View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان :

تولید واکسن (زنده) نوترکیب علیه بیماری استرپتوکوکوزیس برای ایمن کردن قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) (فاز ۱)

مجری:
رضا پورغلام

شماره ثبت
۵۰۵۵۳

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه : تولید واکسن (زنده) نوترکیب علیه بیماری استرپتوکوکوزیس برای ایمن کردن قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) (فاز ۱)
شماره مصوب پروژه : ۸۵۰۲۴-۰۳-۲۰-۰۱۹-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : رضا پورغلام
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : رضا پورغلام
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : مصطفی شریف روحانی، حسینعلی ساسان، فرامرز لالویی، رضا صفری، علی اصغر سعیدی، مهدی سلطانی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : بهرام کاظمی
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان تهران
تاریخ شروع : ۸۵/۲/۱
مدت اجرا : ۴ سال و ۵ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه: تولید واکسن (زنده) نوترکیب علیه بیماری استرپتوکوکوزیس برای ایمن کردن قزل‌آلای رنگین کمان (فازیک)

کد مصوب : ۸۵۰۲۴-۰۳-۲۰-۰۱۹-۲

شماره ثبت (فروست) :۵۰۵۵۳ تاریخ : ۹۵/۸/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای رضا پورغلام دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۵/۷/۱۳ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس پژوهشکده در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱-علایم بالینی ۲
۱-۲-عوامل موثر در بروز استرپتوکوکوزیس ۳
۱-۳-تاریخچه و پراکنش استرپتوکوکوزیس ۴
۱-۴-روشهای تشخیص عامل بیماری ۴
۱-۵-چشم انداز استرپتوکوکوزیس در ایران ۸
۱-۶-پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه تولید واکسن در ماهیان ۹
۱-۷-برخی از پیشرفت‌های اخیر در مورد واکسن‌های ماهیان با تاکید بر ابداع واکسن بر پایه DNA نوترکیب ...۱۰
۱-۸-فرضیات ۲۲
۱-۹-اهداف ۲۳
۲-مواد و روش کار ۲۴
۲-۱-وسایل مورد استفاده ۲۴
۲-۲-مواد و لوازم مصرفی ۲۵
۲-۳- نمونه برداری ۲۷
۲-۴-کشت اولیه باکتری در محل نمونه برداری ۲۷
۲-۵- خالص سازی و شناسایی اولیه باکتری ۲۸
۲-۶-آزمایشات مولکولی ۲۸
۲-۷-هضم آنزیمی محصولPCR ۳۲
۲-۸-جداسازی ژن عامل استرپتوکوکوزیس و کلونینگ ۳۳
۲-۹-ترانسفورما سیون (Transformation): ۳۵
۲-۱۰- استخراج پلاسمید ۳۶
۲-۱۱-تهیه وکتور و قطعه ژن کدکننده پروتئینی های simA و cpsD ۳۶
۲-۱۲- بازیافتDNA از ژل آگارز با استفاده از کیت BioNeer ۳۷
۲-۱۳- انجام واکنش اتصال ۳۸
۲-۱۴-غربالگری کلنی های واجد پلاسمید نوترکیب ۳۸
۲-۱۵-کلنی PCR ۳۸

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۲-۱۶- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ژن های simA و cpsD جهت تأیید کلونینگ ۳۹
۲-۱۷-انتقال پلاسمید به باکتری Lactococcus lactis ۴۰
۲-۱۸-وسترن بلاتینگ ژل پلی اکریل آمید ۴۱
۲-۱۹- واکسیناسیون: ۴۲
۲-۲۰-خونگیری جهت اندازه گیری IgM ۴۳
۲-۲۱-اندازه گیری میزان IgM ۴۴
۲-۲۲- رویارویی با باکتری (Challenge) ۴۴
۲-۲۳- تجزیه و تحلیل آماری ۴۵
۳-نتایج ۴۶
۳-۱- ساخت توالی simA و cpsD بطور جداگانه در پلاسمید pGH ۴۸
۳-۲- ترانسفورماسیون پلاسمید سنتتیک pGH حاوی ژن کد کننده simA و cpsD به درون باکتری TOP10 ..... ۵۰
۳-۳- ساب کلون ژن های simA و cpsD در درون وکتور بیانی pNZ8148 ..... ۵۲
۳-۴-روشهای واکسیناسیون ۵۳
۳-۵-مقایسه دوز ها ۵۷
۳-۶-رویارویی با باکتر ۶۰
۴-بحث و نتیجه گیری ۶۲
پیشنهادها ۶۷
منابع ۶۸
چکیده انگلیسی ۷۴

چکیده

هدف اصلی این تحقیق بررسی امکان تولید واکسن زنده نوترکیب علیه استرپتوکوکوزیس در قزل‌آلای رنگین کمان و ایمن کردن ماهیان قزل آلا علیه این بیماری بوده است. بدین منظور ابتدا حدود ۵۲۰ نمونه ماهی بیمار از۷۲ مزرعه پرورش ماهی از ۸ استان کشور جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از کشت در محیط‌های اختصاصی و آزمایش‌های بیوشیمیایی و تعیین بعضی از گونه‌های استرپتوکوکوس، با استفاده از روشهای مولکولی تائید تشخیص شدند. پس از انجام این آزمایشات، مشخص شد که حدود ۴۰٪ ماهیان (حدود ۲۰۶ نمونه) به گونه‌های مختلف استرپتوکوکوس آلوده بودند. در مجموع تعداد ۱۷۲ نمونه DNA از گونه های مختلف استرپتوکوکوس استخراج گردید و با توجه به نتایج بدست آمده، گونه های *S.uberis*، *S.agalactiae* ، *S.dysgalacotia* ، *S.faecium* و *S. iniae* شناسایی شدند.

با توجه به اینکه آنزیم فسفوگلوکوموتاز به عنوان مهمترین عامل در تولید کپسول پلی ساکاریدی و بیماریزایی گونه استرپتوکوکوس اینیایی شناسایی شده است پس از جداسازی استرپتوکوکوس اینیایی، کلونینگ ژن *pGM* انجام گردبد. پس از تکثیر موفقیت آمیز این ژن در وکتور pTZ57R/T کلون گردید. پلاسمید نوترکیب(PNZ8048) پس از هضم آنزیمی در وکتور بیانی pEtDuet-1 ساب کلون و به روش PCR تائید گردید. ضمنا به منظور تکثیر ژن های *simA* و *cpsD* از پرایمرهای یونیورسال *pNZ8148* و اختصاصی ژن های *simA* و *cpsD* استفاده گردید. برای انجام واکنش انتقال پلاسمید به باکتری *Lactococcus lactis* از باکتری مهندسی شده *Lactococcus lactis* (NZ9000) استفاده گردید.

واکسیناسیون به سه روش خوراکی، غوطه وری و تزریقی (داخل صفاقی) انجام شد که در هر سه روش و همه تیمارها میزان کارایی واکسن منتج از ژن (g2) در مقایسه با ژن (g1) بهتر بود. برای اندازه گیری میزان IgM یا به عبارت دقیق تر ردیابی آنتی بادیهای ضد استرپتوکوکوس اینیایی از روش ELISA استفاده شد. نتایج نشان داد در هر سه روش و در همه تیمارها (همه دوزها و هر دو ژن g1 و g2) میزان IgM در مقایسه با شاهد دارای اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) بوده است.

نتایج رویارویی ماهیان واکسینه شده با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که در صد بقاء نسبی ماهیان در همه تیمارها بجز تیمار۳ (۴۲/۶۳ درصد) بالای ۵۰ درصد و برای گروه کنترل نیز ۲۱/۴۳ درصد بوده است. بیشترین درصد بقاء نسبی ماهیان مربوط به تیمار ۱۱ (۶۱/۲۵ درصد) بود و آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار بین درصد بقاء نسبی ماهیان واکسینه شده با گروه کنترل می باشد ($p<۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: واکسن نوترکیب، قزل‌آلای رنگین، استرپتوکوکوزیس، فسفوگلوکوموتاز

۱-مقدمه

امروزه با توجه به آلودگی های روز افزون منابع آبی و گسترش صنعت آبزی پروری، هر روزه بیماریهای مختلفی در مزارع پرورشی شایع می گردد. بیماریهای باکتریایی از مهمترین بیماریهای است که در مزارع پرورشی باعث مرگ و میر ماهیان می گردد.(Yang and li,2009). استرپتوکوکوزیس در ماهیان در صورت ابتلا می‌تواند تلفات قابل‌ملاحظه‌ای را به همراه داشته باشد. براساس گزارشات متعدد، بیماری استرپتوکوکوزیس، هر ساله خسارات بسیار زیادی را به صنعت آبزی پروری وارد می سازد (Shoemakev *et al*.,2006, Garcia *et al*.,2008,Romalde *et al*.,2008)

عامل اصلی این بیماری گونه های مختلف جنس استرپتوکوک (Streptococcus) هستند. علاوه بر جنس استرپتوکوک، گروه‌های دیگری از باکتری‌های مرتبط با این دسته وجود دارند که می‌توانند عوارض و بیماری‌های مشابهی را ایجاد کنند از جمله: لاکتوکوکوس‌ها(Lactococcus) ، انتروکوکوس‌ها (Entrococcus) و واگوکوکوس‌ها (Vagococcus). معمولا تمامی بیماری‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های مذکور به عنوان استرپتوکوکوزیس تلقی می‌شوند. استرپتوکوکوزیس نخستین بار در سال ۱۹۵۷ از قزل‌آلاهای پرورشی در ژاپن گزارش شد (Hoshina *et al*., 1958). گونه‌های دیگری از ماهیان از جمله آزاد ماهیان، کفال، تیلاپیا، قزل‌آلای دریایی، ماهیان خاویاری، باس مخطط، مارماهی و تعدادی از ماهیان زینتی نسبت به این بیماری حساس تشخیص داده شدند. بیماری در بیش از ۲۴ گونه از ماهیان آب شیرین و دریایی و همچنین ماهیان پرورشی و وحشی بصورت انفرادی و به شکل همه گیر در ماهیان آب شیرین و دریایی در بسیاری از مناطق از جمله آفریقای جنوبی، استرالیا، سنگاپور، انگلیس، نروژ ، چین، ترکیه، اسپانیا، ایتالیا، کره و سایر مناطق گزارش شده است (Bromage& Owens ,2002) .

۱-۱-علایم بالینی

شنای نامنظم، از دست دادن تعادل، بی‌حالی، تیرگی پوست، اگزوفتالمی یک طرفه یا دو طرفه، کدورت قرنیه، خونریزی در اطراف یا داخل چشم، صفحات آبششی، پایه باله‌ها، ناحیه شکمی و اطراف مقعد، آسیت، بروز زخم‌های پوستی از جمله علائم بیماری در ماهیان مبتلاست. البته در برخی از موارد ابتلا این امکان وجود دارد که ماهی‌ها تا زمان مرگ هیچ‌گونه علائم کلینیکی نشان ندهند. از میان علائم فوق‌الذکر، خونریزی، بیرون زدن چشم‌ها، شنای نامنظم و مرگ و میر سریع از علائم شاخص بیماری محسوب می‌شود. در تشخیص تجربی استرپتوکوکوس تاکید بر اخذ تاریخچه بیماری و علائم کلینیکی، یافته‌های کالبدگشایی، جداسازی و شناسایی باکتری گرم مثبت از بافت‌های مغز، طحال،کلیه‌ها یا کبد بایستی مورد توجه قرار گیرد. در ماهیان با شنای نامتعادل، اگزوفتالمی، خونریزی و مرگ و میر شدید و سریع و مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت جداسازی شده از مغز، کلیه یا سایر ارگان‌های ذکر شده می‌توان شدیدا به بیماری مظنون شد.

برای تشخیص قطعی باید اقدام به کشت نمونه از اندام‌های داخلی به خصوص مغز و کلیه و به دنبال آن جداسازی باکتری نمود(Astin1999, Bonar *et al*, 2003; Bromage and Owens 2002؛ Lahav *et al*., 2004 ،Austin and).

از فاکتورهای بیماریزای عمده و مهم *S.iniae*، مانند بسیاری از پاتوژن های سیستمیک، کپسول پلی ساکاریدی این باکتری می باشد که نقش حفاظت از فاگوسیتوزیس در برابر دفاع اولیه میزبان، یعنی سیستم ایمنی ذاتی ، جهت پاک سازی و حذف پاتوژن مهاجم را به عهده دارد. ترکیبات مولکولی ویژه سازنده کپسول در بقاء پاتوژن موثر می باشد(Eyngor, 2008). اولین عامل بیماریزا در ساختار کپسول، ژن فسفوگلوکوموتاز می باشد که با تولید آنزیم فسفو گلوکوکوتاز باعث تبدیل گلوکز ۶- فسفات گلوکز ۱- فسفات می شود که این ترکیبات در ساختارهای قندی کپسول، نقش عمده ای دارند. تحقیقات نشان داده است که از دست دادن ژن pgm (فسفوگلوکوموتاز) در استرپتوکوکوس اینیایی باعث تغییراتی در ویژگی های فنوتیپیک، تغییر مرفولوژی دیواره سلولی، تولید کپسول و همچنین قابلیت دفاع ایمنی ذاتی ماهی می شود(Buchanan, 2005).

۲-۱-عوامل موثر در بروز استرپتوکوکوزیس

علاوه بر حضور باکتری بیماریزا در محیط زندگی آبزی، شرایط محیطی و نیز وضعیت ایمنی میزبان نیز از عوامل تعیین کننده در بروز بیماری است. بطوریکه با تضعیف ایمنی، شرایط برای ایجاد بیماری فراهم می شود که از این پدیده به عنوان استرس نامبرده می شود. بنابراین استرس اغلب نقش مهمی در شیوع بیماریهای عفونی در ماهیان بازی می کند. از مهمترین عوامل استرس زای موثر در بروز استرپتوکوکوزیس میتوان به درجه حرار ت بالاتر و پایین تر از اپتیموم برای رشد ماهی اشاره نمود(Amal 2011 و Zamir-saad). البته باید در نظر داشت خود عوامل ایجاد کننده استرپتوکوکوزیس نیز از نظر دامنه حرارتی رشد و فعالیت به دو گروه گرمابی (گرمادوست) و سردآبی (سرمادوست) تقسیم می شوند.باکتریهایی که در حرارت بالاتر از ۱۵ درجه سانتیگراد بیماری ایجاد میکنند شامل:

Lactococcus garvieae، *Streptococcus iniae*، *Streptococcu agalactiae*، *Streptococcus parauberis* را گرمادوست وآنهایی که در دمای کمتر از ۱۵ درجه سانتیگراد بیماریزا هستند مانند *Vagococcus salmoninarum* و *piscium Lactococcus* را سرمادوست می نامند(Eldar 1999 و Ghittino). علاوه بر حرارت، افزایش شوری و قلیائیت آب (pH>۸)، کاهش اکسیژن محلول، کیفیت پایین آب خصوصا افزایش میزان یون آمونیوم و نیتریت، افزایش تراکم و نیز استرس ناشی از جمع آوری و صید ماهیان از دیگر عوامل مستعد کننده ماهیان به بروز بیماری است(Amal 2011 و ,Zamir-saad). در سراسر سال باکتری در محیط آب و لجن و نیز خلل و فرج موجود در دیواره و کف استخر وجود دارد. این حضور فصلی است بطوریکه در تابستان عمدتا در آب و در پاییز و زمستان در رسوبات است. با توجه به عدم قطعیتی که در طبقه بندی این باکتریها وجود دارد قضاوت در مورد بیماریزایی

عوامل استرپتوکوکی جداشده از آب و رسوبات سخت است ولی درعین حال یک معرف بهداشتی است (1999 Astin و Astin). مطالعات متعددی در خصوص نحوه انتقال عوامل استرپتوکوکی انجام شده است. Nguyen و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که دو باکتری *S. agalactiae* و *S. iniae* از طریق مدفوع ماهیان بیمار به آب وارد شده و موجب بروز عفونت در ماهیان سالم می شوند. لیکن مهمترین راه ورود باکتری به بدن ماهی از طریق آبششها می باشد(Mian *et al*., 2009). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که غیر از آبشش، وجود هرگونه زخم و یا خراشیدگی جلدی نیز راهی مهم در انتقال بیماری است و این مکانیسم معمولا در جایی که میزان تراکم در استخر بالا باشد رخ می دهد(Xu *et al*, 2007). علاوه بر این موارد، مسیر گوارشی یا خوراکی راه دیگر آلودگی است. در این مورد انتقال بیماری یا از طریق کانیبالیسم بین ماهیان سالم و بیمار ویا در اثر مصرف ماهیان تازه آلوده و یخ زده که مراحل حرارتی را طی نکرده اند رخ می دهد. باکتری گاهی بیش از ۶ ماه در شرایط انجماد توانسته است زنده بماند (Yanong 2002 و Francis-Floyd.).

۳-۱-تاریخچه و پراکنش استرپتوکوکوزیس

یکی از مهمترین بیماریهای عفونی که بیش از دو دهه موجب بروز خسارات اقتصادی فراوان در مسیر صنعت آبزی پروری شده است عفونتهای استرپتوکوکوسی است که مشکل عمده مراکز تکثیر و پرورش ماهیان در بسیاری از کشورهای دنیا معرفی شده و تخمین زده شد که موجب خسارات اقتصادی شدید(بیش از ۱۵۰ میلیون دلار در سال) میگردد(Beack *et al*.,2006، Romald *et al*., 2008). این بیماری اولین بار از کشور ژاپن گزارش گردید (Hoshina و همکاران ۱۹۵۸) سپس گونه های دیگری از ماهی نیز به این آلودگی دچار شدند (Buller,2004; klesius *et al*.,2006; Vendrell *et al*., 2006). بتدریج گزارشات متعددی از بروز آن در کشورهای مختلف مانند سنگاپور(Foo *et al*.,1985)، آفریقای جنوبی(Bragg 1986 و Broere)، استرالیا(Carson *et al*., 1993)، اسپانیا(Toranz *et al*., 1994)، آمریکا (Perera *et al*., 1994) ، ایتالیا (Ghittion *et al*., 1995 ، فرانسه(Michel *et al*., 1997)، کویت (Evans *et al*., 2002)،کره جنوبی(Baeck *et al*., 2006) و برزیل (Filho et al., 2009) ارائه گردیدکه نشان دهنده بروز این بیماری در تمام قاره های دنیا است.

۴-۱-روشهای تشخیص عامل بیماری

اصولا استرپتوکوکوزیس ناشی از حضور عوامل باکتریایی کوکسی شکل گرم مثبت است که آنها را به عنوان جنس استرپتوکوکوس می شناختند. لیکن طی دهه گذشته تغییرات زیادی در طبقه بندی عوامل ایجاد کننده این بیماری رخ داده است. با ایجاد روش‌های تشخیصی جدید بر پایه خصوصیات ژنوتیپی، طبقه بندی جدید ایجاد شده است.

۱-۴-۱-جداسازی و شناسایی اولیه

حضور علایم بالینی و وجود کوکسی های گرم مثبت در مغز، کلیه، چشم و دیگر اندامها تشخیص اولیه استرپتوکوکوزیس را میسر می سازد. معمولا کلیه مهمترین اندام جداسازی باکتری است لیکن در مواردی که شنای غیر عادی در ماهیان بیمار مشاهده می شود مغز نیز یکی از مهمترین اندامها جهت جداسازی باکتری است(Yanong و Floyed 2002). جهت کشت اولیه و جداسازی باکتری از محیطهای کشت مختلفی مانند تریپتوز آگار حاوی خون گاو۱(BBTA)، آگار عصاره قلب و مغز۲(BHIA)،TH براث۳، آگار مغذی حاوی خون خرگوش و آگار خون دار(BA)[۴] می توان استفاده نمود. محیط ها پس از کشت در گرمخانه ۳۷ – ۲۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری می شوند. پس از این مدت کلنی هایی با قطر تقریبی ۲ – ۱ میلی متر و به رنگ خاکستری تیره[۵] رشد میکنند(Astin و Astin 1999 ,2007). کلنی تک بدست آمده از یک کشت خالص حاوی کوکسی های گرم مثبت، اکسیداز و کاتالاز منفی که می تواند همولیز از نوع بتا داشته باشد و یا بدون همولیز باشد.

۲-۴-۱-تشخیص تفریقی

در انجام تستهای تفریقی آزمایشات متعددی وجود دارد که به شرح ذیل می باشد(Murrey و همکاران ۲۰۰۳)

الف – تخمیر قند و تولید اسید: در این آزمایش توانایی باکتری در تولید اسید از ترکیبات هیدروکربنی (قند) مختلف سنجیده میشود. در این روش قند معین به محیط براث حاوی معرف (برموکروزل بنفش) افزوده می شود. چنانچه باکتری قابلیت تخمیر قند را داشته باشد بعلت تغییر pH (تولید اسید) رنگ محیط از قرمز به زرد تبدیل می شود.

ب – آزمایش بایل آسکولین: محیط بایل آسکولین محیطی اختصاصی برای باکتریهای کاتالاز منفی است. این محیط اثر مهار کننده بر رشد اکثر باکتریهای گرم مثبت به جز انتروکوکسها دارد. با رشد باکتری آسکولین به آسکولتین و دکستروز تبدیل می شود و اسکولتین تولید شده با کلرید آهن موجود در محیط واکنش داده و ایجاد رنگدانه سیاه میکند.

ج – رشد در حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد: رشد در دو حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد در محیط BHA در تشخیص تفریقی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی یک ابزار تشخیصی مهم است

---

[1] - bovine blood tryptose agar
[2] - brain heart infusion agar
[3] - Tood – Hewitt broth
[4] - blood agar
[5] - dull grey

د – همولیز: قابلیت لیز گلبولهای قرمز از اهمیت خاصی در تشخیص تفریقی استرپتوکوکها برخوردار است. این واکنش با کشت باکتری در محیط حاوی ۵٪ خون گوسفند شناسایی می شود. از نقطه نظر همولیز باکتریها به چند دسته تقسیم می شوند که شامل:

I – همولیز بتا: در این حالت گلبولهای قرمز بطور کامل تخریب شده و در اطراف پرگنه تولید شده یک هاله روشن ایجاد میشود

II – همولیز آلفا: در این حالت در اطراف پرگنه یک هاله تقریبا سبز رنگ در اطراف پرگنه مشاهده می شود.

III – همولیز گاما: هیچگونه تغییری در اطراف پرگنه رشد یافته مشاهده نمی شود.

ه – آزمایش هیدرولیز هیپورات: تعدادی از باکتریها قابلیت تولید آنزیم هیپورات هیدرولاز را دارند که هیپوریت سدیم را به بنزوئیک اسید و گلی سین تجزیه می کند. افزودن کلرید آهن به بنزوئیک اسید موجب تشکیل رسوب قهوه ای رنگ بنزوآت آهن می شود.

و – آزمایش حرکت: این آزمایش در خصوص حرکت باکتری در یک محیط نیمه جامد(ژل) است که تستی مفید در تشخیص تفریقی است. این آزمایش خصوصا در شناسایی انتروکوکوس ها مفید است

ز – آزمایش مقاومت به نمک ۶/۵٪: بعضی از باکتریها قابلیت رشد در محیط حاوی ۶/۵٪ نمک طعام را دارند در حالیکه این غلظت اثر مهار کنندگی بر رشد دیگر باکتریها دارد.

ح – هیدرولیز اوره: اوره به عنوان منبع نیتروژن در باکتری دارای اوره آز مورد استفاده قرار می گیرد و با مصرف اوره و تغییر در pH محیط اندیکاتور محیط(فنل رد) از قرمز به زرد تبدیل می شود.

ط – آزمایش VP (Voges – Proskauer): نتیجه انجام این واکنش تولید استیل متیل کربینول است. از این آزمایش در جهت تفریق جنس و گونه های مختلف کوکسیهای گرم مثبت استفاده می شود.

ی – هیدرولیز آرژنین: بعضی از باکتریها قابلیت هیدرولیز آرژنین را دارند. نتیجه این هیدرولیز قلیایی شدن محیط است که در نتیجه آن رنگ محیط تغییر می کند. این آزمایش برای تشخیص تفریقی باکتریها تست بسیار مناسبی است.

۳-۴-۱-تشخیص با استفاده از کیتهای تجاری

کیتهای تشخیصی سریع مانند API 20E، API Rapid Strp 32 و API CH50 نمی توانند در تشخیص *S. iniae* مورد استفاده قرار بگیرند چون اطلاعات پایه این باکتری در این کیتها موجود نیست. لیکن این کیتهای تشخیصی سریع قابل استفاده در شناسایی *S. agalactiae*، و دیگر گونه های استرپتوکوک هستند (Evans و همکاران ۲۰۰۶a). Jayarao و همکاران (۱۹۹۱) مقایسه ای را بین سیستم تشخیصی Vitek-Gram positive و سیستم API Rapid Strp 32انجام دادند و متوجه شدند که ۹۳٪ از نمونه های *S. agalactiae* با استفاده از این دو کیت قابل

شناسایی است. مقایسه بین API Rapid Strp 32 و سیستم Biology با استفاده از Gram-positive plate نشان داد هر دو سیستم قادر به شناسایی ۱۰۰٪ نمونه های *S. agalactiae* هستند(Evans و همکارانb ۲۰۰۶). لیکن سیستم Biology با استفاده از Gram-positive plate تنها قادر است ۷۰٪ نمونه های *S. iniae* را به درستی شناسایی کند(Roach و همکاران ۲۰۰۶).

۴-۴-۱-تشخیص مولکولی

چندین تکنیک مولکولی برای تشخیص گونه های استرپتوکوکوس انجام شده که نسبت به تستهای رایج آزمایشگاهی حساس تر و ویژگی بالاتری دارد. در سال ۲۰۰۱ ، Berridge و همکارانش ، از روش تعیین توالی ناحیه بین 23S و 16S ریبوزومی جهت تشخیص *S.iniae* استفاده کردند.

در سال ۱۹۹۸ Goh و همکارانش ، از تکنیک DNA هیبریداسیون ژن چاپرون 60 ، که ژن هدف برای تشخیص *S.iniae* بود استفاده نمودند.

Mata و همکارانش در سال ۲۰۰۴ ، تکنیک PCR را براساس ژن لاکتاز اکسیداز ارائه نمودند که جهت تشخیص استرپتوکوکوس اینیایی از ویژگی بیشتری نسبت به ژن 16S ریبوزومی برخوردار بود و علی رغم زمان ۳-۲ روز که برای تشخیص روتین *S.iniae* توسط کشت و تست های بیوشیمیایی نیاز بود ، این تکنیک طی یک روز قادر به شناسایی *S.iniae* بود.

klesius و همکارانش در سال ۲۰۰۶، تکنیک IFAT براساس منوکلونال آنتی بادی که حساسیت و ویژگی بیشتری نسبت به کشت روتین پلیت را دارد ارائه کردند که از کیت تجاری منو کلونال آنتی بادی استفاده نمودند.

