مطالعه برخی پاسخهای ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*mykiss Onchorhyncus*) به برخی آنتی ژنهای استرپتوکوکوس اینیایی

مهدی سلطانی[1]* مجتبی علی شاهی[1] پروانه خضرائی نیا[2] محمد ربانی[3] امیرستاری[1]

دریافت مقاله: ۳۰ بهمن ماه ۱۳۸۴
پذیرش نهایی: ۷ تیر ماه ۱۳۸۵

دراین مطالعه برخی ازشاخص‌های ایمنی اختصاصی وغیراختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس ازتجویز دونوع واکسن استرپتوکوکوس اینیایی مورد بررسی قرار گرفت. ماهی‌قزل‌آلای ۱۰۰-۸۰ گرمی به روشهای مختلف (تزریقی، غوطه‌وری و خوراکی) وبااستفاده‌ازآنتی ژنهای باکتری مذکور (سلول کشته وسلول کشته غنی‌شده با اگزوتوکسین‌های باکتری) واکسینه‌گردیدند. طی هفته‌های ۱۸، ۱۵، ۱۲، ۹، ۶، ۳پس ازواکسیناسیون اقدام به خون‌گیری وتهیه نمونه‌های مورد نیازبرای‌سنجش تیترآنتی بادی (با روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی)، میزان لیزوزیم سرم، قدرت باکتری کشی سرم وجمعیت لکوسیتی درایام مذکورگردید ونتایج حاصله با استفاده از آنالیزواریانس با همدیگر وباگروههای کنترل مقایسه‌گردید. نتایج حاصله نشان دادکه تزریق داخل صفاقی واکسن کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری و حاوی ادجوانت موجب ایجاد بیشترین تیترآنتی‌بادی‌گردید وتجویز واکسن کشته به روش غوطه‌وری موجب ایجاد تیترآنتی‌بادی بیشتری درمقایسه با روش خوراکی (هردونوع واکسن) گردید. به علاوه میزان تولید آنتی‌بادی در هفته‌های اولیه پس از واکسیناسیون حداکثربوده وسپس باگذشت زمان کاهش داشته‌است. نتایج مشابهی درموردسنجش میزان لیزوزیم وقدرت باکتری‌کشی‌سرم‌هادرتیمارهای مذکور به‌دست آمد که در اکثر موارد این مقادیربه طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای کنترل بوده است($p<0/05$). همچنین جمعیت لکوسیتی وشمارش لمفوسیتی در همه‌گروههای ایمن شده بیشتر از گروههای کنترل بوده است($p<0/05$). مقادیرمنوسیتی و هتروفیلی در زمانهای مختلف نمونه‌برداری در مقایسه با گروههای کنترل ازنتایج متفاوتی برخوردار بوده اما تفاوتها معنی‌دارنبوده است($p>0/05$). نتایج این مطالعه نشان می‌دهدکه هر دونوع پاسخ ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ماهی قزل‌آلا در برابرآنتی‌ژنهای استرپتوکوکس‌اینیایی تحریک می‌شوند. اما تزریق داخل صفاقی این‌آنتی ژنها به ویژه‌سلول کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری ازخاصیت ایمنی‌زایی بالاتر و درمرحله بعد تجویز سلول کشته به روش غوطه‌وری ازتوانایی ایمنی‌زایی مناسبی برخوردار بوده است در حالی که تجویز خوراکی‌آنتی ژنهای مذکور به روش خوراکی کمترین پاسخ ایمنی را ایجاد نموده است. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۱، ۹-۱.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، پاسخهای ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی استرپتوکوکوس اینیایی.

ارگانیسم‌های کوکسی گرم مثبت از نوع استرپتوکوکوس، انتروکوکوس و

۱) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه‌شهید چمران اهواز، خوزستان - ایران.
۳) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۹۵۳۱-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱
Email:msoltani@ut.ac.ir

STUDY ON SOME IMMUNOLOGICAL RESPONSES OF RAINBOW TROUT (*ONCHORHYNCHUS MYKISS*) TO SOME ANTIGENS OF *STREPTOCOCCUS INIAE*

Soltani, M.[1]*, Alishahi, M.[2], Khazrayeenia, P.[3], Rabani, M.[4], Sattari, A.[1]

[1]Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [2]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz-Iran. [3]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [4]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

Some specific and non-specific immune variables of rainbow trout were assessed following vaccination of fish with formalin killed cells (FKC) and FKC containing extra cellular products (ECP) of *S. iniae*. Rainbow trout weighing 80-100 g were vaccinated by intraperitoneal (i.p), dip and oral routes using FKC and FKC plus ECP with or without Fround adjuvant (FA) at 16-17°C. Antibody titration, lysozyme activity, serum bacterial killing activity and population of immunocompetent cells were measured on 3, 6, 9, 12, 15 and 18 weeks postvaccination. Data were analyzed by ANOVA. Results showed that the highest antibody titers were produced in i.p vaccinated fish with FKC plus ECP and immunized fish with FKC by dip, respectively. However, oral administration resulted in the lowest response. Also, the level of antibody production was higher during initial period of post-immunization, while it reduced to lower levels at the end of sampling time. Similar results were obtained when lysozyme activity and bacterial killing capacity of sera samples were estimated. Moreover, while, leukocyte and lymphocyte populations in immunized fish were generally higher than control groups, heterophil and monocyte counts were varied during the sampling periods. Reuslts show that both humeral and cellular immunities of trout are enhanced following immunization of fish with FKC with or without ECP administered as i.p and dip. However, i.p administration of FKC with or without ECP could cause higher response than both dip and oral routes. ***J.Vet.Res. 62,1:1-9,2007***.

Key words: *Streptococcus iniae*, immunization, rainbow trout, immune response.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-66929531, Fax: 021-66933222**

لاکتوکوکوس عامل مولد نوعی سپتی سمی باکتریایی با علائم بالینی عمدتاً مشابه در تعداد زیادی از گونه‌های ماهیان پرورشی آبهای شیرین و شور مناطق مختلف دنیا بوده وهر ساله خسارات اقتصادی قابل توجه و موارد جدید آنها گزارش می‌شود(۳،۴،۵،۸،۱۰،۱۵،۲۳،۱۷،۲۴). ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از جمله گونه‌های حساس به این بیماری بوده وشیوع این بیماری درمزارع کشوردر حال توسعه است(۲۷). مطالعات متعددی پیرامون ایمنی زایی و پاسخهای ایمنی گونه‌های ماهیان حساس به عوامل مولد این بیماری انجام گرفته است ولی در موارد زیادی نتایج حاصله متفاوت بوده ولذا هنوز مکانیسم یا مکانیسم‌های ایمنی‌زایی ماهیان در برابر این بیماری نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد. به‌ویژه چنانچه دسترسی به تهیه واکسن‌هایی با کارآیی رضایت بخش موردنظر باشد، اهمیت بررسی پاسخهای ایمنی مایعی و سلولی در گونه‌های حساس را دوچندان می‌نماید. هر چند Toranzo و همکاران درسال ۱۹۹۵ با تجویز آنتی‌ژن سلول کشته انتروکوکوس غنی شده با محصولات خارج سلولی این باکتری به ماهی توربوت، افزایش تعداد و قدرت فاگوسیتوزلکوسیتها را گزارش نمودند ولی نتوانستند هیچ‌گونه تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیایی را به روش الایزا و میکروآگلوتیناسیون باکتریایی در سرم ماهی اندازه‌گیری نمایند(۲۹) ولی Klesius و همکاران درسال ۲۰۰۰ بعد از واکسیناسیون ماهی با باکتری غیرفعال شده استرپتوکوکوس اینیایی توانستند با استفاده از روش میکرو آگلوتیناسیون باکتریایی تیتر ۳/۰۷۰۲- (لگاریتم برمبنای ۱۰ از تیتر) را در تیمار واکسینه به روش داخل صفاقی گزارش نمایند(۱۴). همچنین Barnes و همکاران درسال ۲۰۰۳ که بعد از ایمن سازی ماهی قزل‌آلا با باکتری کشته تیتر سرمی آنتی‌بادی ماهی را پس از ۵۰۰ درجه روز به روش آگلوتیناسیون باکتریایی اندازه‌گیری نمودند در گروه واکسینه تیتر بین ۱:۴ تا ۱:۳۲ و در تیمار واکسینه شده با سوش متفاوت استرپتوکوکوس اینیایی تیتر ۱:۱ تا ۱:۴ را اندازه‌گیری نمودند(۲). Shelby و همکاران درسال ۲۰۰۳ نیز موفق به اندازه‌گیری تیترآنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیایی درسرم ماهی‌های واکسینه شده به روش الایزا و میکروآگلوتیناسیون باکتریایی ۲۸ و ۴۸ روز بعد از ایمن سازی شدند(۲۳).

