University of Tehran

Journal of Fisheries

Home Page: https://jfisheries.ut.ac.ir

Online ISSN: 2423-7809

Protection of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio alginolyticus* and *Streptococcus iniae* with killed divalent vaccine

Mina Ahangarzadeh[1] | Hossein Houshmand[2] ✉ | Seyed Mohammad Jalil Zorriehzahra[3] | Issa Sharifpour[4] | Mansour Torfi Mozanzadeh[5] | Samira Nazemroaya[6] | Lefteh Mohseninejad[7] | Abdul Rahim Oosooli[8] | Shapoor Mehrjooyan[9] | Seyed Reza Seyed Mortezaei[10]

1. South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran. Email: minaahangarzadeh@gmail.com
2. Corresponding author, South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran. Email: houshmand.hossein@gmail.com
3. Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran. Email: zorrieh@yahoo.com
4. Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran. Email: isharifpour@yahoo.com
5. South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran. Email: mansour.torfi@gmail.com
6. South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran. Email: samira.nazemroaya@gmail.com
7. South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran. Email: lmohseninejad@yahoo.com
8. South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran. Email: rahimoosooli@gmail.com
9. South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran. Email: shapoorkahkesh@yahoo.com
10. Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran. Email: rmortezaei@yahoo.com

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 02 August 2024
Revised: 10 November 2024
Accepted: 19 January 2025
Published online: 25 March 2025

Keywords:
Antibody titer,
Asian seabass,
Killed divalent vaccine,
Non-specific immune response,
Survival rate.

ABSTRACT

This study was aimed to develop and evaluate a killed divalent vaccine against *Vibrio alginolyticus* and *Streptococcus iniae*, delivered by intraperitoneal injection in Asian seabass. The fish were divided into three groups with 60 fish in triplicate: I) a control group injected with phosphate-buffered saline (PBS), II) a group vaccinated by divalent vaccine (V. alginolyticus + S. iniae) and III) a group vaccinated with the same divalent vaccine plus an oral booster. Immunological parameters and antibody titer were measured before and at three, five-, and eight-week post-vaccination. The efficacy of the killed vaccine was assessed five weeks post-vaccination by challenging with each isolate separately as well. The vaccinated groups had higher survival rate than control group. The highest relative percentage survival rate, 73.91 and 73.07 ± 3.84% which was observed in group III after challenging with *S. iniae* and *V. alginolyticus*, respectively ($P < 0.05$). The vaccinated fish produced significantly higher antibody titers against these two isolates than the control group ($P < 0.05$). In the vaccinated groups non-specific immune parameters significantly enhanced, especially in group III, after vaccination, within five weeks was evident in comparison to the control. The results demonstrated that the administration of a killed divalent vaccine can effectively protect Asian seabass against *V. alginolyticus*, and *S. iniae*.

Cite this article: Ahangarzadeh, M., Houshmand, H., Jalil Zorriehzahra, M., Sharifpour, I., Torfi Mozanzadeh, M., Nazemroaya, S., Mohseninejad, L., Oosooli, A.R., Mehrjooyan, Sh., Seyed Mortezaei, S.R. (2025). Protection of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio alginolyticus* and *Streptococcus iniae* with killed divalent vaccine. *Journal of Fisheries*, 78 (1), 27-42. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2025.379378.1436

© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2025.379378.1436

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
سایت نشریه: https://jfisheries.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۷۸۰۹-۲۴۲۳
دانشگاه تهران

محافظت ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) برعلیه ویبریو آلجینولیتیکوس و استرپتوکوکوس اینیایی با واکسن کشتهٔ دو ظرفیتی

مینا آهنگرزاده[۱] | حسین هوشمند[۲*] | سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا[۳] | عیسی شریف‌پور[۴] | منصور طرفی موزان‌زاده[۵] | سمیرا ناظم رعایا[۶] | لفته محسنی‌نژاد[۷] | عبدالرحیم اصولی[۸] | شاپور مهرجویان[۹] | سیدرضا سید مرتضایی[۱۰]

۱. پژوهشکدهٔ آبزی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: minaahangarzadeh@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، پژوهشکدهٔ آبزی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: houshmand.hossein@gmail.com
۳. مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: zorrieh@yahoo.com
۴. مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: isharifpour@yahoo.com
۵. پژوهشکدهٔ آبزی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: mansour.torfi@gmail.com
۶. پژوهشکدهٔ آبزی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: samira.nazemroaya@gmail.com
۷. پژوهشکدهٔ آبزی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: lmohseninejad@yahoo.com
۸. پژوهشکدهٔ آبزی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: rahimoosooli@gmail.com
۹. پژوهشکدهٔ آبزی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: shapoorkahkesh@yahoo.com
۱۰. مؤسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: rmortezaei@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۳۰
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۱/۰۵

کلیدواژه:
ایمنی غیر اختصاصی،
باس دریایی آسیایی،
تیتر آنتی‌بادی،
میزان محافظت،
واکسن کشتهٔ دو ظرفیتی.

چکیده

این مطالعه با هدف توسعه و ارزیابی واکسن دو ظرفیتی کشته‌شده علیه *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* به‌صورت تزریق داخل صفاقی در ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) انجام گردید. ماهی‌ها به سه گروه ۶۰ تایی در سه تکرار تقسیم شدند: گروه شاهد تزریق شده با نمک بافر فسفات (PBS)، گروه دوم واکسینه‌شده با واکسن دو ظرفیتی (*Vibrio alginolyticus* + *Streptococcus iniae*) و گروه سوم با واکسن دو ظرفیتی به اضافه یک بوستر خوراکی واکسینه شدند. شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی و تیتر آنتی‌بادی قبل و سه، پنج و هشت هفته پس از واکسیناسیون اندازه‌گیری شد. همچنین اثربخشی واکسن کشته‌شده پنج هفته پس از واکسیناسیون با چالش با هر جدایه به‌طور جداگانه ارزیابی شد. گروه‌های واکسینه‌شده نسبت به گروه کنترل میزان بقای بالاتری داشتند. بالاترین درصد نسبی بقا، ۷۳/۹۱ و ۳/۸۴±۷۳/۰۷ درصد بود که در گروه سه به ترتیب بعد از چالش با *S. iniae* و *V. alginolyticus* مشاهده شد ($P<0.05$). ماهی‌های واکسینه شده به‌طور قابل توجهی تیتر آنتی‌بادی بالاتری علیه این دو جدایه، نسبت به گروه کنترل تولید کردند ($P<0.05$). شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در گروه‌های واکسینه شده به‌ویژه گروه سه در هفتهٔ پنجم بعد از واکسیناسیون نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج نشان داد که تجویز یک واکسن دو ظرفیتی کشته‌شده می‌تواند به‌طور مؤثری از ماهی باس آسیایی در برابر *V. alginolyticus* و *S. iniae* محافظت کند.

استناد: آهنگرزاده؛ مینا، هوشمند؛ حسین، جلیل ذریه زهرا؛ سید محمد ابراهیم، شریف‌پور؛ عیسی، طرفی موزان‌زاده؛ منصور، ناظم رعایا؛ سمیرا، محسنی‌نژاد؛ لفته، اصولی؛ عبدالرحیم، مهرجویان؛ شاپور، سید مرتضایی؛ سیدرضا (۱۴۰۴). محافظت ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) برعلیه ویبریو آلجینولیتیکوس و استرپتوکوکوس اینیایی با واکسن کشتهٔ دو ظرفیتی. *نشریهٔ شیلات، مجله منابع طبیعی ایران*، ۷۸ (۱)، ۴۲-۲۷. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2025.379378.1436

© نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2025.379378.1436

۱. مقدمه

میزان تولید جهانی آبزیان در سال ۲۰۱۸ به ۱۷۹ میلیون تن به ارزش ۴۰۱ میلیارد دلار رسید که در این میان آبزی‌پروری در دریا و آب‌های ساحلی با تولید ۳۰/۸ میلیون تن آبزی به ارزش ۱۰۶/۵ میلیارد دلار نسبت به سایر بخش‌های آبزی‌پروری رشد سریعی داشت. در حال حاضر آبزی‌پروری دریایی تقریباً یک سوم کل تولیدات آبزی‌پروری را در دنیا شامل می‌شود و با توجه به ثابت ماندن میزان صید جهانی آبزیان، این صنعت توجه زیادی را در تأمین پروتئین باکیفیت به‌خود جلب نموده است (FAO, 2020). گزارش‌های فراوان، از بروز بیماری‌ها خصوصاً بیماری‌های باکتریایی و تلفات ناشی از آنها و در نتیجه خسارت اقتصادی در آبزی‌پروری ماهیان دریایی، نشان می‌دهد که بیماری‌ها به‌عنوان چالش بزرگ پیش روی این توسعه خواهند بود (Woo and Gregory, 2014). سپتی‌سمی باکتریایی در ماهیان دریایی، بیشتر توسط ویبریوها ایجاد می‌شود. این باکتری‌ها فرصت‌طلب اند و در شرایط استرس‌زا، بیماری‌زا می‌شوند. براساس سوابق موجود بیش از ۵۰ گونه ماهی دریایی به عفونت ناشی از گونه‌های مختلف ویبریو حساسند (Woo and Gregory, 2014; Buller, 2014). بیماری ایجاد شده به‌وسیلهٔ این باکتری‌ها ویبریوز نامیده می‌شود که باعث تلفات و ضرر اقتصادی زیادی در سیستم آبزی‌پروری دریایی می‌شود (Chin *et al.*, 2020). هشت گونهٔ مهم از جنس ویبریو و در خانواده ویبریوناسه، به‌عنوان عامل بیماری و تأثیرگذار بر صنعت پرورش ماهی دریایی در آب‌های معتدل و گرم معرفی شده که یکی از این گونه‌ها، *ویبریو آلجینولیتیکوس* (*V. alginolyticus*) است (Bellos *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018). موارد بیماری ویبریوز ناشی از این باکتری، در ماهیان دریایی، اولین بار در کشورهای مدیترانه‌ای در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) و باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) گزارش شد و بعداً موارد ویبریوز و تلفات ناشی از *ویبریو آلجینولیتیکوس* از کشورهای آسیایی نیز گزارش گردید که به‌طورکلی این تلفات به‌دنبال عفونت گوارشی و آب آوردگی شکم رخ می‌دهد (Rameshkumar *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). یکی دیگر از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی که بیش از دو دهه، موجب بروز خسارات اقتصادی فراوان در مسیر صنعت آبزی‌پروری شده است عفونت‌های استرپتوکوکوسی است. ماهیان پرورشی مانند باس آسیایی در برابر هر دو بیماری ناشی از ویبریوزیس و استرپتوکوکوزیس آسیب‌پذیر ند (Lin *et al.*, 2017). در میان بیماری‌های استرپتوکوکی، *استرپتوکوکوس اینیایی* (*Streptococcus iniae*) یکی از جدی‌ترین پاتوژن‌های ماهیان وحشی و پرورشی دریایی و آب‌های شیرین در همهٔ مناطق معتدل است که باعث مرگ‌ومیر گسترده در آبزی‌پروری می‌شود (Van Khang *et al.*, 2019). این باکتری گرم مثبت که حداقل ۲۷ گونه ماهی را آلوده می‌کند، می‌تواند سالانه بین ۸ تا ۱۵ درصد کاهش تولید در ماهی باس دریایی آسیایی ایجاد کند، که در همه‌گیری‌های شدید، این رقم می‌تواند تا ۷۰ درصد افزایش یابد (Shoemaker *et al.*, 2017). از طرفی عفونت‌های چندگانه حاوی چند گونه باکتری که اغلب در شرایط مزرعه مشاهده می‌شود، در مقایسه با یک عامل عفونی منفرد، ضرر بسیار بیشتری ایجاد می‌کنند (Ismail *et al.*, 2017; Pasaribu *et al.*, 2018). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها که به‌طورگسترده برای درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی، از جمله استرپتوکوکوزیس و ویبریوزیس، در فعالیت‌های آبزی‌پروری استفاده می‌شوند (Cao *et al.*, 2018; Bahnasawy *et al.*, 2019) اثرات منفی زیادی مانند باقیماندهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت دارویی، تجمع زیستی، اثرات سمی روی اکوسیستم‌های آبی و جهش گونه‌های باکتری برای زنده ماندن در شرایط جدید را به‌دنبال دارد (Cao *et al.*, 2018; Mohamad *et al.*, 2021). در این راستا و به‌منظور کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها به‌عنوان یک اقدام پیشگیرانه و جایگزینی مطلوب در آبزی‌پروری مدرن بسیار مؤثر ند (Toranzo *et al.*, 2009). البته واکسیناسیون موفقیت‌آمیز هم مستلزم تولید محصولات مؤثر و هم استفاده صحیح از آنهاست (Torres-Corral *et al.*, 2021). در سال‌های اخیر، بیشتر برنامه‌های توسعهٔ واکسن روی محصولات چندظرفیتی به‌همراه ادجوانت‌ها[1] به‌عنوان ابزارهای مهمی برای افزایش قدرت واکسن متمرکز شده‌اند (Bao *et al.*, 2019). واکسن ویبریوزیس نمایندهٔ یکی از موفق‌ترین روش‌ها در پیش‌گیری از بیماری‌ها در آبزی‌پروری مدرن محسوب می‌شود (Gudding and Van Muiswinkel, 2013). اولین تلاش‌ها برای تولید واکسن در برابر ویبریوزیس ماهی به سال ۱۹۹۱ برمی‌گردد و اولین فرمولاسیون واکسن برای *لیستونلا آنگوئیلاروم* در سال ۱۹۹۸ تهیه شد (Miccoli *et al.*, 2019). واکسن‌های مورد استفاده برای ویبریوزیس، بیشتر به‌صورت سلول کامل کشته هستند

[1] Adjuvant

(Angosto *et al.*, 2018). Cao و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که در شرایط آزمایشگاهی، واکسن‌های *ویبریو آلجینولیتیکوس* عمدتاً شامل واکسن‌های کشته‌شده با فرمالدئید هستند. امروزه مطالعات متعددی در مورد واکسیناسیون ماهی گزارش شده است از جمله واکسن پلی‌والان غیرفعال شده با فرمالین شامل *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، که می‌تواند میزان محافظتی معادل ۹۱/۷ درصد و ۷۵ درصد را بعد از چالش با باکتری‌های بیماری‌زا در ماهی سیم دریایی ایجاد نماید (Aly *et al.*, 2021). همچنین در مطالعهٔ Nehlah و همکاران (۲۰۱۷) مشخص گردید که واکسن نوترکیب *ویبریو آلجینولیتیکوس*، درصد بقای ۱۰۰ درصدی را بعد از عفونت تجربی با این باکتری در هیبرید هامور (*Epinephelus fuscoguttatus* ×*Epinephelus Lanceolatus*) نشان می‌دهد. واکسن پلی‌والان کشتهٔ خوراکی نیز بر علیه ویبریوزیس، استرپتوکوکوزیس و سپتی‌سمی آئروموناسی در ماهی باس دریایی آسیایی توسط Mohammad و همکاران (۲۰۲۱) تهیه شد. همچنین Spinos و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که واکسن دی‌والان به روش تزریقی می‌تواند از بیماری فوتوباکتریوزیس و ویبریوزیس در ماهی باس دریایی آسیایی پیشگیری کند. در سال‌های اخیر شیوع بالایی از بیماری‌های ناشی از عوامل باکتریایی مانند گونه‌های مختلف از جنس ویبریو و *استرپتوکوکوس اینیایی* در ماهی باس دریایی آسیایی در ایران ثبت شده است که نیاز به ساخت واکسن‌های کارآمد بومی را آشکارتر می‌کند (Houshmand *et al.*, 2021) از آنجا که پیشگیری و مدیریت بهداشتی بیماری‌ها، یک جنبهٔ بسیار مهم برای نتایج موفقیت‌آمیز آبزی‌پروری است، این مطالعه با هدف ارزیابی اثربخشی واکسن دو ظرفیتی به‌صورت تزریق داخل صفاقی جهت جلوگیری همزمان از ویبریوزیس و استرپتوکوکوزیس در ماهی باس دریایی آسیایی انجام گردید.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲– ۱. سویه‌های باکتریایی

برای تهیهٔ بذر واکسن، از سویه‌های بومی بیماری‌زای *ویبریو آلجینولیتیکوس* (با شناسهٔ ثبت شده در بانک ژن جهانی= MW654505) و *استرپتوکوکوس اینیایی* (با شناسه ثبت شده در بانک ژن جهانی = MW892415) که از ماهیان دریایی پرورشی دارای علائم سپتی‌سمی باکتریایی از سواحل جنوبی ایران جداسازی و به روش بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی و با استفاده از ردیابی ژن‌های حدت و LD_{50}، تعیین حدت شدند، (Houshmand *et al.*, 2021) استفاده گردید.

۲–۲. تهیهٔ واکسن دوظرفیتی کشته

جدایه‌های مورد نظر در محیط کشت TSB به‌مدت یک شب در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار، گرمخانه‌گذاری گردید. پس‌ازآن محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب ته لوله سه بار با سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد. پس از این مراحل، باکتری‌های رسوب یافته با PBS و با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و شمارش کلونی‌های باکتریایی، سوسپانسیون طوری تنظیم شد که در هر میلی‌لیتر از آن حدود 10^{10} CFU/ml باکتری وجود داشته باشد. برای تهیهٔ واکسن دوظرفیتی ابتدا با استفاده از فرمالین ۱درصد غیر فعال‌سازی انجام شد و سپس حجم مساوی از سوسپانسیون هر باکتری (حاوی 10^{10} CFU/ml باکتری) با هم ترکیب گردید (Arigo *et al*., 2005; Silva *et al*., 2014). جهت اطمینان از سلامت واکسن تهیه شده، تست‌های ایمن بودن (safety tests) و استریل بودن (sterility test) واکسن انجام گرفت (Bahnasawy *et al*., 2019; Chin *et al*., 2020).

