ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **اسماعیل کرمی**: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
- **مجتبی علیشاهی***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
- **محمدرضا تابنده**: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
- **مسعود قربانپور**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
- **تکاور محمدیان**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٥ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٥

چکیده

در این پژوهش ایمنی‌زایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/لاکتوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ارزیابی شد. تعداد ٢٤٠ قطعه ماهی قزل‌آلا با متوسط وزن ١±٣٠ گرم به دو گروه، هر گروه در سه تکرار تقسیم شدند. ماهی‌ها در تیمار واکسینه در ابتدا به‌روش داخل صفاقی با واکسن غیرفعال شده با فرمالین ایمن شدند و ٣٠ روز بعد واکسن یادآور به‌روش غوطه‌وری انجام شد. گروه شاهد کاملاً مشابه تیمار شاهد با سرم فیزیولوژی تیمار شد. در روزهای ٠، ١٥، ٣٠، ٤٥ و ٦٠ روز بعد از تزریق اولیه نمونه‌های خون و کلیه قدامی از ماهی‌ها تهیه و شاخص‌های خون‌شناسی (هماتوکریت، هموگلوبین و شمارش تام گلبول‌های سفید و قرمز خون) و برخی شاخص‌های ایمنی شامل: فعالیت لایزوزیم سرم، فعالیت کمپلمان و قدرت باکتری‌کشی سرم و قدرت بیگانه‌خواری لکوسیت‌های کلیه قدامی بررسی گردید. نتایج نشان داد که در بین شاخص‌های خونی هرچند تعداد گلبول‌های سفید خونی در تیمار ایمن شده افزایش معنی‌داری داشت ($p<0/05$) ولی سایر شاخص‌های خونی تحت تاثیر واکسیناسیون قرار نگرفت ($p\geq0/05$). در بین شاخص‌های ایمنی، افزایش معنی‌دار در فعالیت لایزوزیم و کمپلمان سرم، قدرت باکتری‌کشی سرم و قدرت بیگانه‌خواری لکوسیت‌های کلیه قدامی نسبت به گروه شاهد در اکثر مراحل نمونه‌گیری مشاهده گردید ($p<0/05$). لذا می‌توان نتیجه گرفت واکسیناسیون ماهی قزل‌آلا با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش تزریقی و غوطه‌وری ایمنی‌زایی مناسبی داشته و برای واکسیناسیون ماهی قزل‌آلا مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: واکسن دوگانه، استرپتوکوکوزیس، ایمنی‌زایی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

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

مقدمه

بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ایجاد شده توسط *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور می‌باشد (soltani و همکاران، ۲۰۱۶). اولین مورد استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران از استان مازندران در سال ۱۳۷۹ گزارش شده است (قیاسی و همکاران، ۱۳۷۹). از آن به بعد شیوع این بیماری در مزارع پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان روبه افزایش بوده و موجب زیان اقتصادی ۸ میلیون دلار در سال گردیده است. نخستین بار در ایران عامل *لاکتوکوکوس گارویه* از مزرعه پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان در استان فارس جداسازی شده است (Soltani و همکاران، ۲۰۰۵). از آن‌جایی‌که عوامل این بیماری نیز قابل انتقال به انسان می‌باشد، این بیماری از نظر بهداشت انسانی نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد (MacMillan، ۲۰۰۱). با توجه به تلفات بالا و خسارات اقتصادی بالای این بیماری، آنتی‌بیوتیک تراپی یکی از روش‌های مقابله با بیماری است (Vendrell و همکاران، ۲۰۰۶) ولی استفاده از آنتی بیوتیک در شرایط پرورشی علاوه بر هزینه بالا باعث ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی، تجمع آنتی بیوتیک در بدن ماهیان، انتقال مقاومت دارویی به انسان و مشکلات زیست محیطی می‌گردد (MacMillan، ۲۰۰۱). از موثرترین روش‌های جایگزین مقابله با این بیماری در ماهی، استفاده از واکسن‌ها می‌باشد (Pridgeon و Klesius، ۲۰۱۱). بیش‌ترین مطالعات‌روی واکسن‌استرپتوکوکوزیس بر روی سلول کشته شده باکتری با فرمالین با تجویز تزریقی و به‌صورت مونووالانت (تک واحدی) بوده است (Bercovier و همکاران، ۱۹۹۷؛ Romalde و همکاران، ۲۰۰۴). ولی استفاده از واکسن‌های دو و چند گانه می‌تواند علاوه بر کاهش هزینه، استرس ماهی را نیز کاهش دهند و از آن‌جا که در کشور هر دو عامل *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* باعث ایجاد عفونت و تلفات در ماهی قزل‌آلا می‌گردند (Soltani و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از واکسن دوگانه توجیه کافی دارد. تحقیق روی واکسن استرپتوکوکوزیس در کشور سابقه بیش از ده ساله دارد و در مطالعه سلطانی و همکاران (۱۳۸۶) انواع روش‌های تجویز واکسن فرمالینه بررسی و موثرترین روش، روش تزریقی و به‌دنبال آن روش غوطه‌وری گزارش گردید، براساس یافته‌های این تحقیق و تحقیقات تکمیلی در فاز تجاری، واکسنی تجاری براساس سویه‌های بومی بیمای تولید گردید که سال‌هاست در سطح مزارع پرورش قزل‌آلای کشور استفاده می‌گردد. از آن‌جاکه این واکسن مجوز تولید به‌صورت دوگانه و تجویز به‌صورت تزریقی و غوطه‌وری را داراست و تا به حال تحقیق مستقلی بر ایمنی‌زایی این واکسن صورت نگرفته است، در این تحقیق اثر تجویز این واکسن، بر برخی شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی گردید. از آن‌جاکه شاخص فاگوسایتوزیس لکوسیت‌های کلیه قدامی یکی از بهترین شاخص‌های تشخیص وضعیت ایمنی ماهی بعد از ایمنی‌سازی یا تحریک ایمنی است (Li و همکاران، ۲۰۱۶). این شاخص تا به حال در کشور استفاده نشده است، در این تحقیق روی این شاخص تاکید بیش‌تری نسبت به سایر شاخص‌های خونی و ایمنی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و واکسن: در زمستان ۹۴ تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی به وزن متوسط ۱/۷±۳۰ گرم از یکی از مزارع پرورشی استان لرستان که شرایط بهداشتی مناسبی داشته و بدون سابقه بیماری استرپتوکوکوزیس در سه سال اخیر بود، خریداری و تحت شرایط مناسب به سالن آکواریوم بخش بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شد. برای اطمینان از سلامت ماهی‌ها علاوه بر بررسی‌های انگلی و قارچی، از کلیه قدامی و مغز ۵ عدد ماهی نمونه باکتریایی در محیط TSA و ژلوز خوندار انجام شد. با توجه به عدم رشد باکتریایی از عدم حضور عفونت پنهان اطمینان حاصل شد. قبل از شروع تحقیق ماهیان به‌مدت دو هفته جهت سازگاری در مخازن ۳۰۰ لیتری نگه‌داری شدند. از آب شهری بعد از کلرزدایی استفاده شد. روزانه ۵۰٪ تعویض آب صورت می‌گرفت. هوادهی دائمی در طی دوره برقرار بوده و شرایط آب دوره تحقیق به‌صورت زیر بود:

