2026, 2(2): 31-44

JAER

Journal of Animal Environmental Reaserch

Journal homepage: http://www.journalaer.com

Research Article

Effect of *Bacillus subtilis* on immunogenicity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* bivalent oral vaccine encapsulated with Alginate/chitosan in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Elham Osroush [1], Takavar Mohammadian [*2,3], Mojtaba Alishahi [2,3], Mohammad Khosravi [4], Dariush Gharibi [3,4]

[1] *PhD Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[2] *Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[3] *Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[4] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

Key Words

Alginate/Chitosan
Bacillus subtilis
Bivalent vaccine
Encapsulation
Nile tilapia

Abstract

Introduction: The use of probiotics in order to increase the immunogenicity and efficiency of vaccines in aquatic animals has been widely used in the last decade. In this research, the effect of *Bacillus subtilis* probiotic on the immunogenicity of the bivalent oral vaccine of *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* encapsulated with alginate/chitosan in the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) was measured and in terms of immunogenicity, its effects on growth indicators and blood parameters were compared.

Materials & methods: First, the bivalent bacterium *Streptococcus agalactia* and *Streptococcus agalactiae* were successfully encapsulated by the internal emulsification method. Then 600 pieces of Nile tilapia fish weighing 30±2.32 gr were divided into 10 groups (Each group in three repetitions of 20 numbers) include A: treatment group with *S. iniae*, B: treatment group with *S. agalactiae*, C: treatment group with bivalent vaccine, D: treatment group with *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, E: treatment group with *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, F: immunized with bivalent vaccine and *Bacillus subtilis*, G: immunized with encapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, H: immunized with encapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, I: treatment group with bivalent encapsulated vaccine and *Bacillus subtilis*, and Control. The fish were fed and kept under the same conditions for two months, and on days 0, 30 and 60, along with fish biometry, samples were taken from each treatment and blood and serum were isolated. Growth indices and some immune and blood indices of fish were compared between treatments. Then, the fish of each group were challenged with live bacteria *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*, and the deaths of the treatments were recorded up to 14 days and compared between the treatments.

Results: The results showed that the growth indices were affected by immunization and the growth indices including food conversion coefficient, specific growth coefficient and percentage of weight gain in the treatment group with bivalent encapsulated vaccine and *Bacillus subtilis* were improved significantly compared to the control treatment ($p<0.05$). Among the Immune indicators, anti-*streptococcus agalactiae* and anti-*streptococcus iniae* antibody levels, NBT recovery rate, serum globulin and protein levels, and serum lysozyme activity were significantly improved in the sampling stages in the oral treatment of encapsulated and *Bacillus subtilis* ($p<0.05$). Blood parameters including: hemoglobin, hematocrit and white blood cells showed a significant difference between research treatments ($p<0.05$). Investigations showed that in both stages of sampling on the 30th and 60th days, the highest number of white blood cells was related to the encapsulated and *Bacillus subtilis* treatments ($p<0.05$). The lowest rate of deaths in the challenge with live bacteria *S. agalactiae* and *S. iniae*, with 36.7% and 30%, respectively, was related to the treatment group with bivalent encapsulated vaccine and *Bacillus subtilis*, compared to the control treatment (100%) showed a significant decrease ($p<0.05$).

Conclusion: Therefore, it can be concluded that according to the favorable results of *Bacillus subtilis* probiotic immunogenicity on bivalent encapsulated vaccine in the current research and the special advantages of oral vaccine administration, with additional research it is possible to use this method as an alternative to injectable vaccine.

Article info

* Corresponding Author's email: t.mohammadian@scu.ac.ir

Received: 22 September 2024
Reviewed: 22 October 2024
Revised: 22 December 2024
Accepted: 22 January 2025

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

مقاله علمی - پژوهشی

اثر پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس بر ایمنی زایی واکسن خوراکی دوگانه استرپتوکوکوس اینیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)

الهام اسروش[۱]، تکاور محمدیان*[۲،۳]، مجتبی علیشاهی[۲،۳]، محمد خسروی[۴]، داریوش غریبی[۳،۴]

[۱] دکتری تخصصی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] گروه بهداشت دام طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[٤] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

آلژینات/کیتوزان
باسیلوس سابتیلیس
واکسن دوگانه
ریزپوشانی
ماهی تیلاپیای نیل

چکیده

مقدمه: استفاده از پربیوتیک‌ها به‌منظور افزایش ایمنی‌زایی و کارایی واکسن‌ها در آبزیان در دهه اخیر کاربرد زیادی یافته است. در این تحقیق اثر پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس بر ایمنی‌زایی واکسن خوراکی دوگانه استرپتوکوکوس اینیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) مورد سنجش قرار گرفت و از نظر ایمنی‌زایی، کارایی اثرات آن بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها: ابتدا باکتری دوگانه استرپتوکوکوس اینیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه به‌روش Internal Emulsification با موفقیت ریزپوشانی گردید. سپس ٦۰۰ قطعه ماهی تیلاپیای نیل با میانگین ۲/۳۲±۳۰ گرم به ۱۰ گروه (هر گروه در سه تکرار ۲۰ عددی) شامل A: گروه ایمن شده با *S. iniae*، B: ایمن شده با *S. agalactiae*، C: ایمن شده با واکسن دوگانه، D: ایمن شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، E: ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابتیلیس، F: ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، G: ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، H: ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، I: ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، Control: گروه شاهد، تقسیم گردیدند. ماهی‌ها به‌مدت دو ماه در شرایط مشابه، تغذیه و نگه‌داری شدند و در روزهای صفر، ۳۰ و ٦۰ ضمن زیست‌سنجی ماهی‌ها، نمونه از هر تیمار اخذ و خونگیری و جداسای سرم انجام شد. شاخص‌های رشد و برخی شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی بین تیمارها مقایسه گردید. سپس ماهیان هر گروه با باکتری زنده استرپتوکوکوس اگالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیه چالش داده شدند و تلفات تیمارها تا ١٤ روز ثبت و بین تیمارها مقایسه صورت گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد شاخص‌های رشد تحت تاثیر ایمن‌سازی قرار گرفته و شاخص‌های رشد شامل ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه و درصد افزایش وزن در تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بهبود یافته بود ($p<۰/۰۵$). در بین شاخص‌های ایمنی، عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اگالاکتیه و ضد استرپتوکوکوس اینیه، میزان احیای NBT، میزان گلوبولین و پرتئین سرم و فعالیت لایزوزیم سرم به‌طور معنی‌داری در مراحل نمونه‌گیری در تیمار خوراکی ریزپوشانی و باسیلوس‌سابتیلیس بهبود یافته بود ($p<۰/۰۵$). پارامترهای خونی شامل: هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول‌های سفید خون بین تیمارهای تحقیق تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($p<۰/۰۵$). بررسی‌ها نشان داد که در هر دو مرحله نمونه‌گیری روزهای ۳۰ و ٦۰، بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید مربوط به تیمارهای ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس بود ($p<۰/۰۵$). کم‌ترین میزان تلفات در چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس آگالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیه، به ترتیب با ۳٦/۷٪ و ۳۰٪ مربوط به تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس بود که نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰٪) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری: لذا می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به نتایج مناسب ایمنی‌زایی پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس بر واکسن دوگانه ریزپوشانی شده در تحقیق جاری و مزیت‌های ویژه تجویز واکسن خوراکی، با تحقیقات تکمیلی امکان استفاده از این روش به‌عنوان یک جایگزین برای واکسن تزریقی وجود دارد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
t.mohammadian@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ مهر ۱٤۰۳
تاریخ داوری: ۱ آبان ۱٤۰۳
تاریخ اصلاح: ۲ دی ۱٤۰۳
تاریخ پذیرش: ۳ بهمن ۱٤۰۳

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

مقدمه

در دو دهه گذشته توسعه پرورش آبزیان در جهان نسبت به سایر منابع پروتئین بسیار بالاتر بوده است، به طوری که سازمان غذا و کشاورزی جهانی توسعه آبزی‌پروری را بهترین گزینه تامین پروتئین جمعیت در حال توسعه جهانی دانسته است. یکی از پرطرفدارترین و سریع‌الرشدترین ماهیان پرورشی جهان ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) است که با رشدی حدود ۸٪ در صنعت آبزی‌پروری جهان در دهه اخیر رتبه اول رشد را به خود اختصاص داده است و به یکی از ماهیان مهم در آبزی‌پروری به‌ویژه برای کشورهای در حال توسعه دارای تنش آبی مطرح شده است و تولید جهانی تیلاپیای نایل در سال ۲۰۱۸ بیش از ۴/۴ میلیون تن و کل گونه‌های تیلاپیا بیش ۵/۷ میلیون تن بوده است که بعد از ماهی آمور مقام دوم را در تولید جهانی دارد (۳۷). این ماهی در بیش از ۱۴۰ کشور مانند چین، فیلیپین، تایلند، عربستان، مصر و آمریکا پرورش داده می‌شود. ماهی تیلاپیا به‌خاطر رشد سریع و مقاومت نسبتاً بالا به شرایط محیطی به ویژه شوری، توقع غذایی کم، امکان پرورش بسیار متراکم و نیاز کم به تعویض آب به‌عنوان یکی از گونه‌های مناسب پرورش در ایران می‌باشد. یکی از مشکلات آبزی‌پروری کشور، تنوع پایین در ماهیان پرورشی است، به‌طوری که به‌جز ۴ گونه کپور ماهی چینی، ماهی دیگری به‌طور تجاری به‌صنعت آبزی‌پروری گرمابی کشور معرفی نشده است. تنوع گونه‌ای در صنعت آبزی‌پروری هر کشور ضامن استمرار و پایداری صنعت می‌باشد. به‌طوری که اگر پرورش یک یا چند گونه با چالش جدی (مثل بیماری‌های ویروسی کشنده) مواجه شد، امکان شیفت‌نمودن صنعت به سمت سایر گونه‌های موجود در کشور وجود داشته باشد و صنعت ورشکسته نشود. از این‌رو یکی از گونه‌های مورد حمایت FAO گونه تیلاپیا است که مزیت‌های پرورشی فراوانی دارد. هم‌چنین این ماهی بازارپسندی خوبی در مناطق غیر ساحلی که طعم و بوی معمول ماهی را خوشایند نمی‌دانند، دارد. به‌دلیل طول‌عمر و دوره پرورش کوتاه این ماهی، تجمع سموم و فلزات سنگین در این گونه کم‌تر از سایر گونه‌های ماهی است و این ماهی چهارمین ماهی مصرفی از نظر میزان مصرف در امریکا است. هم‌چنین این ماهی به پرفروش‌ترین ماهی در کشورهای اتحادیه اروپا تبدیل شده است. این ماهی به‌دلیل مقاومت‌بالا در برابر شرایط محیطی استرس‌زا و تکثیر ساده و سریع هم به‌عنوان فرصت و هم به‌عنوان تهدید برای آبزی‌پروری و آبزیان بومی در سطح دنیا مطرح شده است، به‌طوری که در استان Guangdong چین که ۴٪ تولید تیلاپیای چین (بزرگ‌ترین تولیدکننده دنیا) را به‌عهده دارد، علی‌رغم موفقیت بسیار زیاد در تولید، تبعات زیست محیطی آن نیز بر ماهیان بومی گزارش شده است (۹).

