15(1) 191-200, Spring 2023

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

Original Research Paper

Effects of using GaroVak immersion vaccine in rearing the juvenile Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and experimentally infected with *Streptococcus iniae*

Vahid Morshedi [1*], Nehzat Bakhshi [1], Hadi Ebrahimi [1], SiamakYousefi Siahkalroudi [2]

[1] *Department of Fisheries and Marine Biology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran*
[2] *Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran*

Key Words
Immersion vaccine
Survival rate
Bacterial challenge
Immunological responses
Asian sea bass

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the effects of GaroVak immersion vaccine against lactococcosis and streptococcosis disease in different weights on growth and feeding performance and some immunological responses and survival rate of Asian Sea bass (*Lates calcarifer*).

Materials & Methods: Fish with an average weight of 5, 10 and 14 g in 300-liter polyethylene circular tanks in 6 treatments and 2 repetitions including vaccinated groups in low, medium and high-weights and control groups of each the weight without vaccination (SC, MC, LC) were examined. Feeding was done twice a day *ad libitum* for 8 weeks.

Results: The obtained results showed that GaroVak immersion vaccine has no significant effect on growth and feeding performance the vaccinated fish and the control fish ($P>0.05$). Regarding immunological responses, the amount of total protein and albumin was significantly higher in the low weight-treatment compared to the low-weight control group, and no significant difference was observed in the medium-weight and the high-weight between the vaccinated treatments and the control group ($P>0.05$). Also, vaccination did not show a significant effect on antibody titer and lysozyme activity in any of the treatments ($P>0.05$). In addition, the survival rate at the end of the experiment did not show a significant difference between the vaccinated treatments and the control group ($P>0.05$). However, the result of the bacterial challenge showed that mortality rate in the low-weight vaccinated group was lower than the medium-weight control group ($P<0.05$).

Conclusion: According to the general results of this study, administration of GaroVak immersion vaccine against streptococcosis disease has been able to improve the survival rate after bacterial challenge in low-weight of Asian seabass.

* Corresponding Author's email: siamak.yousefi1@gmail.com; v.morshedi@gmail.com
Received: 10 February 2022; Reviewed: 16 March 2022; Revised: 18 May 2022; Accepted: 20 June 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.387492.2939

مقاله پژوهشی

اثرات استفاده از واکسن غوطه‌وری گارووواک در پرورش بچه‌ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) و چالش باکتریایی با *Streptococcus iniae*

وحید مرشدی[1*]، نهضت بخشی[1]، هادی ابراهیمی[1]، سیامک یوسفی‌سیاه‌کلرودی[2*]

[1] گروه شیلات و زیست‌شناسی دریا، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

[2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

کلمات کلیدی

واکسن غوطه‌وری
میزان بازماندگی
چالش باکتریایی
شاخص‌های ایمنی
ماهی سی‌باس آسیایی

چکیده

مقدمه: هدف از این‌مطالعه بررسی اثرات واکسن غوطه‌وری گارووواک علیه بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در وزن‌های مختلف ماهی بر عملکرد رشد و تغذیه، برخی شاخص‌های ایمنی و میزان بازماندگی ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) بود.

مواد و روش‌ها: ماهیان با میانگین وزنی ۵، ۱۰ و ۱۴ گرم در مخازن مدور ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی در ۶ تیمار و دو تکرار شامل تیمارهای واکسینه شده در وزن‌های پایین (ST)، متوسط (MT) و بالا (LT) و گروه‌های شاهد هر یک از وزن‌ها شامل پایین (SC)، متوسط (MC) و بالا (LC) بدون اعمال واکسیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند. غذادهی دو بار در روز و تا حد سیری به‌مدت ۸ هفته انجام شد.

نتایج: نتایج حاصل بیانگر این بود که واکسن غوطه‌وری گارووواک اثر معنی‌داری بر عملکرد رشد و تغذیه ماهیان واکسینه شده و شاهد ندارد ($P>0/05$). در مورد شاخص‌های ایمنی میزان پروتئین کل و آلبومین در تیمار واکسینه شده وزن پایین به‌صورت معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد وزن ST بود ($P<0/05$) و در تیمار وزن متوسط و وزن بالا تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های واکسینه شده و شاهد مشاهده نگردید ($P>0/05$). هم‌چنین انجام واکسیناسیون تاثیر معنی‌داری بر میزان تیتر آنتی‌بادی و لیزوزیم در هیچ‌کدام از تیمارها نشان نداد ($P>0/05$). علاوه بر این، میزان بازماندگی نیز در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای واکسینه و گروه شاهد نشان نداد ($P>0/05$). با این‌حال، نتایج مربوط به چالش باکتریایی نشان داد که میزان تلفات در تیمار واکسینه شده وزن ST به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد وزن MT کم‌تر بود ($P<0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج کلی این مطالعه، تجویز واکسن غوطه‌وری گارووواک بر علیه بیماری استرپتوکوکوزیس توانسته است در وزن ST ماهی سی‌باس آسیایی میزان بازماندگی بعد از چالش باکتریایی را بهبود ببخشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: siamak.yousefi1@gmail.com; v.morshedi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲۱ بهمن ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۲۵ اسفند ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲۸ اردیبهشت ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۳۰ خرداد ۱۴۰۱
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.387492.2939

