بررسی پاسخ پادتن سرمی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس

اسماعیل کرمی*[۱]، مجتبی علیشاهی[۱]، مسعود قربانپور[۲]، محمدرضا تابنده[۳]، تکاور محمدیان[۱]

*karami78@gmail.com

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
۲- گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
۳- گروه علوم پایه ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۷

چکیده

در این پژوهش پاسخ ایمنی اختصاصی ماهی قزل آلای رنگین کمان بعد از تجویز واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس با اندازه گیری عیار پادتن ضد این دو باکتری به روش الایزا ارزیابی گردید. بدین منظور تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلا با وزن ۱/۷±۳۰ گرم به دو گروه، هر گروه در سه تکرار تقسیم شدند. ماهیان در تیمار واکسینه ابتدا با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس (در برابر استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه) به روش داخل صفاقی ایمن شدند و ۳۰ روز بعد واکسن یادآور به روش غوطه‌وری با همان واکسن انجام شد. گروه شاهد کاملاً مشابه تیمار واکسینه با سرم فیزیولوژی تیمار شد. در روزهای ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ بعد از واکسیناسیون اولیه، نمونه سرمی از ماهیان تهیه و تیتر پادتن ضد *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* به روش الایزا و با استفاده از پادتن پلی کلونال Rabbit anti- trout بررسی و بین تیمارها مقایسه گردید. ۶۰ روز بعد از واکسیناسیون اولیه ماهیان هر تیمار با حادترین سویه در دسترس باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه* چالش داده شدند و نتایج به مدت دو هفته ثبت و درصد بقاء نسبی (RPS) بین تیمارها مقایسه گردید. میزان بقاء نسبی در تیمار واکسینه چالش شده با *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* بترتیب برابر ۷/۲۲±۶۲/۰۵ و ۸/۶۷±۶۸/۹۸ درصد بود که نسبت به تیمار کنترل افزایش معنی‌داری داشت. عیار پادتن دو هفته بعد از واکسیناسیون قابل اندازه‌گیری بود و ۴۵ روز بعد از واکسیناسون به حداکثر رسید. هر چند در روز ۶۰ سطح پادتن کاهش یافت، اما همچنان نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری بالاتر بود ($p<0/05$). لذا، نتیجه‌گیری می شود که از واکسن دوگانه حاوی این دو باکتری علاوه بر کارایی قابل قبول، قادر به افزایش عیار پادتن سرمی در ماهی می‌باشد. لذا، می‌توان روش واکسیناسیون پیشنهادی این تحقیق علیه بیماری استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس را در کشور، موثر و قابل اجرا دانست.

لغات کلیدی: پاسخ پادتن، قزل آلای رنگین کمان، واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس

*نویسنده مسئول

مقدمه

بیماری‌ها مهمترین مانع در گسترش و ثبات در فعالیت‌های آبزی‌پروری در سراسر دنیا می‌باشند. اغلب پاتوژن‌های باکتریایی مسئول تلفات شدید در گستره وسیعی از مراحل مختلف رشد ماهی می‌باشند. (Vendrell *et al*., 2006) بیماری‌های عفونی باکتریایی در آبزی‌پروری به طور عمده توسط میکروارگانیسم‌های گرم منفی رخ می‌دهند. با این حال، در دهه‌های اخیر به دلایل ناشناخته بیماری‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت رو به رشد هستند و اکنون از مهمترین معضلات آبزی‌پروری می‌باشند. کوکسی‌های گرم‌مثبت *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* که به نام بیماری استرپتوکوکوزیس شناخته می‌شوند، عامل بیماری عفونی استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس و موجب مرگ میر شدید در ماهیان در اب شیرین و شور بویژه ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌باشند (Agnew and Barnes, 2007).

