زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۵۶- ۴۷

مقاله پژوهشی

ارزیابی عیار آنتی‌بادی اختصاصی و بازماندگی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پاسخ به چالش با باکترین *استرپتوکوکوس اینیایی* و *یرسینیا راکری*

سیدعبدالحمید حسینی[1*]، مجتبی علیشاهی[2]، سیدمحمدجلیل ذریه زهرا[3]، ابوالحسن راستیان نسب[1]، رقیه محمودی[1]، عیسی فلاحت ناصرآباد[1]، اسماعیل کاظمی[1]

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران.

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: hoseiniabdolhamid@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2021.687826

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۰۸

چکیده

استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس از مهمترین بیماری‌های ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در آبزی‌پروری می‌باشند. در این پژوهش، عیار آنتی‌بادی سرمی ضد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و یرسینیا راکری در ماهیان واکسینه شده با واکسن دوگانه این دو بیماری ارزیابی گردید. به همین منظور تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به وزن ۲ ± ۲۵ گرم به ٤ تیمار ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوزیس، ایمن شده با واکسن یرسینیوز، ایمن شده با واکسن ترکیبی استرپتوکوکوس/یرسینیوز و گروه کنترل تقسیم شده و تزریق واکسن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در روزهای صفر و ١٤ به روش داخل صفاقی انجام گرفت. روزهای صفر، ۳۰ و ٦٠ واکسیناسیون، نمونه سرمی تهیه و به روش الایزا و با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال نسبت به تعیین عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیایی و یرسینیا راکری اقدام گردید. همچنین بعد از روز ٦٠ و به مدت ١٤ روز تیمارهای مذکور با دوز ایجاد کننده تلفات ۵۰ درصد (LD_{50}) هر باکتری به صورت جداگانه مورد چالش قرار گرفتند. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار میزان آنتی‌بادی در روز ۳۰ و ٦٠ آزمایش در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۵$)، هرچند این میزان در روز ٦٠ نسبت به روز ۳۰ کمتر می‌باشد. همچنین چالش باکتریایی نیز نشان داد که درصد تلفات تجمعی در تیمارهای ایمن شده نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. درصد تلفات بعد از چالش در تیمار واکسن استرپتوکوکوس، واکسن یرسینیوز و واکسن دوگانه به ترتیب برابر ۱۰، ۲۰ و ۱۰ درصد بود که نسبت به تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). بنابراین می‌توان گفت که تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث ایجاد پاسخ ایمنی مؤثری در برابر این دو بیماری شده که قابل رقابت با هریک از واکسن‌ها به تنهایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: واکسن دوگانه، استرپتوکوکوزیس، یرسینیوزیس، عیار آنتی‌بادی، چالش باکتریایی.

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با تولیدی به میزان ۱۷۳۳۸٤ تن نقش مهمی در تأمین پروتئین کشور ایفا می‌کند (٦). در بیان اهمیت جایگاه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ذکر این نکته ضروری است که از ۸٤۸ هزار تن تولید این ماهی در دنیا، کشور ما دارای جایگاه نخست تولید این ماهی می‌باشد (۲۲). بنابراین توجه به این صنعت از نظر جلوگیری از شیوع و بروز انواع بیماری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. از بیماری‌هایی که در چند سال اخیر شیوع و بروز آنها در مزارع پرورشی باعث بروز تلفات و خساراتی گردیده است، بیماری‌های باکتریایی استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس می‌باشد (۵، ۲۰).

یکی از راه‌های معمول مبارزه با این بیماری‌ها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست. اما استفاده از آنتی‌بیوتیک در شرایط پرورشی بعضی محدودیت‌ها و نگرانی‌هایی را در پی دارد. اولین نگرانی ایجاد مقاومت در باکتری-های بیماریزا است، از سوی دیگر تجمع آنتی‌بیوتیک در بدن ماهیان سبب انتقال دارو به مصرف‌کنندگان ماهی و احتمال ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری-زای انسانی می‌گردد. مسائل زیست محیطی و از طرفی هزینه و مشکلات اجرایی تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها نیز محدودیت بزرگی در تجویز آنهاست. لذا یافتن راه‌های جایگزین پیشگیری و کنترل ضروری به نظر می‌رسد (۸). در همین راستا امروزه ساخت و استفاده از واکسن‌ها به عنوان یکی از مهمترین راه‌های برقراری شرایط ایمنی زیستی و از موثرترین روش-های مقابله با بیماری‌های باکتریایی در مزارع پرورشی در حال توسعه می‌باشد (١٦).

