

مطالعه میدانی اثربخشی واکسن استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس بر ایمنی زایی و زنده‌مانی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

احمد عرفان منش^۱، مجید خانزاده^{۱*}، بابک بیک‌زاده^۲.

۱- گروه پژوهشی فرآورده‌های بیولوژیک دامی، سازمان جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۲

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۲/۰۹/۱۵

*نویسنده مسئول:

khanzade@acecr.ac.ir

در این مطالعه ایمنی‌زایی واکسن چندظرفیتی استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مزرعه بررسی شد. ۹۰۰ ماهی با میانگین 50 ± 5 گرم به سه تیمار و سه تکرار (تیمار تزریقی، تیمار غوطه‌وری و گروه شاهد) تقسیم شدند. ماهیان به مدت ۶۰ روز نگهداری و نمونه برداری در روزهای ۳۰ و ۶۰ انجام شد. سپس ماهیان به مدت ۱۴ روز با سه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راکری به صورت جداگانه به چالش کشیده شدند. نمونه‌برداری برای ارزیابی فعالیت لیزوزیم، کمپلمان، عیار آنتی‌بادی و نرخ بقا صورت پذیرفت. نتایج حاکی از افزایش معنادار فعالیت لیزوزیم و کمپلمان سرم در روزهای ۳۰ و ۶۰ نمونه‌برداری در گروه‌های واکسینه نسبت به گروه شاهد افزایش بود ($P < 0.05$). عیار آنتی‌بادی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راکری در روزهای ۳۰ و ۶۰ نمونه‌برداری در گروه‌های واکسینه افزایش معناداری را نسبت به گروه شاهد داشت ($P < 0.05$). درصد بقای نسبی پس از ۱۴ روز چالش با استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راکری در گروه تزریقی به ترتیب (۷۰، ۶۰ و ۷۶/۶٪) بود که نسبت به گروه شاهد معنادار بود ($P < 0.05$). همچنین درصد بقای نسبی در گروه غوطه‌وری با استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راکری به ترتیب (۳۰، ۳۶/۶ و ۵۳/۳٪) بود که فقط در گروه غوطه‌وری با استرپتوکوکوس اینیایی معنادار بود ($P < 0.05$). به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از واکسن چندظرفیتی به روش تزریقی و غوطه‌وری اثرات قابل توجهی بر ایمنی و میزان بقای قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. با این حال، روش تزریق موثرتر و مناسب‌تر از روش غوطه‌وری است.

کلیدواژه‌ها: واکسن، استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس یرسینیوزیس، ایمنی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

با افزایش روز افزون جمعیت جهان، در دسترس بودن غذا مهم ترین عاملی است که بر زندگی انسان تأثیر می‌گذارد و تولید آبزیان مهمترین پاسخ به این مشکل است [۱]. امروزه آبزی‌پروری یک صنعت موثر در تولید غذا محسوب می‌شود و از چند دهه گذشته نیز به سرعت به یک صنعت پویا و رو به رشد تبدیل شده است [۲]. آبزی‌پروری تجارتی است که تحت تأثیر بیماری‌های عفونی قرار دارد، که عمدتاً توسط باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و تا حدی قارچ‌ها ایجاد می‌شود. بیماری‌های باکتریایی می‌توانند زیان‌های بیولوژیکی و اقتصادی قابل توجهی را وارد کنند [۳]. بیماری‌های باکتریایی معمولاً با آنتی‌بیوتیک‌ها قابل کنترل هستند. استفاده بی‌رویه از این داروها در نهایت به دلیل ایجاد و انتقال مکانیسم‌های مقاومت در میان گونه‌های باکتریایی، که برخی از آنها پاتوژن‌های انسانی نیز هستند، تهدیدی برای سلامت انسان است. بنابراین مصرف آنها در بسیاری از کشورها به شدت تنظیم و کنترل شده است [۴]. راهکارهای پیشگیری مختلفی در حال حاضر برای کنترل مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها مانند اقدامات مهار زیستی (به عنوان مثال، قرنطینه و غربالگری ماهی‌های تازه معرفی شده)، سیستم‌های تصفیه آب (به عنوان مثال، امواج فراپاش UV) و از (ازن) پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها برای تحریک سیستم ایمنی و ارتقاء رشد [۵] استفاده می‌شود، اما بهترین راهکار برای جلوگیری از شیوع بیماری‌های باکتریایی استفاده از واکسن است [۶]. برای غلبه بر عوارض ناشی از تلفات بیماری‌ها پس از محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها

در سطح مزارع آبی‌پروری، واکسیناسیون یکی از جایگزین‌های قابل قبول و مناسب است [۷]. واکسن‌ها، سیستم ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند و تولید آنتی‌بادی‌هایی می‌کنند که ماهیان را در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند، اما بلعکس هدف اصلی آنتی‌بیوتیک‌ها کشتن یا توقف بیماری‌ها است [۸].

اگرچه، امروزه واکسن‌های تک ظرفیتی برای پیشگیری از بیماری‌ها در مزارع آبی‌پروری به خوبی شناخته شده‌اند، اما به دلیل بروز عفونت‌های همزمان در مزارع به بیش از یک واکسن مورد نیاز است. بنابراین، استفاده از واکسن‌های چند ظرفیتی نه تنها باعث کاهش هزینه‌های واکسیناسیون می‌شود بلکه استرس فرآیند واکسیناسیون را کاهش می‌دهد [۹]. واکسن‌های چند ظرفیتی بهترین نوع واکسن‌ها هستند، زیرا می‌توانند همزمان در برابر چندین عوامل بیماری‌زا که ماهیان به آن حساس هستند محافظت ایجاد کنند [۹].

