

## مطالعه برخی پاسخهای ایمنی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*mykiss*) *(Onchorhynchus)* به برخی آنتی ژنهای استرپتوکوکوس اینیایی

مهدی سلطانی<sup>۱\*</sup>، مجتبی علی شاهی<sup>۱</sup>، پروانه خضرائی نیا<sup>۲</sup>، محمد ربانی<sup>۳</sup>، امیرستاری<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۲۰ بهمن ماه ۱۳۸۴

پذیرش نهایی: ۷ تیر ماه ۱۳۸۵

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

Soltani, M.<sup>1\*</sup>, Alishahi, M.<sup>2</sup>, Khazrayenia, P.<sup>3</sup>, Rabani, M.<sup>4</sup>, Sattari, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. <sup>2</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz-Iran. <sup>3</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. <sup>4</sup>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 Freund 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. Results 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

در این مطالعه برخی از شاخص های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان پس از تجویز دونوع واکسن استرپتوکوکوس اینیایی مورد بررسی قرار گرفت. ماهی قزل آلاهی ۸۰-۱۰۰ گرمی به روشهای مختلف (تزریقی، غوطه وری و خوراکی) و با استفاده از آنتی ژنهای باکتری مذکور (سلول کشته و سلول کشته غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری) واکسینه گردیدند. طی هفته های ۱۸، ۱۵، ۱۲، ۹، ۶، ۳ پس از واکسیناسیون اقدام به خونگیری و تهیه نمونه های مورد نیاز برای سنجش تیترا آنتی بادی (با روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی)، میزان لیزوزیم سرم، قدرت باکتری کشی سرم و جمعیت لکوسیتی در ایام مذکور گردید و نتایج حاصله با استفاده از آنالیز واریانس با همدیگر و با گروه های کنترل مقایسه گردید. نتایج حاصله نشان داد که تزریق داخل صفاقی واکسن کشته غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری و حاوی ادجوانت موجب ایجاد بیشترین تیترا آنتی بادی گردید و تجویز واکسن کشته به روش غوطه وری موجب ایجاد تیترا آنتی بادی بیشتری در مقایسه با روش خوراکی (هردونوغ واکسن) گردید. به علاوه میزان تولید آنتی بادی در هفته های اولیه پس از واکسیناسیون حداکثر بوده و سپس با گذشت زمان کاهش داشته است. نتایج مشابهی در مورد سنجش میزان لیزوزیم و قدرت باکتری کشی سرم هاد تیمارهای مذکور به دست آمد که در اکثر موارد این مقادیر به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای کنترل بوده است ( $p < 0.05$ ). همچنین جمعیت لکوسیتی و شمارش لمفوسیتی در همه گروه های ایمن شده بیشتر از گروه های کنترل بوده است ( $p < 0.05$ ). مقادیر منوسیتی و هتروفیلی در زمانهای مختلف نمونه برداری در مقایسه با گروه های کنترل از نتایج متفاوتی برخوردار بوده اما تفاوتها معنی دار نبوده است ( $p > 0.05$ ). نتایج این مطالعه نشان می دهد که هر دونوع پاسخ ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ماهی قزل آلا در برابر آنتی ژنهای استرپتوکوکوس اینیایی تحریک می شوند. اما تزریق داخل صفاقی این آنتی ژنها به ویژه سلول کشته غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری از خاصیت ایمنی زایی بالاتر و در مرحله بعد تجویز سلول کشته به روش غوطه وری از توانایی ایمنی زایی مناسبی برخوردار بوده است در حالی که تجویز خوراکی آنتی ژنهای مذکور به روش خوراکی کمترین پاسخ ایمنی را ایجاد نموده است. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۱، ۹-۱.

واژه های کلیدی: قزل آلاهی رنگین کمان، پاسخهای ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی استرپتوکوکوس اینیایی.

ارگانایسم های 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 دانشگاه شهید 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: ۰۲۱-۶۶۹۲۹۵۳۱، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲

Email: msoltani@ut.ac.ir



استرپتوکوکوس 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 و هر 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 و شیوع این بیماری در مزارع کشور در 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 و لذا هنوز مکانیسم یا مکانیسم‌های ایمنی‌زایی ماهیان در برابر این بیماری نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد. به‌ویژه چنانچه دسترسی به تهیه واکسن‌هایی با کارایی رضایت بخش مورد نظر باشد، اهمیت بررسی پاسخهای ایمنی مایعی و سلولی در گونه‌های حساس را دوچندان می‌نماید.