دما ۱/۳±۱۴درجه سانتی‌گراد، سختی ۱۰۵۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر مربع، pH=۸/۳±۰/۶ ، میزان اکسیژن محلول ۱/۵±۷/۷ میلی گرم در لیتر، میزان NH_3 و نیتریت کم‌تر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و میزان نیترات کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر.

ماهیان به‌مدت ۶۰ روز با خوراک تجاری و روزانه به میزان ۲٪ وزن بدن غذادهی شدند. در این تحقیق از واکسن استرپتوکوکوزیس (ACECR, Iran) تولیدی جهاد دانشگاهی (Academic Centre for Education, Culture and Research (Jahade deneshgahi)) (دارای مجوز سازمان دامپزشکی) استفاده شد. این واکسن محتوی دو سویه بیماری‌زای مهم مسبب استرپتوکوکوزیس ماهی بوده که شامل باکترین غیرفعال (کشته) باکتری‌های بیماری‌زای *Streptococcus iniae* و *Loctoccus garviea* با دوز۱×۱۰^{۹} سلول در میلی‌لیتر و به‌همراه تولیدات خارج سلولی باکتری جرم‌در میلی‌لیتر بدون ادجوانت می‌باشد.

واکسیناسیون: برای انجام این مطالعه تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی به ۲ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار در مخازن ۲۵۰ لیتری تقسیم شدند. واکسیناسیون طبق روش زیر انجام گرفت. گروه واکسینه

شده طبق پروتکل واکسن روز اول به‌صورت تزریقی و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت 10^9باکتری فرمالینه، و واکسن یاداور در روز سی‌ام تحقیق به‌روش غوطه‌وری و با غلظت 10^8 باکتری در میلی‌لیتر به‌مدت ۱۲۰ ثانیه انجام شد. به گروه شاهد در روز صفر ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به جای واکسن تزریق گردید و در روز سی‌ام غوطه‌وری بدون واکسن صورت گرفت. ۲ روز قبل از واکسیناسیون غذادهی قطع گردید. قبل از شروع واکسیناسیون ماهیان با دوز ۰/۴ میلی‌لیتر از فنوکسی‌اتانول در یک لیتر آب بی‌هوش گردیدند (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰) در طول دوره پرورش ماهی‌های با خوراک تجاری شرکت فرادانه به‌صورت اکسترودر (شناور) مخصوص ماهیان ۲۵ تا ۵۰ گرم با کد FFT2 و قطر ۴ میلی‌متر، میزان پروتئین خام ۴۲٪، چربی ۱۳٪، فیبر ۳٪ و رطوبت ۹٪ به‌میزان ۲٪ زی‌توده ماهی تغذیه گردیدند.

نمونه‌گیری: در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ از هر تیمار ۹ عدد (هر تکرار سه عدد) نمونه‌برداری گردید. به این منظور ماهی‌ها روز قبل از نمونه‌گیری قطع غذا شده و با ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنوکسی اتانول بی‌هوش گردیدند، سپس با سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری و سوزن ۲۲ از ورید ساقه دمی ماهی‌ها خونگیری گردید. برای انجام آزمایشات هماتولوژی از خون هپارینه استفاده شد بلافاصله بعد از تهیه نمونه خون هپارینه کلیه آزمایشات هماتولوژی در همان روز انجام شد. برای انجام آزمایشات ایمنی نمونه‌ها غیرهپارینه به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه‌داری گردیدند و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها جداسازی و تا زمان استفاده در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند. بعد از خونگیری از ماهی‌ها نمونه کلیه قدامی، برای انجام آزمایش فاگوسایتوزیس لکوسیت‌های کلیه قدامی در شرایط استریل و زیر هود باکتریولوژیک برداشت شده و آزمایشات فاگوسایتوزیس هم در همان روز انجام شد. کلیه آزمایشات خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت.

آزمایشات خون‌شناسی: هماتوکریت، یا حجم فشرده گلبولی یا PCV به همان روش معمول و متداول برای پستانداران و پرندگان یعنی روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفوژ میکروهماتوکریت صورت گرفت (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰). هموگلوبین (Hb)، به‌روش استاندارد سیانومت‌هموگلوبین انجام گرفت. ۰/۰۱ میلی‌لیتر خون با ۲/۵ سی‌سی محلول تجارتی درابکین (معرف سیانومت‌هموگلوبین) مخلوط و پس از گذشت ۱۰ دقیقه، نمونه مخلوط‌شده به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور رسوب ذرات هسته با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین برحسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه گردید (Thrall و همکاران، ۲۰۰۴). شمارش کلی گلبول‌های قرمز (TRBC) شمارش کلی گلبول‌های قرمز ماهی به‌روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت. نمونه‌های خونی به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده نات- هریک (Natt- Herrik) رقیق گردید. و شمارش با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ میکروسکوپ فازکنتراست انجام شد. شمارش کلی گلبول‌های سفید (TWBC) به‌روش مستقیم (هماسیتومتر) و همانند شمارش کلی گلبول‌های سفید پرندگان با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده نات- هریک صورت گرفت. (Thrall و همکاران، ۲۰۰۴).