استرپتوکوکوس اینیایی / لاکتوکوکوس گارویه به همراه یرسینیا راکری باکتری‌های رایجی هستند که سبب بیماری‌های سیستماتیک، مرگ و میر بالا و زیان‌های اقتصادی شدید در سطح مزارع ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌شوند [۷]. یکی از بیماری‌هایی که در دهه اخیر باعث مرگ و میر بسیاری در مزارع پرورش ماهیان سردآبی شده است استرپتوکوکوزیس است. استرپتوکوکوس اینیایی یک کوکسی گرم مثبت از خانواده باکتری‌های استرپتوکوکاسه است. این بیماری با ظاهر بالینی نظیر، تورم طحال، کوری، پرخونی و گاهی تخریب کامل چشم نمایان می‌شود [۱۰]. یرسینیا راکری عامل ایجاد کننده بیماری دهان قرمز، یک بیماری سیستماتیک در ماهی سردآبی است که باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت آبی‌پروری، به ویژه در آزاد ماهیان در سراسر جهان می‌شود. ماهیان مبتلا علائمی نظیر کندی حرکت، تیرگی رنگ همراه با قرمز شدن رنگ اطراف دهان، سرپوش آبششی و قاعده باله‌ها به همراه اگزوفتالمی از خود نشان می‌دهند [۱۰]. لاکتوکوکوس گارویه عامل ایجاد کننده لاکتوکوکوزیس، یک کوکو باسیل گرم مثبت غیر متحرک است که به عنوان یک پاتوژن در بسیاری از گونه‌های ماهی، به ویژه قزل‌آلای رنگین کمان گزارش شده است [۷].

مدل ارزیابی اثربخشی واکسن‌ها در ماهی، بیشتر بر اساس روش‌های ایمن سازی ماهی در محیط آزمایشگاهی است. این مدل‌ها از نظر علمی ثابت کرده‌اند که ارتباطی بین ایمنی ایجاد شده توسط آنتی‌ژن واکسن انتخابی و اثربخشی آن وجود دارد. اطلاعات دقیق حاصل از بررسی سازوکارهای مرتبط با سیستم ایمنی در سطوح مولکولی (بیان ژن)، می‌تواند به فهم بهتر و دقیق‌تر ارتباط میان ایمنی‌زایی و حفاظت میزبان در مقابل عامل مهاجم و فعالیت سایتوکین‌ها کمک کرده و به طور گسترده در ارتقاء روش‌های پیشگیری و درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد [۲۴]. به طور خاص سایتوکین‌های مولد التهاب از جمله $IL1\beta$ ، $IL8$ و $TNF\alpha$ به صورت عمومی در مطالعه ژن‌های تنظیم کننده ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استفاده می‌شوند. این سایتوکین‌ها به منظور کمک به مکانیسم‌های دفاعی میزبان در پاسخ به کلونیزه کردن و یا حمله به باکتری‌ها استفاده می‌شوند [۲۵]. واکسیناسیون باعث افزایش تولید ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها و همچنین افزایش تولید سایتوکین و لیزوزیم می‌شود. در طی بررسی‌های انجام شده توسط علিশاهی و همکاران، استفاده از واکسن ضد استرپتوکوکوس باعث افزایش گلبول‌های سفید خون و جمعیت لنفوسیت‌ها شده است [۲۶].

مطالعات مختلفی به بررسی اثر واکسن‌های دوگانه و چند گانه در شرایط آزمایشگاهی پرداخته‌اند. برای مثال عرفان منش و همکاران (۲۰۲۳)، اثر واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس را در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی کردند و گزارش کردند که این واکسن اثر مثبت و بهبود بخشی بر شاخص‌های ایمنی و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان دارد [۷]. در مطالعه‌ای دیگر حسینی و همکاران (۱۴۰۰) عیار آنتی بادی و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را با استفاده از واکسن‌های استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس بررسی کردند و گزارش کردند که این واکسن‌ها اثر معناداری بر ایمنی و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان دارد [۱۱].

از آنجایی که اثر واکسن در شرایط فارمی (مزارع پرورشی) بررسی نشده اند، بنابراین در مطالعه جاری ایمنی زایی واکسن چندانگانه استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس بر شاخص‌های ایمنی و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

در تابستان سال ۱۴۰۱ تعداد ۹۰۰ قطعه ماهی به وزن 50 ± 5 گرم از یک مزرعه فاقد بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی مورد تأیید سازمان شیلات خریداری شد و تحت شرایط مناسب به شهرستان فیروزکوه استان تهران انتقال یافت. پس از سازگاری اولیه با شرایط محیط به مدت ۱۴ روز به صورت تصادفی در سه تیمار و سه تکرار در تراف‌هایی به ابعاد $1 \times 5/5 \times 3$ با تراکم ۱۰۰ ماهی در هر تراف تقسیم شدند. ماهیان مورد آزمایش طی ۲ ماه با جیره تجاری ۲۱ بیضا حاوی ۴۵ درصد پروتئین خام، ۱۴/۵ درصد چربی خام، کمتر از ۱۰ درصد رطوبت و ۴۳۰۰ کیلوکالری بر کیلوگرم انرژی قابل هضم تغذیه شدند. تامین آب از طریق چشمه با میانگین دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد، pH آب: ۷/۸-۷/۵، سختی آب: ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و اکسیژن محلول در آب ۹ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت.

