



Original Research Paper

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

Somayeh Namrudi ¹, Siamak Yousefi Siahkalroodi ², Ali Hajibaglu ³, Mohammad Mazandarani ^{3*}

¹ Department of Environmental Sciences, Faculty of Environment and Fisheries, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran

² Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran

³ Department of Fisheries, Faculty of Environment and Fisheries, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran

Key Words

Immunity
Streptococcus
Lactococcus
 Vaccination
 Rainbow trout

Abstract

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

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

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

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

* Corresponding Author's email: mazandarani57@gmail.com

Received: 27 April 2023; Reviewed: 30 May 2023; Revised: 4 August 2023; Accepted: 3 September 2023

(DOI): [10.22034/AEJ.2023.406674.3008](https://doi.org/10.22034/AEJ.2023.406674.3008)

مقاله پژوهشی

اثرات واکسن دو سویه استرپتوکوکوزیسی (*Lactococcus garvieae*/*Streptococcus iniae*) در بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر برخی شاخص های ایمنی

سمیه نمرودی^۱، سیامک یوسفی سیاه کلودی^۲، علی حاجی بگلو^۳، محمد مازندران^{۳*}

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

کلمات کلیدی

چکیده

ایمنی
 استرپتوکوکوس
 لاکتوکوکوس
 واکسیناسیون
 قزل آلائی رنگین کمان

مقدمه: استرپتوکوکوزیسی یکی از شایع ترین بیماری باکتریایی مزارع سردابی کشور است که همه ساله خسارت فراوانی به این مزارع وارد می سازد و واکسیناسیون می تواند در کنترل این بیماری بسیار موثر باشد. در بررسی حاضر کارایی واکسن دو گانه استرپتوکوکوس/ لاکتوکوکوس در دو روش تزریقی و حمام در بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزیابی قرار گرفت. **مواد و روش کار:** به این منظور چهار گروه آزمایشی شامل گروه ماهیان واکسینه شده یک مرحله ای به روش حمام، گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله ای به روش حمام، گروه ماهیان محیط هایپر اسموتیک + واکسن دو مرحله ای به روش حمام و گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و یک گروه شاهد در نظر گرفته شد. در این راستا ۳۵۰ عدد ماهی با میانگین وزنی ۴/۲±۰/۳۶ در ۱۰ تراف (دو تکرار) تقسیم شده و به مدت دو ماه مورد پرورش و آزمایش قرار گرفتند در این بررسی ۵ گروه آزمایشی شامل گروه شاهد، گروه ماهیان یک مرحله ای واکسیناسیون به روش حمام، گروه ماهیان دو مرحله ای واکسیناسیون به روش حمام، گروه ماهیان واکسینه محیط هایپر اسموتیک + واکسینه دو مرحله ای به روش حمام و ماهیان گروه واکسیناسیون به روش تزریق یک مرحله ای در نظر گرفته شده و به دو روش حمام و تزریق مورد واکسیناسیون قرار گرفتند.

نتایج: براساس نتایج مقادیر پروتئین کل سرم در ماهیان واکسینه شده بالاتر از ماهیان گروه شاهد بود و براساس بررسی های آماری بالاترین میزان برای گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و حمام دو مرحله ای هایپر اسموتیک + واکسن بود. مقادیر گلوکز نیز در هر دو گروه ماهیان واکسینه دو مرحله ای و نیز روش تزریق بالاتر از بقیه گروه های آزمایشی اندازه گیری شد. مقادیر ALP، ALT و AST در ماهیان گروه تزریق بالاتر از سایر گروه ها ثبت شد. در نهایت تیتراژ آنتی بادی سرمی برای هر دو باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه برای ماهیان گروه تزریق و دو گروه حمام دو مرحله ای بالاتر از ماهیان واکسینه یک مرحله ای بود. در عین حال هیچ تیتراژی برای ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری: براساس نتایج دو مرحله حمام واکسن تیتراژی آنتی بادی برابر با روش تزریقی در ماهی ایجاد می کند در عین حال آسیب های کبدی کمتری در مقایسه به روش تزریقی در ماهی به همراه داشت. به همین دلیل در شرایطی که ماهیان در استرس قرار دارند واکسیناسیون به روش حمام به همراه واکسن یادآور می تواند کارایی مطلوبی را داشته باشد.

