بهره گیری از غذای زنده غنی شده با واکسن در آبزیان جهت پیشگیری از بیماری های اخطار کردنی سازمان OIE

سید جلیل ذریه زهرا[1*]، محمدرضا مهرابی[1]، مسعود صیدگر[2]

1- بخش بهداشت و بیماری های آبزیان ، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، تهران، ایران

2- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

*آدرس الکترونیکی نویسنده مسئول: zorrieh@yahoo.com

مقدمه

نیاز به پروتئین و توسعه صنعت آبزی پروری در س ل های اخیر رشد سریعی داشته است، از سوی دیگر شرایط حاکم بر محیط‌های پرورشی ماهیان و تراکم بالای آن‌ها، ماهیان را در معرض انواع بیماری‌ها قرار داده است. در میان مشکلاتی که صنعت آبزی‌پروری با آن روبروست، بروز بیماری‌های عفونی از اهمیت بالایی برخوردار است؛ به طوری که بر اساس آمار رسمی کشور سالیانه در حدود ده درصد از کل آبزیان پرورشی بر اثر عفونت‌های باکتریایی تلف می‌شوند. سالهاست مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف برای مهار بیماری‌های باکتریایی و انگلی در ماهیان پرورشی مورد استفاده قرار گرفته، اما این مواد اغلب اثرات جانبی نامطلوب از قبیل تجمع در گوشت ماهی، افزایش مقاومت دارویی و آلودگی محیط زیست ایجاد می‌کنند، بنابراین اکثر تلاش‌ها بر پیشگیری از بیمارها متمرکز شده است. در این میان واکسیناسیون ماهیان راهی مناسب برای افزایش میزان ایمنی بدن ماهی در برابر عوامل بیماریزای رایج است. مطالعات در زمینه ایمونولوژی ماهی رو به افزایش هستند؛ استفاده از واکسن‌های ضد باکتری و ویروسی، نتایج خوبی در بسیاری از آبزیان داشته که یکی از مزیت‌های آن کاهش استفاده از داروهای ضد میکروبی در محیط‌های آبزیان بوده است. برنامه‌های ایمن‌سازی در برابر بیماری‌ها برای استفاده پیشگیرانه‌ای که برای حفظ سلامتی حیوانات آبزی بی‌خطر هستند، ضروری می‌باشند. عمده‌ترین مزیت استفاده از واکسیناسیون و محرک‌های ایمنی از نظر بهداشت عمومی، به حداقل رساندن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی است. در واقع با توسعه فرهنگ استفاده از محرک‌های ایمنی و واکسن‌ها در این صنعت احتمال وقوع بیماری به حداقل رسیده و پرورش دهنده مجبور به استفاده از آنتی بیوتیک به منظور درمان یا حتی پیشگیری از بیماری‌های واگیر و غیرواگیر ماهیان نخواهد بود. از نظر اقتصادی هم، هزینه پیشگیری و ایمن کردن ماهیان پایین‌تر از هزینه‌های درمانی است و زیان‌های مرگ و میر و تلفات احتمالی نیز برای پرورش‌دهنده بسیار کاهش می‌یابد. ضمن آنکه میزان رشد، ضریب تبدیل غذایی و توجیه اقتصادی نیز در صورت استفاده از واکسیناسیون و محرک‌های ایمنی بهبود می‌یابد. در گذشته واکسن‌های نسل اول به سادگی از باکتری‌های بیماری‌زای کشته شده با حرارت یا فرمالین (غیر فعال) تهیه می‌شدند. واکسن های پیشرفته مانند واکسن‌های DNA نوترکیب و واکسن‌های تحویل‌دهنده با میانجیگری ذرات نانو نیز محصولات پژوهشی جدید هستند. مزایا و معایب بسیاری در انواع واکسن‌ها وجود دارد. برای مثال واکسن زنده تخفیف حدت یافته تحت شرایط خاص، می‌تواند حدت خود را با قرار گرفتن در معرض میزبان مناسب از بین ببرد و در برخی موارد موجب بروز بیماری‌های نوظهور و مهلکی گردد. از سوی دیگر واکسن‌های کشته شده نیز، خاصیت ایمنی زایی خود را از دست می دهند و برای ایجاد حفاظت طولانی، ممکن است نیاز به تکرار دوزهای یادآور داشته باشند.