بیش از یک دهه است که از روشهای مولکولی با استفاده از تکنیکهای مختلف PCR جهت شناسایی عوامل ایجاد کننده استرپتوکوکوزیس استفاده می شود. در بسیاری از تکنیکهای PCR از ژن 16S rRNA به عنوان مارکر مولکولی جهت شناسایی *S. iniae* استفاده می شود(Zlotkin و همکاران ۱۹۹۸). مارکر دیگری که مورد استفاده است intergenic spacer region(ISR) در دو ناحیه 16S و 23S از rDNA است که یک ابزار تشخیصی مهم برای گونه های استرپتوکوکوس است. تفاوت سکانس این نواحی باعث شده که از آن جهت تشخیص گونه های مختلف استفاده گردد. تکثیر این نواحی و برش آنها با آنزیم یا RFLP – PCR یک ابزار تشخیصی دقیق است(Eldar و همکاران ۱۹۹۷). به غیر از ژن rDNA ناحیه 16S از ژنهای دیگری مانند ژن لاکتات دهیدروژناز (lctO) استفاده شده است. از آنجایی گاهی که بخاطر شباهتهای فیلوژنیکی طراحی یک پرایمر خاص بر اساس این ژن مشکل است بهتر است از ژنهایی استفاده شود که از اشتراک کمتری برخوردار هستند. ژن (lctO) فقط در بین *S.iniae* و *S.equi subsp zooepidermis* مشترک است(Mata و همکاران ۲۰۰۴a). لیکن برای شناسایی خصوصیات دیگر و یا در واقع پلی مورفیسمی که منجر به ایجاد تیپهای مختلف بر اساس نواحی جغرافیایی و یا حتی نوع میزبان میشود از Rapid – PCR استفاده میگردد. امروزه این روش، روشی کاربردی در تحقیقات

اپیدمیولوژیکی است. با این روش خط سیر عفونت، منشا و نیز کلون های ثابت ایجاد کننده عفونت در مزارع و نواحی مختلف شناسایی می شود(Romald و همکاران ۱۹۹۹). از آنجایی که گاهی بروز استرپتوکوکوزیس می تواند ناشی از چند عامل باشد، جهت شناسایی بهتر و در مدت زمان کوتاهتر روشهای multiplex PCR ابداع شد که هم زمان چند جنس و گونه را شناسایی می کند. برای مثال Mata و همکاران(b۲۰۰۴) توانستند یک multiplex PCR طراحی کنند که بوسیله آن سه عامل بروز استرپتوکوکوزیس در ماهیان گرمابی شامل *S. iniae*، *S. difficilic(agalactiae)* و *S. parauberis* را شناسایی کند. این روش نه تنها در نمونه خالص باکتری بلکه در بافت ماهی نیز قادر به ردیابی پاتوژنهای فوق بود. در کنار تکنیکهای مولکولی جهت تایید تشخیص معمولا از روشهای دیگری نیز استفاده می شود که می توان به تکنیک آنتی بادی فلورسنت غیر مستقیم (IFAT) اشاره نمود که با استفاده از مونوکلنال آنتی بادی روشی بسیار حساس، دقیق با ویژگی بالا است. از این روش Klesius و همکاران (۲۰۰۶) جهت شناسایی *S.iniae* استفاده نمودند. این روش قادر است تا ۱۰ باکتری را شناسایی کند. با توجه به خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری نیاز به روشی سریع و آسان برای تشخیص میباشد. از این روش برای تشخیص باکتری بدست آمده از کشت آب، رسوبات، وسایل پرورش، غذای ماهی و نیز پوست ماهی می توان استفاده کرد.

۵-۱-چشم انداز استرپتوکوکوزیس در ایران

بیماری استرپتوکوکوزیس در ایران برای اولین بار از یکی از مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان منطقه هراز در استان مازندران گزارش گردیدکه عامل آن نیز باکتری *S. fecium* بود (قیاسی و همکاران ۱۳۷۹) و بعد از آن بیماری در اثر *S. iniae* در استان فارس گزارش شد(اخلاقی و کشاورزی ۱۳۸۱) و بتدریج نه تنها بروز بیماری بلکه شیوع و تنوع عوامل ایجاد کننده آن نیز افزایش یافت. قلی پور کنعانی و همکاران (۱۳۸۶و ۲۰۰۹) بروز استرپتوکوکوزیس را با جداسازی باکتری *S. fecium* از استان خراسان گزارش کرده است. در مطالعه دیگری در استان مازندران جداسازی *S. fecium* گزارش شده است (قیاسی و زاهدی۱۳۸۶). سلطانی و نیکبخت بروجنی(۱۳۸۶) طی یک مطالعه اپیدمیولوژیکی دو ساله نشان دادند که استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه دو باکتری بسیار مهم در برخی از مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان استانهای مطرح در تولید این ماهی در ایران هستند. موسوی (۱۳۸۶) طی یک بررسی یک ساله از ۱۲ مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران مبادرت به شناسایی باکترهای گرم مثبت بیماریزا نمود. در این بررسی پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی باکتریهای *S. milleri*، *S. agalactiae*، *S. iniae* و *Enterococcus fecalis* شناسایی شدند. در مطالعه ای دو ساله بر روی عوامل رایج استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در استان فارس از ۴ مزرعه ۶۰۰ عدد ماهی واجد علایم بالینی نمونه برداری و از کلیه، مغز و کبد آنها کشت تهیه گردید. در مجموع ۴۸۰ پرگنه بدست آمد که از این تعداد ۳۹۰ نمونه *S. iniae* و ۹۰ نمونه *L. garvieae* شناسایی

شد(Soltsni & Tarahomi 2009). در بررسی دیگری در استان اصفهان ۷۲ عدد ماهی با وزن ۲۰۰ – ۱۵۰ گرم واجد علایم بالینی از ۶ مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان نمونه برداری و در آزمایشگاه از کلیه و کبد آنها کشت میکروبی انجام شد. از تمام نمونه های فوق باکتری استرپتوکوکوس جدا سازی شد(Mohammadi Arani وMoghadas 2009). در بررسی علل تلفات ایجاد شده در سه مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان با علایم بالینی مشکوک به استرپتوکوکوزیس در منطقه سندگان استان چهار محال بختیاری پس از کشت و خالص سازی باکتری با استفاده از روش PCR و دو پرایمر pLG1 و pLG2 مشخص شد باکتری عامل بیماری *L. garvieae* بوده است(Fadaeifard *et al*., 2011). در بررسی دیگری بروز بیماری و تلفات در قزل آلای رنگین کمان پرورشی ناشی از باکتری استرپتوکوکوس از استان همدان گزارش شده است(Habibipour و Bayat 2009). هوشمند و حقیقی(۱۳۸۸) در بررسی علل تلفات یک مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان در غرب استان گیلان توانستند باکتری *S. disgalacteae* را جداسازی و شناسایی نمایند.. در تحقیق دیگری وضعیت بیماری استرپتوکوکوزیس در استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت که طی آن از ۱۰۲ مزرعه پرورش ماهیان قزل آلای رنگین کمان ۲۲ مزرعه واجد ماهیانی بودند که علایم بیماری را داشته و در بررسیهای باکتری شناسی وجود باکتری استرپتوکوس اثبات شد(Shahbazian *et al*., 2010).

Heydarynezhad و همکاران (۲۰۱۰) در یک ارزیابی بر پایه تکنیکهای PCR و هیستوپاتولوژی به شناسایی عامل بروز استرپتوکوکوزیس در شهر ایلام پرداختند. در این بررسی بر پایه متد مولکولی باکتری بیماریزا در سه مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان در این شهرستان *L. garvieae* شناسایی شد. در یک مطالعه اپیدمیولوژی استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در مراکز تکثیر و پرورش قزل آلا در ایران تعداد ۱۰۸ نمونه کوکسی گرم مثبت از ماهیان بیمار قزل آلای رنگین کمان ۷ استان کشور طی سالهای ۲۰۰۹ – ۲۰۰۸ جمع آوری گردید. در بررسی اولیه از تستهای تفریقی و بیوشیمیایی ۴۹ نمونه(۴۵/۳۷٪) *S. iniae* و ۳۷ نمونه(۳۵/۲٪) *L. garvieae* و ۲۲ نمونه نیز استرپتوکوکوس با گونه نامشخص شناسایی گردید. لیکن در بررسی با روش PCR برای یافتن باند اختصاصی ۵۰۰bp ، ۶۴ نمونه(۵۹/۲٪) *S. iniae* و ۴۴ نمونه(۴۰/۸٪) *L. garvieae* شناسایی شدند (Haghighi Khiabania *et al*., 2007).

۶-۱-پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه تولید واکسن در ماهیان

به طور کلی واکسن‌های تهیه شده برای ایجاد مصونیت در ماهیان را می توان در سه دسته اصلی قرار داد: واکسن کشته تهیه شده از سلول کامل، واکسن زنده تخفیف حدت یافته، واکسن‌های مبتنی بر DNA نوترکیب. استفاده از آدجوان ها، محرک های ایمنی یاحامل های واکسن موجب گردیده تا کارایی واکسن ها به طور قابل توجهی بهبود یابد. با این حال هنوز راه های تجویز واکسن از عواملی است که می تواند کارایی واکسن ها را تحت تاثیر قرار دهد. بطور کلی در ماهیان تجویز واکسن به شیوه تزریقی در مقایسه با واکسیناسیون از طریق غوطه وری

برتری دارد. معهذا،یکی از نکاتی که باید به آن توجه نمود مدت زمان مصونیت ایجاد شده با استفاده از راههای تجویز اختصاصی است. در حال حاضر تنها شش واکسن تجاری جهت واکسیناسیون ماهی ها وجود دارد. از این تعداد پنج واکسن کشته شده با فرمالین منشاء باکتریایی دارند. این واکسن ها عبارتند از: واکسن های یرسینیا راکری(*Yersinia ruckeri*)، ویبریو آنگوئیلاروم(*Vibrio anguillarum*)، ویبریو سالمونیسیدا(*V. salmonicida*) ، ویبریو اوردالی(*V. ordalli*) و آئروموناس سالمونیسیدا(*Aeromonas salmonicida*). ششمین واکسن یک واکسن نوترکیب است که ماهی را در مقابل ابتلاءبه ویروس نکروز عفونی پانکراس مصون می نماید Hegde and Sin, (2006).

۷-۱-برخی از پیشرفت‌های اخیر در مورد واکسن‌های ماهیان با تاکید بر ابداع واکسن بر پایه DNA نوترکیب

واکسن کشته تهیه شده از سلول کامل

این نوع واکسن ها سوسپانسیونی متشکل از عوامل بیماریزای کشته شده بوسیله حرارت یا مواد شیمیایی هستند که پس از تجویز قادر به تحریک پاسخ ایمنی اختصاصی بر ضد آن عوامل بیماریزا می‌باشند. این واکسن‌ها در کنترل برخی از عوامل مهم بیماریزای باکتریایی ماهیان نظیرویبریو آنگوئیلاروم ، ویبریو سالمونیسیدا ، اوردالی ، یرسینیا راکری و آئروموناس سالمونیسیدا کاربرد زیادی داشته اند. این نوع واکسن‌های کشته شده که به صورت تجاری در دسترس می باشند، واکسن‌هایی هستند که از سلول کامل تهیه شده و با استفاده از فرمالین غیر فعال می گردند و ممکن است همراه با آدجوان ها و یا به تنهایی تجویز شوند . این واکسن ها بر علیه عوامل بیماریزای فوق ایمنی محافظت کننده قابل توجهی ایجاد می نمایند و تولید آنها هزینه چندانی در بر ندارد، اما تا کنون مشخص نگردیده کدامیک از آنتی ژن های اختصاصی موجود در این واکسن ها در ایجاد مصونیت دخالت دارند. اگرچه محققین معتقدند در بسیاری از موارد لیپوپلی ساکاریدها مواد اصلی ایمنی زا می‌باشند. بنابراین، چنانچه تلاش ها در جهت انتخاب سویه مطلوب واکسن، سروتیپ و یا زیر مجموعه آنتی‌ژنی غالب در هر منطقه جغرافیایی سوق داده شود کارایی و اثر بخشی واکسن های فوق به میزان قابل توجهی افزایش خواهد یافت. علاوه بر این ، مشخص شدن عوامل آنتی‌ژنی و حدت سویه هایی که در ایجاد مصونیت از اهمیت برخوردارند در تولید واکسن‌هایی با ایمنی زایی بیشتر نقش بسزایی خواهند داشت.

امروزه واکسن های کشته شده برای ایجاد مصونیت در مقابل برخی از ویروس‌های بیماریزای ماهیان نظیر ویروس نکروز پانکراتیک عفونی، ویروس نکروز خونساز عفونی، ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی، ویروس ویرمی بهاره کپور ماهیان در دسترس می باشد. تزریق واکسن کشته شده ویروس نکروز پانکراس عفونی به بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مصونیت قابل ملاحظه ای را دربرابر این بیماری ویروسی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ایجاد می‌نماید ،اما هنگامی که این واکسن در ماهی قزل‌الای نهری همراه با

آدجوان کامل فروند تجویز شود، پاسخ هومورال قوی اما با مصونیتی اندک ایجاد می کند. همچنین در ماهی قزل آلای رنگین کمان استفاده موفقیت آمیز از واکسن کشته شده ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی نیز گزارش شده است. چنانچه واکسن غیر فعال شده با فرمالین ویروس نکروز خونساز عفونی با غلظت زیاد برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تجویز گردد ، واکسن قادر است در ماهیان واکسینه شده ایمنی محافظت کننده ای ایجاد کند. هر چندکاربرد کلیه واکسن‌های فوق در مقیاس آزمایشگاهی نتایج امیدوار کننده ای در بر داشته، اما تا کنون بجز واکسن کشته شده ویروس ویرمی بهاره کپور هیچیک برای استفاده به صورت تجاری در دسترس نیستند. واکسن کشته شده ویروس ویرمی بهاره کپور شامل دو سویه غیر فعال شده ویروس ویرمی بهاره کپور است که به صورت تعلیق در روغن در دسترس می باشد.

علیرغم کارایی واکسن های کشته ویروسی در ایجاد مصونیت در ماهیان، چنین واکسن هایی دارای معایبی نیز هستند. از جمله این معایب می توان به هزینه زیاد برای تهیه آنها در کشت سلول و خالص سازی و عرضه دشوار آنها اشاره نمود. از سویی واکسن‌های کشته شده به تنهایی فقط پاسخ ایمنی هومورال را فعال نموده و بر پاسخ ایمنی سلولی تاثیری ندارند. و پس از ایجاد ایمنی توسط چنین واکسن هایی ایمنی ایجاد شده به مرور زمان کاهش یافته و از بین می رود و بنابراین برای حفظ سطوح ایمنی تجویز دوزهای یادآور واکسن ضروری خواهد بود(Hegde and Sin, 2006).

۱-۷-۱-واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته

واکسن زنده تخفیف حدت یافته سوسپانسیونی متشکل از عوامل بیماریزای زنده ضعیف شده است که می تواند در داخل بدن میزبان همانند سازی نموده و پاسخ ایمنی محافظت کننده ای را ایجاد نماید، اما قادر به ایجاد بیماری نیست. این نوع واکسن هاهمانند عوامل بیماریزا یک عفونت واقعی را ایجاد می کنند و بنابراین دوز اندک چنین واکسن هایی جهت تحریک پاسخ ایمنی محافظت کننده ای که مدتها ی طولانی دوام داشته باشدکافی است. واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را تحریک می‌نمایند. این نوع واکسن ها قادرند بخوبی پاسخ ایمنی با واسطه سلولی را تحریک نمایند. بطوری که واکسن های تخفیف حدت یافته ترجیحاً پاسخ تکثیر لمفوسیت های T درمقایسه با پاسخ‌های لمفوسیت B را افزایش می‌دهند. در حال حاضر واکسن‌های ویروسی زنده بر ضد ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده، ویروس نکروز عفونی بافت خونساز و ویروس نکروز عفونی پانکراس جهت ایجاد مصونیت در ماهیان در دسترس می باشند. همچنین با پاساژهای متوالی و پی در پی ویروس نکروز پانکراس عفونی در سلول های RTG2 سویه هایی فاقد حدت از این ویروس بدست آمده است. علاوه بر این برخی از سویه های جدا شده از ماهیان مبتلا نیز به عنوان واکسن های زنده مورد استفاده قرار گرفته اند. سویه‌های فاقد حدت ویروس نکروز عفونی بافت خونساز نیز بعنوان واکسن زنده مورد استفاده قرار گرفته اند. همچنین با پاساژهای متوالی و پی در پی ویروس سپتی سمی

خونریزی دهنده در رده های سلولی کپور ماهیان با افزایش دما واکسن زنده تخفیف حدت یافته ای از این ویروس تهیه شده است. پس از ایجاد ایمنی در ماهیان طلایی با تزریق داخل صفاقی و غوطه وری آنها با تومیت‌های زنده ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس(*Ichthyophthirius multifiliis*) وتترا هایمنا پیریفورمیس( ) *Tetrahymena pyriformis* این ماهیان در مقابل برخی از انگل های خارجی شایع مقاوم گردیدند. در ماهیان ایمن شده بدین طریق عیار های بالای آنتی بادی در پلاسما وموکوس پوست مشاهده شده است.

اگرچه برخی از این واکسن‌ها به عنوان واکسن‌های زنده در مقیاس آزمایشگاهی مفید می‌باشند، اما تا کنون هیچیک از این واکسن ها مجوز استفاده در شرایط میدانی را کسب ننموده اند. شاید از علل عمده چنین نقیصه ای بتوان به وجود معایب احتمالی این نوع واکسن ها نظیر نگرانی از حدت یافتن آنها در گونه های غیر هدف، احتمال بیماری زا شدن آنها و مشکلات توام با بر جای ماندن حدت این نوع واکسن اشاره نمود Hegde and (Sin, 2006).

۲-۷-۱-واکسن‌های مبتنی بر DNA نوترکیب

در سه دهه اخیر پیشرفت‌هایی که در زمینه تحقیق بیولوژی مولکولی خصوصاً ابداع فناوری DNA نوترکیب حاصل شده تاثیر عمیقی در بهبود تحقیق پزشکی زیستی بر جای گذاشته است. در دهه های اخیر سیستم های ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی در انسان ، حیوانات و ماهیان بطور عمیقی مورد بررسی قرار گرفته است. در طول این سال ها همچنین مکانیسم‌های مولکولی ایجاد عفونت، پاسخ ایمنی و اساس مولکولی حدت و بیماریزایی عوامل بیماریزا تشریح و توصیف گردیده است. علاوه بر این در طول این سال ها انواع مختلف واکسن‌ها و آدجوان‌ها که پروتئین های ایمنی زای ضعیف را برای کار کردی بهتر تقویت می کنند ابداع شده اند.

بطور خلاصه، DNA نوترکیب نوعی فناوری است که بوسیله آن با جای دادن ملکول های اسید نوکلئیک از طریق یک سیستم حامل در خارج سلول ترکیبات جدیدی از مواد ژنتیکی تشکیل می شود. این فناوری به طور گسترده ای در تولید واکسن‌های جدیدی مورد استفاده قرار گرفته است که مجموعاً از آنها بعنوان واکسن‌های مبتنی بر DNA نوترکیب و یا واکسن‌های نسل جدید یاد می شود.تا کنون چهار نوع واکسن مبتنی بر فناوری DNA نوترکیب تولید شده است . این واکسن ها عبارتند از: (i) واکسن های پروتئینی ایمنی‌زای نوترکیب یا اپی‌توپ‌های خالص شده ای از ناقلین که حامل ژن مورد نظر در سیستم‌های بیان پروکاریوتی یا یوکاریوتی است. (ii) واکسن‌های پپتیدی (iii) واکسن‌های زنده ای که از طریق دستکاریهای ژنتیکی مشخص و حاملین میکروبی ژن کد کننده پروتئین ایمنی‌زا تولید می‌شوند (iv) واکسن‌های DNA. از ده سال پیش تا کنون تحقیقات بسیاری در زمینه تولید واکسن‌های مبتنی بر پایه فناوری DNA نوترکیب صورت گرفته است و بسیاری از این واکسن‌ها از نظر کارایی و پاسخ ایمنی در ماهیان مورد آزمایش قرار گرفته اند(Hegde and Sin, 2006).

۳-۷-۱-واکسن‌های پروتئینی نوترکیب

به طور کلی، تولید یک واکسن پروتئینی نوترکیب با شناسایی زیرواحدهای ایمن‌زا و یا پروتئین خاصی در عوامل بیماریزا آغاز شده و سپس ایمنی‌زایی آن در حیوانات تجربی و شرایط آزمایشگاهی مورد تایید قرار می گیرد. برای مثال در تحقیقی گلیکوپروتئین های خالص شده از ویروسهای IHNV و VHSV به عنوان واکسن‌های زیر واحد در ماهیان مورداستفاده قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که گلیکوپروتئین های مذکور دارای خاصیت ایمنی زایی می‌باشند . سپس این پروتئین ها به طور گسترده ای برای تولید واکسن نوترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین، در مطالعه مشابهی نشان داده شد که در کپور ماهیان واکسن زیر واحد فاقد RNA ویروس هموراژیک ماهی آمور که در محلول نمکی رقیق با NP40 یک درصد تحت تاثیر قرار گرفته بود می تواند در این ماهیان بیشتر از ۸۰ درصد مصونیت ایجاد نماید. هرگاه، پروتئین‌های ایمنی‌زا و یا زیر واحدهای عامل بیماریزا شناسایی گردند، می توان ژن یا ژن های کد کننده آنها را به یک حامل معرفی نمود، در این صورت ژن های مذکور به میزان قابل توجهی در حامل بیان شده و در چنین شرایطی می‌توان از آنها به عنوان واکسن‌های پروتئینی نوترکیب استفاده نمود.

ویروس‌ها یا پلاسمیدهای باکتریایی سیستم های حاملی هستند که بطور معمول برای بیان پروتئین های نوترکیب وسلول های پروکاریوتی و یوکاریوتی بعنوان سیستم‌های بیان مورد استفاده قرار می گیرند. سیستم بیان پروکاریوتی شامل باکتری‌هایی نظیر اشیرشیا کلی(*Escherichia coli*) و سیستم بیان یوکاریوتی شامل مخمرها، سلول های حشرات و سلول های پستانداران است. در هریک از این دو سیستم محاسن و معایب ذاتی چندی وجود دارد. از مشکلات اساسی سیستم‌های پروکاریوتی (همانند باکتری‌ها) عدم وجود سیگنالهای مورد نیاز برای تغییرات مناسب پس از ترجمه و نتیجتاً چین خوردگی ناقص و فقدان گلیکولیزه شدن پروتئین ها می باشد که این امر منجر به تولید پروتئین‌هایی با ویژگی های آنتی ژنی غیر قابل پیش بینی می‌گردد. در مواردی، تولید پروتئین های نوترکیب به شکل گنجیدگی ها یا ذرات داخلی است. قبل از اینکه چنین پروتئین هایی بتوانند به عنوان واکسن مورد استفاده قرار گیرند لازم است تحت تاثیر فعل و انفعالات بیوشیمیایی نظیر تغییر ماهیت و بازیابی ماهیت واقع شوند. این نوع تغییرات شیمیایی ایمنی زایی پروتئین را کاهش می دهد. از محاسن آشکار سیستم بیان پروکاریوتی می توان به بیان پروتئین نوترکیب با مقادیر بالا، (غالباً بیش از ۳۰ درصد)، مطالعه مطلوب سیستم ژنتیکی و تخمیر اشریشیا کلی و افزایش تولید واکسن اشاره نمود. در مورد سیستم بیان یوکاریوتی، اگرچه مشکلاتی از قبیل چین خوردگی و گلیکولیزه شدن وجود ندارد، اما محصول نهایی پروتئین بیان شده پایین ناچیز بوده و افزایش فرآیند تولید دشوار خواهد بود.

اخیراً، برخی از پروتئین‌های آنتی‌ژنی در گیاهان بیان شده اند برای مثال آنتی‌ژن‌های ویروس هاری و طاعون گاوی در گیاهان بیان شده اند که از آنها برای ایجاد ایمنی استفاده شده است و مطالعات متعددی در مورد ایمنی زایی این نوع پروتئین ها به صورت واکسن های خوراکی در حیوانات انجام پذیرفته است. با توجه به چنین

نتایجی می توان امیدوار بود که در آینده تولید واکسن های ماهی در گیاه نیز امکان پذیر گردد. هر چند ممکن است تاحصول فرآیند کامل این فن آوری و ورود چنین واکسن هایی به بازار راه طولانی در پیش باشد.
بنابراین، به علل متعددی می توان انتظار داشت که سیستم بیان پروکاریوتی مناسب ترین سیستم برای تولید پروتئین نوترکیب باشد. در سیستم های بیان پروکاریوتی برای حفظ خصوصیت آنتی‌ژنی پروتئین نوترکیب تولید شده اقدامات مختلفی از قبیل تولید پروتئین در غشاء پری‌پلاسم با اتصال پپتیدی مناسب،کند کردن روند تولید پروتئین از طریق استفاده از درجه حرارت های پائین (به طوری که پروتئین تولید شده محلول باشند) و استفاده از ملکول های همراه نظیر GroEL و GroES صورت پذیرفته است. در ماهیان برای تولید آنتی‌ژن‌های ویروسی، باکتریایی و انگلی هر دو سیستم بیان پروکاریوتی و یوکاریوتی و عمدتاً سیستم های بیان پروکاریوتی مورد استفاده قرار گرفته اند(Hegde and Sin, 2006).

۴-۷-۱-واکسن‌های پروتئینی نوترکیب برای بیماری ویروسی ماهیان

در این مورد واکسن های ویروس نکروز عفونی پانکراس و ویروس نکروز عفونی بافت خونساز را می توان نـام برد.

۵-۷-۱-واکسن‌های ویروسی تولید شده در سلول‌های یوکاریوتی برای ماهیان

تاکنون علاوه بر سلول‌های پروکاریوتی، چندین سلول یوکاریوتی نظیر سلول‌های حشرات به عنوان میزبان برای بیان پروتئین نوترکیب همراه با باکولاویروس بعنوان ناقل برای تولید پروتئین های ویروسی ماهی مورد استفاده قرار گرفته اند . پلی‌پروتئین ویروس نکروزعفونی پانکراس و گلیکوپروتئین ویروس نکروز عفونی بافت خون ساز در باکولا ویروس بیان شده و از خود خاصیت آنتی ژنی نشان داده اند، اما تا کنون کارایی آنها در ایمنی محافظت کننده ماهی مورد آزمایش قرار نگرفته است. همچنین ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده می‌تواند در سلول های حشرات همانندسازی نموده و از نظر بیولوژیکی پروتئین‌های فعالی را تولید نماید که ایمنی محافظت کننده بیشتری را در مقایسه با واکسن کشته شده این ویروس ایجاد می کند. با این حال، مشکل عمده آن است که علاوه بر تولید این گلیکوپروتئین نوترکیب، سلول‌های حشرات ذرات باکولا ویروس را نیز تولید می‌نمایند. این امر سبب بروز مشکلاتی در خالص‌سازی پروتئین بیان شده می گردد زیرا قبل از اینکه این پروتئین بیان شده بعنوان واکسن مورد استفاده قرار گیرد ذرات باکولا ویروس غیرفعال می شوند. از سویی، هنگامی‌که این گلیکوپروتئین در مخمر ساکارومیسس سرویزیه(*Saccharomyces cerevi siae*) بیان شود به عنوان یک پروتئین با طول کامل در مقایسه با پروتئین های بیان شده در باکتری ها و سلول حشره نتیجه بهتری در بر دارد. با توجه به اینکه پروتئین‌های بیان شده در مخمر قادرند بیشترین ایمنی محافظت کننده را ایجاد کنند، انجام تحقیقات بیشتر با استفاده از واکسن های ویروسی بیان شده در مخمردر بیماری هایی از قبیل سپتی سمی

خونریزی دهنده ویروسی ارزشمند است. اما تنها نقیصه ای که در سیستم های بیان مخمری وجود دارد آن است که محصول پروتئین بیان شده در سیستم های بیان مخمری در حدود ۱٪ است که این میزان در مقایسه با سیستم های بیان باکتریایی بسیار اندک است(در سیستم های بیان باکتریایی میزان محصول پروتئین ۳۰٪ است) Hegde (and Sin, 2006).

