15(2) 205-212, Summer 2023

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

Original Research Paper

Effects of two-strain streptococcosis vaccine *Streptococcus iniae* / *Lactococcus garvieae* on some serum immune parameters in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Somayeh Namrudi [1], Siamak Yousefi Siahkalroodi [2], Ali Hajibaglu [3], Mohammad Mazandarani [3*]

[1] Department of Environmental Sciences, Faculty of Environment and Fisheries, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran
[3] Department of Fisheries, Faculty of Environment and Fisheries, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran

Key Words
Immunity
Streptococcus
Lactococcus
Vaccination
Rainbow trout

Abstract

Introduction: Streptococciosis is one of the most common bacterial diseases in cold water fish farms in Iran that causes a lot of losses to these farms every year and vaccination can be very effective in controlling this disease. In this study, the effectiveness of *streptococcus/lactococcus* vaccine was evaluated in both injection and bath methods in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerling.

Materials & methods: For this purpose, four treatment groups include one-step vaccinated using the bath method group, two-step vaccinated using the bath method group, hyperosmotic fish group+two-step vaccine using the bath method, the group of fish vaccinated with the injection method, and a control group considered. In this regard, 350 fish with a weight of 4.2±0.36 were divided into 10 tanks (two replicates for each group). The fish were reared and tested for two months. In this study, 5 experimental groups including the control group, the group of one-stage bath vaccination fish, the two-step bath vaccination group, the group of fishes vaccinated with hyperosmotic environment+two-step bath vaccination, and the group of vaccination via injection method.

Results: Based on the results, total serum protein levels in all vaccinated fish were higher than those in the control group, and based on statistical analysis, the highest level was recorded in the fish vaccinated by injection and the two-stage hyperosmotic+vaccine bath method. Glucose values were also measured in both groups of two-step vaccinated fish and the injection method was higher than in other fish. The ALP, ALT, and AST levels in the injected fish group were higher than those of the other groups. Finally, the serum antibody levels for both *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* bacteria was higher for the fish in the injection group and the two two-stage bath groups than the one-stage vaccinated fish. At the same time, no antibody was observed in the control group.

Conclusion: Based on the results, the two bath steps vaccination more and less produces the same levels of serum antibody titer as the injection method in fish, at the same time, the bath method caused less injuries compared to the injection method in fish. So in situations where fish are under stress, bath vaccination with reminder doses can be critical and more effective.

* Corresponding Author's email: mazandarani57@gmail.com
Received: 27 April 2023; Reviewed: 30 May 2023; Revised: 4 August 2023; Accepted: 3 September 2023
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.406674.3008

مقاله پژوهشی

اثرات واکسن دو سویه استرپتوکوکوزیس (*Lactococcus garvieae/Streptococcus iniae*) در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر برخی شاخص‌های ایمنی

سمیه نمرودی[۱]، سیامک یوسفی‌سیاه‌کلرودی[۲]، علی حاجی‌بگلو[۳]، محمد مازندرانی[۳]*

[۱] گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
[۳] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

ایمنی
استرپتوکوکوس
لاکتوکوکوس
واکسیناسیون
قزل‌آلای رنگین‌کمان

چکیده

مقدمه: استرپتوکوکوزیس یکی از شایع‌ترین بیماری باکتریایی مزارع سردابی کشور است که همه ساله خسارت فراوانی به این مزارع وارد می‌سازد و واکسیناسیون می‌تواند در کنترل این بیماری بسیار موثر باشد. در بررسی حاضر کارآیی واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/ لاکتوکوکوس در دو روش تزریقی و حمام در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار: به این منظور چهار گروه آزمایشی شامل گروه ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای به‌روش حمام، گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به‌روش حمام، گروه ماهیان محیط هایپر اسموتیک + واکسن دو مرحله‌ای به‌روش حمام و گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و یک گروه شاهد درنظر گرفته شد. در این راستا ۳۵۰ عدد ماهی با میانگین وزنی ۰/۳۶±۴/۲ در ۱۰ تراف (دو تکرار) تقسیم شده و به‌مدت دو ماه مورد پرورش و آزمایش قرار گرفتند در این بررسی ۵ گروه آزمایشی شامل گروه شاهد، گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، گروه ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک + واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای درنظر گرفته شده و به دو روش حمام و تزریق مورد واکسیناسیون قرار گرفتند.

