اثرات واکسن دو سویه استرپتوکوکوزیس (*Streptococcus iniae / Lactococcus garvieae*) به‌روش حمام بر برخی از شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سیامک یوسفی سیاه‌کلرودی[1*]، محمد مازندرانی[2]، رعد عبدالیمه حبیب[3]،
پرستو محبی درخش[4]، مهیار یوسفی سیاه‌کلرودی[5]

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
[2] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[3] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[4] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
[5] دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۹

چکیده

واکسیناسیون به عنوان مقرون به صرفه‌ترین و پایدارترین روش کنترل بیماری‌های عفونی ماهی است. این تحقیق با هدف اثرات واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/لاکتوکوکوس به‌روش حمام بر برخی از شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام گرفته است. به همین منظور تعداد ۳۵۰ بچه‌ماهی با میانگین وزنی حدود ۱±۱۰ گرم مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارها شامل تیمار ۱: بچه‌ماهیان ایمن شده با واکسن به روش حمام یک مرحله‌ای، تیمار ۲: بچه‌ماهیان ایمن شده با روش حمام واکسن دو مرحله‌ای، تیمار ۳: بچه‌ماهیان ایمن شده با واکسن به روش حمام دو مرحله‌ای هایپر اسموتیک، تیمار ۴: بچه‌ماهیان ایمن شده با روش تزریق یک مرحله‌ای واکسن و تیمار شاهد (بچه‌ماهیان واکسینه نشده) در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد در تیمارهای واکسینه به روش‌های مختلف، تعداد گلبول‌های قرمز خون، میزان هموگلوبین خون، MCV، MCH، MCHC اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند، ولی درصد هماتوکریت خون در تیمارهای مختلف با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. هم‌چنین واکسیناسیون ماهیان باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون در تیمارهای واکسینه در مقایسه با گروه شاهد شده بود. در بررسی حاضر براساس نتایج تمامی گروه‌های واکسینه شده برای هر دو گونه استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه آنتی‌بادی تولید شده است. در ماهیان واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای ساده و نیز واکسن+ محیط هایپراسموتیک در مقایسه با ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای تیتر آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر اندازه‌گیری شد و تیتری برابر با واکسن تزریقی یک مرحله‌ای ثبت شد. در این مطالعه زمان نمونه‌برداری برای ماهیان واکسینه شده به روش حمام دو مرحله‌ای ۲۱ روز پس از آخرین واکسیناسیون انجام شد، در حالی که نمونه‌برداری برای روش تزریقی یک‌مرحله‌ای ۴۲ روز بعد از تزریق بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه واکسیناسیون به روش تزریق ایمنی بیشتری را نسبت به روش حمام ایجاد می‌کند اما با بکارگیری واکسیناسیون یادآور در روش حمام می‌توان به همان کارآیی رسید.

واژه‌های کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، کارایی واکسن، استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس، آنتی‌بادی

مقدمه

نقش آبزی‌پروری در تامین پروتئین مورد نیاز جمعیت در حال توسعه جهان بسیار چشمگیر است و فائو از این صنعت به عنوان مناسب‌ترین گزینه برای تامین پروتئین ارزان برای جمعیت آینده جهان یاد کرده است (FAO,۲۰۲۰). امروزه ماهی و سایر آبزیان

*نویسنده مسئول: siamak.yousefi1@gmail.com

از منظر توسعه پایدار مورد توجه قرار دارد و از آبزی پروری می‌توان به عنوان عاملی که می‌تواند موجب توسعه اقتصادی و اجتماعی یک کشور شود نام برد. ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (Rainbow trout) جزء خانواده آزادماهیان (Salmonidae) است (یوسفی سیاه کلرودی و همکاران، ۱۴۰۲). بنابر آمار منتشر شده سازمان شیلات ایران پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در ۳۰ استان کشور انجام می پذیرد میزان پرورش این ماهی از ۱۶۳۳۲۵ تن در سال ۱۳۹۵ به ۲۰۸ هزار تن در سال ۱۴۰۱رسیده است (سالنامه آمار شیلات ایران، ۱۴۰۲). استرپتوکوکوزیس بیماری سیستمیک در ماهیان دریایی، لب شور و آب شیرین از جمله مارماهی، باس دریایی، تیلاپیا، ماهی دم زرد و قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد، این بیماری امروزه به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در آبزی‌پروری شناخته شده است (Agnew و Barnes، ۲۰۰۷؛ Austin و Austin، ۲۰۰۷). زیان اقتصادی ناشی از استرپتوکوکوزیس در جهان ۱۰۰ میلیون دلار برآورد شده است (Shoemaker و همکاران، ۲۰۱۰). پیشرفت این بیماری در ماهی تا حدی متغیر بوده و بستگی به حدت سویه جداسازی شده، میزبان مبتلا، مسیر ابتلا به بیماری، سن ماهی و دیگر فاکتور های محیطی و کیفیت آب دارد. علائم کلینیکی می‌تواند شامل چند یا تمام علائم زیر باشد: اگزوفتالمی (که ممکن است دو طرفه باشد)، کدورت قرنیه، سیاه شدن غیرطبیعی رنگ ماهی، بی‌حالی، عدم تعادل، شنای نامنظم، جمود نعشی، انحرافات اسکلتی، بی‌اشتهایی و لاغری می‌باشد ؛ خون‌ریزی، تشکیل آبسه مغزی، نکروز و تورم کلیه، طحال و مغز، پریکاردیت و نکروز هیالین در کلیه نیز ممکن است مشاهده شود (Ghittino و همکاران، ۱۹۹۵). از گذشته تاکنون برای درمان استرپتوکوکوزیس از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می شده است البته زیاده‌روی در استفاده از این داروها می‌تواند موجب مقاوم شدن باکتری ها در برابر آن ها شود اگر چه برخی از این داروها در شرایط آزمایشگاهی موجب از بین بردن باکتری‌ها می‌شوند اما در شرایط مزرعه فاقد تاثیر بوده‌اند. علت این پدیده احتمالاً به‌خاطر بی‌اشتهایی ماهی‌ها و عدم مصرف دارو توسط آن‌ها و همچنین وجود سویه‌های مقاوم باکتری است(Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۲)، ولی تمایل به حذف آنتی‌بیوتیک‌ها درآبزی‌پروری به‌علت هزینه بالا، ایجاد مقاومت‌های دارویی، مشکلات زیست‌محیطی، پایین آوردن کیفیت گوشت و مشکلات اجرایی تجویز، باعث شده واکسیناسیون به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها، بیشتر مورد توجه قرار گیرند (Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۲). نکته حائز اهمیت این که واکسن‌ها با عث حفاظت میزبان بر علیه پاتوژن و عوامل بیماری‌زایی خاص می‌شوند که می‌توان با تست چالش مورد ارزیابی دقیق قرار گیرند. واکسیناسیون در ماهیان به بیش از ۵۰ سال پیش بر می‌گردد (Fajardo و همکاران ،۲۰۲۲). در مجموع می توان گفت که واکسیناسیون قادر به کاهش خسارات ناشی از بیماری‌های متعدد منجر شده و بسیار مفید است، واکسن‌های آبزیان عمدتاً به‌صورت کشته شده و غیرفعال و از طریق روش های غوطه‌وری یا تزریق بکار گرفته می شوند. واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته به‌دلیل تحریک بیش‌تر سیستم ایمنی می‌توانند مؤثرتر باشند و پاسخ آنتی‌بادی قوی‌تری را القا کنند (Sneeringer و همکاران، ۲۰۱۹؛ Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۲). سالانه میلیون‌ها ماهی واکسینه می‌شوند به‌عنوان مثال، از زمان معرفی واکسن‌ها در نروژ، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش ماهی قزل‌آلا کاهش چشمگیری داشته است (Rodger, 2016) و واکسیناسیون به عنوان مقرون به صرفه‌ترین و پایدارترین روش کنترل بیماری های عفونی ماهی

