JOMB
Journal of Marin Biology
J Marin Bio, 2026; 17(4): 18-37 Doi
https://jmb.ahvaz.iau.ir

Journal of Marin Biology

Islamic Azad university
Ahvaz Branch

Original Article

Comparative Efficacy and Immunologicity of Oral and Injectable DNA Vaccination Against Streptococcus agalactiae in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Parisa Moftakhar[1], Mojtaba Alishahi[2*], Mohammadreza Tabandeh[3], Mohammad Khosravi[4], Mohmoud Gharbavi [5]

1. Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animals Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. Department of Basic Sciences, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
5. Nanotechnology Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Article history:

Received: 16 February 2026
Revised: 17 April 2026
Accepted: 2 May 2026
ePublished: 2 May 2026

***Corresponding author:** Mojtaba Alishahi, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animals Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

E-mail: alishahim@scu.ac.ir

Abstract

Vaccination remains the most effective strategy for mitigating streptococcosis in tilapia culture. The inherent advantages of third-generation vaccines have increasingly shifted the focus of aquatic health management toward DNA-based platforms. This study aimed to evaluate the immunogenicity, efficacy, and growth-promoting potential of a novel DNA vaccine based on the BibA gene of Streptococcus agalactiae, comparing oral and injectable delivery routes with a traditional traditional formalin-killed Cells (FKC). A total of 225 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*; 19.4 ± 3.25 g) were randomly assigned to five experimental groups in triplicate. Groups 1 and 2 received the BibA-DNA vaccine via oral and injectable routes, respectively, while Groups 3 and 4 were immunized with the FKC through the same administration routes. A fifth group served as the control. Fish were maintained under standardized conditions for 75 days, with biometric assessments and blood sampling conducted on days 30, 60, and 75. Growth indices, specific antibody titers, and non-specific immune parameters were analyzed. Subsequently, all groups were challenged with virulent S. agalactiae, and cumulative mortality was monitored for 14 days. Results showed that both injectable vaccines (DNA and FKC) exhibited significantly higher non-specific immune responses and specific antibody titers compared to the control and oral groups ($P < 0.05$). In contrast, oral administration did not significantly modulate most immunological parameters ($P > 0.05$). Post-challenge results revealed relative percent survival (RPS) values of 70% and 75% for the injectable DNA and FKC groups, respectively. For oral delivery, the DNA vaccine outperformed the FKC, yielding an RPS of 40% compared to 35% in the killed vaccine group. Notably, injectable treatments showed a significant improvement in growth performance ($P < 0.05$). Hematological profiles remained unaffected by vaccine type or delivery route ($P > 0.05$). Our findings demonstrate that the injectable BibA - DNA vaccine offers protective efficacy comparable to the traditional killed vaccine while providing superior growth performance. Furthermore, the DNA-based platform exhibited higher potential for oral immunization compared to the inactivated vaccine, suggesting it is a promising candidate for the sustainable management of streptococcosis in tilapia aquaculture.

Keywords: Streptococcus agalactiae, DNA vaccine, Nile tilapia, immunogenicity, BibA gene.

Please cite this article as follows: Moftakhar P., Alishahi M., Tabandeh M., Khosravi M., Gharbavi M. Comparative Efficacy and Immunologicity of Oral and Injectable DNA Vaccination Against *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Mar Bio, 2026; 17(4): 18–37. DOI:

Copyright © 2026 Journal of Marin Biology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (*http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/*) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

مقاله اصلی

مقایسه کارایی و ایمنی زایی واکسن DNA علیه استرپتوکوک آگالاکتیه به روش تزریقی و خوراکی در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*)

پریسا مفتخر[۱]، مجتبی علیشاهی[۲*]، محمدرضا تابنده[۳]، محمد خسروی[٤]، محمود غرباوی[٥]

۱. گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳. گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی و زیست‌شناسی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
٤. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
٥. مرکز تحقیقات فناوری نانو، پژوهشگاه علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

واکسیناسیون بهترین روش مقابله با بیماری *استرپتوکوکوزیس* در ماهی تیلاپیاست. مزایای واکسن‌های نسل سوم موجب گرایش بیشتر متولیان بهداشت آبزیان به استفاده از این واکسن‌ها برای پیشگیری از این بیماری شده‌است. در این تحقیق ، ایمنی‌زایی، کارایی و اثر بر رشد واکسن DNA تولیدشده بر پایه ژن *BibA* باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در دو روش خوراکی و تزریقی با واکسن فرمالینه نسل اول این باکتری مقایسه گردید. به این منظور، تعداد ۲۲۵ قطعه ماهی تیلاپیا (۳/۲۵±۱۹/۴ گرم) در قالب ۵ گروه و هر گروه با سه تکرار تقسیم شدند. تیمارهای ۱ و ۲ به‌ترتیب با واکسن DNA *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به روش خوراکی و تزریقی واکسینه شدند. تیمارهای ۳ و ۴ با واکسن فرمالینه همین باکتری به روش خوراکی و تزریقی ایمن شدند و گروه شاهد واکسنی دریافت نکرد. ماهی‌ها به مدت ۷۵ روز در شرایط یکسان پرورش یافتند. در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ زیست‌سنجی انجام و از ماهی‌ها نمونه خون اخذ شد. شاخص‌های رشد، عیار آنتی‌بادی اختصاصی و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی بین تیمارها مقایسه گردید. سپس تمامی گروه‌ها با باکتری زنده *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* چالش داده شدند و تلفات طی ۱۴ روز ثبت شد. نتایج نشان داد در اغلب شاخص‌های ایمنی بررسی‌شده، هر دو تیمار واکسن تزریقی (DNA و کشته) به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بودند ($p<0/05$)، درحالی‌که بیشتر شاخص‌های ایمنی در روش خوراکی تحت تأثیر قرار نگرفتند ($p>0/05$). کارایی واکسن در تیمارهای تزریقی DNA و کشته به‌ترتیب ۷۰ و ۷۵ درصد و در تیمارهای خوراکی DNA و کشته به‌ترتیب ۴۰ و ۳۵ درصد بود. شاخص‌های رشد در تیمارهای تزریقی بهبود معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند ($p<0/05$)، اما شاخص‌های خونی تحت تأثیر نوع واکسن و روش تجویز قرار نگرفتند ($p>0/05$). به‌طور کلی، تجویز تزریقی واکسن DNA کارایی مشابه واکسن کشته داشت و واکسن خوراکی DNA نیز نسبت به واکسن خوراکی کشته عملکرد بهتری نشان داد.

واژگان کلیدی: *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، واکسن DNA، ماهی تیلاپیای نیل، ایمنی‌زایی، ژن *BibA*.

تاریخچه مقاله
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۱۱/۲۷
تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۵/۱/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۲/۱۲
تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۵/۲/۱۲

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

* نویسنده مسئول: مجتبی علیشاهی، گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

ایمیل: alishahim@scu.ac.ir

استناد: مفتخر، پریسا؛ علیشاهی، مجتبی؛ تابنده، محمدرضا؛ خسروی، محمد؛ غرباوی، محمود. مقایسه کارایی و ایمنی‌زایی واکسن DNA علیه *Streptococcus agalactiae* به روش تزریقی و خوراکی در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*). مجله زیست شناسی دریا، زمستان ۱۴۰۴؛ ۱۷(۴): ۱۸-۳۷

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

ماهی تیلاپیا یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی در جهان است که در دو دهه اخیر بالاترین میزان رشد تولید را در جهان داشته است (EL-Sayed و همکاران، ۲۰۲۳). در سال‌های اخیر به دلیل مزیت‌های پرورشی این گونه، توجه ویژه‌ای به پرروش این ماهی در ایران شده‌است. علی‌رغم مزیت‌های پرورشی مناسب این گونه مانند رشد مناسب ،تراکم‌پذیری بالا، توقع کیفیت غذایی پایین، مقاومت بالا در برابر کمبود اکسیژن و مسمومیت با ترکیبات ازته، تکثیر ساده و سریع (El-Sayed و همکاران، ۲۰۲۳)، مشکلات زیست‌محیطی این گونه در منابع آبی کشور منجر به نگرانی برخی محققین و متولیان زیست‌محیطی در کشور شده‌است (El-Sayed و همکاران، ۲۰۲۳). امروزه پرورش این گونه در برخی استان‌های داخلی که ارتباط آبی با منابع آبی جاری ندارند مجاز و در حال توسعه است (mohammadi و همکاران ۲۰۲۵). مهم‌ترین بیماری باکتریایی در ماهی تیلاپیا، بیماری *استرپتوکوکوزیس* ناشی از باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* می‌باشد (Abdallah و همکاران، ۲۰۲۴)که منجر به ایجاد عفونت سیستمیک و مرگ و میر بالا در ماهی تیلاپیا می‌شود. این بیماری خسارت‌های شدید اقتصادی در صنعت پرورش این گونه به وجود آورده‌است (Abdallah و همکاران، 2024). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسیناسیون و استفاده از محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک‌ها در مقابله با این بیماری کاربرد دارد. با این وجود بهترین و مؤثرترین روش مقابله با این بیماری، پیشگیری با استفاده از واکسیناسیون می‌باشد (Zeng و همکاران، ۲۰۲۱). کنترل و درمان *استرپتوکوکوزیس* بعد از ایجاد بیماری مشکل است، همچنین استرس‌های محیطی می‌توانند این بیماری را تشدید کنند. استفاده از آنتی‌بیوتیک در شرایط پرورشی منجر به ایجاد بعضی محدودیت‌ها و نگرانی‌ها مانند ایجاد باکتری‌های مقاوم، معضلات زیست‌محیطی و هزینه بالای اقتصادی تجویز و برهم خوردن فلور روده می‌شود (Haenen و همکاران، ۲۰۲۳). موارد فوق باعث گرایش بیشتر به استفاده از واکسن‌ها برای مبارزه با این بیماری شده‌است.

در بین روش‌های تجویز واکسن، دو روش تزریقی و خوراکی از مهم‌ترین روش‌های تجویز واکسن درماهی هستند. روش تزریقی در ماهی کارایی و ایمنی‌زایی بیشتری دارد، با این وجود به دلیل ایجاد استرس در هنگام صید و بیهوشی و تزریق، تلفات بعد از تجویز، هزینه بالا، عدم امکان تجویز در سنین پایین، پرورش‌دهندگان تمایل چندانی به استفاده از این روش ندارند. علاوه بر این واکسیناسیون غوطه‌وری هم به دلیل کارایی نسبتاً پایین، عدم امکان استفاده در سنین بالا و استرس نسبتاً بالای صید و بیهوشی نتوانسته جایگاه خود را در روش‌های واکسیناسیون در آبزیان حفظ کند (Monir و همکاران، 2022). واکسن‌های خوراکی هم علی‌رغم هزینه کم تجویز و حداقل استرس درتجویز، معمولا مشکل کارایی نسبتاً پایین را دارند (علیشاهی و همکاران، ۲۰۲۴).