۶-۷-۱- واکسن پروتئینی نوترکیب برای بیماری‌های باکتریایی ماهیان

در طول سالیان گذشته برخی از فرآورده های خارج سلولی با کتریایی در ماهیان از قبیل پروتئازها و پروتئین‌های خارج غشایی تنظیم شده با آهن برای تولید واکسن نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن‌های هدف مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفته اند. پروتئین اتصالی پروتئازسرین ۷۰ کیلودالتونی در آئروموناس سالمونیسیدا کلون و بیان شده و بعنوان یک واکسن الگو استفاده گردیده است. بسیاری از محققین در سرتاسر دنیا استفاده بالقوه از پروتئین‌های غشاء خارجی را بعنوان واکسن مورد مطالعه قرار داده اند.همچنین ژن همولیزین باکتری آئروموناس سالمونیسیدا کلون گردیده است. اما با این حال، تا کنون گزارشی مبنی بر ایمنی زایی این پروتئین در موجودات زنده در دسترس نیست. از این پروتئین‌های نوترکیب می توان بعنوان واکسن استفاده نمود. اخیراً، برخی از محققین گزارش کرده اند که می توان از یک پروتئین الصاقی (Adhesion) جدا شده از آئروموناس هیدروفیلا که ۴۳ کیلو دالتون وزن دارد و از پروتئین های غشا خارجی این باکتری محسوب می شود به عنوان واکسن استفاده نمود. چنانچه این پروتئین همراه با آدجوان کامل فروند تجویز شود قادر است هر دوسیستم ایمنی هومورال و ایمنی سلولی را تقویت کند. تصور می شود که آنتی‌بادی ضد این پروتئین می‌تواند از طریق ممانعت از اتصال و تهاجم باکتری به داخل سلول بعنوان اولین سد دفاعی عمل کند. این در حالی است که سیتوکین های تولید شده توسط لکوسیت‌های ایمن و ماکروفاژهای فعال می توانند از طریق کاهش دادن باکتری های مهاجم بعنوان دومین سد دفاعی عمل نمایند.اخیراً، یک واکسن نوترکیب پروتئینی از این پروتئین چسبنده آئروموناس هیدروفیلا تهیه شده است(Hegde and Sin, 2006).

۷-۷-۱-واکسن پروتئینی نوترکیب برای بیماری‌های انگلی ماهیان

از بین عوامل انگلی آلوده کننده ماهیان انگل های مهمی نظیر ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس *Ichthyophthirius multifilis*) ، آمیلودیلیوم اوسلاتیوم(*Amyloodilium ocellatiu*)، کریپتوبیا سالموسیتیکا (*Cryptobia salmositica*) و لپیوفتریوس سالمونیس (*Lepeophtherius salmonis*) نامزدهای مناسبی برای تولید واکسن محسوب می شوند. ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس از عوامل بیماریزای ماهیان آب شیرین، ماهیان پرورشی و ماهیان آکواریومی است. این انگل تک یاخته ی مژک داری است که در ماهیان موجب بیماری لکه سفید می شود و بطور معمول از آن به عنوان "ایک" یاد می شود. این تک یاخته بیماری زا عمدتاً آبشش و پوست را مورد تهاجم قرار می

دهد. این انگل دارای سیکل زندگی پیچیده‌ای است. تومیت‌های عفونت زای انگل در زیر اپیتلیوم پوست ماهیان آلوده جایگزین شده و سپس به تروفوزوئیت هایی که مرحله تغذیه کننده انگل محسوب می شوند تبدیل می شوند. پس از آنکه انگل در اندام هدف بالغ شد پوست را ترک نموده و تشکیل کیست می‌دهد. سپس کیست به تومیت‌های عفونت زای متعددی تبدیل می شود که قادرند آزادانه در آب شنا کنند و از این طریق بسیاری از ماهیان سالم دیگر را آلوده نمایند. بنابراین درمان بیماری با مواد شیمیایی در شرایطی که تومیت‌های انگلی در داخل بافت‌های ماهی جایگزین شده اند دشوار می باشد. علاوه بر این ممکن است مواد شیمیایی به علت اثرات جانبی زیان آور سلامت ماهیان را با خطر مواجه کنند. بنابراین در حال حاضر تلاش‌ها در جهت درک بهتری از پاسخ ایمنی ماهیان در برابر این تک یاخته بیماریزا و تولید واکسن معطوف شده است. ایمنی اکتسابی محافظت کننده در برابر ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس در طیف وسیعی از ماهیان مانند کپور، ماهی حوض، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و تیلاپیا گزارش گردیده است. ماهیانی که در برابر آلودگی کشنده بیماری دوام آورند نسبت به آلودگی‌ها بعدی مقاوم می‌شوند. در مورد پاسخ ایمنی ماهی حوض (*Carassiu auratus*) در برابر ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس و تولید واکسن نوترکیب مطالعه ای صورت گرفته است. آنتی‌بادی ثابت و غیر گردشی موجود در موکوس و سرم ماهیان می تواند ماهی را در مقابل عفونت ناشی از این انگل حفاظت نماید. در ایجاد مقامت بر علیه بیماری ایمنی سلولی نیز نقش مهمی در از بین بردن تومیت‌های عفونی ایفا می‌کند. چنانچه ماهیان از طریق آب درمعرض انگل قرار گیرند می توان این موجودات را در مقابل بیماری ایمن نمود. با این حال با توجه به اینکه این انگل انگل اجباری محسوب می شود جمع آوری مقادیر کافی تومیت از ماهیان زنده برای کار عملی دشوار است. بنابراین استفاده از فن‌آوری DNA نوترکیب برای تولید چنین واکسنی باید بعنوان اقتصادی ترین و کاربردی ترین راه مورد توجه قرار گیرد.

در تحقیقات انجام گرفته نشان داده شده است که ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس دارای آنتی‌ژن ثابتی (iAg) است که می تواند نامزد مناسبی برای تولید یک واکسن نوترکیب پروتئینی باشد. در مطالعات انجام شده یک کلون کوچک ازخزانه DNA حلقوی برای این آنتی ژن ۴۸KD جدا ومشخص گردید که توالی اسید آمینه حاصله از این کلون شامل سه تکرار متوالی است. همچنین قطعه ژن کاملی که مسئولیت کدگذاری یک تکرار را بر اساس توالی اسید آمینه این آنتی ژن به عهده دارد سنتز و مونتاژگردیده است. این قطعه به صورت یک پروتئین اس – ترانسفراز[1] برای بیان آنتی ژن I نوترکیب در اشریشیا کلی مورد استفاده قرار می گیرد. تزریق داخل صفاقی پروتئین خالص شده الحاقی همراه باآدجوان کامل فروند موجب گردیده تا در صد بقاء ماهیان ایمن شده در مقایسه با ماهیان غیر ایمن پس از مواجهه آنها با تومیت های عفونت زای ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس بیشتر باشد.

لپتوفتریوس سالمونیس یا شپش آزاد ماهی (*Leptophtrious salmonis*) یک انگل سخت پوست ماهی آزاد است. تولید واکسن بر ضد این عامل بیماریزا هدف تحقیق بسیاری از آزمایشگاهها است. از آنجا که کشت عاری از

جرم این سخت پوست انگلی بیماریزا دشوار است، تولید واکسن برعلیه آن با استفاده از روش های متداول سنتی میسر نیست. درعوض ممکن است واکسن نوترکیب پروتئینی واکسن مطلوبی محسوب شود. با استفاده از فن آوری های موجود مولکول‌های ساختمانی و عمل کننده این انگل از جمله برخی از پروتئازها و لیپازها خالص شده اند، بطوری که بنظر می رسد این ملکول ها پس از ایمن سازی در مقابل تخریب ایمنی پاسخگو می باشند. با استفاده از روش های ایمونوبلاتینگ و تشخیص آنزیمی شناسایی آنتی ژن های موجود خزانه DNA حلقوی مورد بررسی قرار گرفته است. این امر موجب گردیده تا برخی از آنتی ژن های این انگل در تهیه و تولید مورد آزمایش و ارزیابی قرار گیرند. تجویز خوراکی واکسن نوترکیب تهیه شده از آنتی ژن های مذکور می تواند در سطح پوست ماهیان برعلیه این انگل ایمنی محافظت کننده ای ایجاد کند(Hegde and Sin, 2006).

۸-۷-۱-واکسن های پپتیدی

واکسن‌های پپتیدی در حقیقت پپتیدهای صناعی یا ساختگی هستند که پس از تجویز قادرند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمایند. برای تولید واکسن‌های پپتیدی ابتداً لازم است تا نواحی ایمنی زا یا اصطلاحاً جایگاه های آنتی ژنی موجود بر روی پروتئین مورد نظر شناخته شوند. اصطلاح اپی‌توپ یا شاخص آنتی ژنی به قطعه ای از آنتی ژن اطلاق می گردد که دارای ۶-۸ اسید آمینه است. اپیتوپها یا شاخص های آنتی ژنی می توانند بطور اختصاصی به آنتی‌بادی‌ها و یا گیرنده های موجود بر روی لمفوسیت های T ایمن اتصال یابند. آن دسته از شاخص های آنتی ژنی که از طریق لمفوسیت های B اختصاصی به آنتی‌بادی‌ها متصل می گردند شاخص های آنتی ژنی لمفوسیت های B نامیده می‌شوند، در حالیکه شاخص های آنتی ژنی که توسط گیرنده‌های موجود بر روی سطح لمفوسیت های T فعال تشخیص داده می‌شوند اپی‌توپ‌ها یا شاخص های آنتی ژنی لمفوسیت های T نامیده می‌شوند. برای شناسایی شاخص های آنتی ژنی لمفوسیت های B استفاده از آنتی‌بادی‌های تک دودمانی یا مونوکلونال ضروری است. اخیراً برای پیش‌بینی شاخص های آنتی ژنی که بطور طبیعی بر روی سطح پروتئین‌ها قرار گرفته اند بر اساس ساختمان سه بعدی پروتئین ها از تجزیه و تحلیل رایانه ای استفاده می شود متناوباً، باتوجه به این نکته که برای اجتناب از تداخل با آنتی بادی های محافظت کننده نواحی متغییر به علت فشار انتخابی بالا بر روی توالی اسید آمینه پدید می آیند ،از میان سویه‌های متعدد یک عامل بیماری زا ناحیه‌ای با تغییر پذیری توالی بالا انتخاب می شود و چنین ناحیه ای به عنوان یکی از نامزدهای مناسب جهت تولید واکسن پپتیدی صناعی مورد استفاده قرار می گیرد. بسیاری از اپی‌توپ‌های موجود بر روی پروتئین‌ها اپی‌توپ‌های لمفوسیت B می باشند. چنین اپیتوپ هایی به علت چین خوردگی سه بعدی پروتئین ها بوجود می آیند. در حال حاضر نقشه برداری شاخص های آنتی ژنی و استفاده از واکسن ها بر علیه عوامل بیماریزای ماهی در مراحل ابتدایی خود بسر می برد. برخی از شاخص های آنتی ژنی لمفوسیت های B موجود بر روی پروتئین های ویروسی ماهی نظیر گلیکوپروتئین ویروس نکروز عفونی بافت خونساز شناخته شده اند. واکسن‌های پپتیدی صناعی مخلوط شده با

آدجوان کامل فروند در مقایسه با ویروس محلی موجب تولید آنتی‌بادی های خنثی کننده اندکی شده اند. این مسئله نشانگر آن است که پپتید ها به تنهایی در مقایسه با پروتئین محلی ایمنی زایی کمتری دارند. اخیراً پپتیدها ی مشترک متعددی که در محدوده اسیدهای آمینه ۲۷۰-۳۳۶ بر روی گلیکوپروتئین ویروس نکروز عفونی بافت خونساز قرار دارند سنتز شده اند. هر یک از این پپتیدها قبل از ایمن کردن ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و موش های بالبسی ابتدا با سرم آلبومین گاوی آمیخته شده و با آدجوان مخلوط می گردند. در موش هایی که از طریق داخل صفاقی و زیر جلدی ایمن گردیده اند تولید آنتی بادی اختصاصی تحریک می گردد. این پدیده از طریق واکنش گلیکوپروتئین با سرم ها در آزمایش ایمنوبلات قابل اندازه گیری است. در حالیکه، در ماهیانی که از طریق داخل صفاقی و عضلانی ایمن شده اند تنها یک پپتید واجد اسیدهای آمینه ۳۲۱-۳۴۰ موجب تولید آنتی‌سرم ها در ماهی قزل‌آلا می گردد. در مورد ویروس نکروز عفونی پانکراس، برخی از شاخص های آنتی ژنی لمفوسیت B نیز شناخته شده اند. با استفاده چندآنتی بادی مونوکلونال یک شاخص آنتی ژنی خنثی کننده وابسته به لمفوسیت B بر روی پروتئین ویروس نکروز عفونی پانکراس شناخته شده اند. مضافاً، با استفاده از قطعات حذف بیان شده در اشریشیا کلی، پروتئین VP2 ویروس نکروز عفونی پانکراس از سویه SP ویروس، اپی‌توپ موجود در محدوده اسید های آمینه ۲۱۰-۸۶ بر روی VP2 شناسایی گردیده است در حالی‌که اپی‌توپ خنثی کننده دیگری بنام N1-F2 در منطقه اسیدهای آمینه ۳۳۰-۲۰۴ یافت می‌شود. با این حال، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص کارایی این واکسن پپتیدی در حیوان تجربی وجود نداشته است(Hegde and Sin, 2006).

۹-۷-۱-واکسن‌های زنده تغییر یافته از نظر ژنتیکی

برای ایمن کردن ماهیان می توان با دست کاری های ژنتیکی مشخص در عوامل بیماری زا و یا ناقلین میکروبی که حاوی ژن کد کننده پروتئین ایمنی زا هستند از واکسن های زنده استفاده نمود. با توجه به اینکه واکسن‌های زنده در داخل بدن میزبان دریافت کننده همانند عفونت طبیعی عمل می کنند، این واکسن ها قادرند در میزبان ایمنی مناسبی را ایجاد کنند. گزارشات نشان می دهد این نوع واکسن در مقایسه با واکسن های غیرهمانندسازی شونده ایمنی‌زایی بیشتری دارند. درخلال ده سال اخیر، گامهایی توسط محققین مختلف برای تولید چنین واکسن‌های زنده ای برعلیه عوامل بیماری زا در ماهیان برداشته شده است. عدم موفقیت در تولید واکسن های زنده موثر با استفاده از روش های سنتی محققین را بر آن داشته تا تحقیقاتی در جهت تولید واکسن های زنده ای که از نظر ژنتیکی تغییر یافته اند انجام دهند. زیرا فن آوری DNA نوترکیب موجب تضعیف عوامل حدت ونهایتاً کاهش حدت کنترل شده وهدف دار واکسن می گردد. برای دست یافتن به چنین هدفی لازم است مطالعات مختلفی بر روی جنبه های مولکولی عفونت و تجزیه و تحلیل آنتی‌ژن‌های عوامل بیماریزا صورت پذیرد. پس از شناسایی پروتئین ایمنی زا روش های متعددی برای غیر بیماریزا نمودن ویروس وجود دارد. انتخاب یک موتان پایدار غیر بیماریزا برای استفاده به عنوان یک واکسن زنده فرآیند پیچیده ای است به طوری

که در این فرآیند لازم است ویروس ها در شرایط کشت متفاوتی رشد یافته ویا موتاسیون های هدف دار بوسیله انجام آزمایشات مختلف در حیوان تجربی و یا آزمایشگاه مشخص شوند. از بین روش های مختلف انتخاب موتان های تخفیف حدت یافته یا ضعیف شده می توان به روش هایی نظیر سازگاری با رده سلولی نامتجانس ، سازگاری با حرارت بالا و انتخاب موتان های رها شده از آنتی بادی مونوکلونال خنثی کننده نام برد. تصور می شود سازش پذیری این سویه ها با شرایط دشوار فوق ناشی از تغییرات ژنتیکی است که در آنها رخ داده است. چنین تغییراتی موجب می گردد تا حدت این سویه ها تغییر یابد. مضافاً، مطالعات انجام شده بر روی حیوانات و در شرایط آزمایشگاهی می تواند تغییرات ظاهری و فنوتیپی ایجاد شده در این سویه هارا آشکار نموده و از این طریق در انتخاب چنین سویه هایی به عنوان نامزد هایی برای تولید واکسن زنده کمک کننده باشد. تغییرات ژنتیکی مشخصی که منجر به پدید آمدن موتان هایی با فنوتیپ دلخواه می گردد را می توان از طریق ایجاد موتاسیون ها یا جهش های هدف دار در سویه های مختلف ایجاد نمود. با استفاده از بررسی توالی موتان های متعدد آنتی بادی مونوکلونال خنثی کننده، شاخص های آنتی ژنی خنثی کننده بسیاری از ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده که در بیماریزایی این ویروس نقش دارند شناخته شده اند. کلیه موتان ها در نتیجه جهش همزمان در دو قطعه موجود بر روی گلیکوپروتئین حاصل شده اند، یکی در منطقه ای از اسید آمینه ۱۴۰-۱۲۵ و دیگری در منطقه ای از اسید آمینه ۴۳۳-۴۳۰. از بین رفتن جهش در این دو قطعه منجر به بازگشت حالت بیماریزایی و تاییدی بر اهمیت آنها در بیماری زایی ویروس است. بعلاوه، بررسی موتان های مقاوم به حرارت که از طریق کشت ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده در محیط کشت سلولی در دمای ^{o}C۲۵ حاصل شده اند منجر به تولید سویه واکسن بسیار پایداری بنام Mtr-25-2 گردیده است که این سویه در محل ۱۳۹ از سرین تا آسپاراژین تغییر داشته است.اگر چه مطالعات نشان داده است که این سویه فاقد حدت در ماهی قزل‌آلای نابالغ خاصیت ایمنی زایی دارد، اماتاکنون کارآزمایی های میدانی این واکسن زنده گزارش نشده است. واکسن‌های زنده تهیه شده بر علیه برخی از عوامل بیماریزای باکتریایی نظیر آئروموناس سالمونیسیدا و آئروموناس هیدروفیلا برای ایجاد ایمنی بر علیه این اجرام در ماهیان استفاده گردیده است. برای ایجاد جهش و بوجود آوردن باکتری های جهش یافته می توان از روش های مختلفی ازقبیل نوترکیبی همسان یا هومولوگ، ایجاد جهش با کمک ترکیبات شیمیایی و ایجاد جهش از طریق عناصر کوچک و متحرک ژنتیکی (ترانسپوزون = در طول ژنوم خود و یا سایر ژنوم‌های موجود در همان سلول تغییر مکان می‌دهند) استفاده نمود. این باکتری های جهش یافته غیر بیماریزا بوده ومی توان از آنها به عنوان واکسن زنده استفاده نمود. در مراحل بعد لازم است خاصیت از دست رفته باکتری هایی که با استفاده از این روش ها جهش یافته اند از طریق الحاق یا تکمیل ژن با انجام آزمایشات برروی حیوانات یا شرایط آزمایشگاهی مورد تائید قرار گیرد. با استفاده از روش جابجایی اللی ساختار جدیدی از یک سویه جهش یافته آئروموناس سالمونیسیدا گزارش شده است. ژن AroA در مسیر بیوسنتز اسید آمینه حلقوی دخالت دارد به طوری که فقدان این ژن بشدت مسیر آنزیمی مورد نیاز برای بیوسنتز اسیدهای آمینه

حلقوی را تحت تاثیر قرار می دهد. تزریق داخل صفاقی این باکتری جهش یافته در ماهی قزل آلای قهوه ای موجب بروز یک پاسخ ایمنی محافظت کننده گردیده و استفاده ازآن در کارآزمایی های میدانی انجام شده در ماهی آزاد اقیانوس اطلس موفقیت‌آمیز بوده است. سویه های جهش یافته متالو پروتئاز ترانسپوزون Tn-5 در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از خود کاهش حدت نشان داده اند. بعلاوه، در ماهی گورامی آبی و تریکوگاستر تریکوپتروس (*Trichogaster trichopterus*) استفاده از سویه های جهش یافته کند رشد آئروموناس هیدروفیلا که از طریق ترانسپوزون کوچک Tn-5 ایجاد شده اند، توانسته است این موجودات را در مقابل مقادیر کشنده آئروموناس هیدروفیلا بخوبی حفاظت نماید.

برای ایجاد ایمنی حفاظت کننده می توان از برخی ناقلین میکروبی فاقد حدت با تغییرات ژنتیکی مشخص که ژن های بیگانه را با خود حمل می کنند استفاده نمود. به طوری که این محصولات ژنی می تواند در حیوانات بیان شود. در مطالعه ای برای ارزیابی پاسخ ایمنی گربه ماهی جویباری کوچک در مقابل محصول ژن lacZ، ویروس گربه ماهی جویباری فاقد ژن TK به عنوان یک ناقل واکسن برای بیان ژن lacZ اشریشیا کلی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق غوطه ور کردن ماهیان مذکور در محیطی که حاوی این ناقل ویروسی بود موجب بروز پاسخ ایمنی هومورال مطلوبی گردید. در ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان، از سویه غیر بیماریزای A440A آئروموناس سالمونیسیدا بعنوان ناقلی که قادر به حمل اپیتوپ های گلیکوپروتئینی ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده و ویروس نکروز عفونی بافت خونساز است به عنوان یک واکسن زنده استفاده شده است. در ماهیانی که به این طریق ایمن گردیده اند در مقابل سویه های کشنده این دو ویروس ایمنی محافظت کننده قابل توجهی مشاهده شده است(Hegde and Sin, 2006).

۱۰-۷-۱-واکسن‌های DNA

واکسن‌های DNA در حقیقت سوسپانسیونی از پلاسمیدهای باکتریایی است که حامل ژن کد کننده پروتئین ایمنی‌زاست. این ژن خود تحت کنترل یک سیستم پیش برنده یوکاریوتی است. ویژگی‌های اساسی یک واکسن DNA عبارتند از وجود یک منشاء همانند سازی مناسب برای تولید محصولات زیاد پلاسمید در اشریشیا کلی، وجود یک ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک جهت ایجاد رشد انتخابی اشریشیا کلی درآنتی‌بیوتیک، وجود یک تقویت کننده یا پیش برنده و وجود یک توالی پلی آدنیلاسیون نسخه ریبونوکئیک اسید پیامبر(mRNA) برای هدایت و جهت دهی بیان ژن در سلول های پستانداران . بنابراین ابتدا پلاسمیدهای ساخته شده در اشریشیا کلی رشد داده می شوند، سپس خالص گردیده و نهایتاً پس از آنکه در محلول نمکی به صورت سوسپانسیون در آمدند از طریق تزریق عضلانی یا با استفاده از دستگاه تزریق ژن وارد بدن میزبان می‌گردند.

گزارشات موجود نشان می دهد که در پستانداران استفاده از واکسن‌های DNA برای ایجاد ایمنی بر علیه برخی از بیماری ها توانسته است آنها را در مقابل بیماری های مربوطه حفاظت کند. اخیراً برخی از این واکسن ها در

کار آزمایی های بالینی مورد ارزیابی قرار گرفته اند. همچنین استفاده از واکسن های DNA در ماهیان استفاده شده نتایج بسیار امیدوار کننده ای به همراه داشته است. متعاقب تزریق داخل عضلانی سازه های پلاسمید ی حامل ژن دلخواه و ژن گزارشگر بیان موثری از ژن های گزارشگر در سلول های عضلانی گزارش شده است. هنگامیکه پلاسمیدهای حامل ژن لوسیفراز تحت کنترل ویروس سیتومگال با دوز ۵۰ میکروگرم DNA به ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تزریق شود، ۵ تا ۷ روز پس از تزریق حداکثر فعالیت لوسیفرازمشاهده می‌شود و فعالیت لوسیفراز تا ۱۱۵ روز باقی می‌ماند. تزریق پلاسمیدهای حامل ژن لوسیفراز در یک غلظت مشخص DNA به ماهی و موش موجب افزایش فعالیت لوسیفراز در ماهی در مقایسه با موشها شده است . هنگامی که این پلاسمید ها با دوز یک میلی گرم DNA تزریق شود فعالیت لوسیفرازدر سلول های عضلانی بیش از ۱۲ هفته باقی می ماند. تزریق توام پلاسمیدهای حامل ژن های گلیکوپروتئین ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده و ویروس نکروز عفونی بافت خونساز نشان می‌دهد که DNA پلاسمید در سلول‌های عضلانی تا ۴۵ روز باقی می‌ماند.

استفاده از واکسن های DNA برای ایجاد ایمنی موجب برانگیخته شدن هر دو نوع پاسخ ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی در میزبان می شود. در کار آزمایی های بالینی انجام شده بر روی مدل حیوانی به علت ایجاد آنتی بادی های اختصاصی و آغاز پاسخ‌های لمفوسیت های T سطوح بالایی از مصونیت مشاهده شده است. در ماهی قزل آلای رنگین کمان متعاقب تزریق سازه ای که پروتئین G ویروس نکروز خونریزی دهنده عفونی را کد گذاری می کند مصونیت قابل توجهی در ماهیان بر علیه این ویروس مشاهده شده است. ایجاد ایمنی با استفاده از واکسن های DNA در مرحله اول از طریق تحریک آلفایا بتا اینترفرون موجب تحریک پاسخ ایمنی غیر اختصاصی و در مرحله بعد موجب تحریک پاسخ ایمنی اختصاصی می گردد. در ماهی قزل‌الای رنگین کمان تزریق پلاسمیدهای حامل ژن G ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده به تنهایی و یا همراه با سازه ای که حامل ژن N می‌باشد، می تواند این موجودات را در مقابل ویروس نکروز عفونی خونریزی دهنده حفاظت نماید. هنگامی‌که سازه ی حامل ژن G ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده و ژن لوسیفراز همراه با یکدیگر به ماهی قزل آلای رنگین کمان تزریق شوند در سلول‌های عضله ماهی کاهش سریع فعالیت ژن لوسیفراز مشاهده می‌شود. این ماهیان باکشتن سلول های آلوده میزبان و کاهش بیان ژن G و ژن لوسیفراز موجب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی سلولی می گردند. در مواردی که پلاسمیدها همراه با گلیکوپروتئین ویروس نکروز عفونی بافت خونساز و ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده تجویز شوند، سنتز سطوح بالای آنتی بادی های اختصاصی خنثی کننده ومحافظت کننده مشاهده شده است. بعلاوه، سلول‌های اختصاصی سیستم ایمنی و مکانیسم‌های دفاع غیراختصاصی از طریق تشخیص اسید ریبونوکلئیک های پیامبر سیستم سازگاری نسجی کلاس ۲ و پروتئین Mx قابل تشخیص اند.

صرفنظر از وارد کردن بخشی از ژنوم یک عامل بیماریزا که کد گذاری یک پروتئین ایمنی زا را به عهده دارد، می توان ژن کد کننده برای یک آنتی بادی را که عامل بیماریزا را مورد هدف قرار داده و آن را از بین می برد

وارد کرد. پس از تزریق داخل عضلانی سازه های ژنی کد کننده آنتی بادی های یک زنجیره ای به ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان این موجودات بر علیه ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده محافظت می گردند. این سازه های ژنی بااستفاده از بخش های متغیر ژن های زنجیره سنگین و سبک ایمونوگلوبولین که از یک مخزن اسید دزاکسی ریبونوکئیک حلقوی سلول های هیبرید تولید کننده آنتی بادی های مونوکلونال بر علیه ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده کلون شده تهیه شده اند و در مرحله بعد با استفاده از یک جداکننده ۱۴ اسید آمینه ای به یک ژن جایگاه ثابت زنجیره کاپای انسانی در انتهای '3 متصل گردیده اند. در سرم ماهیانی که این سازه های ژنی به آنها تزریق شده آنتی‌بادی‌های نوترکیب تشخیص داده شده است. در این حیوانات محافظت ایمنی آشکاری بر علیه ویروس زنده مشاهده می شود که این محافظت بسیار اختصاصی است.

