16(1) 129-142, Spring 2024

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effects of anti-Streptococcosis vaccine by bath method on the levels of cortisol and lactate dehydrogenase (LDH) and the expression of immune-related genes in Asian seabass (*Lates calcarifer*)

Siamak Yousefi Siahkalroodi [1], Ahmad Ghasemi [2], Parastoo Mohebi derakhsh [3], Mahyar Yousefi Siahkalroodi [*4], Taregh Jamil Neameh [5]

[1] *Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran*
[2] *Department of Fisheries and Marine Biology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran*
[3] *Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization, Tehran, Iran*
[4] *Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[5] *Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

Key Words

Vaccine
Streptococcosis
Asian seabass
Cortisol
Lactate dehydrogenase
Gene expression

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the effects of immersion vaccine (Garovak) against streptococcosis and lactococcosis in different weights on the growth, feeding and survival rates of Asian seabass (*Lates calcarifer*).

Materials and Methods: Fish with an average weight of 5 gr were studied in 300-liter round polyethylene tanks in 2 treatments and 3 repetitions, including the vaccinated treatments at a weight of 5 grams (ST) and the control group without vaccination. Feeding was done twice a day until satiety for 8 weeks.

Results: The results related to the bacterial challenge showed that the death rate in the vaccinated treatment was significantly lower than the control group ($P<0.05$). According to the general results of this study, the administration of Garovak immersion vaccine has been able to improve the survival rate after bacterial challenge in Asian seabass weighing 5 grams. In the statistical analysis of the results of the present study using SPSS software tests, the expression of genes related to immunity using Real-time (RT)-PCR, which has a significant difference in the gene expression of treatment samples was observed with control samples. Also, the average levels of cortisol and lactate dehydrogenase (LDH) enzymes in the tested treatments were 107 ng/g and 1279 u/kg, which had no significant difference with the control group. Also, in the statistical analysis, no significant difference was observed between gene expression data (Lysozymes, TNF, MHCI, and IGF-I). But in 1L-IB and MHCII, was seen significant difference between treatments and controls. However, the average gene expression (Lysozymes, 1L-IB, TNF, MHCI, MHCII and IGF-I) in the vaccinated treatment was higher than the average values of the control treatment.

Conclusion: The results obtained in the current study showed that the vaccine had a better effect on the health of Asian sea bass weighing 5 gr. According to the general results of this study, the vaccine has been able to have a positive effect on fish health indicators, but on cortisol and lactate dehydrogenase enzymes (LDH) and also gene expression (Lysozymes, TNF, MHCI, and IGF-I) had no significant effect. The results obtained in the current study showed that the vaccine had a better effect on the health of Asian sea bass weighing 5 grams. But it had no significant effect on the levels of cortisol and lactate dehydrogenase (LDH). While it had a significant effect on MHC1 and interleukin 1B gene expression.

* Corresponding Author's email: mahyaryousefi98@gmail.com
Received: 31 December 2022; Reviewed: 31 January 2023; Revised: 2 April 2023; Accepted: 5 May 2023
(DOI): 10.22034/AEJ.2024.453286.3123

مقاله پژوهشی

اثرات واکسن ضداستریپتوکوکوزیس به‌روش حمام بر سطوح کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و بیان ژن‌های وابسته به ایمنی در ماهی سی‌باس آسیایی

سیامک یوسفی سیاه‌کلرودی[۱]، احمد قاسمی[۲]، پرستو محبی‌درخش[۳]، مهیار یوسفی سیاه‌کلرودی[۴]، طارق جمیل نعمه[۵]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

[۲] گروه شیلات و زیست شناسی دریا، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

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

[۴] دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۵] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

واکسن
استریپتوکوکوزیس
ماهی سی‌باس آسیایی
کورتیزول
لاکتات دی هیدروژناز
بیان ژن

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی اثرات واکسن غوطه‌وری علیه بیماری‌های استریپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس (گاروواک) در وزن‌های مختلف بر شاخص‌های رشد، تغذیه و میزان بازماندگی ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) بود.

مواد و روش: ماهیان با میانگین وزنی ۵ گرم در مخازن مدور ۳۰۰ لیتری پلی اتیلنی در ۲ تیمار و ۳ تکرار شامل تیمارهای واکسینه شده در وزن ۵ گرم (ST) و گروه شاهد بدون اعمال واکسیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند. غذادهی دو بار در روز و تا حد سیری به‌مدت ۸ هفته انجام شد.

نتایج: نتایج مربوط به چالش باکتریایی نشان داد که میزان تلفات در تیمار واکسینه شده به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کم‌تر بود (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج کلی این مطالعه، تجویز واکسن غوطه‌وری گاروواک توانسته است در ماهی سی‌باس آسیایی با وزن ۵ گرم میزان بازماندگی بعد از چالش باکتریایی را بهبود ببخشد. در تحلیل آماری نتایج به‌دست آماده پژوهش حاضر با استفاده از آزمون‌های نرم‌افزار SPSS، بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی با استفاده از Real-time (RT)-PCR که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن نمونه‌های تیمار با نمونه‌های شاهد مشاهده شد. هم‌چنین میانگین سطوح آنزیم‌های کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در تیمارهای مورد آزمایش ۱۰۷ ng/g و ۱۲۷۹ u/kg که اختلاف‌معنی‌داری با گروه‌شاهد نداشت. هم‌چنین در بررسی آماری بین داده‌های بیان ژنی(Lysozymes،lL-IB،TNF،MHCI، MHCII و IGF-I) اختلاف‌معنی‌داری مشاهده نشد. هرچند میانگین بیان ژنی (Lysozymes،lL-IB،TNF،MHCI، MHCII و IGF-I) در تیمار واکسینه شده بالاتر ازمیانگین مقادیر تیمار شاهد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده در پژوهش کنونی نشان دادواکسن، تأثیر بهتری برسلامت سی‌باس آسیای در وزن ۵ گرم داشته است. ولی بر روی سطوح کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز (LDH) اثر معنی‌داری نداشت. درحالی‌که بر روی بیان ژنی MHC1 و اینترلوکین 1B تاثیر معنی‌داری داشت.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mahyaryousefi98@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۰ دی ۱۴۰۱؛ تاریخ داوری: ۱۱ بهمن ۱۴۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۱۳ فروردین ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۵ اردیبهشت ۱۴۰۲
(DOI): 10.22034/AEJ.2024.453286.3123

مقدمه

نقش آبزی‌پروری در تامین پروتئین مورد نیاز جمعیت در حال توسعه جهان بسیار چشمگیر است و فائو از این صنعت به‌عنوان مناسب‌ترین گزینه برای تامین پروتئین ارزان برای جمعیت آینده جهان یاد کرده است (۱). امروزه ماهی و سایر آبزیان از منظر توسعه پایدار مورد توجه قرار دارد و از آبزی‌پروری می‌توان به‌عنوان عاملی که می‌تواند موجب توسعه اقتصادی و اجتماعی یک کشور شود نام برد. در آبزی‌پروری، با دیدگاه مدیریتی کلان، استفاده بهینه از منابع آبی از اولویت‌های این بخش محسوب می‌شود و لزوم حفظ منابع محدود، هم از منظر زیستی و هم از لحاظ گسترش آبزی‌پروری در آینده از اهمیت خاصی برخوردار است. در کشور نیز سیاست‌های دولت در برنامه توسعه ششم توسعه بر پرورش ماهی در قفس‌های پرورشی دریایی در جنوب و شمال کشور متمرکز شده‌است. بررسی‌های ابتدایی روی گونه‌های مختلف ماهی دریایی قابل پرورش در کشور منجر به معرفی ماهی باس آسیایی شد (۲). ماهی باس آسیایی با نام علمی (*Lates calcarifer*) که در آسیا به نام باس دریایی (سی‌باس) و در استرالیا به نام بارامونده شناخته می‌شود یکی از اعضا بزرگ خانواده Latidae است که قادر به تحمل محدوده شوری بالا (Euryhaline) می‌باشد. این گونه از گونه‌های پرورشی مهم در بسیاری از کشورها به ویژه استرالیا و جنوب‌شرق آسیاست که با توجه به قیمت مناسب جهانی، سرعت رشد مناسب و مقاومت بالا در برابر عوامل بیماری‌زا و قابلیت تحمل دامنه وسیعی از شوری‌های بالا تا پایین مورد توجه واقع شده است (۳). این گونه علاوه بر این‌که قابلیت پرورش در قفس‌های دریایی را دارد، قابلیت پرورش در سیستم استخرهای خاکی را دارا می‌باشد (۴). طبق گزارش فائو از کل تولید ماهیان دریایی ۲۶۷ هزار تن مربوط به سی‌باس آسیایی بوده که این نکته بیانگر بازارپسندی این ماهی در دنیا می‌باشد (۵). متخصصین بروز و شیوع برخی بیماری‌ها ازجمله بیماری استرپتوکووزیس در ماهی باس دریایی آسیایی را ناشی از درجه حرارت بالا می‌دانند (۶). بنابراین با توجه به درجه حرات بالایی که در فصل تابستان در منطقه خلیج فارس شاهد آن هستیم این بیماری به‌عنوان یک عامل خطرساز و تهدید کننده پرورش ماهی باس دریایی آسیایی می‌تواند مطرح باشد. بیماری استرپتوکوکوزیس یک بیماری جدی و مهم در ماهی باس آسیایی دریایی و سایر گونه‌های ماهیان دریایی می‌باشد. این بیماری از ۲۰ سال پیش به‌عنوان مهم‌ترین بیماری باکتریایی ماهی باس دریایی آسیایی گزارش شده است که در دمای بالا تهدیدکننده سلامت ماهی است (۷). یکی از راه‌های معمول مبارزه با بیماری‌های باکتریایی در صنعت پرورش ماهیان دریایی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از روش‌های سنتی و معمول مبارزه با بیماری‌های باکتریایی در آبزیان است (۸، ۹)، ولی تمایل به حذف آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌علت هزینه بالا، ایجاد مقاومت‌های دارویی، مشکلات زیست‌محیطی، پایین آوردن کیفیت گوشت و مشکلات اجرایی تجویز، باعث شده واکسیناسیون به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها، بیش‌تر مورد توجه قرار گیرند (۸). با توجه به آلودگی‌های توام بیماری‌های باکتریایی، به‌کارگیری واکسن پلی‌والان از جهات مختلف نسبت به واکسن مونووالان (تک واحدی) ارجحیت دارد. نکته حائز اهمیت این‌که واکسن‌ها باعث حفاظت میزبان بر علیه پاتوژن و عوامل بیماری‌زایی خاص می‌شوند که می‌توان با تست چالش مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد؛ از سویی دیگر چون واکسن باعث بهبود روند وضعیت سلامت ماهی می‌شود و یکی از مهم‌ترین شاخص‌های سلامت ماهی عملکرد رشد و تغذیه می‌باشد می‌توان با ارزیابی دقیق عملکرد رشد و تغذیه به وضعیت سلامت ماهی پی برد. لذا در این تحقیق واکسن ۳ ظرفیتی استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس تولیده شده توسط شرکت بوژان با نام تجاری گارووواک و براساس پروتکل تجاری شرکت در وزن ۵ گرم به‌صورت غوطه‌وری مورد استفاده قرار گرفت تا مناسب‌ترین وزن جهت واکسیناسیون بچه‌ماهی سی‌باس آسیایی معرفی گردد. هم‌چنین کارایی واکسن با تست چالش بر علیه استرپتوکوکوزیس (سویه استرپتوکوکوس اینیایی تهیه شده توسط شرکت بوژان) مورد سنجش قرار گرفت و علاوه بر آن تاثیرات واکسن بر عملکرد رشد و تغذیه و بازماندگی بچه‌ماهی سی‌باس آسیایی نیز ارزیابی شد مطالعات گسترده‌ای درخصوص اثرات واکسن بر آبزیان انجام شده است ازجمله ارزیابی عملکرد واکسن آنتی‌یرسین در بچه‌ماهیان رنگین‌کمان (۱۰)، اثرات واکسن تک و دوگانه برعلیه استروپتوکوزیس اینیه و ویبریو هاروی به‌صورت تزریقی و غوطه‌وری بر عملکرد رشد، فاکتورهای رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی سرم، فعالیت‌های گوارشی و دفاع آنتی‌اکسیدانی در بچه‌ماهیان سی‌باس آسیایی (۱۱)، Alishahi و همکاران (۱۲) پاسخ پادتن سرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان به واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس میزان بقاء نسبی در تیمار واکسینه چالش شده با استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه را بررسی کردند.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها: روش تحقیق مورد استفاده در این پژوهش از نوع کمی و نیمه‌تجربی می‌باشد. از این‌رو در ابتدا به بررسی تحقیقات صورت گرفته در زمینه اثرات واکسن بر ماهی سی‌باس آسیایی با تاکید بر سطوح کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز (LHD) و بیان ژن‌های وابسته به ایمنی در بچه‌ماهیان واکسینه شده و مقایسه