برای اثبات نقش آنتی‌بادی‌ها (ایمنی هومورال) در برابر استرپتوکوکوزیس بعد از واکسیناسیون، تعدادی از محققین اقدام به ایمن سازی غیرفعال (پاسیو) ماهی با استفاده از تجویز آنتی سرم ماهی ایمن شده بر علیه باکتری استرپتوکوکوس نمودند(۲۲، ۶، ۱). هرچند Shelby موفق به اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی ضعیفی بعد از ۴۸ ساعت در ماهی ایمن شده به‌صورت غیرفعال با آنتی سرم تولیدی در ماهی ایمن گردید ولی Akhlaghi و همکاران درسال ۱۹۹۶ تیتر آنتی بادی قابل اندازه‌گیری به روش الایزا را حتی ۲۴ ساعت بعد از ایمن‌سازی ماهی با آنتی سرم تولیدی در ماهی ایمن مشاهده ننمود با این وجود هردو محقق فوق الذکر نقش آنتی بادیها و ایمنی هومورال را در ایمنی واکسن مورد تاکید قرار دادند. البته Eldar و همکاران در سال ۱۹۹۷ با توجه به پاسخ ایمنی ضعیف ایجاد شده در ماهی قزل‌آلا در برابر استرپتوکوکوس بعد از تزریق آنتی سرم ماهی فوق ایمن، نقش آنتی بادیها را در ایمنی حاصل مورد تردید قرار داد.

در مورد دیگر پاسخهای ایمنی ماهی، افزایش لوکوسیتها وقدرت فاگوسیتوز آنها، افزایش میزان لیزوزیم سرم وقدرت باکتری‌کشی آنتی سرمها در ماهیهای واکسینه یا بیمار شده به‌صورت تجربی توسط باکتریهای بیماریزا گزارش گردیده است(۲،۱۲،۳۰).

بنابراین با توجه به مطالعات مورد اشاره و نتایج حاصله به نظر می‌رسد که واکنش‌های ایمنی (اختصاصی و غیر اختصاصی) در برابر بیماری مذکور از اهمیت خاصی برخوردار باشد. در همین راستا مطالعه حاضر به منظور بررسی برخی پاسخهای ایمنی(سنجش تیتر آنتی‌بادی، قدرت کشندگی سرم، تولید لیزوزیم لکوسیتی و جمعیت لکوسیت‌ها) و در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ایمن شده با ایزوله استرپتوکوکوس اینیایی بدست آمده از همین ماهی در مزارع کشور پرداخته شده است. در این مطالعه ماهیان با استفاده از آنتی ژنهای سلول کشته و سلول کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های خارج سلولی باکتری به روشهای، تزریقی، غوطه وری و خوراکی ایمن گردیده و پاسخهای ایمنی مورد اشاره و فاکتورهای فوق تا ۱۸ هفته پس از ایمنی‌سازی مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد وروش کار

۱- ماهی: در این مطالعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با وزن ۱۰۰-۸۰ گرمی تهیه شده از یکی از مزارع پرورش قزل‌آلای کشور با سابقه عدم بیماری استرپتوکوکوزیس استفاده گردید. ماهیان پس از انتقال به تانکهای ۱۰۰۰ لیتری در دانشکده دامپزشکی با آب جاری و هوادهی لازم به مدت ۲ هفته به شرایط جدید سازگاری داده شده و با استفاده از خوراک شرکت چینه به میزان ۲ درصد توده زنده (Biomass) در روز تغذیه می‌شدند.

۲- شرایط کیفی آب: منبع آب مورد استفاده آب چاه با جریان مداوم (جاری) و با دمای ۱۶-۱۷ درجه سانتیگراد، سختی آب براساس کربنات کلسیم ۱۸۰mg/L، pH برابر ۷/۸، CO_2 کمتر از ۶mg/L، اکسیژن محلول حداقل ۸mg/L (هوادهی مداوم)، هدایت الکتریکی ۷۸۰ میکروزیمنس در سانتیمتر مربع، نیترات کمتر از ۰/۱mg/L و آمونیاک کمتر از ۰/۰۱mg/L بود.

۳- باکتری لیوفیلیزه: از ایزوله باکتری لیوفیلیزه استرپتوکوکوس اینیایی برای این مطالعه استفاده شد. ایزوله مذکورقبلا از یکی از مزارع پرورش قزل‌آلای کشور توسط سلطانی و همکاران درسال ۲۰۰۵ جداسازی و شناسایی گردیده بود(۲۷).

۴- تهیه آنتی ژنها

۴-۱- سلول کامل غیر فعال شده با فرمالین: ابتدا ایزوله لیوفیلیزه باکتری روی محیط آگار ژلوز خون در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده سپس از پرگنه‌های رشد یافته پاساژ بعدی به محیط مایع TSB (Tryptic Soya Broth) حاوی نیم درصد گلوکز منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباسیون انجام گردید

جدول۱- روشهای ایمن سازی با واکسنها و تیمارهای موجود در هر روش (FKC=باکتری غیر فعال شده با فرمالین، FKC+ECP=باکتری غیر فعال شده و غنی شده با تولیدات خارج سلولی، ADJ= ادجوانت)

نوع تجویز	تزریق داخل صفاقی					غوطه وری		خوراکی		
تیمارهای هر روش	FKC+ECP +ADJ	FKC+ ADJ	FKC	فقط ادجوانت	شاهد	FKC	شاهد	FKC+ECP	FKC	شاهد
تعداد ماهی	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۰۰	۱۵۰
میزان تجویز	۰/۱ml	۰/۱ml	۰/۱ml	۰/۱ml	۰/۱ml	حمام در 10^{6} cell/ml	حمام درسرم فیزیولوژی	10^{6}باکتری درهر گرم خوراک		خوراک معمولی

وسلولهای باکتریایی حاصله با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل و سه بار سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد جمع‌آوری گردید ومتعاقبا سرم فیزیولوژی استریل و نیز فرمالین خالص به نسبت ۰/۲درصد به آنها اضافه شد و نسبت به نگهداری سلولها در ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شب اقدام گردید. سپس سلولهای غیرفعال شده را سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو(سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور به مدت۱۵ دقیقه در۴درجه سانتیگراد) تا فرمالین به‌طور کامل حذف و به سلولهای غیرفعال شده مقداری سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد به‌طوری‌که غلظت باکتری کشته 10^{10} باکتری در میلی لیتر سرم فیزیولوژی تنظیم گردید(با تغلیظ چهار برابر سوسپانسیون باکتریایی تنظیم شده با لوله‌های استاندارد مک فارلن شماره۸) و تا زمان استفاده در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای اطمینان از غیرفعال شدن کامل سلولها از این نمونه برروی محیط آگارژلوز خون کشت داده شد که نتایج حاصل بیانگر غیرفعال سازی کامل سلولها و نیز عدم هرگونه آلودگی ثانویه بود.

