

مقاله پژوهشی

اثر سه روش تجویز باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس بر ایمنی
اختصاصی و بیان ژن های IL-6 و IgM در ماهی قزل آلی رنگین کمان

مجتبی علیشاهی^{۱،۲*}، مصطفی حلیمی^۱، مسعود قربانپور^۲، محمد رضا تابنده^۴

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۸

تاریخ دریافت: اسفند ۹۷

چکیده

در این مطالعه اثر تجویز واکسن (باکترین) دو گانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به سه روش خوراکی، تزریقی و غوطه‌وری در ماهی قزل آلی رنگین کمان بر بیان دو ژن مرتبط با ایمنی (IL-6 و IgM) ارزیابی شد. به این منظور ۶۰۰ قطعه ماهی (۱۴±۲/۱ گرم) به چهار تیمار، هر تیمار در سه تکرار به صورت زیر تقسیم شدند: تیمار تجویز خوراکی حاوی ۱۰^۸CFU/g از باکترین دوگانه (*Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae*)، تیمار تزریقی (تزریق داخل صفاقی باکترین دوگانه به مقدار ۱۰^۹CFU/mL)، تیمار غوطه‌وری (حمام دو دقیقه‌ای در سوسپانسیون باکترین دوگانه به مقدار ۱۰^۹CFU/mL) و تیمار شاهد بدون تجویز باکترین. ماهی‌ها به مدت دو ماه در شرایط مشابه تغذیه و نگهداری شدند. در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ عیار پادتن سرمی به روش الیزا، و میزان بیان دو ژن ایمنی IL-6 و IgM در کلیه قدامی ماهی‌ها با استفاده از تکنیک کمی با روش qRT-PCR ارزیابی شد. سپس تیمارها در روز ۶۰ آزمایش با هر دو باکتری به طور جداگانه مواجهه داده شدند و تلفات بین تیمارها مقایسه شد. نتایج نشان داد که تلفات بعد از مواجهه تیمار باکترین تزریقی در مورد *S. iniae* و *L. garvieae* به ترتیب ۱۰±۲۰ و ۲۶/۶۷±۵/۷۷، در روش خوراکی ۱۰±۵۶/۳۰ و ۱۰±۵۷/۷۰ و در غوطه‌وری ۵۰±۷/۶۳ و ۴۳/۳۳±۵/۶۳ بود. عیار پادتن در برابر هر دو باکترین در تیمار تزریقی به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر افزایش داشت ($P < 0/05$). میزان بیان هر دو ژن در تیمارهای واکسینه شده به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد ($P < 0/05$) و بیشترین بیان مربوط به تیمار تزریقی بود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که میزان محافظت، عیار پادتن و میزان بیان هر دو ژن ایمنی در تیمار باکترین تزریقی از روش‌های دیگر بالاتر بود، ولی با توجه به ارجحیت‌های روش غوطه‌وری و خوراکی نسبت به روش تزریقی، انجام پژوهش‌های بیشتر در بهبود کارایی این روش‌ها توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: باکترین استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس، روش تجویز، کارایی باکترین، IgM، IL-6، قزل آلی رنگین کمان.

۱- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد، قطب علمی بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، اهواز، ایران.

۳- دانشجوی دکتری بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۴- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۵- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: alishahimoj@gmail.com

مقدمه

ایران در سال‌های اخیر از عمده‌ترین تولیدکنندگان ماهی قزل‌آلا در آب شیرین در سطح جهان بوده است و همراه کشور ترکیه بالاترین رشد را در دهه اخیر در تولید این ماهی داشته‌اند (FAO, 2017). به جرات می‌توان گفت که مهم‌ترین بیماری باکتریایی صنعت پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس است که زبان‌های اقتصادی زیادی را به این صنعت وارد کرده است. این بیماری یک بیماری سیستمیک در ماهیان آب شیرین، لب شور و دریایی است. این بیماری در ابتدا در میان جمعیت قزل‌آلای رنگین‌کمان در ژاپن توسط Hoshina و همکاران در سال ۱۹۵۸ گزارش شد. بعدها این بیماری در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در آفریقای جنوبی، ایالات متحده آمریکا، بریتانیا و نروژ نیز اهمیت یافت و امروزه به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در آبی‌پروری شناخته شده است (Austin and Austin, 2007). عامل استرپتوکوکوزیس اولین بار در ایران در سال ۲۰۰۰ از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران و سپس در سال ۲۰۰۳ از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استان فارس جدا

شد (Faghani et al., 2008). درمان و کنترل این بیماری مشکل است، زیرا زمانی این بیماری آشکار می‌شود که ماهی به وسیله کیفیت پایین آب تحت استرس قرار گیرد (Sakai et al., 1993). درمان به دلیل مشکلات اجرایی تجویز، هزینه بالا و از همه مهم‌تر مقاوم شدن باکتری نسبت به داروهای رایج کارایی لازم را ندارد (Soltani et al., 2016). روش‌های جایگزین برای کنترل بیماری‌های استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس، استفاده از واکسن‌ها است (Pridgeon and Klesius, 2011) و اکثر کشورهای دارای صنعت پرورش ماهیان سردابی از این واکسن‌های موثر برای این بیماری سود می‌جویند (Soltani et al., 2016). در کشور ایران نیز بیش از یک دهه است که واکسن تجاری دوگانه این بیماری تولید و استفاده شده است. یکی از مشکلات واکسیناسیون در ماهی روش تجویز آن است. در روش تزریقی استرس تزریق واکسن، تلفات بعد از تزریق، در کنار هزینه و نیروی کار بالا، مانع اصلی گرایش پرورش‌دهندگان به استفاده از این واکسن است (Soltani et al., 2016). مدل ارزیابی میزان اثربخشی واکسن‌ها در ماهی، بیشتر بر اساس کارایی (Efficacy) و میزان ایمنی‌زایی سرمی

یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌های پیش‌التهابی در ماهی است که از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود و در پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش دارد. اینترلوکین ۶ از سلول‌های بیگانه خوار و لنفوسیت T کمکی و لنفوسیت‌های B ترشح می‌شود و بر تولید ایمونوگلوبولین و همچنین ایمنی غیراختصاصی موثر است (علیشاهی، ۱۳۸۹). شکل کلی این ژن در بین مهره‌داران محافظت شده است. IL-6 سیتوکینی مهم در پروسه فاز حاد التهاب در ماهی است (Hirano, 1998). از این رو، در این مطالعه اثر سه روش واکسیناسیون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس بر عیار پادتن و بیان دو ژن IGM و IL-6 ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس

برای تهیه باکترین (واکسن) ابتدا باکتری‌های *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* که در مطالعات قبلی از بین حدود ۱۰ ایزوله مختلف جدا شده از ماهیان مبتلا به استرپتوکوکوزیس در نقاط مختلف کشور بر اساس حدت آن‌ها انتخاب شده