۲–۳. تیماربندی و استراتژی واکسیناسیون

برای انجام این کار ۱۸۰ قطعه بچه‌ماهی باس دریایی آسیایی با وزن متوسط ۶/۴۳±۵۵ (میانگین ± SD) گرم تهیه شد و به‌مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش با شرایط سازگار شدند . سپس ماهیان به‌طور تصادفی در سه گروه با سه تکرار شامل نه مخزن پلی‌اتیلن ۳۰۰ لیتری (۲۰ ماهی در هر تکرار) ذخیره شدند. در این تحقیق از آب دریای جاری استریل (۱۰ppm کلر) در سیستم جریان عبوری (۱۰۰ درصد تبادل آب روزانه) استفاده شد. ماهیان سه بار در روز (۰۹:۰۰، ۱۲:۰۰ و ۱۵:۰۰) با جیرهٔ پلت شده تجاری (۴۲ درصد

پروتئین، ۱۵ درصد چربی، قطر ۳ میلی‌متر، ۲۱ بیضا، شیراز، ایران) تغذیه شدند. شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب به شرح: دما ۲±۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و شوری ۲±۴۳ گرم در لیتر ثبت گردید. سه گروه آزمایشی شامل: گروه یک: گروه شاهد بدون واکسیناسیون و تزریق شده با نمک بافر فسفات، گروه دو: واکسینه‌شده با واکسن دی‌والان تزریقی، گروه سه: واکسینه با واکسن دی‌والان تزریقی به‌همراه بوستر خوراکی (به مدت هفت روز) به‌میزان 10^{9} CFU در گرم غذا مطابق جدول ۱ طراحی گردید.

جدول ۱- چگونگی تیماربندی گروه های آزمایش

نام گروه	ایمن‌سازی	تعداد ماهی
گروه یک (شاهد)	تزریق PBS	۲۰ قطعه (در ۳ تکرار)
تیمار دو	تزریق واکسن دی‌والان (*V. alginolyticus* + *S. iniae*) کشته	۲۰ قطعه (در ۳ تکرار)
تیمار سه	تزریق واکسن دی‌والان (*V. alginolyticus* + *S. iniae*) کشته + بوستر خوراکی	۲۰ قطعه (در ۳ تکرار)

قبل از واکسیناسیون، ماهی‌ها با یک مادهٔ بی‌حس‌کننده (۲-فنوکسی اتانول، به‌میزان ppm ۱۰۰) بیهوش شدند. در گروه‌های واکسینه‌شده ماهی‌ها با دوز ۱۰۰ میکرولیتری از واکسن حاوی 10^{10} CFU/ml باکتری کشته به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند. همان‌طورکه در بالا ذکر شد، بوستر خوراکی در گروه سه انجام شد. در این راستا، واکسن روی پلیت غذا اسپری شد و از هفتهٔ سوم پس از واکسیناسیون به‌مدت هفت روز به ماهی عرضه شد. تمامی گروه‌های آزمایش (گروه واکسینه و کنترل) به‌مدت هشت هفته نگهداری شدند.

۲-۴. بررسی کارایی واکسن

جهت ارزیابی کارایی واکسن، آزمایش چالش دو هفته بعد از دوز بوستر خوراکی (پنج هفته بعد از شروع ایمن‌سازی اولیه با تزریق داخل صفاقی) انجام شد. بدین‌منظور ماهیان به‌روش داخل صفاقی با *ویبریو آلجینولیتیکوس* ($۳/۶۶ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml) و *استرپتوکوکوس اینیایی* (۳×۱۰^{۷} CFU/ml) به‌طور جداگانه مواجه شدند (Halimi *et al.*, 2018; Mohamad *et al.*, 2021). پس از چالش، تلفات تجمعی به‌مدت دو هفته ثبت گردید و درصد مرگ‌ومیر نسبی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد بقای نسبی[۱] = [۱- (درصد تلفات گروه واکسیناسیون / درصد تلفات گروه شاهد) × ۱۰۰]

در پایان آزمون چالش، رای تأیید تلفات ناشی از باکتری تزریق شده از کلیهٔ ماهیان تلف شده در گروه‌های ایمن‌شده و غیرایمن در شرایط استریل کشت باکتریایی تهیه شد (Li *et al.*, 2015; Nehlah *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017; Bahnasawy *et al.*, 2019).

۲-۵. نمونه‌گیری جهت اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی‌شناسی

از ماهیان در چهار مرحله شامل: روز صفر قبل از ایمن‌سازی، هفته‌های سه، پنج و هشت پس از ایمن‌سازی خون‌گیری از ورید ساقه دمی بعد از بیهوشی به‌عمل آمد. سرم خون به‌دست آمده جهت بررسی‌های ایمنی‌شناسی، با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید.

۲-۶. ارزیابی شاخص‌های ایمنی سرم ماهیان

شاخص‌های ایمنی‌شناسی سرم، براساس روش‌های استاندارد برای فعالیت لیزوزیم (Ellis *et al.*, 1990)، میزان فعالیت کمپلمان (Barta *et al.*, 1993)، پروتئین کل (Lowry *et al.*, 1951) و ایمونوگلوبولین کل (Siwicki and Anderson, 1993) مورد ارزیابی قرار گرفت.

[۱] Relative percent survival (RPS)

۲-۷. تهیهٔ آنتی‌سرم خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین ماهی باس دریایی آسیایی

به‌منظور خالص‌سازی ایمونوگلوبولین در باس دریایی آسیایی از سولفات آمونیوم اشباع استفاده شد. به این روش که مقدار ۱۰ میلی‌گرم از ایمونوگلوبولین‌های به‌دست‌آمده از ماهی در دو نوبت به فاصلهٔ دو هفته ابتدا با ادجوانت کامل فروند و سپس با ادجوانت ناقص فروند به‌صورت عضلانی به دو عدد خرگوش نر بالغ عاری از هرگونه بیماری تزریق گردید دو هفته پس از تزریق دوم، از سیاهرگ لبهٔ گوش خون‌گیری شد و سرم خون، که حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین ماهی باس دریایی آسیایی بود، جدا گردید (Ahangarzadeh *et al.*, 2023).

۲-۸. انجام آزمایش الایزا برای اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی

سطح آنتی‌بادی علیه هر باکتری مورد بررسی به‌طور جداگانه انجام شد (Firdaus-Nawi *et al.*, 2013). پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (Nunc، دانمارک) با ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن سونیکه (۱۰۰ میکروگرم در لیتر) با رقت ۱:۶۰ و ۱:۴۰ (با بافر کربنات-بی‌کربنات با اسیدیته ۹/۶) به‌ترتیب برای *ویبریوآلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* به‌طور جداگانه کوت شد. پلیت‌ها به‌مدت ۱۸ ساعت در یخچال با دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس سه بار با نمک بافر فسفات[1] حاوی توئین (محلول شستشو) شستشو گردید و واکنش با بافر مسدود کننده (PBST، ۵ درصد شیر بدون چربی، دو ساعت، ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) مسدود شد. سپس برای بلوک کردن چاهک‌ها، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بلوک کننده (شیر چربی گرفته ۵ درصد حاوی نمک بافر فسفات توئین) اضافه شد. مجدداً سه بار با محلول شستشو، شسته شدند. در مرحلهٔ بعد، سرم‌های شاهد مثبت و منفی و همچنین سرم‌های مورد آزمایش، با رقیق‌کنندهٔ نمک بافر فسفات حاوی توئین به‌همراه شیر چربی گرفته ۰/۱ درصد رقیق‌سازی گردید و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر سرم رقیق‌شده اضافه گردید. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، محتویات پلیت تخلیه‌شده و چهار مرتبه با محلول شستشو، شسته شدند. سرم خرگوش (آنتی‌سرم ضد پادتن ماهی باس دریایی آسیایی) رقیق‌شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. بعد از طی زمان انکوباسیون، محتویات پلیت تخلیه‌شده و مانند مرحلهٔ قبل چهار مرتبه شستشو شد. کونژوگه ضد ایمونوگلوبولین G خرگوشی رقیق‌شده به ۹۶ چاهک پلیت اضافه گردید و به‌مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. پس از شستشوی پلیت، محلول کروموژن–سوبسترا (تترامتیل بنزیدین+ آب‌اکسیژنه) به تمامی چاهک‌ها اضافه‌شده و واکنش بعد از ۱۵ دقیقه با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال به‌عنوان متوقف‌کننده، متوقف گردید. جذب نوری محتویات پلیت با استفاده از دستگاه قرائت‌کنندهٔ میکروپلیت در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد. مقادیر جذب نوری براساس نسب جذب نوری نمونه به جذب نوری کنترل مثبت مطابق رابطهٔ زیر گزارش گردید (Mohamad *et al.*, 2021; Jung *et al.*, 2020; El-Jakee *et al.*, 2008):

درصد نمونه به کنترل مثبت[2] = (جذب نوری نمونه – جذب نوری کنترل منفی/ جذب نوری کنترل مثبت – جذب نوری کنترل منفی) × ۱۰۰

۲-۹. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش تجزیه واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار SPPS نسخهٔ ۲۳ استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم‌افزار Excel انجام گرفت. تمامی میانگین ها همراه با خطای استاندارد بیان شده است.

