مقایسه کارایی و ایمنی‌زایی سه روش تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **مجتبی علیشاهی***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مصطفی حلیمی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مسعود قربانپورنجف‌آبادی**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **احمد عرفان‌منش**: جهاد دانشگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ١٣٩٧ تاریخ پذیرش: بهمن ١٣٩٧

چکیده

در این تحقیق کارایی و ایمنی‌زایی تجویز واکسن دو گانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به سه روش خوراکی، تزریقی و غوطه‌وری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ارزیابی گردید. به این منظور ٦٠٠ قطعه ماهی قزل‌آلا (١٤±٢/١ گرم) به چهار تیمار، هر تیمار در سه تکرار به‌صورت زیر تقسیم گردیدند: تیمار واکسن خوراکی که با خوراک حاوی 10^8 cfu/g به‌مدت دو هفته تغذیه گردیدند، تیمار واکسن تزریقی که با ٠/١ میلی‌لیتر از باکترین دو باکتری به‌میزان 10^9 cfu/ml به‌روش داخل صفاقی تزریق گردید و در تیمار غوطه‌وری ماهی‌ها به‌مدت دو دقیقه در سوسپانسیون واکسنی 10^9 cfu/ml غوطه‌ور گردیدند و تیمار شاهد بدون تجویز واکسن. ماهی‌ها به‌مدت دو ماه تغذیه و نگه‌داری شدند و در روزهای صفر، ٢٠، ٤٠ و ٦٠ شاخص‌های ایمنی شامل: عیار آنتی‌بادی، فعالیت لایزوزیم، کمپلمان و باکتری‌کشی سرم و نیز میزان پروتئین و گلوبولین سرم بین تیمارها مقایسه گردید. سپس تیمارها با هر دو باکتری به‌طور جداگانه چالش داده شدند و تلفات بین تیمارها مقایسه گردید. نتایج نشان داد که تلفات بعد از چالش تیمار واکسن تزریقی در مورد *S. iniae* و *L. garviae* (١٠±٢٠ و٥/٧٧±٢٦/٦٧ و در روش خوراکی به ترتیب برابر (٣±٥٦/١٠ و ١٠±٥٧/٧) و در غوطه‌وری به‌ترتیب برابر (٧/٦٣±٥٠ و ٥/٦٣±٤٣/٣٣) بوده و شاخص‌های ایمنی اندازه‌گیری شده نیز در تیمار واکسن تزریقی به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش نشان داد($P<0/05$). به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که علی‌رغم این که تیمار واکسن تزریقی بالاترین میزان کارایی و ایمنی‌زایی را نشان داد، ولی تجویز خوراکی و غوطه‌وری نیز باعث ایجاد محافظت نسبی در ماهی قزل‌آلا گردید و با توجه به ارجحیت‌های روش غوطه‌وری و خوراکی نسبت به تزریقی انجام تحقیق در بهبود کارایی این روش‌ها توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس، روش تجویز، خوراکی، تزریقی، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: alishahim@scu.ac.ir

مقدمه

ایران در سال‌های اخیر بالاترین تولید ماهی قزل‌آلا در آب‌شیرین در سطح جهان را به‌خود اختصاص داده است (FAO، ۲۰۱۷) و همراه کشور ترکیه بالاترین رشد را در دهه اخیر داشته‌اند، به جرات می‌توان گفت که مهم‌ترین بیماری باکتریایی صنعت پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس است که زیان‌های اقتصادی زیادی را به این صنعت وارد کرده است، این بیماری یک بیماری سیستمیک در ماهیان آب‌شیرین، لب‌شور و دریایی است. این بیماری در ابتدا در میان جمعیت قزل‌آلای رنگین‌کمان در ژاپن توسط Hoshina و همکاران (۱۹۵۷) گزارش شد. بعدها این بیماری در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در آفریقای جنوبی، ایالات متحده آمریکا، بریتانیا و نروژ نیز اهمیت یافت و امروزه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قزل آلای رنگین‌کمان در آبزی‌پروری شناخته شده است. استرپتوکوکوزیس اولین‌بار در ایران از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران در سال ۲۰۰۰، از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استان فارس در سال ۲۰۰۳ جدا شده است (Faghani و همکاران، ۲۰۰۸). درمان و کنترل این بیماری مشکل است، زیرا زمانی این بیماری آشکار می‌شود که ماهی به‌وسیله کیفیت پایین آب تحت استرس قرار گیرد (Sakai و همکاران، ۱۹۹۳). درمان به‌دلیل مشکلات اجرایی تجویز، هزینه بالا، و از همه مهم‌تر مقاوم شدن باکتری نسبت به داروهای رایج کارایی لازم را ندارد (Soltani و همکاران، ۲۰۱۵). روش‌های جایگزین برای کنترل بیماری‌های استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس استفاده از واکسن‌ها می‌باشد (Pridgeon و Klesius، ۲۰۱۱). یکی از روش‌های مورد اعتماد و مناسب برای پیشگیری و کنترل این بیماری استفاده از واکسیناسیون است و اکثر کشورهای دارای صنعت پرورش ماهیان سردابی از این واکسن‌های موثر برای این بیماری سود می‌جویند. در کشور نیز یک دهه است که واکسن تجاری دوگانه این بیماری تولید و استفاده شده است. یکی از مشکلات تجویز واکسن در ماهی روش تجویز است، در تجویز غوطه‌وری و خوراکی کارایی واکسن مناسب نیست و در روش تزریقی هم استرس و تلفات بعد از تزریق و هم‌چنین هزینه و مشکلات اجرایی تزریق مانع اصلی گرایش پرورش‌دهندگان به استفاده از این واکسن می‌باشد (Gudding و همکاران، ۲۰۱۴). هریک از روش‌های تجویز واکسن مزیت‌ها و معایبی نسبت به یکدیگر دارند و انجام تحقیقی در مورد بررسی کارایی این واکسن‌ها می‌تواند گزینه‌های بیش‌تری را در برابر پرورش‌دهندگان قرار دهد تا با آشنایی با کارایی روش‌های مختلف، مناسب‌ترین روش را با توجه به شرایط خود انتخاب کنند. از آن‌جاکه تا به‌حال در مورد مقایسه کارایی تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس تحقیقی صورت نگرفته بود، در این تحقیق مقایسه سه روش تجویز تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری این واکسن ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس: از باکتری استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه که در تحقیق قبلی از مزارع استان چهارمحال بختیاری و خوزستان جداسازی و تعیین هویت و تعیین حدت شده بودند (کرمی و همکاران، ۱۳۹۶) استفاده گردید. به این منظور پس از کشت باکتری استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه به‌طور جداگانه که با روش PCR جنس و گونه آن‌ها اثبات شده بود در محیط TSB به‌مدت ۴۸ ساعت، باکتری‌ها در مجاورت فرمالین ۱درصد به‌مدت ۱۲ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس باکتری‌ها با سرم فیزیولوژی ۳ بار شست‌وشو شدند. به‌منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن کامل باکتری‌ها، از باکتری غیرفعال شده کشت مجدد تهیه شد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰). قبل از غیرفعال نمودن باکتری‌ها، با استفاده از رقت‌سازی و کشت در محیط جامد تعداد باکتری‌ها در حد 10^{10} تنظیم گردید. در انتهای کار، باکتری‌های غیرفعال‌شده در سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون در آمدند. برای تیمارهای تزریقی از دو باکتری به نسبت مساوی با هم ترکیب شدند و نهایتاً برای تیمارهای تزریقی ۱۰۰ میکرو لیتر از محصول به‌صورت تزریق داخل صفاقی به ماهی‌ها تزریق گردید. در تیمار خوراکی هم از محصول باکتریایی با غلظت 10^{10} به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر به ۱۰۰ گرم خوراک مخلوط گردید، یعنی نهایتاً 10^{9} باکتری در هر گرم خوراک درنظر گرفته شد. ماهی‌ها به‌مدت ۱۰ روز با خوراک واکسنی تهیه شده تغذیه گردیدند. برای تیمار غوطه‌وری، محصول باکتریایی تهیه شده به نسبت ۱ به ۱۰ در آب آکواریوم رقیق گردید (صد میلی‌لیتر واکسن به ۹۰۰ میلی‌لیتر آب) و سپس ماهی‌ها به‌مدت ۲ دقیقه در واکسن تهیه شده با هوادهی غوطه‌ور گردیدند.

