جداسازی و شناسایی باکتری‌های کوکسی شکل بیماری‌زا در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمانی در مزارع پرورشی شمال غرب استان فارس با استفاده از روش‌های کشت و PCR

فرشید کفیل زاده[1*]، یلدا بناکار[1] و ایرج نامداری[2]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران.

۲ـ استادیار، اداره کل دامپزشکی شیراز، شیراز، ایران.

مسئول مکاتبات: Kafilzadeh@jia.ac.ir

چکیده

یکی از بیماری‌های مهم در آبزی پروری بیماری استرپتوکوکوزیس/ آنتروکوکوزیس است که یک بیماری عفونی سپتی سمیک ناشی از کوکسی‌های گرم مثبت در ماهیان آب‌های شیرین و شور بوده و در چند دهه اخیر خسارات اقتصادی جبران ناپذیری را به بار آورده است. از جمله باکتری‌های مهم، لاکتیک اسید باکتری‌ها هستند که مزارع پرورشی را مورد هجوم قرار داده و تلفات سنگینی را به جای می‌گذارند. هدف از این پژوهش شناسایی کوکسی‌های گرم مثبت بیماری زا در مزارع پرورشی قزل‌آلای رنگین کمانیی در قسمت شمال غربی استان فارس با استفاده از روش‌های کشت و PCR است. از مزارع مشکوک به بیماری تعداد ۹۰ نمونه ماهی قزل‌آلای رنگین کمانی برداشته شد. پس از بررسی و ثبت مشخصات بالینی ماهیان بیمار و تلف شده، از اندام داخلی که شامل بافت کلیه ماهیان بیمار می‌باشد نمونه برداری و با انجام کشت و تست‌های بیوشیمیایی لازم شناسایی باکتری‌ها صورت گرفت. در مرحله بعدی جهت تعیین نوع آنتی بیوتیک موثر بر باکتری‌های شناخته شده، تست آنتی بیوگرام صورت گرفت. در نهایت با استفاده از روش مولکولی PCR بر پایه ژن 16srRNA شناسایی باکتری‌ها انجام شد. از بین ٤٣ نمونه که کوکسی گرم مثبت شناخته شدند، ۳ گونه باکتری شامل ٤/٦ درصد استرپتوکوکوس اینیایی، ۲۳/۳ درصد لاکتوکوکوس گارویهآ و ۷۲/۱ درصد استرپتوکوکوس میلری تشخیص داده شدند. نتایج تست PCRنشان داد که باکتری‌های شناخته شده جزو باکتری‌های لاکتیک اسید بوده که باعث ایجاد بیماری در ماهیان می‌شوند. با توجه به اینکه بیماری مذکور از لحاظ اقتصادی و مشترک بودن بین انسان و آبزیان بسیار مهم می باشد لذا شناسایی و درمان این عوامل عفونی حائز اهمیت است.از آنجا که علائم بالینی تمامی باکتری‌های مسبب بیماری بسیار شبیه بوده و با استفاده از روش های بیوشیمیایی امکان تشخیص نادرست وجود دارد بنابراین دقیق ترین روش ممکن استفاده از روش مولکولی PCR است.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمانی، باکتری های لاکتیک اسید، PCR، استرپتوکوکوس میلری

مقدمه

در طی چند دهه اخیرسهم آبزی پروری در تأمین غذاهای دریایی رو به افزایش نهاده است. یکی از دلایلی که می‌توان از آن به عنوان علت صعود ناگهانی آبزی پروری یاد کرد تغییر آبزی پروری از یک هنر به یک علم می‌باشد. همراه چنین توسعه‌ای که سودآوری بیشتری نیز با خود داشته و افزایش تراکم واحد سطح را طلب می‌کند، انواع بیماری های عفونی با سرعت هرچه تمام تر در جمعیت ماهیان پرورشی گسترش یافته است. به علاوه به دلیل عدم اجرای مدیریت صحیح بهداشتی درمزارع، بیماری‌های ناشی از انتقال ناخواسته عوامل باکتریایی و ویروسی هم اکنون عمده‌ترین خسارت را به این صنعت وارد می‌سازند [۱۰]. از جمله بیماری‌های مهم درآبزی پروری استرپتوکوکوزیس/ آنتروکوکوزیس است، که یک بیماری عفونی سپتی سمیک در ماهیان آب شیرین، آب شور و لب شور می‌باشد. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ در ژاپن در ماهی قزل آلای رنگین کمانی (*Oncorhynchus mykiss*) گزاش گرد یده است[۹]. استرپتوکوکوزیس اصطلاحی است که برای بیماری ناشی

از چندین گونه کوکسی گرم مثبت به کار می‌رود [۱۲] و نوع باکتری عامل بیماری استرپتوکوکوزیس تحت تاثیر منطقه جغرافیایی می باشد. این بیماری عفونی که سپتی سمیک است ممکن است به شکل حاد، مزمن و یا بدون علامت بروز یابد [۸]. با این حال تلفات بیماری قابل توجه است.

