15(1) 213-220, Spring 2023

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of bivalent vaccine, streptococcus / yersinios on some of the blood and Immunologic factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Seyed Abdolhamid Hosseini [1], Mojtaba Alishahi [2*], Abolhassan Rastiannasab [1], Mohammad Meysam Salahi Ardakani [1], Mohsen Mohammadpour [1]

[1] Shahid Motahary Cold Water Fishes Genetic and breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Yasoj, Iran.
[2] Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Key Words
Bivalent vaccine
Streptococosis
Yersiniosis
Blood and Immune indices

Abstract

Introduction: Streptococcosis and Yersiniosis are important diseases for the aquaculture industry especially in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in our country. The aim of this study was to investigate the effects of a bivalent vaccine (*Streptococcus iniae* and *Yersinia rockeri*) on the immune responses including serum lysozyme, complement activation, bactericidal, respiratory burst (NBT), total protein, albumin, globulin and some hematological indices in rainbow trout.

Materials & Methods: In this study three hundred rainbow trout fingerlings (25±2g) were randomly divided into four equal groups, each in triplicates. The groups were as follow: Streptococcosis vaccine, Yersiniosis vaccine, bivalent vaccine and control group. Fish in vaccinated treatment intraperitonealy injected with 100 microliter vaccine on the first day. The control group was injected with sterile PBS, identical to vaccinated group. Blood samples were collected from vaccinated and non-vaccinated groups at days 0, 30, and 60 of study.

Result: The results demonstrated that lysozyme rate in bivalent vaccine were significantly higher at day 60 post-immunization compared to the control group ($p<0.05$). A significant increase was observed in the complement activation in bivalent vaccine at day 30 and 60 post-vaccination compared to the other groups ($p<0.05$). Also this results demonstrated that number of WBC in vaccinated groups were higher than control treatment. Generally, it can be concluded that the administration of bivalent Streptococosis/Yersiniosis vaccine to the rainbow salmon provided appropriate protection against disease and effectively induced the immune response against these two diseases which is comparable to either of the vaccines separately.

Conclusion: Investigation of the efficiency of the bivalent vaccine at commercial level is highly warranted.

* Corresponding Author's email: alishahimoj@gmail.com
Received: 23 October 2020; Reviewed: 21 November 2020; Revised: 22 January 2021; Accepted: 23 February 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.268851.2451

مقاله پژوهشی

تأثیر تجویز تزریقی واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/یرسینیوز بر برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سیدعبدالحمید حسینی[1]، مجتبی علیشاهی[2*]، ابوالحسن راستیان‌نسب[1]، محمدمیثم صلاحی‌اردکانی[1]، محسن محمدپور[1]

[1] مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

[2] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

واکسن دوگانه
استرپتوکوکوزیس
یرسینیوزیس
شاخص‌های خونی و ایمنی

چکیده

مقدمه: بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس به‌عنوان دو بیماری مهم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است که هر ساله باعث زیان اقتصادی قابل توجهی به صنعت آبزی‌پروری می‌شود. در این مطالعه به بررسی تأثیر تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/یرسینیوز بر روی برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: به‌همین منظور تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به وزن ۲±۲۵ گرم به ٤ تیمار ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوزیس، ایمن شده با واکسن یرسینیوز، ایمن شده با واکسن ترکیبی استرپتوکوکوس/یرسینیوز و گروه شاهد تقسیم شدند و طی یک دوره ٦٠ روزه و در روزهای صفر، ۳۰ و ٦٠ نمونه‌برداری جهت تعیین میزان لایزوزیم، کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی سرم، توتال پروتئین، آلبومین، گلوبولین، قدرت احیاء، شاخص‌های خونی انجام گرفت.

نتایج: نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار میزان لایزوزیم تیمار واکسن دوگانه در روز ٦٠ بعد از واکسیناسیون نسبت به گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). میزان فعالیت کمپلمان نیز هم در روز ۳۰ و هم در روز ٦٠ در تیمارهای ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوس، یرسینیوز و دوگانه به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد به‌دست آمد. در مورد گلبول‌های سفید نیز افزایشی در تعداد آن‌ها در تیمار ایمن شده با واکسن یرسینیوز و واکسن دوگانه مشاهده گردید. سایر شاخص‌های ایمنی و هم‌چنین شاخص‌های خونی تحت تأثیر ایمن‌سازی با واکسن قرار نگرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری: تجویز واکسن دوگانه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان علاوه بر ایجاد محافظت مناسب در برابر بیماری، به نحو مؤثری باعث ایجاد پاسخ ایمنی گردیده که قابل رقابت با هریک از واکسن‌ها به تنهایی می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: alishahimoj@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲ آبان ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱ آذر ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۳ بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۵ اسفند ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.268851.2451

