

بررسی اثر ادجوانی نانوکیتوزان بر ایمنی زایی واکسن کشته آنروموناتس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

مجتبی علیشاهی^{۱*}، عذرا حاجی پور^۲، مسعود قربانپور^۳، مهرزاد مصباح^۱

۱) گروه علوم در مانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲) دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۴ شهریور ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۲ آذر ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: اخیراً گزارشات متعددی از اثرات تحریک ایمنی و ادجوانی نانوکیتوزان در حیوانات مختلف گزارش شده است. هدف: در این مطالعه، اثر ادجوانی نانوکیتوزان تولید شده از کیتوزان حاصل از کیتوزان پوسته میگو بر ایمنی زایی واکسن کشته آنروموناتس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت. روش کار: تعداد ۳۰۰ عدد ماهی کپور معمولی (با وزن متوسط $51 \pm 5/6$ g) به چهار گروه (هر گروه ۷۵ ماهی و ۲۵ ماهی در هر تکرار) تقسیم شدند. گروه ۱، ۲ و ۳ با واکسن آنروموناتس هیدروفیلا ایمن شدند. در گروه ۱ واکسن بدون ادجوان، گروه ۲، واکسن همراه ادجوان فروند و گروه ۳ واکسن همراه ادجوان نانوکیتوزان استفاده شد. گروه ۴ (شاهد) با سرم فیزیولوژی تزریق گردید. ماهی‌های هر گروه در روز صفر و ۱۴ ایمن شدند و به مدت ۶ هفته با شرایط مشابه نگهداری و تغذیه شدند. خونگیری در انتهای هفته ۲، هفته ۴ و هفته ۶ تحقیق انجام گرفت. برخی شاخص‌های ایمنی مانند تعداد گلبول‌های سفید خونی، فعالیت لایزوزیم و قدرت ضدباکتریایی سرم، فعالیت کمپلمان، میزان احیای NBT، پروتئین و گلوبولین تام و عیار آنتی بادی ضد آنروموناتس هیدروفیلا بررسی شد. در انتهای دوره ماهی‌ها با غلظت LD₅₀ باکتری زنده آنروموناتس هیدروفیلا چالش داده شدند و میزان تلفات طی ۱۰ روز ثبت شد. نتایج: نتایج نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید خونی، فعالیت لایزوزیم سرم، میزان گلوبولین، میزان فعالیت NBT و عیار یادتن در دو تیمار فروند و نانوکیتوزان در مراحل نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل یافت ($p < 0/05$). در میزان فعالیت ضدباکتریایی و سطح آلبومین سرم در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > 0/05$). تلفات بعد از چالش نیز در هر دو تیمار نانوکیتوزان و فروند کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار بدون ادجوان و کنترل نشان دادند ($p < 0/05$). نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج این تحقیق نانوکیتوزان دارای خواص ادجوانی مناسب و قابل رقابت با ادجوان فروند بوده و گزینه خوبی برای جایگزینی ادجوان‌های رایج ماهی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوکیتوزان، ادجوان، کپور معمولی، آنروموناتس هیدروفیلا

مقدمه

مواد مغذی مثل ویتامین C در شرایط معده ماهی (۴) محافظت و تشدید اثرات آنتی باکتریال در مواد غذایی (۲۹) و محافظت از واکسن‌های DNA و پروتئین‌های نوترکیب در روش تجویز خوراکی (۴۵) اخیراً رایج شده است. کوچک نمودن اندازه اجزای مواد بیولوژیک در حد نانو، توان زیستی آن‌ها را بصورت فزاینده‌ای افزایش می‌دهد که این اثر در مورد مواد بیولوژیک پلیمری مثل کیتین و کیتوزان قابل توجه است و در بعضی تحقیقات کاهش اندازه ذرات در حد نانو افزایش معنی‌دار اثر بیولوژیک آن‌ها را باعث شده است (۸).

آنروموناتس هیدروفیلا به عنوان یکی از باکتری‌های بیماری‌زای فرصت طلب در بسیاری از گونه‌های ماهی آب شیرین و لب شور و به خصوص کپورماهیان در کشورهای آسیایی مورد توجه بوده و از طرفی رشد روزافزون پرورش آبزیان به صورت مترکم باعث شیوع هر چه بیشتر بیماری‌ها از جمله آلودگی به این باکتری گشته است (۲۲).

به منظور کنترل این بیماری امروزه به ساخت واکسن توجه بیشتری شده است و به این منظور باکتری غیرفعال شده، به روش‌های مختلف مانند غوطه وری، تزریقی یا خوراکی به عنوان واکسن و با هدف ایجاد پاسخ قوی

استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی و ادجوان‌ها در ماهی نقش مؤثرتری در مقایسه با موجودات خونگرم دارند (۲۶)، از طرفی اخیراً استفاده از مواد بیولوژیک به جای مواد شیمیایی آسیب‌رسان در آبی‌پروری و بویژه بهداشت آبزیان جایگاه ویژه‌ای یافته است (۲۳). بسیاری از ترکیبات پلیمریک (ترکیبات حاوی واحدهای تکرار شوند) و پلی ساکاریدی به دلیل حفاظت از آنتی ژن‌ها و انکپسوله نمودن آن‌ها، از تخریب و تغییر آنتی ژن کاسته و همانند یک ادجوان عمل می‌نمایند به همین دلیل اخیراً روش‌های انکپسوله نمودن آنتی ژن‌های میکروبی در میکروذرات و نانوذرات پلیمریک و پلی ساکاریدی، در حال رشد و توسعه است. یکی از این ذرات پلی ساکاریدی کیتوزان بوده که از نظر ساختار شیمیایی از جنس گلوکز آمین می‌باشد و از استیل زدایی کیتین به دست می‌آید. کیتین فراوانترین پلیمر طبیعی بعد از سلولز در طبیعت است (۷) خاصیت تحریک رشد و تقویت سیستم ایمنی توسط این ترکیب در گونه‌های مختلف آبزیان نشان داده شده است (۲، ۷). استفاده از نانوکیتوزان به عنوان محافظت کننده



غیرفعال شده در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون در آمدند و با استفاده از روش مک فارلند و نیز روش کدورت سنجی غلظت واکسن در حد ۱۰۱۰ تنظیم گردید (۴۶).

تهیه ادجوان نانوکیتوزان: در این تحقیق از کیتوزان استحصال شده از پوسته میگو به روش توصیه شده توسط Abdou و همکاران در سال ۲۰۰۸ استفاده شد (۲). درصد استیلاسیون کیتوزان تهیه شده با استفاده از دستگاه آنالیز عناصر (Elemental analyzer) مشخص گردید. همچنین جهت تعیین وزن مولکولی کیتوزان از ارتباط بین ویسکوزیته ذاتی محلول کیتوزان و وزن مولکولی استفاده گردید.

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان به روش ژلاسیون یونوتروپیک (Ionotropic gelation) انجام گردید. بدین منظور ۴ ml محلول سدیم تری پلی فسفات (Sodium tripolyphosphate) ۲٪ به تدریج به ۱۰۰ ml محلول کیتوزان که بر روی همزن مغناطیسی در حال هم زدن بود، افزوده شد و عمل هم زدن به مدت دو ساعت ادامه یافت (۱۳). اندازه نانوذرات تولید شده و میزان پتانسیل زتای نانوذرات به وسیله دستگاه پارتیکل سائیزر و زتاسائیزر (Zetasizer, Nano-ZS, Malvern Instruments) اندازه گیری گردید.

برای کاهش pH نانوکیتوزان تولید شده دو بار در ۱۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴°C سانتیفریوژ 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 (۵).