علاوه بر اهمیت بیماری در آبزی پروری این بیماری یک تهدید برای سلامت عمومی انسان‌هایی که با آبزیان سروکار دارند محسوب می‌شود [٥]. استرپتوکوکوزیس در ماهی به شکل مجموعه‌ای از بیماری‌های مشابه می‌باشد و توسط جنس‌ها و گونه‌های مختلفی از باکتری‌های کوکسی که در رنگ آمیزی گرم مثبت هستند و از باکتری های لاکتیک اسید می‌باشند ایجاد می‌شود [٦]. این کوکسی‌های گرم مثبت کوچک بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که اغلب در زنجیره‌های طولانی به اندازه ۰/۵-۰/۳میکرومتر دیده می‌شوند [۱۵،۱۳].

هدف از این تحقیق جدا سازی و شناسایی باکتری‌های کوکسی شکل بیماری زا درماهیان قزل آلای رنگین کمانی در مزارع پرورشی منطقه شمال غرب استان فارس با استفاده از دو روش کشت بر روی محیط کشت غنی و مولکولی (PCR) می‌باشد.

مواد و روش کار

این پژوهش به صورت تحقیقی انجام شده و جهت انجام پروسه مورد نظر از سه منطقه مختلف در بخش بیضاء از استان فارس (ملوس جان، هفت خوان و حسین آباد) تعداد ۹۰ نمونه از ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمانی از مزارع پرورش ماهی گرفته شد. سپس نمونه ها در کنار یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل شده و پس از بررسی علایم کلینیکی ماهی‌های بیمار (اشکال ۱A و ۱B)، نمونه برداری از بافت کلیه ماهیان که بهترین محل جهت انجام نمونه گیری است به صورت استریل انجام گردید. شرایط فیزیکوشیمیایی مناطق نمونه برداری در جدول ۱ نشان داده شده است. ابتدا نمونه گرفته شده به محیط LB broth منتقل و پس از گذشت ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، نمونه ها به محیط Blood agar منتقل شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ٤٨-٢٤ ساعت انکوبه گردیدند.

در مرحله بعد رنگ آمیزی گرم صورت گرفت و جهت شناسایی بیشتر باکتری‌ها تست‌های بیوشیمیایی انجام شد (جدول۳). در مراحل بعد با تعیین نوع باکتری، نوع آنتی بیوتیک مؤثر توسط تست‌های آنتی بیوگرام مشخص شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک اپتچین(Op)، کلرامفنیکل(C)، تری متوپریم/ سولفامتوکسازول(SXT)، باسی تراسین(Bac)، استرپتومایسین(S)، آمپی سیلین(AM)، تتراسیکلین (Te)، پنی سیلین(P)، نالیدیکسیک اسید (Na) و آموکسی‌سیلین(AMX) جهت انجام تست آنتی بیوگرام استفاده گردید [۱،۲،۳].

در مرحله آخر جهت تأیید تشخیص، آزمون PCR بر پایه ژن ١٦ srRNA انجام گرفت. بدین منظور ابتدا به کمک کیت استخراج DNA شرکت سیناژن به شماره ساخت DN 8115 C، DNA را استخراج کرده و سپس به کمک آنزیم Taq DNA پلی مراز و پرایمر عملیات PCR در ۳۰ سیکل انجام و محصولات به دست آمده الکتروفورز گردید [۷] .

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های ANOVA و Duncan انجام گرفت.