تبدیل شده است. مطالعات گوناگونی درخصوص اثر مثبت واکسیناسیون برتولید پاتن، افزایش شاخص های خونی و ایمنی و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر باکتری *S. iniae* و *L. garvieae*، استرس‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا انجام شده است (نمرودی و همکاران، ۱۴۰۲؛ علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۹؛ خاج و همکاران، ۱۳۹۶؛ فقانی و همکاران، ۱۳۸۸؛ پورمظفر و همکاران، ۱۳۹۴). در بررسی حاضر وضعیت عملکرد واکسن دوگانه استرپتوکوکوس اینیایی / الکتوکوکوس گارویه در روش‌های مختلف واکسیناسیون بر بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی نمونه‌ها: برای انجام آزمایش تعداد ۳۵۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی ۱±۱۰ گرم در نظر گرفته شدند. ماهیان ابتدا در یک مخزن فایبر گلاس ۵۰۰ لیتری با حجم آب حدود ۴۲۰ لیتر برای مدت یک هفته جدا سازی و نگه‌داری شدند و پس از یک هفته ماهیان در ۱۴ تراف و مخزن ۲۰۰ لیتری تقسیم شده و به منظور سازگاری با شرایط آزمایش به مدت یک هفته و پس از تیماربندی نیز به‌مدت ۶ هفته مورد پرورش قرار گرفتند. در این دوره ماهیان ۴ بار در روز غذادهی صورت گرفت. هر مخزن با استفاده از یک سنگ هوا، هوادهی شد. سیستم خروجی آن‌ها طوری طراحی گردید که حجم و ارتفاع آب در تمام مخازن یکسان و قابل کنترل بود. هر روز ۵۰ درصد آب مورد استفاده نیز تعویض می‌شد. زیست سنجی طول و وزن ماهیان در روزهای شروع آزمایش و پایان آزمایش صورت گرفت. برای تأمین منبع آب شیرین مورد نیاز تحقیق از آب‌چاه پس از طی مراحل فیلتراسیون استفاده شد. مخازن در محیط سرپوشیده سوله در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان قرار داشتند و به صورت کاملاً تصادفی بین تیمارها تقسیم شدند. دوره نوری در زمان انجام تحقیق به صورت طبیعی استفاده گردید و بین ۱۲-۱۰ ساعت روشنایی و ۱۲- ۱۰ ساعت تاریکی متغیر بود. ماهیان جهت آزمایش به قرار زیر تیماربندی شدند:

۱- تیمار ایمن شده با واکسن دو گانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک به‌روش حمام یک مرحله‌ای
۲- تیمار ایمن شده با روش حمام واکسن دو گانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک دو مرحله‌ای
۳- تیمار ایمن شده با واکسن دو گانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک به‌روش حمام دو مرحله‌ای هایپراسموتیک
۴- تیمار ایمن شده با روش تزریق یک مرحله‌ای واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گاروواک
۵- تیمار شاهد، بدون استفاده از واکسن