با اینکه سه نسل واکسن‌ها در ماهی تحقیق و تجاری شده‌است، ولی هنوز واکسن‌های نسل اول (واکسن‌های کشته و تخفیف حدت یافته) بیشتری بازار واکسن آبزیان را به خود اختصاص داده‌اند. جدیدترین واکسن‌های تجاری نسل سوم موجود در بازار، واکسن‌های DNA هستند. این واکسن‌ها حاوی هیچ میکروارگانیسمی نیستند و همچنین حاوی قطعات آنتی‌ژنی نیز نمی‌باشند. واکسن‌های DNA به جای تکیه بر روش‌های سنتی، شامل معرفی مواد ژنتیکی هستند که آنتی‌ژن‌های پاتوژن خاص را مستقیماً در داخل میزبان کدگذاری می‌کنند. این بار ژنتیکی می‌تواند با تحریک سلول‌های میزبان برای بیان آنتی‌ژن‌های هدفمند مورد نظر، محافظت ایجاد کند و در نتیجه پاسخ ایمنی قوی ایجاد کند (Moftakhar وAlishahi ، ۲۰۲۵). ژن‌های آنتی‌ژن معمولاً در کنار تمام عناصر ژنتیکی لازم برای شروع، تنظیم و خاتمه بیان ژن در داخل سلول‌های یوکاریوتی، در ناقل‌های بیان، که اغلب پلاسمیدها هستند، کدگذاری می‌شوند. پس از تجویز، ژن‌های انتخاب شده متعاقباً به آنتی‌ژن‌های مورد نظر ترجمه می‌شوند. این آنتی‌ژن‌ها توسط سیستم ایمنی میزبان شناسایی می‌شوند و پاسخ‌های ایمنی قوی ایجاد می‌کنند و ایمنی سلولی و هومورال را فعال می‌کنند (Moftakhar وAlishahi ، ۲۰۲۵ و Mondal و همکاران، ۲۰۲۲). در کانادا، یک واکسن DNA علیه ویروس *نکروز خون‌ساز عفونی* (*IHNV*) به صورت تجاری در دسترس است (Mondal و همکاران، ۲۰۲۲)، همچنین در سال ۲۰۱۷، یک واکسن DNA علیه *آلفاویروس SAV-3* ماهی قزل‌آلا در اروپا مجوز گرفت و نقطه عطفی مهم برای واکسیناسیون جهانی آبزی‌پروری محسوب می‌شود (Thorarinsson و همکاران، ۲۰۲۴).

لذا در این تحقیق ایمنی زایی، کارایی و تحریک رشد واکسن DNA تولید شده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که بر پایه ژن *BibA استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به دو روش تزریقی و خوراکی با واکسن فرمالینه این باکتری مقایسه گردید.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

مواد و روش‌ها

باکتری بذر واکسن

در این پژوهش، از جدایه‌ی باکتریایی استفاده شد که پیش‌تر از ماهی تیلاپیای مبتلا به سپتی سمی، با علائم عمومی باکتریمی، در آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز جداسازی و خالص‌سازی شده بود. شناسایی اولیه‌ی این جدایه بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل و رنگ کلنی) و تست‌های بیوشیمیایی استاندارد (مانند تست کاتالاز، همولیز روی آگار خوندار، و تخمیر قندها) انجام گرفت و به گونه‌ی *Streptococcus agalactiae* نسبت داده شد.

برای تأیید قطعی هویت باکتری، از روش‌های مولکولی بهره گرفته شد. در این راستا، استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تجاری مطابق با دستورالعمان سازنده انجام پذیرفت. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با به‌کارگیری پرایمرهای جهانی اختصاصی ناحیه‌ی ژن *16S rRNA* طراحی شد.

به منظور تأیید نهایی تشخیص، استخراج اختصاصی باند DNA مربوطه از ژل آگارز انجام و برای تعیین توالی (سکانس)به یک شرکت معتبر ارسال گردید. توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) BLAST در پایگاه‌های اطلاعاتی مرجع (GenBank) مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفت. نتیجه‌ی آنالیز توالی‌یابی، نشان داد که توالی ژن *16S rRNA* جدایه‌ی مورد مطالعه دارای همسانی بیش از ۹۹ درصد با توالی‌های ثبت‌شده برای گونه‌ی *Streptococcus agalactiae* در پایگاه‌های اطلاعاتی است. این یافته به طور قطعی هویت جنس و گونه‌ی باکتری مورد مطالعه را به عنوان *Streptococcus agalactiae* تأیید نمود.

تهیه واکسن DNA *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*

در این مطالعه، از واکسن DNA علیه‌ی باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* تولید شده در تابستان ۱۴۰۳ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز استفاده گردید. این واکسن با استفاده از ناحیه‌ای به‌طول ۳۴۵ جفت‌باز از ژن *BibA* (قسمت‌های ۱۸۹۱ تا ۲۲۳۵) که با روش‌های بیوانفورماتیکی دارای بالاترین ایمونوژنیسیتی بود، با استفاده از آغازگرهای حاوی جایگاه‌های برشی EcoRI و HindIII تکثیر گردید. در این واکسن از وکتور پلاسمیدی pCDNA3.1(+) HisA برای کلون نمودن ژن *BibA* استفاده شد. ساختار نوترکیب حاصل با روش تعیین توالی تأیید و سپس با استفاده از روش شوک حرارتی و کلرید کلسیم به سلول‌های مستعد *E. coli* TOP10F' منتقل شد. در نهایت، بیان پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی ۱۳ کیلودالتون، پس از ترانسفکشن ساختار پلاسمیدی به سلول‌های CHO به روش الکتروپوریشن، با استفاده از تکنیک وسترن بلات و آنتی‌بادی ضد HisTag به‌طور موفقیت‌آمیزی تأیید گردید. نهایتا واکسن DNA بر پایه ژن *BibA* باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در تحقیق جاری استفاده گردید.

تهیه واکسن فرمالینه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*

پس از کشت باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در محیط کشت TSB به مدت ۴۸ ساعت، باکتری‌ها از طریق سانتریفیوژ از محیط کشت جدا سازی‌شده، بعد از شستشو، در مجاورت فرمالین ۱ درصد به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد غیر فعال شدند، سپس با سرم فیزیولوژی سه مرتبه شستشو شده و برای اطمینان از غیرفعال شدن کامل باکتری‌ها، باکتری غیر فعال‌شده مجدد کشت داده شد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۴). قبل از غیر فعال کردن باکتری‌ها، با استفاده از رقت‌سازی متوالی و کشت در محیط جامد تعداد باکتری‌ها با غلظت 10^{10} باکتری در میلی لیتر افزایش پیدا کرد. نهایتاً باکتری‌های غیرفعال‌شده در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون تهیه شدند و با غلظت مورد نیاز برای ریزپوشانی تنظیم و استفاده شدند.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

تیماربندی ماهی‌ها

تعداد ۲۲۵ قطعه ماهی از یکی از مراکز تکثیر ماهی تیلاپیا در استان یزد، شهرستان بافق خریداری و به مرکز تحقیقاتی بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید. ماهی‌ها به مدت دو هفته شرایط آداباتاسیون را گذرانده و با خوراک مخصوص تیلاپیا تغذیه شدند. بعد از اطمینان از سلامت ماهی‌ها، ماهی‌ها زیست‌سنجی شده و با وزن ۳/۲۵ ±۱۹/۴ گرم به ۵ تیمار (هر تیمار در سه تکرار) بصورت بلوک‌های کاملا تصادفی طبق جدول شماره ۱ تقسیم شدند.

جدول ۱. تیماربندی ماهیان تحقیق بصورت بلوک‌های کاملاً تصادفی

نام تیمار	تعداد ماهی در هر تیمار	نام گروه
A	۱۵ قطعه (در سه تکرار)	خوراکی DNA واکسینه شده با واکسن
B	۱۵ قطعه (در سه تکرار)	تزریقی DNA واکسینه شده با واکسن
C	۱۵ قطعه (در سه تکرار)	واکسینه شده با واکسن فرمالینه خوراکی
D	۱۵ قطعه (در سه تکرار)	واکسینه شده با واکسن فرمالینه تزریقی
E	۱۵ قطعه (در سه تکرار)	تیمار شاهد

در تیمار A میزان ۲۰ میکروگرم (µg) از واکسن DNA بصورت تزریق داخل عضلانی در روز صفر و روز ۲۱ به عضله پشتی ماهی تزریق گردید.

در تیمار B میزان ۱۰۰ میکرولیتر (µl) از واکسن فرمالینه با غلظت 10^{10} به روش تزریق داخل صفاقی به ماهی ها در روز صفر و ۲۱ تزریق گردید.

در تیمار C میزان ۴۰ میکروگرم (µg) واکسن DNA به روش گاواژ در روز صفر و ۲۱ به ماهی تجویز گردید.

در تیمار D ماهی‌ها به با واکسن کشته به میزان 10^{10} باکتری در میلی لیتر (ml) به روش گاواژ در روز صفر و ۲۱ واکسینه شدند.

در گروه E به عنوان تیمار شاهد، بدون واکسن، با خوراک معمول تغذیه شدند.

به منظور بررسی تأثیر ایمنی‌زایی واکسن خوراکی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* بر سیستم ایمنی ماهی تیلاپیا از شاخص‌های ایمنی اخصاصی (آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*) و ایمنی غیر اخصاصی شامل سیستم کمپلمان، میزان لیزوزیم سرم، انفجار تنفسی (NBT)، میزان پروتئین کل و گلوبولین سرم و قدرت باکتری‌کشی سرم استفاده شد. برای این منظور ابتدا از تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ روز پس از تجویز واکسن خون‌گیری و جداسازی سرم صورت گرفت و سپس جهت انجام آزمایشات ذیل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه گیری عیار آنتی‌بادی سرمی ضد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در تیلاپیا

از روش الایزای غیر مستقیم توصیه شده توسط Dezfuly و همکاران، ۲۰۲۰ استفاده گردید. به این منظور ابتدا در کف هر گودههای پلیت الایزا میزان ۱۰۰ میکرولیتر (µl) از غلظت ۱۰۰ میکروگرم (µg) در میلی لیتر از آنتی‌ژن لیز شده (۴ بار فریز و دفراست شده) باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* رقیق شده با بافر کربنات-بیکربنات (PH=۹/۶) ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. سپس محلول رویی پلیت‌های الایزا دور ریخته شد و ۳ بار با بافر PBS حاوی توئین ۰/۰۵٪ شستشو گردید. در ادامه مرحله بلاکینگ با اضافه نمودن محلول ۴ درصد از شیر خشک چربی گرفته در PBS به میزان ۲۵۰ میکرولیتر (µl) انجام شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۳ بار شستشو با بافر شستشو انجام شد و ۱۰۰ میکرولیتر (µl) از رقت ۲۰:۱ هر نمونه سرم در بافر PBS-توئین به هر گوده اضافه شد. پلیت به مدت ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس محلول گوده ها دور ریخته شد و ۳ بار شستشو مطابق مراحل پیشین انجام شد. آنتی‌بادی IgG پلی کلونال خرگوشی، اختصاصی IgM تیلاپیا به میزان ۱۰۰ میکرولیتر (µl) و با غلظت 20 میکروگرم بر میلی لیتر (µg/mL) به هر گوده اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، سه بار شستشو انجام شد و آنتی‌بادی ضد IgG خرگوشی کنژوگه با آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (HRP) تولید شده در بز (Pure Goat anti-Rabbit IgG Fc, Immuno Chemistry Technologies company, USA, HRP Affi

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

CatalogNumber: 6293)، با رقت ۱/۲۰.۰۰۰ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر (µl) در هر چاهک اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه ۳ بار شستشو مطابق مراحل قبل انجام شد. در ادامه ۶۰ میکرولیتر (µl) سوبسترای کروموژن تترا متیل بنزیدین (TMB) به هر چاهک اضافه گردید، پس از ۱۰ دقیقه ۶۰ میکرولیتر (µl) محلول متوقف‌کننده اسیدسولفوریک ۲ نرمال به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری مربوط به هر چاهک در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه گیری میزان فعالیت کمپلمان سرم

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده گردید (Brata و همکاران، ۱۹۹۳). برای این‌کار ابتدا آگارز ۱/۵٪ در بافر فسفات (PH=۷/۲) حاوی ۰/۵ میلی‌مول (mM) کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول(mM) کلرید کلسیم تهیه و مقدار ۱۰۸ ×۱ گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتیگراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت‌ها توزیع و پلیت‌ها به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر(mm) و با فاصله ۲ سانتی‌متر (cm) از هم در آگار ایجاد و در هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر (µl) از سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس از آن قطر هاله لیز گلبولی با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم

اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم با استفاده از روش کدورت‌سنجی که توسط Ellis (۱۹۹۰) توصیه شده است، انجام شد. در ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر (µl) از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم (mg) در میلی‌لیتر باکتری *میکروکوکوس لیزوداکتیکوس* (سیگما)در بافر ۰/۰۲ مولار (M) سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گودهای میکروپلیت تخت مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری پروتئین کل و گلوبولین پلاسما

غلظت ایمنوگلوبولین کل براساس روش Ellis (1990) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا پروتئین تام و آلبومین پلاسما توسط کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری گردید. سپس میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت میلوپراکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت میلوپراکسیداز از روش توصیه شده توسط Quade و Roth (۱۹۹۷) استفاده شد. بطور خلاصه، نمونه‌های سرم با سوبستراهای TMB ۲۰ میلی‌مولار (mM) و H_2O_2 ۵ میلی‌مولار (mM) انکوبه شدند و پس از ۲ دقیقه، واکنش با افزودن H_2SO_4 ۲ مولار (M) متوقف گردید. سپس جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر جهت تعیین میزان کل MPO قرائت شد.

