Journal of Aquaculture Development
Vol. 19, No. 2, 2025, Pages: 115-128
DOI: 10.71901/jad-2025-2-850

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Evaluation of using the hyperosmotic environment on the *Yersinia ruckeri* vaccine efficacy by bath method in juvenile great sturgeon (*Huso huso*)

Tabibi, H.R.[1], Afshar Moghaddam, R.[1], Hatami Zharabad, A.[1], Yousefi Siahkalroodi, M.[2], Namrudi, S.[3], Mazandarani, M[1*]

1- Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Department of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan Iran

Received: 25 May 2024 **Accepted: 20 September 2024**

Abstract:

Introduction: In this study, the effectiveness of *Yersinia ruckeri* vaccine was assessed using both the bath and injection methods on great sturgeon (*Huso huso*).

Materials and Method: Six experimental groups were formed, including a group of fish vaccinated by injection method (treatment 1), group of fish vaccinated in two stages using the hyperosmotic solution+vaccine by bath method (treatment 2), a group of fish vaccinated in two stages using the vaccine by bath method (treatment 3), a group of fish vaccinated in one stage using the hyperosmotic solution+vaccine (treatment 4), a group of fish vaccinated in one stage by the bath method (treatment 5), and a control group (treatment 6). For each group, 20 fish were used in two replications, totaling 120 fish with an average weight of 24.6±1.5, which were distributed across 12 fiberglass tanks with a water volume of 140 liters. In this experiment, the second stage of vaccination for the two-stage vaccinated fish was administered 21 days after the first stage, and sampling and bacterial exposure were conducted 42 days after the first vaccination.

Results and Discussion: Based on the results the total protein and serum immunoglobulin levels and the serum antibody titer against *Yersinia rockeri* was higher in fish vaccinated by injection method compared to other treatments ($p \geq 0.05$). On the other hand, in fish vaccinated by bath method, there was no significant difference in these parameters compared to the control ($p < 0.05$). The highest number of white blood cells (WBC) was observed in fish vaccinated by injection method, followed by fish vaccinated by two-step bath method ($p \geq 0.05$). No significant difference was recorded between the fish that received one-

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

step vaccine by bath method and the control (p>0.05). After the bacterial challenge, the control group had the highest mortality rate (77.8%), while the lowest mortality rate was recorded in the fish vaccinated by injection method (33%). In the analysis of serum alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) levels, no significant differences were observed in all the studied groups. Therefore the one-step vaccination by bath method did not provide adequate immunity in great sturgeon.

Conclusion: In conclusion, it seems that vaccination by injection method has good efficacy with no side effects in this fish.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, *Huso huso*,vaccination, bacterial challenge, antibody titer

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

* *Corresponding Author: mazandarani57@gmail.com*

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

DOI: 10.71901/jad-2025-2-850

"مقاله پژوهشی"

ارزیابی محیط هایپراسموتیک بر عملکرد واکسن *یرسینیا راکری* " *Yersinia ruckeri*" به‌روش حمام در فیل‌ماهی جوان (*Huso huso*)

حمیدرضا طبیبی[۱]، رضا افشارمقدم[۱]، عبداسلام حاتمی‌ژارآباد[۱]، مهیار یوسفی‌سیاه‌کلرودی[۲]، سمیه نمرودی[۳]، محمد مازندرانی [۱*]

۱-گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲-گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳-گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۳۰

چکیده

در این بررسی وضعیت عملکرد واکسن *یرسینیا راکری* (*Yersina ruckeri*) در روش حمام و تزریق در فیل‌ماهی (*Huso huso*) مورد ارزیابی قرارگرفت. در این راستا شش گروه آزمایشی شامل گروه ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق (تیمار۱)، گروه ماهیان دو مرحله واکسینه شده به‌روش محیط هایپر اسموتیک + حمام (تیمار۲)، گروه ماهیان دو مرحله واکسینه شده (تیمار۳)، گروه ماهیان یک مرحله واکسینه شده به‌روش محیط هایپر اسموتیک + حمام (تیمار۴)، گروه ماهیان یک مرحله واکسینه شده به‌روش حمام (تیمار۵) و ماهیان گروه شاهد (تیمار۶) مهیا گردید. برای هر گروه از ماهیان دو تکرار و برای هر تکرار ۱۰ عدد ماهی نظر گرفته شد. بچه ماهیان مورد بررسی با میانگین وزن اولیه ۱/۵ ± ۲۴/۶ در تانک های فایبرگلاس با حجم آب حدود ۱۴۰ لیتر معرفی شدند. در این بررسی واکسیناسیون مرحله دوم برای ماهیان گروه واکسینه دومرحله‌ای ۲۱ روز پس از واکسیناسیون دوره اول صورت گرفت و نمونه‌برداری‌ها و نیز مواجهه باکتریایی ۴۲ روز پس از اولین واکسیناسیون صورت گرفت. براساس نتایج مقادیر پروتئین کل و ایمنوگلوبولین سرم تیتر آنتی‌بادی سرمی بر علیه *یرسینیا راکری* در ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق بالاتر از سایر تیمارها اندازه‌گیری شد ($p\leq$۰/۰۵)، اما در ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($p>$۰/۰۵). بالاترین میزان تعداد گلبول‌های سفید خون در ماهیان واکسینه شده به روش تزریق و سپس در ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵)، در ماهیانی که یک مرحله واکسن به روش حمام دریافت نمودند اختلاف معنی‌دار با ماهیان گروه شاهد مشاهده نگردید ($p>$۰/۰۵). در مواجهه باکتریایی بالاترین میزان تلفات مربوط به ماهیان گروه شاهد (۷۷/۸ ٪) و پایین ترین میزان تلفات مربوط به ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق (۳۳ ٪) ثبت گردید. در بررسی آنزیم‌های کبدی آلکالاین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) هیچ اختلاف معنی‌داری در تمامی گروه‌های مورد بررسی مشاهده نشد ($p>$۰/۰۵). در این بررسی یک مرحله واکسن به‌روش حمام ایمنی مناسبی در فیل ماهیان ایجاد نکرد و در عین حال بهترین کارآیی برای این واکسن بدون عوارض ناشی از تزریق مربوط به واکسیناسیون به‌روش تزریق می‌باشد.