در مرحله بعد باکتری غیر فعال شده با نانوکیتوزان به نسبت ۱:۱ مخلوط شده و با انجام ورتکس و عبور با فشار از سوزن سرنگ با حجم ۶۰ سی سی کاملاً یکنواخت شد. در نتیجه غلظت نهایی باکتری آماده شده برابر با 5×10^9 گردید (۲۱).

تیمار بندی و ایمن سازی ماهی ها: برای انجام این مطالعه ماهی ها به ۴ گروه (تیمار) تقسیم گردیدند. هر گروه دارای ۳ تکرار و هر تکرار حاوی ۲۵ عدد ماهی، در آکواریوم های شیشه ای ۱۲۰ لیتری مجزا با شرایط یکسان تقسیم شدند. گروه ها به شرح زیر ایمن گردیدند:

- ۱- واکسن آئروموناتس هیدروفیلا بدون ادجوان
- ۲- واکسن آئروموناتس هیدروفیلا + ادجوان فروند
- ۳- واکسن آئروموناتس هیدروفیلا + ادجوان نانوکیتوزان
- ۴- شاهد (دریافت حجم مساوی از سرم فیزیولوژی استریل به جای واکسن)

ایمن سازی در روز صفر و روز چهاردهم انجام شد. ایمن سازی به روش تزریقی انجام شد. روش ایمن سازی برای همه ماهی ها به صورت داخل صفاقی و به میزان ۰/۵٪ وزن بدن بود (۱۷). ماهی ها قبل از تزریق با mg/l ۱۰۰ ماده بیهوشی MS۲۲۲ بیهوش شدند.

نمونه گیری: نمونه گیری در روز صفر، هفته ۲، هفته ۴ و هفته ۶ از

و طولانی مدت علیه آنتی ژن باکتریایی، مصرف می شود. برای رسیدن به این هدف یعنی تحریک ایمنی طولانی تر توسط واکسن ها، علاوه بر آنتی ژن کشته شده نیاز به افزودن یک ادجوان نیز در واکسن می باشد (۳،۷). ادجوان ها مواد محرک ایمنی هستند که همراه واکسن ها استفاده شده و علاوه بر عرضه تدریجی آنتی ژن، اثرات تحریک ایمنی بویژه در عرضه آنتی ژن واکسنی با افزایش فعالیت سلول های T یاریگر (یاور) دارند. از جمله شناخته شده ترین ادجوان ها در واکسن های انسانی و دامی ادجوان فروند می باشد که به شکل امولسیون آب در روغن است، در ماهی نیز استفاده از این نوع ادجوان در واکسن های تزریقی کاربرد دارد. از معایب این ادجوان، تحریک بافتی، ایجاد چسبندگی و گرانولوما در محل تزریق می باشد (۷). از آنجا که نانوکیتوزان به دلیل ویژگی تحریک ایمنی به ویژه افزایش جذب آنتی ژن از مخاطات و بدنال آن افزایش عرضه آن توسط سلول های دندریتیک و همینطور قابلیت بالا در حفظ و نگهداری ذره آنتی ژنی توانایی استفاده به عنوان ادجوان در واکسن های ماهی را داراست (۷،۵۱). لذا این تحقیق با هدف بررسی اثر تجویز داخل صفاقی (تزریقی) واکسن آئروموناتس هیدروفیلا به همراه نانوکیتوزان (به عنوان یک ادجوان) در مقایسه با ادجوان فروند (به عنوان یک ادجوان تجاری شناخته شده)، بر بازماندگی و تقویت سیستم ایمنی ماهی کپور انجام گرفت.

مواد و روش کار

ماهی: تعداد ۳۰۰ عدد ماهی کپور معمولی (با وزن متوسط $51 \pm 5/6$ گرم) و سن کمتر از یک سال از یکی از مراکز پرورش ماهی گرمابی (شوشتر، خوزستان، ایران) تهیه شد. پس از انتقال به سالن آکواریوم بخش بهداشت و بیماری های آبیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، به مدت دو هفته در دو مخزن ۳۰۰ لیتری فایبرگلاس نگهداری شدند تا با شرایط آزمایشگاه سازش یابند. ماهی ها قبل از انجام تحقیق از نظر بهداشتی و عدم ابتلا به بیماری های انگلی و باکتریایی کاملاً مورد ارزیابی قرار گرفتند

غذای مورد استفاده، خوراک مخصوص بچه ماهی کپور ساخت شرکت بیضای شیراز با میزان پروتئین ۳۲٪ بود. میزان خوراک روزانه حدود ۳٪ وزن توده زنده (Biomass) در دو الی سه وعده مجزا در نظر گرفته شد.

آماده سازی و تزریق واکسن: پس از کشت باکتری آئروموناتس هیدروفیلا (AH۰۴) که با روش PCR جنس و گونه آن اثبات شده بود) در محیط TSB، باکتری در مجاورت غلظت های متوالی فرمالین (از ۰/۱ تا ۵٪) به مدت ۲۴ ساعت در ۴°C قرار داده شد و کمترین غلظتی که تمام باکتری ها را کشته بود (۰/۲۵٪) مشخص گردید که باکتری ها با این غلظت غیر فعال شدند. سپس باکتری ها با سرم فیزیولوژی سه بار شستشو شدند. به منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن کامل باکتری ها، از باکتری غیر فعال شده کشت مجدد تهیه شد (۳۵،۳۸). در انتهای کار، باکتری های



با روش توصیه شده توسط Selvaraj و همکاران در سال ۲۰۰۵ اندازه گیری گردید (۴۱). بطور خلاصه، ۵۰۰ µl سرم کپور در بافر EGTA ژلاتین ورونال منیزیم دار بطور متوالی رقیق گردید. ۲۰۰ µl سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفندی (10⁶ cell/ml) به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در ۱۵ °C انکوبه گردید. فعالیت همولیز با اضافه نمودن بافر ۱۰ mM EDTA ورونال بافر ژلاتین دار متوقف گردید. بعد از سانتریفیوژ، میزان همولیز از روی میزان جذب نوری مایع بالای هر لوله در ۴۱۴ nm اندازه گیری گردید.

اندازه گیری عیار آنتی بادی ضد آنروموناتس هیدروفیلا: عیار آنتی بادی به روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی یا MAT با استفاده از روش توصیه شده توسط Shen و همکاران در سال ۱۹۹۹ اندازه گیری شد (۴۲).

به طور خلاصه ابتدا سرم‌ها در میکروپلیت‌های ته گرد بر مبنای دو با (PBS (Micro Agglutination Test) استریل با pH=۷/۲ رقیق گردیدند. سپس هم حجم سرم رقیق شده، باکتری آنروموناتس هیدروفیلا غیر فعال شده با فرمالین، که با بافر فسفات کاملاً شستشو شده بود، با غلظت 10⁸ Cell/ml به هر گوده اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای اطاق انکوبه گردیده و عیار آنتی بادی ضد آنروموناتس هیدروفیلا بر اساس آخرین غلظت ایجاد کننده آگلوتیناسیون باکتریایی، گزارش گردید. از سرم ماهی فوق ایمن به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. نتایج به صورت لگاریتم عیار آنتی بادی بر مبنای دو گزارش شد (۴۷).

شمارش کلی گلبول‌های سفید (TWBC): شمارش کلی گلبول‌های سفید به روش مستقیم (هماسیتومتر) و همانند شمارش کلی گلبول‌های سفید پرندگان با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات-هریک صورت گرفت. برای این کار و پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر تعداد کل گلبول‌های سفید خون در میلی متر مکعب خون تعیین گردید (۴۰).

