Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Vaccines, adjuvants and conventional methods of using them in farmed fish

Majid Khanzadeh[*1], Babak Beikzadeh[2], Seyed Hossein Hoseinifar[3]

1. Corresponding Author, Animal Biological Product Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran Organization, Tehran, Iran and Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: majidkhanzadeh92@yahoo.com
2. Dept. of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran. E-mail: b.beikzadeh@bio.ui.ac.ir
3. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hoseinifar@gau.ac.ir

Article Info

Article type:
Review Article

Article history:
Received: 06.28.2023
Revised: 11.05.2023
Accepted: 11.25.2023

Keywords:
Adjuvant,
Aquaculture,
Vaccination methods,
Vaccine

ABSTRACT

Fish immunization using vaccines has been practiced for more than 50 years and is generally accepted as an effective method for preventing a wide range of bacterial and viral diseases. Vaccination contributes to environmental, economic and social sustainability in global aquaculture. Most of the manufactured vaccines are inactive vaccines that are formulated using adjuvants and delivered to fish through injection, immersion or oral routes. Live vaccines are more effective than inactivated vaccines because they mimic the conditions of natural pathogen infections and elicit a strong antibody response. Unfortunately, vaccines are usually not able to provide protection on their own. Especially those vaccines that are based on recombinant antigens or inactive pathogens. Therefore, the use of adjuvants or immunostimulants is often necessary to increase vaccine efficacy and have more potential to be administered through injection, oral or immersion routes. Nowadays, new vaccines (mucous and toxoid) and herbal adjuvants have been more and more noticed by researchers and have had significant effects against infectious diseases. Advanced technologies hold promise for the future of aquaculture vaccines, providing health benefits and increased economic potential for producers. Considering that vaccines have protective and preventive functions against a wide range of diseases, in this article we discussed the types of vaccines and aquatic adjuvants and their methods of use.

Cite this article: Khanzadeh, Majid, Beikzadeh, Babak, Hoseinifar, Seyed Hossein. 2024. Vaccines, adjuvants and conventional methods of using them in farmed fish. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (3), 27-48.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.21511.1795
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

واکسن‌ها، ادجوانت‌ها و روش‌های مرسوم استفاده از آن‌ها در ماهیان پرورشی

مجید خان‌زاده*[۱]، بابک بیک‌زاده[۲]، سید حسین حسینی‌فر[۳]

۱. نویسنده مسئول، گروه پژوهشی فرآورده‌های بیولوژیک دامی، سازمان جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ایران و گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: majidkhanzadeh92@yahoo.com

۲. گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: b.beikzadeh@bio.ui.ac.ir

۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hoseinifar@gau.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله مروری

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰٤/۰۷
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰۸/۱٤
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۹/۰٤

واژه‌های کلیدی:
آبزی‌پروری،
ادجوانت،
روش‌های واکسیناسیون،
واکسن

چکیده

ایمن‌سازی ماهی با استفاده از واکسن بیش از ۵۰ سال است که انجام می‌شود و به‌طورکلی به عنوان یک روش مؤثر برای پیشگیری از طیف گسترده‌ای از بیماری‌های باکتریایی و ویروسی پذیرفته شده است. واکسیناسیون به پایداری زیست‌محیطی، اجتماعی و اقتصادی در آبزی‌پروری جهانی کمک می‌کند. اکثر واکسن‌های تولیدی واکسن‌های غیرفعال هستند که با استفاده از ادجوانت‌ها فرموله شده و از طریق مسیرهای تزریقی، غوطه‌وری یا خوراکی به ماهی تحویل داده می‌شوند. واکسن‌های زنده کارآمدتر از واکسن‌های غیرفعال هستند، زیرا این واکسن‌ها شرایط عفونت‌های بیماری‌زای طبیعی را تقلید می‌کنند و پاسخ آنتی‌بادی قوی ایجاد می‌کنند. متأسفانه، واکسن‌ها معمولاً به تنهایی قادر به ایجاد محافظت نیستند. به ویژه آن دسته از واکسن‌هایی که بر پایه آنتی‌ژن‌های نوترکیب یا پاتوژن‌های غیرفعال هستند. بنابراین، استفاده از ادجوانت‌ها یا محرک‌های ایمنی اغلب برای افزایش کارایی واکسن ضروری هستند و پتانسیل بیش‌تری برای تجویز از طریق راه‌های تزریقی، خوراکی یا غوطه‌وری دارند. امروزه واکسن‌های جدید (واکسن‌های مخاطی، توکسوئید) و ادجوانت‌های گیاهی بیش از پیش مورد توجه پژوهش‌گران قرار گرفته‌اند و اثرات قابل‌توجهی در برابر بیماری‌های عفونی داشته‌اند. فناوری‌های پیشرفته نویدبخش آینده واکسن‌های آبزی‌پروری است و مزایای سلامتی و افزایش پتانسیل اقتصادی را برای تولیدکنندگان فراهم خواهند کرد. با توجه به این‌که واکسن‌ها عملکردهای ایمنی و پیشگیری‌کننده در برابر طیف وسیعی از بیماری‌ها را دارند، در این مقاله به انواع واکسن‌ها و ادجوانت‌های آبزیان و روش‌های استفاده از آن‌ها پرداختیم.

استناد: خان‌زاده، مجید، بیک‌زاده، بابک، حسینی‌فر، سید حسین (۱۴۰۳). واکسن‌ها، ادجوانت‌ها و روش‌های مرسوم استفاده از آن‌ها در ماهیان پرورشی. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۳)، ۴۸-۲۷.
DOI: 10.22069/japu.2023.21511.1795

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

تقاضای روزافزون مصرف ماهی و محدود بودن ذخایر طبیعی، موجب توسعه صنعت آبزی‌پروری در جهان شده است. در سال‌های اخیر آبزی‌پروری یکی از بخش های مؤثر در تولید غذا بوده و از چند دهه گذشته نیز به سرعت به یک صنعت پویا و رو به رشد تبدیل شده است (۱). افزایش نیاز به پروتئین ماهی باعث شده است تا سیستم‌های پرورش به سمت پرورش متراکم و فوق متراکم سوق پیدا کنند (۲). پرورش متراکم ماهی باعث می‌شود ماهی بیش‌تر از بیماری‌های عفونی آسیب‌پذیر باشد، در نتیجه منجر به بروز زیان شدید اقتصادی از لحاظ مرگ و میر و هزینه‌های درمانی می‌شود (۲). با متراکم شدن پرورش ماهی، عوامل بیماری‌زا باعث بیماری‌های جدی در تولید ماهی می‌شوند. شایع‌ترین عوامل ایجادکننده بیماری‌های عفونی در آبزی‌پروری باکتری‌ها (٥٤/٩ درصد) و پس از آن ویروس‌ها (٢٢/٦ درصد)، انگل‌ها (١٩/٤ درصد) و قارچ‌ها (٣/١ درصد) هستند (٣). آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و کنترل گسترش بیماری‌های باکتریایی در ماهیان جوان و بالغ، می‌توانند به عنوان ابزاری برای جلوگیری و پیشگیری از عفونت‌های ماهیان استفاده شوند (٤). بخش قابل‌توجهی از این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز به عنوان عوامل درمانی ضروری برای درمان بیماری‌های باکتریایی در انسان استفاده می‌شوند. بنابراین، استفاده کنترل نشده از این آنتی‌بیوتیک‌ها در تولید پروتئین حیوانی خطر بزرگی برای سلامت انسان به همراه دارد (٥). آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند میکروارگانیسم‌های مفید را از بین ببرند، باعث ایجاد اختلال در میکروبیوتای دستگاه گوارش شوند (٦)، بر تغذیه و ایمنی (٧) تأثیر بگذارند و استفاده از آن‌ها می‌تواند منجر به انتخاب باکتری‌های مقاوم و انتقال ژن‌های مقاومت بین انسان و دام به میکروبیوتای انسانی شود (٨). با توجه به مشکلات ذکر شده، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر در الویت نیست و نیاز جدی برای یافتن جایگزین‌های زیست‌محیطی و مناسب برای حل مسائل مربوط به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد، که امروزه بهترین راه برای جلوگیری از شیوع بیماری‌ها استفاده از واکسیناسیون است (٩). برای غلبه بر عوارض ناشی از مرگ و میر بیماری‌ها پس از محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری، واکسیناسیون یکی از جایگزین‌های مناسب است (١٠). واکسن‌ها، برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها، سیستم ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند و سپس آنتی‌بادی‌هایی تولید می‌کنند که ماهی را در برابر بیماری‌ها محافظت می‌کنند، اما هدف آنتی‌بیوتیک‌ها کشتن یا توقف بیماری‌ها است (١١). واکسن‌ها به‌عنوان یک ماده بیولوژیک تعریف می‌شوند که برای بهبود ایمنی در برابر یک بیماری خاص یا گروهی از بیماری‌ها تولید می‌شوند (١٢). در آبزی‌پروری، واکسیناسیون یک جنبه مهم است. واکسیناسیون به‌عنوان یک روش درمانی کارآمد برای پیشگیری از طیف گسترده‌ای از بیماری‌های باکتریایی و هم‌چنین ویروسی در نظر گرفته می‌شود (١٣). بسیاری از واکسن‌های باکتریایی و ویروسی، اعم از تک‌ظرفیتی یا چندظرفیتی، با موفقیت توسعه یافته و تجاری شده‌اند (١٤، ١٥). امروزه واکسیناسیون به یکی از مقرون به صرفه‌ترین و هم‌چنین روش‌های پایدار برای کنترل چندین بیماری عفونی در ماهی تبدیل شده است (١٣). با این‌حال، امروزه بیش‌تر واکسن‌ها علیه یک عفونت استفاده می‌شوند. توسعه و استفاده از یک واکسن چندظرفیتی برای درمان چندین عفونت به‌طور هم‌زمان می‌تواند سهولت استفاده از واکسن را فراهم کند و حجم کار را در مقایسه با واکسن تک‌ظرفیتی در فرآیند واکسیناسیون کاهش دهد (١٥). واکسن‌ها از راه‌های مختلفی برای ماهی‌ها تجویز می‌شود که شامل خوراکی، تزریقی (داخل صفاقی یا داخل عضلانی) و غوطه‌وری است (١٦). روش تجویز واکسن با در نظر گرفتن عوامل مربوط به عامل بیماری‌زا، مسیر