(Immunogenicity) واکسن است. ثابت شده است که بین کارایی واکسن و پاسخ ایمنی سرمی در ماهی ارتباط مستقیم وجود دارد (Liu et al., 2016; Craig et al., 2017). اطلاعات سازوکارهای مولکولی و سلولی پاسخ ایمنی و میزان بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی (Immune-related Gene Expression) می‌تواند به فهم بهتر، دقیق‌تر و عمیق‌تر ارتباط میان حفاظت، ایمنی‌زایی میزبان در مقابل عوامل بیماری‌زای مهاجم کمک کند و به درک بهتر روند ایمنی‌زایی و فرآیندهای دخیل در ایجاد مقاومت در برابر عامل بیماری‌زا کمک کند (Raida and Buchmann, 2008). پیشرفت‌های چشمگیری در سال‌های اخیر در جداسازی و توصیف ژن سیتوکین از ماهی به دست آمده است (Wang and Secombes, 2009). این سیتوکین‌ها به منظور کمک به مکانیسم‌های دفاعی میزبان در محدود کردن مکانیسم بیماری‌زایی باکتری‌ها دخالت دارند (Kadowaki et al., 2013). ژن IGM در ماهی‌ها در روند تولید و ترشح IGM نقش دارد و یکی از ژن‌های مهم در ارزیابی ایمنی اختصاصی هومورال در ماهی است که بیشترین بیان را در کلیه پیشین ماهی دارد (Ismail et al., 2016). همچنین ژن اینترلوکین ۶ (IL-6)

نظر گرفته شد. ماهی‌ها به مدت ده روز با خوراک همراه باکترین تهیه شده تغذیه شدند. برای تیمار غوطه‌وری، محصول باکتریایی تهیه شده به نسبت ۱ به ۱۰ در آب آکواریوم رقیق شد (۱۰۰ میلی‌لیتر باکترین به ۹۰۰ میلی‌لیتر آب) و سپس ماهی‌ها به مدت ۲ دقیقه در باکترین تهیه شده با هوادهی غوطه ور شدند.

مراحل تیماربندی و تجویز باکترین‌ها

به منظور تیماربندی ماهی‌ها، ۶۰۰ قطعه ماهی قزل آلائی رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی $14 \pm 2/1$ گرم از یکی از کارگاه‌های بخش خصوصی شهرستان ازنا (لرستان) خریداری و به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. ماهی‌ها بعد از سازگاری با شرایط جدید به مدت دو هفته به ۴ تیمار (هر تیمار در سه تکرار و هر تکرار با ۵۰ قطعه ماهی) تقسیم شدند. برای تغذیه و ساخت باکترین از خوراک تجاری (Skretting، ایتالیا) مخصوص ماهیان ۱۰ تا ۴۰ گرم قزل‌آلا استفاده شد. بررسی بهداشتی ماهی‌ها (بررسی انگلی، کشت از اندام‌های داخلی و مغز) انجام شد تا از سلامت ماهی‌ها از نظر عدم ابتلا به بیماری‌های باکتریایی و انگلی اطمینان حاصل شود. سوابق

و به طور جداگانه با روش PCR جنس و گونه آن‌ها اثبات شده بود، برای مطالعه در نظر گرفته شدند. باکتری‌ها در محیط (TSB Trypticase Soy Broth) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس باکتری‌ها با مجاورت فرمالین ۱ درصد به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شدند و بعد با سرم فیزیولوژی سه بار شستشو شدند. به منظور اطمینان از غیرفعال شدن کامل باکتری‌ها، از باکتری غیرفعال شده کشت مجدد تهیه شد (Alishahi et al., 2010). قبل از غیرفعال کردن باکتری‌ها، با استفاده از رقیق‌سازی و کشت در محیط جامد تعداد باکتری‌ها در حد 10^{10} CFU/mL تنظیم شد. در انتهای کار، باکتری‌های غیرفعال شده در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون در آمدند.

برای تیمارهای تزریقی از دو باکتری به نسبت مساوی با هم ترکیب شدند و نهایتاً برای تیمارهای تزریقی ۱۰۰ میکرولیتر از محصول به صورت تزریق داخل صفاقی به ماهی‌های قزل‌آلائی رنگین‌کمان تزریق شد.

در تیمار واکسیناسیون خوراکی هم از محصول باکتریایی با غلظت 10^{10} ، به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به هر ۱۰۰ گرم خوراک اضافه شد، یعنی نهایتاً 10^9 باکتری در هر گرم خوراک در

صفر و ۱۴ انجام شد، نمونه‌برداری از ماهی‌ها در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ انجام شد و در هر مرحله، از هر تکرار ۴ ماهی (۱۲ ماهی از هر تیمار) برای تهیه نمونه‌های ژنی از کلیه قدامی و خون‌گیری انتخاب شد. نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم جداسازی شده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش الایزا نگهداری شد. نمونه‌های بافتی کلیه قدامی نیز پس از جمع‌آوری در شرایط استریل، بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در انتهای دوره ماهیان تیمارهای مختلف به طور جداگانه در مواجهه باکتریایی با هر دو باکتری زنده *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* قرار داده شدند.

تعیین عیار ضد *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* در سرم

برای اندازه‌گیری عیار پادتن ضد *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* در سرم ماهیان تیمارهای مختلف به روش الایزا، از روش توصیه شده توسط Shelby و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد. آزمایش الایزا برای هر باکتری به طور جداگانه انجام گرفت. به این ترتیب که ابتدا رقت ۱:۵۰ از آنتی‌ژن

بیماری در مزرعه تهیه بچه ماهی‌ها که همواره یکی از مزارع پرورش ماهی نمونه بوده است، وجود نداشت.

ماهی‌ها در مخازن پلاستیکی ۵۰۰ لیتری با تعویض روزانه آب، دمای ۱۳ تا ۱۴ درجه سانتی‌گراد، سختی آب ۸۵۰ میکروزیمنس بر سانت‌متر مربع، pH ۸/۱ تا ۸/۵، میزان نیتریت و نیترات کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و اکسیژن بالای ۸ میلی‌گرم در لیتر نگهداری شدند. هوادهی با یک سیستم هواده بلوئر مرکزی انجام شد. بعد از دوره سازگاری، ماهی‌ها به این صورت تیمار بندی شدند:

تیمار اول: ایمن‌سازی با باکترین دوگانه غیرفعال شده به روش خوراکی (10^8 عدد باکتری در گرم خوراک به مدت ۱۰ روز).

تیمار دوم: ایمن‌سازی به روش تزریقی (تزریق داخل صفاقی ۰/۱ میلی‌لیتر از باکترین دو باکتری با غلظت 10^9 باکتری در میلی‌لیتر).

تیمار سوم: ایمن‌سازی به روش غوطه‌وری (به مدت ۲ دقیقه در غلظت 10^9 باکترین دوگانه در میلی‌لیتر).

تیمار چهارم: تیمار شاهد بدون تجویز باکترین.