هر چند امروزه غالب واکسن‌های در دسترس آبزی-پروری، تک واحدی یا مونووالانت می‌باشند، ولی با توجه به مزیت‌های متعدد استفاده از واکسن‌های چند واحدی (پلی والانت) در چند سال اخیر بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته و امروزه در پرورش آزاد ماهیان در نروژ حتی واکسن‌های پنج واحدی هم کاربردی شده‌اند (٤، ۱۵). بنابراین بکارگیری واکسن پلی‌والان از جهات مختلف نسبت به واکسن مونووالان (تک واحدی) ارجحیت داشته و استراتژی ایمنی سازی با چند عامل در تحریک پاسخ ایمنی موثرتر واقع شده و موجب برانگیخته‌شدن پاسخ ایمنی در برابر گستره وسیعی از بیماری‌ها می‌گردد، علاوه بر آن کاهش هزینه و استرس ماهی را نیز به دنبال دارد (۱).

مطالعات مختلفی در خصوص بررسی ایمنی‌زایی واکسن‌های دوگانه انجام گرفته شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعه کرمی و همکاران (۱۳۹٦) اشاره کرد که به بررسی اثر واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس بر پاسخ ایمنی اختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند (۱۰).

در مطالعه دیگری Shomaker و همکاران (۲۰۱۲)، واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/ویبریو را در ماهی تیلاپیای تغییر جنسیت یافته با موفقیت استفاده کردند و کارایی مناسب این واکسن را به روش تزریقی گزارش نمودند (۱۹). همچنین Bastardo و همکاران (۲۰۱۲) واکسن دوگانه لاکتوکوکوس/ آئروموناس را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کرده و کارایی این دو واکسن را نسبت به واکسن‌های تک‌واحدی هر باکتری مشابه گزارش کردند (۳). در تحقیقی دیگر Spinos و همکاران (۲۰۱۷) واکسن دوگانه باکتریایی در برابر بیماری‌های photobacteriosis و vibriosis در ماهی سی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) را ارزیابی و ایمنی‌زایی مناسب واکسن را گزارش نمودند (۲۱).

بنابراین در این پژوهش پاسخ ایمنی اختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/یرسینیوزیس با اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی ضد این دو باکتری ارزیابی گردید. همچنین میزان تلفات تجمعی و درصد محافظت واکسن تزریق شده در تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط محل انجام آزمایش: تعداد ۳۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌الای رنگین‌کمان به وزن ۲ ± ۲۵ گرم در زمستان ۱۳۹۸ از یکی از مزارع استان کهگیلویه و بویراحمد تهیه و به مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج منتقل گردید. قبل از انتقال، ماهیان از لحاظ عدم ابتلا به بیماری استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس مورد آزمایش قرار گرفتند. ماهیان در ۱۲ عدد مخزن فایبرگلاس با گنجایش ۲۰۰۰ لیتر به چهار تیمار مساوی (هر تیمار در سه تکرار ۲۵ قطعه‌ای) تقسیم (جدول ۱) و پرورش آنها همراه با شرایط محیطی کنترل شده و یکسان انجام پذیرفت. قبل از شروع تحقیق سازگاری ماهیان به شرایط پرورشی جدید به مدت ۲ هفته انجام پذیرفت. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای ۰/۷ ± ۱۲/۵ درجه سانتیگراد، اکسیژن ۰/٤ ± ۹ میلی‌گرم در لیتر، سختی ۲۲ ± ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و میزان pH برابر با ۰/۲ ± ۷/۸ انجام پذیرفت. تغذیه ماهیان به مدت ٦۰ روز با غذای تجاری شرکت ۲۱- بیضا، ایران، و به میزان ۲/۸ درصد وزن بدن صورت گرفت.