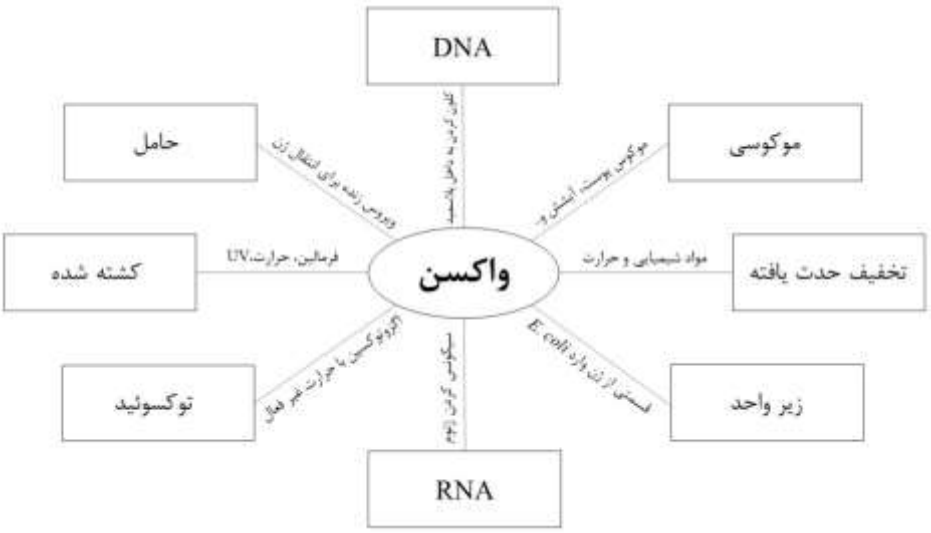
عفونت‌زایی، ایجاد خاطره ایمنی، نوع واکسن، هزینه‌های نیروی کار، مرحله زندگی ماهی مشخص می‌شود (۱۷). اولین گزارش در مورد ایمنی‌زایی واکسن توسط اسنیزکو و همکاران (۱۹۳۸) بود که از واکسن برای جلوگیری از بیماری باکتریایی *Aeromonas punctata* استفاده کردند (۱۸). اولین گزارش به زبان انگلیسی توسط داف (۱۹۴۲) بود که حفاظت در برابر *A. salmonicida* در قزل‌آلای رنگین‌کمان، را با تجویز خوراکی و تزریقی گزارش کرد (۱۹). اولین واکسن علیه یرسینیوزیس در سال ۱۹۷۶ ساخته شد و توسط وزارت کشاورزی ایالات متحده مجوز دریافت کرد و پس از آن واکسن ویبریو مجوز دریافت کرد (۲۰، ۲۱). در این مقاله به بررسی انواع واکسن ها، روش‌های تجویز و ایمنی‌زایی واکسن در مطالعات پیشین تمرکز می‌کنیم.

نقش واکسن در آبزی‌پروری

سالانه خسارت‌های بسیار زیادی در اثر انواع بیماری‌های مختلف به مزارع پرورش ماهیان وارد می‌شود و پرورش‌دهندگان برای مبارزه با بیماری‌ها به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها روی آورده‌اند. استفاده طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری علاوه‌بر ایجاد مشکلات زیست‌محیطی بسیار زیاد، موجب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فلور باکتریایی منابع آبی و ایجاد خسارات بیش‌تر به صنعت آبزی‌پروری می‌شود (۵). بنابراین روش‌هایی که بر اساس پیشگیری از وقوع بیماری شکل گرفته‌اند بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از روش‌های پیشگیری از بیماری‌ها، واکسیناسیون می‌باشد. اساس کار واکسن، تحریک و فعال کردن سیستم ایمنی بدن ماهی در برابر یک بیماری خاص می‌باشد (۲۲). تحریک سیستم ایمنی و واکسیناسیون به‌طور اولیه بر اساس تقابل بین میکروارگانیسم و میزبان است، اما محیط مطلوب، نقش قابل‌توجهی در ایجاد مقاومت مناسب در میزبان دارد (۲۳). به‌منظور دست‌یابی به بهترین روش، واکسیناسیون همیشه باید مکمل دیگر روش‌های امنیت زیستی باشد، تا مشکلات ناشی از گسترش عفونت را کاهش دهد و با بهبود شرایط محیطی، باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری شود (۲۳).

انواع واکسن‌ها در آبزی‌پروری و مزایای آن‌ها

انواع مختلفی از واکسن‌ها در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند که در ادامه بیان خواهند شد (شکل ۱، جدول‌های ۱ و ۲).



شکل ۱- انواع واکسن‌های آبزیان.

واکسن‌های غیر فعال: واکسن‌های غیرفعال یا کشته شده معمولاً از یک میکروب بیماری‌زای بدخیم ایجاد می‌شوند و از طریق برخی فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی توانایی خود را برای آلوده کردن یا تکثیر در داخل یا خارج از میزبان از دست می‌دهند. این تغییرات را می‌توان از طریق روش‌های فیزیکی و شیمیایی مانند غیرفعال سازی با گرما، تابش اشعه ماوراء بنفش یا غیرفعال‌سازی با فرمالین بدون به خطر انداختن آنتی‌ژن عامل میکروبی القا کرد (۲٤). برخلاف واکسن‌های زنده (که در زیر بحث می‌شود)، واکسن‌های غیرفعال در شرایط مزرعه پایدارتر هستند و ممکن است هزینه تولید کم‌تری داشته باشند (۲۵). واکسن‌های غیرفعال در محیط یا ماهی‌های واکسینه‌شده باقی نمی‌مانند، بنابراین معمولاً بی‌خطر هستند، اما در مقایسه با سایر انواع واکسن‌ها ممکن است ایمنی ضعیف‌تر یا کوتاه‌تری را ایجاد کنند (۲٦). ایمنی‌زایی ضعیف واکسن‌های غیرفعال ممکن است به فعال‌سازی ضعیف ایمنی سلولی در گونه‌های ماهی نسبت داده شود و بنابراین، می‌تواند نیاز به استفاده از ادجوانت‌ها یا ایمن‌سازهای چندگانه تقویت‌کننده را برای القای ایمنی محافظتی در ماهیان نیاز داشته باشد (۲۷). معایب واکسن‌های غیرفعال شامل وجود آنتی‌ژن‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، واکنش‌های سمی ناشی از ادجوانت‌های تقویت‌کننده سیستم ایمنی، کاهش ایمنی‌زایی به‌دلیل دناتوره شدن پروتئین‌ها و واکنش‌های سیستمیک به برخی ادجوانت‌ها است (۲۷).

واکسن‌های زنده تخفیف حدت‌یافته: این نوع واکسن‌ها حاوی میکروارگانیسم‌های زنده ضعیف شده یا فاقد توان بیماری‌زایی بوده که قادر به تکثیر و ارائه خواص ایمنی‌زایی خود در داخل میزبان هستند (۲۸). این واکسن‌ها از میکروارگانیسم‌های زنده مانند باکتری‌ها و ویروس‌ها تشکیل شده‌اند که دیگر خاصیت ایجاد عفونت خاص را ندارند (۲۹). واکسن‌ها تخفیف حدت یافته با روش‌های مختلفی از جمله شیمیایی، حرارتی، عبور مداوم پاتوژن در سیستم‌های هترولوگ مختلف (حیوانات هترولوگ، کشت بافت، تخم‌های جنینی) و تضعیف ژنتیکی (جهش با حذف، اختلال یا قرار دادن مسیر متابولیک یا ژن حدت) تهیه می‌شوند (۳۰). این نوع از واکسن‌ها به‌دلیل این‌که عامل بیماری‌زا قابلیت تکثیری دارد، نیازی به ادجوان ندارد و می‌تواند هم پاسخ‌های ایمنی هومورال و هم سلولی را تحریک کند که به نوبه خود به ایجاد سطح بالایی از ایمنی محافظتی طولانی‌مدت در میزبان کمک می‌کند (۳۱). ارزیابی و هم‌چنین کاربرد این واکسن‌ها در آبزی‌پروری از دهه ۱۹۰۰ گزارش شده است (۳۲). در حال حاضر، چهار واکسن تضعیف‌شده زنده برای تجویز علیه سه بیماری باکتریایی در ایالات متحده: بیماری سپتی‌سمی روده‌ای در گربه‌ماهی (ESC)، بیماری باکتریایی کلیوی (BKD)، بیماری کلوموناریس (۳۳) و یک بیماری ویروسی در کپور ماهیان به نام ویروس هرپس کوی (KHV) مجوز دارند (۱٦).

DNA واکسن: DNA واکسن شامل یک پلاسمید خارج کروموزومی خود تکثیرشونده است که حاوی ژن ایمنی‌زای عامل بیماری است که پس از تکثیر در باکتری‌ها و خالص‌سازی به بدن ماهیان تزریق می‌شوند (۳٤). این واکسن‌ها ابتدا می‌توانند هم پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و به دنبال آن ایمنی اختصاصی را تحریک کنند، اما مسیرهای حفاظتی دقیقی که توسط این واکسن‌ها در ماهیان انجام می‌شود هنوز نامشخص باقی مانده است (۳۵، ۳٦). ژن‌های ویروسی که گلیکوپروتئین‌های سطحی را از طریق تزریق ماهیچه‌ای کد می‌کنند، سطوح بالاتری از محافظت را در برابر عفونت‌های VHSV و IHNV در آبزی‌پروری برانگیخته‌اند (۳۷، ۳۸). استفاده از

گلیکوپروتیین VHSV و به دنبال آن واکسیناسیون با واکسن DNA منجر به یک پاسخ ایمنی مؤثر در قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است (۳۹). باکتری *ویبریو آنگویلاروم* که برای ماهی‌ها بیماری‌زا است، دارای متالوپروتئاز خارج سلولی عنصر روی (Zinc) است که یک عامل حدت‌یافته شناخته شده برای باکتری *ویبریو آنگویلاروم* است. نشان داده شده است که این ماده سمی یک آنتی‌ژن قوی برای ساخت واکسن DNA است (۴۰، ۴۱). در مطالعه‌ای که توسط نوسبام و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد، گزارش کردند که DNA واکسن باعث ایجاد ایمنی محافظتی قوی در برابر برخی از عفونت‌های ویروسی در ماهیان، به ویژه در قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس آلوده به رابدویروس‌ها و هرپس ویروس‌ها و گربه‌ماهیان آلوده، ایجاد می‌کند (۴۲). مطالعه انجام شده توسط ریس و همکاران (۲۰۱۷) روی یک واکسن DNA دار علیه IPNV نشان داد که گاهی ایمن‌سازی خوراکی با استفاده از خوراک می‌تواند نتایج بهتری در مقایسه با تزریق داخل صفاقی در ماهی سالمون اقیانوس اطلس داشته باشد (۴۳).

