

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 agalactiae* 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

مقاله علمی - پژوهشی

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

الهام اسروش^۱، تکاور محمدیان^{۲*}، مجتبی علیشاهی^۳، محمد خسروی^۴، داریوش غریبی^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

^۴ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

آلژینات/کیتوزان
باسیلوس سابتیلیس
واکسن دوگانه
ریزپوشانی
ماهی تیلاپای نیل

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

مواد و روش‌ها: ابتدا باکتری دوگانه استرپتوکوکوس اینیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه به روش Internal Emulsification با موفقیت ریزپوشانی گردید. سپس ۶۰۰ قطعه ماهی تیلاپای نیل با میانگین $30 \pm 2/32$ 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 به مدت دو ماه در شرایط مشابه، تغذیه و نگهداری شدند و در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ ضمن زیست‌سنجی ماهی‌ها، نمونه از هر تیمار اخذ و خونگیری و جداسازی سرم انجام شد. شاخص‌های رشد و برخی شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی بین تیمارها مقایسه گردید. سپس ماهیان هر گروه با باکتری زنده استرپتوکوکوس آگالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیه چالش داده شدند و تلفات تیمارها تا ۱۴ 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، به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد بهبود یافته بود ($p < 0/05$). در بین شاخص‌های ایمنی، عیار آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس آگالاکتیه و ضد استرپتوکوکوس اینیه، میزان احیای NBT، میزان گلوبولین و پرتئین سرم و فعالیت لایزوزیم سرم به طور معنی داری در مراحل نمونه گیری در تیمار خوراکی ریزپوشانی و باسیلوس سابتیلیس بهبود یافته بود ($p < 0/05$). پارامترهای خونی شامل: هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول‌های سفید خون بین تیمارهای تحقیق تفاوت معنی داری نشان دادند ($p < 0/05$). بررسی‌ها نشان داد که در هر دو مرحله نمونه گیری روزهای ۳۰ و ۶۰، بیشترین تعداد گلبول‌های سفید مربوط به تیمارهای ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس بود ($p < 0/05$). کمترین میزان تلفات در چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس آگالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیه، به ترتیب با ۳۶/۷٪ و ۳۰٪ مربوط به تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس بود که نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰٪) کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری: لذا می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به نتایج مناسب ایمنی زایی 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 به عنوان یک جایگزین برای واکسن تزریقی وجود دارد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

t.mohammadian@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ مهر ۱۴۰۳

تاریخ داور: ۱ آبان ۱۴۰۳

تاریخ اصلاح: ۲ دی ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۳ بهمن ۱۴۰۳

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 آبی پروری را بهترین گزینه تامین پروتئین جمعیت در حال توسعه جهانی دانسته است. یکی از پرطرفدارترین و سریع‌الرشدترین ماهیان پرورشی جهان ماهی تیلپیا (*Oreochromis niloticus*) است که با رشدی حدود ۸٪ در صنعت آبی پروری جهان در دهه اخیر رتبه اول رشد را به خود اختصاص داده است و به یکی از ماهیان مهم در آبی پروری به‌ویژه برای کشورهای در حال توسعه دارای تنش آبی مطرح شده است و تولید جهانی تیلپیا نایل در سال ۲۰۱۸ بیش از ۴/۴ میلیون تن و کل گونه‌های تیلپیا بیش از 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 تیلپیا به‌خاطر رشد سریع و مقاومت نسبتاً بالا به شرایط محیطی به ویژه شوری، توقع غذایی کم، امکان پرورش بسیار مترکم و نیاز کم به تعویض آب به‌عنوان یکی از گونه‌های مناسب پرورش در ایران می‌باشد. یکی از مشکلات آبی پروری کشور، تنوع پایین در ماهیان پرورشی است، به طوری که به جز ۴ گونه کپور ماهی چینی، ماهی دیگری به‌طور تجاری به‌صورت آبی پروری گرمابی کشور معرفی نشده است. تنوع گونه‌ای در صنعت آبی پروری هر کشور ضامن استمرار و پایداری صنعت می‌باشد. به طوری که اگر پرورش یک یا چند گونه با چالش جدی (مثل بیماری‌های ویروسی کشنده) مواجه شد، امکان شیفت نمودن صنعت به سمت سایر گونه‌های موجود در کشور وجود داشته باشد و صنعت ورشکسته نشود. از این رو یکی از گونه‌های مورد حمایت FAO گونه تیلپیا 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. به دلیل طول عمر 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 آمریکا است. هم‌چنین این ماهی به پرفروش‌ترین ماهی در کشورهای اتحادیه اروپا تبدیل شده است. این ماهی به دلیل مقاومت بالا در برابر شرایط محیطی استرس‌زا و تکثیر ساده و سریع هم به‌عنوان فرصت و هم به‌عنوان تهدید برای آبی پروری و آبزیان بومی در سطح دنیا مطرح شده است، به طوری که در استان Guangdong چین که ۴٪ تولید تیلپیا 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 تیلپیا 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 به دلیل مزیت‌های پرورشی خاص این گونه باشیم. مجوز تولید مترکم این ماهی به میزان 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 تیلپیا است (۱۶، ۲۸). تاکنون دو گونه باکتری شامل *S. iniae* و *S. agalactiae* به‌عنوان عامل استرپتوکوکوزیس در تیلپیا گزارش شده‌اند (۲۰). استرپتوکوکوزیس در تیلپیا در دمای بالای ۳۰ درجه باعث ایجاد انواع علائم بالینی در ماهی‌های آلوده می‌شود. شایع‌ترین علائم بالینی با توجه به مننژوانسفالیت شدید در تیلپیا شنای نامنظم، اغزوفاکمی، کدورت قرنیه، خونریزی در چشم و پایه باله، تیرگی رنگ، آسیت، زخم‌های پوستی و ناهنجاری استخوانی است. تلفات این بیماری در تیلپیا 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 تیلپیا نیل پرورشی داخل کشور را تأیید قطعی و توالی یابی نموده‌اند. روش معمول مقابله با این بیماری آنتی‌بیوتیک‌تراپی است، ولی با توجه به عواقب نگران‌کننده استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، الزامات‌های 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 به دلیل 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 به روش تزریقی است. رفع مشکل کارایی 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