کلمات کلیدی: *یرسینیا راکری*، *Huso huso*، واکسیناسیون، مواجهه باکتریایی، تیتر آنتی‌بادی

* عهده‌دار مکاتبات: mazandarani57@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله با ارزش ترین ماهیان اقتصادی در دنیا محسوب می‌شوند که گذشته سهم بسیار بالایی را به لحاظ اقتصادی در صنعت شیلات کشور دارا بوده است، البته این مبحث بیشتر مربوط به صید ماهیان خاویاری از دریای خزر و صادرات خاویار دریایی بود اما به دلایل مختلف ازجمله فروپاشی شوروی و عدم رعایت اصول صید توسط کشورهای حاشیه خزر، آلودگی دریا، از بین رفتن منابع طبیعی بازسازی ذخایر و.... روند صید از دریا به‌شدت کاهش یافت به گونه ای که میزان صید از ۱۷۸۹ تن ماهی خاویاری در سال ۱۹۹۱ به ۱۳ تن در سال ۲۰۲۱ رسیده است (Statistical Yearbook of Iranian Fisheries, 2022). به همین دلیل در سال های اخیر پرورش ماهی خاویاری در کشور در اولویت قرار گرفته و همه ساله آمار تولید رو به افزایش بوده است براساس آمار شیلات ایران میزان استحصال ماهیان خاویاری پرورشی در کشور از ۲۱۴۶ تن در سال ۲۰۱۶ به ۳۱۴۵ تن در سال ۲۰۲۱ رسیده است و در ۲۱ استان کشور در حال حاضر پرورش ماهیان خاویاری صورت می‌گیرد (Statistical Yearbook of Iranian Fisheries, 2022). فیل ماهی یکی از با ارزش ترین و بزرگ ترین گونه پرورشی در کشور است که از اقبال بیشتری در بین پرورش‌دهندگان برخوردار است. آنچه مسلم است محیط‌های پرورش و به خصوص پرورش متراکم محیطی بسیار استرس‌زا برای ماهی است و این استرس باعث کاهش عملکرد سیستم ایمنی ماهی می‌شود که با بروز بیماری‌های مختلف ویروسی، قارچی و باکتریایی همراه است (El-noby *et al*., 2021).

یکی از بیماری‌های شایع در کشور که به طور گسترده مزارع ماهیان سردابی دچار مشکل نموده است بیماری ناشی از باکتری *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*) بوده و معمولاً به صورت عمومی و سیستماتیک با علایم کلینیکی گسترده ماهیان را درگیر نموده و خسارات فراوانی به این مزارع وارد می‌سازد (Tobback *et al*., 2009). این بیماری در طیف وسیعی از ماهیان پرورشی و غیرپرورشی در نقاط مختلف دنیا گزارش گردید (Bøgwald and Dalmo, 2019). برخی از محققین بر این باور هستند که آزادماهیان حساسیت بالاتری نسبت به سایر گونه‌ها به این بیماری دارند (Furones *et al*., 1993). در ایران این بیماری در سال ۱۹۹۹ از مزارع ماهیان سردآبی رویت و گزارش شد (Soltani *et al*., 1999)، پس از آن از از نقاط مختلف کشور برای مزارع سردآبی گزارش شد (Soltani *et al*., 1999; Fadaeifard and Simin, 2014). با توجه به حساسیت ماهیان خاویاری و حضور بیماری در منطقه، بروز این بیماری در مزارع خاویاری در صورت عدم مدیریت بهداشتی اجتناب ناپذیر است، در این راستا واکسیناسیون یکی از مناسب‌ترین و به‌صرفه ترین روش در کنترل بیماری‌ها محسوب می‌شود که در تمام مزارع پرورشی مدرن در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. واکسیناسیون برای آبزیان عمدتاً به سه روش خوراکی، حمام و تزریق به کار گرفته می‌شود که بالاترین کارآیی مربوط به روش تزریق است اما به‌دلیل عوارض ناشی از تزریق و استرس وارده به مزارع و نیز لزوم حضور نیروی متخصص سایر روش‌ها از اقبال بیشتری برخوردار است در این راستا بررسی‌های متعددی برای افزایش کارآیی واکسیناسیون به این روش‌ها پیشنهاد شده است که یکی از این

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

پیشنهادات استفاده از محیط هایپراسموتیک پیش از واکسیناسیون در محیط آب شیرین است (Du *et al*., 2017).

با توجه به شیوع بالای یرسینیوزیس در مزارع ماهیان پرورشی در کشور و اهمیت بالای پرورش ماهیان خاویاری و نیز لزوم کنترل بیماری‌های شایع در واکسیناسیون امری اجتناب‌ناپذیر است لذا در این راستا پیشنهاد نحوه به کارگیری واکسن در مزارع ماهیان خاویاری می‌تواند مفید واقع گردد در این بررسی عملکرد واکسن *یرسینیا راکری* در بچه ماهیان خاویاری فیل ماهی در دو روش حمام و تزریقی و تاثیر به کارگیری محیط هایپراسموتیک بر عملکرد آن مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه‌ماهی و شرایط پرورش

به‌منظور انجام آزمایش ۱۲۰ بچه فیل ماهی پرورشی با میانگین وزنی ۱/۵±۲۴/۶ از یکی از مزارع پرورشی استان مازندران تهیه گردیده و با ماشین حمل ماهی به همراه هواده به مرکز تحقیقات آبزی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. ماهیان مذکور پس از هم‌دمایی در یک تانک فایبرگلاس با ابعاد ۲×۲ با ارتفاع آبگیری ۴۵ سانتی‌متر منتقل شده و به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند سپس در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری با حجم آب ۱۴۰ لیتر تقسیم شده و به‌مدت یک هفته به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایش مورد پرورش قرار گرفتند. سپس ماهیان تیماربندی شده و بررسی‌های تکمیلی صورت پذیرفت. در این دوره ماهیان ۲ بار در روز غذادهی شده و ۸۰ درصد آب هر تانک نیز به‌طور روزانه تعویض گردید.