چالش با باکتری آنروموناتس هیدروفیلا: در انتهای هفته ششم تعداد ۱۰ عدد ماهی در هر تکرار با غلظت 10⁸ cfu ml⁻¹ به روش تزریق داخل صفاقی به میزان ۱۰۰ µl به ازای هر ماهی چالش داده شدند (۳۳). یک گروه از ماهی‌های گروه کنترل فقط با PBS (فاقد باکترین) به عنوان کنترل منفی تزریق شدند. تلفات ماهی‌ها در گروه‌های مختلف تا ۱۰ روز ثبت شد و کارایی هر واکسن محاسبه و مقایسه گردید.

آزمون آماری: برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون استاتستیک تست (Leven statistic test) برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از آنوای یک طرفه (One way ANOVA) برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی در تیمارها استفاده گردید. برای بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین‌ها از

ماهی‌های هر تکرار به عمل آمد و آزمایشات زیر روی نمونه‌ها انجام شد.
فعالیت لایزوزیم سرم: فعالیت لایزوزیم سرم به روش توربیدومتری با استفاده از روش توصیه شده توسط Ellis و همکاران در سال ۱۹۹۰ با کمی تغییرات اندازه گیری شد (۱۵). در این روش ابتدا ۱۰ µl از سرم نمونه با ۲۰۰ از سوسپانسیون ۰/۲ mg/ml باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۲) در گوده‌های پلیت الایزا مخلوط شد و جذب نوری در دمای ۲۵ °C در زمان‌های ۱ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط سازی در طول موج ۵۳۰ nm اندازه گیری شد [دستگاه قرائت کننده الایزا (۵۰۰۰ Dynatech MR) ساخت کشور هلند]. فعالیت لایزوزیم باعث تخریب باکتری و کاهش جذب نوری می‌گردد. یک واحد فعالیت لایزوزیم با میزان کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه در هر میلی لیتر سرم مشخص گردید.

بررسی قدرت باکتری کشی سرم: برای اندازه گیری قدرت باکتری کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران در سال ۱۹۹۰ با کمی تغییرات استفاده گردید (۲۷). بطور خلاصه در این روش باکتری آنروموناتس هیدروفیلا بعد از رقیق سازی در بافر، به سرم ماهی اضافه شده و بعد از ۹۰ دقیقه مجاورت سرم و باکتری، از مخلوط باکتری و سرم کشت تهیه شده و باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت شمارش شدند، کاهش تعداد باکتری شمارش شده در تیمارها نسبت به تیمار کنترل نشان دهنده اثرات ضدباکتریایی سرم می‌باشد.

بررسی فعالیت نیتروبلو تترازولیوم NBT: از روش توصیه شده توسط Sahoo و همکاران در سال ۲۰۰۵ به این منظور استفاده گردید (۳۹). بطور خلاصه ماده نیتروبلو تترازولیوم (مرک) ۰/۲٪ به لوله‌های حاوی خون تازه اضافه شده و بعد از انکوباسیون در دمای ۲۵ °C، این مخلوط به نسبت ۱ به ۲۰ به محلول دی متیل فرماید (سیگما) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون، لوله در ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید، سپس میزان جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۴۰ nm در دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت گردید. افزایش جذب نوری نشان دهنده افزایش احیای نیتروبلو تترازولیوم می‌باشد.
اندازه گیری میزان پروتئین‌های سرم: از روش توصیه شده توسط Swain و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای اندازه گیری گلوبولین سرم استفاده شد، ابتدا میزان پروتئین کل سرم با روش Lowry اندازه گیری شد (۴۷). سپس ۵۰ µl محلول سولفات آمونیوم اشباع بصورت قطره قطره به ۵۰۰ µl سرم اضافه شد. بعد از هم زدن ملایم، نمونه سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شده و سپس ۲۰ µl از این نمونه با ۸۰ µl بافر بیکربنات-کربنات (pH=۹/۳) مخلوط شده و میزان پروتئین با کیت تخمین پروتئین استاندارد تعیین گردید. میزان گلوبولین سرم حاصل تفریق پروتئین مرحله دوم از پروتئین تام اولیه می‌باشد. میزان آلبومین سرم با استفاده از کیت پارس شیمی (ایران) اندازه گیری شد.

روش اندازه گیری میزان فعالیت کمپلمان سرم: فعالیت ACP مطابق



جدول ۱. مقایسه برخی شاخص‌های ایمنی بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری، نتایج براساس (Mean±SD) آورده شده است و حروف کوچک لاتین غیر همنام در هر مرحله نمونه‌گیری نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

میلگین	قدرت باکتری کشی سرم (تعداد باکتری)	پروتئین تام (g/dl)	آلبومین (g/dl)	گلوبولین (g/dl)	
روز صفر	غیر ایمن	۶۷/۵۷±۱۴/۹۵ ^a	۳/۸۴±/۶۸ ^a	۲/۸۴±/۵۱ ^a	۷۷۴±/۳۴ ^a
	فروند	۶۵/۵۷±۱۵/۶۸ ^a	۳/۸۶±/۶۷ ^a	۲/۸۷±/۵۳ ^a	۷۶۷±/۳۲ ^a
	نانوکیروزان	۶۳/۳۸±۱۶/۱۷ ^a	۳/۶۸±/۶۶ ^a	۲/۶۸±/۴۸ ^a	۷۷۵±/۳۱ ^a
	باکترین	۶۴/۵±۹/۸۹ ^a	۳/۵±/۶۱ ^a	۲/۵±/۴۸ ^a	۷۷±/۳۵ ^a
روز ۱۴	غیر ایمن	۶۵/۱۴±۱۲/۷۷ ^a	۳/۹۸±/۸۶ ^a	۲/۷۶±/۵۷ ^a	۷۶±/۲۰ ^b
	فروند	۵۹/۳۸±۱۸/۴ ^a	۴/۴±/۹۵ ^a	۲/۲۳±/۶۲ ^a	۷۷۹±/۲۹ ^b
	نانوکیروزان	۵۳/۴۳±۶/۱۱ ^a	۴/۵۶±/۵۸ ^a	۲/۲۶±/۵۴ ^a	۲/۰۴±/۵۱ ^a
	باکترین	۵۹/۰۵±۱۸/۱۱ ^a	۴/۰±/۶۶ ^a	۲/۳۳±/۵۱ ^a	۷۸±/۳۵ ^b
روز ۲۸	غیر ایمن	۶۲/۲۵±۱۸/۲۲ ^a	۳/۸۴±/۵۷ ^b	۲/۱۶±/۴۶ ^a	۷۶۸±/۳۶ ^b
	فروند	۵۹/۵±۱۵/۱۲ ^a	۴/۳±/۸۷ ^{ba}	۲/۶۷±/۷۳ ^a	۷۹۵±/۵۹ ^{ba}
	نانوکیروزان	۵۳/۱۸±۱۴/۴۶ ^a	۴/۷±/۷۵ ^a	۲/۵۴±/۶۶ ^a	۲/۱۶±/۵۷ ^a
	باکترین	۵۹/۱±۱۴/۲۴ ^a	۴/۱۵±/۷۹ ^b	۲/۴±/۵۷ ^a	۷۸±/۳۵ ^b
روز ۴۲	غیر ایمن	۶۵/۱۴±۱۳/۶۴ ^a	۳/۹۷±/۷۳ ^a	۲/۴۳±/۵۳ ^a	۷۵±/۳۱ ^a
	فروند	۶۱/۱۴±۱۴/۳۲ ^a	۲/۰۵±/۶۳ ^a	۲/۲۴±/۵۳ ^a	۷۹۷±/۴۳ ^a
	نانوکیروزان	۵۹/۱±۹/۸۲ ^a	۴/۳±/۶۶ ^a	۲/۳۹±/۴۹ ^a	۷۹۴±/۳۴ ^a
	باکترین	۶۲/۵۷±۱۵/۱ ^a	۴/۱۵±/۶۳ ^a	۲/۷±/۵۱ ^a	۷۷۶±/۳۹ ^a

تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

کمپلمان در تیمار ایمن شده با باکترین فاقد ادجوان افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل نداشت ($p > 0.05$) (نمودار ۳).

