را در ماهی قزل‌آلا گزارش نمودند در صورتی که این تیتر ارتباطی با محافظت ایجاد شده در ماهی‌ها نداشت. همچنین Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز عدم ارتباط بین عیار آنتی‌بادی سرمی ماهی بعد از واکسیناسیون و محافظت ایجاد شده را گزارش نمودند. اختلاف در این نتایج کاربرد کیتوزان و نانوکیتوزان در ماهی می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع ماهی و استفاده از کیتوزان با درجه‌ی داستیلاسیون متفاوت و اندازه‌ی نانوذرات کیتوزان مورد استفاده و دوره‌ی تجویز باشد.

در مطالعه‌ی حاضر علی‌رغم تأثیر نانوکیتوزان بر بهبود برخی شاخص‌های ایمنی و عیار آنتی‌بادی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی واکسینه شده، میزان تلفات بعد از چالش با باکتری زنده تغییر معنی‌داری نیافت، لذا هر چند نانوکیتوزان توان ایمنی‌زایی واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* را افزایش می‌دهد، ولی تأثیری بر کارایی واکسن خوراکی نداشته و تحقیقات وسیع‌تری برای افزایش کارایی واکسن‌های خوراکی در آبزیان نیاز است.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

این تحقیق با پشتیبانی مالی و تجهیزاتی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل پژوهانه نگارندگان انجام گرفت. نگارندگان از همکاری خانم دکتر زهرا طولابی دزفولی در مراحل انجام تحقیق تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

Abdou, E.S.; Nagy, K.S.A. and Elsabee, M.Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. Bioresource Technology, 99: 1359-1367.

Alishahi, A. and Aider, M. (2012). Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review. Food Bioprocess Technology, 5: 817-830.

Alishahi, M. and Abdy, E. (2013). Effects of different levels of *Aloe vera* L. extract on growth performance, hemato immunological indices of *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology. 5(2): 33-44.

Alishahi, M.; Esmaeili Rad, A.; Zarei, M. and Ghorbanpour, M. (2014). Effect of dietary chitosan on immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio*, Iranian Journal of Veterinary Medicine, 8(2): 125-133.

Altun, S.; Kubilay, A.; Ekici, S.; Işıl Didinen, B. and Diler, O. (2010). Oral vaccination against lactococcosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) Carrier. Kafkas University Veterinary Faculty Letter.16 (Suppl-B): S211-S217.

Alvarez-pellitero, P.; Sitja-Bobadilla, A.; Bermdez, R. and Quiroga, M.I. (2006). Levamisole activates several innate immune factors in *Scophthalmus moximus* (L.) (Teleostei). International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 19(4): 727-738.

Anderson, D.P.; Moritomo, T. and de Grooth, R. (1997). Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology, 30: 419-429.

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.

Bar-Ilan, O.; Albrecht, R.M.; Fako, V.E. and Furgeson, D.Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos, Small, 5(1): 1897-1910.

Barnes, A.C.; Young, F.M.; Horne, M.T. and Ellis, A.E. (2003). *Streptococcus iniae*: serological differences presence of capsule and resistance to immune serum killing. Disease of Aquatic Organisms. 53: 241-247.

Bowman, K. and Leong, K.W. (2006). Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery, International Journal of Nanomedicine, 1(2): 117-128.

Brata, O. (1993). Veterinary Clinical Immunology laboratory, Bar- Lab Inc, Vo12, Section 3: 24-25.

Cha, S.H.; Lee, J.S.; Song, C.B.; Lee, K.J. and Jeon, Y.J. (2008). Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 278: 110-118.

Chaudhury, A. and Das, S. (2011). Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents, Pharmacology Sciences and Technology, 12(1): 10-20.

Cheng, A.C.; Tu, C.W.; Chen, Y.Y.; Nan, F.H. and Chen, J.C. (2007). The immunostimulatory effects of sodium alginate and κ-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coicoides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology, 22: 197-205.

Divyagnaneswari, M.D.; Christybapita, A. and Dinakaran Michael, R. (2007). Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. Fish and Shellfish Immunology. 23: 249-259.

Du, Y.; Zhao, Y.; Dai, S. and Yang, B. (2009). Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10: 103-107.

Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assay. In: Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S., Robertson, B.S. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, Fair Haven, NJ. 101-103.

www.SID.ir

Archive of SID

Geng, X.; Dong, X.H.; Tan, B.P.; Yang, Q.H.; Chi, S.; Liu, H.Y. and Liu, X. (2011). Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Fish and Shellfish Immunology. 31: 400-406.

Gonzalez-Ferreiro, M.; Tillman, L.; Hardee, G. and Bodmeier, R. (2002) Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carrier. International Journal of Pharmaceutics, 239: 47-59.

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

Harikrishnan, R.; Kim, J.S.; Balasundaram, C. and Heo, M.S. (2012). Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. Aquaculture, 326-329: 46-52.

Harikrishnan, R.; Kim, M.C.; Kim, J.S.; Han, Y.J.; Jang, I.S.; Balasundaram, C. and Heo, M.S. (2010). Immune response and expression analysis of cathepsin K in goldfish during *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology, 28: 511-516.

Jain, S.; Sharma, R.K. and Vyas, S.P. (2006). Chitosan nanoparticles encapsulated vesicular systems for oral immunization: preparation, in-vitro and in-vivo characterization. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 58(3): 303-310.

Kajita, Y.; Sakai, M.; Atsuta, S. and Kobayash, M. (1990). The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathology, 25: 93-98.