۲-۴- سلول کامل غیرفعال شده وغنی شده با محصولات خارج سلولی باکتری: سلول کامل غیرفعال شده با فرمالین به روش مورد اشاره تهیه گردید. برای تهیه محصولات خارج سلولی باکتری از روش Klesius و همکاران درسال۲۰۰۰ استفاده گردید(۱۴). برای اینکار ابتدا باکتری در محیط TSB حاوی نیم درصد گلوکز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد (برروی شیکر). سپس با فرفرمالین ۱۰ درصد به محیط کشت اضافه و پس از انکوبه نمودن کشت فرمالینه به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد، نسبت به سانتریفیوژ آن در سه هزار دور به مدت ۲۰ دقیقه اقدام گردید و مایع رویی حاوی محصولات خارج سلولی وعاری از سلول جداسازی گردید. اجرام مولکولی کمتر از ۲ کیلودالتون موجود در محصولات خارج سلولی باکتری با استفاده از فیلترهای مخصوص حاوی ستون آمیکون (با اندازه دو کیلو دالتون) توسط سانتریفوژ در ۶۰۰۰g به‌مدت ۳۰ دقیقه حذف و بدینوسیله تولیدات خارج سلولی باکتری ۱۰ برابر غلیظ گردید. سپس سلول کامل غیرفعال شده با فرمالین، به نسبت ۱به۱ (حجم به حجم) با محصولات خارج سلولی تغلیظ شده مخلوط گردید. محصول بدست آمده تا موقع استفاده در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای اطمینان از عدم وجود اثرات کشندگی محصولات خارج سلولی ۵۰ میکرولیتر از آن قبل و بعد از مخلوط شدن با سلولهای باکتری غیرفعال شده به روش داخل صفاقی به تعدادی ماهی قزل‌آلا تزریق و اثرات جانبی آن به مدت یک هفته کنترل گردید.

۵- ایمن‌سازی ماهیان: روشهای ایمن‌سازی و تیمارهای موجود در هر روش در جدول۱ آورده شده است.

۵-۱- تجویزداخل صفاتی: در این روش پس از اتمام دوره قطع غذا به‌مدت ۴۸ ساعت، از آنتی ژن مربوطه به میزان یک دهم میلی لیتر به ازای هر ماهی و پس از ایجاد بیهوشی با تریکائین متان سولفانات(MS_{222}) در ناحیه صفاقی تزریق گردید. در گروههایی که ادجوانت استفاده شده بود قبل از استفاده، آنتی ژن مذکور به نسبت۲ به۱ (آنتی ژن: ادجوانت) با ادجوانت کامل فروند مخلوط گردید. در گروه شاهد از سرم فیزیولوژی استریل استفاده گردید.

۵-۲- روش غوطه‌وری: در این روش ماهی‌ها به‌مدت ۱ دقیقه در حمام واکسن با رقت 10^{6} سلول به ازاء هر میلی لیتر آب، واکسینه و سپس به تانکهای مربوطه منتقل شدند. تیمار شاهد در سرم فیزیولوژی (هم حجم واکسن) به‌مدت یک دقیقه غوطه‌ور گردیدند.

۵-۳- روش خوراکی: در این روش واکسن‌ها با میزان 10^{6} سلول کشته به ازاء هر گرم غذای ماهی، به مدت۱۴ روز و روزانه در سه نوبت صبح، ظهر وبعدازظهر به تیمارها تجویز گردید. تیمار شاهد با خوراک معمولی تغذیه شد.

دو هفته پس از تجویزواکسنها نسبت به تجویز واکسن یادآور با مقادیر استفاده شده برای مرحله اول اقدام گردید با این تفاوت که در تیمارهای تزریقی مرحله یادآور از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد.

۶- نمونه‌برداری: طی هفته‌های۱۸،۱۵،۱۲،۹،۶،۳ پس از ایمن‌سازی ماهیان نسبت به نمونه‌برداری اقدام گردید. در هر مرتبه نمونه برداری از هر تیمار به صورت تصادفی تعداد ۵ ماهی برداشت و پس از ایجاد بیهوشی بوسیله MS_{222} با دوز ۴۰mg/L از طریق سیاه‌رگ ناحیه دمی خون‌گیری به‌عمل آمد. همزمان با خون‌گیری نسبت به تهیه گسترش‌های خونی نیز اقدام می‌گردید. نمونه‌های خون ابتدا در دمای اتاق یک‌ساعت نگهداری و پس از انتقال به دمای ۴ درجه سانتیگراد به‌مدت یک شب نسبت به جداسازی سرم‌ها اقدام و پس از توزیع در لوله‌های استریل اپندرف تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند.

۷- سنجش تیتر آنتی‌بادی: برای سنجش تیتر آنتی‌بادی از روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی توصیه شده توسط Roberson در سال۱۹۹۹ استفاده گردید(۱۹). به‌طور خلاصه: با افزودن میزان ۲۵ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم به گوده‌های پلیت میکروآگلوتیناسیون (به‌جز گوده اول) و

جدول۲- نتایج تیتر آنتی‌بادی به روش میکروآگلوتیناسیون در ماهی قزل آلای واکسینه شده علیه استرپتوکوکوزیس. (تیتر آنتی‌بادی میانگین عکس رقت‌های بدست آمده در آزمایش‌های میکروآگلوتیناسیون در هر مرحله می‌باشد). نتایج به صورت میانگین ±(خطای معیار) نمایش داده شده‌اند.

زمان(هفته) پس از واکسیناسیون	A	B	C	D	E	F	G	H
۳	۲۳±۵/۷۶	۱۸±۵/۳۸	۱۷±۵/۷۵	۴/۷۵±۱/۷۴	۰/۷۵±۰/۵۱	۰/۰	۰/۱۳±۰/۲	۰/۵۰±۰/۸۲
۶	۲۰±۶/۰۵	۱۸±۵/۳۸	۱۶±۴/۲۸	۳/۷۶±۱/۷۹	۰/۷۵±۰/۵۱	۰/۵±۰/۵۳	۰/۰	۰/۲۵±۰/۴۱
۹	۱۸±۱/۲۱	۱۶±۶/۰۶	۱۴±۴/۲۸	۳/۲۵±۱/۹۵	۰/۵±۰/۴۴	۰/۱۳±۰/۲	۰/۰	۰/۳۸±۰/۴۳
۱۲	۱۵±۴/۵۸	۱۲±۵/۳۸	۱۴±۴/۷۸	۱/۵±۱/۶	۰/۰	۰/۱۳±۰/۲	۰/۰	۰/۰
۱۵	۱۲/۵±۵/۱۵	۱۰/۵±۵/۵۱	۱۲±۵/۸۳	۰/۳۸±۰/۴۳	۰/۱۳±۰/۰۲	۰/۲۵±۰/۴۱	۰/۰	۰/۰
۱۸	۸/۵±۲/۸۸	۸/۵±۲/۸۸	۱۲±۵/۳۸	۰/۰	۰/۲۵±۰/۴۱	۰/۱۳±۰/۲	۰/۰	۰/۰

A=واکسن‌کشته غنی‌شده با محصولات خارج سلولی به علاوه ادجوانت(روش داخلی صفاقی)، B=واکسن‌کشته حاوی ادجوانت(روش داخل صفاقی)، C=واکسن‌کشته بدون ادجوانت(روش داخل صفاقی)، D=واکسن‌کشته (روش غوطه وری)، E=واکسن‌کشته غنی شده با محصولات خارج سلولی (روش خوراکی)، F=واکسن‌کشته (روش خوراکی)، G=ادجوانت (روش داخل صفاقی)، H=بافر فسفات سدیم استریل(روش داخل صفاقی).