علی‌رغم محدودیت‌های شدید پرورش تیلاپیا در کشور، فعلاً در کشور چهار استان غیرساحلی (خراسان جنوبی، یزد، سمنان و قم) مجاز به تکثیر و پرورش این ماهی می‌باشند، ولی باید منتظر توسعه پرورش آن در کشور به‌دلیل مزیت‌های پرورشی خاص این گونه باشیم. مجوز تولید متراکم این ماهی به‌میزان بیش از ۶ هزار تن در شهرستان فردوس خراسان جنوبی و سمنان صادر شده و کارگاه‌ها در حال آماده سازی است. استرپتوکوکوزیس مهم‌ترین بیماری باکتریایی در صنعت پرورش ماهی تیلاپیا است (۱۶، ۲۸). تاکنون دو گونه باکتری شامل *S. iniae*، *S. agalactiae* به‌عنوان عامل استرپتوکوکوزیس در تیلاپیا گزارش شده‌اند (۲۰). استرپتوکوکوزیس در تیلاپیا در دمای بالای ۳۰ درجه باعث ایجاد انواع علایم بالینی در ماهی‌های آلوده می‌شود. شایع‌ترین علایم بالینی با توجه به مننگوانسفالیت شدید در تیلاپیا شنای نامنظم، اگزوفتالمی، کدورت قرنیه، خونریزی در چشم و پایه باله، تیرگی رنگ، آسیت، زخم‌های پوستی و ناهنجاری استخوانی است. تلفات این بیماری در تیلاپیای قرمز در پرورش در قفس در مالزی ۷۰٪ و در کل پرورش در سال ۲۰۱۰ تا ۵۰٪ بوده است. در چین که بزرگ‌ترین تولیدکننده این ماهی در جهان است، نیز این بیماری با دو عامل *S. Iniae* و *S. agalactiae* مهم‌ترین بیماری باکتریایی این ماهی در دو دهه اخیر گزارش شده است (۲۴). مطالعات منتشر نشده تیم تحقیق این پایان‌نامه تشخیص قطعی *استرپتوکوکوس اینیه* و *استرپتوکوکوس اگالاکتیه* از ماهی تیلاپیای نیل پرورشی داخل کشور را تایید قطعی و توالی یابی نموده‌اند. روش معمول مقابله با این بیماری آنتی‌بیوتیک‌تراپی است، ولی با توجه به‌عواقب نگران‌کننده استفاده از آنتی بیوتیک ها، التراناتیوهای دیگر شامل، استفاده از محرک‌های ایمنی (۱۰)، پروبیوتیک‌ها و واکسیناسیون در پیشگیری و کنترل این بیماری نقش دارند که موثرترین و مناسب‌ترین روش پیشگیری از بیماری استفاده از واکسیناسیون است (۱۷). در بین روش‌های مختلف تجویز واکسن‌ها، روش تزریقی بالاترین کارایی را داشته و اکثر واکسن‌های تجاری به این روش استفاده می‌گردند (۸)، اما واکسن‌های خوراکی به‌دلیل سهولت تجویز، استرس‌زا نبودن و امکان تجویز در جمعیت‌های بالا و مناسب بودن برای واکسیناسیون در تمام سنین، بهترین روش تجویز واکسن است (۲۵). اصلی‌ترین مشکل تجویز خوراکی واکسن میزان کارایی محافظتی کم آن نسبت به‌روش تزریقی است. رفع مشکل کارائی محافظتی پایین این روش، کاهش تجزیه آنتی‌ژن و حفظ بهتر آنتی‌ژن در معده و قسمت قدامی لوله گوارش است. پتانسیل نانو و میکرو ذرات برای انتقال خوراکی آنتی‌ژن‌ها در چندین گونه ماهی با استفاده از انواع مختلف پلیمرهای طبیعی و سنتزی مطالعه شده است. آنتی‌ژن‌ها معمولاً درون ذرات کپسوله شده، ولی گاهی ممکن است با پیوندهای کووالانسی نیز به

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]
[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

آن‌ها متصل شوند. به‌طورکلی ذرات استفاده شده در ریزپوشانی آنتی ژن واکسنی غیرسمی، با قابلیت تخریب زیستی (تجزیه‌پذیری زیستی) بوده و برای انتقال خوراکی آنتی ژن مناسب هستند (۲۱). اغلب مطالعات، جذب خوب در انتهای لوله گوارشی، افزایش تولید پادتن اختصاصی و هم‌چنین محافظت بهتر با استفاده از ذرات میکروسکوپی آلژینات، لیپوزوم‌ها، پلی‌دی‌ال‌لاکتیدکو گلایکولیک اسید (PLGA) و کیتوزان را گزارش کرده‌اند (۱۴)، کیتوزان و آلژینات دو پلیمر طبیعی زیست تخریب‌پذیر هستند که علاوه بر محافظت آنتی‌ژن در شرایط لوله گوارش، تحریک ایمنی مخاطی را باعث می‌شوند و نقش ادجوانی دارند (۱۱). از طرفی ارزان‌قیمت و در دسترس هستندو در تحقیقات مختلف از آن‌ها برای پوشش دادن واکسن‌های خوراکی استفاده شده است (۱۲). استفاده از پربیوتیک‌ها به منظور افزایش ایمنی زایی و کارایی واکسن ها در آبزیان در دهه اخیر کاربرد زیادی یافته است (۳۰). ترکیب واکسیناسیون با تجویز پروبیوتیک دریک واکنش متقابل بُرد بُرد، علاوه بر افزایش کارایی و ایمنی زایی واکسن، بهبود اثرات پروبیوتیک تجویز شده را نیز باعث می شود. استفاده از باسیلوس سابتیلیس به‌عنوان یک پروبیوتیک شناخته شده در ماهی رایج است (۶). اثرات ادجوانی مرحله هاگ این باکتری در واکسن انفلوانزا در انسان (۳۱) و طیور (۱۸) هم گزارش شده است. هم‌چنین از باکتری باسیلوس سابتیلیس بیان کننده آنتی ژن استرپتوکوکوس اگالاکتیه در ماهی تیلاپیا با موفقیت و ایمنی‌زایی بالا گزارش کردند (۳۵). لذا با توجه به مزیت‌های متعدد استفاده از پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه باسیلوس سوبتیلیس در آبزیان، اهمیت بیماری استرپتوکوکوزیس (ایجاد شده توسط *S. Iniae* و *S. agalactiae*) در ماهی تیلاپیا در کشور و باعنایت به مزایای واکسیناسیون خوراکی نسبت به سایر روش‌های واکسیناسیون، در این تحقیق تاثیر پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس بر کارایی و ایمنی‌زایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوس آگالاکتیه و اینیه ریزپوشانی شده با نانوذرات آلژینات/ کیتوزان ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه باکترین (Formalin Killed Cells): از حادترین سویه باکتری استرپتوکوکوس اینیه و آگالاکتیه که توسط تیم تحقیق از تیلاپیای پرورشی جداسازی شده و با آزمایشات مولکولی و توالی‌یابی قبلاً هویت آن تایید شده بود، ابتدا باکتری بذر واکسنی در محیط مایع TSB کشت داده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه گردید، باکتری از محیط کشت استخراج شده و با استفاده از فرمالین ۱ درصد و انکوبه کردن به‌مدت ۲ ساعت، غیرفعال شده و سه مرتبه با بافر فسفات استریل شسته شد تا فرمالین باقی مانده حذف شود. به‌منظور اطمینان از غیرفعال شدن، باکترین قبل از استفاده در محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. به‌منظور افزودن باکترین به غذا از روش رایج استفاده شد. غلظت باکترین در خوراک ده به توان ۸ در هر گرم خوراک و غلظت واکسن با استفاده از استاندارد مک فارلند به غلظت 10^{10} رسانده شد (۱).

ریزپوشانی باکترین‌ها با ریزذرات آلژینات/کیتوزان به‌روش ژلاسیون یونی (Ionic gelation): برای این منظور، مقدار ۱۱۷/۵ سی‌سی محلول آلژینات-سدیم ۰/۰۶۳٪ را که pH آن روی ۴/۹ تنظیم گردید با سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شد و در حالت چرخش با دور ۸۰۰ rpm در دقیقه به‌هم زده‌شد. سپس ۷/۵ سی‌سی از محلول کلرید کلسیم ۱۸ میلی‌مولار را قطره قطره در مدت ۶۰ دقیقه به آن اضافه شد تا یک پیش ژل آلژینات تهیه گردید. سپس ۲۵ سی‌سی از محلول کیتوزان ۰/۰۷٪ را که pH آن روی ۴/۶ تنظیم گردید، قطره قطره به پیش ژل طی ۹۰ دقیقه اضافه شد. پراکنش کلوئیدی در pH برابر ۴/۷ با اضافه کردن کیتوزان چند کاتیونی شکل گرفت. بعد از اضافه کردن کیتوزان، اجازه‌داده شد تا به‌مدت ۳۰ دقیقه دیگر نیز در شرایط فوق باقی بماند تا کپسولاسیون کامل شود. کپسول‌ها با سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دوردردقیقه به‌مدت یک‌ساعت جداسازی شد.

بررسی مشخصات محصول ریزپوشانی شده: ویژگی‌های محصول ریز پوشانی شده شامل: اندازه ذرات (با استفاده از دستگاه پارتیکل سایزر)، پتانسیل زتا (با استفاده از دستگاه زتا آنالایزر)، شکل و نحوه پراکنش ذرات با میکروسکوپ فاز کنتراست و میکروسکوپ الکترونی (SEM) مشخص گردید.