RNA واکسن: واکسن‌های RNA دار دو نوع هستند: mRNA خودتکثیرشونده و mRNA غیرتکثیرشونده. اصل واکسن mRNA این است که mRNA اصلاح‌شده ژن هدف یا در یک ناقل کلون می‌شود یا مستقیماً به میزبان تزریق می‌شود. mRNA تحت ترجمه پروتئین هدف قرار می‌گیرد و پروتئین به‌عنوان یک ماده خارجی توسط سیستم ایمنی میزبان شناسایی می‌شود و ایمنی خاصی در برابر پاتوژن ایجاد می‌کند (۴۴). استفاده از RNA در یک واکسن چندین مزیت دارد: ایمن است زیرا RNA غیرعفونی است و توسط فرآیندهای سلولی طبیعی تجزیه می‌شود و خطر بالقوه عفونت یا جهش‌زایی وجود ندارد. علاوه‌بر این، RNA یک محرک قوی ایمنی است (۴۵). در حال حاضر بیش‌ترین استفاده از واکسن‌های RNA خودتکثیرشونده بر اساس ژنوم آلفا ویروس است (۴۶). آلفاویروس‌ها متعلق به خانواده Togaviridae هستند که شامل ویروس Sindbis، ویروس Semliki Forest و ویروس‌های encephalitis اسب می‌باشند (۴۷). آلفاویروس اصلاح‌شده در طیف وسیعی از سلول‌های میزبان مانند پستانداران، پرندگان، خزندگان، دوزیستان، حشرات و ماهی‌ها عمل می‌کند. بنابراین، با جایگزینی ژن‌های پروتئین‌های ساختاری ویروس با یک آنتی‌ژن بیماری‌زا در ماهی، واکسن RNA خودتکثیرشونده می‌تواند به‌طور بالقوه در برابر تعدادی از بیماری‌های مهم ماهی محافظت ایجاد کند. بیماری ویروس پانکراس سالمون (SPDV)[1]، یک آلفاویروس شناخته شده ماهیان سالمونیده (SAV)، است که متعلق به خانواده Togaviridae، جنس آلفا ویروس و شبیه ژنوم آلفا ویروس‌های پستانداران است. کالسن و همکاران توصیف کردند که نواحی ترجمه نشده ژنوم آلفا ویروس سالمونید ۳ (SAV3) و شبیه‌سازی مبتنی بر ریپلیکون (replicon)[2] SAV3 ساخته شده است (۴۸). واکسن ریپلیکون محافظت بالایی در برابر کم خونی عفونی آزادماهیان ISA با تزریق عضلانی بدون ادجوانت ایجاد می‌کند، اما تزریق داخل صفاقی با همان باعث محافظت نمی‌شود (۴۹). این ساختار SAV3 می‌تواند نامزد آینده برای واکسن mRNA در ماهیان باشد (۴۸).

واکسن‌های حامل[3]: واکسن حامل از ناقل‌های ویروس زنده برای انتقال ژن‌های آنتی‌ژنی به میزبان گیرنده استفاده می‌کند که به نوبه خود پروتئین رمزگذاری شده یک میکروارگانیسم بیماری‌زا دیگر را به‌عنوان آنتی‌ژن واکسن بیان می‌کند (۱۶). توانایی

1- Salmon pancreas disease virus

۲- یک مولکول اسید نوکلئیک، یا بخشی از یک مولکول، که به‌عنوان یک واحد تکثیرشونده است

3- Vector Vaccine

خودآرایی پروتئین‌های ساختاری ویروسی با شباهت یک ویروس بومی منجر به ایجاد این دسته از واکسن‌های زیر واحد بر اساس ذرات شبه ویروس (VLP) شده است (۵۰). آنتی‌ژن‌های این واکسن قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی هستند، در حقیقت واکسن‌های حامل پتانسیل تکثیر فعال در داخل سلول‌های میزبان را دارند و سیستم ایمنی را مانند یک ادجوانت فعال می‌کنند. ذرات شبه ویروس را می‌توان در میزبان‌هایی مانند باکتری‌ها، گیاهان یا قارچ‌ها تولید کرد. واکسن‌های آزمایشی مبتنی بر VLPs در سال‌های اخیر ساخته شده‌اند، یعنی واکسن علیه نکروز عفونی پانکراس، که در IPNV پروتئین کپسید VP2 بیان شده در مخمر به ذرات زیر ویروسی (SVPs) مونتاژ می‌شود و پاسخ ایمنی را در قزل‌آلای رنگین‌کمان القا می‌کند (۵۱). واکسن ضدویروس نکروز عصبی ماهی کاد اقیانوس اطلس (ACNNV) برای ماهی سی‌باس آسیایی، که در آن پروتئین توسط گیاه *Nicotiana benthamiana* پوشش داده شده بود بیان شد. واکسن‌های ضد نکروز عصبی هامور (۵۲) و نکروز عصبی ویروسی (۵۳) به‌ترتیب برای هامور خالدار نارنجی و سی‌باس اروپایی با استفاده از خودآرایی VLPs ساخته شدند. حامل‌های ریپلیکون آلفاویروس آزادماهیان نیز معمولاً برای تولید واکسن‌های ماهی استفاده می‌شوند، زیرا این حامل‌ها در سلول‌های طیف وسیعی از طبقات حیوانی عملکرد دارند و ژن موردنظر را در محدوده دمایی ۳۷-٤ درجه سانتی‌گراد بیان می‌کنند (٥٤). ریپلیکون مبتنی بر آلفاویروس این مزیت را دارد که پس از تکثیر اولیه، سایر سلول‌ها را گسترش نمی‌دهد ویا دوباره آلوده نمی‌کند (٥٤) و هم‌چنین توانایی بهبود ایمنی موکوسی را دارد (۵۵).

واکسن‌های موکوسی: واکسن‌های موکوسی در حال حاضر به‌دلیل مصونیت بالا در ماهی‌های واکسینه شده توجه گسترده‌ای را در آبزی‌پروری به خود جلب کرده‌اند (۲۸). توسعه واکسن‌های موکوسی علیه عفونت‌های بیماری‌زا در آبزی‌پروری در حال حاضر تمرکز پژوهش‌ها است زیرا این واکسن‌ها با مسدود کردن پاتوژن‌ها در محل اولیه تکثیر پتانسیل ایجاد پاسخ‌های محافظتی را دارند (٥٦). مطالعه‌ای بر روی پاسخ‌های موکوسی و سیستمیک سلول‌های B و T پس از ایمن‌سازی با واکسن‌های موکوسی در برابر پاتوژن‌ها در ماهیان استخوانی از طریق راه‌های مختلف تجویز که شامل واکسیناسیون خوراکی، غوطه‌وری و از راه بینی بود، انجام شده است (٥٦). مونانگ آندو و همکاران (۲۰۱۲) گزارش داد که یکی از مشکلات در طراحی واکسن‌های موکوسی محافظ برای ماهیان استخوانی، تعیین دوز آنتی‌ژن محافظ مورد نیاز برای ایجاد ایمنی است (۵۷).

واکسن‌های زیر واحد: واکسن‌های زیرواحد فقط از اجزای آنتی‌ژنیک برای واکسیناسیون استفاده می‌کنند و از آن‌جایی‌که واکسن‌های زیرواحد نمی‌توانند در میزبان تکثیر شوند، خطر بیماری‌زایی برای میزبان یا گونه‌های غیرهدف وجود ندارد (١٦). ابزارهای بیوتکنولوژیکی برای شناسایی و طراحی توالی ژنی آنتی‌ژن محافظ عامل بیماری‌زا استفاده می‌شود. پس از طراحی، ژن‌های آنتی‌ژنی در میزبان‌های پروکاریوتی (۵۸) یا یوکاریوتی (۵۹) وارد می‌شوند و در مقیاس وسیع تحت شرایط آزمایشگاهی کاملاً کنترل شده توسط فناوری تخمیر، با هدف تولید پروتئین آنتی‌ژن، کشت داده می‌شوند. میزبان‌های تولیدی شامل باکتری‌ها (۵۸)، کشت سلولی (٦٠)، مخمر (٦١)، سلول‌های حشرات (۵۹)، ریزجلبک‌ها و هم‌چنین گیاهان تراریخته (۲۹) است. بیش‌تر واکسن‌های زیرواحد با بیان پروتئین زیر واحد در سیستم بیان پروکاریوتی مبتنی بر *اشریشیا کلای* ایجاد می‌شوند. یکی از موفق‌ترین نمونه‌ها، واکسن زیر واحدی علیه

نکروز عفونی پانکراس (IPN) است که شامل ژن IPN-VP2 است. واکسن ویروس کم‌خونی عفونی آزادماهیان حاوی پروتئین هماگلوتینین استراز نوترکیب به‌عنوان یک واکسن خوراکی به نام Centrovet در شیلی موجود است. روش باکولوویروس و روش بیان مخمر برای واکسن علیه سپتی سمی هموراژیک (VHS) و نکروز خون‌ساز عفونی (IHN) استفاده شده است (۲۵، ٦۲). مشکل اصلی واکسن‌های نوترکیب ایمنی محیطی و مجوز قانونی است. بنابراین، واکسن‌های مبتنی بر پروتئین نوترکیب باید ایمنی محیطی خود را برای آزمایش میدانی اثبات کنند (٦۳). اگرچه گزارش‌های زیادی در مورد واکسن‌های زیرواحد برای ماهی وجود دارد، اما این واکسن‌ها به‌صورت تجاری برای استفاده در آبزی‌پروری در دسترس نیستند.

واکسن توکسوئید: سموم (اگزوتوکسین و اندوتوکسین) اجزایی هستند که توسط باکتری‌ها به‌عنوان بخشی از پاسخ بیماری‌زا ترشح می‌شوند. واکسن توکسوئید به‌طورکلی از اگزوتوکسین ساخته می‌شود. هنگامی که سمیت سم با عملیات شیمیایی یا حرارتی غیرفعال یا کاهش می‌یابد، اما ایمنی‌زایی خود را حفظ می‌کند، به آن توکسوئید می‌گویند. توکسوئید توانایی تحریک پاسخ ایمنی و تقویت پاسخ ایمنی و حافظه را دارد. توکسوئید توانایی تحریک پاسخ ایمنی و تقویت پاسخ ایمنی و ایجاد حافظه را دارد. هنگامی که سیستم ایمنی واکسنی حاوی یک سم بی‌ضرر دریافت می‌کند، سیستم ایمنی هومورال فعال می‌شود. گزارش شده است که واکسن غیرفعال غنی‌شده با سم حاوی *فتوباکتریوم دمسلا* ٤۱-۳۷ درصد محافظت ایجاد می‌کند. واکسن توکسوئید نیز علیه *آئروموناس سالمونیسیدا* آزمایش شده است (۳۰).