مرحله تیماربندی و تجویز واکسن‌ها

تیماربندی ماهی‌ها: به‌منظور تیماربندی ماهی‌ها تعداد ۶۰۰ عدد ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی ۲/۱±۱۴ گرم به ۴ تیمار (هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار ۵۰ عدد ماهی) به‌صورت زیر تقسیم شدند. برای تغذیه و ساخت واکسن از خوراک تجاری اسکرتینگ Skretting ساخت ایتالیا، مخصوص ماهیان ۱۰ تا ۴۰ گرم قزل‌آلا استفاده شد (پروتئین ۴۴٪، چربی ۱۴٪، رطوبت ۹٪ ، خاکستر ۱۱٪) ماهی‌ها بعد از انتقال به‌مدت یک هفته جهت سازش‌یابی با محیط نگه‌داری و با خوراک معمول تغذیه شدند، بررسی بهداشتی ماهی‌ها (بررسی انگلی، کشت از اندام‌های داخلی و مغز) انجام شد تا از سلامت ظاهری ماهی‌ها اطمینان حاصل

گردد. سوابق بیماری در مزرعه تهیه بچه‌ماهی‌ها (مزرعه‌ای در شهرستان ازنا) که همواره یکی از مزارع پرورش ماهی نمونه بوده‌است، وجود نداشت. ماهی‌ها در مخازن پلاستیکی ۵۰۰ لیتری به‌صورت زیر تیماربندی گردیدند. تیمار اول: ایمن شده با باکتری غیرفعال شده به‌روش خوراکی (10^9 عدد باکتری در گرم خوراک به‌مدت دو هفته)، تیمار دوم : ایمن شده به‌روش تزریقی (تزریق داخل صفاقی ۰/۱ میلی‌لیتر از باکترین دو باکتری با غلظت ۱۰۹ باکتری در میلی‌لیتر، تیمار سوم: ایمن شده به‌روش غوطه‌وری (به‌مدت ۲ دقیقه در غلظت 10^9 باکتری در میلی‌لیتر)، تیمار چهارم: تیمار شاهد بدون تجویز واکسن. ماهی‌ها به‌مدت ۶۰ روز نگه‌داری گردیدند و در زمان‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ از ماهی‌ها نمونه خون و سرم اخذ گردید و در انتهای دوره اقدام به چالش باکتریایی با هر دو باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه گردید.

نمونه‌گیری، آزمایشات ایمنی، خونی، چالش باکتریایی و بررسی بیان ژن‌های ایمنی: در روزهای ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ از ۱۲ ماهی از هر تیمار (۴ ماهی از هر تکرار) خونگیری انجام شد، از ماهی‌های هر تیمار دو سری نمونه خون گرفته شد، یک‌سری نمونه خون هپارینه و یک‌سری نمونه خون بدون ماده ضدانعقاد. نمونه‌های هپارینه برای آزمایشات خون‌شناسی و اندازه‌گیری NBT استفاده گردید و نمونه‌های بدون ماده ضدانعقاد برای جداسازی سرم و آزمایشات ایمنی استفاده گردید. از ماهی‌ها نمونه مخاط نیز تهیه گردید، به‌منظور تهیه نمونه مخاط از روش توصیه شده توسط Hatten و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. نمونه موکوس با قرار دادن دو عدد ماهی در یک کیسه پلاستیکی کوچک زیپ‌دار حاوی ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به‌مدت دو دقیقه انجام‌شد. بعد از خارج نمودن ماهی نمونه مخاط جمع‌آوری و در دمای ۲۰- تا زمان استفاده نگه‌داری گردید.

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط Ellis (۱۹۹۰) توصیه شده است، استفاده گردید. برای این‌کار در این ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکرو کوکوس لیزوداکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گودهای میکروپلیت تخت مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های ۰ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱). برای میزان فعالیت لیزوزیم هر ۰/۰۰۱ کاهش در جذب نوری در دقیقه یک واحد درنظر گرفته شد (Nayak و همکاران، ۲۰۰۸).

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم: برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه‌شده توسط Budino و همکاران (۲۰۰۶)، با کمی تغییرات استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به‌مدت ۶ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس از آن رقت 2×10^{-9} تهیه گردید و سپس دوبار با سرم فیزیولوژی استریل شست و شو داده شد، در ادامه برای اطمینان بیش‌تر دورقت دیگر از غلظت اولیه در میکروپلیت تهیه گردید. در ادامه به هر گوده میکروپلیت ۳۳ میکرولیتر از سرم ماهی مورد آزمایش ریخته‌شد و بعد از آن ۱۳۳ میکرولیتر از رقت‌های باکتری‌های تهیه شده در مجاورت با سرم قرار گرفتند و خوب مخلوط شدند و برای مدت ۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و همه نمونه‌ها به‌طور هم‌زمان انکوبه شدند. برای کنترل هم از PBS استریل و سرم ماهی غیرفعال‌شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در پایان زمان انکوباسیون به همه گوده‌ها به‌میزان ۸۶ میکرولیتر محلول MTT (۳۳ diphenyltetrazolium bromide, sigma M5655) با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد و دوباره به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و درنهایت تغییر رنگ ناشی از احیای MTT توسط باکتری‌های زنده در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد و نتیجه به‌صورت میانگین جذب تکرارها گزارش گردید.

اندازه‌گیری احیاء NBT: از آزمایش احیاء نیترو بلو تترازولیوم (NBT) جهت ارزیابی انفجار تنفسی لکوسیت‌ها استفاده گردید. به‌این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از ماده نیتروبلو تترازولیوم (مرک) ۰/۲ درصد به لوله‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر خون تازه اضافه شده و بعد از انکوباسیون در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ میکرولیتر از محلول فوق داخل لوله‌های شیشه‌ای حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول دی‌متیل‌فرمامید (سیگما) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون، لوله در ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شده و میزان جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۳۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و به‌عنوان فعالیت NBT گزارش گردید (Sahoo و همکاران، ۲۰۰۵).

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان: جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان به هر گوده پلیت الایزا ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه و ۲۳۰ میکرولیتر بافر کمپلمان (ورونال بافر، pH=۲/۵، حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلریدکلسیم) و ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش شسته شده اضافه شد. یک شب نمونه‌ها در دمای ۴ درجه انکوبه شده و سپس جذب نوری مایع رویی با اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل و گلوبولین پلاسما

غلظت ایمنوگلوبولین تام: غلظت ایمنوگلوبولین کل براساس روش شرح داده شده توسط Nayak و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه ابتدا پروتئین تام و آلبومین پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه شد.

اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی

شمارش تعداد تام گلبول‌های سفید و شمارش گلبول‌های قرمز: برای اندازه‌گیری شاخص‌های خونی از دو منبع Thrall (۲۰۰۴) و Feldman و همکاران (۲۰۰۰) استفاده گردید. شمارش کلی گلبول‌های سفید و قرمز به‌روش مستقیم (با استفاده از لام هماسیتومتر یا نئوبار) و همانند شمارش کلی گلبول‌های خون پرندگان، با رقیق کردن خون، به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده نات–هریک، صورت گرفت. برای این‌کار و پس از انتقال نمونه رقیق‌شده به لام هماسیتومتر، تعداد گلبول‌های سفید در ۴ مربع بزرگ اولیه که هر یک شامل ۱۶ مربع متوسط بود، شمارش می‌گردید. برای شمارش گلبول‌های قرمز تعداد آن‌ها در ۵ مربع متوسط وسط که هریک شامل ۲۵ مربع کوچک بود، استفاده شد. سپس تعداد کل گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز در میلی‌متر مکعب خون محاسبه می‌گردید.