مقدمه

به‌دلیل شرایط بوم‌شناختی و سازگاری با شرایط زیست‌محیطی و رشدسریع، قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در ایران است(۱).این ماهی از اهمیت بسیار زیادی در سیاست‌گذاری‌ها و برنامه‌ریزی‌های تحقیقاتی و اجرایی برخوردار بوده و با تولیدی به میزان ۱۸۹۹۳۲تن نقش مهمی در تأمین پروتئین کشور ایفا می‌کند (۲). در بیان اهمیت جایگاه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ذکر این نکته ضروری است که از ۸۴۸ هزار تن تولید ماهی قزل‌آلا در دنیا، ایران دارای جایگاه نخست تولید این ماهی می‌باشد (۳). بنابراین توجه به این صنعت از نظر جلوگیری از شیوع و بروز انواع بیماری‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. از بیماری‌هایی که در چند سال اخیر شیوع و بروز آن‌ها در مزارع پرورشی باعث بروز تلفات و خساراتی گردیده است بیماری‌های باکتریایی استرپتوکوکوس و یرسینیوز می‌باشد (۴، ۵). در همین راستا امروزه ساخت و استفاده از واکسن‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌های برقراری شرایط ایمنی‌زیستی و از موثرترین روش‌های مقابله با بیماری‌های باکتریایی در مزارع پرورشی در حال توسعه می‌باشد (۶). هر چند امروزه غالب واکسن‌های در دسترس آبزی‌پروری، تک‌واحدی یا مونووالانت می‌باشند، ولی با توجه به مزیت‌های متعدد استفاده از واکسن‌های چند واحدی (پلی‌والانت) در چند سال اخیر بیش‌تر مورد توجه محققان قرار گرفته و امروزه در پرورش آزاد ماهیان در نروژ حتی واکسن‌های پنج‌واحدی هم کاربردی شده‌اند (۷، ۸). بنابراین به‌کارگیری واکسن پلی‌والان از جهات مختلف نسبت به واکسن مونووالان (تک‌واحدی) ارجحیت داشته و استراتژی ایمنی‌سازی با چند عامل در تحریک پاسخ ایمنی موثرتر واقع شده و موجب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی در برابر گستره وسیعی از بیماری‌ها می‌گردد، علاوه بر آن کاهش هزینه و استرس ماهی را نیز به‌دنبال دارد (۹). به‌طوری‌که در نروژ واکسن‌های ۴ یا ۵ واحدی در ماهی آزاد اقیانوس اطلس استفاده می‌شود (۱۰). مطالعات مختلفی درخصوص بررسی ایمنی‌زایی واکسن‌های دوگانه انجام گرفته شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعه Karami و همکاران اشاره کرد که به بررسی اثر واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس بر پاسخ ایمنی اختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند (۱۱). در مطالعه دیگری Shomaker و همکاران، واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/ ویبریو را در ماهی تیلاپیای تغییر جنسیت یافته با موفقیت استفاده کردند و کارایی مناسب این واکسن را به‌روش تزریقی گزارش نمودند (۱۲). هم‌چنین Bastardo و همکاران، واکسن دوگانه لاکتوکوکوس/ آئروموناس را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کرده و کارایی این دو واکسن را نسبت به واکسن‌های تک‌واحدی هر باکتری مشابه گزارش کردند (۱۳). از آن‌جایی‌که تاکنون مطالعه مستقلی درخصوص اثرات ایمنی تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ یرسینیوزیس انجام نگرفته است بنابراین در این مطالعه به بررسی تأثیر تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/یرسینیوز بر روی برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخته شد. از مهم‌ترین اهدافی که در این مطالعه دنبال می‌شود می‌توان به تجویز تزریقی واکسن‌ها به‌صورت تکی و دوگانه و بررسی کارایی و ایمنی‌زایی آن‌ها اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط محل انجام آزمایش: تعداد ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به وزن ۲±۲۵ گرم در زمستان ۱۳۹۸ از یکی از مزارع استان کهگیلویه و بویراحمد تهیه و به مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج منتقل گردید. قبل از انتقال، ماهیان از لحاظ عدم ابتلا به بیماری استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس مورد آزمایش قرار گرفتند. ماهیان در ۱۲ عدد مخزن فایبرگلاس با گنجایش ۲۰۰۰ لیتر به چهار تیمار مساوی (هر تیمار در سه تکرار ۲۵ قطعه ای) تقسیم (جدول ۱) و پرورش آن‌ها همراه با شرایط محیطی کنترل شده و یکسان انجام پذیرفت. قبل از شروع تحقیق سازگاری ماهیان به شرایط پرورشی جدید به‌مدت ۲ هفته انجام پذیرفت. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای ۰/۷±۱۲/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۰/۴±۹ میلی‌گرم در لیتر، سختی ۲۲±۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و میزان pH برابر با ۰/۲±۷/۸ انجام پذیرفت. تغذیه ماهیان به‌مدت ۶۰ روز با غذای تجاری و به‌میزان ۲/۸ درصدوزن بدن صورت گرفت.

