وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور

عنوان:

امکان سنجی تولید انواع واکسن‌های کشته باکتریایی ویبریوزیس – استرپتوکوکوزیس در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی

مجری مسئول:
مینا آهنگرزاده

شماره ثبت
٦٦٠٣٦

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور

عنوان طرح/پروژه: امکان‌سنجی تولید انواع واکسن‌های کشته باکتریایی ویبریوزیس – استرپتوکوکوزیس در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی
کد مصوب: ۹۸۰۳۸-۰۲۷-۱۲-۷٤-۰۱٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: مینا آهنگرزاده
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : مینا آهنگرزاده
نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان استانی: -
نام و نام خانوادگی همکار(ان): -
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): مسعود قربانپور نجف آبادی، سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا
محل اجرا: استان خوزستان
تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۷/۱
مدت اجرا: ۲ سال و ۳ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱٤۰۳
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: امکان سنجی تولید انواع واکسن‌های کشته باکتریایی ویبریوزیس – استرپتوکوکوزیس در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی

کد مصوب: ۹۸۰۳۸-۰۲۷-۱۲-۷٤-۰۱٤

شماره ثبت (فروست): ٦٦٠٣٦ تاریخ: ۱٤۰۳/۷/۸

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مینا آهنگرزاده دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت آبزیان است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۴۰۳/۶/۲۵ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱

۱- جداسازی و شناسایی گونه های دخیل در سپتی‌سمی باکتریایی ماهیان دریایی (باس دریایی، صبیتی و هامور) با تأکید بر سه گونه ی ویبریو هارویی، ویبریو آلجینولیتیکوس و استرپتوکوکوس اینیایی و تعیین حدت و بیماری زایی آنها در ماهی باس دریایی آسیایی ۳