۳. یافته‌های پژوهش

۳-۱. استریل بودن و بی خطر بودن واکسن

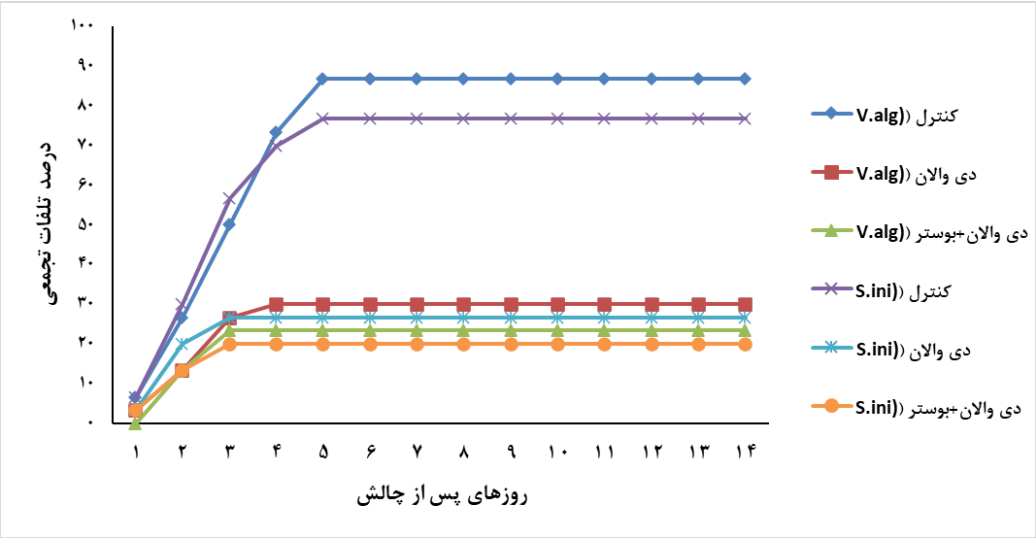
در پلیت‌های کشت داده‌شده از واکسن، رشد هیچ‌گونه کلونی باکتریایی بعد از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری مشاهده نشد. همچنین

[1] PBS
[2] SP%

هیچ گونه تلفات و عوارض جانبی ناشی از عفونت و یا ایجاد بیماری متعاقب تزریق واکسن مشاهده نشد و کشت از اندام‌های ماهی تزریق‌شده در محیط کشت هیچ‌گونه رشدی را نشان نداد.

۳-۲. محافظت‌کنندگی و ایمنی‌زایی واکسن

پنج هفته پس از واکسیناسیون، ماهی‌ها با جدایه‌های حاد *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* چالش داده شد و اثر حفاظتی واکسن دو ظرفیتی مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد تلفات تجمعی و میزان بازماندگی در تیمارهای مورد آزمایش در جدول ۲ و شکل ۱ نشان داده شده است.

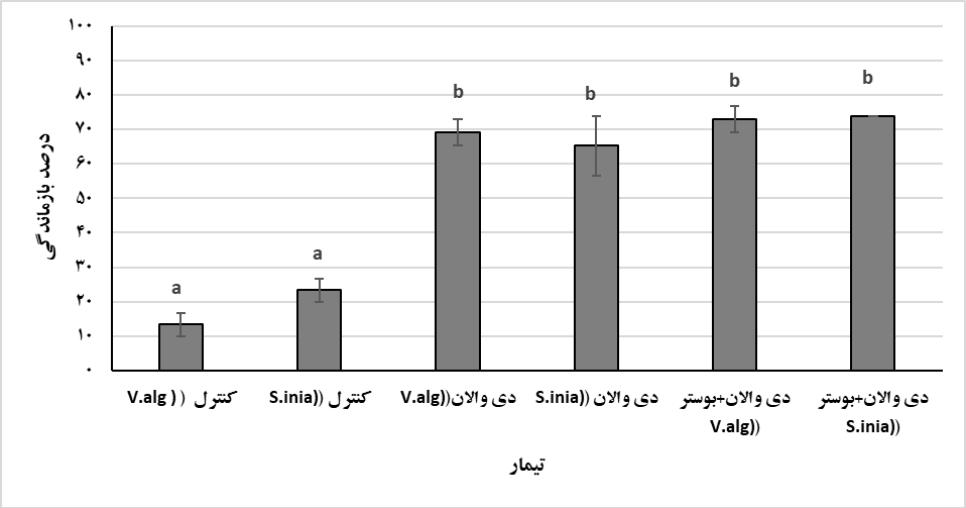


شکل ۱- نمودار تلفات تجمعی ماهیان واکسینه و غیرواکسینه پس از مواجه با جدایه‌های بیماری‌زای *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی*

جدول ۲- جزئیات طراحی آزمایش و درصد بازماندگی در تیمارهای مختلف

تیمار	تعداد	واکسیناسیون اولیه (روز صفر- داخل صفاقی- میلی‌لیتر/ماهی ۰/۱)	دوز بوستر (روز ۲۱ تا ۲۸ خوراکی)	گروه چالش شده (۱۰ ماهی در هر تانک در ۳ تکرار)	درصد تلفات± خطای استاندارد	درصد بقای نسبی± خطای استاندارد
کنترل	۶۰	PBS	-	کنترل (+ *V.alg*)	۸۶/۶۶ ± ۳/۳۳	۲۳/۲۲ ± ۳/۸۴
				کنترل (+ *S.inia*)	۷۶/۶۶ ± ۳/۳۳	۱۳/۳۳ ± ۳/۳۳
واکسینه (بدون بوستر)	۶۰	10^{10} CFU mL^{-1}	-	واکسینه (+ *V.alg*)	۲۶/۶۶ ± ۳/۳۳	۶۹/۲۲ ± ۳/۸۴
				واکسینه (+ *S.inia*)	۲۶/۶۶ ± ۶/۶۶	۶۵/۲۷ ± ۸/۷۲
واکسینه (با بوستر)	۶۰	10^{10} CFU mL^{-1}	غذا 10^{9} CFU g^{-1}	واکسینه (+ *V.alg*)	۲۳/۳۳ ± ۳/۳۳	۷۳/۰۷ ± ۳/۸۴
				واکسینه (+ *S.inia*)	۲۰	۷۳/۹۱

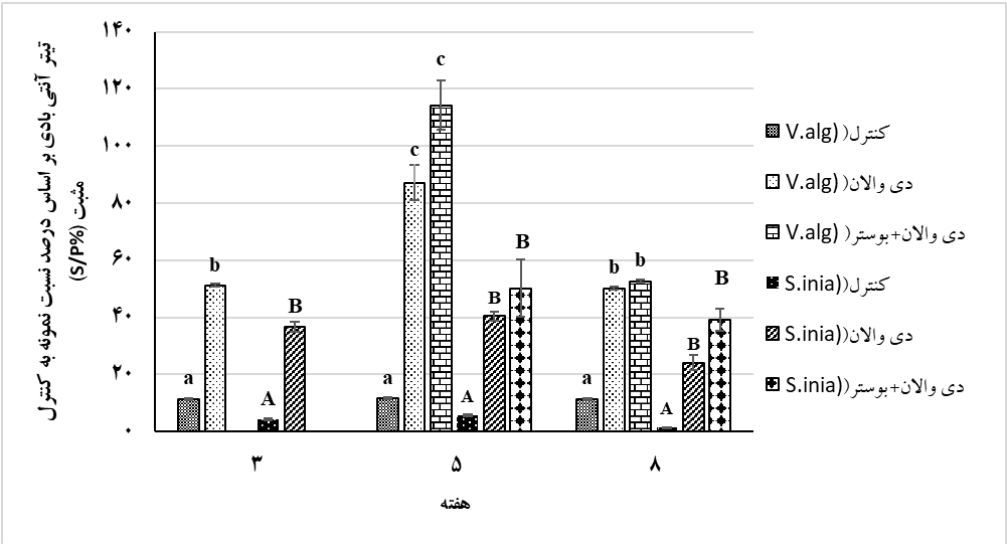
نتایج نشان داد بیشترین درصد تلفات تجمعی در گروه کنترل و بیشترین درصد بازماندگی در گروه‌های واکسینه به‌همراه بوستر بود ($P<۰/۰۵$). بررسی‌های آماری اختلاف معنی‌داری را در میزان تلفات و درصد بازماندگی بین گروه کنترل و گروه‌های واکسینه نشان داد ($P<۰/۰۵$). درصد بازماندگی در گروه‌های واکسینه به‌همراه بوستر خوراکی بالاتر از گروه‌های واکسینه بدون بوستر بود ولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج مواجهه‌سازی با هر دو باکتری *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* نشان داد که بیشترین درصد بازماندگی در گروه‌های واکسینه، به‌ویژه گروه واکسینه با بوستر به‌ترتیب با ۷۳/۰۷±۳/۸۴ و ۷۳/۹۱ درصد بود (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار ستونی میانگین درصد بازماندگی±خطای استاندارد تیمارهای مختلف پس از مواجه با دو عامل بیماری‌زای *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی*

۳-۳. پاسخ آنتی‌بادی

بررسی آماری نشان داد، هیچ اختلاف معنی‌داری در پاسخ آنتی‌بادی بین گروه‌های مختلف قبل از درمان وجود نداشت ($P<۰/۰۵$). تیتر آنتی‌بادی در هر دو گروه واکسینه چه همراه با بوستر خوراکی و چه بدون بوستر خوراکی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($P<۰/۰۵$). تیتر آنتی‌بادی سرم در پنج هفته پس از واکسیناسیون، در همهٔ گروه‌های واکسینه افزایش یافت (شکل ۳).