واکسن مورد استفاده در این بررسی واکسن دوگانه استرپتوکوکوس اینیایی/لاکتوکوکوس گارویه (گاروواک) ساخت شرکت بوژان تک فارمد بود. این واکسن به صورت سوسپانسیون باکتری غیرفعال بوده براساس دستورالعمل شرکت تولید کننده، واکسن به‌میزان ۰/۱ با آب پرورش رقیق شده (یک لیتر واکسن در ۹ لیتر آب) و به مدت ۳ دقیقه برای روش حمام مورد استفاده قرار گرفت. برای گروه واکسیناسیون به‌روش هایپراسمتیک + واکسیناسیون در ابتدا ماهیان هر تیمار به مدت ۱۰ دقیقه در محیط آب نمک ۱۵ گرم/ لیتر قرار داده شده و بلافاصله بعد از آن واکسیناسیون به‌روش حمام صورت گرفت. در روش واکسیناسیون به روش تزریق نیز ماهیان، ۰/۱ سی سی از واکسن را به‌روش تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند. در این روش در ابتدا ماهیان با ۱۰۰ میلی‌گرم/

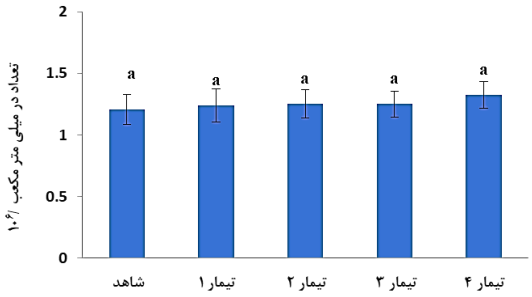
لیتر یوجینول بیهوش شده و ۰/۱ سی‌سی از واکسن با کمک سرنگ و سر سوزن انسولینی به ماهیان تزریق گردید. در ماهیان گروه واکسیناسیون دو مرحله‌ای ۲۱ روز پس از مرحله اول، واکسیناسیون با کیفیت یاد شده تکرار گردید. چهار هفته بعد از مرحله دوم واکسیناسیون خونگیری از ماهیان (۱۲ ماهی از هر تیمار) صورت گرفت. به این منظور ماهیان با غلظت ۱۰۰(mg/l) محلول یوجینول بیهوش شده و خونگیری با سرسوزن گیج ۲۵ از ساقه دمی صورت گرفت. نمونه‌های خون در میکروتیوپ‌های فاقد ماده ضد انعقاد قرار گرفتند. سرم خون قسمتی از نمونه‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm) جدا شده و توسط سمپلر به میکروتیوپ‌های جدید منتقل شد. برای سنجش تیتر آنتی‌بادی از روش میکروآگلوتیناسیون استفاده شد (Swain و همکاران، ۲۰۰۷). ایمنوگلوبولین کل حاصل از اختلاف میزان پروتئین سرم قبل و بعد از ته‌نشینی با پلی‌اتیلن‌گلیکول به روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) مشخص شد. تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با استفاده از لام نئوبار و محلول رقیق‌کننده دایس انجام شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید پس از تهیه لام و رنگ‌آمیزی با گیمسا انجام شد (Blaxhall و Daisley، ۱۹۷۳). هماتوکریت با استفاده از روش میکروهماتوکریت و سانتریفیوژ و هموگلوبین با استفاده از کیت تجاری زیست شیمی اندازه‌گیری گردید. حجم متوسط گلبول قرمز(MCV)، هموگلوبین متوسط گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) براساس فرمول‌های ارائه شده توسط Blaxhall و Daisley (۱۹۷۳) محاسبه شد.

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov انجام شد. سپس از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) جهت تحلیل داده‌ها و اختلاف بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن (Duncan) بررسی شد. برای آنالیز آماری نتایج این پژوهش، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و سطح خطای ۰/۰۵ استفاده شد. هم‌چنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۹ استفاده گردید (منصورفر، ۱۳۹۱).

نتایج

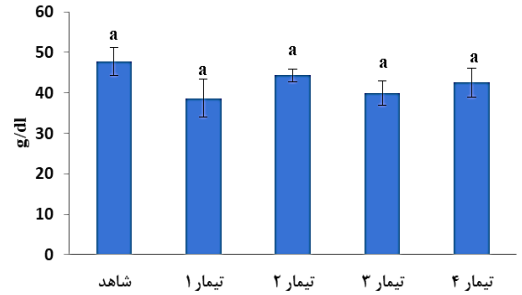
بررسی مقایسه آماری نمونه‌ها: نتایج نشان داد که تعداد گلبول های قرمز خون (RBC) در تیمار های مختلف ماهیان واکسینه شده با روش‌های مختلف با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱). این نتیجه درخصوص میزان هموگلوبین نیز تکرار گردید هرچند میانگین هموگلوبین در تیمار ۱ اندکی پایین‌تر از سایر تیمارها بود و بیش‌ترین میزان هموگلوبین متعلق به گروه شاهد بود (شکل ۲).

مقایسه میزان هماتوکریت خون (Hct) نشان داد که کلیه تیمارهای واکسینه اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد دارند و دو تیمار ۲ و ۴ (واکیسنه شده به‌روش غوطه‌وری دو مرحله‌ای و تزریق صفاقی یک مرحله‌ای) دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها و شاهد دارند کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار هماتوکریت به‌ترتیب متعلق به تیمار ۱ (تیمار غوطه‌وری یک مرحله‌ای) و گروه شاهد بود (شکل ۳). هم‌چنین بررسی تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) نشان داد که کلیه تیمارهای ماهیان واکسینه شده با روش‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد دارند (شکل ۴). بالاترین میزان گلبول‌های سفید توسط تیمارهای ۲ و ۴ (ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار تزریق صفاقی یک مرحله‌ای) ثبت شد. از سویی کم‌ترین میزان WBC متعلق به تیمار شاهد بود.