مقدمه

ماهی باس آسیایی با نام علمی *Lates calcarifer* یکی از اعضای بزرگ خانواده Latidae است که قادر به تحمل محدوده شوری بالا می‌باشد. این گونه از گونه‌های پرورشی مهم در بسیاری از کشورها به‌ویژه استرالیا و جنوب‌شرق آسیاست که با توجه به قیمت مناسب جهانی، سرعت رشد مناسب و مقاومت بالا در برابر عوامل بیماری‌زا و قابلیت تحمل دامنه وسیعی از شوری‌های بالا تا پایین بسیار مورد توجه واقع شده‌است (۱). این گونه علاوه بر این‌که در قفس‌های دریایی پرورش داده می‌شود، قابلیت پرورش در استخرهای خاکی و بتونی را نیز دارا می‌باشد (۲). طبق گزارش فائو از کل ماهیان دریایی دنیا، ۱۰۵ هزار تن مربوط به سی‌باس آسیایی بوده که این نکته بیانگر بازارپسندی این ماهی در دنیا می‌باشد (۳). در کشور ایران نیز سیاست‌های دولت در برنامه ششم توسعه بر پرورش ماهی در قفس‌های پرورشی دریایی در جنوب و شمال کشور متمرکز شده است. بررسی‌های ابتدایی روی گونه‌های مختلف ماهی دریایی قابل پرورش در کشور منجر به معرفی ماهی باس آسیایی شد (۴). در سال‌های اخیر آبزی‌پروری یکی از بخش‌های موثر در تولید غذای مورد نیاز جامعه در حال رشد بوده و از چندین دهه گذشته به سرعت به یک صنعت پویا و روبه رشد تبدیل شده است ولی در کنار این رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که ازجمله آن می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد. روش‌های مختلفی در جهت دستیابی به بهبود عملکرد رشد و تغذیه، تحریک سیستم ایمنی و بازماندگی مورد مطالعه قرار گرفته است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از روش‌های سنتی و معمول مبارزه با بیماری‌های باکتریایی در آبزیان است (۵، ۶)، ولی تمایل به حذف آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌علت هزینه بالا، ایجاد مقاومت‌های دارویی، مشکلات زیست‌محیطی، پایین آوردن کیفیت گوشت و مشکلات اجرایی تجویز، باعث شده واکسیناسیون به‌عنوان جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها، بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد (۵). استفاده از واکسن و عملیات واکسیناسیون از مهم‌ترین و مطمئن‌ترین روش‌های پیشگیری شناخته شده علیه برخی بیماری‌ها است. *Streptococcus iniae* یک پاتوژن باکتریایی گرم مثبت است که در چندین گونه از ماهیان دریایی و آب‌شیرین باعث سپتی‌سمی و عفونت پرده مغز (مننژیت) می‌شود و تاکنون گزارشات متعددی از همه‌گیری آن در کشورهای مختلف منتشر شده است (۷، ۸). استرپتوکوکوزیس اولین بار در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران سال ۱۳۷۹ از مازندران گزارش شد (۹) نخستین عامل لاکتوکوکوس گارویه نیز در قزل‌آلای رنگین‌کمان در مزرعه‌ای در فارس مشاهده گردید (۱۰). این باکتری در موارد زیادی از انسان نیز جدا شده است و این مسئله نشان می‌دهد که این باکتری می‌تواند به‌عنوان یک بیماری مشترک انسان و دام باشد (۱۱). زیان اقتصادی ناشی از استرپتوکوکوزیس در جهان ۱۰۰ میلیون دلار برآورد شده است (۱۲). متخصصین بروز و شیوع برخی بیماری‌ها از جمله بیماری استرپتوکووزیس/لاکتوکوکوزیس در ماهی باس دریایی آسیایی را ناشی از درجه حرارت بالا می‌دانند (۱۳). بنابراین با توجه به درجه حرات بالایی که در فصل تابستان در منطقه خلیج فارس شاهد آن هستیم این بیماری به‌عنوان یک عامل خطرساز و تهدیدکننده پرورش ماهی باس دریایی آسیایی می‌تواند مطرح باشد. بیش‌ترین مطالعات در ارتباط با واکسن استرپتوکوکوزیس بر روی سلول کشته شده باکتری با فرمالین با تجویز تزریقی و به صورت تک واحدی بوده است (۱۴). ولی با توجه به آلودگی‌های توام بیماری‌های باکتریایی، به‌کارگیری واکسن پلی‌والان از جهات مختلف نسبت به واکسن مونووالان (تک واحدی) ارجحیت دارد. استفاده از واکسن چندظرفیتی علاوه بر کاهش هزینه، استرس ماهی را نیز کاهش می‌دهد. تحقیقات روی واکسن استرپتوکوکوزیس در ایران بیش از دو دهه سابقه دارد و در مطالعه Soltani و همکاران (۱۵) انواع روش‌های تجویز واکسن فرمالینه بررسی و موثرترین روش، روش تزریقی و به دنبال آن روش غوطه‌وری گزارش شده است. در این تحقیق واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس تولیده شده توسط شرکت بوژان با نام تجاری گارووواک در وزن‌های پایین (۵ گرم)، متوسط (۱۰ گرم) و بالا (۱۴ گرم) به‌صورت غوطه‌وری مورد استفاده قرار گرفت تا مناسب‌ترین وزن جهت واکسیناسیون بچه‌ماهی سی‌باس آسیایی معرفی گردد. علاوه بر آن تاثیرات واکسن بر عملکرد رشد، تغذیه، پاسخ ایمنی و بازماندگی بچه‌ماهی سی‌باس آسیایی ارزیابی و کارایی واکسن با انجام تست چالش بر علیه سویه استرپتوکوکوس اینیایی مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش: ماهیان مورد نیاز آزمایش با میانگین وزن ۱۰-۱ گرم از کارگاه خصوصی پرورش ماهیان دریایی (شرکت راموز بوشهر، ایران) خریداری شده و از طریق ماشین‌های مخصوص حمل به ایستگاه تحقیقاتی آبزیان دریایی پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس منتقل شدند و برای سازگاری با شرایط آزمایش به‌مدت ۱۴ روز به‌وسیله غذای کنسانتره تجاری ماهی سی‌باس (شرکت بیضاء، فارس، ایران؛ ۵۰ درصد پروتئین، ۱۶ درصد چربی، ۱۴ درصد خاکستر، ۱۰ درصد رطوبت، ۲/۵ درصد فیبر) در دو مرحله و در ساعت‌های ۸ و ۱۶ تا حد سیری تغذیه شدند. برای انجام این آزمایش، تعداد ۳۶۰ قطعه بچه‌ماهی در یک طرح کاملاً تصادفی در ۶ تیمار با ۲ تکرار در

هر مخزن توزیع شدند. جهت بررسی عملکرد رشد، تغذیه، پاسخ ایمنی و بازماندگی تحت تاثیر واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گارووواک (شرکت بوژان، تک فارمد) بچه‌ماهیان سی باس آسیایی به‌روش غوطه‌وری به‌مدت ۸ هفته تحت تیمار قرار گرفتند. تیمارهای آزمایش به قرار زیر می باشند:

جدول ۱: وزن های مختلف تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده

تیمار شاهد (بدون استفاده از واکسن)	تیمار واکسینه شده به روش غوطه‌وری
تیمار شاهد وزن پایین (۵ گرم) (SC)	تیمار وزن پایین (۵ گرم (ST)
تیمار شاهد وزن متوسط (۱۰ گرم) (MC)	تیمار وزن متوسط (۱۰ گرم) (MT)
تیمار شاهد وزن بالا (۱۴ گرم) (LC)	تیمار وزن بالا (۱۴ گرم) (LT)

ایمن‌سازی بچه‌ماهیان با واکسن سه‌ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گارووواک (شرکت بوژان، تک فارمد) در دو مرحله (روز شروع آزمایش و پایان هفته ۴ آزمایش) صورت گرفت. در هر دو مرحله واکسن به نسبت ۱ به ۱۰ در آب رقیق گردید و ماهی‌ها به‌مدت ۱-۲ دقیقه در سوسپانسیون واکسن غوطه‌ور شدند (مطابق با دستورالعمل درج شده بر روی بطری واکسن). در گروه‌های شاهد در روز صفر و در روز ۲۸ غوطه‌وری بدون واکسن صورت گرفت. برای انجام عملیات واکسیناسیون به‌مدت ۲۴ ساعت قبل از اعمال واکسن غذادهی ماهیان در تیمارها مختلف قطع شد. در طول مدت آزمایش، بچه‌ماهیان مشابه با دوره‌سازگاری با غذای کنسانتره تجاری ماهی سی‌باس تغذیه‌شده‌و شوری،دما، pH و اکسیژن به‌ترتیب ۱±۴۰ گرم‌در لیتر، ۱±۲۶/۵ °C، ۰/۴±۷/۷۳ و۰/۴±۶/۸ میلی‌گرم‌در لیتر ثبت شد. دوره نوری شامل ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

بررسی پارامترهای رشد و تغذیه: در پایان آزمایش و پس از زیست‌سنجی، شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن بدن (WG%)، نرخ رشد ویژه (SGR%)، ضریب چاقی (CF%) و شاخص‌های تغذیه نظیر غذاگیری روزانه (DFI) ، نسبت بازده پروتئین (PER) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

= درصد افزایش وزن بدن (Weight gain)

وزن اولیه بدن /۱۰۰× (وزن اولیه بدن - وزن نهایی بدن)

= ضریب رشد ویژه (Specific growth rate)

کل روزهای پرورش/۱۰۰× (وزن اولیه بدن Ln - وزن نهایی بدن Ln)

= شاخص وضعیت (Condition factor)

^{3}(میانگین طول نهایی بدن) / ۱۰۰ × میانگین وزن نهایی بدن

= میزان غذاگیری روزانه (Daily Feed Intake)

کل روزهای پرورش/ کل غذای مصرف شده

= ضریب کارایی پروتئین (Protein efficiency ratio)

پروتئین مصرف شده/ افزایش وزن

= ضریب تبدیل غذایی (Feed conversion ratio)