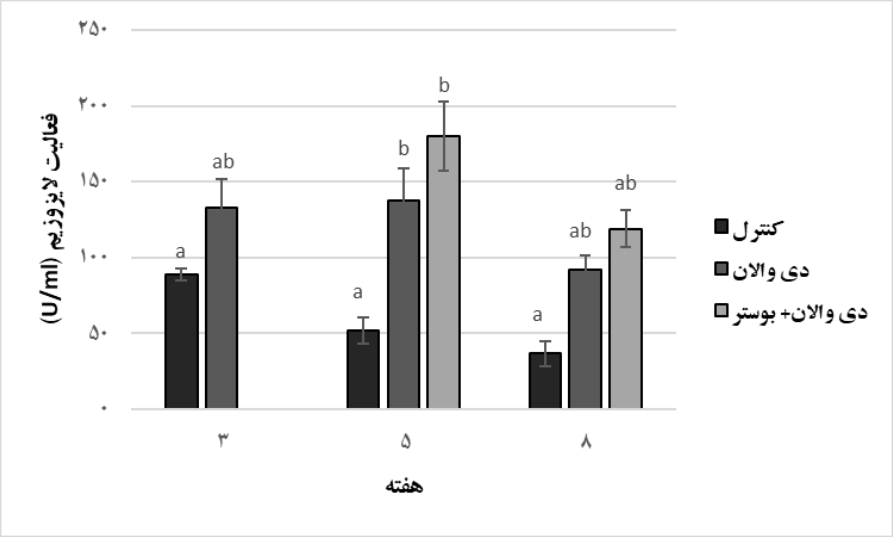


شکل ۳- نمودار مقایسهٔ تیتر آنتی‌بادی سرم ماهی باس دریایی آسیایی (S/P%) بر علیه *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* (میانگین±SE) در تیمارهای مختلف در ۳، ۵ و ۸ هفته پس از واکسیناسیون. حروف لاتین کوچک هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار($P<۰/۰۵$). بین تیتر آنتی‌بادی علیه *ویبریو آلجینولیتیکوس* و حروف لاتین بزرگ بالای هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$). بین تیتر آنتی‌بادی علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* است.

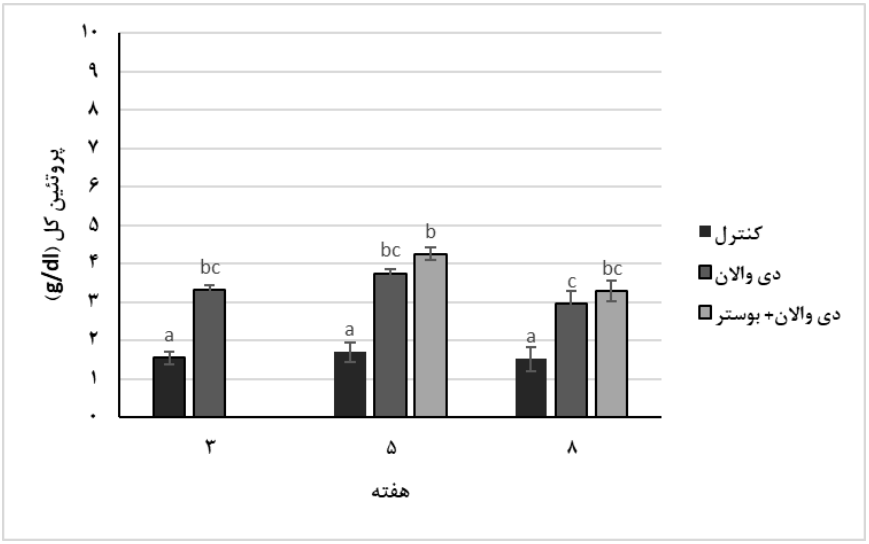
بالاترین تیتر آنتی‌بادی علیه *ویبریو آلجینولیتیکوس* به‌ترتیب در تیمار دی‌والان به‌همراه بوستر و دی‌والان در هفتهٔ پنجم پس از واکسیناسیون مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با این تیمارها در هفتهٔ سوم و هشتم نشان دادند ($P<۰/۰۵$). همچنین بالاترین تیتر آنتی‌بادی بر علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* در تیمار دی‌والان به‌همراه بوستر در هفتهٔ پنجم گزارش گردید، ولی این افزایش تیتر اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌های واکسینه و در هفته‌های سه و پنج پس از واکسیناسیون نداشت ($P>۰/۰۵$).

۳-۴. شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرم

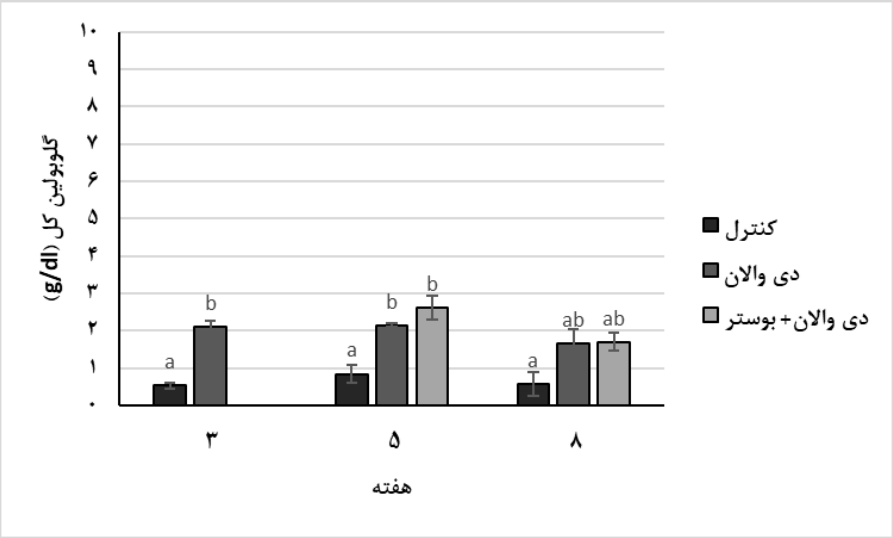
بسیاری از شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی ارزیابی شده، از جمله لیزوزیم سرم، پروتئین تام و سطح ایمونوگلوبولین تام، در گروه‌های واکسینه‌شده، به‌ویژه در گروه واکسینه با واکسن دی‌والان به‌همراه بوستر در هفتهٔ ۵ بعد از واکسیناسیون در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$) (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). سطح فعالیت مکمل تحت تأثیر در گروه‌های آزمایشی مختلف یا زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان نداد (شکل ۷).



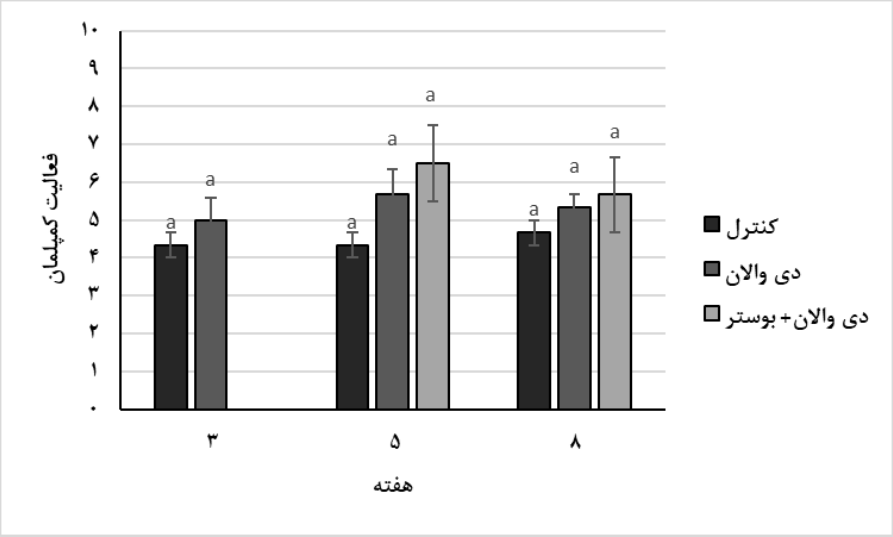
شکل ٤- نمودار فعالیت لیزوزیم سرم ماهی باس دریایی آسیایی ایمن شده
(حروف بالای ستون‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد) ($P<۰/۰۵$)