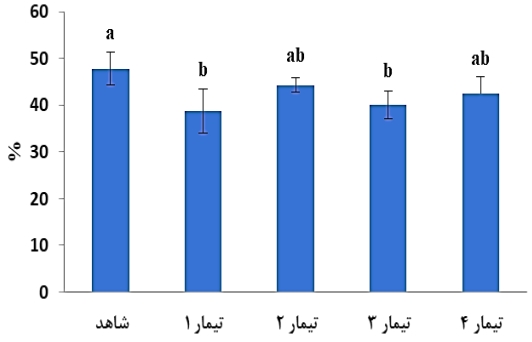
شکل ۱- مقایسه تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در تیمارهای مختلف ماهیان واکسینه با تیمار شاهد

(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳: گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای)



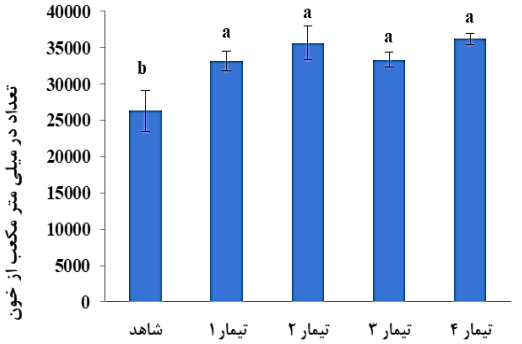
شکل ۲- مقایسه میزان هموگلوبین خون (Hb) درگروه‌های مختلف ماهیان واکسینه

(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳: گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای)



شکل ۳- مقایسه میزان هماتوکریت (Hct) تیمارهای واکسینه و تیمار شاهد

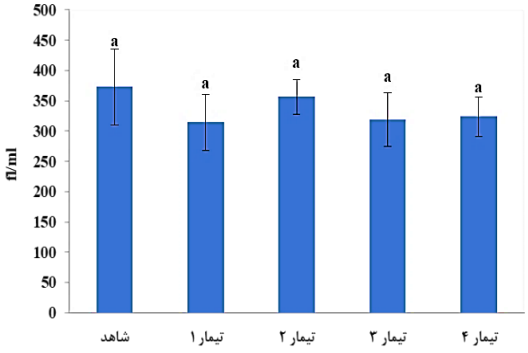
(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳: گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای)



شکل ۴- مقایسه میزان گلبول‌های سفید (WBC) تیمارهای واکسینه و تیمار شاهد

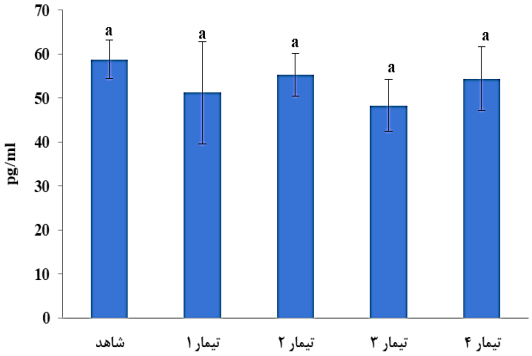
(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به روش حمام، تیمار ۲:ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به روش حمام ، تیمار ۳:گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک + واکسینه دو مرحله ای به روش حمام وتیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به روش تزریق یک مرحله‌ای)

مقایسه مقادیر MCV، MCHC و MCH نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین مقادیر این شاخص ها در تیمارهای مورد آزمایش با گروه شاهد وجود ندارد (شکل‌های ۵، ۶و۷). بالاترین میزان MCV و MCH متعلق به گروه شاهد بود. اما درخصوص شاخص MCHC بیش‌ترین مقدار در تیمار ۱ (گروه شاهد) ثبت گردید.



شکل ۵ مقایسه میزان MCV تیمارهای واکسینه و تیمار شاهد

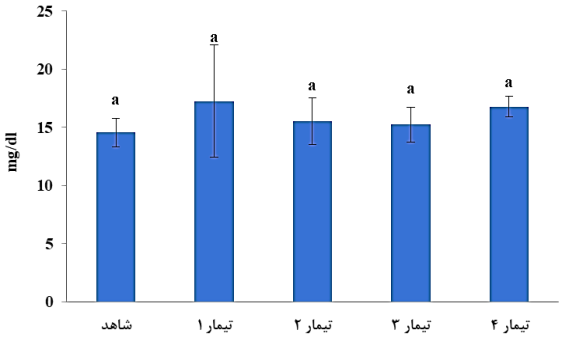
(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳:گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای)



شکل ۶- مقایسه میزان MCH تیمارهای واکسینه و تیمار شاهد

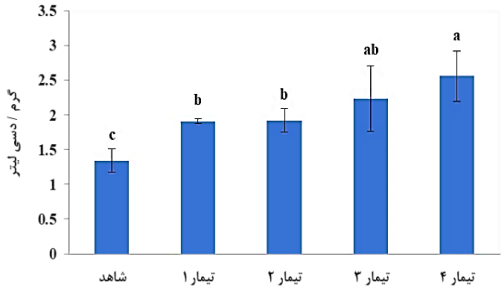
(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳:گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک + واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای)

ایمنوگلوبولین: در این بررسی مقادیر ایمنوگولوبولین سرم در تمامی ماهیان واکسینه شده بالاتر از گروه شاهد بود و هم‌چنین بالاترین مقادیر سرمی در گروه تزریق و ماهیان واکسینه شده دومرحله‌ای محیط هایپراسموتیک+ واکسن اندازه‌گیری و ثبت گردید (شکل ۸).