قدرت باکتری کشی سرم

به این منظور از روش Ellis و همکاران (1990) استفاده شد. به‌طور خلاصه، غلظت مشخصی از باکتری با سرم ماهی در میکروپلیت مخلوط و به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید؛ در این آزمون از PBS و سرم غیرفعال‌شده (۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه) به عنوان کنترل استفاده شد. در پایان، جهت تعیین میزان باکتری‌های زنده، به محصول محلول MTT اضافه گردید و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت و ثبت شد.

شاخص های رشد

ضریب تبدیل غذایی (FCR)، درصد افزایش وزن (WGP)، ضریب رشد ویژه (SGR) و ضریب کارایی خوراک (FER) بر اساس معادله های زیر محاسبه گردید.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

WGP = (وزن اولیه− وزن نهایی) /(وزن اولیه)×100

FCR= افزایش وزن بدن (گرم) / غذای خورده شده (گرم)

SGR= ۱۰۰(Ln w2 – Ln w1) / دوره پرورش به روز

Lnw1 = لگاریتم وزن اولیه

Lnw2 = لگاریتم وزن نهایی

FER = مقدار غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن بدن (گرم)

چالش باکتریایی

۱۰ قطعه ماهی از هر تکرار بطور جداگانه با باکتری های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به میزان دوز ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات (بدست آمده در تحقیقات قبلی تیم تحقیق $LD50=1.75\times10^6$)، به صورت داخل صفاقی، چالش داده شدند. همزمان گروه کنترل (غیرواکسینه) نیز با LD50 باکتری مورد تزریق قرار گرفتند. به یک گروه از ماهیان گروه کنترل نیز فقط PBS به همان روش تزریق شد.در طی دوره چالش، روزانه ماهی بررسی شده و میزان تلفات در طی ۱۴ روز ثبت شد. درصد تلفات در تیمارها مقایسه گردید. از آنجا که ماهیان تزریق شده با PBS هیچگونه تلفاتی در طول دوره چالش نداشتند، در نمودارهای چالش این گروه آورده نشده است (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۴).

آزمون آماری

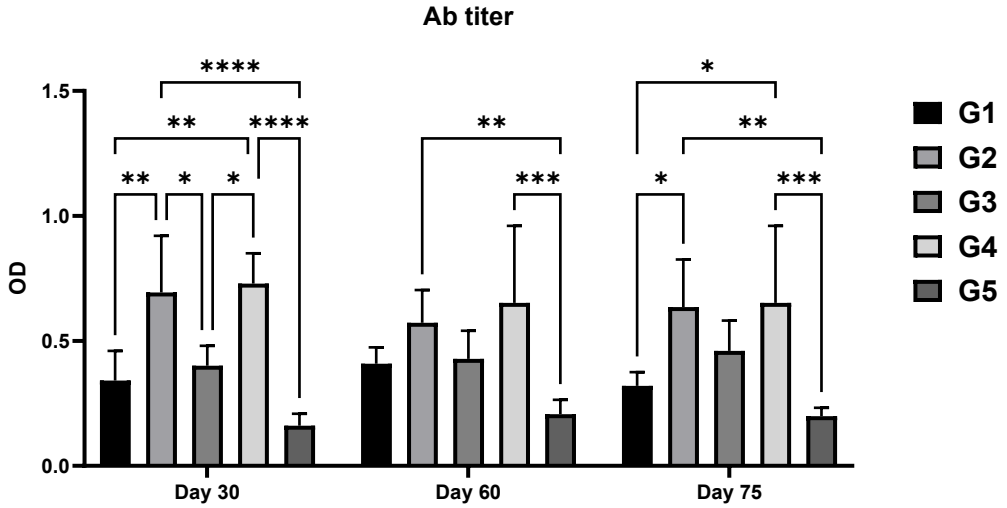
برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون استاتیستیک تست برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از همگن بودن انحراف معیارها، از ANOVA یک طرفه برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی در تیمارها استفاده گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. کلیه داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید.

نتایج

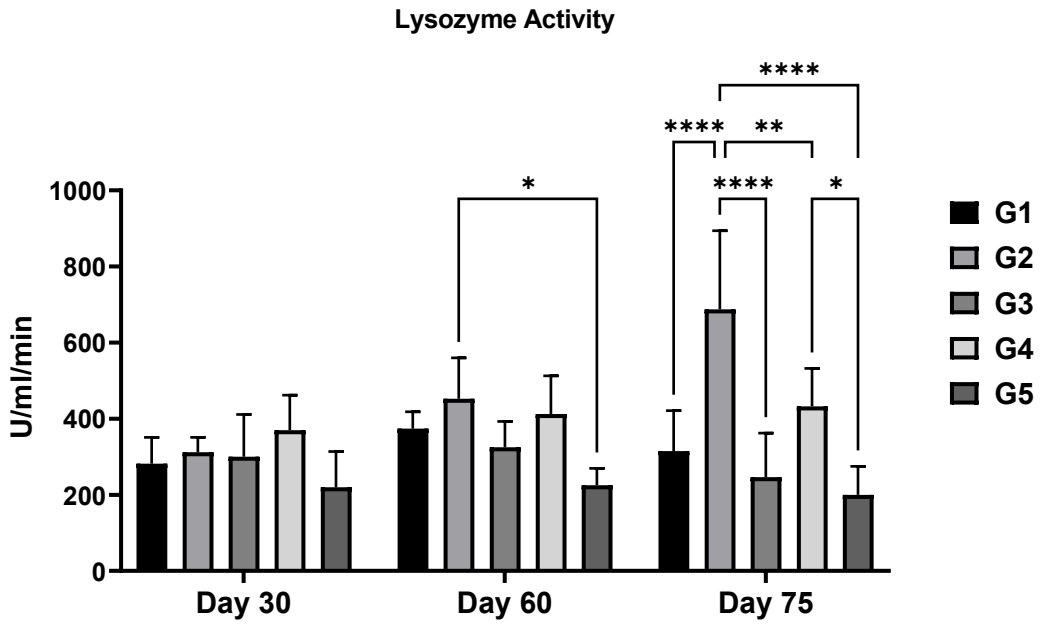
نتایج بررسی عیار آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری در شکل ۱ آورده شده است. عیار آنتی‌بادی ضد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در تیمارهای تحقیق در هر سه مرحله نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری با هم داشتند (P<۰/۰۵). بطوریکه عیار آنتی‌بادی در هر سه مرحله نمونه‌گیری تیمار واکسن تزریقی DNA و واکسن کشته تزریقی بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار کنترل و برخی تیمارهای خوراکی بود (P<۰/۰۵). ولی عیار آنتی‌بادی در تیمارهای خوراکی تفاوت معنی‌داری با تیمار کنترل نداشت (P>۰/۰۵)

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir



شکل ۱. نتایج عیار آنتی بادی ضد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به روش الایزا در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. * تفاوت معنی دار در سطح P <۰/۰۵ ، ** تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۱، * تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۰۱ ، **** تفاوت معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۰۰۱)**



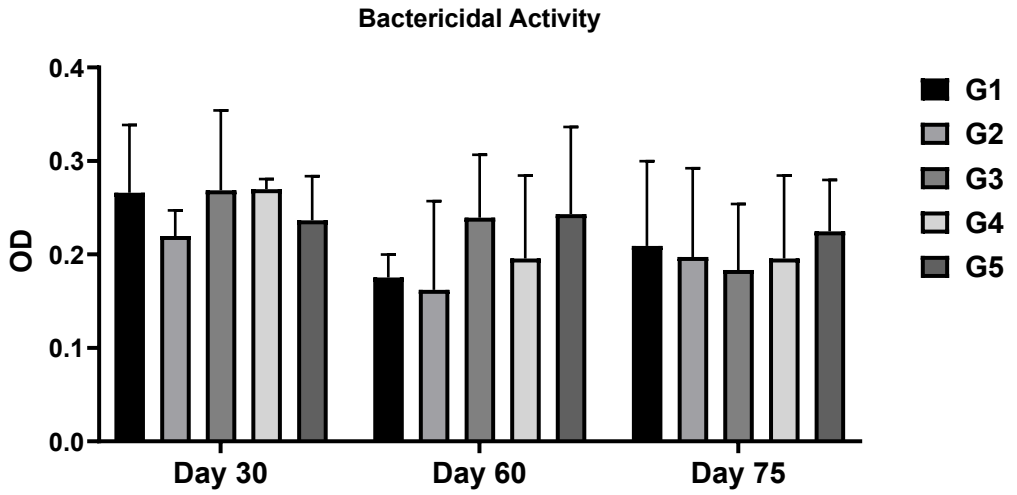
شکل ۲. نتایج فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. * تفاوت معنی‌دار در سطح P <۰/۰۵ ، ** تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۱، * تفاوت معنی‌دار در سطح P <۰/۰۰۱ ، **** تفاوت معنی‌دار در سطح P <۰/۰۰۰۱)**

فعالیت لایزوزیم در روز ۶۰ و ۷۵ تحقیق در تیمارهای واکسن DNA و واکسن کشته تزریقی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل داشت. ولی تیمارهای واکسن خوراکی DNA و کشته خوراکی تفاوت معنی‌داری در سطح لایزوزیم سرم ایجاد نکردند (P>0.05).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

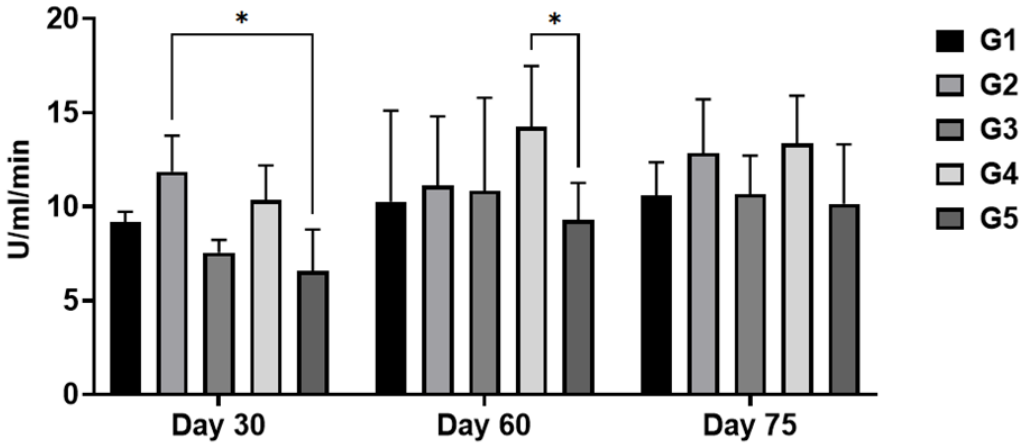
JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

قدرت باکتری‌کشی



شکل ۳. نتایج فعالیت باکتری‌کشی سرم در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. * تفاوت معنی دار در سطح P <۰/۰۵، ** تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۱، * تفاوت معنی دار در سطح P <۰/۰۰۱، **** تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۰۰۱)**

فعالیت باکتری‌کشی سرم در هر سه مرحله نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحقیق مشاهده نشد (شکل ۳- P>۰/۰۵).