جدول ۱ – شرایط فیزیکوشیمیایی مناطق نمونه برداری

ایستگاه نمونه برداری	دمای آب (درجه سانتی گراد)	زمان نمونه برداری	اکسیژن ورودی (mg/l)	اکسیژن خروجی (mg/l)
هفت خوان ۱	۱۷	۱۱:۳۰	۸	۵/٦
هفت خوان ۲	۱۸	۱۲:۳۰	۸	٦/٦
حسین آباد ۱	۱۹	۱٤	۷	۷
ملوس جان	۱۸	۱۰:۰۰	۷	۷
حسین آباد ۲	۵/۱٦	۱۳:۰۰	۷/۱	۳/٦

نتایج

از بین ۹۰ نمونه گرفته شده ٤۳ نمونه (٤۷/۷درصد) به صورت کوکسی گرم مثبت می‌باشند که فراوانی آن هادر مزارع پرورشی در نمودار ۱ نشان داده شده است. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی مشخص گردید باکتری های مورد نظر همگی استرپتوکوکسی های بیماری زا بوده که از نظر گونه با هم متفاوتند، ولی در نهایت همگی باعث ایجاد بیماری استرپتوکوکوزیس/انتروکوکوزیس در ماهیان شده و قابل انتقال به انسان نیز هستند. کلنی های ظاهر شده و تصویر مشاهده شده از باکتری زیر میکروسکوپ بعد از رنگ آمیزی گرم در اشکال 1C و 1D نمایش داده شده است.

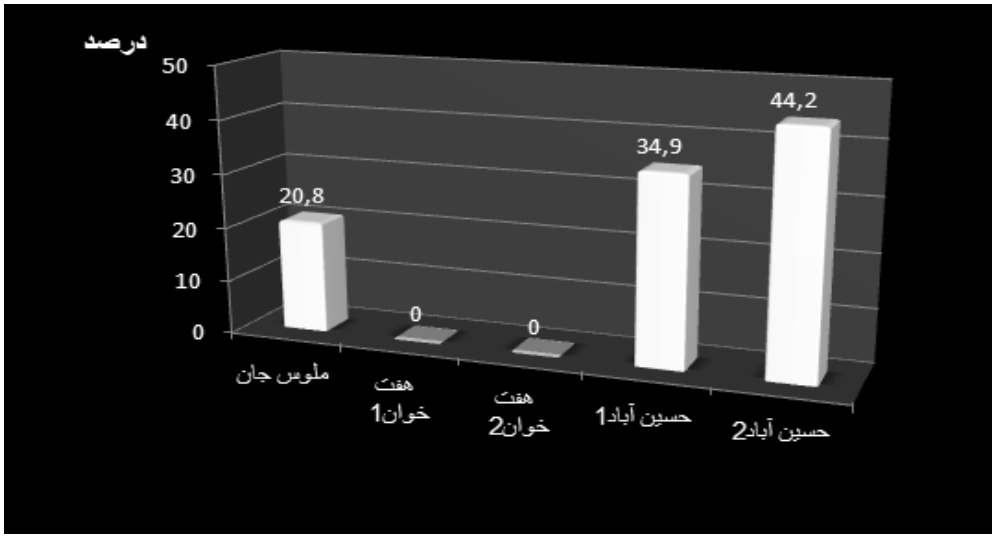
از بین کوکسی‌های گرم مثبت مشخص شده ۲۳/۳درصد لاکتوکوکوس گارویهآ (*Lactococcus garvieae*)، ٤/٦درصد استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) و ۷۲/۱درصد استرپتوکوکوس میلری (*Streptococcus milleri*) را شامل می‌شود (جدول ۲). پس از انجام تست آنتی بیوگرام مشخص شد که بهترین داروی مورد نظر کلرامفنیکل بوده که باکتری‌ها بیشترین حساسیت را به آن نشان می دهند و بعد از آن SXT در درجه بعدی اهمیت قرار دارد. اما باکتری‌ها، مقاوم به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، پنی سیلین، نالیدیکسیک اسید و آموکسی‌سیلین می‌باشند.

با انجام آنالیز PCR مشخص شد که ۸۳/۷ درصد از کوکسی‌های گرم مثبت مورد نظر باکتری‌های لاکتیک اسید بوده و ۱٦/۳ درصد باکتری های غیر لاکتیک اسید بوده‌اند (نمودار۲). شکل۲ نتیجه حاصل از الکتروفورز را نشان می دهد