انتخاب باکتری‌های بذر واکسنی: باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و یرسینیا راکری مورد استفاده در این تحقیق حاصل تحقیقات قبلی تیم تحقیق بودند که طی این دو تحقیق از بین ده‌ها ایزوله جداسازی شده از ماهیان بیماری چهار استان چهارمحال بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، خوزستان و لرستان بذرهای واکسنی انتخاب گردیدند. به این منظور ابتدا بررسی پاتوژنیسیتی در شرایط برون تنی (in vitro) شامل: پاتوژنیسیتی ژنتیکی (حضور ژن‌های حدت)، پاتوژنیسیتی فنوتیپی (پروتئولیز و همولیز) انجام گرفت و بدنبال آن باکتری‌های منتخب بر اساس پاتوژنیسیتی درون تنی (in vivo) با تعیین LD_{50} ارزیابی و حادترین ایزوله‌ها هم از نظر برون تنی و هم از نظر درون تنی برای تحقیق انتخاب گردیدند (۱۱، ۲۳).

تهیه واکسن: بذر باکتریایی انتخاب شده *استرپتوکوکوس اینیایی* و *یرسینیا راکری* (جداسازی شده از تلفات ماهی قزل‌آلا در کشور که توسط تست-های مولکولی تایید تشخیص شده بود) در محیط کشت مایع TSB به مدت ۳٦ ساعت (فاز رشد لگاریتمی) کشت داده شد. سپس با استفاده از فرمالین ۱ درصد و انکوبه کردن به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه، غیرفعال شده و سه مرتبه با بافر فسفات استریل شستشو گردید تا فرمالین باقیمانده حذف شود. به منظور اطمینان از غیرفعال شدن، باکتری قبل از استفاده در محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. باکتری با استفاده از لوله‌های استاندارد مک فارلن به غلظت 10^{10} باکتری در میلی‌لیتر تنظیم و به عنوان واکسن (FKC) تک واحدی و ترکیب مساوی این دو باکتری به عنوان واکسن دوگانه استفاده شد (۲، ۲٤). برای اطمینان از تخمین تعداد باکتری با لوله‌های مک فارلن، از روش تهیه سریال دایلوشن و کشت در محیط TSA به روش کشت سطحی استفاده گردید.

واکسیناسیون: واکسیناسیون در روز صفر و روز ۱٤ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به روش تزریق داخل صفاقی انجام گرفت. به گروه شاهد ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به جای واکسن تزریق گردید. از هر تیمار ۹ ماهی (هر تکرار ۳ عدد) در روز صفر، ۳۰ و ٦۰ از

شروع تحقیق نمونه خون اخذ گردید. به این منظور تعداد سه ماهی از هر تکرار در هر مرحله نمونه‌گیری اخذ و بعد از بیهوشی با ۵۰۰ میلی لیتر در لیتر فنوکسی اتانول ماهی‌ها با سرنگ انسولین (سوزن ۲۳) به همراه هپارین به میزان حدود ۵۰۰ میکرولیتر خونگیری شده بعد از نمونه‌گیری برای ازمایشات هماتولوژی در همان زمان، بقیه خون برای جداسازی سرم و انجام آزمایشات ایمنی شناسی در نظر گرفته شد.

تعیین عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوک و یرسینیوز: تعیین عیار آنتی‌بادی ضد هر باکتری به روش الایزا و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد زنجیره سنگین IgM قزل‌آلا در موش حاصل تحقیق رویا رهنما (۱۳۹۷) (اهدایی دکتر صیفی، دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز) انجام گرفت (۱۷). از الایزای غیر مستقیم برای تشخیص تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس و یرسینیوز استفاده شد (۷). بدین منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن (باکتری سونیکه شده در بافر پوشاننده با میزان پروتئین ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به کف گوده ۹۶ خانه‌ای کوت شد. بعد از ۲۰ ساعت محتویات پلیت تخلیه شده و ٤ مرتبه با PBS حاوی توئن ۸۰ شستشو گردید. سپس سرم‌های مورد آزمایش به نسبت ۱:۲۰ با رقیق‌کننده شیرچربی گرفته شده رقیق‌سازی گردید و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر سرم رقیق شده اضافه گردید. پس از ٤۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، محتویات پلیت تخلیه گردید. پس از شستشوی کامل پلیت، میزان ۱۰۰ میکرولیتر پادتن منوکلونال Mouse anti trout به هر چاهک اضافه گردید. و به مدت ٤۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در این مرحله میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کونژوگه خرگوشی (Rabbit anti mouse) به چاهک اضافه و به مدت ٤۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. بعد از اضافه کردن سوبسترا، پلیت با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا در طول موج ٤۵۰ نانومتر قرائت گردید (۱۸).