جدول ۱: تیمارهای آزمایشی

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
تیمار ۱	ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوس	۷۵ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۲	تیمار ایمن شده با واکسن یرسینیوز	۷۵ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۳	ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/یرسینیوز	۷۵ قطعه (در سه تکرار)
شاهد	بدون تزریق واکسن (سرم فیزیولوژی)	۷۵ قطعه(در سه تکرار)

تهیه واکسن: بذر باکتریایی انتخاب شده *استرپتوکوکوس اینیه* و *یرسینیا راکری* در محیط کشت مایع TSB به‌مدت ۳۶ ساعت (فاز رشد لگاریتمی) کشت داده شد. سپس با استفاده از فرمالین ۱ درصد

و انکوبه کردن به‌مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه، غیرفعال شده و سه مرتبه با بافر فسفات استریل شستشو گردید تا فرمالین باقی‌مانده حذف شود. به‌منظور اطمینان از غیرفعال شدن، باکتری قبل از استفاده در محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. باکتری با استفاده از لوله‌های استاندارد مک‌فارلن به غلظت 10^{10} باکتری در میلی‌لیتر تنظیم و به عنوان واکسن (FKC) تک‌واحدی و ترکیب مساوی این دو باکتری به‌عنوان واکسن دوگانه استفاده شد.

واکسیناسیون: واکسیناسیون در روز صفر و روز ۱۴ به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر به‌روش تزریق داخل صفاقی انجام گرفت. به گروه شاهد ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به‌جای واکسن تزریق گردید. از هر تیمار ۹ ماهی (هر تکرار ۳ عدد) در روز صفر، ۳۰ و ۶۰ نمونه خون اخذ و آزمایشات خونی و ایمنی‌شناسی زیر روی آن‌ها انجام گرفت.

اندازه‌گیری میزان فعالیت کمپلمان سرم: جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده گردید (۱۴). برای این‌کار ابتدا آگارز ۱/۵٪ در بافر فسفات (pH=۷/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلرید کلسیم) تهیه و مقدار 1×10^{8} گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت‌ها توزیع گردید. پلیت‌ها به‌مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر از هم در آگار ایجاد و در هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس از آن قطر هاله لیز گلبولی با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی استفاده شد. برای این‌کار در ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *میکروکوکوس لیزوداکتیکوس* (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH=۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت تخت مخلوط و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های ۰ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۵).

اندازه‌گیری پروتئین کل و گلوبولین پلاسما: برای اندازه‌گیری غلظت ایمنوگلوبولین کل از روش توصیه شده توسط Swain و همکاران استفاده گردید (۱۶). به این منظور ابتدا میزان پروتئین کل و البومین سرم توسط کیت‌های زیست‌شیمی (ایران) اندازه‌گیری شده، میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه گردید (۱۶).

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم: برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش Kajita و همکاران، با کمی تغییرات استفاده شد. در این روش سرم ماهی در مجاورت باکتری قرار داده شده و بعد از ۳۰ دقیقه کشت انجام شده و باکتری‌ها شمارش شدند. برای این‌کار ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به‌مدت ۶ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس از آن رقت 2×10^{5} تهیه گردید. نمونه سرمی با سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شده و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوباسیون صورت گرفت، سپس از مخلوط باکتری و سرم کشت در محیط TSA تهیه شده و کاهش تعداد باکتری نسبت به گروه شاهد نشان‌دهنده قدرت ضدباکتریایی سرم ماهی می‌باشد (۱۷).

اندازه‌گیری احیاء NBT: برای ارزیابی احیاء NBT مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل گوده‌های میکروپلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه گردید. پلیت به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشت، و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرمامید اضافه گردید. سپس از نمونه سانتریفوژ، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۸).

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی: هماتوکریت (PCV) به‌روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ نمونه در ۱۰۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه صورت گرفت (۱۸). اندازه‌گیری هموگلوبین به‌روش سیانومت هموگلوبین و با استفاده از محلول درابکین انجام گرفت. بدین‌صورت که ۲۰میکرولیتر از خون را به ۵ میلی‌لیتر از محلول درابکین اضافه کرده بعد از ۵ دقیقه و پس از صفر کردن اسپکتروفتومتر با محلول بلانک، جذب تمام نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰nm خوانده و میزان هموگلوبین برحسب گرم در دسی لیتر محاسبه گردید جهت شمارش کلی گلبول‌های قرمز و سفید، نمونه‌های خونی به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده نات-هریک (Natt-Herrik) رقیق و شمارش با استفاده از لام نئوبار انجام گرفت (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای بررسی معنی‌داری بودن تفاوت بین میانگین‌ها در ۴ گروه تحقیق از پس‌آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های خونی: نتایج حاصل از تأثیر واکسن دوگانه استرپتوکوکوس اینیه و یرسینیا راکری بر روی برخی از فاکتورهای