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در شرایط پرورشی سبب ایجاد مقاومت آنتی بیوتیک، تجمع آنتی بیوتیک در بدن ماهیان و انتقال دارو به مصرف کنندگان ماهی می‌گردد و احتمال ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و مشکلات زیست محیطی ناشی از تجویز آنتی بیوتیک‌ها افزایش می‌یابد. لذا، یافتن راههای پیشگیری جهت به حداقل رساندن خسارات اقتصادی ناشی از تلفات در مزارع پرورش ماهی و نیز کاهش مشکلات زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها ضروری بنظر می‌رسد. (Hastein *et al*., 2005).

غالب واکسن‌های در دسترس در آبزی‌پروری، مونو والانت می‌باشند. در حالیکه در محیط زیست ماهی، همواره گستره وسیعی از باکتری‌های مختلف و نیز مهاجم‌های ثانویه وجود دارند و استراتژی واکسیناسیون تنها با یک عامل، ممکن است قادر به محافظت در برابر یک پاتوژن خاص یا یک عامل بیماری باشد (Vendrell *et al*., 2006). استراتژی ایمنی سازی با چند عامل در تحریک پاسخ ایمنی مؤثرتر واقع می شود و موجب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی در برابر گستره وسیع‌تر از بیماری‌ها می‌گردد و در نتیجه، هزینه ایمن‌سازی و نیز استرس ناشی از آن نیز کاهش می‌یابد. بنابراین، در این پژوهش علاوه بر بررسی کارایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان، پاسخ پادتنی ماهیان بعد از واکسیناسیون نیز در برابر این دو باکتری ارزیابی گردید.

مواد و روش کار

تهیه ماهی

تعداد ۴۵۰ قطعه ماهی به وزن متوسط ۱/۷±۳۰ گرم از یکی از مزارع پرورشی استان لرستان خریداری و تحت شرایط مناسب به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی شهید چمران انتقال داده شدند. از ۵ عدد ماهی از کلیه و مغز نمونه‌برداری گردید و در محیط TSA تلقیح گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند تا اطمینان حاصل گردد ماهیان مبتلا به استرپتوکوزیس نیستند. نتایج نمونه‌برداری منفی بود. قبل از شروع تحقیق ماهیان به مدت دو هفته جهت سازگاری در مخازن ۲۵۰ لیتری نگهداری شدند. آب مورد استفاده آب کلرزدایی شده لوله کشی شهری بود که روزانه ۵۰٪ تعویض آب صورت می‌گرفت. هوادهی دائمی طی دوره برقرار بود. ماهیان به مدت ۶۰ روز با خوراک تجاری بایومار سایز ۰/۷ و روزانه به میزان ۲٪ وزن بدن غذادهی شدند. طی تحقیق درجه حرات آب ۲±۱۴ درجه سانتی‌گراد و pH آب ۰/۳±۷، اکسیژن محلول بالای ۸ میلی‌گرم در لیتر (بالای ۸۰٪ اشباع) و میزان NH3 و NO2 کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بود.

تهیه واکسن

از واکسن تجاری دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس جهاد دانشگاهی ACECR[1] (دارای مجوز سازمان دامپزشکی) استفاده شد. این واکسن محتوی دو سویه بیماری‌زای غیرفعال(کشته) باکتری‌های بیماریزای

[1] Academic Centre for Education, Culture and Research (Jahade daneshgahi)

Streptococcus iniae و *Lactococcus garviae* با دوز $۱×۱۰^{۹}$ جرم در میلی لیتر و ECP[1] غلیظ شده دو باکتری می‌باشد.