مقدمه

شده همواره پیشگیری روش بهتر و کم هزینه‌تری است روش‌های مختلفی برای پیشگیری پیشنهاد شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کنترل شرایط محیطی، استفاده از محرک‌ها و تقویت کننده‌های ایمنی و نیز واکسیناسیون اشاره نمود (۲۱). واکسیناسیون یکی از شایع‌ترین روش‌های کنترل بیماری در مدیریت بهداشتی است که معمولاً با توجه به بیماری‌های شایع منطقه برای مزارع در نظر گرفته می‌شود، کارایی واکسیناسیون در آبزیان هنوز به رضایت‌بخشی واکسیناسیون در پستانداران و طیور نرسیده است به همین دلیل بررسی‌های متعددی بر روی افزایش کارایی واکسن در ماهیان صورت گرفته و در حال انجام است (۳). در مجموع می‌توان گفت یکی از روش‌های مرسوم در کنترل بیماری‌ها استفاده از واکسیناسیون است که امروزه در صنعت آبی‌پروری به سرعت در حال توسعه است و در بچه‌ماهیان و مولدین مورد استفاده قرار گرفته و حتی گزارشاتی در رابطه با انتقال آنتی‌بادی از مولدین واکسینه شده به بچه‌ماهیان نیز موجود است (۱۵). واکسیناسیون در آبزیان به روش‌های مختلفی از جمله روش تزریق، روش خوراکی و روش حمام صورت می‌گیرد و کارایی روش تزریقی را از همه بالاتر عنوان می‌کنند اما به دلیل وجود مشکلاتی هم چون استرس ناشی از تزریق و نیز ضرورت به کارگیری نیروی متخصص، پرورش دهندگان به استفاده از روش حمام استقبال بیش‌تری نشان داده‌اند. کارایی واکسیناسیون به روش حمام نیز می‌تواند تحت تاثیر شرایط مختلف قرار بگیرد مثلاً دوز باکتری سوسپانسیون شده، زمان واکسیناسیون، وضعیت استرسی ماهیان، گونه ماهی و غیره می‌تواند بر روی عملکرد واکسن تاثیر بگذارد (۴). در عین حال به کارگیری روش‌هایی برای افزایش عملکرد واکسیناسیون توسط برخی محققین پیشنهاد شده است که یکی از این روش‌ها استفاده از محیط‌های پرموتیک و سپس انجام واکسیناسیون است. (۸). در بررسی حاضر وضعیت عملکرد واکسن دوگانه *استرپتوکوکوس اینیایی* / *لاکتوکوکوس گارویه* در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه‌ماهی و شرایط پرورش: برای انجام آزمایش تعداد ۳۵۰ عدد ماهی با میانگین وزنی $4/2 \pm 0/36$ گرم تهیه شده و به منظور سازگاری با شرایط آزمایش به مدت یک هفته در حوضچه ۵۰۰ لیتری نگهداری شدند پس از یک سازگاری اولیه ماهیان مذکور در ۱۰ تراف ۲۰۰ لیتری تقسیم شدند (۳۵ ماهی در هر تراف) و به منظور سازگاری با شرایط آزمایش مدت یک هفته دیگر مورد پرورش قرار گرفتند و پس از سازگاری و تیمار بندی آزمایش عملکرد واکسیناسیون در

در سال‌های اخیر آبی‌پروری از توسعه فراوانی برخوردار شده و تبدیل به یکی از صنایع بسیار گسترده جهانی شده است همگام با این توسعه نیاز به تحقیقات علمی و نوآوری ضرورت می‌یابد (۲). این توسعه با افزایش تولیدات در واحد حجم همراه بوده است و به تبع آن مزارع پرورش متراکم ماهیان با مشکلات استرس‌زای فراوانی همراه گردید، یکی از این درگیری‌ها در مزارع پرورش متراکم شیوع بیماری‌های باکتریایی است (۷). استرپتوکوکوزیس یکی از بیماری‌های باکتریایی شایع در مزارع آبزیان است که سالیانه خسارات فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد به عنوان مثال در سال ۲۰۰۸ میلادی خسارتی در حدود ۲۵۰ میلیون دلار در رابطه با این بیماری در مزارع آبی‌پروری کشور آمریکا گزارش شده است، این بیماری تاکنون تقریباً از اکثر نقاط دنیا و بسیاری از ماهیان دریایی و آب شیرین گزارش شده است و در برخی موارد منجر به تلفات بیش از ۵۰ درصد در مزارع گردیده است (۷). استرپتوکوزیس هم به صورت حاد و هم به صورت مزمن در مزارع ماهیان مختلف بروز پیدا نموده و با علائم بسیار گسترده‌ای همراه است، در بروز این بیماری علاوه بر گونه‌های مختلف *استرپتوکوکوس* (*Streptococcus*) گروه دیگری از باکتری‌ها از قبیل *لاکتوکوکوس* (*Lactococcus*)، *واگوکوکوس* (*Vagococcus*) و *انتروکوکوس* (*Enterococcus*) نیز بیماری‌هایی مشابه ایجاد می‌کنند که همه بیماری‌های ناشی از این باکتری‌ها را استرپتوکوزیس در نظر گرفته می‌شود (۱۹). علائم کلینیکی بسیار گسترده‌ای برای این بیماری ثبت شده است که از آن جمله می‌توان به اگزوفتالمی، تجمع مایعات در محوطه شکمی، بی‌حالی و بی‌اشتهایی، خونریزی گسترده در پوست، مغز، کلیه، کبد، دستگاه گوارش، چشم و اندام داخلی اشاره نمود این علائم بسته به گونه ماهی، سن ماهی، سایز و حدت سویه باکتری بیماری‌زا می‌تواند متفاوت باشد (۶، ۱۵). این بیماری در ایران اولین بار در مزارع ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش گردید و تاکنون در کشور تنها دو گونه *استرپتوکوکوس اینیایی* (*S. iniae*) و *لاکتوکوکوس گارویه* (*L. garvieae*) از بیماری‌های مزارع آبزیان جداسازی شده است که همه ساله خسارت اقتصادی فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد (۱۹). پس از بروز بیماری یکی از راهکارهای مرسوم کنترل بیماری استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است که خود با مشکلاتی همراه است به عنوان مثال در کنار گران بودن داروها و هزینه بالای آن، ماهیان بیمار معمولاً دچار بی‌اشتهایی شده و در نتیجه افزودن دارو به غذا در بسیاری موارد با دریافت دارو توسط همه ماهیان همراه نیست از طرفی استفاده از روش حمام و یا تزریق نیز با استرس و مشکلات دیگری همراه است (۱۸). بنا به دلایل یاد