سپس افزودن مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم رقیق نشده به اولین و دومین گوده و تهیه رقتهای برمبنای دو در گوده‌های ۲ الی ۱۲ و حذف ۲۵ میکرولیتر از گوره۱۲ و نیز افزودن مقدار ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی استرپتوکوکوس اینیایی تهیه شده در بافر فسفات سدیم (مطابق با لوله مک فارلین شماره ۳ = ۸×۹^{۱۰} cells/ml) و قرائت نتایج پس از یک شب در دمای اتاق به‌طوری‌که آخرین گوده‌ای (بالاترین رقتی) که در آن آگلوتیناسیون باکتریایی صورت گرفته به‌عنوان تیتر آنتی بادی نمونه سرم در نظر گرفته شد. و سرم معمولی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و تمام نمونه‌ها در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۸- **سنجش میزان لیزوزیم**: سنجش میزان لیزوزیم در نمونه‌های سرم براساس روش توصیه شده توسط Ellis در سال ۱۹۹۰ صورت گرفت(۷). به‌طور خلاصه ابتدا مقدار ۱/۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (محصول سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ میلی‌گرم به ازاء هر میلی لیتر از بافر فسفات سدیم با مولاریته ۰/۰۵ و pH برابر ۶/۲) با میزان ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم مخلوط و میزان جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش اسپکتروفتومتری و در طول موج ۶۷۰ نانومتر قرائت گردید. تفاوت جذب نوری بین اولین و دومین مرحله نورسنجی ثبت گردیده و نتایج حاصله برحسب میکروگرم لیزوزیم به ازاء هر میلی‌لیتر نمونه سرم و به کمک رسم منحنی استاندارد با استفاده از رقتهای بر مبنای ۲ لیزوزیم سفیدهٔ تخم مرغ (محصول سیگما) تهیه شده در بافر فسفات سدیم محاسبه گردید. همچنین از بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده گردید.

۹- **تعیین قدرت باکتری‌کشی آنتی سرم‌ها**: برای تعیین قدرت باکتری‌کشی نمونه‌های سرم از روش توصیه شده توسط Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ استفاده شد(۲). ابتدا باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلولهای باکتریایی با سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آنها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱ تعیین گردید. سپس سوسپانسیون مذکور را به‌میزان ۵۰ برابر در بافر فسفات سدیم استریل رقیق سازی و از رقت حاصله میزان ۵۰ میکرولیتر با میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه سرم نرمال غیرفعال شده (در ۴۴ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۰ دقیقه برای غیرفعال کردن کمپلمان) مورد آزمایش مخلوط و به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس به این مجموعه مقدار ۴۰۰ میکرولیتر سرم نرمال تازه اخذ شده از ماهیان غیر ایمن اضافه گردید (برای تامین کمپلمان به‌طور یکسان برای همه نمونه‌ها) و پس از تهیه رقت‌های بر مبنای ۱۰ از آن، از هر رقت میزان ۱۰ میکرولیتر در سه تکرار برروی سطح محیط TSA پخش و پلیتهای مربوطه در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و سپس نسبت به شمارش پرگنه‌های باکتریایی رشد یافته اقدام و تعداد پرگنه‌های حاصله با توجه به رقت مورد استفاده برحسب تعداد پرگنه (سلول زنده) به ازاء هر میلی لیتر محاسبه گردید. در خاتمه درصد بقاء سلول‌های باکتریایی رشد یافته در نمونه‌های سرم و مقایسه آنها با تعداد سلولهای رشد یافته در نمونه سرم معمولی (غیر ایمن یا گروه کنترل) مقایسه گردید. برای اطمینان از زنده بودن باکتریها از رقتهای باکتریایی قبل از اضافه کردن آنتی سرم کشت در محیط TSA گردید.

۱۰- **شمارش لکوسیتی**: برای بررسی تاثیر تجویز واکسنها بر تعداد و نسبت لکوسیتها اقدام به شمارش لکوسیتی گردید. گسترش‌های به‌دست آمده در زمان خون‌گیری، ابتدا توسط متانول فیکس و سپس با روش رنگ‌آمیزی گیمسا رنگ‌آمیزی و درصد افتراقی سلولهای لکوسیتی تعیین گردید(۱۶).

۱۱- **آنالیز آماری**: به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار version 11.5 SPSS استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارها و همچنین مقایسه میانگین بین تیمارها و گروه شاهد از آنالیز واریانس یکطرفه و برای تسخیص معنی دار بودن تفاوتها از تست تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج

۱- **تیتر آنتی‌بادی**: نتایج حاصل از سنجش تیتر آنتی بادی به‌روش میکرو

جدول۳- نتایج حاصل از سنجش مقادیر لیزوزیم سرم در گروههای مختلف قزل آلای ایمن شده علیه استرپتوکوکوزیس(واحد اعداد میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد). نتایج به صورت میانگین±(خطای معیار) نمایش داده شده‌اند.

زمان(هفته) پس از واکسیناسیون	A	B	C	D	E	F	G	H
۳	۱۴/۲۸±۱/۸۶	۱۲/۰۸±۱/۴۹	۹/۵۶±۸/۷۵	۶/۰۹±۱/۰۵	۵/۰۴±۰/۹۵	۴/۱۵±۰/۲۸	۴/۷۷±۱/۰۷	۴/۴۲±۰/۹۴
۶	۸/۸۳±۱/۹۱	۹/۹۴±۱/۳۷	۹/۷۱±۶/۱	۶/۱۷±۱/۰۹	۴/۲۴±۰/۷۵	۴/۰۹±۰/۶۹	۴/۵۴±۰/۴۸	۴/۰۷±۱/۰۹
۹	۸/۳۳±۱/۲۱	۸/۲۹±۲/۰۶	۷/۶±۸/۸۱	۴/۹۱±۰/۸۳	۴/۳۸±۰/۲۴	۴/۱۴±۰/۴۷	۴/۱۹±۰/۹۸	۴/۸۹±۱/۳۵
۱۲	۵/۰±۱/۱۴	۵/۷۹±۰/۸۵	۵/۶۱±۱۳/۲۴	۵/۰۲±۰/۸۷	۴/۲۶±۰/۶۴	۳/۰۸±۰/۴۷	۳/۶۳±۰/۷۲	۳/۵۲±۰/۸۹
۱۵	۴/۸۴±۱/۲۶	۵/۱±۰/۶۷	۵/۷۹±۵/۸۳	۴/۳۶±۰/۸۷	۳/۶۴±۰/۵۶	۳/۸۹±۰/۷۹	۳/۶۱±۰/۵۲	۴/۸۴±۱/۲۶
۱۸	۴/۲۲±۱/۱۱	۴/۱۳±۰/۵۴	۴/۷±۹/۲۴	۳/۸۳±۰/۶۴	۳/۹۱±۰/۶۲	۴/۴±۰/۹۸	۳/۶۵±۰/۹۱	۳/۶۵±۰/۸

A=واکسن کشته غنی شده با محصولات خارج سلولی به علاوه ادجوانت(روش داخلی صفاقی)، B= واکسن کشته حاوی ادجوانت(روش داخل صفاقی)، C= واکسن کشته بدون ادجوانت(روش داخل صفاقی)، D= واکسن کشته (روش غوطه وری)، E= واکسن کشته غنی شده با محصولات خارج سلولی (روش خوراکی)، F= واکسن کشته (روش خوراکی)، G= ادجوانت (روش داخل صفاقی)، H= بافر فسفات سدیم استریل(روش داخل صفاقی).