تهیه و تیماربندی ماهی‌ها: تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی تیلاپیا با وزن ۲/۳۲±۳۰گرم خریداری و در وضعیت مناسب به سالن نگه‌داری ماهیان در وان‌های ۳۰۰ لیتری‌واقع در بخش بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. برای حصول اطمینان از وضعیت بیماری در این ماهیان بررسی بیماری‌های انگلی و قارچی، کشت باکتریایی از مغز و کلیه‌قدامی از ۱۰ قطعه ماهی صورت گرفت. پس از اطمینان از عدم‌وجود بیماری‌های مختلف و عدم رشد باکتری در محیط کشت انکوبه شده، قبل از شروع مراحل تحقیق، ماهیان تیلاپیا خریداری شده جهت سازگاری با شرایط جدید در مخازن ۳۰۰ لیتری، به‌مدت دو هفته نگه‌داری شدند. هر دو روز یک‌بار کل آب هر مخزن با آب لوله‌کشی کلرزدایی شده و هم‌دما شده تعویض می‌گردید. تمام مخازن ۳۰۰ لیتری توسط کمپرسور هوادهی در طی دوره آزمایش مجهز بود و شرایط آب دوره تحقیق به‌صورت زیر بود: دما ۲۹-۲۸ درجه‌سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول در تمام مخازن ۷-۵/۸ میلی‌گرم در لیتر، pH= ۸-۷، میزان آمونیاک و نیتریت کم‌تر

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

از یک‌صدم میلی‌گرم در لیتر و میزان نیترات کم تر از یک‌دهم میلی‌گرم در لیتر برای تمامی وان‌ها تنظیم شد. در ادامه، ماهیان به ۱۰ تیمار (هر تیمار در سه تکرار ۲۰ قطعه‌ای) به‌صورت تصادفی طبق جدول ۱ تقسیم گردیدند. ماهیان در مخازن ۳۰۰ لیتری به‌صورت مجزا با شرایط مناسب و نزدیک به‌شرایط طبیعی پرورش ماهی تیلاپیا آماده و به‌مدت ۶۰ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. برای ایمن‌سازی خوراکی، ماهی‌ها به‌مدت ۱۵ روز با خوراک حاوی 10^8 باکترین در هر گرم خوراک تغذیه شدند. تجویز پروبیوتیک بعد از تجویز واکسن به‌مدت یک‌ماه با باکتری باسیلوس سابتیلیس به‌میزان 10^8 در گرم خوراک انجام گردید.

جدول ۱: تیماربندی ماهیان تحقیق

Table 1: Treatment of research fish

Group name	Food type	Number of fish
Control treatment	Without vaccinations and basic food	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment A	Immunized with *S. iniae*	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment B	Immunized with *S. agalactiae*	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment C	Immunized with dual vaccine	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment D	Immunized with *S. iniae* and *Bacillus subtilis*	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment E	Immunized with *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment F	Immunized with dual vaccine and *Bacillus subtilis*	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment G	Immunized with microencapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis*	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment H	Immunized with microencapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment I	Immunized with dual microencapsulated vaccine and *Bacillus subtilis*	20 pieces (in 3 repetitions)

اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضداستر پتوکوکوس اینیه و استر پتوکوکوس اگالاکتیه: اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی ضداستر پتوکوکوس اگالاکتیه و اینیه به روش الایزای غیرمستقیم انجام شد (۱۲). ابتدا آنتی ژن (باکتری سونیکه) به کف گوده ۹۶ خانه‌ای کوت گردید، سپس نمونه سرمی به آن اضافه شد. در مرحله بعد، آنتی‌بادی ثانویه یعنی آنتی‌سرم تیلاپیا در خرگوش (Rabbit anti tilapia Ab) اضافه گردید. مرحله بعد اضافه نمودن آنتی‌بادی کونژوگه ضدایمونوگلوبولین خرگوش بود و نهایتاً سوبسترای آنزیمی افزوده شد و در دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. عیار آنتی‌بادی ضدباکتری مورد اشاره با روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی Micro Aglitination Test سنجش گردید. از سرم ماهی فوق ایمن به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین میزان فعالیت کمپلمان سرم: برای اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان، از مسیر فرعی کمپلمان (ACP) و مسیر کلاسیک کمپلمان مطابق با روش توصیه شده توسط Selvaraj و همکاران، استفاده شد (۳۲). در این روش از قدرت کمپلمان برای تخریب جدار گلبول‌های قرمز خون خرگوش و ایجاد همولیز استفاده شد. پس از تهیه آنتی‌بادی IgG ضدگلبول قرمز خرگوش و مجاور نمودن با گلبول قرمز شسته شده، حساس‌سازی گلبول‌های قرمز انجام شد. گلبول‌های قرمز حساس شده و حساس نشده با رقت مناسب سرم مجاور شدند و ارزیابی میزان همولیز با اندازه‌گیری جذب نوری نمونه سانتریفیوژ شده انجام گردید.

تعیین سطح فعالیت لیزوزیم: سطح فعالیت لیزوزیم پلاسمای خون با استفاده از روش کدورت سنجی براساس روش Ellis تعیین گردید (۷). برای این منظور، ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرو لیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH=۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت مخلوط شد و جذب نوری آن در دمای اتاق در روزهای صفر و ۳۰ و ۶۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم مرغ سیگما تعیین گردید.

ارزیابی احیاء NBT: برای این منظور، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل گوده‌های میکروپلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه گردید. پلیت به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشته، و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرمامید اضافه شد. پس از سانتریفوژ نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

ارزیابی میزان پروتئین تام و ایمونوگلوبولین سرم: مقایسه میزان کلی پروتئین تام و ایمونوگلوبولین سرم با اندازه‌گیری پروتئین و آلبومین تام با استفاده از کیت‌های زیست‌شیمی انجام شد. با تفریق نمودن البومین از پروتئین تام، میزان گلوبولین سرم تعیین گردید.

آزمایشات هماتولوژی: محاسبه هموگلوبین با استفاده از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر خون به ۲/۵ سی‌سی محلول تجاری درابکین (معرف سیانومت هموگلوبین) اندازه‌گیری شد. در ادامه، محاسبه تعداد کل گلبول‌های سفید با استفاده از لام نئوبار و رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات‌هریک انجام شد.

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

ارزیابی شاخص‌های رشد: شاخص‌های رشد شامل ضریب رشد ویژه (SGR)، درصد افزایش وزن (WGP)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) بر طبق روش Salas محاسبه شد (۳۳).

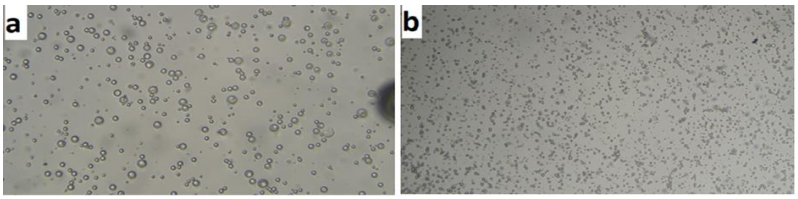
محاسبه LD_{50} باکتری: ابتدا از باکتری استرپتوکوکوس اینیه و آگالاکتیه یک کشت تازه در محیط کشت TSB با ۱/۵٪ نمک تهیه شد. محیط کشت حاوی باکتری پس از انکوباسیون و انتقال به فالکون ۵۰ سی‌سی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب ته فالکون پس از عمل سانتریفیوژ با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو شد. سپس سوسپانسیون باکتری با استفاده‌از سرم فیزیولوژی استریل در تراکم شماره ۷ مک‌فارلند تنظیم ($۲/۱\times۱۰^{۹}$) گردید. پس از آن با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل این تراکم به تراکم $۱۰^{۹}$ باکتری در میلی‌لیتر، به‌عنوان محلول ذخیره رسانده شد. با رقت‌سازی‌های متوالی از محلول ذخیره ($۱۰^{۵}$ CFU/ml الی $۱۰^{۱۱}$) و تزریق داخل صفاقی، تلفات هر رقت روزانه و به‌مدت دو هفته ثبت گردید. پس از تلفات ماهیان، برای اطمینان از علل تلفات از مغز و کلیه قدامی ماهیان مورد تحقیق کشت باکتریایی مجدد داده شد. نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار Probit، LD_{50} باکتری اندازه‌گیری شد.

چالش باکتریایی: در پایان روز ۶۰ تحقیق، ماهیان هر کدام از تیمارها با باکتری زِنده استرپتوکوکوس اینیه و استرپتوکوکوس اگالاکتیه با دوز ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات (LD50) به روش تزریق داخل صفاقی، مورد چالش قرار گرفته و تلفات به‌مدت ۱۴ روز ثبت شد. برای اطمینان از نقش باکتری در تلفات، از ماهیان تازه تلف شده، کشت از مغز و کلیه قدامی انجام شد و Reisolation باکتری‌ها انجام گرفت. تعداد تلفات روزانه ثبت شده و نهایتاً درصد تلفات تجمعی بین تیمارها مقایسه و نتایج با روش کاپلان میر آنالیز گردید.

آنالیز آماری: پس از ثبت داده‌ها، ابتدا به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از آزمون آماری لون و کولموگورف–اسمیرنف استفاده شد. سپس برای مقایسه کلی بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) و برای مقایسه میانگین بین تیمارها و بررسی روند معنی‌داری از آزمون دانکن تحت نرم‌افزار SPSS استفاده شد. هم‌چنین جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید. در تمامی موارد نتایج بر اساس میانگین و خطای معیار میانگین (Mean±SEM) بیان شد.

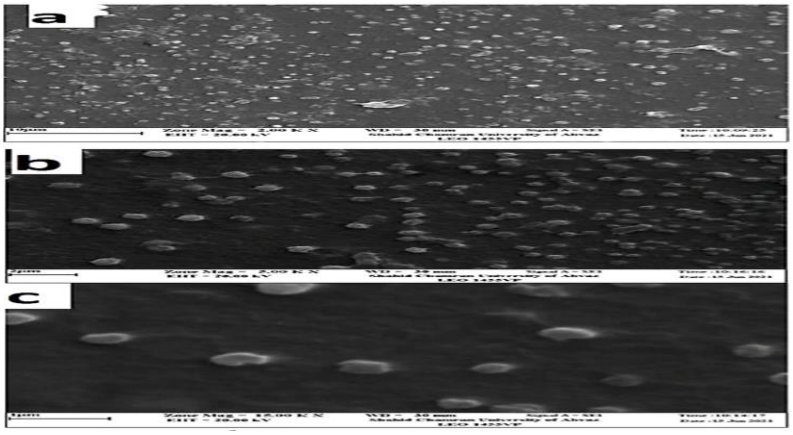
نتایج

بررسی نانو/میکروذرات با میکروسکوپ فاز کنتراست و الکترونی SEM: در روش ریزپوشانی باکترین با ریزذرات آلژینات کیتوزان، تصاویر میکروسکوپ فاز کنتراست و SEM نشان‌دهنده پوشش دهی مناسب واکسن خوراکی بود به‌طوری که در تصاویر مشاهده می‌گردد پوشش دهی باکترین به خوبی انجام شده و ساختار پوشش آلژینات کیتوزان روی باکترین به‌خوبی قابل تشخیص است (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری فاز کنتراست واکسن کپسوله شده با آلژینات-کیتوزان، a: بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر، b: بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

Figure 1: Phase contrast optical microscope image of the alginate-chitosan encapsulated vaccine, a: 1000x magnification, b: 400x magnification



