13 (3) 209-222, Autumn 2021

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

Original Research Paper

Effect of alginate/chitosan nanoencapsulation on immunogenicity and efficacy of *Streptococosis/lactococosis* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Mojtaba Alishahi [1*], Zahra Tulaby Dezfuly [1], Masoud Ghorbanpoor [2], Mohammad reza Tabandeh [3], Mehrzad Mesbah [1]

[1] Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Key Words
Streptococosis/lactococosis vaccine
Rainbow trout
Microencapsulation
Alginate/Chitosan
Immunogenicity

Abstract

Introduction: In this study, the effect of injection of *streptococcus* / *lactococcosis* vaccine with alginate /chitosan microparticles on immunogenicity in rainbow trout was investigated. For this purpose, first *S. iniae* and *L. garviae* were cultured in TSB medium and inactivated with formalin, then the inactivated bacteria were finely coated with alginate /chitosan particles.

Materials & Methods: 600 pieces of rainbow trout (14±2.1 g) divided to four Treatments: Each treatment was divided into three replications as follows: the first treatment with encapsulated vaccine, the second treatment with uncoated vaccine and the third treatment with alginate / chitosan without bacteria, and the fourth treatment was injected with sterile PBS as control. The fish were fed and maintained for two months and on days 0, 20, 40 and 60, serum samples were prepared from the fish and immunity indicators included: serum antibody titer, complement activity, bactericidal, lysozyme activity, Leukocyte phagocytosis, serum protein and immunoglobulin levels, and expression levels of IL-6 and IgM in anterior kidney were evaluated. Treatments with both bacteria were challenged separately and mortality was compared between treatments.

Result: The results showed that the immunity indices in fish vaccinated with encapsulated vaccine improved compared to other treatments. Also, the expression of IL-6 and IgM genes and survival after bacterial challenge were significantly higher in encapsulated treatment than other treatments.

Conclusion: Therefore, the vaccine microencapsulated method with chitosan and alginate microparticles is effective and can be used to improve the efficiency of *streptococcus*/ *lactococcosis* vaccine in rainbow trout.

* Corresponding Author's email: alishahim@scu.ac.ir
Received: 23 July 2020; Reviewed: 7 September 2020; Revised: 3 November 2020; Accepted: 6 December 2020
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.247605.2347

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ریزپوشانی با نانوذرات کیتوزان/آلژینات بر کارایی و ایمنی‌زایی واکسن تزریقی استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مجتبی علیشاهی*[1]، زهرا طولابی‌دزفولی[1]، مسعود قربانپور[2]، محمد رضا تابنده[3]، مهرزاد مصباح[1]

[1] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران
[2] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران
[3] گروه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

واکسن
استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس
قزل‌آلای رنگین‌کمان
ریزپوشانی
آلژینات/ کیتوزان
ایمنی‌زایی

چکیده

مقدمه: در این تحقیق اثر ریزپوشانی واکسن تزریقی دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس با ریزذرات آلژینات/کیتوزان بر ایمنی‌زایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: به این منظور ابتدا باکتری استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه در محیط TSB کشت و با فرمالین غیرفعال شده، سپس باکتری‌های غیرفعال‌شده با ریز ذرات آلژینات/کیتوزان ریزپوشانی شدند. ۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۴±۲/۱ گرم) به چهار تیمار، هر تیمار در سه تکرار به‌صورت زیر تقسیم گردیدند: تیمار اول با واکسن ریزپوشانی شده، تیمار دوم با واکسن بدون ریزپوشانی و تیمار سوم با آلژینات/کیتوزان بدون باکتری و به تیمار چهارم نیز PBS استریل تزریق گردید. ماهی‌ها به‌مدت دو ماه تغذیه و نگه‌داری شده و در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ نمونه سرم از ماهی‌ها تهیه و شاخص‌های ایمنی شامل: عیار آنتی‌بادی سرمی، فعالیت کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی سرم، فعالیت لایزوزیم، میزان بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها، میزان پروتئین و ایمونوگلوبولین سرم، و میزان بیان دو ژن IL-6 و IgM در کلیه قدامی ماهی‌ها ارزیابی گردیدند. تیمارها با هر دو باکتری به‌طور جداگانه چالش داده شده و تلفات بین تیمارها مقایسه گردید.

نتایج: نتایج حاکی از بهبود شاخص‌های ایمنی در ماهیان واکسینه شده با واکسن ریزپوشانی شده نسبت به سایر تیمارها بود، هم‌چنین میزان‌بیان دو ژن IL-6 و IgM و بازماندگی بعد از چالش باکتریایی نیز در تیمار ریزپوشانی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود.

نتیجه‌گیری و بحث: لذا روش ریزپوشانی واکسن با ریزذرات کیتوزان و آلژینات برای بهبود کارایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلا کارایی داشته و قابل استفاده است.

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

تاریخ دریافت: ۲ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۷ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۳ آبان ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۶ آذر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.247605.2347

مقدمه

در سال‌های اخیر ایران ازعمده‌ترین تولیدکنندگان ماهی قزل‌آلا در آب شیرین در سطح جهان بوده و در دهه اخیر همراه کشور ترکیه بالاترین رشد را در تولید این ماهی داشته‌اند (FAO، ۲۰۱۷). به جرات می‌توان گفت که مهم‌ترین بیماری باکتریایی صنعت پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس بوده، که زیان‌های اقتصادی زیادی را به این صنعت وارد کرده است. این بیماری سیستمیک در ماهیان آب شیرین، لب‌شور و دریایی در ابتدا در میان جمعیت قزل‌آلای رنگین‌کمان در ژاپن توسط Hoshina و همکاران (۱۹۵۸) گزارش شد. بعدها در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در آفریقای جنوبی، ایالات متحده آمریکا، بریتانیا و نروژ نیز اهمیت یافت و امروزه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در آبزی‌پروری شناخته شده است (Agnew و Barnes، ۲۰۰۷؛ Austin و Austin، ۲۰۰۷). استرپتوکوکوزیس اولین بار در ایران از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران در سال ۲۰۰۰ و استان‌فارس در سال ۲۰۰۳ جدا گردید(Faghani و همکاران، ۲۰۰۸). درمان و کنترل این بیماری منمودار است، زیرا زمانی این بیماری آشکار می‌شود که ماهی به‌وسیله کیفیت پایین آب تحت استرس قرار گیرد (Sakai و همکاران، ۱۹۹۳). درمان به‌دلیل منمودارات اجرایی تجویز، هزینه بالا و از همه مهم‌تر مقاوم شدن باکتری نسبت به داروهای رایج کارایی لازم را ندارد (Soltani و همکاران، ۲۰۱۶). روش‌های جایگزین برای کنترل استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس، استفاده از واکسن‌ها است (Pridgeon و Klesius، ۲۰۱۱). اکثر کشورهای دارای صنعت پرورش ماهیان سردابی از این واکسن‌های مؤثر سود می‌جویند. در ایران نیز بیش از یک دهه است که واکسن تجاری دوگانه این بیماری تولید و استفاده می‌شود. یکی از منمودارات تجویز واکسن در ماهی کارایی واکسن است، هرچند روش تزریقی بالاترین کارایی را در بین روش‌های تجویز واکسن دارد، ولی از آن‌جا که واکسن‌های معمول باکتری فرمالینه هستند، میزان تحریک ایمنی مناسبی ایجاد نمی‌کنند، لذا استفاده از مواد محرک ایمنی برای ریزپوشانی یا میکروکپسوله کردن واکسن روش مناسبی برای افزایش کارایی واکسن‌های تزریقی است (آرامون و همکاران، ۱۳۹۷؛ Tulaby Dezfuly و همکاران، ۲۰۲۰؛ طولابی و همکاران، ۱۳۹۹). مدل ارزیابی میزان اثربخشی واکسن‌ها در ماهی، بیش‌تر براساس کارایی و میزان ایمنی‌زایی سرمی واکسن است. ثابت شده است که بین کارایی واکسن و پاسخ ایمنی سرمی در ماهی ارتباط مستقیم وجود دارد (Liu و همکاران، ۲۰۱۶؛ Craig و همکاران، ۲۰۱۷). اطلاعات ساز و کارهای مولکولی و سلولی پاسخ ایمنی و میزان بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی می‌تواند به فهم بهتر، دقیق‌تر و عمیق‌تر ارتباط میان حفاظت، ایمنی‌زایی میزبان در مقابل عوامل بیماری‌زای مهاجم کمک نموده و به درک بهتر روند ایمنی‌زایی و فرایندهای دخیل در ایجاد مقاومت در برابر عامل بیماری‌زا کمک نماید (Raida و همکاران، ۲۰۰۸). پیشرفت‌های چشمگیری در سال‌های اخیر در جداسازی و توصیف ژن سایتوکین از ماهی به‌دست آمده است (Secombes و همکاران، ۲۰۱۱). این سایتوکین‌ها به‌منظور کمک به مکانیسم‌های دفاعی میزبان در محدودنمودن مکانیسم بیماری‌زایی باکتری‌ها دخالت دارند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۷). ژن IgM در ماهی‌ها در روند تولید و ترشح IgM نقش داشته و یکی از ژن‌های مهم در ارزیابی ایمنی اختصاصی هومورال در ماهی است که بیش‌ترین بیان را در کلیه قدامی ماهی دارد (Ismail و همکاران، ۲۰۱۶). هم‌چنین ژن IL-6 یکی از مهم‌ترین سایتوکین‌های پیش التهابی در ماهی بوده که از گلبول‌های سفید ترشح شده و در پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش دارد. اینترلوکین ۶ از سلول‌های بیگانه‌خوار و لنفوسیت T کمک‌کننده و لنفوسیت‌های B ترشح شده و بر تولید ایمونوگلوبولین و هم‌چنین ایمنی غیراختصاصی مؤثر است(علیشاهی، ۱۳۹۶؛ Halimi و همکاران، ۲۰۲۰). لذا در این تحقیق اثر ریزپوشانی واکسن تزریقی دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس با ریزذرات کیتوزان-آلژینات بر کارایی، ایمنی و بیان دو ژن IgM و IL-6 در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس: پس از کشت باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* به‌طور جداگانه که با روش PCR جنس و گونه آن‌ها اثبات شده بود در محیط TSB به‌مدت ۴۸ ساعت، باکتری‌ها در مجاورت فرمالین ۱ درصد به‌مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده، سپس باکتری‌ها با سرم فیزیولوژی سه بار شستشو شدند. به‌منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن کامل باکتری‌ها، از باکتری غیرفعال شده کشت مجدد تهیه شد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰). قبل از غیرفعال نمودن باکتری‌ها، با استفاده از رقت‌سازی و کشت در محیط جامد تعداد باکتری‌ها درحد 10^{10} تنظیم گردید. در انتهای کار، باکتری‌های غیرفعال در سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون در آمدند. برای تیمارهای تزریقی دو باکتری به نسبت مساوی با هم ترکیب شدندو برای تیمارغیرریزپوشانی، ۱۰۰ میکرولیتر از محصول به‌صورت داخل صفاقی به ماهی‌ها تزریق گردید.