ماهی‌ها به مدت ۶۰ روز در تیمارهای مختلف نگهداری شدند. تجویز باکترین‌ها در روز

چاهک اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق همراه شیک انکوبه شد. بعد از ۳ بار شستشو با PBS-T، ۵۰ میکرولیتر کونژوگه HRP خرگوشی ضد ایمنوگلوبولین موشی (Rabbit Anti Mouse HRP Conjugate، Abcam، انگلستان) رقیق شده به نسبت ۱:۲۵۰۰ در PBS-T حاوی ۱ درصد شیر چربی گرفته شده به چاهکها اضافه شد. بعد ۶۰ دقیقه انکوباسیون، چاهکها به روش قبل شستشو شدند و ۵۰ میکرولیتر محلول کروموژن محلول کروموژن - سوبسترا TMB (تترامتیل بنزیدین + آب اکسیژنه) به میزان ۵۰ میکرولیتر به تمامی چاهکها اضافه شده، واکنش بعد از ۱۰ دقیقه با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال متوقف شد و پلیت با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا (Accu Reader، تایوان) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی میزان حدت باکتری‌ها (LD₅₀)

به منظور محاسبه LD₅₀ هر باکتری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ابتدا باکتری‌های *Lactococcus garvieae* و *Streptococcus iniae* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TSB کشت داده شدند. پس از سانتریفوژ و جداسازی

سونیکه شد (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). برای این منظور، باکتری کشت داده شده با غلظت ۱۰^{۱۰} در دستگاه سونیکاتور به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه شد. بعد از آزاد شدن کلیه آنتی‌ژن‌های باکتری‌ها، آنتی‌ژن‌ها در بافر پوشاننده (بافر کربنات- بیکربنات با pH ۹/۶) حل شد و ۵۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ چاهکی (Nunc، دانمارک) کوت شده، به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از شستشوی چاهکها با بافر فسفات شستشو (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد تواین ۲۰ یا PBS-T)، چاهکها با شیر چربی گرفته شده (High Media، هند) ۲/۵ درصد در PBS-T به مدت یک ساعت در ۲۵ درجه بلاک شد. سپس چاهکها با PBS-T سه مرتبه شستشو شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرمی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۵ در PBS-T حاوی ۱ درصد شیر چربی گرفته شده و انکوبه شدن به مدت ۹۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد همراه شیک ممتد، چاهکها به روش قبلی شستشو شدند. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر پادتن منوکلونال ضد IgM ماهی قزل‌آلا در سرم خرگوشی (اهدایی دکتر مسعود صیفی- دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز) رقیق شده به نسبت ۱:۷۵۰۰ در PBS-T حاوی ۱ درصد شیر چربی گرفته شده به هر

قرار داده شدند. همزمان گروه شاهد (غیرواکسینه) نیز با LD₅₀ باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. به یک گروه از ماهیان گروه شاهد نیز فقط PBS به همان روش تزریق شد. در طی دوره مواجهه، روزانه ماهی‌ها بررسی شدند و میزان تلفات در طی ۱۰ روز ثبت شد و درصد تلفات در تیمارها مقایسه شد. از آنجا که ماهیان تزریق شده با PBS هیچگونه تلفاتی در طول دوره مواجهه نداشتند، در نمودارهای مواجهه این گروه آورده نشد.

ارزیابی بیان ژن‌های IL-6 و IgM در کلیه قدامی

برای ارزیابی بیان ژن‌های IL-6 و IgM در کلیه قدامی از روش PCR در زمان حقیقی (qRT-PCR) استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA نمونه‌های کلیه قدامی به وسیله کیت RNXTM (SinaClon، ایران) و بر اساس روش توصیه شده توسط شرکت سازنده انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده با اندازه‌گیری نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میکروفوتومتر (Eppendorf، آلمان) و ارزیابی حضور RNA‌های ریبوزومی بر روی ژل آگارز

باکتری، غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی در حد ۱۰^۹ باکتری در میلی‌لیتر تنظیم شد (Alishahi et al., 2010) و از این سوسپانسیون رقت‌های متوالی (۱۰^۵ تا ۱۰^۹CFU/mL) تهیه شد. از هر غلظت به ده ماهی تزریق داخل صفاقی انجام و تلفات هر رقت به مدت ۱۰ روز ثبت شد. پس از مرگ ماهی‌ها، با کشت مجدد باکتری از اندام‌های داخلی شامل کلیه قدامی و کبد، از علت مرگ به خاطر عفونت باکتریایی در اثر مواجهه، اطمینان حاصل شد. نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار Probit میزان LD₅₀ اندازه‌گیری شد.

میزان LD₅₀ باکتری *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* $1/3 \times 10^6$ CFU/mL و $4/7 \times 10^5$ CFU/mL محاسبه شد. یعنی *Lactococcus garvieae* حدت نسبتاً بالاتری نسبت به *Streptococcus iniae* داشت.

مواجهه باکتریایی

۶۰ قطعه ماهی از هر تیمار به طور جداگانه در مواجهه با باکتری‌های *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* به میزان مقدار ایجاد کننده ۵۰ درصد تلفات (به دست آمده در مرحله قبل)، به صورت داخل صفاقی،

انجام شد. توالی‌های آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه به همراه اطلاعات مربوط به هر یک در جدول شماره ۱ آورده شده است.

qRT-PCR

برای ارزیابی تغییر میزان بیان ژن‌های IgM و IL-6 با روش qRT-PCR از دستگاه Lightcycler® Detection System (Roche، آمریکا) استفاده شد. ژن EF1 α به عنوان ژن کالیبراتور استفاده شد. واکنش‌ها با حجم ۱۲/۵ میکرولیتری شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Super SYBR Green qRT-PCR Mastermix (یکتاتجهیز، ایران) و ۰/۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰۰ nM)، ۳ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ ng) و ۲/۲۵ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز بود.

۱/۵ درصد انجام شد. نمونه‌های RNA با جذب بالاتر از ۱/۸ برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند.

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Synthesis Kit، YTA، یکتا تجهیز، ایران) با مقدار تقریبی ۱ میکروگرم RNA و آغازگرهای هگزامر تصادفی بر اساس روش توصیه شده شرکت سازنده انجام گرفت.

طراحی آغازگر برای qRT-PCR

آغازگرهای qRT-PCR بر اساس توالی ژن‌های IL-6 و IgM و Elongation Factor 1 α (EF1 α) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجود در بانک ژن NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و با استفاده از نرم افزار Beacon Designer 7.1

جدول ۱: ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

نام ژن	طول قطعه (bp)	توالی آغازگر 3'>>>5'	عدد دسترسی بانک ژن
EF1 α	۲۰۵	CAAGGATATCCGTCGTGGCA ACAGCGAAACGACCAAGAGG	XM_020500543
IgM	۲۲۰	TACAAGAGGGAGACCGGAGGA CTTCCTGATTGAATCTGGCTAGTGGT	S63348
IL-6	۱۸۷	CCTTGCGGAACCAACAGTTTG CCTCAGCAACCTTCATCTGGTC	MN_001124657

یک‌طرفه (One-way ANOVA) برای بررسی تفاوت میانگین‌های شاخص‌های اندازه‌گیری شده در تیمارها استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد.