نتایج: براساس نتایج مقادیر پروتئین کل سرم در ماهیان واکسینه شده بالاتر از ماهیان گروه شاهد بود و براساس بررسی‌های آماری بالاترین میزان برای گروه ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق و حمام دومرحله‌ای هایپراسموتیک + واکسن بود. مقادیر گلوکز نیز در هر دو گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای و نیز روش تزریق بالاتر از بقیه گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد. مقادیر ALP، ALT و AST در ماهیان گروه تزریق بالاتر از سایر گروه‌ها ثبت شد. در نهایت تیتر آنتی‌بادی سرمی برای هر دو باکتری \استرپتوکوکوس \ینیایی و لاکتوکوکوس گاروییه برای ماهیان گروه تزریق و دو گروه حمام دو مرحله‌ای بالاتر از ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای بود. در عین حال هیچ تیتری برای ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج دومرحله‌حمام واکسن تیتری‌آنتی‌بادی برابر با روش‌تزریقی درماهی ایجادمی‌کند درعین‌حال آسیب‌های کبدی کم‌تری درمقایسه به روش تزریقی در ماهی به‌همراه داشت. به‌همین دلیل در شرایطی که ماهیان در استرس قرار دارند واکسیناسیون به‌روش حمام به همراه واکسن یادآور می‌تواند کارآیی مطلوبی را داشته باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mazandarani57@gmail.com

تاریخ دریافت: ۷ اردیبهشت ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۹ خرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۱۳ مرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۲ شهریور ۱۴۰۲
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.406674.3008

مقدمه

در سال‌های اخیر آبزی‌پروری از توسعه فراوانی برخوردار شده و تبدیل به یکی از صنایع بسیار گسترده جهانی شده است همگام با این توسعه نیاز به تحقیقات علمی و نوآوری ضرورت می‌یابد (۲). این توسعه با افزایش تولیدات در واحد حجم همراه بوده است و به تبع آن مزارع پرورش متراکم ماهیان با مشکلات استرس‌زای فراوانی همراه گردید، یکی از این درگیری‌ها در مزارع پرورش متراکم شیوع بیماری‌های باکتریایی است (۷). استرپتوکوکوزیس یکی از بیماری‌های باکتریایی شایع در مزارع آبزیان است که سالیانه خسارات فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۸ میلادی خسارتی در حدود ۲۵۰ میلیون دلار در رابطه با این بیماری در مزارع آبزی‌پروری کشور آمریکا گزارش شده است، این بیماری تاکنون تقریباً از اکثر نقاط دنیا و بسیاری از ماهیان دریایی و آب شیرین گزارش شده است و در برخی موارد منجر به تلفات بیش از ۵۰ درصد در مزارع گردیده است (۷). استرپتوکوزیس هم به‌صورت حاد و هم به صورت مزمن در مزارع ماهیان مختلف بروز پیدا نموده و با علایم بسیار گسترده‌ای همراه است، در بروز این بیماری علاوه بر گونه‌های مختلف *استرپتوکوکوس* (*Streptococcus*) گروه دیگری از باکتری‌ها از قبیل *لاکتوکوکوس* (*Lactococcus*)، *واگوکوکوس* (*Vagococcus*) و *انتروکوکوس* (*Enterococcus*) نیز بیماری‌هایی مشابه ایجاد می‌کنند که همه بیماری‌های ناشی از این باکتری‌ها را استرپتوکوزیس در نظر گرفته می‌شود (۱۹). علایم کلینیکی بسیار گسترده‌ای برای این بیماری ثبت شده است که از آن جمله می‌توان به اگزوفتالمی، تجمع مایعات در محوطه شکمی، بی‌حالی و بی‌اشتهایی، خونریزی گسترده در پوست، مغز، کلیه، کبد، دستگاه گوارش، چشم و اندام داخلی اشاره نمود این علایم بسته به گونه ماهی، سن ماهی، سایز و حدت سویه باکتری بیماری‌زا می‌تواند متفاوت باشد (۶، ۱۵). این بیماری درایران اولین‌بار در مزارع ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش گردید و تاکنون در کشور تنها دو گونه *استرپتوکوکوس اینیایی* (*S. iniae*) و *لاکتوکوکوس گارویه* (*L. garvieae*) از بیماری‌های مزارع آبزیان جداسازی شده است که همه ساله خسارت اقتصادی فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد (۱۹). پس از بروز بیماری یکی از راهکارهای مرسوم کنترل بیماری استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است که خود با مشکلاتی همراه است به‌عنوان مثال در کنار گران بودن داروها و هزینه بالای آن، ماهیان بیمار معمولاً دچار بی‌اشتهایی شده و در نتیجه افزودن دارو به غذا در بسیاری موارد با دریافت دارو توسط همه ماهیان همراه نیست از طرفی استفاده از روش حمام و یا تزریق نیز با استرس و مشکلات دیگری همراه است (۱۸). بنا به‌دلایل یاد شده همواره پیشگیری روش بهتر و کم هزینه‌تری است روش‌های مختلفی برای پیشگیری پیشنهاد شده‌است که‌از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کنترل شرایط محیطی، استفاده از محرک‌ها و تقویت کننده‌های ایمنی و نیز واکسیناسیون اشاره نمود (۲۱). واکسیناسیون یکی از شایع‌ترین روش‌های کنترل بیماری در مدیریت بهداشتی است که معمولاً با توجه به بیماری‌های شایع منطقه برای مزارع درنظر گرفته می‌شود، کارآیی واکسیناسیون در آبزیان هنوز به رضایت‌بخشی واکسیناسیون در پستانداران و طیور نرسیده است به‌همین دلیل بررسی‌های متعددی بر روی افزایش کارآیی واکسن در ماهیان صورت گرفته و در حال انجام است (۳). در مجموع می‌توان گفت یکی از روش‌های مرسوم در کنترل بیماری‌ها استفاده از واکسیناسیون است که امروزه در صنعت آبزی‌پروری به‌سرعت در حال توسعه است و در بچه‌ماهیان و مولدین مورد استفاده قرار گرفته و حتی گزارشاتی در رابطه با انتقال آنتی‌بادی از مولدین واکسینه شده به بچه‌ماهیان نیز موجود است (۱۵). واکسیناسیون در آبزیان به روش‌های مختلفی ازجمله روش تزریق، روش خوراکی و روش حمام صورت می‌گیرد و کارآیی روش تزریقی را از همه بالاتر عنوان می‌کنند اما به‌دلیل وجود مشکلاتی هم‌چون استرس ناشی از تزریق و نیز ضرورت به‌کارگیری نیروی متخصص، پرورش‌دهندگان به استفاده از روش حمام استقبال بیش‌تری نشان داده‌اند. کارآیی واکسیناسیون به‌روش حمام نیز می‌تواند تحت تاثیر شرایط مختلف قرار بگیرد مثلاً دوز باکتری سوسپانسون شده، زمان واکسیناسیون، وضعیت استرسی ماهیان، گونه ماهی و غیره می‌تواند بر روی عملکرد واکسن تاثیر بگذارد (۴). در عین حال به‌کارگیری روش‌هایی برای افزایش عملکرد واکسیناسیون توسط برخی محققین پیشنهاد شده است که یکی از این روش‌ها استفاده از محیط هایپراسموتیک و سپس انجام واکسناسیون است. (۸). در بررسی حاضر وضعیت عملکرد واکسن دوگانه *استرپتوکوکوس اینیایی*/ *لاکتوکوکوس گارویه* در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه‌ماهی و شرایط پرورش: برای انجام آزمایش تعداد ۳۵۰ عدد ماهی با میانگین وزنی ۴/۲±۰/۳۶ گرم تهیه شده و به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایش به‌مدت یک‌هفته در حوضچه ۵۰۰ لیتری نگه‌داری شدند پس از یک سازگاری اولیه ماهیان مذکور در ۱۰ تراف ۲۰۰ لیتری تقسیم شدند (۳۵ ماهی در هر تراف) و به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایش مدت یک هفته دیگر مورد پرورش قرار گرفتند و پس از سازگاری و تیماربندی آزمایش عملکرد واکسیناسیون در