آگلوتیناسیون باکتریای در جدول۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج مذکور ایمن سازی قزل‌آلا با دو واکسن فوق باعث افزایش معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی در تیمارهای تزریقی و غوطه‌وری نسبت به تیمارهای شاهد و تجویز خوراکی گردیده است($p<۰/۰۵$) به‌طوری‌که آنتی‌بادی تولیدی در ماهیان ایمن شده به روش تزریق داخل صفاقی با واکسن کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری و حاوی ادجوانت بیشترین میزان آنتی‌بادی (۵/۷۶±۲۳) را در هفته سوم پس از ایمن سازی نشان داد. این میزان طی هفته‌های بعد به تدریج کاهش یافته به‌طوری‌که در پایان هفته هیجدهم پس از ایمن‌سازی به حداقل (۸/۵±۲/۸۸) رسید. تجویز واکسن کشته حاوی ادجوانت به روش داخل صفاقی نیز به ترتیب موجب حداکثر (۵/۳۸±۱۸) و حداقل (۸/۵±۲/۸۸) تیتر آنتی‌بادی طی هفته‌های ۳ الی ۶ و ۱۸ پس از ایمن‌سازی گردید. همچنین تجویز داخل صفاقی واکسن کشته بدون ادجوانت از نتایج مشابه برخوردار بود با این تفاوت که مقادیر آنتی‌بادی تولیدی در هفته‌های اولیه پس از واکسیناسیون اندکی پایین‌تر بوده است. بگونه‌ای که این میزان در هفته‌های ۳ الی ۶ برابر ۱۷-۱۶ ولی در پایان هفته ۱۸ پس از ایمن سازی به ۱۲ کاهش یافت. به‌علاوه تجویز غوطه‌وری واکسن کشته به ترتیب موجب حداکثر با میانگین (۱/۷۴±۴/۷۵) و حداقل (۰/۴۳±۰/۳۸) تولید آنتی‌بادی طی هفته سوم و پانزدهم پس از واکسیناسیون گردید. تجویز خوراکی واکسن کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری موجب ایجاد حداکثر تیتر آنتی‌بادی (با میانگین ۰/۷۰) در هفته‌های ۳ الی ۶ پس از ایمن‌سازی گردید. در حالی‌که حداقل تیتر آنتی‌بادی (با میانگین ۰/۱۳) در هفته‌های ۱۲ به بعد حاصل شد. مصرف خوراکی واکسن کشته بدون اگزوتوکسین‌های باکتری به ترتیب موجب بیشترین میزان آنتی‌بادی (۰/۷۵±۰/۵۱) و کمترین تیتر آنتی‌بادی (۰/۱۳±۰/۰۲) طی هفته‌های ۶-۳ و هفته‌های پس از آن گردید که گویای عدم معنی‌دار بودن تفاوت تیتر آنتی‌بادی در این دو گروه با گروه شاهد بود($p>۰/۰۵$).

میزان تیتر آنتی‌بادی تولیدی در گروههای کنترل تیمارهای دریافت کننده فقط ادجوانت و سرم فیزیولوژی به روش داخل صفاقی در طی دوران پس از ایمن‌سازی تقریباً مشابه($p>۰/۰۵$) و عمدتاً غیرقابل سنجش بود.

۲- لیزوزیم: نتایج حاصل از سنجش مقادیر لیزوزیم در گروههای مختلف ایمن شده در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج مذکور مقادیر لیزوزیم در تیمار ایمن شده به روش داخل صفاقی و با استفاده از واکسن کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری و حاوی ادجوانت در هفته سوم پس از ایمن‌سازی از بالاترین سطح (۱/۸۶ ± ۱۴/۲۸میکروگرم در میلی‌لیتر) برخوردار بوده است در حالی‌که این مقدار طی هفته‌های پس از آن به تدریج کاهش نشان داده است. به‌طوری‌که در پایان هفته ۱۸ به حداقل (۱/۱۱±۴/۲۲) رسید. نتایج مشابهی در مورد تیمار ایمن شده به‌روش داخل صفاقی واکسن کشته حاوی ادجوانت و نیز تیمار ایمن شده با واکسن کشته بدون ادجوانت به‌روش داخل صفاقی مشاهده گردید. با این تفاوت که مقدار لیزوزیم در هفته سوم پس از ایمن‌سازی برای این دو تیمار پایین‌تر از تیمار قبلی بوده است(جدول۳)(حداکثر و حداقل میزان لیزوزیم برای تیمار ایمن شده با واکسن کشته حاوی ادجوانت به ترتیب برابر ۱۲/۱۸ و ۴/۱۳ و برای تیمار ایمن شده با واکسن کشته بدون ادجوانت ۹/۷۱ و ۴/۷۰ بوده است). به‌علاوه مقدار لیزوزیم در ماهیان ایمن شده با واکسن کشته به روش غوطه‌وری طی هفته‌های ۳ الی ۹ به‌طور معنی‌داری کمتر از ۳ تیمار ایمن شده فوق بود($p<۰/۰۵$). ولی پس از این زمان تفاوت مذکور در حد معنی‌دار نبوده است($p>۰/۰۵$). به‌علاوه بیشترین (با میانگین ۶/۱۷ - ۶/۰۹) و کمترین (۳/۸۳) مقدار لیزوزیم در ماهیان ایمن شده با واکسن کشته به‌روش غوطه‌وری به‌ترتیب طی هفته‌های ۳،۶،۱۸ پس از ایمن‌سازی مشاهده شد. همچنین مقادیر لیزوزیم در گروههای ایمن شده به‌روش خوراکی (هر دو واکسن) در طی ایام نمونه‌برداری پس از ایمن‌سازی تقریباً مشابه و فاقد تفاوت معنی‌دار بوده است($p>۰/۰۵$). مقادیر لیزوزیم در گروههای کنترل (تیمارهای دریافت کننده فقط ادجوانت و سرم فیزیولوژی) در ایام نمونه‌برداری تقریباً مشابه($p>۰/۰۵$) ولی در مقایسه با تیمارهای ایمن شده به‌روشهای تزریق داخل صفاقی (سه تیمار) و تیمار غوطه‌وری به‌طور معنی‌داری تا هفته ۱۵ پس از ایمن‌سازی پایین‌تر بوده است($p<۰/۰۵$).

جدول ۴- نتایج حاصل از قدرت باکتری کشی آنتی سرم‌های بدست آمده از تیمارهای مختلف قزل آلای ایمن شده علیه استرپتوکوکوزیس. قدرت باکتری‌کشی بر اساس میانگین تعداد پرگنه شمارش شده در پلیتها بعد از مجاورت با آنتی سرم‌ها آورده شده است . نتایج به صورت میانگین ±(خطای معیار) نمایش داده شده‌اند.

زمان(هفته) پس از واکسیناسیون	A	B	C	D	E	F	G	H
۳	۴۰±۹/۷۱	۴۲±۸/۷۴	۴۴±۶/۷۵	۷۷±۸/۷۵	۱۰۶±۱۹/۲۴	۱۱۷±۱۳/۲۴	۱۱۰±۱۰/۵۰	۱۲۵±۱۵/۳۹
۶	۴۶±۱۳/۲۴	۵۲±۶/۸۹	۴۹±۷/۵۷	۷۸±۶/۱	۱۰۹±۹/۹۵	۱۱۳±۱۰/۵۰	۱۱۱±۹/۸۴	۱۱۸±۱۲/۸
۹	۴۱±۱۳/۲۱	۵۴±۶/۵۳	۵۳±۹/۳۵	۸۴±۸/۸۱	۱۱۱±۱۳/۲۴	۱۱۲±۹/۲۴	۱۱۱±۸/۶۵	۱۰۳±۶/۲۷
۱۲	۵۰±۱۲/۲	۵۶±۷/۷۵	۵۲±۶/۴۵	۹۰±۱۳/۲۴	۱۰۸±۱۰/۳۷	۱۰۲±۱۲/۶۴	۱۱۴±۱۰/۳۴	۱۱۱±۱۳/۲۵
۱۵	۴۷±۶/۵	۵۶±۷/۷۵	۵۷±۶/۷۵	۸۷±۵/۸۳	۱۰۵±۶/۶۲	۱۰۸±۵/۲۴	۱۰۹±۱۲/۴۴	۱۳۲±۲۴/۲۴
۱۸	۴۷±۹/۷۱	۵۶±۷/۹۹	۵۸±۷/۹۹	۹۱±۹/۲۴	۱۱۷±۸/۵۱	۱۱۶±۷/۶۲	۱۰۴±۵/۴۶	۱۱۳±۱۶/۴۶

A= واکسن کشته غنی شده با محصولات خارج سلولی به علاوه ادجوانت (روش داخلی صفاقی)، B= واکسن کشته حاوی ادجوانت (روش داخل صفاقی)، C= واکسن کشته بدون ادجوانت (روش داخل صفاقی)، D = واکسن کشته (روش غوطه وری)، E= واکسن کشته غنی شده با محصولات خارج سلولی (روش خوراکی)، F= واکسن کشته (روش خوراکی)، G= ادجوانت (روش داخل صفاقی)، H= بافر فسفات سدیم استریل (روش داخل صفاقی).