دمای آب در طی دوره آزمایش ۳/۵±۲۱/۴ درجه سانتی‌گراد، سختی آب برابر با ۰/۳۳±۱۸۶/۲ میلی‌گرم/لیتر، pH برابر ۰/۳±۷/۱ (با استفاده از دستگاه پرتال Modeh AZ–۸۶۰) اندازه‌گیری گردید.

گروه‌بندی و انجام آزمایش

به‌منظور انجام آزمایش ۶ گروه آزمایشی در نظر گرفته شد. در این راستا برای هر تیمار نیز دو تکرار تعیین گردید، که به ترتیب شامل گروه شاهد: گروه ماهیان غیر واکسینه، تیمار۱: گروه ماهیان واکسینه شده به روش تزریق، تیمار۲: گروه ماهیان واکسینه دو مرحله‌ای محیط هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام، تیمار۳: گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام، تیمار۴: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای هایپراسمزتیک + واکسن به روش حمام و تیمار ۵: گروه ماهیان واکسینه یک مرحله‌ای به‌روش حمام. واکسن مورد استفاده در این بررسی واکسن غیر فعال شده *یرسینیا راکری* ساخت شرکت بوژان تک فارمد بود. این واکسن به‌صورت سوسپانسیون باکتری غیر فعال بوده (با غلظت 10^8/باکتری/میلی‌لیتر) براساس دستورالعمل شرکت تولید کننده، واکسن به‌میزان ۰/۱ با آب پرورش رقیق شده (یک لیتر واکسن در ۹ لیتر آب) و به‌مدت دو دقیقه برای روش حمام مورد استفاده قرار گرفت. در گروه واکسیناسیون به‌روش هایپراسمتیک + واکسن ماهیان پیش از واکسیناسیون به‌مدت ۸ دقیقه در محیط آب نمک ۱۵ گرم/لیتر قرار داده شده (Namrudi *et al*., 2015) و بلافاصله بعد از آن واکسیناسیون به روش حمام صورت گرفت. در ماهیان

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق به هر کدام از ماهیان ۰/۱ سی سی از واکسن را به‌روش تزریق داخل صفاقی تزریق شد. در ماهیان گروه واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای ۲۱ روز پس از مرحله اول، واکسن یادآور به‌روش حمام تکرار گردید.

نحوه ارزیابی مواجهه باکتریایی و روند تلفات

به منظور ارزیابی عملکرد واکسن در مواجهه مستقیم، سویه باکتری *Yersina ruckeri* با کد PTCC 1888 (Mazandarani) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه گردید.

پس از آماده سازی باکتری به روش استاندارد، بار باکتریایی سوسپاسپانسون به دست آمده به روش کدورت سنجی و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۴۰ نانومتر و OD برابر با یک تنظیم گردید که با کشت سطحی در رقت‌های سریالی بر مبنای تشکیل CFU رقت سلول‌های زنده به‌میزان $۷/۱ \times ۱۰^{۸}$ سلول باکتری در هر سی‌سی از سوسپانسیون برای باکتری *یرسینیا راکری* محاسبه شد (Gholitebar *et al*., 2022). در این راستا ۹ ماهی برای هر تیمار در نظر گرفته شد. سوسپانسون‌های باکتریایی مذکور به میزان یک دهم با سرم فیزیولوژی رقیق شده و از هر استوک ۰/۱ سی سی به هر ماهی تزریق گردید. به این منظور ماهیان با داروی بیهوشی یوجینول (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) بیهوش شده و با سرنگ انسولینی و سر سوزن گیج ۳۰ به روش تزریق داخل صفاقی مورد مواجهه قرار گرفته شده و به صورت روزانه مورد مانیتورینگ قرار گرفته شده و تلفات ثبت گردید (Mazandarani and Taheri Mirghaeed, 2016). به‌منظور تأیید علت مرگ ماهیان از کلیه ماهیان در حال مرگ و یا تازه تلف شده کشت باکتریایی در محیط نوترینت آگار صورت گرفته و باکتری *یرسینیا راکری* به‌عنوان عامل بیماری جداسازی و تایید گردید.

تیتر آنتی‌بادی در برابر باکتری *یرسینیا راکری* به‌روش میکرواگلوتیناسیون

تیتر آنتی بادی براساس روش توضیح داده شده توسط Swain و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. به این منظور از پلیت‌های ۹۶ گوده‌ای استفاده گردید و رقت سوسپانسیون باکتریایی در این آزمایش $۳/۸ \times ۱۰^{۸}$CFU/ml بوده و پس از اضافه شدن این سوسپانسیون پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اطاق انکوبه شدند. عدد نهایی به‌صورت لگاریتم در مبنای ۲ عکس بالاترین رقتی که آگلوتیناسیون در آن مشاهده گردید ثبت شد (Swain *et al*., 2007).

