

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 1395 تاریخ پذیرش: اسفند 1395

چکیده

در این پژوهش ایمنی‌زایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ارزیابی شد. تعداد 240 قطعه ماهی قزل‌آلای با متوسط وزن 30 ± 1 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 30 روز بعد واکسن یادآور به‌روش غوطه‌وری انجام شد. گروه شاهد کاملاً مشابه تیمار شاهد با سرم فیزیولوژی تیمار شد. در روزهای 0، 15، 30، 45 و 60 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 ($p \geq 0/05$). 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 قزل‌آلای با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به‌روش تزریقی و غوطه‌وری ایمنی‌زایی مناسبی داشته و برای واکسیناسیون ماهی قزل‌آلای مناسب می‌باشد. کلمات کلیدی: واکسن دوگانه، استرپتوکوکوزیس، ایمنی‌زایی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

انتقال به انسان می‌باشد، این بیماری از نظر بهداشت انسانی نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد (MacMillan، 2001). با توجه به تلفات بالا و خسارات اقتصادی بالای این بیماری، آنتی‌بیوتیک‌تراپی یکی از روش‌های مقابله با بیماری است (Vendrell و همکاران، 2006) ولی استفاده از آنتی‌بیوتیک در شرایط پرورشی علاوه بر هزینه بالا باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تجمع آنتی‌بیوتیک در بدن ماهیان، انتقال مقاومت دارویی به انسان و مشکلات زیست محیطی می‌گردد (MacMillan، 2001). از موثرترین روش‌های جایگزین مقابله با این بیماری در ماهی، استفاده از واکسن‌ها می‌باشد (Pridgeon و Klesius، 2011). بیش‌ترین مطالعات روی واکسن استرپتوکوکوزیس بر روی سلول کشته شده باکتری با فرمالین با تجویز تزریقی و به‌صورت مونووالانت (تک واحدی) بوده است (Bercovier و همکاران،

بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس ایجاد شده توسط استرپتوکوکوس/اِنبیه و لاکتوکوکوس گارویه از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور می‌باشد (Soltani و همکاران، 2016). اولین مورد استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران از استان مازندران در سال 1379 گزارش شده است (قیاسی و همکاران، 1379). از آن به بعد شیوع این بیماری در مزارع پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان روبه افزایش بوده و موجب زیان اقتصادی 8 میلیون دلار در سال گردیده است. نخستین بار در ایران عامل لاکتوکوکوس گارویه از مزرعه پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان فارس جداسازی شده است (Soltani و همکاران، 2005). از آنجایی‌که عوامل این بیماری نیز قابل



(1997؛ Romalde و همکاران، 2004). 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/اِینیه و لاکتوکوکوس گارویه باعث ایجاد عفونت و تلفات در ماهی قزل‌آلای می‌گردند (Soltani و همکاران، 2005). 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 (1386) انواع روش‌های تجویز واکسن فرمالینه بررسی و موثرترین روش، روش تزریقی و به دنبال 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، 2016). 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 94 تعداد 240 قطعه ماهی به وزن متوسط $30 \pm 1/7$ 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 5 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 به مدت دو هفته جهت سازگاری در مخازن 300 لیتری نگهداری شدند. از آب شهری بعد از کلرزدایی استفاده شد. روزانه 50% تعویض آب صورت می‌گرفت. هوادهی دائمی در طی دوره برقرار بوده و شرایط آب دوره تحقیق به‌صورت زیر بود:

دما $14 \pm 1/3$ درجه سانتی‌گراد، سختی 1050 میکروزیمنس بر سانتی‌متر مربع، $pH = 8/3 \pm 0/6$ ، میزان اکسیژن محلول $7/7 \pm 1/5$ میلی‌گرم در لیتر، میزان NH_3 و نیتريت کمتر از 0/01 میلی‌گرم در لیتر و میزان نیترات کمتر از 0/1 میلی‌گرم در لیتر. ماهیان به مدت 60 روز با خوراک تجاری و روزانه به میزان 2% 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 دوز 1×10^9 سلول در میلی‌لیتر و به همراه تولیدات خارج سلولی باکتری جرم در میلی‌لیتر بدون ادجوانت می‌باشد. **واکسیناسیون:** برای انجام این مطالعه تعداد 240 قطعه ماهی به 2 تیمار و هر تیمار 3 تکرار در مخازن 250 لیتری تقسیم شدند. واکسیناسیون طبق روش زیر انجام گرفت. گروه واکسینه شده طبق پروتکل واکسن روز اول به‌صورت تزریقی و به میزان 100 میکرولیتر از غلظت 10^9 باکتری فرمالینه، و واکسن یادآور در روز سیام تحقیق به‌روش غوطه‌وری و با غلظت 10^8 باکتری در میلی‌لیتر به مدت 120 ثانیه انجام شد. به گروه شاهد در روز صفر 100 میکرولیتر سرم فیزیولوژی به جای واکسن تزریق گردید و در روز سیام غوطه‌وری بدون واکسن صورت گرفت. 2 روز قبل از واکسیناسیون غذادهی قطع گردید. قبل از شروع واکسیناسیون ماهیان با دوز 0/4 میلی‌لیتر از فنوکسی اتانول در یک لیتر آب بی‌هوش گردیدند (Alishahi و همکاران، 2010) در طول دوره پرورش ماهی‌های با خوراک تجاری شرکت فرادانه به‌صورت اکسترودر (شناور) مخصوص ماهیان 25 تا 50 گرم با کد FFT2 و قطر 4 میلی‌متر، میزان پروتئین خام 42%، چربی 13%، فیبر 3% و رطوبت 9% به‌میزان 2% زی‌توده ماهی تغذیه گردیدند.

نمونه‌گیری: در روزهای صفر، 15، 30، 45 و 60. از هر تیمار 9 عدد (هر تکرار سه عدد) نمونه‌برداری گردید. به این منظور ماهی‌ها روز قبل از نمونه‌گیری قطع غذا شده و با 400 میلی‌گرم در لیتر فنوکسی اتانول بی‌هوش گردیدند، سپس با سرنگ 2/5 میلی‌لیتری و سوزن 22 از ورید ساقه‌دمی ماهی‌ها خونگیری گردید. برای انجام آزمایشات هماتولوژی از خون چهارپاره استفاده شد بلافاصله بعد از تهیه نمونه خون چهارپاره کلیه آزمایشات هماتولوژی در همان روز انجام شد. برای انجام آزمایشات ایمنی نمونه‌ها غیرهپارینه به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری گردیدند و سپس به مدت 10 دقیقه در دور 4000 و دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها جداسازی و تا زمان استفاده در 80- 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 سانتریفیوژ نمونه به مدت 10 دقیقه در 10000 دور در دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ میکروهماتوکریت صورت گرفت (Feldman و همکاران، 2000). هموگلوبین (Hb)، به‌روش استاندارد سیانومت هموگلوبین انجام گرفت. 0/01 میلی‌لیتر خون با 2/5 سی‌سی محلول تجاری درابکین (معرف سیانومت-هموگلوبین) مخلوط و پس از گذشت 10 دقیقه، نمونه مخلوط‌شده به مدت 10 دقیقه به‌منظور رسوب ذرات هسته با سرعت 2000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس جذب نوری محلول

فوقانی در طول موج 540 نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه گردید (Thrall و همکاران، 2004). شمارش کلی گلبول های قرمز (TRBC) شمارش کلی گلبول های قرمز ماهی به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت. نمونه های خونی به نسبت 1 به 200 با محلول رقیق کننده نات-هریک (Natt-Herrick) رقیق گردید. و شمارش با بزرگنمایی 400 میکروسکوپ فاز کنتراست انجام شد. شمارش کلی گلبول های سفید (TWBC) به روش مستقیم (هماسیتومتر) و همانند شمارش کلی گلبول های سفید پرندگان با رقیق کردن خون به نسبت 1 به 200 با محلول رقیق کننده نات-هریک صورت گرفت. (Thrall و همکاران، 2004).

آزمایشات ایمنی شناسی: به منظور ارزیابی ایمنی زایی واکسن برخی شاخص های تحریک ایمنی غیر اختصاصی ارزیابی گردید.