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 به روش

ژلاسیون یونی (Ionic gelation): برای این منظور، مقدار ۱۱۷/۵ سی‌سی محلول آلژینات-سدیم 0.063% را که pH آن روی ۴/۹ تنظیم گردید با سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شد و در حالت چرخش با دور ۸۰۰ rpm در دقیقه به هم زده شد. 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 0.07% را که pH آن روی ۴/۶ تنظیم گردید، قطره قطره به پیش ژل طی ۹۰ دقیقه اضافه شد. پراکنش کلونیدی در pH برابر ۴/۷ با اضافه کردن کیتوزان چند کاتیونی شکل گرفت. بعد از اضافه کردن کیتوزان، اجازه داده شد تا به مدت ۳۰ دقیقه دیگر نیز در شرایط فوق باقی بماند تا کپسولاسیون کامل شود. کپسول‌ها با سانتریفیوژ 10000 دور در دقیقه به مدت یک ساعت 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 تیمار بندی ماهی‌ها: تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی تیلپیا با وزن $30 \pm 2/32$ گرم خریداری و در وضعیت مناسب به سالن نگهداری ماهیان در وان‌های ۳۰۰ لیتری واقع در بخش بهداشت آبیان 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 کلیه قدامی از ۱۰ قطعه ماهی صورت گرفت. پس از اطمینان از عدم وجود بیماری‌های مختلف و عدم رشد باکتری در محیط کشت انکوبه شده، قبل از شروع مراحل تحقیق، ماهیان تیلپیا خریداری شده جهت سازگاری با شرایط جدید در مخازن ۳۰۰ لیتری، به مدت دو هفته نگهداری شدند. هر دو روز یک‌بار کل آب هر مخزن با آب لوله‌کشی کلرزدايي شده و هم‌دمای شده تعویض می‌گردید. تمام مخازن ۳۰۰ لیتری توسط کمپرسور هوادهی در طی دوره آزمایش مجهز بود و شرایط آب دوره تحقیق به صورت زیر بود: دما ۲۸-۲۹ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول در تمام مخازن ۵/۸-۷ میلی‌گرم در لیتر، pH= ۷-۸، میزان آمونیاک و نیتريت کم‌تر

آن‌ها متصل شوند. به‌طور کلی ذرات استفاده شده در ریزپوشانی آنتی ژن واکسنی غیرسمی، با قابلیت تخریب زیستی (تجزیه پذیری 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 گلیکولیک اسید (PLGA) و کیتوزان را گزارش کرده‌اند (۱۴)، کیتوزان و آلژینات دو پلیمر طبیعی زیست تخریب پذیر هستند که علاوه بر محافظت آنتی‌ژن در شرایط لوله گوارش، تحریک ایمنی مخاطی را باعث می‌شوند و نقش ادجوانی دارند (۱۱). از طرفی ارزان قیمت و در دسترس هستند و در تحقیقات مختلف از آن‌ها برای پوشش دادن واکسن‌های خوراکی استفاده شده است (۱۲). استفاده از پروبیوتیک‌ها به منظور افزایش ایمنی زایی و کارایی واکسن‌ها در آبزیان در دهه اخیر کاربرد زیادی یافته است (۳۰). ترکیب واکسیناسیون با تجویز پروبیوتیک در یک واکنش متقابل بُرد بُرد، علاوه بر افزایش کارایی و ایمنی زایی واکسن، بهبود اثرات پروبیوتیک تجویز شده را نیز باعث می‌شود. استفاده از باسیلوس سابتیلیس به عنوان 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 آگالاکتیه در ماهی تیلپیا با موفقیت و ایمنی زایی 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. agalactiae* و *S. Iniae*) در ماهی تیلپیا در کشور و با عنایت به مزایای واکسیناسیون خوراکی نسبت به سایر روش‌های واکسیناسیون، در این تحقیق تاثیر پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس بر کارایی و ایمنی زایی 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 تیلپای پروورشی 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 به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه گردید، باکتری از محیط کشت استخراج شده و با استفاده از فرمالین ۱ درصد و انکوبه کردن به مدت ۲ ساعت، غیرفعال شده و سه مرتبه با بافر فسفات استریل شسته شد تا فرمالین باقی مانده