میزان هموگلوبین: مقدار هموگلوبین نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Milton roy) با طول موج ۵۴۶ نانومتر و با استفاده از معرف درآپکینز به‌دست آمد. برای این کار ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول درآپکینز در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های خون و با نسبت ۱ به ۲۵۰ اضافه شد و بلافاصله مخلوط شد و در ادامه در دستگاه اسپکتوفوتومتری و در طول موج ۵۴۶ نانومتر میزان جذب‌نوری خوانده شد. عدد به‌دست آمده در ۳۶/۹ ضرب شد تا میزان هموگلوبین برحسب گرم در دسی‌لیتر به‌دست آمد.

میزان هماتوکریت: جهت تعیین هماتوکریت نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در لوله‌های موئین توسط سانتریفیوژ میکرو هماتوکریت به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس لوله موئینه را روی خط‌کش مخصوص قرارداده با حرکت لوله روی خط‌کش وضعیتی ایجاد گردید که فصل مشترک بین خمیر و خون روی عدد صفر و آخرین سطح پلاسما روی عدد صد قرار گیرد حالا عددی که طول ستون گویچه‌های قرمز رانشان می‌دهد هماتوکریت شخص می‌باشد.

بررسی میزان حدت باکتری‌ها (LD50): به‌منظور محاسبه LD50 هر باکتری در ماهی قزل‌آلا، ابتدا استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TSB کشت داده شدند. پس از سانتریفوژ و جداسازی باکتری، غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی درحد 10^9 باکتری در میلی‌لیتر تنظیم شده (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰) و با استفاده از رقت‌های متوالی از این سوسپانسیون (10^5 الی 10^9) تهیه گردید. از هر غلظت به ده ماهی تزریق داخل صفاقی انجام شده و تلفات هر رقت به‌مدت ۱۰ روز ثبت و پس از مرگ ماهی‌ها، با کشت مجدد باکتری از اندام‌های داخلی شامل کلیه قدامی و کبد، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی چالش داده شده، اطمینان حاصل گردید. نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار Probit، اقدام به اندازه‌گیری LD50 گردید. میزان LD50 باکتری استرپتوکوکوس اینیه به‌میزان $1/3\times10^6$ و در مورد باکتری لاکتوکوکوس گارویه $4/7\times10^5$ محاسبه شد. یعنی لاکتوکوکوس گارویه حدت نسبتاً بالاتری نسبت به استرپتوکوکوس اینیه داشت.

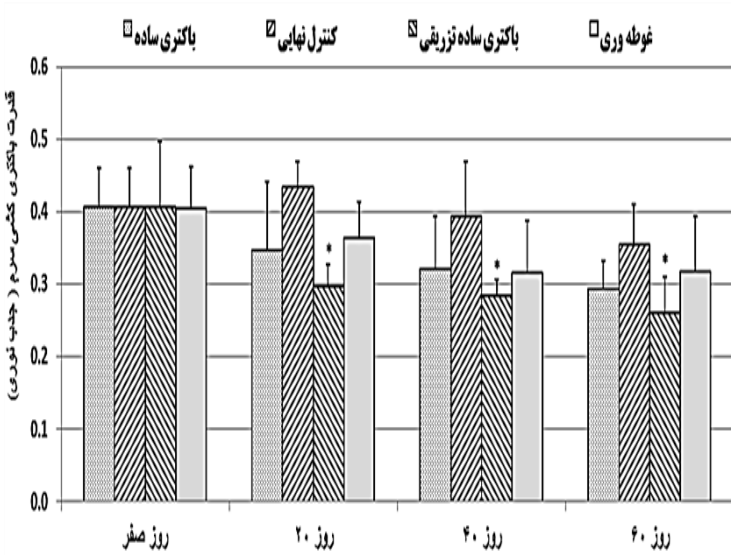
چالش باکتریایی: ۶۰ قطعه ماهی از هر تیمار به‌طور جداگانه با باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه به‌میزان دوز ایجادکننده ۵۰٪ تلفات (به‌دست آمده در مرحله قبل)، به‌صورت داخل صفاقی، مورد چالش داده شدند. هم‌زمان گروه شاهد (غیرواکسینه) نیز با LD50 باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. به یک گروه از ماهیان گروه شاهد نیز فقط PBS به‌همان روش تزریق شد. در طی دوره چالش، روزانه ماهی بررسی شده و میزان تلفات در طی ۱۰ روز ثبت شد. درصد تلفات در تیمارها مقایسه گردید. از آن‌جا که ماهیان تزریق شده با PBS هیچ‌گونه تلفاتی در طول دوره چالش نداشتند در نمودارهای چالش این گروه آورده نشده است.

آزمون آماری: برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون استاتیستیک تست (Leven statistic test) برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی در تیمارها استفاده گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

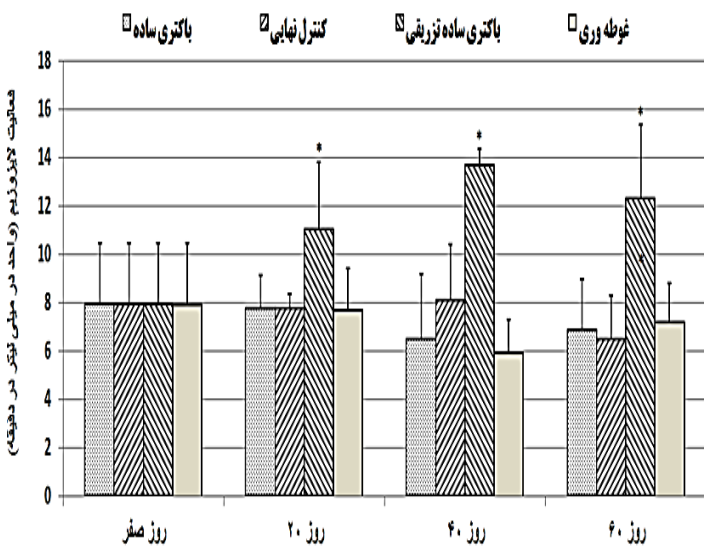
نتایج

نتایج شاخص‌های ایمنی نشان داد که اکثر شاخص‌ها در تیمار واکسینه شده با واکسن تزریقی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت. قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمار واکسینه به‌روش تزریقی به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد ($P<0/05$). درصورتی‌که در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد ($P>0/05$)(شکل ۱). فعالیت لایزوزیم سرم نیز در تیمار واکسینه به‌روش تزریقی در هر سه مرحله نمونه‌گیری به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت ($P<0/05$). در صورتی‌که در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد ($P>0/05$)(شکل ۲). فعالیت لایزوزیم سرم نیز در تیمار واکسینه به‌روش تزریقی در هر سه مرحله نمونه‌گیری به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت ($P<0/05$). درصورتی‌که در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد ($P>0/05$) (شکل ۲). احیای NBT سلول‌های خونی نیز در تیمار واکسینه به‌روش تزریقی روز ۲۰ و ۶۰ نمونه‌گیری به‌طور معنی‌داری نسبت

به تیمار شاهد افزایش داشت (P<۰/۰۵). درصورتی‌که در بقیه روز ۴۰ در تیمار تزریقی و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵)(شکل۳). فعالیت کمپلمان سرم، میزان پروتئین و گلوبولین سرم و شاخص‌های خونی مورد بررسی، در بین تیمارهای‌موردبررسی‌تفاوت معنی‌داری در مراحل مختلف نمونه‌گیری نشان ندادند (P>۰/۰۵)(شکل۴و جدول ۱).