۱-۱- مقدمه ۳

۱-۱-۲-آبزی‌پروری ماهیان دریایی ۳

۱-۱-۳- تولید جهانی پرورش ماهی در قفس ۳

۱-۱-۴- آبزی پروری و پرورش در قفس ماهیان دریایی در ایران ۴

۱-۱-۵- بیماری‌های عفونی در ماهیان دریایی گرمابی ۵

۱-۱-۵-۱- بیماری‌های باکتریایی ۵

۱-۲. مواد و روش کار ۲۶

۱-۲-۱-روش تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده ۲۶

۱-۲-۱-۱- بافرTAE ۲۶

۱-۲-۱-۲- روش تهیه آب DEPC ۲۶

۱-۲-۱-۳- روش تهیه(1X) PBS ۲۶

۱-۲-۱-۴- ژل آگارز ۱/۵% ۲۶

۱-۲-۲- روش تهیه محیط‌های کشت باکتری ۲۷

۱-۲-۲-۱- روش تهیه محیط آگار خون ۲۷

۱-۲-۲-۲- روش تهیه Skim milk ده درصد براي نگهداري باکتري در فريزر ۲۷

۱-۲-۲-۳- روش تهیه گلیسرول ۳۰% براي نگهداري باکتري ۲۷

۱-۲-۲-۴- محیط کشتEYA ۲۷

۱-۲-۳- روش کار ۲۷

۱-۲-۳-۱- نمونه‌برداري و تهيه ماهي ۲۷

۱-۲-۳-۲- جداسازی و خالص‌سازی ۲۸

۱-۲-۳-۳- تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها ۲۸

۱-۲-۳-۴- شناسایی مولکولی جدایه‌ها ۲۹
۱-۲-۴- بررسی ژنوتیپی عوامل حدت به‌وسیله ردیابی مولکولی ژن‌های حدت ۳۳
۱-۲-۴-۱- ویبریو هاروی ۳۳
۱-۲-۴-۲- ویبریو آلجینولینیکوس ۳۴
۱-۲-۴-۳- استرپتوکوکوس اینیایی ۳۵
۱-۲-۵- تعیین LD_{50} جدایه‌های واجد بیش‌ترین عوامل حدت ۳۶
۱-۲-۶- کشت جدایه‌های حاد جهت تعیین LD_{50} ۳۶
۱-۳- نتایج ۳۷
۱-۳-۱- علائم ماهیان بیمار ۳۷
۱-۳-۲- جداسازي و خالص‌سازی باکتري ۳۸
۱-۳-۳- تشخیص اولیه به روش بیوشیمیایی ۳۸
۱-۳-۴- شناسایی مولکولی جدایه های گرم منفی ۳۹
۱-۳-۵-شناسایی مولکولی جدایه های گرم مثبت ۴۱
۱-۳-۶- عوامل حدت باکتری‌های جداشده ۴۲
۱-۳-۶-۱- نتایج ردیابی مولکولی ژن‌های حدت ویبریو هاروی ۴۲
۱-۳-۶-۲- نتایج ردیابی مولکولی ژن‌های حدت ویبریو آلجینولیتیکوس ۴۳
۱-۳-۶-۳- نتایج ردیابی مولکولی ژن‌های حدت استرپتوکوکوس اینیایی ۴۴
۱-۳-۷- ردیابي فاکتورهاي حدت به روش فنوتیپي ۴۵
۱-۳-۸- جدایه‌های واجد بیشترین عوامل حدت ۴۸
۱-۳-۹- میزان LD50 جدایه‌های حاد ۴۸
۱-۳-۱۰- نتایج ثبت باکتری‌ها در بانک جهانی ژن ۵۰
۱-۴- بحث ۵۰
۱-۴-۱- فاکتورهای حدت ۵۴
۱-۵- نتیجه‌گیری نهایی ۶۰
۲- تهیه و بررسی اثر بخشی واکسن های مونووالان ویبریو آلجینولیتیکوس، دی والان ویبریو آلجینو لیتیکوس+ استرپتوکوکوس و پلی والان ویبریو - استرپتوکوکوس اینیایی در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی ۶۱
۲-۱- مقدمه ۶۱

۲-۱-۱-آبزی‌پروری ماهیان دریایی ۶۱
۲-۱-۲- تولید جهانی پرورش ماهی در قفس..... ۶۲
۲-۱-۳- آبزی پروری و پرورش در قفس ماهیان دریایی در ایران ۶۲
۲-۱-۴- بیماری‌های عفونی در ماهیان دریایی گرمابی ۶۳
۲-۱-۴-۱- بیماری‌های باکتریایی ۶۳
۲-۱-۵- گونه های مهم و بیماریزا خانواده ویبریوناسه..... ۷۱
۲-۱-۵-۱- ویبریو هاروی (*V. harveyi*)..... ۷۱
۲-۱-۵-۲- ویبریو آلجینولیتیکوس (*Vibrio alginolyticus*) ۷۳
۲-۱-۶- استرپتوکوکوزیس..... ۷۵
۲-۱-۶-۱- بیماریزایی و حدت در استرپتوکوکوس اینیایی ۷۶
۲-۱-۷- سیستم ایمنی ماهی..... ۷۷
۲-۱-۷-۱- سیستم ایمنی اختصاصی..... ۷۷
۲-۱-۷-۲- دفاع اختصاصي هومورال..... ۷۸
۲-۱-۷-۳- آشنایی با پادگن‌ها و واکنش بدن در مقابل آن‌ها..... ۷۸
۲-۱-۸- آشنایی با واکسیناسیون در آبزی‌پروری..... ۷۸
۲-۱-۸-۱- تاریخچه واکسیناسیون ماهی..... ۷۹
۲-۱-۸-۲- سابقه واکسن آبزیان در ایران..... ۸۱
۲-۱-۹- انواع واکسن در آبزی‌پروری ۸۲
۲-۱-۹-۱- واکسن‌های غیر فعال شده ۸۲
۲-۱-۹-۲- واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته ۸۳
۲-۱-۹-۳- واکسن‌های نوترکیب..... ۸۴
۲-۱-۹-۴- واکسن‌های اتوژن(بومی-منطقه‌ای) ۸۶
۲-۱-۱۰- روش‌های واکسیناسیون در آبزیان..... ۸۶
۲-۱-۱۰-۱- واکسیناسیون به روش خوراکی..... ۸۶
۲-۱-۱۰-۲- واکسیناسیون به روش تزریقی ۸۷
۲-۱-۱۰-۳- واکسیناسیون به روش غوطه وری ۸۸
۲-۱-۱۱- ظرفیت واکسن ۸۹