نتایج

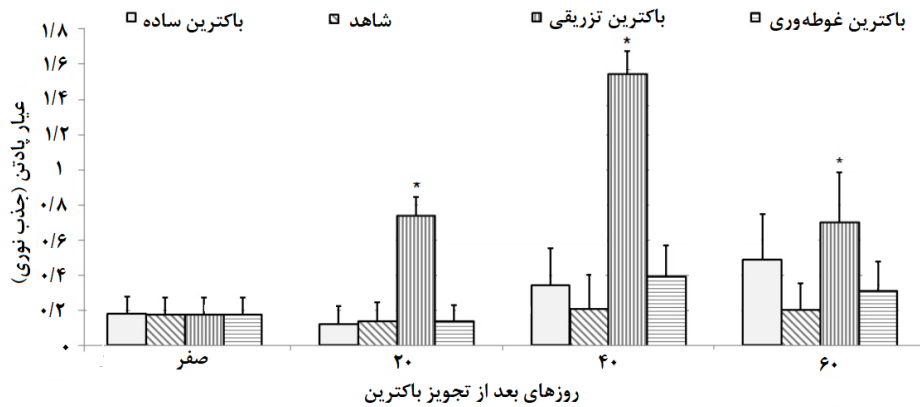
نتایج مربوط به عیار پادتن ضد *Lactococcus* و *Streptococcus iniae* در ماهیان واکسینه شده به سه روش تزریقی، خوراکی و غوطه‌وری در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است با وجود افزایش نسبی عیار پادتن ضد هر دو باکتری در تمام تیمارهای ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان واکسینه شده، فقط در تیمار تزریقی افزایش معنی‌دار عیار مشاهده شد ($P < 0.05$).

نتایج مربوط به درصد تلفات بعد از مواجهه حاد با دو باکتری *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* در تیمارهای آزمایشی به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است.

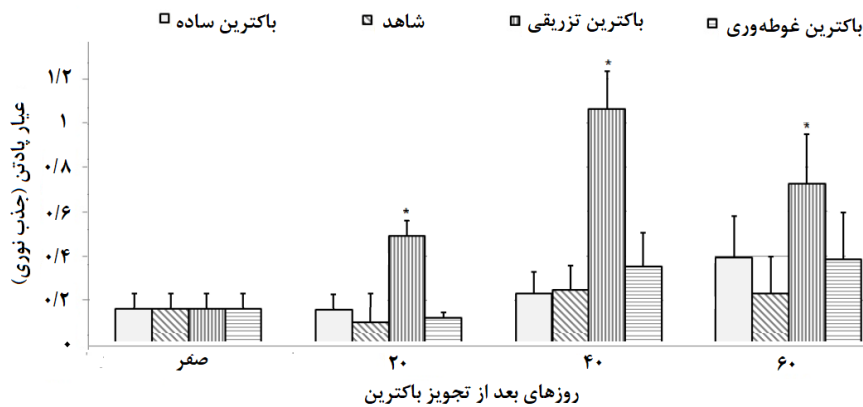
پروتکل PCR شامل ۵ دقیقه دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. دو واکنش کنترل شامل کنترل منفی بدون cDNA و کنترل حاوی RNA به جای cDNA در نظر گرفته شد. بیان نسبی ژن‌ها در مقایسه با ژن کالیبراتور با استفاده از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ و نرم‌افزار Lightcycler 96 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ارزیابی کارایی تکثیر ژن‌های هدف (IL-6 و IgM) در مقایسه با ژن مرجع ($EF1\alpha$) با تهیه رقت‌های مختلف cDNA و رسم نمودار کارایی مطابق دستور العمل MIQE انجام شد (Bustin et al., 2009).

آزمون‌های آماری

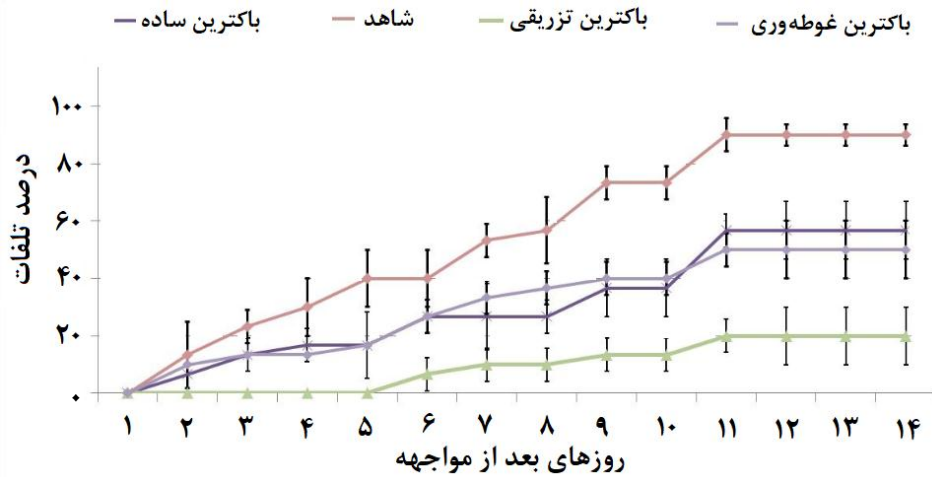
برای تحلیل داده‌های به دست آمده، از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد. ابتدا از آزمون آماری لون (Leven Statistic Test) برای بررسی همگن بودن انحراف معیار داده‌ها استفاده شد. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از آزمون تحلیل واریانس



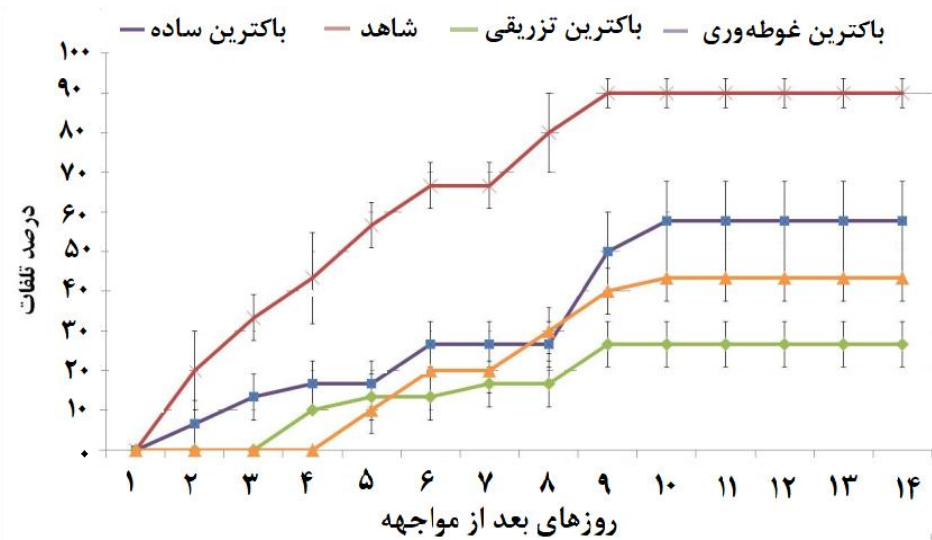
شکل ۱: مقایسه عیار پادتن ضد *Streptococcus iniae* بین تیمارهای واکسینه شده با باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری (میانه \pm انحراف معیار). وجود علامت * در هر مرحله نمونه‌برداری نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد است ($P < 0.05$).