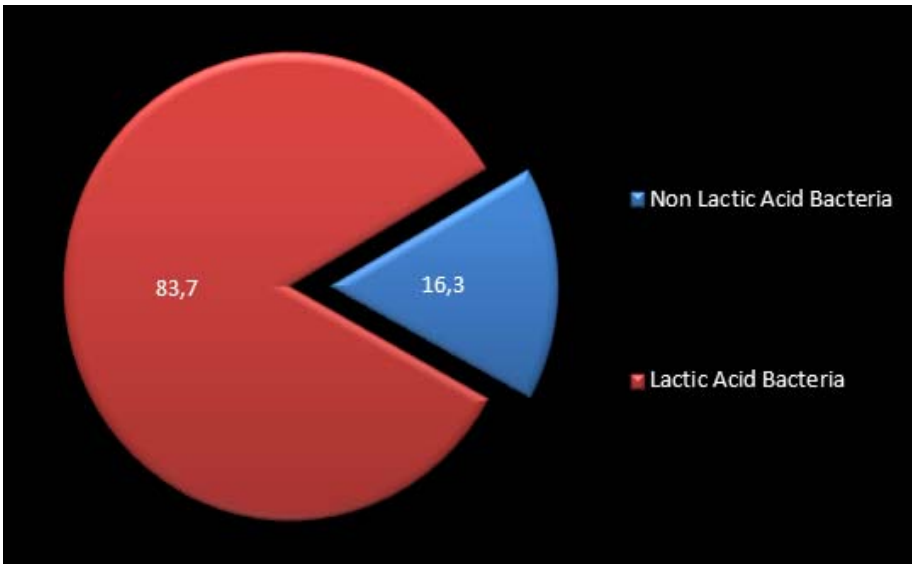
.

جدول۲ـ نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی

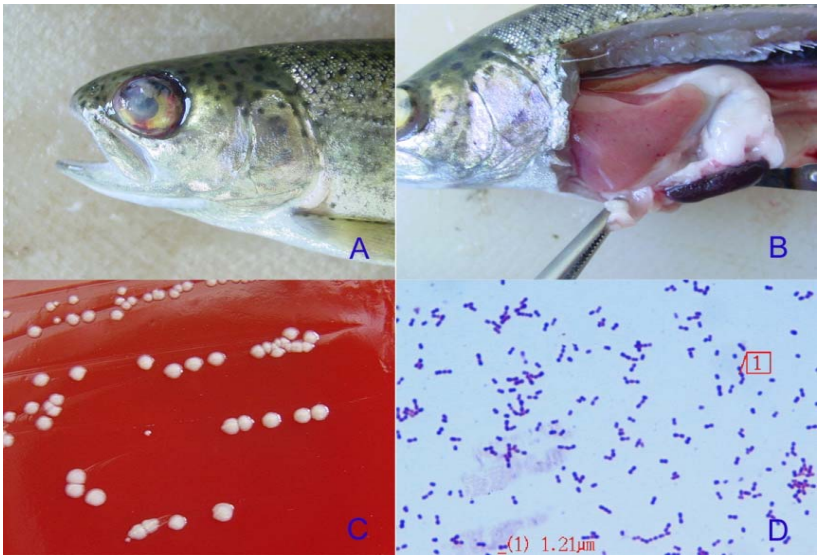
تست بیوشیمیایی / نام باکتری	کاتالاز	احیاء نیترات	ژلاتیناز	هیدرولیز نشاسته	متیل رد	رشد در ٦/٥ درصد نمک	تجزیه دی ـ زایلوز
لاکتوکوکوس گارویهآ	–	+	+	–	+	+	–
استرپتوکوکوس اینیایی	–	+	–	+	+	–	–
استرپتوکوکوس میلری	–	–	–	–	+	–	–