اندازه‌گیری پارامترهای سرمی

برای بررسی های سرولوژیکی و خون‌شناسی، چهار هفته بعد از مرحله دوم واکسیناسیون از ۶ عدد ماهی از هر تکرار (۱۲ ماهی از هر تیمار) خونگیری صورت پذیرفت. برای بیهوشی ماهیان از محلول یوجینول با غلظت ۱۰۰ (میلی‌گرم/لیتر) استفاده شد و خونگیری با سرسوزن گیج ۲۳ از ساقه دمی انجام گرفت (Namrudi *et al*., 2015). خونگیری از ساقه دمی با سرسوزن گیج ۲۳ و سرنگ‌های ۲/۵ سی‌سی صورت گرفت. قسمتی از خون به‌منظور بررسی‌های هماتولوژی در اپندروف‌های حاوی ۵۰ میکرولیتر هپارین منتقل شده و ۱ سی‌سی از خون نیز به‌منظور جداسازی سرم در لوله‌های ۲ سی‌سی غیر هپارینه منتقل شد. سرم خون نمونه‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm) جدا سازی

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

گردید و اندازه گیری مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی گلوکز، پروتئین، آلبومین، ALP، AST و ALT توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون صورت گرفت. به این منظور اندازه گیری مقادیر ایمنوگولوبولین کل در ابتدا مقادیر پروتئین کل با استفاده از کیت‌های پارس آزمون و به روش Johnson و همکاران (۱۹۹۹) تعیین شد سپس به سرم پلی‌اتیلن گلیکول اضافه گردید و از اختلاف میزان پروتئین سرم قبل و بعد از ته‌نشینی با پلی‌اتیلن گلیکول به روش Siwicki و همکاران (۱۹۹۳) مقدار ایمنوگولوبولین محاسبه گردید.

اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید

برای اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید قسمتی از خون هپارینه شده با محلول دایس به میزان ۱۰۰ برابر رقیق شد و کمک لام نئوبار و براساس روش استاندارد تعداد گلبول‌های سفید خون در هر میلی متر مکعب محاسبه شد (Dacie and Lewis, 2001).

تجزیه و تحلیل آماری

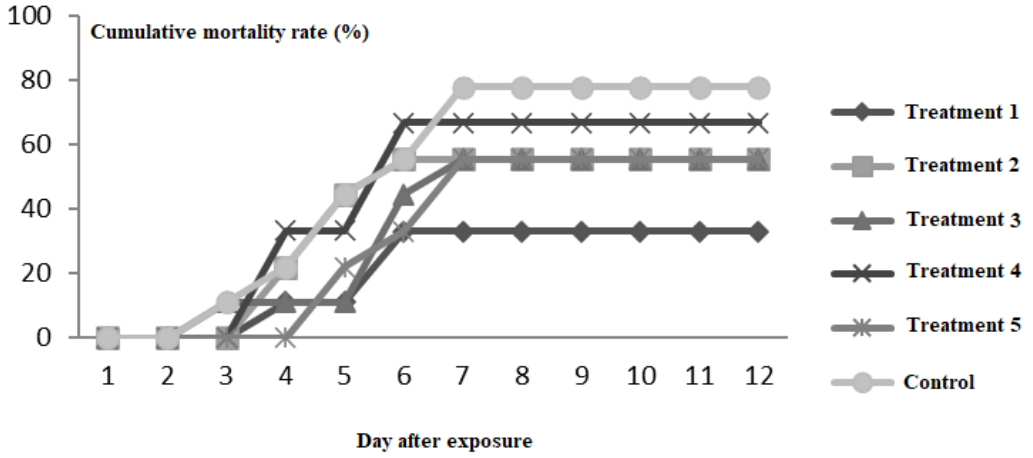
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای SPSS18 و Excell 2010 استفاده شد. در این راستا برای تعیین سطوح معنی‌داری از آزمون آماری Duncan با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) استفاده گردید.

نتایج

وضعیت زنده‌مانی ماهیان گروه‌های مختلف واکسینه شده به روش تزریق و حمام در مقایسه با ماهیان گروه شاهد در مواجهه با سویه بیماری‌زای باکتری *یرسینیا راکری* در شکل ۱ آورده شده‌است. همان گونه که مشاهده می‌شود ۴۸ ساعت اول پس از مواجهه هیچ تلفاتی در گروه‌های مختلف ماهیان مورد بررسی ثبت نگردید، اولین تلفات در ماهیان گروه شاهد و گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای در محیط هایپراسموتیک+واکسن به روش حمام مشاهده شد. تلفات در تمامی گروه‌های مورد بررسی در طی روزهای بعدی ثبت گردیده و تا روز هفتم پس از مواجهه باکتریایی روند تلفات ادامه داشته و پس از آن تا روز ۱۴ پس از مواجهه این روند تغییری نداشت. همان گونه که مشاهده می‌شود در این بررسی در نهایت پس از مواجهه باکتریایی ۷۷/۸ درصد از ماهیان گروه شاهد، ۵۵/۵ درصد از ماهیان واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای، ۶۶/۷ درصد از ماهیان واکسینه شده در محیط هایپراسموتیک+واکسن به روش حمام، ۵۵/۵ درصد از ماهیان هر دو گروه واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای و نیز ۳۳ درصد از ماهیان واکسینه شده به روش تزریق تلف شدند (شکل ۱).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]



شکل ۱: درصد تلفات تجمعی ماهیان تیمار و شاهد بعد از مواجهه با باکتری *یرسینیا راکری* طی ۱۲ روز

Chart 1: Cumulative Mortality Percentage of Treatment and Control Fish After Exposure to *Yersinia ruckeri* Over 12 Days

در بررسی سرولوژی، مقادیر آنزیم آلکالاین فسفاتاز (ALP) در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده به روش حمام و تزریق و نیز ماهیان غیر واکسینه اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p\geq$۰/۰۵) (شکل ۲). در بررسی مقادیر اندازه گیری شده آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) نیز هیچ اختلاف معنی‌داری ($p\geq$۰/۰۵) در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده (به روش حمام و تزریق) و نیز ماهیانی که واکسن دریافت نکردند ثبت نشد (شکل ۳). همچنین بر اساس نتایج قابل مشاهده در نمودار ۳، مقادیر آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تماهی ماهیان گروه‌های مختلف واکسینه شده و غیر واکسینه فاقد اختلاف معنی دار بود (شکل ۴).