شکل ۵- نمودار میزان پروتئین کل سرم در تیمارهای مختلف
(حروف بالای ستون‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد) ($P<۰/۰۵$)



شکل ٦- نمودار گلوبولین کل سرم در تیمارهای مختلف
(حروف بالای ستون‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$)



شکل ۷- نمودار فعالیت کمپلمان سرم در تیمارهای مختلف
(حروف بالای ستون‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$)

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

یکی از تهدیدات عمده برای صنعت آبزی‌پروری تلفات اقتصادی ناشی از بروز و شیوع بیماری‌های عفونی به‌دلیل مرگ‌ومیر بالا در ماهی‌های پرورشی و سیستم‌های آبزی‌پروری تجاری است. مقالات مختلف نشان می‌دهند که ۵۴/۹ درصد پاتوژن‌های باکتریایی، ۲۲/۶ درصد ویروس‌ها، ۳/۱ درصد عوامل قارچی و ۱۹/۴ درصد عوامل انگلی مسئول شیوع دوره‌ای بیماری در پرورش ماهی هستند (Dhar *et al.*, 2014). با توجه به اهمیت عوامل بیماری‌زای باکتریایی در ایجاد سپتی‌سمی در ماهیان دریایی و با عنایت به این موضوع که ارائه راهکارهای کنترلی و پیشگیری از بروز بیماری‌های عفونی، مستلزم مطالعات تشخیص دقیق عامل بیماری است، پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران جهت بررسی محافظت‌کنندگی جدایه‌های بیماری‌زای بومی در ماهیان دریایی صورت گرفت. در حال حاضر در ایران گونه‌های مختلفی از ماهیان دریایی به‌عنوان کاندیدای پرورش معرفی شده‌اند که از بین آنها ماهی

باس دریایی آسیایی به‌عنوان یک گونهٔ غیربومی به‌علت ویژگی‌های بهتری که در پرورش دارد در استان‌های جنوبی کشور در قفس و استخر خاکی پرورش داده می‌شود. با توجه به توسعهٔ پرورش این ماهی در جنوب کشور، جا دارد راهکار مناسب در پیشگیری از بروز سپتی‌سمی‌های باکتریایی به‌عنوان مهمترین علت تلفات در این ماهی مورد بررسی قرار گیرد. متأسفانه تمامی واکسن‌های تجاری موجود در بازار، در برابر سویه‌های رایج در مناطق جغرافیایی و کشورهای خاصی ساخته‌شده و در برابر سویه‌های مناطق دیگر کارایی مناسبی ندارند، بنابراین لازم است در هر منطقه واکسن‌هایی از جدایه‌های بومی ساخته شود. با توجه به شیوع پاتوژن‌های باکتریایی که باعث سپتی‌سمی در ماهیان دریایی می‌شوند، توسعهٔ استراتژی‌های جدید برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی ضروری است. در این راستا، واکسن‌های چندظرفیتی به‌عنوان یک راه‌حل بالقوه مورد توجه قرار گرفته‌اند، اگرچه نگرانی‌هایی در مورد اثربخشی آنها مطرح شده است (Abu-Elala *et al.*, 2019). واکسن‌های کشته‌شده با فرمالین به‌دلیل پایداری بالا، ایمنی و مقرون به صرفه بودن، در آبزی‌پروری ماهی محبوب هستند (Mayo *et al.*, 2017) و نشان داده شده است که محافظت کارآمدی خصوصاً در برابر ویبریوز در گونه‌های مختلف ماهی در سراسر جهان دارند (Colquhoun *et al.*, 2014). استفاده از واکسن‌های دو یا چندظرفیتی، که حاوی چندین آنتی‌ژن در یک دوز واحد هستند، می‌تواند مقرون به‌صرفه باشد (Shoemaker *et al.*, 2012). میزان بازماندگی یک شاخص مهم برای ارزیابی کارایی واکسن‌هاست. در این مطالعه میزان محافظت‌کنندگی تیمار واکسینه به‌همراه بوستر به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ولی با اینکه از نظر عددی بالاتر از تیمار واکسینهٔ بدون بوستر خوراکی بود، ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. همچنین میزان محافظت واکسن دی‌والان تهیه‌شده برعلیه هر دو عامل بیماری‌زا، تقریباً یکسان و بیش از ۷۰ درصد بود. Ismail و همکاران (۲۰۱۰) و Chettri و همکاران (۲۰۱۵) به این نتیجه رسیدند که واکسن خوب واکسنی است که بتواند بیش از ۶۰ الی ۷۰ درصد محافظت ایجاد کند که براساس نتایج مطالعهٔ حاضر می‌توان نتیجه گرفت که واکسن دی‌والان تهیه‌شده، محافظت قابل قبولی به‌دنبال ایمن‌سازی با واکسن دی‌والان چه همراه با بوستر خوراکی و چه بدون بوستر خوراکی، در برابر عفونت تجربی با باکتری‌های بیماری‌زا ایجاد شده است.

اگرچه تفاوت معنی‌داری بین دو روش واکسیناسیون وجود نداشت، ولی به‌نظر می‌رسد که آنتی‌ژن‌های واکسن خوراکی می‌توانند از طریق جذب و انتقال از رودهٔ خلفی، پاسخ‌های ایمنی موضعی و سیستمیک را القا کنند (Ismail *et al.*, 2016). رودهٔ خلفی نقش مهمی در واکسیناسیون خوراکی دارد، زیرا در انتقال آنتی‌ژن‌ها از مجرای روده به ماکروفاژهای داخل اپیتلیال شرکت می‌کند (Firdaus-Nawi *et al.*, 2013). اگرچه روش واکسیناسیون خوراکی نمی‌تواند به‌خوبی روش تزریقی ایجاد محافظت کند (Colquhoun *et al.*, 2014)، اما Li و همکاران (۲۰۱۵) ، گزارش کردند که، واکسیناسیون خوراکی برای محافظت از ماهی سیم نقره‌ای (*Silver Sea Bream*) در برابر عامل بیماری‌زای *ویبریو آلجینولیتیکوس* مؤثر به‌نظر می‌رسد. واکسیناسیون خوراکی، برای افزایش واکسیناسیون در طول دورهٔ رشد در قفس‌ها یا استخرها برای ماهی‌های کوچک و بزرگ بسیار قابل استفاده هستند. هرچند به‌عنوان واکسن‌های اولیه به‌ویژه واکسن سلول کامل غیرفعال، حفاظت مناسبی در برابر عوامل بیماری‌زا ندارد، اما زمانی که به‌عنوان واکسن تقویت‌کننده استفاده می‌شود، علی‌رغم اثر گذرا، می‌تواند حفاظت در برابر پاتوژن را افزایش داده یا گسترش دهد (Ballesteros *et al.*, 2014; Mutoloki *et al.*, 2015). Ahangarzadeh و همکاران (۲۰۲۳) به‌دنبال واکسیناسیون ماهیان باس دریایی آسیایی با واکسن پلی‌والان به‌همراه بوستر خوراکی، میزان محافظت خوب و قابل قبولی را گزارش کردند. در توافق با نتایج مطالعهٔ حاضر، Mohamad و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی کارایی واکسن کشتهٔ پلی‌والان برعلیه بیماری ویبریوزیز، استرپتوکوکوزیس و آئروموناس‌های متحرک در ماهی باس دریایی آسیایی، نشان دادند که میزان محافظت واکسن پلی‌والان تهیه‌شده حدود ۷۵ درصد بود. همچنین Aly و همکاران (۲۰۲۰) در ایمن‌سازی ماهیان سیم دریایی (*S. aurata*) با واکسن دی‌والان تهیه‌شده از دو باکتری *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* میزان محافظت بسیار خوبی را نشان دادند. آنالیز آماری درصد بازماندگی تیمارهای واکسینه با واکسن دی‌والان بدون بوستر و همراه با بوستر خوراکی در مواجه با هر دو باکتری نشان داد که با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری دارند، ولی تیمارهای واکسینه با همدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. همسو با مطالعهٔ حاضر، Li و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی میزان کارایی واکسن ویبریو آلجینولیتیکوس در ماهی سیم دریایی که به روش‌های مختلف غیر فعال‌شده (فرماین، حرارت، فنل، کلروفرم)، نشان داد که بهترین روش برای غیر فعال‌سازی باکتری، استفاده