و نهایتاً سوبسترای آنزیمی افزوده شد و در دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. عیار آنتی بادی ضد باکتری مورد اشاره با روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی Micro Agglutination Test سنجش گردید. از سرم ماهی فوق ایمن به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین میزان فعالیت کمپلمان سرم: برای اندازه گیری 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 گلبول های قرمز خون خرگوش و ایجاد همولیز استفاده شد. پس از تهیه آنتی بادی IgG ضد گلبول قرمز خرگوش و مجاور نمودن با گلبول قرمز شسته شده، حساس سازی گلبول های قرمز انجام شد. گلبول های قرمز حساس شده و حساس نشده با رقت مناسب سرم مجاور شدند و ارزیابی میزان همولیز با اندازه گیری جذب نوری نمونه سانتریفیوژ شده انجام گردید.

تعیین سطح فعالیت لیزوزیم: سطح فعالیت لیزوزیم پلاسما ی خون با استفاده از روش کدورت سنجی براساس روش Ellis تعیین گردید (۷). برای این منظور، ابتدا ۱۵ میکرو لیتر سرم با ۱۳۵ میکرو لیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH=۵/۸) در گوده های میکرو پلیت مخلوط شد و جذب نوری آن در دمای اتاق در روزهای صفر و ۳۰ و ۶۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری 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 میلی لیتر از خون هپارینه در داخل گوده های میکرو پلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ میلی لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه گردید. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و سپس ۰/۱ میلی لیتر از مخلوط حاصل برداشته، و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی لیتر دی متیل فرماید اضافه شد. پس از سانتریفوژ نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

ارزیابی میزان پروتئین تام و ایمونوگلوبولین سرم: مقایسه میزان کلی پروتئین تام و ایمونوگلوبولین سرم با اندازه گیری پروتئین و آلبومین تام با استفاده از کیت های زیست شیمی 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 میکرو لیتر خون به ۲/۵ سی سی محلول تجاری دراکین (معرف سیانومت هموگلوبین) اندازه گیری شد. در ادامه، محاسبه تعداد کل گلبول های سفید با استفاده از لام نئوبار و رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده ناتهریک انجام شد.

از یک صدم میلی گرم در لیتر و میزان نیترات کم تر از یک دهم میلی گرم در لیتر برای تمامی وان ها تنظیم شد. در ادامه، ماهیان به ۱۰ تیمار (هر تیمار در سه تکرار ۲۰ قطعه ای) به صورت تصادفی طبق جدول ۱ تقسیم گردیدند. ماهیان در مخازن ۳۰۰ لیتری به صورت مجزا با شرایط مناسب و نزدیک به شرایط طبیعی پرورش ماهی تیلاپیا آماده و به مدت ۶۰ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. برای ایمن سازی خوراکی، ماهی ها به مدت ۱۵ روز با خوراک حاوی ۱۰^۸ باکترین در هر گرم خوراک تغذیه شدند. تجویز پروبیوتیک بعد از تجویز واکسن به مدت یک ماه با باکتری باسیلوس سابتیلیس به میزان ۱۰^۸ در گرم خوراک انجام گردید.

جدول ۱: تیمار بندی 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 <i>S. iniae</i>	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment B	Immunized with <i>S. agalactiae</i>	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment C	Immunized with dual vaccine	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment D	Immunized with <i>S. iniae</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment E	Immunized with <i>S. agalactiae</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment F	Immunized with dual vaccine and <i>Bacillus subtilis</i>	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment G	Immunized with microencapsulated <i>S. iniae</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment H	Immunized with microencapsulated <i>S. agalactiae</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	20 pieces (in 3 repetitions)
Treatment I	Immunized with dual microencapsulated vaccine and <i>Bacillus subtilis</i>	20 pieces (in 3 repetitions)

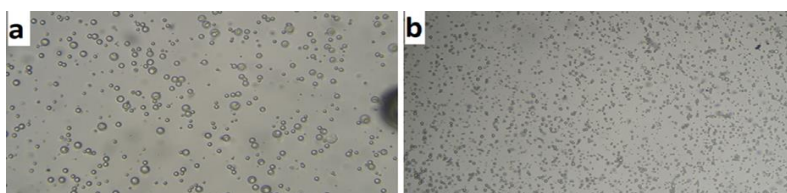
اندازه گیری آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه و استرپتوکوکوس آگالاکتیه: اندازه گیری تیتراژ آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس آگالاکتیه و اینیه به روش الایزای غیر مستقیم انجام شد (۱۲). ابتدا آنتی ژن (باکتری سونیکه) به کف گوده ۹۶ خانه ای کوت گردید، سپس نمونه سرمی به آن اضافه شد. در مرحله بعد، آنتی بادی ثانویه یعنی آنتی سرم تیلاپیا در خرگوش (Rabbit anti tilapia Ab) اضافه گردید. مرحله بعد اضافه نمودن آنتی بادی کونژوگ ضد ایمونوگلوبولین خرگوش بود

داخل صفاقی، مورد چالش قرار گرفته و تلفات به مدت 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 ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) بیان شد.