ماهیان مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مدت ماهیان ۴ بار در روز با جیره خوراکی شرکت فرادانه (جدول ۱) غذادهی شدند. دمای آب ۱/۳±۱۳ درجه‌سانتی‌گراد، سختی آب برابر با ۰/۳۳±۵۸/۳ میلی‌گرم/لیتر،pH برابر ۰/۱±۷/۱ اندازه‌گیری گردید. دبی آب ورودی نیز برای هر تراف حدود ۳ لیتر در دقیقه بود.

جدول۱: آنالیز شیمیایی و مشخصات خوراک اکسترود ماهی قزل‌آلا در بررسی حاضر (مربوط به شرکت فرادانه)

	جیره آغازین برای ماهی ۲ تا ۱۵ گرم	جیره پیش پر.واری برای ماهی ۱۵ تا ۳۰ گرم
پروتئین خام (٪)	۵۰ – ۴۶	۴۴- ۴۰
چربی خام (٪)	۱۵- ۱۱	۱۶ – ۱۲
فیبر خام (٪)	۳ – ۱/۵	۴ – ۲
خاکستر (٪)	۱۳ – ۹	۱۱ – ۷
رطوبت (٪)	۱۱ – ۵	۱۱ – ۵
فسفر (٪)	۱/۵ – ۱	۱/۵ – ۱

تیماربندی و طرح آزمایش: در این بررسی ۵ گروه آزمایشی در دو تکرار درنظر گرفته شد که به‌ترتیب شامل گروه شاهد، گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، گروه ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای درنظر گرفته شد. واکسن مورد استفاده در این بررسی واکسن دوگانه *استرپتوکوکوس اینیایی/ لاکتوکوکوس گارویه* (گارووواک) ساخت شرکت بوژان تک فارمد بود. این واکسن به‌صورت سوسپانسیون باکتری غیرفعال بوده (با غلظت 10^8/باکتری/میلی‌لیتر) براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده، واکسن به‌میزان ۰/۱ با آب پرورش رقیق‌شده (یک لیتر واکسن در ۹ لیتر آب) و به‌مدت ۳ دقیقه برای روش حمام مورد استفاده قرار گرفت. .برای گروه واکسیناسیون به‌روش هایپراسمتیک+ واکسیناسیون در ابتدا ماهیان هر تیمار به‌مدت ۱۰ دقیقه در محیط آب نمک ۱۵ گرم/لیتر قرار داده شده و بلافاصله بعد از آن واکسیناسیون به‌روش حمام صورت گرفت. در ماهیان گروه تزریق نیز به‌هر کدام از ماهیان ۰/۱ سی‌سی از واکسن روش صفاقی تزریق شد. در این راستا در ابتدا ماهیان با یوجینول (۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر) بی‌هوش شده و ۰/۱ سی‌سی از واکسن با کمک سرنگ و سرسوزن انسولینی (سرسوزن گیج ۳۰) در ناحیه صفاق ماهیان تزریق صورت گرفت. در گروه‌های ماهیانی که دومرحله واکسیناسیون داشتند، مرحله دوم واکسیناسیون به‌روش حمام ۲۱ روز پس از مرحله اول، تکرار گردید. چهار هفته بعد از مرحله دوم واکسیناسیون نمونه‌برداری از ماهیان (۱۲ ماهی از هر تیمار) صورت گرفت. به این منظور ماهیان با مجدداً با محلول یوجینول(۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر) بی‌هوش شده و خونگیری با سرسوزن گیج ۲۵ از ساقه دمی صورت گرفت.