تیمارهای آزمایشی

- ۱- گروه شاهد
- ۲- گروه واکسن خورده تزریقی
- ۳- گروه واکسن خورده غوطه وری

تهیه واکسن

در این تحقیق از واکسن کشته (با فرمالین) سه‌گانه (استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس) و واکسن (یرسینیوزیس) تولیدی سازمان جهاد دانشگاهی تهران دارای مجوز سازمان دامپزشکی استفاده شد. واکسن سه‌گانه حاوی دو سویه بیماری‌زای بومی عامل استرپتوکوکوزیس بوده که شامل باکتری غیرفعال با دوز 4×10^8 سلول در میلی‌لیتر است. واکسن یرسینیوزیس حاوی سویه بیماری‌زای بومی عامل یرسینیوزیس بوده که شامل باکتری غیرفعال با دوز 1×10^9 سلول در میلی‌لیتر است.

واکسیناسیون

بدین منظور گروه واکسینه طبق پروتکل واکسن‌ها به روش غوطه‌وری (یک لیتر واکسن در نه لیتر آب مخلوط شد) واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس به همراه واکسن یرسینیوزیس به مدت ۹۰ ثانیه در وزن ۵۰ گرم در روز صفر انجام شد. گروه واکسینه به روش تزریقی ۰/۱ میلی لیتر از واکسن چند ظرفیتی به صورت داخل صفاقی به ماهیان تزریق گردید. دو روز قبل از واکسیناسیون غذادهی قطع گردید.

نمونه‌گیری

در انتهای روزهای ۳۰ام و ۶۰ام نمونه برداری از هر تیمار ۲۷ (۹ ماهی از هر تکرار و در مجموع ۲۷ ماهی از هر تیمار) عدد ماهی به صورت تصادفی نمونه برداری گردید. به این منظور ماهی‌ها روز قبل از نمونه‌گیری قطع غذا شده و با ۰/۲ گرم در لیتر پودر گل میخک بیهوش گردیدند،

سپس با سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری از ورید ساقه دمی ماهی‌ها خون‌گیری گردید (۹ ماهی از هر تکرار). برای سنجش شاخص‌های ایمنی‌شناسی نمونه خون‌ها به مدت یک روز در دمای یخچال نگهداری گردیدند و سپس روز بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها جداسازی و تا زمان استفاده در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

آزمایش‌های ایمنی‌شناسی

سنجش لیزوزیم

برای سنجش لیزوزیم ابتدا ۹ میلی‌گرم از دیواره باکتری میکروکوکوس لوتوس در ۳۰ میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سرم به دورن چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد و پس از آن ۹۰ میکرولیتر از سوسپانسیون دیواره به چاهک‌ها اضافه شدند. خوانش در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا انجام شد. ترتیب خوانش: دقیق صفر ۱۰ دقیقه بود. فعالیت هر واحد آنزیم با کاهش هر ۰/۰۰۱ واحد در دقیقه محاسبه شد [۱۲].

سنجش فعالیت کمپلمان

برای اندازه‌گیری فعالیت مکمل، از روش یانو (۱۹۹۲) با اندکی تغییراتی استفاده شد. به طور خلاصه، ۲۰ میکرولیتر سرم نمونه و ۲۳۰ میکرولیتر بافر کمپلمان (pH: ۲/۵، حاوی ۰/۵ میلی مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی مول کلرید کلسیم) و ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش شسته شده به هر چاهک صفحه ELISA اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس جذب نوری مایع رویی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۳].

سنجش عیار آنتی بادی علیه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس

عیار آنتی بادی سرم علیه استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس با روش توصیه شده توسط Skov و همکاران با تغییرات جزئی توسط الایزا اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، به هر چاهک از صفحات الایزا ۵۰ میکرولیتر آنتی ژن محلول استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راکری (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در بافر بی کربنات (pH: ۹/۶) اضافه شد و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌های هر چاهک سه بار با ۱٪ PBS حاوی PBS توئین شستشو شدند. سپس با شیر بدون چربی ۲/۵ درصد در PBS توئین به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مسدود شدند. پس از ۳ بار شستشو با بافر، نمونه‌های سرم ۱:۴۰۰ در PBS توئین رقیق شده و ۱٪ شیر بدون چربی و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۹۰ دقیقه بر روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد و پس از ۴ بار شستشو، آنتی بادی پلی کلونال ضد قزل‌آلای رنگین کمان خرگوش ۱:۲۰ رقیق شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو، ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه ضد خرگوشی تولید شده در بز (Goat anti mouse) به صورت کنژوگ HRP با رقت ۱:۳۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترای کروموزنیک به چاهک‌ها و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک ۲ درصد) به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت عدد جذب نمونه‌ها توسط الایزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد [۱۴].

بررسی میزان حدت باکتری‌ها (LD₅₀)

به منظور محاسبه دوز کشنده هر باکتری در ماهی قزل آلا، ابتدا/استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راگری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط TSB کشت داده شدند و پس از سانتریفوژ و جداسازی، باکتری، غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی به 10^9 باکتری در میلی لیتر تنظیم شد و با سریال رقت از این سوسپانسیون رقت های (10^5 الی 10^9) تهیه گردید. با استفاده از این رقت ها تزریق داخل صفاقی انجام و تلفات به مدت ۳ روز ثبت گردید. پس مرگ ماهی ها کشت به منظور اطمینان از اینکه علت تلفات باکتری بوده از اندام های داخلی صورت گرفت. نهایتاً با استفاده از نرم افزار Probit میزان LD_{50} اندازه گیری شد. میزان LD_{50} باکتری استرپتوکوکوس اینیایی $2/6 \times 10^6$ ، لاکتوکوکوس گارویه $5/1 \times 10^7$ و یرسینیا راگری $6/9 \times 10^7$ محاسبه شدند [۲۸].