روش‌های واکسیناسیون در ماهی‌ها

برای واکسیناسیون ماهی ها معمولاً از سه روش اساسی ذیل استفاده می‌شود که شامل روش خوراکی، روش غوطه وری ماهی در مایه واکسن آماده شده و روش تزریق واکسن در عضله یا داخل پرده صفاقی (در محوطه شکمی) است. کاربرد این سه روش به شرح ذیل می باشد:

1- روش خوراکی یا مایه کوبی همراه غذا: در این روش واکسن همراه غذا وارد بدن ماهی می شود. باید تأکید نمود که هر گاه آنتی ژن بدون محافظ یا کپسول همراه غذا وارد بدن ماهی شود، موجب پایین آمدن کیفیت واکسن به علت مجاورت در حرارت محیط و یا اسیدی بودن محیط گوارشی گردد. از طرفی باید کپسول واکسن به گونه ای آماده شود که واکسن به محیط خارج نشت نکند و در محیط مناسب کپسول حل شده و واکسن توسط بافت های مخاطی بدن بتدریج جذب گردد. در واکسیناسیون ماهیان به روش خوراکی می‌توان از کپسول‌های زنده (ترکیب واکسن همراه آرتمیا) استفاده کرد. واکسیناسیون به این روش به دلیل سهولت تجویز، استرس و هزینه کم و قابل استفاده بودن در دوره‌های مختلف زندگی ماهی دارای مزیت می‌باشد. ضمن آنکه در این روش به دلیل عدم تخریب آنتی ژن در لوله گوارش قبل از جذب روده‌ای و با استفاده از ادجوان واکسن های پلی والان خوراکی می توان کارایی واکسن را افزایش داد.

آرتمیا غذای آغازی بسیار باارزشی است که بیشتر آبزیان می‌توانند از آن استفاده کنند و تقریباً بعنوان بهترین غذای داده شده به لاروهای چندین گونهٔ ماهیان پرورشی و تزئینی طی دوره ابتدائی تغذیهٔ خارجی از آن استفاده میشود. تغذیه لاروها و بچه ماهیان با آرتمیای غنی سازی شده با واکسن علاوه بر افزایش میزان رشد و بازماندگی در طی دوره لاروی ماهیان، این مزیت را دارد که از بیماریهای مهلک ماهیان نیز پیشگیری می نماید.

بدین منظور محلول واکسن را با نسبت 1 به 10 به آب افزوده و پس از همگن نمودن آن، به مقدار 30 تا 50 میلی لیتر از آن را به ازای هر لیتر آب انکوباتور حاوی ناپلیوس آرتمیا (مرحله اینستار 1) افزوده و پس از 9 ساعت که غنی‌سازی کامل گردید می‌توان از آنها برای تغذیه لارو و بچه ماهیان به منظور واکسیناسیون استفاده نمود.

روش خوراکی روش بسیار مناسبی است و استرس هنگام انجام کار در ماهی‌ها ایجاد نمی‌شود. ولی باید تأکید کرد که مدت زمان پایداری و ثبات واکسن بسیار محدود و مدت زمان ایمنی حاصله نیز کوتاه خواهد بود. باید یادآوری نمود که اگر چه روش استفاده از واکسن های خوراکی از نقطه نظر پرورش دهندگان ماهی روش انتخابی مناسبی است ولی تعداد کمی از این گونه واکسن ها در بازار وجود دارند و اغلب در مراحل پژوهشی خود می باشند. از سوی دیگر نتایج مبهمی نیز در مورد کارایی و مدت محافظت در مورد واکسیناسیون خوراکی توسط محققین مختلف گزارش شده است (Vandenberg, 2004). جنس‌های مختلف ماهی مکانیسم‌های جذب آنتی ژنی و پاسخ‌های ایمنی متفاوتی نشان می‌دهند. برای مثال، کپورماهیان که فاقد معده هستند ممکن است به دلیل عدم وجود آنزیم های پروتئولیتیک گوارشی، واکسن های خوراکی را بهتر جذب کنند (Vandenberg, 2004).