واکسیناسیون

برای انجام این مطالعه تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی به ۲ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار (۴۰ قطعه ماهی در هر تکرار) در تانک‌های ۲۵۰ لیتری تقسیم شدند. واکسیناسیون طبق روش ذیل انجام گرفت. گروه واکسینه شده طبق پروتکل واکسن روز اول به صورت تزریقی و به روش تزریق داخل صفاقی i.p و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر واکسن و بوستر در روز سی ام آزمایش به صورت غوطه‌وری و با رقیق نمودن واکسن به نسبت ۱ به ده واکسیناسون انجام شد. واکسن ابتدا با دوز $۱۰^{۱۰}$ تهیه شد و ۳۰۰ میلی‌لیتر واکسن با ۲۷۰۰ میلی‌لیتر آب مخازن ماهی مخلوط و برای واکسیناسیون استفاده شد. به گروه کنترل در روز صفر تنها حجم مساوی از سرم فیزیولوژی به جای واکسن تزریق گردید و در روز سی ام غوطه‌وری در آب بدون واکسن صورت گرفت. ۲ روز قبل از واکسیناسیون غذادهی قطع گردید. قبل از شروع واکسیناسیون ماهیان با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر از فنوکسی اتانول (Hedayati, 2018) بیهوش گردیدند.

نمونه‌گیری

در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ از تیمارها نمونه‌برداری بعمل آمد. از هر تیمار ۶ عدد در هر مرحله با سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری از ساقه دمی خونگیری گردید. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردیدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها جداسازی و تا زمان استفاده در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. قبل از خونگیری ماهیان با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر با فنوکسی اتانول بیهوش گردیدند (Hedayati, 2018)

اندازه‌گیری تیتر پادتن

تهیه آنتی‌سرم خرگوشی ضد IgM ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان: سرم ۵ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جمع‌آوری گردید. ایمنوگلوبولین‌های سرم با ترسیب با سولفات آمونیوم اشباع خالص‌سازی نسبی شدند. ایمنوگلوبولین ماهی به نسبت ۱:۱ با ادجوانت کامل فروند در تزریق اول و با ادجوانت ناقص فروند در تزریق دوم مخلوط گردید. دو تزریق به فاصله ۲ هفته به ۳ عدد خرگوش تزریق گردید. نهایتاً از خرگوش خون‌گیری از قلب انجام شد و سرم آن با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه جداسازی و در ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری گردید.

روش الایزا توصیه شده توسط Shelby و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. به طور خلاصه، 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 گردید و ۴ مرتبه با PBS حاوی توئن شستشو گردید. در مرحله بعد برای بلاک کردن چاهک‌های پلیت به هر چاهک میزان ۲۰۰ میکرولیتر شیر پس چرخ ۲٪ اضافه شد. در دمای آزمایشگاه به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. مجدداً محتویات پلیت تخلیه شد و ۴ بار با PBS حاوی توئن شستشو گردید. در مرحله بعد سرم‌های شاهد مثبت و منفی و سرم‌های مورد آزمایش به نسبت ۱:۲۰ با رقیق کننده شیر پس چرخ ۱٪ رقیق‌سازی گردید و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر سرم رقیق شده اضافه گردید. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، محتویات پلیت تخلیه و ۴ مرتبه با PBS+ Tween مورد شستشو قرار گرفت. پس از شستشوی کامل پلیت، پادتن پلی کلونال خرگوشی تولید شده در مرحله قبل به نسبت ۱:۱۵۰۰ در شیر ۱٪ رقیق شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس محتویات پلیت تخلیه و ۴ مرتبه با PBS+ Tween مورد شستشو قرار گرفت. در این مرحله آنتی بادی کونژوگه Goat anti Rabbit به نسبت

[1] Excretion of cytosolic proteins

۱:۵۰۰۰ در شیر ۱٪ رقیق شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس محتویات پلیت تخلیه و ۲ مرتبه با PBS+ Tween و ۲ مرتبه دیگر با PBS مورد شستشو قرار گرفت. سپس محلول کروموژن-سوبسترا (تترامتیل بنزیدین+ آب اکسیژنه) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و واکنش بعد از ۱۰ دقیقه با اضافه کردن ۷۵ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال به عنوان متوقف کننده واکنش، متوقف گردید. پلیت با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