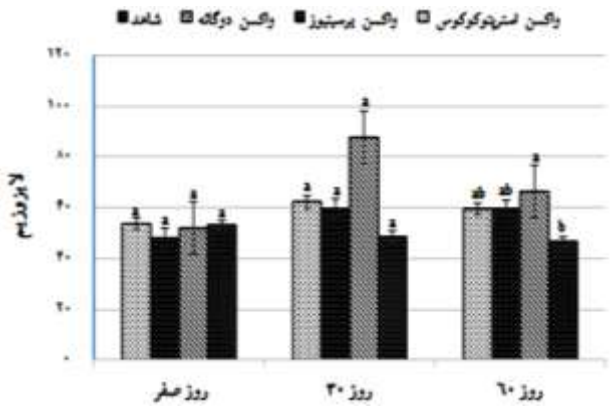
خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ در جدول ۲ آورده‌شده است. همان‌گونه که در جدول ملاحظه می‌گردد، در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش در میزان هماتوکریت، هموگلوبین و گلبول‌های قرمز تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. هرچند افزایشی در میزان هماتوکریت واکسن دوگانه در روز ۳۰ نسبت به سایر تیمارها مشاهده می‌گردد که این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد ($p>0/05$). در مورد گلبول‌های سفید نیز تعداد آن در تیمار واکسن یرسینیوز و واکسن دوگانه در روز ۳۰ نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بود که این افزایش در تیمار واکسن یرسینیوز به‌صورت معنی‌دار ($p<0/05$) و در واکسن دوگانه غیرمعنی‌دار می‌باشد ($p>0/05$). در روز ۶۰ نیز افزایشی در تعداد گلبول‌های سفید در گروه واکسن یرسینیوز و واکسن دوگانه مشاهده شد که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول۲: مقایسه میانگین (± انحراف معیار) برخی از شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مراحل مختلف نمونه‌گیری تحقیق

زمان	تیمار	هماتوکریت	هموگلوبین	گلبول سفید	گلبول قرمز
روز صفر	واکسن استرپتوکوکوس	۳۸/۶۷ ± ۹/۴۵ a	۳/۵۵ ± ۱/۳۱ a	۲۷/۳۳ ± ۵/۵۸ a	۱/۱۸ ± ۰/۱۹ a
	واکسن یرسینیوز	۳۹/۰۰ ± ۱۰/۵۴ a	۳/۵۲ ± ۰/۹۸ a	۲۷/۳۳ ± ۵/۵۸ a	۱/۱۷ ± ۰/۰۷ a
	واکسن دوگانه	۳۸/۳۳ ± ۹/۲۹ a	۳/۵۵ ± ۱/۳۱ a	۲۷/۳۳ ± ۵/۵۸ a	۱/۲۰ ± ۰/۱۲ a
	کنترل	۳۷/۳۳ ± ۹/۰۲ a	۳/۷۱ ± ۱/۲۲ a	۲۷/۳۳ ± ۵/۵۸ a	۱/۱۴ ± ۰/۱۳ a
روز ۳۰	واکسن استرپتوکوکوس	۳۶/۶۷ ± ۳/۷۹ a	۳/۶۹ ± ۱/۳۳ a	۲۷/۰۰ ± ۴/۴۶ b	۱/۱۵ ± ۰/۰۳ a
	واکسن یرسینیوز	۳۷/۶۷ ± ۷/۰۹ a	۳/۷۷ ± ۰/۲۲ a	۴۲/۵۰ ± ۱/۰۰ a	۱/۲۳ ± ۰/۲۵ a
	واکسن دوگانه	۳۹/۶۷ ± ۱/۱۵ a	۳/۶۳ ± ۱/۱۵ a	۳۴/۶۷ ± ۴/۵۴ ab	۱/۲۲ ± ۰/۰۶ a
	کنترل	۳۹/۳۳ ± ۵/۵۱ a	۳/۵۵ ± ۰/۱۰ a	۲۸/۰۰ ± ۶/۰۶ b	۱/۱۶ ± ۰/۲۲ a
روز ۶۰	واکسن استرپتوکوکوس	۳۷/۲۵ ± ۴/۶۵ a	۳/۵۸ ± ۱/۵۱ a	۳۲/۱۳ ± ۴/۴۴ a	۱/۲۳ ± ۰/۲۹ a
	واکسن یرسینیوز	۳۷/۰۰ ± ۸/۵۲ a	±۷۹/۳ ۰/۱۲ a	۳۵/۰۰ ± ۳/۸۱ a	۱/۲۱ ± ۰/۱۴ a
	واکسن دوگانه	۳۵/۵ ± ۱۳/۷ a	۳/۹۲ ± ۱/۶۲ a	۳۳/۵۰ ± ۴/۰۲ a	۱/۱۸ ± ۰/۱۰ a
	کنترل	۳۲/۵ ± ۱۴/۷۵ a	۳/۹۶ ± ۱/۲۰ a	۲۹/۳۳ ± ۳/۳۵ a	۱/۱۹ ± ۰/۱۶ a