افزایش وزن/ غذای مصرف شده

خونگیری از ماهیان و بررسی پاسخ ایمنی: جهت بررسی پاسخ ایمنی ماهیان پس از ۸ هفته تغذیه، از هر تیمار ۶ قطعه ماهی (از هر تکرار ۳ قطعه) به‌صورت کاملاً تصادفی انتخاب گردید و سریعاً در داخل محلول ۲ فنوکسی اتانول با غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر لیتر آب قرار گرفتند. پس از بیهوش شدن ماهیان عمل خونگیری با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری از ورید ساقه دمی صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله به تیوب منتقل‌شدند و به‌مدت۵دقیقه‌در ۱۶۰۰×g سانتریفیوژ شدند و سرم با استفاده از سمپلر جدا و درون تیوب در فریزر منفی ۸۰ نگه‌داری گردید. فعالیت لایزوزیم سرم براساس روش Cha و همکاران (۱۶) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لایزوزیم (*Micrococcus lysodiekticus*) اندازه‌گیری شد. به این منظور ابتدا یک سوسپانسیون با محلول کردن ۰/۲ میلی‌گرم از سلول‌های لیوفریزه *M. lysodiekticus* (سیگما،آمریکا) در ۱ میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم ۰/۲ مولار (pH ۵/۵) تهیه شد. ۱۵ میکرولیتر از سرم یا موکوس رقیق شده، درون حفره‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و سپس ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری در بافر به آن افزوده و مخلوط گردید .جذب نوری نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک بار تا ۶۰ دقیقه به کمک الایزا ریدر (بیوتک، آمریکا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. از لایزوزیم استخراج شده از سفیده تخم‌مرغ (سیگما،آمریکا)، جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده شد و هر واحد از فعالیت لایزوزیم بر اساس کاهش جذب (۰/۰۰۱ در دقیقه) تعیین شد. برای سنجش تیتر آنتی‌بادی براساس روش Roberson و همکاران (۱۷) و بر مبنای میکروآگلوتیناسیون باکتریایی انجام گرفت. به‌طور خلاصه، از بافر فسفات سدیم، سرم غلیظ، سرم رقیق شده (رقت‌های دو برابر) و سوسپانسیون باکتریایی *استرپتوکوکوس اینیایی* تهیه شده در بافر فسفات سدیم به چاهک ها اضافه شد. سرم معمولی هم به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق خوانش به کمک الایزا ریدر صورت گرفت. آخرین چاهک (بیش‌ترین غلظت) که در آن آگلوتیناسیون باکتریایی صورت گرفته است به‌عنوان تیتر آنتی‌بادی سرم در نظر گرفته شد. آلبومین طبق روش ذکر شده توسط Doumas و همکاران (۱۸) و پروتئین کل طبق روش ذکر شده توسط Tietz (۱۹) اندازه‌گیری شد.

ارزیابی کارایی واکسن و چالش باکتریایی: باکتری *استرپتوکوکوس* اینیائی لیوفیلیزه مورد استفاده (تهیه شده توسط شرکت بوژان) در شرایط مناسب به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده خلیج فارس انتقال یافت. پس از انتقال، باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت

دردمای ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) کشت داده شد. سپس محیط سانتریفوژ شده و قسمت سطحی جدا گردید. قسمت زیرین دوباره در بافر فسفات معلق‌سازی شد تا با استفاده از لوله مک فارلند رقت 10^{7} CFU/ml به‌دست بیاید. برای ارزیابی کارایی واکسن‌ها بعد از ۸ هفته از واکسیناسیون، تیمارهای واکسینه شده با باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* به‌میزان دوز ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات (به‌دست آمده در تحقیقات قبلی 10^{7})، به‌میزان ۰/۱ میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفاقی، مورد تزریق قرار گرفتند. هم‌زمان گروه شاهد (غیرواکسینه) نیز با LC_{50} باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. در طی دوره چالش، روزانه ماهیان بررسی و میزان تلفات در طی ۱۰ روز ثبت و مورد سنجش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) صورت گرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov انجام شد. برای مقایسه همگنی واریانس‌ها از آزمون Levene و برای بررسی تأثیر واکسن بین گروه واکسینه شده و تیمار شاهد از آزمون T-test استفاده شد. در بررسی میزان بازماندگی علاوه بر آزمون T-test از آزمون one-way ANOVA و آزمون Tukey برای بررسی اختلافات درون گروهی بین تمام تیمارها استفاده گردید. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار EXCEL استفاده گردید.

نتایج

شاخص‌های رشد: نتایج حاصل از بررسی عملکرد رشد شامل وزن نهایی (FW: Final weight)، SGR و CF (جدول ۲) با استفاده از آزمون T-test در پایان آزمایش حاکی از آن بود که تیمارهای واکسینه شده (واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک) براساس پروتکل تجاری شرکت در وزن‌های پایین (۵ گرم)، متوسط (۱۰ گرم) و بالا (۱۴ گرم) (MT, ST, LT) اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد خود (MC, SC, LC) نشان ندادند (P>۰/۰۵). هم‌چنان‌که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در ابتدای آزمایش وزن اولیه ماهیان در تیمارهای واکسینه شده (MT, ST, LT) و گروه‌های شاهد خود (MC, SC, LC) اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (P>۰/۰۵).

شاخص‌های تغذیه: هم‌چنان که در جدول ۳ مشاهده می‌شود آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون T-test نشان داد که درصد WG، FCR، PER و DFI تیمارهای واکسینه شده (واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک) براساس پروتکل تجاری شرکت در وزن‌های مختلف (MT, ST, LT) اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد خود (MC, SC, LC) نشان ندادند (P>۰/۰۵). بررسی دقیق‌تر نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که در پایان آزمایش بیش‌ترین درصد WG و بهترین میزان FCR در مقایسه با گروه های شاهد مربوط به تیمارهای واکسینه شده می‌باشد؛ اما این اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد (P>۰/۰۵). شایان‌ذکر است که با توجه به تفاوت موجود در وزن اولیه ماهیان هر تیمار (۵، ۱۰ و ۱۴ گرم) و به‌دنبال آن تفاوتی که در پارامترهای رشد و تغذیه به‌وجود می‌آورد، مقایسه آماری بین تیمارهای مختلف (MT, ST, LT) و گروه شاهد را با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه امکان‌پذیر نمی‌کند.

شاخص‌های ایمنی: نتایج حاصل از بررسی تیتر آنتی‌بادی و فعالیت لیزوزیم (جدول ۴) با استفاده از آزمون T-test در پایان آزمایش حاکی از آن بود که تیمارهای واکسینه شده (واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک) براساس پروتکل تجاری شرکت در وزن‌های مختلف (MT, ST, LT) اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد خود (MC, SC, LC) نشان ندادند (P>۰/۰۵). هم‌چنان که در جدول ۳ مشاهده می‌شود آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون T-test نشان داد که میزان پروتئین کل و آلبومین در پایان ۵۶ روز آزمایش در تیمارهای واکسینه شده در وزن پایین (ST) اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد خود (SC) نشان داد (P<۰/۰۵). با این‌حال در هر دو پارامتر مذکور تیمارهای واکسینه شده وزن متوسط و بالا (MT, LT) اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد خود (MC, LC) نشان ندادند (P>۰/۰۵). لازم به ذکر است که عنوان شود برخلاف شاخص‌های رشد و تغذیه، در آنالیز آماری مربوط به شاخص‌های ایمنی و میزان بازماندگی با توجه به این‌که محدودیت‌هایی مانند تفاوت موجود در وزن اولیه ماهیان هر تیمار (۵، ۱۰ و ۱۴ گرم) در این شاخص‌ها منعکس نمی‌شود؛ علاوه بر این‌که بین هر تیمار و شاهد مربوط به خود با استفاده از آزمون T-test مقایسه انجام گرفت؛ تیمارهای واکسینه شده در وزن‌های مختلف (MT, ST, LT) و گروه‌های شاهد (MC, SC, LC) با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمون ANOVA یک‌طرفه نشان داد که میزان پروتئین کل و آلبومین به‌صورت معنی‌داری در تیمار واکسینه شده وزن پایین (ST) به‌ترتیب بالاتر از گروه شاهد تیمار وزن بالا (LC) و گروه‌های شاهد تیمارهای وزن بالا و متوسط (MC, LC) بود (P<۰/۰۵). با این‌حال در هر دو پارامتر مذکور بین تیمارهای مختلف واکسینه شده (MT, ST, LT) با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

میزان بازماندگی: هم‌چنان‌که در شکل ۱ مشاهده می‌شود آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون T-test نشان داد که درصد بازماندگی در پایان ۵۶ روز آزمایش در تیمارهای واکسینه شده (واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک) در وزن‌های مختلف

(MT, ST, LT) اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد خود (MC, SC, LC) نشان ندادند (P>۰/۰۵). علاوه‌براین، نتایج آزمون ANOVA یک‌طرفه نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مختلف واکسینه شده (MC, SC, LC) با یکدیگر و حتی بین تیمارهای مختلف واکسینه شده و گروه‌های شاهد وجود نداشت (P>۰/۰۵).