برخی از محققین معتقدندکه واکسن‌های DNA فاقد معایب سایر واکسن ها بوده و از این نظر بر آنها برتری دارند. مزیت اصلی واکسن‌های DNA در مقایسه با واکسن های نوترکیب پروتئینی توانایی این واکسن ها در تحریک تولید شکل بومی ومحلی پروتئین با ایجاد تغییرات یا اصلاحات مناسب پس از ترجمه در این پروتئین ها است. این امر در مورد ایمنی‌زایی واکسن های DNA در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به اثبات رسیده است. پس از تزریق پلاسمیدهای حامل ژن پروتئین G ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده، پروتئین G بیان شده بوسیله آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی تشخیص داده می‌شود. واکسن‌های DNA از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده و بی خطر هستند و مضافاً این واکسن ها قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی طولانی مدت می باشند. با توجه به اینکه غالب عوامل بیماریزای ماهی، بویژه ویروس ها این موجودات را در سنین بسیار پائین مبتلا می سازند، استفاده عملی واکسن های DNA در ماهی بنظر امیدوار کننده نیست. تجویز چنین واکسن هایی به ماهیان کوچک از طریق تزریق که تنها راه تجویز واکسن های DNA است، دشوار می نماید. با این حال ، روش های فعلی تجویز واکسن DNA نظیر استفاده از ماشین های تزریق هنوز برای ایجاد مصونیت در ماهیان مولد نسبتاً بزرگ روشی سودمند بشمار می رود. این مسئله با انتقال غیرفعال ایمنی از مادر به فرزندان به اثبات رسیده است بطوریکه این امر در کنترل بیماری Ich اثبات گردیده است. بنابراین، استفاده از واکسن‌های DNA برای تک تک ماهیان در آبزی‌پروری متراکم در مقیاس وسیع دشوار است مگر اینکه بتوان واکسن DNA را از طریق خوراکی و یا بافت آبششی در محیط آبی وارد بدن ماهیان نمود (Hegde and Sin, 2006)

۸-۱-فرضیات

۱- امکان بیان ژن بیماریزای *Streptococcus iniae* در باکتری *Lctococcus lactis* وجود دارد.

۲- امکان تولید واکسن نوترکیب علیه استرپتوکوکوزیس در قزل آلای رنگین کمان وجود دارد.

۳- واکسن زنده نوترکیب تولید شده علیه استرپتوکوکوزیس در قزل آلای رنگین کمان ایمنی ایجاد کرده و از تلفات آنها جلو گیری می کند.

۹-۱-اهداف

۱-شناسایی و بیان ژن بیماریزای *Streptococcus iniae* در باکتری *Lctococcus lactis*

۲- تولید واکسن زنده نوترکیب علیه استرپتوکوکوزیس در قزل‌آلای رنگین کمان

۳- ایمن کردن ماهیان قزل آلا علیه استرپتوکوکوزیس و کاهش خسارات اقتصادی مربوطه

۲-مواد و روش کار

۲-۱-وسایل مورد استفاده

- انکوباتور معمولی ۳۷ درجه (Shimaz- ایران)
- انکوباتور دارای Shaker ۳۷ درجه (Daiki)
- سانتریفیوژ یخچال دار (Hettich مدل Universal R32 آلمان)
- همزن (Stirrer)
- دستگاه ترمال سایکلر(Eppendorf)
- تانک الکتروفورز افقی به همراه قالب (cast) و شانه مناسب (اختریان- ایران)
- منبع تغذیه برق مستقیم (DC)
- فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد (Saiwan)
- تانک الکتروفورز عمودی (پویا پژوهش- ایران)
- دستگاه Power supply (اختریان- ایران)
- بن ماری (بهداد- ایران)
- میکروفیوژ (Hettich مدل Micro 20 آلمان)
- دستگاه Uv transilluminator (Uvitec Cambridge)
- ترازوی دیجیتال (Sartorius)
- سمپلر (Socorex – سوئیس)
- لوله شیشه ای در پیچ دار ۲۰ سانتی متری
- اسکالپر
- دماسنج
- دستگاه سونیکاسیون (Dr.hielscher Gmbh)
- تانک بلاتینگ (Appelex)
- قالب (cast) مخصوص بلاتینگ (اختریان)
- دستگاه اتوکلاو
- دستگاه Vortex
- ظروف شیشه ای از قبیل ارلن و بشر
- رک های مخصوص برای نگه داری نمونه
- لوله های مخصوص برای جمع آوری نمونه
- لوپ و سواپ استریل جهت برداشت و کشت باکتری

- هود کشت سلول (ژال- ساخت ایران)
- شیکر (اختریان)
- مگنت
- شعله چراغ

۲-۲-مواد و لوازم مصرفی

- سرسمپلر استریل
- میکروتیوب ۰/۲ و ۰/۵ و ۱/۵ میلی لیتر (Eppendorf)
- پلیت کشت باکتری استریل
- پیپت پاستور
- دستکش یک بار مصرف
- سرنگ وسوزن ۲ و ۵ میلی لیتر
- اسید کلریدریک غلیظ (سیگما)
- پودر محیط کشت LB (Luria Broth)
- استات سدیم (Merck)
- کلرید منیزیم (Merck)
- هیدروکسید سدیم (NaOH)
- آکریل آمید (MERCK)
- بیس آکریل آمید (N,N ′- methylen bis acrylamid) (سیگما)
- Tris-base (سیناژن)
- SDS(Sodium dodecyl sulfate) (سیگما)
- گلیسرول (Merck)
- استن (Merck)
- گلایسین (Merck)
- ساکارز (Merck)
- پودرآگارآگار (Sigma)
- پودر آگارز (شرکت فرمنتاز لیتوانی)
- سایبر گرین (Invitrogen)
- پودر آگارز (Low Melting Point) (شرکت فرمنتاز)

- 1000bp DNA marker (ساخت فرمنتاز)
- پودر کلرید کلسیم (Merck)
- پودر گلوکز (Merck)
- NaCl (Merck)
- فنل (Merck)
- کلروفرم (Merck)
- آب مقطر دی یونیزه استریل
- اتانل مطلق و ۷۰ درجه
- آنزیم‌های برش دهنده *NcoI* و *KpnI* و *SacI* و *XbaI* و بافرهای مربوطه (فرمنتاز لیتوانی و تاکارا)
- آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۳۰ µg/ml
- آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ mg/ml
- آنزیم T_4DNA ligase و بافر مربوطه (فرمنتاز)
- dNTP Mix (100 mM) (فرمنتاز)
- آنزیم Taq DNA polymerase (با غلظت ۵ واحد / میکرولیتر) و بافرمربوطه (ساخت سیناژن)
- PEG (Poly Ethylene Glycol)
- باکتری *E. coli* سویه TOP10 (سیناژن)
- باکتری *E. coli* سویه BL21 (سیناژن)
- پلاسمید *pNZ8148* (MoBiTec)
- کیت استخراج از ژل (BioNeer)
- کیت استخراج از ژل (Fermentas)
- کیت استخراج پلاسمید (BioNeer)
- بروموفنل بلو (Merck)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)(فرمنتاز)
- مارکر پروتئین (Vivantis)
- مارکر پروتئین (Fermentas)
- رنگ کوماسی بلو G_{250} (ساخت شرکت فرمنتاز)
- اسید استیک گلاسیال (Merck)
- Triton X-100 (سیگما)
- کاغذ نیتروسلولز (Porablot آلمان)
- شیر خشک (Skim Milk)

- Anti mouse کونژوگه با آلکالن فسفاتاز (abcam)
- BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) و NBT (nitro blue tetrazolium) سوبستراهای آلکالاین فسفاتاز به همراه بافر مربوطه (امریکا Invitrogen)
- TEMED (N,N,N,N- tetramethylen-ethylen diamine) (Sigma)
- پودر APS (Ammonium Persulfate) (Merck)
- پر اکسید هیدروژن(H_2O_2) (Merck)
- FBS (Fetal Bovin Serum) (Gibco– آلمان)
- nisin
- Tween 20 (Merck)
- متانول (Merck)

۳-۲- نمونه برداری

نمونه برداری از ماهیان بیمار و در حال مرگ و نیز ماهیان به ظاهر سالم از ۲۷ مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی ۸ استان مازندران، گیلان، کرمانشاه، لرستان، چهارمحال بختیاری، کهگلویه و بویر احمد، تهران و استان فارس در گروه وزنی ۲۰۰ – ۵۰ گرم و طی فصل تابستان انجام گردید. اطلاعات مربوط به مزارع، تعداد نمونه اخذ شده و تعداد نمونه های مثبت در جدول۱-۲ آورده شده است.

جدول۱-۲: اطلاعات مربوط به تعداد مزارع انتخاب شده، مزارع واجد علایم بیماری، نمونه اخذ شده و تعداد نمونه به تفکیک هر استان

استان	تعداد مزارع انتخاب شده	تعداد مزارع واجد علایم	تعداد نمونه اخذ شده	تعداد نمونه مثبت
مازندران	۲۲	۱	۷۲	۵
گیلان	۶	۶	۳۰	۳۰
لرستان	۱۹	۱۰	۴۶	۲۰
چهارمحال بختیاری	۱۱	۷	۲۱۸	۷۰
فارس	۳	۲	۳۳	۲۱
کرمانشاه	۱	۱	۱۰	۱۰
تهران	۱	۰	۱۱	۰
کهکیلویه و بویراحمد	۹	۵	۱۰۰	۵۰
جمع	۷۲	۳۲	۵۲۰	۲۰۶

۴-۲-کشت اولیه باکتری در محل نمونه برداری

پس از جمع آوری نمونه ها، ماهیان از نظر علایم ظاهری مورد بررسی قرار گرفتند و سپس در شرایط استریل کالبد گشایی شده و پس از شکافتن محوطه بطنی اندامهای داخلی بررسی شد. سپس با استفاده از آنس استریل

از سه بافت کبد ،کلیه و طحال در دو محیط عصاره قلب و مغز(BHA) و تریپتوکاز سوی آگار (TSA) کشت خطی جهت جداسازی باکتری انجام گردید(Astin و Astin 2007 ,1999). پلیت های کشت داده شده به مدت ۲۴الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدو پس از مشاهده رشد باکتری در محیط، پلیتها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی پژوهشکده منتقل گردید.

۵-۲- خالص سازی و شناسایی اولیه باکتری

پس از انتقال پلیتهای کشت داده شده به آزمایشگاه ، از پرگنه های رشد یافته مجددا کشت در دو محیط BHA و TSA انجام گردید و پس از گرمخانه گذاری بمدت ۲۴ ساعت و مشاهده کلنی های تک، آزمایشات اولیه شناسایی شامل تست کاتالاز و رنگ آمیزی گرم برای هر نمونه خالص انجام گردید. پس از این مرحله با مشاهده کوکسی های زنجیره ای گرم مثبت و نتیجه منفی تست کاتالاز جنس استرپتوکوک تایید گردید. پس از این مرحله آزمایشات تفریقی جهت شناسایی گونه باکتری انجام گردید. آزمایشات تفریقی که در این مرحله انجام گردید شامل:

کشت در محیط blood agar جهت تعیین همولیز، تخمیر قند و تولید اسید از قندهای مانیتول سوربیتول، لاکتوز، سوکروز، رافینوز، ترهالوز، ریبوز و سالیسین، رشد در حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد، آزمایش مقاومت در مجاورت ۶/۵٪ NaCl، هیدرولیز هیپورات و اوره، وژز پروسکوئر(VP)، آزمایش بایل آسکولین، هیدرولیز آرژنین، تست حرکت و تولید اندول، مصرف سیترات، تجزیه ژلاتین و احیا نیترات بود(Astin و Astin ,1999 2007).

۶-۲-آزمایشات مولکولی

۱-۶-۲- استخراج DNA به روش فنل – کلروفرم

استخراج DNA به روش فنل – کلروفرم انجام شد(Sambrookand Russell, 2006):

۱- ابتدا تعدادی از کلنی ها (حدود ۵ کلنی) از محیط کشت به لوله اپندروف ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر متلاشی کننده منتقل کرده ، سپس در بن ماری $37^{o}C$ به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. Tris موجود در بافر نقش بافری دارد، EDTA به عنوان مهار کننده آنزیم های نوکلئاز و SDS موجود در آن نیز به عنوان حل کننده چربیهای موجود در غشاء سلول عمل می کند.

۲- هم حجم مایع مورد نظر (۵۰۰ میکرولیتر)، به اپندروف فنل اضافه شد و به شدت آن را تکان داده ، سپس با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ انجام شد.

۳- مایع شفاف رویی را به لوله اپندروف ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل کرده و هم حجم آن محلول کلروفرم اضافه شد و پس از تکان دادن با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ انجام شد.

۴- مایع شفاف رویی را به اپندروف ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل کرده و یک دهم حجم ، آن نمک استات سدیم ۳ مولار و دو برابر حجم کلی الکل مطلق سرد اضافه نموده، به مدت نیم الی ۲ ساعت در فریزر ۲۰- قرار داده شد. که سرما به رسوب DNA کمک می کند.

۵- سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد.

۶- مایع رویی تخلیه شده و رسوب حاصل با ۱۰۰ میکرولیتر الکل اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد. این عمل به منظور حذف املاح از DNA صورت گرفت. پس از اضافه نمودن اتانل ۷۰٪ ، چند بار به انتهای اپندروف ضربه زده و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. اتانل ۷۰٪ باعث شستشوی نمکها می شود.

۷- مایع رویی تخلیه شده و اپندروف حاوی DNA به مدت ۲۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفت تا خنک شده و اتانل موجود در آن کاملاً تبخیر گردید.

۸- پس از خشک شدن لوله ، ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به اپندروف اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا DNA موجود در ته لوله کاملاً در آب حل گردد، بدین ترتیب DNA خالص شده جهت انجام PCR به دست آمد.

۲-۶-۲-تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص DNA استخراجی از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده گردید(Sambrook and Russell).

۳-۶-۲- ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

برای تعیین کمیت DNA نمونه‌های DNA استخراج شده پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL (مدل ۲۰۴۰DE) با آب مقطر، ۲۰ میکرولیتر DNA ژنومی به وسیله آب مقطر به حجم ۳۰۰µL رسانده شد، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر و نسبت A260/280 به وسیله دستگاه اندازه‌گیری و ثبت شده و در پایان غلظت DNA با استفاده از فرمول ۲-۱ محاسبه گردید.

فرمول ۲-۱

غلظت DNA بر حسب ng/ml = ۵۰× D × A260

A میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر

D نسبت رقت ۶۰=۲۰/۳۰۰۰

اگر نسبت جذب A1/A2=۱/۸ باشد DNA مناسب است و اگر A1/A2>۱/۸ باشد DNA دارای ناخالصی RNA است و اگر نسبت جذب A1/A2< ۱/۸ باشد نشان دهنده ناخالصی با فنل و پروتئین است.

۴-۶-۲- طراحی پرایمر

برای انجام واکنش PCR نیاز به پرایمرهای اختصاصی هر گونه می باشد. برای طراحی پرایمر از توالی ژنهای 16.S.RNA و گلوکوکیناز گونه های مختلف استرپتوکوکوس استفاده شد. برای این منظور ۵ جفت پرایمر طراحی و ساخته شد.

با توجه به اینکه طراحی بعضی از پرایمرها به صورت کاملاً اختصاصی برای هر گونه با مشکل مواجه بود، از هضم آنزیمی با آنزیم های برش دهنده استفاده شده است، برای این منظور محصول PCR با پرایمر ENR را با آنزیم *XhOI* برش داده ، در صورتیکه قطعه ای به طول ۱۶۳ جفت باز ایجاد گردد، نمونه مورد نظر *S.parauberis* است و در صورتیکه آنزیم *XhOI* بر روی محصول PCR محل قطع نداشته باشد، گونه *S.faecium* می باشد. همچنین محصول PCR ایجاد شده با پرایمر STRP اگر با آنزیم *DraIII* قطع گردد و قطعاتی به طول ۱۱۰ و ۱۵۰ جفت باز ایجاد شود، نمونه *S.dysgalactae* و اگر آنزیم با همین پرایمر محل قطع نداشت، نمونه *S.uberis* می باشد. (جدول ۲-۲).

جدول ۲-۲: طول قطعات محصول PCR با استفاده از هر یک از پرایمرها

	طول قطعات (جفت باز)					
پرایمر	*S. parauberis*	*S. faecium*	*S. uberis*	*S. agalactiae*	*S. dysgalactiae*	*S. iniae*
Bac RNA	۶۷۵	۶۷۵	۶۷۵	-	۶۷۵	-
ENR	۵۴۰	۵۴۰	-	-	-	-
STRA	-	-	-	۴۳۰	-	-
STRP	-	-	۲۶۰	-	۲۶۰	-
STRP1	-	-	-	-	-	۵۵۴

۵-۶-۲- واکنش PCR

دراین بررسی واکنش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی که بر اساس توالی نوکلئوتیدهای ژن 18s ribosomal RNA و Glocus kinase طراحی گردیده، انجام شده است. برای این منظور واکنش PCR با استفاده از ۵ µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰µM، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl2 با غلظت ۲/۵ mM، ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰µl برسد، انجام شد.

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب واسرشته سازی (Denaturation)، ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه ، اتصال پرایمر (Annealing)، ۶۴ تا ۶۹ درجه سانتیگراد بمدت ۴۵ ثانیه وبرای بسط واکنش(Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است.

کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر ۵۰ pb DNA و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت(Sambrook and Russell, 2006).

الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه قطعات حاصل از PCR با مقایسه با مارکر DNA (pBR322 DNA/AluI Marker, 20, MBI Fermentas) بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد و با روش رنگ آمیزی نیترات نقره بدست آمد. از آنجایی که حساسیت ژل پلی‌اکریل‌آمید ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر ژل آگارز می‌باشد. در تحقیق حاضر از این ژل برای بررسی نتایج PCR استفاده گردید.

جهت تهیه ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد ابتدا ۳۱ میلی‌لیتر آب مقطر را با ۱۳/۵ میلی‌لیتر پلی‌اکریل‌آمید ۳۰ درصد و ۴/۵ میلی‌لیتر بافر TBE (10X) در داخل بالن دارای بازوی جانبی مخلوط ریخته و به مدت ۴ دقیقه توسط دستگاه کمپرسور هواگیری شِد و سپس ۳۸۵ میکرولیتر از محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر از محلول TEMED به مخلوط قبلی اضافه شده این ترکیب در فضای بین دو شیشه که از طرفین و قسمت زیری مسدود و از قسمت بالایی نیز شانه‌ای را در فضای بین خود جا داده ریخته شد، جلوگیری از ایجاد حباب هوا در این مرحله کاملاً الزامی است. مدت زمان لازم برای پلیمریزه شدن این ژل حدود ۳۰ دقیقه بوده و بعد از این مدت شانه به آرامی از قسمت بالایی خارج و بعد از شستشوی چاهک‌های ایجاد شده توسط محلول TBE (1X) (بافر الکترود)، نمونه‌های PCR را به ترتیب در محل چاهک‌ها ریخته، و ژل در ستون عمودی بافر TBE (1X) قرار گرفت بطوری که ژل در بین دو مخزن بافر قرار گرفته و تنها ارتباط بین این دو بافر از طریق ژل میسر باشد. زمانی که دستگاه به مولد برق با ولتاژ ۱۵۰ ولت وصل می‌گردد به مخزن بالا قطب مثبت و به مخزن پایین قطب منفی وصل می‌شود که باعث برقراری جریان از سمت مخزن بالا به سمت مخزن پایین و حرکت نمونه‌های ریخته شده در چاهک در این مسیر می‌شود و قطعات DNA تکثیر شده براساس وزن مولکولی خود در طول ژل از هم جدا شوند، الکتروفوز نمونه‌ها در مدت ۳ ساعت انجام شد. جهت نمایان شدن باندهای DNA از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد و برای اطمینان از تکرارپذیری نوارها آزمایش سه الی چهار بار در شرایط یکسان تکرار گردید.

۶-۶-۲- رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با نیترات نقره

جهت رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید سه نوع محلول بصورت زیر تهیه شدند: (Sambrook and Russell, 2006).

محلول A، بافر اسید استیک ۰/۵ درصد و اتانول ۱۰ درصد

اتانول	۴۰ میلی‌لیتر
اسید استیک	۲ میلی‌لیتر
آب مقطر	۳۶۰ میلی‌لیتر

محلول B، بافر نیترات نقره ۰/۱ درصد

نیترات نقره	۰/۲ گرم
آب مقطر	۲۰۰ میلی گرم

محلول C، بافر فرمالدئید ۰/۱۵ درصد، NaBH4 ۰/۱ درصد و NaOH ۴/۵ درصد

NaOH	۴/۵ گرم
NaBH4	۰/۰۳ گرم
آب مقطر	۳۰۰ میلی لیتر
فرمالین	۱/۲ میلی لیتر

شایان ذکر است که جهت تهیه محلول شماره ۳ (محلول C) ابتدا هیدروکسید سدیم را در آب مقطر حل و سپس مواد دیگر بر روی آنها ریخته می‌شود.

پس از اتمام زمان الکتروفورز ژل از صفحات شیشه‌ای با یک کاردک جدا و جهت رنگ آمیزی ابتدا دو بار و در هر بار به مدت ۳ دقیقه ژل در داخل محلول A بر روی شیکر قرار گرفت، سپس به مدت ۱۰ دقیقه به محلول B منتقل در پایان این مدت دو بار و هر بار بمدت ۱ دقیقه با آب مقطر شستشو شد. در نهایت بمدت ۱۰ دقیقه یا تا زمانی که باندها بصورت نوارهای تیره رنگی دیده شوند در محلولC قرار داده شد. ژلهای رنگ آمیزی شده به درون پوشش پلاستیکی منتقل و جهت نگهداری پرس شدند.

۷-۶-۲- ثبت تصاویر

تصاویر ژل پلی‌اکریل‌آمید پس از رنگ آمیزی ابتدا توسط دستگاه مستند سازی ژل[6] ترانس ایلومیناتور مدل DOC008.XD ساخت کمپانی UVI همراه با برنامه نرم‌افزاری UVI DOC Version V.99.04 ثبت و ذخیره گردید.

۷-۲-هضم آنزیمی محصول PCR

برای هضم آنزیمی محصول PCR مقدار ۵-۸µl از محصول PCR را در یک میکروتیوپ ۵۰۰ میکرولیتری ریخته و مقدار ۱µl آنزیم محدودگرو ۲µl بافر آنزیم به آن اضافه و سپس با dH2O حجم نهایی به ۲۰µl رسانده شد. سپس لوله‌ها بمدت ۳-۲ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت، کلیه

[6] Gel documentation

نمونه‌ها با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد، همراه با مارکر ۵۰bp DNA الکتروفورز و الگوهای هضم آنزیمی محصولات PCR با رنگ آمیزی نیترات نقره قابل مشاهده گردیدند(Sambrook and Russell, (2006 .

۸-۲-جداسازی ژن عامل استرپتوکوکوزیس و کلونینگ

پس از شناسائی گونه های مختلف استرپتوکوکوس، برای جداسازی ژن فسفوگلوکوموتاز بعنوان عامل استرپتوکوکوزیس از گونه *S. iniae* استفاده گردید.

پس از اینکه با واکنش PCR ، تایید شد که باکتری های ایزوله شده *S.iniae* می باشند، PCR دیگری جهت تکثیر ژن استرپتوکوکوزیس انجام گردید. برای این منظور با استفاده از بانک های اطلاعاتی توالی ژن مورد نظر شناسائی و سپس اقدام به طراحی پرایمر گردید. بدین ترتیب دو جفت پرایمر برای تکثیر قطعات ژن رمزکننده پروتئین های *simA* و *cpsD* ساخته شد. قابل ذکر است برای اطمینان بیشتر از نتیجه آزمایشات و جلوگیری از اتلاف وقت، همزمان اقدام به انجام آزمایشات با دو قطعه ژن با اندازه های متفاوت تحت عنوان g1 (*simA*) و g2 (*cpsD*) گردید.

محلول واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتری با بشرح ذیل تهیه گردید:

Buffer PCRLO*	1X	3µl
dNTP Mixture (100mM)	0.2 mM	0.5 µl
Primers (work)	40 pmol	2 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1mM	1 µ
DNA	1 µg	3 µl
Taq DNA polymerase	1.25 unit	0.25 µl
D.W	upto 30	20/25 µl
Total volume	30 µl	

محلول واکنش پس از آماده سازی در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفته و برنامه تنظیمی زیر برای تکثیر به کار برده شد:

Primary Denaturation	94°	5´
Denaturation	94°	30´´
Annealing	51°	1´
Extension	72°	1´
Rapeated 30X		
Final Extension	72°	5´

در نهایت بهترین دمای annealing برای تکثیر ، دمای ۵۵ و ۵۸ درجه انتخاب گردید. پس از انجام واکنش PCR، برای مشاهده شدن محصول PCR از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد نور UV و دستگاه Transillaminator استفاده شد.

۱-۸-۲-استخراج و خالص سازی قطعات *SimA* و *CpsD*

پس از انجام PCR اقدام به خالص سازی قطعات تکثیر شده از جمله پرایمر Dimer و باندهای غیر اختصاصی گردید. پس از انجام الکتروفورز و مشاهده باند مورد نظر با نور UV، قطعات تفکیک شده توسط اسکالپل از بقیه قسمت های ژل جدا گردید و درون لوله های اپندروف ۱/۵ میلی لیتر قرار گرفت. سپس طبق بروشور موجود در کیت، براساس مراحل زیر تخلیص صورت گرفته شد:

۱- محلول اتصال (Binding) به اندازه ای که روی ژل را کاملاً بپوشاند، ریخته شده و در بن ماری ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار گرفت تا ژل ذوب شود در این حالت هر ۵ دقیقه لوله تکان داده می شد.

۲- پس از حل شدن کامل ژل، ۱۰-۵ µl سیلیکا که قبلاً تهیه شده است، به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه دربن ماری ۵۵ درجه قرار داده و پس از آن ورتکس گردید. این عمل دو بار تکرار شده است.

۳- سپس به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت و محلول رویی تخلیه شد.

۴- به رسوب لوله، ۵۰۰ میکرولیتر محلول شستشو اضافه و مجدداً ورتکس و به مدت۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت و محلول رویی جهت انجام T/A کلونینگ جمع آوری شد.

۲-۸-۲- کلونینگ

T.vector مورد استفاده در این بررسی، PTZ57R بوده که به صورت آماده از شرکت Fermentase (لیتوانی) تهیه شد.

جهت انجام واکنش Ligation علاوه بر T.vector به Insert نیازاست که همان محصول PCR خالص شده می باشد.در این واکنش توسط آنزیم T4 DNA Ligase محصول PCR به T.vector متصل می شود.

جهت بالا بردن میزان کارایی واکنش Ligation ، لازم است که غلظت مناسبی از Insert و Vector در واکنش مورد استفاده قرار گیرد. مناسب ترین نسبت مولاریته Insert به Vector براساس بروشور شرکت، نسبت ۳ به ۱ مشخص شده که در این بررسی نیز همین نسبت در نظر گرفته شد. به منظور تعیین غلظت Insert ، میزان جذب یک میکرولیتر از محصول PCR خالص شده بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به این ترتیب با دانستن میزان DNA در حجم مشخصی از Insert و vector ، میزان غلظت آنها به دست آمد.