تیتر آنتی‌بادی در برابر باکتری *یرسینیا راکری* به‌روش میکرواگلوتیناسیون: برای اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی به‌روش Swain و همکاران، در ابتدا به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم به تمام گوده‌های پلیت میکرو آگلوتیناسیون اضافه شد (۱۷). سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر از سرم به اولین گوده اضافه شده و رقت‌هایی بر مبنای دو از گوده اول تا آخرین گوده هر سری ساخته شد. رقت سوسپانسیون باکتریایی در این آزمایش $1/5 \times 10^9$ CFU/ml بوده و پس از اضافه شدن این سوسپانسیون پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. عدد نهایی به‌صورت لگاریتم در مبنای ۲ عکس بالاترین رقتی که آگلوتیناسیون داده بود بیان گردید (۱۶).

نحوه آماده‌سازی باکتری‌ها برای تیتر آنتی‌بادی: برای ارزیابی مقاومت گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده و غیرواکسینه از سویه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با کد PTCC 1887 (Mazandarani) و باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* با کد PTCC 1884 (Mazandarani) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه گردید. این باکتری‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط نوترینت براس (Nutrient Broth) غنی‌سازی شدند و سپس به‌صورت کشت سطحی بر روی محیط نوترینت آگار (Nutrient Agar) تلقیح شدند. ۴۸ ساعت پس از کشت، باکتری‌ها از سطح محیط کشت جمع‌آوری شده از آن سوسپانسون باکتریایی تهیه گردید. بار باکتریایی سوسپاسپانسون به روش کدورت‌سنجی و براساس جدول استاندارد مک‌فارلند و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۴۰ نانومتر و OD برابر با یک تنظیم گردید. این کدورت در حدود 10^8 باکتری درنظر گرفته شد. هم‌زمان از سوسپانسیون‌های مذکور در چند رقت سریالی کشت سطحی داده شده و بار باکتریایی آن‌ها براساس CFU تایید گردید.

اندازه‌گیری پارامترهای سرمی: ابتدا ماهیان با ۱۰۰ ppm یوجینول بی‌هوش شدند و اخذ نمونه‌های خون از قسمت ساقه دمی ماهیان توسط سرنگ ۲۱ گیج انجام شد. نمونه‌ها در میکروتیوپ‌های فاقد ماده ضدانعقاد قرار گرفتند. سرم خون قسمتی از نمونه‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm) جدا شده و توسط سمپلر به میکروتیوپ‌های جدید منتقل شد. فاکتورهای بیوشیمیایی خون شامل: گلوکز، پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، ALP، AST و ALT توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شدند. در این آزمایش اندازه‌گیری پروتئین کل و آلبومین در سرم خون با استفاده از کیت‌های پارس آزمون و به‌روش نورسنجی (اسپکتروفوتومتری)

صورت گرفت، ایمنوگلوبولین کل حاصل از اختلاف میزان پروتئین سرم قبل و بعد از ته‌نشینی با پلی‌اتیلن‌گلیکول به‌روش Thomas و همکاران، مشخص شد (۲۰).