درصد تلفات پس از اعمال چالش باکتریایی: هم‌چنان‌که در شکل۲ مشاهده می‌شود آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون T-test نشان داد که درصد تلفات در پایان ۱۰ روز چالش باکتریایی با سویه *Streptococcus iniae* (تهیه شده توسط شرکت بوژان) در تیمارهای واکسینه‌شده(واکسن سه‌ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گارروواک) در وزن‌های مختلف (MT, ST, LT) اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد خود (MC, SC, LC) نشان ندادند (P>۰/۰۵). با این‌حال نتایج آزمون ANOVA یک‌طرفه نشان‌داد که‌تیمار واکسینه شده وزن پایین (ST) اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد وزن متوسط (MC) نشان داد (P<۰/۰۵). لازم به ذکر است که در سایر تیمارهای مختلف واکسینه شده (MC, LC) با یکدیگر و حتی با گروه‌های شاهد این اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه شاخص‌های رشد بین تیمارهای مورد بررسی (وزن‌های مختلف ماهی) با گروه شاهد در پایان ۸ هفته آزمایش (نتایج بر اساس Means±SE گزارش شده‌اند)

تیمار/ پارامتر	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	ضریب رشد ویژه (٪ / روز)	شاخص وضعیت
شاهد وزن متوسط (MC)	۱۱/۷۰±۰/۵۱	۲۱/۴۷±۰/۴۲	۱/۰۸±۰/۰۴	۱/۲۱±۰/۰۰
غوطه‌وری وزن متوسط (MT)	۱۰/۶۵±۰/۲۰	۲۱/۴۰±۰/۱۷	۱/۲۴±۰/۰۴	۱/۲۶±۰/۰۳
شاهد وزن پایین (SC)	۵/۳۲±۰/۰۷	۱۹/۵۹±۰/۴۱	۲/۳۲±۰/۰۶	۱/۱۸±۰/۰۰
غوطه‌وری وزن پایین (ST)	۵/۰۷±۰/۱۲	۱۸/۸۳±۰/۳۳	۲/۳۴±۰/۰۱	۱/۱۹±۰/۰۴
شاهد وزن بالا (LC)	۱۴/۴۲±۰/۲۴	۲۴/۵۶±۰/۶۶	۰/۹۴±۰/۰۱	۱/۲۶±۰/۰۰
غوطه‌وری وزن بالا (LT)	۱۴/۵۵±۰/۰۸	۲۷/۹۶±۱/۵۷	۱/۱۶±۰/۱۱	۱/۲۳±۰/۰۰

* نبود حروف لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف می‌باشد. با توجه به تفاوت وزن ماهی در هر تیمار، آنالیز آماری فقط بین هر تیمار و شاهد مربوط به خود (مشخص شده در جدول با خط ممتد) با استفاده از آزمون T-test انجام گرفته است.

جدول ۳: مقایسه شاخص‌های تغذیه بین تیمارهای مورد بررسی (وزن‌های مختلف ماهی) با گروه شاهد در پایان ۸ هفته آزمایش (نتایج بر اساس Means±SE گزارش شده‌اند)

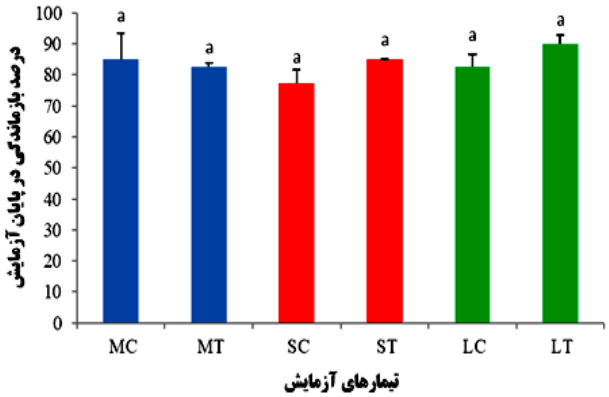
تیمار/ پارامتر	افزایش وزن بدن (٪)	ضریب تبدیل غذایی	ضریب کارایی پروتئین	غذاگیری روزانه (گرم)
شاهد وزن متوسط (MC)	۸۳/۹۵±۴/۵۵	۱/۰۴±۰/۱۲	۲/۰۰±۰/۲۳	۶/۶۶±۰/۰۲
غوطه‌وری وزن متوسط (MT)	۱۰۱/۱۹±۵/۴۷	۰/۹۷±۰/۰۳	۲/۰۵±۰/۰۷	۶/۲۴±۰/۱۵
شاهد وزن پایین (SC)	۲۶۸/۳۳±۱۲/۷۴	۰/۹۲±۰/۰۸	۲/۲۱±۰/۲۰	۵/۰۲±۰/۰۷
غوطه‌وری وزن پایین (ST)	۲۷۱/۲۸±۲/۸۵	۰/۸۴±۰/۰۱	۲/۳۶±۰/۰۳	۴/۹۲±۰/۰۲
شاهد وزن بالا (LC)	۷۰/۲۳±۱/۷۲	۰/۹۳±۰/۰۵	۲/۲۱±۰/۱۷	۶/۸۶±۰/۲۵
غوطه‌وری وزن بالا (LT)	۹۲/۳۴±۱۱/۹۹	۰/۸۲±۰/۰۱	۲/۴۲±۰/۰۵	۷/۵۱±۰/۰۲

* نبود حروف لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف می‌باشد. با توجه به تفاوت وزن ماهی در هر تیمار، آنالیز آماری فقط بین هر تیمار و شاهد مربوط به خود (مشخص شده در جدول با خط ممتد) با استفاده از آزمون T-test انجام گرفته است.

جدول ۴: مقایسه شاخص‌های ایمنی بین تیمارهای مورد بررسی (وزن‌های مختلف ماهی) با گروه شاهد در پایان ۸ هفته آزمایش (نتایج براساس Means±SE گزارش شده‌اند)