هر تیمار) صورت گرفت. به این منظور ماهیان با مجدداً با محلول یوجینول (۱۰۰ میلی گرم/لیتر) بی هوش شده و خونگیری با سرسوزن گیج ۲۵ از ساقه دمی صورت گرفت.

تیترا آنتی بادی در برابر باکتری *یرسینیا راکری* به روش

میکرواگلوتیناسیون: برای اندازه گیری تیترا آنتی بادی به روش Swain و همکاران، در ابتدا به میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم به تمام گوده های پلیت میکرو آگلوتیناسیون اضافه شد (۱۷). سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر از سرم به اولین گوده اضافه شده و رقت هایی بر مبنای دو از گوده اول تا آخرین گوده هر سری ساخته شد. رقت سوسپانسیون باکتریایی در این آزمایش $10^9 \times 1/5$ CFU/ml بوده و پس از اضافه شدن این سوسپانسیون پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. عدد نهایی به صورت لگاریتم در مبنای ۲ عکس بالاترین رقتی که آگلوتیناسیون داده بود بیان گردید (۱۶).

نحوه آماده سازی باکتری ها برای تیترا آنتی بادی: برای ارزیابی

مقاومت گروه های مختلف ماهیان واکسینه شده و غیرواکسینه از سویه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با کد PTCC 1887 (Mazandarani) و باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* با کد PTCC 1884 (Mazandarani) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید. این باکتری ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط نوترینت براس (Nutrient Broth) غنی سازی شدند و سپس به صورت کشت سطحی بروی محیط نوترینت آگار (Nutrient Agar) تلقیح شدند. ۴۸ ساعت پس از کشت، باکتری ها از سطح محیط کشت جمع آوری شده از آن سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید. بار باکتریایی سوسپانسیون به روش کدورت سنجی و براساس جدول استاندارد مک فارلند و دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۴۰ نانومتر و OD برابر با یک تنظیم گردید. این کدورت در حدود 10^8 باکتری در نظر گرفته شد. هم زمان از سوسپانسیون های مذکور در چند رقت سریالی کشت سطحی داده شده و بار باکتریایی آن ها براساس CFU تایید گردید.

اندازه گیری پارامترهای سرمی: ابتدا ماهیان با ۱۰۰ ppm

یوجینول بی هوش شدند و اخذ نمونه های خون از قسمت ساقه دمی ماهیان توسط سرنگ ۲۱ گیج انجام شد. نمونه ها در میکروتیوپ های فاقد ماده ضد انعقاد قرار گرفتند. سرم خون قسمتی از نمونه ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm) جدا شده و توسط سمپلر به میکروتیوپ های جدید منتقل شد. فاکتورهای بیوشیمیایی خون شامل: گلوکز، پروتئین کل، آلومین، گلوکز، ALP، AST و ALT توسط کیت های شرکت پارس آزمون اندازه گیری شدند. در این آزمایش اندازه گیری پروتئین کل و آلومین در سرم خون با استفاده از کیت های پارس آزمون و به روش نورسنجی (اسپکتروفوتومتری)

ماهیان مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مدت ماهیان ۴ بار در روز با جیره خوراکی شرکت فردانه (جدول ۱) غذایی شدند. دمای آب $13 \pm 1/3$ درجه سانتی گراد، سختی آب برابر با $58/3 \pm 0/33$ میلی گرم/لیتر، pH برابر $7/1 \pm 0/1$ اندازه گیری گردید. دبی آب ورودی نیز برای هر تراف حدود ۳ لیتر در دقیقه بود.

