Informatics in Biology, Health, and Food

Interdisciplinary Explorations in Life Science

Volume 2. Number 2. Dec. 2025 DOI: 10.22034/ibhf.2025.556898.1042

Original Article

Evaluation of the efficacy of an oral vaccine based on a native *Vibrio harveyi* strain in Asian seabass (Lates calcarifer)

Mahboubeh Mousavi[1], Mohammad Mehdi Namavari[1]*, Zahra Khabazan[1], Saeid Hassanpour[2]

[1] Simia Vaccine Company Shiraz, Growth Center of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran

[2] Department of Fisheries Science and Engineering, Faculty of Nano and Biological Technology, Bushehr Branch, Persian Gulf University, Iran.

Received: 2025/11/02 **Accepted:** 2025/12/05 **Online Published:** 2025/12/05

Abstract

Vibriosis caused by *Vibrio harveyi* is a significant disease in Asian sea bass, leading to massive mortality, reduced growth, and considerable economic losses in aquaculture. This study aimed to evaluate the efficacy of an oral vaccine containing inactivated *Vibrio harveyi* with nanochitosan as an adjuvant on the immunity and survival of Asian sea bass. A total of 180 fingerlings (average weight 10 g) were divided into three groups: a control group (non-vaccinated), a group vaccinated with nanochitosan-adjuvanted vaccine, and a group vaccinated without adjuvant. Oral vaccination was administered in two rounds (days 0 and 14), with each round consisting of three daily feedings. All groups were maintained under identical conditions for 12 weeks and fed daily at a rate of 4% of their body weight. On day 70, a pathogen challenge was conducted via intraperitoneal injection of live *Vibrio harveyi*, and mortality was recorded over 7 days. The group receiving the nanochitosan-adjuvanted vaccine exhibited a stronger immune response ($p < 0.05$), higher survival, and improved growth compared to the control group. This study is one of the first in Iran to use a native strain of *Vibrio harveyi* and oral nanochitosan as an adjuvant, representing key innovations. The findings highlight the potential of the nanochitosan-adjuvanted oral vaccine in controlling vibriosis and may pave the way for future research into developing effective oral vaccines for aquaculture.

Keywords: *Vibrio harveyi*, Vaccine, Asian seabass, Nano-chitosan, Adjuvant

Cite this article: Mousavi M., Namavari M.M., Khabazan Z, Hassanpour S. Evaluation of the efficacy of an oral vaccine based on a native Vibrio harveyi strain in Asian seabass (Lates calcarifer). *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(2):11-23.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Mohammad Mehdi Namavari **Email**: namavari@yahoo.com.

انفورماتیک در زیست‌شناسی، بهداشت و غذا

کاوش‌های بین رشته‌ای در علوم زیستی

دوره ۲. شماره ۲. آذر ۱۴۰۴ DOI: 10.22034/ibhf.2025.556898.1042

مقاله پژوهشی

ارزیابی واکسن خوراکی *ویبریو هاروی* تهیه شده از سویه بومی در ماهی سی‌بس آسیایی

محبوبه موسوی[۱]، محمد مهدی نام آوری[۱*]، زهرا خبازان[۱] ، سعید حسن پور[۲]

[۱]شرکت سیمیا واکسن شیراز، مرکز رشد موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شیراز، ایران

[۲] گروه علوم و مهندسی شیلات - دانشکده علوم و فناوری نانو و زیستی- واحد بوشهر- دانشگاه خلیج فارس

دریافت: ۱۴۰۴/۸/۱۱ **پذیرش:** ۱۴۰۴/۹/۱۴ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۴/۹/۱۴

چکیده

ویبریوز ناشی از *ویبریو هاروی* یکی از بیماری‌های مهم در ماهی سی‌بس آسیایی است که منجر به تلفات گسترده، کاهش رشد و خسارات اقتصادی قابل توجه در آبزی‌پروری می‌شود. این مطالعه با هدف ارزیابی اثربخشی واکسن خوراکی کشته شده *ویبریو هاروی* با ادجوانت نانوکیتوزان بر ایمنی و بقای ماهی سی‌بس آسیایی انجام شد. تعداد ۱۸۰ بچه ماهی (میانگین وزن ۱۰ گرم) به سه گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (بدون واکسن)، گروه واکسینه شده با نانوکیتوزان و گروه واکسینه شده بدون ادجوانت. واکسیناسیون خوراکی در دو نوبت (روزهای صفر و ۱۴) و در هر نوبت به‌صورت سه بار تغذیه در روز صورت گرفت. همه گروه‌ها به مدت ۱۲ هفته در شرایط یکسان نگهداری و روزانه معادل ۴ درصد وزن بدن تغذیه شدند. در روز ۷۰، چالش بیماری‌زایی بصورت تزریق صفاقی باکتری زنده ویبریو هاروی به ماهیان انجام شد و تلفات طی ۷ روز ثبت گردید. گروه دریافت‌کننده واکسن با نانوکیتوزان پاسخ ایمنی قوی‌تر ($p<0.05$)، بقای بالاتر و رشد بهتری نسبت به گروه کنترل داشت. این مطالعه یکی از اولین پژوهش‌ها در ایران است که از سوش بومی *ویبریو هاروی* و نانوکیتوزان خوراکی به‌عنوان ادجوانت استفاده کرده و نوآوری‌های کلیدی آن محسوب می‌شوند. این یافته‌ها نشان‌دهنده پتانسیل واکسن خوراکی با نانوکیتوزان در کنترل ویبریوز است و می‌تواند راهگشای تحقیقات آینده برای توسعه واکسن‌های خوراکی مؤثر در آبزی‌پروری باشد.

کلمات کلیدی: *ویبریو هاروی*، واکسن، ماهی سی‌بس، نانوکیتوزان، ادجوانت

Cite this article: Mousavi M., Namavari M.M., Khabazan Z., Hassanpour S. Evaluation of the efficacy of an oral vaccine based on a native Vibrio harveyi strain in Asian seabass (Lates calcarifer). *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(2):11-23.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Mohammad Mehdi Namavari **Email**: namavari@yahoo.com.

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری سریع‌ترین رشد را در میان صنایع غذایی جهان تجربه می‌کند. تولید آبزیان از مزارع کوچک تا مجتمع‌های متراکم را شامل می‌شود و دامنه توزیع آن از سطح محلی تا بین‌المللی گسترده است. افزایش تراکم جمعیت ماهی یکی از اهداف اصلی آبزی‌پروری است؛ با این حال، تراکم بالا باعث افزایش شیوع بیماری‌های عفونی می‌شود. یکی از مهم‌ترین این بیماری‌ها، ویبریوز است که صنعت آبزی‌پروری را تحت تأثیر قرار می‌دهد و خسارات اقتصادی قابل توجهی به همراه دارد (۱).