روش واکسیناسیون خوراکی را می توان برای تجویز واکسن‌های یادآور (تقویتی) در فواصل منظم برای واکسن‌هایی که به سایر روش ها تجویز می شوند نیز به کار برد.

2- روش غوطه وری مایه کوبی به روش فرو کرون ماهی در مایه واکسن: بافت پوششی پوست و آبشش ها با مکانیسم های اختصاصی، ماهی ها را در مقابل بیماری ها حمایت می‌کنند. مایه کوبی از طریق ایمرزیون (روش غوطه وری ماهی) در مایه واکسن به قدرت جذب سطوح مخاطی که عوامل بیماریزا با آن در تماس هستند بستگی دارد. وقتی که ماهی ها در آب محتوی واکسن فرو برده می شوند سوسپانسیون حاصله از آنتی ژن های واکسن به وسیله پوست و آب شش ها جذب می شوند؛ سپس سلول های اختصاصی مثل سلول های ترشح کننده پادتن که در پوست و آبشش ها حضور دارند فعال شده و ماهی‌ها را در مقابل پاتوژن های فعال حمایت می کنند. به عبارت دیگر سلول های موجود در اپیتلیوم و آبشش ها مانند سلول های معرفی کننده آنتی ژن ها (ماکروفاژها)، واکسن را جذب کرده و آن ها را به بافت های اختصاصی که باعث تولید و برقراری پاسخ های ایمنی می شوند، منتقل می کنند.

در مایه کوبی به روش فرو بردن از دو روش استفاده می شود که شامل فرو بردن عمقی ماهی ها در مایه واکسن و حمام کردن یا غوطه ور کردن ماهی ها در مایه غلیظ واکسن است که در زیر شرح داده می شود:

در روش فرو بردن ماهی در مایه واکسن، ماهی ها برای مدت کوتاهی در یک سوسپانسیون واکسن برای مدت ۳۰ ثانیه فرو برده می شوند. ولی در روش حمام دادن، ماهی ها برای یک دوره طولانی معمولاً یک تا چند ساعت با سوسپانسیون واکسن رو به رو می شوند. از دو روش انتخابی و متفاوت، مایه کوبی به روش فرو بردن عمقی ماهی در سوسپانسیون غلیظ واکسن به طور وسیعی استفاده می شود و با استفاده از روش مزبور تعداد زیادی از ماهی ها را می‌توان واکسینه کرد (۱۰۰ کیلو ماهی برای هر لیتر واکسن) روش فرو کردن ماهی در سوسپانسیون واکسن در ماهی های نوزاد به وزن ۵-۱ گرم به طور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد.

به طور کلی روش فرو کردن ماهی ها در سوسپانسیون واکسن یک روش مؤثری است که نتیجه آن حمایت و ایمنی ماهی ها در برابر عفونت است. معذالک باید اضافه کرد که مدت زمان ایمنی طولانی نیست و ضرورت دارد مایه کوبی مجدد بعد از مدتی انجام بشود. این روش برای ماهی های بزرگ به دلیل ایجاد استرس در موقع واکسیناسیون چندان کاربردی ندارد و از نظر اقتصادی هم روش مزبور با صرفه نیست. لازم به یادآوری است که در ماهی هایی با وزن کمتر از یک گرم امکان دارد هنوز سیستم ایمنی کاملاً رشد نکرده باشد و در نتیجه ممکن است کیفیت واکسن مطلوب نباشد و ایمنی زائی مناسبی نیز حاصل نگردد.