پس از محاسبه میزان غلظت Insert و vector طی محاسباتی که ذکر شد، واکنش ۲۰ میکرولیتری جهت Ligation در نظر گرفته شد که شامل ترکیبات زیر است:

۵- Insert	10µl
۶- T.vector (Fermentase)	2 µl
۷- T4 DNA Ligase (Fermantase)	1 µl
۸- Buffer T4 DNA Ligase 5x	2 µl
۹- D.W	5 µl
۱۰- Total volume	20 µl

محلول فوق به مدت ۲ ساعت در دمای ̊C ۲۲ و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ̊C ۶۵ در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

۹-۲-ترانسفورما سیون (Transformation):

۱-۹-۲- تهیه سلول مستعد پذیرش DNA[7]

یک کلنی ازسویه باکتری *E. coli* مورد نظر در ۱ میلی لیتر محیط کشت مایع براث LB کشت داده شد و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷°C شیکردار انکوبه شد.

۱. از کشت شبانه، کشت دو ساعته انجام گرفته و در انکوباتور ۳۷°C شیکردار انکوبه شد. در این مرحله باکتری بعد از ۲ ساعت در فاز لگاریتمی خواهد بود.
۲. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت دو ساعته داخل میکروتیوب ریخته شد.
۳. میکروتیوب حاوی باکتری به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرارداده شد.
۴. سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با ۲۵۰۰rpm در دمای ۷°C انجام شد.
۵. با وارونه کردن میکروتیوب، مایع رویی خارج شده؛ سپس ۲۰۰ میکرولیتر، کلرید کلسیم سرد (۰/۱M) به رسوب سلول ها اضافه گردید و با پیپت کردن آهسته، رسوب سلول داخل کلرید کلسیم سوسپانسیون شد.
۶. میکروتیوب ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفته و مشابه قبل سانتریفوژ می گردد.
۷. پس از سانتریفوژ، مایع رویی خارج و ۵۰ میکرولیتر کلرید کلسیم سرد (۰/۱M) به رسوب سلولی اضافه شده و با پیپت آهسته در کلرید کلسیم سوسپانسیون شد. در این مرحله سلول، مستعد پذیرش DNA می باشد((Hanahan, D. (1983) .

۲-۹-۲- مراحل انتقال DNA به سلول باکتری زنده

۱. پس از قراردادن لوله حاوی سلول پذیرا روی یخ، DNA مورد نظر که می‌تواند پلاسمید، پلاسمید نوترکیب و یا محصول واکنش Ligation باشد، به محتویات لوله اضافه شده و پس از پیپت کردن آهسته، به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرارگرفت.
۲. پس از سپری شدن زمان مذکور، شوک حرارتی ۴۲°C به مدت ۶۰ ثانیه به سلول داده شد.
۳. لوله محتوی سلول پذیرا و پلاسمید، به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرارگرفت.
۴. پس از آن، لوله ۱ دقیقه در دمای محیط گذاشته شد.
۵. ۱۰۰ میکرولیتر از محیط LB بدون آنتی بیوتیک به مخلوط فوق اضافه گردیده و به مدت یک ساعت در ۳۷°C انکوبه شد

[7] Competent Cell

۶. محتوای لوله روی پلیت LB حاوی آنتی بیوتیک مورد نظر (برای وکتور *pGH*، آنتی بیوتیک آمپی سیلین و برای وکتور بیانی *pNZ8148* آنتی بیوتیک کلرامفنیکل) پخش گردید.
۷. محتویات لوله، پس از جذب شدن به محیط کشت، به صورت وارونه، به مدت یک شب در حرارت ۳۷°C قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، به دلیل وجود ژن مقاوم به آنتی بیوتیک های ذکر شده در هر دو وکتور *pNZ8148* و *pGH* ، تنها کلنی های واجد پلاسمید روی محیط کشت رشد یافت(Smith, 1984)

۱۰-۲- استخراج پلاسمید

۱-۱۰-۲-استخراج پلاسمید با استفاده از کیت *BioNeer*

از کلنی های غربال شده، کشت شبانه تهیه شد.

۱. مقدار ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری، به مدت ۵ دقیقه با ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد.
۲. رسوب باکتری با ۲۵۰ میکرولیتر بافر شماره یک ورتکس گردید (بافر قبل از استفاده تکان داده شد).
۳. به محتویات لوله، ۲۵۰ میکرولیتر بافر شماره دو اضافه شده و ۴-۳ بار بطور آهسته وارونه گردید.
۴. سپس ۳۵۰ میکرولیتر بافر شماره سه اضافه گردیده و ۴-۳ بار وارونه می شود و سانتریفوژ با ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در ۷°C انجام گرفت.
۵. مایع حاصل را به درون ستون ریخته و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام داده و مایع جدا گردید.
۶. بافر شماره چهار را به درون ستون افزوده و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.
۷. پس از خشک شدن، ستون به یک تیوب جدید منتقل شده و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و ۵-۴ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. پس از آن به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیده، سپس برای تأیید وجود ژن در پلاسمید، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه های استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد.

۱۱-۲-تهیه وکتور و قطعه ژن کدکننده پروتئینی های *simA* و *cpsD*

در این مرحله از آنزیم های محدود الاثر به منظور آماده سازی ژن مورد نظر استفاده گردید. با توجه به نقشه پلاسمید *pGH* و توالی های تکثیر یافته ژن *simA* و *cpsD*، درمیان قسمت تکثیر یافته جایگاه هایی به منظور برش آنزیم های محدود الاثر *NcoI* و *KpnI* ، *SacI* و *XbaI* وجود دارد. مواد زیر برای واکنش های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (۳-۲ و ۴-۲) .

جدول ۳-۲ واکنش آنزیمی جهت برش *pGH* حامل ژن *simA* و *pNZ8148*

مواد مصرفی	مقدار
(1) *NcoI* or (2) *KpnI*	۱ µl (5 units)
Tango Buffe 10X	۲ µl (1X)
pNZ8148 , *pGH*	۵ µg (1 µg)
ddH_2O	۱۲ µl

جدول ۴-۲ واکنش آنزیمی جهت برش *pGH* حامل ژن *cpsD* و *pNZ8148*

مواد مصرفی	مقدار
(1) XbaI , (2) SacI	۱ µl (5 units)
BSA+M Buffer 10X (XbaI) L Buffer 10X (SacI)	۲ + ۲ µl (1X) ۲ µl (1X)
pNZ8148 , pGH	۳ µg (1 µg)
ddH2O	رساندن حجم به۲۰ µl

۱۲-۲- بازیافت DNA از ژل آگارز با استفاده از کیت *BioNeer*

۱. ابتدا کل محصول برش آنزیمی، روی ژل آگارز ۱/۵درصد، الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از نور UV (چراغ دستی)، باند مورد نظر مشاهده شد.

۲. با استفاده از تیغ اسکالپر استیل، باند مورد نظر بریده شده و به یک لوله میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تمیز انتقال داده شد.

۳. به نسبت ۳:۱ بافر شماره یک را به میکروتیوب افزوده، سپس لوله را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰°C انکوبه کرده تا قطعات ژل درون لوله کاملاً ذوب شود (هر ۳-۲ دقیقه، باید لوله را وارونه کرد).

۴. محلول زرد رنگ حاصل را درون ستون ریخته و مدت ۱ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ انجام گردید.

۵. مایع را خارج کرده و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر شماره دو درون ستون ریخته و به مدت ۱ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

۶. مرحله ۵ دوباره تکرار شد.

۷. مجددا سانتیفیوژ به مدت ۱ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰، جهت حذف باقیمانده اتانول انجام شد.

۸. ۳۰ میکرولیتر آب درون ستون ریخته و ستون را درون میکروتیوب جدیدی قرار داده و حداقل ۱ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد.

۹. پس از زمان مذکور، ستون را به مدت ۱ دقیقه و rpm ۱۳۰۰۰سانتریفیوژ کرده، سپس برای تأیید وجود قطعه مورد نظر، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه های استخراج شده روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز گردید.

۱۳-۲- انجام واکنش اتصال

در این مرحله از پلاسمید *pNZ8148* به عنوان ناقل و از قطعات ژنی استخراج شده *simA* و *cpsD* به عنوان Insert استفاده گردید. محلول واکنش اتصال به صورت زیر آماده گردید (۵-۲).

جدول ۵-۲ واکنش اتصال قطعه و وکتور

مواد مصرفی	مقدار
T_4DNA ligase Buffer10X	۲ µl (1X)
Insert (*simA*, *cpsD*)	۸ µl (2 µg)
Vector (*pNZ8148*)	۴ µl (1 µg)
T_4DNA Ligase	۱ µl (2 units)
dH_2O	۵ µl

واکنش مدت ۲ ساعت دردمای ۲۲°C قرار می گیرد. مراحل تهیه سلول مستعد و سپس مراحل انتقال پلاسمید نوترکیب در باکتری انجام گردید.

۱۴-۲-غربالگری کلنی های واجد پلاسمید نوترکیب

پس از ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون بر روی پلیت های آگار حاوی کلرافنیکل پخش و نهایتاً بر روی پلیت تعدادی کلونی مشاهده شد. تک کلونی ها جهت کشت شبانه به محیط LB انتقال یافتند و سپس استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام گرفت. پس از استخراج پلاسمید، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه های استخراجی به همراه وکتور پلاسمید بدون قطعه (به عنوان کنترل) ، بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید. نمونه هایی که از پلاسمید کنترل سنگین تر بودند، برای PCR انتخاب شدند.

۱۵-۲-کلنی PCR

در این روش به ترتیب زیر عمل شد:

۱. به تعداد کلنی‌ها، میکروتیوب استریل ۰/۵ میلی لیتری برداشته و در هریک ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ریخته شد.

۲. زیر هود و در کنار شعله به وسیله لوپ استریل از هر کلنی برداشته و در پلیت محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل دیگری که به تعداد کلنی‌ها بخش بندی و شماره گذاری شده است، کشت داده و سپس همزمان در میکروتیوب مربوط به همان کلنی حل شد.

۳. پس از اتمام کار تمامی کلنی‌ها، پلیت قسمت بندی شده به منظور رشد مجدد کلنی ها در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد.
۴. میکروتیوب ها داخل قایق یونولیتی قرار داده و به مدت ۲۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه جوشانده شد.
۵. به مدت ۵ ثانیه میکروتیوب‌ها در میکروفیوژ با rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شده، سپس مایع رویی به عنوان DNA در واکنش PCR به کار گرفته شد.
۶. پس از اتمام PCR، محصول را روی ژل آگارز ۱/۵٪ ریخته شد.
۷. کلنی های تأیید شده، از پلیت قسمت بندی شده انتخاب شده و پس از ۲۴ ساعت مورد استخراج پلاسمید قرار گرفت.

۱۶-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ژن های *simA* و *cpsD* جهت تأیید کلونینگ

در این مطالعه از PCR برای تأیید اتصال و حضور پلاسمید نوترکیب استفاده شد. در این مرحله به منظور تکثیر ژن های *simA* و *cpsD* از پرایمرهای یونیورسال *pNZ8148* و اختصاصی ژن های *simA* و *cpsD* استفاده گردید.
مواد واکنش PCR طبق جدول ۶-۲ می باشد :

جدول ۶-۲ مقدار و غلظت محلول واکنش PCR

مواد تشکیل دهنده واکنش	مقدار
PCR Buffer 10X	۲µl (1X)
dNTP 10mM	۰/۴µl (0.2mM)
$Mgcl_2$ 50mM	۰/۸µl (2mM)
Primer F/R	۱ µl (2pmol)
Template DNA	۱ µl (10ng)
Taq DNA polymerase	۰/۱ µl (0.5units)
dH_2O	۱۴/۷ µl

مواد فوق، جهت انجام یک واکنش PCR معمولی می باشد، جهت انجام کلنی PCR، مقدار حجم DNA الگو به ۳ میکرولیتر افزایش یافته و به همین نسبت از حجم آب کاسته شد.
سپس واکنش PCR با برنامه زیر انجام گرفت (۷-۲)، این برنامه برای PCR پلاسمید *pNZ8148* تنظیم گردیده بود.

جدول ۷-۲ برنامه واکنش PCR برای پلاسمید *pNZ8148*

مرحله PCR	دما oC	زمان s
Initial denaturotion	95	5 min
Denaturation	94	45 sec
Annealing	48	30 sec
Extension	72	45 sec
مرحله دوم طی ۳۰ سیکل انجام شد.		
Final Elongationh	72	5 min

۱۷-۲-انتقال پلاسمید به باکتری *Lactococcus lactis*

برای انجام این واکنش از باکتری مهندسی شده *Lactococcus lactis* (NZ9000) استفاده گردید.

۱-۱۷-۲-محیطهای کشت مورد استفاده:

M17 : حاوی ۵گرم تریپتون، ۵گرم پپتون سویا، ۵گرم گوشت هضم شده، ۲.۵ گرم عصاره مخمر، ۰.۵ گرم اسید آسکوربیک، ۰.۲۵ گرم سولفات منیزیم و ۱۹ گرم گلیسروفسفات دی سدیم با pH 6.9

GM17 : محیط M17 غنی شده با ۰.۵ گرم گلوکز

SGM17 : GM17 با 0.5M سوکروز

SR plate: ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۲۰۰گرم سوکروز، ۱۰ گرم گلوکز، ۲۵گرم ژلاتین

۲-۱۷-۲-آماده سازی سلولهای پذیرای لاکتوکوکوس

۱-کشت شبانه لاکتوکوکوس لاکتیس در محیط GM17 در دمای ۳۰ درجه تا OD=0.5

۲-پاساژ باکتری در۲میلی لیتر محیط SGM17 حاوی گلایسین تا OD=0.5 در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد

۳-سانتریفیوژ محیط مرحله قبل با دور 5000g در ۴ درجه سانتی گراد، دو بار شستشو در سوکروز 0.5M سرد حاوی ۱۰٪ گلیسرول که در نهایت در همین محلول برای انتقال آماده بود.

۳-۱۷-۲-مرحله انتقال

۱- در یک میکروتیوب استریل ۱۰۰ میکرولیتر از سلول پذیرا با ۱ میکروگرم از پلاسمید را آرام پیپت کرده و در سل مخصوص الکتروپوریشن (Electroporation) ریخته شد.

۲-دستگاه را روی 2000V و Ω ۲۰۰ تنظیم وسل را در دستگاه قرار داده و جریان فوق به مدت ۵ میلی ثانیه از محتویات سل عبور داده شد. این جریان منجر به باز شدن غشاء باکتری و ورود پلاسمیدگردید.

۳-محتویات سل را در ۲ میلی لیتر محیط کشت SGM17 ریخته و به مدت ۲ ساعت در ۳۰ درجه انکوبه گردید.

۴-از محیط مایع مرحله قبل ۱۰۰ میکرولیتر رویی هر پلیت حاوی محیط SR ریخته شد و ۳ روز در ۳۰ درجه انکوبه گردید.

۱۸-۲-وسترن بلاتینگ ژل پلی اکریل آمید

از وسترن بلاتینگ برای تشخیص و آنالیز پروتئین‌ها استفاده می‌شود. این روش یک آزمایش تاکید کننده است و وجود نوعی پادتن علیه چند نوع پروتئین را بررسی می کند. این روش آزمایشگاهی دارای۳ مرحله است:

مرحله اول: تفکیک پروتئین‌ها توسط الکتروفورز نمونه در ژل آکریل آمید.

مرحله دوم: انتقال پروتئین به غشاء نیتروسلولزی .

مرحله سوم: شناسایی پروتئین اختصاصی

ترکیب مواد موجود در ساخت بافر انتقال ، محلول شستشوو محلول بلوکه کننده به ترتیب در جداول ۸-۲ ، ۹-۲ و ۱۰-۲ ارائه شده است .

جدول ۸-۲: نوع و مقدار مواد مورد نیاز برای ساخت بافر انتقال

ماده	غلظت
گلایسین	۰/۲۹ درصد
Tris base	۰/۵۸ درصد
متانول	۲۰ درصد (v/v)
سدیم دودوسیل سولفات	۰/۰۳۷ درصد

جدول ۹-۲: ترکیب مواد موجود در محلول شستشو (TBST1X)

نام ماده	غلظت
Tris base (pH=7.5)	۰/۶۰۵ درصد
Nacl	۰/۸۷۶ درصد
توین ۲۰	۰/۰۵ درصد

جدول ۱۰-۲: مواد تشکیل دهنده محلول بلوکه کننده و مقدار آن

نام ماده	غلظت
Skim milk	2%(w/v) in TBST 1X

۱-۱۸-۲-نحوه‌ی تهیه ساندویچ وسترن بلاتینگ

مواد مورد نیاز:

ژل ۱۵ درصد SDS-PAGE، بافر انتقال، بافر TBST1X، شیرخشک، کاغذ صافی، کاغذ PVDF، متانول، آنتی بادی اولیه، آنتی بادی ثانویه.

پس از تهیه ژل SDS-PAGE و الکتروفورز نمونه‌ها، ژل با کاغذ PVDF مجاور شد. به طوری که از قطب منفی به سمت قطب مثبت ساندویچی به تر تیب زیر ساخته شد:

ابتدا چند لایه ابر، سپس کاغذ صافی، کاغذ PVDF، کاغذ صافی، چند لایه ابر.

در هنگام آماده سازی این ساندویچ غشای نیتروسلولزی طبق دستور شرکت سازنده به ترتیب به مدت ۲-۱ ثانیه در متانل، ۳-۱ دقیقه در آب مقطر و ۱۰ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد. سپس هر کدام از لایه‌ها توسط بافر انتقال کاملاً خیس شده و حباب بین آنها توسط غلطک خارج شد. هنگام قرار دادن این لایه‌ها باید دقت نمود که ژل همیشه باید به طرف قطب منفی باشد و کاغذ PVDF تماس کافی با ژل داشته باشد. این ساندویچ درون یک تانک مخصوص حاوی بافر انتقال قرار گرفته و تانک به منبع جریان برق متصل شد و با ولتاژ ۲۰ به مدت یک شب الکتروفورز انجام گردید. طی این مدت پروتئین ها از ژل به کاغذ PVDF منتقل شدند و در نهایت مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت:

کاغذ PVDF در بافر بلوکه کننده به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد جهت بلوکه کردن مناطق فاقد پروتئین غوطه ور شد. با استفاده از بافر شستشو (TBST 1X)، غشا برای ۳ بار هر مرتبه ۵ دقیقه شسته شد. آنتی بادی اولیه که اختصاصی است با تراکم مناسب ۱:۳۰۰۰۰ در بافر شستشو به غشا اضافه و به مدت ۲/۳۰ ساعت، غشا در مجاورت آنتی بادی اولیه و دمای ۴ درجه سانتی گراد روی شیکر قرار گرفت. برای ۵ مرتبه هر بار ۵ دقیقه غشا با بافر شستشو، شستشو شد. آنتی بادی ثانویه با رقت ۱:۵۰۰۰ در بافر شستشوی ۱X به مدت ۱/۳۰ ساعت با دور آرام روی شیکر قرار گرفت. ۱۰ بار شستشو، هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر شستشوی ۱X صورت گرفت. پس از آن با کمک ماده ظهور و محلول‌های گسترش و تثبیت کننده، موجود در کیت ECL Advance Western Blotting Detection باندهای پروتئینی روی فیلم حساس به نور ظاهر شد (Shewry and Fido, 1998).

۱۹-۲- واکسیناسیون

۱-۱۹-۲- روش خوراکی

از دو ژن g1 (*simA*) و g2 (*cpsD*) و سه دوز $۱۰^{۷}$ Cfuml^{-1}، $۱۰^{۸}$ Cfuml^{-1} و $۱۰^{۹}$ Cfuml^{-1} (g1d1، g1d2، g1d3و g2d1، g2d2، g2d3) استفاده گردید.

در مورد g1d1، g1d2 و g1d3 بترتیب ۳، ۳۰ و ۳۰۰ میلی لیتر از واکسن به غذای ماهی به نسبت وزن بدن اضافه و مخلوط شد.

در مورد g2d1، g2d2 و g2d3 بترتیب ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی لیتر(در مقایسه با نمونه های g1 رقیق تر بود ولی تعداد باکتری در هردو نمونه g1 وg2 برابر بودند) از واکسن به غذای ماهی به نسبت وزن بدن اضافه و مخلوط شد.

بعد از مخلوط نمودن واکسن با غذا در شرایط استریل، داخل اون ۳۰- ۳۵ درجه سانتیگراد خشک شد تا برای تغذیه ماهیان آماده گردد.

در این روش از دو ژن و سه دوز (۶ تیمار) و هر کدام سه تکرار همراه با گروه شاهد، از تعداد ۶۳۰ عدد ماهی در ۲۱ ونیرو استفاده شد که در مجموع ۵۴۰ عدد از آنها واکسینه شدند. در روش خوراکی ده روز قبل از تغذیه با غذای حاوی واکسن، ماهیان به روش غوطه وری، از ژن g2 و با دوز $۱۰^{۷}$ واکسینه شدند (قبل از این کار جهت اطمینان از سلامت ماهیان به مدت یک هفته آدابتاسیون صورت گرفت). یک روز بعد از اولین خونگیری، تغذیه ماهیان با غذای حاوی واکسن شروع و به مدت دو هفته ادامه پیدا کرد.

۲-۱۹-۲- روش غوطه وری

از یک ژن (g2) (بعلت محدودیت فضا و امکانات) و دو دوز $۱۰^{۶}$ $Cfuml^{-1}$ و $۱۰^{۷}$ $Cfuml^{-1}$ (g2d1 و g2d2) استفاده گردید.

در این روش از یک ژن و دو دوز (۲ تیمار) و هر تیمار سه تکرار همراه با گروه شاهد مجموعا ۲۷۰ عدد ماهی در ۹ عدد ونیرو استفاده شد، که در مجموع ۱۸۰ عدد از آنها واکسینه شدند. ماهیان جهت واکسیناسیون به مدت سی ثانیه بصورت غوطه ور در معرض واکسن قرار گرفتند.

۳-۱۹-۲- روش تزریقی (داخل صفاقی)

از دو ژن (g1,g2) و دو دوز $۱۰^{۷}$ $Cfuml^{-1}$ و $۱۰^{۸}$ $Cfuml^{-1}$ (g1d1، g1d2 و g2d1، g2d2) به میزان ۰/۱ میلی لیتر در داخل صفاق ماهی تزریق شد.

در این روش از دو ژن و دو دوز (۴ تیمار) و هر کدام سه تکرار همرا با گروه شاهد مجموعا ۴۵۰ عدد ماهی در ۱۵ عدد ونیرو استفاده شد که در مجموع تعداد ۳۶۰ عدد از آنها واکسینه شدند.

۲۰-۲-خونگیری جهت اندازه گیری IgM

۱-۲۰-۲- روش خوراکی

اولین خونگیری یک روز قبل از شروع تغذیه ماهیان با غذای حاوی واکسن(بعد از بیهوشی با پودر گل میخک انجام شد. بعد از دو هفته، تغذیه با غذای حاوی واکسن، قطع و دومین انجام گردید. سومین و چهارمین خونگیری هر کدام به فاصله ده روز (بعلت محدودیت زمان و افزایس دمای آب) انجام شد. در هر مرحله خونگیری، از هر ونیرو سه عدد و در مجموع ۶۳ عدد ماهی از ۲۱ ونیرو بصورت تصادفی صید و از ساقه دمی آنها مبادرت به خونگیری(۲ میلی لیتر) شد. بدین ترتیب بعد از چهار مرحله مجموعا از ۲۵۲ عدد ماهی خونگیری بعمل آمد.

۲-۲۰-۲- روش غوطه وری

در این روش خونگیری در سه مرحله و هر کدام به فاصله ده روز انجام شد. در طی سه مرحله در مجموع از تعداد ۸۱ عدد ماهی خونگیری بعمل آمد.

۲-۲۰-۳- روش تزریقی (داخل صفاقی)

خونگیری در سه مرحله و هر کدام به فاصله ده روز انجام شد. در طی سه مرحله در مجموع از تعداد ۱۳۵ عدد ماهی خونگیری بعمل آمد.

۲-۲۱-اندازه گیری میزان IgM

بعد از واکسیناسیون ماهیان، برای انداره گیری میزان IgM یا به عبارت دقیق تر ردیابی آنتی بادیهای ضد استرپتوکوکوس اینیایی از روش ELISA استفاده شد. بدین منظور از پلیت های پلی استیرن ۹۶ خانه (ICN Flow, Linbro, Sydney, Australia) حاوی باکتری هموژنیزه *S. iniae* (100 µl/well) استفاده و ۱۲ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس آنتی ژن برداشته شد و سایتهای آزاد باقیمانده با ۱۰۰µl/well ژلاتین (Oxoid) ۱درصد (w/v) در PBS و Tween 20 (PBST) ۰/۰۵ درصد به مدت نیم ساعت در حرارت اتاق تثبیت شدند. سپس پلیت ها پنج مرتبه با آب مقطر و Tween 20 (DWT) ۰/۰۵ درصد با استفاده از یک شستشو دهنده میکروپلیت Titertek۱۲۰ (ICN Flow laboratories) شسته شدند.

نمونه های رقیق شده سرم در دو بار اضافه شده (100 µl/well) و به مدت ۹۰ دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شدند. بعد از شستشو با آب مقطر، ضد آنتی بادی های قزل آلای تولید شده در خرگوش (با رقت ۱/۲۰۰ ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم – شعبه شیراز) مانند مرحله قبل اضافه، انکوبه و شسته شدند. این کار با swine anti-rabbit-HRP (با رقت ۱/۱۰۰۰ ، Dako Patts) همانند شرایط مرحله قبل تکرار شد. بعد از شستشو، ۱۰۰ میکرو لیتر بازای هر چاهک 2,2'-azino-bis-(3-ethyl benzene thiazoline-6 sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) در ۱۰۰ میلی مول سیترات فسفات، با pH ۴/۲ ، ۲/۵ میلی مول پراکسید هیدروژن اضافه شد. واکنش بعد از انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق با اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر سدیم آزید ۰/۰۱۵ M در اسید سیتریک ۰/۱ M متوقف شد و OD در طول موج ۴۹۰ نانو متر با استفاده از میکروپلیت ریدر اتوماتیک ۳۰۹ EL (Bio-Tek) اندازه گیری شد(Liaghat *et al.*, 2011) .

۲-۲۲- رویارویی با باکتری (Challenge)

باکتریهای جدا شده از بافت کلیه ماهیان مشکوک به استرپتوکوکوزیس، با روش کشت میکروبی و تست های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند(Buller, 2004; Austin and Austin, 2007). سپس در آزمایشگاه ژنتیک

مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر با استفاده از واکنش PCR و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از ژن 16srRNA، تائید تشخیص نهایی صورت گرفت. پس از تهیه لگاریتم ۶ باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، مقدار ۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی به ۲۶۰ عدد از ماهیان (۱۲ تیمار و یک گروه کنترل) تزریق شد. ماهیان مذکور حداکثر به مدت ۱۴ روز تحت نظر قرار گرفتند (Rodas *et al.*,2002). پس از بروز علائم بیماری در ماهیان، از ارگانهای مختلف نظیر کبد، کلیه و قلب نمونه گیری و در محیطهایی نظیر Blood agar و broth Hipporate با استفاده از روش Austin & Austin (۲۰۰۷) کشت داده شد و وجود یا عدم وجود کلنی های مشکوک به استرپتوکوکوس اینیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد تلفات در تیمارهای مختلف ثبت و با استفاده از فرمول زیر درصد بازماندگی نسبی(RPS) تعیین گردید(Ellis, 1988):

$$RPS = 1- \left[\frac{\text{Percent mortality in treated group}}{\text{Percent mortality in control group}} \times 100 \right]$$

۲۳-۲- تجزیه و تحلیل آماری

داده ها و آمار توصیفی با برنامه SPSS تحلیل و پردازش گردیدند. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2007 و از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA جهت تعیین معنی دار بودن میانگین متغیرها استفاده شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ تعیین گردید.