ویبریوها طیف وسیعی از جانداران دریایی، به ویژه ماهی‌ها، میگوها و صدف‌های دریایی را آلوده می‌کنند. این باکتری‌ها گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، متحرک، خمیده‌شکل و دارای یک تاژک قطبی هستند و در محیط‌های آبی، به‌ویژه آب‌های شور، یافت می‌شوند. ویبریوها در حضور ۴–۲ درصد نمک به‌خوبی رشد می‌کنند و تا غلظت ۸ درصد نمک را تحمل می‌کنند (۲). اگرچه گونه‌های مختلف ویبریو می‌توانند عامل ویبریوزیس در ماهیان دریایی باشند، اما *ویبریو هاروی* (*vibrio harveyi*) به‌عنوان عامل اصلی در مزارع پرورش ماهی سی‌بس آسیایی گزارش شده است (۱, ۳ و ۴). ماهی‌های آلوده طیف وسیعی از ضایعات را نشان می‌دهند، شامل ضایعات چشمی یا کوری، گاستروانتریت، نکروز عضلانی، زخم‌های پوستی، فلس‌ریزی و پوسیدگی باله (۵). بزرگ‌ترین جمعیت آبزیان در معرض این بیماری، ماهیان سی‌بس آسیایی و میگوها هستند (۶-۸). طبق گزارش‌ها، خسارت اقتصادی ناشی از ویبریوز در مالزی در سال ۱۹۹۰ حدود ۷/۴ میلیون دلار بوده است (۱). در ایران نیز، تلفات روزانه ۳–۲ درصد در فرم مزمن و تلفات ۸۰ درصدی طی ۳ تا ۴ روز گزارش گردیده است (۹).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم شیمیایی روش سنتی کنترل باکتریایی است؛ اما به دلیل هزینه بالا، ایجاد مقاومت دارویی، اثرات زیست‌محیطی، کاهش کیفیت گوشت و مشکلات اجرایی، جایگزینی واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی مورد توجه قرار گرفته است (۱۰، ۱۱). واکسیناسیون یکی از مؤثرترین راهکارها برای افزایش ایمنی آبزیان است. با رشد صنعت آبزی‌پروری، استفاده از واکسن‌ها نیز گسترش یافته است. محدودیت‌های روش‌های تزریقی و غوطه‌وری در قفس‌های دریایی، موجب توجه به واکسن‌های خوراکی شده است. این روش مزایایی مانند سهولت تجویز، کاهش هزینه و استرس، و امکان استفاده در دوره‌های مختلف زندگی ماهی دارد. همچنین، با توجه به کوتاه بودن دوره پایداری سیستم ایمنی در ماهیان، نیاز به دوز یادآور وجود دارد که واکسیناسیون خوراکی این امکان را فراهم می‌کند (۱۲) .

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که واکسن‌های خوراکی ویبریو همراه با ادجوانت نانوکیتوزان در ماهی سی‌بس آسیایی مؤثر بوده و ایمنی قابل‌توجهی ایجاد کرده‌اند (۱۳). یکی از واکسن‌های خوراکی *ویبریو هاروی* مبتنی بر پیکره کامل باکتریایی، توسط محمد و همکاران در سال ۲۰۲۲ ارائه شد. این واکسن با ادجوانت روغن پالم، تلفات را کاهش داد و افزایش وزن ۲۲/۵۶ درصدی ایجاد کرد (۱۲).

با توجه به اهمیت واکسن‌های خوراکی و مشکلات ویبریوز در ماهیان سی‌بس و میگوهای پرورشی ایران، هدف از این پژوهش، ارزیابی یک واکسن آزمایشی خوراکی بر روی ماهی سی‌بس در سطح آزمایشگاهی می‌باشد. در این مطالعه، از باکتری کشته *ویبریو هاروی* (سوش بومی جداسازی‌شده توسط اژدری و همکاران و ادجوانت نانوکیتوزان داخلی استفاده شد (۱۴). نانوکیتوزان به واسطه ویژگی‌هایی مانند تحریک مؤثر سیستم ایمنی، پایداری بالا در شرایط معده، و توانایی حفاظت از آنتی‌ژن در برابر تخریب، به‌عنوان ادجوانت مؤثر در واکسن‌های خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵, ۱۶). همچنین، کیتوزان در واکسن‌های انسانی مانند واکسن خوراکی اسهال ویروسی و واکسن داخل دماغی آنفلوانزا نیز کاربرد دارد (۱۷, ۱۸). در مطالعه ای که توسط علیشاهی و همکاران (۲۰۱۸) انجام گرفت، استفاده از نانوکیتوزان به‌عنوان ادجوانت در واکسن کشته *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور، منجر به افزایش معنی‌دار تیتر آنتی‌بادی و فاکتورهای ایمنی گردید (۱۹). با وجود مطالعات پیشین بر روی ادجوانت‌های مختلف، پژوهش‌های معدودی به طور همزمان بر روی استفاده از یک سوش بومی بیماری‌زا و یک ادجوانت نانویی مقرون‌به‌صرفه و داخلی (مانند نانوکیتوزان) در قالب یک واکسن خوراکی برای ماهی سی‌بس متمرکز شده‌اند. بنابراین، شکاف دانشی در زمینه ارائه یک فرمولاسیون واکسن خوراکی کاملاً بومی، کارآمد و عملی برای مقابله با ویبریوز در صنعت آبزی‌پروری ایران وجود دارد. این مطالعه با هدف پر کردن این شکاف و با مأموریت بررسی اثربخشی واکسن خوراکی حاوی نانوکیتوزان علیه بیماری ویبریوز ناشی از یک سوش بومی در ماهی سی‌بس طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری ماهی

تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی سی‌بس(Lates calcarifer) با میانگین وزن ۱۰ گرم از مراکز پرورش ماهی دریایی (راموز، نیکسا) تهیه شد. برای اطمینان از سلامت و سازگاری، ماهیان به‌مدت ۱۰ روز در تانک های حاوی آب دکلره و هوادهی‌شده نگهداری و دراین دوره، سه بار در روز با غذای تجاری (شرکت بیضاء، استان فارس) تغذیه شدند. دمای آب حدود ۲۸ درجه سانتی‌گراد، شوری ۲۰ pptو PH برابر۷/۵ ثابت نگه داشته شد (۲۰). این پژوهش با اخذ مجوز از کمیته اخلاق در پژوهش‌های جانوری (کد اخلاق: IR.IAU.R.REC.1402.038) و با رعایت کامل اصول اخلاقی انجام گردید.

تهیه واکسن غیرفعال

باکتری بر روی محیط TSB حاوی ۱/۵٪ NaCl در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm به‌مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس، بر روی محیط TCBS آگار به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردید (۱۲). باکتری‌های در فاز لگاریتمی با افزودن فرمالین به غلظت نهایی ۰/۵درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شدند (۱۲). سوسپانسیون چهار بار با PBS استریل شسته و دردور ۶۰۰۰ rpm، ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. غلظت نهایی بر اساس روش مک‌فارلند برابر ۵×۱۰^{۶} CFU/g (واحد تشکیل کلنی درهر گرم) تنظیم شد (۱۲, ۲۱, ۲۲). برای تأیید غیرفعال‌سازی، بخشی از سوسپانسیون بر روی TSA حاوی ۱/۵ درصدNaCl کشت داده شد و عدم رشد پس از ۲۴ ساعت انکوبه بررسی گردید (۱۲).

تأیید مولکولی سویه باکتریایی

به منظور تأیید هویت مولکولی سوش بومی *ویبریو هاروی* مورد استفاده در این مطالعه، آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با پرایمرهای اختصاصی ژن همولیزین (Vhh) انجام گرفت (جدول ۱) (۲۳،۲۴). DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج تجاری DNP، شرکت سیناکلون (بر اساس دستورالعمل سازنده) استخراج شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط آماده PCR 2X (شرکت سیناکلون، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده (تقریباً ۵۰ نانوگرم) و ۸/۵ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز (DNase/RNase- free water)انجام شد. واکنش در ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با برنامه دمایی زیر اجرا گردید: دناتوراسیون اولیه در ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه؛ متعاقباً ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه؛ و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه. محصولات PCR همراه با لِدر ۱۰۰ جفت باز (شرکت سیناکلون) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی ماده رنگ‌آمیزی Safe Stain (شرکت سیناکلون) الکتروفورز شدند. باندهای DNA تحت نور UVدر دستگاه ثبت تصویر ژل (کوداک، آمریکا) مشاهده و عکسبرداری شدند. ظهور یک باند اختصاصی در اندازه ۲۱۵ جفت باز (bp) به عنوان تأیید مثبت حضور *ویبریو هاروی* در نظر گرفته شد.

