

## مطالعه هیستوپاتولوژیک پوست و روده در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان پرورشی مبتلا به *Lactococcus garvieae*

### • سعیده حیدری نژاد

کارشناس ارشد بافت شناسی آبزیان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

### • نگین سلامات

استادیار گروه بافت شناسی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

### • فاضل پوراحمد

استادیار دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام

### • احمد سواری

استاد گروه زیست دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

### • بیتا ارچنگی

استادیار گروه زیست دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۲

Email: s.heidarinejad@gmail.com

### چکیده

قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های مهم ماهیان در صنعت آبی پروری است و بیماری‌های باکتریایی یکی از عوامل کاهش تولیدات ماهی می‌باشد. باکتری *Lactococcus garvieae* یکی از مهمترین عوامل عفونی است که سبب بروز خسارات اقتصادی فراوانی در مزارع پرورشی می‌باشد. *Streptococosis* بیماری با علائم مشابه *Lactococcosis* بوده که تشخیص قطعی را پیچیده می‌کند. در ۵ سال اخیر بیماری مشکوک به *Streptococosis* در مزارع پرورشی قزل آلاهی رنگین کمان ایلام به صورت اپیدمی شایع شده است. در این تحقیق، تعداد ۶۰ عدد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان بیمار با علائم بالینی نظیر شنای نامنظم، آگزوفتالمی و... از مزارع پرورشی جمع‌آوری شد. جهت تشخیص عامل بیماری، نمونه‌هایی از طحال، کلیه و کبد ماهی جمع‌آوری شد. بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی و روش Multiplex PCR با استفاده از سه مجموعه پرایمر طراحی شده *16SrRNA*، *23S rRNA* - ۱۶S و *lctO* مربوط به، *L. garvieae*، *S. iniae* و *S. dysgalactiae* ایزوله‌های جداشده در این مطالعه، باندهایی به طول (bp) ۱۱۰۰ تولید کردند و باکتری ایجاد کننده بیماری *L. garvieae* شناسایی شد. برخی از نتایج هیستوپاتولوژیک مشاهده شده عبارتند از: نکروز سلول‌های اپیدرمی، زخم در پوست و خونریزی، افزایش سلولهای موکوسی و ارتشاح سلول‌های التهابی در روده. نتایج مطالعه حاضر با استفاده از روش m-PCR تأیید کرد که باکتری *L. garvieae* عامل اصلی بیماری اپیدمیک در مزارع پرورشی قزل آلاهی رنگین کمان ایلام می‌باشد.

کلمات کلیدی: قزل آلاهی رنگین کمان، *Lactococcus garvieae*، هیستوپاتولوژی، پوست، روده

● **Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 104 pp: 64-69**

By: Heidarinejad, S., (Corresponding Author), Department of Marine Biology, School of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, P.O. Box: 669, Khorramshahr, Iran

Salamat, N., Department of Marine Biology, School of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, P.O. Box: 669, Khorramshahr, Iran

Pourhmad, F., School of Veterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran

Savari, A., Department of Marine Biology, School of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, P.O. Box: 669, Khorramshahr, Iran

Archangi, B., Department of Marine Biology, School of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, P.O. Box: 669, Khorramshahr, Iran

Received: June 2013 Accepted: August 2013

Email: s.heidarinejad@gmail.com

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is an important fish species in aquaculture. The bacterial disease caused the decline in the production of this fish. *Lactococcus garvieae* is one of the most serious infectious agents that caused disease with economical losses in fish farms. Streptococcosis have signs similar to lactococcosis. Therefore the definite diagnosis is sometimes complicated. In the last 5 years, the disease suspected to be streptococcosis was epidemic in rainbow trout farms in Ilam. In this research, 60 diseased rainbow trout with clinical signs such as erratic swimming and exophthalmia, were collected from rainbow trout farms. For detection the agent of the disease, samples were collected from spleen, kidney and liver of fishes. Based on the biochemical tests and Multiplex PCR by using three sets of primers designed from 16S rRNA, 16S-23S rRNA and (lctO) genes of *L. garvieae*, *S. dysgalactiae* and *Streptococcus iniae*, the isolates in this research, produced a single specific fragment bands with a size of 1100 (bp) have shown and characteristics of *L. garvieae*. Some of histopathological that observed was necrosis of epidermal cells and ulcer in the skin and hemorrhage, increase of mucosal cell (Goblet cell), infiltration of inflammatory cell in the intestine. In conclusion of the present study confirmed that *L. garvieae* is the main agent of the epidemic disease in the rainbow farms in Ilam use of the m-PCR method.