نمودار ۱ـ فراوانی (درصد) کوکسی‌های گرم مثبت در مزارع پرورشی

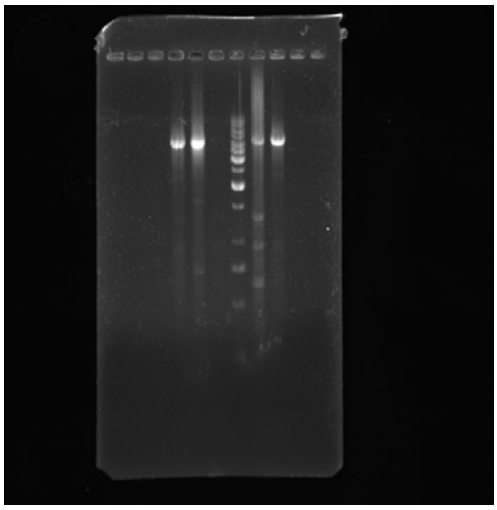


نمودار۲ـ درصد باکتری‌های لاکتیک اسید و غیر لاکتیک اسید حاصل از آنالیز PCR



شکل۱– A: ظاهر ماهی مبتلا به استرپتوکوکوزیس. B: مشاهده هموراژی نقطه‌ای اندام‌های داخلی. C: کلنی‌های ظاهر شده بعد از نمونه‌برداری از ماهی بیمار بر روی محیط کشت غنی آگار خوندار. D: تصویر مشاهده شده از باکتری زیر میکروسکوپ بعد از رنگ‌آمیزی گرم.

نتیجه حاصل از الکتروفورز



شکل۲- نتیجه حاصل از الکتروفورز: از سمت راست به چپ: ستون سوم مارکر Kb ۱ و باندهای مشاهده شده در ستون اول، دوم، پنجم، ششم مربوط به الکتروفورز باکتری‌های مورد آزمایش می‌باشد که در ۵۰۰۰bp باند داده اند.در ستون چهارم باندی مشاهده نگردید.

بحث

با توجه به این که عفونت استرپتوکوکی به ویژه پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و خسارات جبران ناپذیری را به بار می‌آورد، از این رو شناسایی مناطق آلوده و کمک به رفع آلودگی از طریق تشخیص به موقع بیماری و عامل مسبب آن از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است، چرا که مردم تولیدات بهداشتی با کیفیت استاندارد را می‌پسندند.

در مزارع متراکم، شرایط محیطی باعث استرس‌های قابل توجه شده و ماهیان را به طیف وسیعی از پاتوژن‌ها حساس می‌نماید. گاهی نیز در غیاب بیماری، پاتوژن‌ها می‌توانند حضور داشته باشند. از طرفی باکتری های پاتوژن علاوه بر از بین بردن ماهیان در مزارع قابلیت انتقال و سرایت به انسان را دارند، بنابراین تشخیص دقیق و به موقع می‌تواند از گسترش بیماری جلوگیری به عمل آورد.

در پژوهش جاری بیشترین میزان وقوع بیماری (٤٤/٢درصد) مربوط به منطقه حسین آباد۲ بوده که متراکم ترین مزرعه را شامل می‌شود. نکته قابل توجه در ارتباط با کوکسی‌های گرم مثبتی که در ارتباط با بیماری‌های ماهیان می‌باشد این است که علائم کلینیکی همگی ماهیان بیمار بسیار شبیه به هم بوده و همگی باعث ایجاد یکسری علائم مشترک می‌گردند اما عامل مسبب اگرچه استرپتوکوکوس است ولی از لحاظ گونه بایکدیگر متفاوت هستند. مطابق پژوهش‌های انجام شده [١،٤،٥،٨،١٢،١٤]، در تحقیق جاری نیز باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویهآ گزارش گردیدند. علاوه بر این باکتری‌ها، باکتری استرپتوکوکوس میلری نیز براساس تست‌های بیوشیمیایی مشخص شده است، که اولین گزارش وقوع آن در منطقه جنوب کشور می‌باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر تمامی کوکسی‌های گرم مثبت جدا شده در ارتباط با بیماری ماهیان بوده و باعث ایجاد استرپتوکوکوزیس/انتروکوکوزیس می‌شوند. همگی، کلنی های کوچک سفید رنگ ایجاد کرده و حالت موکوئیدی دارند. براساس تست‌های بیوشیمیایی مشخص شد که دو گونه استرپتوکوکسی شامل استرپتوکوکوس میلری (۷۲/۱ درصد) و استرپتوکوکوس اینیایی (٤/٦ درصد) و یک گونه لاکتوکوکوس شامل لاکتوکوکوس گارویهآ (۲۳/۳درصد) از عوامل بیماری زا هستند. همان طور که در پژوهش های دیگر بیان شده [٥،٦،٧،٤] تست‌های بیوشیمیایی رایج توان شناسایی صد در صد باکتری‌ها را نداشته و امکان تشخیص غلط نیز وجود دارد. بنابراین از روش مولکولی PCR بر پایه ژن ١٦srRNA جهت شناسایی دقیق استفاده شده است.

در مطالعات انجام شده توسط Altinok و همکاران(۲۰۱۱) وجود باکتری لاکتوکوکوس گارویه آ در قزل آلای رنگین کمانی با استفاده از روش (mPCR) Multiplex PCR به اثبات رسید [٤].