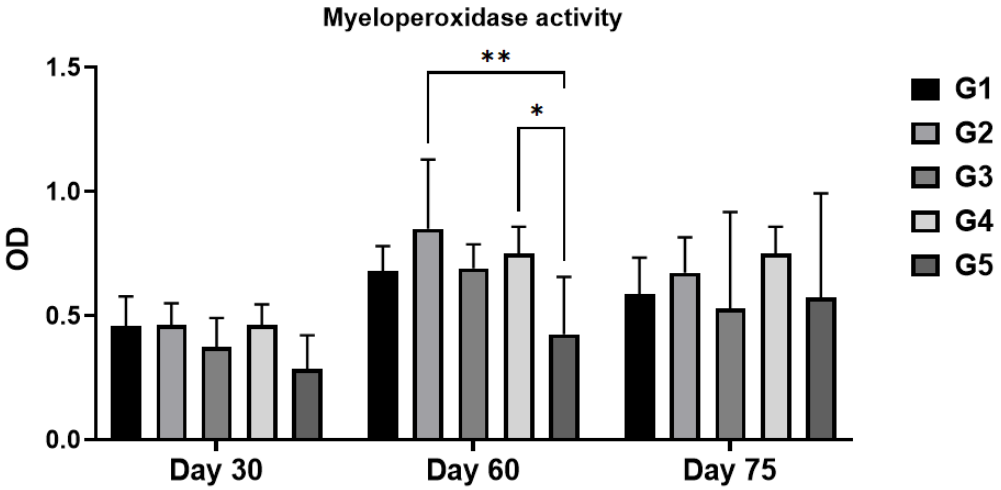
شکل ٤. نتایج فعالیت کمپلمان سرم در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. * تفاوت معنی‌دار در سطح P <۰/۰۵، ** تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۱، * تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۰۱، **** تفاوت معنی‌دار در سطح P <۰/۰۰۰۱)**

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

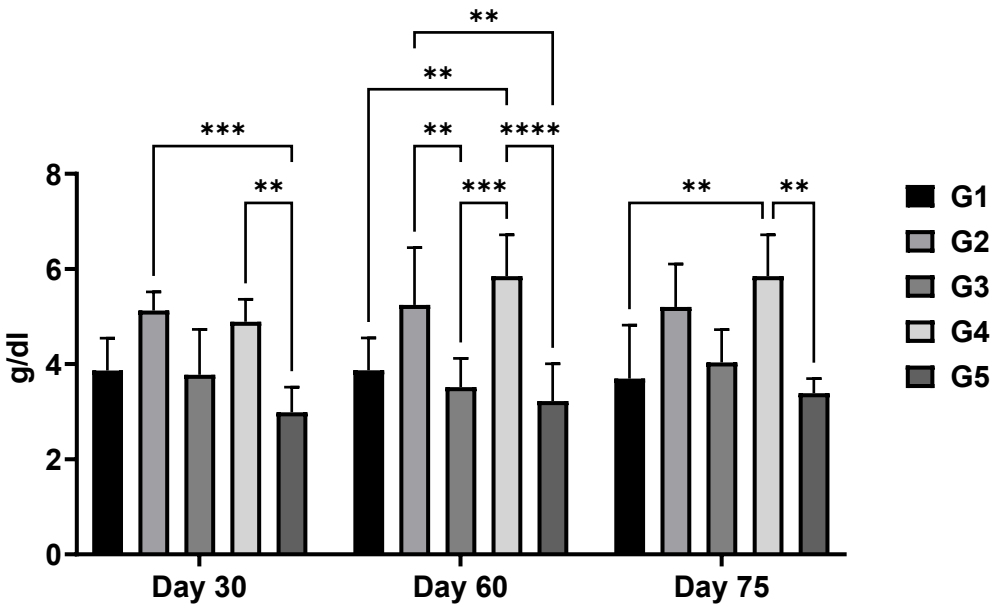
JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

فعالیت کمپلمان سرم در روز ۳۰ تحقیق فقط در تیمار واکسن DNA تزریقی و در روز ۶۰ فقط در تیمار واکسن تزریقی کشته افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۵).

میلو پراکسیداز



شکل ۵. نتایج فعالیت میلوپراکسیداز سرم در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. * تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ ، ** تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۱)

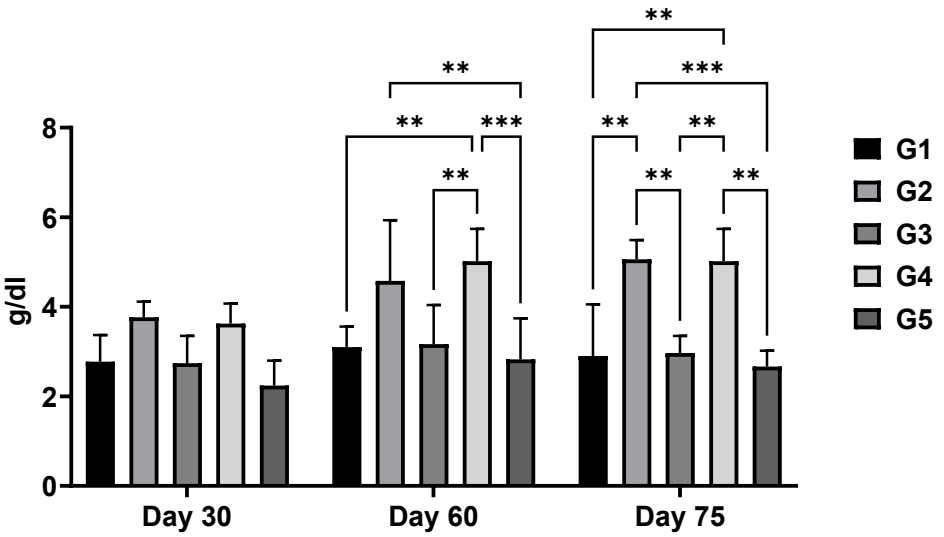


شکل ٦. نتایج فعالیت پروتئین تام سرم در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. (* تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵، ** تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۱ ، * تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۰۱، **** تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۰۰۱)**

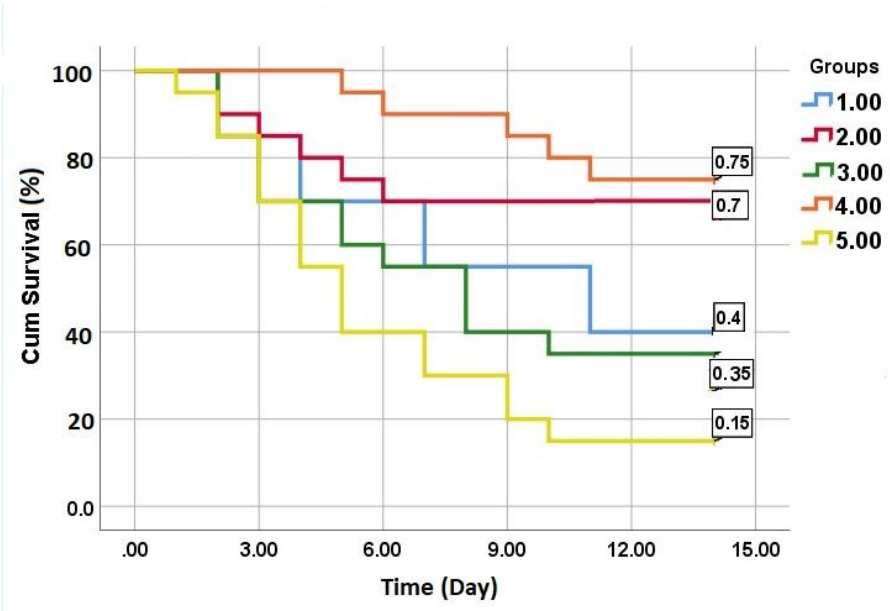
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

سطح پروتئین و گلوبولین سرم نیز در تیمارهای واکسن DNA تزریقی و واکسن کشته تزریقی نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای خوراکی بطور معنی‌داری بهبود یافته بود (تصاویر ۶ و ۷، P<۰/۰۵).



شکل ۷. نتایج سطح گلوبولین تام سرم در تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. (* تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ ، ** تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۱ ، * تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۰۱)**

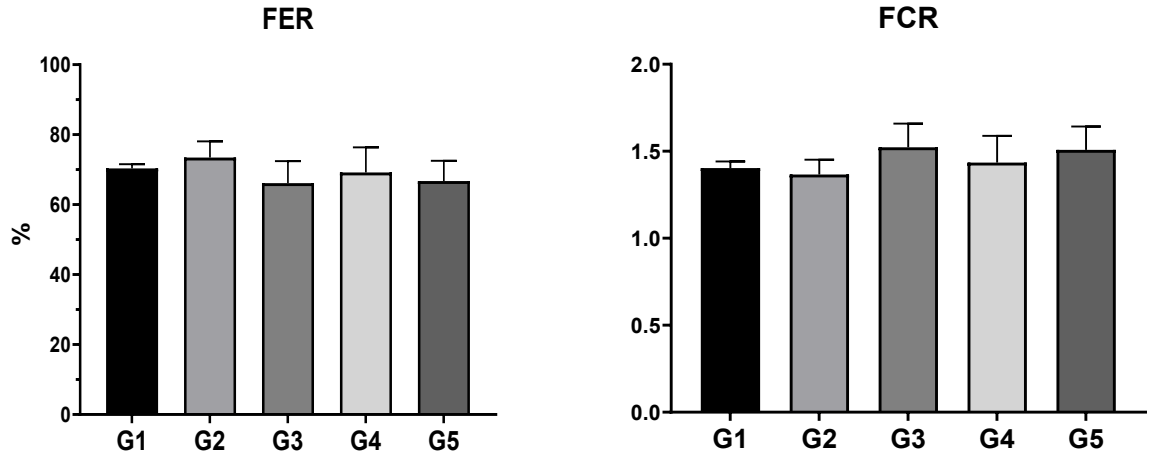


شکل ۸. نتایج درصد بقای بعد از چالش با باکتری حاد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در روز ۷۵ تحقیق ، روش کاپلان مایر.(G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد)

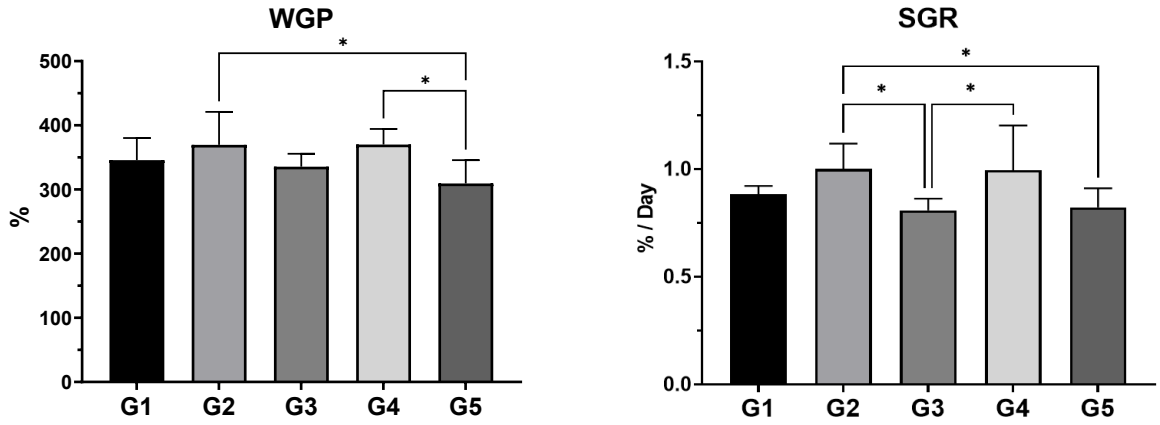
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

نتایج چالش تیمارهای تحقیق با باکتری حاد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* نشان داد، بالاترین میزان بقای بعد از چالش در تیمارهای تزریق واکسن کشته (۷۵٪) و تزریق واکسنه DNA (۶۵٪) مشاهده شد، که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند (P<۰/۰۵) ولی با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). هر چند نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشتند. میزان بقا در تیمارهای واکسن کشته خوراکی (۳۵٪) و واکسن DNA خوراکی (۴۰٪) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد (۱۵٪) نشان داد (P<۰/۰۵).