از فرمالین است و نتایج محافظت ناشی از باکترین فرمالینه خیلی بهتر از باکترین غیر فعال‌شده با کلروفرم، حرارت و فنل است و محافظتی معادل ۸۰ درصد را در ۳ هفته پس از واکسیناسیون ماهیان به‌دست آورد. Klesius و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه‌ای تحت عنوان «اثربخشی واکسن *استرپتوکوکوس اینیایی* با استفاده از جدایهٔ تکی و ترکیبی به روش داخل صفاقی و عضلانی در ماهی تیلاپیا» نشان دادند که درصد بازماندگی بعد از چالش با باکتری حاد *استرپتوکوکوس اینیایی* در روز ۳۰ پس از واکسیناسیون در گروه واکسینه با یک جدایهٔ همولوگ *استرپتوکوکوس اینیایی* معادل ٪۴۵ و در گروهی که با دو جدایهٔ ترکیبی هترولوگ *استرپتوکوکوس اینیایی* واکسینه شدند، معادل ٪۹۴ بود. Shoemaker و همکاران (۲۰۱۲) به‌دنبال استفاده از واکسن دوظرفیتی شامل *استرپتوکوکوس اینیایی* و *ویبریو ولنیفیکوس* در ماهی تیلاپیا محافظتی بین ۶۹ تا ۱۰۰درصدی را گزارش کردند. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعهٔ حاضر مشخص کرد که ماهیان قبل از ایمن‌سازی هم دارای مقداری آنتی‌بادی اختصاصی ضد *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* هستند که احتمالاً به‌دلیل حضور دائم باکتری در محیط‌های آبزی باشد. این موضوع با نتایج Ahangarzadeh و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای که روی تأثیر واکسن‌های چندظرفیتی کشته‌شدهٔ باکتریایی بر بقا و ایمنی‌زایی باس دریایی آسیایی انجام دادند، همخوانی دارد. بالاترین میانگین عیار آنتی‌بادی اختصاصی علیه *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* در مطالعهٔ حاضر مربوط به گروه واکسینه با بوستر خوراکی در پنج هفته پس از ایمن‌سازی است. Nguyen و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر روی ایمن‌سازی هامور خال نارنجی (*Epinephelus coioides*) به‌وسیلهٔ واکسن کشتهٔ فرمالینه *ویبریو هارویی* انجام گردید، مشخص کردند، که تیتر آنتی‌بادی سرم در گروه‌های واکسینه در هفته‌های ۲، ۶ و ۱۲ پس از ایمن‌سازی، به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود و همچنین بیشترین میزان تیتر آنتی‌بادی در هفتهٔ ششم پس از واکسیناسیون گزارش شد.

در این مطالعه به‌جز میزان فعالیت کمپلمان سرم، سایر فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی در گروه‌های واکسینه به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. مشابه نتایج مطالعهٔ حاضر، Dezfuly و همکاران (۲۰۲۰) افزایش قابل توجهی در اکثر پاسخ‌های ایمنی هومورال در قزل‌آلای رنگین‌کمان واکسینه‌شده با لیپوپلی‌ساکارید *یرسینیا راکری* پوشانده شده با میکرو/نانوذرات آلژینات–کیتوسان نشان دادند. همچنین عنوان کردند که زمان بر عوامل ایمنی غیراختصاصی مؤثر بوده، به‌طوری‌که افزایش معنی‌داری فاکتورهای مذکور در روز سی‌ام مشاهده شد. در مطالعه‌ای که از واکسن چندظرفیتی علیه بیماری ویبریوزیز و آئروموناس در ماهی باس دریایی آسیایی استفاده شد، فعالیت لیزوزیم پس از هفت روز واکسیناسیون خوراکی تا هفتهٔ ششم به‌طور قابل توجهی بهبود یافت و همچنین با تحریک پارامترهای ایمنی هومورال با استفاده از واکسن چندظرفیتی، ایمنی ماهی را در برابر باکتری‌های بیماری‌زا تقویت می‌گردد (Mohamad *et al.*, 2021). به‌طورکلی، یافته‌های مطالعهٔ حاضر نشان داد که واکسن دی‌والان با تحریک پارامترهای ایمنی هومورال می‌تواند سیستم ایمنی ماهی را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* تقویت کند و در نتیجه میزان بقای ماهیان را پس از چالش با آنها افزایش دهد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق کاهش میزان مرگ‌ومیر تجمعی، افزایش درصد بازماندگی پس از مواجهه با باکتری‌های بیماری‌زا و تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های واکسینه در مقایسه با گروه کنترل کاملاً مشهود است. همچنین بهبود و افزایش عملکرد شاخص‌های ایمنی ذاتی در گروه‌های دریافت‌کنندهٔ واکسن در مقایسه با گروه شاهد نشان از عملکرد خوب ایمنی ذاتی ماهیان دارد. در نهایت، نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که تجویز واکسن دو ظرفیتی شامل *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* باعث تحریک پاسخ‌های ایمنی محافظتی در برابر هر دو پاتوژن‌های باکتریایی شرکت‌کننده در این واکسن در ماهی باس دریایی آسیایی می‌شود. با توجه به نقش پررنگ باکتری‌ها خصوصاً ویبریوها و استرپتوکوکوس در ماهیان دریایی و با توجه به رشد سریع آبزی‌پروری ماهیان دریایی در کشور، به‌خصوص سیستم پرورش در قفس و وجود استرس‌های بالقوهٔ شرایط پرورش، پیاده‌سازی اقدامات پیشگیرانه بسیار توصیه می‌گردد و استفاده از این واکسن می‌تواند در دستور کار واحدهای توسعه و تحقیق شرکت‌هایی که هم‌اکنون مبادرت به پرورش ماهی در سیستم قفس نموده‌اند، قرار گیرد. به‌طورکلی تأمین ایمنی میزبان از طریق واکسیناسیون برای غلبه بر بیماری‌های ماهی، روشی امیدوارکننده، ایمن و مقرون به‌صرفه خواهد بود. برای دستیابی به صنعت آبزی‌پروری سازگار با محیط‌زیست بدون نگرانی در مورد سلامت انسان، واکسن‌های غیرفعال استراتژی‌های بسیار توصیه شده هستند.

References

Abu-Elala, N.M., Samir, A., Wasfy, M., Elsayed, M., 2019. Efficacy of Injectable and Immersion Polyvalent Vaccine against Streptococcal Infections in Broodstock and Offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology* 88, 293-300. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.02.042.

Ahangarzadeh, M., Houshmand, H., Torfi Mozanzadeh, M., Kakoolaki, S., Nazemroaya, S., Sepahdari, A., Peyghan, R., Ajdari, A., Sadr, A.S., 2023. Effect of killed autogenous polyvalent vaccines against *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* and *Streptococcus iniae* on survival and immunogenicity of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish & Shellfish Immunology* 143, 109226. DOI: 10.1016/j.fsi.2023.109226.

Aly, S.M., Eissa, A.E., ElBanna, N.I., Albutti, A., 2021. Efficiency of monovalent and polyvalent *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio Parahaemolyticus* vaccines on the immune response and protection in gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.) against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology* 111, 145-151. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.10.011.

Angosto, D., López-Muñoz, A., García-Alcazar, A., Meseguer, J., Sepulcre, M.P., Mulero, V., 2018. Aluminum is a powerful adjuvant in teleost fish despite failing to induce interleukin-1β release. *Developmental & Comparative Immunology* 85, 18-24. DOI: 10.1016/j.dci.2018.03.017.

Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Magariños, B., Toranzo, A.E., Moriñigo, M.A., 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damselae* subsp. piscicida. *Journal of Fish Diseases* 28(1), 33-38.DOI: 10.1111/j.1365-2761.2004.00597.x. eng

Bahnasawy, M., El-Bakry, K., El-Safy, M., El-Borsh, D., 2019. Use of vaccines in controlling bacteria fish diseases caused by *Vibrio anuiliticus*. *African Journal of Biological Sciences* 15(1), 87-100.DOI: 10.21608/ajbs.2019.64002.

Ballesteros, N.A., Rodriguez Saint-Jean, S., Perez-Prieto, S.I., 2014. Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Fish & Shellfish Immunology* 37(2), 220-228.DOI: 10.1016/j.fsi.2014.02.003.

Bao, P., Sun, X., Liu, Q., Zhang, Y., Liu, X., 2019. Synergistic effect of a combined live *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella piscicida* vaccine in turbot. *Fish & Shellfish Immunology* 88, 84-90. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.02.014.

Barta, O., 1993. Veterinary clinical immunology laboratory. Bar-Lab Publishing, Oxford, UK, 350.

Bellos, G., Angelidis, P., Miliou, H., 2015. Effect of temperature and seasonality principal epizootiological risk factor on vibriosis and photobacteriosis outbreaks for european sea bass in greece (1998-2013). *Journal of Aquaculture Research & Development* 6(5), 338-341. DOI: 10.4172/2155-9546.1000338.

Buller, N.B., 2014. Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals, 2nd Edition: A Practical Identification Manual. CABI, Wallingford, Oxfordshire, 881p.

Cao, J., Zhang, J., Ma, L., Li, L., Zhang, W., Li, J., 2018. Identification of fish source *Vibrio alginolyticus* and evaluation of its bacterial ghosts vaccine immune effects. *Microbiology Open* 7(3), e00576. DOI: 10.1002/mbo3.576.

Chettri, J.K., Jaafar, R.M., Skov, J., Kania, P.W., Dalsgaard, I., Buchmann, K., 2015. Booster immersion vaccination using diluted *Yersinia ruckeri* bacterin confers protection against ERM in rainbow trout. *Aquaculture* 440, 1-5. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.01.027.