تهیه ادجوانت نانوکیتوزان

برای تهیه نانوکیتوزان، از روش ژلاسیون یونوتروپیک استفاده شد (۲۵). بدین منظور، ۰/۲گرم پودر کیتوزان (تهیه شده از شرکت ایران کیتوزان) در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱درصد حل و به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شد. سپس محلول فیلتر شده و محلول تری‌پلی‌فسفات‌سدیم (STPP) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان عامل اتصال‌دهنده، تهیه و به نسبت ۱:۸ به محلول کیتوزان افزوده شد. مخلوط ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰ rpm همگن گردید (۲۷-۲۵). pH به ۴/۸ – ۴/۶ با NaOH تنظیم شد (۲۸). پس از افزودن آنتی‌ژن، مخلوط ۳۰-۴۰ دقیقه هموژنایز گردید (۲۹،۳۰).

فرمولاسیون نانوکیتوزان-آنتی‌ژن

نانوکیتوزان به میزان ۱۰ درصد از کل آنتی‌ژن افزوده و همگن شد (۱۲, ۲۵, ۳۱). یکنواختی پوشش با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل TESCAN-Vega3 بررسی گردید. سوسپانسیون به‌صورت اسپری بر روی غذای تجاری اعمال و ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (۳۲،۳۳).

تست ایمنی (Safety)

برای اطمینان از بی‌خطر بودن واکسن تهیه شده، دوز ۵×۱۰^{۶} CFU/fish(۱۰۰ میکرولیتر) به ۲۰ قطعه ماهی تزریق صفاقی شد. ماهیان ۱۴ روز از نظر عوارض جانبی (تغییرات رفتاری، بی‌حالی، کاهش اشتها) پایش شدند (۳۴،۳۵).

تیماربندی و ایمن سازی ماهی ها

ماهیان به‌طور تصادفی به سه گروه (هر گروه ۳ تکرار، هر تکرار ۲۰ ماهی) تقسیم شدند و در آکواریوم‌های شیشه‌ای با شرایط فیزیکوشیمیایی یکسان نگهداری شدند. پیش از ایمن‌سازی، ۲۴ ساعت گرسنگی اعمال شد (۲۰). ایمن سازی گروه‌ها به صورت زیرانجام گرفت:

گروه کنترل: تغذیه با غذای معمولی بدون واکسن، گروه واکسن + نانوکیتوزان: تغذیه با واکسن خوراکی *ویبریو هاروی* حاوی

ادجوانت نانوکیتوزان، گروه واکسن بدون نانوکیتوزان: تغذیه با واکسن خوراکی *ویبریو هاروی* بدون ادجوانت (۱۹).
پس از خشک شدن غذاها به مدت دو روز در دمای اتاق، ماهیان در روزهای ۰ و ۱۴، سه نوبت در روز و با احتساب ۴ درصد وزن بدن، واکسن خوراکی با دوز 5×10^{6} CFU/g را دریافت نمودند (۱۲،۳۵).

بررسی رشد و افزایش وزن: میانگین وزن در هر گروه به صورت هفتگی به مدت ۶۰ روز اندازه‌گیری و ثبت گردید (۳۶،۳۷).

خون‌گیری و آزمون آگلوتیناسیون

در روزهای ۰، ۲۸ و ۴۲ به صورت تصادفی از تعدادی از ماهیان هر گروه، خون‌گیری انجام و سرم جداسازی شد. برای این منظور، ماهیان با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده بیهوشی MS222 بیهوش شده و نمونه خون از ساقه دمی با استفاده از سرنگ‌های هپارینه‌ی استریل جمع‌آوری گردید. از هپارین سدیم بعنوان ماده ضد انعقاد استفاده شد. نمونه‌های خون به منظور جداسازی سرم، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سرم‌های جداسازی شده در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون نگهداری شدند. عیار آنتی‌بادی علیه *ویبریو هاروی* با روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی (MAT) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی اندازه‌گیری گردید (۳۸). به طور خلاصه، سرم‌ها با سری‌های رقت دوبرابری در بافر فسفات سالین (PBS) رقیق شده و با سوسپانسیون باکتری غیرفعال شده با فرمالین (در غلظت نهایی 10^{8} سلول در میلی‌لیتر) مخلوط شدند. پلیت‌ها پس از اختلاط، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عیار آنتی‌بادی به‌عنوان بالاترین رقتی از سرم تعریف شد که واکنش آگلوتیناسیون قابل مشاهده (تشکیل دانه‌های قابل رؤیت) را نشان داد (۱۹).

چالش با باکتری زنده

۷۰ روز پس از ایمن سازی، چالش با باکتری زنده *ویبریو هاروی* با تزریق صفاقی 1×10^{7} CFU/fish (۲۰۰ میکرولیتر) انجام شد. تلفات ۷ روز ثبت و نمونه‌برداری پاتولوژیک صورت گرفت (۳۵،۳۹).

برای ارزیابی و مقایسه بقای ماهیان پس از چالش، منحنی‌های بقا با روش Kaplan-Meier رسم شدند و تفاوت بین گروه‌ها با آزمون Log-rank بررسی گردید. رویداد (Event) در این مطالعه، مرگ ماهی در دوره پس از چالش تعریف شد و ماهیانی که تا پایان دوره زنده ماندند، به‌عنوان سانسور شده (Censored) منظور شدند.

شکل ۱. تزریق صفاقی میکروب زنده *ویبریو هاروی* به ماهی سی‌بس آسیایی

Figure 1. Intraperitoneal injection of live *Vibrio harveyi* into Asian sea bass (Lates calcarifer).

تحلیل آماری

داده‌های رشد و تیتر آنتی‌بادی به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) ارائه شدند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه XX و آزمون ANOVA یک‌طرفه به همراه آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد. همچنین، جهت تحلیل داده‌های بقا، از روش Kaplan–Meier و آزمون Log-rank استفاده گردید.

نتایج

نتیجه PCR برای تشخیص باکتری *ویبریو هاروی*: آزمون PCR، باند ۲۱۵ bp (Vhh) را تأیید کرد.

جدول ۱. پرایمر اختصاصی استفاده شده برای تائید مولکولی باکتری *ویبریو هاروی*

Table 1. Specific primers used for the molecular confirmation of *Vibrio harveyi*

نام پرایمر	نام ژن	توالی پرایمر	طول باند(bp)	منابع
VHF(F)	Vhh	5´-TCAGTGCCTCTCAAGTAAGA-3´	۲۱۵	(۲۳)
VHR(R)		5´-GCTTGATAACACTTCGCGGT-3´		(۲۴)

تست استریلیتی و بررسی میکروسکوپ الکترونی

پس از ۴۸ ساعت انکوبه، هیچ گونه آلودگی مشاهده نشد. میکروسکوپ الکترونی توزیع مناسب نانوذرات را تایید کرد.