سنجش فعالیت لیزوزیم: فعالیت لایزوزیم سرم به روش توربیدومتری با استفاده از روش توصیه شده توسط Ellis و همکاران (1990) با کمی تغییرات اندازه گیری شد (Feldman و همکاران، 2000). در این روش ابتدا 10 میکرو لیتر از سرم نمونه با 200 میکرو لیتر از سوسپانسیون 0/2 میلی گرم در میلی لیتر باکتری میکروکوکوس لیزود/یکتیکوس (سیگما) در بافر فسفات سدیم 0/05 مولار (pH=6/2) در گوده های پلیت الایزا مخلوط شد و جذب نوری در دمای 25 درجه سانتی گراد در زمان های 1 و 6 دقیقه بعد از مخلوط سازی در طول موج 530 نانومتر اندازه گیری شد [دستگاه الایزا ریدر (Dynatech MR 5000) ساخت کشور هلند]. فعالیت لایزوزیم باعث تخریب باکتری و کاهش جذب نوری می گردد. یک واحد فعالیت لایزوزیم با میزان کاهش جذب نوری به میزان 0/001 در دقیقه در هر میلی لیتر سرم مشخص گردید.

اندازه گیری فعالیت کمپلمان سرم: فعالیت کمپلمان با استفاده از قدرت لیز کنندگی سیستم کمپلمان بر روی سلول های گلبول قرمز خرگوش انجام شد (Barta، 1993). سلول های گلبول قرمز خرگوش در آگاروز 1.5% (pH=7/2) شامل 75 میکرو لیتر $MgCl_2$ یک مولار و 150 میکرو لیتر $CaCl_2$ یک مولار در 100 میلی لیتر نمک فسفات بافر تهیه گردید. سلول های گلبول قرمز خرگوش با بافر فسفات سالین شستشو گردید و سپس در دور 750 g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس سلول ها در غلظت 1×10^8 در میلی لیتر تنظیم گردید. 15 میلی لیتر آگاروز حاوی سلول های گلبول قرمز خرگوش به هر پلیت ریخته شد و در 4 درجه سانتی-گراد انکوبه شد و سپس گوده های سه میلی لیتری در آن ایجاد گردید. به هر گوده 20 میکرو لیتر از سرم مورد مطالعه اضافه شد و در درجه حرارت اتاق برای 48 ساعت انکوبه گردید. در نهایت قطر هاله لیز اطراف گوده اندازه گیری و به عنوان میزان فعالیت کمپلمان ثبت گردید (Barta، 1993).

ارزیابی قدرت فاگوسیتوزیس ماکروفاژ های کلیه قدامی: برای ارزیابی فعالیت فاگوسیتوزیس ماکروفاژ های کلیه قدامی در همان روز نمونه گیری ابتدا اقدام به جداسازی و خالص سازی ماکروفاژ های کلیه قدامی گردید. سپس میزان زندهمانی ماکروفاژ ها ارزیابی شده و با تنظیم تعداد ماکروفاژ هادر میلی لیتر از باکتری برای ارزیابی فاگوسیتوزیس استفاده شد. جداسازی لکوسیت های کلیه قدامی به روش توصیه شده توسط Brown و

همکاران (1996) 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 لکوسیت های چند هسته ای کلیه قدامی نمونه از توری پلاستیکی مخصوص با مش 70 میکرومتر با استفاده از سانتریفوژ عبور داده شد. سلول های جداسازی شده سه بار با محیط RPMI شستشو داده شد. بعد از شستشوی مرحله آخر لایه گلبول های قرمز از کف میکروتیوپ خارج شده و باقی مانده سلول های زنده ماکروفاژ های کلیه قدامی بودند.

تعیین میزان زندهمانی ماکروفاژ ها: بعد از استخراج ماکروفاژ ها برای اطمینان از تراکم و زنده بودن آن ها از رنگ آمیزی حیاتی Trypan blue استفاده شد. تریپان بلو 0/2% با ماکروفاژ های جداسازی و خالص سازی شده مخلوط شده و ماکروفاژ های زنده با استفاده از لام نئوبار و با بزرگنمایی 400 میکروسکوپ فاز کنتراست شمارش شده و نسبت ماکروفاژ های زنده و مرده و درصد بقای ماکروفاژ ها مشخص گردید. ارزیابی فاگوسیتوزیس ماکروفاژ ها با روش Secombes (1990) با اعمال تغییراتی به روش زیر انجام گردید:

1- کشت 6 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 5×10^7 CFU/ml تنظیم گردید.

2- سرم چندین ماهی قزل آلائی رنگین مخلوط و در 58 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه حرارت داده شد تا کمپلمان سرم غیر فعال شود.