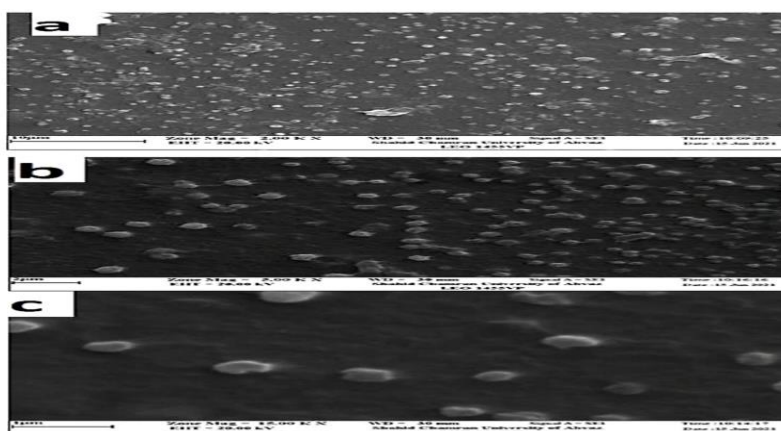
نتایج

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 به‌طوری‌که در تصاویر مشاهده می‌گردد پوشش دهی باکترین به خوبی انجام شده و ساختار پوشش آلژینات کیتوزان روی باکترین به خوبی 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

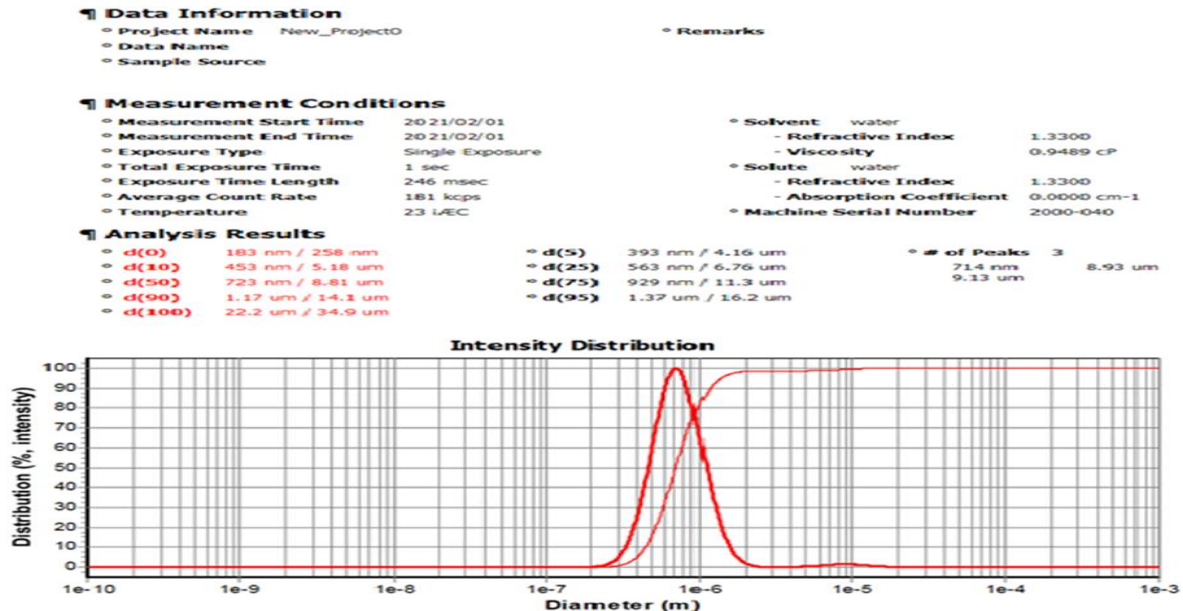


شکل ۲: تصاویر SEM از ریزکپسول‌های واکسنی تولید شده با آلژینات-کیتوزان، a: بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰ برابر، b: بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰ برابر، c: بزرگ‌نمایی ۱۵۰۰۰ برابر

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

همان‌طورکه در تصویر مشخص است میانگین قطر ۵۰ درصد از میکروسفرهای تشکیل شده بین از حدود ۰/۷۳ تا ۸/۱۸ میکرومتر است.

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.