جدول ۱: آنالیز شیمیایی و مشخصات خوراک اکستروود ماهی قزل آلا در بررسی حاضر (مربوط به شرکت فردانه)

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

تیمار بندی و طرح آزمایش: در این بررسی ۵ گروه آزمایشی

در دو تکرار در نظر گرفته شد که به ترتیب شامل گروه شاهد، گروه ماهیان یک مرحله ای واکسیناسیون به روش حمام، گروه ماهیان دو مرحله ای واکسیناسیون به روش حمام، گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله ای به روش حمام و ماهیان گروه واکسیناسیون به روش تزریق یک مرحله ای در نظر گرفته شد. واکسن مورد استفاده در این بررسی واکسن دوگانه *استرپتوکوکوس اینیایی/لاکتوکوکوس گارویه* (گاروواک) ساخت شرکت بوژان تک فارمد بود. این واکسن به صورت سوسپانسیون باکتری غیرفعال بوده (با غلظت 10^8 باکتری/میلی لیتر) براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده، واکسن به میزان ۰/۱ با آب پرورش رقیق شده (یک لیتر واکسن در ۹ لیتر آب) و به مدت ۳ دقیقه برای روش حمام مورد استفاده قرار گرفت. برای گروه واکسیناسیون به روش هایپراسموتیک+ واکسیناسیون در ابتدا ماهیان هر تیمار به مدت ۱۰ دقیقه در محیط آب نمک ۱۵ گرم/لیتر قرار داده شده و بلافاصله بعد از آن واکسیناسیون به روش حمام صورت گرفت. در ماهیان گروه تزریق نیز به هر کدام از ماهیان ۰/۱ سی سی از واکسن روش صفاقی تزریق شد. در این راستا در ابتدا ماهیان با یوجینول (۱۰۰ میلی گرم/لیتر) بی هوش شده و ۰/۱ سی سی از واکسن با کمک سرنگ و سرسوزن انسولینی (سرسوزن گیج ۳۰) در ناحیه صفاق ماهیان تزریق صورت گرفت. در گروه های ماهیانی که دو مرحله واکسیناسیون داشتند، مرحله دوم واکسیناسیون به روش حمام ۲۱ روز پس از مرحله اول، تکرار گردید. چهار هفته بعد از مرحله دوم واکسیناسیون نمونه برداری از ماهیان (۱۲ ماهی از

شد ($P \leq 0.05$) در حالی که پروتئین کل در ماهیان گروه تزریق و گروه هایپرآسموتیک+ حمام اختلاف معنی داری نداشت. همچنین اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و ماهیان یک مرحله واکسینه شده به روش حمام در مقادیر پروتئین کل ثبت نشد (جدول ۲). بالاترین مقادیر آلبومین سرم نیز در ماهیان واکسینه شده به روش تزریق ثبت گردید و پایین مقادیر مربوط به گروه واکسینه شده دو مرحله‌ای حمام+ هایپرآسموتیک بود (شکل ۱). همچنین در بررسی حاضر در ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و گروه‌های واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام مقادیر گلوکز سرم به طور معنی داری ($P \leq 0.05$) بالاتر از ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای و ماهیان گروه شاهد اندازه‌گیری گردید (شکل ۲). در این بررسی مقادیر ایمنوگلوبولین سرم در تمامی ماهیان واکسینه شده بالاتر از گروه شاهد بود و همچنین بالاترین مقادیر سرمی در گروه تزریق و ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای محیط هایپرآسموتیک+ واکسن اندازه‌گیری و ثبت گردید (جدول ۲).

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

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

نتایج

نتایج حاصل از بررسی‌های سرمی در گروه‌های مختلف واکسینه شده به روش حمام و تزریق در جدول ۲ و شکل‌های ۱ تا ۵ آورده شده است. براساس این نتایج مقادیر پروتئین کل سرم در ماهیان گروه‌های ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و گروه حمام+ محیط هایپرآسموتیک به طور معنی داری از ماهیان سایر گروه‌ها بالاتر اندازه‌گیری

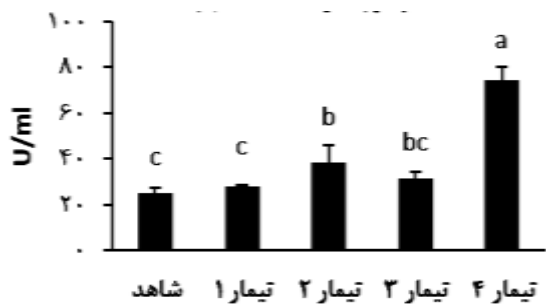
جدول ۲: مقادیر برخی پارامترهای سرمی در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