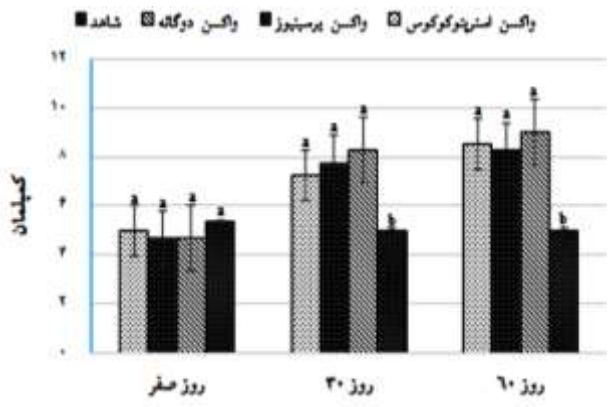
حروف لاتین کوچک غیرمشابه به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

شاخص‌های ایمنی: در مورد اندازه‌گیری لایزوزیم در بین تیمارهای آزمایشی همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، در روز ۶۰ این میزان در واکسن استرپتوکوکوس (۵۹/۵۸±۸/۵۴)، واکسن یرسینیوز (۵۹/۳۳±۸/۸۳) و واکسن دوگانه (۶۶/۶۷±۱۰/۲۷) بیش‌تر از گروه شاهد (۴۶/۶۷±۱۱/۴۷) بود که در مورد واکسن دوگانه این افزایش نسبت به گروه شاهد به‌صورت معنی‌دار می‌باشد. میزان فعالیت کمپلمان نیز هم‌در روز ۳۰ و هم در روز ۶۰ در تیمارهای ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوس، یرسینیوز و دوگانه به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد به‌دست آمد ($p<0/05$) (شکل ۲).



شکل ۱: میزان فعالیت لایزوزیم در تیمارهای آزمایشی

(حروف لاتین کوچک غیرمشابه به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است)



شکل ۲: میزان فعالیت کمپلمان در تیمارهای آزمایشی

(حروف لاتین کوچک غیرمشابه به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

در مورد میزان قدرت باکتری‌کشی سرم نیز افزایشی در تیمارهای واکسن پرسینوز و واکسن دوگانه و هم‌چنین گروه شاهد در روز ۳۰ نسبت به تیمار واکسن استرپتوکوکوزیس مشاهده گردید که این افزایش در تیمار شاهد نسبت به تیمار واکسن استرپتوکوکوزیس معنی‌دار بود ($p<0/05$). هیچ اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی در روزهای ۳۰ و ۶۰ از نظر شاخص‌هایی مانند آلبومین، پروتئین تام و قدرت احیاء مشاهده نگردید. درصورتی‌که میزان گلوبولین در روز ۳۰ در تیمارهای واکسن استرپتوکوکوزیس، واکسن دوگانه و گروه شاهد بیش‌تر از تیمار واکسن پرسینوز بود (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین (± انحراف معیار) برخی از شاخص‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مراحل مختلف نمونه‌گیری تحقیق