ریزپوشانی به‌روش Internal Emulsification: در یک بشر حاوی ۵۵ سی‌سی محلول آلژینات سدیم ۲ درصد به‌میزان ۳/۵ سی-سی سوسپانسیون کربنات کلسیم ۵۰۰ میلی‌مولار اضافه، سپس ۱۰ سی‌سی از محلول حاصل با ۵ سی‌سی سوسپانسیون میکروبی مخلوط شد. در بشر دیگری ۳۵ سی‌سی روغن زیتون ریخته شده و ۰/۵ گرم اسپن ۸۰ به آن اضافه گردید. محلول حاصل با محلول بالا مخلوط شده و ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه هم‌زده شد. در ظرف دیگری ۱۰ سی‌سی روغن زیتون و ۰/۵ سی‌سی اسید استیک با هم مخلوط شده و این محلول قطره‌قطره تا ایجاد pH ۳/۵ به محلول اول اضافه‌شده و ۳۰ دقیقه‌هم‌زده شد.روغن‌زیتون باسانتریفیوژدر ۱۰۰۰۰ دوردر ۱۰ دقیقه ازسوسپانسیون‌جدا شده‌ودرمرحله‌نهایی ۱۵ سی‌سی کیتوزان ۰/۴ درصد قطره‌قطره با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به محلول اضافه شده و بعد به‌مدت یک ساعت کاملاً به‌هم زده شد. نهایتاً محلول به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید (Huiyi و همکاران، ۲۰۱۳). در تیمار ریزپوشانی هم از محصول فوق با غلظت 10^{10} باکتری در میلی‌لیتر استفاده شده و ۱۰۰ میکرولیتر از واکسن به‌روش داخل صفاقی تزریق گردید.

مرحله تیماربندی و تجویز واکسن‌ها

تیماربندی ماهی‌ها: به‌منظور تیماربندی ماهی‌ها تعداد ۶۰۰ عدد ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی ۱۴±۲/۱ گرم به ۴ تیمار (هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار ۵۰ عدد ماهی) به‌صورت زیر تقسیم شدند. برای تغذیه و ساخت واکسن از خوراک تجاری اسکرتینگ Skretting ساخت ایتالیا، مخصوص ماهیان ۱۰ تا ۴۰ گرم استفاده شد. ماهی‌ها بعد از انتقال به‌مدت یک هفته جهت سازش یابی با محیط نگه‌داری و با خوراک معمول تغذیه شدند، بررسی بهداشتی ماهی‌ها (بررسی انگلی، کشت از اندام‌های داخلی و مغز) انجام شد تا از سلامت ظاهری ماهی‌ها اطمینان حاصل گردد. سوابق بیماری در مزرعه تهیه بچه ماهی‌ها (مزرعه‌ای در شهرستان ازنا)، که همواره یکی از مزارع پرورش ماهی نمونه بوده است، وجود نداشت. ماهی‌ها در مخازن پلاستیکی ۵۰۰ لیتری به‌صورت زیر تیماربندی و در روز صفر و ۱۴ به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده به آن‌ها تزریق گردید (جدول ۱). ماهی‌ها به‌مدت ۶۰ روز نگه‌داری و در زمان‌های صفر، ۲۰ و ۶۰ از ماهی‌ها نمونه خون و سرم اخذ و در انتهای دوره اقدام به چالش باکتریایی با هر دو باکتری زنده *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* به‌طور جداگانه گردید.

تعیین عیار ضداسترپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه

در سرم نمونه‌ها: برای اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی ضد*استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* در سرم ماهیان تیمارهای تحقیق به‌روش الایزا، از روش توصیه‌شده توسط Shelby و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. آزمایش الایزا به‌صورت جداگانه برای هر باکتری انجام گرفت. ابتدا رقت ۱:۵۰ از آنتی‌ژن سونیکه (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در بافر پوشاننده (بافر کربنات/بیکربنات با pH=۹/۶) تهیه گردید و ۵۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ گوده‌ای (Nunc, Denmark) کوت شده و به‌مدت ۱۸ ساعت‌در ۴ درجه‌سانتی‌گرادانکوبه‌گردید. بعداز شستشوی گوده‌ها با بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۰۵درصد توئین ۲۰ یا PBS-T)، گوده‌ها با شیر چربی گرفته (High media, India) ۲/۵ درصد در PBS-T به‌مدت یک ساعت در ۲۵ درجه بلاک گردید. سپس گوده‌ها با PBS-T سه مرتبه شست و شو شده و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرمی رقیق‌شده به نسبت ۱ به ۲۵ در PBS-T حاوی ۱ درصد شیر چربی گرفته و انکوبه شدن به‌مدت ۹۰ دقیقه در ۲۵ درجه همراه تکان دادن ممتد، گوده‌ها به‌روش قبلی شست و شو گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال ضد IgM ماهی قزل‌آلا در خرگوشی (اهدایی دکتر مسعود صیفی- دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز) رقیق‌شده به نسبت ۱:۷۵۰۰ در PBS-T حاوی ۱ درصد شیر چربی گرفته به هر چاهک اضافه گردید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق همراه شیک انکوبه گردید. بعد از ۳ بار شستشو با PBS+T، ۵۰میکرولیتر کونژوگه HRP بزی‌ضدایمنوگلوبولین‌خرگوش (Sigma-Aldrich) رقیق شده به نسبت ۱:۲۵۰۰ درPBS-T حاوی ۱درصد شیر چربی گرفته به گوده‌ها اضافه گردید و بعد ۶۰ دقیقه انکوباسیون، چاهک‌ها به‌روش قبل شستشو شده و ۵۰ میکرولیتر محلول کروموژن محلول کروموژن- سوبسترا TMB (تترامتیل بنزیدین+ آب اکسیژنه) به‌میزان ۵۰ میکرولیتر به تمامی چاهک‌ها اضافه شده و واکنش بعد از ۱۰ دقیقه با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال متوقف گردید و پلیت با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا (Accu Reader, Taiwan) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

جدول ۱: تیماربندی ماهی‌ها

تیمار اول	ایمن شده با واکسن غیرفعال‌شده به‌روش تزریقی
تیمار دوم	ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده به‌روش تزریقی
تیمار سوم	تیمار تزریق شده با کیتوزان- آلژینات
تیمار چهارم	تیمار شاهد بدون تجویز واکسن (تزریق بافر فسفات استریل)

بررسی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی: در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ از ۱۲ ماهی از هر تیمار (۴ ماهی از هر تکرار) خونگیری انجام شد؛ از ماهی‌های هر تیمار دو سری نمونه خون گرفته شد، یک سری نمونه خون هپارینه و یک‌سری نمونه خون بدون ماده ضدانعقاد. نمونه‌های هپارینه برای آزمایش‌های خون‌شناسی و اندازه‌گیری NBT

و نمونه‌های بدون ماده ضدانعقاد برای جداسازی سرم و آزمایش‌های ایمنی استفاده گردید.

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط Ellis (۱۹۹۰) توصیه شده است، استفاده گردید. به‌طور خلاصه در این روش از توانایی سرم ماهی برای تخریب باکتری *میکروکوکوس لیزوداکتیکوس* (سیگما) استفاده می‌شود. نهایتاً کاهش جذب نوری نشان‌دهنده میزان فعالیت لایزوزیم در سرم مورد آزمایش است.

