استفاده از Multiplex PCR جهت تشخیص کوکسی های گرم مثبت ایجاد کننده بیماری در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) ایلام

سعیده حیدری نژاد[1]*، نگین سلامات[2]، فاضل پوراحمد[3]

(تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۳/۲۶تاریخ پذیرش۱۳۹۶/۵/۲۷)

چکیده:

در پنج سال اخیر بیماری مشکوک بهstreptococosis در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان شهر ایلام به صورت اپیدمی شایع شد. در مطالعه حاضر، ۶۰ قطعه ماهی با علائم بالینی نظیر بی حالی، شنای نامنظم، تیرگی پوست و اگزوفتالمی، از مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان ایلام(جنوب غربی ایران) جمع آوری شد. جهت تشخیص عامل اصلی بیماری، نمونه‌هایی از کبد، کلیه و طحال برداشته و در محیط کشت آگار خوندار (blood agar) در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بر اساس تست های بیوشیمیایی نمونه های جدا شده *Lactococcus garvieae* شناسایی شدند جهت تایید ایزوله‌ها از multiplex PCR و ژن‌های *lctO* ، 16S rRNA و 16S- 23S rRNA که به ترتیب جهت شناسایی *Lactococcus garvieae, Streptococcus iniae* و*Streptococcus dysgalactiae* به کار می رود استفاده شد. در این مطالعه برای غالب ایزوله‌ها باندی به طول bp ۱۱۰۰ تشکیل شد که مربوط به باکتری *L. garvieae* می باشد. بر این اساس می توان نتیجه گرفت که عامل اصلی بروز سپتی سمی *L. garvieae* بوده است. در نتیجه Multiplex PCR روش تشخیصی قطعی جهت شناسایی سریع باکتری به ویژه در عفونت های ترکیبی می باشد.

کلمات کلیدی:*Lactococcus garvieae, Streptococcus iniae* ، قزل آلای رنگین کمان، multiplex pcr، استرپتوکوکوزیس ، کوکسی گرم مثبت.

۱-گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

۲-استادیار گروه بافت شناسی دانشکده علوم اقیانوسی و علوم وفنون دریایی خرمشهر

۳-استادیار دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام

مقدمه:

صنعت آبزی پروری، به طور اجتناب ناپذیری پرورش ماهی را در شرایط متراکم به همراه دارد و به موازات چنین شرایطی، سلامت آبزیان به خطر افتاده و انتشار بیماری‌های عفونی در بین جمعیت های آبزیان به سهولت بیشتری انجام می پذیرد. در سالهای اخیر، صنعت آبزی پروری در ایران با مشکل شیوع بیماری های باکتریایی به مواجه شده است. باکتری های streptococcosisویژه بیماری زا در ماهی به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می شوند بر اساس مطالعات تاکسونومیک شش گونه باکتری گرم مثبت سبب ایجاد بیماری در ماهی می شوند که عبارتند از : *Streptococcus parauberis* (Domenech et al., 1996), *Streptococcus iniae* (Eldar et al., 1995), *Streptococcus difficillise* (Eldar et al., 1994), *Lactococcus piscium* (Williams et al., 1990), *Vagococcus salmoninarum* (Michel et al., 1997), و *Lactococcus garviea* (Eldar et al., 1996)

Lactococcus garviea کوکسی گرم مثبتی است که به عنوان عامل اصلی بیماری لاکتوکوکوزیس در گونه های مختلف ماهی در سراسر جهان هنگامی که دمای آب به بالاتر از ۱۶ $^{\circ}C$ برسد گزارش شده است (Vendrell et al., 2007;Vendrell et al., 2006; Barnes et al., 2002) لاکتوکوکوزیس بیماری اصلی شایع در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تعدادزیادی از کشورها مانند ایتالیا(Ghittino and Prearo., 1992)، استرالیا و آفریقای جنوبی(Carson et al., 1993)، انگلستان(Barak and Mc Gregor, 2001)، پرتغال(Pereira et al., 2004)، فرانسه (Eyngor et al., 2004) و ترکیه (Kav and Evganis., 2008) بوده و سبب بروز خسارات فراوان اقتصادی به مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان از سال ۱۹۷۰شده است (Lincoln and Glasscock., 2001). در ایران این بیماری برای اولین بار در قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران، در شمال ایران در سال ۱۹۹۹گزارش گردید (Ghiasi et al.,2000), پس از آن به صورت پراکنده در استان فارس، در جنوب ایران گزارش گردید.(Akhlagi and Mahjor, 2004).