شکل ۲: مقایسه عیار پادتن ضد *Lactococcus garvieae* بین تیمارهای واکسینه شده با باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف در ۴ مرحله نمونه‌گیری (میانه \pm انحراف معیار). وجود علامت * در هر مرحله نمونه‌برداری نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد است ($P < 0.05$).



شکل ۳: مقایسه درصد تلفات بعد از مواجهه با *Streptococcus iniae* بین تیمارهای واکسینه شده با باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف (میانگین \pm انحراف معیار)



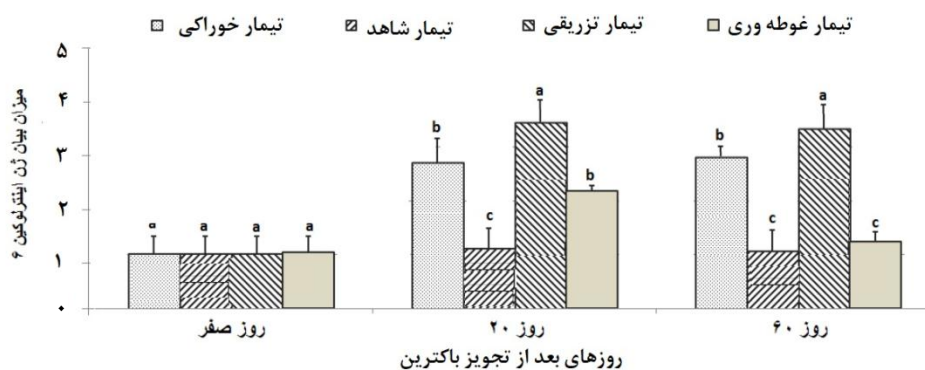
شکل ۴: مقایسه درصد تلفات بعد از مواجهه با *Lactococcus garvieae* بین تیمارهای واکسینه شده با باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس به روش‌های مختلف (میانگین \pm انحراف معیار).

میزان بیان ژن‌های IL-6 و IgM در بافت کلیه قدامی ماهیان تیمارهای آزمایشی در مراحل نمونه‌گیری در شکل‌های ۵ و ۶ آورده شده است. در مورد میزان بیان IL-6، تیمار خوراکی در روزهای ۲۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $2/72 \pm 0/44$ و $2/83 \pm 0/17$ ، در تیمار غوطه‌وری $2/1 \pm 0/1$ و $1/24 \pm 0/19$ و در تیمار تزریقی $3/47 \pm 0/31$ و $3/35 \pm 0/74$ بود.

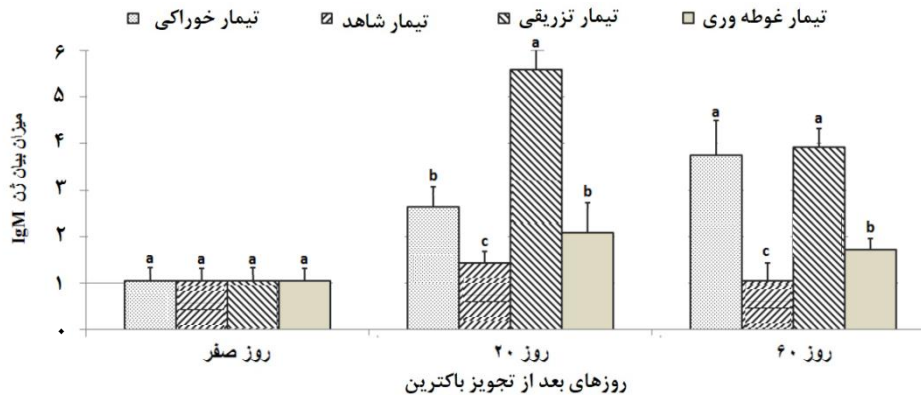
در مورد میزان بیان ژن IgM در تیمار خوراکی در دو مرحله ۲۰ و ۶۰ روز به ترتیب برابر $2/65 \pm 0/49$ و $3/76 \pm 0/74$ ، در تیمار غوطه‌وری $2/09 \pm 0/8$ و $1/71 \pm 0/29$ و در تیمار تزریقی $5/52 \pm 0/52$ و $3/93 \pm 0/4$ بود.

درصد تلفات در تیمارهای واکسینه شده به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش داشت، که این کاهش در تیمار تزریقی به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای دیگر بود ($P < 0/05$). به طوری که تلفات بعد از مواجهه با *Streptococcus iniae* در تیمار خوراکی $56/7 \pm 10$ درصد، تیمار شاهد $90 \pm 3/67$ درصد، تیمار تزریقی 20 ± 10 درصد و تیمار غوطه‌وری 50 ± 10 درصد بود.

تلفات بعد از مواجهه با *Lactococcus garvieae* در تیمار خوراکی $57/7 \pm 10$ درصد، تیمار شاهد $90 \pm 3/67$ درصد، تیمار تزریقی $26/67 \pm 5/77$ درصد و تیمار غوطه‌وری $43/33 \pm 5/77$ درصد بود.



شکل ۵: مقایسه میزان بیان ژن اینترلوکین ۶ بین تیمارهای ایمن شده به روش‌های مختلف در سه مرحله نمونه‌گیری (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرهمنام در هر مرحله نمونه‌برداری نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0/05$).



شکل ۶: مقایسه میزان بیان ژن IgM بین تیمارهای ایمن شده به روش‌های مختلف در سه مرحله نمونه‌گیری (میائین ± انحراف معیار). حروف غیرهمنام در هر مرحله نمونه‌برداری نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

میزان تلفات حدود ۵۰ درصد در روش

بحث

غوطه‌وری در مطالعه حاضر نیز قابل مقایسه با مطالعات دیگر در این زمینه است. مثلاً Bercovier و همکاران (۱۹۹۷) بازماندگی حدود ۴۰ درصد را در ماهیان واکسینه شده به روش غوطه‌وری در برابر استرپتوکوکوزیس گزارش کردند. همچنین Soltani و همکاران (۲۰۰۷) در باکترین استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلفات حدود ۷۰ درصد را در تیمار غوطه‌وری گزارش کردند. در مارماهی اروپایی ایمن شده با باکترین غوطه‌وری *Vibrio vulnificus* ایمنی محدودی (حدود ۲۰ درصد) گزارش شد، ولی باکترین غوطه‌وری به همراه باکترین خوراکی یادآور محافظت بالای ۷۰

در این مطالعه تیمار ایمن به روش تزریقی به ترتیب تلفات 20 ± 10 و $26/67 \pm 5/77$ درصد را در مواجهه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با باکتری *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* نشان داد که به طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای دیگر بود ($P < 0.05$). در مقایسه با گزارش‌های مشابه کارایی این روش قابل قبول است، به طوری که در مطالعه Eldar و Ghittino (۱۹۹۹) و Altun و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، به دنبال باکترین *Lactococcus garvieae* به روش تزریقی تلفات ۱۰ درصد گزارش شد.