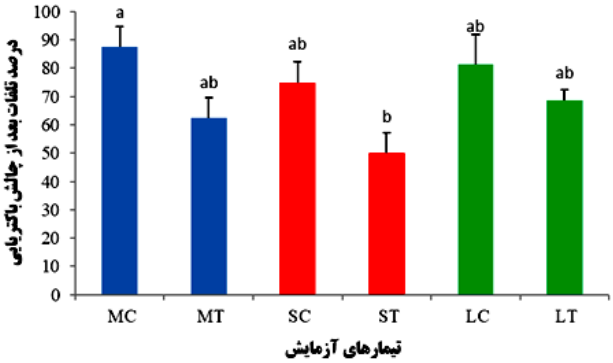
تیمار/ پارامتر	تیتر آنتی بادی (OD)	پروتئین کل (mg/dl)	آلبومین (mg/ml)	لیزوزیم (U/ml/min)
شاهد وزن متوسط (MC)	۰/۰۱۳±۰/۱۵^{a}	۰/۰۸۶±۲/۹۵^{aABC}	۰/۰۰۵±۰/۴۹^{aB}	۱۴/۴۱۹±۱۵۸/۱۸^{a}
غوطه‌وری وزن متوسط (MT)	۰/۰۰۴±۰/۱۷^{a}	۰/۰۵۷±۳/۳۰^{aAB}	۰/۱۴۴±۰/۸۵^{aAB}	۸/۷۰۹±۱۵۸/۱۷^{a}
شاهد وزن پایین (SC)	۰/۰۰۵±۰/۱۲^{a}	۰/۰۲۸±۲/۸۵^{bBC}	۰/۰۲۰±۰/۴۸^{bB}	۹/۶۱۲±۹۹/۹۰^{a}
غوطه‌وری وزن پایین (ST)	۰/۰۰۰±۰/۱۵^{a}	۰/۱۱۵±۳/۴۰^{aA}	۰/۱۴۴±۰/۹۵^{aA}	۵/۸۰۷±۱۰۸/۲۳^{a}
شاهد وزن بالا (LC)	۰/۰۰۲±۰/۱۲^{a}	۰/۱۴۴±۲/۶۵^{aC}	۰/۰۲۸±۰/۴۵^{aB}	۳۸/۴۵۱±۲۴۹/۷۵^{a}
غوطه‌وری وزن بالا (LT)	۰/۰۲۳±۰/۱۶^{a}	۰/۱۷۳±۳/۱۰^{aABC}	۰/۱۱±۵۶/۰۰^{aAB}	۴/۸۰۶±۱۴۱/۵۲^{a}

* حروف لاتین کوچک غیرهمنام نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین هر تیمار و شاهد مربوط به خود در هر ردیف (در جدول با خط ممتد مشخص شده و با استفاده از آزمون T-test انجام گرفته است) می‌باشد. حروف لاتین بزرگ غیرهمنام نیز نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین همه تیمارها و شاهد با یکدیگر در هر ستون (با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه انجام گرفته است) می‌باشد.



شکل ۱: نمودار مقایسه درصد بازماندگی بین تیمارهای مورد بررسی (وزن های مختلف ماهی) با گروه شاهد در پایان ۸ هفته آزمایش (Means±SE)

نبود حروف لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۲: نمودار مقایسه درصد تلفات بین تیمارهای مورد بررسی (وزن های مختلف ماهی) با گروه شاهد بعد از اعمال چالش باکتریایی (Means±SE).

حروف لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بحث

کاربرد واکسن‌های کشته شده یک استراتژی است که به‌طور وسیع برای شاهد و پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود. واکسن‌های کشته برای تولید، نسبتاً مناسب و اقتصادی هستند و به دلیل داشتن آنتی‌ژن‌های زیاد می‌توانند نقش ایمنی‌زایی و حفاظتی بالایی داشته باشند. در آبزی‌پروری به‌علت این صرفه اقتصادی، واکسن‌های کشته شده با فرمالین به‌طور معمول برای حفاظت ماهی در برابر بیماری‌های باکتریایی استفاده می‌شوند (۲۰). با توجه به اهمیت پرورش ماهی سی‌باس آسیایی در کشور و وجود بیماری استرپتوکوکوزیس در قفس‌های پرورشی واقع در خلیج‌فارس و دریای عمان، انجام چنین تحقیقاتی با هدف ایمن‌زایی با واکسن‌های غیرفعال شده *S. Iniae* و غیره در شکل‌های یک ظرفیتی و چند ظرفیتی به شدت احساس می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ایمنی‌زایی با واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گارووا‌ک به‌روش غوطه‌وری و در سه وزن مختلف شامل وزن پایین (۵ گرم)، متوسط (۱۰ گرم) و بالا (۱۴ گرم) (MT, ST, LT) عملکرد رشد ماهی سی‌باس آسیایی را به صورت معنی‌داری تحت تاثیر قرار نداد. Pylkko و همکاران) اثرات واکسن تزریقی با ماده مکمل روغنی (Adjuant) را در دماهای مختلف پرورش ماهی چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) مورد بررسی قرار دادند (۲۱). نتایج این مطالعه حاکی از آن بود که تفاوت معنی‌داری در FW و ضریب رشد بین تیمار واکسینه شده و گروه شاهد مشاهده نشد. Koskela و همکاران که تاثیر دو واکسن تجاری (Apoject 1800 و Lipogen duo) را به‌صورت خوراکی روی ماهی سفید اروپایی (*Coregonus lavaretus* L.) مطالعه نمودند، گزارش دادند که واکسن‌های مورد مطالعه رشد ماهی را تحت تاثیر قرار نداده است (۲۲). یافته‌های مطالعات مذکور و مطالعه حاضر پیشنهاد می‌دهد که واکسیناسیون تاثیر منفی و نامناسبی را بر روی عملکرد رشد ماهیان مورد آزمایش نداشته است. در تضاد با نتایج تحقیق حاضر برخی از پژوهشگران در تحقیقات خود تاثیر منفی واکسیناسیون را بر رشد بچه‌ماهیان گزارش و بیان کردند که انجام واکسیناسیون کاهش رشد را در مقایسه با گروه شاهد به همراه داشت (۲۳، ۲۴). در توجیه این مسئله برخی محققین تاثیرات منفی واکسیناسیون بر رشد ماهی و مدت توقف رشد بعد از اعمال واکسیناسیون را به فعال شدن سیستم ایمنی بدن در ماهیان واکسینه نسبت می‌دهند (۲۵). علاوه بر تحقیقات ذکر شده مطالعاتی نیز حاکی از تاثیر مثبت واکسیناسیون روی رشد ماهی می‌باشد، به این معنی که واکسیناسیون موجب بهبود شاخص‌های رشد به‌ترتیب ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) و سی‌باس آسیایی شده است (۲۶، ۲۷، ۲۸). مطالعات نشان داده است که انجام واکسیناسیون ایمن‌زایی در مقابل بیماری را ایجاد می‌کند و به‌دنبال آن افزایش نرخ رشد و بهبود کارایی تغذیه را در ماهیان به‌همراه دارد (۲۳، ۲۹). در توجیه عدم‌وجود اختلاف معنی‌دار در عملکرد رشد ماهیان مطالعه حاضر می‌توان اشاره کرد که احتمالاً واکسیناسیون در روزها و هفته‌های اولیه آزمایش باعث استرس شده است و این استرس منجر به کاهش تغذیه، کم شدن اشتها و افزایش نیاز متابولیکی شده است (۲۹، ۳۰) اما در هفته‌های بعدی آزمایش ماهیان واکسینه شده با شرایط سازگار شده و رفتار تغذیه‌ای خود را به شرایط نرمال برگردانده‌اند و کاهش عملکرد رشد را جبران کرده‌اند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد شاخص‌های تغذیه‌ای مانند FI، FCR و PER ۸ هفته بعد از اعمال واکسن در وزن‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند. در تضاد با نتایج تحقیق حاضر،