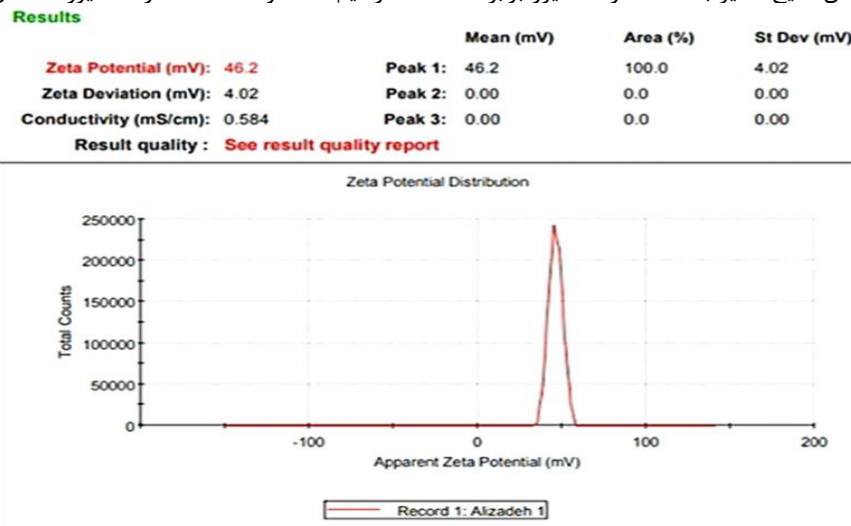


شکل ۳: نتیجه سایز ذرات محصول ریزپوشانی شده با آلژینات - کیتوزان (خروجی دستگاه PSA)

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

۴۶/۲ میلی‌ولت تعیین شد که در اطلاعات خروجی دستگاه و نمودار ترسیم شده توسط دستگاه زتا آنالایزر مشخص است (شکل ۴).

اندازه‌گیری پتانسیل زتا: میزان پتانسیل زتای ذرات واکسن کلونیدی ایجاد شده بر اساس نتایج آنالیز با دستگاه زتا آنالایزر برابر

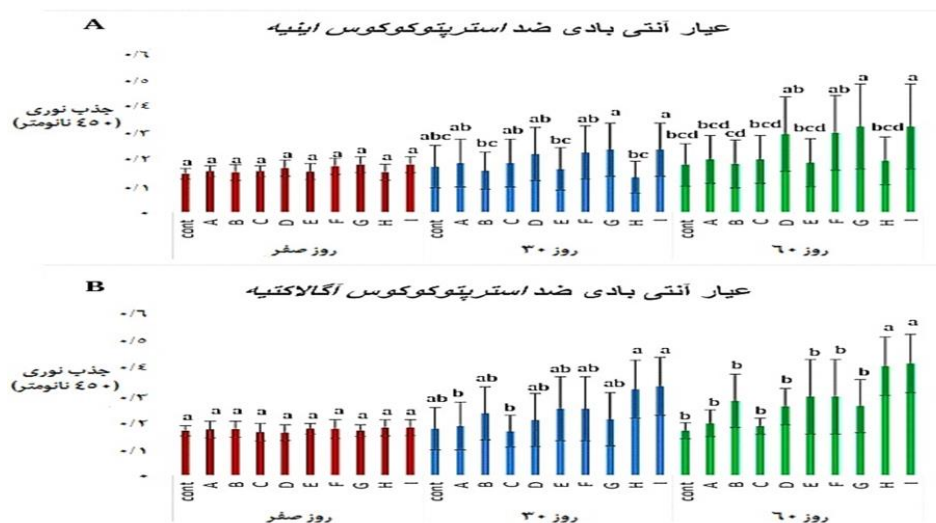


شکل ۴: پتانسیل زتای میکروکپسول‌ها به روش امولسیون خارجی با استفاده از آلژینات (با ویسکوزیته متوسط) و کیتوزان (با وزن مولکولی پایین). pH محلول آلژینات و کیتوزان ۳/۵ بود.

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.

ساقه دمی خونگیری به عمل آمد. نتایج عیار آنتی‌بادی با محاسبه جذب نوری نمونه‌ها در نمونه‌های سرمی ماهیان گروه‌های مختلف به‌وسیله الایزای غیرمستقیم در شکل ۵ خلاصه شده است.

تیتراژ پادتن: همان‌طورکه در روش کار بیان شد، در روز صفر (قبل از ایمن‌سازی) و هفتمین‌طور روز ۳۰ و ۶۰ پس از ایمن‌سازی، جهت بررسی سطح آنتی‌بادی سرم، پس از بی‌هوشی ماهیان، از ورید



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 انحراف معیار 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 سابیتیلیس; E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابیتیلیس; F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابیتیلیس; G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس; H: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس; I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس; 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.