آزمایشات ایمنی‌شناسی: به‌منظور ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن برخی شاخص‌های تحریک ایمنی غیراختصاصی ارزیابی گردید.

سنجش فعالیت لیزوزیم: فعالیت لایزوزیم سرم به‌روش توربیدومتری با استفاده از روش توصیه شده توسط Ellis و همکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰). در این روش ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سرم نمونه با ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *میکروکوکوس لیزودایکتیکوس* (سیگما) در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۲) در گودهای پلیت الایزا مخلوط شد و جذب نوری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [دستگاه الایزا ریدر (Dynatech MR 5000 ساخت کشور هلند]. فعالیت لایزوزیم باعث تخریب باکتری و کاهش جذب نوری می‌گردد. یک واحد فعالیت لایزوزیم با میزان کاهش جذب نوری به‌میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه در هر میلی‌لیتر سرم مشخص گردید.

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان سرم: فعالیت کمپلمان با استفاده از قدرت لیز کنندگی سیستم کمپلمان بر روی سلول‌های گلبول قرمز خرگوش انجام شد (Barta، ۱۹۹۳). سلول‌های گلبول قرمز خرگوش در اگاروز ۱،۵٪ (pH=۷/۲) شامل ۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ یک مولار و ۱۵۰ میکرولیتر $CaCl_2$ یک مولار در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمک فسفات بافر تهیه گردید. سلول‌های گلبول قرمز خرگوش با بافر فسفات سالین شستشو گردید و سپس در دور ۷۵۰ g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس سلول‌ها در غلظت 1×10^8 در میلی‌لیتر تنظیم گردید. ۱۵ میلی‌لیتر آگاروز حاوی سلول‌های گلبول قرمز خرگوش به هر پلیت ریخته شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس گودهای سه میلی‌لیتری در آن ایجاد گردید. به هر گوده ۲۰ میکرولیتر از سرم مورد مطالعه اضافه شد و در درجه حرارت اتاق برای ۴۸ ساعت انکوبه گردید. در نهایت قطر هاله لیز اطراف گوده اندازه‌گیری و به‌عنوان میزان فعالیت کمپلمان ثبت گردید (Barta، ۱۹۹۳).

ارزیابی قدرت فاگوسیتوزیس ماکروفاژهای کلیه قدامی: برای ارزیابی فعالیت فاگوسایتوزیس ماکروفاژهای کلیه قدامی در همان روز نمونه‌گیری ابتدا اقدام به جداسازی و خالص‌سازی ماکروفاژهای کلیه قدامی گردید. سپس میزان زنده‌مانی ماکروفاژها ارزیابی شده و با تنظیم تعداد ماکروفاژها در میلی‌لیتر از باکتری برای ارزیابی فاگوسایتوزیس استفاده شد. جداسازی لکوسیت‌های کلیه قدامی به‌روش توصیه شده توسط Brown و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بعد از کالبدگشایی ماهیان خونگیری شده، کلیه قدامی ماهی در شرایط استریل برداشت شد. کلیه در محیط کشت سلولی RPMI اضافه شده و با اسکالپل قطعه قطعه گردید، سپس برای جداسازی لکوسیت‌های چند هسته‌ای کلیه‌قدامی نمونه از توری پلاستیکی مخصوص با مش ۷۰ میکرومتر با استفاده از سانتریفوژ عبور داده شد. سلول‌های جداسازی شده سه بار با محیط RPMI شستشو داده شد. بعد از شستشوی مرحله آخر لایه گلبول‌های قرمز از کف میکروتیوپ خارج شده و باقی‌مانده سلول‌های زنده ماکروفاژهای کلیه قدامی بودند.

تعیین‌میزان زنده‌مانی ماکروفاژها: بعد از استخراج ماکروفاژها برای اطمینان از تراکم و زنده بودن آن‌ها از رنگ‌آمیزی حیاتی Trypan blue استفاده شد. تریپان بلو ۰/۲٪ با ماکروفاژهای جداسازی و خالص سازی شده مخلوط شده و ماکروفاژهای زنده با استفاده از لام نئوبار و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ میکروسکوپ فازکنتراست شمارش شده و نسبت ماکروفاژهای زنده و مرده و درصد بقای ماکروفاژها مشخص گردید. ارزیابی فاگوسایتوزیس ماکروفاژها با روش Secombes (۱۹۹۰) با اعمال تغییراتی به‌روش زیر انجام گردید:

۱- کشت ۶ ساعته از باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در آبگوشت مغز و قلب (BHI) تهیه شد. بعد از سانتریفیوژ محیط کشت و جداسازی باکتری، باکتری با PBS استریل شستشو شد و در غلظت CFU/ml ۵×۱۰^{۷} تنظیم گردید.

۲- سرم چندین ماهی قزل‌آلای رنگین مخلوط و در ۵۸ درجه سانتی گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد تا کمپلمان سرم غیرفعال شود.

۳- ماکروفاژهای کلیه قدامی طبق روش گفته شده در بالا استخراج و شمارش گردید و در غلظت تعدد باکتری در میلی‌لیتر یا CFU/ml ۵×۱۰^{۶} تنظیم شد.

۴- مخلوطی از ۰/۴ میلی‌لیتر از سرم غیرفعال رقیق شده با محیط RPMI (نسبت ۱ به ۵) و ۰/۲ میلی‌لیتر از باکتری آماده‌سازی شده و ۰/۱ میلی‌لیتر ماکروفاژ مخلوط گردید و اضافه کردن محیط RPMI به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد.

۵- بعداز ۶۰دقیقه‌انکوباسیون‌در دمای آزمایشگاه میزان فاگوسایتوزیس با شمارش تعداد باکتری‌های زنده نسبت به نمونه‌های فاقد ماکروفاژ گزارش گردید. نهایتاً نسبت فاگوسایتوزیس باکتری‌ها با مقایسه تعداد باکتری زنده شمارش شده در تیمارهای با گروه شاهد بدون سلول بیگانه‌خوار مشخص گردید.