چالش باکتریایی

بعد از ۶۰ روز ۳۰ ماهی از تیمار به منظور چالش باکتریایی به سالن تکثیر و پرورش دانشگاه تهران واقع در امین آباد شهر ری انتقال یافتند. ماهی ها به صورت جداگانه با باکتری های استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راگری با دوز LD_{50} تعیین شده به صورت درون صفاقی چالش شدند. تلفات به مدت ۱۴ روز ثبت و با فرمول زیر محاسبه گردید [۷].

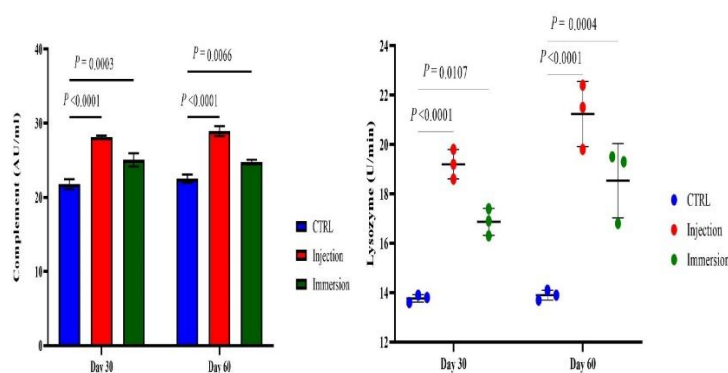
$$100 \times (\text{درصد تلفات گروه کنترل} / \text{درصد تلفات گروه واکسینه} - 1)$$

تجزیه و تحلیل آماری

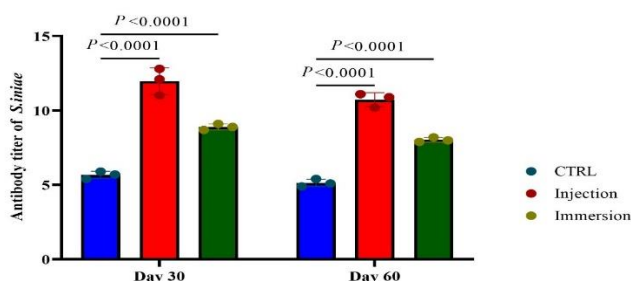
برای آنالیز داده های به دست آمده از نرم افزار GraphPad PRISM نسخه هشت استفاده گردید. ابتدا از آزمون statistic test Leven برای نرمالیتی و همگن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده شد. همچنین برای مقایسه گروه های واکسینه و شاهد در طی زمان از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه ANOVA و Tukey استفاده و سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. داده ها بصورت میانگین $\pm$ SE نشان داده شده اند.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه بر شاخص های ایمنی از قبیل لیزوزیم و کمپلمان سرم نشان داد که در روزهای ۳۰ و ۶۰ نمونه برداری در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس افزایش معناداری در میزان لیزوزیم و کمپلمان سرم نسبت به گروه شاهد وجود دارد (شکل ۱ و ۲)، ($P < 0.05$). اثر اصلی زمان در میزان لیزوزیم سرم و فعالیت کمپلمان معنادار نبود ($P > 0.05$). همچنین اثر متقابل تیمار در زمان در میزان لیزوزیم سرم ($P = 0.1874$) و فعالیت کمپلمان ($P = 0.2443$) معنادار نبود.

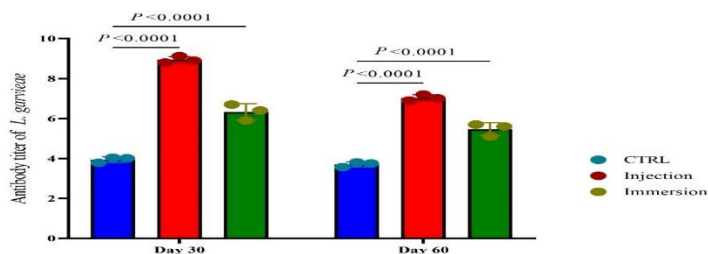


شکل ۱ و ۲. مقایسه فعالیت لیزوزیم و کمپلمان سرم در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس نسبت به گروه کنترل در روزهای ۳۰ ام و ۶۰ام نمونه برداری، CTRL: گروه شاهد، Injection: گروه واکسن تزریقی، Immersion: گروه واکسن غوطه‌وری نتایج مربوط به عیار آنتی بادی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوزیس گارویه و یرسینیا راکری به ترتیب در شکل های ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده‌اند. عیار آنتی بادی ضد/استرپتوکوکوس/اینیایی در روز ۳۰ام و ۶۰ام نمونه برداری، در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشتند (شکل ۳)، ($P < 0.05$). بیشترین عیار آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس اینیایی در گروه واکسن تزریقی (۱۱/۹۷) در روز ۳۰ام مشاهده شد. اثر اصلی زمان فقط در گروه واکسن تزریقی در روز ۳۰ام نسبت به روز ۶۰ام معنادار بود ($P = 0.0490$). اما اثر متقابل تیمار در زمان در عیار آنتی بادی علیه/استرپتوکوکوس/اینیایی معنادار نبود ($P = 0.4235$).