بررسی‌های آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای SPSS18 و Excell 2010 استفاده شد. در این راستا برای تعیین سطوح معنی‌داری از آزمون آماری Duncan با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One – Way ANOVA) استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی‌های سرمی در گروه‌های مختلف واکسینه شده به‌روش حمام و تزریق در جدول ۲ و شکل‌های ۱ تا ۵ آورده شده است. براساس این نتایج مقادیر پروتنین کل سرم در ماهیان گروه‌های ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق و گروه حمام+ محیط هایپراسموتیک به‌طور معنی‌داری از ماهیان سایر گروه‌ها بالاتر اندازه‌گیری شد ($P\leq ۰/۰۵$) درحالی‌که پروتئین کل در ماهیان گروه تزریق و گروه هایپراسموتیک+ حمام اختلاف معنی‌داری نداشت. هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و ماهیان یک مرحله واکسینه شده به روش حمام در مقادیر پروتئین کل ثبت نشد (جدول ۲). بالاترین مقادیر آلبومین سرم نیز در ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق ثبت گردید و پایین مقادیر مربوط به گروه واکسینه شده دو مرحله‌ای حمام+ هایپراسموتیک بود (شکل ۱). هم‌چنین در بررسی حاضر در ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق و گروهای واکسینه شده دو مرحله‌ای به‌روش حمام مقادیر گلوکز سرم به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بالاتر از ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای و ماهیان گروه شاهد اندازه‌گیری گردید (شکل ۲). در این بررسی مقادیر ایمنوگولوبولین سرم در تمامی ماهیان واکسینه شده بالاتر از گرروه شاهد بود و هم‌چنین بالاترین مقادیر سرمی در گروه تزریق و ماهیان واکسینه شده دومرحله‌ای محیط هایپراسموتیک+ واکسن اندازه‌گیری و ثبت گردید (جدول ۲).

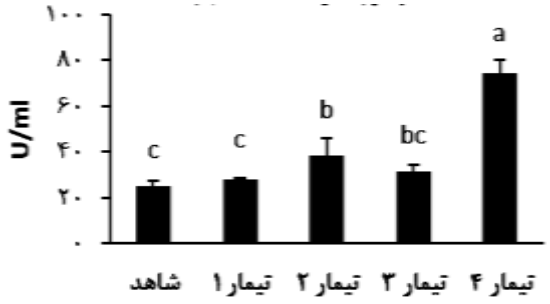
جدول۲: مقادیر برخی پارامترهای سرمی در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

	گروه شاهد	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴
پروتئین کل (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	$۲/۴۹ \pm ۰/۲۳^{c}$	$۲/۵۷ \pm ۰/۱۵^{c}$	$۳/۲۶ \pm ۰/۱۱^{b}$	$۴/۱۳ \pm ۰/۱۲^{a}$	$۴/۴ \pm ۰/۴^{a}$
آلبومین (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	$۱/۰۸ \pm ۰/۰۲^{bc}$	$۱/٦٤ \pm ۰/۱۱^{b}$	$۱/۳ \pm ۰/۳۳^{b}$	$۰/۸۷ \pm ۰/۰۲^{c}$	$۲/۲۴ \pm ۰/۱۲^{a}$
ایمنوگلوبولین کل (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	$۱/۳۴ \pm ۰/۱۷^{c}$	$۱/۹۱ \pm ۰/۳^{b}$	$۱/۹۲ \pm ۰/۱۷^{b}$	$۲/۲۳ \pm ۰/٤۷^{ab}$	$۲/۵۶ \pm ۰/۳٦^{a}$
گلوکز (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	$۳٤/۳٦ \pm ۳/۲^{a}$	$۳۲/۳ \pm ۲/۱٤^{a}$	$۴۷/۰۸ \pm ۳/۱۵^{a}$	$۴۲/۲۷ \pm ۱/۰۳^{a}$	$۴۳/۴۶ \pm ۱/۵٤^{a}$

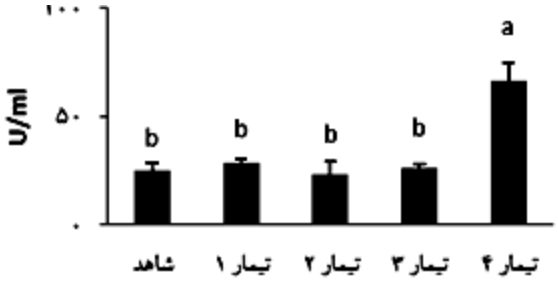
گروه شاهد: گروه ماهیان غیرواکسینه، تیمار۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای حمام هایپراسمزتیک+ واکسینه، تیمار۳: گروه محیط دو مرحله‌ای حمام و تیمار۴: گروه ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق

نتایج حاصل از بررسی برخی آنریم‌های در ارتباط با آسیب‌های کبدی-کلیوی در شکل‌های ۱ تا ۳ قابل مشاهده است در بررسی مقادیر آلکالین فسفاتاز (ALP) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در ماهیان تغذیه شده به‌روش تزریق به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بالاتر از سایر گروه‌ها ثبت گردید و در عین حال اختلاف معنی‌داری بین سایر گروه‌های واکسینه‌شده به‌روش حمام و نیز گروه شاهد مشاهده نشد (شکل‌های ۱ و ۳). در بررسی مقادیر آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) سرم ماهیان بالاترین میزان برای گروه ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق ثبت گردید درعین حال این میزان در ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به‌روش حمام بعد از گروه تزریق بالاتر از سایر گروه‌ها بود، در ماهیان گروه شاهد و ماهیان گروه واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای این میزان AST به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۲). همان‌گونه که در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شود در تمامی ماهیان واکسینه‌شده آگلوتیناسیون باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* مشاهده شد، در عین حال هیچ تیتری در ماهیان گروه شاهد برای دو باکتری یاد شده ثبت نگردید. براساس این نتایج در تمام ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای، ماهیان واکسینه شده در محیط هایپراسموتیک + حمام دو مرحله‌ای و ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق تیتر آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر از ماهیان گروه واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای برای باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (شکل ۵) و باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* (شکل ۴) اندازه‌گیری شد ($P\leq ۰/۰۵$). در این بررسی تیتر آنتی‌بادی باکتری‌های یاد شده برای ماهیان گروه‌های واکسینه حمام دو مرحله‌ای و گروه تزریق اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$).