اخیراً روش های تشخیصی مولکولی مانند واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) برای شناسایی تعدادزیادی از باکتری های بیماری زا در ماهی مانند *Yersinia ruckeri*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *L. garvieae*, *Renibacterium salmoninarum* and *Aeromonas salmonicida* (Gustafson et al., 1992; Miriam et al., 1997; Gibello et al., 1999; Aoki et al., 2000; Blanco et al., 2002)

استفاده می شود. Multiplex PCR یکی از اصلی ترین و مفید ترین روش های شناسایی باکتری های بیماری زا در ماهیان می باشد.(Edwards and Gibbs, 1994) این روش جهت تشخیص سریع پاتوژن های ماهی

بخصوص استرپتوکوک های آب گرم (Mata et al., 2004b) و نیز سه پاتوژن دیگر ماهی *A. salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Y. ruckeri* (Del Cerro et al., 2002) استفاده شده است. از سال ۲۰۰۶، بیماری با علائم کلینیکی مشابه با استرپتوکوکزیس، شامل: شنای نامنظم، تیرگی پوست، اگزوفتالمی و خونریزی در پوست در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان توسط اداره دامپزشکی استان ایلام، گزارش گردید. هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی عامل اصلی بیماری درمزارع پرورشی قزل آلایرنگین کمان در استان ایلام با استفاده از multiplex PCR می باشد.

مواد و روش ها:

۱- نمونه برداری و کشت باکتری

جهت انجام تحقیق حاضر، ۶۰ قطعه ماهی (میانگین وزنی ۲۳±۱۴۱/۴۷ گرم و میانگین طول کل ۶۳ ±۲۰/۰۷ سانتی متر) به طور تصادفی از میان ماهیان دارای نشانه-های بالینی بیماری (اگزوفتالمی، هموراژی در باله ،اتساع شکم و....) و نیز ۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان فاقد علائم کلینیکی بیماری به عنوان شاهد (دارای میانگین وزن و طول مشابه ماهیان بیمار)، از ۵ مزرعه پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان واقع در اطراف شهر ایلام با سابقه گزارش بیماری و مرگ ومیر ماهی، در بهمن ماه ۱۳۸۸، جمع آوری شد. پس از انتقال ماهیان به آزمایشگاه و بیهوش نمودن آنها توسط عصاره گل میخک، در شرایط کاملاً استریل نمونه‌هایی جهت کشت باکتری از کبد، کلیه و طحال برداشته و به اولین محیط کشت مغذی یعنی محیط کشت مایع تریپتون سوی (TSB)منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت۲۴ - ۱۸ ساعت انکوبه شدند. پس از رشد باکتری ها در محیط (TSB)، نمونه ها روی محیط کشت آگار خوندار (حاوی ۵ درصد خون گوسفند) کشت و در دمای۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شدند (Vendrell et al., 2007).

۲- شناسایی باکتری

۲-۱- مورفولوژی کلنی باکتری

جهت شناسایی اولیه، باکتری ها تحت رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز و اکسیداز قرار گرفتند.