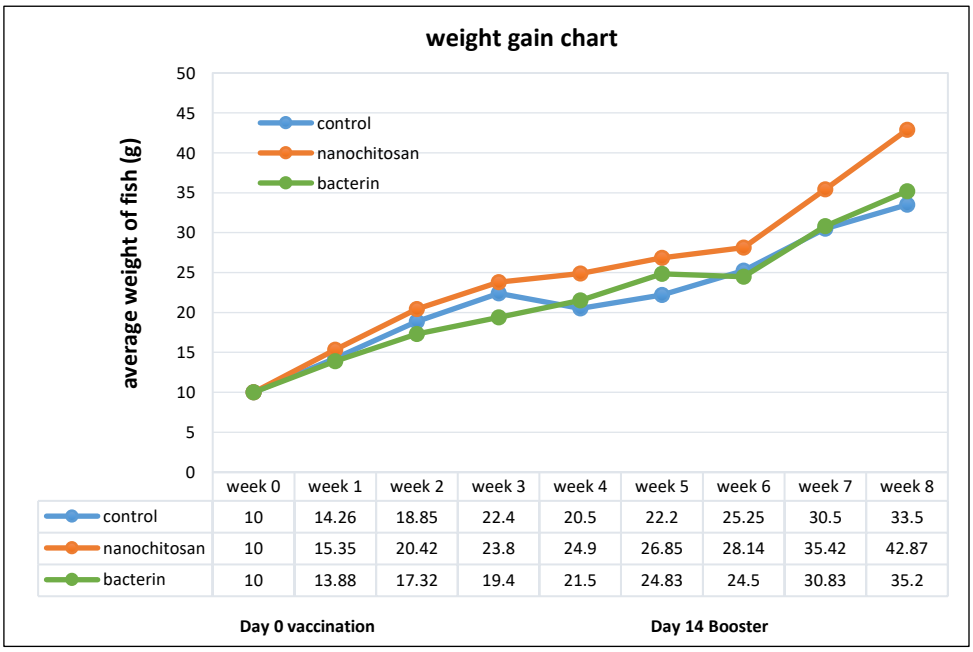
نتایج آزمون آگلوتیناسیون و ایمنی: در روز ۲۸ تیتر آنتی بادی در سرم ماهیان گروه واکسینه شده با ادجوانت نانوکیتوزان، به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه ها بود ($p < 0.05$). در مقابل، هیچ واکنش آگلوتیناسیونی در گروه کنترل مشاهده نشد (۳۹, ۴۰). بر اساس نتایج، عیار آنتی‌بادی ضد *ویبریو هاروی* در ماهی سی‌بس در گروه واکسینه شده با نانوکیتوزان ۵۱۲/۱ ± ۶۴، در گروه واکسینه شده بدون ادجوانت ۲۵۶/۱ ± ۳۲ و در گروه کنترل صفر بود .

در تست ایمنی، طی ۱۴ روز هیچ عارضه‌ای مشاهده نشد.

به منظور ارزیابی ایمنی واکسن، تزریق صفاقی (IP) آن با دوز ۵×۱۰^{۶} cfu/fish در تعدادی از ماهیان سی‌بس انجام شد. طی ۱۴ روز مشاهده، هیچ گونه علائم رفتاری غیرطبیعی شامل بی حالی، کاهش اشتها، بی‌قراری، تغییر رنگ، مرگ و میر یا سایرنشانه‌های بالینی مرتبط با تزریق IP گزارش نگردید. این نتایج مؤید بی‌خطر بودن واکسن بود.

بررسی رشد و افزایش وزن

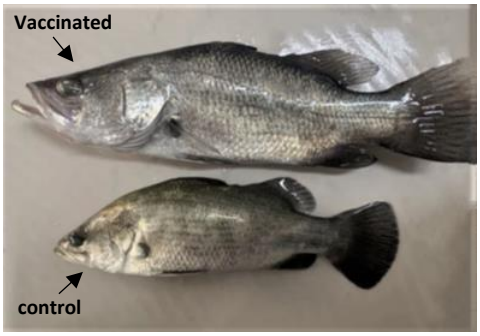
پس از ۶۰ روز، افزایش وزن در گروه واکسینه شده با نانوکیتوزان به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($p<0.05$). میانگین وزن نهایی در گروه واکسینه شده با نانوکیتوزان (۲۵/۳ ±۱/۲ گرم) در مقایسه با گروه کنترل (۱۸±/۴ ۰/۸ گرم) بود. گروه واکسینه شده بدون ادجوانت نیز با وزن نهایی ۲۰/۵ ± ۱/۰ گرم، وضعیت میانی داشت (شکل ۲و ۳).



	week 0	week 1	week 2	week 3	week 4	week 5	week 6	week 7	week 8
control	10	14.26	18.85	22.4	20.5	22.2	25.25	30.5	33.5
nanochitosan	10	15.35	20.42	23.8	24.9	26.85	28.14	35.42	42.87
bacterin	10	13.88	17.32	19.4	21.5	24.83	24.5	30.83	35.2

شکل ۲. نمودار افزایش وزن ماهیان سی‌بس مورد مطالعه در طول دوره واکسیناسیون (۶۰ روزه)

Figure 2. Weight gain of studied Asian sea bass (Lates calcarifer) during the 60-day vaccination period.

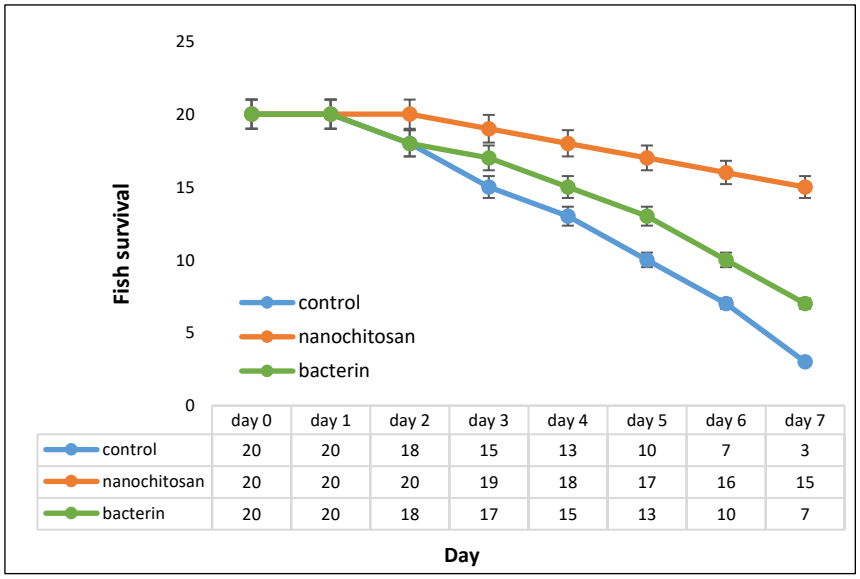


شکل ۳. مقایسه سایز ماهیان سی‌بس در گروه های واکسینه با ادجوانت نانوکیتوزان و کنترل

Figure 3. Comparison of Asian sea bass (Lates calcarifer) size in groups vaccinated with nanochitosan adjuvant and the control group.