شکل ۳. مقایسه عیار آنتی بادی علیه استرپتوکوکوس اینیایی در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس نسبت به گروه کنترل در روزهای ۳۰ ام و ۶۰ام نمونه برداری، CTRL: گروه شاهد، Injection: گروه واکسن تزریقی، Immersion: گروه واکسن غوطه‌وری

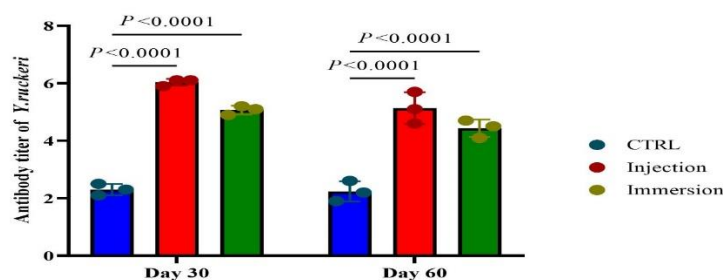
عیار آنتی بادی علیه لاکتوکوکوس گارویه در روز ۳۰ام و ۶۰ام نمونه برداری، در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشتند (شکل ۴)، ($P < 0.05$). بیشترین عیار آنتی بادی علیه لاکتوکوکوس گارویه در گروه واکسن تزریقی (۸/۹۴) در روز ۳۰ام مشاهده شد. اثر اصلی زمان در گروه های واکسن تزریقی و غوطه‌وری در روز ۳۰ام نسبت به روز ۶۰ام معنادار بود ($P = 0.05$). همچنین اثر متقابل تیمار در زمان در عیار آنتی بادی علیه لاکتوکوکوس گارویه معنادار بود ($P = 0.0002$).



شکل ۴. مقایسه عیار آنتی بادی علیه لاکتوکوکوس گارویه در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس نسبت به گروه کنترل در روزهای ۳۰ ام و ۶۰ام نمونه برداری، CTRL: گروه شاهد، Injection: گروه واکسن تزریقی، Immersion: گروه واکسن غوطه‌وری

همچنین عیار آنتی بادی علیه یرسینیا راکری در روز ۳۰ام و ۶۰ام نمونه برداری، در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشتند (شکل ۵)، ($P < 0.05$). بیشترین عیار آنتی بادی علیه یرسینیا راکری در گروه واکسن تزریقی (۶/۰۳) در روز

۳۰ام مشاهده شد. اثر اصلی زمان فقط در گروه واکسن تزریقی در روز ۳۰ام نسبت به روز ۶۰ام معنادار بود ($P = 0.0398$). اما اثر متقابل تیمار در زمان در عیار آنتی بادی علیه یرسینیا راکری معنادار نبود ($P = 0.1053$).

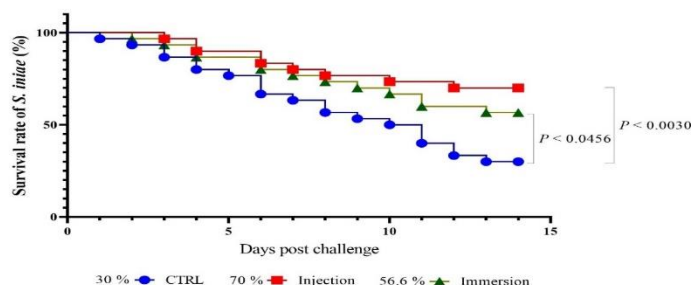


شکل ۵. مقایسه عیار آنتی بادی علیه لاکتوکوکوس گارویه در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس نسبت به گروه کنترل در روزهای ۳۰ام و ۶۰ام نمونه برداری، CTRL: گروه شاهد، Injection: گروه واکسن تزریقی، Immersion: گروه واکسن غوطه‌وری

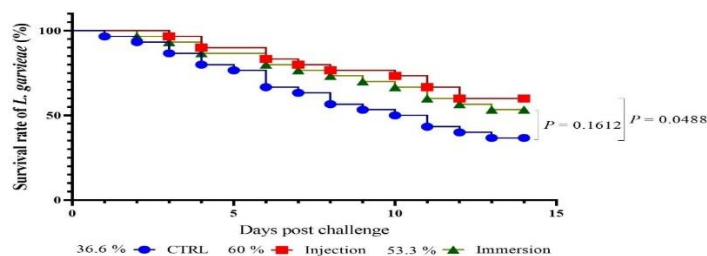
نتایج حاصل از درصد بقای نسبی در مواجهه با استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوزیس گارویه و یرسینیا راکری به ترتیب در شکل‌های ۶، ۷ و ۸ نشان داده شده‌اند. نرخ بقا پس از مواجهه با/استرپتوکوکوس/ینیایی در گروه‌های واکسن تزریقی ($P < 0.0030$) و غوطه‌وری ($P = 0.0456$) افزایش معناداری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دادند (شکل ۶). گروه واکسن تزریقی با ۷۰٪ بازماندگی و گروه شاهد با ۳۰٪ بازماندگی کمترین درصد بقای نسبی را از خود نشان دادند (شکل ۶).

درصد بقای نسبی پس از مواجهه با لاکتوکوکوس گارویه در گروه‌های واکسن تزریقی ($P = 0.0488$) افزایش معناداری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دادند اما گروه واکسن غوطه‌وری ($P = 0.1612$) اختلاف معناداری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان نداد (شکل ۷). گروه واکسن تزریقی با ۶۰٪ بازماندگی و گروه شاهد با ۳۶/۶٪ بازماندگی کمترین درصد بقای نسبی را از خود نشان دادند (شکل ۷).

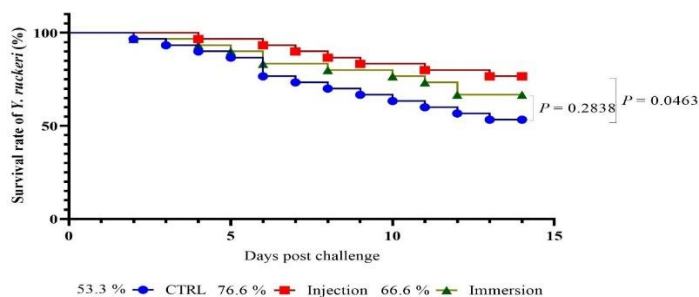
درصد بقای نسبی پس از مواجهه با یرسینیا راکری در گروه‌های واکسن تزریقی ($P = 0.0463$) افزایش معناداری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دادند اما گروه واکسن غوطه‌وری ($P = 0.2838$) اختلاف معناداری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان نداد (شکل ۸). گروه واکسن تزریقی با ۶۰٪ بازماندگی و گروه شاهد با ۳۶/۶٪ بازماندگی کمترین درصد بقای نسبی را از خود نشان دادند (شکل ۸).