واکسن‌های تک‌ظرفیتی و چندظرفیتی

اگرچه واکسن‌های تک‌ظرفیتی برای پیشگیری از بیماری‌ها در ماهی‌ها به خوبی شناخته شده‌اند، اما در مزرعه به بیش از یک واکسن نیاز است زیرا ممکن است چندین عفونت در مزرعه رخ دهد. بنابراین، استفاده از واکسن‌های چند ظرفیتی نه تنها هزینه را کاهش می‌دهد، بلکه استرس فرآیند واکسیناسیون بر روی ماهی را نیز کاهش می‌دهد (٦٤). واکسن چندظرفیتی فرمول ایده‌آل واکسنی است که می‌تواند هم‌زمان در برابر اکثر بیماری‌های عفونی که یک گونه خاص ماهی به آن حساس است محافظت کند (٦٤، ٦٥). واکسن‌های چندظرفیتی در مقایسه با واکسن‌های تک‌ظرفیتی مربوطه در ماهی‌های توربوت و ماهی قزل‌آلا، محافظت بالایی یا مشابهی داشتند (۲۹). عرفان‌منش و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که واکسن چندظرفیتی استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس به روش تزریقی و غوطه‌وری محافظت بالایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد (۱۵). در سال‌های اخیر، بیش‌تر واکسن‌های تجاری ساخته شده شامل واکسن‌های دو، سه، چهار و پنج ظرفیتی هستند (٦٦، ٦۷). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی اثربخشی واکسن چندظرفیتی ME-VAC Aqua Strept از طریق روش‌های تزریق و غوطه‌وری در برابر عفونت‌های باکتریایی در نیل تیلاپیا انجام شد، این واکسن چندظرفیتی غیرفعال یک محافظت ترکیبی در برابر چندین عفونت باکتریایی مانند استرپتوکوکوزیس، انتروکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در ماهی تیلاپیا از خود نشان داد (٦۸).

جدول ۱- واکسن‌های ضدباکتریایی در ماهیان پرورشی.

بیماری	عامل بیماری‌زا	میزبان	نوع واکسن	روش تجویز	شرکت	منابع
ویبریوزیس	*Vibrio anguillarum, V. salmonicida V. ordalii*	*Dicentrarchus labrax Gadus morhua D. labrax*	غیرفعال/ کشته شده	غوطه‌وری، تزریق	آکوا واک (خوراکی) ALPHA MARINE™	(۶۹) (۷۰) (۷۱) (۷۲)
یرسینیوزیس	*Yersinia ruckeri*	*Oncorhynchus mykiss Salmo salar*	غیرفعال	غوطه‌وری، تزریق	آزمایشی	(۷۳) (۷۴) (۷۵) (۷۶)
یرسینیوزیس	*Y. ruckeri*	*O. mykiss*	غیرفعال	غوطه‌وری، تزریق	ACECR	(۱۵)
یرسینیوزیس	*Y. ruckeri*	*O. mykiss*	غیرفعال (وزیکول کامل سلولی و غشای خارجی)	غوطه‌وری	آزمایشی	(۷۷)
یرسینیوزیس	*Y. ruckeri*	*O. mykiss*	غیرفعال	غوطه‌وری	آزمایشی	(۷۸)
استرپتوکوکوزیس	*Streptococcus iniae*	*O. mykiss*	غیرفعال	غوطه‌وری- تزریقی	ACECR	(۱۵)
استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس	*Lactococcus garvieae / S. iniae*	*O. mykiss*	غیرفعال	خوراکی	آزمایشی	(۷۹)
استرپتوکوکوزیس	*S. iniae*	*O. mykiss*	غیرفعال	تزریقی، غوطه‌وری، خوراکی	آزمایشی	(۸۰)
سپتی سمی روده‌ای گربه‌ماهی[1]	*Edwardsiella ictaluri*	*Pangasianodon hypophthalmus*	غیر فعال (غشای خارجی پروتئین)	تزریقی	آکوا واک	(۸۱)
ادواردزیولوزیس	*E. tarda*	*Paralichthys olivaceus Scophthamus maximus Pangasius hypophthalmus P. olivaceus*	غیرفعال، تخفیف حدت‌یافته	غوطه‌وری، تزریقی	آزمایشی	(۸۲) (۸۳) (۸۴) (۸۵)
بیماری باکتریایی کلیه[2]	*Renibacterium salmoninarum*	*Salmo salar*	زنده	تزریقی	-	(۸۶)
مایکوباکتریوزیس	*Mycobacterium marinum*	*Dicentrarchus labrax*	غیرفعال با حرارت	تزریقی	آزمایشی	(۸۷) (۸۸)
بیماری باکتریایی آب سرد[3]	*Flavobacterium psychrophilum*	*S. salar*	تخفیف حدت‌یافته	غوطه‌وری	B.17-ILM	(۸۹)
فرونکولوزیس	*Aeromonas salmonicida*	*S. salar*	غیرفعال	غوطه‌وری، خوراکی	آزمایشی	(۹۰) (۹۱) (۹۲)
کلوموناریس	*Flavobacterium columnaris*	*Ictalurus punctatus Oreochromis niloticus*	تخفیف حدت‌یافته، غیرفعال	غوطه‌وری	آزمایشی	(۹۳) (۹۴)
سپتی‌سمی متحرک آئروموناس[4]	*A. hydrophila*	*Megalobrama amblycephala*	غیر فعال (غشای خارجی پروتئین)	تزریق	آزمایشی	(۹۵)

1- Enteric septicemia of catfsh
2- Bacterial kidney disease
3- Bacterial cold water disease
4- Motile Aeromonas septicemia

جدول ۲- واکسن‌های ضدویروسی در آبزیان پرورشی.

بیماری	عامل بیماری‌زا	میزبان	نوع واکسن	روش تجویز	شرکت	منابع
نکروز عفونی پانکراس (IPN)	*Birna virus*	*S. salar*	غیرفعال	تزریقی	آزمایشی	(۴۳)
نکروز عفونی پانکراس (IPN)	*Birna virus*	*D. labrax*	زیرواحد	تزریقی	آزمایشی	(۴۳)
نکروز عفونی پانکراس (IPN)	*Birna virus*	*G. morhua*	زیرواحد	خوراکی	آزمایشی	(۴۳)
نکروز خونساز عفونی (IHN)	*Rhabdo virus*	*S. salar*	DNA	تزریقی	آزمایشی	(۹۶)
سپتی‌سمی خون‌ریزی‌دهنده (VHS)	*Rhabdo virus*	*O. mykiss*	DNA	غوطه‌وری	آزمایشی	(۹۷)
بیماری پانکراس	*Alpha virus*	*S. salar*	غیرفعال	تزریقی	Norvax®Compact PD	(۹۸)
کم‌خونی عفونی ماهی سالمون	*Orthomyxo virus*	*S. salar*	غیرفعال	تزریقی	آزمایشی	(۹۹)
ویرومی بهاره کپور (SVC)	*Rhabdo virus*	*Cyprinus carpio*	DNA	تزریقی	آزمایشی	(۱۰۰)
هرپس ویروس کوی (KHV)	*Herpes virus*	*C. carpio*	DNA	غوطه‌وری	آزمایشی	(۱۰۱)

ادجوانت

ادجوانت‌ها طیف متنوعی از مولکول‌ها یا مواد هستند که با یک آنتی‌ژن بالقوه ترکیب شده و به میزبان تجویز می‌شوند تا ایمنی‌زایی آنتی‌ژن را افزایش دهند. به‌منظور افزایش ایمنی‌زایی کاهش یافته، ادجوانت‌ها با آنتی‌ژن‌های واکسن ادغام می‌شوند (۱۰۲). استفاده از ادجوانت‌ها به کاهش دوز واکسن، بهبود جذب و کاهش سرعت پردازش آنتی‌ژن، کمک می‌کند. استفاده از ادجوانت‌ها در واکسن‌های انسانی و دامی بسیار رایج است و در آبزی‌پروری اهمیت چشمگیری پیدا کرده است. ادجوانت‌ها به روش‌های زیر عمل می‌کنند: ۱- طولانی شدن آزادسازی آنتی‌ژن ۲- فعال‌سازی و القاء پیام‌های محرک ۳- افزایش التهاب موضعی ٤- فعال‌سازی تکثیر لنفوسیت‌ها (۱۰۳).

طبقه‌بندی ادجوانت‌ها: ادجوانت‌ها در دو دسته مختلف، یعنی تسهیل‌کننده‌های پیام اول و تسهیل‌کننده‌های پیام دوم در طول فعال سازی پاسخ ایمنی گروه‌بندی می‌شوند. عرضه آنتی‌ژن (پیام اول) و مولکول‌های کمک محرک (پیام دوم) برای فعال‌سازی ایمنی اکتسابی از طریق لنفوسیت‌های T و B مورد نیاز است (۱۰٤). ادجوانت از طریق پیام اول به عرضه بهتر آنتی‌ژن از نظر غلظت، مکان و زمان کمک می‌کند. با این حال، هدف از جایگزین کردن ادجوانت‌ها فعال کردن لنفوسیت‌های T و B است که می‌تواند از طریق پیام دوم به‌دست آید (۱۰٤). بسیاری از ادجوانت‌ها از طریق گیرنده‌های تشخیص بیماری‌زا، که شامل گیرنده‌های شبه تول[1]، گیرنده‌های شبه‌دامنه الیگومریزاسیون نوکلئوتیدی (NOD)[2]، دکتین یا ژن القایی رتینوئیک اسید (RIG)[3] شبه هلیکازهای، پاسخ‌های ایمنی را القاء می‌کنند (۱۰٤). جدول ٤ انواع اجوانت‌ها را براساس نوع پیام طبقه‌بندی می‌کند (جدول‌های ۳ و ٤).

1- Toll-like receptors
2- Nucleotide oligomerization domain
3- Retinoic acid-inducible gene

جدول ۳- طبقه‌بندی ادجوانت‌ها براساس القاء پیام اول و دوم.