فعالیت NBT: میزان فعالیت NBT ماهیان در تیمارهای مختلف نشان داد که در روز ۱۴ و ۲۸ تحقیق افزایش معنی‌دار فعالیت NBT در تیمار واکسینه شده با واکسن حاوی نانوکیروزان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$)، در تیمار ادجوان فروند فقط در روز ۲۸ افزایش نسبت به کنترل مشاهده شد. (نمودار ۱). در تیمار باکترین علیرغم افزایش نسبی فعالیت NBT این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

عیار آنتی بادی ضد باکتری آئروموناس هیدروفیلا: عیار آنتی بادی ضد آئروموناس هیدروفیلا در هر سه مرحله نمونه‌گیری در هر سه تیمار نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$). در روز ۲۸ تیتراژ آنتی بادی در دو تیمار نانوکیروزان و فروند افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار باکترین داشت ($p < 0.05$). ولی در بقیه مراحل تفاوتی بین تیتراژ پادتن در تیمارهای ایمن شده مشاهده نگردید ($p > 0.05$).

میزان پروتئین تام و گلوبولین سرم: میزان پروتئین تام و گلوبولین سرم در تیمار نانوکیروزان و فروند در روز ۱۴ و ۲۸ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. در صورتی که در سایر مراحل نمونه‌گیری و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نگردید ($p > 0.05$).

تلفات پس از چالش: تزریق واکسن آئروموناس هیدروفیلا به همراه ادجوان نانوکیروزان و فروند باعث کاهش معنی‌دار تلفات پس از چالش در ماهی‌ها شد ($p < 0.05$). تلفات در گروه باکترین فاقد ادجوان بالاتر از تیمار نانوکیروزان و فروند بود، ولی تلفات نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$).

نتایج

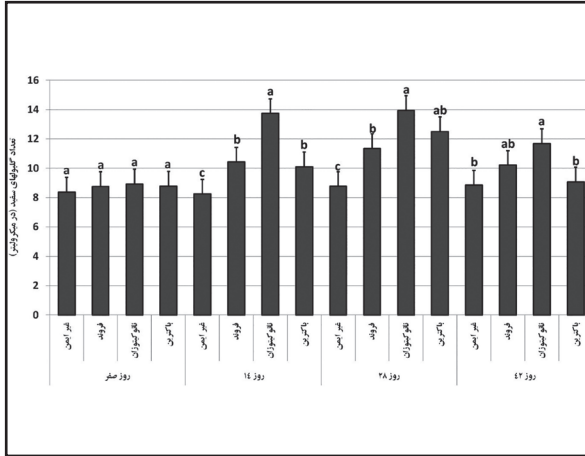
میزان فعالیت لایزوزیم سرم: میزان فعالیت لایزوزیم سرم ماهیان در تیمارهای مختلف نشان داد که در هر سه مرحله نمونه‌گیری افزایش معنی‌دار فعالیت لایزوزیم در تیمار واکسینه شده با واکسن حاوی نانوکیروزان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$)، در سایر تیمارهای و مراحل نمونه‌گیری علیرغم افزایش نسبی فعالیت لایزوزیم سرم، این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) (نمودار ۱).

میزان قدرت باکتری کشی سرم: میزان فعالیت باکتری کشی سرم تحت تأثیر ایمن سازی ماهی با واکسن آئروموناس هیدروفیلا به همراه ادجوان فروند و نانوکیروزان و قرار نگرفت.

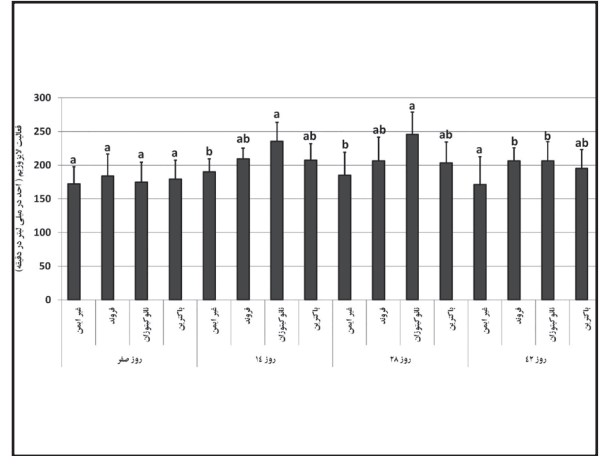
تعداد گلبول‌های سفید خونی: تعداد گلبول‌های سفید خونی ماهیان در تیمارهای مختلف نشان داد که در هر سه مرحله نمونه‌گیری افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید خونی، در تیمار واکسینه شده با واکسن حاوی نانوکیروزان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$)، در تیمار فروند نیز افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در روز ۱۴ و ۲۸ نیز مشاهده گردید، هرچند افزایش تعداد گلبول‌ها در تیمار باکترین فقط در روز ۱۴ نسبت به کنترل معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (نمودار ۲).

میزان فعالیت کمپلمان سرم: افزایش فعالیت کمپلمان در ماهیان ایمن شده با واکسن همراه ادجوان نانوکیروزان و فروند در هر سه مرحله نمونه‌گیری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$)، هرچند فعالیت

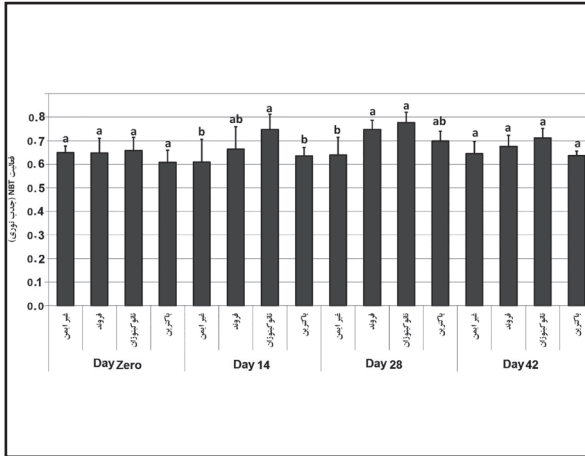




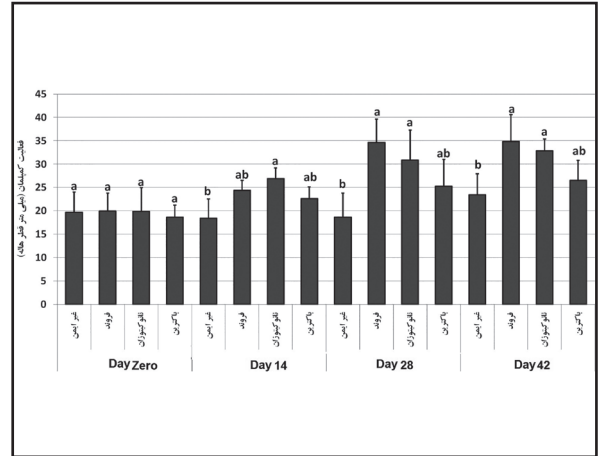
نمودار ۲. مقایسه تعداد گلبولهای سفید خونی بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری. نتایج براساس (Mean±SD) آورده شده است و حروف کوچک لاتین غیر همنام در هر مرحله نمونه‌گیری نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