شکل ۱: نمودار مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتاز سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

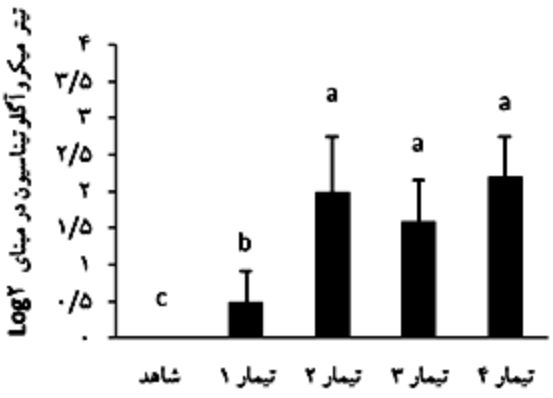


شکل ۲: نمودار مقادیر آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

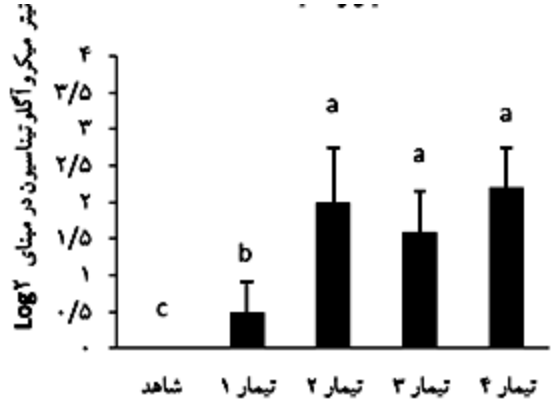


شکل ۳: نمودار مقادیر آنزیم آلانین آمینوترانسفراز سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

گروه شاهد: گروه ماهیان غیرواکسینه، تیمار۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای حمام هایپراسمزتیک+ واکسینه، تیمار۳: گروه محیط دو مرحله‌ای حمام و تیمار۴: گروه ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق



شکل ۴: نمودار تیتر آنتی‌بادی *لاکتوکوکوس گارویه* به‌روش میکروآگلوتیناسیون در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده



شکل ۵: نمودار تیتر آنتی‌بادی *استرپتوکوکوس اینیایی* به‌روش میکروآگلوتیناسیون در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

گروه شاهد: گروه ماهیان غیرواکسینه، تیمار۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای حمام هایپراسمزتیک+ واکسینه، تیمار۳: گروه محیط دو مرحله‌ای حمام و تیمار۴: گروه ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق

بحث

استرپتوکوکوزیس یکی از بیماری‌های شایع باکتریایی در ماهیان محسوب می‌شود که با توسعه تولید ماهیان سردابی کشور در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان از استان‌های مختلف گزارش گردید بیماری‌زایی این باکتری‌ها در بیش از ۴۰ گونه ماهی گزارش شده است (۷). تا کنون بیمایرزایی بیش از ۱۶ گونه‌های باکتریایی متعلق به ۴ جنس *Straptococcus spp*، *Lactococcus spp*، *Vagococcus spp*، *Entrococcus spp* در ماهیان مختلف گزارش شده است (۵). تاکنون تنها دو گونه *S. inaei* و *L. garvieae* از عفونت‌های استرپتوکوکوزیس