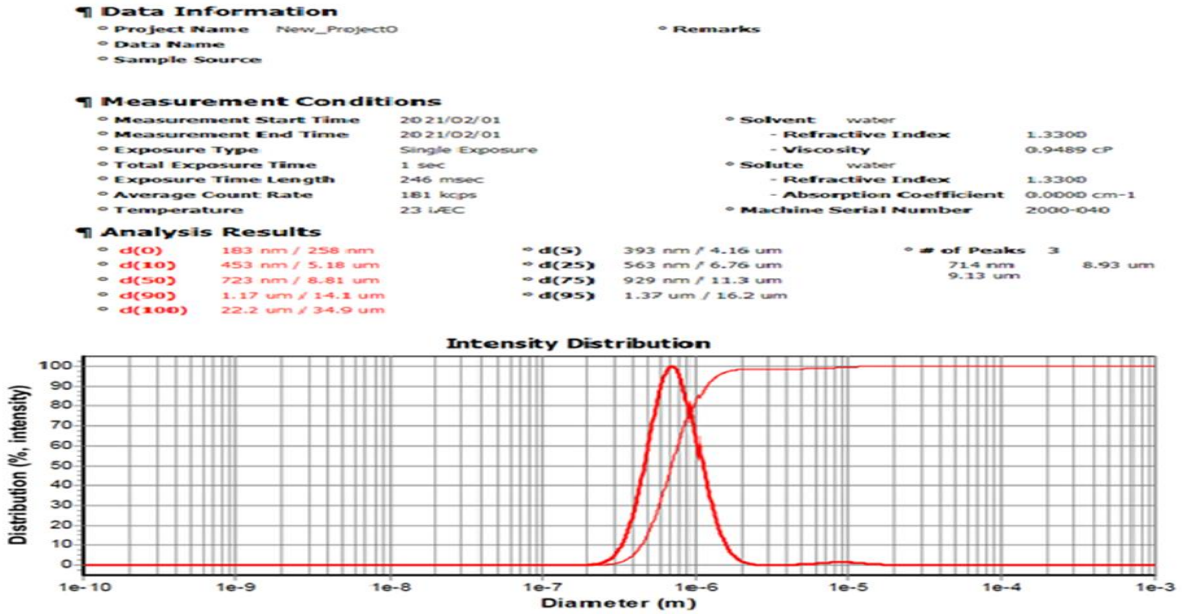
شکل ۲: تصاویر SEM از ریزکپسول‌های واکسنی تولید شده با آلژینات-کیتوزان، a: بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰ برابر، b: بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰ برابر، C: بزرگ‌نمایی ۱۵۰۰۰ برابر

Figure 2: SEM images of vaccine microcapsules produced with alginate-chitosan, a: 2000x magnification, b: 5000x magnification, C: 15000x magnification

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

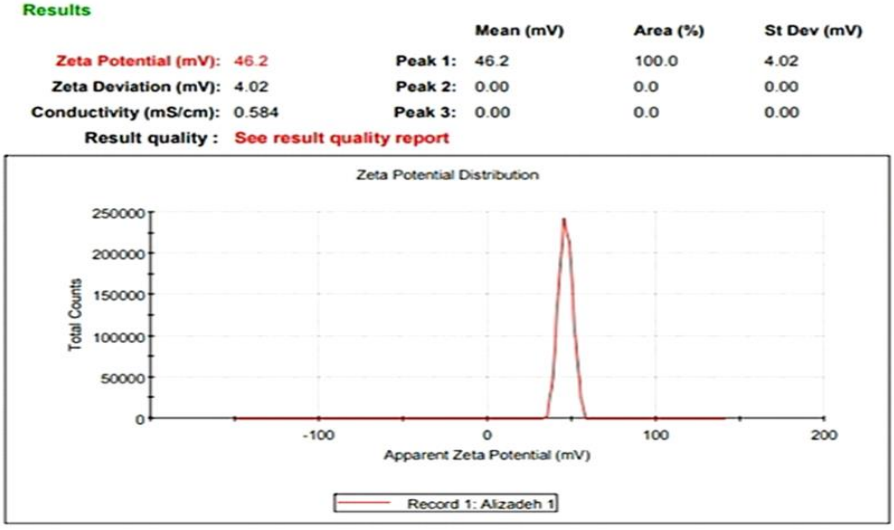
بررسی اندازه ریزذرات با دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر: در بررسی باکترین کپسوله شده، اندازه ذرات با استفاده از دستگاه آنالیز اندازه ذره ثبت گردید که نتایج آن در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طورکه در تصویر مشخص است میانگین قطر ۵۰ درصد از میکروسفرهای تشکیل شده بین از حدود ۰/۷۳ تا ۸/۱۸ میکرومتر است.



شکل ۳: نتیجه سایز ذرات محصول ریزپوشانی شده با آلژینات -کیتوزان (خروجی دستگاه PSA)

Figure 3: Particle size result of the alginate-chitosan microencapsulated product (output of the PSA device)

اندازه‌گیری پتانسیل زتا: میزان پتانسیل زتای ذرات واکسن کلوئیدی ایجاد شده بر اساس نتایج آنالیز با دستگاه زتا انالایزر برابر ۴۶/۲ میلی‌ولت تعیین شد که در اطلاعات خروجی دستگاه و نمودار ترسیم شده توسط دستگاه زتا انالایزر مشخص است (شکل ۴).

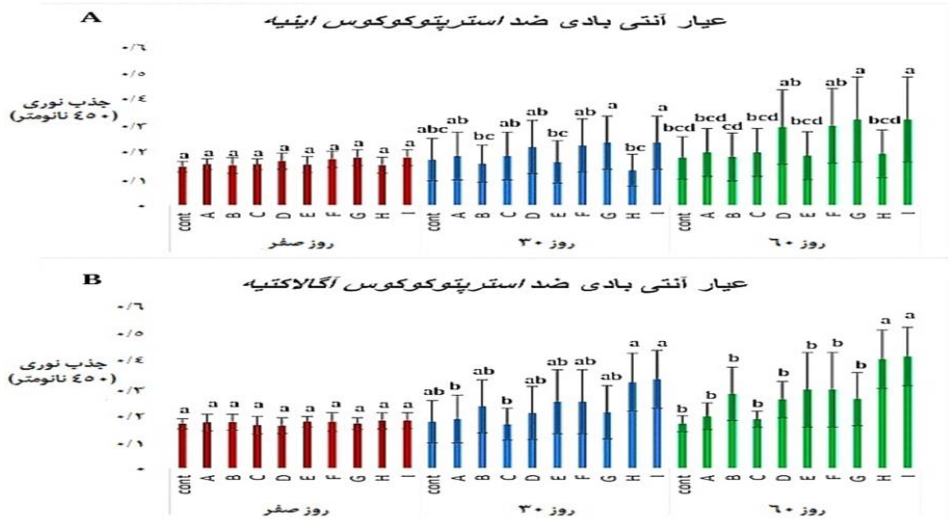


شکل ۴: پتانسیل زتای میکروکپسول‌ها به‌روش امولسیون خارجی با استفاده از آلژینات (با ویسکوزیته متوسط) و کیتوزان (با وزن مولکولی پایین). pH محلول آلژینات و کیتوزان ۳/۵ بود.

Figure 4: Zeta potential of microcapsules by external emulsion method using alginate (with medium viscosity) and chitosan (with low molecular weight). The pH of the alginate and chitosan solution was 3.5.

تیتر پادتن: همان‌طورکه در روش کار بیان شد، در روز صفر (قبل از ایمن‌سازی) و همین‌طور روز ۳۰ و ۶۰ پس از ایمن‌سازی، جهت‌بررسی سطح آنتی‌بادی سرم، پس از بی‌هوشی ماهیان، از ورید ساقه دمی خونگیری به‌عمل آمد. نتایج عیار آنتی‌بادی با محاسبه جذب نوری نمونه‌ها در نمونه‌های سرمی ماهیان گروه‌های مختلف به‌وسیله الایزای غیرمستقیم در شکل ۵ خلاصه شده است.

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]
[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]



شکل ۵: مقایسه عیار پادتن سرمی علیه استرپتوکوکوس اینیه (A) و استرپتوکوکوس آگالاکتیه (B) در سه مرحله نمونه‌گیری بین تیمارهای تحقیق

حروف غیرهمنام روی ستون انحراف‌معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار. A: تیمار ایمن شده با *S. iniae*، B: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae*، C: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه، D: تیمار ایمن شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابتیلیس، F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، H: ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، Control: تیمار شاهد.

Figure 5: Comparison of serum antibody titers against *Streptococcus iniae* (A) and *Streptococcus agalactiae* (B) at three sampling stages between the study treatments. Non-synonymous letters on the standard deviation column indicate significant differences. A: Treatment immunized with *S. iniae*, B: Treatment immunized with *S. agalactiae*, C: Treatment immunized with dual vaccine, D: Treatment immunized with *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, E: Treatment immunized with *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, F: Treatment immunized with dual vaccine and *Bacillus subtilis*, G: Treatment immunized with microencapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, H: Immunized with microencapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, I: Treatment immunized with microencapsulated dual vaccine and *Bacillus subtilis*, Control: Control treatment.

عیار آنتی‌بادی ضداسترپتوکوکوس اینیه در هیچ‌کدام از گروه‌ها نسبت به تیمار کنترل در روز ۳۰ نمونه‌گیری، افزایش معنی‌داری نشان نداد ($p>0/05$). آنالیز آماری نشان داد بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی، میزان آنتی‌بادی در گروه‌های D، F، G و I افزایش معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($p<0/05$). در سایر گروه‌ها علی‌رغم افزایش نسبی عیار آنتی‌بادی، این افزایش از نظر آماری در سطح $p<0/05$ معنی‌دار نبود. عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس آگالاکتیه نیز تفاوت معنی‌داری در هیچ‌کدام از گروه‌ها نسبت به تیمار کنترل در روز ۳۰ نمونه‌گیری نشان نداد ($p>0/05$). اما در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی، میزان آنتی‌بادی در گروه‌های H و I افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p<0/05$).

کمپلمان سرم: فعالیت کمپلمان در تمام تیمارهای مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل در روز ۳۰ نمونه‌گیری اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>0/05$). آنالیز آماری بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی، افزایش معنی داری را بین تیمارهای گروه G، H و I با گروه کنترل نشان داد ($p<0/05$) (شکل 6A).