**Key word:** Rainbow trout, *Lactococcus garvieae*, histopathology, skin, intestine.

### مقدمه

حیوانات و حتی انسان نیز گزارش شده است و اینگونه به نظر می‌رسد می‌توان آن را به عنوان عامل بیماری زای مشترک بین انسان و دام نام برد (Elliot and Facklam, ۱۹۹۶).

پوست به عنوان یک ارگان بزرگ و وسیع موجود را در مقابل عوامل استرس زا و محرک‌های محیطی که باعث اختلال در اعمال فیزیولوژیک اعضا داخلی بدن می‌شود، محافظت می‌کند (Harvey and Bathy, ۱۹۹۸). در سالهای اخیر عفونت موسوم به استرپتوکوکوزیس با علائم ظاهری تیرگی پوست، تورم ناحیه شکم، کم تحرکی و اگزوفتالمی یک یا دو طرفه و... در ماهیان قزلا

و دامپزشکی استان ایلام گزارش شده که عامل آن بدون استفاده از روش تشخیصی مطمئن و تنها با تکیه بر علائم بالینی و ضایعات پاتولوژیک، *Streptococcus iniae* معرفی شد. در این میان غالباً پرورش دهندگان نیز جهت پیشگیری یا درمان این بیماری از روش درمانی استفاده می‌کنند که منجر به ایجاد مقاومت‌های باکتریایی شده است. هدف ما در مطالعه حاضر شناسایی عامل اصلی ایجاد کننده بیماری در مزارع پرورش قزل آلابی رنگین کمان در ایلام با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و نیز

باکتری‌های گرم مثبت از جمله مهم‌ترین پاتوژن‌های ماهیان محسوب می‌شوند که در چند سال اخیر به صورت پراکنده و حتی اپیدمیک در مناطق مختلف جهان گزارش شده است، بیماری‌های باکتریایی سبب بروز خسارت اقتصادی فراوانی به مزارع پرورش ماهی در سراسر جهان می‌شود (Shoemaker, Klesius and Evan, ۲۰۰۱). یکی از این باکتری‌های پاتوژن *Lactococcus garvieae* است که بر پایه مطالعات ژنتیکی جنس *Lactococcus* به همراه جنس‌های *Vagococcus* Carnobacterium, Entrococcus و *Streptococcus* به خانواده Streptococcaceae تعلق دارد (Luis Balcazar, Ruiz-Zarznela, de Blas, Girones, and Muzquiz, ۲۰۰۶). باکتری *Lactococcus garvieae* سبب بروز بیماری لاکتوکوکوزیس می‌شود که دارای نشانه‌های بالینی مشابه بیماری استرپتوکوکوزیس است و عامل بروز سیتی سمی در ماهیان آب شور و شیرین، به ویژه قزل آلابی رنگین کمان و بخصوص زمانیکه دمای آب به بالاتر از ۱۶ درجه سانتی‌گراد می‌رسد، می‌شود (Ghittino and Prearo, ۱۹۹۳). میزان *L. garvieae* محدود به آبزیان نبوده و این باکتری در سایر

## نتایج نتایج مطالعات بالینی

ماهیان مورد مطالعه در این تحقیق از میان ماهیان بیماری که علائم بالینی بیماری نظیر اگزوفتالمی (شکل ۱)، کدر شدن قرنیه، تیره شدن رنگ پوست، خونریزی در باله‌ها، بزرگ شدن و رنگ پریدگی غیر طبیعی کبد، بزرگ شدن طحال، آسیت و خونریزی در حفره‌ی صفاقی، در آنها کاملاً مشهود بود.