چالش باکتریایی: لزوماً باید قبل از چالش باکتریایی غلظت ایجادکننده‌ی ۵۰ درصد تلفات (LD_{50}) برای هر باکتری مشخص شود. به این منظور غلظت‌های افزایشی بر مبنای ده به ماهی‌ها تزریق شده و تلفات تا ده روز ثبت گردید. نتایج به دست آمده با نرم‌افزار Probit آنالیز شده و غلظت LD_{50} مشخص گردید. در چالش این غلظت ($۲/۷\times۱۰^{۸}$ در مورد استرپتوکوکوس اینیایی و $۱/۲\times۱۰^{۸}$ در مورد *یرسینیا راکری*) به تمام ماهی‌های چالش داده شده به روش داخل صفاقی تزریق گردید. در روز ٦۰ تحقیق تعداد ده ماهی از هر تکرار انتخاب و به اکواریوم‌های مخصوص چالش منتقل گردید. برای تهیه سوسپانسیون هر باکتری، پس از کشت هر باکتری در محیط TSA باکتری‌ها به غلظت تعیین شده در مرحله قبل تنظیم گردیدند. و به هر ماهی میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت تهیه شده به روش داخل صفاقی تزریق گردید و میزان تلفات در تیمارهای مختلف به مدت ١٤ روز ثبت و درصد تلفات بین تیمارها مقایسه گردید. در مورد تیمار واکسن دوگانه، چالش باکتریایی با هر دو باکتری بصورت جداگانه انجام گرفت (۲).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای بررسی معنی‌داری بودن تفاوت بین میانگین‌ها در ٤ گروه تحقیق از پس آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ استفاده شد.

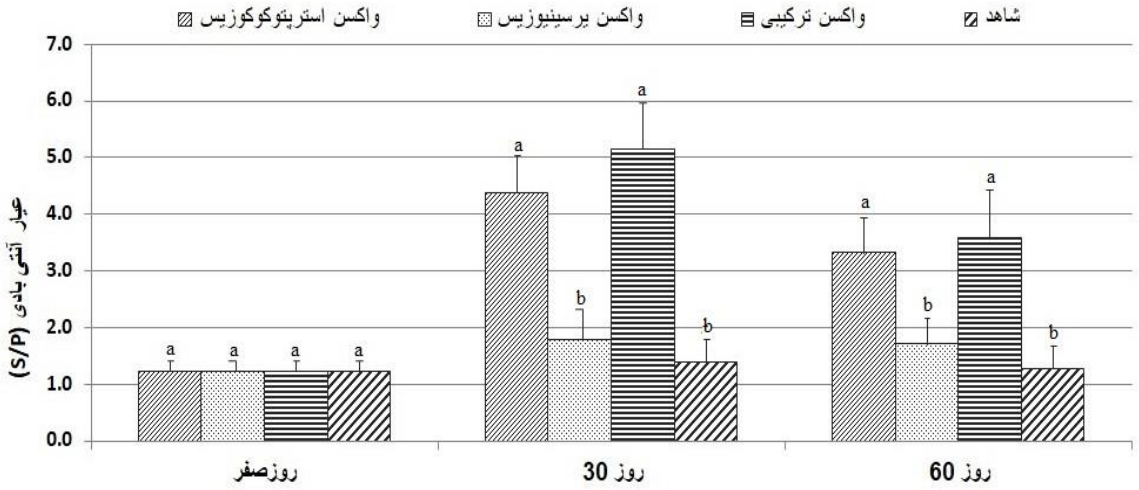
جدول۱-تیمارهای آزمایشی

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
تیمار۱	ایمن شده با واکسن استرپتوکوکوزیس	۷۵ قطعه (در سه تکرار)
تیمار۲	تیمار ایمن شده با واکسن یرسینیوزیس	۷۵ قطعه (در سه تکرار)
تیمار۳	ایمن شده با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/یرسینیوزیس	۷۵ قطعه (در سه تکرار)
کنترل	بدون تزریق واکسن (سرم فیزیولوژی)	۷۵ قطعه (در سه تکرار)