- درصد را باعث شد (Esteve-Gassent et al., 2004).
- تلفات نزدیک به ۶۰ درصد در ماهیان واکسینه شده با باکترین خوراکی در مطالعه حاضر مشاهده شد. Soltani و همکاران (۲۰۰۷) کارایی ضعیف (تلفات حدود ۸۵ درصد) را در مورد باکترین خوراکی استرپتوکوکوزیس گزارش کردند. همچنین Romalde و همکاران (۲۰۰۴) کارایی حدود ۳۰ درصد را در باکترین خوراکی لاکتوکوکوزیس مشاهده کردند. البته گزارش‌هایی از ایجاد پاسخ هومورال در سرم، پوست و مخاط روده گونه‌های مختلف ماهی به دنبال ایمنی‌سازی خوراکی ارائه شده است (Halimi et al., 2020). Eldar و Ghittino (۱۹۹۹) و Altun و همکاران (۲۰۱۰) محافظت کم یا فقدان محافظت باکترین خوراکی در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را گزارش کردند. یکی از دلایل فقدان محافظت یا محافظت پایین واکسن‌های خوراکی آبزیان تغییرات آنتی‌ژن واکسن در شرایط اسیدی معده و تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک روده‌ای است. اسیدیته بالای معده (pH حدود ۳) بیشتر آنتی‌ژن‌های واکسن را تغییر شکل می‌دهد (Smith, 2002) و این تغییر شکل آنتی‌ژنی باعث کاهش تحریک
- ایمنی واکسن می‌شود (Rombout et al., 2014).
- عیار پادتن ضد *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* اندازه‌گیری شده به روش الیزا در تیمار تزریقی به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر افزایش یافت ($P < 0.05$)، ولی در تیمارهای واکسینه شده به روش خوراکی و غوطه‌وری فقط افزایش نسبی مشاهده شد که در هیچ کدام از مراحل نمونه‌گیری از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). گزارش‌ها در مورد ارتباط عیار پادتن با محافظت ایجاد شده به دنبال واکسیناسیون ماهی در برابر استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس متفاوت و گاه متناقض است، به عنوان مثال Barnes و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که هر چند عیار پادتن ضد *Streptococcus iniae* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایمن شده با باکترین همولوگ ایجاد شد، ولی در مورد باکتری هترولوگ هیچ گونه عیار پادتن مشاهده نشد. Bromage و همکاران (۱۹۹۹) در ماهی *Lates calcarifer* و بیماری استرپتوکوکوزیس و Greenway و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی گربه ماهی روگاهی و بیماری ادواردزیلوزیس با وجود مشاهده کارایی مناسب باکترین، هیچ گونه عیار پادتن ضد این باکتری‌ها

را در سرم ماهی واکسینه شده گزارش نکردند. Klesius و همکاران (۲۰۰۰) با تزریق داخل صفاقی و عضلانی باکتری کشته شده *Streptococcus iniae* در ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) افزایش عیار پادتن متناسب با محافظت بالا را گزارش کردند. البته آن‌ها با به کار بردن باکتری اگزولوگ در

مهم‌تری نسبت به ایمونوگلوبولین M دارد و پادتن مونوکلونال ضد زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین M ماهی قادر به تشخیص ایمونوگلوبولین T نیست (Gudding et al., 2014). از این رو، عدم مشاهده عیار پادتن مناسب با وجود مشاهده محافظت نسبی احتمالاً به همین دلیل است.

با وجود اهمیت و موفقیت ایمن‌سازی باکترین علیه بیماری‌های باکتریایی در ماهی، اطلاعات کمی در مورد مکانیسم‌های مولکولی واکسن‌های ایجاد کننده ایمنی در ماهیان استخوانی وجود دارد (Wang et al., 2015). سنجش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی بعد از واکسیناسیون، بینش ارزشمندی درباره مکانیسم‌های ایمنی علیه باکتری‌های *Lactococcus* و *Streptococcus iniae garvieae* در ماهی ایجاد می‌کند. همچنین می‌توان افزایش میزان بیان ژن‌های ایمنی (بیان ژن‌های IgM و IL-6) را به عنوان شاخص اثر بخشی باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس به شمار آورد (Huang et al., 2014).

در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های IgM و IL-6 در کلیه قدامی ماهیان واکسینه شده به هر سه روش از تیمار شاهد بیشتر بود ($P < 0.05$).

تست الایزا عیاری گزارش نکردند (Klesius et al., 2000). در همین راستا Costa و همکاران ۲۰۱۱ نشان دادند که واکسیناسیون ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) با باکترین *Streptococcus iniae* موجب افزایش معنی‌دار عیار پادتن تا ۱۲ هفته شد که بعد از آن عیار پادتن با شیب آرامی کاهش یافت و بعد از سه ماه عیاری مشاهده نشد. به نظر می‌رسد در ماهیان مختلف مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد پاسخ ایمنی در برابر استرپتوکوکوزیس نقش دارند و در برخی گونه‌ها ایمنی اختصاصی با واسطه پادتن نقش کمتری در ایمن‌سازی ماهی دارد.

فقدان عیار پادتن ضد باکتری‌های واکسینی در تیمار غوطه‌وری و خوراکی را می‌توان به نوع ایمونوگلوبولین دخیل در پاسخ ایمنی مخاطی در این اندام‌ها نسبت داد. در ایمن‌سازی مخاطی (روده و آبشش) ایمونوگلوبولین T (IgT) نقش

افزایش بیان ژن IgM در این تیمارها می‌تواند به این دلیل باشد که همه ژن‌های بیان شده به تولید پروتئین و محصول ایمونوگلوبولینی ختم نشدند. احتمالاً درصد بالایی از ژن‌های بیان شده در لکوسیت‌های کلیه قدامی به ایمونوگلوبولین نهایی ترجمه نشدند و بنابراین سطح سرمی IgM افزایش نیافت. افزایش بیان IgM نیز فقط مربوط به آنتی‌ژن واکسنی نبود. از طرفی ایمنی مخاطی به واسطه IgT ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نقش بیشتری نسبت به IgM داشت. هر چند در مطالعه حاضر ارتباط بین ایمنی مخاطی و میزان محافظت و بیان ژن IgM و عیار سرمی IgM پرداخته نشده است، با این وجود، احتمالاً در سطح مولکولی و ژنی هم‌پوشانی بیشتری بین ژن‌های IgM و IgT ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان وجود دارد ولی در سطح ایمونولوژیک، پادتن مونوکلونال ضد ایمونوگلوبولین M قادر به تشخیص ایمونوگلوبولین T نبود. بنابراین، با وجود گزارش بیان بالاتر این ژن در سلول‌های کلیه قدامی، افزایش عیار معنی‌داری در تیمارهای باکترین خوراکی مشاهده نشد.

Buchmann و Raida (۲۰۰۸) بعد از ایمن‌سازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با باکترین *Yersinia ruckeri* شده

البته میزان بیان در تیمار تزریقی به طور معنی‌داری از تیمارهای دیگر بیشتر بود ($P < 0.05$).

ایمونوگلوبولین یا آنتی‌بادی که نقش حیاتی در پاسخ‌های ایمنی اکتسابی ایفا می‌کند یک گلیکوپروتئین است. سه نوع ایمونوگلوبولین IgM، IgD و IgT/IgZ در ماهیان استخوانی حقیقی گزارش شده است. اصلی‌ترین آن‌ها نوع M است که در سطح لنفوسیت‌ها بیان می‌شود (Hordvik, 2015).