زمان	تیمار	قدرت باکتری کشی	آلبومین	پروتئین کل	گلوبولین تام	NBT(احیاء)
روز صفر	واکسن استرپتوکوکوس	۰/۶۶ ± ۰/۰۴ a	۲/۶ ± ۰/۳۲ a	۴/۸۳ ± ۰/۴۹ a	۲/۲۳ ± ۰/۲۱ a	۰/۹۵ ± ۰/۰۶ a
	واکسن پرسینوز	۰/۶۶ ± ۰/۰۴ a	۲/۶۵ ± ۰/۱۸ a	۴/۹۵ ± ۰/۲۷ a	۲/۲۹ ± ۰/۰۹ a	۰/۹۸ ± ۰/۰۳ a
	واکسن دوگانه	۰/۶۶ ± ۰/۰۴ a	۲/۶۶ ± ۰/۰۴ a	۵/۰۳ ± ۰/۱۰ a	۲/۳۷ ± ۰/۰۷ a	۰/۹۷ ± ۰/۱ a
	کنترل	۰/۶۶ ± ۰/۰۴ a	۲/۶ ± ۰/۴۳ a	۴/۸۹ ± ۰/۷۹ a	۲/۲۸ ± ۰/۳۷ a	۰/۹۸ ± ۰/۱۶ a
روز ۳۰	واکسن استرپتوکوکوس	۰/۳۲ ± ۰/۰۷ b	۲/۵۹ ± ۰/۰۸ a	۴/۸۷ ± ۰/۱۴ a	۲/۲۸ ± ۰/۰۷ ab	۰/۹۳ ± ۰/۰۹ a
	واکسن پرسینوز	۰/۳۷ ± ۰/۰۶ ab	۲/۴۲ ± ۰/۱۲ a	۴/۵۴ ± ۰/۲۲ a	۲/۲۶ ± ۰/۲۹ b	۱/۰۶ ± ۰/۰۸ a
	واکسن دوگانه	۰/۳۷ ± ۰/۰۸ ab	۲/۵۸ ± ۰/۱۶ a	۴/۸۶ ± ۰/۳۱ a	۲/۲۷ ± ۰/۱۴ ab	۱/۱۶ ± ۰/۲۲ a
	کنترل	۰/۶۶ ± ۰/۰۵ a	۲/۷ ± ۰/۳۷ a	۵/۱۳ ± ۰/۶۳ a	۲/۴۳ ± ۰/۲۶ a	۱/۰۰ ± ۰/۰۱ a
روز ۶۰	واکسن استرپتوکوکوس	۰/۲۹ ± ۰/۰۹ a	۲/۸۳ ± ۰/۵۷ a	۵/۳۲ ± ۱/۰۷ a	۲/۴۹ ± ۰/۵ a	۰/۹۳ ± ۰/۰۸ a
	واکسن پرسینوز	۰/۲۹ ± ۰/۰۳ a	۲/۵۹ ± ۰/۱۵ a	۴/۸۷ ± ۰/۲۷ a	۲/۲۸ ± ۰/۱۳ a	۰/۹۹ ± ۰/۰۵ a
	واکسن دوگانه	۰/۳۱ ± ۰/۰۹ a	۲/۵۳ ± ۰/۱۴ a	۴/۷۵ ± ۰/۲۷ a	۲/۲۳ ± ۰/۱۲ a	۱/۰۰ ± ۰/۱۴ a
	کنترل	۰/۴ ± ۰/۰۷ a	۲/۵۸ ± ۰/۰۹ a	۴/۸۷ ± ۰/۱۵ a	۲/۳ ± ۰/۰۷ a	۰/۹۶ ± ۰/۰۳ a