به‌علاوه مقایسه مقدار لیزوزیم بین تیمارهای کنترل و تیمارهای خوراکی (۲ تیمار) فاقد تفاوت معنی‌دار بوده است($p>0/05$).

۳- قدرت باکتری‌کشی آنتی سرم: نتایج حاصل از قدرت باکتری‌کشی آنتی سرم‌های بدست آمده از تیمارهای مختلف ایمن شده و گروه کنترل در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به جدول مذکور نتایج زیر قابل توجه است.

۱- بیشترین قدرت باکتری کشی (کمترین تعداد پرگنه شمارش شده در پلیتها) در میان تیمارهای واکسینه در آنتی سرم‌های تیمار واکسینه شده به روش داخل صفاقی با واکسن کشته غنی‌شده با اگزوتوکسین‌های باکتری و حاوی ادجوانت مشاهده گردید، در حالی‌که کمترین قدرت باکتری‌کشی مربوط به تیمارهای دریافت کننده‌واکسن‌های خوراکی بوده‌است. ۲- قدرت باکتری‌کشی در تیمارهای ایمن شده به‌روش داخل صفاقی با واکسن‌های کشته حاوی ادجوانت و واکسن کشته بدون ادجوانت تقریباً مشابه($p>0/05$) و به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار واکسینه شده با واکسن کشته به روش غوطه‌وری بوده است($p<0/05$). ۳- قدرت باکتری‌کشی در تیمار واکسینه شده به روش غوطه‌وری به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای واکسینه شده به روش خوراکی بوده‌است($p<0/05$). ۴- قدرت باکتری‌کشی آنتی سرم‌ها در تیمارهای واکسینه به‌روش خوراکی، تیمار دریافت کننده فقط ادجوان و تیمار کنترل تفاوت معنی داری با هم نداشته($p>0/05$) و این توانایی به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای ایمن شده به‌روش‌های تزریقی و غوطه‌وری بوده‌است($p<0/05$).

۴- **جمعیت لکوسیتی:** نتایج شمارش جمعیت‌های لکوسیتی در جدول ۵ آمده است. نتایج مذکور تا ۸۰ روز پس از ایمن‌سازی ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته‌است. براساس نتایج مذکور: الف) جمعیت کل لکوسیتها در گروههای ایمن شده به‌روش تزریقی و غوطه‌وری و خوراکی در هر چهار مرحله نمونه‌گیری بیشتر از گروههای شاهد (کنترل دریافت کننده سرم فیزیولوژی) بود($p<0/05$). ب) جمعیت لمفوسیتی در تیمارهای ایمن شده نیز بیشتر از گروه شاهد بوده است($p<0/05$). ج) جمعیت هتروفیلی، منوسیتی و سایر سلولهای لکوسیتی (ائوزنیوفیل، بازوفیل و...) در مقایسه با گروه شاهد در زمانهای مختلف نمونه‌برداری متفاوت بوده و تفاوت معنی‌داری در میزان آنها در تیمارهای مختلف مشاهده نگردید($p>0/05$).

بحث

بیماری استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی موجب خسارت اقتصادی قابل توجه در مزارع ماهی در برخی کشورها از جمله مزارع قزل‌آلای پرورشی در ایران می‌باشد. در این مطالعه تأثیر روشهای مختلف مصرف دو نوع واکسن کشته و غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری جداسازی شده از ماهیان قزل‌آلای مبتلا کشور بر برخی فاکتورهای ایمنی اختصاصی (هومورال) و غیر اختصاصی (شمارش لکوسیتی- تعیین قدرت باکتری‌کشی آنتی سرم‌ها- سنجش میزان لیزوزیم سرم) ماهی قزل‌آلا مورد ارزیابی قرار گرفته است. مصرف تزریقی واکسن کشته همراه یا بدون اگزوتوکسین‌های باکتری موجب پاسخ هومورال (تولید آنتی‌بادی) مشابهی می‌شود($p>0/05$) که میزان آن به مراتب از سایر روش‌های غوطه‌وری و خوراکی بالاتر می‌باشد($p<0/05$). به‌هرحال تیتر آنتی‌بادی تولیدی توسط ماهیان ایمن شده با این واکسن‌ها در مقایسه با برخی عوامل بیماری‌زای باکتریایی دیگر نظیر ویبریو آنگوئیلاروم و یرسینیاراکری به‌مراتب کمتر بوده است(۹). در مطالعه Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ تیتر آنتی‌بادی تولیدی به‌وسیله باکتری غیر فعال شده استرپتوکوکوس اینیایی همراه ادجوانت در ماهی قزل‌آلا تجویز شده به روش تزریق داخل صفاقی را بعد از ۵۰۰ درجه روز، ۱:۴ تا ۱:۳۲ گزارش نمودند(۲) که حاکی از تشابه نتایج با تحقیق حاضر است. Shelby و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز موفق به اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیایی در سرم ماهی‌های واکسینه شده به‌روش الایزا و میکروآگلوتیناسیون باکتریایی ۲۸ و ۴۸ روز بعد از ایمن‌سازی شدند(۲۵). با این وجود در بعضی مطالعات، متعاقب واکسیناسیون با سوشهای مختلف باکتری غیرفعال شده استرپتوکوکوس اینیایی و گونه‌های دیگر استرپتوکوکوس و لاکتوکوکوس در گونه‌های مختلف ماهیان مانند تیلاپیا،

جدول۵ - میانگین مقادیر پارامترهای خونی بدست آمده در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده. WBC= جمعیت لکوستی، Lymph= تعداد لمفوسیتها، Heter= تعداد هتروفیلها، Mono= تعداد مونوسیتها، Others= تعداد بقیه لکوسیتها. نتایج به صورت میانگین ±(خطای معیار) نمایش داده شده‌اند.