۲-۱-۱۲- ادجوانت‌ها..... ۸۹
۲-۱-۱۲-۱-انواع و دسته‌بندی ادجوانت‌ها..... ۸۹
۲-۱-۱۲-۲- مکانیسم اثر ادجوانت‌ها و چگونگی اثر آن‌ها بر سیستم ایمنی ۹۰
۲-۱-۱۲-۳- ادجوانت‌های سیگنال ۱ در واکسیناسیون ماهی یا امولسیونهای روغنی..... ۹۱
۲-۱-۱۲-۴- ادجوانت فروند ۹۲
۲-۱-۱۴- واکسیناسیون علیه استرپتوکوکوزیس..... ۹۴
۲-۱-۱۵- مروری بر واکسن‌های ماهی باس دریایی آسیایی ۹۵
۲-۱-۱۵-۱- عوامل موثر در توفیق واکسیناسیون ماهیان ۹۵
۲-۲- مواد و روش کار..... ۹۶
۲-۲-۱- روش تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده ۹۶
۲-۲-۱-۱- روش تهیه(1X) PBS ۹۶
۲-۲-۱-۲- روش تهیه محیط‌های کشت باکتری ۹۷
۲-۲-۱-۳- روش تهیه محیط آگار خون..... ۹۷
۲-۲-۱-۴- روش تهیه Skim milk ده درصد براي نگهداري باكتري در فريزر ۹۷
۲-۲-۱-۵- روش تهیه گلیسرول ۳۰% براي نگهداري باكتري ۹۷
۲-۲-۲- روش تهیه‌ی محلول‌های لازم جهت آزمایش الایزا ۹۷
۲-۲-۲-۱- روش تهیه‌ی بافر پوشاننده ۹۷
۲-۲-۲-۲- روش تهیه‌ی PBST (PBS-Tween) ۹۷
۲-۲-۲-۳- روش تهیه‌ی بافر استات سدیم..... ۹۸
۲-۲-۲-۴- روش تهیه TMB (۱ درصد)..... ۹۸
۲-۲-۲-۵- روش تهیه‌ی محلول سوبسترا - کروموژن برای الایزا..... ۹۸
۲-۲-۲-۶- روش تهیه BSA يك درصد در PBS به عنوان مسدود كننده..... ۹۸
۲-۲-۳- روش کار..... ۹۸
۲-۲-۳-۱- جداسازی و شناسایی باکتری..... ۹۸
۲-۲-۳-۲- بررسی ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی باکترین تهیه‌شده از جدایه‌های حاد ۹۹
۲-۲-۳-۳- آماده‌سازی و افزودن ادجوانت به واکسن ۱۰۰
۲-۲-۳-۴- بررسی استریل بودن باکترین..... ۱۰۰