هر چند Toranzo و همکاران در سال ۱۹۹۵ با تجویز آنتی‌ژن سلول کشته انتروکوکوس غنی شده با محصولات خارج سلولی این باکتری به ماهی توربوت، افزایش تعداد و قدرت فاگوسیتوز لکوسیتها را گزارش نمودند ولی نتوانستند هیچ‌گونه تیتراژ آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیلی را به روش الایزا و میکروآگلوتیناسیون باکتریایی در سرم ماهی اندازه‌گیری نمایند (۲۹) ولی Klesius و همکاران در سال ۲۰۰۰ بعد از واکسیناسیون ماهی با باکتری غیرفعال شده استرپتوکوکوس اینیلی توانستند با استفاده از روش میکرو آگلوتیناسیون باکتریایی تیتراژ ۳/۷۰۲- (لگاریتم بر مبنای ۱۰ از تیتراژ رادریمار واکسینه به روش داخل صفاقی گزارش نمایند (۱۴). همچنین Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ که بعد از ایمن سازی ماهی قزل‌آلای با باکتری کشته تیتراژ آنتی‌بادی ماهی را پس از ۵۰۰ درجه روز به روش آگلوتیناسیون باکتریایی اندازه‌گیری نمودند در گروه واکسینه تیتراژ بین ۱:۴ تا ۱:۳۲ و در تیمار واکسینه شده با سوش متفاوت استرپتوکوکوس اینیلی تیتراژ ۱:۱ تا ۱:۴ را اندازه‌گیری نمودند (۲). Shelby و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز موفق به اندازه‌گیری تیتراژ آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیلی در سرم 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 استرپتوکوکوس بعد از واکسیناسیون، تعدادی از محققین اقدام به ایمن سازی غیرفعال (پاسیو) ماهی با استفاده از تجویز آنتی‌سرم ماهی ایمن شده بر علیه باکتری استرپتوکوکوس نمودند (۲۲، ۱، ۶). هر چند Shelby موفق به اندازه‌گیری تیتراژ آنتی‌بادی ضعیفی بعد از ۴۸ ساعت در ماهی ایمن شده به صورت غیرفعال با آنتی‌سرم تولیدی در ماهی ایمن گردید ولی Akhlaghi و همکاران در سال ۱۹۹۶ تیتراژ آنتی‌بادی قابل اندازه‌گیری به روش الایزارا حتی ۲۴ ساعت بعد از ایمن سازی ماهی با آنتی‌سرم تولیدی در ماهی ایمن مشاهده نمودند با این وجود هر دو محقق فوق‌الذکر نقش آنتی‌بادی‌ها 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 قزل‌آلای در برابر

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 تیتراژ آنتی‌بادی، قدرت کشندگی سرم، تولید لیزوزیم لکوسیتی و جمعیت لکوسیت‌ها) و در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ایمن شده با ایزوله استرپتوکوکوس اینیلی بدست آمده از همین ماهی در مزارع کشور پرداخته شده است. در این مطالعه ماهیان با استفاده از آنتی‌ژن‌های سلول کشته و سلول کشته غنی شده با آگزوتوکسین‌های خارج سلولی باکتری به روشهای، تزریقی، غوطه‌وری و خوراکی ایمن گردیده و پاسخهای ایمنی مورد اشاره و فاکتورهای فوق تا ۱۸ هفته پس از ایمنی سازی مورد مطالعه قرار گرفتند.

## مواد و روش 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 استرپتوکوکوز پس استفاده گردید. ماهیان پس از انتقال به تانکهای ۱۰۰۰ لیتری در دانشکده دامپزشکی با آب جاری و هوادهای لازم به مدت ۲ هفته به شرایط جدید سازگاری داده شده و با استفاده از خوراک شرکت چین 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 بر اساس کربنات کلسیم ۱۸۰ mg/L، pH برابر ۷/۸، CO<sub>2</sub> کمتر از ۶ mg/L، اکسیژن محلول حداقل ۸ mg/L (هوادهای مداوم)، هدایت الکتریکی ۷۸۰ میکروزیمنس در سانتیمتر مربع، نیترات کمتر از ۰/۱ mg/L و آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ mg/L بود.

۳- باکتری لیوفیلیزه: ایزوله باکتری لیوفیلیزه استرپتوکوکوس اینیلی برای این مطالعه استفاده شد. ایزوله مذکور قبلاً از یکی از مزارع پرورش قزل‌آلای کشور توسط سلطانی و همکاران در سال ۲۰۰۵ جدا سازی و شناسایی گردیده بود (۲۷).

### ۴- تهیه آنتی‌ژنها

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



جدول ۱- روشهای ایمن سازی واکسنها و تیمارهای موجود در هر روش (FKC=باکتری غیرفعال شده با فرمالین، FKC+ECP=باکتری غیرفعال شده و غنی شده با تولیدات خارج سلولی، ADJ= ادجوانت)

| نوع تجویز       | تزریق داخل صفاقی |         |       | غوطه‌وری |       | خوراکی                  |  |
|-----------------|------------------|---------|-------|----------|-------|-------------------------|--|
|                 | FKC+ECP+ADJ      | FKC+ADJ | FKC   | شاهد     | شاهد  | FKC                     | شاهد                                   |
| تیمارهای هر روش | ۲۰۰              | ۲۰۰     | ۲۰۰   | ۱۵۰      | ۱۵۰   | ۲۰۰                     | ۱۵۰                                    |
| تعداد ماهی      | ۲۰۰              | ۲۰۰     | ۲۰۰   | ۱۵۰      | ۱۵۰   | ۲۰۰                     | ۱۵۰                                    |
| میزان تجویز     | ۰/۱ml            | ۰/۱ml   | ۰/۱ml | ۰/۱ml    | ۰/۱ml | ۱۰ <sup>۶</sup> cell/ml | ۱۰ <sup>۶</sup> باکتری در هر گرم خوراک |