Kumar, S.R.; Ahmed, V.P.I.; Parameswaran, V.; Sudhakaran, R.; Babu, V.S. and Hameed, A.S.S. (2008). Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. Fish and Shellfish Immunology. 25: 47-56.

Li, T.; Hu, W.; Li, J.; Zhang, X.; Zhu, J. and Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Food Control, 25: 101-106.

Lin, S.; Mao, S.; Guan, Y.; Luo, L.; Luo, L. and Pan, Y. (2012). Effects of dietary chitosan oligosaccharides and Bacillus coagulans on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi)*. Aquaculture. 342-343: 36-41.

Muller, R.H.; Jacobs, C. and Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future. Advanced Drug Delivery Reviews, 47: 3-19.

Obach, A.; Quentel, C. and Bandin Laurencin, F. (1993). Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Disease of Aquatic Organisms. 15: 175-185.

O'Donnell, G.B.; Reilly, P.; Davidson, G.A. and Ellis, A.E. (1996). The uptake of human gamma globulin incorporated into poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles following oral intubation in Atlantic salmon, *Salmo salar* Fish and Shellfish Immunology, 6(7): 507-520.

Raa, J.; Roerstad, G.; Engstad, R. and Robetsen, B. (1992). The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. Disease Asian Aquaculture, 1: 39-50.

Rodde, R.H.; Einbu, A. and Varum, K.M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*pandalus borealis*). Carbohydrate polymers, 71: 388-393.

Romalde, J.L.; Alvárez, A.Z.; Ravelo, C.; Toranzo, T.C. and Blanco-Méndez, J. (2004). Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactoccocosis: Aquaculture, 236(1-4): 119-129.

Sahoo, P.K.; Kumarai, J. and Mishra, B.K. (2005). Nonspecific immune responses in juveniles of Indian major carps. Journal of Applied Ichthyology, 21(2): 151-155.

Sajid, M.; Prabjeet, S.; Hassan S.M. and Khansaheb, B.A. (2010). Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. International Aquatic Research. 2: 77-85.

Sharifzadeh, M.B.; Hosseinzadeh, M.J. and Younesi, H. (2012). Whey Processing with nano chitosan, World Applied Sciences Journal 19 (4): 530-537.

www.SID.ir

Archive of SID

Shelby, R.A.; Shoemaker, C.A. and Klesius, P.H. (2004). Development of ELISA to measure the humoral immune response of hybrid striped bass to Streptococcus iniae. Aquaculture Research 35, 997-1001.

Soltani, M.; Alishahi, M.; Mirzargar, S. and Nikbakht, G. (2007). Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 7(1): 129-140.

Sonia, T.A. and Chandra, P.S. (2011). Chitosan and Its derivatives for drug delivery perspective Advance Polymer Sciences, 243: 23-54.

Swain, P.; Dash, S.; Sahoo, P.K.; Routray, P.; Sahoo, S.K.; Gupta, S.D. et al. (2007). Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology 22 , 38-43.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 12, No. 1, Spring, 2016

Effect of nanochitosan on immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* oral vaccine in Cyprinus carpio

Alishahi, M.[1]; Saidimanesh, M.[2]; Mesbah, M.[1] and Zarei, M.[3]

Received: 09.10.2014 Accepted: 18.04.2015

Abstract

Although oral vaccination has numerous advantages over other routes, degradation of the vaccine antigens in the gut and low uptake in the gut associated lymphoid tissue of the gastrointestinal tract still complicate the development of oral vaccines in fish. Chitosan nanoparticles have recently been shown to possess significant potential as oral drug delivery systems. In this study chitosan nanoparticles were prepared and characterized with respect to size and morphology then used as oral adjuvant with *Aeromonas hydrophila* vaccine (AHB) in *Cyprinus carpio*. Three hundred and sixty juvenile *C. carpio* (46.5±4.67 g) were randomly divided in four groups in triplicates. Groups 1 and 2 received orally AHB and AHB + nanochitosan respectively. Fish in groups 3 received nanochitosan in food, whereas group four received just basal diet free AHB or nanochitosan. Experimental diet of each group administrates at days 1-5 and 20-25 of study. Blood samples were taken from all groups at days 25, 40 and 55 of study. Immunological parameters including: serum lysozyme, bactericidal and complement activity, leukocyte NBT activity as well as serum IgM and anti *A.* hydrophila antibody titer were compared among the groups. Then, fishes of each groups challenged with live *Aeromonas hydrophila* and mortality rate recorded for 10 days. Results showed that some none specific immunological parameters improved significantly. Serum lysozyme, bactericidal and NBT activity increased in group 2 (vaccine + nanochitosan) in all sampling periods ($P<0.05$). Slight increase in immunological parameters were seen in groups 1 and 3. Complement activity showed no significant change among the groups. although anti A hydrophila antibody titer were increased significantly in groups 1 and 2 at 25 and 40 days of study ($P<0.05$), no change were seen among the groups in anti *A. hydrophila* antibody titer at 55 days of study ($P>0.05$). Mortality after challenge with A hydrophila didn't affected by oral vaccination with AHB or AHB+nanochitosan. There were no significant change in mortality rate among the groups ($P>0.05$). Conclusively, although immunization with AHB and nanochitosan in oral route improve some none specific immune response of *C. carpio,* no significant change in anti A hydrophila antibody titer and challenge mortality rate were seen in treated fish.

Key words*: Cyprinus carpio*, *Aeromonas hydrophila* vaccine, Oral vaccine, Nanochitosan, Immune responses

1- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Alishahi, M., E-mail: alishahim@scu.ac.ir

www.SID.ir