نمودار ۱. مقایسه فعالیت لایزوزیم سرم بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری. نتایج براساس (Mean±SD) آورده شده است و حروف کوچک لاتین غیر همنام در هر مرحله نمونه‌گیری نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



نمودار ۴. مقایسه فعالیت NBT گلبولهای سفید بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری. نتایج براساس (Mean±SD) آورده شده است و حروف کوچک لاتین غیر همنام در هر مرحله نمونه‌گیری نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



نمودار ۳. مقایسه فعالیت کمپلمان سرم بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری. نتایج براساس (Mean±SD) آورده شده است و حروف کوچک لاتین غیر همنام در هر مرحله نمونه‌گیری نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

آنروموناتس هیدروفیلا دارای اثراتی قابل رقابت با ادجوان فروند داشته و ماهی کپور ایمن شده با واکسن همراه ادجوان فروند و نانوکیتوزان تحریک ایمنی بیشتری نسبت به تجویز واکسن بدون ادجوان بر شاخص‌های ایمنی نشان داد. بطوریکه عیار آنتی بادی ضد آنروموناتس هیدروفیلا در هر سه مرحله نمونه‌گیری در هر سه تیمار نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری نشان داده است ($p < 0.05$). پاسخ همورال (تولید آنتی بادی) ایجاد شده در روز ۲۸ توسط واکسن حاوی ادجوان فروند مشابه با پاسخ ایجاد شده توسط واکسن حاوی ادجوان فروند بوده و افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار واکسینه به تنهایی داشت ($p < 0.05$). در مطالعات متعدد از نانوذرات مختلف جهت انکپسوله نمودن آنتی ژن‌های میکروبی استفاده شده است که در اغلب این تحقیقات نقش نانوذره در تحریک بیشتر سیستم ایمنی به ویژه ایمنی همورال به اثبات رسیده است.

بحث

کنترل بیماری ناشی از آنروموناتس هیدروفیلا توسط آنتی بیوتیک‌ها همیشه موفقیت آمیز نبوده و ممکن است باعث ایجاد مقاومت باکتریایی شود از این رو توسعه واکسن علیه بیماری در ماهی ضروری به نظر می‌رسد (۲۸). از سال‌های گذشته به موازات تلاش برای ساخت واکسن علیه بیماری‌های مختلف، استفاده از مواد معروف به ادجوان (Adjuvant) در جهت بهبود تأثیر و عملکرد واکسن‌ها مورد توجه و استفاده قرار گرفته است (۷). در بخش آبی پروری نیز، تولید واکسن‌های حاوی ادجوان‌های مختلف سنتتیک و طبیعی جهت ایمن‌سازی هرچه بهتر در مقابل بیماری‌ها حائز اهمیت است (۱۰).

در این مطالعه نانوکیتوزان به عنوان ادجوان همراه با واکسن

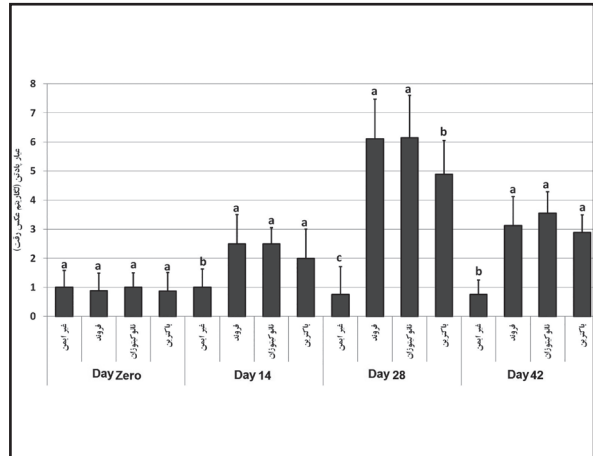


گردید(۱۸).

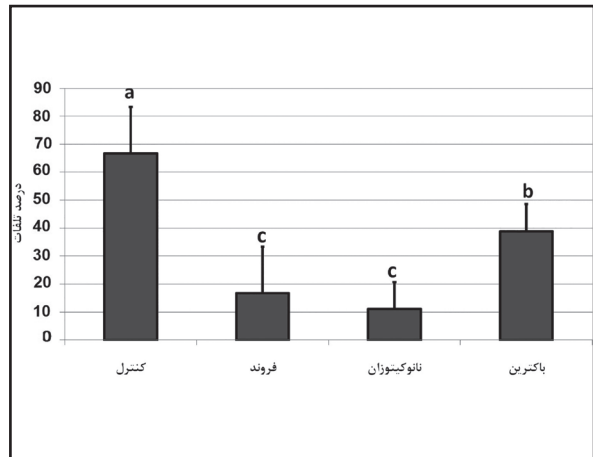
مشاهده شده است که DNA واکسن‌های ماهی به دلیل شارژ مثبت مولکول کیتوزان به سهولت درون این ذرات انکپسوله می‌شوند و از تخریب توسط DNase و نیروهای برشی حفظ می‌شوند (۴۹) و به میزان قابل توجه و با حداقل سیتوتوکسیسیته به سلول‌های ماهی منتقل می‌شوند (۷). در مطالعات انسانی نیز Sonia و همکاران در سال ۲۰۱۱ تأثیر مثبت نانوذرات کیتوزان در جذب آنتی ژن، عرضه آنتی ژن توسط لکوسیت‌ها و بلوغ سلول‌های دندریتیک در روش تزریقی را گزارش نمودند (۴۵). همچنین Fujimura و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ذرات آنتی ژنی انکپسوله شده با نانوذرات کیتوزان که دارای پتانسیل زتای مثبت می‌باشند، بازده جذب آنتی ژن توسط لکوسیت‌های انسانی را بالا می‌برد (۱۹). به همین صورت از نانوکیتوزان برای تجویز آنتی ژن ویروس آنفلوآنزا به روش داخل بینی، و واکسن اسهال ویروسی به روش خوراکی در انسان استفاده شده است (۲۴، ۲۹). به علاوه ثابت شده است که کیتوزان ویژگی‌هایی ادجوانی مشابه با ادجوان فروند و حتی از نظر محافظتی برتر از هیدروکسید آلومینیوم در واکسن‌های پستانداران می‌باشد (۷).

بررسی جمعیت لکوسیتی ماهیان ایمن شده در تیمارهای مختلف نشان داد که در هر سه مرحله نمونه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید خونی، در تیمار واکسینه شده با واکسن حاوی نانو کیتوزان نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($p < 0.05$)، در تیمار فروند نیز افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در روز ۱۴ و ۲۸ نیز مشاهده گردید ($p < 0.05$). این افزایش جمعیت می‌تواند نشان دهنده واکنش بیشتر سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی با آنتی ژن‌های واکسن در ماهیان تیمار نانو کیتوزان و فروند باشد که منجر به تحریک و تمایز و افزایش بیشتر جمعیت سلول‌های سفید خون در این گروه‌ها می‌گردد. در واقع افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی ناشی از تحریک بافت‌های هماتوپوئیتیک مرتبط ایمنی، همانند کلیه قدامی و طحال می‌باشد که بصورت مستقیم یا غیر مستقیم تحت تأثیر نانو کیتوزان قرار گرفته است. به علاوه افزایش جمعیت لکوسیتی می‌تواند افزایش عیار آنتی بادی در خون را توجیه نماید چراکه تولید آنتی بادی بیشتر زمانی میسر خواهد بود که سلول‌های تولید کننده آن‌ها در گردش خون افزایش یابد. افزایش شمار لکوسیت‌ها در خون در مطالعه Maqsood و همکاران در سال ۲۰۱۰ در سال و Lin و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز پس از تجویز خوراکی کیتوزان در ماهی کپور مشاهده شده است (۳۱، ۳۲).