تیمار ۴	تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	گروه شاهد	
۴/۴ ± ۰/۴ ^a	۴/۱۳ ± ۰/۱۳ ^a	۳/۲۶ ± ۰/۱۱ ^b	۲/۵۷ ± ۰/۱۵ ^c	۲/۴۹ ± ۰/۲۳ ^c	پروتئین کل (میلی گرم/دسی لیتر)
۲/۲۴ ± ۰/۱۲ ^a	۰/۸۷ ± ۰/۰۲ ^c	۱/۳ ± ۰/۳۳ ^b	۱/۶۴ ± ۰/۱۱ ^b	۱/۰۸ ± ۰/۰۲ ^{bc}	آلبومین (میلی گرم/دسی لیتر)
۲/۵۶ ± ۰/۳۶ ^a	۲/۲۳ ± ۰/۴۷ ^{ab}	۱/۹۲ ± ۰/۱۷ ^b	۱/۹۱ ± ۰/۳ ^b	۱/۳۴ ± ۰/۱۷ ^c	ایمنوگلوبولین کل (میلی گرم/دسی لیتر)
۴۲/۴۶ ± ۱/۰۵ ^a	۴۲/۲۷ ± ۱/۰۳ ^a	۴۷/۰۸ ± ۳/۱۵ ^a	۳۲/۳ ± ۲/۱۴ ^a	۳۴/۳۶ ± ۳/۲ ^a	گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)

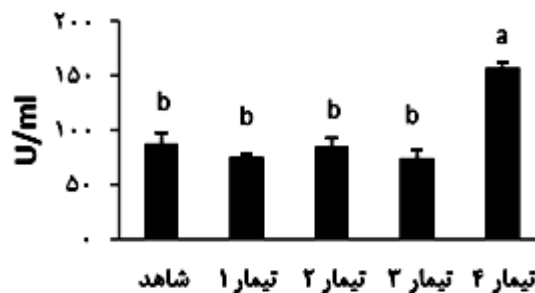
گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار ۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار ۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای حمام هایپرآسموتیک+ واکسینه، تیمار ۳: گروه محیط دو مرحله‌ای حمام و تیمار ۴: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق

۴ و ۵ مشاهده می‌شود در تمامی ماهیان واکسینه شده آگلوتیناسیون باکتری/استریپتوکوکوس/اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه مشاهده شد، در عین حال هیچ تیتري در ماهیان گروه شاهد برای دو باکتری یاد شده ثبت نگردید. براساس این نتایج در تمام ماهیان واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای، ماهیان واکسینه شده در محیط هایپرآسموتیک + حمام دو مرحله‌ای و ماهیان واکسینه شده به روش تزریق تیتري آنتی‌بادی به طور معنی داری بالاتر از ماهیان گروه واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای برای باکتری/استریپتوکوکوس/اینیایی (شکل ۵) و باکتری/لاکتوکوکوس گارویه (شکل ۴) اندازه‌گیری شد ($P \leq 0.05$). در این بررسی تیتري آنتی‌بادی باکتری‌های یاد شده برای ماهیان گروه‌های واکسینه حمام دو مرحله‌ای و گروه تزریق اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$).

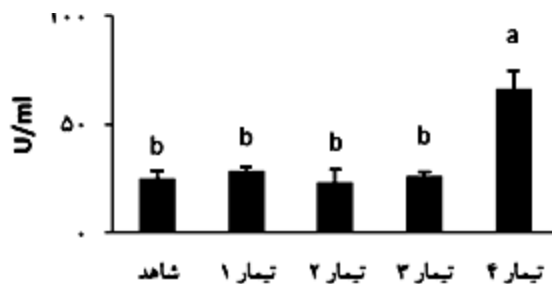
نتایج حاصل از بررسی برخی آنزیم‌های در ارتباط با آسیب‌های کبدی-کلیوی در شکل‌های ۱ تا ۳ قابل مشاهده است در بررسی مقادیر آلکالین فسفاتاز (ALP) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در ماهیان تغذیه شده به روش تزریق به طور معنی داری ($P \leq 0.05$) بالاتر از سایر گروه‌ها ثبت گردید و در عین حال اختلاف معنی داری بین سایر گروه‌های واکسینه شده به روش حمام و نیز گروه شاهد مشاهده نشد (شکل‌های ۱ و ۳). در بررسی مقادیر آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) سرم ماهیان بالاترین میزان برای گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق ثبت گردید در عین حال این میزان در ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام بعد از گروه تزریق بالاتر از سایر گروه‌ها بود، در ماهیان گروه شاهد و ماهیان گروه واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای این میزان AST به طور معنی داری پایین‌تر از سایر گروه‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۲). همان گونه که در شکل‌های