۲-۲-۳-۵- بررسی بی خطر بودن یا سلامت باکترین..... ۱۰۰
۲-۲-۴- محل انجام آزمایش ۱۰۰
۲-۲-۵- تیمار بندی و ایمن‌سازی ماهی‌ها..... ۱۰۱
۲-۲-۶- تهیه واکسن خوراکی..... ۱۰۳
۲-۲-۷- بررسی کارایی واکسن..... ۱۰۳
۲-۲-۷-۱- نمونه‌گیری جهت اندازه‌گیری پادتن ضد ویبریو هارویی، ویبریو آلجینولیتیکوس و استرپتوکوکوس اینیایی ۱۰۳
۲-۲-۷-۲- مواجهه با باکتري داراى بالاترين حدت..... ۱۰۴
۲-۲-۸-بررسي ايمنى‌زايى (تيتر آنتى‌بادى) باكترين‌هاى استفاده شده در تيمارهاي مورد آزمايش با روش الايز۱۰۵
۲-۲-۸-۱- خالص‌سازي ايمونوگلوبولين‌هاى سرم ماهي باس دريايى آسيايى..... ۱۰۵
۲-۲-۸-۲- تهيه آنتى‌سرم خرگوشى ضد ايمونوگلوبولين ماهي ۱۰۶
۲-۲-۹- انجام آزمايش الايزاي غيرمستقيم ۱۰۶
۲-۲-۹-۱- تهيه آنتي‌ژن سونيكه..... ۱۰۶
۲-۲-۹-۲- دستيابى به رقت‌هاي مناسب از آنتي‌ژن، سرم ماهي، سرم خرگوش و كونژوگه در آزمايش الايز۱۰۷
۲-۲-۹-۳- انجام آزمايش الايزا براي نمونه‌هاي موردبررسى ۱۰۸
۲-۲-۱۰- ارزيابى شاخص‌هاى سرمى ماهيان ۱۰۹
۲-۲-۱۰- ۱- اندازه گيرى ميزان فعاليت كمپلمان سرم..... ۱۰۹
۲-۲-۱۰- ۲- اندازه‌گيرى ليزوزيم سرم ۱۱۰
۲-۲-۱۰- ۳- اندازه گيري پروتئين كل، آلبومين و گلوبولين..... ۱۱۰
۲-۲-۱۱- روش تجزيه‌وتحليل آماري داده‌ها ۱۱۰
۲-۳- نتايج ۱۱۰
۲-۳-۱- تهيه باكترين‌ها ۱۱۰
۲-۳-۲- بررسى استريل بودن باكترين‌ها ۱۱۰
۲-۳-۳- بي‌خطر بودن باكترين‌ها..... ۱۱۱
۲-۳-۴- محافظت‌كنندگى و ايمنى‌زايى باكترين‌ها..... ۱۱۱
۲-۳-۴-۱- محافظت كنندگى بعد از مواجهه با باكترى‌هاى بيماريزا ۱۱۱
۲-۳-۴-۲- محافظت كنندگى بعد از مواجهه با باكترى ويبريو هاروى ۱۱۱

۲-۳-۴-۳- محافظت کنندگی بعد از مواجهه با باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس..... ۱۱۳
۲-۳-۵- نتایج میزان بازماندگی بعد از مواجهه با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی..... ۱۱۶
۲-۳-۶- ایمنی زایی ۱۱۸
۲-۳-۶-۱- عیار آنتی‌بادی روز صفر قبل از ایمن سازی ضد ویبریو هاروی، ویبریو آلجینولیتیکوس و استرپتوکوکوس اینیایی..... ۱۱۸
۲-۳-۶-۲- عیار آنتی‌بادی ضد ویبریو هاروی در ماهیان واکسینه شده با باکترین حاوی ویبریو هاروی.. ۱۱۹
۲-۳-۶-۳- عیار آنتی‌بادی ضد ویبریو آلجینولیتیکوس در ماهیان واکسینه شده با باکترین حاوی ویبریو آلجینولیتیکوس ۱۲۰
۲-۳-۶-۴- عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیایی در ماهیان واکسینه شده با باکترین حاوی استرپتوکوکوس اینیایی ۱۲۱
۲-۳-۷- نتایج ارزیابی شاخصهای ایمنی و سرمی ماهیان: ۱۲۲
۲-۳-۷-۱- فعالیت لیزوزیم سرم ۱۲۲
۲-۳-۷-۲- فعالیت کمپلمان سرم..... ۱۲۳
۲-۳-۷-۳- گلوبولین سرم..... ۱۲۴
۲-۳-۷-۴- پروتئین تام سرم ۱۲۵
۲-۳-۷-۵- آلبومین..... ۱۲۶
۲-۴- بحث ۱۲۷
۲-۴-۱- میزان محافظت‌کنندگی..... ۱۲۹
۲-۴-۲- ایمنی‌زایی..... ۱۳۱
۲-۴-۳- فاکتورهای ایمنی و سرمی غیر اختصاصی..... ۱۳۴
۲-۴-۴- مزیت واکسن های پلی والان..... ۱۳۷
۲-۵- نتیجه‌گیری نهایی..... ۱۳۸
۳- بررسي اثر بخشي و دوره زماني محافظت كنندگي باكترين ويبريو هاروي در ماهي باس دريايي آسيايي *Lates calcarifer*در شرايط مزرعه..... ۱۳۹
۳-۱-مقدمه ۱۳۹
۳-۲-مروری بر منابع ۱۴۵
۳-۲-۱- بیماری‌های باکتریایی در آبزی‌پروری دریایی (پرورش ماهیان دریایی گرم آبی در قفس)..... ۱۴۵