## نتایج مطالعات مورفولوژی (کشت و رنگ آمیزی گرم) باکتری و تست‌های بیوشیمیایی

از میان ایزوله‌های جدا شده از کبد، کلیه و طحال ماهیان بیمار، پس از چندین بار تجدید کشت ایزوله‌های خالص باکتری با کلنیهای تک رشد یافت. سپس نمونه‌های باکتری از هر یک از کلنی خالص مورد رنگ آمیزی گرم قرار گرفت، که از میان آن‌ها حدود ۸۲ درصد گرم مثبت و حدود ۱۸ درصد گرم منفی تشخیص داده شدند. تمام ایزوله‌های گرم مثبت، کوکسی شکل بودند، که تعدادی از آنها، روی محیط کشت آگار خون دار همولیز آلفا (شکل ۲ A) ایجاد کردند و نتایج آزمایشات بیوشیمیایی آنها شامل کاتالاز منفی، اکسیداز منفی، اندول منفی، اوره منفی، فنول رد مثبت، سیمون سیترات منفی، VP مثبت، TSI منفی، نیترات منفی، OF مثبت، H<sub>2</sub>S منفی، اسکولین مثبت و غیر متحرک بود، به عنوان *Lactococcus garvieae* در نظر گرفته شدند. تمامی این ایزوله‌ها جهت تشخیص قطعی مورد آزمایش PCR قرار گرفتند.

## نتایج مولتی پلکس PCR

ایزوله‌هایی که در آزمایشات بیوشیمیایی به عنوان *L. garvieae* در نظر گرفته شده بودند، با پرایمر اختصاصی *L. garvieae* محصولی به طول ۱۱۰۰ bp تولید نمودند و به طور قطعی *L. garvieae* تشخیص داده شدند (۲ B).

## نتایج مطالعات هیستوپاتولوژی

افزایش بیش از حد سلول‌های موکوسی (۳)، افزایش ملانوماکروفاژها و نیز نکروز سلول‌های اپیدرم همچنین پرخونی و احتقان خون در درم بافت



شکل ۱: اگزوفتالمی (بیرون زدگی چشم)

بیان تغییرات هیستوپاتولوژیک آن بر روده و پوست ماهیان بیمار می‌باشد.

## مواد و روش‌ها نمونه برداری

جهت انجام تحقیق حاضر، ۶۰ قطعه ماهی (میانگین وزنی  $23 \pm 41/47$  گرم و میانگین طول کل  $63 \pm 20/07$  سانتی متر) به طور تصادفی از میان ماهیانی دارای نشانه‌های 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 در بهمن ماه ۱۳۸۸، جمع‌آوری شد.

جداسازی و شناسایی باکتری

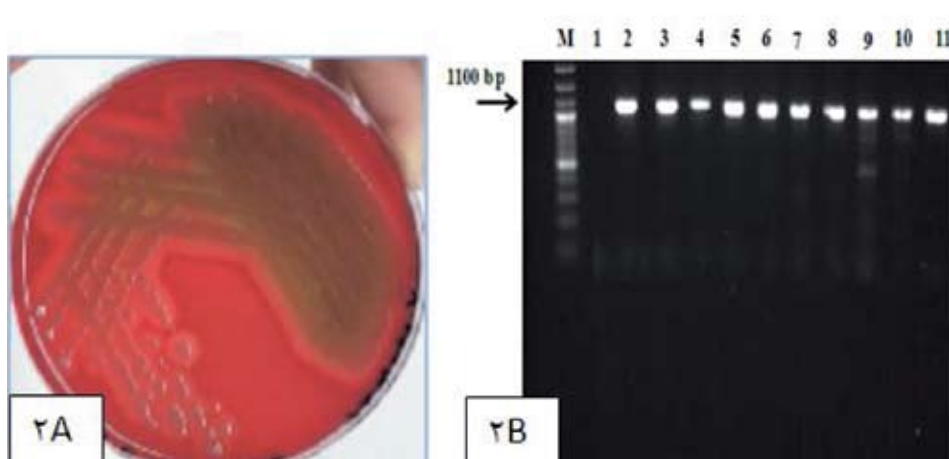
پس از بیهوشی ماهیان توسط عصاره گل میخک (*Syzygium aromaticum*)، در شرایط کاملاً استریل، نمونه‌هایی جهت کشت باکتری از کبد، کلیه و طحال برداشته، به اولین محیط کشت مغذی یعنی محیط کشت مایع تربیتون سوی (TSB) منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ - ۱۸ ساعت انکوبه شدند. پس از رشد باکتری‌ها، نمونه‌ها را بر روی محیط کشت آگار خوندار (حاوی ۵ درصد خون گوسفند) کشت و در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شدند (Vendrell et al, 2007).