مطالعه سنجش میزان لیزوزیم سرم در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل بیشترین میزان لیزوزیم توسط گروه واکسینه شده با واکسن حاوی نانو کیتوزان ایجاد شده است. این افزایش قابل توجه میزان لیزوزیم در ۲ هفته اول پس از ایمن سازی را می‌توان به نقش و دخالت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی علیه این باکتری نسبت داد. از آنجایی که منبع اصلی لیزوزیم سرم سلول‌های مونوسیت/ماکروفاژ



نمودار ۵. مقایسه عیار پادتن ضد آئروموناس هیدروفیلا بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری (عیار آنتی بادی بر اساس عکس لگاریتم بر مبنای دو آورده شده است) نتایج بر اساس (Mean±SD) آورده شده است و حروف کوچک لاتین غیر همنام در هر مرحله نمونه‌گیری نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



نمودار ۶. درصد تلفات متعاقب چالش با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا.

در مطالعه Zheng و همکاران در سال ۲۰۰۶، افزایش عیار آنتی بادی ضد ویروس بیماری ویروس لیمفوسیتیک در ماهی فلاندر ژاپنی بعد از تجویز نانوذرات کیتوزان حاوی آنتی ژن ویروس گزارش گردید (۵۱). همچنین Behera و همکاران در سال ۲۰۱۰ تجویز ریز ذرات پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید حاوی پروتئین نوترکیب غشای خارجی باکتری آئروموناس هیدروفیلا را باعث افزایش عیار آنتی بادی ضد این باکتری در ماهی روگو دانست (۱۱). در مطالعه Tian و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز تجویز نانوذرات آلژینات حاوی DNA قسمتی از پروتئین کپسید ویروس لیمفوسیتیک، باعث افزایش عیار آنتی بادی ضد ویروس در ماهی فلاندر گردید (۴۹). همچنین تزریق واکسن حاوی LPS باکتری آئروموناس سالمونیسیدا میکروانکپسوله شده درون ذرات لیپوزوم باعث تحریک تولید آنتی بادی بیشتر نسبت به گروه کنترل گردید (۳۴). در مطالعه‌ای مشابه تجویز نانوذرات و ریز ذرات پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید حاوی آنتی ژن، بهبود پاسخ پادتنی در برابر آنتی ژن را در ماهی آزاد اطلس باعث



فرایند کشتن داخل سلولی وابسته به اکسیژن " (Oxygen dependent Intracellular killing) در سلول‌های بیگانه خوار می‌باشد. لذا در تحقیق جاری هم آنتی ژن باکتریایی و هم ادجوان نانوکیتوزان و فروند بهبود بیگانه خواری از دو مسیر فوق را باعث شده اند که نتیجه آن افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در لکوسیت‌ها و نهایتاً احیای بیشتر نیتروبلوتترازیولیوم و افزایش جذب نوری بوده است. در تحقیقات مشابه تأثیر کیتوزان خوراکی بر میزان انفجار تنفسی لکوسیت‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (۳۴) و ماهی کپور معمولی (۳۰، ۳۱، ۳۰) گزارش شده است که با نتایج تحقیق جاری مطابقت دارند. همچنین افزایش قدرت انفجار تنفسی لکوسیت‌ها بدنبال تجویز سایر محرک‌های ایمنی نیز گزارش گردیده است (۲۵).

مهمترین شاخص کیفیت واکسن، میزان محافظت ایجاد شده در برابر عامل بیماریزا می‌باشد. تأثیر ادجوان‌ها در کارایی واکسن در تحقیقات مختلف گزارش شده است (۳). در تحقیق جاری نیز تلفات بعد از چالش با باکتری *Aeromonas hydrophila* در پایان هفته ششم نیز حاکی از افزایش معنی‌دار میزان بازماندگی در تیمار نانوکیتوزان و فروند نسبت به تیمار کنترل بود ($p < 0.05$). با توجه به بهبود شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی و همچنین افزایش عیار ضد آنروموناس هیدروفیلا در ماهیان ایمن شده با واکسن به همراه نانوکیتوزان، می‌توان افزایش محافظت واکسن و کاهش تلفات بعد از چالش را به بهبود این شاخص‌های ایمنی نسبت داد، بطوریکه علاوه بر آزادسازی تدریجی آنتی ژن در این تیمار، عرضه بهتر آنتی ژن به سلول‌های دفاعی و افزایش سایتوکین‌های دخیل در مراحل تکوین پاسخ ایمنی مقاومت بیشتر ماهی در برابر عفونت تجربی را باعث شده است. در تحقیقی مشابه نانوکیتوزان به عنوان ادجوان واکسنی در واکسن DNA بیماری لمفوسیتسیس باعث افزایش بازماندگی بدنبال چالش ویروسی در ماهی توربوت شد (۵۰). همچنین تجویز کیتوزان باعث افزایش بازماندگی در ماهی کپور معمولی بعد از تزریق *Aeromonas hydrophila* شده است (۲۰، ۳۲). در موش سوری نیز افزایش کارایی واکسن آنفلوآنزا بدنبال استفاده از نانوکیتوزان به عنوان ادجوان واکسنی گزارش شده است (۱۴). نتایج مشابهی از تأثیر کیتوزان بر قزل‌آلای جویباری و قزل‌آلای رنگین کمان بعد از عفونت تجربی با *Aeromonas salmonicida* بدست آمده است (۴۳، ۶).

نتایج بدست آمده از اثر ادجوان فروند بر فاکتورهای ایمنی در ماهیان واکسینه شده نیز حاکی از تأثیر مثبت این ادجوان بر اغلب پارامترهای مورد مطالعه (عیار آنتی بادی، جمعیت لکوسیتی، فعالیت لیزوزیم، کمپلمان و احیای NBT) می‌باشد که از این نظر با نتایج حاصل از تحقیقات مشابه روی تأثیر ادجوان فروند بر کارایی واکسن آنروموناس سالمونیسیدا در ماهی آزاد مطابقت دارد (۳۶، ۳۷).

بطور کلی به نظر می‌رسد کوچک نمودن ذرات کیتوزان در حد نانو نه

و نوتروفیل‌ها می‌باشند، افزایش در سطوح لیزوزیم سرم در تیمارهای واکسینه می‌تواند بدلیل افزایش تعداد و درصد سلول‌های تولیدکننده لیزوزیم از جمله هتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در خون باشد (۴۴) که نتایج حاصل از شمارش جمعیت لکوسیتی موید این مطلب است. افزایش فعالیت لیزوزیم به دنبال تحریک ایمنی ماهی در تحقیقات مختلف گزارش شده است. در مطالعه Aathi و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Tafi و همکاران در سال ۱۳۹۲ تجویز خوراکی کیتوزان به کپور ماهی هندی (Labeo rohita) و قزل‌آلای رنگین کمان باعث افزایش قابل توجه در فعالیت لیزوزیم سرم شده است (۱، ۴۸). نتایج مشابهی از تزریق لوامیزول (۲۵) و گلوکان (۱۶) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان حاصل شده است.