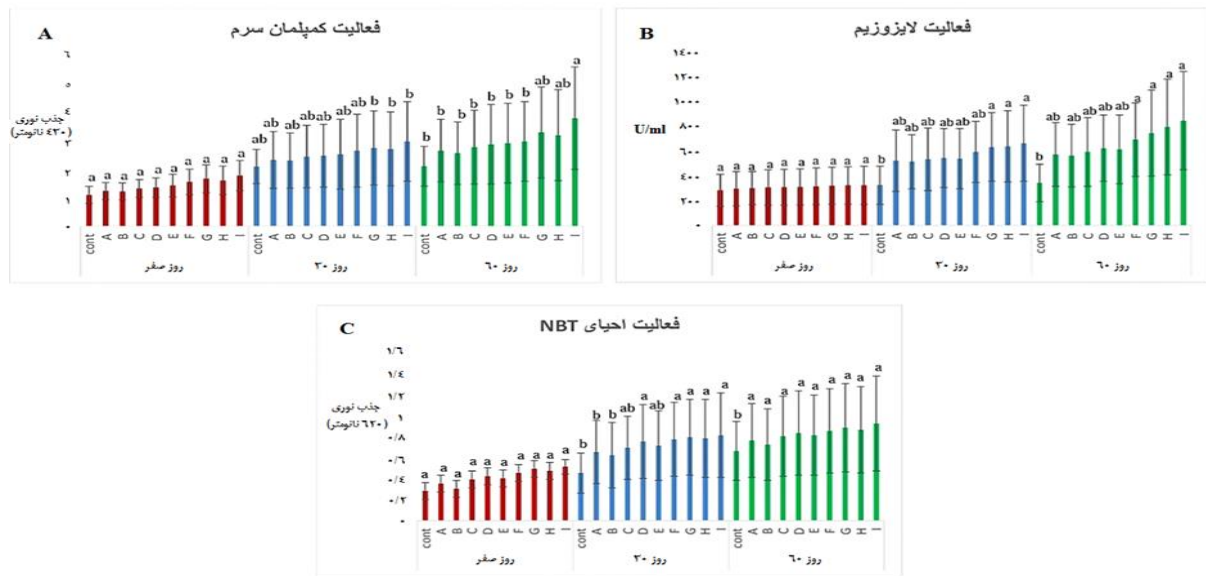
احیای NBT: احیای NBT در روز ۳۰ تحقیق به جز گروه‌های A و B، افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد ($p < 0.05$). در روز ۶۰ در تمام تیمارها افزایش معنی‌دار NBT مشاهده شد ($p < 0.05$) (شکل ۶C).

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 به جز 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 G، F، H و I بود که با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).

عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه در هیچ کدام 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 هیچ کدام 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 معنی‌داری را بین تیمارهای گروه G، H و I با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۶A).

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 ۶B).



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 انحراف معیار 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 سابیتیلیس، E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابیتیلیس، F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابیتیلیس، G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس، H: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس، I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس. 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	Control	2.9±0.14 ^a	1.15±0.27 ^a	1.46±0.17 ^a
	A	2.2±0.08 ^{ab}	0.5±0.23 ^{ab}	1.4±0.23 ^{bc}
	B	2.34±1.3 ^b	1.08±0.7 ^{bcd}	1.26±0.77 ^d
	C	3.18±0.04 ^a	1.06±0.05 ^{bcd}	2.12±0.04 ^{ab}
	D	3.03±0.25 ^{ab}	0.76±0.15 ^{cd}	2.26±0.11 ^a
	E	2.85±0.05 ^{ab}	0.92±0.05 ^{bcd}	1.92±0.09 ^{abc}
	F	2.62±0.08 ^{ab}	0.98±0.16 ^{bcd}	1.64±0.11 ^{cd}
	G	3.14±0.27 ^a	0.56±0.05 ^a	1.58±0.25 ^{cd}
	H	2.88±0.13 ^{ab}	0.98±0.04 ^{bcd}	1.8±0.1 ^{abc}
	I	2.56±0.25 ^{ab}	0.66±0.11 ^d	1.8±0.17 ^{abc}
30 Day	Control	2.78±0.25 ^{ab}	1.1±0.18 ^{bc}	1.9±0.08 ^{bcd}
	A	2.82±0.2 ^b	0.9±0.34 ^b	1.77±0.28 ^b
	B	2.23±0.6 ^a	1.52±0.69 ^a	1.72±0.25 ^b
	C	2.8±0.49 ^{ab}	1.28±0.38 ^{ab}	1.52±0.25 ^b
	D	2.94±0.34 ^{ab}	1.18±0.48 ^{ab}	1.76±0.27 ^b
	E	2.55±0.37 ^{bc}	1.1±0.28 ^{ab}	1.45±0.19 ^b
	F	2.54±0.24 ^{bc}	1.18±0.41 ^{ab}	1.36±0.35 ^b
	G	2.82±0.3 ^{ab}	1.55±0.4 ^a	1.85±0.34 ^{ab}
	H	2.17±0.29 ^c	1.69±0.15 ^a	1.86±0.29 ^{ab}
	I	3.3±0.27 ^{ab}	1.87±0.28 ^a	1.92±0.46 ^a
60 Day	Control	3.42±0.27 ^a	1.98±0.2 ^a	1.96±0.2 ^a
	A	2.82±0.2 ^b	0.9±0.34 ^b	1.77±0.28 ^b
	B	2.23±0.6 ^a	1.52±0.69 ^a	1.72±0.25 ^b
	C	2.8±0.49 ^{ab}	1.28±0.38 ^{ab}	1.52±0.25 ^b
	D	2.94±0.34 ^{ab}	1.18±0.48 ^{ab}	1.76±0.27 ^b
	E	2.55±0.37 ^{bc}	1.1±0.28 ^{ab}	1.45±0.19 ^b
	F	2.54±0.24 ^{bc}	1.18±0.41 ^{ab}	1.36±0.35 ^b
	G	2.82±0.3 ^{ab}	1.55±0.4 ^a	1.85±0.34 ^{ab}
	H	2.17±0.29 ^c	1.69±0.15 ^a	1.86±0.29 ^{ab}
	I	3.3±0.27 ^{ab}	1.87±0.28 ^a	1.92±0.46 ^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 سابیتیلیس، E: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* و باسیلوس سابیتیلیس، F: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه و باسیلوس سابیتیلیس، G: تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس، H: تیمار ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس، I: تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس. 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.