مزارع ماهیان سردابی کشور جداسازی شده، که همه ساله خسارات فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد (۱۸). به‌کارگیری واکسن *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* اواین بار در سال ۱۹۹۵ در ماهی تیلاپیا با موفقیت بررسی گردید در گونه‌های دیگر ماهیان نیز کمابیش این واکسیناسیون با موفقیت گزارش گردید (۷). در ایران بسیاری از مزرعه‌داران بنا به‌دلایل متعدد ازجمله افزایش استرس، زمان‌بر بودن، آسیب به ماهیان در صورت استفاده نادرست و هزینه بالا اقبال زیادی برای واکسیناسیون به‌روش تزریق نشان نمی‌دهند و بیش‌تر به‌کارگیری واکسیناسون به‌روش حمام و یا گاهاً خوراکی را ترجیح می‌دهند در این راستا در برخی مطالعات روش‌های مکمل برای افزایش کارآیی واکسیناسیون به‌کار گرفته شده است که یکی از این روش‌ها استفاده از محیط هایپراسموتیک برای واکسیناسیون به روش حمام است (۳). دربررسی حاضر براساس نتایج تمامی گروه‌های واکسینه شده برای هر دو گونه *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* آنتی‌بادی تولید شده است و همان‌گونه که پیش‌بینی می‌شد در ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای ساده و نیز واکسن+ محیط هایپراسموتیک در مقایسه با ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای تیتر آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر اندازه‌گیری شد و تیتری برابر با واکسن تزریقی یک مرحله‌ای ثبت شد در این مطالعه زمان نمونه‌برداری برای ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای ۲۱ روز پس از آخرین واکسیناسیون انجام شد در حالی که نمونه‌برداری برای روش تزریقی یک مرحله‌ای ۴۲ روز بعد از تزریق بود گویای این موضوع می‌تواند باشد که اگرچه واکسیناسیون به‌روش حمام کارآیی روش تزریق را ندارد اما به‌کارگیری واکسیناسیون یادآور کارآیی واکسن را بسیار ارتقا دهد. از طرفی با بررسی آنزیم‌های ALT، ALP و AST می‌توان در رابطه با آسیب‌های احتمالی کلیوی و کبدی تا حد زیادی قضاوت نمود زیرا این آنریم‌ها به‌عنوان شاخص‌های سلامت کبدی و تا حدودی سلامت کلیوی درنظر گرفته می‌شوند (۹) که براساس نتایج حاضر واکسیناسیون به‌روش تزریق تا حدی با آسیب‌های کبدی همراه است (شکل‌های ۱ تا ۳) زیرا در گروه تزریق شاخص‌های یاد شده به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود ($P\leq ۰/۰۵$). اما در روش‌های حمام آنزیم‌های یاد شده با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل‌های ۱ تا ۳). در واکسیناسیون به‌روش حمام دو مرحله‌ای در ماهیانی که محیط هایپراسموتیک قبل از واکسیناسیون به‌کار گرفته شد سطح پروتئین کل به‌طور معنی‌داری بالاتر اندازه‌گیری شد و نیز تیر آنتی‌بادی علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* به‌طور ظاهری بالاتر ثبت شده ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نشد ($P>۰/۰۵$). در مجموع می‌توان به‌کارگیری واکسن یادآور را برای واکسیناسیون به‌روش حمام ضروری درنظر گرفت. در بررسی Alishahi و همکاران اثرات واکسن دوگانه *استرپتوکوکوس/لاکتوکوکوس* در سه روش تزریقی، خوراکی و حمام بالاترین میزان ایمنی مربوط به‌روش تزریقی و سپس به‌ترتیب برای روش حمام و خوراکی ثبت گردید در مطالعه مذکور اگرچه عیار آنتی‌بادی در ماهیان واکسینه شده به روش حمام و خوراکی اختلاف معنی‌دار نداشت اما در مواجهه میزان تلفات ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام بالاتر از ماهیان واکسینه شده به‌روش خوراکی بود (۱). در بررسی Khaj و همکاران، واکسن دو گانه *استرپتوکوکوس اینیایی/لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کارآیی قابل قبولی از خود نشان داد (۱۳). در بررسی Karami و همکاران، در ماهیانی که با واکسن دوگانه *استرپتوکوکو/لاکتوکوکوس* به‌صورت تزریقی واکسینه شده بودند در روز ۱۴ پس از تزریق تا روز ۶۰ اختلاف معنی‌داری در تیتر آنتی‌بادی سرمی برای دو باکتری مذکور مشاهده نشد (۱۲) اما در بررسی حاضر برای واکسیناسیئن به‌روش حمام تیتر آنتی‌بادی برای ماهیانی که یک‌بار واکسینه شده بودند به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق بود اما با به‌کارگیری واکسن یادآور، تیتر آنتی‌بادی برای باکتری‌های یاد شده با ماهیان گروه تزریق اختلاف معنی‌دار نداشت (شکل‌های ۴ و ۵). دربررسی دیگری کارآیی واکسن *یرسینیا راکری* به‌طور معنی‌داری با به‌کارگیری محیط هایپر اسموتیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش داشت به‌طوری‌که میزان تلفات بچه‌ماهیان در مواجهه با باکتری *یرسینیا راکری* در گروه هایپراسموتیک+ واکسن پایین‌ترین میزان ثبت شده بود هر چند این اختلاف در تیتر آنتی‌بادی برای باکتری‌مذکور در تیمارهای یاد شده اختلاف معنی‌داری نداشت (۱۴). بررسی حاضر در مزرعه و کاملاً سازگار با شرایط محیط پرورش صورت پذیرفت به‌همین دلیل امکان مواجهه باکتریایی در تیمارهای مختلف به‌دلایل بهداشتی و قرنطینه‌ای مهیا نگردید اما در مجموع براساس نتایج می‌توان اعلام نمود به‌کارگیری دو مرحله واکسیناسیون با توجه به آنریم‌های کبدی مورد بررسی زیانی برای ماهیان نداشته (۹) و تیتر آنتی‌بادی بر علیه باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی شرکت دانش‌بنیان بوژان تک فارمد تولیدکننده واکسن‌های ماهی در کشور به انجام رسید. با تشکر و سپاسگزاری از آن مجموعه و آرزوی موفقیت روزافزون.