از آنجا که Soltani و همکاران(۲۰۱۰) در بررسی بیماری‌های سیستمیک فوق حاد که گونه‌های ماهی آب شیرین و شور را درگیر می‌کند مشخص کردند که قزل-آلای رنگین کمانی ایران آلوده به کوکسی‌های گرم مثبت است، روش مولکولی PCR بر پایه ژن ١٦srRNA انجام گرفت که نتیجه آن شامل اثبات وجود استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویهآ و جنس-های دیگری از استرپتوکوکوس بوده است. نتایج این مطالعه مشخص کرد مزارع پرورشی ایران به شدت تحت تأثیر این دو گونه باکتری می‌باشند [۱].

همچنین Pourgholam و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند نمونه های قزل آلای رنگین کمانی ۸ استان در ایران آلوده به استرپتوکوکوس بوده و بر اساس آنالیز PCR ژن ١٦ srRNA مشخص شد که استان فارس آلوده به استرپتوکوکوس اینیایی است ولی غالب گونه ها به ترتیب شامل استرپتوکوکوس آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae*)، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه (*Streptococcus dysgalactiae*) و استرپتوکوکوس اوبریز (*Streptococcus uberis*) بوده است که همگی از باکتری‌های لاکتیک اسید محسوب می‌شوند [۱۱].

Christion و همکاران (۲۰۰۷) وجود باکتری‌های لاکتیک اسید را در مزارع دارای تلفات زیاد در فرانسه بررسی کردند و پس از انجام بررسی‌های فنوتیپی، با استفاده از PCR ژن ١٦ srRNA و روش توالی یابی مشخص کردند تمامی نمونه‌های مشکوک، کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که در گروه باکتری‌های لاکتیک اسید طبقه‌بندی می‌شوند و توالی یابی مشخص کرد که باکتری-ها از جنس استرپتوکوکوس و لاکتوکوکوس می‌باشند [۷].

بنابراین با استناد بر مطالعات ذکر شده و نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مشخص می گردد که تمامی کوکسی‌های گرم مثبت شناخته شده بیماری زا بوده و باعث آلودگی مزارع می‌گردند و آنالیز PCR مشخص کرد که همگی جزو باکتری‌های لاکتیک اسیدی هستند که قزل آلای رنگین کمانی را آلوده می سازند.

براساس منابع علمی ذکر شده با استفاده از این روش و مثبت بودن نمونه‌ها می‌توان بیان کرد که نمونه های تشخیصی صحیح می باشند و از آنجا که در تحقیق حاضر ١٦/٣ درصداز کل نمونه‌ها در آنالیز PCR جواب منفی دادند دلیل دیگری است که استفاده مطلق از شناسایی بر پایه آنالیز بیوشیمیایی را رد می نماید.

بچه ماهی‌های وارد شده به حوضچه‌ها می‌توانند آلودگی را همراه با خود به مزارع منتقل کنند و مزارع سالم را درگیر نمایند. می‌توان چنین اظهار داشت که در منطقه مورد بررسی علاوه بر دو باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویهآ که قبلاً از موارد مشکوک بوده و آنتی بیوتیک‌ها براساس این دو باکتری مصرف می‌شده‌اند، باکتری استرپتوکوکوس میلری نیز وجود دارد به طوری که این باکتری نیز با علائم مشابه می‌تواند باعث تلفات شود.

بنابراین ممکن است نیاز بـه مـصرف آنتـی بیوتیـک‌هـای جدیدتر و مناسب‌تر باشد.

با وجود کاربرد آنتی بیوتیک‌ها به نظر می‌رسد کـه آنتـی-بیوتیک‌ها شیوع بیماری را مهار می‌کنند اما بـاکتری هـا را حذف نمی نمایند و به دلیل کاهش اشـتها، ماهیـان بیمـار نمی‌توانند غذاهای درمانی را مصرف کنند[۱].

در صورت آلودگی مزارع پرورشی ماهیان به این بـاکتری-ها، ضررهای اقتصادی جبران ناپذیری به بار مـی‌آیـد و از آنجا که باکتری قابل انتقال به انـسان و پـستانداران اسـت شناسایی و تشخیص دقیق و به موقع و جلوگیری از ورود آلودگی به منطقه حائز اهمیت است.