کشت مجدد در محیط کشت آگار خوندار تا به دست آوردن کلنی‌های خالص باکتری ادامه یافت سپس رنگ آمیزی گرم و تعدادی از تست‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، اکسیداز و آسکولین و... انجام گرفت. جهت شناسایی قطعی باکتری مولد بیماری از روش مولکولی m-pcr استفاده شد. جهت انجام PCR ابتدا DNA باکتری استخراج شد. استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد (Holmes and Quigley, 1992). پس از استخراج DNA باکتری آزمایش PCR انجام گرفت، از پرایمرهای ۱۶S rRNA، ۲۳S rRNA و ۱۶S (IctO) به ترتیب برای شناسایی باکتری، *L. garvieae*، *S. dysgalactia*، *S. iniae* استفاده گردید که به ترتیب باندهایی به طول (pb) ۱۱۰۰، (pb) ۲۵۹ و (pb) ۸۷۰ تولید می‌کنند انجام شد (Mata, Blanco, Dominguez, Fernandez-Garayzabal, Gibello, 2004).

پس از انجام PCR الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد صورت گرفت و از ژل حاصل عکس برداری شد.

## مطالعات هیستوپاتولوژیک

پس از انجام نمونه برداری از ماهیان جهت مطالعات باکتریولوژیک، جهت مطالعه هیستوپاتولوژی قطعاتی به ابعاد ۵/۰ cm از روده و پوست ماهی جدا شده و در محلول ثبوت بوئن قرار داده شد. سپس مراحل معمول پاساژ بافتی (آبگیری، شفاف سازی و پارافینه شدن) نمونه‌ها در دستگاه هیستوکینت انجام گرفت. پس از قالب گیری نمونه‌ها در پارافین با استفاده از دستگاه روتاری میکروتوم برشهایی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر از نمونه بافتی تهیه انجام گرفت. پس از انجام رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) اسلایدهای حاصل توسط میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.



شکل ۲A: همولیز آلفا باکتری *Lactococcus garvieae*. شکل ۲B: تولید باند (bp) ۱۱۰۰ توسط محصولات PCR مربوط به DNA باکتری‌ها

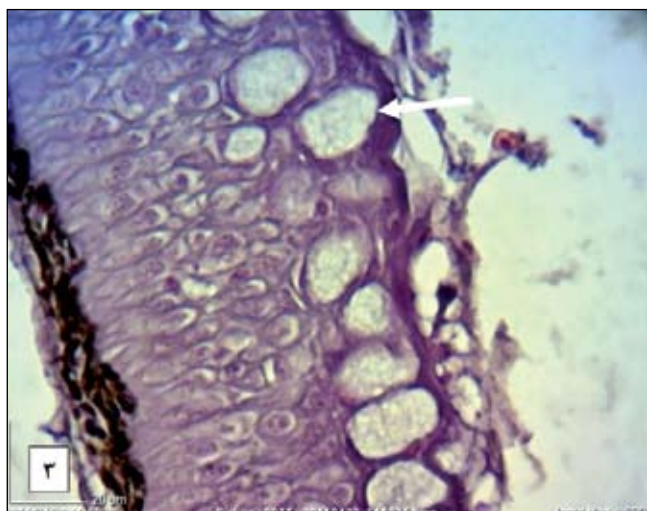
بیوشیمیایی باکتری‌های *L. garvieae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae* شناسایی دقیق آنها تنها بر پایه تست‌های بیوشیمیایی کافی نبوده و بهترین روش استفاده از m-PCR می‌باشد (Mortada, Hussien and Hatal, ۲۰۰۶). در این تحقیق غالب باکتری شناسایی شده *L. garvieae* بوده که بوسیله آن بانندی به طول (bp) ۱۱۰۰ تشکیل داد. پیش از این نیز Mortada و همکاران (۲۰۰۶) جهت شناسایی باکتری در عفونت ترکیبی ماهیان بیمار از m-PCR استفاده نمود.