تجزیه‌و تحلیل آماری داده‌ها: برای آنالیز داده‌های به‌دست آمده از نرم‌افزار SPPS نسخه ۱۹ استفاده گردید. ابتدا از آزمون Leven statistic test برای نرمالیتی و همگن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده شد و از آزمون تی‌تست مستقل برای بررسی تفاوت میانگین تیمارهای واکسینه و غیرواکسینه استفاده گردید.

نتایج

نتایج تغییرات پارامترهای خونی متعاقب واکسیناسیون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۱ آورده شده است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز خون و هماتوکریت و هموگلوبین در بین دو تیمار در روزهای مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار نشان نداشتند ($P>۰/۰۵$)، اما تعداد گلبول‌های سفید خونی در گروه واکسینه نسبت به گروه شاهد در مراحل مختلف نمونه‌گیری اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P>۰/۰۵$) به‌طوری‌که بالاترین تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه واکسینه و در۱۴ روز بعد از واکسیناسیون اولیه مشاهده شد. هم‌چنین در تمام مراحل نمونه‌برداری افزایش میزان فعالیت‌لایزوزیم‌در تیمار واکسینه نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$).بیش‌ترین‌میزان‌لایزوزیم‌در‌روز۴۵ روز بعد از واکسیناسیون اولیه مشاهده گردید (جدول۲). فعالیت کمپلمان سرم نیز روند مشابه فعالیت لایزوزیم نشان داد و میزان فعالیت کمپلمان سرم در تیمار واکسینه شده در تمام مراحل نمونه‌گیری نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری‌را‌نشان‌داد($P>۰/۰۵$)(جدول۲). میزان‌زنده‌مانی‌کلوسیت‌های کلیه قدامی استخراجی در تمام نمونه‌های گرفته شده بیش از ۹۵ ٪ بوده و تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشدند). میزان‌بیگانه‌خواری لکوسیت‌های‌کلیه قدامی در شکل ۱ آورده شده است.

کارایی بیگانه‌خواری لکوسیت‌های کلیه قدامی در تیمار شاهد و تیمار ایمن شده بسیار مناسب بوده و بیش از ۹۰درصد باکتری‌های مجاور شده با لکولسیت‌ها فاگوسیت شدند، البته تفاوت معنی‌داری در دو مرحله اول نمونه‌گیری بین تیمار شاهد و واکسینه مشاهده نگردید، ولی در مرحله سوم و چهارم نمونه‌گیری افزایش توان بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها در تیمار ایمن شده افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید($P>۰/۰۵$). در روز ۴۵ و ۶۰ نمونه‌گیری علی‌رغم کاهش کلی توان بیگانه‌خواری کلوسیت‌ها نسبت به دو مرحله قبل، کاهش این توان نسبت به دو مرحله اول قابل مشاهده بود.

جدول ۱: نتایج حاصل از نمونهگیری روزهای مختلف شاخصهای خونی ماهی و مقایسه آن با تیمار شاهد

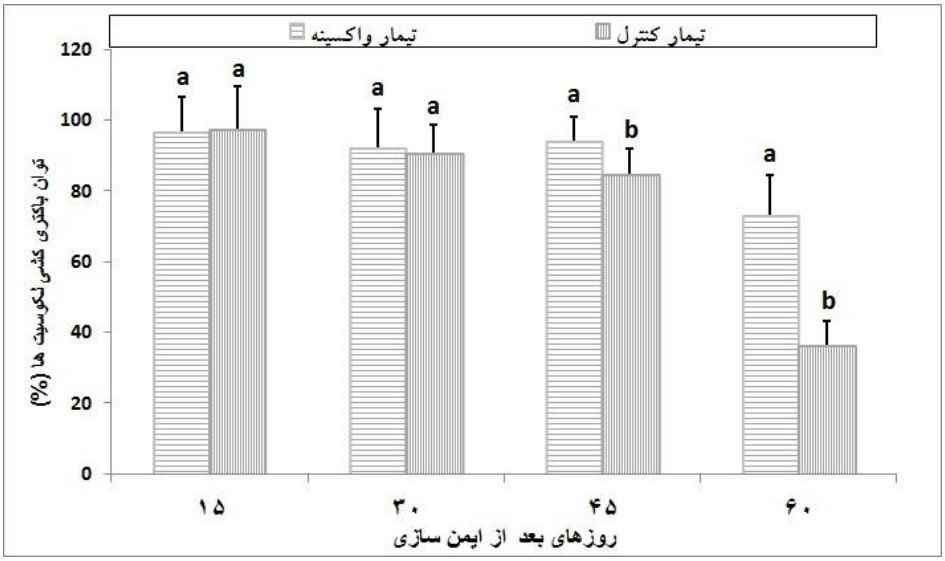
پارامتر	تیمار	روز ۰	روز ۱۴	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
Hct (%)	واکسینه	۴۳/۳±۳^{a}	۲۵±۲^{a}	۳۱/۷±۴^{a}	۳۸/۳±۹^{a}	۳۴/۴±۲^{a}
	شاهد	۳۰/۱±۷^{a}	۲۵/۲±۶^{a}	۲۶/۱±۴^{a}	۲۷/۶±۴^{a}	۳۰/۳±۳^{a}
Hb (g/dl) گرم در دسی لیتر	واکسینه	۶/۴±۰/۲۵^{a}	۶/۰۱±۰/۹^{a}	۵/۸±۰/۸^{a}	۵/۹±۱^{a}	۶/۰۴±۲^{a}
	شاهد	۵/۵±۰/۱۲^{a}	۵/۷۶±۰/۲^{a}	۵/۰۱±۰/۹^{a}	۵/۴±۰/۰۹^{a}	۵/۵±۰/۱۹^{a}
RBC (10^{6}/ μL^{-1})	واکسینه	۱/۵±۰/۱^{a}	۱/۳۷±۰/۱^{a}	۱/۷۹±۰/۳^{a}	۱/۴±۰/۲۲^{a}	۱/۵±۰/۱^{a}
	شاهد	۱/۸±۰/۳^{a}	۱/۴۵±۰/۲^{a}	۱/۲±۰/۰۹^{a}	۰/۹±۰/۱^{a}	۱/۸±۰/۲^{a}
WBC ($10^{3}/\mu L^{-1}$)	واکسینه	۴/۲±۰/۱^{a}	۸/۶±۰/۹^{a}	۶/۸±۰/۲^{a}	۴/۸±۰/۰۹^{a}	۷/۲±۰/۰۵^{a}
	شاهد	۳/۷±۰/۷^{a}	۴/۲±۰/۲۳^{b}	۳/۵±۰/۰۹^{b}	۳/۲±۰/۰۶^{b}	۳/۱±۰/۳^{b}

اطلاعات براساس (خطای استاندارد±میانگین) آورده شده است. حروف غیرمشابه در هر ردیف نشاندهنده تفاوت معنیدار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد در هر پارامتر است.