شکل ۹. نتایج شاخص های رشد FCR و FER بین تیمارهای تحقیق طی ۷۵ روز نمونه‌گیری. (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحقیق مشاهده نگردید P >۰/۰۵)



شکل ۱۰. نتایج شاخص‌های رشد (ضریب رشد ویژه SGR، و درصد افزایش وزن WGP بین تیمارهای تحقیق طی ۷۵ روز نمونه‌گیری (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد. * تفاوت معنی‌دار در سطح P <۰/۰۵)

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

شاخص های خونی

شاخص ها خونی وابسته به گلبول قرمز بین تیمارهای تحقیق در مراحل مختلف نمونه‌گیری فاقد تفاوت معنی‌دار بودند (P>۰/۰۵) . در صورتی‌که تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای تزریقی در روز ۶۰ و ۷۵ تحقیق افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول ۲. شاخص‌های خونی تیمارهای تحقیق در سه مرحله نمونه‌گیری. (G1: تیمار واکسن خوراکی DNA، G2: تیمار واکسن DNA تزریقی، G3: تیمار واکسن فرمالینه خوراکی، G4: تیمار واکسن فرمالینه تزریقی، G5: تیمار شاهد)

روز نمونه گیری	گروه	هماتوکریت (٪)	هموگلوبین (g/dl)	تعداد گلبولهای قرمز ×۱۰^{۳} µl	تعداد گلبولهای سفید µl۱۰^{۳} ×
روز ۳۰	G1	۲۶ ± ۲/۲۴	۶/۱۷ ± ۰/۵۲	۱/۸۰ ± ۰/۱۳	۱۹/۱۳ ± ۰/۸۴
	G2	۲۴/۸ ± ۲/۵۹	۵/۸۴ ± ۰/۶۶	۱/۶۲ ± ۰/۰۹	۱۹/۴۵ ± ۱/۶۴
	G3	۲۶/۲ ± ۲/۳۹	۶/۴۵ ± ۰/۴۳	۱/۷۵ ± ۰/۱۱	۱۷/۲۱ ± ۰/۲۱
	G4	۲۵/۴ ± ۱/۱۴	۶/۸۲ ± ۰/۶۹	۱/۸۴ ± ۰/۱۴	۱۷/۲۳ ± ۱/۱۱
	G5	۲۴/۸ ± ۱/۶۴	۶/۳۲ ± ۰/۶۹	۱/۷۴ ± ۰/۱۴	۱۷/۹۷ ± ۰/۹۳
روز ۶۰	G1	۸ ± ۱/۲۲	۶/۲۳ ± ۰/۶۱	۱/۸۶ ± ۰/۱۳	۱۹/۰۷ ± ۱/۱۴
	G2	۲۳ ± ۱/۲۲	۶ ± ۰/۶۱	۱/۶۰ ± ۰/۱۴	۱۹/۱۳ ± ۰/۸۴
	G3	۲۴/۶ ± ۲/۰۷	۶/۵۰ ± ۰/۱۸	۱/۷۵ ± ۰/۱۳	۱۷/۵۰ ± ۰/۹۷
	G4	۲۴ ± ۲	۶/۳۴ ± ۰/۷۲	۱/۷۵ ± ۰/۱۳	۱۸/۱۲ ± ۱/۲۴
	G5	۲۶/۲ ± ۲/۲۸	۶/۳۹ ± ۰/۳	۱/۷ ± ۰/۰۵	۱۶/۹۲ ± ۰/۶۲
روز ۷۵	G1	۲۴/۸ ± ۱/۶۴	۶/۷ ± ۰/۴۹	۱/۷۵ ± ۰/۱۳	۱۹/۲۳ ± ۱/۴۹
	G2	۲۳/۸ ± ۱/۶۴	۶/۱۹ ± ۰/۲۴	۱/۵۵ ± ۰/۱۳	۱۹/۱۵ ± ۱/۱۶
	G3	۲۴/۴ ± ۲/۳۰	۶/۹۳ ± ۰/۵۵	۱/۸۱ ± ۰/۱۶	۱۷/۲۲ ± ۱/۱۲
	G4	۲۵/۶ ± ۲/۴۱	۶/۲۱ ± ۰/۳۳	۱/۶۹ ± ۰/۰۴	۱۷/۵۱ ± ۱/۰۳
	G5	۲۵ ± ۲/۸۳	۶/۳۹ ± ۰/۳	۱/۷۵ ± ۰/۱۳	۱۶/۸۹ ± ۰/۵۹

شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی

نتایج مربوط به تأثیر واکسن خوراکی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* بدون ریزپوشانی و ریزپوشانی شده با ریزذرات کیتوزان و آلژینات در جدول ۱ آورده شده‌است.

بحث و نتیجه‌گیری

پرورش تیلاپیا (*Oreochromis spp.*) طی دو دهه اخیر به‌عنوان یکی از سریع‌ترین بخش‌های در حال رشد آبزی‌پروری جهان مطرح شده و این گونه به دلیل ویژگی‌هایی نظیر رشد سریع، تحمل بالا به شرایط محیطی، قابلیت پرورش در سیستم‌های متراکم و ارزش اقتصادی مناسب، سهم قابل توجهی از تولید آبزیان پرورشی را به خود اختصاص داده‌است (Tocan و همکاران، ۲۰۲۵). در ایران نیز با توجه به محدودیت منابع آب شیرین، توسعه سیستم‌های پرورش تیلاپیا به‌ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌خشک و استفاده از آب‌های لب‌شور، مورد استقبال قرار گرفته و در برخی استان‌ها به‌عنوان یک گزینه راهبردی در امنیت غذایی مطرح شده‌است (Mohammadi و همکاران، ۲۰۲۳).

استرپتوکوکوزیس ناشی از *Streptococcus agalactiae* همچنان یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های باکتریایی در آبزی‌پروری تیلاپیا محسوب می‌شود که با ایجاد تلفات بالا، کاهش عملکرد رشد و وارد آوردن خسارات اقتصادی قابل توجه، به‌عنوان یکی از چالش‌های اصلی صنعت پرورش این گونه در سطح جهانی شناخته می‌شود. در شرایط کنونی، واکسیناسیون پایدارترین و مؤثرترین راهکار پیشگیرانه جهت کنترل این بیماری تلقی می‌گردد؛ با این حال، اثربخشی واکسن‌ها به عوامل متعددی از جمله مسیر تجویز، نوع فرمولاسیون آنتی‌ژن و توانایی تحریک

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و مخاطی وابسته است (Saba و همکاران، ۲۰۲۵). از طرفی واکسن‌های نسل سوم بویژه واکسن‌های DNA در دامپزشکی آبزیان به دلیل مزایای متعدد خود، به عنوان گزینه‌ای مهم و امیدوارکننده در پیشگیری از بیماری‌های عفونی ماهیان در آینده مطرح هستند (Tammas و همکاران، ۲۰۲۴). بر اساس مطالعات اخیر، این واکسن‌ها با القای همزمان ایمنی هومورال و سلولی، توانایی القای حفاظت طولانی مدت و قویتری در مقایسه با برخی واکسن‌های متعارف ایجاد می‌کنند. از جمله برتری‌های کلیدی واکسن های DNA میتوان به پایداری حرارتی بالا (که چالشهای زنجیره سرمای را کاهش میدهد)، امکان طراحی چندظرفیتی علیه پاتوژن‌های مختلف، و فرآیند تولید نسبتاً سریع و مقیاس پذیر اشاره کرد. همچنین، این واکسن‌ها از نظر سلامت ماهی و احتمال بازگشت به بیماری‌زایی کاملا بی خطر هستند (Saba و همکاران، ۲۰۲۵).

در مطالعه حاضر، ایمنی‌زایی و کارایی حفاظتی یک واکسن DNA پلاسمیدی کدکننده ژن *BibA* از باکتری *S. agalactiae* با ریزپوشانی نیوزومی تولید شده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز با واکسن سنتی کشته‌شده (فرمالینه) در تیلاپیا به دو روش تزریقی و خوراکی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که واکسیناسیون تزریقی با هر دو نوع واکسن DNA و کشته‌شده نتایج رضایت‌بخشی هم در میزان محافظت ایجاد شده و هم در عیار آنتی‌بادی و تحریک ایمنی غیراختصاصی داشتند، هر چند تجویز خوراکی آنتی‌ژن‌ها مخافظت محدود و ملایمی ایجاد نمود.

ارزیابی کارایی واکسن های تحقیق

میزان بقای بعد از چالش در تیمارهای واکسینه شده با واکسن تزریقی DNA و واکسن کشته به ترتیب ۷۰ و ۷۵ درصد بود که نسبت به تیمار شاهد (۱۵٪) و تیمارهای واکسن DNA خوراکی (۴۰٪) و واکسن خوراکی کشته (۳۵٪) بر اساس روش آماری کاپلان میر افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). حفاظت بالای حاصل از تزریق واکسن DNA مبتنی بر ژن *BibA* و نیز واکسن کشته‌شده فرمالینه نشان می‌دهد که هر دو فرمولاسیون قادر به القای پاسخ ایمنی سیستمیک مؤثر علیه *S. agalactiae* بوده‌اند. مشابه بودن درصد بقا در گروه‌های واکسن DNA تزریقی و واکسن کشته‌شده تزریقی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا بیانگر آن است که آنتی‌ژن *BibA* به‌تنهایی می‌تواند یک هدف ایمنی‌زای قوی و محافظت‌کننده محسوب گردد و توانایی ایجاد پاسخ‌هایی را دارد که از نظر اثربخشی با واکسن تمام‌سلولی کشته‌شده قابل رقابت است.

واکسن‌های DNA به دلیل القای بیان درون‌زاد آنتی‌ژن در سلول‌های میزبان، قادر به تحریک همزمان پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی هستند. تولید آنتی‌ژن درون سلولی موجب ارائه آنتی‌ژن از طریق مسیرهای MHC کلاس I و II می‌شود که در نهایت می‌تواند پاسخ‌های ایمنی سلولی (مانند فعال‌سازی لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک)و نیز پاسخ‌های هومورال (تولید آنتی‌بادی)را تقویت نماید (Zhu و همکاران، ۲۰۱۷). چنین ویژگی‌ای برای کنترل عوامل باکتریایی، به‌ویژه در مواردی که بخشی از چرخه پاتوژن با تهاجم به بافت‌ها و فرار از ایمنی همراه است، اهمیت فراوان دارد.