شکل ۷- مقایسه میزان MCHC تیمارهای واکسینه و تیمار شاهد

(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳: گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای)

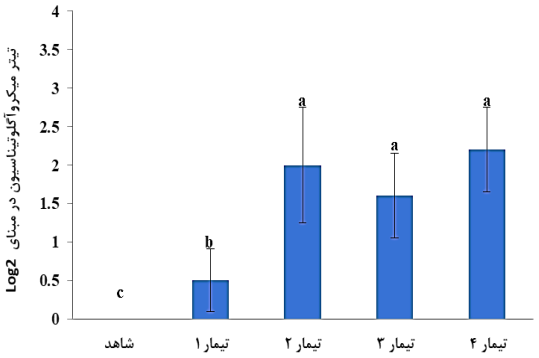


شکل ۸- مقایسه مقادیر ایمنوگلوبولین کل تمارهای واکسینه و گروه شاهد

(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳: گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌وش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به-روش تزریق یک مرحله‌ای)

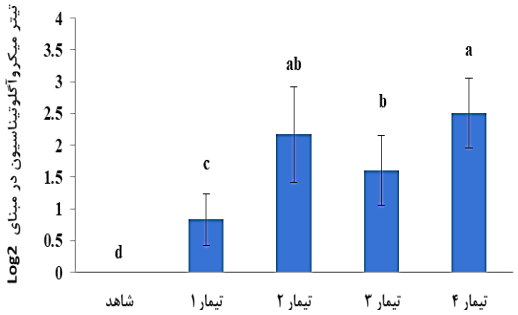
تیتر آنتی بادی: همان‌گونه که در شکل های ۹ و ۱۰ مشاهده می‌شود در تمامی ماهیان واکسینه شده آگلوتیناسیون باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گاروریه مشاهده شد، در عین حال هیچ

تیتری در ماهیان گروه شاهد برای دو باکتری یاد شده ثبت نگردید بر اساس این نتایج در تمام ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای، ماهیان واکسینه شده در محیط هایپراسموتیک + حمام دو مرحله‌ای و ماهیان واکسینه شده به روش تزریق تیتر آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر از ماهیان گروه واکسینه شده به‌روش حمام یک مرحله‌ای برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (شکل۹) و باکتری لاکتوکوکوس گارویه (شکل۱۰) اندازه‌گیری شد ($P\leq$ ۰/۰۵). در این بررسی تیتر آنتی‌بادی باکتری‌های یاد شده برای ماهیان گروه‌های واکسینه حمام دو مرحله‌ای و گروه تزریق اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>$ ۰/۰۵).



شکل ۹- مقایسه تیتر آنتی‌بادی تیمارهای واکسینه شده و گروه شاهد در برابر باکتری *Lactococcus garvie*

(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳: گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله-ای)



شکل ۱۰- مقایسه تیتر آنتی‌بادی تیمارهای واکسینه با گروه شاهد در برابر باکتری *Streptococcus iniae*

(تیمار ۱: گروه ماهیان یک مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۲: ماهیان دو مرحله‌ای واکسیناسیون به‌روش حمام، تیمار ۳: گروه ماهیان واکسینه محیط هایپراسموتیک+ واکسینه دو مرحله‌ای به‌روش حمام و تیمار ۴: ماهیان گروه واکسیناسیون به‌روش تزریق یک مرحله‌ای)

بحث

واکسیناسیون یکی از اقتصادی‌ترین راه‌های کنترل بیماری در ماهیان است درمان آبزیان در بسیاری از موارد خسارات متعددی به محیط زیست و سلامت مصرف‌کنندگان وارد می‌سازد(Bowald و Dalmo، ۲۰۱۹). واکسن‌های غیر فعال شده عمدتاً براساس پاتوژن کشته شده و یا استخراج قسمت‌هایی از عامل پاتوژن که سیستم ایمنی ماهیان را فعال نماید پایه‌گذاری شده است در بسیاری از موارد واکسن‌های تزریقی کارآیی بیش‌تری دارند اما بنابه سختی کار و مشکلات استفاده از این روش، واکسن‌های مورد استفاده به‌روش حمام اقبال بیش‌تری دارند (Bowald و Dalmo، ۲۰۱۹). برای افزایش دریافت واکسن در روش حمام روش‌های مختلفی به‌کارگرفته شده است از جمله استفاده از محیط هایپراسموتیک و سپس انجام واکسیناسیون (Gao و همکاران، ۲۰۱۶) و یا استفاده از ادجوانت‌های مختلف که جذب واکسن را افزایش دهند و (Ji و همکاران، ۲۰۱۹).

در بررسی حاضر براساس نتایج به‌دست آمده تمامی گروه‌های واکسینه شده برای هر دو گونه استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه آنتی‌بادی تولید شده است و همان‌گونه که پیش‌بینی می‌شد در ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای ساده و نیز واکسن+ محیط هایپرا سموتیک