مطالعات زیادی نشان داده است که بعد از واکسیناسیون ماهی با یک واکسن باکتریایی کشته شده میزان بیان ژن IgM افزایش می‌یابد (Racine and Winslow, 2009). افزایش بیان ژن IgM در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از عفونت تجربی یا واکسیناسیون اتفاق می‌افتد و میزان بیان این ژن با سطح محافظت واکسن ارتباط دارد (Wang et al., 2015). در مطالعات آلودگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با انگل تک‌یاخته‌ای، افزایش بیان ژن IgM گزارش شده است (Kumar et al., 2015). البته در مطالعه حاضر عدم مشاهده عیار پادتن ضد باکتری *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* در سرم ماهیان ایمن شده به روش خوراکی و غوطه‌وری با وجود

سیتوکین چندکاره است که اثرات زیستی متعددی دارد (Hirano, 1998). این ژن در سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی نقش داشته، به عنوان یک سیتوکین پیش‌التهابی شناخته شده است و در تحریک تولید پادتن و نیز تمایز سلول‌های T نقش موثری ایفا می‌کند (Cronstein, 2007). Lovoll و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای نشان دادند که باکترین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با LPS باکتری *Aeromonas salmonicida* موجب کاهش بیان ژن IL-6 شده است. بر خلاف یافته بالا، در ماکروفاژهای تحریک شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان واکسینه شده در برابر استرپتوکوکوزیس، میزان بیان IL-6 افزایش معنی‌داری پیدا کرد (Wang and Secombes, 2009). در ماهی هامور تزریق باکترین موجب افزایش بیان ژن IL-6، تمایز بیشتر سلول‌های T و افزایش بیان IgM در کلیه قدامی شد (Chen et al., 2012).

با توجه به بیان بالای هر دو ژن IgM و IL-6 در کلیه قدامی ماهیان واکسینه شده به هر سه روش و عدم گزارش عیار پادتن در روش خوراکی و غوطه‌وری و همچنین کارایی پایین‌تر این دو روش نسبت به روش تزریقی، می‌توان احتمال داد که واکسیناسیون به روش غوطه‌وری

روش حمام، افزایش بیان ژن‌های IgM و IL-6 در مقایسه با گروه شاهد را نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Racine و Winslow (۲۰۰۹) افزایش بیان ژن IgM را در به کارگیری باکتری غیرفعال شده *Aeromonas hydrophila* گزارش کردند.

Deshmukh و همکاران (۲۰۱۳) نیز افزایش بیان ژن IgM را بعد از تجویز واکسن دوگانه تجاری Aqua Vac ERM و Aqua Vac RELERA بر ضد بیماری یرسینیوزیز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش کردند.

در مطالعه حاضر افزایش بیان ژن IgM به طور آشکار در گروه واکسینه شده به روش تزریقی افزایش یافت که با محافظت ایجاد شده متناسب بود. هر چند در واکسن‌های خوراکی با وجود کارایی بالای باکترین و افزایش بیان ژن IgM افزایش معنی‌داری در عیار پادتن مشاهده نشد.

زیر خانواده IL-6 بر فعالیت سلول‌های B و ماکروفاژها تاثیرگذار است. ژن IL-6 در ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) کلون و به خوبی شناسایی شده است (Chen et al., 2012). شکل کلی این ژن در بین مهره‌داران محافظت شده است. نقش IL-6 در پروسه فاز حاد التهاب شناخته شده است و در واقع یک

خوراکی نیز در ایجاد تفاوت در کارایی واکسن‌های خوراکی و غوطه‌وری محتمل است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی قطب علمی بهداشت و بیماریهای ماهیان گرمابی به انجام رسید

و خوراکی با وجود تحریک ایمنی در سطح سلولی و مولکولی در بافت‌های دفاعی، در کارایی و عیار پادتن تاثیر مستقیمی ندارد. بنابراین، ضمن تایید وجود مشکلات معمول ایمنی مخاطی همچون تحمل ایمنی خوراکی، تخریب آنتی‌ژن در دستگاه گوارش، نقش Igt در مخاط، بعد از واکسیناسیون غوطه‌وری و

منابع

- علیشاهی م. ۱۳۸۹. مقدمه‌ای بر ایمنی‌شناسی آبزیان (ترجمه). دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱۴ ص.
- Alishahi M., Ranjbar M.M., Ghorbanpour M., Peyghan R., Mesbah M. and Razi Jalali M. 2010.** Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Veterinary Medicine, 4(3): 189–195.
- Altun S., Kubilay A., Ekici S., Didinen B.I. and Diler O. 2010.** Oral vaccination against lactococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16: 211–217.
- Austin B. and Austin D.A. 2007.** Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish. Springer, Netherlands. 552P.
- Barnes A.C., Young F.M., Horne M.T. and Ellis A.E. 2003.** *Streptococcus iniae*: Serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Diseases of Aquatic Organisms, 53(3): 241–247.
- Bercovier H., Ghittino C. and Eldar A. 1997.** Immunization with bacterial antigens: Infections with streptococci and related organisms. Developments in Biological Standardization, 90: 153–60.
- Bromage E.S., Thomas A. and Owens L. 1999.** *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Disease of Aquatic Organisms, 36: 177–181.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. and Wittwer C.T. 2009.** The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4): 611–622.
- Chen H.H., Lin H.T., Fong Y.F. and Lin J.H.Y. 2012.** The bioactivity of teleost IL-6: IL-6 protein in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) induces Th2 cell differentiation pathway and antibody production. Developmental and Comparative Immunology, 38(2): 285–294.
- Costa A.A., Leef M.J., Bridle A.R., Carson J. and Nowak B.F. 2011.** Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 315: 201–206.

- Craig A., Shoemaker C.A., Benjamin R., LaFrentz R. and Julio C. 2017.** Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated? *Aquaculture*, 468(1): 193–198.
- Cronstein B.N. 2007.** Interleukin-6. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65: 47–53.
- Deshmukh S., Kania P.W., Chettri J.K., Skov J., Bojesen A.M., Dalsgaard I. and Buchmann K. 2013.** Insight from molecular, pathological, and immunohistochemical studies on cellular and humoral mechanisms responsible for vaccine-induced protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(10): 1623–1641.
- Eldar A. and Ghittino C. 1999.** *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Similar, but different diseases. *Disease of Aquatic Organism*, 36(3): 227–231.
- Esteve-Gassent M.D., Fouz B. and Amaro C. 2004.** Efficacy of a bivalent vaccine against diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. *Fish and Shellfish Immunology*, 16: 93–105.
- Faghani T., Azari Takami G., Kousha A. and Faghani S. 2008.** Surveying on alginic acid and anti-*Streptococcus* vaccine effects on the growth performance, survival rate, hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Journal of Zoology*, 3(2): 54–58.
- FAO. 2017.** Yearbook of Fisheries and Aquaculture Statistics 2015. FAO Publication, Italy. 237P.
- Greenway T.E., Byars T.S., Elliot R.B. 2017.** Validation of fermentation and processing procedures for the commercial-scale production of a live, attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccine for use in channel catfish aquaculture. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29(2): 83–88.
- Gudding R., Lillehaug A. and Evensen Y. 2014.** Fish Vaccination. Wiley and Sons Ltd, UK. 587P.
- Halimi M., Alishahi M., Abbaspour M.R., Ghorbanpoor M. and 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.
- Hirano T. 1998.** Interleukin 6 and its receptor: Ten years later.