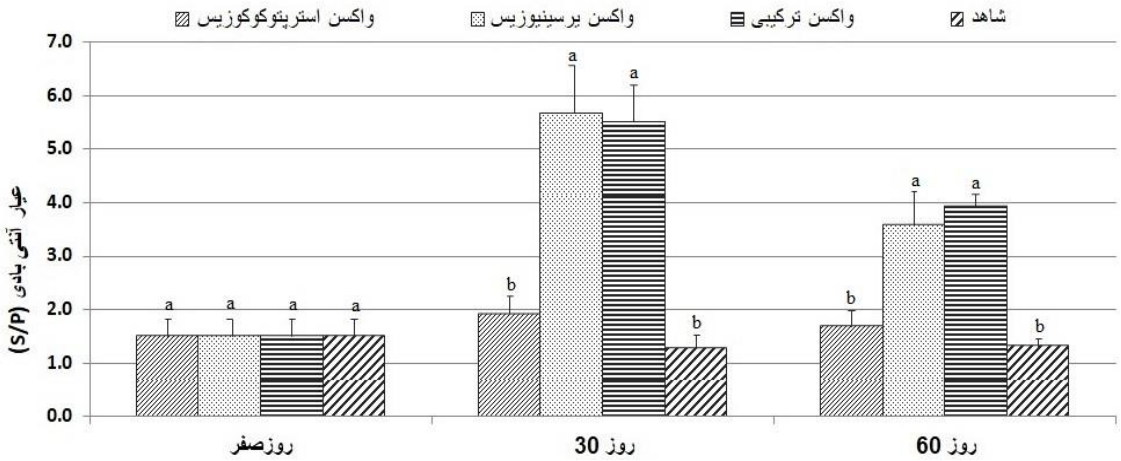
نتایج

عیار آنتی‌بادی: نتایج مربوط به عیار آنتی‌بادی اختصاصی علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* و *یرسینیا راکری* در تیمارهای آزمایشی در شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب نشان داده شده است. عیار آنتی‌بادی بر علیه استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که بیشترین میزان پادتن در روز ۳۰ بعد از واکسیناسیون می‌باشد. در این روز میزان عیار آنتی‌بادی در تیمارهای واکسن استرپتوکوکوس، واکسن دوگانه نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری بالاتر بود ($p < ۰/۰۵$). هرچند در روز ٦۰ بعد از واکسیناسیون کاهش عیار آنتی‌بادی در این دو گروه نسبت به روز ۳۰ مشاهده شد، اما همچنان این میزان در تیمار واکسن استرپتوکوکوس و دوگانه در روز ٦۰ نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). همچنین نتایج تعیین عیار آنتی بادی علیه یرسینیا راکری نشان داد، بیشترین میزان پادتن در روز ۳۰ بعد از واکسیناسیون در تیمار واکسن یرسینیا و دوگانه مشاهده می‌گردد. این میزان در روز ٦۰ نیز دارای اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۵$)، هرچند نسبت به روز ۳۰ دارای میزان کمتری می‌باشد.

چالش باکتریایی: نتیجه تلفات تجمعی چالش با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و یرسینیا راکری بعد از دو هفته به ترتیب در شکل های ۳ و ٤ نشان داده شده است. بین تیمارهای واکسینه چالش شده با هر دو باکتری نسبت به گروه کنترل کاهش درصد تلفات تجمعی مشاهده می‌گردد.



شکل ۱- مقایسه عیار آنتی بادی بر علیه استرپتوکوکوس اینیایی در تیمارهای مختلف در مراحل نمونه برداری، اطلاعات بصورت میانگین ± انحراف معیار، حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$).



شکل۲- مقایسه عیار آنتی‌بادی بر علیه یرسینیا راکری در تیمارهای مختلف در مراحل نمونه‌برداری، اطلاعات بصورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. حروف کوچک متفاوت روی ستون انحراف معیار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$).

شکل ۳- درصد تلفات تجمعی ماهی قزل آلای رنگین کمان بعد از چالش با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی

شکل ٤- درصد تلفات تجمعی ماهی قزل آلای رنگین کمان بعد از چالش با باکتری یرسینیا راکری