پروتئین‌های کمپلمان نیز یکی از فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی هستند که سنجش میزان آن‌ها یکی از راه‌های ارزیابی کارایی واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی محسوب می‌شود (۱۶). مطالعات نشان می‌دهد که مسیر فرعی کمپلمان در پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان استخوانی بسیار حائز اهمیت است (۷). سنجش میزان فعالیت کمپلمان در این مطالعه نشان داد که فعالیت کمپلمان در ماهیان ایمن شده با واکسن همراه ادجوان نانوکیتوزان و فروند در هر سه مرحله نمونه‌گیری نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته است ($p < 0.05$). این افزایش فعالیت را می‌توان به افزایش میزان و نیز فعالیت اجزای کمپلمان نسبت داد. فعالیت گلوبول‌های سفید خونی و افزایش تولید سایتوکین‌های مختلف بویژه اینترلوکین‌هایی که در مراحل تولید پروتئین‌های دخیل در ایمنی، بویژه اجزای کمپلمان نقش دارند تحت تأثیر آنتی ژن و نیز ادجوانت قرار می‌گیرند. حضور آنتی ژن واکسنی (بویژه LPS باکتری آنروموناس هیدروفیلا) نیز در فعال سازی کمپلمان از مسیر آلترناتیو نقش دارد. LPS موجود در دیواره باکتری‌های گرم منفی به نوبه خود، تولید فاکتور C5a کمپلمان که یک کموکاین قدرتمند برای سلول‌های نوتروفیل و ماکروفاژ می‌باشد را تحریک می‌کند و بخشی از افزایش کارایی واکسن را می‌توان به این عامل نسبت داد. گزارشات متعددی از افزایش فعالیت کمپلمان بدنبال استفاده از واکسن و محرک‌های ایمنی وجود دارد که از این نظر با تحقیق حاضر همخوانی دارد (۱۶، ۷).

آزمایش احیای NBT یک آزمایش سریع برای تشخیص توانایی سلول‌های بیگانه خوار خون ماهی در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در روند انفجار تنفسی می‌باشد (۱۰). در این تحقیق با انجام این آزمایش مشخص گردید که میزان فعالیت NBT خون ماهیان، در تیمار واکسن حاوی نانوکیتوزان در روز ۱۴ و ۲۸ و در تیمار واکسن حاوی ادجوان فروند در روز ۲۸ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ($p < 0.05$) که این افزایش می‌تواند به دلیل افزایش تعداد و فعالیت سلول‌های بیگانه خوار سیستم دفاعی ماهی باشد. این افزایش بیگانه خواری یا به دلیل اثرات اپسونین پروتئین‌های ایمنی، بویژه لیزوزیم، اجزای کمپلمان و نیز پادتن‌ها ایجاد شده و یا به دلیل تأثیر بر روند بیگانه خواری و تحریک



References

1. Aathi, K., Ramasubramanian, V., Uthayakumar, V., Munirasu, S. (2013) Effect of supplemented diet on survival, growth, hematological, biochemical and immunological responses of Indian major carp *Labeo rohita*. *Int Res J Pharm.* 4:141-147.
2. Abdou E.S., Nagy, S.A., Elsabee, Z.M. (2008) Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresour Technol.* 99: 1359-1367.
3. Aguilar, J.C., Rodriguez, E.G. (2007) Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine.* (25-19): 3752-3762.
4. Alishahi A. and Auder, M. (2012) Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review. *Food Bioprocess Tech.* 5:817-830.
5. Altun S., Kubilay, A.C., Ekici, S., Işıl, B., 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.
6. Anderson, D.P., Siwicki, A.K. (1994) Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *Prog Fish Cult.* 56: 258-261.
7. Aravena, A.R., Sandino, A.M., Spencer, E. (2013) Nanoparticles and microparticles of polymers and polysaccharides to administer fish vaccines. *Biol Res.* 46: 407-419.
8. Audran, R., Peter, K., Dannull, J., Men, Y., Scandella, E., Groettru, M., Gander, B., Corradin, G. (2003) Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. *Vaccine.* 21(11-12):1250-1255.
9. Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y. (2009) Toxicity assessments of multi-sized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos, *Small.* 5: 1897-1910.
10. Baulny, M.O.D., Quentell, C., Fournierl, V., Amour, F., Le gouvello, R. (1996) Effect of long-term oral administration of β -glucan as an

تنها باعث جذب بهتر و اثرات تحریک ایمنی بیشتر کیتوزان می‌گردد، بلکه اثرات ادجوانی بهتر آنرا باعث می‌گردد (۷،۸،۱۲).

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت، نگارندگان از جناب آقای دکتر زارعی به دلیل مشاوره و همکاری در تهیه نانو کیتوزان و سرکار خانم دکتر زهرا طولابی دزفولی در مراحل انجام تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis Aquat Org.* 26:139-147.

11. Behera, T., Nanda, P.K., Mohanty, C., Mohapatra, D., Swain, P., DAS, B.K., Routray, P., Mishra, B.K., Sahoo, S.K. (2010) Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 28:320-325.
12. Diwan, M., Elamanchili, P., Lane, H., Gainer, A., Samuel, J. (2003) Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human cord blood derived dendritic cells for induction of primary T cell responses. *J Drug Target.* 11(8-10):495-507.
13. Du, Y., Zhao, Y., Dai, S., Yang, B. (2009) Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innov Food Sci. Emerg.* 10: 103-107.
14. Dzung, H.N., Hong, V.D.T., Phuong, N.T., Quynh, N.T., Hiep, D.M. (2011) Chitosan Nanoparticle as a Novel Delivery System for A/H1N1 Influenza Vaccine: Safe Property and Immunogenicity in Mice. *World Academy of Science, J. Engine Technol.* 60:1839-1847.
15. Ellis, A.E. (1990) Lysozyme assays. In: *Techniques in fish immunology*, Fair Haven NJ: SOS Publications. Stolen, J.S, Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (eds.) p. 101-103.
16. Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E. (1992) Yeast glucan induces increase in lysozyme and



- complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 287-297.
17. Evensen, O., Brudeseth, B., Mutoloki, S. (2005) The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish- effects and adverse effects. *Progress in Fish Vaccinology*, 16: 117-125.
 18. Fredriksen, B.N., Grip, J. (2012) PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vaccine*. 30:656-67.
 19. Fujimura, Y., Akisada, T., Harada, T., Haruma, K. (2006) Uptake of microparticles into the epithelium of human nasopharyngeal lymphoid tissue. *Med Mol Morphol.* 39: 181-6.
 20. Gopalakannan, A., 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.
 21. Habeeb, F., Stables, G., Bradbury, F., Nong, S. (2007) The inner gel component of Aloe vera suppresses bacterial-induced pro-inflammatory cytokines from human immune cells. *Methods*, 42: 388-393.
 22. Harikrishnan R., Kim M.C., Kim J.S., Han Y.J., Jang I.S., Balasundaram, C., SooJanga, I., Balasundaramb, C., Heoa, M. S. (2010) Immune response and expression analysis of cathepsin K in goldfish during *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunol.* 28: 511-516.
 23. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2012) *Inonotus obliquus* containing diet enhances the innate immune mechanism and disease resistance in olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*. *Fish Shellfish Immunol.* 32: 1148-1154.
 24. Harikrishnan, R., Nisha, M.R., Balasundaram, C. (2003) Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. 221: 41-50.
 25. Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N., Davis, S.S. (2001) Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 51: 81-96.
 26. Ispir, U., Dorucu, M. (2005) A study on the effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turk J Vet Anim Sci.* 29:1169-1176.
 27. Iwama, G., Nakanishi, T. (1996) The fish immune system: organism, pathogen and environment. *Fish physiology*, vol. 15, (1st ed.) Academic Press, San Diego. p. 12-42, 64-67, 105-139.
 28. Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S, Kobayash, M. (1990) The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.* 25:93-98.
 29. Khushiramani, R., Girisha, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2007) Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish. *Protein Expr Purif.* 51: 303-307.
 30. Li, X., Kong, X., Shi, S., Zheng, X., Guo, G., Wei, Y., Qian, Z.H. (2008) Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnol.* 2008. 8: 89.
 31. Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L., Luo, L., 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.
 32. Lin, S., Pan, Y., Luo, L., Li, L. (2011) Effects of dietary β -1, 3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi). *Fish & Shellfish Immunol.* 31: 788-794.
 33. Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M.H., Balange, A.K. (2010) Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Int Aquat Res.* 2: 77-85.
 34. Matsuyama T., Fujiwara A., Nakayasu C., Kamaishi T., Oseko N., Ikuo Hirono, I., Aoki, T. (2007) Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Fish and Shellfish Immunol.*