۲-۲- مطالعات ژنتیکی

DNA باکتری های خالص بدست آمده با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد (Holmes and Quigley, 1992)

به این ترتیب که۱۲۰ - ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بافر تریس EDTA[1] برداشته و چند کلنی باکتری با آن مخلوط کرده و سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه Thermomixer Comfort eppendorf که در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود ، به مدت ۱۰دقیقه

[1]- Trice EDTA buffer

جوشانده شدند. پس از گذشت ۱۰دقیقه میکروتیوب‌ها با دور rcf ۱۳۰۰۰ و به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ (Centrifuge 5415D eppendorf)شدند. جهت انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) ، ۴ میکرولیتر مسترمیکس (ساخت شرکت سیناژن)، ۶ میکرولیتر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول (برای هرگونه باکتری یک زوج پرایمر) و ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده از باکتری ها درون میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری اضافه شد و حجم محلول توسط آب مقطر دو بار تقطیر تا حجم ۲۰ میکرولیتر افزایش یافت. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه Mastercycler gradient thermal Cycler (ساخت شرکت اپندورف) قرار داده شدند و آزمایش PCR طبق روش زیر صورت گرفت:

الف. دناتوره کردن اولیه[۲] در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه

ب. دناتوره کردن نهایی (ثانویه[۳]) شامل ۳۰ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، هر یک به مدت ۱ دقیقه

ج. اتصال (آنیلینگ[۴]) در دمای۵۰ درجه به مدت ۱ دقیقه

د. امتداد[۵] در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه

پس از اتمام PCRمحصولات pcr بر روی ژل آگاروز ۱درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید و عکس برداری مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- Primary Denaturation

۳ - Secondary Denaturation

٤ - Annealing

٥ - Extension

جدول ۲-۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در Multiplex PCR

Primer pairs	Sequence (5´to 3´)	Target gene	PCR amplicon(pb)	Pathogen	Reference
plG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16SrRNA	1100	*L. garvieae*	Zoltkin et al (1998)
plG-2	GCACCCTCGCGGGTTG				
Lox-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	lctO	870	*S. iniae*	Mata et al (2004b)
Lox-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA				
STRD-DYI	TGGAACACGTTAGGGTCG	16S-23SrRNA	259	S.dysgalactia subsp	Hassan et al(2003)
Dys-16S-23S-2	CTTAACTAGAAAAACTCTTGATTATTC			dysagalactia	

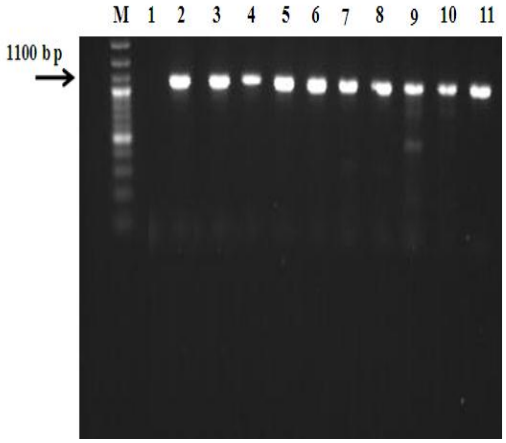
نتایج

مطالعات مورفولوژیک و بیوشیمیایی

تمام باکتری های جدا شده از کبد، کلیه و طحال کوکسی گرم مثبت بوده که پس از کشت بر روی محیط کشت آگار خوندار(blood agar) کلنی هایی خاکستری دارای همولیز آلفا بودند. KOH و اکسیداز و کاتالاز مثبت، سدیم سیترات، H_2S، نیترات و اوره منفی بوده و بر پایه ی این نتایج بیوشیمیایی باکتری*L. garvieae* شناسایی گردید.

نتایج PCR

از ۱۵۶ نمونه باکتری جداشده از ماهیان بیمار ۸۸ مورد پس از انجام mpcr باندهایی به طول ۱۱۰۰bp تشکیل دادند (Mata et al., 2004b)



شکل ۱. الکتروفورز محصول mPCR ، DNA استخراج شده باکتری و پرایمرها. ستون۱ از سمت چپ:DNA سایز مارکر به طول مضربی ازbp ۱۰۰، ستون ۲ :کنترل منفی، ستون ۳: کنترل مثبت (لاکتوکوکوس گارویه (A۱۷۰) را نشان می دهد. تمامی ستون‌ها ایزوله‌هایی هستند که با پرایمر ها تشکیل باند داده ودر ۱۱۰۰bp باند اختصاصی لاکتوکوکوس گارویه را تشکیل دادند(باند تشکیل شده در ستون ۱۳ ضعیف تر از بقیه می باشد).