همچنین در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از ماهیان بیمار با نتایج گزارش شده توسط محققان دیگر (Soltani, Nikbakht, Ebrahimzadeh and Austin and Austin, ۲۰۰۷; Ahmadzadeh Sharifiyazdi et al; ۲۰۰۸; ۲۰۱۰) هماهنگی دارد. یکی از عمده‌ترین علائم پاتولوژیک مشاهده شده در اندام‌های مختلف ماهیان بیمار هموراژی (خونریزی) بود. باکتری *L. garvieae* عامل

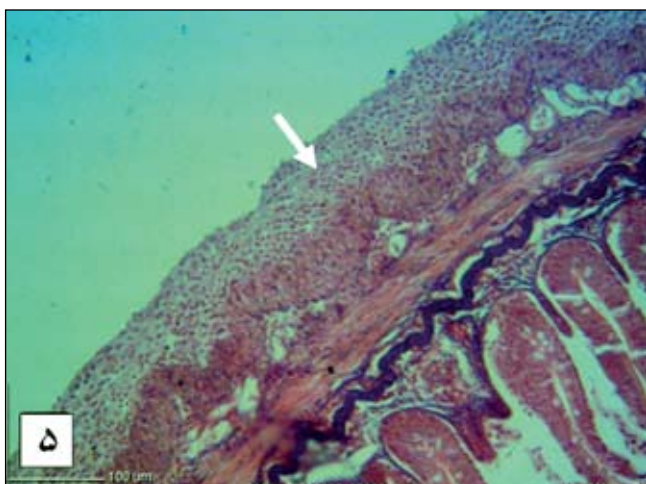
پوست مشاهده شد و تغییرات مشاهده شده در روده شامل: افزایش تعداد سلول‌های موکوسی و کوتاه شدن پرزهای روده و نکروز اپیتلیوم روده، ادماتوز در طبقه زیر مخاطی و خونریزی در پرز و مخاط روده (۴) و ارتشاح سلول‌های التهابی و افزایش بیش از حد لکوسیت‌ها (۵)، پریتونیت حاد و نیز کلنی‌های کوکسی‌های گرم مثبت در لومن و بافت روده.

### بحث

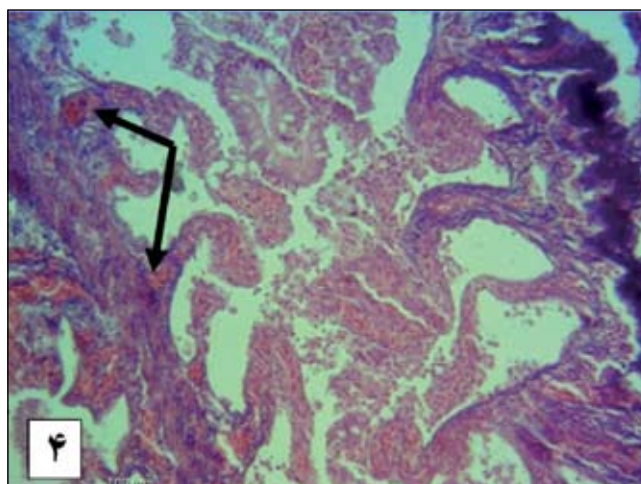
*Lactococcus garvieae* از جمله مهم‌ترین باکتری‌های کوکسی شکل و گرم مثبت است که عامل بروز بیماری لاکتوکوکوزیس است که به عنوان فاکتور تحدید کننده مزارع پرورشی است و سبب بروز خسارات اقتصادی در حدود ۵۰ درصد از تولید کل در اروپا می‌شود (Eyngor, Zlotkin, Ghittino, ۲۰۰۴). استرس‌های محیط، دمای و کیفیت پایین آب و شرایط نگهداری ماهی، شدت و انتقال بیماری را افزایش می‌دهند (Sharifiyazdi, Akhlaghi, Tabatabaei and MostafaviZadeh, ۲۰۱۰). در تحقیق حاضر علائم کلینیکی مشاهده شده در ماهیان مبتلا به لاکتوکوکوزیس (اگزوفتالمی یک طرفه یا دو طرفه، خونریزی در چشم، خونریزی در باله‌ها، تورم شکم، تیره شدن رنگ پوست، شنای نامنظم و...)، با نشانه‌های بالینی گزارش شده در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان مبتلا به گونه‌های مختلف باکتری استرپتوکوکوس توسط سایر محققین (Eldar, Bromage, Thomas, Owens; Horovitz and Bercovier, ۱۹۹۷; Eldar and Ghittino, ۱۹۹۹) تشابه فراوانی داشت، همچنین با علائم کلینیکی مشاهده شده در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس (Kang, Shin, Shin, Chang, Lin and Lee, ۲۰۰۲; Palaksha, Kim and Yang, ۲۰۰۴) نیز بسیار همسان بود. اما علائم مشابه در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مبتلا به سایر عوامل باکتریایی نیز توسط محققین گزارش شده است (Akhlaghi and Mahjor; Roberts, ۲۰۰۱; Ghittino, ۱۹۹۹). جهت کنترل بیماری، شناسایی سریع و دقیق عامل ایجاد کننده بیماری بسیار ضروری است و به دلیل شباهت پاسخ‌های