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم: برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه‌شده توسط Budino و همکاران (۲۰۰۶)، با کمی تغییرات استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باکتری *آئرومونا‌س‌هیدروفیلا* استفاده گردید، به هر گوده میکروپلیت ۳۳ میکرولیتر از سرم ماهی مورد آزمایش ریخته شد و بعد از آن ۱۳۳ میکرولیتر از رقت‌های باکتری‌های تهیه شده در مجاورت با سرم قرار گرفتند. میزان ۸۶ میکرولیتر محلول MTT (diphenyltetrazolium bromide, sigma M5655) با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد و درنهایت تغییر رنگ ناشی از احیای MTT توسط باکتری‌های زنده در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت‌شد و نتیجه به‌صورت میانگین جذب تکرارها گزارش گردید.

اندازه‌گیری احیاء NBT: از آزمایش احیاء نیترو بلو تترازولیوم (NBT) جهت ارزیابی انفجار تنفسی لکوسیت‌ها استفاده گردید. به این منظور ۱۰ میکرولیتر از ماده نیتروبلو تترازولیوم (مرک) ۰/۲درصد به لوله‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر خون تازه اضافه شده و بعد از انکوباسیون در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ میکرولیتر از محلول فوق داخل لوله‌های شیشه‌ای حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول دی متیل فرمامید (سیگما) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون، لوله با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و میزان جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و به‌عنوان فعالیت NBT گزارش گردید (Sahoo و همکاران، ۲۰۰۵).

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

شمارش تعداد تام گلبول‌های سفید: برای اندازه‌گیری شاخص‌های خونی از دو منبع Thrall (۲۰۰۴) و Feldman و همکاران (۲۰۰۰)استفاده گردید.شمارش کلی گلبول‌های‌سفید به‌روش مستقیم (بااستفاده‌از لام‌هماسیتومتر یانئوبار)وبامحلول‌رقیق‌کننده‌نات-هریک، صورت گرفت. تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون شمارش می‌گردید.

چالش باکتریایی: ۶۰ قطعه ماهی از هر تیمار به‌طور جداگانه با باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* به‌میزان دوز ایجادکننده ۵۰ درصد تلفات (به‌دست‌آمده در تحقیقات قبلی گروه‌تحقیق)، به‌صورت داخل‌صفاقی، مورد چالش داده شدند. هم‌زمان گروه کنترل (غیر واکسینه) نیز با LD50 باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. به یک‌گروه از ماهیان گروه شاهد نیز فقط بافرفسفات به‌همان روش تزریق شد. در طی دوره چالش، روزانه ماهی‌ها بررسی و میزان تلفات در طی ۱۰ روز ثبت و درصد تلفات در تیمارها مقایسه گردید. از آن‌جاکه ماهیان تزریق شده با بافر فسفات هیچ‌گونه تلفاتی در طول دوره چالش نداشتند در نمودارهای چالش این گروه آورده نشده است.

نمونه‌گیری و بررسی بیان ژن‌های ایمنی: در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ از ۱۲ ماهی از هر تیمار (۴ ماهی از هر تکرار) خونگیری انجام شد: از ماهی‌های هر تیمار نمونه خون برای جداسازی سرم و انجام الایزا و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی استفاده گردید. نمونه‌های بافتی کلیه قدامی در شرایط استریل جمع‌آوری و بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. برای شاخص‌های ژنی از نمونه‌های صفر، ۲۰ و ۶۰ استفاده گردید.

ارزیابی بیان ژن‌های IL-6 و IgM در کلیه قدامی

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA نمونه‌های کلیه قدامی به‌وسیله کیت RNXTM (SinaClone Bioscience, Iran) و براساس روش توصیه‌شده توسط شرکت سازنده انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده با اندازه‌گیری نسبت جذب نوری ۲۸۰/ ۲۶۰ نانومتر با استفاده‌از دستگاه‌اسپکتروفوتومتر میکروفتومتر (Eppendorf, Germany) و ارزیابی حضور RNAهای ریبوزومی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. نمونه‌های RNA با جذب بالاتر از ۱/۸ برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز YTA cDNA synthesis kit (یکتا تجهیز، ایران)، مقدار تقریبی ۱ میکروگرم RNA و پرایمرهای هگزامر تصادفی براساس روش توصیه شده شرکت سازنده انجام گرفت.

طراحی پرایمر برای qPCR: پرایمرهای qRT-PCR براساس توالی ژن‌های IL-6 و IgM و elongation factor 1α(EF1α) ماهی قزل آلای رنگین‌کمان موجود در بانک‌ژن NCBI(https://www.ncbi. Nlm. nih.gov) و با استفاده از نرم‌افزار Beacon desighner 7.1 انجام شد.

توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به همراه اطلاعات مربوط به هریک در جدول ۲ آورده شده است.

PCR کمی در زمان حقیقی (qPCR): برای ارزیابی تغییر میزان بیان ژن‌های IgM و IL-6، با روش PCR در زمان حقیقی، از دستگاه Lightcycler® Detection System (Roche، آمریکا) استفاده شد.ژن Elongation factor 1 α (EF1α) به‌عنوان ژن کالیبراتور استفاده شد. واکنش‌ها با حجم ۱۲/۵ میکرولیتری شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Super SYBR Green qPCR Mastermix (یکتا تجهیز، ایران) و ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰۰ nM)، ۳ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ نانو گرم) و ۲/۲۵ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز بود. پروتکل PCR شامل ۵ دقیقه دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به‌دنبال آن ۴۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. دو واکنش کنترل شامل کنترل منفی بدون cDNA و کنترل حاوی RNA به‌جای cDNA درنظر گرفته شدند. بیان نسبی ژن‌ها در مقایسه با ژن کالیبراتور با استفاده از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ و نرم‌افزار Lightcycler 96. مورد آنالیز قرار گرفت. ارزیابی کارایی تکثیر ژن‌های هدف (IgM و IL-6) در مقایسه با ژن مرجع (EF1α) با تهیه رقت‌های مختلف cDNA و رسم نمودار کارایی مطابق دستورالعمل MIQE انجام شد (Bustin و همکاران، ۲۰۰۹).

جدول ۲: ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

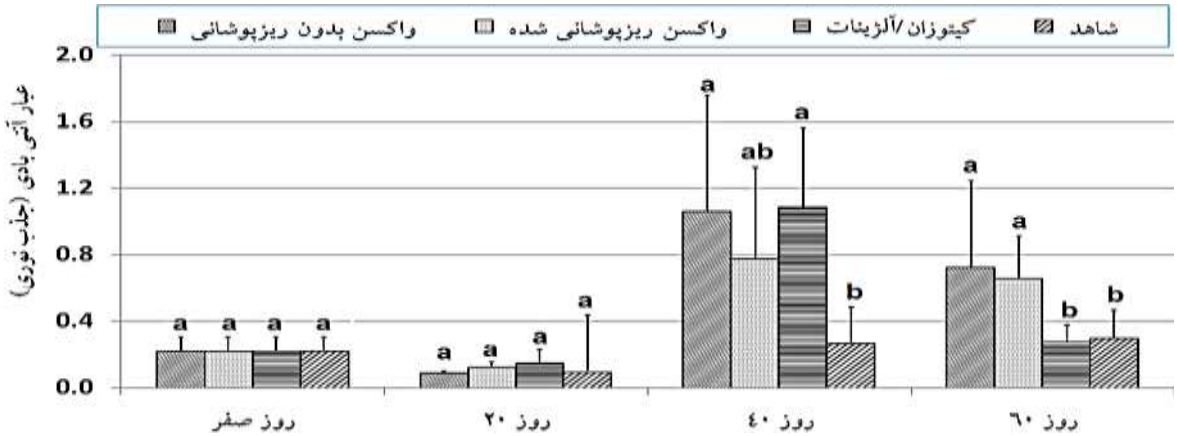
نام ژن	طول قطعه (bp)	توالی پرایمر مورد استفاده'3<<<<5'	عدد دسترسی بانک ژن
EF1α	۲۰۵	CAAGGATATCCGTCGTGGCA ACAGCGAAACGACCAAGAGG	XM_020500543
IgM	۲۲۰	TACAAGAGGGAGACCGGAGGA CTTCCTGATTGAATCTGGCTAGTGGT	S63348
IL-6	۱۸۷	CCTTGCGGAACCAACAGTTTG CCTCAGCAACCTTCATCTGGTC	MN_001124657

آزمون آماری: برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون‌استاتیستیک تست برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از آنوای یک‌طرفه برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی در تیمارها استفاده گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

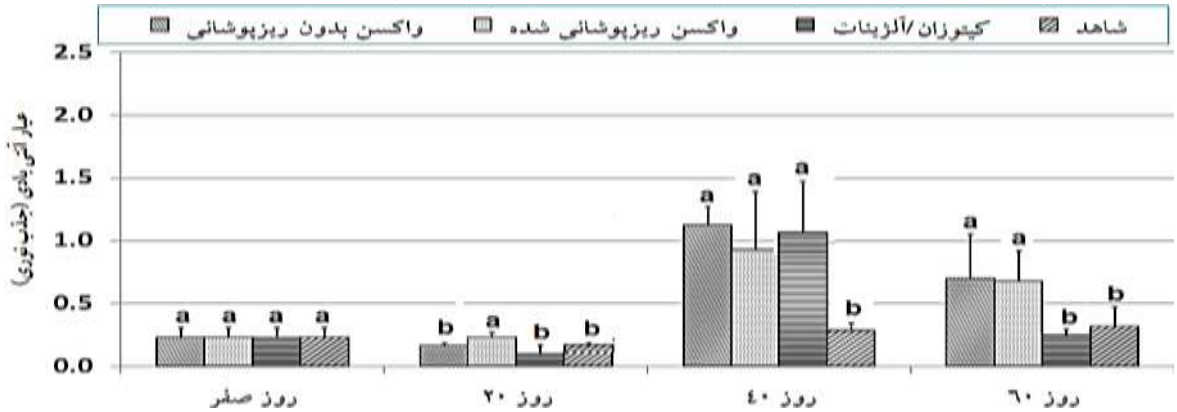
نتایج مربوط به عیار آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهیان واکسینه شده در تیمارهای تحقیق در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است. عیار آنتی‌بادی ضد *لاکتوکوکوس گارویه* در دو مرحله نمونه‌گیری (روزهای ۴۰ و ۶۰) در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد بالاتر بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین عیار آنتی‌بادی در روز ۴۰ و ۶۰ تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی نشده هم از تیمار شاهد بالاتر بود. عیار آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس اینیه* در هر سه مرحله نمونه‌گیری (روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰) در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد بالاتر بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین عیار آنتی‌بادی در روز ۴۰ و ۶۰ تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی نشده هم از تیمار شاهد بالاتر بود.

شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی: میزان فعالیت لایزوزیم سرم در هر سه مرحله نمونه‌گیری (روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰) در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد و سایر تیمارها بالاتر بود (P<۰/۰۵)، هر چند در روزهای ۴۰ و ۶۰ در تیمار تزریق واکسن بدون ریزپوشانی نیز افزایش فعالیت لایزوزیم نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۳). میزان فعالیت ضد باکتریایی سرم در هر سه مرحله نمونه‌گیری (روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰) در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد و سایر تیمارها بالاتر بود (P<۰/۰۵)، هر چند در روزهای ۲۰ و ۴۰ در تیمار تزریق واکسن بدون ریزپوشانی نیز افزایش فعالیت لایزوزیم نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۴). فعالیت بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها بر مبنای میزان احیای نیتروبلو تترازولیوم در دو تیمار واکسینه با واکسن ریزپوشانی شده و واکسن بدون ریزپوشانی در دو مرحله نمونه‌گیری روز ۴۰ و ۶۰ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) از تیمارهای شاهد بیش‌تر بود (جدول ۲). تعداد گلبول‌های سفید خونی و میزان پروتئین و گلوبولین سرم نیز در تیمار ریزپوشانی در اکثر مراحل نمونه‌گیری به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارهای تحقیق بالاتر بود (P<۰/۰۵) (جدول ۳). تفاوت معنی‌داری در سطح آلبومین سرم در تیمارهای تحقیق مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) (جدول ۳).



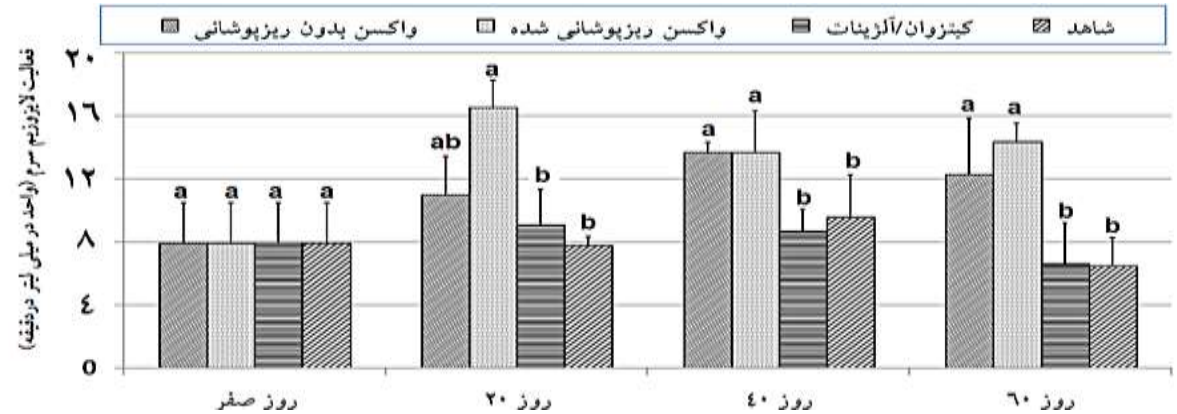
شکل ۱: نمودار مقایسه عیار آنتی‌بادی ضد *لاکتوکوکوس گارویه* بین تیمارهای ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است).



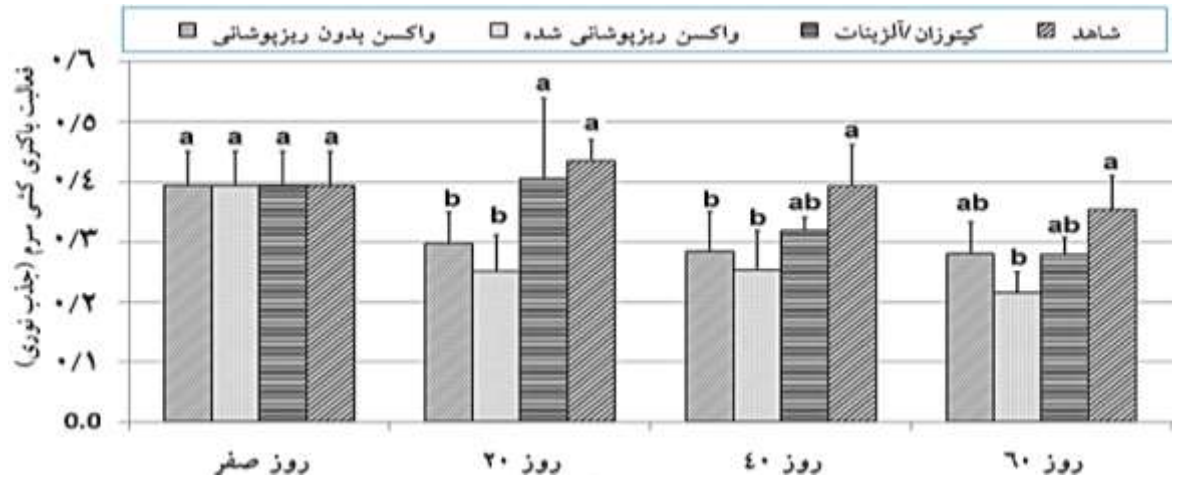
شکل ۲: نمودار مقایسه عیار آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس اینیه* بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است).



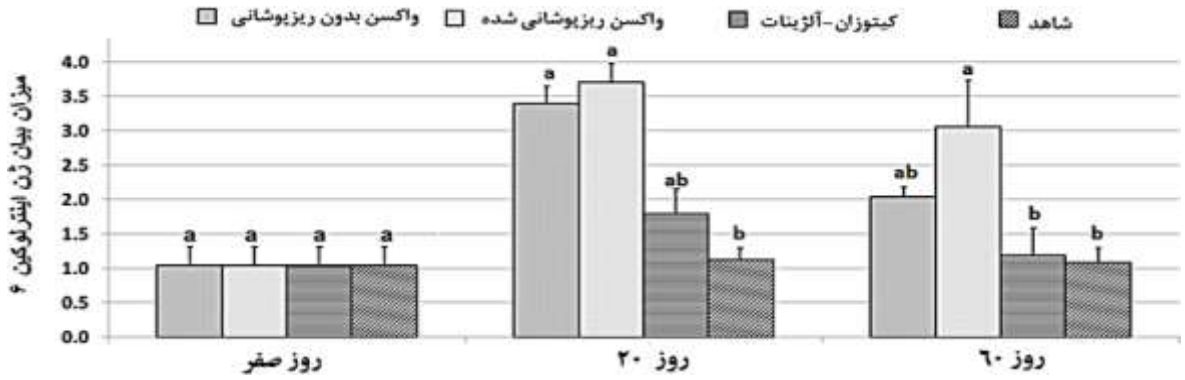
شکل ۳: نمودار مقایسه فعالیت لایزوزیم بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است).



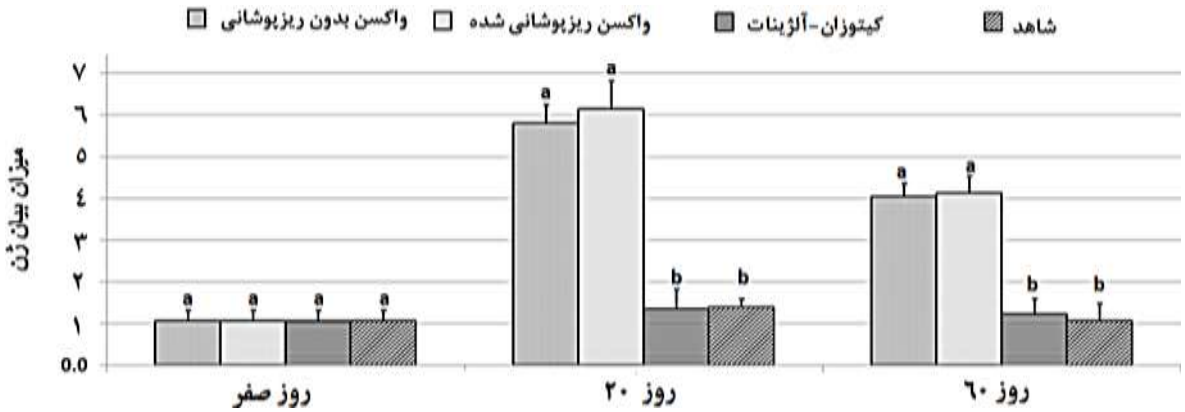
شکل ۴: نمودار مقایسه فعالیت باکتری‌کشی سرم بین تیمارهای ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است).



شکل ۵: نمودار مقایسه میزان بیان ژن اینترلوکین-۶ در کلیه قدامی تیمارهای ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است).



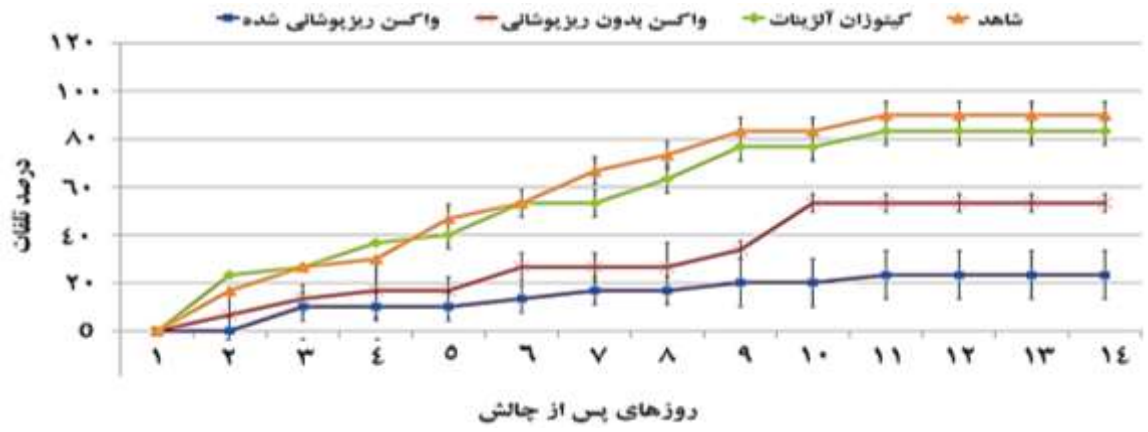
شکل ۶: نمودار مقایسه میزان بیان ژن IgM در کلیه قدامی تیمارهای ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است).

نتایج میزان بیان ژن‌های IL-6 و IgM در بافت کلیه قدامی ماهیان تیمارهای تحقیق در مراحل نمونه‌گیری در شکل‌های ۵ و ۶ آورده شده است. میزان بیان ژن IL-6، در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده در روز ۲۰ و ۶۰ به‌ترتیب برابر ۳/۷۹±۰/۴۴ و ۳/۱۹±۰/۱۷ و در تیمار بدون ریزپوشانی برابر ۳/۳۸±۰/۱ و ۲/۰۴±۰/۱۹ بود که به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بودند. میزان بیان ژن IgM، در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده در روز ۲۰ و ۶۰ به‌ترتیب برابر ۶/۳۴±۰/۵۴ و ۴/۱۲±۰/۱۷ و در تیمار بدون ریزپوشانی برابر ۵/۶۷±۰/۱ و ۴/۰۲±۰/۱۹ بود که نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار بیان این ژن در تیمار ایمن‌سازی با واکسن ریزپوشانی شده نسبت به سایر تیمارهاست. نتایج مربوط به درصد تلفات بعد از چالش با دو باکتری حاد *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* در تیمارهای تحقیق به‌ترتیب در شکل‌های ۷ و ۸ آورده شده‌است. درصد تلفات در تیمارهای ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$)، به‌طوری‌که تلفات بعد از چالش با *استرپتوکوکوس اینیه* در تیمار واکسن ریزپوشانی ۱۰±۲۳/۳ درصد، تیمار ایمن‌سازی بدون ریزپوشانی ۶/۶۷±۵۳/۳ تیمار کنترل ۳/۶۷±۹۰ درصد، در تیمار تجویز آلژینات/ کیتوزان ۶/۶۷±۸۳/۳۴ درصد بود. تلفات بعد از چالش با *لاکتوکوکوس گارویه* در تیمار واکسن ریزپوشانی ۱۰±۲۶/۶۷ درصد، تیمار ایمن‌سازی بدون ریزپوشانی ۱۰±۵۰ تیمار کنترل ۳/۶۷±۸۳/۳۴ درصد، در تیمار تجویز آلژینات/ کیتوزان ۱±۷۶/۶۷ درصد بود.

شکل ۷: نمودار مقایسه تلفات بعد از چالش با لاکتوکوکوس گارویه بین تیمارهای ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0/05$ است).



شکل ۸: نمودار مقایسه تلفات بعد از چالش با استرپتوکوکوس اینیه بین تیمارهای ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0/05$ است).

جدول ۳: مقایسه برخی شاخص‌های ایمنی تیمارهای ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ریزپوشانی شده با کیتوزان- آلژینات و بدون ریزپوشانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

		روز صفر	روز ۲۰	روز ۴۰	روز ۶۰
فعالیت بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها	آلژینات-کیتوزان	۰/۴۵±۰/۰۶۱ a	۰/۴۶±۰/۰۵۶ a	۰/۴۳±۰/۰۶۷ b	۰/۴±۰/۰۵۵ b
	کنترل	۰/۴۵±۰/۰۶۱ a	۰/۴۱±۰/۰۴۶ a	۰/۳۹±۰/۰۵۲ b	۰/۴۳±۰/۰۷۵ b
	واکسن بدون ریزپوشانی	۰/۴۵±۰/۰۶۱ a	۰/۵۸±۰/۰۵۹ a	۰/۶۱±۰/۰۵۲ a	۰/۵۵±۰/۰۶۶ a
	واکسن ریزپوشانی شده	۰/۴۵±۰/۰۶۱ a	۰/۶۳±۰/۰۶۳ a	۰/۶۸±۰/۰۷۸ a	۰/۵۳±۰/۰۴۶ a
تعداد گلبول‌های سفید (میکرولیتر/10^3×)	آلژینات-کیتوزان	۹/۸۵±۱/۷ a	۹/۶۷±۱/۹۳b	۱۰/۴۲±۲/۳۴b	۱۰/۲۲±۲/۴۳b
	کنترل	۹/۸۵±۱/۷ a	۹/۸۷±۲/۰۳ b	۱۱/۱۲±۲/۱۴ b	۱۰/۱±۲/۱۵ b
	واکسن بدون ریزپوشانی	۹/۸۵±۱/۷ a	۱۰/۲۲±۲/۱۴ b	۱۰/۲±۱/۲ b	۱۱/۳۴±۲/۸۹ b
	واکسن ریزپوشانی شده	۹/۸۵±۱/۷ a	۱۲/۶۲±۲/۰۴ a	۱۳/۲±۱/۲ a	۱۲/۵۴±۲/۶۹ a
پروتئین تام (گرم/دسی‌لیتر)	آلژینات-کیتوزان	۴/۸۸±۰/۵۸ a	۵/۱±۰/۶۷ b	۴/۸۵±۰/۶۷ b	۵/۱۲±۰/۵۳ b
	کنترل	۴/۸۸±۰/۵۸ a	۴/۸±۰/۹۶ b	۴/۹۹±۰/۷ b	۴/۹۴±۰/۸۳ b
	واکسن بدون ریزپوشانی	۴/۸۸±۰/۵۸ a	۵/۹۸±۱/۰۳ a	۶/۱۱±۰/۷۹ a	۵/۳۲±۰/۶۲ b
	واکسن ریزپوشانی شده	۴/۸۸±۰/۵۸ a	۶/۸۸±۰/۷۵ a	۶/۰۲±۰/۷۹ a	۵/۸۲±۰/۶۸ a
گلوبولین تام (گرم/دسی‌لیتر)	آلژینات-کیتوزان	۲/۴۶±۰/۷۶ a	۲/۷±۰/۷۶ b	۲/۶±۰/۵۴ b	۲/۴۵±۰/۶۹ b
	کنترل	۲/۴۶±۰/۷۶ a	۲/۵۱±۰/۹۶ b	۲/۶۹±۰/۷ b	۲/۴۶±۰/۹۹ b
	واکسن بدون ریزپوشانی	۲/۴۶±۰/۷۶ a	۳/۸۰±۱/۰۶ a	۳/۹۴±۰/۴۳ a	۲/۹۶±۰/۳۹ b
	واکسن ریزپوشانی شده	۲/۴۶±۰/۷۶ a	۳/۹۸±۰/۸۶ a	۳/۷۸±۰/۹۳ a	۳/۳۴±۰/۶۱ a
آلبومین (گرم/دسی‌لیتر)	آلژینات-کیتوزان	۲/۳۳±۰/۳۵ a	۲/۱۱±۰/۵۶ a	۲/۲۲±۰/۷۴ a	۲/۴۲±۰/۵۷ a
	کنترل	۲/۳۳±۰/۳۵ a	۲/۱۹±۰/۴۹ a	۲/۳±۰/۷۹ a	۲/۴۸±۰/۴۷ a
	واکسن بدون ریزپوشانی	a۲/۳۳±۰/۳۵	a۲/۱۹±۰/۴۷	a۲/۲۶±۰/۷۴	a۲/۳۲±۰/۶۷
	واکسن ریزپوشانی شده	a۲/۳۳±۰/۳۵	a۲/۴۹±۰/۶۷	a۲/۲۹±۰/۶۵	a۲/۴۱±۰/۵۷

(حروف کوچک لاتین روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است).

بحث

در تحقیق جاری اکثر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و عیار آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* در تیمار ایمن شده با واکسنی که با ریزذرات کیتوزان/آلژینات پوشش‌دار شده بود افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها به‌ویژه تیمار کنترل داشت (P<۰/۰۵). عیار آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* اندازه‌گیری شده به‌روش الایزا در تیمار ایمن شده با واکسن تزریقی ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت(P<۰/۰۵)، البته در تیمارهای واکسینه شده با واکسن بدون ریزپوشانی هم افزایش در برخی مراحل نمونه‌گیری در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (P>۰/۰۵). گزارش‌ها در مورد ارتباط تیتر آنتی‌بادی با محافظت ایجادشده به‌دنبال واکسیناسیون ماهی در برابر استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس متفاوت و گاهی متناقض است، به‌عنوان‌مثال Barnes و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که هرچند تیتر آنتی‌بادی ضد*استرپتوکوکوس اینیه* در ماهی قزل‌آلای ایمن شده با واکسن همولوگوس ایجاد گردید، ولی در مورد باکتری هترولوگوس هیچ‌گونه عیار آنتی‌بادی مشاهده نگردید. Bromage و همکاران (۱۹۹۹) در ماهی برماندی و بیماری استرپتوکوکوزیس و Greenway و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی گربه‌ماهی روگاهی و بیماری ادواردزیلوزیس علی‌رغم مشاهده کارایی‌مناسب واکسن، هیچ‌گونه عیار آنتی‌بادی ضد این باکتری‌ها را در سرم ماهی واکسینه گزارش نکردند. Klesius و همکاران (۲۰۰۰) با تزریق داخل صفاقی و عضلانی باکتری کشته استرپتوکوکوس اینیه در ماهی تیلاپیا افزایش عیار آنتی‌بادی متناسب با محافظت بالا را گزارش کردند. البته آن‌ها با به‌کار بردن باکتری اگزولوگوس در تست الایزا عیاری گزارش نکردند. در همین راستا Costa و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که واکسیناسیون ماهی تیلاپیا با باکترین *استرپتوکوکوس اینیه* موجب افزایش معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی تا ۱۲ هفته گردید که بعد از آن تیتر آنتی‌بادی با شیب آرامی کاهش یافت و بعد از سه ماه تیتری مشاهده نشد. به‌نظر می‌رسد در ماهیان مختلف مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد پاسخ ایمنی در

برابر استرپتوکوکوزیس‌نقش دارند و در برخی گونه‌ها ایمنی اختصاصی با واسطه آنتی‌بادی نقش کمتری در ایمن‌سازی ماهی دارد. عدم تغییر عیار آنتی‌بادی ضد باکتری‌های واکسنی در تیمار تجویز کیتوزان و آلژینات (بدون باکترین) هم گویای عدم تأثیر این دو پلیمر طبیعی بر ایمنی اختصاصی بر ضد استرپتوکوکوس و لاکتوکوکوس است. به‌نظر می‌رسداین دو پلیمرطبیعی با تحریک پاسخ‌های‌التهابی و اثر ادجوانتی ایمنی‌زایی واکسن‌های تزریقی را به‌صورت مؤثری افزایش می‌دهند (Gudding و همکاران، ۲۰۱۴). از طرفی تأثیر ریزپوشانی در عرضه تدریجی آنتی‌ژن و دسترسی طولانی‌تر سیستم ایمنی به آنتی‌ژن نیز در افزایش پاسخ ایمنی اختصاصی بی‌تأثیر نبوده است. در بین شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی مورد بررسی فعالیت لایزوزیم، قدرت باکتری‌کشی و فعالیت بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها و سطح پروتئین و گلوبولین سرم به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر ایمن‌سازی با واکسن‌های تجربی تحقیق قرار گرفتند (P<۰/۰۵). فعالیت لایزوزیم در تحقیق جاری در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده در تمامی مراحل نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).. البته این افزایش فعالیت در تیمار ایمن شده با واکسن معمولی‌بدون ریزپوشانی‌در روز ۲۰ تحقیق نیز مشاهده گردید. فعالیت لایزوزیم سرم به‌عنوان یکی از شاخصه‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهی است (Yang و همکاران، ۲۰۱۶). احتمالاً بالا رفتن سطح لایزوزیم در مطالعه حاضر در تیمار تزریقی را باید به‌دلیل وجود مقدار مؤثرآنتی‌ژن در واکسن دانست.افزایش فعالیت لایزوزیم در آزادماهیان بعد از واکسیناسیون تزریقی با آئروموناس گزارش شده است (Vinay و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Zhu و همکاران (۲۰۱۷) روی ماهی تیلاپیا صورت گرفت، افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهیان‌واکسینه نسبت به گروه کنترل گزارش گردید. Craig و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر روی پاسخ‌های ایمنی ماهی تیلاپیا بعد از تجویز واکسن استرپتوکوکوزیس انجام دادند،افزایش معنی‌دار میزان پروتئین و فعالیت لایزوزیم سرم را در گروه واکسینه گزارش نمودند. Alishahi و Buchmann (۲۰۰۶) نشان دادند که تزریق واکسن *ایکتیوفیتیریوس مولتی فیلیس* فعالیت لایزوزیم سرم و پروتئین تام سرم قزل‌آلای رنگین‌کمان را افزایش‌می‌دهد. نتایج تحقیق فعلی نشان داد فعالیت لایزوزیم سرم نه تنها تحت تأثیر ایمن‌سازی تزریقی با واکسن‌معمولی‌قرار گرفته،بلکه‌ریزپوشانی با ریزذرات آلژینات/ کیتوزان افزایش بیش‌تر فعالیت لایزوزیم سرم را در بر داشته است، که احتمالاً اثرات تحریک ایمنی آلژینات و کیتوزان و نقش ادجوانی آن باعث این افزایش شده است. در بین سایر شاخص‌های ایمن غیراختصاصی، قدرت باکتری‌کشی سرم، میزان پروتئین و گلوبولین سرم نیز در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان در هر سه مرحله نمونه‌گیری (روز ۲۰، ۴۰ و ۶۰) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵)، درصورتی‌که در تیمار واکسن معمولی ریزپوشانی نشده در فقط دو مرحله اول افزایش نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید. در تیمار تزریق شده با آلژینات/کیتوزان بدون باکتری هم تفاوت معنی‌داری بین شاخص‌ها در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری با تیمار شاهد مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). در تحقیقات مشابه بهبود شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهیان ایمن شده گزارش شده است. هم‌چنین در تحقیق جاری تعداد گلبول‌های سفید خونی در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده در همه مراحل نمونه‌گیری به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). Balfry و همکاران (۲۰۰۱) افزایش فعالیت کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی سرم و میزان IgM سرم و تعداد گلبول‌های سفید خونی در آزادماهی نقره‌ای واکسینه شده در برابر آئروموناس را گزارش نمودند. Huang و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده‌اند که واکسیناسیون ماهی با واکسن کشته *استرپتوکوکوس اینیه* در ماهی هامور معمولی افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیت کننده و افزایش بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها را باعث می‌شود. Craig و همکاران (۲۰۱۷) افزایش فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت‌های خون ماهی تیلاپیا پس از واکسیناسیون در برابر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را گزارش نمودند.در تحقیقی مشابه Vimal و همکاران (۲۰۱۴) از کیتوزان تری پلی فسفات (CS/TPP) به‌عنوان ادجوانت DNA واکسن علیه عفونت نوداویروس در ماهی باس دریایی آسیایی استفاده کرده و علاوه بر افزایش تحریک ایمنی، میزان کارایی بیش از ۶۰ درصد را گزارش نمودند. Dubey و همکاران (۲۰۱۶) از نانوذرات پلیمر سنتتیک PLGA به‌عنوان ادجوانت به همراه پروتئین OMP باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با دو دوز مختلف استفاده کردند، آن‌ها علاوه بر گزارش بهبود شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی، افزایش تیتر آنتی‌بادی و بقای بعد از چالش با باکتری را در این تیمارها گزارش نمودند. در تحقیقی مشابه Behera و همکاران (۲۰۱۰) با تجویز ریز ذرات پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید حاوی پروتئین نوترکیب غشای خارجی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش عیار آنتی‌بادی ضد این باکتری در ماهی روهو را گزارش کردند.کیتوزان و آلژینات دو پلیمر طبیعی زیست‌تخریب‌پذیرند که در تحقیقات مختلف به‌عنوان محرک ایمنی و ادجوانت در حیوانات خونگرم و ماهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۲). در تحقیق جاری اثر مثبت ریزپوشانی واکسن استرپتوکوکوزیس با نانوذرات کیتوزان/ آلژینات در ایمنی‌زایی و تحریک پاسخ‌ایمنی‌غیراختصاصی مشاهده‌گردید. احتمالاً دلیل این‌تحریک ایمنی علاوه برحفظ بهتر آنتی‌ژن، در عرضه تدریجی و بهتر آنتی‌ژن به سیستم ایمنی است. در تجویز واکسن‌های ژنی کاربرد ریزپوشانی آنتی‌ژن ضروری‌تر به‌نظر می‌رسد، چراکه این

واکسن‌ها قابلیت کم‌تری در تحریک ایمنی از طریق جذب به سیستم ایمنی را دارند. هرچند در تحقیق جاری بهبود شاخص‌های ایمنی و افزایش میزان بقای نسبی بعد از چالش باکتریایی در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده مشاهده گردید، گاهی چنین ارتباطی در ماهیان واکسینه مشاهده نمی‌شود، درهمین راستا علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) ارتباطی بین میزان محافظت و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرمی (کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی سرم و لایزوزیم) ماهیان ایمن شده به با واکسن *آئروموناس هیدروفیلا* با ادجوان نانوکیتوزان مشاهده نکردند. آن‌ها احتمال دادند فاکتورهایی به‌غیر از کمپلمان، لایزوزیم و ایمونوگلوبولین سرم و مخاط افزایش محافظت در برابر باکتری را باعث شده‌اند. در برخی مطالعات نیز عدم تغییر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهیان ایمنی شده با واکسن گزارش گردیده است (Firdaus و همکاران، ۲۰۱۳؛ Alishahi و همکاران، ۲۰۱۲). با وجود اهمیت و موفقیت ایمن‌سازی واکسن علیه بیماری‌های باکتریایی در ماهی،اطلاعات کمی در مورد مکانیسم‌های مولکولی واکسن‌های ایجاد کننده ایمنی در ماهیان استخوانی وجود دارد (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). سنجش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی بعد از واکسیناسیون، بینش ارزشمندی به مکانیسم‌های ایمنی بر علیه باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی ایجاد می‌کند (Huang و همکاران، ۲۰۱۴). این مطالعه افزایش میزان بیان ژن‌های ایمنی (بیان ژن‌های IgM و IL-6) به‌عنوان شاخص اثربخشی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس را نشان‌داد. در تحقیق جاری بیان ژن IgM و IL-6 در کلیه قدامی ماهیان ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده از سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود، البته میزان بیان در تیمار ایمن شده با واکسن بدون ریزپوشانی نیز از تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود ($P<0/05$). مطالعات زیادی نشان داده‌است که بعد از واکسیناسیون ماهی با یک واکسن کشته باکتریایی، میزان بیان ژن IgM افزایش یافته است (علیشاهی و طولابی‌دزفولی، ۱۳۹۶). افزایش بیان ژن IgM در ماهی قزل‌آلا بعد از عفونت تجربی یا واکسیناسیون اتفاق افتاده و میزان بیان این ژن با سطح محافظت واکسن ارتباط دارد (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). در تحقیق جاری هم عیار آنتی‌بادی ضد دو باکتری موجود در واکسن و هم میزان بیان ژن IgM در تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده افزایش نشان دادند که کاملاً منطقی به‌نظر می‌رسد. در تحقیقی مشابه Raida و همکاران (۲۰۰۸) بعد از ایمن‌سازی ماهی قزل‌آلا با باکتری کشته *یرسینیا راکری* به‌روش حمام افزایش بیان ژن‌های IgM ، IL-6 در مقایسه با گروه کنترل را نشان دادند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Cui و همکاران (۲۰۱۰) افزایش بیان ژن IgM را در کاربرد واکسن *ویبریو الژینولیتیکوس* در ماهی هامور گزارش نمودند. Deshmukh و همکاران (۲۰۱۳) نیز افزایش بیان ژن IgM را بعد از تجویز واکسن دوگانه تجاری Aqua Vac ERM و Aqua vac RELERA بر ضد بیماری یرسینیوزیز در ماهی قزل‌آلا گزارش نمودند. زیرخانواده IL-6 بر فعالیت سلول‌های B و ماکروفاژها تأثیرگذارند. ژن IL-6 در ماهی قزل‌آلا کلون و به‌خوبی شناسایی شده است (Chen و همکاران، ۲۰۱۲). نمودار کلی این ژن در بین مهره‌داران محافظت شده است. نقش IL-6 در پروسه فاز حاد التهاب شناخته شده است و در واقع یک سایتوکین چندکاره بوده که اثرات زیستی متعددی دارد (Tulaby Dezfuly و همکاران، ۲۰۲۰). این ژن در سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی نقش داشته و به‌عنوان یک سایتوکین پیش التهابی شناخته شده است. در تحریک تولید آنتی‌بادی و نیز تمایز سلول‌های T نقش مؤثری ایفا می‌نماید. Løvoll و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای نشان دادند که واکسن ماهی قزل‌آلا با LPS باکتری *ائروموناس سالمونیسیدا* موجب کاهش بیان ژن IL-6 گردیده است. برخلاف یافته فوق، ماکروفاژهای تحریک شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان واکسینه شده در برابر استرپتوکوکوزیس، میزان بیان IL-6 افزایش معنی‌داری پیدا کرد (Secombes و Wang، ۲۰۰۹). در ماهی هامور تزریق واکسن موجب افزایش بیان ژن IL-6 و تمایز بیش‌تر سلول‌های T و افزایش بیان IgM در کلیه قدامی گردید (Chen و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به بیان بالای هر دو ژن IgM و IL-6 در کلیه قدامی ماهیان ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده در مقایسه با سایر تیمارها و نیز کارایی بالاتر این تیمار نسبت به سایر تیمارها، احتمال دارد که نقش تحریک ایمنی دو ریز ذره آلژینات و کیتوزان در عرضه بهتر آنتی‌ژن و تحریک بهتر ایمنی در سطح ژنی نیز نقش داشته‌اند. در تحقیق جاری کم‌ترین درصد تلفات بعد از چالش با باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* (۲۳/۳ درصد) و *لاکتوکوکوس گارویه* (۲۶/۷ درصد) مربوط به تیمار ایمن شده با واکسن ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان بود که نسبت به تیمار شاهد (۹۰ و ۸۳/۳ درصد) کاهش معنی‌داری نشان داد. با توجه به میزان تلفات بعد از چالش، در مقایسه با گزارش‌های مشابه، کارایی واکسن ریزپوشانی شده قابل قبول است، به‌طوری‌که در مطالعه Eldar و همکاران (۱۹۹۹) در ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان میزان تلفات ۱۱ درصد و در مطالعه Altun و همکاران (۲۰۱۰) نیز تلفات ۱۰ درصدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دنبال چالش باکتریایی ماهیان واکسن در برابر *لاکتوکوکوس گارویه* به‌روش تزریقی گزارش گردید. هم‌چنین Soltani و همکاران (۲۰۰۷) پس از استفاده از واکسن غوطه‌وری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلفات حدود ۷۰ درصد را در تیمار غوطه‌وری گزارش کردند. در تحقیقی مشابه، Prabhugouda و همکاران (۲۰۱۴) در ماهی *Channa striatus* از پوشش کیتینی برای باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* به‌صورت تزریقی

استفاده کرده و بهبود کارایی واکسن از ۴۹ درصد در تیمار واکسن بدون کیتین به ۹۲ درصد در تیمار واکسن پوشش داده شده با کیتین را گزارش نموده‌اند. Ballesteros و همکاران در سال (۲۰۱۴) واکسن DNA انکپسوله شده با آلژینات را جهت مقابله با بیماری ویروسی نکروز عفونی پانکراس (IPNV) در ماهی قزل‌آلا استفاده کرده و محافظت قوی با درصد بقای نسبی (RPS) بیش از ۸۰ درصد در ماهی واکسینه را گزارش کردند. در ماهی فلاندر ژاپنی تجویز واکسن DNA ویروس بیماری لیمفوسیتوز (LCDV) با ادجوان ریز ذرات آلژینات انجام شد و علاوه بر بیان پروتئین ویروسی در بافت‌های مختلف ماهی افزایش مقاومت قابل ملاحظه در برابر چالش ویروسی گزارش گردید.

مهم‌ترین شاخصه واکسن میزان کارایی آن در برابر چالش با بذر واکسنی است. تحریک ایمنی غیراختصاصی، اختصاصی، افزایش میزان بیان ژن‌ها در ماهیان واکسینه شده در تیمارهای مختلف، نهایتاً باید باعث افزایش مقاومت عملی ماهی در برابر عفونت باکتریایی با باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* گردد. لذا این قسمت تحقیق چکیده و نتیجه‌نهایی تحقیق بوده و تأثیر ریزپوشانی آنتی‌ژن واکسنی در بهبود کارایی عملکردی واکسن را نشان می‌دهد. از آن‌جاکه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی توان ایمنی‌زایی کم‌تری دارند، لذا استفاده از محرک‌های ایمنی در نقش ادجوان در این واکسن‌ها ضرورت بیش‌تری دارد، از طرفی پلیمرهای طبیعی زیست‌تخریب‌پذیر آلژینات و کیتوزان (به‌صورت ریزذرات پوششی) با تأثیر بر ایمنی اختصاصی، غیراختصاصی و کارایی این واکسن‌ها گزینه مناسبی برای تولید واکسن‌های تجاری تزریقی می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسید.

منابع

۱. **ایمانپور، م.؛ محسنی، م. و کرمی‌نسب، م.، ۱۳۹۸.** عملکرد مکمل فیتاز بر جایگزینی پودر ماهی با آرد سویا بر شاخص‌های رشد و برخی پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius trutta*). فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۱ ، شماره ۴، صفحات ۱۷۷ تا ۱۸۶.

۲. **آرامون، ا.؛ علیشاهی، م.؛ صیفی‌آبادشاپوری، م. و قربانپور، م.، ۱۳۹۷.** بررسی میزان ایمنی واکسن بایوفیلم آئروموناس هیدروفیلا خوراکی و تزریقی در ماهی انگشت‌قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه محیط‌زیست جانوری. سال ۱۰، شماره ۳، صفحات ۲۰۷ تا ۲۱۲.

۳. **طولابی‌دزفولی، ز.؛ علیشاهی، م.؛ قربانپور، م. و مصباح، م. و تابنده، م.ر.، ۱۳۹۹.** بررسی ایمنی‌زایی و محافظت‌کنندگی لیپوپلی ساکارید یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) در برابر یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*). فصلنامه محیط زیست جانوری، دوره ۱۲، شماره ۳، صفحات ۲۹۳ تا ۳۰۴. DOI: 10.22034/aej.2020.119247

۴. **علیشاهی، م.؛ سعیدی‌منش، م.؛ مصباح، م. و زارعی، م.، ۱۳۹۵.** بررسی اثر نانوکیتوزان بر ایمنی‌زایی واکسن خوراکی آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۲، شماره ۱، صفحات ۵۴ تا ۶۵.

۵. **علیشاهی، م. و طولابی دزفولی، ز.، ۱۳۹۶.** واکسیناسیون ماهی، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. چاپ اول، ۷۸۲ صفحه.

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

7. **Alishahi, M.; Esmaeili Rad, A.; Zarei, M. and Ghorbanpour, M., 2014.** Effect of dietary chitosan on immune response and disease resistance in *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Veterinary Medicine. Vol. 8, No. 2, pp: 125-133.

8. **Alishahi, M.; Ranjbar, M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R. and Mesbah, M., 2010.** Effects of dietary on some specific and nonspecific immunity in the common carp. International journal of veterinary research. Vol. 4, pp: 189-195.

9. **Altun, S.; Kubilay, A.; Ekici, S.; Didinen, B.I. and Diler, O. 2010.** Oral vaccination against lactococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. Vol. 16, pp: 211-217.

10. **Balfry, S.K. and Higgs, D.A., 2001.** Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. Nutrition and fish health. pp: 213-234.

11. **Ballesteros, N.A.; Saint-Jean, S. R. and Perez-Prieto, S. I., 2014.** Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Fish & shellfish immunology, Vol. 37, No. 2, pp: 220-228.

12. **Barnes, A.C.; Young, F.M.; Horne, M.T. and Ellis, A.E., 2003.** *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Diseases of aquatic organisms. Vol. 53, No. 3, pp: 241-247.

Vaccine Effects on the Growth Performance, Survival Rate, Hematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchos mykiss*). World Journal of Zoology. Vol. 3, No. 2, pp: 54-58.

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

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

27. **Firdaus-Nawi, M.; Sabri, M.Y.; Hanan, Y.; Siti-Zahrah, A. and Zamri-Saad, M., 2013.** Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* spp. in Malaysia. Aquaculture Research. Vol. 45, pp: 87-96.

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

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

30. **Halimi, M.; Alishahi, M.; Abbaspour, M.R.; Ghorbanpoor, M. and Tabandeh. M.R., 2019.** High efficacy and economical procedure of oral vaccination against *Lactococcus garvieae/Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 99, pp: 505-513.

31. **Hoshina, T.; Sano, T. and Morimoto, Y., 1958.** A Streptococcus pathogenic to fish. Journal of the Tokyo University of Fisheries. Vol. 44, No. 5.

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

33. **Huiyi, S.; Weiting, Y.; Meng, G.; Xiudong, L. and Xiaojun, M., 2013.** Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohudrate polymers. Vol. 96: pp: 181-189.

34. **Ismail, M.S.; Siti-Zahrah, A.; Syafiq, M.R.M.; Amal, M.N.A.; Firdaus-Nawi, M. and Zamri-Saad, M., 2016.** Feed-based vaccination regime against streptococcosis in red tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*. BMC Veterinary Research. Vol. 12, No. 1, pp: 194-210.

35. **Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A. and Evans, J.J., 2000.** Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. Vol. 188, pp: 237-246.

36. **Liu, H.; Zhang, S.; Shen, Z.; Ren, G.; Liu, L.; Ma, Y.; Zhang, Y. and Wang, W., 2016.** Development of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in fish based on truncated cell wall surface anchor proteins. Veterinary Research. Vol. 179, pp: 1036-1092.

13. **Behera, T.; Nanda, P.K.; Mohanty, C.; Mohapatra, D.; Swain, P.; DAS, B.K.; Routray, P.; Mishra, B.K. and Sahoo, S.K., 2010.** Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolicacid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate andadaptive immune responses. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 28, No. 2, pp: 320-325.

14. **Bromage, E.S.; Thomas, A. and Owens, L., 1999.** *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Diseases of aquatic organisms. Vol. 36, pp: 177-181.

15. **Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, MW.; Shipley, GL.; Vandesompele, J. and Wittwer, C.T., 2009.** The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical chemistry. Vol. 55, No. 4, pp: 611-622.

16. **Chen, H.H.; Lin, H.T.; Foung, Y.F. and Lin, J.H.Y., 2012.** The bioactivity of teleost IL-6: IL-6 protein in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) induces Th2 cell differentiation pathway and antibody production. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 38, No. 2, pp: 285-294.

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

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

19. **Cui, M.; Zhang, Q.; Yao, Z.; Zhang, Z.; Zhang, H. and Wang, Y., 2010.** Immunoglobulin M gene expression analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge. Fish and shellfish immunology. Vol. 29, No. 6, pp: 1060-1065.

20. **Deshmukh, S.; Kania, P.W.; Chettri, J.K.; Skov, J.; Bojesen, A.M.; Dalsgaard, I. and Buchmann, K., 2013.** Insight from molecular, pathological, and immune histochemical studies on cellular and humoral mechanisms responsible for vaccine-induced protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. Clinical and Vaccine Immunology. Vol. 20, No. 10, pp: 1623-1641.

21. **Dubey, S.; Avadhani, K.; Mutalik, S.; Madambithara, S. and Maiti, B., 2016.** *Aeromonas hydrophila* OmpW PLGA Nanoparticle Oral Vaccine Shows a Dose-Dependent Protective immunity in Roho, Vaccine. Vol. 4, No. 21. pp: 2-11

22. **Eldar, A. and Ghittino, C., 1999.** *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 36, No. 3, pp: 227-731.

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

24. **Faghani, T.; Azari Takami, Gh.; Kousha, A. and Faghani, S., 2008**. Surveying on Alginic Acid and Anti-Streptococcus

expression in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection. International journal of molecular sciences. Vol. 16, No. 5, pp: 9998-10015.

48. **Wang, T. and Secombes, C.J., 2009.** Identification and expression analysis of two fish-specific IL-6 cytokine family members, the ciliary neurotrophic factor (CNTF)-like and M17 genes, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Molecular immunology. Vol. 46, No. 11, pp: 2290-2298

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

37. **Løvoll, M.; Fischer, U.; Mathisen, G.S.; Bøgwald, J.; Ototake, M. and Dalmo, R.A., 2007.** The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription. Veterinary immunology and immunopathology. Vol. 117, No. 3, pp: 284-295.

38. **Prabhugouda, S.K.M.; Shankar, B.T.; Naveen, K.; Rajreddy, P. and Omkar, V.B., 2014.** Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Channa striatus*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 41, pp: 581-585.

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

40. **Raida, M.K. and Buchm ann, K., 2008.** Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against Yersinia ruckeri: effects of temperature on protection and gene expression. Vaccine. Vol. 26, No. 8, pp: 1050-1062.

41. **Sakai, M.; Otubo, T.; Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1993.** Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. Journal of fish Diseases. Vol. 16, pp: 239-247.

42. **Shelby, R.A.; Shoemaker, C.A. and Klesius, P.H., 2004.** Development of and ELISA to measure the humoral immune response of hybrid striped bass Morone chrysops M. saxatilis to *Streptococcus iniae*. Aquaculture research. Vol. 35, pp: 997-1001.

43. **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. Vol. 7, pp:129-140.

44. **Soltani, M.; Pirali Kheirabadi, E.; Taheri Mirghaed, A.; Zargar, A.; Mohamadian, S.; Roohollahi, Sh. and Zakian, M., 2016.** Study on Streptococcosis and Lactococcosis Outbreaks in Rainbow Trout Farms in Fars and Lorestan Provinces. Journal of Veterinary Microbiology. Vol. 30, pp: 49-58.

45. **Tulaby Dezfuly, Z.; Alishahi, M.; Ghorbanpoor, M.; Tabandeh, M.R. and Mesbah, M. 2020.** Immunogenicity and protective efficacy of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide (LPS), encapsulated by alginate-chitosan micro/nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 104, pp: 25-35

46. **Vimal, S.; AbdulMajeed, S.; Nambi, K.S.N.; Madan, N.; Farook, M.A.; Venkatesan, C.; Taju, G. and Sahul Hameed, A.S., 2014.** Delivery of DNA vaccine using chitosan–tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, Lates calcarifer (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. Aquaculture. pp: 240-246.

47. **Wang, E.; Wang, K.; Chen, D.; Wang, J.; He, Y.; Long, B.; Yang, L.; Yang, Q.; Geng, Y.; Huang, X. and Ouyang, P., 2015.** Evaluation and selection of appropriate reference genes for real-time quantitative pcr analysis of gene