بحث:

لاکتوکوکوزیس سبب بروز سپتی سمی خونریزی دهنده در ماهیان می شود(Bercovier et al., 1997). این بیماری سبب بروز خسارات اقتصادی فراوان درمزارع پرورشی قزل آلا در کشورهای اروپایی و کشورهای حاشیه دریای مدیترانه شده است(Ravelo et al., 2003). علائم کلینیکی لاکتوکوکوزیس مشاهده شده در قزل آلا ی رنگین کمان مشابه علائم گزارش شده در گونه های دیگر ماهیان می باشد(Chen et al., 2002). برای نخستین بار *Lactococcus garvieae* به عنوان عامل پاتوژن ماهی در اروپا گزارش شد (Palacios et al., 1993) و نیز برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان در ترکیه این باکتری جداسازی شد(Cagirgan and Tanrikul, 1995) در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از ماهیان بیمار با نتایج گزارش شده توسط محققان دیگر (Austin and Austin, 2007; Soltani *et al*., 2008; Sharifiyazdi *et al*., 2010) هماهنگی دارد. تمایز و شناسایی باکتری های *L. garviae, S. iniae, S. dysgalactiae* از یکدیگر تنها بر پایه ی تست های بیوشیمیایی، بسیار وقت گیر بوده و در ضمن نتایج بدست آمده قابل اطمینان نیستند بنابراین به اندازه کافی برای تشخیص بیماری در مزارع پرورشی مفید نبوده و از نظر اقتصادی به صرفه نیست. در ضمن هر گونه تأخیر در تشخیص عامل بیماری زا در مزارع پرورشی می تواند سبب بروز خسارات اقتصادی فراوان شود.

امروزه لاکتوکوزیس یک عفونت شایع در قزل آلای رنگین کمان در کشورهای مختلف از جمله ایران محسوب می

شود. PCR یک روش سریع و کاربردی در شناسایی پاتوژن های ماهی می باشد (Sharifiyazdi et al., 2010). آزمون multiplex PCR یک روش مفید است که امروزه برای تشخیص عفونت های مختلف در پزشکی و دامپزشکی به کار می رود(Nomoto et al., 2004). روش m-PCR جهت شناسایی *Aeromonassalmonicida*، *Yersinia rockeri* و *Flavobacteriumpsychrophilum* در سال ۲۰۰۲ توسط del Cerro و همکاران پایه گذاری شد و اخیراً multiplex PCR برای شناسایی گونه *Vibrio* به کار گرفته شد(Espineira et al., 2010).

پیش از این Zoltkin و همکاران در سال ۱۹۹۸ با استفاده از پرایمر های PLG_1 و PLG_2 و ژن 16s rRNA باکتری *L. garvieae* را از میان باکتری های جداسازی شده از قزل آلای رنگین کمان مزارع پرورشی آسیا و اروپا و استرالیا شناسایی کرده و گزارش دادند که باکتری ذکر شده باندهایی به طول ۱۱۰۰ bp را تولید می کند.