شکل ۳: افزایش بیش از حد سلول‌های موکوسی در پوست ماهی مبتلا به *Lactococcus garvieae* رنگ آمیزی (H&E ۴۰x)



شکل ۵: افزایش بیش از حد لکوسیت‌ها در روده ماهی مبتلا به *Lactococcus garvieae* رنگ آمیزی (H&E) (× ۱۰)



شکل ۴: پرخونی شدید در بافت روده ماهی مبتلا به *Lactococcus garvieae* رنگ آمیزی (H&E) (× ۱۰)

### تشکر و قدردانی

با سپاس و تشکر فراوان از شیلات استان ایلام و کلیه پرورش دهندگان قزل آلابی رنگین کمان بخش کلم که در امر تهیه نمونه برای این تحقیق ما را یاری نمودند.

### منابع مورد استفاده

- 1- Akhlaghi, M. and Mahjor, A.A. (2004) Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin of European Association of Fish Pathologists. Vol, 24, pp: 132-136.
- 2-Austin, B. and Austin, D. (2007) Bacterial fish pathogens Disease of farmed and wild fish, 4 th ed, Praxis pub, pp: 57-58-155-156-386.
- 3-Avci, H. Aydogan, A. Tanrikul, T.T. and Birincioglu, S.S. (2010) Pathological and Microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with lactococcus garvieae. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. Vol, 16, pp: 313-318.
- 4-Bromage, E.S. Thomas, A. Owens, L. (1999) *Streptococcus ini-ae*, a bacterial infection in barramundi Lates calcarifer. Diseases of Aquatic Organisms. Vol, 36, pp: 177-181.
- 5-Chang, P.H. Lin, C.W. and Lee, Y.C. (2002) *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. Bulletin of European Association of Fish Pathologists. Vol, 22 (5), pp: 319-326.
- 6-Elliot, J.A. Facklam, R.R. (1996) Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed

بیماری لاکتوکوکوزیس، منجر به آسیب آندوتلیوم عروق خونی و نشست خون از عروق می‌شود که خود منجر به خونریزی در اندامهای مختلف می‌گردد، به همین دلیل لاکتوکوکوزیس اساساً به عنوان یک سپتی سمی هموراژیک قلمداد می‌شود (Avci et al, ۲۰۱۰). همچنین تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده در پوست ماهیان بیمار در تحقیق حاضر، با نتایج گزارش شده توسط سایر محققین هماهنگ بود و به نظر می‌رسد که خونریزی و احتقان خون در پوست احتمالاً به دلیل تأثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتری‌ها باشد (Akhlaghi and Mahjor, ۲۰۰۴; Eldar and Ghittino, ۱۹۹۹). همچنین در این مطالعه، آسیب‌های پاتولوژیک مشاهده شده در ناحیه روده با تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده توسط سایر محققین نیز هماهنگی داشت (Eldar and Ghittino, ۱۹۹۹; Chang et al, ۲۰۰۲; Akhlaghi and Mahjor, ۲۰۰۴). عموماً افزایش سلول‌های جامی شکل (موکوسی) به دلیل افزایش تولید موکوس رو می‌دهد که خود این افزایش تولید موکوس، می‌تواند به عنوان یک سد دفاعی در مقابل عامل خارجی و یا دفع و جلوگیری از نفوذ بیشتر به بافت روده بروز نماید.

### نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که m-PCR روش تشخیصی مفیدی جهت شناسایی همزمان عامل یا عوامل اصلی بیماری در عفونت‌های میکس باکتریایی است.

در این مطالعه به نظر می‌رسد ضایعات پاتولوژیک مختلف مشاهده شده در ماهیان قزل‌آلابی بیمار ناشی از فعالیت توکسین‌های باکتری است و احتمالاً تغییرات بافتی در ابتدا به عنوان مکانیسم دفاعی جهت حفظ شرایط پایدار بدن و جلوگیری از نفوذ بیشتر عامل بیماری‌زا صورت می‌گیرد، اما با افزایش و شدت عامل بیماری‌زا که سبب بروز واکنش‌های دفاعی بیشتر و نیز افزایش ضایعات بافتی شده که ضایعات حاصل، خود مانعی در برابر انجام عملکردهای معمول سلول، بافت و کل موجود و در نهایت منجر به مرگ موجود زنده می‌شود.

- method to discriminate between them. Journal of Clinical Microbiology. Vol , 34, pp: 1296–1298.
- 7-Eldar, A. Horovitz, A. Bercovier, H. (1997) Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol, 56, pp: 175– 183.
- 8-Eldar, A. and Ghittino, C. (1999) *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Similar, but different diseases. Disease of Aquatic Organisms. Vol, 36, pp: 227-231.
- 9-Eyngor, M. Zlotkin, A. Ghittino, C. Prearo, M. Douet, D.G. and Chilmonczyk S. (2004) Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. Applied Environmental Microbiology. Vol, 70(9), pp: 5132-5137.
- 10-Ghittino, C. and Prearo, M. (1993) Comparison of some strains isolated from rainbow trout affected by streptococcosis. Boll. Soc. Ital. Patol. Itica. Vol, 11, pp: 30–43.
- 11-Harvey, R. and Bathy, R.S. (1998) Cutaneous taste buds in cod. Journal of Fish Biology. Vol, 53(1), pp:138-149.
- 12-Holmes, D.S. and Quigley, M. (1992) Arapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Annu Rev Biochem. Vol, 114, pp: 93-197.
- 13-Kang ,S. Shin, G. Shin, Y. Palaksha, K.J. Kim Y. and Yang H. (2004) Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). Journal Veterinary Science. Vol, 5, pp: 387–390.
- 14-Mata, A.I. Blanco, M.M. Dominguez, L. Fernandez-Garayzabal, J.F. and Gibello A. (2004) Development of PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. Veterinary Microbiology. Vol, 101, pp: 109-116.
- 15- Mortada, M. Hussien, A. And Hatal, K. (2006) Multiplex PCR for detection of *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae* and *S. dysgalactiae* in cultured yellowtail. Aquaculture Science. Vol, 53, pp: 269-274.
- 16- Roberts, R.J. (2001) Fish Pathology, 3th ed. (ed. W.B. Saunders), London.
- 17- Soltani, M. Nikbakht, G.H. Ebrahimzadeh, H.A. and Ahmadzadeh N. (2008) Epizootic outbreaks of *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin of European Association of Fish Pathologists. Vol, 28, pp: 209-214.
- 18- Shoemaker, C.A. Klesius, P.H. and Evan, J.J. (2001) Prevalence of *Streptococcus iniea* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. American Journal of Veterinary Research. Vol, 62, pp: 174-177.
- 19- Sharifiyazdi, H. Akhlaghi, M. Tabatabaei, M. and MostafaviZadeh, S.M. (2010) Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran. Iran Journal of Veterinary Research Shiraz University. Vol, 11, pp: 342-350.
- 20- Vendrell, D. Luis Balcazar, J. Ruiz-Zarznela, I. de Blas, I. Girones, O. and Muzquiz, J.L. (2006) *Lactococcus garvieae* in fish A review. Comparative Immunology. Microbiology and Infection Disease. Vol , 29, pp: 177-198.
- 21- Vendrell, D. Luis Balcazar, J. Ruiz-Zarauela, I. de Blas, I. Girones, O. and Luis Muzquiz J. (2007) Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Preventive Veterinary Medicine. Vol , 80, pp: 222-229.