پیشنهادات این پژوهش عبارتند از:

۱-انجام تحقیقی مشابه به همراه انجام روش تـوالی یـابی ژن srRNA ١٦ و ثبت در بانک ژنی.

۲-شناسایی سویه‌های مختلف باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و استرپتوکوکوس میلری به روش PCR .

۳-بررسی آلودگی آب‌هـای ورودی بـه مـزارع پروشـی و تأثیر آنها بر انتقال آلودگی به ماهیان.

٤-بررسـی رابطـه سـلامت کـارگران مـزارع پرورشـی و سلامت ماهیان.

۵-بررسی آلودگی میکروبی مواد غذایی ماهی‌ها و وسـایل نگهداری ماهیان و بیماری‌های شایع مزارع پرورشی.

٦-بررسـی اسـتفاده از ترکیبـات مختلـف پروبیـوتیکی در پیـــشگیری و کنتـــرل بیمـــاری اســـترپتوکوکوزیس/ انتروکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمانی.

۷-تهیـه و تولیـد واکـسن DNA بـر علیـه بیمـاری استرپتوکوکوزیس.

۸-مطالعه تأثیر آنتی بیوتیک‌های مختلف بر میـزان ایمنـی اختصاصی و غیـر اختـصاصی ماهیـان قـزل آلای رنگـین کمـانی چـالش یافتـه بـه بـاکتری هـای اسـترپتوکوکی و انتروکوکی.

منابع

۱ــ مظلـــــومی، م. (۱۳۷۲). اســـــترپتوکوکوزیس / آنتروکوکوزیس بیماری مهم اقتصادی در پـرورش مـاهی. انتشارات نوید شیراز، چاپ اول.

۲ـ وزیری، ب. (۱۳٦۳). اصول بیوشیمیایی و میکروب شناسی تشخیصی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران.

۳ـ ناظم، م. راشد، ط و نادری نسب، م.(۱۳۷۰). باکتری شناسی آزمایشگاهی. انتشارات بنیاد فرهنگی رضوی.

4- Altinok, I. (2011), Multiplex pcr assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout diseases. *Inter-Research D.A.O* . 93(3): 199-206.

5- Mata, A.I., Blanco, M.M., Duminguez, L. and J.F. Fernandez-Garayzabal (2004), Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (IctO) gen with potential diagnostic value. *Vet. Microbiol*. 101(2):109-116.

6- Bercover, H., Ghittino, C. and A. Eldar (1997), Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci an related organisms. *Deve. Biol. Stand*. 90: 153 – 160.

7- Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D.G., Lautraite, A. and P. Tailliez (2007), Diversity of Lactic acid bacteria associated with fish and fish farm environment, Established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(9): 2947-2955.

8- Eldar, A. and C. Ghittio (1999), *Lactococcus garviea* and *Streptococcus iniae* infection in rinbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), similar but different diseases. *Dis. Aquat. Org.* 36: 227–231.

9– Hoshina, T., Sano,T. and Y. Morimoto (1958), A *Streptococcus* pathogenic to fish. *J. Tokyo Univ. Fish*. 44: 57–68.

10– Narog, B.J. (2002), Difficult issues for aquaculturists in the US and around the word. *Aquaculture magazine*. May/June: 1-5.

11- Pourgholam, R., Laluei, F., Saeedi, A.A., Zahedi, A., Safari, R., Taghavi, M.J., NasrollahzadehSaravi, H. and H. Pourgholam (2009), Distribution and Molecular identification of some causative agents of streptococcosis isolated from farmed rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Iran. *Iran. J. Fish. Sci*. 10(1): 109-122.

12– Ravelo, C., Magarinos, B., Romalde, J.A. and A.E. Tornazo (2001), Conventional versus miniaturized system for the phenotypic hracterization of *Lactococcus garveae* strains. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 21: 136–144.

13– Ronald, J., and R. Roberta (2001), Fish diseases by bacterial pathogens. In: Fish Pathology. 3rd Edition. New York: W. B. Saunder. 234 -235.

14- Soltani, M., Haghighi Karsidani, S., Nikbakht-Brojeni, G., Ghasemi, M. and H.F. Skall (2010). Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis / lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. *Iran. J. Microbiol.* 2(4): 198-209.

15– Woo, P.T.K. and D.W. Bruno (1999), Fish diseases and disorders. Viral Bacterial and Fungal infection. London: CAP publishing. 33–319.