ادجوانت	نوع پیام فعال شده
امولسیون روغنی	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
ادجوانت کامل فروند	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
ادجوانت ناقص فروند	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
مونتاید	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
روغن‌های معدنی	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
نانو/ریز ذرات	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
ذرات PLGA[1]	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
کمپلکس‌های تحریک‌کننده ایمنی	عرضه آنتی‌ژن (پیام اول)
ادجوانت‌های حاوی آلومینیوم (آلوم)	مولکول‌های کمک محرک (پیام دوم)
لیگاندهای ß-گلوکان برای دکتین-۱	مولکول‌های کمک محرک (پیام دوم)
سیتوکین‌ها	مولکول‌های کمک محرک (پیام دوم)
لیپولیپیدها	مولکول‌های کمک محرک (پیام دوم)
ساپونین‌ها	مولکول‌های کمک محرک (پیام دوم)
آگونیست شبه تول، فلاژلین، پلی‌اینوزینیک پلی‌سیتیدیلیک اسید، الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی CpG	مولکول‌های کمک محرک (پیام دوم)

امولسیون روغنی: امولسیون‌های روغنی شکل پیچیده‌ای از فاز پراکنده (مایع) با فاز پیوسته (مایع دوم) است که به‌صورت مخلوط در می‌آیند. رایج‌ترین شکل مورد استفاده در فرمولاسیون واکسن، آب (محیط آنتی‌ژنیک) و روغن است. با توجه به عوارض جانبی ادجوانت‌های مبتنی بر روغن مانند چسبندگی و کاهش رشد در ماهیان ایمن شده، در یک مطالعه که با استفاده از ادجوانت حاوی روغن، همراه با واکسن *ویبریو آنگویلاروم* انجام شد، درصد بقای نسبی (RPS) را در ماهی تربوت بیش از ۹۰ درصد، گزارش شد (۱۰۵).

ادجوانت کامل فروند: ادجوانت کامل فروند از مایکوباکتریوم کشته (توسط گرما)، روغن معدنی و یک سورفکتانت تشکیل شده است. آنتی‌ژن در محلول آبی با اجوانت کامل فروند مخلوط می‌شود و امولسیون پایدار آب در روغن را تولید می‌کند. ایمن‌سازی با ادجوانت کامل فروند با آنتی‌ژن‌ها منجر به پاسخ‌های قوی سلول‌های T می‌شود (۱۰۶).

ادجوانت ناقص فروند: امروزه به دلیل پاسخ التهابی شدید ناشی از استفاده ادجوانت کامل فروند در میزبان، ادجوانت ناقص فروند که فاقد اجزای مایکوباکتریایی است، استفاده می‌شود. این ادجوانت در واکسیناسیون با کاهش قابل‌توجه سمیت برای ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) مؤثر واقع شده است (۱۰۷).

مونتاید: مونتانید، یک ادجوانت روغن معدنی براساس مخلوطی از روغن معدنی و روغن غیرمعدنی به تنهایی یا ترکیبی از این دو است. به‌طورکلی، مونتانید یک نام تجاری است که با این نام ازامولسیون‌های مختلف با ترکیب شیمیایی سورفکتانت خاص (مانیتول اولئات) استفاده می‌کند (۱۰۸).

ذرات PLGA: کپسوله‌سازی واکسن‌ها در پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر PLGA برای بیش از ۲۰ سال

1- Poly(lactic-co-glycolic acid)

مورد مطالعه قرار گرفته است. آنتی‌ژن از طریق انتشار به وسیله منافذ و با تخریب ماتریکس یا میکروسفرها از نانو ذرات آزاد می‌شود. سرعت تجزیه زیستی این ذرات را می‌توان با تغییر ترکیب پلیمری تعدیل کرد. واکسن‌های خوراکی کپسوله‌شده در PLGA در کفشک ماهی، آزاد ماهیان و ماهی سالمون اقیانوس اطلس استفاده شده است (۱۰۶).

آلوم: از فسفات آلومینیوم و هیدروکسید آلومینیوم به‌عنوان ادجوانت آلوم استفاده می‌شود. این ادجوانت ها پاسخ ایمنی سلولی را تحریک می‌کنند. مزیت استفاده از ادجوانت‌های آلومینیومی برای واکسن‌ها این است که در تحریک ایمنی هومورال از طریق القای پاسخ‌های Th2 موثر است (۱۰۹). با این‌حال در یک مطالعه که واکسن *آئروموناس سالمونیسیدا*، مخلوط با آلوم (پتاسیم آلومینیوم) به عنوان ادجوانت، در ماهی سالمون اقیانوس اطلس آزمایش شد، نتایج معنی‌داری را نشان نداد (۱۱۰). اما واکسن ساخته شده حاوی ادجوانت آلوم (هیدروکسید آلومینیوم) علیه *ادواردزیلا تاردا* محافظت بهتری را در کفشک ماهی ژاپنی نشان داده است (۱۱۱).

بتا گلوکان: بتا گلوکان‌ها به عنوان تحریک‌کننده پاسخ ایمنی غیراختصاصی ماهی شناخته شده‌اند و تصور می‌شود گیرنده دکتین-۱ در آن نقش داشته باشد. برای به‌دست آوردن اثرات محافظتی در برابر بیماری‌ها، بتاگلوکان به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شود و به‌نظر می‌رسد محافظت کوتاه‌مدتی ایجاد کنند (۱۱۲). در آزمایشی واکسن غیرفعال (کشته شده با فرمالین) *آئروموناس سالمونیسیدا* و *ویبریو سالمونیسیدا* همراه با ادجوانت بتاگلوکان در مقایسه با گروهی که بدون ادجوانت تزریق شدند، محافظت بالاتری در برابر فورونکولوزیس داشتند (۱۱۳).

سیتوکین‌ها: سیتوکین‌ها مولکول‌های پروتئینی کوچک و پیام‌رسان سلولی هستند که واسطه ارتباطات بین سلولی می‌باشند. فاکتورهای تنظیم‌کننده اینترفرون ۱ در دفاع میزبان در برابر پاتوژن‌ها و در پیام‌رسانی سیتوکین نقش دارند. هم‌چنین نشان داده شده است که یک حالت ضد ویروسی در سلول‌های ماهی ایجاد می‌کند (۱۱٤). در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، واکسن با اینترلوکین ۸ به عنوان یک ادجوانت علیه ویروس سپتی‌سمی هموراژیک (VHS) مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۱۵).

لیپوپپتید: لیپوپپتیدها در تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها یافت شده‌اند. لیپوپپتیدها، که بیش‌تر در مایکوباکتری‌ها و مایکوپلاسم‌ها وجود دارند، یک پاسخ قوی ذاتی (التهابی) و یک پاسخ ایمنی اکتسابی طولانی‌مدت را القاء می‌کنند. اثر کمکی گلیکوپپتیدولیپیدها در واکسن علیه *آئروموناس سالمونیسیدا* مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱٦).

ساپونین‌ها: ساپونین‌ها ترکیبات زیست‌فعال طبیعی حاصل از گلیکوزیدهای استروئیدی یا تری‌ترپن‌ها هستند. در پستانداران، این ترکیبات به دلیل توانایی در تحریک ایمنی سلولی و تحریک هر دو پاسخ Th1 و Th2 به‌طور گسترده به عنوان ادجوانت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. باکتری *ادواردزیلا تاردای* غیرفعال شده (سلول‌های کشته شده با فرمالین) همراه با ادجوانت ساپونین افزایش قابل‌توجهی در محافظت کفشک ماهی ژاپنی از خود نشان داده است (۱۱۷).

جدول ٤- چند نمونه از انواع مختلف ادجوانت‌ها، کاربرد و کارایی آن‌ها پس از واکسیناسیون در انواع مختلف ماهی.

ادجوانت	میزبان	آنتی‌ژن	روش و نوع واکسن	کارایی (درصد)	منبع
ادجوانت ناقص فروند	*O. mykiss*	*یرسینیا راکری* سرتیپ O1	غیرفعال- تزریقی	٩٦/٨	(١١٨)
ادجوانت ناقص فروند	*O. mykiss*	یرسینیا راکری بیوتیپ یک و دو	غیرفعال- تزریقی	١٠٠	(١١٨)
ادجوانت ناقص فروند	*O. mykiss*	*ویبریو آنگویلاروم* سرتیپ O1 و O2a	غیرفعال- تزریقی	O1: ٩٦/٩٧ و O2a: ٧٢/٧	(١١٨)
ادجوانت ناقص فروند	*O. mykiss*	*آئرومونا‌س سالمونیسیدا*	غیرفعال- تزریقی	٨٧	(١١٩)
ادجوانت ناقص فروند	*Angullia angullia*	*آئرومونا‌س هیدروفیلا*	نوترکیب- تزریقی	٨٣/٣٣	(١٢٠)
ادجوانت ناقص فروند	*A. angullia*	*ادواردزیلا آنگویلاروم*	نوترکیب- تزریقی	٥٥/٥٦	(١٢٠)
ادجوانت ناقص فروند	*A. angullia*	*ویبریو ولانتیفیکوس*	نوترکیب- تزریقی	٥٥/٥٦	(١٢٠)
ادجوانت ناقص فروند	*Oreochromis niloticus*	*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*	غیرفعال- تزریقی	٧٧/٨	(١٢١)
ادجوانت کامل فروند	*Cyclopterus lumpus*	*پاستورلا*	غیرفعال- تزریقی	٤٤/٨٣	(١٢٢)
ادجوانت کامل فروند	*Lutjanus sanguineus*	*ویبریو هاروی*	نوترکیب- تزریقی	٧٦	(١٢٣)
مونتناید	*Paralichthys olivaceus*	VHS	غیرفعال- غوطه‌وری	٦٧	(١٢٤)
مونتناید	*S. maximus*	*ویبریو هاروی*	غیرفعال- تزریقی	٨٣/٨٧	(١٢٥)
مونتناید	*O. mykiss*	*یرسینیا راکری*	غیرفعال- تزریقی	٩٥	(١٢٦)
الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی CpG	*Epinephelus coioides*	*ویبریو هاروی*	غیرفعال- تزریقی	٩٦/٢	(١٢٧)
الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی CpG	*O. niloticus*	*ویبریو آنگویلاروم*	نوترکیب- تزریقی	٦٠	(١٢٨)
آلومیتیوم هیدروکسید (آلوم)	*S. salar*	*فلاوویاکتریوم سایکروفیلوم*	غیرفعال- تزریقی	٨٥/٧١	(١٢٩)
آلومیتیوم هیدروکسید (آلوم)	*S. salar*	*ادواردزیلا تاردا*	نوترکیب- تزریقی	٨١	(١١٠)

استفاده از گیاهان به‌عنوان ادجوانت در واکسن آبزیان

گیاهان و گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن ترکیبات طبیعی مانند اسانس، فنولیک، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، استروئیدها، ساپونین و رنگدانه‌ها دارای خواص بی‌شماری از جمله ضد استرس، تقویت رشد، افزایش اشتها، تقویت‌کننده فعالیت سیستم ایمنی و ضدمیکروبی هستند (١٣٠). گیاهان به عنوان لیگاند برای گیرنده‌های شبه تول عمل می‌کنند که منجر به پاسخ‌های ایمنی ذاتی مختلف از طریق مسیرهای پیام‌دهنده خاص گیرنده‌های شبه تول می‌شوند (١٣١). توصیه شده است که از محرک‌های ایمنی گیاهی در ترکیب با واکسن به عنوان ادجوانت در برنامه‌های واکسیناسیون برای بهبود سلامت ماهی استفاده شود (١٣٢). جدول ٥ زیر به اختصار اثر گیاهان را به عنوان ادجوانت در واکسن آبزیان نشان می‌دهد.