آن‌ها با گروه شاهد به‌صورت جداگانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه مراحل عملی و اجرایی این تحقیق در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس به انجام رسید. ایستگاه دارای امکانات کافی جهت اجرای آزمایش‌ها از قبیل سالن سرپوشیده، سیستم فیلتراسیون، مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری، مخازن ۴ تنی، مخازن ذخیره آب و امکانات دیگر بود. هم‌چنین مراحل انجام چالش باکتریایی در اتاق چالش ایستگاه تحقیقات آبزیان دریایی پژوهشکده خلیج‌فارس انجام گردید. قبل از شروع آزمایش کلیه مخازن با مواد ضدعفونی‌کننده و آب‌شیرین شسته و ضدعفونی شدند. ۱۲۰ قطعه ماهی با میانگین وزن ۵ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی راموز واقع در شهرستان تنگستان استان بوشهر خریداری شده و از طریق ماشین‌های مخصوص حمل به ایستگاه دانشگاه خلیج‌فارس منتقل شدند و پس از سازگاری با دما و شوری با آب سالن در مخازن ۴۰۰۰ لیتری قرار گرفتند. ماهی‌ها در ابتدا به‌مدت ۱۴ روز در مخازن ذخیره (به حجم ۴ مترمکعب) برای تأیید سلامت و سازگاری به شرایط آزمایش و غذادهی نگه‌داری شدند. در این مدت بچه‌ماهیان به‌وسیله غذای کنسانتره (پلت خشک) مخصوص سی‌باس (ساخته شده توسط شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء استان فارس با مشخصات: ۵۰ درصد پروتئین، ۱۶ درصد چربی، ۱۴ درصد خاکستر، ۱۰ درصد رطوبت، ۲/۵ درصد فیبر) در دو مرحله و در ساعت‌های ۸ و ۱۶ تا حد سیری تغذیه شدند. در این آزمایش از ۱۲ مخزن گرد پایه‌دار ۳۰۰ لیتری استفاده گردید. حجم آب موجود در مخازن در طول مدت آزمایش ۲۰۰ لیتر بود. هر مخزن با استفاده از یک سنگ هوا، هوادهی شد. سیستم خروجی آن‌ها طوری طراحی گردید که حجم و ارتفاع آب در تمام مخازن یکسان و قابل کنترل بود. در طی این دوره آزمایشی غذادهی ۲ بار در روی صورت گرفته و هر روز ۵۰ درصد آب مورد استفاده نیز سیفون خواهد شد. برای تأمین منبع آب‌شور مورد نیاز تحقیق از آب خلیج‌فارس پس از طی مراحل فیلتراسیون (رسوب‌گیری، کلرزنی، فیلترشنی) استفاده شد. مخازن در محیط سرپوشیده سوله قرار داشتند و به‌صورت کاملاً تصادفی بین تیمارها تقسیم شدند. دوره نوری در زمان انجام تحقیق به‌صورت طبیعی استفاده گردید و بین ۱۲-۱۰ ساعت روشنایی و ۱۲-۱۰ ساعت تاریکی متغیر بود. در شروع آزمایش ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت قبل از انتقال به تیمارها غذادهی قطع شده و بعد از انجام عملیات زیست‌سنجی (اندازه‌گیری وزن و طول اولیه)، بچه‌ماهیان در یک طرح کاملاً تصادفی و در ۲ تیمار با ۳ تکرار در هر مخزن توزیع شدند (عدم اختلاف معنی‌داری از لحاظ طولی و وزنی بین مخازن آزمایشی). جهت بررسی آنزیم‌ها و بیان ژنی به‌مدت ۸ هفته مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارهای آزمایش به قرار زیر می‌باشند (۱۳): ۱- تیمار با وزن ۵ گرم ایمن شده با واکسن سه ظرفیتی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گارووا‌ک شرکت تک ژن زیست حاوی اسپورهای مقاوم به حرارت: باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) و باسیلوس لیکنی فورمیس (*Bacillus licheniformis*) به‌روش غوطه‌وری (ST). ۲- تیمار شاهد وزن ۵ گرم بدون استفاده از واکسن. در مرحله اول ایمن‌سازی (روز ۰) و در مرحله دوم ایمن سازی (روز ۲۸)، در تیمارهای غوطه‌وری واکسن به نسبت ۱ به ۱۰ در آب رقیق گردید و ماهیان به‌مدت ۲-۱ دقیقه در غلظت 10^9 باکتری در میلی‌لیتر باکتری در سوسپانسیون واکسن غوطه‌ور شدند (طبق پروتکل واکسن). در گروه‌های شاهد در روز ۰ و در روز ۲۸ واکسیناسیون صورت نگرفت. سطوح شوری با استفاده از دستگاه شوری‌سنج (WTW مدل U10) اندازه‌گیری شد. دمای آب روزانه با دماسنج جیوه‌ای و pH آب یک‌بار در هفته با دستگاه pH متر (WTW مدل B3223/set) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین اکسیژن با اکسیژن‌متر (WTW مدل oxi320/set) در طول مدت آزمایش به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری و به‌ترتیب ۴۰ گرم در لیتر، ۲۶/۵±۱ °C، ۷/۷۳±۰/۴ و ۶/۸±۰/۴ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد. باکتری استرپتوکوکوس اینیائی لیوفیلیزه مورد استفاده از دانشگاه کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان در شرایط مناسب به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده خلیج فارس انتقال یافت. پس از انتقال، باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) کشت داده شد. سپس محیط سانتریفوژ شده و قسمت سطحی جدا گردید. قسمت زیرین دوباره در بافر فسفات معلق‌سازی شد تا با استفاده از لوله مک فارلند رقت 10^7 CFU/ml به‌دست بیاید. برای ارزیابی کارایی واکسن‌ها بعداز ۸ هفته از واکسیناسیون، تیمارهای واکسینه شده با باکتری استرپتوکوکوس اینیه به‌میزان دوز ایجادکننده ۵۰٪ تلفات (به‌دست آمده در تحقیقات قبلی 10^7)، به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفاقی، مورد تزریق قرار گرفتند. هم‌زمان گروه شاهد (غیرواکسینه) نیز با LC_{50} باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. در طی دوره چالش، روزانه ماهی‌ها با علائم کلینیکی بیماری کنترل و میزان تلفات در طی ۱۰ روز ثبت و مورد سنجش قرار گرفت. پس از واکسیناسیون از همه ماهی‌های تازه مرده نمونه بافت تهیه شد تا جهت بررسی سطوح کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز و هم‌چنین بیان ژن‌های فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TNF-α) و اینترلوکین-۱ به‌عنوان دو ژن مهم واسطه ایمنی مورد استفاده قرار گیرد. کورتیزول موجود در بافت کبد نمونه‌های بچه‌ماهی مطابق روش Poursaeid و همکاران، استخراج شد (۱۴). به‌طور خلاصه پس از نمونه‌برداری، بچه‌ماهیان با محلول بافرفسفات (pH=۷/۲, ۰/۱ M) سرد توسط دستگاه هموژنایزر (T 10 basic Ultra turrax, IKA,Germany) هموژن گردیدند. به‌منظور استخراج کورتیزول از درون بافت به ۳۰۰ µl بافت هموژن شده محلول دی‌اتیل‌اتر اضافه گردید. پس از نگه‌داری