از سوی دیگر، واکسن کشته‌شده تزریقی نیز سطح حفاظت بالایی ایجاد نمود که نشان‌دهنده کارآمدی پایدار واکسن‌های فرمالینه در تیلاپیا، به‌ویژه در صورت تجویز داخل صفاقی است. واکسن‌های کشته‌شده با ارائه طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌ها شامل پروتئین‌های سطحی، اجزای دیواره سلولی و الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMPs)، باعث می‌شود پاسخ‌های ایمنی در برابر پاتوژن‌های خارج‌سلولی مانند *S. agalactiae* به‌طور قابل توجهی ارتقا یابد. بنابراین، مشابه بودن عملکرد واکسن کشته‌شده و واکسن DNA تزریقی می‌تواند نشان دهد که پروتئین *BibA* احتمالاً یکی از آنتی‌ژن‌های غالب و کلیدی در ایجاد حفاظت ایمنی علیه این پاتوژن محسوب می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر با گزارش‌های پیشین در زمینه موفقیت واکسن‌های DNA علیه *استرپتوکوک‌ها* در تیلاپیا و سایر گونه‌های پرورشی همخوانی دارد و بیانگر پتانسیل بالای این رویکرد در توسعه واکسن‌های نوین آبزیان است (Mondal و همکاران، ۲۰۲۲). در تحقیقی مشابه Zhu و همکاران (۲۰۱۷) واکسن DNA در برابر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر ماهی به روش خوراکی در ماهی تیلاپیا در سه مرحله با فاصله یک هفته تجویز کردند و ایمنی زایی حدود ۵۷٪ را گزارش شد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

همچنین Abotaleb و همکاران (۲۰۲۴) با استفاده از واکسن دوگانه ویبریو و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در ماهی تیلاپیا به روش تزریقی محافظت ۸۰٪ را گزارش نمودند. همچنین Mohd و همکاران (۲۰۲۳) با بکار بردن واکسن خوراکی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *آئرومونواس هیدروفیلا* موفق به ایجاد محافظت تا ۸۰٪ در ماهی تیلاپیا شدند. البته دوز، تعداد دفعات واکسیناسیون متفاوت از تحقیق ما بوده و ادجوانت مونتاناید استفاده گردید.

ایمنی‌زایی قوی مشاهده‌شده در گروه‌های تزریقی را می‌توان به عوامل ایمنی‌شناختی متعددی نسبت داد. تزریق داخل صفاقی موجب عبور مستقیم واکسن از سدهای مخاطی شده و از تخریب آنتی‌ژن در محیط گوارشی جلوگیری می‌کند؛ بنابراین آنتی‌ژن با کارایی بالاتر در اختیار سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن قرار می‌گیرد. از این رو، واکسن‌های تزریقی معمولاً نسبت به واکسن‌های خوراکی، توان بیشتری در تحریک پاسخ‌های سیستمیک از جمله افزایش IgM سرمی و تشکیل حافظه ایمنی دارند.

در مورد واکسنDNA، پاسخ ایمنی تا حد زیادی وابسته به ورود موفق پلاسمید به سلول‌های میزبان و بیان مؤثر ژن هدف است. حفاظت بالا در این مطالعه نشان می‌دهد که پلاسمید طراحی‌شده از پایداری مناسب برخوردار بوده و در بافت‌های میزبان به میزان کافی بیان شده است. از طرفی پروتئین‌های *BibA* در *استرپتوکوک‌ها* معمولاً به‌عنوان عوامل ویرولانس در چسبندگی به سلول‌های میزبان، فرار از پاسخ ایمنی و کلونیزاسیون بافتی شناخته می‌شوند. بنابراین، پاسخ ایمنی علیه *BibA* می‌تواند با مهار اتصال باکتری، کاهش توانایی تهاجم و محدود کردن انتشار سیستمیک آن، نقش حفاظتی مؤثری ایفا نماید.

یکی از یافته‌های کلیدی این مطالعه، کاهش چشمگیر اثربخشی واکسیناسیون خوراکی نسبت به روش تزریقی بود؛ هر چند واکسن DNA کارایی نسبتاً بهتری نسبت به واکسن کشته داشت. مشابه بودن حفاظت ایجادشده توسط واکسن خوراکی DNA و واکسن خوراکی کشته نشان می‌دهد که محدودیت اصلی، مسیر تجویز بوده و نه ماهیت آنتی‌ژن یا نوع واکسن. این یافته با شواهد گسترده موجود در زمینه واکسن‌های خوراکی در آبزیان مطابقت دارد، زیرا به‌طور کلی واکسیناسیون خوراکی در ماهیان بدون بهره‌گیری از سیستم‌های نوین رهایش و ادجوانت‌های مخاطی، اغلب پاسخ ایمنی ضعیف‌تر و متغیرتری ایجاد می‌کند (Xu و همکاران، ۲۰۲۴).

دستگاه گوارش ماهی دارای شرایط فیزیکوشیمیایی خاصی است که شامل pH متغیر، حضور آنزیم‌های گوارشی، نمک‌های صفراوی و فعالیت پروتئولیتیک می‌باشد. این شرایط می‌تواند موجب تخریب آنتی‌ژن‌های واکسنی پیش از رسیدن به محل‌های القای ایمنی گردد. در واکسن‌های کشته‌شده، احتمال دناتوره شدن پروتئین‌های سطحی و کاهش یکپارچگی ساختاری آنتی‌ژن وجود دارد که نهایتاً منجر به کاهش شناسایی توسط سیستم ایمنی و افت ایمنی‌زایی می‌شود. در واکسن‌های DNA نیز پلاسمیدها در محیط روده در معرض نوکلئازها قرار گرفته و تجزیه می‌شوند، در نتیجه میزان ورود پلاسمید به سلول‌ها و بیان ژن هدف کاهش می‌یابد.

همچنین، ایمنی مخاطی در ماهیان دارای ویژگی‌های خاصی است و ایمونوگلوبولین‌هایی مانند IgT/IgZ نقش برجسته‌ای در دفاع مخاطی دارند . بنابراین، احتمال دارد که واکسن خوراکی بیشتر پاسخ‌های مخاطی محدود ایجاد کرده باشد و به دلیل عدم تحریک کافی IgM سیستمیک، حفاظت در برابر عفونت سیستمیک ناشی از باکتری کامل نبوده است. به همین دلیل، حفاظت متوسط ۴۰ درصدی شاید نشان‌دهنده نوعی واکنش اولیه مخاطی یا Mucosal priming باشد که برای جلوگیری از تهاجم سیستمیک باکتری کافی نبوده است.

ارزیابی عیار آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس آگالاکتیه در تیمارها

در ارزیابی پاسخ ایمنی پس از واکسیناسیون، عیار آنتی‌بادی اختصاصی یکی از معتبرترین شاخص‌ها برای سنجش ایمنی هومورال در ماهیان بوده و معمولا ارتباط مستقیمی با سطح حفاظت فراهم‌شده دارد. در گروه‌های تزریقی واکسن (شامل واکسن DNA و واکسن کشته)، افزایش معنی‌دار عیار آنتی‌بادی در سرم دیده شد که نشان‌دهنده فعال‌شدن پاسخ ایمنی اکتسابی هومورال است. این افزایش در تیتر آنتی‌بادی احتمالاً ناشی

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

از تماس مستقیم آنتی‌ژن با سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APCs) در بافت‌های لنفاوی مرکزی مانند طحال و کلیه قدامی بوده است، جایی که لنفوسیت‌های B پس از دریافت آنتی‌ژن تکثیر و تمایز یافته و آنتی‌بادی تولید می‌کنند (Lakshmi و همکاران، ۲۰۲۵).

در مطالعات واکسیناسیون تیلاپیا با واکسن‌های inactivated نیز دیده شده است که واکسن تزریقی موجب افزایش معنی‌دار عیار آنتی‌بادی نسبت به کنترل و گروه‌های غیرواکسینه می‌شود، که این امر با افزایش مقاومت و کاهش مرگ‌ومیر پس از چالش باکتریایی همراه است (Piamsomboon و همکاران، ۲۰۲۴).

مشابهت نتایج تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های تزریقی واکسن DNA و واکسن کشته‌شده نیز جای بحث دارد. واکسن‌های DNA با بیان درون‌زاد آنتی‌ژن در سلول‌های میزبان، می‌توانند پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را همزمان القا کنند. این نوع واکسن‌ها موجب ارائه مؤثر آنتی‌ژن توسط MHC کلاس I و II به لنفوسیت‌های T و B شده و می‌توانند پاسخ آنتی‌بادی را تقویت نمایند. از سوی دیگر، واکسن‌های کشته‌شده با ارائه طیف گسترده‌ای از آنتی‌ژن‌های سطح باکتری و تحریک گیرنده‌های ایمنی ذاتی، نیز پاسخ ترکیبی پادتنی بالایی را به ایجاد می کند (Lakshmi و همکاران، ۲۰۲۵). بنابراین، افزایش مشابه تیتر پادتن در هر دو نوع واکسن تزریقی نشان‌دهنده این است که هر دو روش تجویز توانایی تحریک قوی سیستم ایمنی هومورال را دارند، اگرچه مکانیسم تحریک ابتدایی ممکن است متفاوت باشد.

برخلاف گروه‌های تزریقی، در تیمارهای خوراکی افزایش معنی‌دار در تیتر آنتی‌بادی مشاهده نشد. این نتیجه به خوبی با محدودیت‌های شناخته‌شده مسیر خوراکی سازگار است؛ در مسیر خوراکی، آنتی‌ژن در مواجهه با شرایط دستگاه گوارش آسیب دیده، بنابراین جذب آنتی‌ژن کاهش یافته و پاسخ ایمنی هومورال قوی شکل نمی‌گیرد (Tammas و همکاران، ۲۰۲۴). علاوه بر این، احتمال دارد پدیده تحمل مخاطی (oral tolerance) ممکن است موجب کاهش پاسخ سیستمیک و عیار آنتی‌بادی شود، زیرا سیستم ایمنی مخاطی روده در برابر مواجهه با آنتی‌ژن‌های خوراکی تمایل به حفظ توازن و جلوگیری از پاسخ‌های بیش‌فعال دارد، که در نهایت به عدم افزایش معنی‌دار سرمی آنتی‌بادی منجر می‌گردد (Linh و همکاران، ۲۰۲۲).

در بسیاری از مطالعات واکسن در تیلاپیا و سایر گونه‌های ماهیان نشان داده شده است که ارتباط مستقیم بین سطح پادتن اختصاصی و درصد بقا پس از چالش وجود دارد؛ به‌گونه‌ای که افزایش معنی‌دار تیتر پادتن معمولاً با کاهش مرگ‌ومیر و افزایش نسبت بقای نسبی (RPS) همراه است (Queiroz و همکاران، ۲۰۲۴). این همبستگی نشان می‌دهد که پادتن اختصاصی در ماهیان نقش کلیدی در مقابله با پاتوژن‌های باکتریایی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک شاخص قابل اتکا برای ارزیابی اثربخشی واکسن به کار رود.

همچنین Lu و همکاران (۲۰۲۴) سه روش تجویز واکسن دوگانه *ویبریو/ استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در تیلاپیا را بررسی کرده و تحریک ایمنی غیر اختصاصی در تیمارهای واکسینه شده با واکسن تزریقی را گزارش نمودند.