۳-نتایج

بر اساس نتایج حاصل از تست های میکروبی و بیوشیمیائی ، از تعداد ۲۵۰ نمونه جمع آوری شده از قسمت قدامی کلیه ماهیان بیمار و در حال تلف شدن ۲۰۶ نمونه مثبت بوده و۵ گونه (*S. uberis, S. agalactiae, S. faecium, S. dysgalactiae, S. iniae*) جدا شده است (جدول ۱-۳ و ۲-۳).

جدول ۱-۳: تعداد گونه های شناسائی شده به تفکیک هر استان

استان	*S. uberis*	*S. agalactiae*	*S. faecium*	*S. dysgalactiae*	*S. iniae*
چهار محال بختیاری	۳۰				
مازندران		۱	۴		
گیلان	۳	۱۹		۸	
کهگیلویه و بویراحمد	۱۵			۳۵	
کرمانشاه	۳			۷	
لرستان				۲۰	
فارس	۱۶				۱۱

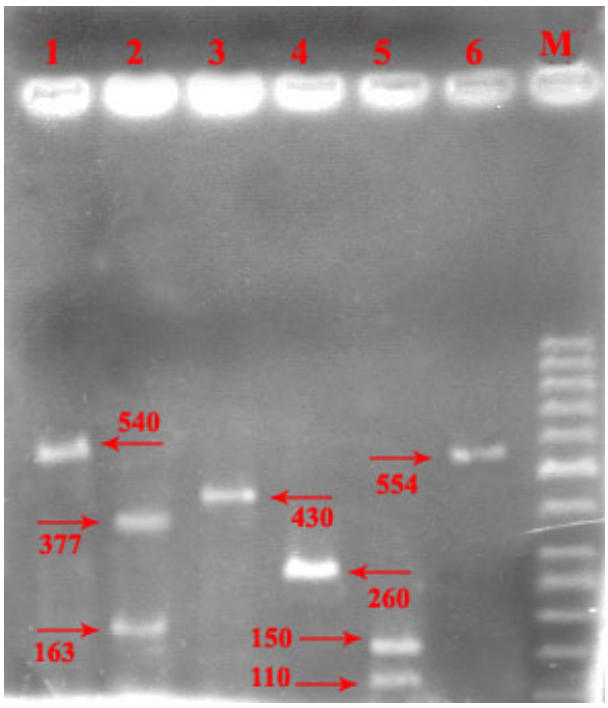
جدول۲-۳: خصوصیات بیوشیمیائی گونه های مختلف استرپتوکوکوس

	St. uberis	St. agalactiae	St. faecium	St. dysgalactiae	St. iniae
Gram – staining	+	+	+	+	+
Catalase production	-	-	-	-	-
Haemolysis	-	-	α	+	+
Swarming	-	-	v	-	-
Production of ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Production of lysine decarboxylase		-			
Production of arginine dihydrolase		-			
Motility test	+	+	+	+	+
Nitrate reduction		-			-
Indole production		-	-		
Citrate utilization		-	-		
Urease production			-	-	
Methyl red		+			-
Vogesproskauer reaction	+	+	+	-	-
Aesculin hydrolases	+	-	+	V	+
Degradation of gelatin		-	-		-
Onpg production	-	-	+		-
Oxidative-fermentative test	F	F	F	F	F
Acid production from arabinose	-	-	+	-	-
Acid production from glucose	+	+	+	+	+
Acid production from inositol		-	-		-
Acid production from maltose	+	+	+		+
Acid production from manitol	+	-	+	-	+
Acid production from mannose	+	+	+		+
Acid production from salicin	+	-	+	V	+
Acid production from sorbitol	+	-	-	-	-

	St. faecium	St. uberis	St. agalactiae	St. dysgalactiae	St. iniae
Acid production from trehalose	+	+	+	+	+
Acid production from xylose	-	-	-		-
Growth at macconkey			-		
Temperature	10^{oC} -50^{oC}	10^{oC} -37^{oC}	25^{oC} -37^{oC}	25^{oC} -37^{oC}	10^{oC} -37^{oC}
Growth on NaCl	0-%6.5	0-%6.5	0-%3	0-%4	2-%4
Hipporatesudium	+	+	+	-	-

برای شناسائی نهائی گونه های مورد بررسی از روش مولکولی استفاده گردید.

برای این منظور از تک کلونی های کشت داده شده، برای استخراج DNA استفاده شد. در مجموع تعداد ۱۷۲ نمونه DNA از گونه های مختلف استرپتوکوکوس استخراج گردید و واکنش PCR برای کلیه نمونه ها با استفاده از ۵ پرایمر طراحی شده انجام شد. پس از الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی برخی از نمونه ها ، وزن مولکولی قطعات DNA اندازه گیری و براساس آن شناسایی گونه ها انجام گرفت(شکل۱-۳) . در این بررسی با توجه به نتایج بدست آمده از جدول ۳-۳، گونه های *S.uberis*، *S.agalactiae* ، *S.dysgalacotia* ، *S.faecium* و *S.inia* شناسایی شدند. قابل ذکر است گونه *S.iniae* فقط در استان فارس شناسایی شد.



شکل۱-۳: الگوی باندی محصول PCR گونه های مختلف استرپتوکوکوس بر روی ژل آگارز

ستون۱: *S. Faecium* ، ستون۲: *S. parauberis* ، ستون۳: *S. agalactiae* ، ستون۴: *S. uberis* ، ستون۵: S. dysgalactiae ، ستون۶: S. iniae، ستون M : مارکر

جدول۳-۳: شناسائی گونه های مختلف استرپتوکوکوس یا روش مولکولی

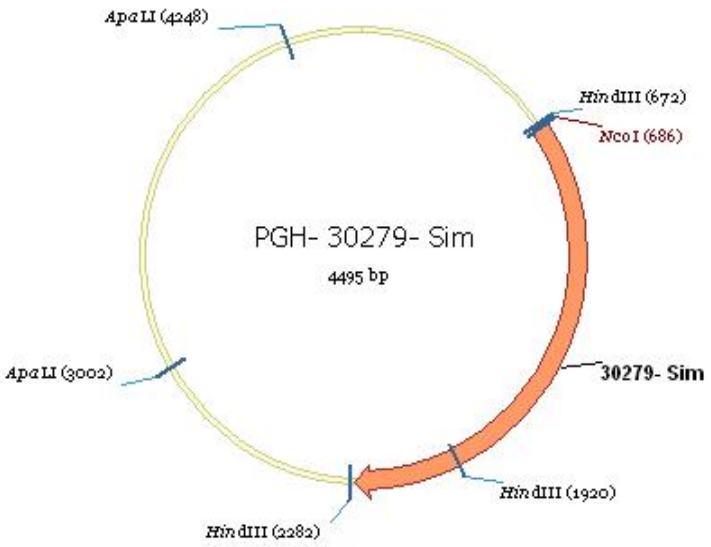
استان	هضم آنزیمی	Primers					گونه	No of samples
		STRP1	STRP	STRA	ENR	BacRNA		
چهارمحال بختیاری	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S. uberis*	۳۰
مازندران	-	–	-	۴۳۰	–	-	*S. agalactiae*	۱
مازندران	بدون قطع :*XhoI*	–	-	–	۵۴۰	۶۷۵	*S. faecium*	۴
گیلان	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S .uberis*	۳
گیلان	-	–	-	۴۳۰	–	-	*S .agalactiae*	۱۹
گیلان	*DraIII:* ۱۱۰و ۱۵۰ جفت باز	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S. dysgalactiae*	۸
کهگیلویه وبویراحمد	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S. uberis*	۱۵
کهگیلویه وبویراحمد	*DraIII:* ۱۱۰و ۱۵۰ جفت باز	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S. dysgalactiae*	۳۵
کرمانشاه	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S .uberis*	۳
کرمانشاه	*DraIII* ۱۱۰و ۱۵۰ جفت باز	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S. dysgalactiae*	۷
لرستان	*DraIII:* ۱۱۰و ۱۵۰ جفت باز	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	*S. dysgalactiae*	۲۰
فارس	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	-	-	۶۷۵	*S .uberis*	۱۶
فارس	-	۵۵۴	-	-	-	-	*S. iniae*	۱۱

پس از شناسائی گونه *S. iniae*، مراحل استخراج ژن و انتقال آن به پلاسمید و باکتری *Lactococcus lactis* انجام شد.

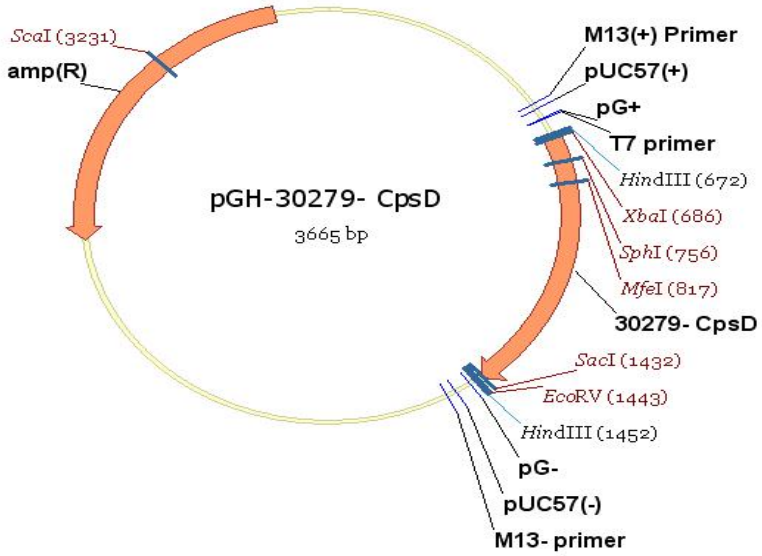
۱-۳- ساخت توالی *simA* و *cpsD* بطور جداگانه در پلاسمید *pGH*

همانطور که ذکر گردید، توالی ژن کد کننده پروتئین *simA* و *cpsD* توسط شرکت ندای فن در وکتور *pGH* ساخته شد.

در شکل ۲-۳ و ۳-۳ نقشه پلاسمید کلون شده ژن *simA* و *cpsD* نشان داده شده است.



شکل ۲-۳: تصویر شماتیک از قطعه ژن simA ساخته شده و جایگاه اثر آنزیمهای محدود الاثر

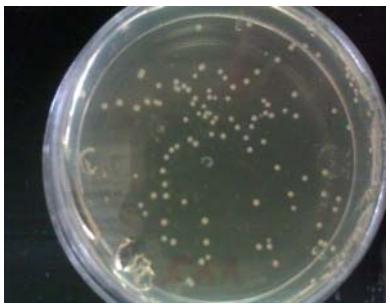


شکل ۳-۳: تصویر شماتیک از قطعه ژن cpsD ساخته شده و جایگاه اثر آنزیمهای محدود الاثر

۲-۳- ترانسفورماسیون پلاسمید سنتتیک *pGH* حاوی ژن کد کننده *simA* و *cpsD* به درون باکتری TOP10

به منظور افزایش تعداد پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعه کد کننده پروتئین *simA* و *cpsD*، پلاسمید های نوترکیب با استفاده از روش ذکر شده به داخل سلول های *E. coli* سویه TOP10 انتقال داده شد.

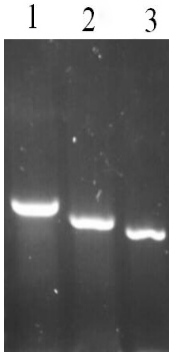
پس از گذشت دوره انکوباسیون، آن‌ها را در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین کشت داده و بعد از گذشت ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، وجود کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب که دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین نیز می باشد، دال بر وجود و صحت ترانسفورماسیون پلاسمید مورد نظر در سلولهای TOP10 هستند(شکل ۴-۳).



شکل ۴-۳: رشد کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب

۱-۲-۳- استخراج پلاسمید های *pNZ8148* و *pGH* حاوی قطعه کد کننده پروتئین *simA* و *cpsD*

پلاسمید *pNZ8148* و پلاسمیدهای حاوی قطعات ژنی *simA* و *cpsD* بترتیب دارای ۳۲۰۸، ۴۴۹۵ و ۳۶۶۵ جفت باز می باشد(۵-۳).

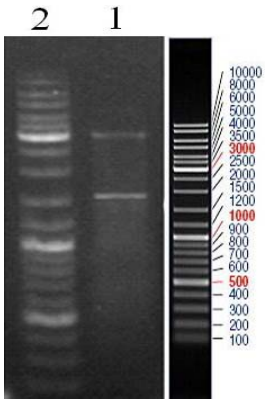


شکل۵-۳: استخراج پلاسمید *pNZ8148* و *pGH* حاوی قطعه insert از سلولهای TOP10

1) پلاسمید حاوی *simA* 2)پلاسمید حاوی *cpsD* 3)پلاسمید *pNZ8148*

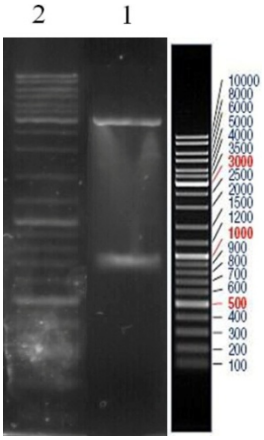
۲-۲-۳-استخراج ژن ها با استفاده از هضم آنزیمی

قطعات ۱۵۷۸ bp مربوط به ژن *simA* و ۷۴۸ bp مربوط به ژن *cpsD* می باشد. با توجه به نتایج حاصله، وجود قطعات ژنی ۱۵۷۸ و ۷۴۸ جفت بازی در پلاسمید اولیه و سنتتیک *pGH* تأیید گردید(شکل ۶-۳ و ۷-۳).



شکل۶-۳: قطعه *simA* برش خورده توسط آنزیم‌های محدود الاثر *NcoI* و *KpnI*

1) قطعه *simA* برش خورده 2) مارکر فرمنتاز ۱۰۰ bp

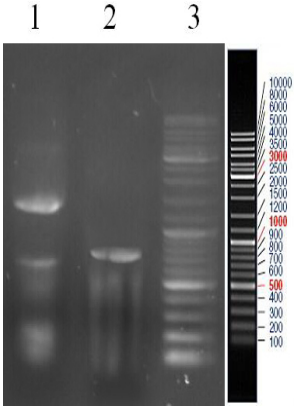


شکل ۷-۳: قطعه *cpsD* برش خورده توسط آنزیم‌های محدود الاثر *SacI* و *XbaI*

1) قطعه *cpsD* برش خورده 2) مارکر فرمنتاز ۱۰۰ bp

۳-۲-۳- استخراج insert از ژل آگارز

پس از بردن قطعه insert آنزیم خورده روی ژل آگارز ۱/۵٪ و استخراج آن، باند حاصل برای تأیید صحت استخراج، روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد(شکل ۸-۳).



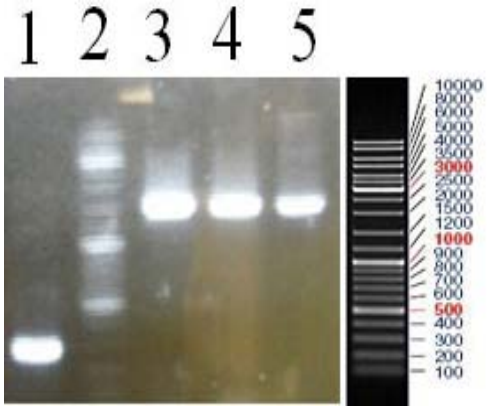
شکل ۸-۳: باند مربوط به قطعه insert استخراج شده از ژل آگارز قطعه *simA* 2) قطعه *cpsD*

3) مارکر فرمنتاز ۱۰۰ bp

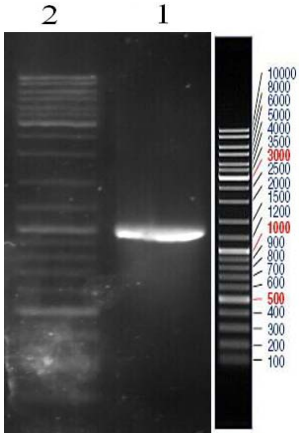
۳-۳- ساب کلون ژن های *simA* و *cpsD* در درون وکتور بیانی *pNZ8148*

۳-۳-۱- تأیید پلاسمیدهای حاوی قطعه های مورد نظر

قطعه PCR شده در پلاسمید حامل قطعه ژنی *simA* و *cpsD*، بترتیب اندازه bp ۱۷۷۸و ۹۴۸ را داشته باشد، که پس از انجام واکنش PCR و الکتروفورز محصولات روی ژل ۱/۵٪ باند موردنظر دیده و حضور قطعه ژنی *simA* و *cpsD* درپلاسمید ها تأئید گردید(شکل ۹-۳و ۱۰-۳).



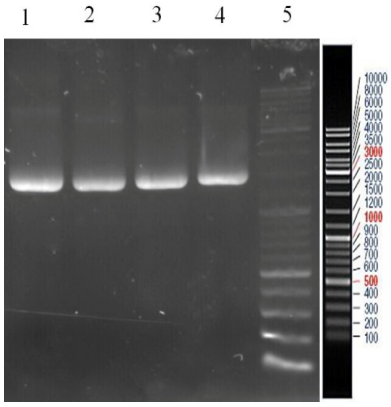
شکل ۹-۳: تأیید حضور ژن کدکننده پروتئین *simA* در وکتور *pNZ8148* با استفاده از پرایمر یونیورسال
1) کنترل منفی (پلاسمید غیرنوترکیب) 2) مارکر bp ۱۰۰ 3-5) ژن *simA* تکثیر یافته



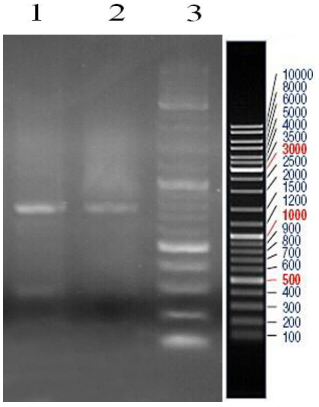
شکل ۱۰-۳: تأیید حضور ژن کدکننده پروتئین *cpsD* در وکنور *pNZ8148* با استفاده از پرایمر یونیورسال
1) ژن *cpsD* تکثیر یافته 2) مارکر bp ۱۰۰

۳-۳-۲- نتایج حاصل از تأیید حضور قطعه به وسیله پرایمرهای اختصاصی ژن های *simA* و *cpsD*

پلاسمید *pNZ8148* فاقد قطعه در واکنش PCR، هیچ باندی را نشان نمی دهند، اما در صورت وجود قطعات ژنی *simA* و *cpsD*، بترتیب باندهای bp ۱۵۷۸ و ۷۴۸ بروی ژل ۱/۵٪ مشاهده گردید(شکل ۱۱-۳ و ۱۲-۳).



شکل ۱۱-۳: تأیید حضور ژن کدکننده پروتئین *simA* در وکنور *pNZ8148* با استفاده از پرایمر اختصاصی 1-4) ژن *simA* تکثیر یافته 5) مارکر ۱۰۰ bp



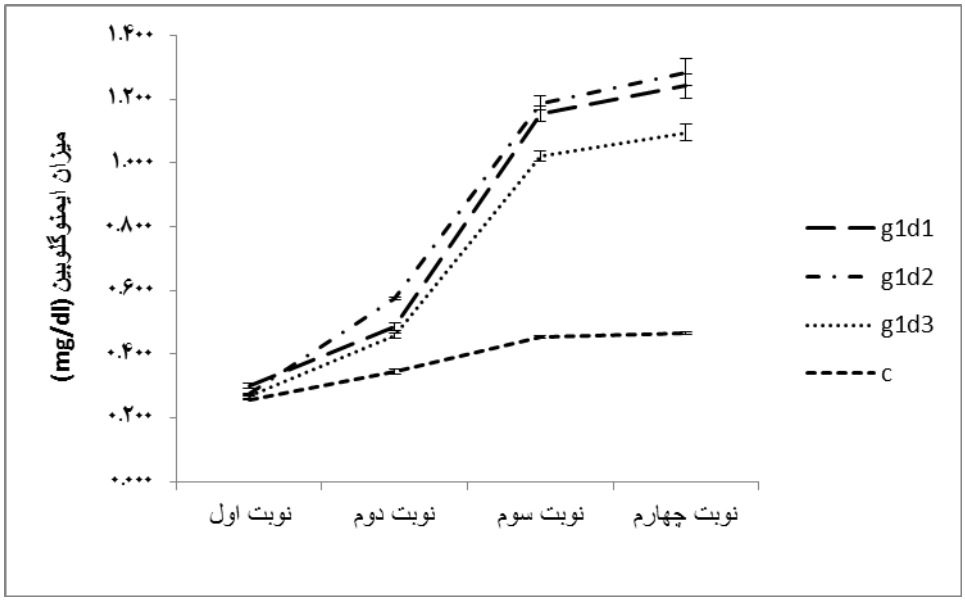
شکل ۱۲-۳: تأیید حضور ژن کدکننده پروتئین *cpsD* در وکنور *pNZ8148* با استفاده از پرایمر اختصاصی

1-2) ژن *cpsD* تکثیر یافته 3) مارکر فرمنتاز ۱۰۰ bp

۴-۳-روشهای واکسیناسیون

۱-۴-۳-روش خوراکی

همانگونه که در شکل ۱۳-۳ مشاهده می گردد در ژن (g1) میزان IgM در g1d2 در مرحله چهارم (۱/۲۸۵±۰/۰۴۲ میلی گرم در دسی لیتر) بیش از دو دوز دیگر بوده و در مقایسه با شاهد دارای اختلاف معنی دار ($p<0/05$) می باشد.

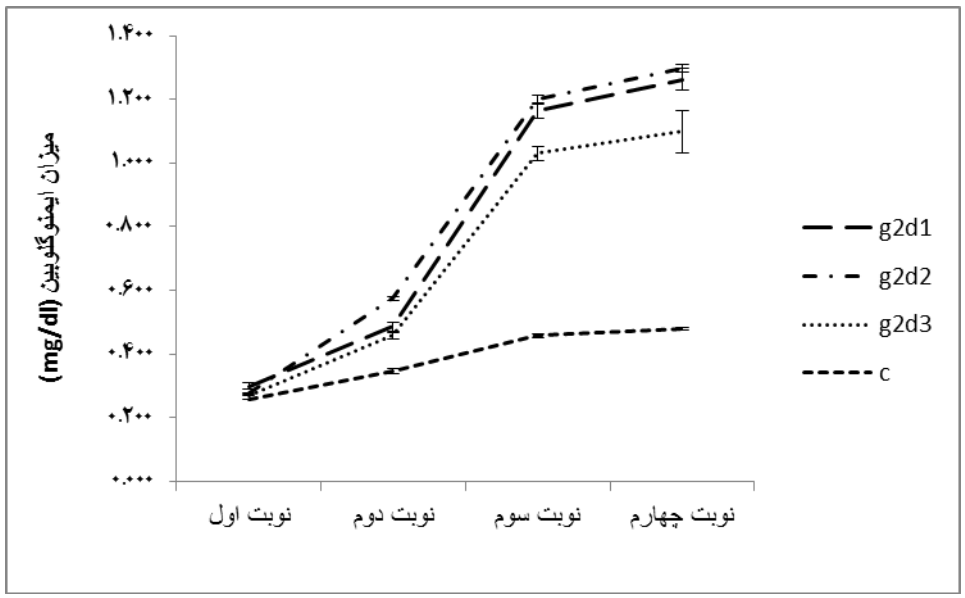


شکل ۱۳-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 ، d3 و شاهد در ژن (g1) به روش خوراکی

جدول ۴-۳ : مقایسه میانگینIgM در d1، d2 ، d3 و شاهد در ژن (g1) به روش خوراکی

	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم	نوبت چهارم
g1d1	0/300±0.007	0/486±0/012	1/154±0/022	1/242±0/038
g1d2	0/276±0/001	0/575±0/005	1/188±0/021	1/285±0/042
g1d3	0/270±0/001	0/457±0/007	1/020±0/016	1/095±0/026
c	0/258±0/001	0/345±0/007	0/454±0/005	0/466±0/004

در ژن (g2) نیز میزان IgM در g2d2 در مرحله چهارم (۰/۰۱۳ ± ۱/۲۹۷ میلی گرم در دسی لیتر) بیش از دو دوز دیگر بوده و در مقایسه با شاهد دارای اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) می باشد (شکل ۱۴-۳).



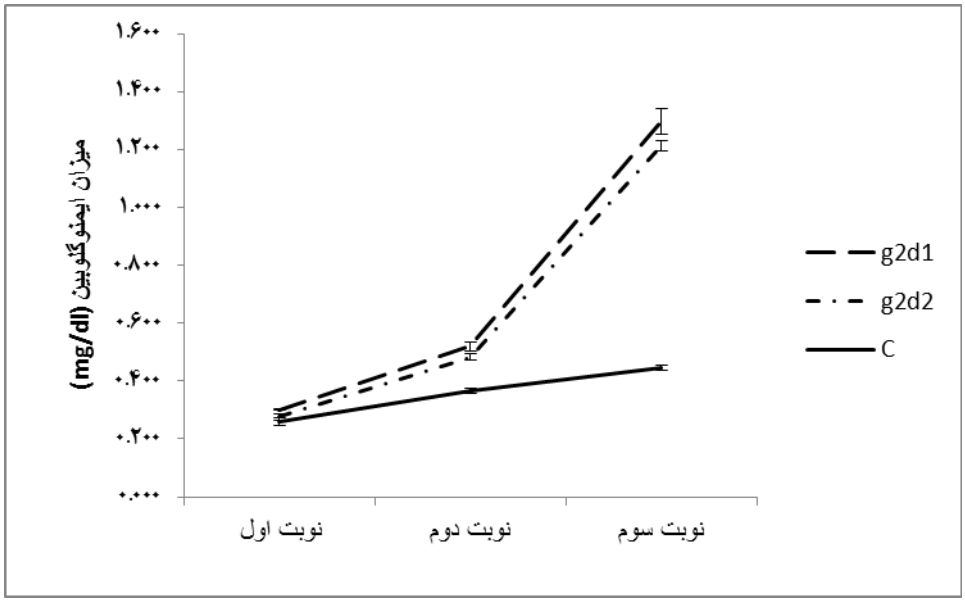
شکل ۱۴-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 ، d3 و شاهد در ژن (g2) به روش خوراکی

جدول۵-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 ، d3 و شاهد در ژن (g2) به روش خوراکی

	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم	نوبت چهارم
g2d1	0/300±0.009	0/486±0/014	1/165±0/024	1/262±0/035
g2d2	0/276±0/002	0/575±0/007	1/199±0/013	1/297±0/013
g2d3	0/270±0/002	0/457±0/009	1/030±0/023	1/098±0/067
c	0/258±0/001	0/345±0/007	0/458±0/005	0/480±0/004

۲-۴-۳- روش غوطه وری

در این روش فقط از ژن g2 استفاده شد. میزان IgM در g2d1 (۰/۰۴۳ ±۱/۲۹۷) در مرحله سوم اندکی بیش از g2d2 (۰/۰۱۷ ± ۱/۲۱۴) بوده و اختلاف آن با شاهد معنی دار (p<۰/۰۵) می باشد (شکل ۱۵-۳ و جدول ۶-۳).



شکل ۱۵-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 و شاهد در ژن (g2) به روش غوطه وری

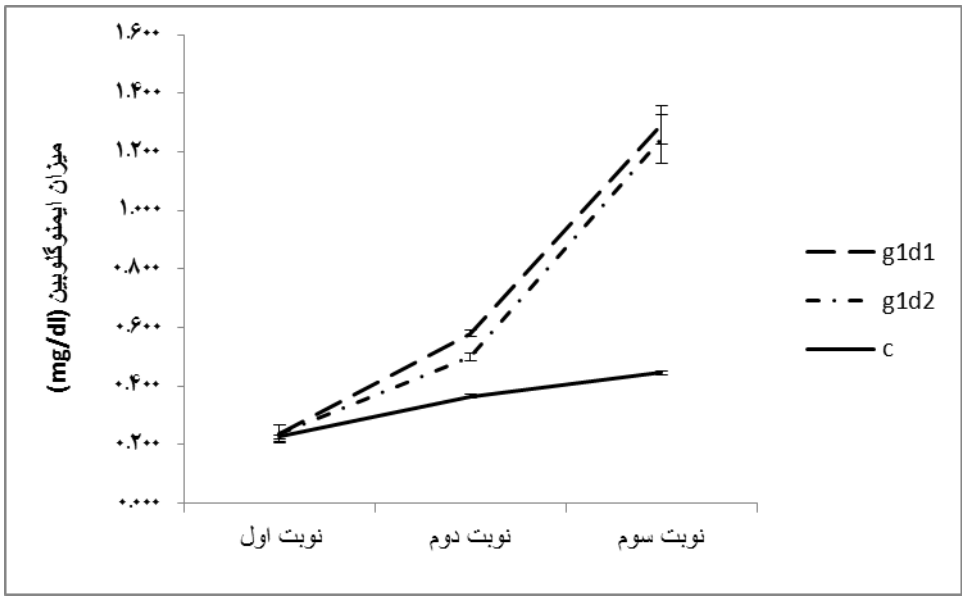
جدول ۶-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 و شاهد در ژن (g2) به روش غوطه وری

	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم
g2d1	0/300±0.002	0/520±0/015	1/298±0/044
g2d2	0/276±0/012	0/483±0/010	1/215±0/018
C	0/258±0/013	0/365±0/008	0/446±0/007

۳-۴-۳- روش تزریقی(داخل صفاقی)

در این روش در ژن (g1) میزان IgM در g1d1 (۰/۰۶۵ ±۱/۲۹۱) در مرحله سوم بیش از g1d2

(۰/۰۸۲± ۲۴۳ /۱) بوده و در مقایسه با شاهد دارای اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) می باشد (شکل ۱۶-۳ و جدول ۷-۳).

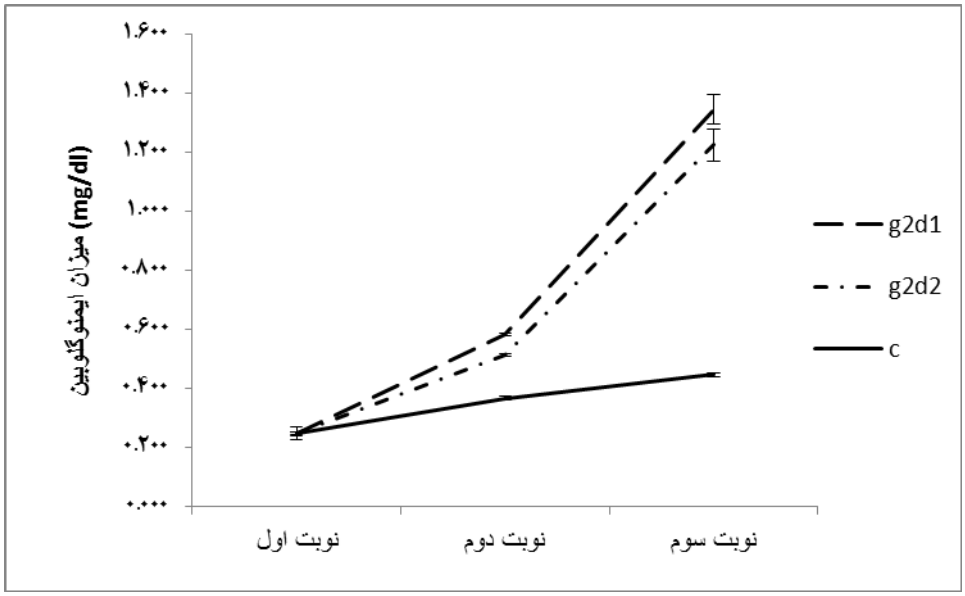


شکل ۱۶-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 و شاهد در ژن (g1) به روش تزریقی

جدول ۷-۳:مقایسه میانگین IgM در d1، d2 و شاهد در ژن (g1) به روش تزریقی

	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم
g1d1	0/238±0/031	0/580±0/012	1/291±0/065
g1d2	0/238±0/029	0/500±0/014	1/243±0/082
c	0/227±0/008	0/365±0/006	0/445±0/006

در ژن (g2) نیز میزان IgM در g2d1 (۰/۰۴۹ ± ۱/۳۴۲) در مرحله سوم بیش از g2d2 (۰/۰۵۴±۱/۲۲۳) بوده و در مقایسه با شاهد دارای اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) می باشد (شکل ۱۷-۳ و جدول ۸-۳).



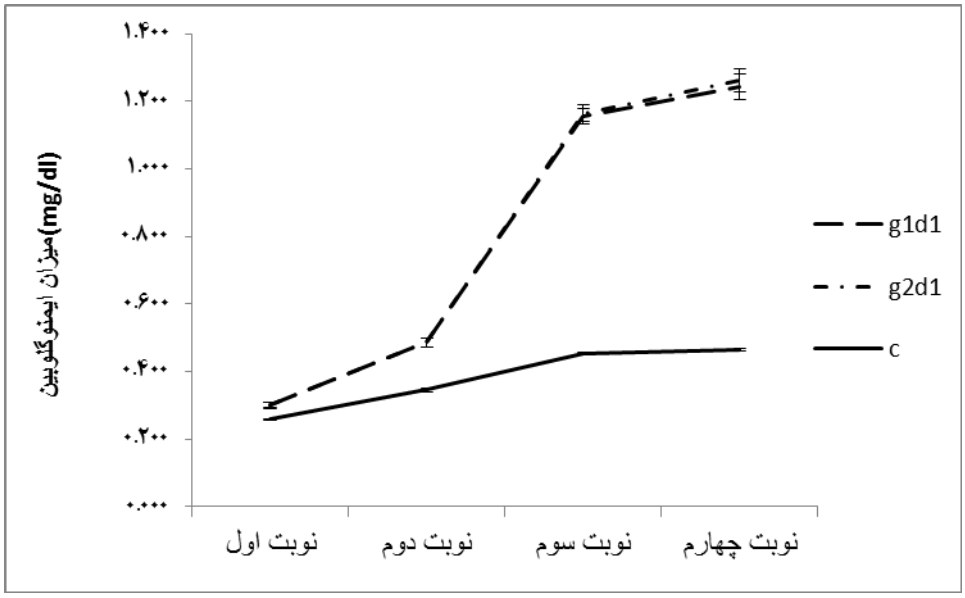
شکل ۱۷-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 و شاهد در ژن (g2) به روش تزریقی

جدول ۸-۳: مقایسه میانگین IgM در d1، d2 و شاهد در ژن (g2) به روش تزریقی

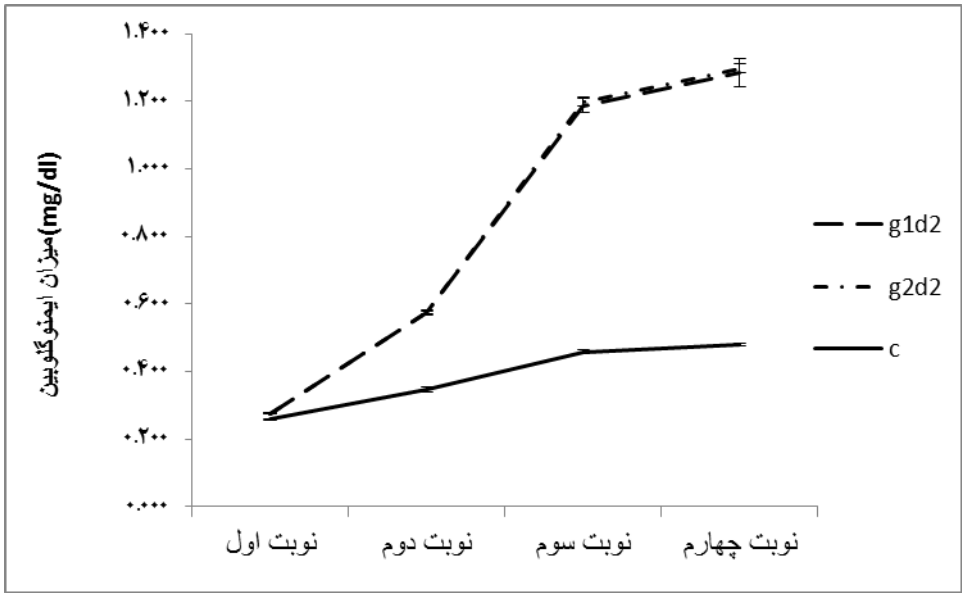
	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم
g2d1	0/245±0/021	0/579±0/004	1/342±0/050
g2d2	0/246±0/004	0/512±0/005	1/223±0/055
c	0/245±0/008	0/365±0/006	0/445±0/006

۵-۳-مقایسه دوزها

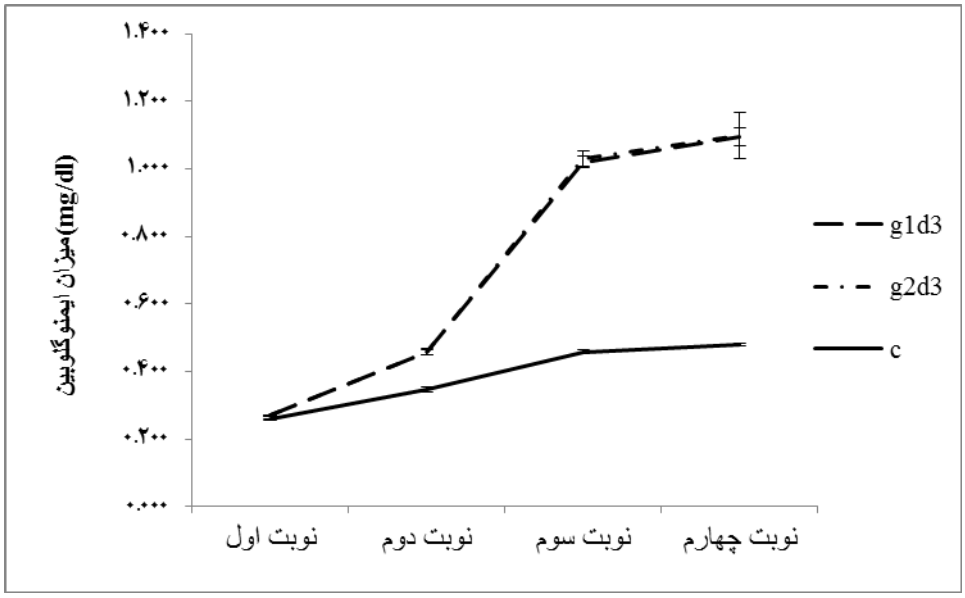
همانطور که در اشکال ۱۸-۳، ۱۹-۳ و ۲۰-۳ ملاحظه می شود در روش خوراکی دوز های d1، d2 و d3 در ژنهای g1 و g2 در تولید میزان IgM چندان تفاوتی باهم ندارند.



شکل ۱۸-۳: مقایسه میانگین IgM در ژنهای g1 و g2 با دوز d1 به روش خوراکی

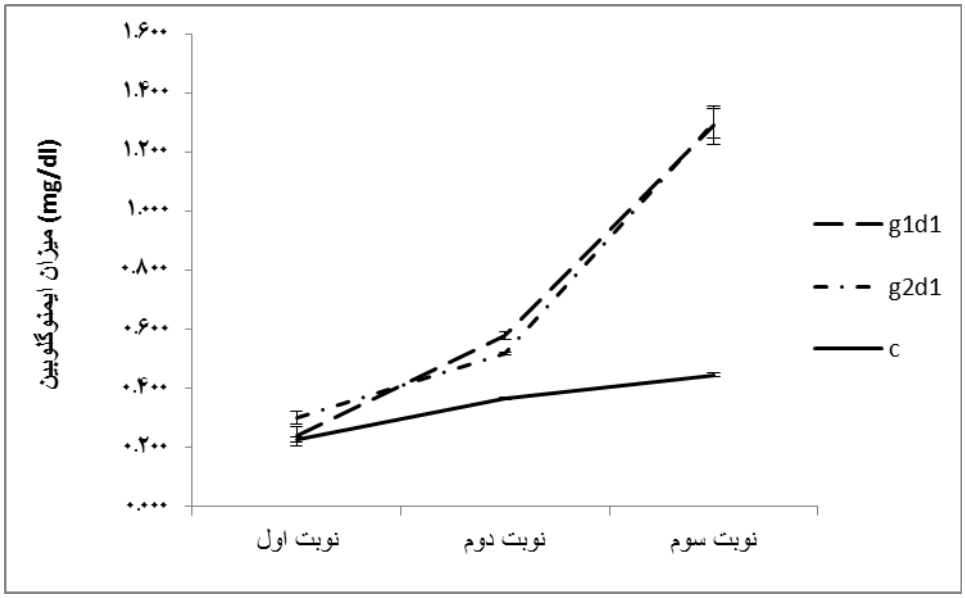


شکل ۱۹-۳: مقایسه میانگین IgM در ژنهای g1 و g2 با دوز d2 به روش خوراکی

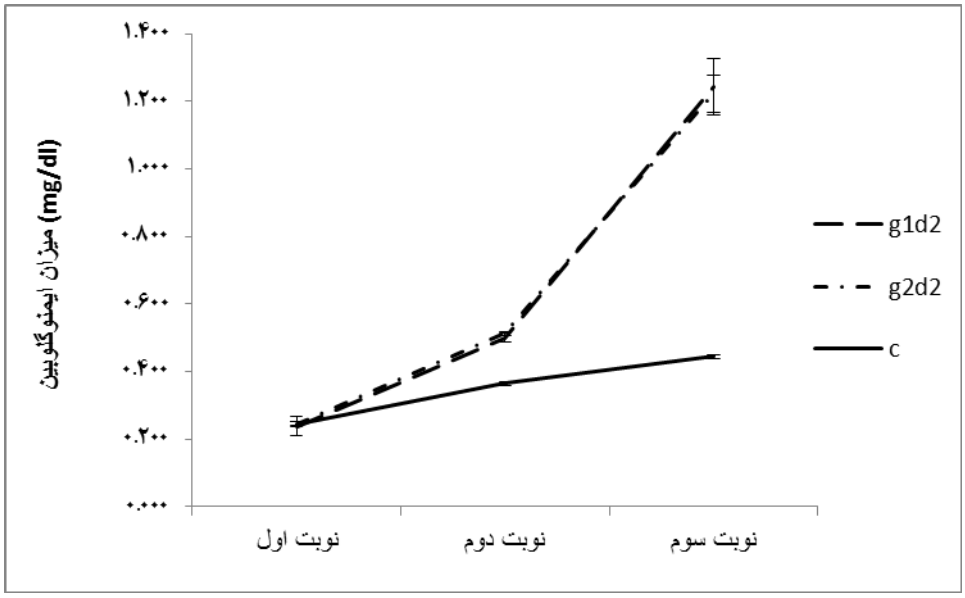


شکل ۲۰-۳: مقایسه میانگینIgM در ژنهای g1 وg2 با دوز d2 به روش خوراکی

در روش تزریقی نیز دوزهای d1 و d2 در ژنهای g1 و g2 در تولید میزان IgM تفاوت چندانی باهم ندارند(شکل ۲۱-۳ و ۲۲-۳).



شکل ۲۱-۳: مقایسه میانگین IgM در ژنهایg1 و g2 با دوز d1 به روش تزریقی



شکل ۲۲-۳: مقایسه میانگین IgM در ژنهای g1 و g2 با دوز d2 به روش تزریقی

۶-۳-رویارویی با باکتری

نتایج رویارویی ماهیان واکسینه شده با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که از تعداد ۲۰ قطعه ماهی مورد بررسی برای هر تیمار، در صد بقاء نسبی ماهیان در کلیه تیمارها بجز تیمار۳ (۸/۲۵±۴۲/۶۳ درصد) بالای ۵۰ درصد و برای گروه کنترل نیز ۱۴/۲۵±۲۱/۴۳ درصد بوده است(جدول ۹-۳). بیشترین درصد بقاء نسبی ماهیان مربوط به تیمار ۱۱ (۲۳/۵±۶۱/۲۵ درصد) بود و آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار بین درصد بقاء نسبی ماهیان واکسینه شده با گروه کنترل می باشد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۹-۳ : میانگین درصد بقاء نسبی ماهیان واکسینه شده در تیمارهای مختلف و گروه کنترل بعد از رویارویی با استرپتوکوکوس اینیایی

شماره ومشخصات تیمارها	تعداد تلفات	تعداد باقیمانده	درصد بقا نسبی (Mean ±SD)
۱- خوراکی (g1d1)	۱۰	۱۰	۵۰/۷۰±۷/۳۷
۲ – خوراکی (g1d2)	۱۰	۱۰	۵۱/۲۰±۵/۲۵
۳- خوراکی (g1d3)	۱۲	۸	۴۲/۶۳±۸/۲۵
۴- خوراکی (g2d1)	۱۰	۱۰	۵۱/۷۲±۷/۳۵
۵- خوراکی (g2d2)	۹	۱۱	۵۴/۲۰±۷/۱۲
۶- خوراکی (g2d3)	۱۰	۱۰	۵۱/۰۰±۷/۷۵
۷- غوطه وری (g2d1)	۹	۱۱	۵۴/۸۰±۵/۲۲
۸- غوطه وری (g2d2)	۱۰	۱۰	۵۱/۰۰±۷/۵۵
۹- تزریقی (g1d1)	۹	۱۱	۵۴/۸۰±۷/۴۲
۱۰- تزریقی (g1d2)	۹	۱۱	۵۴/۴۰±۷/۱۲
۱۱- تزریقی (g2d1)	۸	۱۲	۶۱/۲۵±۳/۵۰
۱۲- تزریقی (g2d2)	۱۰	۱۰	۵۱/۳۰±۵/۷۵
۱۳- شاهد	۱۶	۴	۲۱/۴۳±۴/۲۵

۴-بحث و نتیجه گیری

در چند سال گذشته استرپتوکوکوزیس یکی از مهمترین بیماریهای عفونی باکتریایی در مزارع پرورش ماهیان سردابی (قزل آلای رنگین کمان) در ایران بوده است. این بیماری در ماهی قزل آلا بوسیله گونه های مختلفی از استرپتوکوکوس، لاکتوکوکوس و واگوکوکوس سالمونیناروم (Buller, 2004) بروز می کند.

در مطالعه حاضر ۴۰٪ نمونه های مورد بررسی به گونه های مختلف استرپتوکوک آلوده بودند و از این جنس ۵ گونه بیماریزا جدا گردید.

بر اساس گزارشات دیگر محققین استرپتوکوکوس اینیایی عامل اصلی استرپتوکوکوزیس در ماهیان پرورشی و وحشی دنیا می باشد و بروز این بیماری در صنعت آبزی پروری در ماهیان آب شیرین و شورگزارش شده است(Shoemaker *et al*., 2006; Russo *et al*., 2006; Klesius *et al*., 2006)). در اغلب گزارشات محققین دیگر کشورها، گونه اینیایی بیشتر دیده می شود (Yang and Li., 2009) . Soltani و همکاران (۲۰۰۵) بیماریزایی و خصوصیات بیوشیمیایی گونه اینیایی را در ماهی قزل آلا مزارع پرورشی ایران گزارش کرده و عامل اصلی استرپتوکوکوزیس را گونه مزبور ذکر نموده است. از سال ۱۹۷۶، *S. iniae* به عنوان یکی از باکتری های گرم مثبت بیماری زا در آبزی پروری شناخته شده است. با توسعه سروتایپ های جدید این باکتری و همچنین پتانسیل ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی، ضرورت پیدا کردن راه حل های جایگزین برای کشف عوامل ضدمیکروبی، درمان و پیشگیری به منظور کاهش بیماری *S. iniae* جدید در ماهی ها ضروری می باشد(Agnew *et al*., 2007).

در اغلب ماهیان بیمار در استانها علائمی شامل تیرگی پوست،خونریزی در اطراف چشم ،برانش،قاعده باله ها و بعضی جاهای بدن ،بیرون زدگی چشم اغلب دو طرفه،کدورت چشم، آب آوردگی شکم و زخم دیده شده است.

در بین نشانه های بیماری، خونریزی ، سیاهی ،بیرون زدگی چشم رایج تر بوده ۹۰٪ این علائم با علائمی که دیگران گزارش کردند مشابه بود (Yanong and Francis-Floyd 2002; Russo *et al*., 2006; Suanyuk *et al*., 2008; Romalde *et al*., 2008

با این حال در این مطالعه بعضی از علائم کلینیکی مانند علائمی که به منگوآنسفالیت بر می گردد (شنای غیر متعارف) کمتر دیده شده است.

استرپتوکوکهای جدا شده در ابتدا به روش کشت و تستهای بیو شیمیایی متمایز گردیدند و سپس به روش مولکولی تایید شدند. در پایان ۵ گونه استرپتوکوک بیماریزا شامل گونه اینیایی در فارس ،فسیوم در مازندران آگالاکتیه درگیلان و مازندران، گونه دیسگالاکتیه در کهگلویه و بویر احمد، کرمانشاه و گیلان ،گونه اوبریس درکهگلویه و بویر احمد،کرمانشاه ،فارس،چهارمحال و بختیاری و گیلان شناسایی شدند.

هرچند علایم بالینی مشاهده شده در این تحقیق در بسیاری از مطالعات دیگر محققین نیز مانند:

2002 ؛ Eldar *et al.*, 1997 ؛ Salvador *et al* .2005؛Yanong & Floyed 2002 ; Soltani *et al*., 2005,2008 Bromage & Owens, ؛ Amal 2011 و Zamri-saad. ، اخلاقی و کشاورز، ۱۳۸۱؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۸۶ ؛ سعیدی و همکاران، ۱۳۸۸، پورغلام و همکاران ۱۳۸۹ نیز آمده است، لیکن نمی توان صرفا بر اساس علایم بالینی به تشخیص قطعی استرپتوکوکوزیس رسید.

میزان LD50 باکتری استرپتوکوک در ماهیان قزل‌الا در ده روز معادل $۱/۹۳\times۱۰^{۵}$ $Cfuml^{-1}$ باکتری بوده است، در بررسی‌های Bromage and Owens, 2002 میزان LD50 باکتری استرپتوکوک در ماهیان بارمومندی در مدت ده روز $۳/۲\times۱۰^{۴}$ $Cfuml^{-1}$ بوده است. همچنین در بررسی‌های Eldar and Ghittion, 1999 میزان LD50 استرپتوکوک در ماهیان قزل‌آلا برابر با $۲/۵\times۱۰^{۵}$ $Cfuml^{-1}$ باکتری در ۲۱ روز محاسبه گردید. در بررسی انجام شده توسط سلطانی و همکاران (۱۳۸۶) میزان LD50 ۷۲ ساعته استرپتوکوکوس جدا شده از مزارع پرورشی $۱/۵\times۱۰^{۸}$باکتری بوده است. لذا بر اساس اطلاعات و گزارشهای فوق الذکر، دوز مورد استفاده برای رویارویی در این تحقیق تعیین شده است.

به دلیل اینکه از قبل پیش بینی شده بود اجرای عملیات واکسیناسیون در روش خوراکی ممکن است در مراحل مختلف از دقت کافی برخوردار نباشد و روش تزریقی نیز در تراکمهای بالای ماهیان، عملا کاربرد چندانی نخواهد داشت، لذا برای واکسیناسیون ماهیان هر سه روش خوراکی، غوطه وری و تزریقی استفاده شد.

در این تحقیق نتایج نشان داد که درصد بقا نسبی در همه تیمارها غیر از دوز سوم (d3) در روش خوراکی، بالای ۵۰ درصد بوده و ضمنا در هر سه روش خوراکی، غوطه وری و تزریقی و همه تیمارها میزان کارایی واکسن منتج از ژن (g2) در مقایسه با ژن (g1) بهتر بوده است.

در سال ۲۰۰۵ Buchanan و همکارانش آنزیم فسفوگلوکوموتاز را به عنوان اولین مولکول بیماریزای استرپتوکوکوس اینیایی شناسایی کردند. آنزیم فسفو گلوکوموتاز با تبدیل گلوکز ۶- فسفات و گلوکز ۱- فسفات در تولید ساختارهای پلی ساکاریدی باکتری از جمله کپسول استرپتوکوکوس اینیه، نقش مهمی در بیماریزایی آن دارد. Buchanan و همکارانش نشان دادند در موتانتی که ژن فسفوگلوکوموتاز آن تخریب شده بود، ضخامت کپسول و دیواره سلولی آن در زیر میکروسکوپ الکترونی نسبت به تیپ وحشی باکتری، ۳ برابر کاهش داشت(Facklam, 2005). بنابراین مولکول فسفوگلوکوموتاز، انتخاب مناسبی جهت تهیه واکسن می باشد که احتمالاً می تواند به صورت واکسن نوترکیب علیه استرپتوکوکوس اینیایی عمل کند.

هدف از این تحقیق، جداسازی ژن بیماریزای فسفوگلوکوموتاز از استرپتوکوکوس اینیایی و کلونینگ آن جهت تهیه واکسن نوترکیب بوده است.

تحقیق حاضر مشابه تحقیقی بود که Buchanan و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند. آنها ژن pgm را با استفاده از پرایمرهای Forward 5 –GAACTAGCTAGTTACTTTTGTAACTG-3 و Reverse 5- CTAATTCACAAAAGTGTTGATTTCAG-3 که جایگاه دو آنزیم برش دهنده Bam HI و XbaI در ۵َ پرایمر

تعبیه شده بود، از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی تکثیر کردند و مراحل T/A Cloning را در وکتور PCR2.1Topo انجام دادند و محصول T/A Cloning را توسط واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی pgm که طراحی کرده بودند و همچنین واکنش هضم آنزیمی با آنزیم های دو سر قطعه (XbaI,BamH1) تایید کردند و در نهایت ژن pgm را در وکتور بیان شاتل Pdc123(7) ساب کلون کردند و توسط PCR و هضم آنزیمی تایید نمودند. در این بررسی نیز ژن pgm با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در ژن بانک سایت NCBI با accession no : AY846302 از استرپتوکوکوس اینیایی که Buchanan و همکارانش استفاده کرده بودند با واکنش PCR تکثیر شد. با این تفاوت که در انتهای ´۵ پرایمر، جایگاه برش آنزیم های BamH I و EcoR I تعبیه شد و مراحل T/A Cloning در این تحقیق در وکتور Ptz57R انجام شد. PTZ57R ، ۲۸۸۶ جفت باز دارد که جایگاه کلونینگ (MCS) آن در ژن lacz تعبیه شده است و تشخیص کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب را با توجه به رنگ آبی و سفید آسان می سازد. همچنین این وکتور برای آنزیم BamHI دارای یک جایگاه برش در محل باز ۶۵۴ و برای آنزیم EcoRI در محل باز ۶۱۵ دارد که در این بررسی جهت صحت کلونینگ علاوه بر PCR از روش هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم های فوق استفاده شد و با برش آنزیمی پلاسمید Ptz57R/pgm یک قطعه ۱۷۱۶ جفت بازی و یک باند حدود ۲۸۰۰ جفت بازی مربوط به پلاسمید مشاهده شد. در نهایت قطعه مورد نظر در وکتور pETDuet-1 ساب کلون شد و توسط واکنش PCR نیز تایید شد. pETDuet-1 ، وکتور بیانی است که دارای ۵۴۲۰ جفت باز می باشد و دو جایگاه کلونینگ (MCS_1, MCS_2) دارد و همزمان قادر به بیان دو ژن می باشد. Buchanan و همکارانش (۲۰۰۵) نشان دادند که موتانت Δpgm به طور اولیه در خون، مغز و طحال پخش می شود، اما ظرف ۲۴ ساعت بدون آسیب رساندن به هیچ ارگانیسمی از بین می رود و ۹۰ تا ۱۰۰ درصد از ماهیانی که موتانت Δpgm به آنها تزریق شده بود، در اثر برخورد با نوع وحشی باکتری، زنده می مانند و نشان دادند که این موتانت قادر به تحریک پاسخ محافظتی ایمنی و احتمالاً به عنوان واکسن نوترکیب، کاندید مناسبی برای آبزیان است که تاییدی بود بر هدفی که این تحقیق دنبال می کرد.