3- ماکروفاژ های کلیه قدامی طبق روش گفته شده در بالا استخراج و شمارش گردید و در غلظت تعدد باکتری در میلی لیتر یا 5×10^6 CFU/ml تنظیم شد.

4- مخلوطی از 0/4 میلی لیتر از سرم غیر فعال رقیق شده با محیط RPMI (نسبت 1 به 5) و 0/2 میلی لیتر از باکتری آماده سازی شده و 0/1 میلی لیتر ماکروفاژ مخلوط گردید و اضافه کردن محیط RPMI به حجم 1 میلی لیتر رسانده شد.

5- بعد از 60 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه میزان فاگوسیتوزیس با شمارش تعداد باکتری های زنده نسبت به نمونه های فاقد ماکروفاژ گزارش گردید. نهایتاً نسبت فاگوسیتوزیس باکتری ها با مقایسه تعداد باکتری زنده شمارش شده در تیمار های با گروه شاهد بدون سلول بیگانه خوار مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها: برای آنالیز داده های به دست آمده از نرم افزار SPSS نسخه 19 استفاده گردید. ابتدا از آزمون Leven statistic test برای نرمالیتی و همگن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده شد و از آزمون تی تست مستقل برای بررسی تفاوت میانگین تیمار های واکسینه و غیر واکسینه استفاده گردید.

نتایج

نتایج تغییرات پارامترهای خونی متعاقب واکسیناسیون ماهی قزل آلائی رنگین کمان در جدول 1 آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد گلبول های قرمز خون و هماتوکریت و هموگلوبین در بین دو تیمار در روزهای مختلف نمونه برداری اختلاف معنی دار نشان نداشتند ($p > 0/05$)، اما



تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشدند). میزان بیگانه‌خواری لکوسیت‌های کلیه قدامی در شکل 1 آورده شده است.

کارایی بیگانه‌خواری لکوسیت‌های کلیه قدامی در تیمار شاهد و تیمار ایمن شده بسیار مناسب بوده و بیش از 90 درصد باکتری‌های مجاور شده با لکوسیت‌ها 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 ($P>0/05$). در روز 45 و 60 نمونه‌گیری علی‌رغم کاهش کلی توان بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها نسبت به دو مرحله قبل، کاهش این توان نسبت به دو مرحله اول قابل مشاهده بود.

تعداد گلبول‌های سفید خونی در گروه واکسینه نسبت به گروه شاهد در مراحل مختلف نمونه‌گیری اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P>0/05$) به‌طوری‌که بالاترین تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه واکسینه و در 14 روز بعد از واکسیناسیون اولیه مشاهده شد. همچنین در تمام مراحل نمونه‌برداری افزایش میزان فعالیت لایزوزیم در تیمار واکسینه نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید ($P<0/05$). بیش‌ترین میزان لایزوزیم در روز 45 روز بعد از واکسیناسیون اولیه مشاهده گردید (جدول 2). 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 معنی‌داری را نشان داد ($P>0/05$) (جدول 2). میزان زنده‌مانی لکوسیت‌های کلیه قدامی استخراجی در تمام نمونه‌های گرفته شده بیش از 95 % بوده و

جدول 1: نتایج حاصل از نمونه‌گیری روزهای مختلف شاخص‌های خونی ماهی و مقایسه آن با تیمار شاهد