در مقایسه با ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای تیتر آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر اندازه‌گیری شد و تیتری برابر با واکسن تزریقی یک مرحله‌ای ثبت شد در این مطالعه زمان نمونه‌برداری برای ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دومرحله‌ای ۲۱ روز پس از آخرین واکسیناسیون انجام شد درحالی‌که نمونه‌برداری برای روش تزریقی یک مرحله‌ای ۴۲ روز بعد از تزریق بود گویای این موضوع می‌تواند باشد که اگرچه واکسیناسیون به‌روش حمام کارآیی روش تزریق را ندارد اما با به‌کارگیری واکسیناسیون یادآور می‌توان به همان کارآیی رسید. البته با این‌که تیر آنتی‌بادی علیه استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه به‌طور ظاهری بالاتر ثبت شده ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نشد ($P>0/05$). در مجموع می‌توان به‌کارگیری محیط هایپرا سموتیک برای واکسینا سیون به‌روش حمام را مناسب‌تر در نظر گرفت. در بررسی علیشاهی و همکاران (۱۳۹۹) اثرات واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/ لاکتوکوکوس در سه روش تزریقی، خوراکی و حمام بالاترین میزان ایمنی مربوط به‌روش تزریقی و سپس به‌ترتیب برای روش حمام و خوراکی ثبت گردید در مطالعه مذکور اگرچه عیار آنتی‌بادی در ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام و خوراکی اختلاف معنی‌دار نداشت اما در مواجهه میزان تلفات ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام بالاتر از ماهیان واکسینه شده به‌روش خوراکی بود (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۹). در بررسی کرمی و همکاران (۱۳۹۷) در ماهیانی که با واکسن دوگانه استرپتوکوکوس/ لاکتوکوکوس به‌صورت تزریقی واکسینه شده بودند در روز ۱۴ پس از تزریق تا روز ۶۰ اختلاف معنی‌داری در تیتر آنتی بادی سرمی برای دو باکتری مذکور مشاهده نشد (کرمی و همکاران، ۱۳۹۷). اما در بررسی حاضر برای واکسیناسیون به‌روش حمام تیتر آنتی‌بادی برای ماهیانی که یک‌بار واکسینه شده بودند به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از ماهیان واکسینه شده به‌روش تزریق بود اما با به کارگیری واکسن یادآور، تیتر آنتی‌بادی برای باکتری‌های یاد شده با ماهیان گروه تزریق اختلاف معنی‌دار نداشت. در بررسی دیگری کارآیی واکسن یرسینیا راکری به‌طور معنی‌داری با به‌کارگیری محیط هایپر اسموتیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش داشت به‌طوری‌که میزان تلفات بچه‌ماهیان در مواجهه با باکتری یرسینیا راکری در گروه هایپراسموتیک + واکسن پایین‌ترین میزان ثبت شده بود هر چند این اختلاف در تیتر آنتی‌بادی برای باکتری مذکور در تیمارهای یاد شده اختلاف معنی‌داری نداشت (مازندرانی و همکاران، ۱۴۰۱).

نتایج مطالعه اخیر نشان داد که تجویز واکسن غوطه‌وری گارووا‌ک بر علیه بیماری استرپتوکوکوزیس توانسته است در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۱۰ گرم، منجر به تغییراتی در برخی از شاخص‌های خونی گردد. به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز خون بین تیمارها با شاهد مشاهده نشد. درخصوص میزان هموگلوبین خون، بین تیمارها با گروه شاهد نیز چنین نتیجه‌ای مشاهده گردید هرچند در خصوص این فاکتور خونی، کاهشی در تیمارهای واکسینه شده مشاهده شد ولی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای واکسینه شده و تیمار شاهد وجود نداشت. درصد هماتوکریت خون (Hct) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای واکسینه شده با روش‌های مختلف (حمام یک مرحله‌ای، حمام دو مرحله‌ای و روش حمام دومرحله‌ای+ هایپراسموتیک و تزریق یک مرحله‌ای) وجود دارد. اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای حمام دومرحله‌ای با تزریق واکسن یک مرحله‌ای مشاهده نگردید. هم‌چنین اختلاف معنی‌داری در درصد هماتوکریت خون ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام یک مرحله‌ای و حمام دومرحله‌ای + هایپراسموتیک مشاهده نشد.

نتایج بررسی تعدادگلبول‌های سفید خون (WBC) بین تیمارها و گروه شاهد نشان داد که کلیه تیمارهای واکسینه شده اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. از سویی در تحقیق حاضر اختلاف معنی‌داری در فاکتورهای خونیMCV، MCH و MCHC بین تیمارها و شاهد مشاهده نگردید. در تحقیق مشابه این پژوهش بررسی فاکتورهای خونی ماهی تیلاپیای(*Oreochromis niloticus*) واکسینه شده با چالش باکتریایی *Aeromonas hydrophila* نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز ماهیان آلوده به باکتری فوق تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند (Monir و همکاران، ۲۰۲۰؛ Baione همکاران، ۲۰۱۰). بر طبق نظر Haney و همکاران (۱۹۹۲) کاهش تعداد اریتروسیت‌ها و غلظت هموگلوبین خون ممکن است به‌دلایل باکتریایی رخ دهد. کاهش در صد هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز ممکن است به‌دلیل فعالیت تخریب لوکوسیت‌ها باشد. نتایج مشابهی در افزایش تعداد ترمبوسیت‌ها، لوکوسیت‌ها و درصد هماتوکریت پس از چالش باکتریایی .*Enterococcus* sp بر روی ماهی تیلاپیا رخ داد. در مقابل، کاهش اریتروسیت‌ها به‌دلیل القاء ناکافی برای تغییرات خونی و خون‌سازی می‌باشد (Martins و همکاران،۲۰۰۸). از سوی دیگر، افزایش تعداد گلبول‌های سفید ماهیان واکسینه شده (تزریقی و حمام دومرحله‌ای +اسمزیته) تایید اقدام و واکنش سیستم ایمنی ماهی می‌باشد (Baione و همکاران، ۲۰۱۰).

بررسی پاسخ فاکتورهای خونی و ایمنی واکسن دوگانه خوراکی علیه استروپتوکوکوزیس و ایروموناس هیدروفیلا در هیبرید تیلاپیای قرمز (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) نشان داد که تعداد لکوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها در گروه واکسینه به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه واکسینه نشده افزایش یافته است که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. تعداد گلبول های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت در تحقیق فوق تنها پس از ۹۶ ساعت از واکسیناسیون افزایش یافت. اختلاف معنی‌داری در میزان MCH و MCHC و بین تیمارهای واکسینه شده و گروه شاهد مشاهده نشد (Monir و همکاران، ۲۰۲۰).