بحث

در این پژوهش پاسخ ایمنی اختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/یرسینیوزیس با اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی ضد این دو باکتری ارزیابی گردید.. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین میزان عیار آنتی‌بادی در روز ۳۰ بر علیه هر دوگونه مشاهده گردید. هرچند این میزان در روز ٦٠ کاهش پیدا نمود اما همچنان نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. در مطالعه کرمی و همکاران پاسخ پادتن سرمی قزل-آلای رنگین‌کمان نسبت به تزریق واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین میزان پادتن ۳۰ روز بعد از واکسیناسیون اولیه بر علیه هر دو گونه بدست آمد. هرچند در روزهای ٤٥ و ٦٠ بعد از واکسیناسیون میزان تولید پادتن کاهش نشان داد اما همچنان نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار بود (۱۱). Huang و همکاران در سال ۲۰۱٤ افزایش معنی‌دار عیار آنتی‌بادی را در سرم ماهیان ایمن شده با واکسن کشته استرپتوکوکوس اینیایی در ۱٤ روز پس از تزریق داخل صفاقی واکسن نسبت به تیمار شاهد را گزارش نمودند (۹). در مطالعه دیگری مقایسه عیار آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های موجود در واکسن‌های دوگانه ایرانی و خارجی استرپتوکوکوزیس اینیایی/لاکتوکوکوس گارویه نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد(۱۳). Bastardo و همکاران (۲۰۱۲) افزایش سطح آنتی‌بادی را در مطالعه تأثیر واکسن دوگانه آئرومونوس هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روز ۱٥ واکسیناسیون گزارش نمودند (۳). از مکانیسم‌های اساسی آنتی‌بادی‌های اختصاصی می‌توان از بین بردن توانایی باکتری در چسبیدن و حمله به بافت میزبان اپسونیزه کردن سلولهای باکتری و تحریک فاگوسیتوزیس به وسیله ماکروفاژها و فعال شدن کمپلمان را برشمرد (۱٤).

در این تحقیق کارایی واکسن از طریق چالش با سویه-های باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و یرسینیا راکری بر اساس میزات تلفات ایجاد شده نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد تلفات تجمعی در گروه واکسینه بعد از چالش با هر دو باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و یرسینا راکری برابر ۱۰ بود که نسبت به تلفات

تجمعی در تیمار شاهد که برابر ٤٠ بود، تفاوت معنی-داری نشان داد. بنابراین با توجه به نتیجه بدست آمده میتوان گفت که واکسن دو گانه استرپتوکوکوزیس/ یرسینیوز سطح محافظت مناسبی ایجاد کرده است.

در مطالعه کرمی و همکاران درصد تلفات تجمعی در گروه واکسینه بعد از چالش با هر دو باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه به ترتیب برابر ٣٦/٧ و ٣٠ بود که نسبت به تلفات تجمعی درتیمار شاهد که برابر ٩٦/٧ بود اختلاف معنی‌داری نشان داد. همچنین میزان محافظت نیز ٦٨/٩٨ و ٦٢/٠٥ درصد به ترتیب علیه لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی گزارش گردید (١٢). Vendrell و همکاران (٢٠٠٦) بازماندگی حدود ٩٤ درصد را بعد از چالش ماهیان قزل‌آلای ایمن شده، با سویه حاد لاکتوکوکوس گارویه گزارش نمودند (٢٥). همچنین Bastardo و همکاران (٢٠١٢) گزارش کردند که واکسن دوگانه محافظت بسیار بالایی را علیه لاکتوکوس گارویه و آئروموناس هیدروفیلا موجب می‌شود (٣).

نتیجه‌گیری

نتایج کلی این تحقیق بیانگر این است که تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان علاوه بر ایجاد محافظت مناسب در برابر بیماری، به نحو مؤثری باعث ایجاد پاسخ ایمنی در برابر این دو بیماری گردید که قابل رقابت با هریک از واکسن‌ها به تنهایی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این طرح از محل اعتبارات معاونت ترویج سازمان جهاد کشاورزی استان کهگیلویه و بویراحمد، توسط مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج و با همکاری دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. بدینوسیله از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

منابع

1. Adams A. 2019. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish and Shellfish Immunology*, 90: 210-214.

2. Alishahi M., Ranjbar M.M., Ghorbanpour M., Peyghan R., Mesbah M., Razi Jalali M., 2010. Effects of dietary on specific and nonspecific immunity in the common carp *Aloe vera Cyprinus carpio. International Journal of Veterinary Research*. 3: 189-195.

3. Bastardo A., Ravelo C., Castro N., Calheiros J., Romalde J.L., 2012. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish and Shellfish Immunology*. 32: 756-761.

4. Evensen O. 2016. Development of fish vaccines: Focusing on methods. In Fish Vaccines; Adams, A., Ed.; Springer: Basel, Switzerland, pp: 53-74.