در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه فاز رویی جمع‌آوری شد. بعد از تبخیر، به عصاره خشک‌شده تتراکلروکربن و محلول بافر فسفات اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها (۱۵۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه)، لایه رویی که حاوی هورمون کورتیزول بود جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. غلظت کورتیزول موجود در بافت با روش ELISA اندازه‌گیری شد. به‌منظور سنجش میزان فعالیت بافت کبد بچه‌ماهیان توسط دستگاه هموژنایزر در محلول بافر فسفات (pH =۷/۲ ,۰/۱M) همگن شد. پس از سانتریفیوژ و جداکردن مایع رویی، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. برای اندازه‌گیری از روش DGKC (کینیتیک فوتومتری) استفاده شد. برای اندازه‌گیری LDH از معرف‌های حاوی بافر فسفات (pH=۷/۲) پیرواتو کلرید سدیم (معرف اول) و NADH (معرف دوم) با نسبت ۱ (معرف اول) به ۴ (معرف دوم) استفاده گردید. ابتدا جذب دستگاه توسط آب مقطر به‌عنوان بلانک صفر شد و پس از گذشت یک دقیقه جذب نمونه‌ها خوانده شد (جذب اولیه در زمان صفر دقیقه). سپس در فواصل یک دقیقه به‌مدت ۳ دقیقه جذب نمونه خوانده شد و اختلاف جذب در هر دقیقه و میانگین آن محاسبه گردید. کیت تشخیص کمی LDH (شرکت پارس‌آزمون، تهران، ایران). جهت تغییرات جذب نوری ۰/۱۵ در دقیقه طراحی شده چون که مقدار تغییرات جذب نوری بیش از ۰/۱۵ در دقیقه بود. نمونه به نسبت ۱ به‌علاوه ۱۰ با سرم فیزیولوژی رقیق و جواب آزمایش در عدد ۱۱ ضرب شد (۱۵).

استخراج RNA: RNA از کبد، طحال و کلیه با استفاده از کیت High Pure RNA Tissue (شرکت Roche) استخراج شد. ۴۰۰µl محلول بافر Lysis/Binding به قطعه‌ای از بافت کبد منجمد شده در ازت مایع با وزن حدود mg ۲۵ افزوده و با استفاده از دستگاه هموژنایزر به‌صورت پودر یک‌دست (هموژن) درآمد. مخلوط فوق به‌مدت ۲ دقیقه با دور g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز آبی (محلول بالایی) به لوله جدید (میکروتیوپ استریل ۱/۵ میکرولیتری) منتقل و در ۲۰۰ میکرولیتر، اتانول مطلق به آن اضافه کرده و خوب مخلوط گردید. پس از قراردادن فیلتر مخصوص در داخل لوله جمع‌آوری کننده (مختص کیت)، کل محلول به داخل فیلتر منتقل شده و ۳۰ ثانیه با دور g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع داخل لوله جمع‌کننده خارج شده و پس از قرار دادن مجدد فیلتر مخصوص در لوله جمع‌کننده، ۱۰۰ میکرولیتر محلول DNase (شامل ۹۰ میکرولیتر محلول DNase Incubation Buffer به‌علاوه ۱۰ میکرولیتر آنزیم DNase I) داخل فیلتر افزوده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵°C-۱۵) قرار داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی (I) به آن اضافه کرده و به‌مدت ۱۵ ثانیه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع داخل لوله جمع کننده را دور ریخته و پس از قرار دادن مجدد فیلتر مخصوص در لوله جمع‌کننده، ۵۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی (II) به آن اضافه کرده و به‌مدت ۱۵ ثانیه با g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع داخل لوله جمع‌کننده را دور ریخته و پس از قرار دادن مجدد فیلتر مخصوص در لوله جمع‌کننده، ۳۰۰ میکرولیتر شستشوی (II) به‌آن اضافه کرده و به‌مدت ۲ دقیقه با g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فیلتر در داخل یک میکروتیوپ استریل ۱/۵ میکرولیتری قرار داده شد و ۵۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر محلول حل کننده به آن افزوده و به‌مدت ۱ دقیقه با دور g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول داخل میکروتیوپ حاوی RNA استخراج شده است. برای ارزیابی کمیت و کیفیت از ژل اگارز یک درصد و اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ استفاده گردید (۱۶). جهت تهیه ژل آگارز ۱٪، ۱ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TAE با استفاده از حرارت حل شد. پس از سرد شدن ژل، ۵ میکرولیتر از RNA در ترکیب با ۲ میکرولیتر رنگ (6X DNA loading dye) بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری گردید و در یکی از چاهک‌ها نیز ۲ میکرولیتر نشانگر DNA (GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder) بارگذاری شد. برای رنگ‌آمیزی، ژل آگارز به‌مدت ۱۰ دقیقه درون ظرفی که غلظت اتیدیوم بروماید در آن ۰/۵ mg/ml ید، قرار داده شد. پس از شستشوی ژل با استفاده از آب مقطر، ژل داخل محفظه دستگاه مستندساز UV، با طول موج ۲۶۰ nm جهت مشاهده و عکس‌برداری قرار داده شد (۱۶). پس از انجام تیمار حذف DNAهای احتمالی از RNA به‌دست آمده با استفاده از دئوکسی ریبونوکلئاز DNase، سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis سیناژن و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. cDNA توسط آنزیم رونوشت برداری M-MuLV و Oligo (dT) یا Random hexamer به‌عنوان پرایمر، طبق روش استاندارد و در دو مرحله متوالی ساخته شد: مخلوطی شامل یک میکروگرم RNA، ۱۰ پیکومول Oligo (dT) در حجم ۷ میکرولیتر در یک میکرتیوپ استریل روی یخ آماده شد. پس از سانتریفیوژ کوتاه، میکروتیوپ به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰°c قرار داده شد. سپس میکرتیوپ روی یخ قرار داده شد و ۲ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر RNAase inhibitor، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط نوکلئوتیدها و ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV اضافه شد. مخلوط حاصل برای مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲°c قرار داده شد. واکنش با استفاده از تیمار نمونه در درجه حرارت ۷۰°c به‌مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. cDNA ساخته شده به‌عنوان الگو در واکنش‌های PCR استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. در روش استفاده از Random hexamer مخلوطی شامل یک میکروگرم RNA، ۲۰ پیکومول Oligo (dT) در حجم ۷ میکرولیتر در یک میکرتیوپ استریل روی یخ آماده شد. پس از سانتریفیوژ کوتاه، میکروتیوپ به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰°c قرار داده شد. سپس میکرتیوپ

روی یخ قرار داده شد و ۲ میکرولیتر بافر، ۱میکرولیتر RNAase inhibitor، ۲۰۰ میکرومولار نوکلئوتیدو ۱میکرولیتر آنزیم M-MuLV اضافه شد. مخلوط حاصل برای مدت۲۰ دقیقه در ۲۰°c و سپس ۶۰ دقیقه در ۴۲°c قرار داده شد. واکنش با استفاده از تیمار نمونه در درجه حرارت ۷۰°c به‌مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. cDNA ساخته شده به‌عنوان الگو در واکنش‌های PCR استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

اندازه‌گیری بیان ژن با واکنش RT-PCR: به‌منظور ارزیابی بیان ژن‌های موردنظر در کبد و کلیه از روش PCR در زمان حقیقی و روش مقایسه‌ای Ct ΔΔ انجام شد. روش آزمون بر پایه کاربرد رنگ سایبرگرین استوار بود. در این مطالعه از ژن βactin ماهی سی‌باس به‌عنوان کنترل داخلی استفاده و بیان ژن‌های دیگر در بافت‌های مورد مطالعه با توجه به بیان ثابت این ژن ارزیابی گردید. برای هر نمونه سه تکرار و نمونه‌های کنترل منفی فاقد cDNA در هر واکنش در نظر گرفته شد. خصوصیات و توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن در جدول ۱ آمده است. در این روش از آغازگرهای مخصوص به‌روش PCR در زمان حقیقی جهت ارزیابی بیان ژن‌ها استفاده گردید، که لیست توالی این آغازگرها و در جدول ۱ ارایه شده است. ترکیبات مواد (Mastermix green Amplicon) مخصوص واکنش PCR در زمان حقیقی به‌ترتیب در استریپ‌های مخصوص ۰/۲ میلی‌لیتری درپوش‌دار اضافه شد و برنامه دستگاه جهت واکنش با شرایط چرخه شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه، و منحنی ذوب به‌مدت ۳۰ دقیقه بود. میزان بیان ژن با روش ΔΔCT محاسبه گردید (۱۷).