۳-۲-۱-۱- بیماری ویبریوزیس ۱۴۷
۳-۲-۱-۲- عوامل محیطی مستعد کننده بروز بیماری ۱۴۸
۳-۲-۱-۳- تشخیص ۱۴۹
۳-۲-۱-۴- روش انتقال..... ۱۵۰
۳-۲-۱-۵- زیست پذیری و بقاء ۱۵۰
۳-۲-۱-۶- درمان و پیشگیری ۱۵۱
۳-۲-۲- کلیاتی در مورد ویبریو هاروی ۱۵۱
۳-۲-۲-۱- خوشه هاروی و ویبریو هاروی..... ۱۵۱
۳-۲-۲-۲- ویژگی‌های مرفولوژی و بیوشیمیایی..... ۱۵۳
۳-۲-۲-۳- بیماریزایی و عوامل حدت ۱۵۳
۳-۲-۳- معرفی ماهی باس دریایی آسیایی ۱۵۶
۳-۲-۳-۱- تاریخچه پرورش..... ۱۵۷
۳-۲-۳-۲- بیماری‌های مهم ماهی باس دریایی آسیایی ۱۵۸
۳-۲-۴- کلیاتی در مورد واکسیناسیون در آبزی‌پروری ۱۶۰
۳-۲-۴-۱- تاریخچه‌ی واکسیناسیون ماهی ۱۶۰
۳-۲-۴-۲- مروری بر استفاده از واکسن در آبزی‌پروری..... ۱۶۳
۳-۲-۴-۳- واکسیناسیون علیه ویبریوزیس ۱۶۳
۳-۲-۴-۴- روش‌های واکسیناسیون ۱۶۵
۳-۲-۴-۵- کارایی واکسن ۱۶۵
۳-۲-۴-۶- مروری بر فعالیت شرکت‌های تولیدکننده باس دریایی آسیایی درزمینهٔ پیشگیری از بیماری با واکسیناسیون (واکسن‌های ماهی باس دریایی آسیایی)..... ۱۶۶
۳-۲-۵- اهمیت مطالعه تهیه واکسن ویبریو هاروی در کشور..... ۱۶۷
۳-۳-مواد و روش‌ها..... ۱۶۹
۳-۳-۱- روش تحقیق..... ۱۶۹
۳-۳-۱-۳-شرایط مکانی تحقیق..... ۱۶۹
۳-۳-۲-مواد و تجهیزات مورد نیاز..... ۱۶۹
۳-۳-۲-۱- سویه باکتری مورد استفاده ۱۶۹