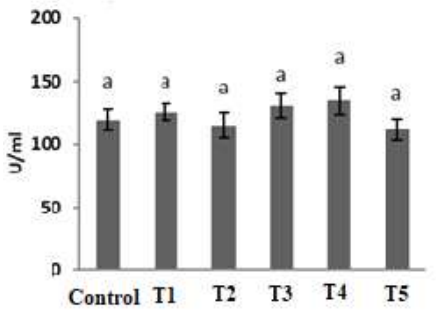
همچنین در ادامه بررسی‌های سرولوژی، بالاترین مقادیر پروتئین تام به ترتیب در ماهیان گروه واکسینه شده به‌روش تزریق و سپس در ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای در محیط هایپراسموتیک + واکسن به روش حمام اندازه‌گیری شد ($p\leq$۰/۰۵)، در سایر ماهیان گروه‌های واکسینه شده و ماهیان گروه شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۵). در بررسی مقادیر ایمنونوگلوبولین سرم خون ماهیان مورد بررسی بالاترین مقدار مربوط به ماهیان گروه واکسینه شده به روش تزریق بود ($p\leq$۰/۰۵) در سایر ماهیان گروه‌های واکسینه شده و گروه شاهد اختلاف معنی دار ثبت نشد (شکل ۶). همچنین هیچ اختلاف معنی داری در سطح گلوکز خون در گروه‌های مختلف ماهیان در این بررسی اندازه‌گیری نشد (شکل ۷).

در بررسی‌های خون‌شناسی تعداد گلبول‌های سفید خون در ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق و هر دو گروه ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به‌روش حمام به طور معنی‌داری بالاتر از سایر ماهیان مورد بررسی بود در این راستا بالاترین میزان در گروه ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق و سپس در ماهیان واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵) در ماهیان گروه‌های واکسینه شده یک مرحله‌ای و نیز ماهیان گروه شاهد اختلاف معنی‌دار ثبت نشد (شکل ۸).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

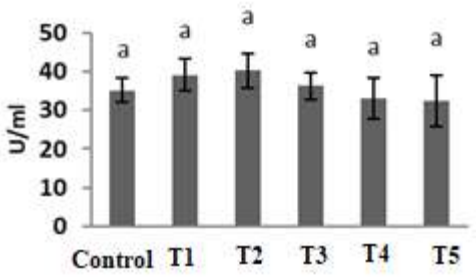
[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

همچنین در بررسی تیتر آنتی‌بادی سرمی، در تمامی ماهیان واکسینه شده آگلوتیناسیون باکتری *یرسینیا راکری* مشاهده شد، در عین حال هیچ تیتری در ماهیان گروه شاهد ثبت نگردید براساس این نتایج بالاترین میزان تیتر مربوط به ماهیان گروه واکسینه شده به‌روش تزریق برای باکتری *یرسینیا راکری* بوده است ($p\leq$۰/۰۵)، پس از آن ماهیان واکسینه شده دو مرحله‌ای به روش حمام بالاترین تیتر را داشتند. تیتر آنتی بادی برای ماهیان گروه‌های واکسینه یک مرحله‌ای (تیمار ۴ و تیمار ۵) آنقدر کم بوده است که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند ($p>$۰/۰۵) (شکل ۹).



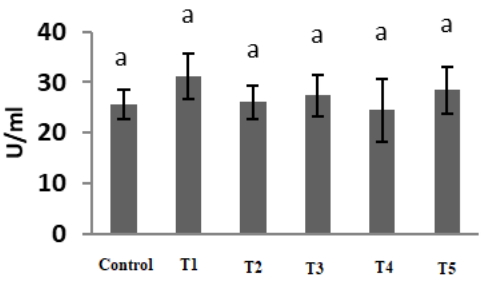
شکل ۲: مقایسه میانگین آنزیم آلکالاین فسفاتاز در گروه های مختلف ماهیان واکسینه

Figur 2: Comparison of Mean Alkaline Phosphatase (ALP) Enzyme Levels in Different Groups of Vaccinated Fish



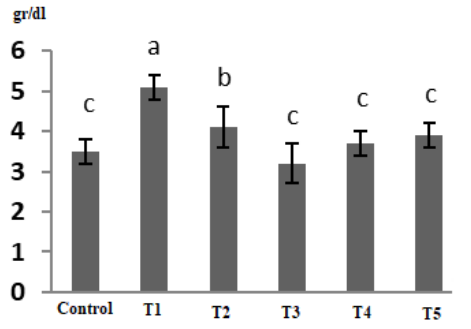
شکل ۳: مقایسه میانگین آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در گروه های مختلف ماهیان واکسینه

Figur 3: Comparison of Mean Aspartate Aminotransferase (AST) Enzyme Levels in Different Groups of Vaccinated Fish



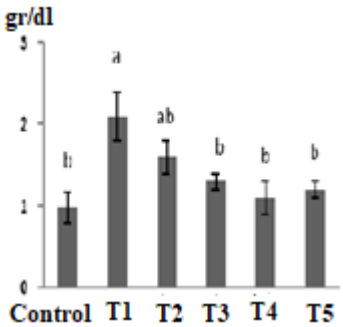
شکل ۴: مقایسه میانگین آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در گروه های مختلف ماهیان واکسینه

Figur 4: Comparison of Mean Alanine Aminotransferase (AAT) Enzyme Levels in Different Groups of Vaccinated Fish



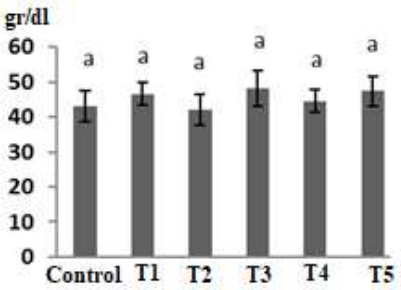
شکل ۵: مقایسه میانگین پروتئین تام سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

Figur 5: Comparison of Mean Total Serum Protein in Different Groups of Vaccinated Fish



شکل ۶: مقایسه میانگین ایمنوگلوبین کل سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