جدول ۱: اسامی ژن‌ها، توالی و کددسترسی در ژن بانک و اندازه قطعه مورد نظر در واکنش PCR در زمان واقعی

ژن	شماره دسترسی بانک ژن	توالی آغازگرها (جلو/معکوس)	جفت باز	کارایی (درصد)
TNF	XM_018699809	AAGGACTCCGCTGAGAAAAC TGAACGATGCCTGGCTGTA	۲۴۱	۹۴
MHC I	OP348944.1	F: TTTGGTTGTGAGTGGGACAA R: TGCCTGTGTGATCAAAGCTC	۱۷۷	۹۵
MHC II	XM_018672853.2	F GCTGGAGTTTGAGCTTGGTC R CAGTTTGGGCAGATCCCTTA	۲۵۰	۹۲
IGF-1	XM_018697285.1	F: ACGCTGCAGTTTGTATGTGG R: CCTTAGTCTTGGGAGGTGCA	۱۵۷	۹۸
Lysozyme	XM_018667849.1	F: GGTGTTTCTGCTCTTGGTGG R: GCCGTAGTCAGTGGATCCAT	۱۹۶	۹۹
IL-1β	XM_018669006.1	F: CCTGTCGCATTTCAGTACGG R: ATTTCCACCGGCTTGTTGTC	۱۴۷	۹۵
18SrRNA	XR_007812784.1	F: TGGTTAATTCCGATAACGAACGA R: CGCCACTTGTCCCTCTAAGAA	۹۴	۹۴

ارزیابی مقایسه کارآیی تکثیر ژن کنترل داخلی و ژن‌های مورد مطالعه: با توجه به انتخاب روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مقایسه‌ای بیان ژن در این مطالعه، ارزیابی کارایی تکثیر ژن کنترل داخلی و ژن هدف ضروری بود. بدین‌منظور اقدام به رسم منحنی لگاریتم استاندارد مقادیر رقت‌سازی شده هرژن (log input) (و ژن Beta actin به‌عنوان کنترل داخلی) در برابر مقادیر Ct هر ژن گردید. بدین‌ترتیب که رقت‌های ۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ از cDNA کبد و آبشش تهیه گردید. بر روی نمونه‌ها واکنش PCR در زمان حقیقی مطابق آن‌چه قبلاً شرح داده شد با ۳ تکرار برای هر نمونه و در مورد هر ژن انجام و مقادیر میانگین Ct رقت‌های مختلف در ۳ بار تکرار محاسبه گردید. سپس با استفاده‌از نرم‌افزار Excel با قرار دادن مقادیر لگاریتم غلظت بر روی محور x و مقادیر Ct هر ژن بر روی محور y، نمودار XYscatter رسم و فرمول خط متناسب با فرمول y=ax+b استخراج شد و کارایی پرایمرهای هر ژن از فرمول E%=(۱۰^(۱/slope)−۱)×۱۰۰ محاسبه گردید (۱۸).

بررسی مقایسه‌ای بیان ژن: رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای کمی‌سازی داده‌های RT-PCR، مورد استفاده قرار گرفت. $2^{-\Delta\Delta CT}$ از رابطه زیر محاسبه شد:

$2^{-\Delta\Delta CT}$ group= (CTCYP–CT18s) in treated group-(CTCYP–CT18s) in control

متعادل‌سازی داده‌ها برای هر گروه آزمایشی، پس از نرمال‌سازی آن‌ها بر مبنای میزان بیان ژن کنترل داخلی از طریق محاسبه نسبت شدت بیان ژن در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد اجرا شد. به‌منظور بررسی ژن‌های ایمنی IL1 و TNF alfa، بعد از انجام نمونه‌برداری، استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت و سپس واکنش زنجیره‌ای

پلی‌مراز با استفاده از کیت سایبر شرکت بیوپارس انجام شد و در خاتمه تجزیه و تحلیل داده‌های صورت گرفته و تغییرات نسبی بیان ژن‌های TNF-alfa و IL-۱ با استفاده از روش ΔΔCt محاسبه شد (۱۷). بیان نسبی ژن‌های MHC1، اینترلوکین 1B (*interleukin*)، لیزوزیم (Lysozyme)، TNF و IGF-1 در کبد و کلیه بعد از ۴۰ روز تیمار با واکسن ارزیابی شد، ژن‌های MHC1، اینترلوکین 1B (*interleukin*)، لیزوزیم (Lysozyme)، TNF مرتبط با ایمنی و ژن IGF-I مرتبط با رشد و متابولسیم در ماهیان هستند.

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov انجام شد. سپس از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) جهت تحلیل داده‌ها و اختلاف بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن (Duncan) بررسی شد. برای آنالیز آماری نتایج این پژوهش، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و سطح خطای ۰/۰۵ استفاده شد. هم‌چنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۹ استفاده گردید.

نتایج

نتایج سطح آنزیم‌های کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز: نتایج سنجش سطح آنزیم‌های کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز به‌همراه میانگین و انحراف معیار آن‌ها در بافت کبدماهی سی‌باس آسیایی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج آماری نشان داد که میزان کورتیزل در ۲ تیمار ذکر شده اختلاف معنی‌داری ندارند (جدول ۲). آزمون‌های مشابهی برای میزان هورمون LDH انجام شد نتایج آزمون one-way ANOVA درخصوص هورمون LDH نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده وجود ندارد (جدول ۳). هم‌چنین نتایج تغییرات بیان ژنی و داده‌های مرتبط نشان داد، داده‌ها نرمال می‌باشند و اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده درخصوص بیان ژن‌های (Lysozymes،IL-IB،TNF،MHCI، MHCII و IGF-I) وجود ندارد (جداول ۴ تا ۱۵ و شکل ۱).

جدول۲: نتایج سنجش سطح آنزیم‌های کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز در بافت کبدماهی سی‌باس آسیایی

ردیف	نام تیمار	نام آنزیم	حداقل غلظت	حداکثر غلظت	میانگین± انحراف معیار
۱	شاهد	کورتیزول	۹۵ng/g	۹۷ng/g	۹۶±۱/۴۱۴۲۱۴
۲	واکسینه شده	کورتیزول	۱۰۳ng/g	۱۱۱ng/g	۱۰۷±۵/۶۵
۳	شاهد	لاکتات دهیدروژناز (LDH)	۱۱۹۷u/kg	۱۳۵۷u/kg	۲۲۳۸±۱۶۸
۴	واکسینه شده	لاکتات دهیدروژناز (LDH)	۲۱۱۹u/kg	۲۳۵۸u/kg	۱۲۷۶±۱۱۱

جدول۳: نتایج آماری One Way Anova مقایسه LDH تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده

LDH	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بین گروه‌ها	۷۵۰۱۲/۴۲۹	۹	۸۳۳۴/۷۱۴	۱/۶۱۶	۰/۳۴۰
درون گروه‌ها	۲۰۶۲۹/۰۰۰	۴	۵۱۵۷/۲۵۰		
جمع کل	۹۵۶۴۱/۴۲۹	۱۳			

جدول ۴: نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن لیزوزیم بین تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده

	کولموگروف-اسمیرنوف			شاپیرو-ویلک		
	Statistic	درجه آزادی	Sig.	Statistic	درجه آزادی	Sig.
لیزوزیم	۰/۱۹۹	۱۴	۰/۱۳۸	۰/۸۴۶	14	0/20

جدول ۵: نتایج آماری One Way Anova مقایسه ژن لیزوزیم تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده

لیزوزیم	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بین گروه‌ها	۰/۶۰۳	۱	۰/۶۰۳	۱۳۱/۴۵۶	۰/۰۰۰
درون گروه‌ها	۰/۱۱۹	۲۶	۰/۰۰۵		
جمع کل	۰/۷۲۳	۲۷			

جدول ۶: نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن IL- IB بین تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده

	کولموگروف-اسمیرنوف			شاپیرو-ویلک		
	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی
IL-IB 2	۰/۱۱۸	۱۴	۰/۲۰۰ *	۰/۹۸۳	۱۴	۰/۹۸۸

جدول ۷: نتایج آماری One Way Anova مقایسه ژن IL- IB تیمارشاهد و تیمار واکسینه شده

IL-IB	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بین گروه‌ها	۴/۶۵۰	۱	۴/۶۵۰	۲۳۲/۱۶۹	۰/۰۰۰*
درون گروه‌ها	۰/۵۲۱	۲۶	۰/۰۲۰		
جمع کل	۵/۱۷۰	۲۷			

جدول ۸: نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن TNF

	کولموگروف-اسمیرنوف			شاپیرو-ویلک		
	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی
TNF 2	۰/۲۴۸	۱۴	۰/۰۱۹	۰/۷۸۳	۱۴	۰/۰۰۳*

جدول ۹: نتایج آماری One Way Anova مقایسه ژن TNF تیمارشاهد و تیمار واکسینه شده

TNF	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بین گروه‌ها	۰/۰۸۷	۱۰	۰/۰۰۹	۰/۹۳۸	۰/۵۹۴
درون گروه‌ها	۰/۰۲۸	۳	۰/۰۰۹		
جمع کل	۰/۱۱۵	۱۳			

جدول ۱۰: نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن MCHI

	کولموگروف-اسمیرنوف			شاپیرو-ویلک		
	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی
	۰/۲۱۲	۱۴	۰/۰۸۸	۰/۸۵۸	14	۰/۰۲۸

جدول ۱۱: نتایج آماری One Way Anova مقایسه ژن MCHI تیمارشاهد و تیمار واکسینه شده

MCHI	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بین گروه‌ها	۰/۱۰۷	۱	۰/۱۰۷	۲۲/۶۰۹	۰/۰۰۰*
درون گروه‌ها	۰/۱۲۳	۲۶	۰/۰۰۵		
جمع کل	۰/۲۳۰	۲۷			

جدول ۱۲: نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن MCHII

	کولموگروف-اسمیرنوف			شاپیرو-ویلک		
	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی	Statistic	درجه آزادی
	۰/۲۱۴	۱۴	۰/۰۸۱	۰/۹۲۱	۱۴	۰/۲۲۹