منابع

1. **Alishahi, M., Halimi, M., Ghorbanpour, M. and Tabandeh, M.R., 2020.** Effect of three administration routes of treptococcus/*lactococus* Bacterin on specific immunity and expression of IgM and IL-6 genes in rainbow trout. Aquatic Physiology and Biotechnology. 8(1): 123-146. DOI: 10.22124/JAPB.2020.12787.1322
2. **Bectas, Z.H., Ucar, F.B. and Savaser, S., 2017.** Isolation and Identification of *Streptococcus parauberis* from Freshwater Fish in Turkey. LimnoFish- Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research. 3(3): 175-182. DOI: 10.17216/limnofish.335516
3. **Bogwald, J. and Dalmo, R.A., 2019.** Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. Microorganisms. 7(12): 627. DOI:10.3390/microorganisms7120627
4. **Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J. and Zhan, W., 2017.** The influence of concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin and immersion time on antigen uptake and expression of immune-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Microb Pathog. 103: 19-28.
5. **Eldar, A., and Ghittino C., 1999.** *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Journal of Diseases of Aquatic Organisms. 36: 227-236.
6. **Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H., 1995.** Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish. Vet. Microbiol. 43: 33-40.
7. **El-Noby, G.A., Hassanin, M., El-Hady and M., Aboshabana, Sh., 2021.** *Streptococcus*: A review article on an emerging pathogen of farmed fishes. Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries. 25(1): 123-139.
8. **Gao, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J. and Zhan, W., 2016.** Antigen uptake and expression of antigen presentation-related immune genes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination with an inactivated *Edwardsiella tarda* immersion vaccine, following hyperosmotic treatment. Fish Shellfish Immun. 55: 274-280.
9. **Giannini, E.G., Testa, R. and Savarino, V., 2005.** Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. Canadian Medical Association Journal. 172(3): 376-379. https://doi.org/10.1503/cmaj.1040752
10. **Golchin Manshadi, A., 2022.** Survey on streptococcosis in selected farms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Yasuj province. Yasuj Journal of Zoonosis. 1(2): 13-23. DOI: 20.1001.1.28209982.1400.1.2.6.6
11. **Ji, J., Torrealba, D., Thwaite, R., Gomez, A.C., Parra, D. and Roher, N., 2019.** Nanostructured TNF alpha protein targets the zebrafish (*Danio rerio*) immune system through mucosal surfaces and improves the survival after *Mycobacterium marinum* lethal infection. Aquaculture. 510: 138-149.
12. **Karami, E., Alishahi, M., Ghorbanpor, M., Tabandeh, M.R. and Mohamadiyan, 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
13. **Khaj, H., Mesbah, M. and Tabandeh, M.R., 2018.** Mohammadian, T. and Dadar, M. Comparative effects of Iranian *streptococcus/lactococcus* vaccine and Aquavac vaccine on growth performance and immunity in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Iranian Veterinary Journal. 13(4): 28-42. DoI: 10.22055/IVJ.2017.48182.1696
14. **Mazandarani, M., Hoseinifar, S.H., Reza Gholitebar, Z., Soudagar, M. and Safari, R., 2022.** Evaluation of Yersinia ruckeri vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics. 11(2): 37-48. DOI: 10.22069/JAPU.2022.20190.1652
15. **Pasaribu, W., Sukenda, S. and Nuryati, S., 2018.** The Efficacy of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Broodstock and Larval Immunization against *Streptococcus agalactiae* and Aeromonas hydrophila. Fishes. 3(1): 161-168.
16. **Romalde, J.L., Ravelo, C., Valdés, I., Magariños, B., de la Fuente, E., San Martín, C., Avendaño-Herrera, R. and Toranzo, A.E., 2008.** *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. Vet. Microbiol. 130: 198-207.
17. **Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K., Meher, N. and Sarangi, A., 2006.** Non specific immune parameters of brood Indian major carp

Labeo rohita and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology. 22: 38-43.

18. **Soltani, M., Pirali Kheirabadi, E., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A., Mohamadian, S., Roohollahi, S. and Zakian M., 2016.** Study on streptococcosis and lactococcosis outbreaks in rainbow trout farms in Fars and Lorestan Provinces. Journal of Veterinary Microbiology. 30: 49-58.
19. **Soltani,M., Nikbakht, G.R., Ebrahimzadeh Moussavi, H.A. and Ahmadzadeh, N., 2008.** Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull Eur Ass Fish Pathol. 28: 209-214.
20. **Thomas, L., 1998.** Clinical laboratory diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results. TH-Books Verlagsgesellschaft Amer Assn for Clinical Chemistry; 1st edition. 1527 p. https://doi.org/10.1093/clinchem/45.4.586a
21. **Van Doan, H., Soltani, M., Leitão, A., Shafiei, S., Asadi, S., Lymbery, A.J. and Ringø, E., 2022.** Streptococcosis a Re-Emerging Disease in Aquaculture: Significance and Phytotherapy. Animals. 12: 2443. https://doi.org/10.3390/ani12182443