تعیین LD_{50} دو باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه:* به منظور محاسبه LD_{50} هر باکتری در ماهی قزل آلا، ابتدا باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TSB کشت داده شدند. پس از سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه و جداسازی باکتری، غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی درحد 10^{10} باکتری در میلی لیتر تنظیم شد و با استفاده از رقت‌های متوالی از این سوسپانسیون (10^{9}-10^{5}) تهیه گردید. از هر غلظت به ده ماهی تزریق داخل صفاقی انجام شده و تلفات هر رقت به مدت ۱۰ روز ثبت و پس از مرگ ماهی‌ها، با کشت مجدد باکتری از اندام‌های داخلی شامل کلیه قدامی و کبد، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی چالش داده شده، اطمینان حاصل گردید. نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار Probit، اقدام به اندازه‌گیری LD_{50} گردید. میزان LD_{50} باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* به میزان $1/3\times10^{6}$ و در مورد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* $4/7\times10^{5}$ محاسبه شد.

چالش باکتریایی

پس از طی دوره آزمایش، در روز ۶۰، از هر تکرار به طور جداگانه برای هر باکتری ۱۰ ماهی (هر تیمار ۳۰ ماهی) به صورت تصادفی انتخاب شد. سپس این ماهیان با دوز LD_{50} محاسبه شده هر *باکتری (لاکتوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه* زنده) به صورت جداگانه با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر واکسن به صورت داخل صفاقی مورد چالش قرار گرفتند. نتایج تلفات تا ۱۴ روز بعد از چالش ثبت گردید و در صد تلفات بین تیمارها مقایسه گردید.

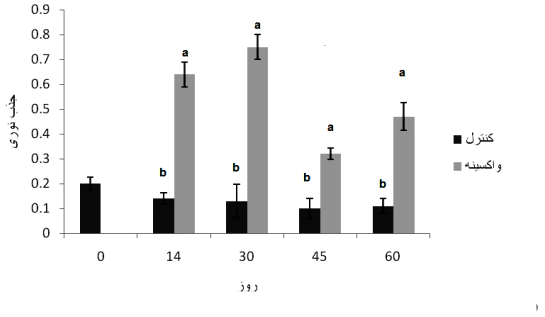
روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای آنالیز داده‌های بدست آمده از نرم افزار SPPS نسخه ۱۶ استفاده گردید. ابتدا از آزمون Leven statistic test برای همگن بودن انحراف معیار اطلاعات واز آزمون تی تست مستقل برای بررسی تفاوت میانگین تیمارها استفاده گردید.

نتایج

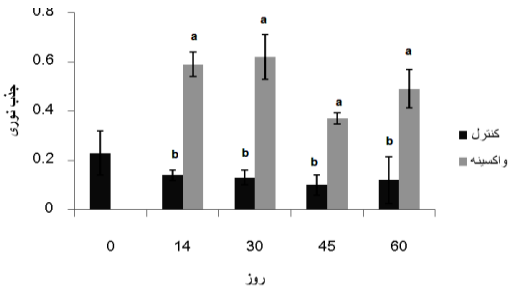
تیتر پادتن

نتایج مربوط به تیتر پادتن اختصاصی علیه *لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیه* در تیمارهای مورد تحقیق در شکل‌های ۱ و ۲ بترتیب نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین میزان پادتن در روز ۳۰ بعد از واکسیناسیون اولیه بر ضد هر دو گونه بدست آمد. هرچند در روزهای ۴۵ و ۶۰ بعد از واکسیناسیون کاهش تیتر نسبت به روز ۳۰ مشاهده گردید، اما همچنان نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری بالاتر بود.