۵- ایمن سازی ماهیان: روشهای ایمن سازی و تیمارهای موجود در هر روش در جدول آورده شده است.

۵-۱- تجویز داخل صفاقی: در این روش پس از اتمام دوره قطع غذا به مدت ۴۸ ساعت، از آنتی ژن مربوطه به میزان یک دهم میلی لیتر به ازای هر ماهی و پس از ایجاد بیهوشی با تریکائین متان سولفات (MS<sub>222</sub>) در ناحیه صفاقی تزریق گردید. در گروههایی که ادجوانت استفاده شده بود قبل از استفاده، آنتی ژن مذکور به نسبت ۲ به ۱ (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 به مدت ۱ دقیقه در حمام واکسن با رقت ۱۰<sup>۶</sup> سلول به ازاء هر میلی لیتر آب، واکسینه و سپس به تانکهای مربوطه منتقل شدند. تیمار شاهد در سرم فیزیولوژی (هم حجم واکسن) به مدت یک دقیقه غوطه‌ور گردیدند.

۵-۳- روش خوراکی: در این روش واکسنها با میزان ۱۰<sup>۶</sup> سلول کشته به ازاء هر گرم غذای ماهی، به مدت ۱۴ روز و روزانه در سه نوبت صبح، ظهر و بعداز ظهر به تیمارها تجویز گردید. تیمار شاهد با خوراک معمولی تغذیه شد.

دو هفته پس از تجویز واکسنها 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- نمونه برداری: طی هفتههای ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۶، ۳۰ پس از ایمن سازی ماهیان نسبت به نمونه برداری اقدام گردید. در هر مرتبه نمونه برداری از هر تیمار به صورت تصادفی تعداد ۵ ماهی برداشت و پس از ایجاد بیهوشی بوسیله MS<sub>222</sub> با دوز ۴۰mg/L از طریق سیاه‌رگ ناحیه دمی خونگیری به عمل آمد. همزمان با خونگیری نسبت به تهیه گسترشهای خونی نیز اقدام می‌گردید. نمونههای خون ابتدا در دمای اتاق یک ساعت نگهداری و پس از انتقال به دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شب نسبت به جداسازی سرمها اقدام و پس از توزیع در لوله‌های استریل اپندرف تازمان استفاده در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند.

۷- سنجش تیترا آنتی‌بادی: برای سنجش تیترا آنتی‌بادی از روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی توصیه شده توسط Roberson در سال ۱۹۹۹ استفاده گردید (۱۹). به‌طور خلاصه: با افزودن میزان ۲۵ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم به گوده‌های پلیت میکروآگلوتیناسیون (به جز گوده اول) و

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 و متعاقباً سرم فیزیولوژی استریل و نیز فرمالین خالص به نسبت ۰/۲ درصد 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 مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد) تا فرمالین به‌طور کامل حذف و به سلولهای غیرفعال شده مقداری سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد به‌طوری‌که غلظت باکتری کشته ۱۰<sup>۱۰</sup> باکتری در میلی لیتر سرم فیزیولوژی تنظیم گردید (با تغلیظ چهار برابر سوسپانسیون باکتریایی تنظیم شده با لوله‌های استاندارد مک فارلن شماره ۸) و تازمان استفاده در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای اطمینان از غیرفعال شدن کامل سلولها از این نمونه بر روی محیط آگار لوز خون کشت داده شد که نتایج حاصل بیانگر غیرفعال سازی کامل سلولها و نیز عدم هرگونه آلودگی ثانویه بود.

۴-۲- سلول کامل غیرفعال شده و غنی 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 در سال ۲۰۰۰ 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 (بر روی شیکر). سپس با فرمالین ۱۰ درصد به محیط کشت اضافه و پس از انکوبه نمودن کشت فرمالینه به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد، نسبت به سانتریفوژ آن در سه هزار دور به مدت ۲۰ دقیقه اقدام گردید و مایع رویی حاوی محصولات خارج سلولی و عاری از سلول جدا سازی 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 به مدت ۳۰ دقیقه حذف و بدینوسیله تولیدات خارج سلولی باکتری ۱۰ برابر غلیظ گردید. سپس سلول کامل غیرفعال شده با فرمالین، به نسبت ۱ به ۱ (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.