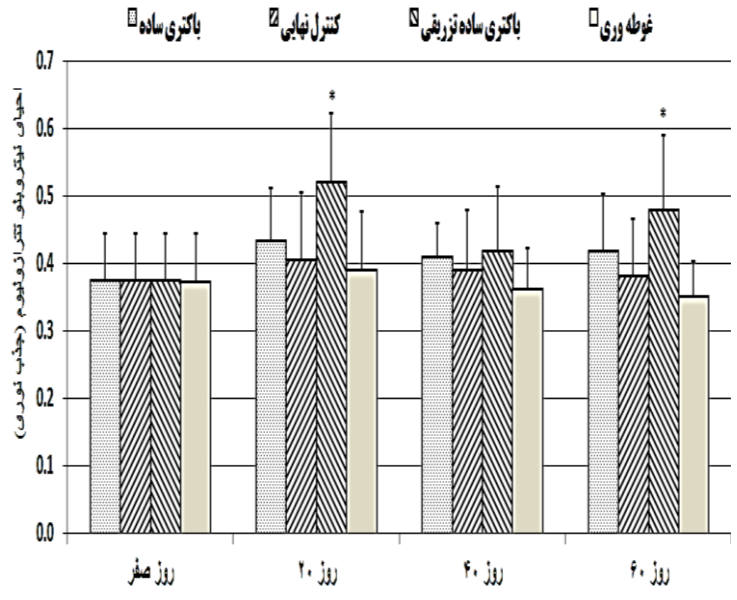


شکل ۱: مقایسه قدرت باکتری‌کشی سرم بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

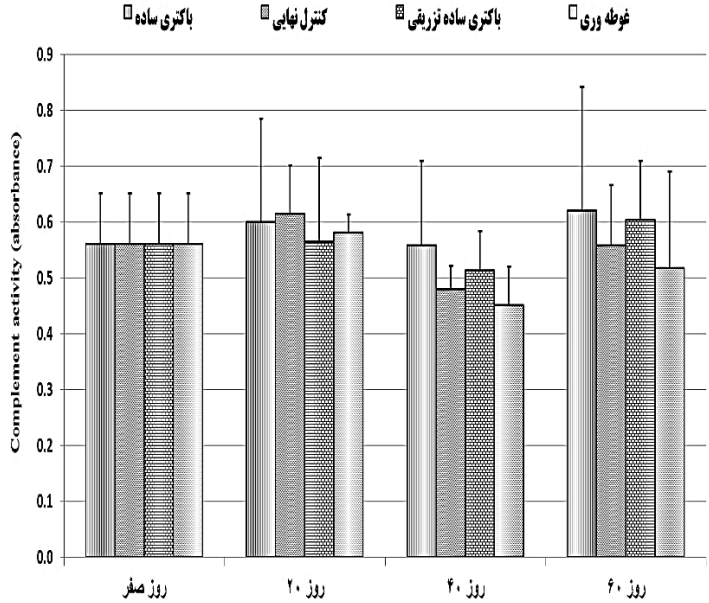


شکل ۲: مقایسه فعالیت لایزوزیم سرم بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

(علامت * در بالای میله انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).



شکل ۳: مقایسه فعالیت احیای NBT خون بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

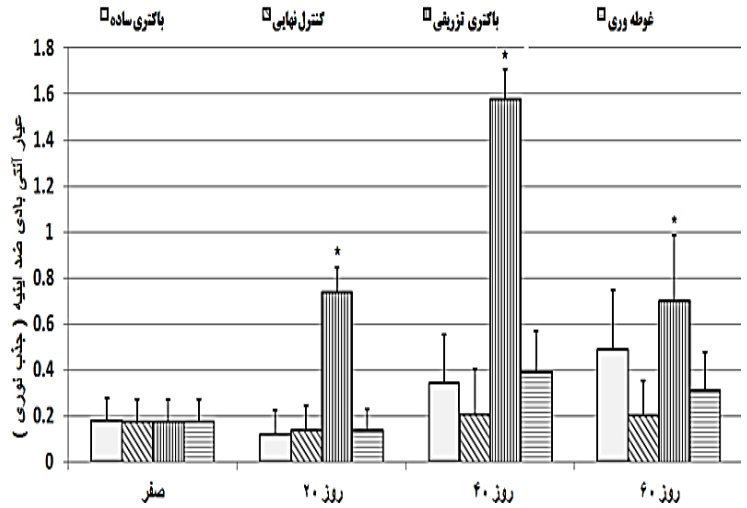


شکل ۴: مقایسه فعالیت کمپلمان سرم بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

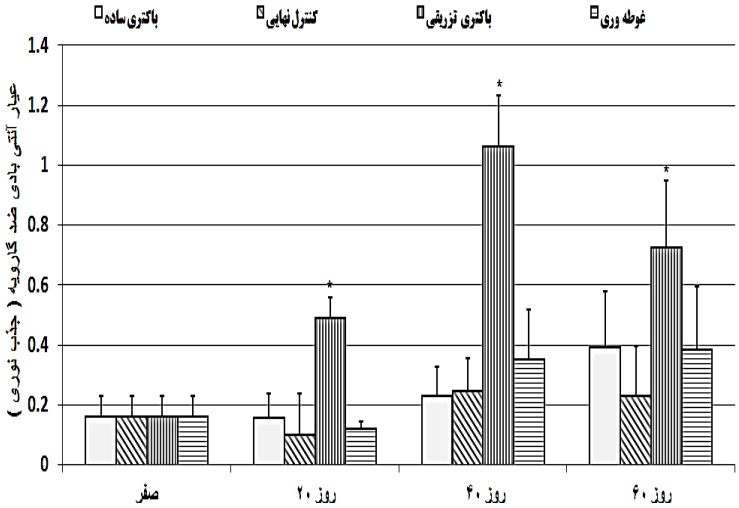
(علامت * در بالای میله انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).

جدول ۱: مقایسه شاخص‌های خونی بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