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 به جز A و B، افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد ($p < 0.05$). در روز ۶۰ نمونه‌گیری، افزایش معنی‌داری در تیمارهای F، G، H و I نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$). در سطح هموگلوبین و در روز ۳۰ نمونه‌گیری علارغم افزایش نسبی اما تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). اما در روز ۶۰ تحقیق، اختلاف

معنی‌دار بین تمام تیمارها نسبت به کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$). بررسی‌ها نشان داد 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 (ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) بوده که در تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p < 0.05$).

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 (10^3)
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
60 Day	I	85.4±0.57 ^a	7.78±2.66 ^a	18.88±2.3 ^a
	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 ۰/۰۵ 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: تیمار 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 ($p < 0.05$). ضریب رشد ویژه (SGR) در روز ۳۰، تفاوت معنی‌داری در هیچ کدام از گروه‌ها نسبت به کنترل نشان نداد ($p > 0.05$). اما در روز ۶۰ تحقیق، افزایش معنی‌داری در تیمارهای G، H و I نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$). درصد افزایش وزن (WGP) در روز ۳۰، علی‌رغم افزایش

نسبی در تمام گروه‌ها اما اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($p > 0.05$). اما در روز ۶۰، افزایش معنی‌داری در تیمار I نسبت به کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$).

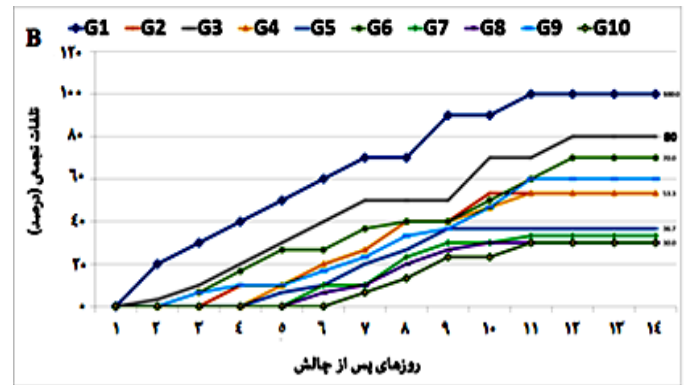
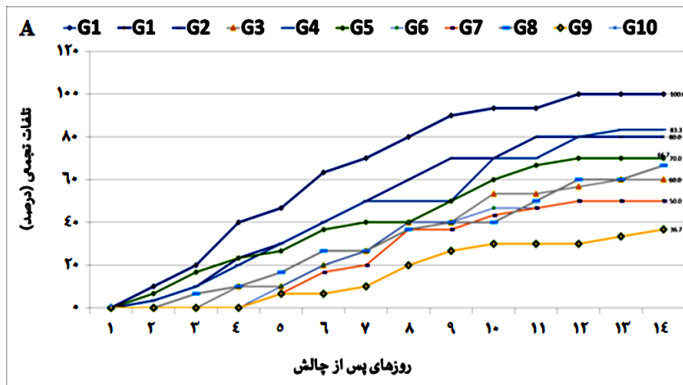
چالش باکتریایی: نتایج مربوط به چالش باکتریایی تمام تیمارهای

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 ($LD_{50} = 1/7 \times 10^7$ CFU/ml) و استرپتوکوکوس اینیه ($LD_{50} = 1/3 \times 10^6$ CFU/ml) به روش تزریق داخل صفاقی، چالش داده شدند.

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}
60 Day	I	0.89±0.1 ^a	0.56±0.27 ^a	12.5±1.8 ^a
	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 iniae* (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*

با باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیه نشان داد که کم‌ترین میزان تلفات مربوط به تیمارهای G8 (تیمار ایمن شده با *S. iniae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس) و G10 (تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس)، هر دو با ۳۰٪ بود که نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰٪) کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$).