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

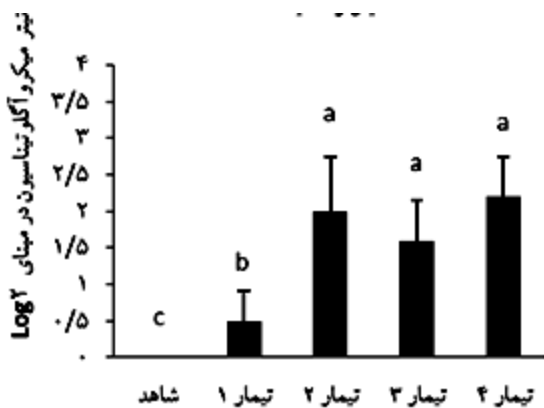


شکل ۱: نمودار مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتاز سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

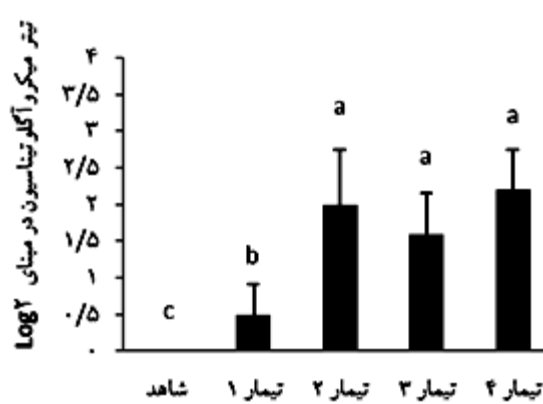


شکل ۳: نمودار مقادیر آنزیم آلانین آمینوترانسفراز سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

گروه شاهد: گروه ماهیان غیرواکسینه، تیمار ۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار ۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای حمام هایپرآسمزتیك+واکسینه، تیمار ۳: گروه محیط دو مرحله‌ای حمام و تیمار ۴: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق



شکل ۵: نمودار تیتراژ آنتی‌بادی استرپتوکوکوس اینیایی به روش میکروآگلوتیناسیون در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده



شکل ۴: نمودار تیتراژ آنتی‌بادی لاکتوکوکوس گارویه به روش میکروآگلوتیناسیون در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

گروه شاهد: گروه ماهیان غیرواکسینه، تیمار ۱: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای، تیمار ۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای حمام هایپرآسمزتیك+واکسینه، تیمار ۳: گروه محیط دو مرحله‌ای حمام و تیمار ۴: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق

بحث

این باکتری‌ها در بیش از ۴۰ گونه ماهی گزارش شده است (۷). تا کنون بیماری‌زایی بیش از ۱۶ گونه‌های باکتریایی متعلق به ۴ جنس *Vagococcus spp*, *Lactococcus spp*, *Straptococcus spp*، *Entrococcus spp* در ماهیان مختلف گزارش شده است (۵). تاکنون تنها دو گونه *L. garvieae* و *S. inaei* از عفونت‌های استرپتوکوکوزیس

استرپتوکوکوزیس یکی از بیماری‌های شایع باکتریایی در ماهیان محسوب می‌شود که با توسعه تولید ماهیان سردابی کشور در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان از استان‌های مختلف گزارش گردید بیماری‌زایی

به‌روش حمام ضروری در نظر گرفت. در بررسی Alishahi و همکاران اثرات واکسن دوگانه *استرپتوکوکوس/لاکتوکوکوس* در سه روش تزریقی، خوراکی و حمام بالاترین میزان ایمنی مربوط به‌روش تزریقی و سپس به‌ترتیب برای روش حمام و خوراکی ثبت گردید در مطالعه مذکور اگرچه عیار آنتی‌بادی در ماهیان واکسینه شده به روش حمام و خوراکی اختلاف معنی‌دار نداشت اما در مواجهه میزان تلفات ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام بالاتر از ماهیان واکسینه شده به‌روش خوراکی بود (۱). در بررسی Khaj و همکاران، واکسن دو گانه *استرپتوکوکوس اینیایی/لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کارآیی قابل قبولی از خود نشان داد (۱۳). در بررسی Karami و همکاران، در ماهیانی که با واکسن دوگانه *استرپتوکوکوس/لاکتوکوکوس* به‌صورت تزریقی واکسینه شده بودند در روز ۱۴ پس از تزریق تا روز ۶۰ اختلاف معنی‌داری در تیتراژ آنتی‌بادی سرمی برای دو باکتری مذکور مشاهده نشد (۱۲) اما در بررسی حاضر برای واکسیناسیون به‌روش حمام تیتراژ آنتی‌بادی برای ماهیانی که یک‌بار واکسینه شده بودند به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق بود اما با به‌کارگیری واکسن یادآور، تیتراژ آنتی‌بادی برای باکتری‌های یاد شده با ماهیان گروه تزریق اختلاف معنی‌دار نداشت (شکل‌های ۴ و ۵). در بررسی دیگری کارآیی واکسن *یرسینیا راکری* به‌طور معنی‌داری با به‌کارگیری محیط هاپیر اسموتیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش داشت به‌طوری‌که میزان تلفات بچه‌ماهیان در مواجهه با باکتری *یرسینیا راکری* در گروه هاپیراسموتیک+ واکسن پایین‌ترین میزان ثبت شده بود هر چند این اختلاف در تیتراژ آنتی‌بادی برای باکتری مذکور در تیمارهای یاد شده اختلاف معنی‌داری نداشت (۱۴). بررسی حاضر در مزرعه و کاملاً سازگار با شرایط محیط پرورش صورت پذیرفت به‌همین دلیل امکان مواجهه باکتریایی در تیمارهای مختلف به‌دلایل بهداشتی و قرنطینه‌ای مهیا نگردید اما در مجموع براساس نتایج می‌توان اعلام نمود به‌کارگیری دو مرحله واکسیناسیون با توجه به آنزیم‌های کبدی مورد بررسی زبانی برای ماهیان نداشته (۹) و تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