جدول ۲- نتایج تیتراژ آنتی بادی به روش میکروآگلوتیناسیون در ماهی قزل آلائی واکسینه شده علیه استرپتوکوکوزیس. (تیتراژ آنتی بادی میانگین عکس رقت های بدست آمده در آزمایش های میکروآگلوتیناسیون در هر مرحله می باشد). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  (خطای معیار) نمایش داده شده اند.

| 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      | ۰/۲۸±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±۰/۲  | 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=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).

به میزان ۵۰ برابر در بافر فسفات سدیم استریل رقیق سازی و از رقت حاصله میزان ۵۰ میکرولیتر با میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه سرم نرمال غیر فعال شده (در ۴۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه برای غیر فعال کردن کمپلمان) مورد آزمایش مخلوط و به مدت 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 به طور یکسان برای همه نمونه ها) و پس از تهیه رقت های بر مبنای ۱۰ از آن، از هر رقت میزان ۱۰ میکرولیتر در سه تکرار بر روی سطح محیط TSA پخش و پلیتهای مربوطه در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و سپس نسبت به شمارش پرگنه های باکتریایی رشد یافته اقدام و تعداد پرگنه های حاصله با توجه به رقت مورد استفاده بر حسب تعداد پرگنه (سلول زنده) به ازاء هر میلی لیتر محاسبه گردید. در خاتمه درصد بقاء سلول های باکتریایی رشد یافته در نمونه های 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. گسترش های بدست آمده در زمان خون گیری، ابتدا توسط متانول فیکس و سپس با روش رنگ آمیزی گیمسا رنگ آمیزی و درصد افتراقی سلولهای لکوسیتی تعیین گردید (۱۶).

۱۱- آنالیز آماری: به منظور آنالیز آماری داده ها 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 تشخیص معنی دار بودن تفاوتها از تست تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

## نتایج

۱- تیتراژ آنتی بادی: نتایج حاصل از سنجش تیتراژ آنتی بادی به روش میکرو

سپس افزودن مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم رقیق نشده به اولین و دومین گوده و تهیه رقتهای بر مبنای دودر گوده های ۱۲ الی ۱۰ و حذف ۲۵ میکرولیتر از گوره ۱۲ و نیز افزودن مقدار ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی استرپتوکوکوس اینیایی تهیه شده در بافر فسفات سدیم (مطابق با لوله مک فارلین شماره ۳ =  $9 \times 10^8$  cells/ml) و قرائت نتایج پس از یک شب در دمای اتاق به طوری که آخرین گوده ای (بالاترین رقتی) که در آن آگلوتیناسیون باکتریایی صورت گرفته به عنوان تیتراژ آنتی بادی نمونه سرم در نظر گرفته شد. و سرم معمولی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و تمام نمونه ها در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۸- سنجش میزان لیزوزیم: سنجش میزان لیزوزیم در نمونه های سرم بر اساس روش توصیه شده توسط Ellis در سال ۱۹۹۰ صورت گرفت (۷). به طور خلاصه ابتدا مقدار ۱/۷۵ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (محصول سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ میلی گرم 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 بر حسب میکروگرم لیزوزیم به ازاء هر میلی لیتر نمونه سرم و به کمک رسم منحنی استاندارد با استفاده از رقتهای بر مبنای ۲ لیزوزیم سفیده 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 باکتری کشی آنتی سرمها: برای تعیین قدرت باکتری کشی نمونه های 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 جمع آوری 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



جدول ۳- نتایج حاصل از سنجش مقادیر لیوزیم سرم در گروههای مختلف قزل آلائی ایمن شده علیه استریوتوکوزیس ( واحد اعداد میکروگرم در میلی لیتر می باشد). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  (خطای معیار) نمایش داده شده اند.

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

پس از ایمن سازی تقریباً مشابه ( $p > 0.05$ ) و عمدتاً غیر قابل سنجش بود.