3- واکسیناسیون تزریقی: بطور کلی پرورش دهندگان ماهی به دلیل احتمال ایجاد تلفات بالا همراه با استرس زیاد به مایه کوبی با روش تزریق چندان علاقه ای ندارند. بررسی های متعددی نشان داده اند که اساساً روش تزریق واکسن در ماهی ها به ویژه ماهی های سالمون تلفات قابل توجهی ندارند. ولی امکان دارد تعداد بسیار محدودی از ماهی هایی که ضعیف هستند در اثر دستکاری در ضمن مایه کوبی تلف بشوند. بیهوشی در حد بسیار پایین برای مایه کوبی از راه تزریق مورد نیاز است زیرا با استفاده از بیهوشی سبک استرس در ماهی‌ها به وجود نیامده و جراحات مکانیکی نیز در محل تزریق کمتر ایجاد می شود و نیز ماهی های واکسینه پس از گذراندن مدت زمان کمی به حالت اولیه برگشته و سلامتی خود را به طور کامل به دست می آورند. از طرفی هر گاه واکسن به نحو مطلوبی تزریق شود مرگ و میر بعد از مایه کوبی از ۰/۲۵ درصد تجاوز نمی‌کند ولی مرگ و میر بیشتر مشخص کننده به کارگیری ناصحیح ماده بیهوشی، دستکاری طولانی همراه استرس بالا، استفاده نادرست از سوزن، مایه کوبی ماهی های ضعیف و بیمار و کمبود اکسیژن محیط است.

مایه کوبی به روش تزریق شامل تزریق در عضله یا داخل پرده صفاقی (حفره شکمی) است که روش داخل صفاقی بسیار معمول تر است. سوزن های مورد استفاده در موقع تزریق باید یک تا دو میلی متر در حفره شکمی ماهی فرو برده شود، زیرا با سوزن های کوتاه ممکن است واکسن وارد عضله شده و در نتیجه باعث تورم و پایین آمدن کیفیت واکسن شود. همچنین سرعت ایجاد پاسخ های ایمنی به درجه حرارت محیط نیز بستگی دارد. معمولاً چند هفته طول می کشد تا ایمنی کامل ماهی ها بعد از مایه کوبی به دست بیاید بنابراین توصیه می شود بعد از مایه کوبی در هفته های نخست، حتی الامکان نباید کاری کرد که در ماهی‌ها استرس ایجاد شود.

مایه کوبی از راه تزریق با امتیازاتی که در بردارد می تواند روش انتخابی برای مایه کوبی محسوب شود. در مایه کوبی از راه تزریق ایمنی طولانی‌تری (بیش از یک سال) در ماهی ها ایجاد می شود و حتی در این روش پرورش دهندگان ماهی مطمئن می‌شوند که دُز کافی از واکسن وارد بدن ماهی می شود. از طرفی می‌توانند مجموعه ای از واکسن ها مثلاً چند واکسن را با یک تزریق وارد بدن ماهی کنند. همچنین یک دز واکسن برای ماهی‌ها برابر با ۰/۲-۰/۱ میلی لیتر است. از نقطه نظر کاربردی بهتر است در ماهی هایی که وزن آن ها بیشتر از ۱۰ گرم باشد از روش تزریق برای مایه کوبی استفاده کنند.

به طور گسترده، تزریق داخل صفاقی آنتی ژن ها به ماهی ها به عنوان مناسب ترین روش در نظر گرفته می شود. هم اکنون، واکسیناسیون، در کشورهایی که انجام می شود بیشتر بوسیله تزریق در مقایسه با سایر روش ها انجام می شود (Gudding and Van Muiswinkel, 2013). یکی از اولین واکسن های استفاده شده در ماهی، که در کشور نروژ به ثبت رسیده، سوسپانسیون نمکی (بر پایه آبی) ساده ای از باکترین هایی بود که به روش داخل صفاقی تزریق شده بودند. با وجود این، این واکسن های مبتنی بر پایه آبی، خیلی محافظت کننده نبودند و بویژه بعد از شیوع ناگهانی آئروموناس سالمونیسیدا درآبزی پروری نروژ به واکسن های مبتنی بر پایه روغنی مبدل شدند (Freund's adjuvants). از آن به بعد، آنتی ژن های معلق شده در روغن، روش انتخابی تزریقی به ماهی هستند. همچنین واکسن های با پایه روغن محافظت خیلی طولانی مدتی از مرحله انگشت قدی تا صید ایجاد می کنند. تغییر به سمت واکسن های بر پایه روغنی بدون مشکل هم نبود. یکی از مشکلات مهم، کاهش درجه بازاری سالمون یعنی میزان