در مطالعه حاضر نتایج فنوتیپی توسط مطالعات مولکولی(m-PCR) تأیید گردید. در تحقیق حاضر جهت انجام m-pcr از توالی ژن های ذکر شده در جدول ۱ جهت شناسایی *L. garviae, S. iniae, S. dysgalactiae* که باندهایی به طول ۱۱۰۰، ۸۷۰ وbp ۲۵۶ را تولید می کنند، استفاده شد. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط Zlotkin و همکاران (۱۹۹۸) برای *L. garvieae*، Mata و همکاران (۲۰۰۴a) برای *S. iniae* وHassan و همکاران (۲۰۰۳) برای *S. dysgalactiae* که همگی از single PCR جهت شناسایی باکتری‌های ذکر شده استفاده کرده بودند، مطابقت داشت. بر اساس داده های حاصل و برپایه ی نتایج تست های بیوشیمیایی و مولکولی، عامل اصلی ایجاد کننده بیماری در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان که تاکنون استرپتوکوکوزیس گفته می شد، لاکتوکوکوزیس و عامل اصلی ایجاد کننده بیماری باکتری *L. garvieae* شناسایی شد. . در نهایت، نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که m-PCR روش تشخیصی مفیدی جهت شناسایی همزمان عوامل اصلی بیماری در عفونت های متفاوت باکتریایی است و یک روش کار آمد برای شناسایی *L. garvieae* در ماهی بیمارو یک روش مفید در مطالعات اپیدمیولوژیک می باشد.

منابع:

Akhlaghi, M. and Mahjor, A. A., 2004. Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss). Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 24, 132-136

Austin, B. and Austin, D. A., 2007. Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish. 2nd Ed. Chichester. UK: Springer Praxis Publishing. P. 552

Aoki, T., Park, C. I., Yamashita, H. and Hirono, I., 2000. Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Disease*, 23, 1–6

Barnes, A. C., Guyot, C., Hanse, B. G., Mackenzie, K., Horn, M.T., Ellis, A. E., 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss L.). Fish Shellfish Immunology*, 12, 155-168.

Bark, S. and Gregor, D. Mc., 2001. The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. Trout News, 31, 9–11.

Bercovier, H., Ghittino, C. and Eldar, A., 1997. Immunization with bacterial antigens: infection with streptococci and related organisms. *Developments Biological Standardization*, 90, 153-160.

Blanco, M. M., Gibello, A., Vela, A. I., Moreno, M. A., Domínguez, L. and Fernández-Garayzabal, J. F., 2002. Winter Disease outbreak in sea bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50, 19–27.

Carson, J., Gudkovs, N. and Austin, B., 1993. Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Journal of Fish Disease*, 6, 381-388

Caghrgan, H. and Tanrhkul, T., 1995. A new problem for turkish rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, W.) farms: Enterococcus like bacterium infection. *Bornova Vet Kont ve Araşt Enst Müd Derg*, 19 (33), 9-19.

Chen, S. C., Liaw, L. L., Su, H. Y., Ko, S. C., Wu, C. Y., Chaung, H. C., Tsai, Y. H., Yang, K. L., Chen, Y. C., Chen, T. H., Lin, G. R., Cheng, S. Y., Lin, Y. D., Lee, J. L., Lai, C. C., Del Cerro, A., Marquez, I., Guijarro, J. A., 2002. Simultaneous detection of Aeromonas salmonicida, Flavobacterium psychrophilum, and Yersinia ruckeri, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5177–5180.

Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J. F., Pascual, C., Garcia, J. A., Cutuli, M. T., Moreno, M. A., Collins, M. D. and Dominguez, L., 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Disease*, 19, 33–38.

Edwards, M. C. and Gibbs, R. A., 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Applied*, 3, S65– S75.

Eldar, A., Bejerano, Y. and Bercovier, H., 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 28, 139–143.

Eldar, A., Frelier, P. F., Assenta, L., Varner, P. W., Lawhon, S. and Bercovier, H., 1995. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 840–842.

Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Goria, M., Prearo, M. and Bercovier, H., 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 32, 85–88.

Espineira, M., Atanassora, M., Vieites, J., M. and Santaclara, F. J., 2010. Validation of a method for the detection of five species, serogroup, biotypes and Virulence factor of Vibrio by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology*, 27, 122-131.

Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D-G., Chilmonczyk, S. and Eldar, A., 2004. Clonality and Diversity of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. *American Society for Microbiology*, 70(9), 5132-5137.

Ghiasi, M., Zahedi, A. and Rostami, H., 2000. The occurrence of streptococcosis in rainbow trout broodstock in Mazenderan province, north of Iran. Proceeding of the 1st Aquatic Animal Health Conference. Ahwaz. Iran.

Ghittno, C . and Prearo, M., 1992. Reported of Streptococcosis in rainbow trout(Oncorrynchus mykiss)in Italy: preliminary not. *Boll Soc it patol Ittica*, 8, 4-1.

Gustafson, C. E., Thomas, C. J. and Trust, T., 1992. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3816–3825.

Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Cutuli, M. T., Domenech, A., Domínguez, L. and Fernandez-Garayzabal, J. F., 1999. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 346–350.

Hassan, A. A., Khan, I. U. and Lammler, C., 2003. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* strains of Lancefield's group C, G and L by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Biology* 50, 161-165.

Holmes, D. S. and Quigley, M., 1992. Arapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Annual Review of Biochemistry*, 114, 193-197.

Kav, K. and Evganis, O., 2008. Antibiotic susceptibility of Lactococcus garvieae in rainbow trout(Oncorhyncus mykiss)farms. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52, 223-226.

Lincoln, D. and Glasscock, D., 2001. Trout News. Center for environment, fisheries and aquaculture science. page 9.

Mata, A. I., Blanco, M. M., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J. F. and Gibello, A., 2004a. Development of PCR assay for Streptococcus iniae based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. *Veterinary Microbiology*, 101, 109-116.

Mata, A. I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M. M., Dominguez, L. and Fernandez-Garayzabal, J. F., 2004b. Multiplex PCR assay for detection of bacteria pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3183-3187.

Miriam, A., Griffiths, S. G., Lovely, J. A. and Lynch, W., 1997. PCR and probe-PCR assays to monitor broodstock Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) ovarian fluid and kidney tissue for presence of DNA of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum. Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1322–1326.

Michel, C., Nougaryede, P., Eldar, A., Sochon, A. and de Kinkelin, P., 1997. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30, 199–208.

Nomoto, R., Munasinghe, L. I., Jin, D-H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T., Yoshida, T., 2004. Lancefied group C Streptococcus dysgalactiae infection responsible for fish mortalities in Japan. *Journal of Fish Disease*, 27, 679-686.

Palacios, M. A., Zamora, M. J., Vasquez, J., Zamora, E., Durano, A., 1993. Streptococcosis in rainbowtrout(*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Boll Soc It Patol Ittica*, 13, 11-16.

Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A. E. and Romalde, J. L., 2004. *Lactococcus garvieae,* an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bulletin European Association Fish Pathology* , 24, 274–279.

Ravelo, C., Magarin, B., Lopez-Romalde, S., Toranzo, A. E., Romalde, J. L., 2003. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 751-756.

Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M. and Mostafavi Zadeh, S. M., 2010. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,
Walbaum) cultured in Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 11, 342-350.

Soltani, M., Nikbakht, G. H., Ebrahimzadeh, H. A. and Ahmadzadeh, N., 2008. rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Epizootic outbreaks of *Lactococcus garvieae* in farmed in Iran. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 28, 209-214.

Vendrell, D., Luis Balcazar, J., Ruiz-Zarznela, I., de Blas, I., Girones, O. and Luis Muzquiz, J., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish A review. Coparative Immunology. *Microbiology and Infection Disease*, 29, 177-198.

Vendrell, D., Luis Balcazar, J., Ruiz-Zarauela, I., de Blas, I., Girones, O., Luis Muzquiz, J., 2007. Safety and efficacy of an inctivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Preventive Veterinary Medicine*, 80, 222-229.

Williams, A. M., Freyer, J. L. and Collins, M. D., 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov., a new *Lactococcus* species from salmonid fish. FEMS Microbiol.Lett, 68, 109–114.

Zlotkin, A., Eldar, A., Ghitting, C. and Bercovior, H., 1998. Identification of Lactococcus garvieae by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 983-985.