۲- لیوزیم: نتایج حاصل از سنجش مقادیر لیوزیم در گروههای مختلف ایمن شده در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج مذکور مقادیر لیوزیم در تیمار ایمن شده به روش داخل صفاقی و با استفاده از واکسن کشته غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری و حاوی ادجوانت در هفته سوم پس از ایمن سازی از بالاترین سطح ( $1.86 \pm 1.4$  میکروگرم در میلی لیتر) برخوردار بوده است در حالی که این مقدار طی هفته های پس از آن به تدریج کاهش نشان داده است. به طوری که در پایان هفته ۱۸ به حداقل ( $1.11 \pm 0.22$ ) رسید. نتایج مشابهی در مورد تیمار ایمن شده به روش داخل صفاقی واکسن کشته حاوی ادجوانت و نیز تیمار ایمن شده با واکسن کشته بدون ادجوانت به روش داخل صفاقی مشاهده گردید. با این تفاوت که مقدار لیوزیم در هفته سوم پس از ایمن سازی برای این دو تیمار پایین تر از تیمار قبلی بوده است (جدول ۳) (حداکثر و حداقل میزان لیوزیم 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). به علاوه مقدار لیوزیم در ماهیان ایمن شده با واکسن کشته به روش غوطه وری طی هفته های ۳ الی ۹ به طور معنی داری کمتر از ۳ تیمار ایمن شده فوق بود ( $p < 0.05$ ). ولی پس از این زمان تفاوت مذکور در حد معنی دار نبوده است ( $p > 0.05$ ). به علاوه بیشترین (با میانگین ۶/۱۷ - ۶/۰۹) و کمترین ( $3/83$ ) مقدار لیوزیم در ماهیان ایمن شده با واکسن کشته به روش غوطه وری به ترتیب طی هفته های ۱۸، ۶، ۲ پس از ایمن سازی مشاهده شد. همچنین مقادیر لیوزیم در گروههای ایمن شده به روش خوراکی (هر دو واکسن) در طی ایام نمونه برداری پس از ایمن سازی تقریباً مشابه و فاقد تفاوت معنی دار بوده است ( $p > 0.05$ ). مقادیر لیوزیم در گروههای کنترل (تیمارهای دریافت کننده فقط ادجوانت و سرم فیزیولوژی) در ایام نمونه برداری تقریباً مشابه ( $p > 0.05$ ) ولی در مقایسه با تیمارهای ایمن شده به روشهای تزریق داخل صفاقی (سه تیمار) و تیمار غوطه وری به طور معنی داری تا هفته ۱۵ پس از ایمن سازی پایین تر بوده است ( $p < 0.05$ ).

آگلوتیناسیون باکتریایی در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج مذکور ایمن سازی قزل آلا با دو واکسن فوق باعث افزایش معنی دار تیتراکتی بادی در تیمارهای تزریقی و غوطه وری نسبت به تیمارهای شاهد و تجویز خوراکی گردیده است ( $p < 0.05$ ) به طوری که آنتی بادی تولیدی در ماهیان ایمن شده به روش تزریق داخل صفاقی با واکسن کشته غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری و حاوی ادجوانت بیشترین میزان آنتی بادی ( $5.76 \pm 2.3$ ) را در هفته سوم پس از ایمن سازی نشان داد. این میزان طی هفته های بعد به تدریج کاهش یافته به طوری که در پایان هفته هجدهم پس از ایمن سازی به حداقل ( $2.88 \pm 0.5$ ) رسید. تجویز واکسن کشته حاوی ادجوانت به روش داخل صفاقی نیز به ترتیب موجب حداکثر ( $3.8 \pm 1.8$ ) و حداقل ( $2.88 \pm 0.5$ ) تیتراکتی بادی طی هفته های ۳ الی ۶ و ۱۸ پس از ایمن سازی گردید. همچنین تجویز داخل صفاقی واکسن کشته بدون ادجوانت از نتایج مشابه برخوردار بود با این تفاوت که مقادیر آنتی بادی تولیدی در هفته های اولیه پس از واکسیناسیون اندکی پایین تر بوده است. بگونه ای که این میزان در هفته های ۳ الی ۶ برابر ۱۷-۱۶ ولی در پایان هفته ۱۸ پس از ایمن سازی به ۱۲ کاهش یافت. به علاوه تجویز غوطه وری واکسن کشته به ترتیب موجب حداکثر با میانگین ( $7.4 \pm 4.75$ ) و حداقل ( $4.3 \pm 0.38$ ) تولید آنتی بادی طی هفته سوم و پانزدهم پس از واکسیناسیون گردید. تجویز خوراکی واکسن کشته غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری موجب ایجاد حداکثر تیتراکتی بادی (با میانگین ۰/۷۰) در هفته های ۳ الی ۶ پس از ایمن سازی گردید. در حالی که حداقل تیتراکتی بادی (با میانگین ۰/۱۳) در هفته های ۱۲ به بعد حاصل شد. مصرف خوراکی واکسن کشته بدون آگزوتوکسین های باکتری به ترتیب موجب بیشترین میزان آنتی بادی ( $5.1 \pm 0.75$ ) و کمترین تیتراکتی بادی ( $0.2 \pm 0.13$ ) طی هفته های ۶-۳ و هفته های پس از آن گردید که گویای عدم معنی دار بودن تفاوت تیتراکتی بادی در این دو گروه با گروه شاهد بود ( $p > 0.05$ ).

میزان تیتراکتی بادی تولیدی در گروههای کنترل تیمارهای دریافت کننده فقط ادجوانت و سرم فیزیولوژی به روش داخل صفاقی در طی دوران



جدول ۴- نتایج حاصل از قدرت باکتری کشی آنتی سرم های بدست آمده از تیمارهای مختلف قزل آلاهی ایمن شده علیه استرپتوکوکوزیس. قدرت باکتری کشی بر اساس میانگین تعداد پرگنه شمارش شده در پلیتها بعد از مجاورت با آنتی سرم ها آورده شده است. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  (خطای معیار) نمایش داده شده اند.

| 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).