تیمارهای مختلف در مراحل نمونه‌برداری. داده‌ها بر اساس میانگین± انحراف معیار ارائه شده است. حروف کوچک متفاوت روی ستون انحراف معیار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

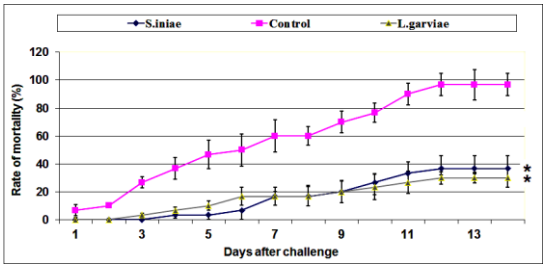
Figure 1: Comparison of antibody titers against *Lactococcus garviae* in different treatments at sampling stages. Data are presented based on mean ± SD. Different lowercase letters on the standard deviation scale indicate a significant difference at the level of 0.05 between treatments.



شکل۲: مقایسه تیتر پادتن علیه *استرپتوکوکوس اینیه* در تیمارهای مختلف در مراحل نمونه‌برداری. داده‌ها بر اساس میانگین± انحراف معیار ارائه شده است. حروف کوچک متفاوت روی ستون انحراف معیار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 2: Comparison of antibody titers against *Streptococcus iniae* in different treatments at sampling stages. Data are presented based on mean ± SD. Different lowercase letters on the standard deviation scale indicate a significant difference at the level of 0.05 between treatments.

در روز ۶۰ بعد از واکسیناسیون ماهیان تکرارهای هر تیمار به طور جداگانه با غلظت کشنده LD_{50} باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* چالش داده شدند. نتیجه تلفات تجمعی بعد از دو هفته در هر تیمار در شکل ۳ نشان داده شده است.

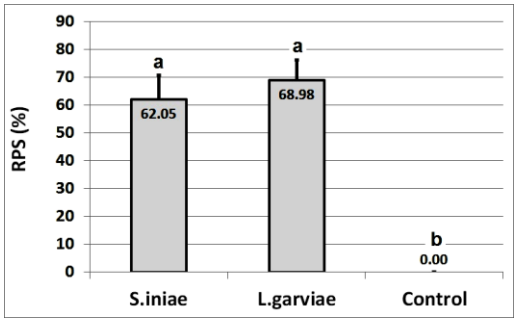


شکل۳: درصد تلفات تجمعی ماهی قزل‌آلا بعد از چالش با باکتری *لاکتوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه*. (تعداد ماهی=۲۰) علامت* در نمودار نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه کنترل است .

Figure 3: The percentage of trout cumulative mortality after the challenge with *Lactococcus garviae* and *Streptococcus iniae*. (Fish number = 20) The * sign in the chart indicates a significant difference with the control group

در هر تیمار واکسینه چالش شده با *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* تلفات تجمعی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت، بطوریکه تلفات تجمعی در تیمار واکسینه چالش شده با *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه* در انتهای دوره چالش بترتیب ۷/۸±۳۰ و ۹/۰۸± ۳۶/۶۷ درصد بود که نسبت به تیمار کنترل (۶/۷±۹۶/۶۷ درصد) تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵)، ولی بین دو تیمار واکسینه چالش شده با دو باکتری تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵) .

درصد بقاء نسبی در تیمار واکسینه و غیرواکسینه چالش شده با *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان بقاء نسبی در تیمار واکسینه چالش شده با *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* بترتیب برابر ۷/۲۲±۶۲/۰۵ و ۸/۶۷±۶۸/۹۸ درصد بود.



شکل ۴: درصد بقای نسبی ماهی قزل‌آلا بعد از چالش با باکتری *لاکتوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه*. حروف کوچک متفاوت روی ستون انحراف معیار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 4: Relative survival rate of trout after challenge with *Lactococcus garviae* and *Streptococcus iniae*. Different lowercase letters on the standard deviation scale indicate a significant difference at the level of 0.05 between treatments

بحث

بیشترین مطالعات در خصوص واکسن استرپتوکوکوزیس بر سلول کشته شده باکتری با فرمالین با تجویز تزریقی و به صورت مونووالانت (تک واحدی) بوده است (Romalde *et al*., 2004; Bercovier *et al*., 1996). ولی استفاده از واکسن‌های دو و چندگانه می‌تواند علاوه بر کاهش

هزینه، استرس ماهی را نیز کاهش دهند. از آنجایی که در کشور هر دو عامل *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* باعث ایجاد عفونت و تلفات در ماهی قزل‌آلا می‌گردند، استفاده از واکسن دوگانه توجیه کافی دارد (Soltani *et al*., 2005).