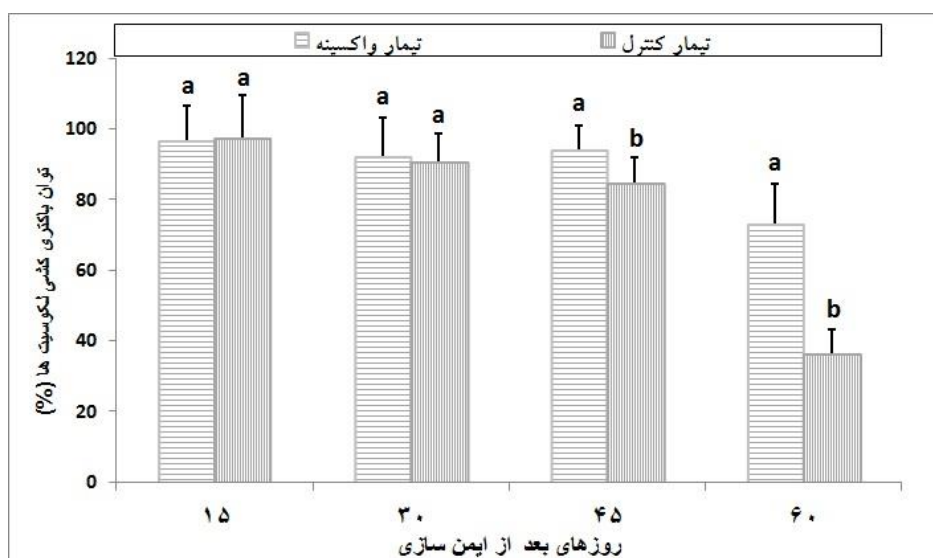
پارامتر	تیمار	روز 0	روز 14	روز 30	روز 45	روز 60
Hct (%)	واکسینه	43/3±3 ^a	25±2 ^a	31/7±4 ^a	38/3±9 ^a	34/4±2 ^a
	شاهد	30/1±7 ^a	25/2±6 ^a	26/1±4 ^a	27/6±4 ^a	30/3±3 ^a
Hb (g/dl)	واکسینه	6/4±0/25 ^a	6/01±0/9 ^a	5/8±0/8 ^a	5/9±1 ^a	6/04±2 ^a
گرم در دسی لیتر	شاهد	5/5±0/12 ^a	5/76±0/2 ^a	5/01±0/9 ^a	5/4±0/09 ^a	5/5±0/19 ^a
RBC (10 ⁶ /μL ⁻¹)	واکسینه	1/5±0/1 ^a	1/37±0/1 ^a	1/79±0/3 ^a	1/4±0/22 ^a	1/5±0/1 ^a
	شاهد	1/8±0/3 ^a	1/45±0/2 ^a	1/2±0/09 ^a	0/9±0/1 ^a	1/8±0/2 ^a
WBC (10 ³ /μL ⁻¹)	واکسینه	4/2±0/1 ^a	8/6±0/9 ^a	6/8±0/2 ^a	4/8±0/09 ^a	7/2±0/05 ^a
	شاهد	3/7±0/7 ^a	4/2±0/23 ^b	3/5±0/09 ^b	3/2±0/06 ^b	3/1±0/3 ^b

اطلاعات براساس (خطای استاندارد-دیمیانگین) آورده شده است. حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح 0/05 با تیمار شاهد در هر پارامتر است.

جدول 2: نتایج حاصل از نمونه‌گیری روزهای مختلف شاخص‌های ایمنی ماهی و مقایسه آن با تیمار شاهد

پارامتر	تیمار	روز 0	روز 14	روز 30	روز 45	روز 60
فعالیت لایزوزیم	واکسینه	145/7±12 ^a	184/2±12 ^a	233/9±21 ^a	163/7±2 ^a	159/4±12 ^a
سرم	شاهد	141/7±13 ^a	143/7±12 ^b	123/8±15 ^b	144/6±9 ^b	132/1±11 ^b
فعالیت کمپلمان سرم	واکسینه	33/1±7 ^a	42/2±7 ^a	43/5±2 ^a	39/4±6 ^a	44/4±4 ^a
	شاهد	29/7±2 ^a	24/8±2 ^b	22/1±3 ^b	26/2±3 ^b	24/1±6 ^b

اطلاعات براساس (خطای استاندارد-دیمیانگین) آورده شده است. حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح 0/05 با تیمار شاهد در هر پارامتر است.