		روز صفر	روز ۲۰	روز ۴۰	روز ۶۰
هماتوکریت (٪)	واکسن خوراکی	۳۴/۱۷±۵/۳۴	۳۲/۴۴±۳/۹۱	۳۳/۲۵±۳/۹	۳۴/۳۸±۲/۶۲
	شاهد	۳۴/۱۷±۵/۳۴	۳۰/۷±۴/۹۶	۲۹/۸±۵/۰۲	۳۰/۷۸±۵/۶
	واکسن تزریقی	۳۴/۱۷±۵/۳۴	۳۱/۳۲±۳/۹۱	۳۲/۴۴±۳/۹۱	۳۱/۴۵±۵/۹۶
	واکسن غوطه‌وری	۳۳/۱۷±۵/۳۴	۳۴/۱۷±۵/۳۴	۳۱/۳۲±۳/۹۱	۳۲/۳±۵/۳۴
هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)	واکسن خوراکی	۶/۱۴±۰/۹	۷/۲۴±۱/۸۴	۶/۹۴±۱/۳۰	۶/۸۸±۱/۰۳
	شاهد	۶/۱۴±۰/۹	۷/۳۶±۱/۴۴	۶/۴۵±۱/۴۶	۶/۲۳±۱/۶۶
	واکسن تزریقی	۶/۱۴±۰/۹	۶/۲۳±۱/۶۲	۷/۰۷±۱/۶۵	۷/۳۴±۱/۳
	واکسن غوطه‌وری	۶/۱۴±۰/۹	۶/۲۳±۱/۲۳	۷/۶±۱/۴۶	۶/۳۴±۱/۳
تعداد گلبول‌های قرمز (میکرولیتر/$۱۰^{۶}$×)	واکسن خوراکی	۱/۲۴±۰/۴۳	۱/۲۷±۰/۲۶	۱/۳۲±۰/۱۴	۱/۳۰±۰/۳۶
	شاهد	۱/۲۴±۰/۴۳	۱/۲۴±۰/۱۷	۱/۴۱±۰/۱۲	۱/۳۴±۰/۳۴
	واکسن تزریقی	۱/۲۴±۰/۴۳	۱/۲۲±۰/۲۶	۱/۳۲±۰/۱۶	۱/۳۲±۰/۲۱
	واکسن غوطه‌وری	۱/۲۴±۰/۴۳	۱/۳۲±۰/۱۶۶	۱/۴۱±۰/۱۲	۱/۳±۰/۴۷
تعداد گلبول‌های سفید (میکرولیتر/$۱۰^{۳}$×)	واکسن خوراکی	۹/۸۵±۱/۷	۱۰/۰۴±۲/۰۳	۱۱/۲±۲/۱۴	۱۱/۱±۲/۱۵
	شاهد	۹/۸۵±۱/۷	۹/۸۷±۲/۰۳	۱۱/۱۲±۲/۱۴	۱۰/۱±۲/۱۵
	واکسن تزریقی	۹/۸۵±۱/۷	۱۰/۲۲±۲/۱۴	۱۰/۲±۱/۲	۱۱/۳۴±۲/۸۹
	واکسن غوطه‌وری	۹/۸۵±۱/۷	۱۰/۲±۲/۱۴	۱۱/۷۲±۲/۷۸	۹/۹۴±۲/۱۴
پروتئین تام (گرم/دسی‌لیتر)	واکسن خوراکی	۴/۸۸±۰/۵۸	۴/۸۵±۰/۳۳	۵/۱۶±۰/۶۲	۵/۰۴±۰/۵۵
	شاهد	۴/۸۸±۰/۵۸	۴/۸±۰/۹۶	۴/۹۹±۰/۷	۴/۹۴±۰/۸۳
	واکسن تزریقی	۴/۸۸±۰/۵۸	۴/۸۸±۱/۱۶	۵/۳۱±۰/۷۹	۵/۳±۰/۶۲
	واکسن غوطه‌وری	۴/۸۸±۰/۵۸	۴/۷۸±۰/۵۶	۴/۹۷±۰/۳۷	۵/۰۷±۰/۹۵
گلوبولین تام (گرم/دسی‌لیتر)	واکسن خوراکی	۲/۴۶±۰/۷۶	۲/۲۷±۰/۵۳	۲/۸۵±۰/۷۹	۲/۶۹±۰/۴۷
	شاهد	۲/۴۶±۰/۷۶	۲/۵۱±۰/۹۶	۲/۶۹±۰/۷	۲/۴۶±۰/۹۹
	واکسن تزریقی	۲/۴۶±۰/۷۶	۲/۹۰±۱/۰۶	۲/۹۴±۰/۳۲	۲/۵۶±۰/۳۹
	واکسن غوطه‌وری	۲/۴۶±۰/۷۶	۲/۳۳±۰/۸۷	۲/۵۱±۰/۷۲	۲/۳۷±۱/۳۵
آلبومین (گرم/دسی‌لیتر)	واکسن خوراکی	۲/۳۳±۰/۳۵	۲/۵۸±۰/۲۶	۲/۳۱±۰/۴	۲/۳۵±۰/۴۷
	شاهد	۲/۳۳±۰/۳۵	۲/۱۹±۰/۴۹	۲/۳±۰/۷۹	۲/۴۸±۰/۴۷
	واکسن تزریقی	۲/۳۳±۰/۳۵	۲/۱۲±۰/۴۷	۲/۳۷±۰/۳۴	۲/۴۴±۰/۵۷
	واکسن غوطه‌وری	۲/۳۳±۰/۳۵	۲/۴۵±۰/۳۹	۲/۴۵±۰/۳۷	۲/۶۹±۰/۷۵

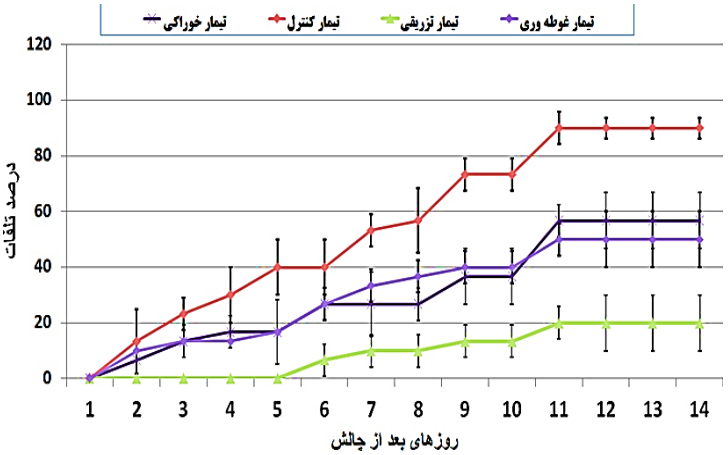


شکل ۵: مقایسه عیار آنتی‌بادی ضداسترپتوکوکوس اینیه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

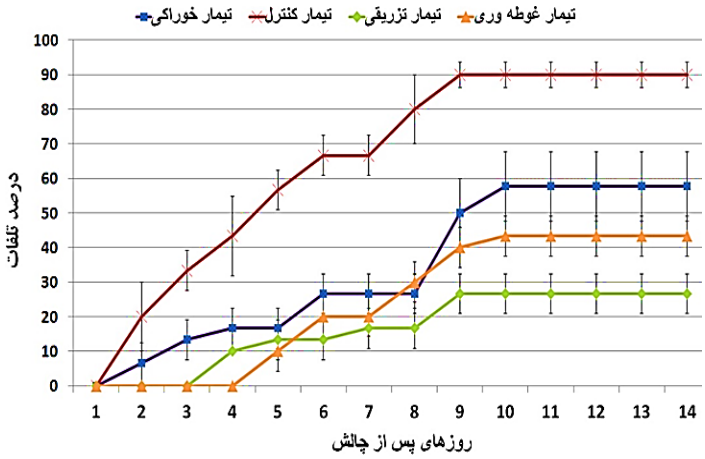


شکل ۶: مقایسه عیار آنتی‌بادی ضدلاکتوکوکوس گارویه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

(علامت * در بالای میله انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).



شکل۷: مقایسه درصد تلفات بعد از چالش با استرپتوکوکوس اینیه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری



شکل۸: مقایسه درصد تلفات بعد از چالش با لاکتوکوکوس گارویه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

بحث

بیماری استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس ایجاد شده توسط استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان در کشور می‌باشد (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۵) که در نقاط مختلف جهان نیز به‌عنوان یک مشکل بهداشتی مهم مطرح است. در این تحقیق کارایی سه روش تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در پیشگیری از این بیماری در ماهی قزل‌آلا ارزیابی گردید. ارزیابی کارایی واکسن مهم‌ترین شاخص در ارزیابی واکسن می باشد (Brudeseth و همکاران، ۲۰۱۳). در تحقیق جاری در تیمار ایمن شده به‌روش تزریقی به‌ترتیب تلفات ۱۰±۲۰ و ۲۶/۶۷ درصد در برابر چالش با باکتری استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه را نشان داد که به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر تیمارها بود. در مقایسه با گزارشات مشابه کارایی قابل قبول می‌باشد، به‌طوری‌که در مطالعه Eldar و همکاران (۱۹۹۹) در ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان تلفات ۱۰ درصد و در تحقیق Romalde و همکاران (۲۰۰۴) در ماهی توربوت نیز تلفات به‌حدود ۱۷درصد به‌دنبال واکسیناسیون تزریقی در برابر استرپتوکوکوزیس گزارش شده است. در مطالعه دیگری Altun و همکاران (۲۰۱۰) نیز تلفات ۱۰ درصد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دنبال واکسن لاکتوکوکوس گارویه به‌روش تزریقی را گزارش کردند. هم‌چنین Klesius و همکاران (۲۰۰۰) با تزریق داخل صفاقی و عضلانی باکتری کشته استرپتوکوکوس اینیه در ماهی تیلاپیا محافظت و ایمنی‌زایی حدود ۸۳ درصد گزارش کردند. در تحقیق جاری تلفات بعد از چالش در تیمار واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش غوطه‌وری در برابر استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه به‌ترتیب ۵۰ و ۴۳/۳ درصد بود که نسبت به تیمار شاهد (تلفات ۹۰ درصد) کاهش معنی‌داری داشت. گزارشات مختلف در مورد مقایسه کارایی واکسن‌ها نشان داده است که کارایی واکسن غوطه‌وری به‌طور معنی‌داری از واکسن تزریقی است. مثلاً Bercovier و همکاران (۱۹۹۷) بازماندگی حدود ۴۰٪ را در ماهیان واکسینه به‌روش غوطه‌وری در برابر استرپتوکوکوزیس گزارش نمودند. هم‌چنین Soltani و همکاران (۲۰۰۷) در واکسن غوطه‌وری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلفات حدود ۷۰ درصد را در تیمار غوطه‌وری گزارش کردند. در مارماهی اروپایی ایمن شده با واکسن غوطه‌وری ویبریو ولنیفیکوس ایمنی محدودی (حدود ۲۰ درصد) گزارش شد، ولی واکسن غوطه‌وری به‌همراه واکسن خوراکی یادآور، محافظت بالای ۷۰درصد را باعث گردید (Esteve-Gassent و همکاران، ۲۰۰۴). در این تحقیق تلفات بعد از چالش در تیمار تجویز خوراکی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌ترتیب برابر ۱۰±۵۶/۳ و ۱۰±۵۷/۷ بود در برابر استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گاویه گردید. Soltani و همکاران (۲۰۰۷) کارایی ضعیف (تلفات حدود ۸۵ درصد) را در مورد واکسن خوراکی استرپتوکوکوزیس گزارش نمودند، هم‌چنین Romalde و همکاران (۲۰۰۴) کارایی حدود ۳۰ درصد را در واکسن خوراکی لاکتوکوکوزیس مشاهده نمودند. البته گزارشاتی از ایجاد پاسخ هومورال در سرم، پوست و مخاط روده گونه‌های مختلف ماهی به‌دنبال ایمنی‌سازی خوراکی گزارش شده است. دلیل اصلی کارایی پایین واکسن خوراکی در این بیماری تغییرات آنتی ژن واکسن در لوله گوارش است (Altun و همکاران، ۲۰۱۰). Eldar و همکاران (۱۹۹۹) و Altun و همکاران (۲۰۱۰) محافظت بسیار کم یا فقدان محافظت باکترین خوراکی در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس /لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلا را گزارش نموده‌اند. یکی از دلایل فقدان محافظت یا محافظت پایین واکسن‌های خوراکی آبزیان تغییرات