- 22: 598-607.
35. Nakhla, A.N., Szalai, A.J., Banoub, J.H., Keough, K.M.W. (1997) Serum anti- LPS antibody production by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to the administration of free and liposomally-incorporated LPS from *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunol.* 7:387-401.
36. Nayak, D.K., Asha, A., Shankar, K.M., Mohan, C.V. (2004) Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus*- a carnivore model. *Fish and Shellfish Immunol.* 16: 613-619.
37. Olivier, G., Evelyn, T.P.T., Lallier, R. (1985) Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Dev Comp Immunol.* 9: 419-432.
38. Paterson, W.D., Fryer, J.L. (1974) Immune responses of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to *Aeromonas salmonicida* cells administered intraperitoneally in Freund's complete adjuvant. *J Fish Res.* 31: 1751-1755.
39. Rohovec, J.S., Winton, J.R., Fryer, J.L. (1981) Bacterins and vaccines for control of infectious diseases in fish. National science councils Taipei, taiwas, Republic of china. 2: 115-121.
40. Sahoo, P.K., Kumarai, J., Mishra, B.K. (2005) Nonspecific immune responses in juveniles of Indian major carps. *J Appl Ichthyol.* 21: 151-155.
41. Schaperclaus, W., Kulow, H., Schreckenbach, K. (1991) Hematological and serological technique. In: *Fish Disease*. Kothekar, V.S. (ed.) (2nd ed.). Connaught circus, Gulab primlani, Oxonian press Pvt. Ltd. New Delhi, India. p. 71-108.
42. Selvaraj, V., Sampath. K. and Sekar. V. (2005) Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunol.* 19: 293-306.
43. Shen, P., Fan, X., Li, G. (1999) *Microbiology experiment*. (3rd ed.) Beijing: Higher Education Press; [in Chinese] 165e167.
44. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. (1994) Dietary intake of Immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 41: 125-139.
45. Soltani, M., Pourgholam, R. (2007) Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinon. *J Vet Res.* 62:49-52.
46. Sonia, T.A., Sharma, P. (2011) Chitosan and Its derivatives for drug delivery perspective, *Adv Polym Sci.* 243: 23-54
47. Sun, Y., Liu, C.S., Sun, L. (2011) A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunol.* 31: 595-599.
48. Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo S.D., Gupta P.K., Meher, N. (2007) Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunol.* 22: 38-43.
49. Tafi, A.A., Meshkini S., Tukmechi, A. (1392) Effects of Chitosan on some immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and enhance resistance against a pathogenic *Aeromonas hydrophila* following experimental infection. *J Animal Res.* 26:468-477.
50. Tian, J.Y., SUN, X.Q., CHEN, X.G. (2008) Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus (LCDV) to Japanese flounder. *Fish Shell fish Immunol.* 24:592-599.
51. Zheng, Z., Yingeng, W., Qingyin, W., Nannan, D., Meijie, L., Jiangbo, Q., Bin, L., Lan, W.I. (2012) Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. *Fish and Shellfish Immunol.* 32: 391-395.
52. Zheng, F.R., Sun, X.Q., Liu, H.Z., Zhang, J.X. (2006) Study on the distribution and expression of a DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture.* 261:1128-1134.



Adjuvant effects of nanochitosan on immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* vaccine in *Cyprinus carpio*

Alishahi, M.^{1*}, Hajipour, O.², Ghorbanpur, M.³, Mesbah, M.¹

¹Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

²Student of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

(Received 26 August 2017, Accepted 13 December 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Recently chitosan nanoparticles have been applied as an immunostimulant and adjuvant in biomedical fields. **OBJECTIVES:** In this study the adjuvant effects of nanochitosan, derived from shrimp shell's chitin, on immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* vaccine in common carp were evaluated. **METHODS:** Totally 300 juvenile common carp (51±5.6 g, Mean ±SD) were randomly divided into four groups, each contained three subgroups with 25 fishes. Groups 1, 2 and 3 were immunized intraperitoneally with *A. hydrophila* vaccine. No adjuvant was used in group 1, but nanochitosan and Freund adjuvant were used with vaccine in groups 2 and 3 respectively. Group 4 (Control) was injected with normal saline instead of vaccine. Fish were immunized at days zero and 14 and fishes were reared in the same situation for 6 weeks. Serum samples were taken every other week and immunological parameters including WBC, serum lysozyme and bactericidal activity, serum complement activity, NBT reduction activity, total protein and globulin levels and anti *A. hydrophila* antibody titer were compared among the groups. At the end of experiment all groups were challenged with LD50 concentration of *A. hydrophila* and mortality was recorded for ten days. **RESULTS:** WBC, serum lysozyme and complement activity, NBT activity, globulin level and anti *A. hydrophila* antibody titer were increased in nanochitosan and Freund groups compared to control group ($p < 0.05$). Serum bactericidal activity and serum albumin level showed no significant change among the groups ($p > 0.05$). Challenge mortality decreased in immunized groups compared to control. **CONCLUSIONS:** Nanochitosan possess proper adjuvant effects which is comparable with Freund adjuvant and can be a good candidate as an alternative to current adjuvant in fish vaccines.

Keyword: Nanochitosan, adjuvant, *Cyprinus carpio*, *Aeromonas hydrophila*

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Comparison of some immunological parameters among the experimental treatments in different sampling points. Data expressed as Mean±SD, different letters show significant difference ($p < 0.05$) among groups.

Graph 1. Comparison of serum lysozyme activity among the experimental treatments in different sampling points. Data expressed as Mean±SD, different letters show significant difference ($p < 0.05$) among groups.

Graph 2. Comparison of WBC among the experimental treatments in different sampling points. Data expressed as Mean±SD, different letters show significant difference ($p < 0.05$) among groups.

Graph 3. Comparison of serum complement activity among the experimental treatments in different sampling points. Data expressed as Mean±SD, different letters show significant difference ($p < 0.05$) among groups.

Graph 4. Comparison of NBT activity of WBC among the experimental treatments in different sampling points. Data expressed as Mean±SD, different letters show significant difference ($p < 0.05$) among groups.

Graph 5. Comparison of anti *A. hydrophila* antibody titer among the experimental treatments in different sampling point. Data expressed as Mean±SD, different letters show significant difference ($p < 0.05$) among groups.

Graph 6. Cumulative mortality following challenge with live *Aeromonas hydrophila*.



*Corresponding author's email: alishahim@scu.ac.ir, Tel: 061-33330072, Fax: 061-33360807

J. Vet. Res. 73, 1, 2018