شکل 1: توان باکتری‌کشی لکوسیت‌ها در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری 60 دقیقه بعد از انکوبه کردن سلول‌های فاگوسیت‌کننده 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, 2001). واکسیناسیون یکی از موفق‌ترین روش‌ها در پیشگیری از بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلاست (Pridgeon و Klesius, 2011). با این حال 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 همورال سیستم ایمنی غیر اختصاصی است که منجر به شکسته شدن پیوند بتا 1-4 بین آن-استیل مورامیک اسید و آن-استیل گلوکز آمین در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت می‌گردد و بدین صورت باعث تخریب دیواره سلولی آن‌ها می‌شود همچنین موجب افزایش فعالیت بیگانه‌خواری و نیز نقش اپسونین (شامل کمپلمان و آنتی‌بادی) در ماهی را داراست (Ellis, 1990). 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, 2003). Choi و همکاران (2008) گزارش کرده‌اند که افزایش میزان لایزوزیم یکی از مهم‌ترین شاخص‌های نشان‌دهنده کارایی سیستم ایمنی ماهی است. در مطالعه‌ای سلطانی و همکاران (2007) 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 (2010) و علیشاهی و همکاران (1395) افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی کپور ایمن شده با باکتری کشته آنروموناتس 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 غیر اختصاصی 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, 1990). فعالیت سیستم کمپلمان در ماهی یکی از شاخص‌های مهم ایمنی غیر اختصاصی 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 (2010) عدم تاثیر ایمنی‌سازی بر فعالیت کمپلمان سرم را گزارش نموده‌اند، هرچند Soltani و همکاران (2007) افزایش فعالیت کمپلمان سرم در ماهیان ایمن شده با باکتری فرمالینه/استرپتوکوکوس/اینیه به‌روش تزریق داخل صفاقی در ماهی قزل-آلا را گزارش نمودند. همچنین Wang و همکاران (2016) گزارش کرده‌اند که ایمنی‌سازی گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) با واکسن تحت واحد/استرپتوکوکوس/اینیه موجب افزایش در فعالیت کمپلمان گردیده است. 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 بیگانه-خواری 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 بیگانه-خواری لکوسیت‌های کلیه قدامی تا 60 روز بعد از واکسیناسیون بود. علی‌رغم این‌که توان بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها از شاخص-های ایمنی غیر اختصاصی می‌باشد و تحت تاثیر مستقیم ایمن سازی با آنتی‌ژن مشخص قرار نمی‌گیرد، ولی افزایش قدرت بیگانه‌خواری لکوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد تا دو ماه بعد از واکسیناسیون نشان‌دهنده تاثیر واکسیناسیون بر ایمنی غیر اختصاصی از طریق سابتوکی‌های ایمنی و تاثیر سلول‌های خاخره ایمنی در تکامل و فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار می‌باشد. فاگوسایتوزیس اولین سد دفاعی بدن بعد از موانع مخاطی در برابر عوامل بیماری‌زا است 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, 1984). سلول‌های فاگوسیت‌کننده، 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, 1994؛ 1995). همچنین Huang و همکاران (2014) 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 45 روز بعد از ایمن سازی را باعث می‌شود. Anderson و Jeney (1991) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند که سلول کشته باکتری *اثرموناس سالمونیسیدا* باعث افزایش فعالیت فاگوسایتوزیس و در نتیجه ارتقا سیستم ایمنی ذاتی ماهی می‌گردد. در تحقیقی مشابه Figueras و همکاران (1997) تجویز تزریقی باکتری *Photobacterium damsela* غیر فعال شده با فرمالین را موجب افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده تا 20 روز در



کفشک ماهی (*Scophthalmus maximus*) دانستند. Li و همکاران (2016) 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 نوتروفیل‌ها بعد از ایجاد التهاب در ماهی متحمل تغییراتی می‌گردد (Suzuki و Hibiya، 1986؛ MacArthur و همکاران، 1984). 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 بوده است، 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 (1995) نیز با تزریق آنتی‌ژن باکتریایی و بیریو دامسلا (*Vibrio damsela*) به کفشک ماهی و افزایش تعداد نوتروفیل در خون محیطی و ماکروفاژها در کلیه 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 فاگوسیتوزیس لکوسیت‌های کلیه قدامی در طی دوره 60 روزه تحقیق افزایش نشان داد. به‌طوری‌که میزان فعالیت فاگوسیتوزیس لکوسیت‌ها در روز 45 و 60 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 30 تحقیق این امتداد اثر بیش‌تر خواهد شد. در تحقیقات دیگر نیز امتداد اثر افزایشی واکسیناسیون بر فعالیت فاگوسیتوزیس سلول‌های بیگانه‌خوار تا دو ماه نیز گزارش شده است (Huang و همکاران، 2014؛ Andrew و همکاران، 2002). 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/استرپتوکوکوزیس/اِپِیِه داشت. هرچند در مورد برخی باکتری‌ها مثل *آنروموناتس هیدروفیل* 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 (1386) افزایش جمعیت کل لکوسیت‌ها در گروه‌های ایمن شده با باکتری فرمالینه/استرپتوکوکوزیس/اِپِیِه به‌روش تزریقی و غوطه‌وری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تا 6 هفته را گزارش نمودند. در