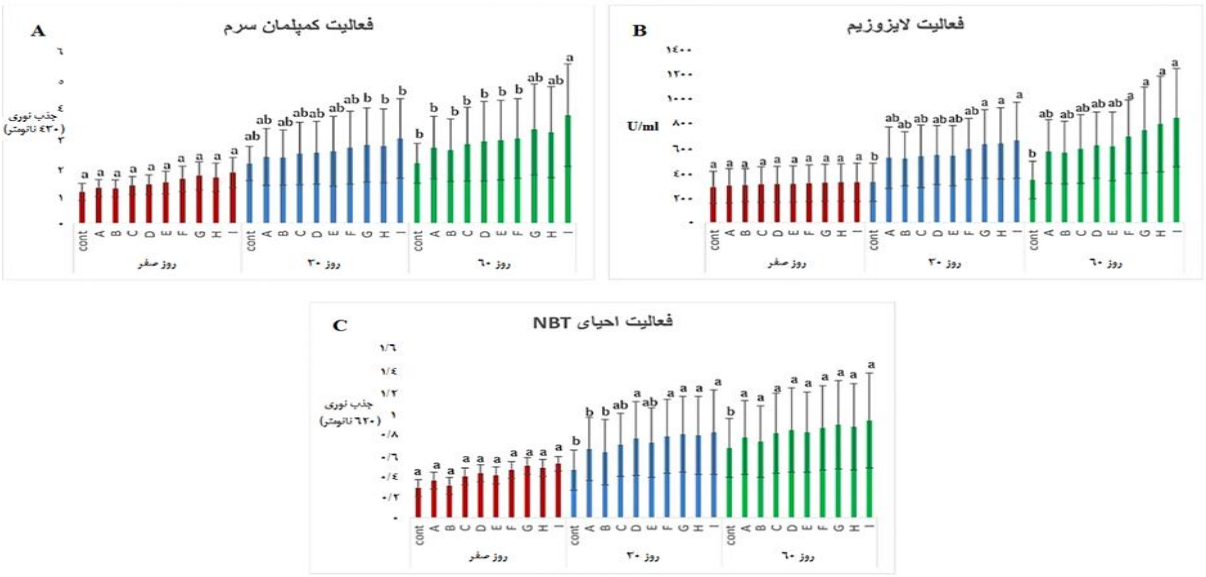
لایزوزیم سرم: فعالیت لایزوزیم سرم در روزهای ۳۰ و ۶۰ نمونه‌گیری در تمام تیمارها نسبت به کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$) (شکل 6B).

احیای NBT: احیای NBT در روز ۳۰ تحقیق به‌جز گروه‌های A و B، افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد ($p<0/05$). در روز ۶۰ در تمام تیمارها افزایش معنی‌دار NBT مشاهده شد ($p<0/05$) (شکل 6C).

سطح پروتئین تام، گلوبولین و آلبومین سرم: بررسی نتایج مربوط به مقایسه سطح پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم در سه مرحله نمونه‌گیری در جدول ۲ آورده شده است. در روز ۳۰ نمونه‌گیری، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد تحقیق با نمونه کنترل دیده نشد ($p>0/05$). بیش‌ترین میزان پروتئین در روز ۶۰ نمونه‌گیری مربوط به تیمارهای A، H و I بود که با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). در سطح آلبومین سرم، اختلاف معنی‌دار بین تمام تیمارها با کنترل به‌جز گروه F در روز ۳۰ نمونه‌گیری دیده شد ($p<0/05$). بالاترین سطح آلبومین سرم در روز ۶۰ نمونه‌گیری، مربوط به تیمارهای G، H و I بود که با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). میزان گلوبولین سرم در روز ۳۰ نمونه‌گیری، دارای افزایش معنی‌دار بین تمام تیمارهای مورد تحقیق با نمونه کنترل به جز گروه A بود ($p<0/05$). بالاترین میزان گلوبولین سرم در روز ۶۰ نمونه‌گیری، مربوط به تیمارهای F، G، H و I بود که با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$).

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]



شکل ۶: مقایسه فعالیت کمپلمان سرم (A)، فعالیت لایزوزیم سرمی (B) و احیای NBT (C) در سه مرحله نمونه‌گیری بین تیمارهای تحقیق

حروف غیرهمنام روی ستون انحراف‌معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری. A: تیمار ایمن شده با *S. iniae*، B: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae*، C: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه، D: تیمار ایمن شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلواس سابتیلیس، F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، H: ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، Control: تیمار شاهد

Figure 6: Comparison of serum complement activity (A), serum lysozyme activity (B) and NBT reduction (C) at three sampling stages between the study treatments. Non-synonymous letters on the standard deviation column indicate significant differences. A: *S. iniae* immunized treatment, B: *S. agalactiae* immunized treatment, C: Dual vaccine immunized treatment, D: *S. iniae* and *Bacillus subtilis* immunized treatment, E: *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis* immunized treatment, F: Dual vaccine immunized treatment and *Bacillus subtilis* immunized treatment, G: Microencapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis* immunized treatment, H: Microencapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis* immunized treatment, I: Microencapsulated dual vaccine immunized treatment and *Bacillus subtilis* immunized treatment, Control: Control treatment

جدول ۲: مقایسه نتایج برخی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در سه مرحله نمونه‌گیری بین تیمارهای تحقیق

Table 2: Comparison of the results of some non-specific safety indicators in the three sampling stages between the research treatments

Time	Treatments	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Globulin (g/dL)
0 Day		2.9±0.14 ^{a}	1.15±0.27 ^{a}	1.46±۰/۷۵ ^{a}
30 Day	Control	2.2±0.08 ^{ab}	0.5±0.23 ^{ab}	1.4±0.23 ^{bc}
	A	2.34±1.3 ^{b}	1.08±0.7 ^{bcd}	1.26±0.77 ^{d}
	B	3.18±0.04 ^{a}	1.06±0.05 ^{bcd}	2.12±0.04 ^{ab}
	C	3.03±0.25 ^{ab}	0.76±0.15 ^{cd}	2.26±0.11 ^{a}
	D	2.85±0.05 ^{ab}	0.92±0.05 ^{bcd}	1.92±0.09 ^{abc}
	E	2.62±0.08 ^{ab}	0.98±0.16 ^{bcd}	1.64±0.11 ^{cd}
	F	3.14±0.27 ^{a}	0.56±0.05 ^{a}	1.58±0.25 ^{cd}
	G	2.88±0.13 ^{ab}	0.98±0.04 ^{bcd}	1.8±0.1 ^{abc}
	H	2.56±0.25 ^{ab}	0.66±0.11 ^{d}	1.8±0.17 ^{abc}
	I	2.78±0.25 ^{ab}	1.1±0.18 ^{bc}	1.9±0.08 ^{bcd}
60 Day	Control	2.82±0.2 ^{b}	0.9±0.34 ^{b}	1.77±0.28 ^{b}
	A	2.23±0.6 ^{a}	1.52±0.69 ^{a}	1.72±0.25 ^{b}
	B	2.8±0.49 ^{ab}	1.28±0.38 ^{ab}	1.52±0.25 ^{b}
	C	2.94±0.34 ^{ab}	1.18±0.48 ^{ab}	1.76±0.27 ^{b}
	D	2.55±0.37 ^{bc}	1.1±0.28 ^{ab}	1.45±0.19 ^{b}
	E	2.54±0.24 ^{bc}	1.18±0.41 ^{ab}	1.36±0.35 ^{b}
	F	2.82±0.3 ^{ab}	1.55±0.4 ^{a}	1.85±0.34 ^{ab}
	G	2.17±0.29 ^{c}	1.69±0.15 ^{a}	1.86±0.29 ^{ab}
	H	3.3±0.27 ^{ab}	1.87±0.28 ^{a}	1.92±0.46 ^{a}
	I	3.42±0.27 ^{a}	1.98±0.2 ^{a}	1.96±0.2 ^{a}

تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون و مرحله نمونه‌گیری با حروف کوچک لاتین متفاوت مشخص شده است. A: تیمار ایمن شده با *S. iniae*، B: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae*، C: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه، D: تیمار ایمن شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابتیلیس، F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، H: ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، Control: تیمار شاهد.

Significant differences at the 0.05 level in each column and sampling stage are indicated by different lowercase Latin letters. A: Treatment immunized with *S. iniae*, B: Treatment immunized with *S. agalactiae*, C: Treatment immunized with dual vaccine, D: Treatment immunized with *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, E: Treatment immunized with *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, F: Treatment immunized with dual vaccine and *Bacillus subtilis*, G: Treatment immunized with microencapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, H: Immunized with microencapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, I: Treatment immunized with microencapsulated dual vaccine and *Bacillus subtilis*, Control: Control treatment.

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

شاخص‌های خونی: بررسی نتایج مربوط به مقایسه سطح پارامترهای خونی در سه مرحله نمونه‌گیری در جدول ۳ آورده شده است. بر این اساس، میزان هماتوکریت خون در روز ۳۰ نمونه‌گیری در تمام تیمارها به‌جز A و B، افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد (p<۰/۰۵). در روز ۶۰ نمونه‌گیری، افزایش معنی‌داری در تیمارهای F، G، H و I نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (p<۰/۰۵). در سطح هموگلوبین و در روز ۳۰ نمونه‌گیری علارغم افزایش نسبی اما تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد (p>۰/۰۵). امادر روز ۶۰ تحقیق، اختلاف معنی‌دار بین تمام تیمارها نسبت به کنترل مشاهده شد (p<۰/۰۵). بررسی‌ها نشان‌داد که در هر دو مرحله نمونه‌گیری روزهای ۳۰ و ۶۰، بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید مربوط به تیمارهای G (ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس)، H (ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) و I (ایمن‌شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) بوده که در تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری دیده نشد (p<۰/۰۵).

جدول ۳: مقایسه نتایج شاخص‌های خونی در سه مرحله نمونه‌گیری بین تیمارهای تحقیق

Table 3: Comparison of blood index results in three sampling stages between research treatments

Time	Treatments	Hematocrit	Hemoglobin	White blood cells ($10x^3$)
0 Day		25.6±0.75 ^{a}	6.2±0.34 ^{a}	15.07±1.56 ^{a}
30 Day	Control	25.6±0.57 ^{b}	5.4±0.23 ^{a}	14.48±1.01 ^{b}
	A	26.6±1.52 ^{b}	6.15±0.34 ^{a}	15.64±1.56 ^{b}
	B	62.3±1.52 ^{b}	7.3±0.81 ^{a}	15.27±1.47 ^{b}
	C	27.0±2.6 ^{ab}	7.6±1.79 ^{a}	15.86±1.1 ^{b}
	D	73.3±0.57 ^{ab}	8.46±1.34 ^{a}	16.64±1.89 ^{b}
	E	72.6±0.57 ^{ab}	7.43±0.83 ^{a}	16.32±1.02 ^{b}
	F	79.45±0.67 ^{ab}	7.62±0.9 ^{a}	17.21±1.03 ^{b}
	G	82.7±2.8 ^{a}	7.94±1.12 ^{a}	18.76±1.1 ^{a}
	H	83.6±1.8 ^{a}	8.02±1.58 ^{a}	18.57±2.1 ^{a}
	I	85.4±0.57 ^{a}	7.78±2.66 ^{a}	18.88±2.3 ^{a}
60 Day	Control	55.6±6.4 ^{b}	5.7±4.7 ^{a}	15.63±1.03 ^{b}
	A	67.8±8.7 ^{b}	7.4±1.09 ^{ab}	16.41±1.91 ^{b}
	B	63.3±6.6 ^{b}	7.64±0.73 ^{ab}	16.12±1.43 ^{b}
	C	74.0±3.4 ^{b}	8.44±3.8 ^{ab}	16.52±1.35 ^{b}
	D	75.6±6.4 ^{b}	8.26±1.19 ^{ab}	17.23±1.4 ^{b}
	E	77.3±2.8 ^{b}	7.65±0.91 ^{ab}	16.86±1.3 ^{b}
	F	80.5±8.3 ^{ab}	6.71±2.03 ^{ab}	17.67±1.8 ^{b}
	G	89.0±4.5 ^{a}	8.4±1.61 ^{ab}	19.55±1.9 ^{a}
	H	91.2±4.2 ^{a}	8.8±1.17 ^{ab}	19.31±1.3 ^{a}
	I	92.6±9.4 ^{a}	8.7±1.95 ^{ab}	21.86±2.54 ^{a}

تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵در هر ستون و مرحله نمونه‌گیری با حروف کوچک لاتین متفاوت مشخص شده است. A: تیمار ایمن شده با *S. iniae*، B: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae*، C: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه، D: تیمار ایمن شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابتیلیس، F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، H: ایمن شده با*S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، Control: تیمار شاهد

Significant differences at the 0.05 level in each column and sampling stage are indicated by different lowercase Latin letters. A: Treatment immunized with *S. iniae*, B: Treatment immunized with *S. agalactiae*, C: Treatment immunized with dual vaccine, D: Treatment immunized with *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, E: Treatment immunized with *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, F: Treatment immunized with dual vaccine and *Bacillus subtilis*, G: Treatment immunized with microencapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, H: Immunized with microencapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, I: Treatment immunized with dual microencapsulated vaccine and *Bacillus subtilis*, Control: Control treatment

شاخص‌های رشد: بررسی نتایج مربوط به شاخص‌های رشد در ماهیان این آزمایش در جدول ۴ آمده است. کم‌ترین نرخ ضریب تبدیل غذایی (FCR) در هر دو مرحله نمونه‌گیری مربوط به تیمار I (ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) بود که با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). ضریب رشدویژه(SGR) در روز ۳۰، تفاوت معنی‌داری در هیچ‌کدام از گروه‌ها نسبت به کنترل نشان نداد (p>۰/۰۵). اما در روز ۶۰ تحقیق، افزایش معنی‌داری در تیمارهای G، H و I نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (p<۰/۰۵). درصد افزایش وزن (WGP) در روز ۳۰، علی‌رغم افزایش نسبی در تمام گروه‌ها اما اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد (p>۰/۰۵). اما در روز ۶۰، افزایش معنی‌داری در تیمار I نسبت به کنترل مشاهده شد (p<۰/۰۵).

چالش باکتریایی: نتایج مربوط به چالش باکتریایی تمام تیمارهای مورد مطالعه با باکتری زنده استرپتوکوکوس آگالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیه در شکل ۷ آورده شده است. در روز ۶۰، تیمارهای تحقیق با غلظت ایجادکننده ۵۰٪ تلفات باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه (LD۵۰= ۱/۷× ۱۰^{۷} CFU/ml) و استرپتوکوکوس اینیه (LD۵۰= ۱/۳×۱۰^{۶} CFU/ml) به‌روش تزریق داخل صفاقی، چالش داده شدند.

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

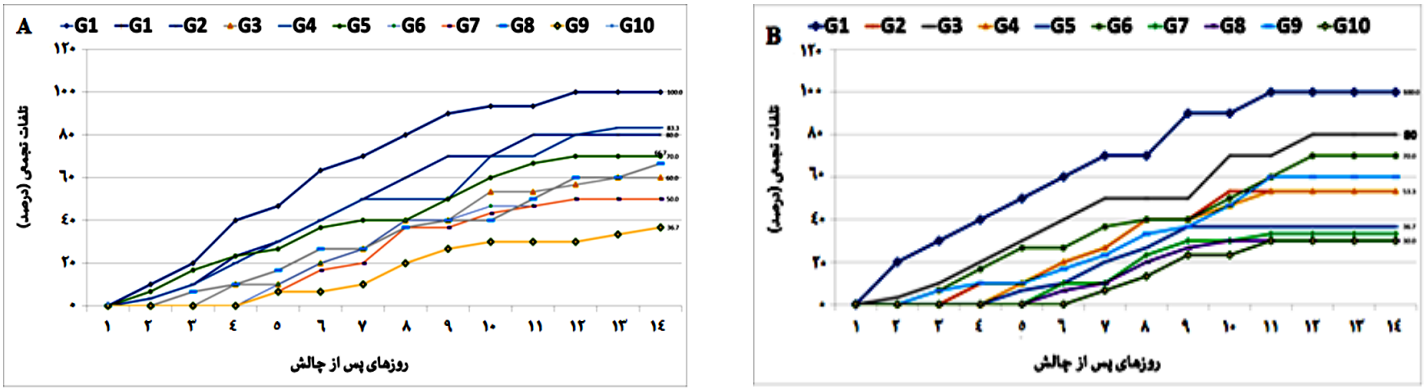
جدول ۴: مقایسه نتایج شاخص‌های رشد در روزهای ۳۰ و ۶۰ بین تیمارهای تحقیق

Table 4: Comparison of growth index results on days 30 and 60 between research treatments

Time	Treatments	Feed conversion ratio	Specific growth rate	Weight gain %
30 Day	Control	1.8±0.2 ^{b}	0.47±0.3 ^{a}	7.1±1.1 ^{ab}
	A	1.7±0.4 ^{b}	0.43±0.04 ^{a}	9.2±2.3 ^{ab}
	B	1.5±0.8 ^{b}	0.49±0.11 ^{a}	7.6±4.0 ^{ab}
	C	1.01±0.5 ^{ab}	0.43±0.07 ^{a}	8.3±2.4 ^{ab}
	D	1.36±0.37 ^{ab}	0.38±0.06 ^{a}	7.3±1.5 ^{ab}
	E	1.13±0.3 ^{ab}	0.42±0.12 ^{a}	7.1±1.5 ^{ab}
	F	1.28±0.4 ^{ab}	0.42±0.1 ^{a}	10.3±2.0 ^{ab}
	G	1.33±0.09 ^{b}	0.53±0.16 ^{a}	8.2±0.4 ^{ab}
	H	1.34±0.17 ^{ab}	0.54±0.36 ^{a}	8.5±5.2 ^{ab}
	I	0.89±0.1 ^{a}	0.56±0.27 ^{a}	12.5±1.8 ^{a}
60 Day	Control	1.68±0.09 ^{a}	0.58±0.02 ^{a}	12.1±6.2 ^{a}
	A	1.66±0.03 ^{a}	0.6±0.1 ^{a}	14.2±1.7 ^{a}
	B	1.53±0.06 ^{a}	0.5±0.1 ^{a}	16.2±2.7 ^{a}
	C	1.29±0.07 ^{ab}	0.34±0.08 ^{a}	14.5±2.3 ^{a}
	D	1.04±0.03 ^{b}	0.27±0.02 ^{a}	13.6±1.5 ^{a}
	E	1.25±0.08 ^{ab}	0.45±0.08 ^{a}	13.2±1.5 ^{a}
	F	1.13±0.04 ^{ab}	0.6±0.09 ^{a}	15.2±1.6 ^{a}
	G	1.2±0.09 ^{ab}	0.84±0.03 ^{b}	12.9±2.0 ^{a}
	H	1.1±0.03 ^{b}	0.83±0.3 ^{b}	12.8±7.8 ^{a}
	I	0.76±0.02 ^{b}	0.85±0.3 ^{b}	22.5±3.9 ^{ab}

تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون و مرحله نمونه‌گیری با حروف کوچک لاتین متفاوت مشخص شده است. A: تیمار ایمن شده با *S. iniae*، B: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae*، C: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه، D: تیمار ایمن شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابتیلیس، F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، H: ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، Control: تیمار شاهد

Significant differences at the 0.05 level in each column and sampling stage are indicated by different lowercase Latin letters. A: Treatment immunized with *S. iniae*, B: Treatment immunized with *S. agalactiae*, C: Treatment immunized with dual vaccine, D: Treatment immunized with *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, E: Treatment immunized with *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, F: Treatment immunized with dual vaccine and *Bacillus subtilis*, G: Treatment immunized with microencapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, H: Immunized with microencapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, I: Treatment immunized with dual microencapsulated vaccine and *Bacillus subtilis*, Control: Control treatment



شکل ۷: مقایسه روند تلفات بعد از چالش با باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه (A) و استرپتوکوکوس اینیه (B) بین تیمارهای تحقیق

G1: تیمار شاهد، G2: تیمار ایمن شده با *S. iniae*، G3: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae*، G4: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه، G5: تیمار ایمن شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، G6: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابتیلیس، G7: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، G8: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، G9: ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، G10: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس

Figure 7: Comparison of mortality trends after challenge with Streptococcus agalactiae (A) and Streptococcus inieae (B) between the study treatments

G1: Control treatment, G2: Immunized with *S. iniae*, G3: Immunized with *S. agalactiae*, G4: Immunized with dual vaccine, G5: Immunized with *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, G6: Immunized with *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, G7: Immunized with dual vaccine and *Bacillus subtilis*, G8: Immunized with microencapsulated *S. iniae* and *Bacillus subtilis*, G9: Immunized with microencapsulated *S. agalactiae* and *Bacillus subtilis*, G10: Immunized with dual microencapsulated vaccine and *Bacillus subtilis*

بررسی‌ها نشان‌داد که کم‌ترین میزان تلفات در چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس آگالاکتیه، مربوط به تیمارهای G9 (ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) و G10 (تیمار ایمن‌شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی‌شده و باسیلوس سابتیلیس)، هر دو با ۳۶/۷٪ بود که نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰٪) کاهش معنی‌داری را نشان دادند (p<۰/۰۵). در ادامه، مقایسه روند تلفات بعد از چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیه نشان‌داد که کم‌ترین میزان تلفات مربوط به تیمارهای G8 (تیمار ایمن‌شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) و G10 (تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس)، هردو با ۳۰٪ بود که نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰٪) کاهش معنی‌داری را نشان دادند (p<۰/۰۵).