شکل ۶. نرخ بقای نسبی تجمعی پس از مواجهه با استرپتوکوکوس اینیایی در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس نسبت به گروه کنترل، CTRL: گروه شاهد، Injection: گروه واکسن تزریقی، Immersion: گروه واکسن غوطه‌وری



شکل ۷. نرخ بقای نسبی تجمعی پس از مواجهه با لاکتوکوکوس گاریجه در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس نسبت به گروه کنترل، CTRL: گروه شاهد، Injection: گروه واکسن تزریقی، Immersion: گروه واکسن غوطه‌وری



شکل ۸. نرخ بقای نسبی تجمعی پس از مواجهه با یرسینیا راکری در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس نسبت به گروه کنترل، CTRL: گروه شاهد، Injection: گروه واکسن تزریقی، Immersion: گروه واکسن غوطه‌وری

بحث

واکسن های چند ظرفیتی به دلیل انواع مختلف باکتری ها در آبی پروری دارای اهمیت ویژه ای هستند و برای مقابله با چندین بیماری به جای یک بیماری توسعه یافته اند [۱۵]. در سال های اخیر، بیشتر واکسن های تجاری توسعه یافته برای ماهیان شامل واکسن های دو ظرفیتی و چند ظرفیتی هستند. واکسن های چند ظرفیتی واکسن های ایده آلی هستند که می توانند به طور همزمان از ماهی ها در برابر اکثر بیماری های عفونی محافظت کنند [۱۶].

اولین یا اساسی ترین سیستم دفاعی در ماهی، پاسخ ایمنی غیر اختصاصی است که نقش مهمی در سیستم ایمنی ثانویه یا اختصاصی و تنظیم هموستاز بدن ایفا می کند [۱۷]. به دلیل ارتباط نزدیک با لکوسیت ها، لیزوزیم یک نشانگر پذیرفته شده و ارجح پاسخ ایمنی است که توسط ماکروفاژها و بسیاری دیگر از محرک های ایمنی در پاسخ به اجزای بیماری زا تولید می شود [۱۸]. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، میزان فعالیت لیزوزیم سرم در گروه های ایمن شده با واکسن چند ظرفیتی افزایش معناداری را نسبت به گروه شاهد در روزهای ۳۰ام و ۶۰ام نمونه برداری داشتند. همسو با نتایج ما عرفان منش و همکاران اثر واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس را بر فعالیت لیزوزیم سرم قزل آلا ی رنگین کمان در مطالعه ای آزمایشگاهی بررسی کردند و گزارش کردند که واکسن چند ظرفیتی اثر معناداری بر گروه های ایمن شده با واکسن دارد [۷]. در گزارشی دیگر اثر واکسن چند ظرفیتی و بیریوزیس، استرپتوکوکوزیس و آئروموناس بر ماهی سی باس آسیایی بررسی شد و گزارش شد که این واکسن اثر معناداری بر فعالیت لیزوزیم سرم دارد [۹]. با توجه به قدرت ضد باکتریایی لیزوزیم و افزایش قابل توجه لیزوزیم سرم ماهیان واکسینه شده نسبت به گروه شاهد، امکان ایجاد حفاظت غیر اختصاصی پس از واکسیناسیون وجود دارد. علاوه بر این،

افزایش مقدار لیزوزیم در گروه واکسینه شده نسبت به گروه کنترل احتمالاً نشان دهنده عملکرد چشمگیر سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی در برابر این بیماری ها است.

سیستم کمپلمان می تواند باعث فعال سازی، فاگوسیتوز، کموتاکسی، پاسخ التهابی، اپسونیزاسیون و ایمونوسیت ها برای پاتوژن ها شود و نقش عمده ای را در ایمنی ذاتی ماهی ایفا می کند [۱۹]. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش فعالیت کمپلمان گروه های واکسینه در روز ۳۰ام و ۶۰ام نمونه برداری نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشتند. همسو با نتایج ما واکسن استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان [۷]، واکسن آئروموناس سالمونیسیدا و *Vibrio scophthalmi* در ماهی توربوت [۲۰] اثر مثبت و معناداری بر میزان فعالیت سیستم کمپلمان داشتند. افزایش فعالیت کمپلمان پس از ایمن سازی با واکسن های چند ظرفیتی، اثربخشی واکسن های غیرفعال را بر علیه بیماری های یاد شده ثابت می کند.

در این مطالعه پاسخ ایمنی اختصاصی قزل آلا ی رنگین کمان بعد از ایمنی زایی با واکسن های استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس با محاسبه عیار آنتی بادی هر یک از باکتری ها ارزیابی گردید. با توجه به نتایج بدست آمده عیار آنتی بادی علیه در هر سه باکتری در گروه های واکسینه در روزهای ۳۰ و ۶۰ نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشت. همسو با نتایج ما واکسن ویبریو آلبینولیتیکوس و ویبریو پاراهمولایتیکوس در ماهی شانک سر طلایی (*Sparus aurata*)، واکسن استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان [۱۱]، واکسن استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان [۷]، واکسن استرپتوکوکوس آگالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیایی در ماهی سی باس آسیایی [۲۱] و واکسن ویبریو هاروی و ویبریو آنکویلاروم در ماهی توربوت [۲۲] افزایش معناداری را بر عیار آنتی بادی واکسن های یاد شده داشتند. افزایش سطح ایمنی را می توان به آنتی ژن های واکسن چندظرفیتی نسبت داد که احتمالاً توانستند به بخش انتهایی روده ماهی منتقل شوند و پاسخ ایمنی موضعی و سیستمیک را القا کنند [۲۳].