- International Reviews of Immunology, 16(3-4): 249–284.
- Hordvik I. 2015.** Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Biomolecules, 5(1): 166–177.
- Hoshina T., Sano T. and Morimoto Y. 1958.** A *Streptococcus* pathogenic to fish. Journal of the Tokyo University of Fisheries, 44(5): 175–184.
- Huang H.Y., Chena Y.C., Wang P.C., Tsai M.A., Yeh S.C., Liang H.J. and Chena S.C. 2014.** Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper *Epinephelus coioides* by intraperitoneal immunization. Vaccine, 32(51): 7014–7020.
- Ismail M.S., Siti-Zahrah A., Syafiq M.R.M., Amal M.N.A., Firdaus-Nawi M. and Zamri-Saad M. 2016.** Feed-based vaccination regime against streptococcosis in red tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*. BMC Veterinary Research, 12(1): 194–210.
- Kadowaki T., Yasui Y., Nishimiya O., Takahashi Y., Kohchi C., Soma G.I. and Inagawa H. 2013.** Orally administered LPS enhances head kidney macrophage activation with down-regulation of IL-6 in common carp (*Cyprinus carpio*), Fish Shellfish Immunol. 34(6) () 1569-1575.
- 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: 237–46.
- Kumar G., Abd-Elfattah A. and El-Matbouli M. 2015.** Identification of differentially expressed genes of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). Parasitology Research, 114(3): 929–939.
- Liu H., Zhang S., Shen Z., Ren G., Liu L., Ma Y., Zhang Y. and Wang W. 2016.** Development of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in fish based on truncated cell wall surface anchor proteins. Veterinary Research, 179: 1036–1092.
- Lovoll M., Fischer U., Mathisen G.S., Bøgdal J., Ototake M. and Dalmo R.A. 2007.** The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription. Veterinary Immunology and Immunopathology, 117(3): 284–295.

- Pridgeon J.W. and Klesius P.H. 2011.** Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccine*, 29(35): 5986–5993.
- Racine R. and Winslow G.M. 2009.** IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunology Letters*, 125(2): 79–85.
- Raida M.K. and Buchmann K. 2008.** Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26(8): 1050–1062.
- Romalde J.L., Luzardo-Alvarez A., Ravelo C., Toranzo A.E. and Blanco-Mendez J. 2004.** Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*, 236(1): 119–129.
- Rombout J.H.W., Yang G. and Kiron V. 2014.** Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(2): 634–643.
- Sakai M., Otubo T., Atsuta S. and Kobayashi M. 1993.** Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases*, 16: 239–247.
- Shelby R.A., Shoemaker C.A. and Klesius P.H. 2004.** Development of and ELISA to measure the humoral immune response of hybrid striped bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis* to *Streptococcus iniae*. *Aquatic Animal Research*, 35: 997–1001.
- Smith P.D. 2002.** Oral delivery technologies to develop and implement effective life-long protection strategies. Workshop on Fish Vaccination. Wageningen Institute of Animal Science (WAIS), Netherlands. P: 78–80.
- Soltani M., Alishahi M., Mirzargar S. and Nikbakht G. 2007.** Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: Comparison of different routes of administration and different vaccines. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 7: 129–140.
- Soltani M., Pirali Kheirabadi E., Taheri Mirghaed A., Zargar A., Mohamadian S., Roohollahi S. and Zakian M. 2016.** Study on streptococcosis and lactococcosis outbreaks in rainbow trout farms in Fars and Lorestan Provinces. *Journal of Veterinary Microbiology*, 30: 49–58.
- Wang E., Wang K., Chen D., Wang J., He Y., Long B., Yang Q., Geng Y., Huang X. and Ouyang P. 2015.** Evaluation and selection

of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection. International Journal of Molecular Sciences, 16(5): 9998–10015.

Wang T. and Secombes C.J. 2009.
Identification and expression

analysis of two fish-specific IL-6 cytokine family members, the ciliary neurotrophic factor (CNTF)-like and M17 genes, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Molecular Immunology, 46(11): 2290–2298.



Research Paper

Effect of three administration routes of streptococosis/lactococosis Bacterin on specific immunity and expression of IgM and IL-6 genes in rainbow trout

Mojtaba Alishahi^{1,2*}, Mostafa Halimi³, Masoud Ghorbanpour⁴,
Mohammad Reza Tabandeh⁵

Received: March 2019

Accepted: June 2019

Abstract

In this study the effect of streptococosis/lactococosis bacterin administrated via oral, bath and intraperitoneal routes on the expression of two immune related genes (IgM and IL-6) was investigated. 600 fish (14±2.1g) were randomly divided into 4 groups in triplicates. Group 1 was vaccinated via oral route using 10⁸CFU bacterial cell (*Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*) in each gram of food. Group 2 was injected with 0.1mL of 10⁹CFU/mL bacterin. Group 3 was vaccinated via immersion route for 2 minutes in 10⁹CFU/mL. Group 4 was none immunized group without vaccination. Fish were reared for two months in a similar situation. At days of 0, 20, 40 and 60, antibody titer against both bacteria was performed by ELISA method and expression of IL-6 and IgM genes were evaluated through qRT-PCR method. Then fishes were exposed to *S. iniae* and *L. garvieae* separately at the end of the experiment and the rate of mortality was compared among the groups. The results showed that the rate of mortality in exposed fish to *S. iniae* in injection, oral, immersion and unvaccinated routes were 20±10, 56.3±10, 50±5.67 and 90±3.67 whereas in exposed fish to *L. garvieae* were 26.67±5.77, 57.7±10, 43.33±5.67 and 90± 4.63 respectively. The antibody titer in the vaccine injection group was increased compared to the control (P<0.05). Expression of IL-6 and IgM in vaccinated groups was significantly increased compared to control group (P<0.05) with the highest rate in the injection group. It can be concluded that although injection route causes the best protection, antibody titer and expression of immune genes, oral and immersion routes could also induce relative protection and immunogenicity in rainbow trout and each route possesses some priority over other routes then further research on efficacy improvement of each route can be recommended.

Key words: *Streptococosis/Lactococosis Bacterin, Administration Routes, Vaccine Efficacy, IL-6, IgM, Rainbow Trout.*

1- Professor in Department of Clinical Sciences, Veterinary Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2- Professor, Excellence Center of Warm Water Fish Health and Diseases, Ahvaz, Iran.

3- Ph.D. Student in Aquatic Animal Health, Veterinary Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

4- Professor in Department of Pathobiology, Veterinary Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

5- Associate Professor in Department of Basic Sciences, Veterinary Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding Author: alishahimoj@gmail.com