در این تحقیق اثر تجویز واکسن دوگانه، بر محافظت در برابر باکتری اگزولوکوس[1] (باکتری به غیر از باکتری بذر واکسنی) و تیتر پادتن اختصاصی علیه *لاکتوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* مطالعه شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان پادتن ۳۰ روز بعد از واکسیناسیون اولیه بر ضد هر دو گونه بدست آمد. اما هر چند در روزهای نمونه‌برداری ۴۵ و ۶۰ بعد از واکسیناسیون میزان تولید پادتن کاهش یافت، اما همچنان نسبت به گروه کنترل بالاتر و دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). مشابه مطالعه حاضر در مطالعات متعددی نشان داده است که واکسیناسیون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با واکسن کشته *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه* سبب القاء پاسخ ایمنی هومورال از طریق تولید آنتی‌بادی قابل سنجش گردیده است (Eldar *et al*., 1997; Akhlaghi *et al*., 1996; Klesius *et al*., 2000). مطالعه Costa و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که واکسیناسیون ماهی تیلاپیا با باکترین *استرپتوکوکوس اینیه* موجب افزایش معنی‌دار تیتر پادتن تا ۱۲ هفته بعد از واکسیناسیون گردید، اما سپس تیتر پادتن با شیب آرامی کاهش یافت. Eldar و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که واکسیناسیون ماهی قزل‌آلا با باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* به روش تزریقی سبب ایجاد پاسخ ایمنی با تولید پادتن علیه این بیماری گردید. Jeong-Hwan و همکاران (۲۰۱۶) با واکسیناسیون کفشک ماهی زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) با باکتری کشته فرمالینه *استرپتوکوکوس اینیه*، گزارش کردند که تولید بیشترین تیتر پادتن اختصاصی ۸ هفته بعد از واکسیناسیون حاصل شده است. بنابراین، احتمالاً در این مطالعه نیز واکسن کشته سلول کامل با عرضه کامل آنتی‌ژن‌های سطحی موجب تحریک ایمنی و در نتیجه باعث افزایش تیتر پادتن نسبت به گروه کنترل گردیده است.

در این پژوهش کارایی واکسن بر اساس درصد تلفات بدنبال چالش به روش تزریقی با سویه‌های حاد باکتری‌های *لاکتوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه* حاد (به غیر از باکتری بذر واکسنی) نیز ارزیابی شد. درصد تلفات تجمعی در گروه واکسینه بعد از چالش با هر دو باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* بترتیب برابر ۳۶/۷ و ۳۰ بود که نسبت به تلفات تجمعی در تیمار شاهد که برابر ۹۶/۷ بود، تفاوت معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). درصد محافظت در این مطالعه ۶۸/۹۸ و ۶۲/۰۵ درصد بترتیب علیه *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیه* بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت (p<۰/۰۵). همچنین این مطالعه نشان داد که واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس سطح محافظت مناسبی ایجاد کرده است. Bastardo و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که واکسن دوگانه محافظت بسیار بالایی (حدود ۹۰٪) را علیه *لاکتوکوکوس گارویه* و *آئروموناس هیدروفیلا* موجب می‌شود. البته آنها برای چالش از باکتری اتوجنوس بذر واکسنی استفاده کردند. از سوی دیگر، مطالعات زیادی بر واکسن مونووالانت نیز گزارش شده است. در مطابقت با نتایج تحقیق جاری، واکسیناسیون ماهی با واکسن کشته علیه *استرپتوکوکوس اینیه* موجب بازماندگی ۹۰٪ (Eldar *et al*., 1997)، بازماندگی ۸۳/۳٪ علیه *لاکتوکوکوس گارویه* (Romalde *et al*., 2004) و نیز بازماندگی ۸۲/۵٪ علیه *لاکتوکوکوس گارویه* (Ravelo *et al*., 2006) گردیده است. Akhlaghi و همکاران (۱۹۹۶) واکسیناسیون ماهی قزل‌آلا با باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* را انجام دادند و بعد از ۱ ماه درصد بازماندگی ۹۱/۷٪ را گزارش نمودند.