بررسی نرخ بقا و تلفات پس از چالش

طبق نتایج تلفات درگروه کنترل، از ۲۴ ساعت پس از چالش آغاز شد و تا روز هفتم به ۱۰۰درصد رسید (شکل ۴ و ۵). در گروه بدون ادجوانت از ۴۸ ساعت و در گروه با نانوکیتوزان از ۷۲ ساعت شروع شد. بقا در گروه با ادجوانت بالاتر بود ($P<0.05$)؛ ترتیب بقا در گروه‌های با نانوکیتوزان ۸۰ درصد، بدون ادجوانت ۴۰ درصد و کنترل صفر درصد بود.



	day 0	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7
control	20	20	18	15	13	10	7	3
nanochitosan	20	20	20	19	18	17	16	15
bacterin	20	20	18	17	15	13	10	7

شکل ۴. نمودار بقای ماهیان سی‌بس پس از چالش با باکتری زنده ویبریو هاروی

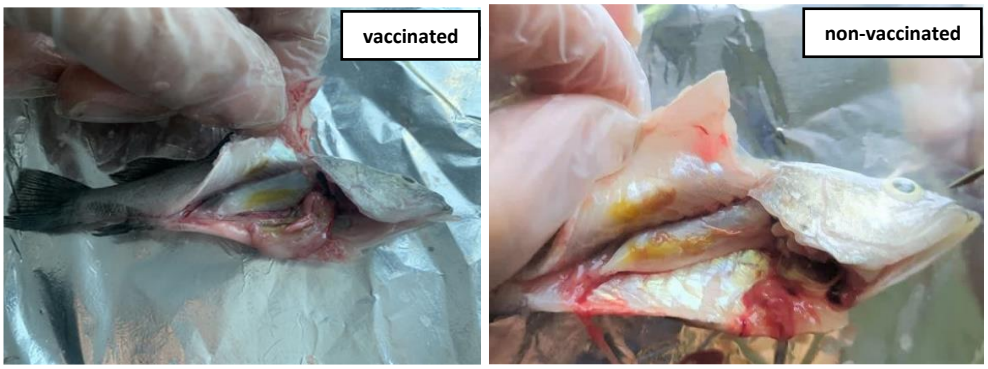
Figure 4. Survival of Asian sea bass (Lates calcarifer) following challenge with live *Vibrio harveyi*.

شکل ۵. ماهی سی‌بس تلف شده در گروه کنترل پس از چالش– خونریزی در ناحیه سر و دهان

Figure 5. Mortalities in the control group of Asian sea bass (Lates calcarifer) post-challenge, showing hemorrhaging in the head and mouth regions.

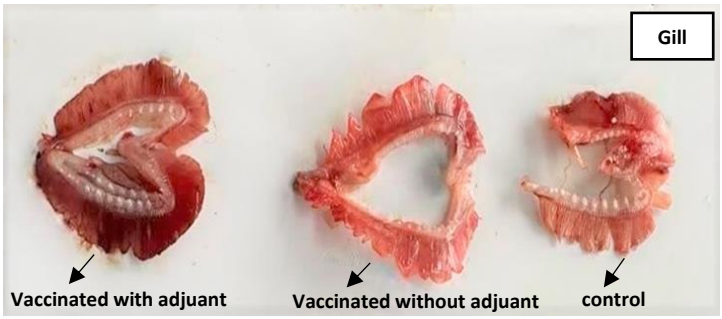
بررسی ضایعات پاتولوژیک

در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک، ضایعات بافتی در مغز، کبد، کلیه، طحال، آبشش و عضله مشاهده شد. برای ارزیابی کمی شدت ضایعات بافتی، از یک سیستم امتیازدهی نیمه‌کمی داخلی (۱ تا ۵) استفاده شد که بر اساس معیارهای زیر تعریف گردید: نمره ۱: بافت سالم (فاقد هرگونه ضایعه)، نمره ۲: ضایعه خفیف (درگیری کمتر از ۲۵ درصد از بافت)، نمره ۳: ضایعه متوسط (درگیری ۲۵-۵۰ درصد از بافت)، نمره ۴: ضایعه شدید (درگیری ۵۰-۷۵ درصد از بافت)، نمره ۵: ضایعه بسیار شدید (درگیری بیش از ۷۵ درصد از بافت و نکروز گسترده). در بافت آبشش، پرخونی، هایپرپلازی و نکروز مشاهده گردید که بر این اساس، میانگین امتیاز ضایعات در گروه کنترل ۴ (شدید)، در گروه واکسینه شده بدون ادجوانت ۲/۵ (متوسط تا شدید) و در گروه واکسینه شده با نانوکیتوزان ۱/۵(خفیف تا سالم) ارزیابی شد. در بافت کبد، احتقان و تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی (MMC) مشاهده شد. همچنین، حدود ۵۰ درصد از ماهیان گروه کنترل دچار تورم شکمی بودند. در بافت عضله، نکروز موضعی مشاهده گردید. در ک لیه، پرخونی، نکروز توبول‌ها و در مغز نیز پرخونی گزارش گردید (۴۱, ۴۲). شکل‌های ۶ تا ۱۰ به ترتیب ضایعات سر، گردن، عفونت سیستم گوارشی ماهی، کم‌خونی در آبشش و پر خونی در مغز در گروه کنترل را نشان می‌دهد.



شکل ۶. عفونت زرد رنگ در سیستم گوارشی ماهی سی‌بس گروه کنترل پس از چالش

Figure 6. Yellowish infection in the digestive system of Asian sea bass (Lates calcarifer) from the control group post-challenge.

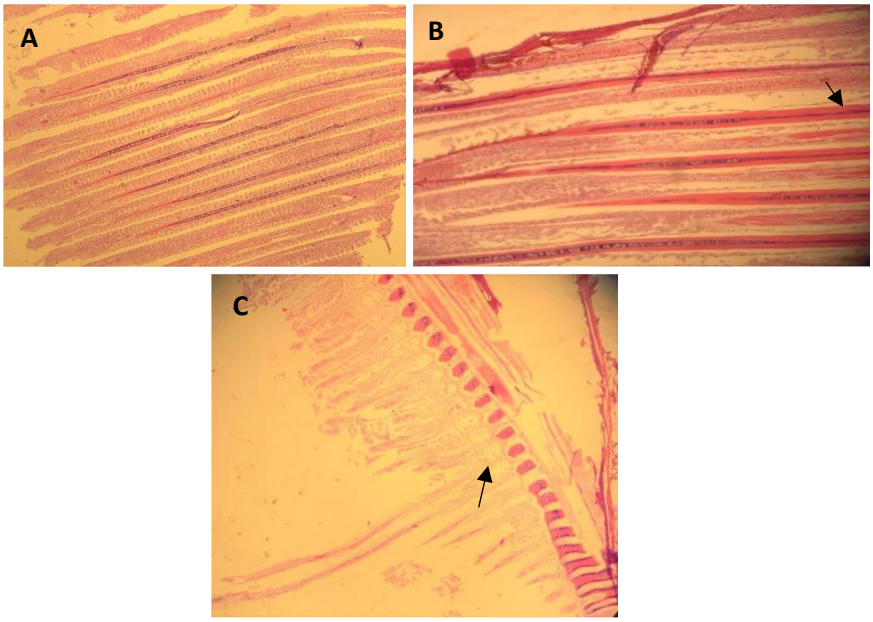


شکل ۷. کم خونی ناشی از ویبریوز در آبشش ماهی سی‌بس در گروه کنترل

Figure 7. Anemia in the gills of Asian sea bass (Lates calcarifer) from the control group, induced by vibriosis.

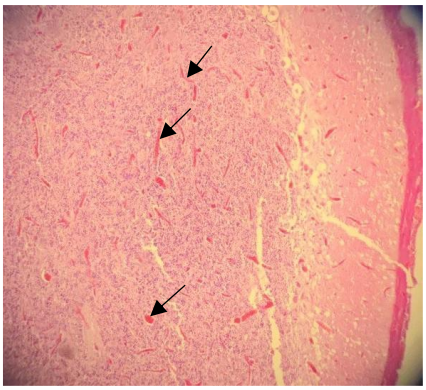
شکل ۸. پرخونی ناشی از ویبریوز در مغز ماهی سی‌بس در گروه کنترل

Figure 8. Hyperemia in the brain of Asian sea bass (Lates calcarifer) from the control group, induced by vibriosis.