Figur 6: Comparison of Mean Total Serum Immunoglobulin in Different Groups of Vaccinated Fish

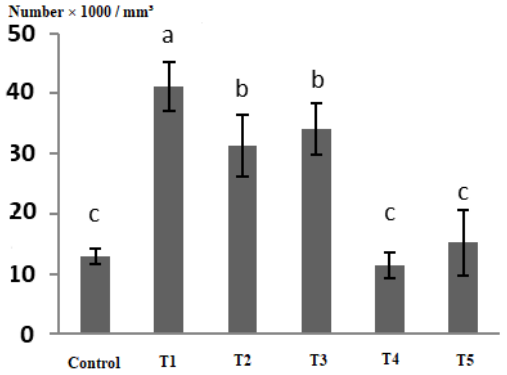


شکل ۷: مقایسه میانگین گلوکز سرم در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

Figur 7: Comparison of Mean Serum Glucose in Different Groups of Vaccinated Fish

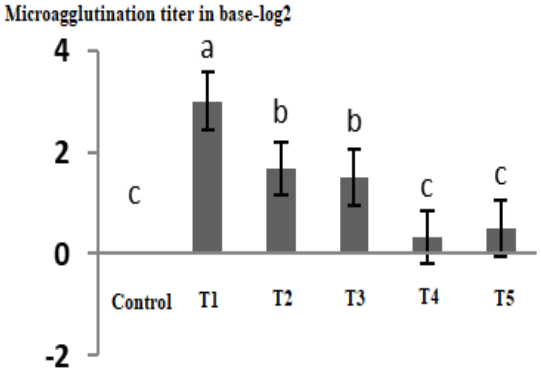
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]



شکل ۸: تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه‌های مختلف ماهیان واکسینه شده

Figur 8: White Blood Cell Count in Different Groups of Vaccinated Fish



شکل ۹: تیتر آنتی‌بادی در برابر باکتری *یرسینیا راکری* به‌روش میکروآگلوتیناسیون در ماهیان واکسینه به‌روش حمام

Figur 9: Antibody Titer Against *Yersinia ruckeri* by Microagglutination Method in Fish Vaccinated by Bath Method

بحث

برای واکسیناسیون ماهیان بالاترین کارآیی واکسن مربوط به روش تزریق عنوان شده است اما مشکلات فراوانی برای استفاده از این روش وجود دارد به همین دلیل در بسیاری از موارد پرورش‌دهندگان، روش حمام یا خوراکی را ترجیح می‌دهند، متاسفانه این روش‌ها کارآیی روش تزریق را ندارد (Bøgwald and Dalmo, 2019). در عین حال عوامل مثل زمان حمام دهی، دوز واکسن، سن ماهی و نیز وضعیت ایمنی ماهیان بر روی کارآیی واکسیناسیون می‌تواند تاثیر بگذارند (Du *et al*., 2017). برای افزایش کارآیی واکسیناسیون پیشنهاداتی توسط برخی محققین عنوان شده است که یکی از این موارد بکارگیری محیط‌های هایپراسموتیک پیش از واکسیناسیون به منظور افزایش جذب آنتی‌ژن‌ها توسط میزبان است (Gao *et al*., 2016). در بررسی حاضر بکارگیری محیط نمکی ۱۵ گرم درلیتر باعث افزایش مقادیر پروتئین تام و ایمنوگلوبولین سرمی در ماهیان گردید، اما در سایر پارامترهای مورد ارزیابی اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید، بنابراین می‌توان عنوان نمود بکارگیری محیط هایپراسموتیک قطعاً نه تنها تاثیر منفی بر روی واکسیناسیون بررسی حاضر نگذاشته است بلکه احتمال زیاد تا حدودی نیز منجر به افزایش کارآیی آن شده اشت. هرچند که برای نتیجه گیری قاطع در این زمینه بررسی‌های تکمیلی بیشتری نیاز است. در بررسی‌های متعدد تاثیر مثبت برای بکارگیری محیط هایپراسموتیک پیش از واکسیناسیون گزارش شده است (Huising *et al*., 2003). بکارگیری محیط هایپراسموتیک در ماهی فلاندر (*Paralichthys olivaceus*) منجر به افزایش معنی‌دار کارآیی واکسن *Edwardseilla tarda* گردید (Gao *et al*., 2016).

در بررسی وضعیت تلفات ماهیان پس از مواجهه مستقیم با باکتری *یرسینیا راکری* همان‌گونه که مشاهده شد ۷۷/۸ درصد از ماهیان شاهد تلفات ثبت گردید. این در حالی است که میزان تلفات در ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق ۳۳ درصد تلفات ثبت گردید، که عملاً نشان دهنده تاثیر مثبت این روش واکسیناسیون برای بیماری مورد بررسی است. در بررسی وضعیت تلفات به

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

روش حمام میزان تلفات ۵۵/۵ و ۶۶/۷ درصد ثبت گردید که اگرچه پایین‌تر از شاهد بوده است، اما اختلاف زیادی نداشت. این موضوع نشان دهنده کارآیی متوسط واکسیناسیون روش حمام در مقایسه با روش تزریقی در فیل‌ماهیان ۳۰ گرمی است. در مطالعه Gholitebar و همکاران (۲۰۲۲) در مواجهه باکتریایی پس از واکسیناسیون *یرسینیا راکری* به‌روش تزریق و حمام تلفات ۳۶/۴ تا ۶۱/۵ درصد تلفات ثبت گردید و این در حالی بوده است که ۱۰۰ درصد ماهیان گروه شاهد تلف شدند. Soltani و همکاران (۲۰۱۴)، در ارزیابی واکسن *یرسینیا راکری* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان زنده مانی را ۱۰ هفته پس از مواجهه برای ماهیان غیر واکسینه کمتر از ۱۰ درصد (تلفات بیش از ۹۰ درصد) و برای ماهیان واکسینه کمتر از ۶۰ درصد (تلفاتی حدود ۴۰ درصد) گزارش کردند. در گزارش Alishahi و همکاران (۲۰۱۹) در واکسیناسیون به روش تزریقی برای باکتری عفونی *Aeromonas hydrophila* میزان تلفات پس از مواجهه در گروه شاهد حدود ۶۵ درصد و در گروه‌های مختلف واکسینه شده بین ۲۰ تا ۴۰ درصد گزارش گردید (Alishahi *et al*., 2019). Chu در سال ۲۰۰۶ میزان زنده مانی در ماهیان قرمز (*Carassrus auratus gibelio*) واکسینه شده با باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا را پس از مواجهه با باکتری عفونی بین ۳۲/۲ تا ۵۰/۱ درصد گزارش کرد.