منوسیتی و سایر سلولهای لکوسیتی (انوز نیوفیل، بازوفیل و...) در مقایسه با گروه شاهد در زمانهای مختلف نمونه برداری متفاوت بوده و تفاوت معنی داری در میزان آنها در تیمارهای مختلف مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ).

## بحث

بیماری استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیبایی موجب خسارت اقتصادی قابل توجه در مزارع ماهی در برخی کشورهای جمله مزارع قزل آلاهی پرورشی در ایران می باشد. در این مطالعه تأثیر روشهای مختلف مصرف دو نوع واکسن کشته و غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری جداسازی شده از ماهیان قزل آلاهی مبتلا کشور بر برخی فاکتورهای ایمنی اختصاصی (هومورال) و غیر اختصاصی (شمارش لکوسیتی - تعیین قدرت باکتری کشی آنتی سرم ها - سنجش میزان لیزوزیم سرم) ماهی قزل آلا مورد ارزیابی قرار گرفته است. مصرف تزریقی واکسن کشته همراه یا بدون آگزوتوکسین های باکتری موجب پاسخ هومورال (تولید آنتی بادی) مشابهی می شود ( $p > 0.05$ ) که میزان آن به مراتب از سایر روش های غوطه وری و خوراکی بالاتر می باشد ( $p < 0.05$ ). به هر حال تیتراژ آنتی بادی تولیدی توسط ماهیان ایمن شده با این واکسن ها در مقایسه با برخی عوامل بیماری زای باکتریایی دیگر نظیر ویبریو آنکو نیلا روم و یرسینیا راکری به مراتب کمتر بوده است (۹). در مطالعه Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ تیتراژ آنتی بادی تولیدی به وسیله باکتری غیر فعال شده استرپتوکوکوس اینیبایی همراه ادجوانت در ماهی قزل آلا تجویز شده به روش تزریق داخل صفاقی را بعد از ۵۰۰ درجه روز، ۱:۴ تا ۳:۲ گزارش نمودند (۲) که حاکی از تشابه نتایج با تحقیق حاضر است. Shelby و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز موفق به اندازه گیری تیتراژ آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس اینیبایی در سرم ماهی های واکسینه شده به روش الایزا و میکرو آگلوتیناسیون باکتریایی ۲۸ و ۴۸ روز بعد از ایمن سازی شدند (۲۵). با این وجود در بعضی مطالعات، متعاقب واکسیناسیون با سوشهای مختلف باکتری غیر فعال شده استرپتوکوکوس اینیبایی و گونه های دیگر استرپتوکوکوس و لاکتوکوکوس در گونه های مختلف ماهیان مانند تیلارپیا،

به علاوه مقایسه مقدار لیزوزیم بین تیمارهای کنترل و تیمارهای خوراکی (۲) تیمار فاقد تفاوت معنی دار بوده است ( $p > 0.05$ ).

۳- قدرت باکتری کشی آنتی سرم: نتایج حاصل از قدرت باکتری کشی آنتی سرم های 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 سرم های تیمار واکسینه شده به روش داخل صفاقی و واکسن کشته غنی شده با آگزوتوکسین های باکتری و حاوی ادجوانت مشاهده گردید، در حالی که کمترین قدرت باکتری کشی مربوط به تیمارهای دریافت کننده واکسن های خوراکی بوده است. ۲- قدرت باکتری کشی در تیمارهای ایمن شده به روش داخل صفاقی با واکسن های کشته حاوی ادجوانت و واکسن کشته بدون ادجوانت تقریباً مشابه ( $p > 0.05$ ) و به طور معنی داری بیشتر از تیمار واکسینه شده با واکسن کشته به روش غوطه وری بوده است ( $p < 0.05$ ). ۳- قدرت باکتری کشی در تیمار واکسینه شده به روش غوطه وری به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای واکسینه شده به روش خوراکی بوده است ( $p < 0.05$ ). ۴- قدرت باکتری کشی آنتی سرم ها در تیمارهای واکسینه به روش خوراکی، تیمار دریافت کننده فقط ادجوان و تیمار کنترل تفاوت معنی داری با هم نداشته ( $p > 0.05$ ) و این توانایی به طور معنی داری کمتر از تیمارهای ایمن شده به روش های تزریقی و غوطه وری بوده است ( $p < 0.05$ ).