آنتی‌ژن واکسنی در شرایط اسیدی معده و تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک روده‌ای است. اسیدیته بالای معده (حدود Ph=۳) اکثر آنتی‌ژن‌های واکسنی دفرمه می‌کند(Smith، ۲۰۰۲) و این تغییر شکل آنتی‌ژنی، با عث کاهش تحریک ایمنی واکسن می‌گردد (Rombout و همکاران، ۲۰۱۴). میزان تلفات بعد از چالش با استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه در تیمار غوطه‌وری به‌ترتیب برابر ۷/۶۳±۵۰ و ۵/۶۷±۴۳/۳۳بود که نتایج مشابه از تحقیق توسط Soltani و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی قزل‌آلا و Zhu و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی تیلاپیا گزارش گردید.عیار آنتی‌بادی ضداسترپتوکوکوس‌اینیه و لاکتوکوکوس گارویه‌اندازه‌گیری‌شده‌به‌روش‌الایزا در تیمار تزریقی به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت (P<۰/۰۵)، ولی در تیمارهای واکسینه‌شده به‌روش خوراکی و غوطه‌وری فقط افزایش نسبی مشاهده شد که در هیچ‌کدام از مراحل نمونه‌گیری از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). گزارشات در مورد ارتباط تیتر آنتی‌بادی با محافظت ایجاد شده به‌دنبال واکسیناسیون ماهی در برابر استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس متفاوت و گاهاً متناقض می‌باشد، به‌عنوان مثال Barnes و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که هرچند تیتر آنتی‌بادی ضداسترپتوکوکوس اینیه در ماهی قزل‌آلای ایمن شده با واکسن هم‌ولوگوس ایجاد گردید، ولی در مورد باکتری هترولوگوس هیچ‌گونه عیار آنتی‌بادی مشاهده نگردید. Liaghat و همکاران (۲۰۱۱) نیز عیار آنتی‌بادی را در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان که به‌صورت طبیعی با استرپتوکوکوس اینیه مبتلا شده بودند تا دو ماه بعد از ابتلا گزارش کردند. Bromage و همکاران(۱۹۹۹) علی‌رغم مشاهده کارایی مناسب واکسن استرپتوکوکوس اینیه در ماهی برماندی، هیچ‌گونه عیار آنتی بادی ضد این باکتری را در سرم ماهی واکسینه گزارش نکردند. Klesius و همکاران (۲۰۰۰) با تزریق داخل صفاقی و عضلانی باکتری کشته استرپتوکوکوس اینیه در ماهی تیلاپیا افزایش عیار آنتی‌بادی متناسب با محافظت بالا را گزارش کردند. البته آن‌ها با به‌کار بردن باکتری اگزولوگوس در تست الایزا عیاری گزارش نکردند. در تحقیقی دیگر Shoemaker و همکاران (۲۰۱۱) افزایش تیتر آنتی‌بادی ضد فلاوباکتریوم کلومناره در سرم و موکوس گربه ماهی را گزارش کردند که با میزان محافظت ایجاد شده هم‌بستگی داشت. در هیمن راستا Costa و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که واکسیناسیون ماهی تیلاپیا باباکترین‌استرپتوکوکوس‌اینیه موجب افزایش معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی تا ۱۲ هفته گردید که بعد از آن تیتر آنتی‌بادی با شیب آرامی کاهش یافت و بعد از سه ماه تیتری مشاهده نگردید. Akhlaghi و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که تیتر آنتی‌بادی ضداسترپتوکوکوس اینیه در ماهیان ایمن شده در برابر این باکتری به‌روش الایزا مشاهده نشد. هم‌چنین در ایمن‌سازی گربه‌ماهی کانالی در برابر باکتری ادواردزیلا ایکتالوری(*Edwardsiella ictaluri*) به‌روش تزریقی نیز تیتر آنتی‌بادی قابل اندازه‌گیری ایجاد نگردید و آن‌ها مکانیسم‌های ایمنی باواسطه سلولی را در محافظت ایجاد شده موثرتر از ایمنی هومورال دانستند (Greenway و همکاران، ۲۰۱۷). به‌نظر می‌رسد در ماهیان مختلف مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد پاسخ ایمنی در برابر استرپتوکوکوزیس نقش دارند و در برخی گونه‌ها ایمنی اختصاصی با واسطه آنتی‌بادی نقش کم‌تری در ایمن‌سازی ماهی دارد. فقدان عیار آنتی‌بادی ضد باکتری‌های واکسنی در تیمار غوطه‌وری و خوراکی را می‌توان به نوع ایمونوگلوبولین دخیل در پاسخ ایمنی مخاطی در این اندام‌ها نسبت داد. در ایمن‌سازی مخاطی (روده و آبشش) ایمونوگلوبولین T (IgT) نقش‌مهم‌تری‌نسبت‌به ایمونوگلوبولین M دارند و آنتی‌بادی مونوکلونال ضدزنجیره سنگین ایمونوگلوبولین M ماهی قادر به تشخیص ایمونوگلوبولین T نبوده (Gudding و همکاران، ۲۰۱۴) و عدم مشاهده تیتر آنتی‌بادی مناسب علی‌رغم مشاهده محافظت نسبی احتمالاً به این دلیل می‌باشد.در این‌تحقیق هیچ‌کدام از شاخص‌های خونی شامل: میزان هموگلوبین، میزان هماتوکریت، تعداد گلبول‌های سفید خونی و تعداد گلبول‌های قرمز تحت تاثیر روش ایمن‌سازی قرار نگرفت (P>۰/۰۵)وتفاوت معنی‌داری بین شاخص‌های خونی اندازه‌گیری شده بین تیمارها در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده نشد. در تاثیر ایمن سازی ماهی بر شاخص‌های خونی ماهی گزارشات بحث برانگیر است، به‌عنوان مثال Soltani و همکاران (۲۰۰۷) عدم تاثیر واکسیناسیون به‌روش‌غوطه‌وری‌وخوراکی‌دربرابر استرپتوکوکوزیس را بر شاخص‌های خونی‌ماهی‌قزل‌آلاگزارش‌کردند.هم‌چنین پورمظفر و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که نه تنها واکسیناسیون با واکسن استرپتوکوکوزیس، بلکه تجویز توام واکسن و محرک ایمنی ماکروگارد تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های‌خونی (هماتوکریت، هموگلوبین، MCH، MCV، MCHC) ماهی قزل نداشت (p≥۰/۰۵). Faghani و همکاران (۲۰۰۸) واکسن ضداسترپتوکوکوزیس به‌همراه آلژنیک اسید را بر روی فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مورد آزمایش و گروه شاهد نشان نداد. در همین راستا فقانی و همکاران (۱۳۸۸) در مطالعه‌ای دیگر که جهت ارزیابی اثر ارگوسان و واکسن ضداسترپتوکوکوزیس بر پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام دادند، گزارش کردند که نه تنها وکسیناسیون ضداسترپتوکوکوزیس بلکه تجویز ارگوسان تأثیری بر شاخص‌های خونی ماهی نداشت. برخلاف موارد فوق، Nulty و همکاران (۲۰۰۳) در ماهی تیلاپیا ایمن شده در برابر استرپتوکوکوزیس به‌روش تزریقی را باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفیدخونی‌وتغییرنسبت‌آن‌هادانستند.آن‌هاافزایش‌تعدادلکوسیت‌های ماهی را دلیلی بر بهبود وضعیت ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی

ماهی ایمن شده دانستند. هم‌چنین علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) تغییر تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی در ماهیان ایمن شده با باکترین خوراکی ائروموناس هیدروفیلا به‌همراه ادجوان نانوکیتوزان را گزارش نمودند. هم‌چنین خاج و همکاران (۱۳۹۶) نیز افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و برخی شاخص‌های مربوط به گلبول‌های قرمز خون را در ماهیان واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس /لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلا گزارش نمودند. احتمالاً در تحقیق جاری یا شاخص‌های سلامت ماهی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر ایمن‌سازی قرار نگرفته است و یا این بهبود به‌میزانی نبوده که بر شاخص‌های خونی ماهی تاثیر معنی‌دار بگذارد. در بین شاخص‌های ایمنی مورد بررسی فعالیت لایزوزیم، قدرت باکتری‌کشی و فعالیت کمپلمان و میزان پروتئین و گلوبولین سرم و فعالیت NBT فقط در تیمار واکسینه شده با واکسن تزریقی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد و در دو تیمار خوراکی و غوطه‌وری افزایش این شاخص‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). فعالیت لایزوزیم و پروتئین سرم به‌عنوان یکی از شاخصه‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهی می‌باشد (Yang و همکاران، ۲۰۱۶)، احتمالاً بالا رفتن سطح لیزوزیم در مطالعه حاضر در تیمار تزریقی را باید به‌دلیل وجود مقدار مؤثر آنتی‌ژن در واکسن دانست. افزایش فعالیت لیزوزیم و کمپلمان در آزادماهیان بعداز واکسیناسیون گزارش شده‌است (Vinay و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Zhu و همکاران (۲۰۱۷) روی ماهی تیلاپیا صورت گرفت، نشان داد که فعالیت لایزوزیم سرم در ماهیان واکسینه نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. Craig و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر روی پاسخ‌های ایمنی ماهی تیلاپیا بعد از تجویز واکسن استرپتوکوکوزیس انجام دادند، افزایش معنی‌دار میزان پروتئین و فعالیت لیزوزیم سرم را در گروه واکسینه گزارش نمودند. Alishahi و Buchmann (۲۰۰۶) نشان دادند که تزریق واکسن ایکتیوفیتیریوس مولتی‌فیلیس فعالیت لیزوزیم سرم و پروتئین تام سرم قزل‌آلای رنگین‌کمان را افزایش می‌دهد.Balfry و همکاران (۲۰۰۱) افزایش فعالیت کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی و IgM سرم در آزاد ماهی نقره‌ای واکسینه شده را گزارش نمودند. Huang و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده‌اند که واکسیناسیون ماهی با واکسن کشته استرپتوکوکوس اینیه در ماهی هامور معمولی افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیت کننده و افزایش بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها را باعث می‌شود. Craig و همکاران (۲۰۱۷) افزایش فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت‌های خون ماهی تیلاپیا پس از واکسیناسیون در برابر استرپتوکوکوس آگالاکتیه را گزارش نمودند. از آن‌جاکه در سایر تیمارهای خوراکی و غوطه‌وری این تحقیق، علی‌رغم مشاهده محافظت در برابر چالش باکتریایی، افزایش معنی‌دار در شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی سرم مشاهده نگردید، سایر مکانیسم‌های ایمنی غیراختصاصی را می‌توان در این محافظت موثر دانست. در همین راستا علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) ارتباطی بین میزان محافظت و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرمی (کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی سرم و لایزوزیم) ماهیان ایمن شده به‌روش خوراکی با واکسن آئروموناس هیدروفیلا با ادجوان نانوکیتوزان مشاهده نکردند. لذا احتمالاً فاکتورهایی به‌غیر از کمپلمان، لایزوزیم و ایمونوگلوبولین سرم و مخاط افزایش محافظت در برابر باکتری را باعث شده‌اند. در برخی مطالعات نیز عدم تغییر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهیان ایمنی شده با واکسن گزارش گردیده‌است(Bercovier و همکاران، ۱۹۹۷؛ Soltani و همکاران، ۲۰۰۷؛ Firdaus و همکاران، ۲۰۱۳؛ Ghittino و Eldar، ۱۹۹۹). به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس /لاکتوکوزیس کارایی مناسبی در روش تجویز تزریقی داشته ولی در روش خوراکی و غوطه‌وری محافظت نسبی کم‌تر از ۵۰ درصد ایجاد نماید، از طرفی تجویز خوراکی و غوطه‌وری این واکسن تغییری در شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلا ایجاد نکرده ولی تجویز تزریقی این واکسن بهبود اکثر شاخص‌های ایمنی ماهی را باعث می‌شود.

تقدیر وتشکر

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهش‌گران معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری (طرح شماره ۹۴۰۰۳۷۶۵) به‌انجام رسید.

منابع

۱. **سلطانی، م.؛ رئیسی، م.؛ گودرزی، م.؛ ممتاز، ح. و مومنی، م.، ۱۳۹۱.** تعیین فراوانی لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان چهارمحال وبختیاری وتعیین توالی ۱۶S rRNA جدایه‌های حاصله. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۸، شماره۱، صفحات ۶۱ تا ۶۷.

۲. **علیشاهی، م.؛ سعیدی‌منش، م.؛ مصباح، م. و محمدیان، ت.، ۱۳۹۵.** بررسی اثر نانوکیتوزان بر ایمنی‌زایی واکسن خوراکی آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۲، شماره ۱، صفحات ۵۳ تا ۶۴.

۳. **کرمی، ا.؛ علیشاهی، م.؛ قربانپور، م.؛ تابنده، م.ر. و محمدیان، ت.، ۱۳۹۶.** ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس /لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۹، شماره ۴، صفحات ۱۹۹ تا ۲۰۷.

۴. **Akhlaghi, M.; Munday, B.L. and Whittington, R.J., 1996.** Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). J Fish Dis. Vol. 19, No. 3, pp: 251-258.

۵. **Alishahi, M. and Buchmann, K., 2006.** Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. Dis Aquat Organ. Vol. 72: pp: 269-273.

routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. Vol. 188, pp: 237-246.

۲۷. **Liaghat, M.; Akhlaghi, M.; Hosseini, A.; Nematollahi, A. and Hosseini, S.M., 2011**. Humoral and non-specific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally exposed to and immunized with *Streptococcus iniae* . IJVSM. Vol. 5, pp: 218-224

۲۸. **Nayak, S.K.; Swain, P.; Nanda, P.K.; Dash, S. and Shukla, S., 2008.** Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp. Fish Shellfish Immunol. Vol. 24, pp: 394-399.

۲۹. **Nulty, S.T.; Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A., 2003.** Hematological Changes in nile tilapia infected with *Streptococcus iniae* by nare inoculation. J world aquacult soc. Vol. 34, No. 3, pp: 418-422.