در بررسی تیتر آنتی‌بادی به‌روش میکروآگلوتیناسیون تمامی ماهیان واکسینه شده دارای تیر بودند و عملاً هیچ تیتری در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد. براساس نتایج بالاترین تیتر مربوط به ماهیان واکسینه شده به روش تزریق بوده و سپس ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای تیتر بالاتری نسبت به ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای به‌روش حمام داشتند.در عین حال اگرچه در ماهیان واکسینه شده به روش حمام یک مرحله‌ای تیترآنتی بادی ثبت شد اما به لحاظ آماری فاقد اختلاف معنی‌دار با ماهیان گروه شاهد بودند. نتایج بررسی حاضر حاکی از این موضوع است که واکسیناسیون به روش حمام در ماهی خاویاری فیل‌ماهی نیاز به دوزهای یادآور دارد و عملاً یک مرحله واکسیناسیون به روش حمام تیتر قابل قبولی برای ماهیان ۳۰ گرمی به همراه ندارد. درعین حال لازم است که این نکته در نظر گرفته شود که تیتر آنتی‌بادی و نیز پارامترهای ایمنی در ماهیان مختلف و نیز تحت تاثیر فاکتورهای متعدد ممکن است تغییر کند. در بررسی صورت گرفته توسط Ma و همکاران (۲۰۲۲) واکسن غیر فعال *یرسینیا راکری* و نیز واکسن تخفیف حدت یافته عامل بیماری ویروس نکروز خونریزی دهنده عفونی (IHN) در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این بررسی واکسیناسیون *یرسینیا راکری* به دو روش تزریق داخل صفاقی (IP) و تلقیح داخل بینی (IN) و واکسیناسیون IHN نیز به دو روش تلقیح داخل بینی و تزریق عضلانی صورت گرفت. در ماهیانی که با *یرسینیا راکری* واکسینه شده بودند ۶ ماه پس از واکسن تیتر آنتی بادی قابل ردیابی بود و ماهیان واکسینه شده به روش تزریق در مقایسه با ماهیان واکسینه شده به‌روش تلقیح داخل بینی تیتر بالاتری اندازه گیری شد. ۱۲ ماه پس از واکسیناسیون تیتر آنتی‌بادی در تمام ماهیان فاقد اختلاف معنی دار بود. در ماهیانی که واکسن IHN دریافت کردند در هر دو گروه تزریق داخل صفاقی و تلقیح داخل بینی ۶ ماه پس از واکسیناسون اختلاف معنی‌داری در تیتر آنتی بادی برای تمامی تیمارها

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

مشاهده نشد. اما در مواجهه باکتریایی نتایج متفاوتی به دست آمد، به طوری‌که ۶ ماه پس از واکسیناسیون به روش تلقیح داخل بینی ماهیانی که واکسن *یرسینیا راکری* دریافت کرده بودند در مواجهه باکتریایی تلفات کمتری نسبت به گروه شاهد نداشتند. ولی در ماهیانی که واکسن IHN دریافت کردند تلفات کمتری ثبت شد (Ma *et al*., 2022). بنابراین ممکن است تیتر فعال از بین برود اما سلول های خاطره در زمان مواجهه با عامل پاتوژن آن را خنثی سازند.

در رابطه با واکسیناسیون همواره بکارگیری روش واکسیناسیون موثر بسیار مورد بحث و تبادل نظر مزرعه داران بوده است. به‌طور معمول سه روش تزریق، حمام و خوراکی برای واکسیناسیون مزارع آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، که روش تزریق بالاترین کارآیی و عملکرد را دارد. در بررسی حاضر این موضوع نیز در عمل مشاهده شد، اما در بسیاری از موارد بنا به دلایل متعدد مزرعه داران از بکارگیری واکسیناسیون به روش تزریق استقبال نمی‌کنند. از جمله این دلایل می‌توان به استرس بالای ناشی از دستکاری، لزوم بیهوش نمودن ماهیان، لزوم نیروی متخصص جهت تزریق، عوارض ناشی از تزریق نادرست در ماهیان و .... اشاره نمود (Du *et al*., 2017). در بررسی حاضر سعی گردید تا عوارض تزریق داخل صفاقی ماهیان خاویاری فیل‌ماهی با ارزیابی آنزیم‌های ALP، AST و ALT مورد بررسی قرار گیرد. آنزیم‌های یاد شده به طور غالب در سلول‌های هپاتوسیت کبدی و نیز تا حدی در برخی سلول‌های عضلانی و کلیوی یافت می‌شوند و افزایش سطح آنها در سرم خون، نشان دهنده آسیب به این سلول‌ها است (Giannini *et al*., 2005). در بررسی حاضر تزریق داخل صفاقی واکسن تزریقی به فیل‌ماهیان حدود ۳۰ گرم منجر به افزایش یا کاهش آنزیم‌های ALP، AST و ALT نگردید. این امر نشان‌دهنده عدم آسیب‌ها ناشی از تزریق داخل صفاقی در ماهیان یاد شده است. این در حالی است که در تحقیقاتی مشابه تزریق داخل صفاقی واکسن *یرسینیا راکری* در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به افزایش معنی‌دار در سطوح آنزیم‌های یاد شده در سرم خون گردید (Gholitebar *et al*., 2022). همچنین تزریق داخل صفاقی واکسن دو گانه استرپتوکوکوس/لاکتوکوکوس نیز به‌طور معنی‌دار منجر به افزایش آنزیم‌های یاد شده (ALP، AST و ALT) در سرم خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان گردید (Namrudi *et al*., 2015).