جدول ۲: نتایج حاصل از نمونهگیری روزهای مختلف شاخصهای ایمنی ماهی و مقایسه آن با تیمار شاهد

پارامتر	تیمار	روز ۰	روز ۱۴	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
فعالیت لایزوزیم سرم	واکسینه	۱۴۵/۷±۱۲^{a}	۱۸۴/۲±۱۲^{a}	۲۳۳/۹±۲۱^{a}	۱۶۳/۷±۲^{a}	۱۵۹/۴±۱۲^{a}
	شاهد	۱۴۱/۷±۱۳^{a}	۱۴۳/۷±۱۲^{b}	۱۲۳/۸±۱۵^{b}	۱۴۴/۶±۹^{b}	۱۳۲/۱±۱۱^{b}
فعالیت کمپلمان سرم	واکسینه	۳۳/۱±۷^{a}	۴۲/۲±۷^{a}	۴۳/۵±۲^{a}	۳۹/۴±۶^{a}	۴۴/۴±۴^{a}
	شاهد	۲۹/۷±۲^{a}	۲۴/۸±۲^{b}	۲۲/۱±۳^{b}	۲۶/۲±۳^{b}	۲۴/۱±۶^{b}

اطلاعات براساس (خطای استاندارد±میانگین) آورده شده است. حروف غیرمشابه در هر ستون نشاندهنده تفاوت معنیدار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد در هر پارامتر است.



شکل ۱: توان باکتریکشی لکوسیتها در زمانهای مختلف نمونهگیری ۶۰ دقیقه بعد از انکوبه کردن سلولهای فاگوسیت کننده و باکتری.

حروف کوچک متفاوت نشاندهنده اختلاف معنیدار در بین تیمارها میباشد.

بحث

یافتن راههای پیشگیری از خسارات اقتصادی ناشی از تلفات در مزارع پرورش ماهی قزلآلا و نیز کاهش مشکلات زیستمحیطی ناشی از مصرف بیرویه آنتیبیوتیکها ضروری بهنظر میرسد (MacMillan، ۲۰۰۱). واکسیناسیون یکی از موفقترین روشها در پیشگیری از بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزلآلاست (Pridgeon و Klesius، ۲۰۱۱). با اینحال در مورد ایمنیزایی واکسن تجاری این بیماری در کشور بررسی چندانی صورت نگرفته است، لذا در این تاثیر واکسن استرپتوکوکوس ساخت داخل بر شاخصهای خونی و سیستم ایمنی ماهی قزلآلای رنگینکمان بررسی گردید.