همانطور که قبلا مطرح شد هدف از کلونینگ و بیان ژن *simA* و *cpsD* دراین تحقیق، تولید واکسن نوترکیب می باشد.

تحقیقات بسیاری تاکنون با سیستم NICE انجام شده است از جمله آنها می توان به تحقیق Wisselink و همکارانش (۲۰۰۵) اشاره کرد که جهت تولید بالای مانیتول توسط لاکتوکوکوس لاکتیس، ژن مانیتول-۱-فسفاتاز *Eimeria tenella* و ژن مانیتول-۱-فسفات دهیدروژناز *Lactobacillus plantarum* را در سیستم بیان NICE در *L. lactis* کلون کردند.

مطالعات نشان داده از وکتور pNZ8148 جهت بیان بهتر پروتئین های غشایی ، ترشح پروتئین در محیط کشت، بیان بالای ژن های هومولوگ و هترولوگ برای مطالعات کاربردی و بدست آوردن مقادیر زیادی از محصولات ژنی خاص استفاده می شود.

تحقیقات بسیاری تابحال بروی ژن های عامل بیماری استرپتوکوکوزیس انجام شده است، که می توان به موارد زیر اشاره کرد؛

Millard و همکاران(۲۰۱۲)، طی پژوهشی به این نتیجه رسیدند که بیوسنتز کپسول در *S. iniae* تحت کنترل اپرن kb ۲۱ شامل حدود ۲۰ ژن است. پنج ژن (*cpsY*، *cpsD*، *cpsE*، *cpsG* و *cpsH*) اپرون cps بسیار متغییر بوده و ارتباط مستقیم بین تغییر در ژن های*cps* با شکست واکسیناسیون وجود دارد. با کمال تعجب، در بعضی از ایزوله ها، هیچ کپسولی تشکیل نشده بود، با این حال عامل بیماریزا هنوز هم قادر به آلوده کردن میزبان، البته با یک آسیب شناسی کاملاً متفاوت بود. نتایج نشان می دهد که واکسن های چندظرفیتی متشکل از انواع مختلف توالی *cpsD* تا حدودی مؤثر هستند. جهش های کد شده در اپرن کپسول با شکست واکسن های اتوژنوز ارتباط دارند.

دلیل انتخاب ژن *cpsD* در این تحقیق، تنوع این ژن در میان ژن های سنتز کننده کپسول *S. iniae* می باشد.

یک هدف بالقوه برای محافظت متقابل سرولوژیکی واکسن ها، M-like protein SiMA، عامل بیماری زای ضروری در *S. iniae* است که در میان سویه های بدخیم بسیار محافظت شده است(Locke *et al.*, 2010).

Locke و همکاران (۲۰۱۰) ، پتانسیل مؤثر واکسیناسیون غیرتزریقی را با استفاده از واکسن های زنده تضعیف شده بررسی کردند. سه سویه تضعیف شده *S. iniae* با جهش های ژنتیکی که فاکتورهای ایجاد کننده بیماری زایی– کپسول پلی ساکاریدی ($\Delta cpsD$)، M-like پروتئین ($\Delta simA$) و فسفوگلوکوموتاز ($\Delta pgmA$) – آنها را حذف کرده بود، بطور موازی با یک ادجوانت، فرمالین کشنده، همه سلول های *S. iniae* مورد بررسی قرار گرفت. واکسن های $\Delta cpsD$، $\Delta pgmA$ و باکتریایی، سطح بالاتری از ایمنی واکسیناسیون (۰٪ مرگ و میر) را نشان داد، در حالی که $\Delta simA$ با وجود آنکه باعث ۱۲ تا ۱۶ درصد مرگ و میر ناشی از واکسیناسیون شد، یکی از کاندیدای واکسن برای ایجاد ۱۰۰٪ حفاظت در هر دو مدل تزریق داخل صفاقی و غوطه وری می باشد. پیش از این، از طریق واکسیناسیون داخل صفاقی (i.p.) HSB، متوجه شده بودند که سطح حفاظت ۱۰۰٪ در برابر *S. iniae* نوع وحشی با سویه موتان M-like پروتئین ($\Delta simA$) و ۹۰ تا ۱۰۰٪ حفاظت با فسفوگلوکوموتاز با جهش جابجایی ($\Delta pgmA$) وجود دارد. واکسیناسیون از طریق غوطه وری، مزایای بیشتری نسبت به روش مبتنی بر تزریق دارد، از جمله اجتناب از صدمه زدن به ماهی وکاهش هزینه ، کاهش دستکاری و در نتیجه کاهش استرس در ماهی و بطور مؤثرتری قادر به تحریک پاسخ ایمنی ماهی می باشد. از طریق غوطه وری ، تنها $\Delta simA$ جهش یافته زنده، سطح بالایی از حفاظت (۱۰۰٪ RPS) را نشان دادند. تحقیقات قبلی نشان داده که $\Delta simA$ جهش یافته، جهت حمله به سلول های اپیتلیال دچار کاهش توانایی می شوند. $\Delta simA$ قادر به ارائه محافظت کامل سیستم ایمنی بدن در مقابل چالش نوع وحشی می باشد. در حالیکه واکسن تزریقی، دقیق و تجدیدپذیر بوده اما کار با آن مشکل و هزینه بر است، بنابراین در برنامه محدود آبزی پروری باگونه های با ارزش مانند ماهیان آزاد استفاده می گردد. واکسن

های غوطه وری مقرون به صرفه تر هستند و بخاطر نزدیکی به مسیرهای عفونت طبیعی مورد استفاده توسط پاتوژن های آبی، نتیجه پاسخ ایمنی بدن بطور بالقوه قوی تر خواهد بود (Locke *et al*., 2010).

پیشنهادها

۱- این مطالعه شاید درهایی را برای تحقیقات آینده باز کرد که می تواند بطور قابل ملاحظه ای دانش ما را از باکتری ها و گزینه هایی برای درمان این عوامل بیماریزای آبی در ماهیان افزایش دهد. شایسته است دانشگاهها و مراکز تحقیقاتی مرتبط درکشور با انجام تحقیقات و پژوهش های موثر نقش ویژه ای را بعهده گیرند.

۲- با عنایت به مسائل و مشکلاتی که در حین اجرای این تحقیق پیش آمد پیشنهاد می گردد واکسیناسیون ماهیان حداقل فقط با روش غوطه وری تکرار گردد.

تشکر وقدردانی

این تحقیق با حمایت مالی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور انجام شد. از کلیه همکاران در موسسه، پزوهشکده اکولوژی دریای خزر و دانشگاه شهید بهشتی که بنحوی در اجرای این پروژه نقش داشته اند سپاسگزاری می نمایم.

منابع

- اخلاقی، م ؛ کشاورز، م؛ ۱۳۸۱، وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلای استان فارس، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره سوم، شماره دوم، ۱۸۳ تا ۱۸۹.
- پورغلام، رضا ؛ مکرمی، علی؛ سعیدی، علی اصغر؛ شریف پور، عیسی؛ غروقی، احمد و پورغلام، حمزه؛ ۱۳۸۹، ارزیابی اثرات حاد استرپتوکوکوس فسیوم بر برخی از مشخصه های خونشناسی و آسیب شناسی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران ۱۹ (۲) ۹-۱۸
- سلطانی، مهدی و غلامرضا نیکبخت بروجنی، ۱۳۸۶، استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای ایران، مجموعه خلاصه مقالات پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران، ۲۵ – ۲۳ بهمن ۱۳۸۶، اهواز، ایران، ۴
- سعیدی، علی اصغر؛ پور غلام ، رضا؛ زاهدی ، آذین ؛ فیروزکندیان ، شراره ؛ ۱۳۸۸ ،انتقال تجربی (آزمایشگاهی) بیماری استرپتوکوکوزیس به بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان با باکتری *Streptococcus faecium* ؛ نخستین همایش ملی بیماریهای اقتصادی صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)* ، دانشگاه آزاد اسلامی ،شهرکرد.
- قیاسی مریم، آذین زاهدی، حسینعلی خوشباور رستمی، ۱۳۷۹، بروز اپیدمی استرپتوکوکوزیس (Streptococcosis) در ماهیان مولد قزل آلای رنگین کمان، اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان، ۲۷ – ۲۵ بهمن، اهواز، ایران، ۵۲
- قیاسی، مریم وآذین زاهدی، ۱۳۸۶، شناسایی عوامل بیماریزا در مزارع تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران، سمیتار ملی زیست شناسی، ۲۴ – ۲۶ اردیبهشت ۱۳۸۶، مرند، ایران، ۱۱۱
- قلی پور کنعانی، حسنا، داور شاهسونی، احمد رضا موثقی، ۱۳۸۶، مجموعه خلاصه مقالات پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران، ۲۵ – ۲۳ بهمن ۱۳۸۶، اهواز، ایران،۱۵
- موسوی، سید سمانه،۱۳۸۶ بررسی بروز استرپتوکوکوزیس و استافیلوکوکوزیس در مزارع منتخب تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
- هوشمند، الهام و حمید حقیقی، ۱۳۸۸، استرپتوکوکوس دیسگالاکتیه عامل استرپتوکوکوزیس در یک مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان در غرب گیلان، نخستین همایش ملی ماهیان سردآبی، ۲۴ – ۲۲ اردیبهشت ۱۳۸۸، تنکابن، ایران، ۱۱۴.

- Agnew W, Barnes AC. 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary microbiology*.122(1):1-15.
- Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M., 2011, Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis iloticus*): A Review, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci*. 34 (2): 195 – 206
- Austin, B. and Austin, D.A. 1999**.** Third ed.Chapter 2: Characteristics of the diseases. *In* Bacterial Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. Springer-Praxis, Praxis Publishing, Ltd. Chichester, cUK. pp 13-15.
- Austin, B. and Austin, D.A., 2007**.** Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish, 4th ed. Springer/Prazis Publishing, Chichester.

- Aviles F, Zhang MM, Chan J, Delamare-Debouttеville J, Green TJ, Dang C., 2012. The conserved surface M-protein SiMA of *Streptococcus iniae* is not effective as a cross-protective vaccine against differing capsular serotypes in farmed fish. *Veterinary microbiology.*
- Beack. G. W; Kim. J. H; Gomez. D. K; Park. S. C; 2006, Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, *Journal of Veterinary Science*, 7(1), 53 – 58
- Berridge, B. R., H. Bercovier, and P. F. Frelier**.** 2001. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR*. Vet. Microbiol*. **78:**165–173.
- Bonar, CJ. and Wagner, R.A. 2003. A third report of "golf ball disease" in an Amazon River dolphin (lnia geoffrensis) associated with *Streptococcus iniae. Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34(3):296-301 **.**
- Bragg. R.R. and Broere J.S.E., 1986, Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* , 6: 89–91.
- Bromage ES, and Owens L ,2002, Infection of barramundi Lates calcarifer with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. Dis Aquat Org 52:199–205.
- Buchanan, J.T., 2005. Streptococcus iniae phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. Infection and Immunity, 73(10): 6935-6944**.**
- Buller, N.B. 2004. Bacteria from Fish and other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual, pp: 37-162. CABI Publishing, Cambridge.
- Bunch, E.C. and Bejerano, I., 1997. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus* to Streptococcosis. *Aquqculture*. 49(2): 67-76.
- Carson. J; Judkovs. N; Austin. B;1993, Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, (*Oncorhychus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Disease*, 16:381-388
- Eldar, A.; Lawhon, S.; Frelier, P.F.; Assenta, L.; Simpson, B.R.; Varner, P.W.and Bercovier, H., 1997. Restriction fragment length polymorphisms of 16S rDNA and of whole rRNA genes (ribotyping) of *Streptococcus iniae* strains from the United States and Israel. Microbiology Letters 151:155-162
- Eldar A, Ghittino C ,1999, *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): similar, but different diseases. Dis Aquat Org 36: 227–231
- Ellis AE. General principles of fish vaccination. In: Ellis AE, editor. Fish vaccination. London: Academic Press; 1988. p. 1e19.
- Evans, J.J., Klesius, P.H.,Gilbert, P.M., Shoemaker, C., Al-Sarawi,M., Landsberg, J., Durumdez**,**R., Al-Marzouk, A., Al-Zenki, S., 2002. Characterization of β-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* and wildmullet, *Liza klunzin–geri* (Day) in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, 25: 505–513.
- Evans, J.J.; Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A., 2006**.** An overview of Streptococcus in warmwater fish. *Aquac. Health Int*. **7:** 10–14.
- Eyngor, M., 2008. mergency of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharid-producing strains fllowing vaccination with nonproducing strains. *Applied and Enviromental Microbiology*, 74(22)): 6892-689 **.**
- Fadaeifard. F, Momtaz. H, Rahimi. E, Mirzakhani. A, 2011, Detection of streptococcus iniae and *Lactococcus garvieae* by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran, *African Journal of Biotechnology*, 11(2): 260-263
- Filho. C. I; Muller. E. E; Pretto-Giordano. L. G; Bracarense. F. R. L;, 2009, Histological finding of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in nile tilapia (*Oreochromis nilotocus*), *Brazilian Journal Veterinary Patology*, 2(1): 12 – 15
- Foo. J.T.W., Ho. B; Lam. T.J;,1985, Mass mortality in Siganus canaliculatus due to streptococcal infection. *Aquaculture*, 49: 185–195
- Garcia, J.C.; Klesius, P.H.; Evans, J.J. and Shoemaker, C.A., 2008**.** Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus. Aquaculture***.** 281**:**151–154.
- Ghittino. C., Praero. M., 1992, Report of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: preliminary note.*Bolletino Della Societa Italiana di Patologia Ittica* , 8: 4–11.
- Ghittino, C., Eldar, A., Prearo, M., Bozzetta, E., Livvof, A., Bercovier, H., 1995. Comparative pathology and experimental vaccination in diseased rainbow trout infected by *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*. VII International Conference of the European Association of Fish Pathologists (EAFP). Palma de Mallorca European Association of Fish Pathologists, Spain, p. 27.
- Goh SH, Driedger D, Gillett S, Low DE, Hemmingsen SM, Amos M, Chan D, Lovgren M, Willey BM, Shaw C, Smith JA. *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2164-6.

- Gholipour. H., Shahsavani. D., Rad. M., 2009, Streptococcal septicemia in raibow trout farms in Sabzevar, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 174
- Habibipour.R, Bayat.S., 2009, Study of streptococcosis in rainbow trout farm in Hamedan Province, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, , 174
- Haghighi Khiabanian Asl. A, Soltani. M, Kazemi. B, Sohrabi Haghdost. E, Sharifpour, 2007, Use of immunohistochemichal and PCR methods of infectious heamatopoietic necrosis disease in some rainbow trout hatcheris in Iran, *Pakistan journal of Biology Sciences*, 10 (2): 230 – 234
- Hanahan, D. (1983) *Studies on transformation on E. coli with plasmids.* J. Mol. Biol.: 503-517.
- Hegde, A. and Y. M. Sin, 2006. *Fish and Shellfish Immunology*: An Introduction. Edited by P. Swain, P.K. Sahoo, S. Ayyappan. 191-206
- Hoshina, T.; Sano, T. and Morimoto, Y., 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of Tokyo University of Fisheries*. 44: 57-68.
- Jayarao,B. M., Dore, J. J. F., Baumbach, G. A., Matthews, K. R., Oliver, S. P.: Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol*. 29, 2774–2778 (1991)
- Klesius, P.; Evans, J.; Shoemaker, C.; Yeha, H.; Goodwin, A.E. and Adams, A., 2006. Thompsond, K. Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique *Aquaculture*. 258: 180– 186.
- Klesius, P. H., C. A. Shoemaker, and J. J. Evans. 2007. Presented at the 13th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Grado, Italy, September 17-21. 18.
- Lahav, D., Eyngor, M., Hurvitz, A., Ghittino, C., Lublin, A., Eldar,A ,2004, *Streptococcus iniae* type II infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Dis Aquat Org, 62. 177-180.
- Liaghat, M., Akhlaghi, M., Hosseini, A., Nematollahi, A., Hosseini, S.M. (2011). Humoral and non-specific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally exposed to and immunized with *Streptococcus iniae*. Int.J.Vet.Res. 5,4:218-224.
- Locke JB, Vicknair MR, Ostland VE, Nizet V, Buchanan JT. Evaluation of *Streptococcus iniae* killed bacterin and live attenuated vaccines in hybrid striped bass through injection and bath immersion. *Diseases of aquatic organisms*. 2010;89(2):117.
- Locke JB, Colvin KM, Varki N, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT. *Streptococcus iniae* beta-hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. *Diseases of aquatic organisms*. 2007;76(1):17.
- Mata, A. I, Blanco. M. M, Dom´ınguez. L, Fernández-Garayzábal. J. F, Gibello. A, 2004a, Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value, *Veterinary Microbiology* 101:109–116
- 82- Mata, A. I, Gibello. A, Casamayor. A., Blanco. M. M., Domínguez. L, Ferna´ndez-Garayza´bal .J. F., 2004b, Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish, *Applide and Environmental Microbiology*: 3183–3187
- McNultya, S.T.; Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A. and Evansb, J.J., 2003. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops_Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. *Aquaculture*. 220**:**165–173.
- Mian, G. F., Godoy D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M. and Figueiredo, H. C. P., 2009. Aspects of the natural history and virulence of S. agalactiae infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136 (1-2), 180-183.
- Michel, C., Nougayre`de, P., Eldar, A., Sochon, E., De Kinkelin, P., 1997, *Vagococcus salmoninarum,* a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30:199–208.
- Mierau I, Kleerebezem M., 2005.10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied microbiology and biotechnology*. 68(6):705-17.
- Millard CM, Baiano JC, Chan C, Yuen B, Aviles F, Landos M, et al. Evolution of the Capsular Operon of *Streptococcus iniae* in Response to Vaccination. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(23):8219-26.
- Mohammadi Arani. M., Moghadas.m B., 2009, Infection of rainbow trout with Streptococcus spp. in Isfehan Province, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 126
- Murray PR, Baro EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (2003) *Manual of clinical microbiology*. (8th ed.). Washington (DC) 7 American Society for Microbiology

- Nguyen, H.T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K., 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. *Journal of Aquaculture*, Vol. 205, pp. 7-17
- Nomoto, R., Munasinghe, L.I., Jin, D.H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T., Yoshida, T., 2004. Lancefield group C Streptococcus dysgalactiae infection responsible for fish mortalities in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 27: 679–686.
- Nomoto, R.; Unose, N.; Shimahara, Y.; Nakamura, A.; Hirae, T.; Maebuchi, K.; Harada, S.; Misawa, N.; Itami, T.; Kagawa, H.; Yoshida, T., 2006. Characterization of Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish. Journal of Fish Diseases. 29: 673–682.
- Perera. R.P., Johnson. S.K., Collins. M.D., Lewis D.H., 1994, *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* × *T. aurea* hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health* ,6: 335–340.
- Pier, G.B. and Madin, S.H. 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26(4): 545-553 .
- Roach, J.C., Levett, P.N., & Lavoie, M.C.,2006, Identification of *S. iniae* by commercial bacterial identification systems. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 20-26.
- Rodas, B.A., Angulo, J.O., Cruz, J. and Garcia, H.S., 2002**,** Proparatian of probiotic buttermilk with *Lactobacillus reuteri*. Milchwissenschoff Milk Sclence International. 57,pp: 26-28
- Romalde, J.L., Magarin˜os, B., Toranzo, A.E., 1999. Prevention of streptococcosis in turbot by intraperitoneal vaccination: a review**.** *J. Appl. Ichthyol*. 15, 153–158.
- Romalde, J.L.; Ravel, C.; Valdes, I; Magarin, B.; Fuente, E.; San Martın, C.; Avendan-Herrera, R. and Toranzo, A.E., 2008. *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture, *Veterinary Microbiology*. 130: 198–207.
- Russo, R., Mitchell, H. and Yanong, R.P.E, 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models, *journal of Aquaculture*. Vol.256, pp. 105 – 110
- Salvador, R., Muller, E.E., Freitas, J.C., Leonhadt, J.H., Giordano, L.G.P., Dias, J.A ,2005, Isolation and characterization of *Streptococcus spp*. group B in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northen region of Parana State, *Brazil. Ciencia Rural. Santa Maria*, 35: 1374-1378.
- Sambrook, J. and Russell, D. W., 2006**.** The conserved protocols from Molecclar cloning. *Cold Spring Harbor laboratory press, pp. 705-762.*
- Shahbazian , N,Maghsudifard, A, E., Abdi, K. Sheikhzadeh, N, 2010, Study the status of Streptococcosis in Rainbow trout fish farms in kermanshah province in 2009, 2nd International congress on aquatic animal health maneagment and disese, October 26 – 27 2010, Tehran, Iran
- Shewmaker, P.L.; Camus, A.C.; Bailiff, T.; Steigerwalt, A.G.; Morey, R.E. and Carvalho, M.G.S., 2007. *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from channel catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57**:** 1603–1606.
- Shewry, P. and R. Fido (1998) *Protein blotting , principle and applications.* 435-444.
- Shoemaker, C.A.; Evans, J.J. and Klesius, P.H., 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia, *Oreochromis niloticus. Aquaculture*. 188: 229–235.
- Shoemaker, C.A., Vandenberg, G.W., Désormeaux, A., Klesius, P.H. & Evans, J.J. 2006. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. Aquaculture*. 255: 151–156.
- Soltani, M.; Jamshidi, S. and Sharifpour, I., 2005**.** Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran: Biochemical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 25: 95-106.
- Soltani, M.; Nikbakht, G.; Ebrahimzadeh Moussavi, H.A. and Ahmadzadeh, N., 2008**.** Epizootic outbreaks of Lactococcosis caused by *Lactoccoccus garviae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 28(5): 95-106.
- Soltani.M., and Tarahomi. M, 2009, Study of streptococcosis/Lactoccosis in some farmed rainbow trout in Fars province, Iran, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 113
- Smith, B. (1984) *SDS polyacrylamide gel electorophoresis of proteins, in Methods in molecular biology,.* edited by W. Jm. Saunders Co, New York: 41-45.
- Suanyuk, N.; Kong, F.; Ko, D.; Gilbert, G. L. and Supamattaya, K., 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia, *O. niloticus* in Thailand, Relationship to human isolates? *Aquaculture*. 284: 35–40

- Toranzo. A. E; Devesa. S; Heinen. P; Riaza. A; Nuñez. S; Barja. J. L;, (1994), Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium, *Bulltan of European Association of Fish Pathology*, 14:19–23
- Vendrell, D.; Balcazar, JL; Ruiz-Zarzuela, I.; de Blas, I.; Girones, O. and Muzquiz, JL., 2006. *Lactococcus arvieae* in fish: A review; Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 29: 77–198.
- Xu, D.H., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2007, Evaluation of the link between grodactylosis and Streptococcus of Nile tilapia (*O. niloticus*). L **.** *Fish Diseases*, 30: 230-238
- Wisselink HW, Moers AP, Mars AE, Hoefnagel MH, De Vos WM, Hugenholtz J. Overproduction of heterologous mannitol 1-phosphatase: a key factor for engineering mannitol production by *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(3):1507-14.
- Yang, W. and Li, A., 2009. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*, *Aquaculture*. 294: 14–17.
- Yanong, R.P.E. and Floyd, R.F., 2002. Streptococcal infections of fish. Florida Cooperative Extension Service. IFAS, University of Florida, pp. 1-5. Circular, FA0 57.
- Ye W, Huo G, Chen J, Liu F, Yin J, Yang L, et al. 2010; Heterologous expression of the *Bacillus subtilis*(natto) alanine dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*. *Microbiological Research*. 165(4):268-75.
- Zlotkin A, Hershko H, Eldar A. 1998, Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Appl Environ Microbiol*.; 64: 4065-4067.

Abstract

The main purpose of this study was survey on achieving recombinant DNA vaccine (live delivery) against streptococcusis for Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) Immunization. Initially, a total of 515 samples were collected from the head kidney of diseased fish (weigh 50-200g) in 72 farms of 8 provinces. Approximately, 40% (206 samples) of specimens were infected to *Streptococcus* species. Then were isolated 172 DNA samples and consequently, five pathogenic species have been identified, including *S. iniae*, S. *faecium*, S. *agalactiae*, *S. dysgalatiae*, and *S. uberis*.

The enzyme phosphoglucomutase (PGM) has recently been discovered to play an important role in polysaccharide capsule production and virulence in *S. iniae*. Therefore, was initially isolated S. *iniae* and cloning phosphoglucomutase gene. Then, the PGM gene was amplified successfully and cloned in pTZ57R cloning vector. The recombinant plasmid was sub cloned into pETD uet-l expression vector by restriction enzymes and confirmed by PCR. Meanwhile, for amplifying *simA* and *cpsD* genes were used universal primers *pNZ814*8 and special for *simA* and *cpsD* genes.The recombinant bacteria *Lactococcus lactis* (NZ9000) was used for transformation the plasmid into *Lactococcus lactis*. Vaccination was performed by oral, bath and injection (peritoneal) methods. The efficiency of g2 was better than g1in these three methods and all of groups. The determination of IgM level, or detection of anti *S. iniae* antibody was carried out by using ELISA. The results revealed that there was a significant ($p<0.05$) difference between the level of IgM in all three methods and experiment groups compare to control group. The results of challenge of vaccinated fish with *S. iniae* showed that fish RPS in all of groups except group 3 (42.63 percent) were more than 50 percent while, in control group was 21.43 percent. The highest fish RPS was belong to group 11(61.25 percent) and statistical analyses revealed that significant ($p<0.05$) difference between fish vaccinated RPS, compare to control group.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute- Caspian Sea Ecology Research

---

Project Title : survey on achieving recombinant DNA vaccine (live delivery) against streptococcusis for Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) Immunization
Approved Number: 2-019-20-03-85024
Author: Reza Pourgholam
Project Researcher : Reza Pourgholam
Collaborator(s) :M. Sharifrohani, H.A. Sasan, F. Laloei, R. Safari, A.A. Saeidi, M. Soltani
Advisor(s): B. Kazemi
Supervisor:-
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2006
Period of execution : 4 Years & 5 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Caspian Sea Ecology Research

Project Title :

survey on achieving recombinant DNA vaccine (live delivery) against streptococcusis for Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) Immunization

Project Researcher :

Reza Pourgholam

Register NO.

50553