۳-۳-۲-۲- تجهیزات..... ۱۶۹
۳-۳-۳- آزمایش های ایمنی شناسی ۱۷۳
۳-۳-۴- بررسي علت تلفات در ماهیان واکسینه..... ۱۷۴
۳-۳-۴-۱- جداسازی و خالص‌سازی..... ۱۷۴
۳-۳-۴-۲- شناسایی ملکولی جدایه ها..... ۱۷۵
۳-۳-۵- تعیین درصد محافظت (تعیین درصد بقا نسبی) ۱۷۶
۳-۳-۶- بررسي سطح آنتی‌بادی در تیمارهاي مورد آزمایش..... ۱۷۶
۳-۳-۷- خالص‌سازي ایمونوگلوبولین‌های سرم ماهي باس دریایی آسیایی ۱۷۶
۳-۳-۸- تهیه آنتی‌سرم خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین ماهي ۱۷۷
۳-۳-۹- انجام آزمایش الایزاي غیرمستقیم..... ۱۷۷
۳-۳-۹-۱- به‌دست آوردن رقت‌هاي مناسب از آنتي‌ژن، سرم ماهي، سرم خرگوش و کونژوگه در آزمایش الایزا ۱۷۸
۳-۳-۹-۲- انجام آزمایش الایزا براي نمونه‌هاي موردبررسی ۱۷۹
۳-۳-۱۰- اندازه فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب ۱۸۰
۳-۳-۱۱- روش تجریه‌وتحلیل آماری داده‌ها ۱۸۰
۳-۴-نتایج ۱۸۱
۳-۴-۱-میزان بروز ویبریوزیس ۱۸۱
۳-۴-۲- نتایج تلفات ماهی از بیماری ویبریوزیس..... ۱۸۲
۳-۴-۳- جداسازي و خالص‌سازی باکتري از ماهیان تلف شده ۱۸۳
۳-۴-۴- نتایج شناسایی مولکولی باکتری ۱۸۵
۳-۴-۵- فاکتورهای محیطی ۱۸۶
۳-۵-بحث..... ۱۸۶
۳-۵-۱- ایمنی‌زایی ۱۸۷
۳-۵-۲- میزان محافظت‌کنندگی ۱۸۸
۳-۶- نتیجه گیری نهایی ۱۹۱
منابع ۱۹۳
چکیده انگلیسی..... ۲۱۵