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز واکسن تزریقی استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلا بهبود شاخص‌های ایمنی ماهی حتی تا دو ماه بعد از تجویز واکسن را باعث شد. هر چند شاخص‌های خونی تاثیر چندانی از تجویز واکسن نپذیرفتند. در این تحقیق تجویز واکسن باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت لایزوزیم سرم در تمام مراحل نمونه‌گیری نسبت به گروه شاهد شد که نشان از بهبود کارایی سیستم ایمنی ذاتی ماهی می‌باشد. لیزوزیم یکی از ترکیبات هومورال سیستم ایمنی غیراختصاصی است که منجر به شکسته شدن پیوند بتا ۱ -۴ بین ان -استیل مورامیک اسید و ان -استیل گلوکز آمین در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت می‌گردد و بدین‌صورت باعث تخریب دیواره سلولی آن‌ها می‌شود هم‌چنین موجب افزایش فعالیت بیگانه‌خواری و نیز نقش اپسونین (شامل کمپلمان و آنتی‌بادی) در ماهی را داراست (Ellis، ۱۹۹۰). مطالعات نشان داده است که میزان لایزوزیم بعد از یک عفونت باکتریایی و تجویز واکسن و محرک‌های ایمنی در ماهی افزایش یافته است (Chen و همکاران، ۲۰۰۳). Choi و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کرده‌اند که افزایش میزان لایزوزیم یکی از مهم‌ترین شاخص‌های نشان‌دهنده کارایی سیستم ایمنی ماهی است. در مطالعه‌ای سلطانی و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که واکسیناسیون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با *s. iniae* موجب افزایش لایزوزیم گردیده است که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی داشت. Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) و علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی کپور ایمن شده با باکتری کشته آئروموناس هیدروفیلا را گزارش نمودند. در این مطالعه افزایش فعالیت سیستم کمپلمان در اکثر مراحل نمونه‌گیری در تیمار واکسینه نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید که این افزایش فعالیت را می‌توان به آنتی‌ژن‌های موجود در واکسن نسبت داد که علاوه بر تحریک تولید ایمنی اختصاصی، بهبود کارایی ایمنی غیراختصاصی ماهی را نیز باعث شده است. ماهی دارای سیستم کمپلمان بسیار پیشرفته بوده که قادر به کشتن مستقیم میکروارگانیسم‌ها با لیز کردن، اپسونیزاسیون میکروارگانیسم‌ها و تحریک عمل التهاب و فعال‌سازی لکوسیت‌ها می‌باشد (Ellis، ۱۹۹۰). فعالیت سیستم کمپلمان در ماهی یکی از شاخص‌های مهم ایمنی غیراختصاصی در ماهی می‌باشد، که تحت تاثیر واکسیناسیون ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا نیز قرار می‌گیرد. گزارشات از تاثیر واکسیناسیون بر فعالیت سیستم کمپلمان در ماهی متفاوت و بعضاً متناقض بوده است. Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) عدم تاثیر ایمنی‌سازی بر فعالیت کمپلمان سرم را گزارش نموده‌اند، هرچند Soltani و همکاران (۲۰۰۷) افزایش فعالیت کمپلمان سرم در ماهیان ایمن شده با باکتری فرمالینه *استرپتوکوکوس اینیه* به‌روش تزریق داخل صفاقی در ماهی قزل‌آلا را گزارش نمودند. هم‌چنین Wang و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کرده‌اند که ایمنی‌سازی گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) با واکسن تحت واحد *استرپتوکوکوس اینیه* موجب افزایش در فعالیت کمپلمان گردیده‌است. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان قدرت فاگوسایتوزیس لکوسیت‌ها بعد از واکسیناسیون بسیار بالا بوده و به‌تدریج کاهش نسبی در این توان ایجاد می‌شود، ولی این کاهش در سه مرحله اول معنی‌دار نبود، میزان بیگانه‌خواری لکوسیت‌های ماهیان در تیمار واکسینه در دو مرحله آخر به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد بود ($P<0/05$). یکی از یافته‌های جالب این تحقیق اثر واکسیناسیون بر قدرت بیگانه‌خواری لکوسیت‌های کلیه قدامی تا ۶۰ روز بعد از واکسیناسیون بود. علی‌رغم این‌که توان بیگانه‌خواری کلوسیت‌ها از شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی می‌باشد و تحت تاثیر مستقیم ایمن سازی با آنتی‌ژن مشخص قرار نمی‌گیرد، ولی افزایش قدرت بیگانه خواری لکوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد تا دو ماه بعد از واکسیناسیون نشان‌دهنده تاثیر واکسیناسیون بر ایمنی غیراختصاصی از طریق سایتوکین‌های ایمنی و تاثیر سلول‌های خاطره ایمنی در تکامل و فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار می‌باشد. فاگوسایتوزیس اولین سد دفاعی بدن بعد از موانع مخاطی در برابر عوامل بیماری‌زاست و در ماهی این سیستم دفاعی کارایی بسیار بالایی دارد. بعد از ورود یک عامل بیگانه به بدن، سلول‌های بیگانه‌خوار ضمن مهاجرت به محل عفونت و بلع و تجزیه عامل بیگانه، آنتی‌ژن‌های عامل را به سیستم ایمنی اختصاصی عرضه می‌کنند. لذا در ایمنی طبیعی و اکتسابی نقش اساسی دارند. پژوهشگران زیادی گزارش کرده‌اند که فعالیت فاگوسیتوزی لکوسیت‌های ماهی با اثر اپسونین آنتی‌بادی و سیستم کمپلمان افزایش می‌یابد (Sakai، ۱۹۸۴). سلول‌های فاگوسیت کننده، بعد از بلع سلول، برای نهایی کردن بیگانه‌خواری و ایجاد انفجار تنفسی، نیاز به تولید آنیون‌های سوپر اکسید دارند. گزارشاتی از اثر ایمن کردن ماهی با آنتی‌ژن‌های باکتریایی بر افزایش فعالیت فاگوسیتوزیس در ماهی وجود دارد (Santarem و Figueras، ۱۹۹۴؛ ۱۹۹۵). هم‌چنین Huang و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده‌اند که واکسیناسیون ماهی با واکسن کشته *استرپتوکوکوس اینیه* در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده و افزایش بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها تا ۴۵ روز بعد از ایمن سازی را باعث می‌شود. Anderson و Jeney در سال (۱۹۹۱) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند که سلول کشته باکتری *ائروموناس سالمونیسیدا* باعث افزایش فعالیت فاگوسایتوزیس و در نتیجه ارتقا سیستم ایمنی ذاتی ماهی می‌گردد. در تحقیقی مشابه Figueras و همکاران (۱۹۹۷) تجویز تزریقی باکتری *Photobacterium damsela* غیرفعال شده با فرمالین را موجب افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده تا ۲۰ روز در کفشک ماهی (*Scophthalmus maximus*) دانستند. Li و همکاران (۲۰۱۶)

نیز گزارش کردند که واکسن کشته باکتریایی موجب افزایش فاگوسیتوزیس و شاخص بیگانه‌خواری در ماهی سیم دریایی (*Sparus sarba*) گردیده است. در گزارشات بسیاری نشان داده شده است که تعداد ماکروفاژها و نوترفیل‌ها بعد از ایجاد التهاب درماهی متحمل تغییراتی می‌گردد (Suzuki و Hibiya، ۱۹۸۶؛ MacArthur و همکاران، ۱۹۸۴). این محققان نشان داده‌اند که در طی فرایند التهاب نوتروفیل‌های ذخیره شده در کلیه قدامی ماهی ابتدا به درون خون محیطی آزاد می‌گردند و سپس به محل التهاب فراخوانی شده و بعد از مهاجرت از رگ خونی به منطقه اقدام به بیگانه‌خواری عامل بیگانه (آنتی‌ژن) می‌نمایند. هم‌چنین آن‌ها نشان داده‌اند که معمولاً افزایش فعالیت بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها همراه افزایش تعداد لکوسیت‌های با هسته چندقسمتی بوده‌است، در مطالعه جاری نیز افزایش قدرت فاگوسیتوزیس همگام با افزایش تعداد تام گلبول‌های سفید خون محیطی بوده است که انطباق نتایج تحقیق جاری با یافته‌های سایر محققین را نشان می‌دهد. مشابه نتایج این تحقیق، Santarem و Igueras (۱۹۹۵) نیز با تزریق آنتی‌ژن باکتریایی ویبریو دامسلا (*Vibrio damsel*) به کفشک ماهی و افزایش تعداد نوتروفیل در خون محیطی و ماکروفاژها درکلیه قدامی را گزارش نمودند، که با نتایج تحقیق جاری که افزایش قدرت فاگوسیتوزیس و فعالیت باکتری‌کشی سلول‌های فاگوسیت‌کننده، هم‌زمان با افزایش تعداد لکوسیت‌های خون محیطی را گزارش کرده‌اند، هم‌خوانی دارد. فعالیت فاگوسایتوزیس لکوسیت‌های کلیه قدامی در طی دوره ۶۰ روزه تحقیق افزایش نشان داد. به‌طوری‌که میزان فعالیت فاگوسایتوزیس لکوسیت‌ها در روز ۴۵ و ۶۰ نمونه‌گیری نسبت به تیمار شاهد بیش‌تر بود، این افزایش فعالیت به این صورت توجیه می‌شود که اولاً هرچند سلول‌های بیگانه‌خوار در محل التهاب (محل تزریق واکسن) در چند روز اول التهاب بیش‌ترین فعالیت بیگانه‌خواری را دارند، ولی فعالیت ماکروفاژهای کلیه قدامی می‌تواند تا مدت‌ها بعد از ایجاد التهاب آنتی‌ژن واکسنی امتداد یافته و به‌ویژه با انجام واکسیناسیون یادآور در روز ۳۰ تحقیق این امتداد اثر بیش‌تر خواهد شد. در تحقیقات دیگر نیز امتداد اثر افزایشی واکسیناسیون بر فعالیت فاگوسایتوزیس سلول‌های بیگانه‌خوار تا دو ماه نیز گزارش شده است (Huang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Andrew و همکاران، ۲۰۰۲). این یافته نشان می‌دهد که واکسن استفاده شده کارایی مناسبی داشته و حداقل تا دو ماه بعد از تجویز تزریقی واکسن می‌توان انتظار اثرات ضدباکتریایی بر علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* داشت. هرچند در مورد برخی باکتری‌ها مثل *آئروموناس هیدروفیلا* این مدت کوتاه‌تر گزارش شده است. آنالیز نتایج نشان داد که گلبول‌های قرمز و هماتوکریت و هموگلوبین در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری ندارد اما تعداد گلبول‌های سفید در تیمار واکسینه در تمام روزهای نمونه‌برداری نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد. افزایش تعداد گلبول‌های سفید بیانگر تأثیر واکسن بر تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی دارد. در مطالعه‌ای مشابه سلطانی و همکاران (۱۳۸۶) افزایش جمعیت کل لکوسیت‌ها در گروه‌های ایمن شده با باکتری فرمالینه *استرپتوکوکوس اینیه* به‌روش تزریقی و غوطه‌وری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تا ۶ هفته را گزارش نمودند. در تحقیقی دیگر Mcnulty و همکاران (۲۰۰۳) در ماهی تیلاپیا افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید خونی را به‌دنبال ایمن‌سازی ماهی با باکترین *استرپتوکوکوس اینیایی* تا یک ماه بعد از واکسیناسیون گزارش کردند، آن‌ها افزایش تعداد لنفوسیت‌ها را در افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید خونی موثر دانستند که در ایمنی اختصاصی نقش موثری دارد. لنفوسیت‌ها در ماهی، برخلاف حیوانات خونگرم، قابلیت فاگوسیتوزیس را نیز دارند. Faghani و همکاران (۲۰۰۸) عدم تاثیر ایمن‌سازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر استرپتوکوکوزیس به‌همراه آلژنیک اسید را بر شاخص‌های خونی گزارش کردند. هم‌چنین Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) نیز ایمن سازی ماهی کپورمعمولی با باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* را بدون تاثیر معنی‌دار بر شاخص‌های خونی (هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز و ایندکس‌های گلبولی) دانستند. در مطالعه‌ای دیگر Alishahi و همکاران (۲۰۱۴) عدم تاثیر ایمن‌سازی با باکترین *آئروموناس هیدروفیلا* و ادجوان نانوکیتوزان را بر شاخص‌های خونی فوق در ماهی کپور معمولی گزارش نمودند. لذا با توجه به عدم تغییر شاخص‌های خونی در تحقیق جاری و نیز مطالعات مشابه می‌توان نتیجه گرفت که شاخص‌های خونی مربوط به گلبول‌های قرمز تحت تاثیر ایمن‌سازی قرار نگرفته و احتمالاً ایمن‌سازی در مراحل هماتوپوئیتیک (خون‌سازی بافت‌های خون‌ساز) و هم‌چنین طول عمر گلبول‌های قرمز نقشی ندارند و عوامل دیگر (به‌ویژه محرک‌های ایمنی) بر این شاخص‌ها موثرند.

با توجه به نتایج تحقیق جاری می‌توان ادعا نمود که تجویز واکسن فرمالینه استرپتوکوکوس/لاکتوکوکوس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌روش به‌کار رفته در این تحقیق در القای پاسخ ایمنی، به‌ویژه قدرت فاگوسایتوزیس سلول‌های بیگانه‌خوار نقش موثری داشته و این اثر تا دو ماه بعد از تجویز نیز امتداد دارد. هرچند این روش تجویز واکسن تاثیری بر شاخص‌های خونی ماهی ندارد. هرچند بررسی بیش‌تر بر روش‌های مختلف تجویز و کارایی واکسن ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام پذیرفت.

منابع

۱. **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. سال ۱۲، شماره ۱، صفحه ۵۳ تا ۶۵.

۲. **سلطانی، م.؛ علیشاهی، م.؛ خضرائی‌نیا، پ.؛ ربانی م. و ستاری، ا.، ۱۳۸۶.** مطالعه برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به برخی آنتی‌ژن‌های *استرپتوکوس اینیه*. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۲ ، شماره ۱، صفحات ۲۳ تا ۳۸.

۳. **قیاسی، م.؛ زاهدی، آ. و خوشباور رستمی، ح.، ۱۳۷۹.** بروز اپیدمی استرپتوکوکوزیس در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان مازندران. اولین همایش بهداشت و بیماری‌های آبزیان ایران، اهواز . صفحه ۵۹.

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

۵. **Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Razijalali, M., ۲۰۱۰.** Effects of dietary *Aloe vera* on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinuscarpio*). Journal of Veterinary Researches. Vol. ٤, No. ٣, pp: ٨٥-٩١.

٦. **Anderson, D.P. and Jeney, G., 1991.** Responses to in vitro and in vivo immunizations with *Aeromonas salmonicida* O antigen bacterins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology.Vol. 1, pp: 251-260.