در مطالعه دیگری، استفاده واکسن‌ها در کنترل باکتری بیماری‌زای ماهی (*Vibrio anuiliticus*) مورد بررسی قرار گرفت که در آن، از دو نوع واکسن (باکتری‌های کشته شده با فرمالین و واکسن باکتری کشته شده با گرما) به‌صورت تزریقی برای ماهی سیم دریایی استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز پس از سه ماه از شروع مرحله واکسیناسیون در مقایسه گروه شاهد افزایش داشته است، دلیل آن را افزایش فعالیت تولید گلبول‌های قرمز که موجب ایجاد ایمنی غیراختصاصی در ماهیان می‌شود بیان کردند (Bahnasawy و همکاران 2019). داده‌های فوق الذکر با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی نداشت. June و همکاران (۲۰۱۶) افزایش معنی‌داری در هماتوکریت ماهیان سی‌بریم واکسینه شده مشاهده نکردند که با نتایج تحقیق اخیر در مورد درصد هماتوکریت پس از واکسیناسیون مغایرت دارد اما با میزان هموگلوبین مطابقت داشت.

ایمنی‌زایی واکسن دوگانه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* توسط کرمی و همکاران (۱۳۹۶) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیق ایشان نشان دادکه شاخص‌های خونی نظیر تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در تیمارهای واکسینه شده اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند که با داده‌های تحقیق اخیر مطابقت دارد. از سویی نتایج تحقیق کرمی و همکاران (۱۳۹۶) در خصوص افزایش معنی‌دار تعداد گلبول های سفید خون در ماهیان

واکسینه با گروه شاهد منطبق با نتیجه تحقیق حاضر می‌باشد که دلیل آن افزایش قدرت فاگوسایتوزیس لکوسیت‌ها پس از واکسیناسیون است. با توجه به عدم تغییر شاخص‌های خونی در تحقیق فوق و نیز مطالعات مشابه می‌توان نتیجه گرفت که شاخص‌های خونی مربوط به گلبول‌های قرمز تحت تاثیر ایمن‌سازی قرار نگرفته و احتمالاً ایمن‌سازی در مراحل هماتوپوئیتیک خون‌سازی بافت‌های خون‌ساز و هم‌چنین طول عمر گلبول‌های قرمز نقشی ندارند و عوامل دیگر به‌ویژه محرک‌های ایمنی بر این شاخص‌ها موثرند.

نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر براساس نتایج تمامی گروه‌های واکسینه شده برای هر دو گونه استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه آنتی‌بادی تولید شده است. در ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دو مرحله‌ای ساده و نیز واکسن+ محیط هایپراسموتیک در مقایسه با ماهیان واکسینه شده یک مرحله‌ای تیتر آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری بالاتر اندازه‌گیری شد و تیتری برابر با واکسن تزریقی یک مرحله‌ای ثبت شد. در این مطالعه زمان نمونه‌برداری برای ماهیان واکسینه شده به‌روش حمام دومرحله‌ای ۲۱ روز پس از آخرین واکسیناسیون انجام شد درحالی‌که نمونه‌برداری برای روش تزریقی یک مرحله‌ای ۴۲ روز بعد از تزریق بود. این موضوع می‌تواند گویای آن باشد که اگرچه واکسیناسیون به‌روش حمام کارآیی روش تزریق را ندارد اما با به‌کارگیری واکسیناسیون یادآور می‌توان به همان کارآیی رسید.

منابع

Agnew, W., Barnes, A.C., 2007. Streptococcus iniae: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Veterinary Microbiology 122, 1-15.

Alishahi, M., Halimi, M., Gurbanpour, M., Tabandeh, M.R., 2019. The effect of three methods of streptococcosis/lactococcosis double bacterin administration on specific immunity and expression of IL-6 and IgM genes in rainbow trout. Aquatic Physiology and Biotechnology 1, 123-146.

Austin, B., Austin D.A., 2007. Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish. Springer-Praxis, Praxis Publishing, Ltd. Chichester, UK. Fourth ed. pp. 238-386.

Bahnasawy, M., El-Bakry, K., El-Safy, M. and El-Borsh, D., 2019. Use of vaccines in controlling bacteria fish diseases caused by *Vibrio anuiliticus*, African Journal of Biological Sciences 1, 87-100.

Bailone, RL., Martins, ML., Mourino, JLP., Vieira, FN., Pedrotti, FS., Nunes, GC., Silva, BC., 2010. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Archivos de Medicina Veterinaria 3, 221-227. http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000300015

Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. Fish Biology Banner 5 (6), 771-781.

Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2019. Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. Microorganisms. 12. 627. DOI: 10/3390/microorganisms712062.

Faghani, T., Azari-Takami, Q., Gheazi, M., Faghani, S., Ahmadifar, A., 2018. Evaluation of the effect of ergosan and anti-streptococci vaccine on the blood parameters of rainbow trout. Tehran University Fisheries Journal 2, 61-71.

FAO., 2022. The state of world fisheries and aquaculture, Rome. 236 p.

Gao, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W., 2016. Antigen uptake and expression of antigen presentation-related immune genes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination with

an inactivated *Edwardsiella tarda* immersion vaccine, following hyperosmotic treatment. Fish and Shellfish Immunology 55, 274-280.

Ghittino, C., Eldar, A., Prearo, M., Bozzetta, E., Livvof, A., Bercovier, H., 1995. September. Comparative pathology and experimental vaccination in diseased rainbow trout infected by *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*. In Diseases of fish and shellfish. Eur. Ass. Fish Pathol., VII Int Conf, Palma de Malloraca. 27 p.

Haney, D.C., Hursh, D.A., Mix, M.C., Winton, J.R., 1992. Physiological and hematological changes in chum salmon artificially infected with erythrocytic necrosis virus. Journal of Aquatic Animail Health 4, 48-57.

Harikrishnan, R., Kim, J.S., Kim, M.C., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2012. Pomegranante enriched diet enhances the hematology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Philasterides dicentrachi*. Veterinary Prasitology (1-2), 147-159

Ji, J., Torrealba, D., Thwaite, R., Gomez, A.C., Parra, D., Roher, N., 2019. Nanostructured TNF alpha protein targets the zebrafish (*Danio rerio*) immune system through mucosal surfaces and improves the survival after *Mycobacterium marinum* lethal infection. Aquaculture 510, 138-149.