حروف لاتین کوچک غیرمشابه به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

بحث

در این تحقیق اثر تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ یرسینیوزیس بر روی برخی از پارامترهای خونی و ایمنی مطالعه شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز واکسن تزریقی استرپتوکوکوزیس/ یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بهبود برخی از شاخص‌های ایمنی را به‌دنبال خواهد داشت. هرچند میزان شاخص‌های خونی دچار تغییرات چندانی در اثر تجویز واکسن نگردید. آنالیز نتایج نشان داد که گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری ندارند اما تعداد گلبول‌های سفید در روز ۳۰ واکسیناسیون در تیمار ایمن شده با واکسن یرسینیوز و واکسن دوگانه نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر می‌باشد که این افزایش در تیمار واکسن یرسینیوز به‌صورت معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$). مشابه با این نتایج در مطالعه Karami و همکاران، افزایش معنی‌دار میزان گلبول‌های سفید در روزهای ۱۴، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ واکسیناسیون نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید (۱۱). افزایش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند بیانگر تأثیر واکسن بر تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی باشد. هم‌چنین Faghani و همکاران، عدم تأثیر ایمن‌سازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر استرپتوکوکوزیس به‌همراه آلژنیک اسید را بر شاخص‌های خونی گزارش نمودند (۲۰). در مطالعه دیگری Alishahi و همکاران، گزارش نمودند ایمن‌سازی کپور معمولی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا دارای تأثیر معنی‌داری بر روی شاخص‌های خونی (هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز) نمی‌باشد (۲۱). Alishahi و همکاران، عدم تأثیر ایمن‌سازی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا و ادجوانت نانوکیتوزان را بر شاخص‌های خونی مذکور در ماهی کپور معمولی گزارش نمودند (۲۲). لذا می‌توان نتیجه گرفت با توجه به عدم تغییر شاخص‌های خونی در مطالعه حاضر و نیز مطالعات مشابه ذکر شده، ایمن‌سازی بر روی شاخص‌های خونی مربوط به گلبول قرمز بی‌تأثیر بوده و به احتمال زیاد در مراحل خون‌سازی بافت‌های خون‌ساز و هم‌چنین در طول عمر گلبول‌های قرمز نقشی ندارد. در این مطالعه افزایش میزان فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوس، یرسینیوز و تیمار واکسن دوگانه در روز ۶۰ واکسیناسیون نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد که این افزایش در تیمار واکسن دوگانه معنی‌دار بود ($p<0/05$). این افزایش می‌تواند نشانگر بهبود کارایی سیستم ایمنی ذاتی ماهی باشد. در مطالعه‌ای افزایش معنی‌دار میزان فعالیت لایزوزیم سرم ماهیان قزل‌آلای ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوس/ لاکتوکوکوس در تمام مراحل نمونه‌برداری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (۲۳). Alishahi و همکاران، افزایش فعالیت لایزوزیم سرم ماهی کپور ایمن شده با باکتری کشته آئروموناس هیدروفیلا را گزارش نمودند (۲۴). یکی از مهم‌ترین شاخص‌های نشان‌دهنده کارایی سیستم ایمنی ماهی افزایش میزان لایزوزیم می‌باشد (۲۵). لایزوزیم یکی از ترکیبات هومورال سیستم ایمنی غیراختصاصی است که منجر به شکسته شدن پیوند بتا ۱-۴ بین ان-استیل مورامیک اسید و ان استیل گلوکزامین در دیواره سلولی باکتری‌ها می‌گردد. و بدبن ترتیب باعث تخریب دیواره سلولی آن‌ها می‌گردد و هم‌چنین موجب افزایش فعالیت بیگانه‌خواری شده و نقش اپسونین در ماهی داراست (۲۶). در مورد اندازه‌گیری میزان فعالیت کمپلمان در تیمارهای آزمایشی، نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار فعالیت کمپلمان در تیمارهای واکسینه شده نسبت به گروه شاهد در روز ۳۰ و روز ۶۰ می‌باشد ($p<0/05$). مشابه با نتایج این تحقیق Karami و همکاران، افزایش فعالیت سیستم کمپلمان در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس را در اکثر مراحل نمونه‌گیری در تیمار واکسینه نسبت به گروه شاهد گزارش نمودند. که این افزایش فعالیت را می‌توان به آنتی‌ژن‌های موجود در واکسن نسبت داد که علاوه بر تحریک تولید ایمنی اختصاصی، بهبود کارایی ایمنی غیراختصاصی ماهی را نیز باعث شده است (۱۱). هم‌چنین Wang و همکاران، نشان دادند ایمنی‌سازی گربه ماهی کانالی (*Lctalurus punctatus*) با واکسن تحت واحد استرپتوکوکوس اینیه موجب افزایش در فعالیت کمپلمان گردیده است (۲۷). البته گزارشات از تاثیر واکسیناسیون بر فعالیت سیستم کمپلمان در ماهی متفاوت و بعضاً متناقض بوده است. Alishahi و همکاران، عدم تاثیر ایمنی‌سازی بر فعالیت کمپلمان سرم را گزارش نموده‌اند (۲۱). درحالی‌که Soltani و همکاران، افزایش فعالیت کمپلمان سرم در ماهیان ایمن شده با باکتری فرمالینه استرپتوکوکوس اینیه به‌روش تزریق داخل صفاقی در ماهی قزل‌آلا را گزارش نمودند (۲۸). Xiujuan Zhou، واکسن ژنی دوگانه در برابر دو ویبریوی بیماریزای ماهی فلاندر ژاپنی را با موفقیت استفاده کرده و تا ۷ هفته تیتر آنتی‌بادی و محافظت را گزارش نمودند (۲۹). هم‌چنین Jing Xinga و همکاران، از پروتئین‌های نوترکیب Hsp33 و OmpC به‌عنوان واکسن دوگانه علیه باکتری‌های ویبریو آنگویلاروم و ادواردزیلا تاردا در ماهی فلاندر (*Paralichthys olivaceus*) استفاده کرده و ۵ هفته بعد از واکسیناسیون، کارایی مناسب واکسن را گزارش نمودند (۳۰). نتایج کلی این تحقیق بیانگر این است که تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان علاوه بر ایجاد محافظت مناسب در برابر بیماری، به‌نحو مؤثری باعث ایجاد پاسخ ایمنی در برابر این دو بیماری می‌گردد که قابل رقابت با هریک از واکسن‌ها به تنهایی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح از محل اعتبارات معاونت ترویج سازمان جهادکشاورزی استان کهگیلویه و بویراحمد، توسط مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهیدمطهری یاسوج و با همکاری دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. بدین‌وسیله از زحمات کلیه کسانی که در انجام این پژوهش یاری نمودند کمال تقدیر و تشکر را به‌عمل می‌آید.