بررسی‌ها نشان داد 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 ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس)، هر دو با ۳۶/۷٪ بود که نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰٪) کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$). در ادامه، مقایسه روند تلفات بعد از چالش

بحث

تقویت سیستم ایمنی از طریق واکسیناسیون و به‌کارگیری ترکیبات محرک ایمنی نظیر پروبیوتیک‌ها که خاصیت ضدباکتریایی دارند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌تراپی 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 سابیتیلیس 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 مطالعه‌ای 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 سین بیوتیک، قابلیت تأثیرگذاری بالایی بر افزایش کارایی دستگاه گوارش به لحاظ جایگزینی پروبیوتیکی و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی دارد (۲۳). یکی از معایب واکسن‌های خوراکی، تغییر ماهیت واکسن در شرایط معده و روده ماهی قبل از جذب است. سیستم دارورسانی با استفاده از مواد پلیمری طبیعی قابل تجزیه 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 عکس‌های فاز کنتراست و میکروسکوپ الکترونی و اندازه‌گیری 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 اکتیو با استفاده از تکنیک ریزپوشانی با نانوذرات آلژینات در غذا گزارش شده است (۲۲). آن‌ها 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 حد ۴۴ میلی‌ولت 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 سابیتیلیس، *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس و تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش فعالیت نشان دادند ($p < 0.05$). در تحقیقی مشابه، اولیگونوکلید 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 سابیتیلیس مشاهده گردید. در تحقیقی مشابه، افزایش میزان گلوبولین سرم را در ماهی به‌دنبال 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، پروتازها و آنتی‌بادی‌های طبیعی باشد (۱۳). نتایج این تحقیق نشان داد که بیش‌ترین فعالیت احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) که شاخصی برای نشان دادن فعالیت بیگانه‌خواری لکوسیت‌های ماهی است، هم در روز ۳۰ و هم در روز ۶۰ در تیمار واکسن خوراکی دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابیتیلیس مشاهده گردید که به‌طور معنی‌داری 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

بیگانه‌خوار استفاده می‌شود (۵). در این تحقیق افزایش احیای NBT می‌تواند به دلیل افزایش تعداد و فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار سیستم دفاعی ماهی باشد. این افزایش بیگانه‌خواری یا به دلیل اثرات اپسونین لیپوپلی‌ساکارید، پروتئین‌های ایمنی، به‌ویژه پپتیدهای ضد میکروبی، اجزای کمپلمان و نیز پادتن‌ها ایجاد شده و یا به دلیل 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 نیتروبولوتترازولیوم و افزایش جذب نوری بوده است. در ادامه، فعالیت کمپلمان سرم، تحت تأثیر 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. به نظر 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 آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس اینیه در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی، در تیمارهای ایمن شده 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 قزل‌آلای ایمن شده به روش 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 آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس آگالاکتیه در ماهی تیلایای قرمز بعد از واکسیناسیون تزریقی علیه این باکتری گزارش شده است (۱۵). ولی در مورد تأثیر واکسن خوراکی محافظت شده بر عیار آنتی‌بادی گزارشات نسبتاً کم و محدود است. در این پژوهش، عیار آنتی‌بادی ضد استرپتوکوکوس آگالاکتیه بعد از واکسیناسیون خوراکی در سه مرحله نمونه‌گیری اندازه‌گیری شد که میزان آنتی‌بادی در روز ۶۰ پس از ایمن‌سازی و در تیمارهای ایمن شده با *S. agalactiae* ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس و تیمار ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p < 0.05$). در توجیه

افزایش عیار پادتن به دنبال ایمن سازی به روش خوراکی، می‌توان به نقش ایمنی مخاطی در آزمون 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 آگالاکتیه و استرپتوکوکوس اینیه ریزپوشانی شده با ریزذرات آلژینات / کیتوزان به همراه پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس در ماهی تیلایا بهبود معنی‌دار کارایی واکسن را باعث شده است، به‌طوری‌که 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 معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$). تحقیقات پیشین نشان داده است که استفاده از واکسن دوگانه استرپتوکوکوس اینیه و آگالاکتیه در ماهی تیلایا منجر به ایمنی متقاطع بین این دو باکتری شده است (۳۴). به نظر می‌رسد یافته مهم تحقیق جاری محافظت قابل قبول ایمنی حدود ۷۰٪ در تیمارهای ایمن شده به روش 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 رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) صورت گرفت و ماهی‌هایی که در رژیم غذایی خود دارای پروبیوتیک بودند، افزایش معنی‌داری از نظر میزان رشد و ویژه، میزان کارایی پروتئین و درصد افزایش وزن نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۲۷). در تحقیق جاری بهبود شاخص‌های رشد تحت تأثیر واکسیناسیون ماهی تیلایا 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 پروبیوتیک 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

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/dao02 6139
 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., Sudhakarn, 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
- نسبت به کنترل در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده شد ($p < 0.05$). 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 ایمن شده با واکسن دوگانه ریزپوشانی شده و باسیلوس سابتیلیس بوده که در تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p < 0.05$). در مطالعات متعددی بهبود شاخص‌های خونی به دنبال 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 ایمنی‌زایی متقاطع ۷۰٪ در چالش با باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیه و ایمنی‌زایی ۶۳/۳٪ را در چالش 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 (*Oncorhynchus 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

- 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 β -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 Machado, 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 β glucan and mananoligosaccharide with *Lactobacillus casei* on some gastrointestinal 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 (*Oncorhynchus 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.