۷. **Andrew, C.; céline, G.; bjarne, G.; Hansen, M.; Horne, A. and Ellis, E., 2002.** Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages Fish & Shellfish Immunology.Vol. 12, pp: 181-186.

۸. **Barta, O., 1993.** Veterinary clinical immunology laboratory. Bar-Lab Inc. 350 P.

۹. **Bercovier, H.; Ghittino, C. and Eldar, A., 1997.** Immunization with bacterial antigens: Infections with streptococci and related organisms. In, Gudding R, Lillehaugh A, Midtlyng PJ, Brown F (Eds): Fish Vaccinology. SW. 160 P.

۱۰. **Brown, L.L.; Iwama, G.K. and Evelyn, T.P.T., 1996.** The effects of early exposure of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) eggs to the p57 protein of *Renibacterium salmoninarum* on the development of immunity to the pathogen. Fish and Shellfish Immuno. Vol. 6, pp: 149-165.

۱۱. **Chen, X.; Wu, Z. And Yin, J., 2003.** Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus* gibelio. J Fish Sci China. Vol.10, pp: 36-40.

۱۲. **Choi, S.H.; Park, K.H.; Yoon, T.J.; Kim, J.B.; Jang, Y.S. and Choe, C.H., 2008.** Dietary Koren mistletoe enhances cellular non- specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish Shellfish Immunol. Vol. 24, pp: 67-73.

۱۳. **Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assays. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB, editors. Techniques in fish immunology, Fair Haven NJ: SOS Publications. pp: 101-103.

۱٤. **Faghani, T.; Azari Takami, Gh.; Kousha, A. and Faghani, S., 2008.** Survening on Alginic acid and anti-streptococcus vaccine effect on the growth performance, survival rate, hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchous mykiss*). World Journal of Zoology. Vol. 3, No. 2, pp: 54-58.

۱۵. **Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000.** Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Vol. 1124, pp: 67-73.

۱٦. **Figueras, A.; Santarém, M.M. and Novoa, B., 1997.** Phagocytic activity of turbot (*Scophthalmus maximus*) leucocytes: opsonic effect of antibody and complement Fish and Shellfish Immunology. Vol. 7, pp: 621-624.

۱۷. **Huang, H.Y.; Chen, Y.C.; Wang, P.C.; Tsai, M.A.; Yeh, S.C.; Liang, H.J. and Chen, S.C., 2014.** Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against Streptococcus iniae infection in the farmed grouper Epinephelus coioides by intraperitoneal immunization. Vaccine. Vol. 5, No. 32, pp: 7014-7020.

۱۸. **Li, J.; Siyuan, M.; Norman, Y. and Woo, S., 2016.** Vaccination of Silver Sea Bream (Sparus sarba) against Vibrio alginolyticus: Protective Evaluation of Different Vaccinating Modalities Int. J. Mol. Sci. Vol. 17, No. 40, pp: 33-40.

۱۹. **MacArthur, J.I.; Fletcher, T.C.; Pirie, B.; Davidison, R.J.L. and Thompson, A.W., 1984.** Peritonea1 inflammatory cells in plaice, Pleuronectes platessa L.: effects of stress and endotoxin. J Fish Biol. Vol. 25, pp: 69-81.

۲۰. **Mcnulty, T.S.; Klesius, P. and Shoemaker, C., 2003.** Hematological Changes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Infected with *Streptococcus iniae* by Nare Inoculation. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 34, No.3, pp: 418-422.

۲۱. **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, pp: 5986-5993.

۲۲. **Romalde, J.L.; Luzardo-Alvarez,A.; Ravelo, C.; Toranzo, AE. and Blanco-Mendez, J., 2004.** Oral immunization using alginate micro-particles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. Aquaculture. Vol. 236, pp: 119-129.

۲۳. **Sakai, D.K., 1984.** Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. Journal of Fish Diseases. Vol. 7, pp: 29-38.

۲٤. **Santarém, M.M. and Figueras, A., 1994.** Kinetics of phagocytic activity, plaque-forming cells and specific agglutinins of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunized with O-antigen of *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida.* Fish and Shellfish Immunology. Vol. 4, pp: 527-537.

۲۵. **Santarém, M.M. and Figueras, A., 1995.** Leucocyte numbers and phagocytic activity in turbot *Scophthalmus maximus* following immunization with *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida* 0-antigen bacterins diseases of aquatic organisms. Vol. 23, pp: 213-220.

۲٦. **Secombes, C.J., 1990.** Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In *Techniques in Fish Immunology* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Robertson & W. B. Muiswinkel, eds) U.S.A. 154 P.

۲۷. **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. J of Veterinary Microbiology. Vol. 30, pp: 49-58.

۲۸. **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, No. 1, pp: 129-140.

۲۹. **Soltani, M.; Jamshidi, Sh. and Sharifpour, I., 2005.** Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogensis. Bulletin of European Association of Fish Pathologists. Vol. 25, pp: 95-107.

۳۰. **Soltani, M.; Pirali Kheirabadi, E.; Taheri, M.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. J of Veterinary Microbiology. Vo. 30, pp: 49-58.

۳۱. **Suzukl, Y. and Hibiya, T., 1986.** Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. Fish Path. Vol. 23, pp: 179-184.

۳۲. **Thrall, M.A.; Baker, D.C. and Lassen, ED., 2004.** Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations Set. John Wiley & Sons. UK, London. pp: 241-402.

۳۳. **Vendrell, D.; Balcazar, J.L.; Ruiz-Zarzuela, I.; Ignacio, d.B.; Girones, O. and Muzquiz, JL., 2006.** *Lactococcus garvieae* in fish: Review. Comparative Immunol Microbiol Infectious Dis. Vol. 29, pp:177-198

۳٤. **Wang, E.; Wang, J.; Long, B.; Kaiyu, W.; Yang H.; Qian.; Huang, H.; Ouyang, P. and Lai, H., 2016.** Molecular cloning, expression and the adjuvant effects of interleukin-8 of channel catfish (*Ictalurus Punctatus*) against *Streptococcus iniae*. Sci. Rep. Vol. 6, 29310 p.