تحقیقی دیگر McNulty و همکاران (2003) در ماهی تیلاپیا افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید خونی را به‌دنبال ایمن‌سازی ماهی با باکترین *استرپتوکوکوس اینیابی* 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 (2008) عدم تأثیر ایمن‌سازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر استرپتوکوکوزیس به‌همراه آلژینک اسید را بر شاخص‌های خونی گزارش کردند. همچنین Alishahi و همکاران (2010) نیز ایمن‌سازی ماهی کپور معمولی با باکترین *آنروموناتس هیدروفیل* را بدون تأثیر معنی‌دار بر شاخص‌های خونی (هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز و ایندکس‌های گلبولی) دانستند. در مطالعه‌ای دیگر Alishahi و همکاران (2014) عدم تأثیر ایمن‌سازی با باکترین *آنروموناتس هیدروفیل* 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 تأثیر 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 استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌روش به‌کار رفته در این تحقیق در القای پاسخ ایمنی، به‌ویژه قدرت فاگوسیتوزیس سلول‌های بیگانه‌خوار نقش موثری داشته و این اثر تا دو ماه بعد از تجویز نیز امتداد دارد. هرچند این روش تجویز واکسن تأثیری 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

1. علیشاهی، م.؛ سعیدی‌منش، م.؛ مصباح، م. و زارعی، م.، 1395. بررسی اثر نانوکیتوزان بر ایمنی‌زایی واکسن خوراکی *آنروموناتس هیدروفیل* در ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. سال 12، شماره 1، صفحه 53 تا 65.
2. سلطانی، م.؛ علیشاهی، م.؛ خضرائی‌نیا، پ.؛ ربانی، م. و ستاری، ا.، 1386. مطالعه برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به برخی آنتی‌ژن‌های *استرپتوکوکوس اینیِه*. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره 62، شماره 1، صفحات 23 تا 38.
3. قیاسی، م.؛ زاهدی، آ. و خوشیاور رستمی، ح.، 1379. بروز ابیدمی استرپتوکوکوزیس در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان مازندران. اولین همایش بهداشت و بیماری‌های آبزیان ایران، اهواز. صفحه 59.
4. Alishahi, M.; Esmaeili Rad, A.; Zarei, M. and Ghorbanpour, M., 2014. Effect of dietary chitosan on immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio*.

25. Santarém, M.M. and Figueras, A., 1995. Leucocyte numbers and phagocytic activity in turbot *Scophthalmus maximus* following immunization with *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida* O-antigen bacterins diseases of aquatic organisms. Vol. 23, pp: 213-220.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Soltani, M.; Jamshidi, Sh. 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: 95-107.
30. 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*. Vol. 30, pp: 49-58.
31. Suzuki, Y. and Hibiya, T., 1986. Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. *Fish Path.* Vol. 23, pp: 179-184.
32. 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.
33. Vendrell, D.; Balcazar, J.L.; Ruiz-Zarzuela, I.; Ignacio, d.B.; Girones, O. and Muzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: Review. *Comparative Immunol Microbiol Infectious Dis*. Vol. 29, pp:177-198.
34. 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.
- Iranian Journal of Veterinary Medicine. Vol. 8, No. 2, pp: 125-133.
5. Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Razijalali, M., 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Researches*. Vol. 4, No. 3, pp: 85-91.
6. 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.
7. Andrew, C.; celine, 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.
8. Barta, O., 1993. *Veterinary clinical immunology laboratory*. Bar-Lab Inc. 350 P.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Choi, S.H.; Park, K.H.; Yoon, T.J.; Kim, J.B.; Jang, Y.S. and Choe, C.H., 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 24, pp: 67-73.
13. 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.
14. Faghani, T.; Azari Takami, Gh.; Kousha, A. and Faghani, S., 2008. Surviving on Alginate acid and anti-streptococcus vaccine effect on the growth performance, survival rate, hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Journal of Zoology*. Vol. 3, No. 2, pp: 54-58.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. MacArthur, J.I.; Fletcher, T.C.; Pirie, B.; Davidson, R.J.L. and Thompson, A.W., 1984. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *J Fish Biol*. Vol. 25, pp: 69-81.
20. 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.
21. 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.
22. Romalde, J.L.; Luzardo-Alvarez, A.; Ravelo, C.; Toranzo, A.E. 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.
23. 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.
24. 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.