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

بحث

تقویت سیستم ایمنی از طریق واکسیناسیون و به‌کارگیری ترکیبات محرک ایمنی نظیر پروبیوتیک‌ها که خاصیت ضدباکتریایی دارند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ تراپی و ترکیبات شیمیایی که پرهزینه و مقرون به‌صرفه اقتصادی نیستند از اهمیت بالایی برخوردار هستند. واکسیناسیون مناسب‌ترین گزینه برای کنترل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان است (۳۸). تعداد زیادی از مطالعات کاربردی نشان داده است که پروبیوتیک‌ها نه تنها توانایی جلوگیری از بیماری بلکه در بهبود پارامترهای پرورش، بازده خوراک و عملکرد رشد نیز مفید هستند (۲۶). در این مطالعه دیده شد که در تیمارهایی که به‌مدت ۶۰ روز از غذای حاوی پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس استفاده شده بود نسبت به گروه کنترل که فاقد این افزودنی بود از نظر فاکتورهای ایمنی و رشد دارای شاخص‌های بهتری بودند. Bagheri و همکاران، وضعیت رشد، میزان بقاء ماهی و جمعیت میکروبی روده نوزادان قزل‌آلای رنگین‌کمان را که رژیم غذایی آن‌ها حاوی پروبیوتیک تجاری *Bacillus spp* بود، بررسی کردند. در ارزیابی آن‌ها میزان جمعیت باکتریایی در روده تیمارهایی که از پروبیوتیک استفاده کرده بودند به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار کنترل (فاقد پروبیوتیک) به‌دست آمده بود (۳). هم‌چنین در مطالعه‌ایی تأثیر استفاده از سین بیوتیک با سطوح مختلف بتاگلوکان و مانان الیگوساکارید به‌همراه لاکتوباسیلوس کازئی بر فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور معمولی (*Ciprinus carpio*) بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد، سطوح مختلف ایمونوژن در ترکیب سین‌بیوتیک، قابلیت تأثیرگذاری بالایی بر افزایش کارایی دستگاه گوارش به لحاظ جایگزینی پروبیوتیکی و افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی دارد (۲۳). یکی از معایب واکسن های خوراکی، تغییر ماهیت واکسن در شرایط معده و روده ماهی قبل از جذب است. سیستم دارورسانی با استفاده از مواد پلیمری طبیعی قابل‌تجزیه مثل نانوذرات و میکروذرات کیتوزان و آلژینات اخیراً به‌عنوان روشی مناسب برای رساندن آنتی‌ژن واکسن به اندام هدف و افزایش ایمنی‌زایی و اثرات ادجوانی واکسن به‌کار رفته است (۲). در تحقیق جاری ریزپوشانی موفقیت‌آمیز باکترین دو گانه استرپتوکوکوس اگالاکتیه و اینیه با آلژینات و کیتوزان انجام شد که عکس های فاز کنتراست و میکروسکوپ الکترونی و اندازه گیری ذرات با دستگاه پارتیکل سایزر، تشکیل این ذرات را تایید نمود. از طرفی کارایی ریزپوشانی نیز با میزان ۸۷ درصد، کاملاً قابل قبول بود. تجویز موفق مواد بایو اکتیوو با استفاده از تکنیک ریزپوشانی با نانوذرات آلژینات در غذا گزارش شده است (۲۲). آن ها اشاره کردند پوشش دهی آلژینات با یک ماده دیگر که مانع باز شدن آلژینات و خارج شدن باکتری واکسنی شود، ضروری است که در تحقیق جاری ما از پوشش مضاعف کیتوزان برای جلوگیری از این مشکل استفاده کردیم. علاوه بر مرور واکسن‌های تهیه شده با آلژینات و کیتوزان، به ایمن‌سازی خوراکی موش با آلبومین گاوی پرداختند و حفظ آنتی‌ژن تا انتهای روده را گزارش کردند. آن‌ها کارایی ریزپوشانی آنتی‌ژن را ۶۰ درصد و پتانسیل زتا را ۴۵/۲ میلی‌ولت گزارش نمودند. هم‌چنین آن‌ها اندازه ذرات حدود ۱۰۰۰ نانومتر (یک میکرومتر) را برای واکسن‌های خوراکی گزارش کردند. در تحقیق جاری نیز پتانسیل حدد ۴۴ میلی ولت و کارایی ریزپوشانی ۸۷ درصد گزارش شد که بازده و کارایی بهتری نسبت به تحقیق آن‌هاست. در ادامه، اثر مثبت پروبیوتیک و ریزپوشانی باکترین مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی شامل احیای NBT، فعالیت لایزوزیم سرم، میزان آلبومین و گلوبولین سرم، به‌واسطه استفاده از باکترین ریزپوشانی شده به همراه پروبیوتیک در تیمارهای ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس و تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش فعالیت نشان دادند ($p<۰/۰۵$). در تحقیقی مشابه، اولیگونوکلئید را با نانوذرات صنعتی PLGA ریزپوشانی کرده و ماهی کپور معمولی را با آن به‌صورت خوراکی واکسینه نمودند. آن‌ها فعالیت بیش‌تر میلو پراکسیداز و لایزوزیم سرم در تیمار ریزپوشانی شده نسبت به سایر تیمارها را گزارش کردند (۳۶). میزان پروتئین و گلوبولین یکی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم است که تحت تأثیر پاسخ ایمنی ماهی قرار می‌گیرد (۷). در این مطالعه، بیش‌ترین میزان پروتئین و گلوبولین در تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس مشاهده گردید. در تحقیقی مشابه، افزایش میزان گلوبولین سرم را در ماهی به دنبال واکسیناسیون با واکسن ریزپوشانی شده آئروموناس هیدروفیلا گزارش کردند، هر چند این افزایش همراه با افزایش محافظت عملی واکسن نبود (۴). این افزایش می‌تواند در اثر افزایش پروتئین‌های ایمنی غیراختصاصی هم چون پپتیدهای ضد میکروبی، پروتئین‌های کمپلمان، لیزوزیم، پروتئازها و آنتی‌بادی‌های طبیعی باشد (۱۳). نتایج این تحقیق نشان داد که بیش‌ترین فعالیت احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) که شاخصی برای نشان‌دادن فعالیت بیگانه‌خواری لکوسیت‌های ماهی است، هم در روز ۳۰ و هم در روز ۶۰ در تیمار واکسن خوارکی دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس مشاهده گردید که به‌طور معنی داری نسبت به کنترل افزایش نشان داد. این موضوع، نشان‌دهنده بهبود ایمنی ذاتی ماهی واکسینه شده به این روش است. از احیای NBT در ارزیابی مواد حد واسط تولید شده در مراحل بیگانه‌خواری و انفجار تنفسی در سلول‌های

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

بیگانه‌خوار استفاده می‌شود (۵). در این تحقیق افزایش احیای NBT می‌تواند به‌دلیل افزایش تعداد و فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار سیستم دفاعی ماهی باشد. این افزایش بیگانه‌خواری یا به‌دلیل اثرات اپسونین لیپوپلی‌ساکارید، پروتئین‌های ایمنی، به‌ویژه پپتیدهای ضدمیکروبی، اجزای کمپلمان و نیز پادتن‌ها ایجاد شده و یا به‌دلیل تأثیر بر روند بیگانه‌خواری و تحریک فرایند کشتن داخل سلولی وابسته به اکسیژن در سلول‌های بیگانه‌خوار است؛ که نتیجه آن افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در لکوسیت‌ها و نهایتاً احیای بیش‌تر نیتروبلوتترازولیوم و افزایش جذب نوری بوده است. در ادامه، فعالیت کمپلمان سرم، تحت تاثیر ایمن سازی با تیمارهای مختلف قرار گرفت و در روز ۳۰ نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری مشاهده نشد. اما آنالیز آماری بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی، افزایش معنی‌داری را بین تیمارهای ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، و تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس با گروه کنترل نشان داد. به‌نظر می‌رسد این شاخص ایمنی غیراختصاصی با میزان بالاتر آنتی‌ژن و یا مدت طولانی‌تر مجاورت با آنتی‌ژن بهبود فعالیت را نشان می‌دهد. در تحقیق جاری عیار آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی، در تیمارهای ایمن‌شده با *S. iniae* و باسیلوس سابتیلیس، ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابتیلیس، ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس و تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، افزایش معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($p<0/05$). در تیمارهای بدون ریزپوشانی علی‌رغم افزایش نسبی عیار آنتی‌بادی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p>0/05$). در تحقیقی مشابه، افزایش عیار آنتی‌بادی در ماهی قزل آلای ایمن شده به‌روش خوراکی با استرپتوکوکوس اینیه ریزپوشانی شده با آلژینات و کیتوزان گزارش شده است. آن‌ها بهبود کارایی واکسن خوراکی با استفاده از این روش را تا ۷۰ درصد گزارش نمودند (۱۲). در تحقیق دیگری، افزایش عیار آنتی بادی ضداسترپتوکوکوس آگالاکتیه در ماهی تیلاپیای قرمز بعد از واکسیناسیون تزریقی علیه این باکتری گزارش شده است (۱۵). ولی در مورد تاثیر واکسن خوراکی محافظت شده بر عیار آنتی بادی گزارشات نسبتاً کم و محدود است. در این پژوهش، عیار آنتی بادی ضداسترپتوکوکوس آگالاکتیه بعد از واکسیناسیون خوراکی در سه مرحله نمونه گیری اندازه گیری شد که میزان آنتی بادی در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی و در تیمارهای ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس و تیمار ایمن‌شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p<0/05$). در توجیه افزایش عیار پادتن به‌دنبال ایمن سازی به‌روش خوراکی، می‌توان به نقش ایمنی مخاطی در آبزیان اشاره نمود. بافت لنفاوی مرتبط با دستگاه گوارش در ماهیان استخوانی ساختار تخصص‌یافته‌ای مانند غدد لنفاوی ندارند ولی سلول‌های ایمنی مخاطی از جمله ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها در بافت پوششی پراکنده شده‌اند و زیر مخاط نقش مهمی در سیستم دفاعی سطح مخاطی دستگاه گوارش ایفا می‌کند. لنفوسیت‌های درون بافت پوششی به عنوان بخشی از بافت لنفاوی دستگاه گوارش نقش قابل‌توجهی در برابر آنتی‌ژن‌های خارجی درون لومن دارند (۱۹). نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز واکسن خوراکی استرپتوکوکوس اگلالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیه ریزپوشانی شده با ریزذرات آلژینات /کیتوزان به همراه پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس در ماهی تیلاپیا بهبود معنی‌دار کارایی واکسن را باعث شده است، به‌طوری که در چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس آگالاکتیه، تیمارهای ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس و تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، هردو با تلفات جمعی ۳۶/۷٪ و در چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیه، تیمارهای ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس و تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس هردو با ۳۰٪ نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰٪) کاهش معنی داری را نشان دادند ($p<0/05$). تحقیقات پیشین نشان داده است که استفاده از واکسن دوگانه استرپتوکوکوس اینیه و اگالاکتیه در ماهی تیلاپیا منجر به ایمنی متقاطع بین این دو باکتری شده است (۳۴). به‌نظر می رسد یافته مهم تحقیق جاری محافظت قابل قبول ایمنی حدود ۷۰٪ در تیمارهای ایمن‌شده به‌روش خوراکی با واکسن ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس است. در مطالعه‌ای، مقایسه تأثیر باکتری‌های دارای توان پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پنتوسوس و لاکتوباسیلوس پلنتاروم بر میزان رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) صورت گرفت و ماهی‌هایی که در رژیم غذایی خود دارای پروبیوتیک بودند، افزایش معنی‌داری از نظر میزان رشد ویژه، میزان کارآیی پروتئین و درصد افزایش وزن نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۲۷). در تحقیق جاری بهبود شاخص‌های رشد تحت تاثیر واکسیناسیون ماهی تیلاپیا با انواع مختلف واکسن ریزپوشانی و بدون ریزپوشانی شده، قرار گرفتند و تمام شاخص‌های رشد مورد ارزیابی در تیمار واکسینه با واکسن خوراکی ریزپوشانی شده با آلژینات /کیتوزان همراه با پروبوتیک باسیلوس سابتیلیس به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بهبود یافته بود. هم‌چنین، در بین شاخص‌های خونی، میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های سفید، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحقیق

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]
[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

نسبت به کنترل در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده شد (p<۰/۰۵). از آن جا که افزایش ایمنی تحت تاثیر تعداد و فعالیت گلبول‌های سفید خونی می‌باشد، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی احتمالاً یکی از عوامل بهبود بازماندگی بعد از چالش باکتریایی و بهبود شاخص‌های خونی مثل لایزوزیم و پپتیدهای آنتی باکتریال است. در این پژوهش، مقایسه شمارش تعداد گلبول‌های سفید خونی بین تیمارهای تحقیق نشان داد که بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید خونی در هر دو مرحله نمونه‌گیری روزهای ۳۰ و ۶۰، مربوط به تیمارهای ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس و تیمار ایمن‌شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس بوده که در تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری دیده نشد (p<۰/۰۵). در مطالعات متعددی بهبود شاخص‌های خونی به‌دنبال ایمن‌سازی ماهی و تجویز محرک‌های ایمنی گزارش شده است (۸). در این پژوهش، اثر مثبت پروبیوتیک و ریزپوشانی باکتری بر تجویز واکسن‌های خوراکی گروه‌های G (ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس)، H (ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) و I (ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) مشاهده شد و در گروه I، یک ایمنی زایی متقاطع ۷۰٪ در چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیه و ایمنی‌زایی ۶۳/۳٪ را در چاش با باکتری زنده استرپتوکوکوس آگالاکتیه در طول ۱۴ روز مراقبت ایجاد کرد که با انجام مطالعات تکمیلی می‌توان از این روش برای ایمن‌سازی ماهی تیلاپیا به‌عنوان جایگزین روش تزریقی استفاده کرد.

منابع

1. **Akter, T., Ehsan, R., Paul, S.I., Ador, M.A.A., Rahman, A., Haque, N., Islam, T. and Rahman, M., 2022.** Development of formalin killed vaccine candidate against streptococcosis caused by *Enterococcus* sp. in Nile tilapia. *Aquaculture Reports*. 27(1): 101371. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101371
2. **Akagi, T., Baba, M. and Akashi, M., 2011.** Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Polymers in Nanomedicine*. 247(1): 31-64. doi: 10.1007/12_2011_150
3. **Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M. and Farzanfa, A., 2008.** Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 8(1): 43-48.
4. **Behera, T. and Swain, P., 2012.** Antigen adsorbed surface modified poly-ε-caprolactone microspheres stimulates both adaptive and innate immune response in fish. *Vaccine*. 30(35): 5278-5284. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.028
5. **Baulny, M.O.D., Quentell, C., Fournierl, V., Amour, F. and Le gouvello, R., 1996.** Effect of long-term oral administration of β-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Disease of Aquatic Organisms*. 26(2): 139-147. doi: 10.3354/dao026139
6. **De Souza, R.D., Batista, M.T., Luiz, W.B., Cavalcante, R.C.M., Amorim, J.H. and Bizerra, R.S.P., 2014.** Bacillus subtilis spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One*. 9(1): 87-100. doi: 10.1371/journal.pone.0087454
7. **Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assay. New Jersey: SOS Publication.
8. **Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K. and Jani Khalili, K., 2011.** Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*. 37(1): 833-842. doi: 10.1007/s10695.011-9481-4
9. **Gu, D.E., Yu, F.D., Yang, Y.X., Xu, M., Wei, H., Luo, D. and Hu, Y.C., 2019.** Tilapia fisheries in Guangdong Province, China: Socio-economic benefits, and threats on native ecosystems and economics. *Fisheries Management and Ecology*. 26(2): 97-107. doi:10.1111/fme.12330
10. **Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S.H., Molayemraftar, T., Raeeszadeh, M. and Doan, H.V., 2023.** Pot Marigold (*Calendula officinalis*) Powder in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Feed: Effects on Growth, Immunity, and Yersinia ruckeri Resistance. *Aquaculture Nutrition*. 23(4): 1-13. doi: 10.1155/2023/7785722
11. **Giri, S.S., Kim, S.G., Kang, J.W., Kim, S.W., Kwon, J., Lee, S.B., Jung, W. and Park, S.C., 2021.** Applications of carbon nanotubes and polymeric micro-/nanoparticles in fish vaccine delivery: progress and future perspectives. *Reviews in Aquaculture*. 13(4): 1844-1863. doi:10.1111/raq.12547
12. **Halimi, M., Alishahi, M., Abbaspour, M.R., Ghorbanpoor, M. and Tabandeh, M.R., 2020.** High efficacy and economical procedure of oral vaccination against *Lactococcus garvieae*/*Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & shellfish immunology. 99(1): 505-513. doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.033
13. **Harikrishnan, R., Kim, J.S., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011.** Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture*. 326(1): 46-52. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.034
14. **Kumar, S.R., Ahmed, V.I., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Babu, V.S. and Hameed, A.S., 2008.** Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*. 25(1): 47-56. doi: 10.1016/j.fsi.2007.12.004
15. **Ke, X., Liu, Z., Chen, S., Chen, Z., Zhang, D., GAO, F. and Lu, M., 2021.** The immune efficacy of a *Streptococcus agalactiae* immersion vaccine for different sizes of young tilapia. *Aquaculture*. 534(15): 62-73. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736289
16. **Liu, G., Zhu, J., Chen, K., Gao, T., Yao, H., Liu, Y. and Lu, C., 2016.** Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. *Diseases of aquatic organisms*. 122(2): 163-170. doi: 10.3354/dao03084

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]
[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]

Agropecu Bras. 29(11): 874-880. doi:10.1590/S0100-736X2009001100002

29. **Shefat, S.H.T., 2018.** Vaccines for use in finfish aquaculture. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 2(11): 15-19.

30. **Soltani, M., Lymbery, A., Song, S.K. and Shekarabi, S.P.H., 2019.** Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines. *Reviews in Aquaculture*. 11(4): 1325-1341. doi:10.1111/raq.12295

31. **Song, M., Hong, H.A., Huang, J.M., Colenutt, C. and Khang, D.D., 2012.** Killed Bacillus subtilis spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine*. 30(1): 3266-3277. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.016

32. **Selvaraj, V., Sampath, K. and Sekar, V., 2006.** Adjuvant and immunostimulatory effects of b-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhance survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol.* 114(1): 15-24. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.06.011

33. **Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Cañavate, J.P. and Manchado, M., 2010.** Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology*. 28(2): 296-302. doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.006

34. **Wang, Q., Fu, T., Li, X., Luo, Q., Huang, J., Sun, Y. and Wang, X., 2019.** Cross-immunity in Nile tilapia vaccinated with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* vaccines. *Fish & Shellfish Immunology*. 97(1): 382-389. doi: 10.1016/j.fsi.2019.12.021

35. **Yao, Y.Y., Chen, D.D., Cui, Z.W., Zhang, X.Y., Zhou, Y.Y., Guo, X. and Zhang, Y.A., 2019.** Oral vaccination of tilapia against *Streptococcus agalactiae* using Bacillus subtilis spores expressing Sip. *Fish & shellfish immunology*. 86(1): 999-1008. doi: 10.1016/j.fsi.2018.12.060

36. **Yogeshwari, G., Jagruthi, C. and Ramasamy, J., 2015.** Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA)-encapsulated CpG-oligonucleotide (ODN) on immune response in *Cyprinus carpio* against Aeromonas hydrophila. *Journal of Aquaculture Research and Development*. 6(1): 327-337. doi: 10.4172/2155-9546.1000327

37. **Zhang, Z., Niu, J., Li, Q., Huang, Y., Jiang, B., Wu, Y., Huang, Y. and Jian, J., 2021.** HMG20A from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) involved in the immune response to bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 119(1): 499-507. doi: 10.1016/j.fsi.2021.10.032

38. **Zamri-Saad, M., Amal, M.N.A., Siti-Zahrah. A. and Zulkafli, A.R., 2014.** Control and prevention of streptococcosis in cultured tilapia in Malaysia: a review. *Pertanika J Trop Agric Sci*. 37(2): 389-410.

17. **Laith, A.A., Ambak, M.A., Hassan, M., Sheriff, S.M., Nadirah, M. and Draman, A.S., 2017.** Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet World*. 10(1): 101-111. doi: 10.14202/vetworld.2017.101-111

18. **Lee, J.E., Kye, Y.C., Park, S.M., Shim, B.S., Yoo, S., Hwang, E. and Yun, C.H., 2020.** *Bacillus subtilis* spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens. *Veterinary research*. 51(1): 68. doi: 10.1186/s13567-020-00788-8

19. **Lazado, C.C. and Caipang, C.M.A., 2014.** Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 39(1): 78-89. doi: 10.1016/j.fsi.2014.04.015

20. **Mishra, A., Nam, G.H., Gim, J.A., Lee, H.E., Jo, A. and Kim, H.S., 2018.** Current challenges of Streptococcus infection and effective molecular, cellular, and environmental control methods in aquaculture. *Molecules and cells*. 41(6): 495-505. doi: 10.14348/molcells.2018.2154

21. **Munang'andu, H.M. and Evensen, Y., 2019.** Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish and shellfish immunology*. 85(1): 132-140. doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.060

22. **Masoomi Dezfooli, S., Gutierrez-Maddox, N., Alfaro, A. and Seyfoddin, A., 2018.** Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 11(3): 631-660. doi: 10.1111/raq.12250

23. **Nasipour, M., Mohammadian, T., Tabandeh, M.R. and Mesbah, M., 2019.** Effects of Synbiotic with different level of βglocan and mananoligosaccharide with *Lactobacillus casei* on some gustrointestinal enzymes activity of *Cyprinus carpio*. *Journal of Animal Environment*. 8(4): 179-188. doi: 20.1001.1.27171388.1395.8.4.24.9 (In Persian)

24. **Piamsomboon, P., Srisuwatanasagul, S., Kongsonthana, K. and Wongtavatchai, J., 2021.** *Streptococcus agalactiae* infection caused spinal deformity in juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Fish Diseases*. 45(4): 603-606. doi: 10.1111/jfd.13568

25. **Plant, K.P., LaPatra, S.E. and Cain, K.D., 2009.** Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. *Journal of fish diseases*. 32(6): 521-534. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01008.x

26. **Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S. and Sadayappan, B., 2013.** Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*. 5(1): 55-59. doi: 10.1016/j.dit.2013.03.003

27. **Ranjbar, A., Masbah, M., Tabandeh, M.R., Mohammadian, T., Gharibi, D. and Alishahi, M., 2019.** Comparative effects of probiotic bacteria, Lactobacillus pentosus and *Lactobacillus plantarum*, on growth factors and digestive enzymes activities in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Journal of Animal Environment*. 10(3): 175-184. doi: 20.1001.1.27171388.1397.10.3.23.0 (In Persian)

28. **Silva, B.C., Martins, M.L., Jatob, A., Neto, C.B., Vieira, F.N. and Mourio, L.P., 2009.** Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes, Pesqui.

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-11-16]

[DOI: 10.22034/aer.2.2.31]