جدول ۵- ترکیب واکسن و ادجوانت گیاهی در واکسیاسیون ماهیان

واکسن	گیاه	میزبان	روش تجویز	اثر	منبع
فلاویو باکتریوم کوموناره	*Echinacea purpurea*	*Danio rerio*	خوراکی	افزایش بازماندگی	(۱۳۳)
لاکتوکوکوس گارویه	*Glycyrrhiza glabra*	*O. mykiss*	تزریقی	افزایش بازماندگی	(۱۳٤)
آئرومونا‌س هید‌روفیلا	*Aloe vera*	*C. carpio*	تزریقی	لیزوزیم، کمپلمان، باکتری‌کشی، تیتر آنتی‌بادی	(۱۳۵)
ویبریو آلجینولیتیکوس	*Avicennia marina*	*Amphiprion sebae*	خوراکی	لیزوزیم، کمپلمان، انفجار تنفسی، نرخ بازماندگی	(۱۳٦)
ویبریو آلجینولیتیکوس	*Quillaja saponaria saponin*	*S. maximus*	حمام	تیتر آنتی‌بادی، افزایش بیان IgM	(۱۳۷)

نتیجه‌گیری

واکسیناسیون ماهیان دارای مزیت آشکاری در کاهش تلفات ناشی از بیماری، کاهش استفاده از مواد شیمیایی و علاوه بر این محافظت طولانی‌مدت در برابر بیماری‌ها است. یک واکسن ایده‌آل، واکسنی است که برای حیوانات و محیط‌زیست بی‌خطر باشد، برای تولید در مقیاس بزرگ مقرون به صرفه، تجویز آن آسان باشد و بتواند ایمنی قوی را در طول دوره پرورش از خود نشان دهد و حداقل عوارض جانبی را داشته باشد. توسعه واکسن‌های جدید پرهزینه است اما با توجه به رویکردهای سنتی برای پرورش ماهیان در کشور و ظهور بیماری‌های جدید، نیاز به واکسن در این حوزه را بیش از بیش ضروری می‌کند. از آن‌جایی‌که آبزی‌پروری در سطح جهانی به رشد خود ادامه می‌دهد، نیاز به واکسن‌های جدید تا مدت‌ها وجود خواهد داشت. گزارش‌ها نشان‌دهنده اثر مثبت واکسن در افزایش ایمنی و هم‌چنین کاهش تلفات در سطح مزارع پرورشی است. علاوه‌بر این نقش واکسن‌ها در تعدیل سلامت و افزایش مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌های رایج باکتریایی و ویروسی در مزارع پرورشی حیاتی است. این مقاله دیدگاه پژوهش‌گران و پرورش‌دهندگان را نسبت به استفاده از واکسن‌ها به‌جای آنتی‌بیوتیک و ضدعفونی‌کننده‌ها هدایت می‌کند.

منابع

1. Adel, M., Gholaghaie, M., Binaii, M., Khanjany, P., & Awad, E. (2016). Effect of dietary Achillea wilhelmsii extract on growth performance, and immune status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 7 (6), 1037-46.
2. Rahman, A. N. A., Khalil, A. A., Abdallah H. M., & ElHady, M. (2018). The effects of the dietary supplementation of *Echinacea purpurea* extract and/or vitamin C on the intestinal histomorphology, phagocytic activity, and gene expression of the Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol*. 82, 312-8.
3. Kibenge, M. J. T., Iwamoto, T., Wang, Y., Morton, A., Routledge, R., & Kibenge, F. S. B. (2016). Discovery of variant infectious salmon anaemia virus (ISAV) of European genotype in British Columbia, Canada. *Virol J.* 13, 1-17.
4. Ringø, E. (2020). Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquac. Fish*. 5 (1), 1-27..
5. Romero, J., Feijoó, C. G., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture–use, abuse and alternatives. *Heal Environ. Aquac.* 159, 159-98.
6. Romero, J., Ringø, E., & Merrifield, D. L. (2014). The gut microbiota of fish. *Aquac Nutr Gut Heal probiotics prebiotics.* 75-100.

7. Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* 115, 66-77.
8. Pereira, W. A., Mendonça, C. M. N., Urquiza, A. V., Marteinsson, VÞ., LeBlanc, J. G., Cotter, P.D., et al. (2022). Use of Probiotic Bacteria and Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in Aquaculture. Microorganisms. 10 (9), 1705.
9. Costanzo, V., & Roviello, G. N. (2023). The Potential Role of Vaccines in Preventing Antimicrobial Resistance (AMR): An Update and Future Perspectives. *Vaccines*. 11 (2), 333.
10. Barnes, A. C., Silayeva, O., Landos, M., Dong, H. T., Lusiastuti, A., Phuoc, L. H., et al. (2022). Autogenous vaccination in aquaculture: A locally enabled solution towards reduction of the global antimicrobial resistance problem. *Rev. Aquac.* 14 (2), 907-18.
11. Wang, B., Thompson, K. D., Wangkahart, E., Yamkasem, J., Bondad-Reantaso, M. G., Tattiyapong, P., et al. (2023). Strategies to enhance tilapia immunity to improve their health in aquaculture. *Rev. Aquac.* 15, 41-56.
12. Czochor, J., & Turchick, A. (2014). Focus: Vaccines. Introduction. *Yale J. Biol. Med.* 87 (4), 401-2.
13. Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms.* 7 (11), 569.
14. Mohamed, L. A., & Soliman, W. S. (2013). Development and efficacy of fish vaccine used against some bacterial diseases in farmed Tilapa. *Nat. Sci.* 11 (6), 120-8.
15. Erfanmanesh, A., Beikzadeh, B., & Khanzadeh, M. (2023). Efficacy of polyvalent vaccine on immune response and disease resistance against streptococcosis/lactococcosis and yersiniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Res. Commun.* 1-9.
16. Adams, A., Aoki, T., Berthe, C., Grisez, L., & Karunasagar, I. (2008). Recent technological advancements on aquatic animal health and their contributions toward reducing disease risks-a review. Dis Asian Aquac VI Colombo, *Sri Lanka Fish Heal Sect Asian Fish Soc*. 2012, 71–88.
17. Yanong, R. P. E., & Erlacher-Reid, C. (2012). Biosecurity in aquaculture, part 1: an overview. *SRAC Publ.* 4707, 522.
18. Snieszko, S., Piotrowska, W., Kocylowski, B., & Marek, K. (1938). Badania bakteriologiczne i serogiczne nad bakteriami posocznicy karpi. Mem l'Institut d'Ichtyobiologie Piscic la Stn Piscic Exp a Mydlniki l'Universite Jagiellonienne a Cracovie. 38.
19. Duff, D. C. B. (1942). The oral immunization of trout against Bacterium salmonicida. *J. Immunol.* 44 (1), 87-94.
20. Mondal, H., & Thomas, J. (2022). A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquac Int.* 1-30.
21. Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet. Res.* 46 (1), 1-10.
22. Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunol.* 90, 210-4.
23. Gudding, R. (2014). Vaccination as a preventive measure. *Fish Vaccin.* 12-21.
24. Tlaxca, J. L., Ellis, S., & Remmele, Jr RL. (2015). Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 93, 56-78.
25. Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I., & Christie, K. E. (2005). Update on viral vaccines for fish. *Dev. Biol*. (Basel). 121, 97-113.
26. Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup Med.* (Chic Ill). 57 (8), 552-6.
27. Di Pasquale, A., Preiss, S., Tavares Da Silva, F., & Garçon, N. (2015). Vaccine

adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*. 3 (2), 320-43.
28. Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., et al. (2017). Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends. *Rev. Fish. Sci Aquac.* 25 (3), 184-217.
29. Muktar, Y., Tesfaye, S., & Tesfaye, B. (2016). Present status and future prospects of fish vaccination: a review. *J. Vet. Sci. Technol.* 7 (02), 299.
30. Bedekar, M. K., & Kole, S. (2022). Types of Vaccines Used in Aquaculture. In: Fish immune system and vaccines. *Springer*. p. 45-63.
31. Ma, R., Yang, G., Xu, R., Liu, X., Zhang, Y., Ma, Y., et al. (2019). Pattern analysis of conditional essentiality (PACE)-based heuristic identification of an in vivo colonization determinant as a novel target for the construction of a live attenuated vaccine against Edwardsiella piscicida. *Fish Shellfish Immunol.* 90, 65-72.
32. Sun, Y., Liu, C., & Sun, L. (2010). Isolation and analysis of the vaccine potential of an attenuated Edwardsiella tarda strain. *Vaccine*. 28 (38), 6344-50.
33. Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Evans, J. J., & Arias, C. R. (2009). Use of modified live vaccines in aquaculture. *J. World Aquac. Soc.* 40(5):573–85.
34. Heppell, J., & Davis, H. L. (2000). Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 43 (1), 29-43.
35. LaPatra, S. E., Corbeil, S., Jones, G. R., Shewmaker, W. D., Lorenzen, N., Anderson, E. D., et al. (2001). Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine*. 19 (28-29), 4011-9.
36. Kurath, G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. Int des épizooties.* 27 (1), 175.
37. Hølvold, L. B., Myhr, A. I., & Dalmo, R. A. (2014). Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Vet. Res.* 45, 1-11.
38. Purcell, M. K., Nichols, K. M., Winton, J. R., Kurath, G., Thorgaard, G. H., Wheeler, P., et al. (2006). Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Immunol.* 43 (13), 2089-106.
39. Utke, K., Kock, H., Schuetze, H., Bergmann, S. M., Lorenzen, N., Einer-Jensen, K., et al. (2008). Cell-media & ted immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus. *Dev. Comp Immunol.* 32 (3), 239-52.
40. Jixiang, C., Shuang, L., Yun, L., Xianghong, W., Zongjun, D., Dehua, Y., et al. (2002). Purification of an extracellular protease from *Vibrio anguillarum* and its physicochemical properties. Zhongguo Shui Chan ke xue= *J. Fish. Sci. China.* 9 (4), 318-22.
41. Denkin, S. M., & Nelson, D. R. (2004). Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence. *Appl. Environ Microbiol.* 70 (7), 4193-204.
42. Nusbaum, K. E., Smith, B. F., DeInnocentes, P., & Bird, R.C. (2002). Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (IHV-1). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84 (3-4), 151-68.
43. Reyes, M., Ramírez, C., Ñancucheo, I., Villegas, R., Schaffeld, G., Kriman, L., et al. (2017). A novel "in-feed" delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Vaccine*. 35 (4), 626-32.
44. Hu, F., Li, Y., Wang, Q., Wang, G., Zhu, B., Wang, Y., et al. (2020). Carbon nanotube-based DNA vaccine against koi herpesvirus given by intramuscular injection. *Fish Shellfish Immunol.* 98, 810-8.
45. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines-a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (4), 261-79.
46. Perri, S., Greer, C. E., Thudium, K., Doe, B., Legg, H., Liu, H., et al. (2003).