شکل ۹. مقایسه ضایعات آبششی در گروه‌های مختلف. A: آبشش سالم در گروه واکسینه: B: آبشش با پرخونی و نکروز در کنترل، C: آبشش با هایپرپلازی در کنترل.

Figure 9. Comparison of gill lesions among different experimental groups. (A) Healthy gill architecture in the vaccinated group. (B) Gill with hyperemia and necrosis in the control group. (C) Gill with hyperplasia in the control group.



شکل ۱۰. پرخونی در مغز ماهیان سی‌بس گروه کنترل

Figure 10. Hyperemia in the brain of Asian sea bass (Lates calcarifer) from the control group.

بحث

در این مطالعه، از واکسیناسیون خوراکی برای ایمن‌سازی ماهی سی‌بس علیه ویبریوز استفاده شد. این روش به دلیل سهولت اجرا و کاهش استرس، یکی از کاربردی‌ترین روش‌های پیشگیری از بیماری‌های شایع در مزارع و قفس‌های پرورش ماهی محسوب می‌شود (۴۲). با این وجود، چالش اصلی در واکسیناسیون خوراکی، حفاظت از آنتی‌ژن در محیط خشن گوارشی و تضمین جذب مؤثر آن توسط سلول‌های ایمنی روده است. موفقیت این استراتژی، مستلزم طراحی دقیق سیستم رهاسازی آنتی‌ژن است که بتواند بر این موانع غلبه کند (۴۳). پیشرفت‌های اخیر در فناوری نانو، راهکارهای امیدوارکننده‌ای را برای حل این چالش‌ها ارائه کرده‌اند.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که واکسن خوراکی تهیه شده از سوش بومی *ویبریو هاروی* به همراه ادجوانت نانوکیتوزان، پاسخ ایمنی هومورال قوی‌تری را در مقایسه با گروه‌های دیگر ایجاد کرد و عملکرد رشد را بهبود بخشید. همچنین مقایسه عیار آنتی‌بادی بین گروه‌ها نشان داد که گروه دریافت کننده نانوکیتوزان (۱/۵۱۲ ± ۶۴) نسبت به گروه بدون ادجوانت (۱/۲۵۶ ± ۳۲) پاسخ ایمنی

تقویت شده‌ای داشت. این نتایج با مطالعات متعددی از جمله تحقیق محمد و همکاران (۲۰۲۲) که بهبود معنی‌دار در عیار آنتی‌بادی را با استفاده از ادجوانت روغن پالم گزارش کردند، همسو است (۱۲). همچنین، کومار و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثربخشی واکسن خوراکی ویبریو بر روی ماهی سی‌بس آسیایی، ایمنی‌زایی قابل‌توجهی را در برابر ویبریوز گزارش کردند (۱۳). در پژوهش وانگ و همکاران (۱۹۹۲) نیز واکسن خوراکی *ویبریو آنجویلاروم* در ماهی سالمون موجب افزایش معنی‌دار سطح آنتی‌بادی و بهبود نرخ بقا تا ۸۰/۳ درصد گردید (۴۴). شایان ذکر است که برتری پاسخ ایمنی در گروه دریافت‌کننده نانوکیتوزان را نه تنها به نقش آن به عنوان ادجوانت، بلکه به عملکرد یکپارچه آن به عنوان یک سیستم رهاسازی هوشمند می‌توان نسبت داد که هر دو جنبه "حفاظت از آنتی‌ژن" و "تحریک ایمنی ذاتی" را به طور همزمان فراهم می‌کند (۴۵).

در مطالعه حاضر، از سوش بومی *ویبریو هاروی* بعلت کارایی بالاتر نسبت به سوش‌های غیربومی استفاده شد (۴۶،۱۴، ۴۷). استفاده از پاتوژن‌های بومی در فرمولاسیون واکسن، یک استراتژی منطقی و هدفمند محسوب می‌شود، زیرا تطابق آنتی‌ژنی بهتری با سویه‌های در حال گردش در یک منطقه جغرافیایی خاص ایجاد می‌نماید. این امر، احتمال محافظت متقاطع در برابر طیف وسیع‌تری از ایزوله‌های میدانی را افزایش می‌دهد (۴۸). همچنین در این پژوهش، ادجوانت نانوکیتوزان به‌دلیل فراوانی داخلی و هزینه کم انتخاب گردید. این مطالعه نشان داد که نانوکیتوزان سیستم ایمنی را تحریک و آنتی‌ژن را حفاظت می‌کند. مکانیسم احتمالی تأثیر نانوکیتوزان می‌تواند ناشی از چند عامل باشد: اولاً، نانوذرات کیتوزان به دلیل اندازه کوچک و بار سطحی مثبت، به راحتی از مخاط روده عبور کرده و جذب سلول‌های ایمنی می‌شوند (۱۵, ۱۶). ثانیاً، این نانوذرات به عنوان سیستم رهاسازی کنترل شده عمل کرده و آنتی‌ژن را در برابر تجزیه در محیط اسیدی معده محافظت می‌کنند (۲۵). ثالثاً، کیتوزان، خود دارای خاصیت ایمنی‌زایی ذاتی است و می‌تواند با فعال کردن ماکروفاژها و افزایش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی، پاسخ ایمنی را تقویت کند (۱۹). مطالعات جدیدتر نشان می‌دهند که نانوکیتوزان می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی، مانند ژن‌های اینترلوکین‌ها، فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-α) و اینترفرون گاما (IFN-γ) در اندام‌های لنفوئیدی ماهی شود که این امر پایه مولکولی قوی‌تری برای اثربخشی آن ارائه می‌دهد (۴۹). در زمینه نرخ بقا، گروه واکسینه شده با نانوکیتوزان پس از چالش با باکتری زنده، بقای ۸۰ درصد را نشان داد که این میزان در مقایسه با گروه کنترل (صفردرصد) و گروه واکسینه شده بدون ادجوانت (۴۰ درصد) بهبود چشمگیری داشت. این نتایج با مطالعه نگوین و همکاران (۲۰۱۷) که بقای ۸۵-۷۵ درصد را در ماهی خوراکی واکسینه شده علیه *ویبریو هاروی* گزارش کردند، مطابقت دارد (۳۹). نرخ بقای بالا نه تنها نشان‌دهنده ایجاد یک حافظه ایمنی هومورال قوی است، بلکه می‌تواند حاکی از فعال‌سازی مؤثر ایمنی سلولی نیز باشد که در پاکسازی عفونت‌های داخل سلولی نقش کلیدی دارد(۵۰).

از جمله یافته‌های مهم دیگر، بهبود عملکرد رشد در گروه واکسینه شده با نانوکیتوزان (۲۱/۸۵ درصد افزایش وزن بیشتر نسبت به کنترل) را می‌توان به کاهش بار باکتریایی و در نتیجه تخصیص بهتر انرژی به رشد نسبت داد. این یافته با گزارش امیردنیل و همکاران (۲۰۲۲) که بهبود رشد را در ماهی سی‌بس واکسینه شده مشاهده کردند، همخوانی دارد (۳۶). واکسیناسیون با کاهش بروز بیماری‌های زیربالینی، باعث بهبود شاخص‌های تبدیل خوراک (FCR) و سلامت کلی ماهی می‌شود که در نهایت بهره‌وری اقتصادی مزرعه را افزایش می‌دهد (۵۱).