نتایج تحقیقات Khaj و همکاران (۲۶) و Mohammadi و همکاران (۲۸) که به‌ترتیب تاثیر واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس (*L. garvie* و *S. iniae*) ایرانی و خارجی در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و تاثیر واکسن‌های تجاری تزریقی و غوطه‌وری یک ظرفیتی و دو ظرفیتی بر علیه بیماری استرپتوکوکوزیس و ویبروزیس در ماهی سی‌باس آسیایی بررسی نمودند، نشان‌دهنده بهبود ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارایی پروتئین در ماهیان واکسینه شده نسبت به گروه شاهد می‌باشد. بهبود عملکرد تغذیه در گروه‌های واکسینه شده بعد از گذشت چندین هفته از واکسیناسیون را می‌توان به این صورت توجیه کرد که افزایش درصد لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها و به‌دنبال آن افزایش سیستم دفاعی بدن موجب افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، تحریکات محیطی و استرس‌ها گردیده که این‌ها در مجموع می‌توانند بهبود شاخص‌های تغذیه، کاهش میزان مرگ و میر و افزایش میزان بازماندگی ماهیان را به‌دنبال داشته باشند (۲۶). هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر، Badzohreh و همکاران گزارش کردند که انجام واکسیناسیون غوطه‌وری (واکسن تک ظرفیتی استرپتوکوکوزیس جهاد دانشگاهی)، افزودن بتاگلوکان به جیره و یا واکسینه کردن توام با افزودن بتاگلوکان به جیره بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اختلاف معنی‌داری در FCR نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد (۲۷). Rønsholdt و McLean (۲۳) و هم‌چنین Midtlyng و همکاران، به‌ترتیب با بررسی تاثیر واکسیناسیون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmon Salar*) گزارش کردند که ضریب تبدیل غذایی با وجود کاهش میزان اشتهای ماهیان در تیمارهای واکسینه شده نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۲۹). البته در هفته‌های بعدی آزمایش ماهیان واکسینه شده با شرایط سازگار شده و رفتار تغذیه‌ای خود را به شرایط نرمال برگرداندند. این محققین پیشنهاد کردند که آبزی پروران باید به استراتژی تغذیه ماهیان بعد از انجام واکسیناسیون و خصوصاً تا قبل از هفته ۴ بعد از اعمال واکسیناسیون دقت ویژه کنند تا هدر رفت غذا در طول این دوره که اشتهای ماهیان واکسینه شده کاهش پیدا کرده به حداقل میزان ممکن برسد. با توجه به مطالعات ذکر شده در بالا، تضاد مشاهده شده در نتایج مربوط به عملکرد رشد و تغذیه را می‌توان به شرایط پرورش در آزمایشات مختلف، نوع گونه ماهی، نوع واکسن استفاده شده، پروتکل استفاده از واکسن، طول دوره آزمایش و ظرفیت ماهیان واکسینه شده از نظر پاسخ رشد جبرانی نسبت داد (۲۲). به علاوه فاکتورهای زیادی از جمله کیفیت آب، دمای آب، مدیریت تغذیه، مدیریت پرورش و عوامل استرس‌زا در کارایی واکسن‌های مورد آزمایش تاثیرگذار هستند (۲۷، ۲۸). برای بررسی اثربخشی واکسن مورد مطالعه علاوه بر فاکتورهای رشد و تغذیه، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون و ایمنی نیز مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر میزان تیتر آنتی‌بادی و لیزوزیم تیمارهای واکسینه شده در وزن‌های مختلف (MT, ST, LT) اختلاف معنی‌داری را با گروه های شاهد خود (MC, SC, LC) نشان ندادند ($P>0/05$). برخلاف نتایج مطالعه حاضر، نتایج برخی از محققین ازجمله Karami و همکاران، بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۳۱)؛ Yang و همکاران بر روی گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) (۳۲)؛ Huang و همکاران با بررسی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) (۳۳) و Costa و همکاران با مطالعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۳۴) حاکی از این بود که میزان تیتر آنتی‌بادی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. در مطالعات مذکور، افزایش آنتی‌بادی که مربوط به سیستم دفاع اختصاصی می‌باشد، عملکرد سیستم ایمنی را در گروه‌های واکسینه بهبود بخشیده است. مشابه نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه Paterson و همکاران، بر روی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (۳۵) و Sakai و همکاران، روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۳۶) میزان تیتر آنتی‌بادی در گروه واکسینه شده تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد. در توجیه علت این امر Soltani و همکاران، گزارش دادند که ممکن است آنتی‌ژن‌های سطحی برخی از این باکتری‌ها نتوانسته باشند که سیستم ایمنی اختصاصی را تحریک کنند (۱۵). در مطالعه Alishahi و همکاران که واکسیناسیون به سه‌روش تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد، گزارش شد که میزان تیتر آنتی‌بادی در روش تزریقی افزایش معنی‌داری در گروه واکسینه نسبت به تیمار شاهد داشت درحالی‌که تفاوت معنی‌داری در بین گروه واکسینه و شاهد در روش غوطه‌وری و خوراکی مشاهده نشد (۳۷). در دو مطالعه‌ای که توسط Bromage و همکاران، بر روی واکسیناسیون ماهی سی‌باس آسیایی علیه بیماری استرپتوکوکوزیس (۳۸) و Greenway و همکاران بر روی واکسن ضدادوردزیلویس در گربه‌ماهی کانالی (۳۹) انجام شد، با توجه به این‌که میزان پادتن در ماهیان واکسینه شده افزایشی نشان نداد ولی این محققین کارایی مناسب واکسن‌ها را گزارش نمودند. با توجه به مطالب ذکر شده به‌نظر می‌رسد که مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی در برابر بیماری‌های باکتریایی ازجمله استرپتوکوکوزیس در ماهیان مختلف وجود دارد و در برخی گونه‌های ماهی، ایمنی اختصاصی که توسط افزایش پادتن رخ می‌دهد کم‌رنگ‌تر است، یعنی با وجود عدم تفاوت معنی‌دار در میزان پادتن تیمار واکسینه شده نسبت به گروه شاهد، ماهی پس از واکسیناسیون در برابر باکتری ایمن شده است (۳۷). از شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی می‌توان به فعالیت لیزوزیم، میزان پروتئین کل و آلبومین اشاره کرد. افزایش میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ارتباط مستقیم دارد (۴۰). در مطالعه حاضر میزان