Vendrell و همکاران (۲۰۰۶) نیز کارایی واکسن تجاری کشته *لاکتوکوکوس گارویه* (Ichtiovac-Lg) در ماهی قزل‌آلا را بررسی کردند. آنها ماهی قزل‌آلا به وزن ۴۰-۳۰ گرم را با ۱۰۰ میکرولیتر از واکسن مورد نظر ایمن نمودند و ۲۹ روز پس از واکسیناسیون با سویه حاد *لاکتوکوکوس گارویه* به میزان ۳×۱۰^{۶} چالش داده و بازماندگی حدود

[1] Exolucus

۹۴٪ را گزارش نمودند. Shelby و همکاران (۲۰۰۲) گزارش نمودند که پاسخ ایمنی همورال نقش مهمی در دفاع سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلا علیه *استرپتوکوس اینیه* ایفاء می‌کند. همچنین نقش ایمونولوژیک پادتن در محافظت علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی با ایمن سازی غیرفعال با سرم حاوی آنتی‌بادی اختصاصی بخوبی نشان داده شده است (Shelby *et al*., 2002). آنها گزارش کردند که دستیابی به محافظت نسبی بعد از چالش با این باکتری نشان‌دهنده نقش مؤثر پادتن در دفاع سیستم ایمنی ماهی در برابر این بیماری می‌باشد.

اکثر تحقیقات مذکور فوق بر اساس استفاده از یک باکتری به عنوان بذر باکتریایی بوده است که چالش نیز با همان باکتری صورت گرفته است و شاید تفاوت کارایی واکسن در تحقیق حاضر با تحقیقات فوق در اثر این عامل باشد، زیرا در این تحقیق هدف این بود که کارایی واکسن تجاری مورد استفاده در کشور در مواجهه با جدایه‌های بشدت بیماری‌زا ارزیابی گردد. لذا، برای انتخاب باکتری مورد نظر برای چالش باکتریایی ابتدا از بین چندین جدایه تهیه شده از ماهیان بیمار در نقاط مختلف کشور با محاسبه LC_{50}، حادترین جدایه بعد از تشخیص مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. هر چند RPS ۶۲ و ۶۸ درصد برای واکسن بعد از چالش با باکتری اتوجنوس خیلی مناسب نیست، ولی این میزان محافظت در مورد واکسن اگزولوکوس بسیار مطلوب است. از سوی دیگر، باکترین دوگانه منجر به سرکوب تولید پادتن نسبت به محتویات واکسن نگردید که ممکن است به دلیل واکنش بالای متقابل و عدم رقابت آنتی ژنی دو باکتری باشد. در نتیجه، استفاده از واکسن دوگانه علیه این بیماری رایج در مزارع پرورش ماهی قزل آلا می‌تواند به عنوان یک استراتژی مفید در جهت کاهش خسارت ناشی از این بیماری مورد استفاده واقع شود. البته بکارگیری این واکسن نیاز به مطالعات و تحقیقات تکمیلی در جنبه‌های مختلف بهداشت ماهی دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت.

منابع

Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Mmicrobiology*, 122(1), pp.1-15. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.03.002

Akhlaghi, M., Munday, B.L. and Whittington, R.J., 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *Journal of Fish Diseases*, 19(3): 251-258. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1996.tb00132.x

Bastardo, A., Ravelo, C., Castro, N., Calheiros, J. and 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(5): 756-761. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.01.028. Epub 2012 Feb 3.