نتیجه‌گیری

اگرچه این مطالعه در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی انجام شد، اما نتایج آن پتانسیل بالای واکسن خوراکی حاوی نانوکیتوزان را برای استفاده در مزارع پرورش ماهی نشان می‌دهد. این واکسن نه تنها با ایجاد پاسخ ایمنی هومورال قوی و بهبود نرخ بقا به ۸۰درصد، بلکه از طریق بهبود عملکرد رشد (۲۱/۸۵ درصد افزایش وزن)، گزینه‌ای مقرون‌به‌صرفه و مؤثر برای پیشگیری از ویبریوز در قفس‌های دریایی ایران محسوب می‌شود. با توجه به دسترسی آسان و هزینه پایین نانوکیتوزان، این فرمولاسیون می‌تواند به عنوان الگویی برای توسعه واکسن‌های خوراکی علیه سایر پاتوژن‌های مهم در آبزی‌پروری نیز مورد استفاده قرار گیرد. برای کاربردی‌سازی این فناوری، انجام مطالعات بعدی در مقیاس نیمه‌صنعتی و ارزیابی طول مدت محافظت و برنامه واکسیناسیون تقویتی (Booster dose) ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان قدردانی خود را از پشتیبانی مالی این پژوهش توسط شرکت سیمیا واکسن شیراز ابراز می‌نمایند. همچنین از کارشناسان و مسئولان محترم در مرکز رشد موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که در انجام مراحل آزمایشگاهی این تحقیق همکاری نمودند، صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود.

Refrences

1. Ransangan J, Mustafa S. Identification of Vibrio harveyi isolated from diseased Asian seabass Lates calcarifer by use of 16S ribosomal DNA sequencing. Journal of Aquatic Animal Health. 2009;21(3):150-5. doi.10.1577/H09-002.1
2. Risk A. Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods. Citeseer; 2001. https://www.fao.org/4/x8124e/x8124e03.htm.
3. Cano-Gomez A, Høj L, Owens L, Baillie BK, Andreakis N. A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of Vibrio harveyi-related species. Aquaculture. 2015;437:195-200. doi.10.1016/j.aquaculture.2014.10.050
4. Tendencia EA. Vibrio harveyi isolated from cage-cultured seabass Lates calcarifer Bloch in the Philippines. Aquaculture Research. 2002;33(6):455-8. doi: 10.1046/j.1365-2109.2002.00688.x
5. Zhang X-H, He X, Austin B. Vibrio harveyi: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. Marine life science & technology. 2020;2:231-45. doi. 10.1007/s42995-020-00037-z
6. Abdel-Latif HMR, Yilmaz E, Dawood MAO, Ringø E, Ahmadifar E, Yilmaz S. Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. Aquaculture. 2022;551:737951. doi. 10.1016/j.aquaculture.2022.737951
7. Nurliyana M, Amal M, Zamri-Saad M, Ina-Salwany M. Possible transmission routes of Vibrio spp. in tropical cage-cultured marine fishes. Letters in applied microbiology. 2019;68(6):485-96. doi.10.1111/lam.13146
8. Atujona D, Huang Y, Wang Z, Jian J, Cai S. Vibrio harveyi (VirB11) recombinant vaccine development against vibriosis in orange-spotted grouper (Epinephelus coioides). Aquaculture Research. 2019;50(9):2628-34. doi.10.1111/are.14220
9. Gibson-Kueh S, Chee D, Chen J, Wang Y, Tay S, Leong L, et al. The pathology of ‘scale drop syndrome’in Asian seabass, Lates calcarifer Bloch, a first description. Journal of fish diseases. 2012;35(1):19-27. doi.10.1111/j.1365-2761.2011.01319.x
10. Harikrishnan R, Kim M-C, Kim J-S, Han Y-J, Jang I-S, Balasundaram C, Heo M-S. Immune response and expression analysis of cathepsin K in goldfish during Aeromonas hydrophila infection. Fish & Shellfish Immunology. 2010;28(4):511-6. doi.10.1016/j.fsi.2009.12.005
11. Dawood MA, Koshio S, Esteban MÁ. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture. 2018;10(4):950-74. doi.10.1111/raq.12209
12. Mohamad A, Mursidi F-A, Zamri-Saad M, Amal MNA, Annas S, Monir MS, et al. Laboratory and field assessments of oral Vibrio vaccine indicate the potential for protection against Vibriosis in cultured marine fishes. Animals. 2022;12(2):133. doi.10.3390/ani12020133
13. Kumar SR, Ahmed VI, Parameswaran V, Sudhakaran R, Babu VS, Hameed AS. 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. 2008;25(1-2):47-56. doi.10.1016/j.fsi.2007.12.004
14. Ajdeeri M, et al. Isolation and molecular identification of Vibrio harveyi from cultured Asian seabass in farms of southern provinces of Iran. Iran Sci Fish J. 2018;27(5):61-9. doi:10.22092/ISFJ.2018.118012
15. Alishahi M, Rad AE, Zarei M, Ghorbanpour M. Effect of dietary chitosan on immune response and disease resistance in Cyprinus carpio. Iran J Vet Med. 2014;8(2):125-33.doi: 10.22059/ijvm.2014.51410
16. Azad I, Shankar K, Mohan C, Kalita B. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of Aeromonas hydrophila in Indian major carps and common carp following oral vaccination antigen localization by a monoclonal antibody. Diseases of aquatic organisms. 2000;43(2):103-8. doi.10.3354/dao043103
17. Matić Z, Šantak M. Current view on novel vaccine technologies to combat human infectious diseases. Applied microbiology and biotechnology. 2022;106(1):25-56. doi.10.1007/s00253-021-11726-9
18. M. Ways TM, Lau WM, Khutoryanskiy VV. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. Polymers. 2018;10(3):267. doi.10.3390/polym10030267
19. Alishahi M, Haji Poor A, Ghorbanpour M, Mesbah M. Investigation of the effect of nanochitosan adjuvant on the immunogenicity of Aeromonas hydrophila killed vaccine in common carp (*Cyprinus carpio*). J Vet Res. 2018;73(1):72-81. doi:10.22059/jvr.2018.113859.2214.
20. Liu X, Wu H, Chang X, Tang Y, Liu Q, Zhang Y. Notable mucosal immune responses induced in the intestine of zebrafish (Danio rerio) bath-vaccinated with a live attenuated Vibrio anguillarum vaccine. Fish & Shellfish Immunology. 2014;40(1):99-108. doi.10.1016/j.fsi.2014.06.030
21. Wei G, Cai S, Wu Y, Ma S, Huang Y. Immune effect of Vibrio harveyi formalin-killed cells vaccine combined with chitosan oligosaccharide and astragalus polysaccharides in♀ Epinephelus fuscoguttatus×♂ Epinephelus lanceolatus. Fish & Shellfish Immunology. 2020;98:186-92. doi.10.1016/j.fsi.2020.01.015
22. Lan NGT, Dong HT, Vinh NT, Salin KR, Senapin S, Pimsannil K, et al. A novel vaccination strategy against Vibrio harveyi infection in Asian seabass (Lates calcarifer) with the aid of oxygen nanobubbles and chitosan. Fish & Shellfish Immunology. 2024;149:109557. doi.10.1016/j.fsi.2024.109557
23. Pang L, Zhang XH, Zhong Y, Chen J, Li Y, Austin B. Identification of Vibrio harveyi using PCR amplification of the toxR gene. Letters in Applied Microbiology. 2006;43(3):249-55. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042Yang G,