جدول ۱۳: نتایج آماری One Way Anova مقایسه ژن MCHII تیمارشاهد و تیمار واکسینه شده

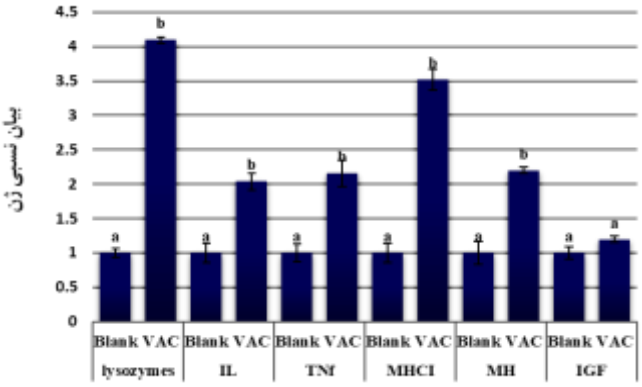
MCHII	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بین گروه‌ها	۰/۰۰۱	۱۱	۰/۰۰۰	۰/۲۰۳	۰/۹۷۰
درون گروه‌ها	۰/۰۰۱	۲	۰/۰۰۰		
جمع کل	۰/۰۰۲	۱۳			

جدول ۱۴: نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن IGFI

کولموگروف-اسمیرنوف			شاپیرو-ویلک		
Statistic	درجه آزادی		Statistic	درجه آزادی	
۰/۲۶۶	۱۴		۰/۰۰۸	۰/۷۸۳	۱۴	۰/۰۰۳

جدول ۱۵: نتایج آماری One Way Anova مقایسه ژن IGFI تیمار شاهد و تیمار واکسینه شده

IGFI	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بین گروه‌ها	۰/۰۸۶	۱۰	۰/۰۰۹	۰/۶۴۴	۰/۷۳۶
درون گروه‌ها	۰/۰۴۰	۳	۰/۰۱۳		
جمع کل	۰/۱۲۶	۱۳			



شکل ۱: نمودار تغییرات بیان نسبی ژنی نمونه‌های کبد تیمار شاهد و تیمارواکسینه شده

بحث

بیماری‌ها مهم‌ترین مانع گسترش و ثبات فعالیت‌های آبزی‌پروری در سراسر دنیا می‌باشد. اغلب پاتوژن‌های باکتریایی مسئول تلفات شدید گستره وسیعی از مراحل مختلف رشد ماهی می‌باشد (۱۹). بیماری‌های عفونی باکتریایی در آبزی‌پروری به‌طور عمده توسط میکروارگانیسم‌های گرم منفی رخ می‌دهند. با این حال در دهه‌های اخیر به‌دلایل ناشناخته بیماری‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت رو به رشد هستند و اکنون از معضلات آبزی‌پروری می‌باشند. جهت موفقیت در صنعت آبزی‌پروری یکی از پیش‌نیازها به حداقل رساندن تلفات ناشی از بیماری‌های و کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است (۲۰). 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 آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد (۲۱). کنترل بیماری‌هایی ماهی با استفاده از مواد دارویی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلاتی از قبیل توسعه باکتری‌های مقاوم در آینده، نگرانی‌هایی برای مصرف‌کننده، به‌دلیل باقی‌مانده دارویی و نیز تاثیرات محیطی دارد (۲۲). کنترل استرپتوکوکوزیس بسیار مشکل است، زیرا زمانی این بیماری آشکار می‌شود که ماهی به‌وسیله کیفیت پایین آب تحت استرس قرار گیرد. علاوه بر این، یک باکتری فراگیر و در سطح جهانی است (۲۳). درمان با مواد شیمیایی هزینه‌بردار و معمولاً بی‌تأثیر است زیرا ماهیان بیمار معمولاً از گرفتن غذا خودداری می‌کنند. روش‌های جایگزین برای کنترل بیماری‌های استرپتوکوکوزیس استفاده از واکسن‌ها می‌باشد. ماهیان دائماً در معرض عوامل استرس‌زا هم در محیط طبیعی و هم در شرایط پرورشی قرار دارند. از آن‌جایی‌که پاسخ ماهی به استرس سازگارپذیر تلقی شده است اما استرس درسیستم آبزی‌پروری به‌علت اثرات زیان‌بخش محتمل آن بر ویژگی‌های عملکرد ماهی مانند متابولیسم، رشد، مقاومت در برابر بیماری و ظرفیت تکثیر یک نگرانی محسوب می‌شود (۲۴). باتوجه به مشکلات موجود در درمان بیماری استرپتوکوکوزیس، واکسیناسیون به‌عنوان یک روش پیشگیری مناسب به‌جای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح جهان پذیرفته شده است. ماهی سی‌باس آسیایی تنها ماهی پرورشی است که در آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان در قفس‌ها پرورش می‌یابد. این ماهی بسیار خوش‌خوراک بوده و مورد استقبال مصرف‌کنندگان قرار می‌گیرد. بچه‌ماهیان سی‌باس به قفس‌ها منتقل شده و پرورش داده می‌شوند. بچه‌ماهی‌ها به محض ورود به دریا به‌دلایل مختلف از جمله استرس، نسبت به بیماری‌های گوناگون حساسیت نشان می‌دهند. یکی از بیماری‌های عمده در خلیج فارس و دریای عمان بیماری استرپتوکوکوزیس است که تلفات عمده‌ای را ایجاد می‌کند. با توجه به این‌که ماهی در محیط طبیعی و آب‌های آزاد قرار گرفته‌اند، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر تاثیر سوء بر انسان به‌دلیل باقی‌ماندن در بدن، باعث آلودگی محیط زیست نیز می‌شود. برای جلوگیری از این مشکل، واکسیناسیون راه حل اساسی به‌شمار می‌آید. کاربرد واکسن‌های کشته شده یک استراتژی است که به‌طور وسیع برای شاهد و پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی استفاده

می‌شود. واکسن‌های کشته برای تولید، نسبتاً مناسب و اقتصادی هستند و به‌دلیل داشتن آنتی‌ژن‌های زیاد می‌توانند نقش ایمنی‌زایی و حفاظتی بالایی داشته باشند. در آبزی‌پروری به‌علت این صرفه اقتصادی، واکسن‌های کشته شده با فرمالین به‌طور معمول برای حفاظت ماهی در برابر بیماری‌های باکتریایی استفاده می‌شوند (۲۵). واکسن ضد استرپتوکوکوزیس با نام تجاری گارووواک توسط شرکت دانش بنیان بوژان تک‌فارمد تهیه و به بازار عرضه‌شده است. در این تحقیق سعی شد تا تاثیر واکسن مذکور بر غلظت هورمون‌های کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز که به‌عنوان بیواندیکاتور استرس شناخته می‌شوند (۲۴) و بیان ژن‌های Lysozymes، IL-IB، TNF، MHCI، MHCII و IGF-I، مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد. کورتیزول (هیدروکورتیزون) یکی از شاخص‌های استرس است که در واکنش اولیه ماهیان به استرس درخون رهاسازی می‌شود. کورتیزول، عمده‌ترین کورتیکواستروئیدی است که از بافت بین کلیوی به‌داخل جریان خون ماهیان استخوانی آب‌شیرین و دریا ترشح می‌شود. کورتیزول هیپرگلیسمیک (بالا برنده قند خون) است و گلیکولیز (تجزیه گلیکوژن) و گلوکوژنز پروتئین‌ها و چربی‌ها را تحریک می‌کند. کورتیزول که در تنظیم اسمزی نقش دارد و به توانایی ماهی در نگه‌داری آب و الکترولیت‌های بدن کمک می‌کند. ماهیان دائماً در معرض عوامل استرس‌زا هم در محیط طبیعی و هم در شرایط پرورشی قرار دارند. از آن‌جایی که پاسخ ماهی به استرس سازگارپذیر تلقی شده است اما استرس در سیستم آبزی‌پروری به‌علت اثرات زیان‌بخش محتمل آن بر ویژگی‌های عملکرد ماهی مانند متابولیسم، رشد، مقاومت در برابر بیماری و ظرفیت تکثیر یک نگرانی محسوب می‌شود (۲۴). نتایج واکسیناسیون بچه‌ماهیان ۵ گرمی سی‌باس آسیایی نشان داد که تجویز واکسن غوطه‌وری گارووواک بر علیه بیماری استرپتوکوکوزیس توانسته است در ماهی سی‌باس آسیایی با وزن ۵ گرمی، میزان بازماندگی بعد از چالش باکتریایی را بهبود ببخشد. از سوی دیگر تفاوت معنی‌داری بین کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز بین دو گروه تیمار و شاهد وجود نداشت. در توجیه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در مطالعه حاضر می‌توان اشاره کرد که احتمالاً واکسیناسیون در روزها و هفته‌های اولیه آزمایش باعث استرس شده است اما در هفته‌های بعدی آزمایش ماهیان واکسینه شده با شرایط سازگار شده خود را به شرایط نرمال برگردانده‌اند. فاکتورهای زیادی از جمله کیفیت آب، دمای آب، مدیریت تغذیه، مدیریت پرورش و عوامل استرس‌زا در کارایی واکسن‌های مورد آزمایش تاثیرگذار هستند. نتایج مشابهی در مطالعه تاثیر عصاره زنجبیل بر برخی شاخص‌های رشد خون بیوشیمی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی عصاره زنجبیل با گروه شاهد نشان نداد (۲۶). هم‌چنین نتایج مطالعه تاثیر استرس شوری بر مقادیر هورمون کورتیزول و گلوکز ماهی کپور علفخوار انگشت‌قد نشان داد که با افزایش شوری سطح هورمون کورتیزول و گلوکز افزایش معنی‌داری داشت که نشانگر واکنش فیزیولوژیکی ماهیان به استرس شوری است (۲۷) که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی ندارد؛ اختلاف موجود در نتایج می‌تواند به‌دلیل سازگاری ماهی به آب شور باشد (۲۸). نتایج مشابه، از مطالعه‌ای درخصوص تاثیر سطوح مختلف پودر تفاله گوجه فرنگی بر فاکتورهای بیوشیمایی سرم خون و شاخص‌های رشد در ماهی کپورمعمولی انجام شد که نتایج این مطالعه نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد به‌دست آمده است که نشان‌دهنده ایجاد تعادل فیزیولوژیک در بدن و کاهش استرس می‌باشد (۲۹). تاثیر سطوح مختلف پوست سیر بر فعالیت برخی آنزیم‌های کبدی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های (LDH) دهیدروژناز و میزان کورتیزول کبدی بین ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف پوست سیر در مقایسه با گروه شاهد وجود نداشت که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. افزایش برخی آنزیم‌های سرم خون ماهی قزل‌آلا شامل ALT و LDH در آلودگی به آئروموناس گزارش شده است (۳۰). در مطالعه‌ای اثر استرس حاد تزریق داخل صفاقی بر پاسخ‌های ایمنی و فاکتورهای خونی بچه‌ماهیان سی‌باس آسیایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد در میزان کورتیزول خون پس از ۲ و ۴ ساعت از تزریق مشاهده شد. در تزریق صفاقی میزان لیزوزیم در پلاسما افزایش یافت درحالی‌که میزان آن در کلیه کاهش یافته بود (۳۱). مطالعات اندکی درخصوص پاسخ غیراختصاصی ماهیان در شرایط استرس‌زا انجام شده است، لیزوزیم آنزیم مهم غیر اختصاصی است که در پاسخ ایمنی بسیاری از گونه‌های ماهیان نقش دارد و یک عامل مهم در محافظت از ماهی در برابر پاتوژن‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی محسوب می‌شوند. در حمل نقل ماهی قزل‌آلا میزان این آنزیم افزایش یافته است. بنابراین میزان سطح این آنزیم در برابر قدرت عامل استرس‌زا و شرایط ماهی متفاوت است (۳۲، ۳۳). در پژوهشی میزان تغییرات کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز در بچه‌ماهی سفید انگشت‌قد در معرض قرارگرفته با آلودگی نفت خام مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت دو آنزیم مذکور در مواجهه ماهی سفید با نفت معنی‌دار بوده است و نشان‌دهنده عدم تطابق بچه‌ماهیان در طی آزمایش فوق بوده است (۳۴). دلیل عدم انطباق نتایج در میزان سطوح کوتیزول و لاکتات دهیدروژناز با تحقیق حاضر می‌تواند بسته به نوع گونه، شرایط استرس‌زایی باشد (۳۳). به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که واکسیناسیون در طی دو مرحله باعث استرس در ماهی‌ها نشده است. با این‌که بعداز مرحله اول آنزیم‌ها در تیمارهای واکسینه شده نسبت