Karmi, A., Alishahi, M., Gurbanpour, M., Tabandeh, M., Mohammadian, T., 2017. Investigation of the serum antibody response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to streptococcosis/lactococcosis dual vaccine. Scientific Journal of Iranian Fisheries 1, 1-8.

Khaj, H., Misbah, M., Tabandeh, M.R., Mohammadian, T., Dadar, M., 2016. Comparison of the effect of Iranian double streptococcosis vaccine (*Lactococcus garvieae* / *Streptococcus iniae*) and foreign vaccine on growth and immunity indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Veterinary Journal 4, 28-42.

Mansourfar, K., 1391. Advanced statistical methods with computer programs, Tehran University Press. 460 p.

Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Amaral, G.V, Vieira, F.N., Dotta, G., Bezerra, A.J.M., Pedrotti, F.S., Jerônimo, G.T., Buglione-Neto, C.C., G Pereira, Jr., 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with Enterococcus sp. Brazilian Journal of Biology 68, 631-637.

Mazandarani, M., Hosseini-Far, S.H., Reza Qoli-Tabar, Z., Soudager, M., Safari, R., 2022 Evaluation of anti-yersin vaccine performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Journal of Exploitation and Aquaculture 2, 37-48.

Pourmozaffar, S., Soltani, M., Nafisi Behbabadi, M., Mohajeri, J., Mohammadi, M., Shun, Kh., 2014. Investigating the effect of macroguard on the effectiveness of the vaccine against streptococcosis (*Streptococcus iniae*) and some blood and growth indicators of rainbow trout. Iranian Veterinary Journal 2, 44-53.

Rodger, H.D., 2016. Fish disease causing economic impact in global aquaculture. In Fish vaccines Springer, Basel, pp: 1-34. DOI: 978-3-0348-0980-1/10/1007_1.

Shoemaker, C.A., Klesius P.H., Evans, J.J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. Amerrican Journal of Veterinary Research 62, 174-177.

Siwicki A.K., Anderson D.P., 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. Olsztyn, Poland. pp. 105-111.

Sneeringer, S., Bowman, M., Clancy, M., 2019. The US and EU animal pharmaceutical industries in the age of antibiotic resistance. Economic Research Report No. (ERR-264) 76 pp.

Statistical Yearbook of Iranian Fisheries. 1402. Statistical Yearbook of Iran Fisheries Organization. Iranian Fisheries Organization. Vice President of Planning and Resource Management. Planning and Budget Office 29 p.

Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K., Meher, N., Sarangi, A., 2006. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology 22, 38-43.

Yousefi Siah-Klorodi, S., Behfar, Z.S., Yousefi Siah-Klorodi, M. and Mohabi Derakhsh, P. 1402. Basics of Zoology. Green Wave Publications. Tehran. 213 p.

Journal of New Technologies in Aquaculture Development
Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Vol. 17, No. 3, Autumn 2023

The effects of anti-streptococci vaccine by bath method on some blood parameters of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*

S. Yousefi Siahkalroodi[1*], M. Mazandarani[2], R. Abdolyameh Habib[3], P. Mohebi Derakhsh[4], M. Yousefi Siahkalroodi[5]

[1] Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran
[2] Department of Fisheries, Faculty of Environment and Fisheries, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran
[3] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4] Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization (AREEO), Tehran, Iran
[5] Faculty of Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Vaccination has become the most cost-effective and sustainable method of controlling infectious fish diseases. This research was conducted with the aim of the effects of anti-streptococci vaccine by bath method on some blood parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In this research, the effects of anti-streptococci vaccine by bath method on some biochemical parameters of blood serum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were investigated. For this purpose, 400 to 500 fish with an average weight of 10 grams were divided into 14 tanks and were reared for 10 to 14 days to adapt to the environmental conditions. Treatment with 10 grams of weight immunized with the trivalent vaccine of streptococcosis and lactococcosis Garovak by one-step bath method, treatment of 10 grams of weight immunized with the bath method of trivalent vaccine of streptococcosis and lactococcosis Garovak two-step, treatment with weight of 10 grams immunized With the trivalent vaccine of streptococcosis and lactococcosis Garovak by the two-step hyperosmotic bath method, the treatment with 10 grams of weight immunized with the one-step injection method of the trivalent vaccine of streptococcosis and lactococcosis Garovak and the unvaccinated control treatment were considered. The effects of the vaccine on the blood factors of rainbow trout were also evaluated. The results showed that the number of red blood cells, blood hemoglobin level, MCV, MCH, MCHC in the vaccinated treatments by the mentioned methods were not significantly different from the control group. But the percentage of blood hematocrit in the treatments There was a significant difference with the control group. Vaccination of fish increased the number of white blood cells in the vaccinated treatments compared to the control group. In this study, based on the results of all the vaccinated groups, antibodies have been produced for both *Streptococcus iniani* and *Lactococcus garvey* species in the fishes vaccinated with a simple two-step bath method and vaccine + hyperosmotic medium compared to the one-step vaccinated fishes. was measured significantly higher and the same titer was recorded as the one-step injection vaccine. In this study, the sampling time for fish vaccinated by the two-step bath method was 21 days after the last vaccination, while the sampling for the one-step injection method was 42 days later. From the injection, it can be said that although the bath vaccination is not as effective as the injection method, the same effectiveness can be achieved by using booster vaccination.

***Keywords*:** Antibody, Streptococcosis, Lactococcosis, Vaccine efficiency, Rainbow trout

*Corresponding author; siamak.yousefi1@gmail.com