پروتئین کل و آلبومین در پایان ۵۶ روز در تیمارهای واکسینه شده در وزن پایین (ST) اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد خود (SC) نشان‌داد. با این‌حال در هر دو پارامتر مذکور تیمارهای واکسینه شده وزن متوسط و بالا (MT, LT) اختلاف معنی‌داری‌را با گروه‌های شاهد خود (MC, LC) نشان ندادند که بیانگر این موضوع است که واکسن مورد استفاده‌روی تیمار وزن پایین جهت فعال کردن سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی دارای تاثیر بیش‌تری می‌باشد. Mohammadi و همکاران، با مطالعه روی ماهی سی‌باس آسیایی (۲۸)، Karami و همکاران، با واکسینه‌کردن ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (۳۱) و Chen و همکاران، با بررسی ماهی کاراس (*Carassius auratus gibelio*) (۴۱) گزارش دادند که میزان لیزوزیم در تیمارهای واکسینه شده نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته است. مطالعه Choi و همکاران، نشان داد که یکی از با اهمیت‌ترین فاکتورهایی که نشان می‌دهد سیستم ایمنی ماهی کارایی خوبی دارد، افزایش میزان لیزوزیم می‌باشد (۴۲). برخلاف مطالعات ذکر شده، در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان لیزوزیم‌در گروه‌های واکسینه‌شده با گروه شاهد وجود نداشت که این موضوع می‌تواند بیانگر عدم تاثیر واکسن مورد مطالعه با دوز معرفی شده در این پژوهش بر میزان لیزوزیم می‌باشد و به مطالعات بیش‌تری نیاز هست. بررسی میزان بازماندگی از دیگر شاخص‌های تعیین کارایی واکسن‌مورد مطالعه می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که درصد بازماندگی در پایان ۵۶ روز آزمایش در تیمارهای واکسینه شده در وزن‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد خود نشان ندادند. مشابه با نتایج تحقیق حاضر، برخی از محققین گزارش کردند که انجام واکسیناسیون اختلاف معنی‌داری در میزان بازماندگی ماهیان واکسینه شده نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد (۲۱، ۲۳، ۲۷، ۲۹). لازم به‌ذکر است که عنوان شود در بیش‌تر مطالعات ارزیابی کارایی واکسن در ماهیان مختلف میزان بازماندگی بعد از اعمال چالش باکتری با عامل بیماری‌زای مدنظر مورد توجه قرار گرفته و ثبت شده است و میزان بازماندگی در پایان آزمایش در مطالعات کمی بررسی شد که در بالا مورد اشاره قرار گرفت. در توجیه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان بازماندگی همان‌طورکه در مورد شاخص‌های رشد و تغذیه عنوان شد احتمالاً استرس بعد از واکسیناسیون در روزها و هفته‌های اولیه آزمایش منجر به کاهش تغذیه، کم شدن اشتها و افزایش نیاز متابولیکی شده است (۲۹، ۳۰) و هم‌چنان که ذکر شد تلفات اندکی را در هفته‌های اول آزمایش به‌دنبال دارد اما در هفته‌های بعدی آزمایش ماهیان واکسینه شده با شرایط سازگار شده و رفتار تغذیه‌ای و میزان بازماندگی خود را به شرایط نرمال برگردانده‌اند. در شرایط عادی پرورش، ارزیابی سیستم ایمنی و فعال کردن آن پیچیدگی‌های خاص خود را دارد و زمان زیادی را می‌طلبد اما با استفاده از چالش باکتریایی به‌وسیله یک عامل بیماری‌زای خاص می‌توان به‌صورت مستقیم و در مدت‌زمان کوتاهی ایمنی‌زایی ایجادشده توسط واکسن هدف را مورد ارزیابی قرار داد (۳۲، ۳۳). در طول دوره رویارویی ماهیان واکسینه شده با سویه *S. iniae* در مطالعه حاضر علائم کلاسیک استرپتوکوکوزیس ثبت شد. تیره‌شدن رنگ پوست، بی‌حالی اولین‌علائمی بود که در ماهیان چالش داده شده مشاهده شد. سپس هموراژی بر روی باله‌های شکمی و اطراف سر و پایه‌های باله‌های سینه‌ای دیده شد و بعد از آن تلفات ماهیان را به همراه داشت. با توجه به نتایج آزمون T-test در مطالعه حاضر درصد تلفات در پایان ۱۰ روز چالش باکتریایی با سویه *S.iniae* در تیمارهای واکسینه شده وزن‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد خود نشان ندادند؛ با این‌حال نتایج آزمون ANOVA یک‌طرفه نشان داد که تیمار واکسینه شده وزن پایین (ST) اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد وزن متوسط (MC) نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که آنتی‌ژن‌های موجود در واکسن توانسته‌اند سلول‌های واسطه ایمنی در دامنه وزنی پایین ماهی سی‌باس آسیایی (۵گرم) را فعال کند و از این‌طریق ایمنی‌زایی لازم را در این‌تیمار به‌وجود آورد که در مجموع باعث کاهش معنی‌داری تلفات پس از رویارویی با سویه *S. iniae* در تیمار واکسینه شده وزن پایین شده است. هم راستا با نتایج مطالعه حاضر، Mohammadi و همکاران، ۶۰ روز پس از واکسیناسیون، تیمارهای آزمایشی را تحت چالش با باکتری‌های *S. iniae* و *Vibrio harveyi* قرار دادند. نتایج این مطالعه حاکی از کاهش نسبت ماهیان مبتلا در تیمارهای واکسینه در برابر این دو باکتری نسبت به گروه شاهد بود که احتمالاً دلیل آن کارایی نسبی این واکسن‌ها در برابر عفونت ایجاد شده می‌باشد. ضمناً این محققین پیشنهاد کردند که واکسیناسیون به‌روش تزریقی محافظت و ایمن‌سازی بهتر نسبت به روش غوطه‌وری در ماهی سی‌باس آسیایی ایجاد می‌کند (۲۸). علاوه بر این، Lan و همکاران، گزارش کردند که واکسن‌های یک ظرفیتی و دو ظرفیتی برعلیه *S. iniae* و *استرپتوکوکوس گارویه* در ماهی سی‌باس آسیایی محافظت بالای ۷۵ تا ۸۵ درصد را در برابر بیماری ایجاد می‌کند (۴۳). Eldar و همکاران (۴۴) گزارش دادند که درصد تلفات قزل‌آلاهای واکسینه شده با *S. iniae*، ۵٪ اما در تیمار شاهد حدود ۵۰٪ بود. در مطالعه Khaj و همکاران، تیمار ماهیان قزل‌آلای واکسینه‌شده و گروه‌شاهد به‌مدت ۱۴ روز با باکتری‌های (*L. garvie* و *S. iniae*) نشان داد که میزان تلفات گروه‌های واکسینه شده نسبت به گروه شاهد پایین‌تر بود (۲۶). با توجه به نتایج این مطالعه، استفاده از واکسن گارووواک، عملکرد رشد و تغذیه و شاخص‌های ایمنی بچه‌ماهیان سی‌باس آسیایی را تحت تاثیر قرار نداد اما یافته‌ها

در ارتباط با رویارویی گروه‌های واکسینه شده با عامل بیماری‌زا نشان داد که تجویز واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گارووواک به‌روش غوطه‌وری (براساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت) در وزن پایین ماهی سی‌باس آسیایی (۵ گرم) جهت فعال کردن سلول‌های واسطه ایمنی موفقیت‌آمیز بوده و این مسئله نقش مهم احتمالی این سلول‌ها در محافظت بر علیه عامل بیماری‌زا را نشان می‌دهد. با این‌حال این مطالعه نتایج اولیه را ارائه می‌کند و پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در سطوح مولکولی و سنجش ژن‌های وابسته به ایمنی در قبل و بعد از چالش باکتریایی و بررسی پاسخ‌های ایمنی اختصاصی این گونه جهت تکمیل نتایج آزمایش مدنظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از حمایت مالی شرکت بوژان تک فارمد جهت انجام پروژه تشکر ویژه داشته باشند و هم‌چنین از همکاری صمیمانه دانشگاه خلیج‌فارس و پژوهشکده خلیج‌فارس برای در اختیار گذاشتن زیرساخت لازم برای انجام عملیات پرورش ماهی (ایستگاه تحقیقات آبزیان دریایی) نهایت سپاس‌گزاری را داشته باشند.