به شاهد افزایش یافته بودند اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبوده است. بیان ژن، مکانیسمی است که طی آن اطلاعات ژنتیکی DNA ابتدا به یک محصول حد واسط (mRNA) و عملکردی تبدیل می‌شود و سپس به محصول نهایی که می‌تواند یک پروتئین باشد ترجمه می‌شوند. در برخی از موارد در مورد ژن‌هایی که محصول پروتئینی ندارند محصول نهایی می‌تواند یک نوع از RNA باشد. استفاده از روش‌های مولکولی به‌خصوص بررسی بیان ژن‌های فاکتورهای ایمنی و سایر مولکول‌های فیزیولوژیک مورد نظر در سطح رونویسی ژن، این امکان را فراهم می‌کند که با فرانگری پاسخ‌های ایمنی از زمان استفاده واکسن، زمان بیان ژن را به‌طور دقیق‌تری به‌دست آورد (۳۵). هم‌چنین مزیتی که بررسی بیان ژن در بافت‌های مختلف می‌توان معیار دقیق‌تری از پاسخ‌گویی بافت‌های مختلف به محرک و هم‌چنین مکانیسم عمل محرک به‌دست آورد (۳۶). از سوی دیگر محرک‌هایی مانند واکسن‌ها می‌توانند ضمن اثر بر ژن‌های مسئول تنظیم ایمنی و پاسخ التهابی بدن، به‌طور مستقیم، باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن شوند. بین کارایی واکسن و پاسخ ایمنی سرمی در ماهی ارتباط مستقیم وجود دارد. اطلاعات ساز و کارهای 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 و به درک بهتر روند ایمنی‌زایی و فرآیندهای دخیل در ایجاد مقاومت در برابر عامل بیماری‌زا کمک کند (۳۷). لیزوزیم یک آنزیم باکتری‌کش است که خصوصاً در برابر باکتری‌های گرم مثبت مؤثر است و باعث لیز باکتری و تحریک فعالیت فاگوسیتوزی می‌شود (۳۸، ۳۹) سنجش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی بعد از واکسیناسیون، بینش ارزشمندی درباره مکانیسم‌های ایمنی علیه باکتری‌های *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* در ماهی ایجاد می‌کند (۴۰). در این مطالعه بیان نسبی ژن‌های MHC1، اینترلوکین 1B (Interleukin)، لیزوزیم (Lysozyme)، TNF و IGF-1 در کبد بعد از دوره تحقیق ارزیابی شد، ژن‌های MHC1، اینترلوکین 1B (Interleukin)، لیزوزیم (Lysozyme) و TNF مرتبط با ایمنی و ژن IGF-I مرتبط با رشد و متابولسیم در ماهیان هستند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین بیان نسبی ژن‌های MHC1 و اینترلوکین 1B تیمار واکسینه با گروه شاهد مشاهده شد. افزایش در بیان نسبی ژن‌های فوق در تیمارهای واکسینه شده نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. ولی درخصوص بیان ژن‌های لیزوزیم (Lysozyme)، TNF، IGF-1 و MHCl1 تفاوت معنی‌داری بین تیمار واکسینه شده و شاهد دیده نشد. مطالعه مشابهی درخصوص اثر سه روش تجویز (خوراکی، غوطه‌وری و تزریقی) باکترین دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس ایمنی اختصاصی و بیان ژن‌های IL-۶ و IgM در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژنی دو ژن در بافت کلیه تیمارهای واکسینه شده به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر افزایش داشته است (۱۲) که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی ندارد. دلیل عدم تطابق نتایج ممکن است گونه ماهی، شرایط محیطی و ژن‌های مورد بررسی باشد. در مطالعه‌ای مشابه ارزیابی اثرات ناپلی غنی‌شده با ید بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی (لیزوزیم و TNF-alfa) در ماهی زبرا گورخری (*Danio rerio*)، نتایج نشان داد که روند افزایش بیان ژنی در تیمارها وابسته به دوز یدید پتاسیم بود (۴۱). لیزوزیم در بسیاری از مهره‌داران وجود دارد و یکی از فاکتورهای دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا است (۴۲). لیزوزیم توسط گلبول‌های سفید منتشر می‌شود و در ترشحات موکوسی آبشش‌ها، بافت کلیه، طحال دستگاه گوارش و سرم خون یافت می‌شود (۴۳). در سیستم ایمنی ماهیان و در ارتباط با التهابات مولکولی سایتوکینی فاکتور نکروزکننده تومور (TNF) نقش مهمی در ایمنی دارد که به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول سفید ترشح می‌شودکه علاوه بر خون در کلیه نیز به مقدار زیادی تجمع و ترشح دارد (۴۴). در مطالعه حاضر تیمارهای واکسینه شده میزان بیان ژنی لیزوزم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشته‌اند. در مطالعه‌ای دیگر اثر عصاره گیاهی بومادران (*Achillea millefolium*) در جیره غذایی ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) بر پاسخ ایمنی موکوس و بیان ژن مرتبط با ایمنی TNF-alfa مورد بررسی قرار گرفت (۳۵). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیان ژن عصاره بومادران در مقایسه با گروه شاهد با یک روند وابسته به دوز را نشان داد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. Khaj و همکاران، به مقایسه تاثیر واکسن دوگانه استروپتوکوکوزیس (*Lactococus garvie* و *Streptococcus iniae*) ایرانی و واکسن خارجی بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداختند نتایج تحقیق فوق نشان داد که مقدارلایزوزیم در دو گروه واکسن ایرانی و خارجی نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. ولی این افزایش در روزهای ۳۱ و ۶۰ آزمایش از نظر آماری معنی‌دار نبوده است که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد (۱۳). تحریک سیستم ایمنی بدن جهت افزایش فعالیت لیزوزیم در آزاد ماهیان بعد از واکسیناسیون مشاهده شده است (۳۸). لیزوزیم یک آنزیم باکتری‌کش است که خصوصاً در برابر باکتری‌های گرم مثبت موثر است و باعث لیز باکتری و تحریک فعالیت فاگوسیتوزی می‌شود (۳۹). در مطالعه‌ای که توسط Jokinen و همکاران، روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد، میزان لیزوزیم پلاسما در روزهای آزمایش ۴۹ و ۴۲، ۳۵، ۲۸، ۲۱، ۱۴، ۷ اندازه‌گیری شد که میزان آن از روز ۱۴ آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایش

معنی‌داری یافت به گونه‌ای که در پیک لیزوزیم (روز ۴۲)، مقدار آن بیست برابر گروه شاهد به‌دست آمد (۴۵). واکسیناسیون باعث افزایش تولید ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها و هم‌چنین افزایش تولید سایتوکین و لیزوزیم می‌شود. Balfry و همکاران، برای بررسی مقاومت آزاد ماهی نقره‌ای *Oncorhynchus kisutch* در برابر *Listonella anguillarum* در روزهای ۰، ۲، ۴، ۷ و ۱۸ پس از واکسیناسیون فاکتورهای ایمنی مختلف را اندازه‌گیری کردند. نتایج حاصل حاکی از افزایش ایمنی ماهیان واکسینه شده بود (۴۶). Barnes و همکاران، مقاومت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی را در برابر قدرت باکتری‌کشی آنتی‌سرم ماهی قزل‌آلای ایمن‌شده گزارش کردند به‌طوری‌که تعداد باکتری شمارش شده در پلیت‌های مربوط به تیمارهای واکسینه ۱۸۰ تا ۴۰۰ درصد نسبت به تیمار شاهد که فاقد سرم بود، افزایش نشان داد (۴۷). Faghani و همکاران، واکسن ضداسترپتوکوکوزیس به‌همراه آلژنیک اسید را روی ارزیابی سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند که حاکی از ارتقای سیستم ایمنی و افزایش مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا بود (۴۸). Badzohreh و همکاران، کارایی واکسن تک گانه تولید داخل را به‌همراه محرک ایمنی بتاگلوکان بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن بتاگلوکان به غذا تأثیر مثبتی بر پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته و می‌تواند کارایی واکسن ضداسترپتوکوکوزیس را افزایش دهد (۴۹). Rastiannasab و همکاران، به بررسی تاثیر پروبیو آنزیم بر بیان ژن‌های وابسته به ایمنی و کنترل بیماری دهان قرمز (yersiniosis) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌مدت ۶۰ روز پرداختند نتایج این مطالعه نشان داد که بیش‌ترین مقاومت مربوط به تیمار بادوز کم‌تر پروبیوانزیم و گروه شاهد داشت. میزان بیان سیتوکین‌های مورد مطالعه وابسته به دوز بوده و ممکن است در بافت‌های مختلف الگوی متفاوتی در بیان داشته باشد (۵۰) که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت دارد. براساس یافته‌ها افزایش بیان سیتوکینین به‌ویژه TFA-a در کلیه، می‌تواند بر توان مقاومت به بیماری در ماهی موثر باشد. هم‌چنین بررسی بیان ژن‌های HSP70، MX3، MX2، MX1 و IFN-γ در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با چای سبز (*Camellia sinensis*) نشان داد که سطح بیان ژن IFN-γ در ماهیان ۲۳ گرمی تغذیه‌شده با رژیم‌های غذایی حاوی عصاره چای سبز افزایش یافته است (۵۱). Hosseinifar و همکاران، در بررسی اثر مکمل غذایی رافینوز، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب دو مکمل بر بیان ژن‌های لیزوزیم و TNF-a در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) به‌مدت ۸ هفته پرداختند نتایج نشان داد که میزان بیان ژن در پوست ماهی فوق لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی بیان ژن لیزوزیم داشت که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد. پروتئین α-TNF جز سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌باشد که توسط سلول‌های سیستم ایمنی و عمدتاً ماکروفاژهای فعال شده تولید می‌شود و در شروع و تقویت فرایندهای التهابی در ماهی و تنظیم سیستم ایمنی در مقابل عوامل عفونی نقش دارد (۵۳). افزایش بیان در سطح ژن می‌تواند باعث افزایش بیان در سطح پروتئین این ژن شده و در نتیجه سیستم ایمنی ماهی را علیه باکتری را فعال کند. اینترلوکین نیز سایتوکاین پیش التهابی دیگری است که توسط چندین گروه سلولی شامل سلول‌های T، B، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های عصبی، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های گلیال تولید می‌شود (۵۴). این سایتوکاین باعث رهایی پروتئین‌های مرحله حاد مانند (protein reactive-C, CRP) از سلول‌های کبدی می‌شود و هم‌چنین در بیان ژن α-TNF نقش دارد و باعث افزایش بیان آن می‌شود (۵۵). در بررسی jiang و همکاران، اثر اسپور باکتری (*Bacillus subtilis*) به‌صورت واکسن، بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (IgM، IFNY2 و IL-10) در جیره غذایی ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) را به‌مدت شش هفته مورد ارزیابی قراردادند. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن‌های مربوط به ایمنی در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد به‌طور قابل توجهی بالاتر بود (۵۶). در مطالعه‌ای اثر مخمر (*Debaryomyces hansenii*) بر وضعیت سیستم ایمنی و سطح بیان برخی از ژن‌های دخیل در ایمنی ماهی باس دریایی (*Sparus aurata*) انجام شد و مشخص گردید که به‌دنبال استفاده از دوز 10^6CFUg-1 پس از چهار هفته به‌صورت خوراکی بیان ژن TNFa در روده نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. اگرچه درکبد قسمت قدامی فوق کلیه به‌ترتیب کاهش و تغییر پیدا نکرده بود (۵۷). هم‌چنین بیان ژن‌های TNF-a و IL-1b در بافت کلیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) توسط باکتری‌های لاکتوباسیلوس (LAB) در مواجهه با باکتری *Lactococcus garvieae* افزایش قابل توجهی نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۵۸) که همه پژوهش‌های فوق با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که واکسیناسیون در طی دو مرحله تاثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های MHC1 و اینترلوکین 1B مورد مطالعه در این تحقیق داشته است. از آن‌جایی که میزان بیان سیتوکین‌های مورد مطالعه وابسته به دوز بوده و ممکن است در بافت‌های مختلف الگوی متفاوتی در بیان داشته باشد، لذا در این مطالعه و بر روی برخی از سیتوکنین‌های بررسی شده تاثیر معنی‌داری داشته است ولی همان طوری که دیده شد بر روی بیان ژن‌های دیگر (Lysozyme، TNF، IGF-1 و MHCl1) تاثیر نداشته است. نتایج به‌دست آمده در پژوهش کنونی نشان داد واکسن با افزایش پاسخ‌های ایمنی و برخی شاخص‌های آنزیمی، تأثیر بهتری بر سلامت سی‌باس آسیای در وزن ۵ گرم داشته

است. با توجه به نتایج کلی این مطالعه، واکسن توانسته است تأثیر مثبتی بر روی شاخص‌های سلامت ماهی داشته باشند اما برای حصول نتیجه‌گیری کامل‌تر نیاز به مطالعات عمیق‌تر از جمله بررسی رشد و فاکتورهای خونی می‌باشد.

منابع

1. **FAO. 2022.** State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
2. **Azhdahakoshpour, A., Payghan, R. and Ahangarzadeh, M., 2017.** Most important diseases of cage cultured marine fish with emphasis on Asian sea bass (*lates calcarifer*) and prevention methods. Journal of Marine Fishes. 1(1): 11-22. (In Persian)
3. **Garza-Gil, M.D., Varela-Lafuente, M. and Caballero Miguez, G., 2009.** Price and production trends in the marine fish aquaculture in Spain. Aquaculture Research. 40: 274-281.
4. **Hajirezaee, S., Ajdar, D., Matinfar, A., Hosseini Aghuzbeni, S. and Rafiee, G., 2015.** A 1earthen ponds of Gwadar region, Iran: an assessment of growth parameters feed intake efficiency and survival rate. Journal of Applied Animal Research. 43(3): 309-313. https://doi.org/10.1080/ 09712119.2014.963105
5. **FAO. 2024.** Globefish Highlights International markets for fisheries and aquaculture products. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
6. **Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y.H., Tay, S., Leong, L.N., Ng, M.L., Jones, J.B., Nicholls, P.K. and Ferguson, H.W., 2012.** The pathology of 'scale drop syndrome in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. Journal of fish diseases. 35(1): 19-27. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01319.x
7. **Bromage, E.S., Thomas, A. and Owens, L., 1999.** *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Diseases of aquatic organisms. 36(3): 177-181. doi:10.3354/dao036177
8. **Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012.** Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated vaccine on immune system in *Epinephelus bruneus* against *Uronema marinum*. Experimental Parasitology. 131: 325-332. https://doi.org/10.1016/j. exppara.2012.04.0176
9. **Raa, J., 1992.** The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organism to microbial infections. Diseases in Asian aquaculture. 39-50. https://doi.org/10. 11233/aquaculturesci.57.167
10. **Mazandarani, M., Hoseinifar, S.H., Reza Gholitebar, Z., Soudagar, M. and Safari, R., 2022.** Evaluation of *Yersinia ruckeri* vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics. 11(2): 37-48. (In Persian)
11. **Mohammadi, Y., Mesbah, M., Dezfoulnejad, M.C., Mehrgan, M.S. and Islami, H.R., 2021.** Growth performance, blood biochemical parameters, immune response, and antioxidant defense of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fingerlings exposed to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus iniae* and *Vibrio harveyi*. Aquaculture International. 29:2751-2767. https://doi.org/10.1007/s 10499-021-00776-5.
12. **Alishahi, M., Halimi, M., Ghorbanpoor Najaf abadi, M. and Erfanmanesh, A., 2020.** Comparison of efficacy and immunogenicity of three administration routs of *Streptococosis*/*lactococosis* vaccine in reinbow trout. Journal of Animal Environment. 11(4): 187-196. (In Persian)
13. **Khaj, H., Mesbah, M., Tabandeh, M.R., Mohammadian, T. and Dadar, M., 2018.** Comparative effects of Iranian *streptococcus*/*lactococcus* vaccine and Aquavac vaccine on growth performance and immunity in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Iranian Veterinary Journal. 13(4): 28-42. (In Persian)
14. **Poursaeid, S., Falahatkar, B., Mojazi Amiri, B. and Van Der Kraak, G., 2012.** Effects of long -term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon (*Huso huso*). Comparative Biochemistry and Physiology. 163: 111-119.
15. **Thomas, P., Woodin, B.R. and Neff, J.M., 1980.** Biochemical responses of the striped mullet *Mugil cephalus* to oil exposure: I. Acute responses-interrenal activations and secondary stress responses. Mar. Biol. 59: 114-141.
16. **Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
17. **Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. Methods. 25: 402-408.
18. **Pfaffl, M.W., 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 1: 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.
19. **Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O. and Múzquiz, J.L., 2006.** *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 29(4): 177-198. doi: 10.1016/j.cimid.2006. 06.003. PMID: 16935332.
20. **Gudding, R., Lillehaug, A. and Evensen, Ø., 1999.** Recent developments in fish vaccinology. Vet Immunol Immunopathol. 72(1-2): 203-212.
21. **Hastein, T., Scarfe, A.D. and Lund, V.L., 2005.** Science-based assessment of welfare: Aquatic animals. Rev. Sci. Tech. 24(2): 529.
22. **Otatake, M., Kiryu, I. and Nakanishi, T., 2002.** Development of vaccine delivery method for fish: *Parcutaneous* administration by immersion with application of multiple puncture instrument. Journal of Vaccine. 1: 3764-3769.
23. **Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. and Vandamme, E.J., 1993.** Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. Adv Appl Microbiol. 39: 213-294. doi: 10.1016/s0065.2164(08) 70597-5. PMID: 8213306.
24. **Bayunova, L., Barannikova, I. and Semenkova, T., 2002.** Sturgeon stress reactions in aquaculture. Journal of Applied Ichthyology. 18(4-6): 397-404 .
25. **Morshedi, V., Bakhshi, N., Ebrahimi, H. and Yousefi Siahkalroudi, S., 2023.** Effects of using GaroVak immersion vaccine in rearing the juvenile Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and experimentally infected with *Streptococcus iniae*. Journal of Animal Environment. 15(1): 191-200. (In Persian)
26. **Akrami, R., Ahmadi, Z., Chitsaz, H., Shamloofar, M., Habibi Nodeh, F., Sadeghi Asl, F. and Zarrini, N.,**

adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout. Journal of Aquatic Animal Health. 12(2): 157-164.

39. **Juha, K., Riitta, R., Marja, P. and Heikki, K., 2004.** Effect of immunization with two commercial vaccines on feed intake, growth, and lysozyme activity in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). Aquaculture. 234 (1-4): 41-50.

40. **Huang, H.Y., Chena, Y.C., Wanga, P.C., Tsaia, M.A., Yeha, S.C., Liangb, 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.

41. **Safari, R., Moghadamfar, S., Imanpour, M.R., Shabani, A. and Jafar Nodeh, A., 2016.** Antioxidant and immune gene expression in zebra fish (*Danio rerio*). Journal of Aquatic Ecology. 6(1): 93-101. (In Persian)

42. **Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996.** The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment. Academic Press. 395 p.

43. **Salighehzadeh, R., Yavari, V., Mosavi, S. and Zakeri, M., 2016.** Effect of *Spirulina platensis* as feed additive on immune factors in *Mesopotamichthys sharpeyi*. Journal of Aquatic Ecology. 5(1): 44-50. (In Persian)

44. **Grayfer, L., Walsh, J.G. and Belosevic, M., 2008.** Characterization and functional analysis of goldfish tumornecrosis factor alfa. Developmental and Comparative Immunology. 32: 532-543.

45. **Jokinen, E.I., Vielma, J., Aaltonen, T.M. and Koskela, J., 2003.** The effect of dietary phosphorus deficiency on the immune responses of European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*). Fish and Shellfish Immunology. 15(2): 159-168.

46. **Balfry, S.K., Maule, A.G. and Iwama, G.K., 2001.** Coho salmon *Oncorhynchus kisutch* strain differences in disease resistance and non-specific immunity, following immersion challenges with *Vibrio anguillarum*, Diseases of Aquatic Organisms. 47(1): 39-48.

47. **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. Inter-Research Diseases of Aquatic Organisms. 53(3): 241-247.

48. **Faghani, T., Azari Takami, Gh., 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*). J. Zool. 3(2): 54-58.

49. **Badzohreh, Gh.R., Soltani, M., Shah Hoseini, Gh.R. and Nafisi Bahabadi, M., 2012.** Effects of β-glucan on the growth, survival, and the efficacy of Anti *streptococcus iniae* vaccine in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Journal of Veterinary Research. 67(1): 11-17. (In Persian)

50. **Rastiannasab, A., Mousavi, S., Zolgharnein, H. and Hosseinzadeh Sahafi, H., 2017.** Effect of the food supplemented probioenzyme on expression of immune related genes and redmouth disease (yersiniosis) control in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 26 (1) :153-166. (In Persian)

51. **Sheikhzadeh, N., Nootash, Sh., Khani Oushani, A., Mousavi, Sh. and Tahapour, K., 2019.** Expression analysis of IFN-γ, MX1, MX2, MX3 and HSP70 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) administrated with **2018.** Effect of feed supplemented with ginger (*Zingiber officinale*) extract on the growth, biochemical and hemato-immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Veterinary Research. 73(2): 155-163. (In Persian)

27. **Makvandi, H., Khodadadi, M., Keyvan Shokoh, S. and Makvandi, Z., 2012.** Effect of salinity stress on cortisol hormone and glucose in grass carp fingerlings (*Ctenopharyngodon idella*). Journal of Aquatic Animals and Fisheries. 2(8): 77-84.

28. **Lim, C., Yildirim-Aksoy, M. and Welker, T., 2005.** Effect of feeding duration of sodium chloride containing diets on growth performance and some osmoregulatory parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after transfer to water of different salinities. In: burright, j., Flemming, C. and Egna, H., (eds). Twenty-Second Annual Technical Report. Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon. 411-420.

29. **Navidpour Aghjeh Mashhad, F., Mirdar Harijani, J., Gharaei, A. and Rahdari, A., 2016.** Effect of different levels of tomato waste powder on blood serum biochemical parameters and growth indices of Common Carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. Journal of Applied Ichthyological Research. 3(4): 101-114. (In Persian)

30. **Chitsaz, H. and Akrami, R., 2016.** The effect of different levels of garlic skin on the activity of some liver enzymes of common carp (*Cyprinus carpio*), the first national conference of aromatic and spicy medicinal plants. Gonbad Kavos University. (In Persian)

31. **Maricchiolo, G., Caruso, G. and Genovese, L., 2008.** Haematological and Immunological Responses in Juvenile Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) After Short-Term Acute Stress, The Open Fish Science Journal. 1: 28-35

32. **Tort, L., Balasch J.C. and MacKenzie, S., 2004.** Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. Contrib Sci. 2: 443-454.

33. **Mock, A. and Peters, G., 1990.** Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. J Fish Biol. 37: 873-885.

34. **Sabouri, S., Falahatkar, B., Khoshkholgh, M.R., Poursaeid, S. and Abtahi, B., 2017.** Cortisol and Lactate dehydrogenase alternation in Caspian Kutum (*Rutilus frisii*) fingerlings exposed to crude oil pollution. Journal of Animal Research. 30(1): 79-89. (In Persian)

35. **Nezhadmoghadam, S., Imanpoor, M.R., Jafari, V. and Safari, R., 2018.** Effect of *Achillea millefolium* on mucosal immune response and immune related (TNFalfa) gene expression in Goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). Journal of Applied Ichthyological Research. 5(4): 87-100. (In Persian)

36. **Paterson, B.D., Rimmer, M.A., Keike, G.M. and Semmens, G.I., 2003.** Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer*, to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. Aquaculture. 218: 717-728. 10.1016/S0044.8486 (02)00564-1.

37. **Raida, M.K. and Buchmann, K., 2008.** Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. Fish Shellfish Immunol. 25(5):533-541. doi: 10.1016/j.fsi.2008.07.008. PMID: 18706505.

38. **Ackerman, P.A., Iwama, G.K. and Thornton, J.C., 2000.** Physiological and immunological effects of

green tea (Camellia sinensis). Iranian Veterinary Journal. 15(3): 32-38. (In Persian)

52. **Hosseinifar, S.H., Hosseini, M., Paknezhad, H., Safari, R. and Jafer, A., 2018.** The effect of retene and *Lactobacillus acidophilus* on nonspecific immune related gene expression in carp (*cyprinus carpio*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics. 7(1): 35-41. (In Persian)

53. **Feng, M., Wang, Z.S., Zhou, A.G. and Ai, D.W., 2009.** The effects of different sizes of nanometer zinc oxide on the proliferation and cell integrity of mice duodenum epithelial cells in primary culture. Pakistan Journal of Nutrition. 8: 1164-1166.

54. **Iliev, D.B., Castellana, B., MacKenzie, S., Planas, J.V. and Goetz, F.W., 2007.** Cloning and expression analysis of an IL-6 homolog in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular immunology 44: 1803-1807.

55. **Starkie, R., Ostrowski, S.R., Jauffred, S., Febbraio, M. and Pedersen, B.K., 2003.** Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-α production in humans. The Federation of American Societies for Experimental Biology. 17: 1-10.

56. **Jiang, H., Chen, T., Sun, H., Tang, Z., Yu, J., Lin, Z., Ren, P., Zhou, X., Huang, Y., Li, X. and Yu, X., 2017.** Immune response induced by oral delivery of *Bacillus subtilis* spores expressing enolase of Clonorchis sinensis in grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*). Fish Shellfish Immunol. 60: 318-325. doi: 10.1016/j.fsi.2016.10.011.

57. **Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F. and Ángeles Esteban, M., 2008.** Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), Fish & Shellfish Immunology. 25(6): 731-739.

58. **Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I. and Ruiz Zarzuela, I., 2011.** Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. Fish & Shellfish Immunology. 31: 196-201.