رشد نامطلوب بود. یکی دیگر از اثرات شناخته شده، واکنش های ایجاد شده در محل تزریق بود. حتی در حال حاضر در برخی کشورها، واکسیناسیون ماهی بطور دستی انجام می شود که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست. ابداع دستگاه های واکسیناسیون اتوماتیک این مشکل را تا حدی حل کرده است هر چند دارای محدودیت های اقتصادی است (Brudeseth *et al*., 2013). همچنین واکسیناسیون تزریقی در مراحل لاروی ماهی ها امکان پذیر نیست چون مشکل بوده و به نیروی کاری زیاد نیاز دارد ولی بیشترین میزان مرگ و میر در مراحل لاروی ماهی ها رخ می‌دهد (Gudding and Van Muiswinkel, 2013).

وضعیت فعلی و چشم انداز آینده واکسیناسیون ماهیان

تولید واکسن اختصاصی موثر و کارآمد برای هر عامل بیماری زای خاص بسیار وقت گیر و پر هزینه است. ساز و کارهای واکسیناسیون در آینده ممکن است با هدف افزایش کارایی و اثر بخشی واکسن های موجود با استفاده از ترکیبات مکمل بهبود دهنده به نام ادجوانت ها (یاور) ساخته شوند. فقط ادجوانت های ابتدایی، در صورت وجود، در صنعت آبزی پروری استفاده می شود (Midtlyng *et al*., 1996). با وجود این، بسیاری از عوارض جانبی از جمله ضایعات موضعی ایجاد شده در محل تزریق ، تغییر رنگ نامطلوب فیله ماهیان در اثر تزریق واکسن گزارش شده است (Midtlyng, 1996) .

از این عوارض جانبی باید با استفاده از افزودن ادجوانت های اصلاح شده تکمیلی و شاید با استفاده از ترکیبات محرک ایمنی با میانجی گری ذرات نانو (ISCOMs) مانند کیتوزان که قادر به درگیر کردن هر دو نوع ایمنی هومورال و سلولی هستند به منظور بقاء و ایجاد مقاومت بهتر نسبت به بیماری باید اجتناب شود. علاوه بر واکسن های موجود، بسیاری از واکسن های پیشرفته تر توسط متخصصین ایمنی شناسی ماهی در سراسر جهان تولید شده یا در حال ساخت هستند. یکی از نمونه های جذاب توسعه یافته، تولید واکسن های DNA است. بسیاری از واکسن‌های DNA نتایج قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی بویژه در برابر عوامل بیماری زای ویروسی نشان داده اند (Evensen and Leong, 2013). تحویل واکسن با استفاده از میانجی های نانوذرات چشم انداز امیدوارکننده دیگری است که نیاز به تحقیقات بیشتر در آینده دارد (Zhao *et al*., 2014).

منابع

1. Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., ... & Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. Fish & shellfish immunology, 35(6), 1759-1768.
2. Evensen, Ø., & Leong, J. A. C. (2013). DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. *Fish & shellfish immunology*, *35*(6), 1751-1758.
3. Gudding, R., & Van Muiswinkel, W. B. (2013). A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. Fish & shellfish immunology, 35(6), 1683-1688.
4. Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., & Speilberg, L. (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) against furunculosis. Fish & Shellfish Immunology, 6(5), 335-350.
5. Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, *32*(3), 327-337.