Bercovier, H., Ghittino, C. and Eldar, A., 1996. Immunization with bacterial antigens: Infections with streptococci and related organisms. In, Gudding R, Lillehaugh A, Midtlyng PJ, Brown F (Eds): *Fish Vaccinology*, (25): 153-160. DOI: 10.12681/jhvms.14965.

Costa, G., Danz, H., Kataria, P. and Bromage, E., 2012. A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*, 36(2): 298-305. DOI: 10.1016/j.dci.2011.04.011

Eldar, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H., 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 56:175-183. DOI: 10.1016/j.dci.2011.04.011

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

Hedayati, A.A., 2018. Effects of 2-phenoxyethanol (2-PE) anesthesia on some haematological and biochemical indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 17(1): 1-10. DOI: 10.22092/IJFS.2018.115578

Jeong-Hwan, J., Kim, D.H., Park, S.H., Park, K., Lee, Y.D. and Heo, M.S., 2016. Protective efficiency of an inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*,. *Archives of Polish Fisheries*, 24: 23-32. DOI: 10.1515/aopf-2016-0003.

Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J., 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188(3): 237-246.

Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M.C., Costa, L., Toranzo, A.E. and Romalde, J.L., 2006. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 251(2): 153-158. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.027

Romalde, J.L., Luzardo-Alvárez, A., Ravelo, C., Toranzo, A.E. and Blanco-Méndez, J., 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactoccocosis. *Aquaculture*, 236(1): 119-129. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.02.028.

Shelby, R.A., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J., 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *Journal of fFish dDiseases*, 25(1): pp.1-6. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00327.x

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

Vendrell, D., Balcazar, JL., Ruiz-Zarzuela, I., Ignacio, d.B., Girones, O. and Muzquiz, JL., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: Review. *Comparative Immunol Microbiol Infectious Dis*, 29:177-198. DOI:10.1016/j.cimid.2006.06.003.

Serum antibody response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to two species of pathogenic bacteria; *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae*

Karami E.[1*]; Alishahi M.[1]; Ghorbanpor M.[2] ; Tabandeh M.R.[3]; Mohamadiyan T.[1]

[*]karami78@gmail.com

1-Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran
2-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran
3-Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran

Abstract

One of the most important bacterial diseases in aquaculture is Streptococosis/loctococosis. Meanwhile this disease has been known as a zoonosis disease, and then fish vaccination against this disease is important. In this study the specific immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to vaccination with bivalent lactococcal/streptococcal vaccine were investigated. Two hundred and fourty rainbow trout fingerlings (30±1.7g) were randomly divided into two equal groups in triplicates. Fish in vaccinated treatment intraperitonealy injected with 100 microliter vaccine on the first day and booster vaccine were directed by immersion route on day 30th of study. The control group was injected with sterile PBS, identical to vaccinated group. Blood samples were collected from vaccinated and non-vaccinated groups at days 0, 14. 30, 45 and 60 of study and antibody titer were subsequently performed. Sixty days after initial immunization all groups were challenged by lethal dose of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae*, mortality rate was calculated and compared between the groups. Survival rates of vaccinated fish after challenge with *S. iniae* and *L. garviae* were 62±7.22% and 68±.8.67% respectively. The results demonstrated that specific plasma IgM antibody titer induced by commercial vaccine were significantly higher compared to the level in the control group ($p<0.05$). Our results demonstrated that not only these bivalent vaccines can effectively protect rainbow trout against *L. garvieae* and *S. iniae*, but also can increase antibody titer in rainbow trout, then it could offer an appropriate strategy to prevent these infections in rainbow trout farms in Iran.

Keywords: Antibody response; Rainbow trout; Streptococosis/loctococosis vaccine

[*]Corresponding author