An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. *J. Virol.* 77 (19), 10394-403.

47. Polo, J. M., Belli, B. A., Driver, D. A., Frolov, I., Sherrill, S., Hariharan, M. J., et al. (1999). Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus- and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (8), 4598-603.
48. Karlsen, M., Villoing, S., Rimstad, E., & Nylund, A. (2009). Characterization of untranslated regions of the salmonid alphavirus 3 (SAV3) genome and construction of a SAV3 based replicon. *Virol. J.* 6 (1), 1-6.
49. Wolf, A., Hodneland, K., Frost, P., Hoeijmakers, M., & Rimstad, E. (2014). Salmonid alphavirus-based replicon vaccine against infectious salmon anemia (ISA): impact of immunization route and interactions of the replicon vector. *Fish Shellfish Immunol.* 36 (2), 383-92.
50. Dhar, A. K., & Allnutt, F. (2011). Challenges and opportunities in developing oral vaccines against viral diseases of fish. *J. Mar. Sci. Res. Dev. S.* 1.
51. Dhar, A. K., Bowers, R. M., Rowe, C. G., & Allnutt, F. C. T. (2010). Expression of a foreign epitope on infectious pancreatic necrosis virus VP2 capsid protein subviral particle (SVP) and immunogenicity in rainbow trout. *Antiviral Res.* 85 (3), 525-31.
52. Chien, M. H., Wu, S. Y., & Lin, C. H. (2018). Oral immunization with cell-free self-assembly virus-like particles against orange-spotted grouper nervous necrosis virus in grouper larvae, Epinephelus coioides. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 197, 69-75.
53. Thiéry, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M., & Schneemann, A. (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J. Virol*. 80 (20), 10201-7.
54. Olsen, C. M., Pemula, A. K., Braaen, S., Sankaran, K., & Rimstad, E. (2013). Salmonid alphavirus replicon is functional in fish, mammalian and insect cells and in vivo in shrimps (*Litopenaeus vannamei*). *Vaccine*. 31 (48), 5672-9.
55. Chen, M., Hu, K. F., Rozell, B., Orvell, C., Morein, B., & Liljeström, P. (2002). Vaccination with recombinant alphavirus or immune-stimulating complex antigen against respiratory syncytial virus. *J. Immunol.* 169 (6), 3208-16.
56. Muñoz-Atienza, E., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2021). Systemic and mucosal B and T cell responses upon mucosal vaccination of teleost fish. *Front Immunol.* 11, 622377.
57. Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Brudeseth, B., Kuo, T. Y., Marjara, I. S., et al. (2012). Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. *Vaccine*. 30 (27), 4007-16.
58. Noonan, B., Enzmann, P. J., & Trust, T. J. (1995). Recombinant infectious hematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus glycoprotein epitopes expressed in *Aeromonas salmonicida* induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Appl. Environ. Microbiol*. 61 (10), 3586-91.
59. Lecocq-Xhonneux, F., Thiry, M., Dheur, I., Rossius, M., Vanderheijden, N., Martial, J., et al. (1994). A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *J. Gen. Virol.* 75 (7), 1579-87.
60. Acosta, F., Collet, B., Lorenzen, N., & Ellis, A. E. (2006). Expression of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) on the surface of the fish cell line RTG-P1 induces type 1 interferon expression in neighbouring cells. *Fish Shellfish Immunol.* 21 (3), 272-8.

61. Vakharia, V. N. (2005). Sub-unit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus. Google Patents.
62. Estepa, A., Thiry, M., & Coll, J. M. (1994). Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leukocyte anamnestic responses in vitro. *J. Gen. Virol.* 75 (6), 1329-38.
63. Rao, B. M., Kole, S., Gireesh-Babu, P., Sharma, R., Tripathi, G., & Bedekar, M. K. (2019). Evaluation of persistence, bio-distribution and environmental transmission of chitosan/PLGA/pDNA vaccine complex against *Edwardsiella tarda* in *Labeo rohita*. *Aquaculture*. 500, 385-92.
64. Mohamad, A., Zamri-Saad, M., Amal, M. N. A., Al-Saari, N., Monir, M. S., Chin, Y. K., et al. (2021). Vaccine efficacy of a newly developed feed-based whole-cell polyvalent vaccine against vibriosis, streptococcosis and motile aeromonad septicemia in Asian Seabass, *Lates calcarifer*. *Vaccines*. 9 (4), 368.
65. Busch, R. A. (1997). Polyvalent vaccines in fish: the interactive effects of multiple antigens. *Dev. Biol. Stand.* 90, 245-56.
66. Ma, Y., Zhang, Y., & Zhao, D. (2010). Polyvalent attenuated live vaccine for preventing and curing vibriosis of cultivated fish. Google Patents.
67. Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., et al. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* 35 (6), 1759-68.
68. Abu-Elala, N. M., Samir, A., Wasfy, M., & Elsayed, M. (2019). Efficacy of injectable and immersion polyvalent vaccine against streptococcal infections in broodstock and offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 88, 293-300.
69. Angelidis, P., Karagiannis, D., & Crump, E. M. (2006). Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Organ*. 71 (1), 19-24.
70. Mikkelsen, H., Lund, V., Larsen, R., & Seppola, M. (2011). Vibriosis vaccines based on various sero-subgroups of *Vibrio anguillarum* O_2 induce specific protection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 30 (1), 330-9.
71. Galindo-Villegas, J., Mulero, I., García-Alcazar, A., Muñoz, I., Peñalver-Mellado, M., Streitenberger, S., et al. (2013). Recombinant TNFα as oral vaccine adjuvant protects European sea bass against vibriosis: insights into the role of the CCL25/CCR9 axis. *Fish Shellfish Immunol.* 35 (4), 1260-71.
72. Siwicki, A. K., Morand, M., Terech-Majewska, E., Niemczuk, W., Kazuń, K., & Glabski, E. (1998). Influence of immunostimulants on the effectiveness of vaccines in fish: in vitro and in vivo study. *J. Appl. Ichthyol.* 14 (3-4), 225-7.
73. Raida, M. K., Nylén, J., Holten-Andersen, L., & Buchmann, K. (2011). Association between plasma antibody response and protection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *PLoS One.* 6 (6), e18832.
74. Skov, J., Kania, P. W., Holten-Andersen, L., Fouz, B., & Buchmann, K. (2012). Immunomodulatory effects of dietary β-1, 3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.* 33 (1), 111-20.
75. Ghosh, B., Nguyen, T. D., Crosbie, P. B. B., Nowak, B. F., & Bridle, A. R. (2016). Oral vaccination of first-feeding Atlantic salmon, *Salmo salar* L., confers greater protection against yersiniosis than immersion vaccination. *Vaccine*. 34 (5), 599-608.
76. Jaafar, R. M., Al-Jubury, A., Chettri, J. K., Dalsgaard, I., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2018). Secondary immune response of rainbow trout following repeated immersion vaccination. *J. Fish. Dis.* 41 (1), 117-23.
77. Erfanmanesh, A., Mohajerfar, T., Nikaein, D., Mokhtari, A., & Beikzadeh, B. (2022). Comparative protection of

two antigens (whole-cell and outer membrane vesicle) of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iran J. Fish Sci*. 21 (1), 187-201.

78. Mazandarani, M., Hoseinifar, S. H., Reza Gholi Tabar, Z., Sudagar, M., & Safari, R. (2022). Evaluation of Yersinia ruckeri vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Util Cultiv. Aquat*. 11 (2), 37-48.
79. Halimi, M., Alishahi, M., Abbaspour, M. R., Ghorbanpoor, M., & Tabandeh, M. R. (2020). High efficacy and economical procedure of oral vaccination against *Lactococcus garvieae/Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*. 99, 505-13.
80. Soltani, M., Alishahi, M., Mirzargar, S., & Nikbakht, G. (2007). Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. *Iran J. Fish. Sci.* 7 (1), 129-40.
81. Thinh, N. H., Kuo, T. Y., Hung, L. T., Loc, T. H., Chen, S. C., Evensen, Ø., et al. (2009). Combined immersion and oral vaccination of Vietnamese catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) confers protection against mortality caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish Shellfish Immunol*. 27 (6), 773-6.
82. Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2015). Immune response of flounder (*Paralichthys olivaceus*) was associated with the concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* and immersion time. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 167 (1-2), 44-50.
83. Xiao, J., Chen, T., Liu, B., Yang, W., Wang, Q., Qu, J., et al. (2013). *Edwardsiella tarda* mutant disrupted in type III secretion system and chorismic acid synthesis and cured of a plasmid as a live attenuated vaccine in turbot. *Fish Shellfish Immunol*. 35 (3), 632-41.
84. Triet, T. H., Tinh, B. T. T., Hau, L. V., Huong, T. V., & Binh, N. Q. (2019). Development and potential use of an *Edwardsiella ictaluri* wzz mutant as a live attenuated vaccine against enteric septicemia in *Pangasius hypophthalmus* (Tra catfish). *Fish Shellfish Immunol*. 87, 87-95.
85. Gao, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2016). Antigen uptake and expression of antigen presentation-related immune genes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination with an inactivated *Edwardsiella tarda* immersion vaccine, following hyperosmotic treatment. *Fish Shellfish Immunol*. 55, 274-80.
86. Salonius, K., Siderakis, C., MacKinnon, A. M., & Griffiths, S. G. (2005). As a live vaccine against. *Dev. Biol. Basel*. 121, 189-97.
87. Ravid-Peretz, S., Colorni, A., Sharon, G., & Ucko, M. (2019). Vaccination of European sea bass *Dicentrarchus labrax* with avirulent *Mycobacterium marinum* (iipA:: kan mutant). *Fish Shellfish Immunol*. 90, 317-27.
88. Ziklo, N., Colorni, A., Gao, L., Du, S. J., & Ucko, M. (2018). Humoral and Cellular Immune Response of European Seabass *Dicentrarchus labrax* Vaccinated with Heat-Killed *Mycobacterium marinum* (iipA:: kan Mutant). *J. Aquat. Anim. Health*. 30 (4), 312-24.
89. Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2019). Review on immersion vaccines for fish: An update 2019. *Microorganisms*. 7 (12), 627.
90. Costa, A. A., Leef, M. J., Bridle, A. R., Carson, J., & Nowak, B. F. (2011). Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 315 (3-4), 201-6.
91. Nguyen, T. D., Crosbie, P. B. B., Nowak, B. F., & Bridle, A R. (2018). The effects of inactivation methods of *Yersinia ruckeri* on the efficacy of single dip vaccination in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish Dis.* 41 (7), 1173-6.
92. Thornton, J. C., Garduno, R. A., Newman, S. G., & Kay, W. W. (1991). Surface-disorganized, attenuated mutants of *Aeromonas salmonicida* as furunculosis live vaccines. *Microb. Pathog*. 11 (2), 85-99.

93. Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., Drennan, J. D., & Evans, J. J. (2011). Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 30 (1), 304-8.
94. Kitiyodom, S., Kaewmalun, S., Nittayasut, N., Suktham, K., Surassmo, S., Namdee, K., et al. (2019). The potential of mucoadhesive polymer in enhancing efficacy of direct immersion vaccination against *Flavobacterium columnare* infection in tilapia. *Fish Shellfish Immunol.* 86, 635-40.
95. Zhang, M., Zhang, T., He, Y., Cui, H., Li, H., Xu, Z., et al. (2023). Immunogenicity and protective efficacy of OmpA subunit vaccine against *Aeromonas hydrophila* infection in *Megalobrama amblycephala*: An effective alternative to the inactivated vaccine. *Front Immunol.* 14, 1133742.
96. Vendramin, N., Alencar, A. L. F., Iburg, T. M., Dahle, M. K., Wessel, Ø., Olsen, A. B., et al. (2018). Piscine orthoreovirus infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*) protects against subsequent challenge with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Vet. Res.* 49, 1-12.
97. Fernandez-Alonso, M., Rocha, A., & Coll, J. M. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*. 19 (23-24), 3067-75.
98. Lund, M., Røsæg, M. V., Krasnov, A., Timmerhaus, G., Nyman, I. B., Aspehaug, V., et al. (2016). Experimental Piscine orthoreovirus infection mediates protection against pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet. Res.* 47 (1), 1-16.
99. Caruffo, M., Maturana, C., Kambalapally, S., Larenas, J., & Tobar, J. A. (2016). Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol.* 54, 54-9.
100. Zhang, C., Zheng, Y. Y., Gong, Y. M., Zhao, Z., Guo, Z. R., Jia, Y. J., et al. (2019). Evaluation of immune response and protection against spring viremia of carp virus induced by a single-walled carbon nanotubes-based immersion DNA vaccine. *Virology*. 537, 216-25.
101. Aonullah, A. A., Nuryati, S., & Alimuddin, M. S. (2017). Efficacy of koi herpesvirus DNA vaccine administration by immersion method on *Cyprinus carpio* field scale culture. *Aquac. Res.* 48 (6), 2655-62.
102. Mohan, T., Verma, P., & Rao, D. N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J. Med. Res.* 138 (5), 779.
103. Raman, R. P., & Kumar, S. (2022). Adjuvants for fish vaccines. In: Fish immune system and vaccines. Springer. p. 231-44.
104. Tafalla, C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol.* 35 (6), 1740-50.
105. Li, J., Tang, L., Li, S., Li, G., & Mo, Z. (2020). The efficacy and side-effects of oil-based adjuvants emulsified *Vibrio anguillarum* bivalent inactivated vaccine in turbot (*Scophthalmus maximus*) under production mode. *Aquaculture*. 524, 735259.
106. Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2012). Developments in adjuvants for fish vaccines. In: Infectious Disease in Aquaculture. *Elsevier*. p. 244-74.
107. Gjessing, M. C., Falk, K., Weli, S. C., Koppang, E. O., & Kvellestad, A. (2012). A sequential study of incomplete Freund's adjuvant-induced peritonitis in Atlantic cod. *Fish Shellfish Immunol.* 32 (1), 141-50.
108. Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M. C., Costa, L., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (2006). Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 251 (2-4), 153-8.
109. Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 33 (4), 492-503.

110.Mulvey, B., Landolt, M. L., & Busch, R. A. (1995). Effects of potassium aluminium sulphate (alum) used in an *Aeromonas salmonicida* bacterin on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.* 18 (6), 495-506.

111.Jiao, X., Cheng, S., Hu, Y., & Sun, L. (2010). Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an Edwardsiella tarda major antigen. *Vaccine*. 28 (7), 1832-7.

112.Rørstad, G., Aasjord, P. M., & Robertsen, B. (1993). Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 3 (3), 179-90.

113.Ogier de Baulny, M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., & Le Gouvello, R. (1996). Effect of long-term oral administration of beta-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Organ.* 26 (2), 139-47.

114.Caipang, C. M. A., Hirono, I., & Aoki, T. (2005). Induction of antiviral state in fish cells by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, interferon regulatory factor-1. *Fish Shellfish Immunol.* 19 (1), 79-91.

115.Sanchez, E., Coll, J., & Tafalla, C. (2007). Expression of inducible CC chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) DNA vaccine and interleukin 8. *Dev. Comp. Immunol.* 31 (9), 916-26.

116.Hoel, K., & Lillehaug A. (1997). Adjuvant activity of polar glycopeptidolipids from*Mycobacterium chelonaein* experimental vaccines against*Aeromonas salmonicida*in salmonid fish. *Fish Shellfish Immunol.* 7 (6), 365-76.

117.Kamilya, D., Maiti, T. K., Joardar, S. N., & Mal, B. C. (2006). Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *J. Fish. Dis.* 29 (6), 331-7.

118.Marana, M. H., Sepúlveda, D., Chen, D., Al-Jubury, A., Jaafar, R. M., Kania, P. W., et al. (2019). A pentavalent vaccine for rainbow trout in Danish aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 88, 344-51.

119.Villumsen, K. R., Koppang, E. O., & Raida, M. K. (2015). Adverse and long-term protective effects following oil-adjuvanted vaccination against *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 42 (1), 193-203.

120.He, L., Wu, L., Tang, Y., Lin, P., Zhai, S., Xiao, Y., et al. (2020). Immunization of a novel outer membrane protein from *Aeromonas hydrophila* simultaneously resisting *A. hydrophila* and *Edwardsiella anguillarum* infection in European eels (*Angullia angullia*). *Fish Shellfish Immunol*. 97, 300-12.

121.Ramos-Espinoza, F. C., Cueva-Quiroz, V. A., Yunis-Aguinaga, J., Alvarez-Rubio, N. C., de Mello, N. P., & de Moraes, J. R. E. (2020). Efficacy of two adjuvants administrated with a novel hydrogen peroxide-inactivated vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Nile tilapia* fingerlings. *Fish Shellfish Immunol*. 105, 350-8.

122.Ellul, R. M., Bulla, J., Brudal, E., Colquhoun, D., Wergeland, H., & Rønneseth, A. (2019). Protection and antibody reactivity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) following vaccination against *Pasteurella sp*. *Fish Shellfish Immunol.* 95, 650-8.

123.Huang, P., Cai, J., Yu, D., Tang, J., Lu, Y., Wu, Z., et al. (2019). An IL-6 gene in humphead snapper (*Lutjanus sanguineus*): Identification, expression analysis and its adjuvant effects on Vibrio harveyi OmpW DNA vaccine. *Fish Shellfish Immunol.* 95, 546-55.

124.Hwang, J. Y., Kwon, M. G., Kim, Y. J., Jung, S. H., Park, M. A., & Son, M. H. (2017). Montanide IMS 1312 VG adjuvant enhances the efficacy of immersion vaccine of inactivated viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 420-5.

125.Xu, W., Jiao, C., Bao, P., Liu, Q., Wang, P., Zhang, R., et al. (2019). Efficacy of Montanide™ ISA 763 A VG as aquatic adjuvant administrated with an inactivated *Vibrio harveyi* vaccine in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 84, 56-61.

126.Soltani, M., Mokhtari, A., Mirzargar, S. S., Taherimirghaed, A., Zargar, A., Shafiei, S., et al. (2016). Efficacy and immune response of intraperitoneal vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a *Yersinia ruckeri* bacterin formulated with Montanide™ ISA 763 AVG adjuvant. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 36 (6), 225-36.

127.Nguyen, H. T., Nguyen, T. T. T, Tsai, M. A., Ya-Zhen, E., Wang, P. C., & Chen, S. C. (2017). A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol.* 65, 118-26.

128.Kwon, H. C., & Kang, Y. J. (2016). Effects of a subunit vaccine (FlaA) and immunostimulant (CpG-ODN 1668) against *Vibrio anguillarum* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 454, 125-9.

129.Hoare, R., Jung, S. J., Ngo, T. P. H., Bartie, K., Bailey, J., Thompson, K. D., et al. (2019). Efficacy and safety of a non-mineral oil adjuvanted injectable vaccine for the protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Shellfish Immunol.* 85, 44-51.

130.Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquac Int.* 18 (3), 403-14.

131.Van Hai, N. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*. 446, 88-96.

132.Aly, S. M., Al Zohairy, M. A., Rahmani, A. H., Fathi, M., & Atti, N. M. A. (2016). Trials to improve the response of Orechromis niloticus to *Aeromonas hydrophila* vaccine using immunostimulants (*garlic*, *Echinacea*) and probiotics (Organic GreenTM and Vet-YeastTM). *African J. Biotechnol.* 15 (21), 989-94.

133.Guz, L., Puk, K., Walczak, N., Oniszczuk, T., & Oniszczuk, A. (2014). Effect of dietary supplementation with *Echinacea purpurea* on vaccine efficacy against infection with *Flavobacterium columnare* in zebrafish (*Danio rerio*). *Pol J. Vet. Sci.* 17 (4).

134.Zaheri Abdevand, L., Soltani, M., & Shafiei, S. (2021). Adjuvant effect of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract on the efficacy of lactococcosis vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iran J. Fish. Sci.* 20 (3), 646-62.

135.Abdy, E., Alishahi, M., Tollabi, M., Ghorbanpour, M., & Mohammadian, T. (2017). Comparative effects of Aloe vera gel and Freund's adjuvant in vaccination of common carp (*Cyprinus carpio* L.) against *Aeromonas hydrophila*. *Aquac. Int.* 25, 727-42.

136.Dhayanithi, N. B., Kumar, T. T. A., Arockiaraj, J., Balasundaram, C., & Harikrishnan, R. (2015). Dietary supplementation of *Avicennia marina* extract on immune protection and disease resistance in Amphiprion sebae against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 45 (1), 52-8.

137.Wang, Y., Wang, X., Huang, J., & Li, J. (2016). Adjuvant effect of *Quillaja saponaria* saponin (QSS) on protective efficacy and IgM generation in turbot (*Scophthalmus maximus*) upon immersion vaccination. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (3), 325.