24. Conejero MJU, Hedreyda CT. PCR detection of hemolysin (vhh) gene in Vibrio harveyi. The Journal of general and applied microbiology. 2004;50(3):137-42. doi.10.1016/j.colsurfa.2004.10.010
25. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2012;90:21-7. doi.10.1002/(SICI)10974628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4
26. Qi L, Xu Z. Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2004;251(1-3):183-90. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.10.010
27. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso M. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. Journal of applied polymer science. 1997;63(1):125-32. doi.10.1186/s13036-024-00403-w
28. Mohammed MA, Syeda JT, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. Pharmaceutics. 2017;9(4):53. doi.10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016016957Sun H, Zhao D, Xiong B, Zhang C, Bi C. Engineering Corynebacterium glutamicum for violacein hyper production. Microb Cell Fact. 2016;15:1–9. doi.10.1186/s12934-016-0545-0
29. Gutiérrez-Ruíz SC, Cortes H, González-Torres M, Almarhoon ZM, Gürer ES, Sharifi-Rad J, Leyva-Gómez G. Optimize the parameters for the synthesis by the ionic gelation technique, purification, and freeze-drying of chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticles for biomedical purposes. Journal of Biological Engineering. 2024;18(1):12. doi.10.3390/vaccines4040040
30. Desai KG. Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems. 2016;33(2). doi. 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016014850
31. Dubey S ,Avadhani K, Mutalik S, Sivadasan SM, Maiti B, Girisha SK, et al. Edwardsiella tarda OmpA encapsulated in chitosan nanoparticles shows superior protection over inactivated whole cell vaccine in orally vaccinated fringed-lipped peninsula carp (Labeo fimbriatus). Vaccines. 2016;4(4):40. doi.10.1139/f74-222
32. Nakhla AN, Szalai AJ, Banoub JH, Keough KM. Serum anti-LPS antibody production by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in response to the administration of free and liposomally-incorporated LPS from Aeromonas salmonicida. Fish Shellfish Immunol. 1997;7(6):387-401. doi.10.1128/jb.00165-20.
33. Paterson W, Fryer J. Immune response of juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch) to Aeromonas salmonicida cells administered intraperitoneally in Freund's complete adjuvant. Journal of the Fisheries Board of Canada. 1974;31(11):1751-5. doi.10.1038/s41598-017-08000-2
34. Nag D, Farr DA, Walton MG, Withey JH. Zebrafish models for pathogenic vibrios. Journal of bacteriology. 2020;202(24):10.1128/jb. 00165-20. https://doi.org/10.3390/vaccines11010009
35. Tokunaga Y, Shirouzu M, Sugahara R, Yoshiura Y, Kiryu I, Ototake M, et al. Comprehensive validation of T-and B-cell deficiency in rag1-null zebrafish: Implication for the robust innate defense mechanisms of teleosts. Scientific reports. 2017;7(1):7536. doi.10.1016/j.fsi.2016.11.026
36. Amir-Danial Z, Zamri-Saad M, Amal MNA, Annas S, Mohamad A, Jumria S, et al. Field Efficacy of a Feed-Based Inactivated Vaccine against Vibriosis in Cage-Cultured Asian Seabass, Lates calcarifer, in Malaysia. Vaccines. 2022;11(1):9. doi.10.1016/j.fsi.2005.01.001
37. Lin H-L, Shiu Y-L, Chiu C-S, Huang S-L, Liu C-H. 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. 2017;60:474-82. doi:10.1016/j.fsi.2016.11.026
38. Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (Cyprinus carpio) infected with Aeromonas hydrophila. Fish & shellfish immunology. 2005;19(4):293-306. doi.10.1111/j.1472-765X.2006.01962.x
39. Nguyen HT, Nguyen TTT, Tsai M-A, Ya-Zhen E, Wang P-C, Chen S-C. A formalin-inactivated vaccine provides good protection against Vibrio harveyi infection in orange-spotted grouper (Epinephelus coioides). Fish & Shellfish Immunology. 2017;65:118-26. doi.10.2323/jgam.50.137
40. Chen L, Yan J, Sun W, Zhang Y, Sui C, Qi J, et al. A zebrafish intelectin ortholog agglutinates both Gram-negative and Gram-positive bacteria with binding capacity to bacterial polysaccharide. Fish & shellfish immunology. 2016;55:729-36. doi.10.1016/j.fsi.2016.06.023
41. Firmino J, Furones MD, Andree KB, Sarasquete C, Ortiz-Delgado JB, Asencio-Alcudia G, Gisbert E. Contrasting outcomes of Vibrio harveyi pathogenicity in gilthead seabream, Sparus aurata and European seabass, Dicentrachus labrax. Aquaculture. 2019;511:734210. doi.10.1016/j.aquaculture.2019.734210
42. Horne M. Technical aspects of the administration of vaccines. Developments in biological standardization. 1997;90:79-89. doi./10.1023/A:1018321822088
43. Tafalla C, Bøgwald J, Dalmo RA. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. Fish & Shellfish Immunology. 2013;35(6):1740-50. doi.10.1016/j.fsi.2013.02.029
44. Wong G, Kaattari SL, Christensen JM. Effectiveness of an oral enteric coated vibrio vaccine for use in salmonid fish. Immunological investigations. 1992;21(4):353-64. doi.10.3109/08820139209069375

45. Biswas R, Mondal S, Ansari MA, Sarkar T, Condiuc IP, Trifas G, Atanase LI. Chitosan and its derivatives as nanocarriers for drug delivery. Molecules. 2025;30(6):1297. https://doi.org/10.3390/molecules30061297
46. Barnes AC, Rudenko O, Landos M, Dong HT, Lusiastuti A, Phuoc LH, Delamare‐Debouteville J. Autogenous vaccination in aquaculture: A locally enabled solution towards reduction of the global antimicrobial resistance problem. Reviews in Aquaculture. 2022;14(2):907-18. https://doi.org/10.1111/raq.12633
47. Onireti OB, Cao T, Vasquez I, Chukwu-Osazuwa J, Gnanagobal H, Hossain A, et al. Evaluation of the protective efficiency of an autogenous Vibrio anguillarum vaccine in lumpfish (Cyclopterus lumpus) under controlled and field conditions in Atlantic Canada. Frontiers in Aquaculture. 2023;2:1306503. https://doi.org/10.3389/faquc.2023.1306503
48. Yimer Muktar YM, Shimels Tesfaye ST, Biruk Tesfaye BT. Present status and future prospects of fish vaccination: a review. 2016. https://DOI: 10.4172/2157-7579.1000299
49. Chen C, Zu S, Zhang D, Zhao Z, Ji Y, Xi H, et al. Oral vaccination with recombinant Lactobacillus casei expressing Aha1 fused with CTB as an adjuvant against Aeromonas veronii in common carp (Cyprinus carpio). Microbial cell factories. 2022;21(1):114. https://doi.org/10.1186/s12934-022-01839-9
50. Secombes C, Wang T. The innate and adaptive immune system of fish. Infectious disease in aquaculture: Elsevier; 2012. p. 3-68. https://doi.org/10.1533/9780857095732.1.3
51. Munang'andu HM, Mutoloki S, Evensen Ø. A review of the immunological mechanisms following mucosal vaccination of finfish. Frontiers in immunology. 2015;6:427. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00427