	تیمار	WBC/mm3	Lymph	Hete	Mono	Others
اولین مرحله خونگیری(۲۰ روز پس از ایمن سازی)	گروه شاهد	۱۷/۷±۰/۴	۸۸۹±۱	۲۸۴/۴±۲/۴	۸۵۳۴±۲/۵	۸۸۹۰± ۱۳۸۲/۲
	گروه تزریقی (ECP+FKC)	۱/۴±۲/۱	۰/۶±۰/۸۹	۱/۶±۱/۶	۱۴۸۳۵±۱/۸	۱۵۳۹۰±۲۱۸۷/۸
	گروه غوطه وری (FKC)	۱/۶± ۱/۴	۱/۲±۰/۸	۰/۵±۰/۴	۹۶۰۳±۲	۹۹۰۰±۱۹۷۲/۳
	گروه تزریقی (FKC)	۱/۲±۱	۲±۱/۵	۰/۸±۰/۶	۱۲۶۷۶±۲	۱۳۱۵۰±۴۹۴۲
	گروه خوراکی (ECP+FKC)	۰	۱/۶±۱/۲	۲/۸±۲/۱	۱۳۹۶±۳/۶	۱۰۸۳۰±۸۱۹/۷
دومین مرحله خونگیری(۴۰ روز پس از ایمن سازی)	گروه شاهد	۷۷/۹±۶۷/۹	۱۱۵/۷±۷۳/۲	۷۸/۹±۷۳/۵	۸۳۵۶±۱۰۶۵/۹	۸۵۷۰±۱۱۵۶/۸
	گروه تزریقی (ECP+FKC)	۱۱۸±۸۵	۱۸۵±۱۸۳	۱۶۶۲±۸۲۳	۱۷۱۳۵±۴۶۵۲	۱۸۲۳۰±۵۸۴۸
	گروه غوطه وری (fkc)	۲۰۶/۶±۹۲/۴	۱۱۴±۶۸	۱۴۶/۲±۱۳۰	۱۳۷۶۷±۲۴۱۱	۱۴۱۲۰±۲۵۷۰
	گروه تزریقی (FKC)	۱۴۰±۱۳۰	۱۸۳±۱۷۷	۳۰۶±۲۹۷	۱۷۸۲۱±۶۴۳۵	۱۸۴۴۴±۶۵۰۲
	گروه خوراکی (ECP+FKC)	۳۷/۵±۲۵/۸	۹۵±۷۷	۲۲۵±۲۰۷	۸۶۲۹±۲۶۴۹	۸۹۴۰±۲۸۰۹
سومین مرحله خونگیری(۶۰ روز پس از ایمن سازی)	گروه شاهد	۰	۲۷۹±۲۳۹	۵۴۸±۴۳۲	۸۰۱۲±۲۰۳۸	۸۸۴۰±۲۲۹۰
	گروه تزریقی (ECP+FKC)	۱۶۰±۷۱/۶	۳۷۰±۲۴۹	۳۳۸±۳۳۳	۲۱۲۶۹±۶۴۹۰	۲۱۹۵۰±۶۵۱۳
	گروه غوطه وری (fkc)	۰	۰	۳۲۵±۲۴۹	۲۸۲±۲۵۵	۱۷۴۲۳±۶۳۴۲
	گروه تزریقی (FKC)	۱۰۲/۶±۷۲	۲۲۵±۲۰۷	۱۰۵±۷۷	۱۹۱۳۹±۳۱۹۰	۱۹۴۹۶±۳۲۹۷
	گروه خوراکی (ECP+FKC)	۹۷±۴۳	۲۵۵±۲۲۴	۱۵۷±۱۲۸/۵	۱۳۵۶۲±۶۶۷۴	۱۳۹۹۰±۷۰۰۵
چهارمین مرحله خونگیری(۸۰ روز پس از ایمن سازی)	گروه شاهد	۰	۰	۳۶۴±۳۴۸	۸۳۴۱±۲۴۰۱	۸۶۹۰±۲۶۸۳
	گروه تزریقی (ECP+FKC)	۰	۳۲۹±۱۶۹	۵۰۴±۳۵۰	۲۱۸۷۶±۴۴۳۴	۲۲۷۱۰±۴۷۱۰
	گروه غوطه وری (FKC)	۶۵±۴۷/۵	۲۴/۹±۵۵	۲۷۰۶±۲۳۱۶	۱۰۷۴۱±۱۸۱۹	۱۳۵۶۰±۱۷۱۵
	گروه تزریقی (FKC)	۱۱۲±۵۰	۲۰۶±۲۰۶	۲۲۵۵±۱۸۴۹	۱۹۴۳۶±۳۱۵۹	۲۱۰۰۰±۲۲۷۲
	گروه خوراکی (ECP+FKC)	۷۶±۳۴	۲۰۷±۱۵۰	۱۳۷۱±۹۸۶	۱۵۳۳۸±۲۵۱۴	۱۶۵۲۰±۲۴۴۶

گیش دم زرد، باس راه راه و توربوت، عدم پاسخ هومورال یا پاسخ به‌میزان بسیار ناچیزگزارش گردیده است(۲۰،۲۱،۲۲). یکی از علل احتمالی این موضوع عدم تحریک ایمنی اختصاصی توسط آنتی‌ژن‌های سطحی برخی از این باکتری‌ها است. اثبات یا رد این موضوع نیازمند مطالعات بعدی است. مقایسه میزان تولید آنتی‌بادی در روشهای مختلف مصرف واکسن‌ها نیز نشان می‌دهد که مصرف خوراکی این واکسن‌ها کمترین تأثیر را بر تولید آنتی‌بادی داشته است که مطالعه Romalde و همکاران در سال ۱۹۹۹ نیز نتایج مشابه را نشان داده است(۲۲).

مطالعه سنجش میزان لیزوزیم سرم در تیمارهای مختلف ماهیان ایمن شده نشان می‌دهد که بیشترین سطح لیزوزیم تولیدی توسط روش داخل صفاقی و به‌ترتیب توسط واکسن کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری و حاوی ادجوانت و واکسن کشته حاوی ادجوانت و واکسن کشته بدون ادجوانت ایجاد شده است و پس از آن بیشترین میزان لیزوزیم به‌ترتیب به‌دنبال تجویز روش غوطه‌وری (واکسن کشته) و روش خوراکی با مصرف واکسن کشته غنی شده با اگزوتوکسین‌های باکتری و روش خوراکی با مصرف واکسن کشته حاصل شده است. لذا با توجه به قدرت ضد باکتریایی لیزوزیم به‌ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت و افزایش میزان قابل توجه آن در سرم ماهیان واکسینه شده به‌ویژه در روشهای تزریقی و افزایش میزان قابل توجه آن در سرم ماهیان واکسینه شده به‌ویژه در روشهای تزریقی و حمام در مقایسه با گروه کنترل امکان ایجاد محافظت غیراختصاصی حداقل برای یک دوره ۹ هفته‌ای پس از ایمن‌سازی ماهیان به‌روش‌های مذکور وجود دارد. به‌علاوه افزایش سطح قابل توجه لیزوزیم در گروههای تیمار و در هفته‌های اولیه پس از ایمن‌سازی احتمالاً حکایت از نقش و درگیری بیشتر سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی علیه این بیماری دارد. هر چند افزایش میزان لیزوزیم سرم در ماهیهای واکسینه یا بیمار شده به‌صورت تجربی توسط باکتریهای بیماریزا در مطالعات مشابه گزارش گردیده است(۳۰، ۱۳،۱۸، ۱۲) ولی این اولین باری است که ارتباط بین واکسیناسیون علیه استرپتوکوکوزیس و سطح لیزوزیم سرم گزارش می‌گردد.

در مطالعه Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ قدرت باکتری‌کشی آنتی‌سرم و سرم نرمال ماهی علیه برخی سوش‌های کپسول‌دار این باکتری ناچیز بوده است و حتی افزودن سرم تازه موجب تسریع در رشد باکتری گردیده بود. به‌هرحال در این مطالعه قدرت باکتری‌کشی آنتی‌سرم‌ها به ویژه برای آن دسته از ماهیانی که به‌روش تزریقی واکسینه شده‌بودند بالا بود. از جمله علل احتمالی این موضوع می‌توان به عدم کپسول‌دار بودن سوش مورد استفاده و نیز افزایش برخی از عوامل ایمنی غیراختصاصی نظیر لیزوزیم در سرم ماهیان ایمن شده باشد. زیرا کپسولهای پلی‌ساکاریدی در استرپتوکوکوسها مانع قدرت باکتری‌کشی سرمها می‌شوند. Sunyer و همکاران در سال ۱۹۹۵ در ماهی سوف دریایی یا sea bream قدرت باکتری‌کشی آنتی‌سرمها را در ماهیان

ایمن شده در برابر استرپتوکوکوس اینیایی مورد بررسی قرار دادند. آنها ضمن گزارش تفاوت معنی دار قدرت باکتری‌کشی گروه واکسینه با گروه شاهد (غیر ایمن) بردخالت فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی در این مورد تاکید کردند (۲۸).