چکیده

در حال حاضر آبزی پروری سریع‌ترین رشد را در صنعت تولید غذا داشته و تقریباً نیمی از غذاهای دریایی مورد نیاز انسان در دنیا را تأمین می کند. گزارش‌های فراوان، از بروز بیماری‌ها و تلفات ناشی از آن‌ها و درنتیجه خسارت اقتصادی در آبزی‌پروری ماهیان دریایی، نشان می‌دهد که بیماری‌ها خصوصا بیماری‌های باکتریایی چالش بزرگ پیش روی توسعه آبزی‌پروری در بیشتر کشورهای پیشگام این صنعت خواهند بود و به‌عنوان یک هشدار برای پرورش دهندگان و برنامه‌ریزان شیلاتی در این کشورها محسوب می‌شوند. باکتری‌ها از جمله پاتوژن‌های بیماری‌زای جدی آبزی‌پروری دریایی می باشند که از آن‌جمله، می توان به بیماری ویبریوزیسیس ناشی از باکتری‌های جنس ویبریو به‌ویژه ویبریو هاروی ویبریو آلجینولیتیکوس در مناطق گرم و معتدله و استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی اشاره کرد که هر ساله خسارت سنگینی به اقتصاد تولید ماهیان دریایی وارد می کنند. شناسایی عوامل دخیل در بروز سپتی‌سمی‌های باکتریایی در ماهیان دریایی پرورشی و تعیین حدت و بیماری‌زایی آنها و در آخر معرفی جدایه‌های حاد منطقه برای اقدامات پیشگیرانه مانند تولید واکسن بسیار حائز اهمیت است. واکسن به عنوان اقتصادی‌ترین، کارآمدترین و روشی با کمترین آسیب به محیط زیست برای محافظت از میزبان در برابر عفونت های باکتریایی مطرح می‌باشد. این طرح در ۳ فاز به ترتیب انجام گردید. جهت انجام این طرح در ابتدا از ۱۳۰ عدد ماهی دریایی پرورشی که مظنون به سپتی سمی باکتریایی بودند، نمونه برداری و شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. تعداد ٤٨ جدایه ویبریو آلجینولیتیکوس، ۳۹ جدایه ویبریو هارویی و ۱۰ جدایه استرپتوکوکوس اینیایی شناسایی شده و ردیابی ژن‌های حدت و فاکتورهای حدت فنوتیپی انجام شد. همچنین کاندید بذر واکسن در بانک ژن جهانی گردید. سپس واکسن به ۳ روش مونو والان ویبریو آلجینولیتیکوس، دی والان ویبریو آلجینولیتیکوس + استرپتوکوکوس اینیایی و پلی¬والان ویبریو آلجینولیتیکوس + استرپتوکوکوس اینیایی + ویبریو هاروی به صورت سلول کامل کشته شده با فرمالین تهیه شد. بررسی ایمنی زایی با ارزیابی میزان آنتی بادی ضدِ ویبریو هارویی، ویبریو آلجینولیتیکوس و استرپتوکوکوس اینیایی با استفاده از روش الایزا و اندازه گیری فاکتورهای سرمی ایمنی غیر اختصاصی شامل: کمپلمان، لیزوزیم، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین انجام شد. جهت ارزیابی کارایی واکسن های تهیه شده، ماهیان با با سوسپانسیون زنده جدایه‌های بذر واکسن (که داراي بیشترین حدت بودند)، به‌صورت داخل صفاقی مواجهه شده و میزان بقای نسبی بعد از چالش مشخص گردید. نتایج نشان داد بیشترین میزان محافظت در گروه پلی والان با بوستر به میزان ۸۵/۷۱% در برابر ویبریو هاروی بود. نتایج آزمایش الیزا نشان داد بالاترین عیار آنتی بادی اختصاصی علیه ویبریو هاروی، ویبریو آلجینولیتیکوس مربوط به گروه واکسینه با باکترین پلی والان با بوستر خوراکی در ۵ هفته و علیه استرپتوکوکوس اینیایی مربوط به گروه واکسینه با واکسن دی والان با بوستر خوراکی و واکسن پلی والان با بوستر خوراکی در ۵ هفته پس از ایمن سازی است. در مرحله آخر محافظت کنندگی واکسن ویبریو هاروی تولید شده در موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی _ شعبه جنوب کشور، در شرایط مزرعه‌ی شرکت پرورش ماهی در قفس طرح توسعه نیکسا انجام شد. بچه ماهی

واکسینه شده به مزرعه قفس منتقل شده و در قفس های آزمایشی در کنار سایر قفس ها، پرورش داده شد. تیتر آنتی بادی در ماهی واکسینه شده به طور قابل توجهی افزایش یافت و تا ۱۲ هفته پس از ایمن سازی نسبت به گروه کنترل معنی دار بود و حفاظت معنی داری در برابر ویبریوزیس در گروه واکسینه شده نسبت به گروه کنترل غیر واکسینه مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از سویه‌های باکتری‌های بیماریزای داخلی کارامد بوده و سبب ایجاد مقاومت و کاهش تلفات در ماهیان می‌شوند و انتخاب واکسن مناسب با واکسن‌های تهیه شده از نمونه باکتری-های بومی و داخلی ارجحیت دارد.

کلمات کلیدی: ماهیان دریایی، سپتی سمی باکتریایی، ویبریو، استرپتوکوکوس، فاکتور حدت، واکسن مونووالان و دی والان و پلی والان، میزان محافظت