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

مزارع ماهیان سردابی کشور جداسازی شده، که همه ساله خسارات فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد (۱۸). به‌کارگیری واکسن *استرپتوکوکوس آگلاکتیه* اولین بار در سال ۱۹۹۵ در ماهی تیلپیا با موفقیت بررسی گردید در گونه‌های دیگر ماهیان نیز کمابیش این واکسیناسیون با موفقیت گزارش گردید (۷). در ایران بسیاری از مزرعه‌داران بنا به دلایل متعدد از جمله افزایش استرس، زمان‌بر بودن، آسیب به ماهیان در صورت استفاده نادرست و هزینه بالا اقبال زیادی برای واکسیناسیون به‌روش تزریق نشان نمی‌دهند و بیش‌تر به‌کارگیری واکسیناسون به‌روش حمام و یا گاهاً خوراکی را ترجیح می‌دهند در این راستا در برخی مطالعات روش‌های مکمل برای افزایش کارآیی واکسیناسیون به‌کار گرفته شده است که یکی از این روش‌ها استفاده از محیط هاپیراسموتیک برای واکسیناسیون به روش حمام است (۳). در بررسی حاضر براساس نتایج تمامی گروه‌های واکسینه شده برای هر دو گونه *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* آنتی‌بادی تولید شده است و همان‌گونه که پیش‌بینی می‌شد در ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای ساده و نیز واکسن+ محیط هاپیراسموتیک در مقایسه با ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای تیتراژ آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر اندازه‌گیری شد و تیتراژی برابر با واکسن تزریقی یک مرحله‌ای ثبت شد در این مطالعه زمان نمونه‌برداری برای ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای ۲۱ روز پس از آخرین واکسیناسیون انجام شد در حالی که نمونه‌برداری برای روش تزریقی یک مرحله‌ای ۴۲ روز بعد از تزریق بود گویای این موضوع می‌تواند باشد که اگرچه واکسیناسیون به‌روش حمام کارآیی روش تزریق را ندارد اما به‌کارگیری واکسیناسیون یادآور کارآیی واکسن را بسیار ارتقا دهد. از طرفی با بررسی آنزیم‌های ALT، ALP و AST می‌توان در رابطه با آسیب‌های احتمالی کلیوی و کبدی تا حد زیادی قضاوت نمود زیرا این آنزیم‌ها به‌عنوان شاخص‌های سلامت کبدی و تا حدودی سلامت کلیوی در نظر گرفته می‌شوند (۹) که براساس نتایج حاضر واکسیناسیون به‌روش تزریق تا حدی با آسیب‌های کبدی همراه است (شکل‌های ۱ تا ۳) زیرا در گروه تزریق شاخص‌های یاد شده به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود ($P \leq 0.05$). اما در روش‌های حمام آنزیم‌های یاد شده با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل‌های ۱ تا ۳). در واکسیناسیون به‌روش حمام دو مرحله‌ای در ماهیانی که محیط هاپیراسموتیک قبل از واکسیناسیون به‌کار گرفته شد سطح پروتئین کل به‌طور معنی‌داری بالاتر اندازه‌گیری شد و نیز تیتراژ آنتی‌بادی علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* به‌طور ظاهری بالاتر ثبت شده ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نشد ($P > 0.05$). در مجموع می‌توان به‌کارگیری واکسن یادآور را برای واکسیناسیون