5. Faied M., Ramezani B. 2020. Bacterial investigation of infected fish with streptococcus and evaluation of their antibiotic resistance in rainbow trout in guilan province. *Journal of Aquaculture Development*, 3(14): 1-11. [In Persian].

6. Ghorbanzade R., Nazari S. 2020. Annual Statistical Book, Iranian Fisheries Organization Press, 64p. [In Persian].

7. Halimi M., Alishahi M., Abbaspour M. R., Ghorbanpoor M., Tabandeh M. R. 2020. High efficacy and economical procedure of oral vaccination against *Lactococcus garvieae*/*Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 99: 505-513.

8. Hastein T., Gudding R., Evensen O. 2005. Bacterial vaccines for fish-an update of the current situation worldwide. *Developments in Biologicals*, 121: 55-74.

9. Huang H.Y., Chen Y.C., Wang P.C., Tsai M.A., Yeh S.C., Liang H.J., Chen S.C. 2014. Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper *Epinephelus coioides* by intraperitoneal immunization. *Vaccine*, 2(51): 7014-7020.

10. Karami E., Alishahi M., Tabandeh M.R., Ghorbanpor M., Mohamadiyan T. 2018. Immunogenicity of bivalent vaccine, Streptococcus/Lactococcus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*). *Journal of animal environment*, 9(4): 199-206. [In Persian].

11. Karami E. 2019. Effect of bivalent vaccine, Streptococcus/Lactococcosis on specific immune response and expression of immune genes in rainbow trout. Phd degree thesis, in the field of aquatic health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz. [In Persian].

12. Karami E., Alishahi M., Ghorbanpor M., Tabandeh M.R., 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): 1-9. [In Persian].

13. Khaj H., Mesbah M.2., Tabandeh M.R., Mohammadian T., Dadar M. 2018. Comparative effects of Iranian streptococcus/lactococcus vaccine and Aquavac vaccine on growth performance and immunity in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Iranian Veterinary Journal*, 13(4): 28-43. [In Persian].

14. Lafrentz B.R., Shoemaker C.A., Klesius P.H. 2011. Immuno proteomic analysis of the antibody response obtained in Nile tilapia following vaccination with a *Streptococcus iniae* vaccine. *Veterinary Microbiology*, 152 (3-4): 346-352.

15. Ma J., Bruce T.J., Jones E.M., Cain K.D. 2019. A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms*, 7(11): 569.

16. Pridgeon J.W., Klesius P.H. 2011. Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccine*, 29: 5986-5993.

17. Rahnama R. 2018. Production of monoclonal antibody of anti-igm in rainbow trout and evaluation those with study of serological of VHS virus in farms suspected of septicemia and hemorrhage (VHS). Phd degree thesis, in the field of aquatic health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz. [In Persian].

18. Shelby R.A., Klesius P.H., Shoemaker C.A., Evans J.J. 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *Journal of Fish Diseases*, 25(1): 1-6.

19. Shomaker C.A., Klesius P. 2012. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus.Aquaculture*, (354-355): 45-49.

20. Soltani M., Mousavi S., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Mirzargar S.S., Taheri Mirghaed A., Shafiei Sh., Shohreh P., Mohammadian S. 2014. Molecular study of *Yersinia ruckeri* distribution, the causative agent of yersiniosis in some farmed rainbow trout of Iran. *Iranian Veterinary Journal*, 10(1): 59-68. [In Persian].

21. Spinos E., Kokkoris G.D., Bakopoulos V. 2017. Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. *Aquaculture*, 471: 172-184.

22. The state of world fisheries and aquaculture. 2020. http://www.fao.org/publications/sofia/2020/en/

23. Tulaby dezfooli Z. 2020. Inestigation of immunogenicity and protection of Yersinia rockeri lipopolysaccharide, encapsulated by alginate-chitosan in rainbow trout. Phd degree thesis, in the field of aquatic health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz [In Persian].

24. Tulaby Dezfuly Z., Aramoon A., Alishahi M., Halimi M., Rahnama R. 2020. The Effects of Lead Toxicity on the Hematological Parameters Common Carp (*Cyprinus carpio*) at Varying Salinity Levels. *Iranian Journal of Toxicology*, 14(1): 1-8.

25. Vendrell D., Balcazar JL., Ruiz-Zarzuela I., Ignacio D.B., Girones O., Muzquiz JL., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: Review. *Comparative Immunology and Microbiological Infectious Diseases*, 29: 177-198.