به‌علاوه بررسی جمعیت لکوسیتی ماهیان ایمن شده نشان داد که در ایام نمونه‌برداری پس از واکسیناسیون (تا ۸۰ روز پس از ایمن‌سازی) در مقایسه با گروه شاهد به ویژه افزایش جمعیت گلبولهای سفید (شمارش کلی) و جمعیت لمفوسیتی از افزایش قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده است. این موضوع حکایت از تحریک و تمایز و افزایش جمعیت‌های سلول‌های درگیر در ایمن اختصاصی و غیر اختصاصی ماهیان ایمن شده با واکسن‌های مذکور و به‌روش‌های مختلف (تزریقی، غوطه‌وری و خوراکی) دارد. تنها مطالعه انجام شده در این خصوص توسط Ikeda و همکاران در سال ۱۹۸۲ نیز بیانگر این مطلب است (۱۱).

تشکر و قدردانی

از زحمات کارشناسان گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. این تحقیق در قالب طرح‌های تحقیقاتی مصوب دانشگاه تهران و با اعتبارات ویژه (گرانت) معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام گرفته است.

References

1. Akhlaghi, M., Munday, B.L., Whittington, R.J. (1996) Comparison of passive and active immunization of fish against Streptococcosis (enterococcosis). J. Fish Dis. 19:251-258.
2. Barnes, A. C., Young, F.M., Horne, M.T., Ellis, A.E. (2003) *Streptococcus iniae* : serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Dis. Aqu. Org. 53:241-247.
3. Carson, J. Gudkovs, N., Austin, B.(1993) Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, O. mykiss (Walbaum). J. Fish Dis. 16: 381-388.
4. Chang, P.H., Lin, C.W., Lee, Y.C.(2002) Lactococcus garvieae infection of cultured rainbow trout, On. mykiss, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 22: 319-327.
5. Chen, S.C., Liaw, L-L., Su, H-Y., Ko, S-C., Wu, C-Y., Channg, H-C., Sai, Y-H., Yang, R-L., Chen, Y-C., Chen, T-H., Lin, G-R., Cheng, S-Y., Lin, Y-D., Lee, JL., Lai, C-C., Weng, Y-J. and Chu, S-Y.(2002) Lactococcus garvieae, a cause of disease in grey mullet, Mugil cephalus, L. in Taiwan. J. Fish Dis. 25: 727-733.
6. Eldar, A., Horovitcz A., Bercovier, H. (1997) Development and efficacy and of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Vet. Imm. And Immunopathol. 56:175-183.
7. Ellis Anthony, E., (1990) Lysozyme Assays: In Stolen Aal;SOS. Tech. Fish Immunol. 101-103.
8. Evans, J.J, Klesius, P.H., Gilbert, P.M., Shoemarker, C.A., Al-Sarawi, M.A., Landsberg, J.L., Duremdez, R., Al-Marzouk, A. and Al-Zemki, S.(2002) Characterization of B-haemolytic group B Streptococcus agalactiae in cultured seabream, Sparus auratus, L. and wild mullet, Liza kulnzingeri, (Day) in Kuwait. J. Fish Dis. 25: 505-515.
9. Horn, M. T., Barnes, A. C.(1999) Enteric redmouth disease (Yersinia ruckeri) In:Woo, P. T. K. and Bruno, D. W(eds) Fish Disease and Disorders, Vol 3:Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing. pp. 425-474.
10. Iida, T., Wakabayashi, H., Egusa, S. (1981) Vaccination for control of streptococcal disease in culured yellowtail. Fish Pathol. 16: 201-206.
11. Ikeda, Y., Minami T., T. (1982) Hematological and biochemical assessment on streptococcal infection in cultured yellow tail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48: 1383- 1388.
12. Iwama, G., Nakanishi, T.(1997) The Fish Immune System: organisem, pathogen and environment, published by ACADEMIC PRESS, First edition. pp.471.
13. Klesius, P.H., Shomaker, C.A., Evans, J.J. (1999) Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19:39-41.
14. Klesius, P.H., Shomaker, C.A., Evans, J.J. (2000) Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (O. niloticus). Aquaculture. 188: 237-246.
15. Kitao, T., Streptococcal infections (1993) In:Inglis

V., Roberts J.R. and Bromage N.R. (eds) Bacterial Diseases of Fish, Blackwell Science, pp.196-210.

16. Klontz, G.W. (1994) Fish hematology. In: Stelon, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C, Kaattari, S.L. and Smith, S.A. (eds) Techniques in Fish Immunology, Vol.3, SOS Pub.pp.121-132.
17. Kusuda R., Salati F. (1999) Enterococcus seriolicida and Streptococcus iniae. In: Woo P.T.K. and Bruno D.W. (Eds) Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections, CAB Int. 3: 303-317.
18. Moyner, K., Roed, K. H., Sevatdal, S. and Heum, M. (1993) Changes in nonspecific immune parameter in atlantic salmon, Salmo solar L., induced by Aeromonas salmonicida infection. Fish and Shellfish Immunol. 3: 253-265.
19. Roberson, B.S. (1990) Bacterial agglutination. In: Techniques in fish Immunology (ed. by J.S. Stolen. T.C. Fletcher, D.P. Anderson. B.S. Roberson and W.B. Van Muiswinkel). SOS Publications. pp. 81-87.
20. Romalde, J.l., Toranzo, A.E.(2002) Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. In:Cunningham, C.O. (ed) Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases. Kluwer Academic Publishers, London. 3: 211-233.
21. Romalde, J.L., Magarifios, B., Toranzo, A.E. (1999) Prevention of streptococcosis in turbot by intraperitoneal vaccination: a review. Appl. Ichthyol. 15: 153-158.
22. Sakai, M., Austin, S., Kobayashi, M. (1989) Protective immune response in rainbow trout (O. mykiss) vaccinated with B-haemolytic streptococcal bacterin. Fish Pathol. 24:169-173.
23. Schmidtke, L.M., Carson, J.(1999) Induction, characterization and pathogenicity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) of Lactoccus garvieae Lforms. Vet. Microbiol. 69: 287-300.
24. Schmidtke, L.M., Carson, J.(2003) Lactococcus garvieae strains isolated from rainbow trout and yellowtail in Australia, South Africa and Japan differentiated by repetitive sequence markers. Bull. Eur. Asso. Fish Pathol. 23: 206-212.
25. Shelby, R.B., Klesius, P.H., Shomaker, C.A., Evans, J.J. (2002) Passive immunization of tilapia, Oreocromis niloticus, with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. J. Fish Dis. 25:1-6.
26. Shelby, R.B., Shomaker, C.A., Klesius, P.H. (2003) Development of an immunoassay to measure the humoral immune response of hybrid striped bass. Vet. Immunol. Immunopathol. 91:217-225.
27. Soltani, M., Jamshidi, Sh., Sharifpour, I. (2005) Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (O. Mykiss) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 25:95-106.
28. Sunyer, J. O., Tort, L.(1995) Natural hemolitic and bactericidal activities of sea bream (Sparus aurata) serum are effected by the alternative compelement pathway. Vet. Immunol. Immunopathol. 45: 335-345.
29. Toranzo, A.E. Devesa, S., Romalde, J.L., Lamas, J., Riaza A., Lero, J. and Barja, J.L. (1995) Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against Enterococcus sp. Infection in turbot. Aquaculture. 134:17-27.
30. Vivas, J., Razquin, B., Fierro, P. L., Villena. A.J.(2005) Modulation of the immune response to an Aeromonas hydrophila live vaccine in rainbow trout: effect of culture media on the humoral immune response and complement consumption. Fish and shellfish immunol. 18: 2323-2333.