۴- جمعیت لکوسیتی: نتایج شمارش جمعیت های لکوسیتی در جدول ۵ آمده است. نتایج مذکور تا ۸۰ روز پس از ایمن سازی ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است. بر اساس نتایج مذکور: الف) جمعیت کل لکوسیتها در گروه های ایمن شده به روش تزریقی و غوطه وری و خوراکی در هر چهار مرحله نمونه گیری بیشتر از گروه های 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،



جدول ۵ - 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  $\pm$  (خطای معیار) نمایش داده شده‌اند.

| Others       | Mono       | Hete      | Lymph      | WBC/mm <sup>3</sup> | تیمار                 |  |
|--------------|------------|-----------|------------|---------------------|-----------------------|--|
| ۸۸۹۰±۱۳۸۲/۲  | ۸۵۳۴±۲/۵   | ۲۸۴/۴±۲/۴ | ۸۸۹±۱      | ۱۷/۷±۰/۴            | گروه شاهد             | اولین مرحله خونگیری (۲۰ روز پس از ایمن سازی)   |
| ۱۵۳۹۰±۲۱۸۷/۸ | ۱۴۸۳۵±۱/۸  | ۱/۶±۱/۶   | ۰/۶±۰/۸۹   | ۱/۴±۲/۱             | گروه تزریقی (ECP+FKC) |  |
| ۹۹۰۰±۱۹۷۲/۳  | ۹۶۰۳±۲     | ۰/۵±۰/۴   | ۱/۲±۰/۸    | ۱/۶±۱/۴             | گروه غوطه‌وری (FKC)   |  |
| ۱۳۱۵۰±۴۹۴۲   | ۱۲۶۷۶±۲    | ۰/۸±۰/۶   | ۲±۱/۵      | ۱/۲±۱               | گروه تزریقی (FKC)     |  |
| ۱۰۸۳۰±۸۱۹/۷  | ۱۳۹۶±۳/۶   | ۲/۸±۲/۱   | ۱/۶±۱/۲    | ۰                   | گروه خوراکی (ECP+FKC) |  |
| ۸۵۷۰±۱۱۵۶/۸  | ۸۳۵۶±۱۶۵/۹ | ۷۸/۹±۷۳/۵ | ۱۱۵/۷±۷۳/۲ | ۷۷/۹±۶۷/۹           | گروه شاهد             | دومین مرحله خونگیری (۴۰ روز پس از ایمن سازی)   |
| ۱۸۳۰±۵۸۶۸    | ۱۷۱۳۵±۶۵۲  | ۱۶۶۲±۸۳۳  | ۱۸۵±۱۸۳    | ۱۱۸±۸۵              | گروه تزریقی (ECP+FKC) |  |
| ۱۴۱۲۰±۳۵۷۰   | ۱۳۷۶۷±۲۴۱۱ | ۱۴۶/۲±۱۳۰ | ۱۱۴±۶۸     | ۲۰۶/۶±۹۲/۴          | گروه غوطه‌وری (fkC)   |  |
| ۱۸۴۴۴±۶۵۰۲   | ۱۷۸۲۱±۶۴۳۵ | ۳۰۶±۲۹۷   | ۱۸۳±۱۷۷    | ۱۴۰±۱۳۰             | گروه تزریقی (FKC)     |  |
| ۸۹۴۰±۳۸۰۹    | ۸۶۲۹±۲۶۴۹  | ۲۲۵±۲۰۷   | ۹۵±۷۷      | ۳۷/۵±۲۵/۸           | گروه خوراکی (ECP+FKC) |  |
| ۸۸۴۰±۲۲۹۰    | ۸۰۱۲±۲۰۳۸  | ۵۴۸±۴۳۲   | ۲۷۹±۲۳۹    | ۰                   | گروه شاهد             | سومین مرحله خونگیری (۶۰ روز پس از ایمن سازی)   |
| ۲۱۹۵۰±۶۵۱۳   | ۲۱۸۶۹±۶۴۹۰ | ۳۳۸±۳۳۳   | ۳۷۰±۲۴۹    | ۱۶۰±۷۱/۶            | گروه تزریقی (ECP+FKC) |  |
| ۱۷۴۲۳±۶۳۴۲   | ۲۸۲±۲۵۵    | ۳۲۵±۲۴۹   | ۰          | ۰                   | گروه غوطه‌وری (fkC)   |  |
| ۱۹۴۹۶±۳۳۹۷   | ۱۹۱۳۹±۳۱۹۰ | ۱۰۵±۷۷    | ۲۲۵±۲۰۷    | ۱۰۲/۶±۷۲            | گروه تزریقی (FKC)     |  |
| ۱۳۹۹۰±۷۰۰۵   | ۱۳۵۶۲±۶۶۷۴ | ۱۵۷±۱۲۸/۵ | ۲۵۵±۲۲۴    | ۹۷±۴۳               | گروه خوراکی (ECP+FKC) |  |
| ۸۶۹۰±۲۶۸۳    | ۸۳۴۱±۳۴۰۱  | ۳۶۴±۳۴۸   | ۰          | ۰                   | گروه شاهد             | چهارمین مرحله خونگیری (۸۰ روز پس از ایمن سازی) |
| ۲۲۷۱۰±۴۷۱۰   | ۲۱۸۷۶±۴۴۳۴ | ۵۰۴±۳۵۰   | ۳۲۹±۱۶۹    | ۰                   | گروه تزریقی (ECP+FKC) |  |
| ۱۳۵۶۰±۱۷۱۵   | ۱۰۷۴۱±۱۸۱۹ | ۲۷۰۶±۳۳۱۶ | ۲۴/۹±۵۵    | ۶۵±۴۷/۵             | گروه غوطه‌وری (FKC)   |  |
| ۲۱۰۰۰±۲۲۷۲   | ۱۹۴۳۶±۳۱۵۹ | ۲۲۵۵±۱۸۴۹ | ۲۰۶±۲۰۶    | ۱۱۲±۵۰              | گروه تزریقی (FKC)     |  |
| ۱۶۵۲۰±۲۴۴۶   | ۱۵۳۳۸±۲۵۱۴ | ۱۳۷۱±۹۸۶  | ۲۰۷±۱۵۰    | ۷۶±۳۴               | گروه خوراکی (ECP+FKC) |  |