در این پژوهش کارایی واکسن با استفاده از چالش باکتریایی (استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه و یرسینیا راکری) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که درصد بقا نسبی پس از چالش با باکتری های استرپتوکوکوس اینیایی (تزریقی و غوطه وری)، لاکتوکوکوس گارویه (در گروه تزریقی) و یرسینیا راکری (در گروه تزریقی) نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری دارند. همسو با نتایج ما Zhang و همکاران (۲۰۲۱) محافظت بالای واکسن دوگانه علیه ویبریوزیس را گزارش کردند [۲۲]. همچنین حسینی و همکاران (۱۴۰۰)، بازماندگی ۹۰ درصدی را با استفاده از واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گزارش کردند [۱۱]. در مطالعه ای دیگر عرفان منش و همکاران (۲۰۲۳) بازماندگی ۸۰ درصدی با واکسن استرپتوکوکوزیس، ۹۰ درصدی با واکسن لاکتوکوکوزیس و ۸۰ درصدی با واکسن یرسینیوزیس را نسبت به گروه شاهد گزارش کردند [۷]. در مطالعه ای دیگر حسینی و همکاران (۱۴۰۲) بازماندگی ۹۰ درصدی با واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس را نسبت به گروه شاهد گزارش کردند [۲۷].

نتیجه گیری

ایمن سازی با استفاده از واکسن های غیرفعال، یک استراتژی خوب در برابر بسیاری از بیماری ها در آبزی پروری است، زیرا یک ایمنی قوی را فراهم می کند و ماهی را از عفونت ها محافظت می کند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده ای این است که واکسن چند ظرفیتی استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در ماهی قزل آلا در سطح مزرعه توانسته است محافظت بالایی را در برابر باکتری های یاد شده از خود نشان دهد. همچنین این واکسن نشان داد که می تواند با واکسن های تک ظرفیتی با توجه به ایمنی بالا و مقرون به صرفه بودن رقابت

گند. ما پیشنهاد می‌کنیم که ژن‌های دخیل در تقویت ایمنی در قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از واکسیناسیون چند ظرفیتی مورد مطالعه قرار گیرند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی را از کسانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند، به خصوص جهاد کشاورزی استان تهران ابراز می‌نماید.

تائیدیه‌های اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: بین نویسندگان تعارض منافی وجود ندارد.

منابع مالی / حمایت‌ها: این تحقیق با حمایت مالی جهاد کشاورزی استان تهران انجام پذیرفت.

منابع

1. Khanzadeh M, Beikzadeh B, Hoseinifar SH. The Effects of *Laurencia caspica* Algae Extract on Hemato-Immunological Parameters, Antioxidant Defense, and Resistance against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*. 2023;2023.
2. Adel M, Gholaghaie M, Binaii M, Khanjany P, Awad E. Effect of dietary *Achillea wilhelmsii* extract on growth performance, and immune status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016;7(6):1037–46.
3. Kibenge MJT, Iwamoto T, Wang Y, Morton A, Routledge R, Kibenge FSB. Discovery of variant infectious salmon anaemia virus (ISAV) of European genotype in British Columbia, Canada. *Virology Journal*. 2016;13:1–17.
4. Lulijwa R, Rupia EJ, Alfaro AC. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*. 2020;12(2):640–63.
5. Miccoli A, Manni M, Picchietti S, Scapigliati G. State-of-the-art vaccine research for aquaculture use: The case of three economically relevant fish species. *Vaccines*. 2021;9(2):140.
6. Costanzo V, Roviello GN. The Potential Role of Vaccines in Preventing Antimicrobial Resistance (AMR): An Update and Future Perspectives. *Vaccines*. 2023;11(2):333.
7. Erfanmanesh A, Beikzadeh B, Khanzadeh M. Efficacy of polyvalent vaccine on immune response and disease resistance against streptococcosis/lactococcosis and yersiniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research Communications*. 2023;1–9.
8. Pereira WA, Mendonça CMN, Urquiza AV, Marteinsson VP, LeBlanc JG, Cotter PD, et al. Use of Probiotic Bacteria and Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in Aquaculture. *Microorganisms*. 2022;10(9):1705.
9. Mohamad A, Zamri-Saad M, Amal MNA, Al-Saari N, Monir MS, Chin YK, et al. Vaccine efficacy of a newly developed feed-based whole-cell polyvalent vaccine against vibriosis, streptococcosis and motile aeromonad septicemia in Asian Seabass, *Lates calcarifer*. *Vaccines*. 2021;9(4):368.
10. Varalakshmi B, Shanmugapriya A, Karpagam T, Suganya V, Firdous J, Arumugam VA, et al. Bacterial Fish Diseases and Treatment. In: *Aquaculture Science and Engineering*. Springer; 2022. p. 517–72.
11. Hosseini SA, Alishahi M. Efficacy of Injectable monovalent and bivalent Vaccines against Streptococcosis and yersiniosis in rainbow trout. *Journal of Aquaculture Development*. 2023;17(1):27–40.
12. Ross NW, Firth KJ, Wang A, Burka JF, Johnson SC. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2000;41(1):43–51.
13. Yano T. Assay of hemolytic complement activity. *Techniques in Fish Immunology*. 1992;131–41.
14. Skov J, Chettri JK, Jaafar RM, Kania PW, Dalsgaard I, Buchmann K. Effects of soluble immunostimulants on mucosal immune responses in rainbow trout immersion-vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*. 2018;492:237–46.
15. Cheng Z, Chu X, Wang S, Peng X, Li H. Six genes of ompA family shuffling for development of polyvalent vaccines against *Vibrio alginolyticus* and *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2018;75:308–15.
16. Mondal H, Thomas J. A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquaculture International*. 2022;1–30.
17. Bae J, Lee S, Moniruzzaman M, Hamidoghli A, Choi W, Lee S, et al. Evaluation of dietary fish meal analog with or without supplementation of natural feed additives as the substitute of fish meal in juvenile Japanese eel,

Anguilla japonica. Frontiers in Marine Science. 2022;9:931940.