ارزیابی شاخص های ایمنی غیر اختصاصی بین تیمارها

ایمنی غیر اختصاصی(ذاتی) به‌عنوان اولین خط دفاع در برابر پاتوژن‌ها نقش بسیار مهمی در سلامت آبزیان دارد و شاخص‌های آن مانند فعالیت لیزوزیم، سیستم کمپلمان، میلوپراکسیداز، توتال پروتئین و گلوبولین‌ها معیارهایی ارزشمند برای سنجش وضعیت ایمنی عمومی ماهی‌ها می‌باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در هر دو نوع واکسن DNA و کشته در تیمارهای تزریقی، تمام شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی (لیزوزیم، کمپلمان، میلوپراکسیداز، توتال پروتئین و گلوبولین)به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و گروه‌های خوراکی افزایش یافت ($p<0/05$)، در حالی که واکسن‌های خوراکی علیرغم افزایش نسبی، تأثیر معنی داری بر شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی فوق ایجاد نکردند ($p>0/05$).

واکسن‌های تزریقی با ورود مستقیم آنتی‌ژن به محیط داخل‌بافتی بلافاصله با سلول‌های ایمنی ذاتی تماس یافته و پاسخ‌های غیر اختصاصی را تقویت می‌کنند. این تماس مستقیم آنتی‌ژن با ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها، پیام‌های سایتوکاینی القا می‌کند که موجب افزایش سنتز پروتئین‌های فاز حاد، فعال‌سازی کمپلمان و افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد میکروبی مانند لیزوزیم و میلوپراکسیداز می‌گردد (Magnadóttir، ۲۰۱۸). بر اساس شواهد، سیستم کمپلمان با تسهیل اپسونیزاسیون، فاگوسیتوز و لیز مستقیم باکتری‌ها، نقش حیاتی در دفاع ذاتی دارد و افزایش سطح کمپلمان

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

سرمی پس از واکسیناسیون تزریقی با کاهش بار پاتوژن ارتباط مستقیم دارد (Tammas et al., 2024). همچنین، افزایش فعالیت لیزوزیم و میلوپراکسیداز نشان‌دهنده آماده‌سازی هرچه بیشتر فاگوسیت‌ها برای نابودی پاتوژن‌ها می‌باشد که این پاسخ در واکسن‌های تزریقی قوی‌تر از خوراکی است .

در مورد واکسن‌هایDNA ، علاوه بر القای پاسخ ایمنی هومورال و سلولی، آنتی‌ژن‌های بیان‌شده در بافت‌های میزبان می‌توانند به‌صورت مستقیم مسیرهای ایمنی ذاتی را نیز تحریک کنند. توالی‌های CpG موجود در پلاسمیدهای DNA به‌عنوان ادجوانت‌های طبیعی شناخته می‌شوند، که با القای مسیرهای پیش التهابی و ایمنی ذاتی، موجب افزایش فعالیت فاکتورهای ایمنی مانند کمپلمان و آنزیم‌های ضد میکروبی می‌شوند (Liu و همکاران، ۲۰۱۹). این امر می‌تواند دلیل افزایش چشمگیر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در واکسن‌های تزریقی DNA را توجیه نماید.احتمالاً تخریب آنتی‌ژن در مسیر گوارشی باعث جذب ناکافی آنتی ژن واکسنی می شود چراکه آنتی‌ژن خوراکی باید از سد مخاطی روده عبور کند تا بتواند به GALT (بافت لنفاوی مرتبط با روده) برسد. مطالعات نشان داده‌اند که جذب آنتی‌ژن‌های خوراکی در ماهیان کارامدی کافی ندارد مگر اینکه با ادجوانت مناسب همراه شود (Liu و همکاران، ۲۰۱۹). احتمال دارد تحمل مخاطی به عنوان واکنش تدافعی مخاطی به جای تحریک قوی ایمنی، به سمت تعدیل و عدم پاسخ حرکت کند که مواجهه مکرر با آنتی‌ژن از مسیر خوراکی می‌تواند پاسخ‌های ذاتی و اکتسابی را تضعیف نماید (Mondal et al., 2022).

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که واکسیناسیون تزریقی در ماهیان موجب افزایش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم، کمپلمان و سایر شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی می‌گردد. به‌طور مثال، در تیلاپیا واکسینه‌شده با واکسن کشته‌شده تزریقی، هم کمپلمان و هم لیزوزیم و میلوپراکسیداز به‌طور معنی‌داری افزایش یافته‌اند که با کاهش تلفات ناشی از بیماری همراه بوده است (Wong و همکاران، ۲۰۲۴). همچنین Zhu و همکاران (۲۰۱۷) با تجویز خوراکی واکسن DNA ضد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در ماهی تیلاپیا در سه مرحله با فاصله یک هفته تحریک ایمنی غیر اختصاصی بویژه افزایش سطح لایزوزیم سرم، فعالیت کمپلمان و قدرت باکتری کشی سرم و فعالیت NBT را در تیمارهای واکسینه نسبت به گروه شاهد گزارش نمودند.

ارزیابی شاخص های خونی

شاخص‌های خونی از جمله تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، میزان هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (Hct) از مهم‌ترین پارامترهای فیزیولوژیک برای ارزیابی وضعیت سلامت عمومی، ظرفیت حمل اکسیژن و میزان استرس فیزیولوژیک در ماهیان محسوب می‌شوند. در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که بین گروه‌های واکسینه‌شده با واکسن DNA و واکسن کشته (خوراکی و تزریقی)و گروه شاهد، هیچ تفاوت معنی‌داری در RBC، Hb و Hct مشاهده نشد (Zhu و همکاران، ۲۰۱۷).

مطالعات متعددی نیز گزارش کرده‌اند که واکسن‌های استاندارد و ایمن در آبزیان معمولاً باعث تغییرات شدید در شاخص‌های گلبول قرمز نمی‌شوند و در صورت مشاهده تغییرات شدید، این موضوع می‌تواند نشانه سمیت واکسن، التهاب سیستمیک یا اثرات جانبی نامطلوب باشد (Witeska و همکاران، ۲۰۲۳). همچنین Afsharipour و همکاران (۲۰۲۲) عدم تأثیر واکسیناسیون با واکسن *VNN* را بر شاخص های خونی ماهی خاویاری گزارش نمودند. هر چند افزایش تعداد گلبولهای سفید در تیمارهای واکسینه شده مشاهده شد. Darvishi و همکاران (۲۰۲۵) هم در ماهی قزل آلا تجویز واکسن دوگانه *استرپتوکوکوزیس و یرسینیا* را فاقد تأثیر معنی‌دار بر شاخص‌های خونی مرتبط با گلبولهای قرمز گزارش نمودند.

این یافته می‌تواند از جنبه ایمنی زیستی واکسن‌ها (vaccine safety) بسیار حائز اهمیت باشد. این نتایج نشان می‌دهد که شاخص‌های خونسازی و طول عمر گلبول‌ها و بافت‌های خونساز تحت تأثیر واکسن‌های تحقیق قرار نگرفته است. البته عدم تغییر معنی‌دار در شاخص‌های هماتولوژیک از طرفی بیانگر آن است که واکسن‌های مورد استفاده در این پژوهش، چه از نوع DNA و چه از نوع واکسن کشته، منجر به بروز کم‌خونی، همولیز، اختلال در خون‌سازی یا استرس شدید فیزیولوژیک نشده‌اند. به عبارت دیگر، عدم تأثیر بر شاخص‌های RBC، Hb و Hct نشان

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات: ۱۸-۳۷
https://jmb.ahvaz.iau.ir

می‌دهد که واکسن‌ها به احتمال زیاد اثر منفی بر عملکرد سیستم خون‌سازی و ظرفیت اکسیژن‌رسانی ماهی نداشته‌اند و از این منظر، واکسیناسیون انجام‌شده قابل قبول و ایمن ارزیابی می‌شود.

اثر بر شاخص های رشد

بهبود عملکرد رشد، شاخصی مهم و حیاتی در ارزیابی کارایی و عملکرد واکسن در آبزی‌پروری به شمار می‌رود. در مطالعه حاضر، ماهی‌های ایمن‌سازی شده با واکسن DNA مبتنی بر ژن *BibA* و واکسن کشته تزریقی، شاخص‌های رشد (SGR و WGP) به‌طور معنی‌داری بالاتر نسبت به گروه‌های شاهد و واکسن خوراکی نشان دادند. این مشاهده از این حیث حائز اهمیت است که نشان می‌دهد کاندیدای واکسن DNA نه‌تنها ایمنی‌زایی اختصاصی مطلوبی ایجاد می‌کند، بلکه منجر به حفظ یا ارتقای تعادل متابولیک مثبت در ماهی تیلاپیا می شود. بهبود شاخص های رشد در گروه واکسن DNA را می‌توان به اثر محافظتی آن نسبت داد. در حالی‌که گروه شاهد ممکن است تحت تأثیر عوامل استرس‌زای فرصت‌طلبِ تحت‌بالینی یا بار متابولیک ناشی از آنها قرار گیرد. واکسن DNA با القای پاسخ‌های ایمنی قدرتمند باعث کاهش صرف انرژی توسط ماهی برای مقابله با فرایندهای التهابی و عفونت های تحت بالینی می‌گردد و انرژی بیشتری به سمت رشد سوماتیک تخصیص پیدا می‌کند. این یافته با مطالعات پیشین بر روی تیلاپیا همسو است که در آن‌ها واکسن‌های DNA علیه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* منجر به بهبود شاخص‌های رشد شدند؛ امری که احتمالاً ناشی از کاهش صرف انرژی برای نگهداری سیستم ایمنی است (Mubeen و همکاران، ۲۰۲۵ و Alishahi و همکاران، ۲۰۲۴). تفاوت معنی‌دار بین واکسن‌های تزریقی (DNA و کشته) و واکسن‌های خوراکی در شاخص‌های رشد، احتمالاً ریشه در دقت و میزان دوز تجویز شده و سالم ماندن آنتی‌ژن و کینتیک پردازش آنتی‌ژن دارد. واکسن‌های خوراکی علی‌رغم استرس کمتر در زمان تجویز، اغلب در دستگاه گوارش دچار تخریب شده که منجر به جذب ناهماهنگ آنتی‌ژن و احتمالاً القای ایمنی ضعیف می گردد.

هم‌افزایی هورمونی و متابولیک از منظر فیزیولوژیک، بهبود رشد در تیلاپیای واکسینه شده با DNA ممکن است با تنظیم محور هورمون رشد/فاکتور رشد شبه‌انسولین (GH/IGF-1) مرتبط باشد (Lu و همکاران، ۲۰۲۴). مطالعات اخیر نشان‌دهنده وجود یک ارتباط متقابل بین سیستم ایمنی و سیستم غدد درون‌ریز در ماهیان است؛ یک پاسخ ایمنی هدفمند می‌تواند از کاهش بیان mRNA مربوط به *igf-1* که معمولاً در زمان استرس مزمن یا عفونت رخ می‌دهد، جلوگیری کند. برتری عملکرد رشد در واکسن DNA تزریقی نشان‌دهنده یک تحریک رشد زیست‌سازگارتر است؛ به طوری که تولید درون‌سلولی آنتی‌ژن، بدون ایجاد آسیب‌های بافتی گسترده، یک عفونت طبیعی را شبیه‌سازی کرده و در نتیجه وضعیت آنابولیک ماهی را حفظ می‌کند.

از منظر کاربردی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که واکسن DNA مبتنی بر ژن *BibA* و واکسن کشته‌شده فرمالینه به روش تزریقی می‌توانند گزینه‌های بسیار مؤثری برای کنترل *استرپتوکوکوزیس* در مزارع تیلاپیا باشند. با این حال، واکسیناسیون تزریقی به دلیل نیاز به نیروی انسانی زیاد، ایجاد استرس و آسیب فیزیکی در ماهی، و دشواری اجرای آن در مقیاس صنعتی (به‌ویژه در ماهیان کوچک)دارای محدودیت‌های جدی است. از طرفی واکسیناسیون خوراکی با واکسن DNA و واکسن کشته در برابر استرپتوکوکوزیس تیلاپیا، علیرغم کارایی پایین، دارای مزیتهای خاص است. لذا این تحقیق ضمن تاکید بر کارایی مناسب و قابل رقابت واکسن DNA با توجه به حفاظت ۴۰ درصدی حاصل از واکسن خوراکی، ظرفیت بالقوه این روش در شرایط مزرعه باشد زیرا در مزرعه حتی کاهش نسبی تلفات نیز می‌تواند از نظر اقتصادی ارزشمند باشد، با این حال، برای دستیابی به حفاظت در سطح تجاری مشابه واکسن‌های تزریقی، نیاز به بهینه‌سازی فرمولاسیون خوراکی وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی بنیاد ملی علم ایران INSF در قالب طرح شماره ۴۰۲۸۳۳۹ به انجام رسید.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

References

1- **Abdallah, E. S. H., Metwally, W. G. M., Abdel-Rahman, M. A. M., Albano, M., & Mahmoud, M. M. (2024).** Streptococcus agalactiae infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. Biology, 13(11), 914-928

2- **Aboleila, S. M., Salah, A., Mohamed, R. A., & Diab, A. M. (2022).** Combined effect of a mixture of Bacillus species and vaccination on haemato-biochemical parameters, immune response and transcriptomic changes of Nile tilapia challenged with *Streptococcus iniae*. Aquaculture Research, 53(14), 5029-5044.

3- **Abotaleb, M. M., Soliman, H. M., Tawfik, R. G., Mourad, A., Khalil, R. H., & Abdel-Latif, H. M. (2024).** Efficacy of combined inactivated vaccines against Vibrio alginolyticus and *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia in Egypt. *Aquaculture International*, *32*(2), 1317-1334.

4- **Afsharipour, E., Azari Takami, G., Zorriehzahra, M. J., & Motallebi, A. A. (2022).** Evaluation of killed vaccine efficacy on hematology parameters and IgM assay of Acipenser stellatus challenged with *Nervous Necrosis Virus* (NNV). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *21*(1), 301-315.

5- **Alishahi M, Alizadehnia P, Khosravi M, Mohammadian T, Moftakhar P.** Improvement of Immunogenicity and Efficacy of Oral *Streptococcus agalactiae* Vaccine in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using Antigen Microencapsulation Technique. 3 2024; 16 (1) :56-74

6- **Alishahi M, Esmaeili Rad A, Zarei M, Ghorbanpour M,. (2014).** Effect of dietary chitosan on immune response and disease resistance in Cyprinus carpio. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 8(2):125-133.

1- **Alishahi, M., & Moftakhar, P. (2025).** Latest vaccine findings in aquaculture with emphasis on marine vaccines.

2- **Alishahi, M., Lababian, H., Heidari, H., Tabandeh, M. R., & Khosravi, M. (2024).** Development of an injectable DNA vaccine against *Aeromonas hydrophila* infection nanoencapsulated with poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) in common carp. *Aquaculture Research*, *2024*(1), 7270489.

3- **Alishahi, M., Vaseghi, M., Tabandeh, M. R., & Khosravi, M. (2024a).** Immunogenic and protective effects of an oral polylactic-co-glycolic acid nano encapsulated DNA vaccine encoding aopB gene of *Aeromonas hydrophila* in common carp. Aquaculture International, 32(2), 1169-1190.

4- **Brata, O. (1993).** Veterinary clinical immunology laboratory 2 (pp. 24–25). Blacksburg, VA: Bar-Lab Inc.

5- **Darvishi, M., Firouzbakhsh, F., Yeganeh, S., & Safari, R. (2025).** Effect of *Lactobacillus plantarum and Bacillus subtilis* bacteria on growth and hematological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry immunized with bivalent *streptococcosis/lactococcosis* vaccine and yersiniosis vaccine. *Journal of Aquaculture Development*, *19*(2), 49-65.

6- **Dezfuly, Z. T., Alishahi, M., Ghorbanpoor, M., Tabandeh, M. R., & Mesbah, M. (2020).** Immunogenicity and protective efficacy of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide (LPS), encapsulated by alginate-chitosan micro/nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). Fish & shellfish immunology, 104, 25-35.

7- **Ellis, A. E. (1990).** Lysozyme assays. Techniques in fish immunology, 1, 101-103.

8- **El-Sayed, A. F. M., & Fitzsimmons, K. (2023).** From Africa to the world—The journey of Nile tilapia. Reviews in Aquaculture, 15, 6-21.

9- **Gao, Y., Huo, X., Wang, Z., Yuan, G., Liu, X., Ai, T., & Su, J. (2021).** Oral administration of *Bacillus subtilis* subunit vaccine significantly enhances the immune protection of grass carp against GCRV-II infection. Viruses, 14(1), 30.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

10- **Haenen, O. L., Dong, H. T., Hoai, T. D., Crumlish, M., Karunasagar, I., Barkham, T., ... & Bondad-Reantaso, M. G. (2023).** Bacterial diseases of tilapia, their zoonotic potential and risk of antimicrobial resistance. *Reviews in Aquaculture*, *15*, 154-185.

11- **Lakshmi, S., Nandhakumar, Guha, R., Wang, A., Wangkahart, E., Wang, T., & Elumalai, P. (2025).** Analysis of the efficacy of two molecular adjuvants, flagellin and IFN-γ, on the immune response against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, *51*(1), 47.

12- **Linh, N. V., Dien, L. T., Dong, H. T., Khongdee, N., Hoseinifar, S. H., Musthafa, M. S., ... & Van Doan, H. (2022).** Efficacy of different routes of formalin-killed vaccine administration on immunity and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fishes*, *7*(6), 398.

13- **Liu, C., Hu, X., Cao, Z., Sun, Y., Chen, X., & Zhang, Z. (2019).** Construction and characterization of a DNA vaccine encoding the SagH against *Streptococcus iniae*. *Fish & shellfish immunology*, *89*, 71-75.

14- **Lu, C. L., Wangkahart, E., Huang, J. W., Huang, Y. X., Huang, Y., Cai, J., ... & Wang, B. (2024).** Immune response and protective efficacy of *Streptococcus agalactiae* vaccine coated with chitosan oligosaccharide for different immunization strategy in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, *145*, 109353.

15- **Mohammadi, M., Ghaedi, A., Sarsangi Aliabad, H., & Akhavan, M. (2024).** An Analysis of tilapia introducing the country's aquaculture industry. *Advanced Aquaculture Sciences Journal*, *7*(پاییز و زمستان ۱۴۰۲), ۱-۱۱.

16- **Mohd Ali, N. S., Saad, M. Z., Azmai, M. N. A., Salleh, A., Zulperi, Z. M., Manchanayake, T., ... & Md Yasin, I. S. (2023).** Immunogenicity and efficacy of a feed-based bivalent vaccine against *streptococcosis* and motile aeromonad septicemia in red hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*). *Animals*, *13*(8), 1346.

17- **Mondal, H., & Thomas, J. (2022).** A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquaculture international*, *30*(4), 1971-2000.

18- **Monir, M. S., Yusoff, M. S. M., Zamri-Saad, M., Amal, M. N. A., Mohamad, A., Azzam-Sayuti, M., & Ina-Salwany, M. Y. (2022).** Effect of an oral bivalent vaccine on immune response and immune gene profiling in vaccinated red tilapia (*Oreochromis spp.*) during infections with *Streptococcus iniae* and *Aeromonas hydrophila*. *Biology*, *11*(9), 1268.

19- **Mubeen, N., Abbas, F., Hafeez-ur-Rehman, M., Crumlish, M., Mahboob, H., Akmal, M., ... & Jalil, S. (2025).** Effectiveness of Feed-Based Monovalent *Aeromonas* Vaccine in Farmed Carp. *Microorganisms*, *13*(8), 1903.

20- **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*. *Diseases of aquatic organisms*, *26*(2), 139-147.

21- **Piamsomboon, P., Jantrakajorn, S., Tanpichai, P., & Wongtavatchai, J. (2024).** Implementation of formalin-inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* broodstock: Efficient vaccination regime, antibody response, and immune-related genes. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *50*(4), 558-565.

22- **Quade, M. J., & Roth, J. A. (1997).** A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary immunology and immunopathology*, *58*(3-4), 239-248.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]

23- **Queiróz, G. A. D., Silva, T. M. F. E., & Leal, C. A. G. (2024).** Duration of protection and humoral immune response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) vaccinated against *Streptococcus agalactiae*. *Animals*, *14*(12), 1744.

24- Saba**, A. O., Mohamad, A., Yasin, I. S. M., Salleh, A., Sayuti, M. A., Saad, M. Z., & Azmai, M. N. A. (2025).** Development, Application, Efficacy, and Future Directions of Vaccination Against *Streptococcus* Infections in Tilapia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Aquaculture Research*, *2025*(1), 5521990.

25- Su**, F. J., & Chen, M. M. (2022).** Protective efficacy of novel oral biofilm vaccines against *Photobacterium damselae* subsp. damselae infection in giant grouper, Epinephelus lanceolatus. *Vaccines*, *10*(2), 207.

26- **Tacon, A. G., Metian, M., Parsons, G. J., & Shumway, S. E. (2025).** A global aquaculture and aquafeed production update: 2010 to 2023. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-10.

27- **Tammas, I., Bitchava, K., & Gelasakis, A. I. (2024).** Advances in vaccine adjuvants for teleost fish: implications for aquatic welfare and the potential of nanoparticle-based formulations. *Vaccines*, *12*(12), 1347.

28- **Tammas, I., Bitchava, K., & Gelasakis, A. I. (2024).** Transforming aquaculture through vaccination: A review on recent developments and milestones. *Vaccines*, *12*(7), 732.

29- **Thorarinsson, R., Ramstad, A., Wolf, J. C., Sindre, H., Skjerve, E., Rimstad, E., ... & Rodriguez, J. F. (2024).** Effect of pancreas disease vaccines on infection levels and virus transmission in Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with salmonid alphavirus, genotype 2. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1342816.

30- **Witeska, M., Kondera, E., & Bojarski, B. (2023).** Hematological and hematopoietic analysis in fish toxicology—A review. *Animals*, *13*(16), 2625.

31- **Wong, K. Y., Khair, M. H. M. M., Song, A. A. L., Masarudin, M. J., Loh, J. Y., Chong, C. M., ... & In, L. L. A. (2024).** Recombinant *lactococcal*-based oral vaccine for protection against *Streptococcus agalactiae* infections in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, *149*, 109572.

32- **Xu, F. F., Deng, Z. Y., Sheng, J. J., & Zhu, B. (2024).** The HSP70 and IL-1β of Nile tilapia as molecular adjuvants can enhance the immune protection of DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* infection. *Journal of Fish Diseases*, *47*(11), e14002.

33- Xu**, F. F., Jiang, F. Y., Zhou, G. Q., Xia, J. Y., Yang, F., & Zhu, B. (2022).** The recombinant subunit vaccine encapsulated by alginate-chitosan microsphere enhances the immune effect against *Micropterus salmoides rhabdovirus*. *Journal of Fish Diseases*, *45*(11), 1757-1765.

34- **Zeng, W., Wang, Y., Chen, X., Wang, Q., Bergmann, S. M., Yang, Y., ... & Lan, W. (2021).** Potency and efficacy of VP20-based vaccine against tilapia lake virus using different prime-boost vaccination regimens in tilapia. *Aquaculture*, *539*, 736654.

35- **Zhu, L., Yang, Q., Huang, L., Wang, K., Wang, X., Chen, D., ... & Lai, W. (2017).** Effectivity of oral recombinant DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia. *Developmental & Comparative Immunology*, *77*, 77-87.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-21]