منابع

- Association Journal. 172(3): 376-379. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1040752>
10. **Golchin Manshadi, A., 2022.** Survey on streptococcosis in selected farms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Yasuj province. Yasuj Journal of Zoonosis. 1(2): 13-23. DOI: 20.1001.1.28209982.1400.1.2.6.6
 11. **Ji, J., Torrealba, D., Thwaite, R., Gomez, A.C., Parra, D. and Roher, N., 2019.** Nanostructured TNF alpha protein targets the zebrafish (*Danio rerio*) immune system through mucosal surfaces and improves the survival after *Mycobacterium marinum* lethal infection. Aquaculture. 510: 138-149.
 12. **Karami, E., Alishahi, M., Ghorbanpor, M., Tabandeh, M.R. and Mohamadiyan, T., 2019.** Serum antibody response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to two species of pathogenic bacteria; *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae*. Iranian Scientific Fisheries Journal. 28(1): 1-8. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118605
 13. **Khaj, H., Mesbah, M. and Tabandeh, M.R., 2018.** Mohammadian, T. and Dadar, M. Comparative effects of Iranian *streptococcus/lactococcus* vaccine and Aquavac vaccine on growth performance and immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Veterinary Journal. 13(4): 28-42. DoI: 10.22055/IVJ.2017.48182.1696
 14. **Mazandarani, M., Hoseinifar, S.H., Reza Gholitebar, Z., Soudagar, M. and Safari, R., 2022.** Evaluation of Yersinia ruckeri vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics. 11(2): 37-48. DOI: 10.22069/JAPU.2022.20190.1652
 15. **Pasaribu, W., Sukenda, S. and Nuryati, S., 2018.** The Efficacy of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Broodstock and Larval Immunization against *Streptococcus agalactiae* and Aeromonas hydrophila. Fishes. 3(1): 161-168.
 16. **Romalde, J.L., Ravelo, C., Valdés, I., Magariños, B., de la Fuente, E., San Martín, C., Avendaño-Herrera, R. and Toranzo, A.E., 2008.** *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. Vet. Microbiol. 130: 198-207.
 17. **Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K., Meher, N. and Sarangi, A., 2006.** Non specific immune parameters of brood Indian major carp
 1. **Alishahi, M., Halimi, M., Ghorbanpour, M. and Tabandeh, M.R., 2020.** Effect of three administration routes of treptococcus/*lactococcus* Bacterin on specific immunity and expression of IgM and IL-6 genes in rainbow trout. Aquatic Physiology and Biotechnology. 8(1): 123-146. DOI: 10.22124/JAPB.2020.12787.1322
 2. **Bectas, Z.H., Ucar, F.B. and Savaser, S., 2017.** Isolation and Identification of *Streptococcus parauberis* from Freshwater Fish in Turkey. LimnoFish- Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research. 3(3): 175-182. DOI: 10.17216/limnofish.335516
 3. **Bogwald, J. and Dalmo, R.A., 2019.** Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. Microorganisms. 7(12): 627. DOI:10.3390/microorganisms7120627
 4. **Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J. and Zhan, W., 2017.** The influence of concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin and immersion time on antigen uptake and expression of immune-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Microb Pathog. 103: 19-28.
 5. **Eldar, A., and Ghittino C., 1999.** *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Journal of Diseases of Aquatic Organisms. 36: 227-236.
 6. **Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A. and Bercovier, H., 1995.** Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish. Vet. Microbiol. 43: 33-40.
 7. **El-Noby, G.A., Hassanin, M., El-Hady and M., Aboshabana, Sh., 2021.** *Streptococcus*: A review article on an emerging pathogen of farmed fishes. Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries. 25(1): 123-139.
 8. **Gao, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J. and Zhan, W., 2016.** Antigen uptake and expression of antigen presentation-related immune genes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination with an inactivated *Edwardsiella tarda* immersion vaccine, following hyperosmotic treatment. Fish Shellfish Immun. 55: 274-280.
 9. **Giannini, E.G., Testa, R. and Savarino, V., 2005.** Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. Canadian Medical

- Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology. 22: 38-43.
18. **Soltani, M., Pirali Kheirabadi, E., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A., Mohamadian, S., Roohollahi, S. and Zakian M., 2016.** Study on streptococcosis and lactococcosis outbreaks in rainbow trout farms in Fars and Lorestan Provinces. Journal of Veterinary Microbiology. 30: 49-58.
 19. **Soltani, M., Nikbakht, G.R., Ebrahimzadeh Moussavi, H.A. and Ahmadzadeh, N., 2008.** Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull Eur Ass Fish Pathol. 28: 209-214.
 20. **Thomas, L., 1998.** Clinical laboratory diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results. TH-Books Verlagsgesellschaft Amer Assn for Clinical Chemistry; 1st edition. 1527 p. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.4.586a>
 21. **Van Doan, H., Soltani, M., Leitão, A., Shafiei, S., Asadi, S., Lymbery, A.J. and Ringø, E., 2022.** Streptococcosis a Re-Emerging Disease in Aquaculture: Significance and Phytotherapy. Animals. 12: 2443. <https://doi.org/10.3390/ani12182443>