18. Harikrishnan R, Devi G, Van Doan H, Vijay S, Balasundaram C, Ringø E, et al. Dietary plant pigment on blood-digestive physiology, antioxidant-immune response, and inflammatory gene transcriptional regulation in spotted snakehead (*Channa punctata*) infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Fish & Shellfish Immunology. 2022;120:716–36.
19. Li M, Zhang H, Sun J. A novel C1qDC (PoC1qDC) with a collagen domain in *Paralichthys olivaceus* mediates complement activation and against bacterial infection. Fish & Shellfish Immunology. 2023;132:108472.
20. Zhou S, Zheng X, Ding Y, Su L, Huang Q, Xiu Y. Immuno-Protective Efficiency of the Bivalent Inactivated Vaccine Against *Vibrio scophthalmi* and *Aeromonas salmonicida* Infections in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Journal of Ocean University of China. 2023;22(4):1079–86.
21. Lan NGT, Salin KR, Longyant S, Senapin S, Dong HT. Systemic and mucosal antibody response of freshwater cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*. Fish & Shellfish Immunology. 2021;108:7–13.
22. Zhang J, Hu Y, Sun Q, Li X, Sun L. An inactivated bivalent vaccine effectively protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture. 2021;544:737158.
23. Radhakrishnan A, Vaseeharan B, Ramasamy P, Jeyachandran S. Oral vaccination for sustainable disease prevention in aquaculture—An encapsulation approach. Aquaculture International. 2023;31(2):867–91.
24. Secombes C.J, Wang T, Bird S, The interleukins of fish. Developmental & Comparative Immunology. 2011; 35:1336–1345.
25. ZHANG, Zhihui, et al. Immune responses of zebrafish (*Danio rerio*) induced by bath-vaccination with a live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine candidate. Fish & Shellfish Immunology. 2012;33.1: 36-41.
26. Faghani T, Takami G. A, Kousha A, Faghani S. Surveying on alginic acid and anti-streptococcus vaccine effects on the growth performance, survival rate, hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Journal of Zoology. 2008;3.2: 54-58.
27. Hosseini S A, Alishahi M, rastiannasab A, mahmoudi R, gandomkar H. Efficacy of Injectable monovalent and bivalent Vaccines against Streptococcosis and yersiniosis in rainbow trout. Journal of Aquaculture Development. 2023;17 (1) :27-40.
28. Ghanei-Motlagh R, Gharibi D, Mohammadian T, Khosravi M, Mahmoudi E, Zarea M, et al, Feed supplementation with quorum quenching probiotics with anti-virulence potential improved innate immune responses, antioxidant capacity and disease resistance in Asian seabass (*Lates calcarifer*). Aquaculture. 2021; 535: 736345.

Field study of Streptococcosis / Lactococcosis and Yersiniosis vaccine effectiveness in immunogenicity and survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ahmad Erfanmanesh¹, Majid Khanzadeh^{1*}, Babak Beikzadeh²

¹ Animal Biological Product Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran Organization, Tehran, Iran.

² Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

ABSTRACT

In this study, the immunogenicity of streptococcosis/lactococcosis and yersiniosis vaccine in rainbow trout was investigated in farm. 900 fish with an average of 50 ± 5 g was divided into three treatments and three replications (injection treatment, immersion treatment and control group). Fish were kept for 60 days and samples were taken on the 30th and 60th days. Then the fishes were challenged for 14 days with three bacteria, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, and *Yersinia ruckeri*. Sampling was done to evaluate lysozyme activity, complement, antibody titer and survival rate. The results indicated a significant increase in serum complement and lysozyme activity on the 30th and 60th days of sampling in the vaccinated groups compared to the control group ($P < 0.05$). Antibody titers against *S. iniae*, *L. garvieae* and *Y. ruckeri* on the 30th and 60th days of sampling in the vaccinated groups had a significant increase compared to the control group ($P < 0.05$). The relative percentage survival after 14 days of challenge with *S. iniae*, *L. garvieae* and *Y. ruckeri* in the injected group was (70, 60, and 76.6%), respectively, which was significant compared to the control group ($P < 0.05$). Also, the relative percentage survival in the immersion group with *S. iniae*, *L. garvieae* and *Y. ruckeri* was (30, 36.6 and 53.3%), respectively, which was significant only in the group immersed with *S. iniae* ($P < 0.05$). In general, it can be concluded that the use of polyvalent vaccine by injection and immersion has significant effects on the immunity and survival rate of rainbow trout. However, the injection method is more effective and suitable than the immersion method.

KEYWORDS: Vaccine, Streptococcosis, Lactococcosis, yersiniosis, Immunity, Rainbow trout

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 26 Aug 2023

Accepted: 23 Nov 2023

ePublished: 6 Dec 2023

* Corresponding Author:

Email address: khanzade@acecr.ac.ir

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513