Chin, Y.K., Al-saari, N., Zulperi, Z., Mohd-Aris, A., Salleh, A., Silvaraj, S., Mohamad, A., Lee, J., Zamri-Saad, M., Ina-Salwany, M.Y., 2020. Efficacy of bath vaccination with a live attenuated Vibrio harveyi against vibriosis in Asian seabass fingerling, *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research* 51(1), 389-399. DOI: 10.1111/are.14386.

Colquhoun, D.J., Lillehaug, A., 2014. Vaccination against vibriosis, in: R. Gudding, A. Lillehaug, Ø. Evensen (Eds.), Fish vaccination, 1st ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, United State, 172-184. DOI: 10.1002/9781118806913.ch15

Dezfuly, Z.T., Alishahi, M., Ghorbanpoor, M., Tabandeh, M.R., Mesbah, M., 2020. Immunogenicity and protective efficacy of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide (LPS), encapsulated by alginate-chitosan micro/nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 104, 25-35. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.05.029.

Dhar, A.K., Manna, S.K., Thomas Allnutt, F.C., 2014. Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease* 25(1), 1-17. DOI: 10.1007/s13337-013-0186-4. eng

El-Jakee, J.K., Marzouk, M.S., Mahmoud, N.A., EL-HADY, M.A. Trials to create Edwardsiellosis native vaccines for freshwater fish in Egypt. *In:* H. Elghobashy, K. Fitzsimmons, A.S. Diab, eds. 8th International Symposium on tilapia in Aquaculture, October 12-14 2008 Cairo, Egypt. Central Laboratory for Aquaculture Research (CLAR), Egypt: Citeseer, 1143-1155.

Ellis, T., 1990. Lysozyme assays, in: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Van Muiswinkel (Eds.), Techniques in fish immunology. SOS Publications, Fair Haven, USA, 101-103

FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture, Food and Agriculture Organization. Sustainability in action, Rome, 1-244. DOI: 10.4060/ca9229en

Firdaus-Nawi, M., Yusoff, S.M., Yusof, H., Abdullah, S.-Z., Zamri-Saad, M., 2013. Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* spp. in Malaysia. *Aquaculture Research* 45(1), 87-96. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03207.x.

Gudding, R., Van Muiswinkel, W.B., 2013. A history of fish vaccination: Science-based disease prevention in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 35(6), 1683-1688. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.09.031.

Halimi, M., Alishahi, M., Abbaspour, M.R., Ghorbanpoor, M., Tabandeh, M.R., 2018. Efficacy of a Eudragit L30D-55 encapsulated oral vaccine containing inactivated bacteria (*Lactococcus garvieae*/*Streptococcus iniae*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 81, 430-437. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.07.048.

Hooshmand, H., Ahangarzadeh, M., Sadat Sadr, A., Nazemroaya, S., Ghorbanpoor, M., Mohammadiyan, T., Kakoolaki, S., AZhdari, A., 2022. Isolation and molecular identification of *Vibrio alginolyticus* from cultured marine fish in farms located south provinces of Iran. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 31(1), 9-21. DOI: 10.22092/ISFJ.2022.126359. (in Persian)

Ismail, M.S., Syafiq, M.R., Siti-Zahrah, A., Fahmi, S., Shahidan, H., Hanan, Y., Amal, M.N.A., Zamri Saad, M., 2017. The effect of feed-based vaccination on tilapia farm endemic for streptococcosis. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 21-24. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.11.040.

Ismail, N.E.D.A., Atta, N.S., Ahmed, A.E.A.M., 2010. Oral Vaccination of Nile Tilapia (*Orechromis niloticus*) Against Motile Aeromonas Septicaemia. *Report and Opinion* 2(1), 46-51. DOI: 10.7537/marsroj020110.09.

Ismail, N.I.A., Amal, M.N.A., Shohaimi, S., Saad, M.Z., Abdullah, S.Z., 2016. Associations of water quality and bacteria presence in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*O. mossambicus*. *Aquaculture Reports* 4, 57-65. DOI: 10.1016/j.aqrep.2016.06.004.

Jung, A., Rautenschlein, S., 2020. Development of an in-house ELISA for detection of antibodies against *Enterococcus cecorum* in Pekin ducks. *Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A* 49(4), 355-360. DOI: 10.1080/03079457.2020.1753653. eng

Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., Evans, J.J., 2000. Efficacy of single and combined Streptococcus iniae isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188(3), 237-246. DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00345-8.

Li, J., Ma, S., Woo, N.Y., 2015. Vaccination of Silver Sea Bream (*Sparus sarba*) against *Vibrio alginolyticus*: Protective Evaluation of Different Vaccinating Modalities. *International Journal of Molecular Sciences* 17(1), 40. DOI: 10.3390/ijms17010040. eng

Lin, H.L., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., Huang, S.L., Liu, C.H., 2017. Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 474-482. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.11.026. eng

Liu, S., Li, E., Cai, Y., Wang, S., Ren, Z., Li, Q., Guo, W., Wu, Y., Zhou, Y., 2018. Isolation, identification and pathogenicity characterization of *Vibrio ponticus* from the golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture* 496, 285-290. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.04.065.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1), 265-275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

Mayo, C., Lee, J., Kopanke, J., MacLachlan, N.J., 2017. A review of potential bluetongue virus vaccine strategies. *Veterinary Microbiology* 206, 84-90. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.03.015.

Miccoli, A., Saraceni, P.R., Scapigliati, G., 2019. Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish & Shellfish Immunology* 94, 800-809. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.09.065.

Mohamad, A., Zamri-Saad, M., Noor Azmai Amal, M., Al-Saari, N., Monir, M.S., Chin, Y.K., Md Yasin, I.-S., 2021. 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* 9(4). DOI: 10.3390/vaccines9040368.

Nehlah, R., Firdaus-Nawi, M., Nik-Haiha, N.Y., Karim, M., Zamri-Saad, M., Ina-Salwany, M.Y., 2017. Recombinant vaccine protects juvenile hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*, against infection by *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture International* 25(6), 2047-2059. DOI:10.1007/s10499-017-0172-8.

Nguyen, H.T., Thu Nguyen, T.T., Tsai, M.-A., Ya-Zhen, E., Wang, P.-C., Chen, S.-C., 2017. A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology* 65, 118-126. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.04.008.

Pasaribu, W., Sukenda., S., Nuryati, S., 2018. The Efficacy of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Broodstock and Larval Immunization against *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila*. *Fishes* 3(1), 1-16. DOI: 10.3390/fishes3010016.

Rameshkumar, P., Nazar, A.K.A., Pradeep, M.A., Kalidas, C., Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Samal, A.K., Sirajudeen, S., Venkatesan, V., Nazeera, B.M., 2017. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from sea cage cultured cobia (*Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766)) in India. *Letters in Applied Microbiology* 65(5), 423-430. DOI: 10.1111/lam.12800. eng

Sharma, S.R.K., Pradeep, M.A., Sadu, N., Dube, P.N., Vijayan, K.K., 2017. First report of isolation and characterization of *Photobacterium damselae* subsp. damselae from cage-farmed cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Ffish Diseases* 40(7), 953-958. DOI: 10.1111/jfd.12557. eng

Shoemaker, C.A., LaFrentz, B.R., Klesius, P.H., 2012. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. *Aquaculture* 354-355, 45-49. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.033.

Shoemaker, C.A., Lozano, C.A., LaFrentz, B.R., García, J.C., Soto, E., Xu, D.-H., Beck, B.H., Rye, M., 2017. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated? *Aquaculture* 468, 193-198. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.022.

Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, A., Calado, R., Gomes, N.C., Pardo, M.A., Hernandez, I., Almeida, A., 2014. Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PLoS One* 9(12), e114197. DOI:10.1371/journal.pone.0114197. eng

Siwicki, A., Anderson, D.P., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum, in: A.K. Siwicki, D.P. Anderson, J. Waluga (Eds.), Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego, Olsztyn, Poland, 105-111

Spinos, E., Kokkoris, G.D., Bakopoulos, V., 2017. Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. *Aquaculture* 471, 172-184. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.01.017.

Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Magariños, B., Barja, J.L., 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases, in: B. Basurco, C. Rogers (Eds.), The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Zaragoza: CIHEAM, 155-176

Torres-Corral, Y., Girons, A., González-Barreiro, O., Seoane, R., 2021. Effect of Bivalent Vaccines against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* Subspecie achromogenes on Health and Survival of Turbot. 9(8). DOI: 10.3390/vaccines9080906.

Van Khang, P., Van Nha, V., Nguyen, N.H., 2019. Resistance to *Streptococcus iniae* and its genetic associations with traits of economic importance in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Journal of Fish Diseases* 42(12), 1657-1666. DOI: 10.1111/jfd.13092.

Viale, I., Cubadda, C., Angelucci, G., Salati, F., 2006. Immunization of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, Fingerlings with a Commercial Vaccine Against Vibriosis. *Journal of Applied Aquaculture* 18(3), 53-67. DOI: 10.1300/J028v18n03_04.

Woo, P.T.K., Gregory, D.W.B., 2014. Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture, 2nd Edition, illustrated, revised ed. CABI, 354. DOI: 10.1079/9781780642079.0000