نتیجه گیری کلی

با توجه به این نتایج می‌توان عنوان نمود تزریق داخل صفاقی واکسن در ماهی خاویاری فیل ماهی در حدود وزنی ۳۰ گرم آسیب‌های کمتری در مقایسه با تزریق واکسن در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با حدود وزنی ۵ تا ۱۰ گرم دارد، لذا برای این رنج وزنی فیل‌ماهیان می‌توان روش تزریقی واکسن را پیشنهاد داد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی شرکت دانش بنیان بوژان تک فارمد تولیدکننده واکسن‌های ماهی در کشور به انجام رسید با تشکر و سپاسگزاری از آن مجموعه و آرزوی موفقیت روز افزون.

منابع

1. Alishahi M., Tollabi M. and Ghorbanpoor M., 2019. Comparison of the adjuvant effect of propolis and

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

Freund on the efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccine in common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(3), pp.428-444. DOI: 10.22092/ijfs.2019. 118393

2. Bøgwald, J. and Dalmo, R.A., 2019. Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorganisms*, 7(12), 627. DOI:10.3390/microorganisms7120627
3. Chu, W.H., 2006. Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in *Carassrus auratus gibelio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 21, pp.113-117. DOI: 10.1016/j.fsi. 2005.10.002
4. Dacie, J.V. and Lewis, S.M., 2001. Practical Haematology. 9th, ed. Churchill Livingstone, London. 633 P.
5. Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J. and Zhan, W., 2017. The influence of concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin and immersion time on antigen uptake and expression of immune-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microbial Pathogenesis*, 103, pp.19-28. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.12.011
6. El-Noby, G.A., Hassanin, M., El-Hady M. and Aboshabana, Sh., 2021. *Streptococcus*: A review article on an emerging pathogen of farmed fishes. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 25(1), pp.123-139. DOI: 10.21608/ejabf.2021.138469
7. Fadaeifard, F. and Simin, S., 2014. Detection of virulence genes (yrp1 and yrpE) in the *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction test in Chaharmahal-Va-Bakhtiary province, Iran. *Biological Journal of Microorganism*. 3(9), pp.65-74. [In Persian]
8. Furones, M.D., Rodgers, C.J. and Munn, C.B., 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric red mouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases,* 3, pp.105-125. DOI: 10.1016/0959-8030(93)90031-6
9. Gao, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J. and 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 and Shellfish Immunology*, 55, pp.274-280. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.05.042
10. Gholitebar, Z., Mazandarani, M., Hoseinifar, S.H., Soudagar, M. and Safari, R., 2022. Evaluation of *Yersinia ruckeri* vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11(2), pp.37-48. [In Persian]
11. Giannini, E.G., Testa, R. and Savarino, V., 2005. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*, 172(3), pp.376-379. DOI: 10.1503/ cmaj.1040752
12. Huising, M.O., Guichelaar, T., Hoek, C., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Flik, G., Savelkoul, H.F.J. and Rombout, J.H.W.M., 2003. Increased e_cacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine*, 21, pp.4178-4193. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00497-3
13. Johnson, M.A., Rohlfs E.M. and Silverman L.M., 1999. Determination of proteins in urine. Burtis CA, Ashwood ER, Teitz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd Ed, Philadelphia: WB Saunders. pp.525-526.
14. Ma, J., Casadei, E., Bruce, T.J., Sepahi, A., Cain, K.D. and Salinas, I., 2022. Long-term efficacy of nasal vaccination against enteric red mouth (ERM) disease and infectious hematopoietic necrosis (IHN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine*, 40(2), pp.229-238. DOI:10.1128/spectrum.03245-22
15. Mazandarani, M. and Taheri Mirghaeed, A., 2016. Pathogenicity of *Yersinia ruckeri* bacterium in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings. *Journal of Aquatic Ecology*, 5(4), pp.79-87. [In Persian]

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]

and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84, pp.219-228. DOI: 10.3354/dao02057

16. Namrudi, S., Yousefi Siahkalroodi, S., Hajibaglu, A. and Mazandarani, M., 2015. Effects of two-strain streptococcosis vaccine *Streptococcus iniae*/*Lactococcus garvieae* on some serum immune parameters in Rainbow trout. *Journal of Animal Environment*, 15(2), pp.205-212. DOI: 10.22034/AEJ.2023.406674.3008 [In Persian]
17. Siwicki, A.K., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego. pp.105 -111.
18. Soltani, M., Fadaii, F. and Mehrabi, M.R., 1999. First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 9, pp.173-177.
19. Soltani, M., Shafiei, Sh., Mirzargar, S.S., Ebrahimzadeh Musavi, H.A. and Ghodratnama, M., 2014. Study of efficacy of vaccination against yersinosis in rainbow trout using local strains of Yersinia ruckeri. Journal of Veterinary Research, 69(1), pp.57-63. DOI: 10.22059/JVR.2014.36713 [In Persian]
20. Statistical Yearbook of Iranian Fisheries (2016–2021). 2022. Iranian Fisheries Organization, Deputy for Planning and Resource Management, Planning and Budget Office, Planning and Statistics Group. 58 P. www.shilat.com [In Persian]
21. Swain, P., Dash, S., Sahoo, P.K., Routray, P., Sahoo, S.K., Gupta, S.D., Meher, P.K., Sarangi, N., 2007. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(1-2), pp.38-43. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.03.010.
22. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Ryckaert, J., Duchateau, L. and Haesebrouck, F., 2009. Route of entry

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-2-850]