منابع

1. **Garza Gil, M.D., Varela Lafuente, M. and Caballero Miguez G. 2009**. Price and production trends in the marine fish aquaculture in Spain. Aquaculture Research. 40(3): 274-281. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02106.x
2. **Hajirezaee, S., Ajdar, D., Matinfar, A., Hosseini Aghuzbeni, S. and Rafiee, G., 2015.** A 1earthen ponds of Gwadar region, Iran: an assessment of growth parameters feed intake efficiency and survival rate. Journal of Applied Animal Research. 43(3): 309-313. https://doi.org/10.1080/09712119.2014.963105
3. **FAO. 2022.** Species Fact Sheets *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) (Accessed 4 April 2020). http://www.fao.org/fishery/species/3068/en/
4. **Azhdahakoshpour, A., Payghan, R., Ahangarzadeh, M. and Mohseninejad, L., 2018.** Incidence of Vibriosis diseas of Cultured Asian seabass (*Lates calcalifer*) in cage and pond farm. Journal of Marine Fishes. 2(3): 27-33.
5. **Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012.** Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA)-encapsulated vaccine on immune system in *Epinephelus bruneus* against *Uronema marinum*. Experimental Parasitology. 131: 325-332. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.017
6. **Raa, J., 1992.** The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organism to microbial infections. Diseases in Asian aquaculture. 39-50. https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.57.167
7. **Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K. and Park, S.C., 2006.** Isolation and characterization of Streptococcus sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. Journal of veterinary science. 7(1): 53-58. DOI: https://doi.org/10.4142/jvs.2006.7.1.53
8. **Bark, S. and McGregor, D., 2001.** The first occurrance of *Lactococcosis* in farmed trout in England. Trout News. 9-10.
9. **Ghiasi, M., Zahedi, A. and Khoshbavar Rostami, H., 2000.** The epidemia expression of streptococcusis in Mazandaran province rainbow trout. The first meeting of health and disease of Iran aquatics, Ahvaz. 59 p. (In persian)
10. **Soltani, M., Jamshidi, S. and Sharifpour, I., 2005.** Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. Bulletin of the European Asociation of Fish Pathologists. 25(3): 95-106.
11. **Fefer, J.J., Ratzan, K.R., Sharp, S.E. and Saiz, E., 1998.** *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. Diagnostic microbiology and infectious disease. 32(2): 127-130. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(98)00065-0
12. **Shoemaker, C.A., LaFrentz, B.R., Klesius, P.H. and Evans, J.J., 2010.** Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of Fish Diseases. 33(7): 537-544. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01148.x
13. **Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y.H., Tay, S., Leong, L.N., Ng, M.L., Jones, J.B., Nicholls, P.K. and Ferguson, H.W., 2012.** The pathology of 'scale drop syndrome'in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. Journal of fish diseases. 35(1): 19-27. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01319.x
14. **Amal, M.N. and Zamri-Saad, M., 2011.** Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. Pertanika J. Trop. Agric. Sci. 34(2): 195-206.
15. **Soltani, M., Alishahi, M., KHazraeinia, P., Rabani, M. and Satari, A., 2007.** Study on some immunological responses of rainbow trout (*Onchorhynchus Mykiss*) to some antigens of *Streptococcus Iniae*. Journal of Veterinary Research. 62(1): 1-9. (In Persian)
16. **Cha, S.H., Lee, J.S., Song, C.B., Lee, K.J. and Jeon, Y.J., 2008.** Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 278(1-4): 110-118. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.025
17. **Roberson, B.S., 1990.** Bacterial agglutination. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and van Muiswinkel, W.B., (eds) Techniques in fish immunology. SOS Publications, Fair Haven, NJ. 81-86.
18. **Doumas, B.T., Watson, W.A. and Biggs, H.G., 1997.** Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clinica chimica acta. 258(1): 21-30. https://doi.org/10.1016/S0009-8981(96)06447-9
19. **Tietz, N.W., 1986.** Textbook of clinical chemistry. Saunders.
20. **Bercovier, H., Ghittino, C. and Eldar, A., 1997.** Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. Developments in biological standardization. 90: 153-160.
21. **Pylkkö, P., Lyytikäinen, T., Ritola, O. and Pelkonen, S., 2000.** Vaccination influences growth of Arctic charr. Diseases of aquatic organisms. 43(1): 77-80. doi:10.3354/dao043077
22. **Koskela, J., Rahkonen, R., Pasternack, M. and Knuutinen, H., 2004.** Effect of immunization with two commercial vaccines on feed intake, growth, and lysozyme activity in European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*).

Aquaculture. 234(1-4): 41-50. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.03

23. **Rønsholdt, B. and McLean, E., 1999.** The effect of vaccination and vaccine components upon short-term growth and feed conversion efficiency in *rainbow trout*. Aquaculture. 174(3-4): 213-221. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00016-2

24. **Chalmers, L., Migaud, H., Adams, A., Vera, L.M., McStay, E., North, B., Mitchell, C. and Taylor, J.F., 2020.** Response of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) to commercial vaccines. Fish & shellfish immunology. 97: 624-636. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.070

25. **Poppe, T.T. and Breck, O., 1997.** Pathology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) intraperitoneally immunized with oil adjuvanted vaccine. A case report. Diseases of Aquatic Organisms. 29(3): 219-226. doi:10.3354/dao029219

26. **Khaj, H., Mesbah, M., Tabande, M.R., Mohamadian, T. and Dadar, M., 2018.** Comparative effects of Aquavac and Iranian streptococcus/lactococcus vaccine on Health Factors in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Iranian Veterinary Journal. 13(4): 28-42. (In Persian)

27. **Badzohreh, G.R., Soltani, M., Hoseini, G.R. and Bahabadi, M.N., 2012.** Effects of β-glucan on the growth, survival, and the efficacy of anti-*Streptococcus iniae* vaccine in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Journal of Veterinary Research. 67(1). (In Persian)

28. **Mohammadi, Y., Mesbah, M., Dezfoulnejad, M.C., Mehrgan, M.S. and Islami, H.R., 2021.** Growth performance, blood biochemical parameters, immune response, and antioxidant defense of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fingerlings exposed to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus iniae* and *Vibrio harveyi*. Aquaculture International. 29: 2751-2767. https://doi.org/10.1007/s10499-021-00776-5

29. **Midtlyng, P.J., Reitan, L.J. and Speilberg, L., 1996.** Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salarL.*) against furunculosis. Fish & Shellfish Immunology. 6(5): 335-350. https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0034

30. **Mutoloki, S., Alexandersen, S. and Evensen, Ø., 2004.** Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. Fish & Shellfish Immunology. 16(5): 633-644. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.10.002

31. **Karami, E., Alishahi, M., Ghorbanpour, M., Tabandeh, M.R. and Mohammadian, 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. (DOI): 10.22092/ISFJ.2019.118605 (In Persian)

32. **Yang, Q., Pan, Y.L., Wang, K.Y., Wang, J., He, Y., 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*). Molecular Immunology. 78: 1-8. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.08.011

33. **Huang, H.Y., Chen, Y.C., Wang, P.C., Tsai, M.A., Yeh, S.C., Liang, H.J. and Chen, S.C., 2014.** Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper Epinephelus coioides by intraperitoneal immunization. Vaccine. 32(51): 7014-7020. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.039

34. **Costa, G., Danz, H., Kataria, P. and Bromage, E., 2012.** A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Developmental & Comparative Immunology. 36(2): 298-305. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.04.011

35. **Paterson, W.D., Desautels, D. and Weber, J.M., 1981.** The immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) to the causative agent of bacterial kidney disease, Renibacterium salmoninarum. Journal of fish diseases. 4(2): 99-111. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1981.tb01115.x

36. **Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1993.** The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) injected with five Renibacterium salmoninarum bacterins. Aquaculture. 113(1-2): 11-18. https://doi.org/10.1016/0044.8486(93)90336-W

37. **Alishahi, M., Halimi, M., Ghorbanpour, M. and Tabandeh, M.R., 2020.** Effect of three administration routes of *streptococosis/lactococosis* Bacterin on specific immunity and expression of IgM and IL-6 genes in rainbow trout. Aquatics Physiology and Biotechnology. 8(1): 123-146. 10.22124/japb.2020.12787.1322 (In Persian)

38. **Bromage, E.S., Thomas, A. and Owens, L., 1999.** *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Diseases of aquatic organisms. 36(3): 177-181. doi:10.3354/dao036177

39. **Greenway, T.E., Byars, T.S., Elliot, R.B., Jin, X., Griffin, M.J. and Wise, D.J., 2017.** Validation of fermentation and processing procedures for the commercial-scale production of a live, attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccine for use in channel catfish aquaculture. Journal of Aquatic Animal Health. 29(2): 83-88. https://doi.org/10.1080/08997659.2017.1290710

40. **Wiegertjes, G.F., Stet, R.M., Parmentier, H.K. and van Muiswinkel, W.B., 1996.** Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. Developmental & Comparative Immunology. 20(6): 365-381. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(96)00032-8

41. **Chen, X. and Wu, Z., 2003.** Effects of four species of herbs on immune function of Carassius auratus gibelio. Fish Sci China. (10): 36-40.

42. **Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J., Kim, J.B., Jang, Y.S. and Choe, C.H., 2008.** Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish & shellfish immunology. 24(1): 67-73. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.08.007

43. **Lan, N.G., Salin, K.R., Longyant, S., Senapin, S. and Dong, H.T., 2021.** Systemic and mucosal antibody response of freshwater cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*. Fish & Shellfish Immunology. 108: 7-13. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.014

44. **Eldar, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H., 1997.** Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary immunology and immunopathology. 56(1-2): 175-183. https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05738-8