منابع

1. **Rastiannasab, A., Mousavi, S., Zolgharnein, H. and Hosseinzadeh Sahafi, H., 2017.** Effect of the food supplemented probioenzyme on expression of immune related genes and redmouth disease (yersiniosis) control in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 26(1): 153-166. (In Persian)
2. **Annual Statistics of Iranian Fisheries. 2021.** Planning and development office of Iranian Fisheries Organization. Irran. Tehran. (In Persian)
3. **The state of world fisheries and aquaculture. 2020.** http://www.fao.org/publications/sofia/ 2020/en/.
4. **Faeed, M. and Ramezani, B., 2018.** Bacterial Study of Streptococcosis in Infected fish and Antibiotic Resistance in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Guilan Province. Journal of Aquaculture Development. 12(2): 103-112. (In Persian)
5. **Soltani, M., Mousavi, Sh., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Mirzargar, S., Taheri Mirghaed, A., Shafiei, Sh., Shohreh, P. and Mohammadian, S., 2014.** Molecular study of Yersinia ruckeri distribution, the causative agent of yersiniosis in some farmed rainbow trout of Iran. Iranian Veterinary Journal. 10(1): 59-67. (In Persian)
6. **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. 29(35): 5986-5993.
7. **Evensen, Ø., 2016.** Development of fish vaccines: Focusing on methods. In Fish Vaccines; Adams, A., Ed.; Springer: Basel, Switzerland. 53-74.
8. **Ma, J., Bruce, T.J., Jones, E.M. and Cain, K.D., 2019.** A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms. *7*(11): 569-587.
9. **Adams, A., 2019.** Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. Fish & shellfish immunology. 90: 210-214.
10. **Azhdahakoshpour, A., Payghan, R., Ahangarzadeh, M. and Mohseninejad, L., 2018.** Incidence of Vibriosis disease of Cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) in cage and pond farms. Journal of Marine Fishes. 2(3): 27-33. (In Persian)
11. **Karami, E., Alishahi, M., Tabandeh, M., Ghorbanpour, M. and Mohammadian, T., 2017.** Evaluation of immunogenicity of bivalent vaccine Streptococosis / Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Animal Environment. 9(4): 199-206. (In Persian)
12. **Shomaker, C.A. and Klesius, P., 2012.** Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus.*Aquaculture. 354-355: 45-49.
13. **Bastardo, A., Ravelo, C., Castro, N., Calheiros, J. and Romalde, J.L., 2012.** Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish & Shellfish Immunology. 32(5): 756-761.
14. **Brata, O., 1993.** Veterinary Clinical Immunology Laboratory 2. Bar-Lab Inc. 24-25.
15. **Nayak, S.K., Swain, P., Nanda, P.K., Dash, S., Shukla, S., Meher, P.K. and Maiti, N.K., 2010.** Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. Fish & shellfish immunology. 24(4): 394-399.
16. **Swain, P., Sahoo, P.K. and Ayyappan, S., (Eds) 2007.** Fish & shellfish immunology, Navendra Publishing House, D., Woo, P.T.K. and Bruno, D.W., (eds.), 1999. Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, CABI, U.K., 874 p. Delhi. 239: 1-12.
17. **Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayash, M., 1990.** The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathology. 25(2): 93-98.
18. **Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000.** Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 1124: 67-73.
19. **Thrall, M.A., Baker, D.C. and Lassen, E.D., 2004.** Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations Set. John Wiley & Sons. UK, London. 241-402.
20. **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*). World Journal of Zoology. 3(2): 54-58.
21. **Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M. and jalali, M., 2010.** Effects of dietary Aloe vera on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). International Journal of Veterinary Research. 4(3): 189-195.
22. **Alishahi, M., Esmaeili Rad, A., Zarei, M. and Ghorbanpour, M., 2014.** Effect of dietary chitosan on

immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 8(2): 125-133.

23. **Karami, E., Alishahi, M., Ghorbanpour, M., Tanande, M. and Mohammadiyan, T., 2019.** Serum antibody response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to two species of pathogenic bacteria; *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae*. Iranian Scientific Fisheries Journal. 28(1):1-8. (In Persian)
24. **Alishahi, M., Saidimanesh, M., Mesbah, M. and Zarei, M., 2016.** Effect of nanochitosan on immunogenicity of Aeromonas hydrophila oral vaccine in Cyprinus carpio. Iranian Veterinary Journal. 12(1): 53-65. (In Persian)
25. **Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J., Kim, J.B., Jang, Y.S. and Choe, C.H., 2008.** Dietary Koren mistletoe enhances cellular non- specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish Shellfish Immunol. 24 (1): 67-73.
26. **Ellis, A.E., 1990.** Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology. 9: 291-308. For Responsible fisheries.NO.5/suppl.4.Rome. 53p.
27. **Wang, E., Wang, J., Long, B., Kaiyu, W., Yang, H., Qian Huang, H., Ouyang, P. and Lai, H., 2016.** Molecular cloning, expression and the adjuvant effects of interleukin-8 of channel catfish (*Ictalurus Punctatus*) against *Streptococcus iniae*. Sci. Rep. 4(6): 29310 p.
28. **Soltani, M., Alishahi, M., Mirzargar, S. and Nikbakht, G., 2007.** Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 7(1): 129-140.
29. **Zhou, X., Xing, J., Tang, X. and Zhan, W., 2018.** Evaluation of bivalent vaccines candidates among VAA, OmpK and OmpR from Vibrio anguillarum in flounder (*Paralichthys olivaceus*). Dev Comp Immunol. 85: 1-9.
30. **Xing, J., Wang, L., Zhen, M., Tang, X. and Zhan, W., 2018.** Variations of T and B lymphocytes of flounder (*Paralichthys olivaceus*) after Hirame novirhabdovirus infection and immunization. Mol Immunol. 96: 19-27.