با گروه کنترل امکان ایجاد محافظت غیر اختصاصی حداقل برای یک دوره ۹ هفته‌ای پس از ایمن سازی ماهیان به روش‌های مذکور وجود دارد. به علاوه افزایش سطح قابل توجه لیزوزیم در گروه‌های تیمار و در هفته‌های اولیه پس از ایمن سازی احتمالاً حکایت از نقش و درگیری بیشتر سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی علیه این بیماری دارد. هر چند افزایش میزان لیزوزیم سرم در ماهیهای واکسینه یا بیمار شده به صورت تجربی توسط باکتریهای بیمارها در مطالعات مشابه گزارش گردیده است (۳۰، ۱۸، ۱۲، ۱۱) 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 آنتی سرم و سرم نرمال ماهی علیه برخی سوش‌های کپسول دار این باکتری ناچیز بوده است و حتی افزودن سرم تازه موجب تسریع در رشد باکتری گردیده بود. به هر حال در این مطالعه قدرت باکتری‌کشی آنتی سرم‌ها به ویژه برای آن دسته از ماهیانی که به روش تزریقی واکسینه شده بودند بالا بود. از جمله علل احتمالی این موضوع می‌توان به عدم کپسول دار بودن سوش مورد استفاده و نیز افزایش برخی از عوامل ایمنی غیر اختصاصی نظیر لیزوزیم در سرم ماهیان ایمن شده باشد. زیرا کپسول‌های پلی ساکاریدی در استرپتوکوکوسها مانع قدرت باکتری‌کشی سرم‌ها می‌شوند. Sunyer و همکاران در سال ۱۹۹۵ در ماهی سوف دریایی یا sea bream قدرت باکتری‌کشی آنتی سرم‌ها در ماهیان

گیش دم زرد، باس راه راه و توربوت، عدم پاسخ هومورال یا پاسخ به میزان بسیار ناچیز گزارش گردیده است (۲۲، ۲۱، ۲۰). 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 به ترتیب توسط واکسن کشته غنی شده با آگرو توکسین‌های باکتری و حاوی ادجوانت و واکسن کشته حاوی ادجوانت و واکسن کشته بدون ادجوانت ایجاد شده است و پس از آن بیشترین میزان لیزوزیم به ترتیب به دنبال تجویز روش غوطه‌وری (واکسن کشته) و روش خوراکی با مصرف واکسن کشته غنی شده با آگرو توکسین‌های باکتری و روش خوراکی با مصرف واکسن کشته حاصل شده است. لذا با توجه به قدرت ضد باکتریایی لیزوزیم به ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت و افزایش میزان قابل توجه آن در سرم ماهیان واکسینه شده به ویژه در روش‌های تزریقی و افزایش میزان قابل توجه آن در سرم ماهیان واکسینه شده به ویژه در روش‌های تزریقی و حمام در مقایسه





## 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, *O. 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, J.L., 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., Horovitz 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., Shoemaker, 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 cultured 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: organism, 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

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

به علاوه بررسی جمعیت لکوسیتی ماهیان ایمن شده نشان داد که در ایام نمونه برداری پس از واکسیناسیون (تا ۸۰ روز پس از ایمن سازی) در مقایسه با گروه شاهد به ویژه افزایش جمعیت گلبولهای سفید (شمارش کلی) و جمعیت لمفوسیتی از افزایش قابل ملاحظه ای برخوردار بوده است. این موضوع حکایت از تحریک و تمایز و افزایش جمعیت های سلول های درگیر در ایمن اختصاصی و غیر اختصاصی ماهیان ایمن شده با واکسن های مذکور و به روش های مختلف (تزریقی، غوطه وری 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 بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی به عمل می آید. این تحقیق در قالب طرح های تحقیقاتی مصوب دانشگاه تهران و با اعتبارات ویژه (گرانث) معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام گرفته است.





- 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: Stelton, 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.I., 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 *Lactococcus 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, *Oreochromis 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 hemolytic 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.