۳۰. **Pridgeon, J.W. and Klesius, P.H., 2011.** Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Vaccine. Vol. 29, No. 35, pp: 5986-5993.

۳۱. **Romalde, J.L.; Luzardo-Alvárez, A.; Ravelo, C.; Toranzo, A.E. and Blanco-Méndez, J., 2004.** Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactoccocosis. Aquaculture. Vol. 236, No. 1, pp: 119-۱۲۹.

۳۲. **Rombout, J.H.W.; Yang, G. and Kiron, V., 2014.** Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. Vol. 40, No. 2, pp: 634-6٤۳.

۳۳. **Sahoo, P.K.; Kumari, J. and Mishra, BK., 2005.** Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. J Appl Ichthyol. Vol. 21, pp: 151-155.

۳۴. **Sakai, M.; Otubo, T.; Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1993.** Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of bovine lactoferrin, J Fish Dis. Vol. 16, pp: 239-2٤۷.

۳۵. **Shoemaker, C.A.; Klesius, P.H.; Drennan, J.D. and Evans, J.J., 2011.** Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. Fish Shellfish Immunol. Vol. 30, pp: 304-308.

۳۶. **Smith, P.D., 2002.** Oral delivery technologies to develop and implement effective life-long protection strategies. Workshop on Fish Vaccination. Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen, The Netherlands. pp: 78-80.

۳۷. **Soltani, M.; Mousavi, H.A. and Mirzargar, S., 2009.** Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran", 1th international congress on aquatic animal, Islamic Republic of Iran, Tehran. pp: 27-28.

۳۸. **Soltani, M.; Jamshidi, S.H. and Sharifpour, I., 2005.** Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. Bulletin of European Association of Fish Pathologists. Vol. 25, pp: 95-1۰۷.

۳۹. **Soltani, M.; Alishahi, M.; Mirzargar, S. and Nikbakht, G., 2007.** Vaccination of rainbow trout against *Streptococcusiniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. IFSRI. Vol. 7, pp: 129-140.

۴۰. **Soltani, M.; Pirali Kheirabadi, E.; Taheri Mirghaed, A.; Zargar, A.; Mohamadian, S.; Roohollahi, Sh. and Zakian, M., 2015.** Study on Streptococcosis and Lactococcosis Outbreaks in Rainbow Trout Farms in Fars and Lorestan Provinces. Vet Microbiol. Vol. 30, pp: 49-5۸.

۴۱. **Sun, Y.; Liu, C.S. and Sun, L., 2011.** A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. Fish and Shellfish Immunol. Vol. 31, pp: 595-5۹۹.

۴۲. **Thrall, M.A., 2004.** Veterinary hematology & clinical chemistry. Lippincott Whiliams & Wilkins. NewYork. 402 p.

۴۳. **Vinay, T.N.; Bhat, S.; Gon, T.; Paria, A. and Jung, M.H., 2017**. Recent Advances in Application of Nanoparticles in Fish Vaccine Delivery. Rev Fish Sci Aquac. Vol. 1, pp: 29-41.

۴۴. **Yang, Q.; Pan, Y.L.; Wang, K.Y.; Wang, Y.; Yang, H.; Wang, E.L.; Liu, T.; Geng, Y.; Chen, D.F. and Huang, X.L., 2016.** OmpN, outer membrane proteins of *Edwardsiella ictaluri* are potential vaccine candidates for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Mol Immunol. Vol. 78, pp: 1-8.

۴۵. **Zhu, L.; Yang, Q.; Huang, H. and Wang, K., 2017.** Effectivity of oral recombinant DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia. Dev Comp Immunol. Vol. 77, pp: 77-87.

۶. **Alishahi, M.; Ranjbar, M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R. and Mesbah, M., 2010.** Effects of dietary on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*cyprinus carpio*). Int J Vet Res. Vol. 4, pp: 189-1۹۵.

۷. **Altun, S.; Kubilay, A.; Ekici, S.; Didinen, B.I. and Diler, O., 2010.** Oral vaccination against lactococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. Kafkas Univ Vet Fak Derg. Vol. 16, pp: 2۱۱-۲۱۷.

۸. **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. Dis Aquat Organ. Vol. 53, No. 3, pp: 241-247.

۹. **Bercovier, H.; Ghittino, C. and Eldar, A., 1997.** Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. Dev Biol Stand. Vol. 90, pp: 153-160.

۱۰. **Bromage, E.S.; Thomas, A. and Owens, L., 1999.** *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi Lates calcarifer. Dis Aquat Org. Vol. 36, pp: 177-181.

۱۱. **Brudeseth, B.E.; Wiulsrød, R.; Fredriksen, B.N.; Lindmo, K.; Løkling, K.E.; Bordevik, M.; Steine, N.; Klevan, A. and Gravningen, K., 2013.** Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. Fish Shellfish Immunol. pp: 1-۱۰

۱۲. **Costa, A.A.; Leef, M.J.; Bridle, A.R.; Carson, J. and Nowak, B.F., 2011.** Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture. Vol. 315, pp: 201-206.

۱۳. **Craig, A.; Shoemaker. C.; Benjamin, R.; LaFrentz, R. and Julio, C., 2017.** Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (***Oreochromis niloticus***) to ***Streptococcus iniae*** and ***S. agalactiae*** capsular type Ib: Is genetic resistance correlated. Aquaculture. Vol. 468, No. 1, pp: 193-198

۱۴. **Eldar, A. and Ghittino, C., 1999.** *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis Aquat Organ. Vol. 36, No. 3, pp: 227-231.

۱۵. **Ellis, A.E., 1999.** Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol. Vol. 9, pp: 291-308.

۱۶. **Esteve-Gassent, M.D.; Fouz, B. and Amaro, C., 2004b**. Efficacy of a bivalent vaccine against diseases caused by Vibrio vulnificus after its administration by four different routes. Fish Shellfish Immunol. Vol. 16, pp: 93-105.

۱۷. **Faghani, T.; Azari Takami, Gh.; Kousha, A. and Faghani, S., 2008.** Surveying on Alginic Acid and Anti-Streptococcus Vaccine Effects on the Growth Performance, Survival Rate, Hematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchos mykiss*). J. Zool. Vol. 3 No. 2, pp: 54-58

۱۸. **FAO Yearbook of fisheries and aquaculture statistics 2015. 2017.** FAO publication, Rom Italy, www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2015_CD_Master/index.htm.

۱۹. **Feldman, B.; Zinkl, J. and Jain, N., 2000**. Schalm, s Veterinary Hematology. 5th Ed., Lippincott. Williams and Wilkins. A Wolterscompany. Philadeia, Baltimore, Naw York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo.

۲۰. **Firdaus-Nawi, M.; Sabri, M.Y.; Hanan, Y.; Siti-Zahrah, A. and Zamri-Saad, M., 201۲.** Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* sp. in Malaysia. Aquacul Res. Vol. 45, pp: 87-96.

۲۱. **Greenway, T.; Byars E. and Elliot, R.B., 2017.** Validation of Fermentation and Processing Procedures for the Commercial-Scale Production of a Live, Attenuated *Edwardsiella ictaluri* Vaccine for Use in Channel Catfish. J Aquat Anim Health. Vol. 29, No. 2, pp: 83-88

۲۲. **Gudding, R.; Lillehaug, A. and Evensen, Y., 2014.** Fish Vaccination. Wiley and Sons, Ltd, London, UK.

۲۳. **Hatten, F.; Fredriksen, I.; Hordvik, I. and Endresen, C., 2001.** Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Fish Shellfish Immunol. Vol. 11, pp: 257-268.

۲۴. **Hoshina, T.; Sano, T. and Morimoto, Y., 1958.** A Streptococcus pathogenic to fish. J Tokyo Univ Fish. Vol. 44, No. 5.

۲۵. **Huang, H.Y.; Chena, Y.C.; Wanga, P.C.; Tsaia, M.A.; Yeha, S.C.; Liangb, H.J. and Chena, S.C., 2014.** Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper *Epinephelus coioides* by intraperitoneal immunization. Vaccine. pp: 1-7

۲۶. **Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A. and Evans, J.J., 2000.** Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular