

## مقایسه کارایی و ایمنی زایی سه روش تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **مجتبی علیشاهی\***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مصطفی حلیمی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مسعود قربانپور نجف آبادی**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **احمد عرفان منش**: جهاد دانشگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

### چکیده

در این تحقیق کارایی و ایمنی زایی تجویز واکسن دو گانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به سه روش خوراکی، تزریقی و غوطه‌وری در ماهی قزل آلی رنگین کمان ارزیابی گردید. به این منظور ۶۰۰ قطعه ماهی قزل آلی (۱/۲±۱۴ گرم) به چهار تیمار، هر تیمار در سه تکرار به صورت زیر تقسیم گردیدند: تیمار واکسن خوراکی که با خوراک حاوی  $10^8$  cfu/g به مدت دو هفته تغذیه گردیدند، تیمار واکسن تزریقی که با ۰/۱ میلی لیتر از باکتری دو باکتری به میزان  $10^9$  cfu/ml به روش داخل صفاقی تزریق گردید و در تیمار غوطه‌وری ماهی‌ها به مدت دو دقیقه در سوسپانسیون واکسنی  $10^9$  cfu/ml غوطه‌ور گردیدند و تیمار شاهد بدون تجویز واکسن. ماهی‌ها به مدت دو ماه تغذیه و نگره‌داری شدند و در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ شاخص‌های ایمنی شامل: عیار آنتی‌بادی، فعالیت لایزوزیم، کمپلمان و باکتری‌کشی سرم و نیز میزان پروتئین و گلوبولین سرم بین تیمارها مقایسه گردید. سپس تیمارها با هر دو باکتری به طور جداگانه چالش داده شدند و تلفات بین تیمارها مقایسه گردید. نتایج نشان داد که تلفات بعد از چالش تیمار واکسن تزریقی در مورد *S. iniae* و *L. garviae* (۱۰±۲۰ و ۷۷±۵/۶۷±۲۶) و در روش خوراکی به ترتیب برابر (۳±۵/۱۰ و ۱۰±۵/۷) و در غوطه‌وری به ترتیب برابر (۶۳±۵/۰ و ۶۳±۵/۴۳) بوده و شاخص‌های ایمنی اندازه‌گیری شده نیز در تیمار واکسن تزریقی به طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که علی‌رغم این که تیمار واکسن تزریقی بالاترین میزان کارایی و ایمنی زایی را نشان داد، ولی تجویز خوراکی و غوطه‌وری نیز باعث ایجاد محافظت نسبی در ماهی قزل آلی گردید و با توجه به ارجحیت‌های روش غوطه‌وری و خوراکی نسبت به تزریقی انجام تحقیق در بهبود کارایی این روش‌ها توصیه می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس، روش تجویز، خوراکی، تزریقی، ماهی قزل آلی رنگین کمان



## مقدمه

تحقیق مقایسه سه روش تجویز تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری این واکسن ارزیابی گردید.

## مواد و روش‌ها

**تهیه واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس:** از باکتری استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه که در تحقیق قبلی از مزارع استان چهارمحال بختیاری و خوزستان جداسازی و تعیین هویت و تعیین حدت شده بودند (کریمی و همکاران، ۱۳۹۶) استفاده گردید. به این منظور پس از کشت باکتری استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه به‌طور جداگانه که با روش PCR جنس و گونه آن‌ها اثبات شده بود در محیط TSB به مدت ۴۸ ساعت، باکتری‌ها در مجاورت فرمالین ۱ درصد به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس باکتری‌ها با سرم فیزیولوژی ۳ بار شست‌وشو شدند. به‌منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن کامل باکتری‌ها، از باکتری غیرفعال شده کشت مجدد تهیه شد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰). قبل از غیرفعال نمودن باکتری‌ها، با استفاده از رقت‌سازی و کشت در محیط جامد تعداد باکتری‌ها در حد  $10^{10}$  تنظیم گردید. در انتهای کار، باکتری‌های غیرفعال شده در سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون در آمدند. برای تیمارهای تزریقی از دو باکتری به نسبت مساوی با هم ترکیب شدند و نهایتاً برای تیمارهای تزریقی  $100$  میکرو لیتر از محصول به‌صورت تزریق داخل صفاقی به ماهی‌ها تزریق گردید. در تیمار خوراکی هم از محصول باکتریایی با غلظت  $10^{10}$  به‌میزان  $10$  میلی‌لیتر به  $100$  گرم خوراک مخلوط گردید، یعنی نهایتاً  $10^9$  باکتری در هر گرم خوراک در نظر گرفته شد. ماهی‌ها به مدت ۱۰ روز با خوراک واکسنی تهیه شده تغذیه گردیدند. برای تیمار غوطه‌وری، محصول باکتریایی تهیه شده به نسبت ۱ به ۱۰ در آب آکواریوم رقیق گردید (صد میلی‌لیتر واکسن به ۹۰۰ میلی‌لیتر آب) و سپس ماهی‌ها به مدت ۲ دقیقه در واکسن تهیه شده با هوادهی غوطه‌ور گردیدند.

### مرحله تیمار بندی و تجویز واکسن‌ها

**تیمار بندی ماهی‌ها:** به‌منظور تیمار بندی ماهی‌ها تعداد ۶۰۰ عدد ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی  $14 \pm 2/1$  گرم به ۴ تیمار (هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار ۵۰ عدد ماهی) به‌صورت زیر تقسیم شدند. برای تغذیه و ساخت واکسن از خوراک تجاری اسکرتینگ Skretting ساخت ایتالیا، مخصوص ماهیان ۱۰ تا ۴۰ گرم قزل‌آلا استفاده شد (پروتئین ۴۴٪، چربی ۱۴٪، رطوبت ۹٪، خاکستر ۱۱٪) ماهی‌ها بعد از انتقال به مدت یک هفته جهت سازش‌یابی با محیط نگه‌داری و با خوراک معمول تغذیه شدند، بررسی بهداشتی ماهی‌ها (بررسی انگلی، کشت‌اندام‌های داخلی و مغز) انجام شد تا از سلامت ظاهری ماهی‌ها اطمینان حاصل

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

آن رقت  $2 \times 10^{-9}$  تهیه گردید و سپس دوبار با سرم فیزیولوژی استریل شست و شو داده شد، در ادامه برای اطمینان بیش تر دورقت دیگر از غلظت اولیه در میکروپلیت تهیه گردید. در ادامه به هر گوده میکروپلیت ۳۳ میکرولیتر از سرم ماهی مورد آزمایش ریخته شد و بعد از آن ۱۳۳ میکرولیتر از رقت های باکتری های تهیه شده در مجاورت با سرم قرار گرفتند و خوب مخلوط شدند و برای مدت ۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و همه نمونه ها به طور هم زمان انکوبه شدند. برای کنترل هم از PBS استریل و سرم ماهی غیرفعال شده در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در پایان زمان انکوباسیون به همه گوده ها به میزان ۸۶ میکرولیتر محلول MTT (۲۳) diphenyltetrazolium bromide, sigma M5655) با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و در نهایت تغییر رنگ ناشی از احیای MTT توسط باکتری های زنده در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری و ثبت شد و نتیجه به صورت میانگین جذب تکرارها گزارش گردید.

**اندازه گیری احیاء NBT:** از آزمایش احیاء نیترو بلو تترازولیم (NBT) جهت ارزیابی انفجار تنفسی لکوسیت ها استفاده گردید. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از ماده نیتروبلو تترازولیم (مرک) ۰/۲ درصد به لوله های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر خون تازه اضافه شده و بعد از انکوباسیون در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، ۵۰ میکرولیتر از محلول فوق داخل لوله های شیشه ای حاوی ۱ میلی لیتر محلول دی متیل فرمامید (سیگما) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون، لوله در ۳۰۰۰g سانتی فیوژ شده و میزان جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۳۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری و به عنوان فعالیت NBT گزارش گردید (Sahoo و همکاران، ۲۰۰۵).

**اندازه گیری فعالیت کمپلمان:** جهت اندازه گیری فعالیت کمپلمان به هر گوده پلیت الایزا ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه و ۲۳۰ میکرولیتر بافر کمپلمان (ورونال بافر،  $pH=7.2$ ، حاوی ۰/۵ میلی مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی مول کلرید کلسیم) و ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش شسته شده اضافه شد. یک شب نمونه ها در دمای ۴ درجه انکوبه شده و سپس جذب نوری مایع رویی با اسپکتوفوتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه گیری شد.

#### اندازه گیری پروتئین کل و گلوبولین پلاسما

**غلظت ایمنوگلوبولین تام:** غلظت ایمنوگلوبولین کل براساس روش شرح داده شده توسط Nayak و همکاران (۲۰۰۸) اندازه گیری شد. به طور خلاصه ابتدا پروتئین تام و آلومین پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوانالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه گیری شد. میزان ایمنوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه شد.

گردد. سوابق بیماری در مزرعه تهیه بچه ماهی ها (مزرعه ای در شهرستان ازنا) که همواره یکی از مزارع پرورش ماهی نمونه بوده است، وجود نداشت. ماهی ها در مخازن پلاستیکی ۵۰۰ لیتری به صورت زیر تیمار بندی گردیدند. تیمار اول: ایمن شده با باکتری غیرفعال شده به روش خوراکی (۱۰۹ عدد باکتری در گرم خوراک به مدت دو هفته)، تیمار دوم: ایمن شده به روش تزریقی (تزریق داخل صفاقی ۰/۱ میلی لیتر از باکترین دو باکتری با غلظت ۱۰۹ باکتری در میلی لیتر، تیمار سوم: ایمن شده به روش غوطه وری (به مدت ۲ دقیقه در غلظت ۱۰۹ باکتری در میلی لیتر)، تیمار چهارم: تیمار شاهد بدون تجویز واکسن. ماهی ها به مدت ۶۰ روز نگهداری گردیدند و در زمان های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ از ماهی ها نمونه خون و سرم اخذ گردید و در انتهای دوره اقدام به چالش باکتریایی با هر دو باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه گردید.

#### نمونه گیری، آزمایشات ایمنی، خونی، چالش باکتریایی و

**بررسی بیان ژن های ایمنی:** در روزهای ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ از ۱۲ ماهی از هر تیمار (۴ ماهی از هر تکرار) خونگیری انجام شد، از ماهی های هر تیمار دو سری نمونه خون گرفته شد، یک سری نمونه خون هپارینه و یک سری نمونه خون بدون ماده ضد انعقاد. نمونه های هپارینه برای آزمایشات خون شناسی و اندازه گیری NBT استفاده گردید و نمونه های بدون ماده ضد انعقاد برای جداسازی سرم و آزمایشات ایمنی استفاده گردید. از ماهی ها نمونه مخاط نیز تهیه گردید، به منظور تهیه نمونه مخاط از روش توصیه شده توسط Hatten و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. نمونه موکوس با قرار دادن دو عدد ماهی در یک کیسه پلاستیکی کوچک زیپ دار حاوی ۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به مدت دو دقیقه انجام شد. بعد از خارج نمودن ماهی نمونه مخاط جمع آوری و در دمای ۲۰- تا زمان استفاده نگهداری گردید.

**اندازه گیری لایزوزیم سرم:** برای اندازه گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش کدورت سنجی که توسط Ellis (۱۹۹۰) توصیه شده است، استفاده گردید. برای این کار در این ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر باکتری میکرو کوکوس لیزوداکتیوکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سترات ( $pH=5.8$ ) در گوده های میکروپلیت تخت مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان های ۰ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد (شکل ۱). برای میزان فعالیت لیزوزیم هر ۰/۰۱ کاهش در جذب نوری در دقیقه یک واحد در نظر گرفته شد (Nayak و همکاران، ۲۰۰۸).

**بررسی قدرت باکتری کشی سرم:** برای اندازه گیری قدرت باکتری کشی سرم از روش توصیه شده توسط Budino و همکاران (۲۰۰۶)، با کمی تغییرات استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به مدت ۶ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس از



## اندازه گیری پارامترهای خون شناسی

شمارش تعداد تام گلبول های سفید و شمارش گلبول های قرمز: برای اندازه گیری شاخص های خونی از دو منبع Thrall (۲۰۰۴) و Feldman و همکاران (۲۰۰۰) استفاده گردید. شمارش کلی گلبول های سفید و قرمز به روش مستقیم (با استفاده از لام هماسیتومتر یا نوبار) و همانند شمارش کلی گلبول های خون پرندگان، با رقیق کردن خون، به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات-هریک، صورت گرفت. برای این کار و پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر، تعداد گلبول های سفید در ۴ مربع بزرگ اولیه که هر یک شامل ۱۶ مربع متوسط بود، شمارش می گردید. برای شمارش گلبول های قرمز تعداد آن ها در ۵ مربع متوسط وسط که هر یک شامل ۲۵ مربع کوچک بود، استفاده شد. سپس تعداد کل گلبول های سفید و گلبول های قرمز در میلی متر مکعب خون محاسبه می گردید.

**میزان هموگلوبین:** مقدار هموگلوبین نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Milton roy) با طول موج ۵۴۶ نانومتر و با استفاده از معرف درآپکینز به دست آمد. برای این کار ابتدا ۲/۵ میلی لیتر از محلول درآپکینز در لوله های آزمایش حاوی ۱۰ میکرولیتر از نمونه های خون و با نسبت ۱ به ۲۵۰ اضافه شد و بلافاصله مخلوط شد و در ادامه در دستگاه اسپکتروفتومتری و در طول موج ۵۴۶ نانومتر میزان جذب نوری خوانده شد. عدد به دست آمده در ۳۶/۹ ضرب شد تا میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر به دست آمد.

**میزان هماتوکریت:** جهت تعیین هماتوکریت نمونه های خون جمع آوری شده در لوله های موئین توسط سانتریفیوژ میکرو هماتوکریت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس لوله موئینه را روی خط کش مخصوص قرار داده با حرکت لوله روی خط کش وضعیتی ایجاد گردید که فصل مشترک بین خمیر و خون روی عدد صفر و آخرین سطح پلاسما روی عدد صد قرار گیرد حالا عددی که طول ستون گویچه های قرمز را نشان می دهد هماتوکریت شخص می باشد.

**بررسی میزان حدت باکتری ها (LD50):** به منظور محاسبه LD50 هر باکتری در ماهی قزل آلا، ابتدا استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط کشت TSB کشت داده شدند. پس از سانتریفیوژ و جداسازی باکتری، غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی در حد  $10^9$  باکتری در میلی لیتر تنظیم شده (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰) و با استفاده از رقت های متوالی از این سوسپانسیون ( $10^5$  الی  $10^9$ ) تهیه گردید. از هر غلظت به ده ماهی تزریق داخل صفاقی انجام شده و تلفات هر رقت به مدت ۱۰ روز ثبت و پس از مرگ ماهی ها، با کشت مجدد باکتری از اندام های داخلی شامل کلیه قدامی و کبد، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی چالش داده شده، اطمینان حاصل گردید. نهایتاً

با استفاده از نرم افزار Probit، اقدام به اندازه گیری LD50 گردید. میزان LD50 باکتری استرپتوکوکوس اینییه به میزان  $10^6 \times 1/3$  و در مورد باکتری لاکتوکوکوس گارویه  $10^5 \times 4/7$  محاسبه شد. یعنی لاکتوکوکوس گارویه حدت نسبتاً بالاتری نسبت به استرپتوکوکوس اینییه داشت.

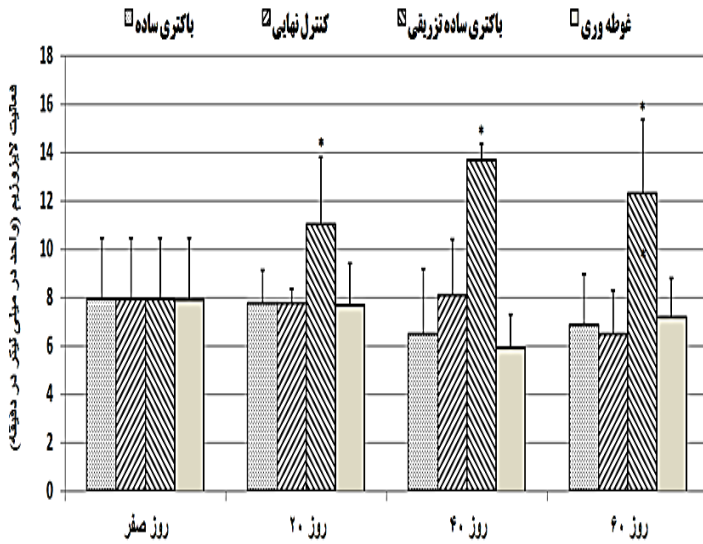
**چالش باکتریایی:** ۶۰ قطعه ماهی از هر تیمار به طور جداگانه با باکتری های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه به میزان دوز ایجادکننده ۵۰٪ تلفات (به دست آمده در مرحله قبل)، به صورت داخل صفاقی، مورد چالش داده شدند. هم زمان گروه شاهد (غیرواکسینه) نیز با LD50 باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. به یک گروه از ماهیان گروه شاهد نیز فقط PBS به همان روش تزریق شد. در طی دوره چالش، روزانه ماهی بررسی شده و میزان تلفات در طی ۱۰ روز ثبت شد. درصد تلفات در تیمارها مقایسه گردید. از آن جا که ماهیان تزریق شده با PBS هیچ گونه تلفاتی در طول دوره چالش نداشتند در نمودارهای چالش این گروه آورده نشده است.

**آزمون آماری:** برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون استاتستیک تست (Leven statistic test) برای بررسی هموزن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از واریانس یک طرفه (One way ANOVA) برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی در تیمارها استفاده گردید. برای بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین ها از تست تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد.

## نتایج

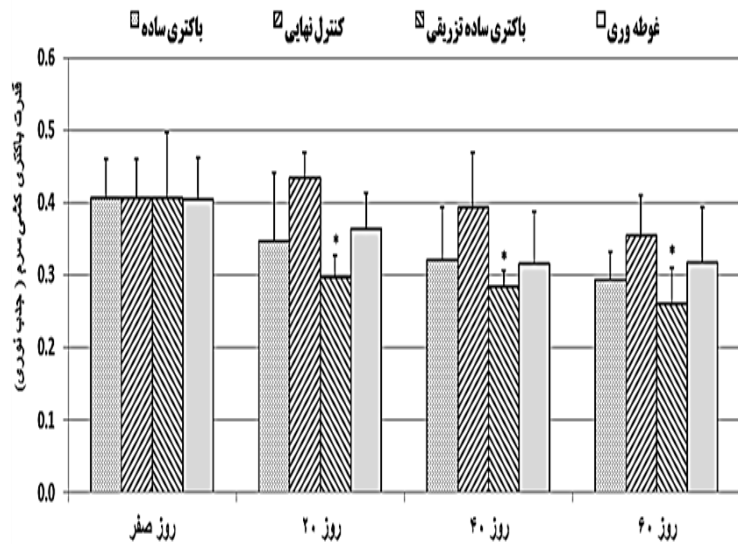
نتایج شاخص های ایمنی نشان داد که اکثر شاخص ها در تیمار واکسینه شده با واکسن تزریقی افزایش معنی داری نسبت به تیمار شاهد داشت. قدرت باکتری کشی سرم در تیمار واکسینه به روش تزریقی به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). در صورتی که در بقیه تیمارها تفاوت معنی داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) (شکل ۱). فعالیت لایزوزیم سرم نیز در تیمار واکسینه به روش تزریقی در هر سه مرحله نمونه گیری به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت ( $P < 0/05$ ). در صورتی که در بقیه تیمارها تفاوت معنی داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) (شکل ۲). فعالیت لایزوزیم سرم نیز در تیمار واکسینه به روش تزریقی در هر سه مرحله نمونه گیری به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت ( $P < 0/05$ ). در صورتی که در بقیه تیمارها تفاوت معنی داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) (شکل ۲). احیای NBT سلول های خونی نیز در تیمار واکسینه به روش تزریقی روز ۲۰ و ۶۰ نمونه گیری به طور معنی داری نسبت

پروتئین و گلوبولین سرم و شاخص‌های خونی مورد بررسی، در بین تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری در مراحل مختلف نمونه‌گیری نشان ندادند ( $P > 0/05$ ) (شکل ۴ و جدول ۱).

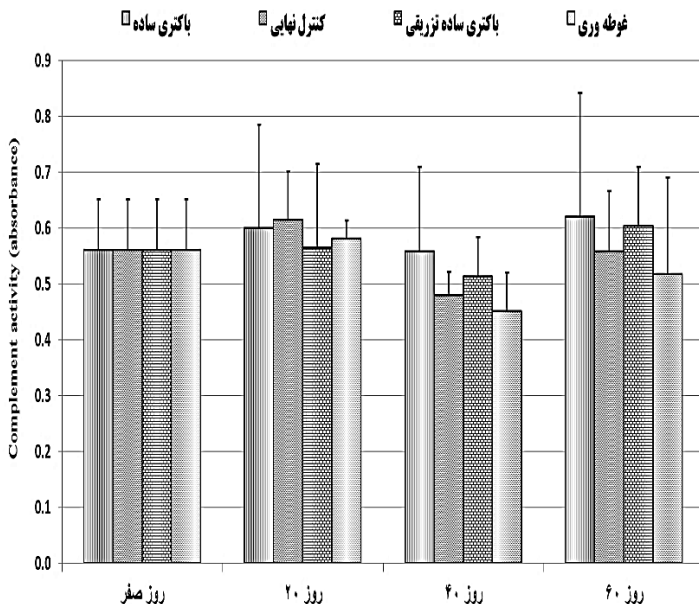


شکل ۲: مقایسه فعالیت لایزوزیم سرم بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری (علامت \* در بالای میله انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).

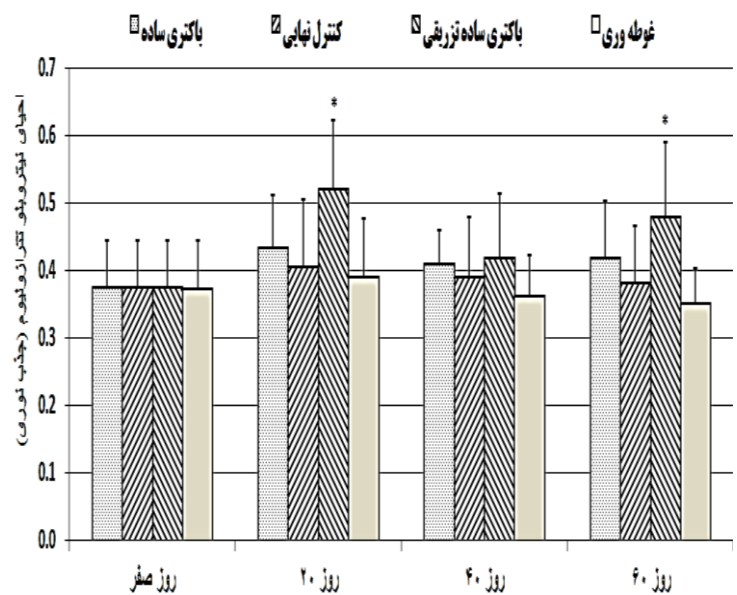
به تیمار شاهد افزایش داشت ( $P < 0/05$ ). در صورتی که در بقیه روز ۴۰ در تیمار تزریقی و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) (شکل ۳). فعالیت کمپلمان سرم، میزان



شکل ۱: مقایسه قدرت باکتری‌کشی سرم بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری (علامت \* در بالای میله انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).



شکل ۴: مقایسه فعالیت کمپلمان سرم بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری (علامت \* در بالای میله انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).

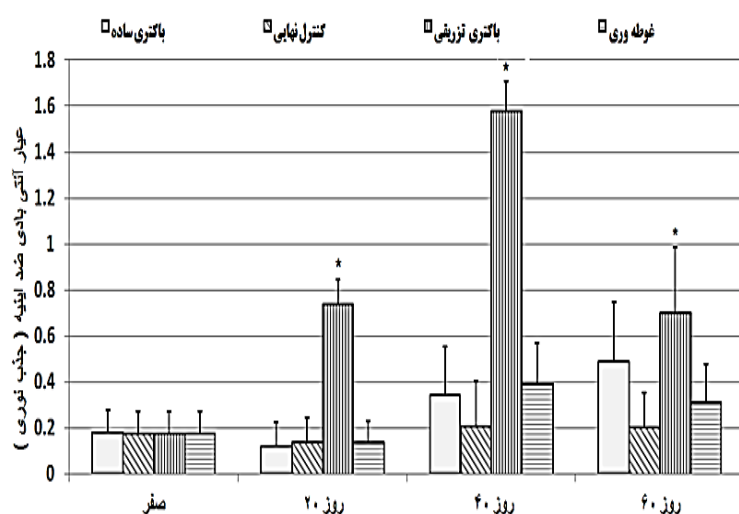
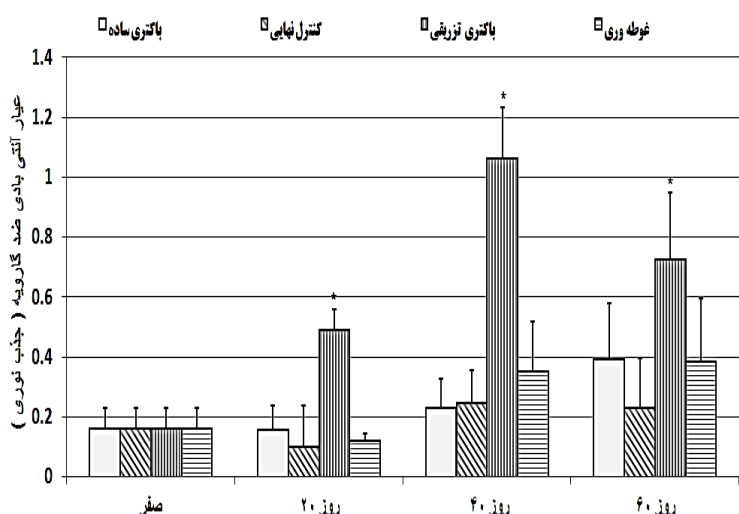


شکل ۳: مقایسه فعالیت احیای NBT خون بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری (علامت \* در بالای میله انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).



جدول ۱: مقایسه شاخص های خونی بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش های مختلف در ۴ مرحله نمونه گیری

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

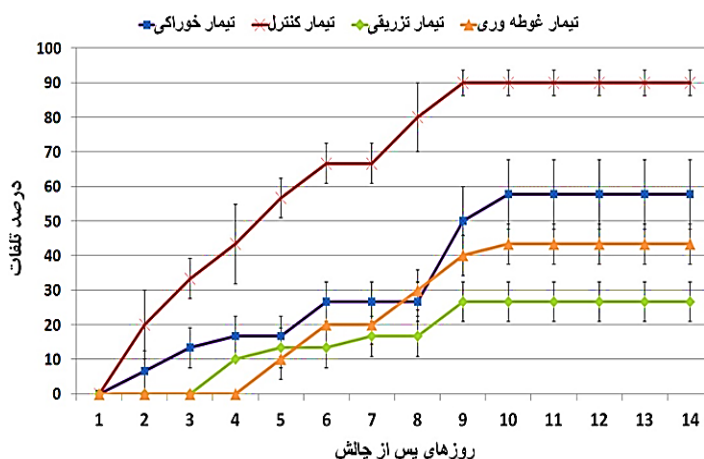


شکل ۶: مقایسه عیار آنتی بادی ضد لاکتوکوکوس گارویه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش های مختلف در ۴ مرحله نمونه گیری

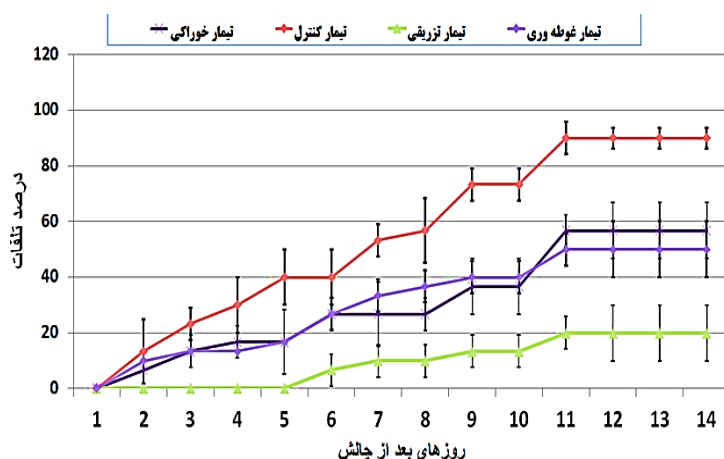
شکل ۵: مقایسه عیار آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش های مختلف در ۴ مرحله نمونه گیری

(علامت \* در بالای میله انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است).





شکل ۸: مقایسه درصد تلفات بعد از چالش با لاکتوکوکوس گارویه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری



شکل ۷: مقایسه درصد تلفات بعد از چالش با استرپتوکوکوس اینیه بین تیمارهای واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری

## بحث

درصد بود که نسبت به تیمار شاهد (تلفات ۹۰ درصد) کاهش معنی‌داری داشت. گزارشات مختلف در مورد مقایسه کارایی واکسن‌ها نشان داده است که کارایی واکسن غوطه‌وری به‌طور معنی‌داری از واکسن تزریقی است. مثلاً Bercovier و همکاران (۱۹۹۷) بازماندگی حدود ۴۰٪ را در ماهیان واکسینه به‌روش غوطه‌وری در برابر استرپتوکوکوزیس گزارش نمودند. هم‌چنین Soltani و همکاران (۲۰۰۷) در واکسن غوطه‌وری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلفات حدود ۷۰ درصد را در تیمار غوطه‌وری گزارش کردند. در مارماهی اروپایی ایمن شده با واکسن غوطه‌وری و بی‌ریو ولنیفیکوس ایمنی محدودی (حدود ۲۰ درصد) گزارش شد، ولی واکسن غوطه‌وری به‌همراه واکسن خوراکی یادآور، محافظت بالای ۷۰ درصد را باعث گردید (Esteve-Gassent و همکاران، ۲۰۰۴). در این تحقیق تلفات بعد از چالش در تیمار تجویز خوراکی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس به‌ترتیب برابر  $56/3 \pm 10$  و  $57/7 \pm 10$  بود در برابر استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه گردید. Soltani و همکاران (۲۰۰۷) کارایی ضعیف (تلفات حدود ۸۵ درصد) را در مورد واکسن خوراکی استرپتوکوکوزیس گزارش نمودند، هم‌چنین Romalde و همکاران (۲۰۰۴) کارایی حدود ۳۰ درصد را در واکسن خوراکی لاکتوکوکوزیس مشاهده نمودند. البته گزارشاتی از ایجاد پاسخ هومورال در سرم، پوست و مخاط روده گونه‌های مختلف ماهی به‌دنبال ایمنی‌سازی خوراکی گزارش شده است. دلیل اصلی کارایی پایین واکسن خوراکی در این بیماری تغییرات آنتی ژن واکسن در لوله گوارش است (Altun و همکاران، ۲۰۱۰). Eldar و همکاران (۱۹۹۹) و Altun و همکاران (۲۰۱۰) محافظت بسیار کم یا فقدان محافظت باکتری خوراکی در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای را گزارش نموده‌اند. یکی از دلایل فقدان محافظت یا محافظت پایین واکسن‌های خوراکی آبیان تغییرات

بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس ایجاد شده توسط استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور می‌باشد (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۵) که در نقاط مختلف جهان نیز به‌عنوان یک مشکل بهداشتی مهم مطرح است. در این تحقیق کارایی سه روش تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در پیشگیری از این بیماری در ماهی قزل‌آلای ارزیابی گردید. ارزیابی کارایی واکسن مهم‌ترین شاخص در ارزیابی واکسن می‌باشد (Brudeseth و همکاران، ۲۰۱۳). در تحقیق جاری در تیمار ایمن شده به‌روش تزریقی به‌ترتیب تلفات  $26/67$  و  $20 \pm 10$  درصد در برابر چالش با باکتری استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه را نشان داد که به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر تیمارها بود. در مقایسه با گزارشات مشابه کارایی قابل قبول می‌باشد، به‌طوری‌که در مطالعه Eldar و همکاران (۱۹۹۹) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلفات ۱۰ درصد و در تحقیق Romalde و همکاران (۲۰۰۴) در ماهی توربوت نیز تلفات به‌حدود ۱۷ درصد به‌دنبال واکسیناسیون تزریقی در برابر استرپتوکوکوزیس گزارش شده است. در مطالعه دیگری Altun و همکاران (۲۰۱۰) نیز تلفات ۱۰ درصد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دنبال واکسن لاکتوکوکوس گارویه به‌روش تزریقی را گزارش کردند. هم‌چنین Klesius و همکاران (۲۰۰۰) با تزریق داخل صفاقی و عضلانی باکتری کشته استرپتوکوکوس اینیه در ماهی تیلاپیا محافظت و ایمنی‌زایی حدود ۸۳ درصد گزارش کردند. در تحقیق جاری تلفات بعد از چالش در تیمار واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس به‌روش غوطه‌وری در برابر استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه به‌ترتیب  $50$  و  $43/3$





آنتی ژن واکسنی در شرایط اسیدی معده و تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک روده‌ای است. اسیدیته بالای معده (حدود  $\text{pH}=3$ ) اکثر آنتی ژن‌های واکسنی دفرمه می‌کند (Smith, 2002) و این تغییر شکل آنتی ژنی، با عث کاهش تحریک ایمنی واکسن می‌گردد (Rombout و همکاران، 2014). میزان تلفات بعد از چالش با استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه در تیمار غوطه‌وری به ترتیب برابر  $50 \pm 7/63$  و  $43/33 \pm 5/67$  بود که نتایج مشابه از تحقیق توسط Soltani و همکاران (2007) در ماهی قزل‌آلا و Zhu و همکاران (2017) در ماهی تیلاپیا گزارش گردید. عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه اندازه‌گیری شده به روش الیزا در تیمار تزریقی به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت ( $P < 0/05$ )، ولی در تیمارهای واکسینه شده به روش خوراکی و غوطه‌وری فقط افزایش نسبی مشاهده شد که در هیچ کدام از مراحل نمونه‌گیری از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). گزارشات در مورد ارتباط تیتراژ آنتی‌بادی با محافظت ایجاد شده به دنبال واکسیناسیون ماهی در برابر استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس متفاوت و گاه متناقض می‌باشد، به‌عنوان مثال Barnes و همکاران (2003) نشان دادند که هرچند تیتراژ آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه در ماهی قزل‌آلای ایمن شده با واکسن همولوگوس ایجاد گردید، ولی در مورد باکتری هتروولوگوس هیچ‌گونه عیار آنتی‌بادی مشاهده نگردید. Liaghat و همکاران (2011) نیز عیار آنتی‌بادی را در قزل‌آلای رنگین‌کمان که به‌صورت طبیعی با استرپتوکوکوس اینیه مبتلا شده بودند تا دو ماه بعد از ابتلا گزارش کردند. Bromage و همکاران (1999) علی‌رغم مشاهده کارایی مناسب واکسن استرپتوکوکوس اینیه در ماهی برماندی، هیچ‌گونه عیار آنتی‌بادی ضد این باکتری را در سرم ماهی واکسینه گزارش نکردند. Klesius و همکاران (2000) 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 الیزا عیاری گزارش نکردند. در تحقیقی دیگر Shoemaker و همکاران (2011) افزایش تیتراژ آنتی‌بادی ضد فلاوباکتریوم کلومناره در سرم و موکوس گربه ماهی را گزارش کردند که با میزان محافظت ایجاد شده هم‌بستگی داشت. در همین راستا Costa و همکاران (2012) نشان دادند که واکسیناسیون ماهی تیلاپیا با باکترین استرپتوکوکوس اینیه موجب افزایش معنی‌دار تیتراژ آنتی‌بادی تا 12 هفته گردید که بعد از آن تیتراژ آنتی‌بادی با شیب آرامی کاهش یافت و بعد از سه ماه تیتراژی مشاهده نگردید. Akhlaghi و همکاران (1996) گزارش کردند که تیتراژ آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه در ماهیان ایمن شده در برابر این باکتری به‌روش الیزا مشاهده نشد. همچنین در ایمن‌سازی گربه‌ماهی کانالی در برابر باکتری ادواردزیلا

ایکتالوری (*Edwardsiella ictaluri*) به‌روش تزریقی نیز تیتراژ آنتی‌بادی قابل اندازه‌گیری ایجاد نگردید و آن‌ها مکانیسم‌های ایمنی با واسطه سلولی را در محافظت ایجاد شده موثرتر از ایمنی هومورال دانستند (Greenway و همکاران، 2017). به‌نظر می‌رسد در ماهیان مختلف مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد پاسخ ایمنی در برابر استرپتوکوکوزیس نقش دارند و در برخی گونه‌ها ایمنی اختصاصی با واسطه آنتی‌بادی نقش کم‌تری در ایمن‌سازی ماهی دارد. فقدان عیار آنتی‌بادی ضد باکتری‌های واکسنی در تیمار غوطه‌وری و خوراکی را می‌توان به نوع ایمونوگلوبولین دخیل در پاسخ ایمنی مخاطی در این اندام‌ها نسبت داد. در ایمن‌سازی مخاطی (روده و آبشش) ایمونوگلوبولین T (IgT) نقش مهم‌تری نسبت به ایمونوگلوبولین M دارند و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین M ماهی قادر به تشخیص ایمونوگلوبولین T نبوده (Gudging و همکاران، 2014) و عدم مشاهده تیتراژ آنتی‌بادی مناسب علی‌رغم مشاهده محافظت نسبی احتمالاً به این دلیل می‌باشد. در این تحقیق هیچ‌کدام از شاخص‌های خونی شامل: میزان هموگلوبین، میزان هماتوکریت، تعداد گلبول‌های سفید خونی و تعداد گلبول‌های قرمز تحت تاثیر روش ایمن‌سازی قرار نگرفت ( $P > 0/05$ ) و تفاوت معنی‌داری بین شاخص‌های خونی اندازه‌گیری شده بین تیمارها در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده نشد. در تاثیر ایمن‌سازی ماهی بر شاخص‌های خونی ماهی گزارشات بحث برانگیز است، به‌عنوان مثال Soltani و همکاران (2007) عدم تاثیر واکسیناسیون به‌روش غوطه‌وری و خوراکی در برابر استرپتوکوکوزیس را بر شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلا گزارش کردند. هم‌چنین پورمظفر و همکاران (1394) نشان دادند که نه تنها واکسیناسیون با واکسن استرپتوکوکوزیس، بلکه تجویز توام واکسن و محرک ایمنی ماکروگارد تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های خونی (هماتوکریت، هموگلوبین، MCH، MCV، MCHC) ماهی قزل‌نا داشت ( $p \geq 0/05$ ). Faghani و همکاران (2008) واکسن ضد استرپتوکوکوزیس به‌همراه آلژینیک اسید را بر روی فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مورد آزمایش و گروه شاهد نشان نداد. در همین راستا فغانی و همکاران (1388) در مطالعه‌ای دیگر که جهت ارزیابی اثر ارگوسان و واکسن ضد استرپتوکوکوزیس بر پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام دادند، گزارش کردند که نه تنها واکسیناسیون ضد استرپتوکوکوزیس بلکه تجویز ارگوسان تأثیری بر شاخص‌های خونی ماهی نداشت. برخلاف موارد فوق، Nulty و همکاران (2003) در ماهی تیلاپیا ایمن شده در برابر استرپتوکوکوزیس به‌روش تزریقی را باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی و تغییر نسبت آن‌ها دانستند. آن‌ها افزایش تعداد لکوسیت‌های ماهی را دلیلی بر بهبود وضعیت ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی



اختصاصی سرم مشاهده نگردید، سایر مکانیسم‌های ایمنی غیر اختصاصی را می‌توان در این محافظت موثر دانست. در همین راستا علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) ارتباطی بین میزان محافظت و شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی سرمی (کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی سرم و لایوزیم) ماهیان ایمن شده به روش خوراکی با واکنش آنتروموناس هیدروفیلا با ادجوان نانوکیتوزان مشاهده نکردند. لذا احتمالاً فاکتورهایی به غیر از کمپلمان، لایوزیم و ایمونوگلوبولین سرم و مخاط افزایش محافظت در برابر باکتری را باعث شده‌اند. در برخی مطالعات نیز عدم تغییر شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان ایمنی شده با واکنش گزارش گردیده است (Bercovier و همکاران، ۱۹۹۷؛ Soltani و همکاران، ۲۰۰۷؛ Firdaus و همکاران، ۲۰۱۳؛ Eldar و Ghittino، ۱۹۹۹). به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که واکنش دوگانه استرپتوکوکوزیس /لاکتوکوزیس کارایی مناسبی در روش تجویز تزریقی داشته ولی در روش خوراکی و غوطه‌وری محافظت نسبی کم‌تر از ۵۰ درصد ایجاد نماید، از طرفی تجویز خوراکی و غوطه‌وری این واکنش تغییری در شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلا ایجاد نکرده ولی تجویز تزریقی این واکنش بهبود اکثر شاخص‌های ایمنی ماهی را باعث می‌شود.

## تقدیر و تشکر

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

## منابع

۱. سلطانی، م.؛ رئیسی، م.؛ گودرزی، م.؛ ممتاز، ح. و مومنی، م.، ۱۳۹۱. تعیین فراوانی لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان چهارمحال و بختیاری و تعیین توالی rRNA ۱۶S جدایه‌های حاصله. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۸، شماره ۱، صفحات ۶۱ تا ۶۷.
۲. علیشاهی، م.؛ سعیدی‌منش، م.؛ مصباح، م. و محمدیان، ت.، ۱۳۹۵. بررسی اثر نانوکیتوزان برای ایمنی‌زایی واکنش خوراکی آنتروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۲، شماره ۱، صفحات ۵۳ تا ۶۴.
۳. کرمی، ا.؛ علیشاهی، م.؛ قربانپور، م.؛ تابنده، م. ر. و محمدیان، ت.، ۱۳۹۶. ارزیابی ایمنی‌زایی واکنش دوگانه استرپتوکوکوزیس /لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۹، شماره ۴، صفحات ۱۹۹ تا ۲۰۷.
۴. Akhlaghi, M.; Munday, B.L. and Whittington, R.J., 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). J Fish Dis. Vol. 19, No. 3, pp: 251-258.
۵. Alishahi, M. and Buchmann, K., 2006. Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. Dis Aquat Organ. Vol. 72: pp: 269-273.

ماهی ایمن شده دانستند. هم‌چنین علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) تغییر تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی در ماهیان ایمن شده با باکترین خوراکی آنتروموناس هیدروفیلا به همراه ادجوان نانوکیتوزان را گزارش نمودند. هم‌چنین خاج و همکاران (۱۳۹۶) نیز افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و برخی شاخص‌های مربوط به گلبول‌های قرمز خون را در ماهیان واکنش‌دهنده با واکنش دوگانه استرپتوکوکوزیس /لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلا گزارش نمودند. احتمالاً در تحقیق جاری یا شاخص‌های سلامت ماهی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر ایمن‌سازی قرار نگرفته است و یا این بهبود به‌میزانی نبوده که بر شاخص‌های خونی ماهی تاثیر معنی‌دار بگذارد. در بین شاخص‌های ایمنی مورد بررسی فعالیت لایوزیم، قدرت باکتری‌کشی و فعالیت کمپلمان و میزان پروتئین و گلوبولین سرم و فعالیت NBT فقط در تیمار واکنش‌دهنده با واکنش تزریقی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد و در دو تیمار خوراکی و غوطه‌وری افزایش این شاخص‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). فعالیت لایوزیم و پروتئین سرم به‌عنوان یکی از شاخصه‌های ایمنی غیر اختصاصی در ماهی می‌باشد (Yang و همکاران، ۲۰۱۶)، احتمالاً بالا رفتن سطح لایوزیم در مطالعه حاضر در تیمار تزریقی را باید به دلیل وجود مقدار مؤثر آنتی‌ژن در واکنش دانست. افزایش فعالیت لایوزیم و کمپلمان در آزاد ماهیان بعد از واکنش‌دهنده است (Vinay و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Zhu و همکاران (۲۰۱۷) روی ماهی تیلاپیا صورت گرفت، نشان داد که فعالیت لایوزیم سرم در ماهیان واکنش‌دهنده نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. Craig و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر روی پاسخ‌های ایمنی ماهی تیلاپیا بعد از تجویز واکنش استرپتوکوکوزیس انجام دادند، افزایش معنی‌دار میزان پروتئین و فعالیت لایوزیم سرم را در گروه واکنش‌دهنده گزارش نمودند. Alishahi و Buchmann (۲۰۰۶) نشان دادند که تزریق واکنش اکتیو فیتریبوس مولتی‌فیلیس فعالیت لایوزیم سرم و پروتئین تام سرم قزل‌آلای رنگین‌کمان را افزایش می‌دهد. Balfry و همکاران (۲۰۰۱) افزایش فعالیت کمپلمان، قدرت باکتری‌کشی و IgM سرم در آزاد ماهی نقره‌ای واکنش‌دهنده را گزارش نمودند. Huang و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که واکنش‌دهنده ماهی با واکنش کشته استرپتوکوکوس اینیبه در ماهی هامور معمولی افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده و افزایش بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها را باعث می‌شود. Craig و همکاران (۲۰۱۷) افزایش فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت‌های خون ماهی تیلاپیا پس از واکنش‌دهنده در برابر استرپتوکوکوس آگلانتیه را گزارش نمودند. از آن‌جاکه در سایر تیمارهای خوراکی و غوطه‌وری این تحقیق، علی‌رغم مشاهده محافظت در برابر چالش باکتریایی، افزایش معنی‌دار در شاخص‌های ایمنی غیر



- routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. Vol. 188, pp: 237-246.
۲۷. Liaghat, M.; Akhlaghi, M.; Hosseini, A.; Nematollahi, A. and Hosseini, S.M., 2011. Humoral and non-specific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally exposed to and immunized with *Streptococcus iniae*. *IJVS*. Vol. 5, pp: 218-224
۲۸. Nayak, S.K.; Swain, P.; Nanda, P.K.; Dash, S. and Shukla, S., 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 24, pp: 394-399.
۲۹. Nulty, S.T.; Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A., 2003. Hematological Changes in Nile tilapia infected with *Streptococcus iniae* by rare inoculation. *J world aquacult soc*. Vol. 34, No. 3, pp: 418-422.
۳۰. Pridgeon, J.W. and Klesius, P.H., 2011. Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccine*. Vol. 29, No. 35, pp: 5986-5993.
۳۱. Romalde, J.L.; Luzardo-Alvarez, A.; Ravelo, C.; Toranzo, A.E. and Blanco-Méndez, J., 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*. Vol. 236, No. 1, pp: 119-124.
۳۲. Rombout, J.H.W.; Yang, G. and Kiron, V., 2014. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 40, No. 2, pp: 634-642.
۳۳. Sahoo, P.K.; Kumari, J. and Mishra, B.K., 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *J Appl Ichthyol*. Vol. 21, pp: 151-155.
۳۴. Sakai, M.; Otubo, T.; Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1993. Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of bovine lactoferrin. *J Fish Dis*. Vol. 16, pp: 239-245.
۳۵. Shoemaker, C.A.; Klesius, P.H.; Drennan, J.D. and Evans, J.J., 2011. Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 30, pp: 304-308.
۳۶. Smith, P.D., 2002. Oral delivery technologies to develop and implement effective life-long protection strategies. Workshop on Fish Vaccination. Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen, The Netherlands. pp: 78-80.
۳۷. Soltani, M.; Mousavi, H.A. and Mirzargar, S., 2009. Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran<sup>۱</sup>, 1th international congress on aquatic animal, Islamic Republic of Iran, Tehran, pp: 27-28.
۳۸. Soltani, M.; Jamshidi, S.H. and Sharifpour, I., 2005. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. Vol. 25, pp: 95-104.
۳۹. 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. *IFSRI*. Vol. 7, pp: 129-140.
۴۰. Soltani, M.; Pirali Kheirabadi, E.; Taheri Mirghaed, A.; Zargar, A.; Mohamadian, S.; Roohollahi, Sh. and Zakian, M., 2015. Study on Streptococcosis and Lactococcosis Outbreaks in Rainbow Trout Farms in Fars and Lorestan Provinces. *Vet Microbiol*. Vol. 30, pp: 49-54.
۴۱. Sun, Y.; Liu, C.S. and Sun, L., 2011. A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunol*. Vol. 31, pp: 595-599.
۴۲. Thrall, M.A., 2004. Veterinary hematology & clinical chemistry. Lippincott Williams & Wilkins. New York. 402 p.
۴۳. Vinay, T.N.; Bhat, S.; Gon, T.; Paria, A. and Jung, M.H., 2017. Recent Advances in Application of Nanoparticles in Fish Vaccine Delivery. *Rev Fish Sci Aquac*. Vol. 1, pp: 29-41.
۴۴. Yang, Q.; Pan, Y.L.; Wang, K.Y.; Wang, Y.; Yang, H.; Wang, E.L.; Liu, T.; Geng, Y.; Chen, D.F. and Huang, X.L., 2016. OmpN, outer membrane proteins of *Edwardsiella ictaluri* are potential vaccine candidates for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mol Immunol*. Vol. 78, pp: 1-8.
۴۵. Zhu, L.; Yang, Q.; Huang, H. and Wang, K., 2017. Effectivity of oral recombinant DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia. *Dev Comp Immunol*. Vol. 77, pp: 77-87.
۶. Alishahi, M.; Ranjbar, M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R. and Mesbah, M., 2010. Effects of dietary on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Int J Vet Res*. Vol. 4, pp: 189-190.
۷. Altun, S.; Kubilay, A.; Ekici, S.; Didinen, B.I. and Diler, O., 2010. Oral vaccination against lactococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. Vol. 16, pp: 211-214.
۸. Barnes, A.C.; Young, F.M.; Horne, M.T. and Ellis, A.E., 2003. *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. *Dis Aquat Organ*. Vol. 53, No. 3, pp: 241-247.
۹. Bercovier, H.; Ghittino, C. and Eldar, A., 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Dev Biol Stand*. Vol. 90, pp: 153-160.
۱۰. Bromage, E.S.; Thomas, A. and Owens, L., 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi Lates calcarifer. *Dis Aquat Org*. Vol. 36, pp: 177-181.
۱۱. Brudeseth, B.E.; Wiulsrød, R.; Fredriksen, B.N.; Lindmo, K.; Løking, K.E.; Bordevik, M.; Steine, N.; Klevan, A. and Gravningen, K., 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol*. pp: 1-11.
۱۲. Costa, A.A.; Leef, M.J.; Bridle, A.R.; Carson, J. and Nowak, B.F., 2011. Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. Vol. 315, pp: 201-206.
۱۳. Craig, A.; Shoemaker, C.; Benjamin, R.; LaFrentz, R. and Julio, C., 2017. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated. *Aquaculture*. Vol. 468, No. 1, pp: 193-198
۱۴. Eldar, A. and Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis Aquat Organ*. Vol. 36, No. 3, pp: 227-231.
۱۵. Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 9, pp: 291-308.
۱۶. Esteve-Gassent, M.D.; Fouz, B. and Amaro, C., 2004b. Efficacy of a bivalent vaccine against diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 16, pp: 93-105.
۱۷. Faghani, T.; Azari Takami, Gh.; Kousha, A. and Faghani, S., 2008. Surveying on Alginate Acid and Anti-Streptococcus Vaccine Effects on the Growth Performance, Survival Rate, Hematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Zool*. Vol. 3 No. 2, pp: 54-58
۱۸. FAO Yearbook of fisheries and aquaculture statistics 2015. 2017. FAO publication, Rom Italy. [www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2015\\_CD\\_Master/index.htm](http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2015_CD_Master/index.htm).
۱۹. Feldman, B.; Zinkl, J. and Jain, N., 2000. Schalm, s Veterinary Hematology. 5th Ed., Lippincott, Williams and Wilkins. A Wolterscompany. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo.
۲۰. Firdaus-Nawi, M.; Sabri, M.Y.; Hanan, Y.; Siti-Zahrah, A. and Zamri-Saad, M., 2017. Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* sp. in Malaysia. *Aquacul Res*. Vol. 45, pp: 87-96.
۲۱. Greenway, T.; Byars E. and Elliot, R.B., 2017. Validation of Fermentation and Processing Procedures for the Commercial-Scale Production of a Live, Attenuated *Edwardsiella ictaluri* Vaccine for Use in Channel Catfish. *J Aquat Anim Health*. Vol. 29, No. 2, pp: 83-88
۲۲. Gudding, R.; Lillehaug, A. and Evensen, Y., 2014. Fish Vaccination. Wiley and Sons, Ltd. London, UK.
۲۳. Hatten, F.; Fredriksen, I.; Hordvik, I. and Endresen, C., 2001. Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 11, pp: 257-268.
۲۴. Hoshina, T.; Sano, T. and Morimoto, Y., 1958. A Streptococcus pathogenic to fish. *J Tokyo Univ Fish*. Vol. 44, No. 5.
۲۵. Huang, H.Y.; Chena, Y.C.; Wang, P.C.; Tsai, M.A.; Yeh, S.C.; Liang, H.J. and Chena, S.C., 2014. Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper *Epinephelus coioides* by intraperitoneal immunization. *Vaccine*. pp: 1-7
۲۶. Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A. and Evans, J.J., 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular