View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان :

شناسایی گونه های استرپتو کوکوس جدا سازی شده از ماهیان قزل آلا در ایران به روش مولکولی

مجری :
رضا پورغلام

شماره ثبت
٤١٩٧٤

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه/ طرح : شناسایی گونه های استرپتو کوکوس جدا سازی شده از ماهیان قزل آلا در ایران به روش مولکولی
شماره مصوب : ۸۹۱۸۲-۱۲-۷۶-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : رضا پورغلام
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : رضا پورغلام
نام و نام خانوادگی همکاران : فرامرزلالویی،علی اصغر سعیدی، احمد غرقی، محمدجواد تقوی،رضا صفری، عیسی شریف‌پور،ابوالفضل سپهداری،آذین زاهدی
نام و نام خانوادگی مشاوران : -
نام و نام خانوادگی ناظر : حسینعلی خوشباور رستمی
محل اجرا : استان مازندران
تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱
مدت اجرا : ۶ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۲
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : شناسایی گونه های استرپتو کوکوس جدا سازی شده از ماهیان قزل آلا در ایران به روش مولکولی

کد مصوب : ۸۹۱۸۲-۱۲-۷۶-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۱۹۷۴ **تاریخ :** ۹۱/۹/۱۳

با مسئولیت اجرایی جناب آقای رضا پورغلام **دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیمارهای آبزیان می‌باشد.**

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیمارهای آبزیان مورد ارزیابی و با نمره ۱۹/۲ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در :

ستاد □ **پژوهشکده** ■ **مرکز** □ **ایستگاه** □

با سمت رئیس پژوهشکده اکولوژی دریای خزر **مشغول بوده است.**

به نام خدا

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱

۱ - کلیات ۲

۱ – ۱ - جایگاه قزل الای رنگین کمان در صنعت آبزی پروری جهان و ایران ۲

۱ – ۲ - تاریخچه و پراکنش بیماری استرپتوکوکوزیس ۳

۱ – ۳ - مهمترین عوامل باکتریایی ایجاد کننده بیماری استرپتوکوکوزیس ۴

۱ – ۴ - میزبانهای حساس ۴

۱ – ۵ - همه گیری شناسی و آشنایی با عوامل موثر در بروز استرپتوکوکوزیس ۵

۱ – ۶ - بیماریزایی ۶

۱ – ۷ - تشخیص ۷

۱ – ۷ – ۱ - جداسازی و شناسایی اولیه ۷

۱ – ۷ – ۲ - تشخیص تفریقی ۷

۱ – ۷ – ۳ - تشخیص با استفاده از کیتهای تجاری ۹

۱ – ۷ – ۴ - تشخیص مولکولی ۹

۱ – ۸ - چشم انداز استرپتوکوکوزیس در ایران ۱۱

۲ - روش کار ۱۳

۲ – ۱ - نمونه برداری ۱۳

۲ – ۲ - انجام کشت اولیه باکتری ۱۴

۲ – ۳ - خالص سازی و شناسایی اولیه باکتری ۱۴

۲ – ۴ - انجام آزمایشات مولکولی ۱۵

۲ – ۴ – ۱ - استخراج DNA ۱۵

۲ – ۴ – ۲ - تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۱۶

۲ – ۴ – ۳ - طراحی پرایمر ۱۶

۲ – ۴ – ۴ - انجام واکنش PCR ۱۷

۲ – ۴ – ۵ - الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد ۱۸

۲ – ۴ – ۶ - رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با نیترات نقره ۱۹

۲ – ۴ – ۷ - ثبت تصاویر ۲۰

۲ – ۴ – ۸ - هضم آنزیمی محصول PCR ۲۰

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۳ – نتایج ۲۱
۱ – ۳ – نتایج حاصل از ثبت علایم بالینی ۲۱
۲ – ۳ – نتایج حاصل از آزمایشات تشخیص تفریقی ۲۲
۳ – ۳ – نتایج حاصل از آزمایشات مولکولی ۲۳
۴ - بحث ۲۷
منابع ۳۲
چکیده انگلیسی ۳۶

چکیده

بیماری استرپتوکوکوزیس بیماری حاد عفونی است که موجب بروز تلفات در ماهیان پرورشی دریایی و آب شیرین می گردد. یکی از مهمترین میزبانهای حساس به این بیماری قزل آلای رنگین کمان است که پرورش آن در ایران طی دهه گذشته صنعتی رو به رشد بوده است و این امر موجب شده که بر اساس آمار فائو نام ایران در بین ۱۰ کشور مطرح تولید کننده این ماهی معرفی شود. استرپتوکوکوزیس بیماری است که در اثر حضور چندین باکتری از جنس استرپتوکوکوس، واگوکوکوس و انتروکوکوس ایجاد می شود لیکن علایم بالینی بدون در نظر گرفتن نوع عامل مشترک بوده و چهره بالینی یکسانی دارد. بیش از یک دهه از اولین گزارش بروز این بیماری در ایران می گذرد و متاسفانه این بیماری به یکی از معضلات صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان تبدیل شده است. بر همین اساس طی سالهای ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ از ۷۲ مزرعه تکثیر و پروش ماهی قزل آلای رنگین کمان در ۸ استان شامل مازندران، گیلان، لرستان، چهارمحال بختیاری، فارس، کرمانشاه، تهران و کهکیلویه و بویراحمد ۵۲۰ عدد ماهی بیمار و بظاهر سالم با متوسط وزنی ۲۰۰ – ۵۰ گرم نمونه برداری گردید که در آزمایشات اولیه ۲۰۶ عدد آنها مبتلا به بیماری استرپتوکوکوزیس بودند. پس از کشت اولیه و انجام آزمایشات بیوشیمیایی و تستهای تفریقی از ۲۰۶ نمونه، ۱۷۲ نمونه بررسی تحت آزمایشات مولکولی(PCR) قرار گرفت. در نهایت ۵ گونه *S.uberis*، *S.agalactiae* ، *S.dysgalactiae* ، *S.faecium* و *S.iniae* شناسایی شدند. بر اساس نتایج فوق بیشترین فراوانی مربوط به گونه *S. uberis* (جداسازی در ۵ استان از ۷ استان تحت بررسی) و بعد از آن *S. dysgalactiea* (۴ استان از ۷ استان)، *S. agalactia* (دو استان از ۷ استان) و *S. faecium* و *S. iniae* (یک استان از ۷ استان) بود. همچنین قابل ذکر است گونه *S.iniae* فقط در استان فارس شناسایی شد. شایان ذکر است که نمونه مثبتی در استان تهران در این بررسی یافت نشد.

کلمات کلیدی: استرپتوکوکوک، PCR، قزل آلا، ایران

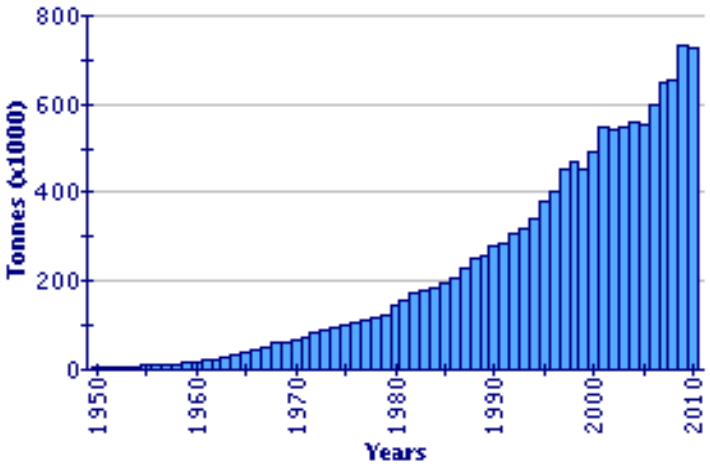
۱ - کلیات

۱ – ۱ - جایگاه قزل الای رنگین کمان در صنعت آبزی پروری جهان و ایران

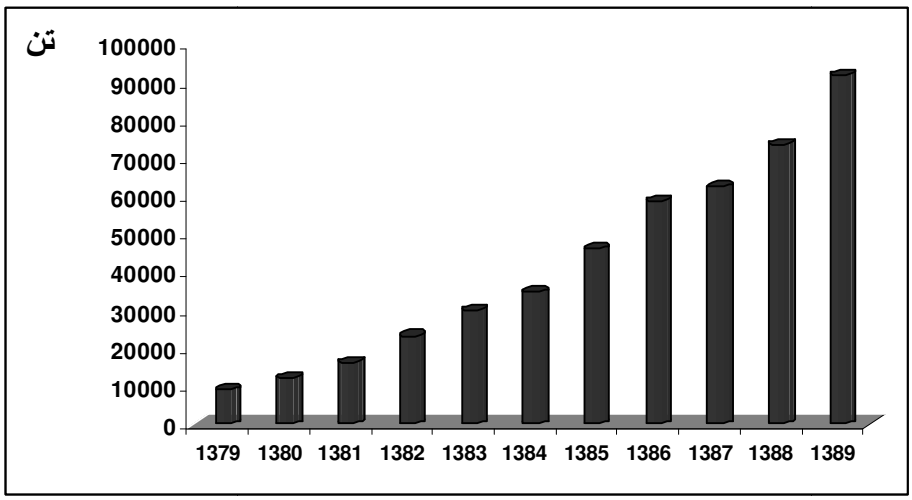
قزل آلای رنگین کمان ماهی مقاومی است که به آسانی تکثیر یافته، به سرعت رشد نموده، مقاومت به دامنه وسیعی از عوامل نامساعد محیطی و دستکاری داشته و ماهیان نورس آن به آسانی به یک جیره مصنوعی عادت میکنند. این ماهی توانایی زندگی در شرایط مختلف، دامنه ای از یک زندگی کوچ رو[1] تا زندگی دائمی در یک محل (دریاچه) را داشته و تحمل دامنه حرارتی ($^{\circ}$C ۲۷ – ۰) وسیعی را دارد لیکن تخم ریزی و رشد آن در دامنه محدود دمایی($^{\circ}$C ۱۴ – ۹) اتفاق می افتد. معمولا حرارت مناسب رشد برای پرورش قزل آلای رنگین کمان می باید کمتر از $^{\circ}$C۲۱ باشد. (Shepherd و Bromage ۱۹۹۲ ، Stevenson ۱۹۸۷).

به همین دلیل است که امروزه این ماهی به عنوان گونه شماره یک اکثر کارگاه های تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بیشتر نقاط جهان درآمده است (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹). تولید قزل الای رنگین کمان بطور تصاعدی از دهه ۱۹۵۰ خصوصا در اروپا و اخیرا در شیلی افزایش داشته است. این مسئله می تواند مربوط به تولید فزاینده این ماهی در آبهای داخلی در کشورهایی مانند فرانسه، ایتالیا، دانمارک، آلمان و اسپانیا جهت استفاده در بازارهای محلی و یا پرورش آنها در قفس در نروژ و شیلی برای صادرات باشد. از مهمترین کشورهای تولید کننده قزل آلای رنگین کمان می توان از نروژ، فرانسه، ایتالیا، اسپانیا، دانمارک، ایالت متحده آمریکا، آلمان، ایران و بریتانیا نام برد. میزان تولید این ماهی در سال ۲۰۱۰ بیش از ۷۰۰ هزار تن بوده است (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en) (نمودار ۱ –۱). در صنعت آبزی پروری ایران نیز این ماهی اهمیت به سزایی داشته و طی چند سال گذشته میزان تولید آن از رشد چشمگیری برخوردار بوده است، بطوریکه آمار بدست آمده از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۹ نشان داده است که تولید قزل آلای رنگین کمان در کشور از ۴۹۹۴ تن در سال ۱۳۷۷ به ۹۲۰۰۰ تن در سال ۱۳۸۹ رسیده است و این به معنی یک افزایش ۱۸/۵ برابری تولید طی ۱۲ سال گذشته است(آمار شیلات ایران ۱۳۸۹، ذریه زهرا ۱۳۸۴) (نمودار۲ – ۱).

[1] - anadromous



نمودار ۱ – ۱ – تولید جهانی قزل آلای رنگین کمان



نمودار ۲- ۱- مقایسه میزان تولید قزل آلای رنگین کمان طی سالهای ۱۳۸۹ – ۱۳۷۷ در کشور

۲-۱- تاریخچه و پراکنش بیماری استرپتوکوکوزیس

یکی از مهمترین بیماریهای عفونی که بیش از دو دهه است موجب بروز خسارات اقتصادی فراروان در مسیر صنعت آبزی پروری شده است عفونتهای استرپتوکوکوسی است که مشکل عمده مراکز تکثیر و پرورش ماهیان در بسیاری از کشورهای دنیا معرفی شده است و تخمین زده شده که موجب خسارات اقتصادی شدید(بیش از ۱۵۰ میلیون دلار در سال) میگردد(Beack و همکاران ۲۰۰۶، Romald و همکاران ۲۰۰۸). این بیماری اولین بار از کشور ژاپن گزارش گردید(Hoshin و همکاران ۱۹۵۸) لیکن بتدریج گزارشات متعددی از بروز آن در کشورهای مختلف مانند سنگاپور(Foo و همکاران ۱۹۸۵)، آفریقای جنوبی(Bragg و Broere ۱۹۸۶)،

استرالیا(Carson و همکاران ۱۹۹۳)، اسپانیا(Toranz و همکاران ۱۹۹۴)، آمریکا (Perera و همکاران ۱۹۹۴)، اسرائیل(Eldar و همکاران ۱۹۹۵)، ایتالیا (Ghittion و همکاران ۱۹۹۵)، فرانسه(Michel و همکاران ۱۹۹۷)، کویت (Evans و همکاران ۲۰۰۲)،کره جنوبی(Baeck و همکاران ۲۰۰۶) و برزیل(Filho و همکاران ۲۰۰۹) ارائه گردیدکه نشان دهنده بروز این بیماری در تمام قاره های دنیا است.

۳-۱- مهمترین عوامل باکتریایی ایجاد کننده بیماری استرپتوکوکوزیس

اصولا بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از حضور عوامل باکتریایی کوکسی شکل گرم مثبت است که آنها را به عنوان جنس استرپتوکوکوس می شناختند. لیکن طی دهه گذشته تغییرات زیادی در طبقه بندی عوامل ایجاد کننده این بیماری رخ داده است. با ایجاد روش‌های تشخیصی جدید بر پایه خصوصیات ژنوتیپی، طبقه بندی جدید ایجاد شده و جنسهای انتروکوکوس، لاکتوکوکوس، واگوکوکوس و کارنوباکتریوم به جنس استرپتوکوکوس افزوده شده است(Venderell و همکاران ۲۰۰۶). از مهمترین عوامل بروز استرپتوکوکوزیس میتوان به موارد ذیل اشاره نمود(Romalde و همکاران ۲۰۰۸).

Enterococcus faecalis , Streptococcus parauberis, Entrococcus faecium,

Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactia, Streptococcus iniae, Lactococcus garvieae, Streptococcus milleri, Vagococcus salmoninarum,

Lactococcus Piscium, S. phocae, S. ictaluri, S. uberis

٤ – ۱ - میزبانهای حساس

طیف وسیعی از ماهیان پرورشی دریایی و آب شیرین و گرمابی و سردآبی به این بیماری حساس هستند. تعدادی از مهمترین میزبانهای حساس در جدول ۱ آمده است(Vendrell و همکاران ۲۰۰۶).

جدول ۱ – معرفی جنس و گونه های ماهیان حساس به بیماری استرپتوکوکوزیس

Scientific name	Common name	Scientific name	Common name
Micropogonias undulatus	Atlantic Croaker	*(Onchorhynchus mikiss*	Rainbow trot
Ictalurus punctatus	Channel catfish	*Pomatomus saltatrix*	Blue fish
Arius felis	Hard hed catfish	*Notemigonus crysoleucas*	Golden shiner
Lagodon rhomboides	Pin fish	*Brevoortia tyrannus*	Menhaden
Salvelinus agassizi	Silver trout	*Cynoscion nebulosus*	Sea trout
Dasyatis sp.	Stingary	*Leiostmus xanthurus*	Spot
Mugil cephalus	Striped mullet	*Morone saxatilis*	Striped bass
Seriola lalandi	yellowtail	*(Helicolenus dactylopterus*	Jacopever
Anguilla japonica	Japanese eel	*Oreochromis sp.*	Tilapia
Paralichthys olivaceus	Olive flounder	*Coris aygula*	Wild wrasse
Seriola dumerili	Amber jack	*Sebastes schlegeli*	Black rock fish

۵-۱- همه گیری شناسی و آشنایی با عوامل موثر در بروز استرپتوکوکوزیس

در بروز بیماری، صرف حضور باکتری بیماریزا در محیط از شرایط لازم است ولی کافی نیست. در این میان شرایط محیطی و نیز وضعیت ایمنی میزبان نیز از شرایط تعیین کننده در بروز بیماری است. بطوریکه با تضعیف ایمنی، شرایط برای ایجاد بیماری فراهم می شود که از این پدیده تحت عنوان استرس نامبرده می شود. بنابراین استرس اغلب نقش مهمی در شیوع بیماریهای عفونی در ماهیان بازی می کند. از مهمترین عوامل استرس زای موثر در بروز استرپتوکوکوزیس میتوان به درجه حرار ت بالاتر و پایین تر از اپتیموم رشد ماهی اشاره نمود(Amal و Zamir-saad ۲۰۱۱). البته باید در نظر داشت خود عوامل ایجاد کننده استرپتوکوکوزیس نیز از نظر دامنه حرارتی رشد و فعالیت به دو گروه گرمابی و سردآبی تقسیم می شوند. عواملی که در حرارت بالاتر از ۱۵ درجه سانتیگراد بیماری ایجاد میکنند شامل Lactococcus garvieae ، Streptococcus iniae ، Streptococcu agalactiae ، Streptococcus parauberis را گرمابی وآنهایی که در دمای کمتر از ۱۵ درجه سانتیگراد بیماریزا هستند مانند Vagococcus salmoninarum وLactococcus piscium سردآبی می نامند(Eldar و Ghittino ۱۹۹۹). در کنار حرارت افزایش شوری و قلیائیت آب(pH>۸)، کاهش اکسیژن محلول، کیفیت پایین آب خصوصا افزایش میزان یون آمونیوم و نیتریت، افزایش تراکم و نیز استرس ناشی از جمع آوری و صید ماهیان از دیگر عوامل مستعد کننده ماهیان به بروز بیماری است(Amal و Zamir-saad ۲۰۱۱). در سراسر سال باکتری در محیط آب و لجن و نیز خلل و فرج موجود در دیواره و کف استخر وجود دارد. این حضور فصلی است بطوریکه در تابستان عمدتا در آب و در پاییز و زمستان در رسوبات است. با توجه به عدم قطعیتی که در طبقه بندی این باکتریها وجود دارد قضاوت

در مورد بیماریزایی عوامل استرپتوکوکی جداشده از آب و رسوبات سخت است ولی درعین حال یک معرف بهداشتی است(Astin و Astin ۱۹۹۹). مطالعات متعددی در خصوص نحوه انتقال عوامل استرپتوکوکی انجام شده است. Nguyen و همکاران(۲۰۰۲) نشان دادند که دو باکتری *S. agalactiae* و *S. iniae* از طریق مدفوع ماهیان بیمار به آب وارد شده و موجب بروز عفونت در ماهیان سالم می شود. لیکن مهمترین راه ورود باکتری به بدن ماهی از طریق آبششها می باشد(Mian و همکاران ۲۰۰۸). به غیر از آبشش، در مطالعاتی نشان داده شده که وجود هرگونه زخم و یا خراشیدگی جلدی نیز راهی مهم در انتقال بیماری است و این مکانیسم معمولا در جایی که میزان تراکم در استخر بالا باشد رخ می دهد(Xu و همکاران ۲۰۰۷). در کنار اینها مسیر گوارشی یا خوراکی راه دیگر آلودگی است. در این مورد انتقال بیماری یا از طریق کانیبالیسم بین ماهیان سالم و بیمار ویا در اثر مصرف ماهیان تازه آلوده و یخ زده که پروسه حرارتی را طی نکرده اند رخ می دهد. در مواردی باکتری بیش از ۶ ماه در شرایط فریزر توانسته زنده بماند(Yanong و Francis-Floyd،۲۰۰۲).

٦-۱- بیماریزایی

عفونتهای ناشی از عوامل استرپتوکوکی منجر به علایم بالینی متعددی می گردد که شامل خونریزی در صفحه آبششی، از دست دادن اشتها، شنای نامتعادل، تیرگی رنگ، خونریزی در چشم و کدورت قرنیه، خونریزی در قاعده باله ها و سرپوش آبششی است. مهمترین علامت در این بیماری بیرون زدگی چشمها بصورت یک یا دو طرفی است که از آن به عنوان چشم برآمده[۲] یاد می شود و نیز اتساع محوطه بطنی است. در کالبد گشایی حضور مایع خونابه ای در محوطه بطنی، بزرگی و پر خونی طحال، رنگ پریدگی و بزرگ شدن کبد، پرخونی کلیه و در مواردی بروز خونریزی در سطح کبد و قلب مشاهده می شود. علاوه بر اینها زخمهای خونریزی دهنده نیز در سطح بدن ممکن است مشاهده شود(Yanong و Floyed ۲۰۰۲، Salvador و همکاران ۲۰۰۵).

[2] - pop eye

۷-۱- تشخیص

۱-۷-۱- جداسازی و شناسایی اولیه

حضور علایم بالینی و وجود کوکسی های گرم مثبت در مغز، کلیه، چشم و دیگر اندامها تشخیص اولیه استرپتوکوکوزیس را میسر می سازد. معمولا کلیه مهمترین اندام جداسازی باکتری است لیکن در مواردی که شنای غیر عادی در ماهیان بیمار مشاهده می شود مغز نیز یکی از مهمترین اندامها جهت جداسازی باکتری است(Yanong و Floyed ۲۰۰۲). جهت کشت اولیه و جداسازی باکتری از محیطهای کشت مختلفی مانند تریپتوز آگار حاوی خون گاو[3](BBTA)، آگار عصاره قلب و مغز[4](BHIA)،TH براث[5]، آگار مغذی حاوی خون خرگوش و آگار خون دار(BA)۶ می توان استفاده نمود. محیط ها پس از کشت در گرمخانه ۳۷ – ۲۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری می شوند. پس از این مدت کلنی هایی با قطر تقریبی ۲ – ۱ میلی متر و به رنگ خاکستری تیره۷ رشد میکنند(Astin و Astin ۱۹۹۹). کلنی تک بدست آمده از یک کشت خالص حاوی کوکسی های گرم مثبت، اکسیداز و کاتالاز منفی که می تواند همولیز از نوع بتا داشته باشد و یا بدون همولیز باشد.

۲ – ۷ – ۱ – تشخیص تفریقی

در انجام تستهای تفریقی آزمایشات متعددی وجود دارد که به شرح ذیل می باشد(Murrey و همکاران ۲۰۰۳)

الف – تخمیر قند و تولید اسید: در این آزمایش توانایی باکتری در تولید اسید از ترکیبات هیدروکربنی (قند) مختلف سنجیده میشود. در این روش قند معین به محیط براث حاوی ادیکاتور (برموکروزل بنفش) افزوده می شود. چنانچه باکتری قابلیت تخمیر قند را داشته باشد بعلت تغییر pH (تولید اسید) رنگ محیط از قرمز به زرد تبدیل می شود.

---

[3] - bovine blood tryptose agar
[4] - brain heart infusion agar
[5] - Tood – Hewitt broth
[6] - blood agar
[7] - dull grey

ب – آزمایش بایل آسکولین: محیط بایل آسکولین محیطی اختصاصی برای باکتریهای کاتالاز منفی است. این محیط اثر مهار کننده بر رشد اکثر باکتریهای گرم مثبت به جز انتروکوکسها دارد. با رشد باکتری آسکولین به آسکولتین و دکستروز تبدیل می شود و اسکولتین تولید شده با کلرید آهن موجود در محیط واکنش داده و ایجاد رنگدانه سیاه میکند.

ج – رشد در حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد: رشد در دو حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد در محیط BHA در تشخیص تفریقی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی یک ابزار تشخیصی مهم است

د – همولیز: قابلیت لیز گلبولهای قرمز از اهمیت خاصی در تشخیص تفریقی استرپتوکوکها برخوردار است. این واکنش با کشت باکتری در محیط حاوی ۵٪ خون گوسفند شناسایی می شود. از نقطه نظر همولیز باکتریها به چند دسته تقسیم می شوند که شامل:

I – همولیز بتا: در این حالت گلبولهای قرمز بطور کامل تخریب شده و در اطراف پرگنه تولید شده یک هاله روشن ایجاد میشود

II – همولیز آلفا: در این حالت در اطراف پرگنه یک هاله تقریبا سبز رنگ در اطراف پرگنه مشاهده می شود.

III – همولیز گاما: هیچگونه تغییری در اطراف پرگنه رشد یافته مشاهده نمی شود.

ه – آزمایش هیدرلیز هیپورات: تعدادی از باکتریها قابلیت تولید آنزیم هیپورات هیدرولاز را دارند که هیپوریت سدیم را به بنزوئیک اسید و گلی سین تجزیه می کند. افزودن کلرید آهن به بنزوئیک اسید موجب تشکیل رسوب قهوه ای رنگ بنزوآت آهن می شود.

و – آزمایش حرکت: این آزمایش در خصوص حرکت باکتری در یک محیط نیمه جامد(ژل) است که تستی مفید در تشخیص تفریقی است. این آزمایش خصوصا در شناسایی انترکوکها مفید است

ز – آزمایش مقاومت به نمک ۶/۵٪: بعضی از باکتریها قابلیت رشد در محیط حاوی ۶/۵٪ نمک طعام را دارند در حالیکه این غلظت اثر مهار کنندگی بر رشد دیگر باکتریها دارد.

ح – هیدرولیز اوره: اوره به عنوان منبع نیتروژن در باکتری هایی که اوره آز ایجاد می کنند می باشد و با مصرف اوره و تغییر در pH محیط اندیکاتور محیط(فنل رد) از قرمز به زرد تبدیل می شود.

ط – آزمایش VP (Voges – Proskauer): نتیجه انجام این واکنش تولید استیل متیل کربینول است. از این آزمایش در جهت تفریق جنس و گونه های مختلف کوکسیهای گرم مثبت استفاده می شود.

ی – هیدرولیز آرژنین: بعضی از باکتریها قابلیت هیدرولیز آرژنین را دارند. نتیجه این هیدرولیز قلیایی شدن محیط است که در نتیجه آن رنگ محیط تغییر می کند. این آزمایش برای تشخیص تفریقی باکتریها تست بسیار مناسبی است.

۳-۷-۱- تشخیص با استفاده از کیتهای تجاری

کیتهای تشخیصی سریع مانند API 20E، API Rapid Strp 32 و API CH50 نمی توانند در تشخیص *S. iniae* مورد استفاده قرار بگیرند چون اطلاعات پایه این باکتری در این کیتها موجود نیست. لیکن این کیتهای تشخیصی سریع قابل استفاده در شناسایی *S. agalactiae*، و دیگر گونه های استرپتوکوک هستند (Evans و همکاران ۲۰۰۶a).Jayarao و همکاران (۱۹۹۱) مقایسه ای را بین سیستم تشخیصی Vitek-Gram positive و سیستم API Rapid Strp 32انجام دادند و متوجه شدند که ۹۳٪ از نمونه های *S. agalactiae* با استفاده از این دو کیت قابل شناسایی است. مقایسه بین API Rapid Strp 32 و سیستم Biology با استفاده از Gram-positive plate نشان داد هر دو سیستم قادر به شناسایی ۱۰۰٪ نمونه های S. agalactiae هستند(Evans و همکارانb ۲۰۰۶). لیکن سیستم Biology با استفاده از Gram-positive plate تنها قادر است ۷۰٪ نمونه های *S. iniae* را به درستی شناسایی کند(Roach و همکاران ۲۰۰۶).

٤-۷-۱- تشخیص مولکولی

بیش از یک دهه است که از روشهای مولکولی با استفاده از تکنیکهای مختلف PCR جهت شناسایی عوامل ایجاد کننده استرپتوکوکوزیس استفاده می شود. در بسیاری از تکنیکهای PCR از ژن 16S rRNA به عنوان مارکر مولکولی جهت شناسایی *S. iniae* استفاده می شود(Zlotkin و همکاران ۱۹۹۸). مارکر دیگری که مورد استفاده است intergenic spacer region(ISR) در دو ناحیه 16S و 23S از rDNA است که یک ابزار تشخیصی مهم برای گونه های استرپتوکوکوس است. تفاوت سکانس این نواحی باعث شده که از آن جهت تشخیص گونه های

مختلف استفاده گردد. تکثیر این نواحی و برش آنها با آنزیم یا RFLP – PCR یک ابزار تشخیصی دقیق است(Eldar و همکاران ۱۹۹۷). به غیر از ژن rDNA ناحیه 16S از ژنهای دیگری مانند ژن لاکتات دهیدروژناز (lctO) استفاده شده است. از آنجایی گاهی که بخاطر شباهتهای فیلوژنیکی طراحی یک پرایمر خاص بر اساس این ژن مشکل است بهتر است از ژنهایی استفاده شود که از اشتراک کمتری برخوردار هستند. ژن (lctO) فقط در بین *S.iniae* و S.equi subsp zooepidermis مشترک است(Mata و همکاران ۲۰۰۴a). لیکن برای شناسایی خصوصیات دیگر و یا در واقع پلی مورفیسمی که منجر به ایجاد تیپهای مختلف بر اساس نواحی جغرافیایی و یا حتی نوع میزبان میشود از RAPD – PCR استفاده میگردد. امروزه این روش، روشی کاربردی در تحقیقات اپیدمیولوژیکی است. با این روش خط سیر عفونت، منشا و نیز کلون های ثابت ایجاد کننده عفونت در مزارع و نواحی مختلف شناسایی می شود(Romald و همکاران ۱۹۹۹). از آنجایی که گاهی بروز استرپتوکوکوزیس می تواند ناشی از چند عامل باشد، جهت شناسایی بهتر و در مدت زمان کوتاهتر روشهای multiplex PCR ابداع شد که هم زمان چند جنس و گونه را شناسایی می کند. برای مثال Mata و همکاران(b۲۰۰۴) توانستند یک multiplex PCR طراحی کنند که بوسیله آن سه عامل بروز استرپتوکوکوزیس در ماهیان گرمابی شامل *S. iniae* ،*S. difficilic*(agalactiae) و *S. parauberis* را شناسایی کند. این روش نه تنها در نمونه خالص باکتری بلکه در بافت ماهی نیز قادر به ردیابی پاتوژنهای فوق بود. در کنار تکنیکهای مولکولی جهت تایید تشخیص معمولا از روشهای دیگی نیز استفاده می شود که می توان به تکنیک indirect fluorscent antibody techniqe (IFAT) اشاره نمود که با استفاده از مونوکلنال آنتی بادی روشی بسیار حساس، دقیق با ویژگی بالا است. از این روش در Klesius و همکاران (۲۰۰۶) جهت شناسایی S.iniae استفاده نمودند. این روش قادر است تا ۱۰ باکتری را شناسایی کند. با توجه به خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری نیاز به روشی سریع و آسان برای تشخیص میباشد. از این روش برای تشخیص باکتری بدست آمده از کشت آب، رسوبات، وسایل پرورش، غذای ماهی و نیز پوست ماهی می توان استفاده کرد.

۸-۱- چشم انداز استرپتوکوکوزیس در ایران

وجود بیماری استرپتوکوکوزیس در ایران برای اولین بار با عاملیت باکتری *S. fecium* از یکی از مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان منطقه هراز در استان مازندران گزارش گردید(قیاسی و همکاران ۱۳۷۹) و بعد از آن بیماری با عاملیت *S. iniae* در استان فارس گزارش شد(اخلاقی و کشاورزی ۱۳۸۱) و بتدریج نه تنها بروز بیماری بلکه شیوع و تنوع عوامل ایجاد کننده آن نیز افزایش یافت. قلی پور کنعانی و همکاران (۱۳۸۶و ۲۰۰۹) بروز استرپتوکوکوزیس را با جداسازی باکتری *S. fecium* از استان خراسان گزارش کرده است. در مطالعه دیگری در استان مازندران جداسازی *S. fecium* گزارش شده است (قیاسی و زاهدی۱۳۸۶). سلطانی و نیکبخت بروجنی(۱۳۸۶) طی یک مطالعه اپیدمیولوژیکی دو ساله نشان دادند که استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه دو باکتری بسیار مهم در برخی از مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان استانهای مطرح در تولید این ماهی در ایران هستند. موسوی (۱۳۸۶) طی یک بررسی یک ساله از ۱۲ مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران مبادرت به شناسایی باکترهای گرم مثبت بیماریزا پرداخت. در این بررسی پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی باکتریهای *S. milleri* ،*S. agalactiae* ،*S. iniae* ،*Enterococcus fecalis* شناسایی شدند. در مطالعه ای دو ساله بر روی عوامل رایج استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در استان فارس از ۴ مزرعه ۶۰۰ عدد ماهی واجد علایم بالینی نمونه برداری و از کلیه، مغز و کبد آنها کشت تهیه گردید. در مجموع ۴۸۰ پرگنه بدست آمد که از این تعداد ۳۹۰ نمونه *S. iniae* و ۹۰ نمونه *L. garvieae* شناسایی شد(Soltsni & Tarahomi ۲۰۰۹). در بررسی تعداد دیگری در استان اصفهان ۷۲ عدد ماهی با وزن ۲۰۰ – ۱۵۰ گرم واجد علایم بالینی از ۶ مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان نمونه برداری و در آزمایشگاه از کلیه و کبد آنها کشت میکروبی انجام دادند. از تمام نمونه های فوق باکتری استرپتوکوکوس جدا سازی شد(Mohammadi Arani و Moghadas ۲۰۰۹). در بررسی علل تلفات ایجاد شده در سه مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان با علایم بالینی مشکوک به استرپتوکوکوزیس در منطقه سندگان استان چهار محال بختیاری پس از کشت و خالص سازی باکتری با استفاده از روش PCR و دو پرایمر pLG1 و pLG2 مشخص شد باکتری عامل بیماری *L. garvieae* بوده است(Fadaeifard و همکاران ۲۰۰۹). در بررسی دیگری بروز بیماری و تلفات در قزل آلای رنگین کمان پرورشی ناشی از باکتری استرپتوکوکوس از استان همدان گزارش شده است(Habibipour و Bayat ۲۰۰۹). هوشمند و حقیقی(۱۳۸۸) در

بررسی علل تلفات یک مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان در غرب استان گیلان توانستند باکتری *S. disgalacteae* را جداسازی و شناسایی نمایند.. در تحقیق دیگری وضعیت بیماری استرپتوکوکوزیس در استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت که طی آن از ۱۰۲ مزرعه پرورش ماهیان قزل آلای رنگین کمان ۲۲ مزرعه واجد ماهیانی بودند که علایم بیماری را داشته و در بررسیهای باکتری شناسی وجود باکتری استرپتوکوس اثبات شد(Shahbazian و همکاران ۲۰۱۰).

Heydarynezhad و همکاران (۲۰۱۰) در یک ارزیابی در بر پایه تکنیکهای PCR و هیستوپاتولوژی به شناسایی عامل بروز استرپتوکوکوزیس در شهر ایلام پرداختند. در این بررسی بر پایه متد مولکولی باکتری بیماریزا در سه مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان در این شهرستان *L. garvieae* شناسایی شد. در یک مطالعه اپیدمیولوژی استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در مراکز تکثیر و پرورش قزل آلا در ایران تعداد ۱۰۸ نمونه کوکسی گرم مثبت از ماهیان بیمار قزل آلای رنگین کمان ۷ استان کشور طی سالهای ۲۰۰۹ – ۲۰۰۸ جمع آوری گردید. در بررسی اولیه از تستهای تفریقی و بیوشیمیایی ۴۹ نمونه(۴۵/۳۷٪) *S. iniae* و ۳۷ نمونه(۳۵/۲٪) *L. garvieae* و ۲۲ نمونه نیز استرپتوکوکوس با گونه نامشخص شناسایی گردید. لیکن در بررسی با روش PCR برای یافتن باند اختصاصی ۵۰۰bp ، ۶۴ نمونه(۵۹/۲٪) S. iniae و ۴۴ نمونه(۴۰/۸٪) *L. garvieae* شناسایی شدند(Haghighi Khiabania و همکاران ۲۰۱۰).

۲ - روش کار

۱ – ۲ - نمونه برداری

نمونه برداری از ماهیان بیمار و در حال مرگ و نیز ماهیان به ظاهر سالم از مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی ۸ استان مازندران، گیلان،کرمانشاه،لرستان،چهارمحال بختیاری،کهگلویه و بویر احمد، تهران و فارس در گروه وزنی ۲۰۰ – ۵۰ گرم و طی فصل تابستان طی سالهای ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ انجام گردید. اطلاعات مربوط به تعداد مزارع، تعداد نمونه اخذ شده و تعداد نمونه های مثبت در جدول ۱ – ۲ آورده شده است.

جدول ۱– ۲ – اطلاعات مربوط به تعداد مزارع انتخاب شده، مزارع واجد علایم بیماری، نمونه اخذ شده و تعداد نمونه به تفکیک هر استان

استان	تعدادمزارع انتخاب شده	تعداد مزارع واجد علایم	تعداد نمونه اخذ شده	تعداد نمونه های مثبت
مازندران	۲۲	۱	۷۲	۵
گیلان	۶	۶	۳۰	۳۰
لرستان	۱۹	۱۰	۴۶	۲۰
چهارمحال بختیاری	۱۱	۷	۲۱۸	۷۰
فارس	۳	۲	۳۳	۲۱
کرمانشاه	۱	۱	۱۰	۱۰
تهران	۱	۰	۱۱	۰
کهکیلویه و بویراحمد	۹	۵	۱۰۰	۵۰
جمع	۷۲	۳۲	۵۲۰	۲۰۶

تصویر ۱ – ۲

تصویر ۲ –۲

تصاویر ۱ – ۲ و ۲ –۲ – نمایی از مزارع مورد نمونه برداری به ترتیب در استانهای لرستان و مازندران

۲-۲- انجام کشت اولیه باکتری

پس از اخذ نمونه ها، ماهیان از نظر علایم ظاهری مورد بررسی قرار گرفتند و سپس در شرایط استریل کالبد گشایی شدند و پس از شکافتن محوطه بطنی اندامهای داخلی بررسی شد. سپس با استفاده از آنس استریل از سه بافت کبد ،کلیه و طحال در دو محیط BHA و تریپتوکاز سوی آگار (TSA) کشت خطی جهت جداسازی باکتری انجام گردید(Astin و Astin ۱۹۹۹) و پلیت های کشت داده شده به مدت ۲۴الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و پس از مشاهده رشد باکتری در محیط، پلیتها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی پژوهشکده منتقل گردید.

۲-۳- خالص سازی و شناسایی اولیه باکتری

پس از انتقال پلیتهای کشت داده شده به آزمایشگاه میکروب شناسی پژوهشکده از پرگنه رشد یافته در سطح پلیتهای اولیه مجددا کشت در دو محیط BHA و TSA انجام گردید و پس از گرمخانه گذاری بمدت ۲۴ ساعت و مشاهده کلنی های تک آزمایشات اولیه شناسایی شامل تست کاتالاز و رنگ آمیزی گرم برای هر نمونه خالص انجام گردید. پس از این مرحله با مشاهده کوکسی های زنجیره ای گرم مثبت و نتیجه منفی تست کاتالاز جنس استرپتوکوک تایید گردید. پس از این مرحله آزمایشات تفریقی جهت شناسایی گونه باکتری انجام گردید.
آزمایشات تفریقی که در این مرحله انجام گردید شامل:
کشت در محیط blood agar جهت تعیین همولیز، تخمیر قند و تولید اسید از قندهای مانیتول سوربیتول، لاکتوز، سوکروز، رافینوز، ترهالوز، ریبوز و سالیسین، رشد در حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد، آزمایش مقاومت در مجاورت ۶/۵٪ NaCl، هیدرولیز هیپورات و اوره، وژز پروسکوئر(VP)، آزمایش بایل آسکولین، هیدرولیز آرژنین، تست حرکت و تولید اندول، مصرف سیترات، تجزیه ژلاتین و احیا نیترات بودند. پس از شناسایی اولیه نمونه باکتری های خالص شده جهت انجام آزمایشات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

٤-۲- انجام آزمایشات مولکولی

۱-٤-۲- استخراج DNA

استخراج DNA با بهینه سازی روش فنل – کلروفرم انجام گردیده است(Fevolden & Pogson, 1997).

الف - در این مرحله حدود ۵ کلنی با استفاده از آنس استریل از محیط کشت برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر متلاشی کننده (STE) منتقل کرده و در بن ماری ^{o}C ۳۷ به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. Tris موجود در بافر نقش بافری دارد، EDTA به عنوان مهار کننده آنزیم های نوکلئاز و SDS موجود در آن نیز به عنوان حل کننده چربیهای موجود در غشاء سلول عمل می کند.

ب – پس از گرمخانه گذاری به تیوب به اندازه هم حجم مایع موجود (۵۰۰ میکرولیتر) فنل اضافه گردید و به شدت تکان داده شد و سپس با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ انجام گردید.

ج - سپس مایع شفاف رویی را به لوله اپندروف دیگری منتقل شده و هم حجم آن محلول کلروفرم اضافه گردید و پس از تکان دادن با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ انجام شد.

د – مجددا مایع شفاف رویی برداشت و به اپندروف دیگری منتقل شده و یک دهم حجم آن نمک استات سدیم ۳ مولار و دو برابر حجم کل الکل مطلق سرد افزوده شد و به مدت نیم الی ۲ ساعت در فریزر ۲۰- قرار داده شد تا سرما به رسوب DNA کمک می کند. پس از این مرحله تیوبها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند.

ه – سپس مایع رویی تخلیه و رسوب حاصل با ۱۰۰ میکرولیتر الکل اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد. این عمل به منظور حذف املاح از DNA صورت گرفت. پس از اضافه نمودن اتانل ۷۰٪ ، چند بار به انتهای اپندروف ضربه زده و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید.

و- بعد از سانتریفوژ مایع رویی تخلیه و اپندروف حاوی DNA به مدت ۲۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفت تا اتانل موجود در آن کاملاً تبخیر گردید.

ز- پس از خشک شدن لوله ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به اپندروف اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا DNA موجود در ته لوله کاملاً در آب حل گردد، بدین ترتیب DNA خالص شده جهت انجام PCR به دست آمد.

۲-٤-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری استفاده گردید. به این منظور پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومترCECIL (مدل ۲۰۴۰DE) با آب مقطر، ۲۰ میکرولیتر DNA ژنومی به وسیله آب مقطر به حجم ۳۰۰µL رسانده شد، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر و نسبت A260/280 به وسیله دستگاه اندازه‌گیری و ثبت شده و در پایان غلظت DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

غلظت DNA بر حسب ng/ml = ۵۰× D × A260

A = میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر

D = نسبت رقت ۶۰=۲۰/۳۰۰۰

اگر نسبت جذب A1/A2=۱/۸ باشد DNA مناسب است و اگر A1/A2>۱/۸ باشد DNA دارای ناخالصی RNA است و اگر نسبت جذب A1/A2< ۱/۸ باشد نشان دهنده ناخالصی با فنل و پرتئین است.

۳- ٤ – ۲ - طراحی پرایمر

برای انجام واکنش PCR نیاز به پرایمرهای اختصاصی هر گونه بود لذا برای طراحی پرایمر از توالی ژنهای 16S RNA و گلوکوکیناز گونه های مختلف استرپتوکوکوس استفاده شد. برای این منظور ۵ جفت پرایمر طراحی و ساخته شد(جدول ۲ –۲)

جدول ۲ –۲ - توالی پرایمرهای طراحی شده برای شناسائی گونه های استرپتوکوک

Primer	Sequence (5`…..3`)	Gene	Annealing
STRP	TAGGAGAGAGCTACTCGTTG TTACTAGCGCTAGCTGTCTC	16S RNA	69˚C
STRA	GATGCTCAATCGCTATATGGA GTACAGTGTAGATCTCCATTG	Glucose kinas	64˚C
Bac RNA	TCCCCACAGGACTTGCAACCTGGAGGACAG GACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG	16S RNA	66˚C
ENR	TCGCTGAGCGGTAATGGTGC GATATCCTTTCTGAATGTAGG	16S RNA	64˚C
STRP1	GAGACTCTGCTAGGAAATTC TTGATACGAGATTCCCTGCC	16S RNA	57˚C

با توجه به اینکه طراحی بعضی از پرایمرها به صورت کاملاً اختصاصی برای هر گونه با مشکل مواجه بود، از هضم آنزیمی با آنزیم های برش دهنده استفاده شده است. برای این منظور محصول PCR با پرایمر ENR را با آنزیم *XhOI* برش داده ، در صورتیکه قطعه ای به طول ۱۶۳ جفت باز ایجاد گردد، نمونه مورد نظر *S.parauberis* است و در صورتیکه آنزیم *XhOI* بر روی محصول PCR محل قطع نداشته باشد، گونه *S.faecium* می باشد. همچنین محصول PCR ایجاد شده با پرایمر STRP اگر با آنزیم *DraIII* قطع گردد و قطعاتی به طول ۱۱۰ و ۱۵۰ جفت باز ایجاد شود، نمونه *S.dysgalactae* و اگر آنزیم با همین پرایمر محل قطع نداشت، نمونه *S.uberis* می باشد(جدول ۳ – ۲).

جدول ۳ –۲ - طول قطعات محصول PCR با استفاده از هر یک از پرایمرها

	طول قطعات (جفت باز)					
پرایمر	*S. parauberis*	*S. faecium*	*S. uberis*	*S. agalactiae*	*S. dysgalactiae*	*S. iniae*
Bac RNA	۶۷۵	۶۷۵	۶۷۵	-	۶۷۵	-
ENR	۵۴۰	۵۴۰	-	-	-	-
STRA	-	-	-	۴۳۰	-	-
STRP	-	-	۲۶۰	-	۲۶۰	-
STRP1	-	-	-	-	-	۵۵۴

٤ – ٢ – انجام واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از ۵ µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰µM، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ mM، ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰µl برسد، انجام شد.

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب واسرشته سازی (Denaturation) ، ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه ، اتصال پرایمر (Annealing) ،۶۴ تا ۶۹ درجه سانتیگراد بمدت ۴۵ ثانیه وبرای بسط واکنش (Extention) ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است. کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر pb DNA ۵۰ و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

۵ – ٤ – ۲ - الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه قطعات حاصل از PCR با مقایسه با مارکر DNA (pBR322 DNA/AluI Marker, 20, MBI Fermentas) بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد و با روش رنگ آمیزی نیترات نقره بدست آمد. از آنجایی که حساسیت ژل پلی‌اکریل‌آمید ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر ژل آگارز می‌باشد. در تحقیق حاضر از این ژل برای بررسی نتایج PCR استفاده گردید. جهت تهیه ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد ابتدا ۳۱ میلی‌لیتر آب مقطر را با ۱۳/۵ میلی‌لیتر پلی‌اکریل‌آمید ۳۰ درصد و ۴/۵ میلی‌لیتر بافر TBE (10X) در داخل بالن دارای بازوی جانبی مخلوط ریخته و به مدت ۴ دقیقه توسط دستگاه کمپرسور هواگیری شِد و سپس ۳۸۵ میکرولیتر از محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر از محلول TEMED به مخلوط قبلی اضافه شده این ترکیب در فضای بین دو شیشه که از طرفین و قسمت زیری مسدود و از قسمت بالایی نیز شانه‌ای را در فضای بین خود جا داده ریخته شد، جلوگیری از ایجاد حباب هوا در این مرحله کاملاً الزامی است. مدت زمان لازم برای پلیمریزه شدن این ژل حدود ۳۰ دقیقه بوده و بعد از این مدت شانه به آرامی از قسمت بالایی خارج و بعد از شستشوی چاهک‌های ایجاد شده توسط محلول TBE (1X) (بافر الکترود)، نمونه‌های PCR را به ترتیب در محل چاهک‌ها ریخته، و ژل در ستون عمودی بافر TBE (1X) قرار گرفت بطوری که ژل در بین دو مخزن بافر قرار گرفته و تنها ارتباط بین این دو بافر از طریق ژل میسر باشد. زمانی که دستگاه به مولد برق با ولتاژ ۱۵۰ ولت وصل می‌گردد به مخزن بالا قطب مثبت و به مخزن پایین قطب منفی وصل می‌شود که باعث برقراری جریان از سمت مخزن بالا به سمت مخزن پایین و حرکت نمونه‌های لود شده در چاهک در این مسیر می‌شود و قطعات DNA تکثیر شده براساس وزن مولکولی خود در طول ژل از هم جدا شوند، الکتروفوز نمونه‌ها در مدت ۳ ساعت انجام شد. جهت نمایان شدن باندهای DNA از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد و برای اطمینان از تکرارپذیری نوارها آزمایش سه الی چهار بار در شرایط یکسان تکرار گردید.

٦- ٤ – ٢ - رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با نیترات نقره

جهت رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید سه نوع محلول بصورت زیر تهیه شدند:

محلول A : بافر اسید استیک ۰/۵ درصد و اتانول ۱۰ درصد

اتانول	۴۰ میلی‌لیتر
اسید استیک	۲ میلی‌لیتر
آب مقطر	۳۶۰ میلی‌لیتر

محلول B، بافر نیترات نقره ۰/۱ درصد

نیترات نقره	۰/۲ گرم
آب مقطر	۲۰۰ میلی گرم

محلول C، بافر فرمالدئید ۰/۱۵ درصد، NaBH4 ۰/۱ درصد و NaOH ۴/۵ درصد

NaOH	۴/۵ گرم
NaBH4	۰/۰۳ گرم
آب مقطر	۳۰۰ میلی لیتر
فرمالین	۱/۲ میلی لیتر

لازم به ذکر است که جهت تهیه محلول شماره ۳ (محلول C) ابتدا هیدروکسید سدیم را در آب مقطر حل و سپس مواد دیگر بر روی آنها ریخته می‌شود.

پس از اتمام زمان الکتروفورز ژل از صفحات شیشه‌ای با یک کاردک جدا و جهت رنگ آمیزی ابتدا دو بار و در هر بار به مدت ۳ دقیقه ژل در داخل محلول A بر روی شیکر قرار گرفت، سپس به مدت ۱۰ دقیقه به محلول B منتقل در پایان این مدت دو بار و هر بار بمدت ۱ دقیقه با آب مقطر شستشو شد. در نهایت بمدت ۱۰ دقیقه یا تا زمانی که باندها بصورت نوارهای تیره رنگی دیده شوند در محلولC قرار داده شد. ژلهای رنگ آمیزی شده به درون پوشش پلاستیکی منتقل و جهت نگهداری پرس شدند.

۷ – ٤ – ۲- ثبت تصاویر

تصاویر ژل پلی‌اکریل‌آمید پس از رنگ آمیزی ابتدا توسط دستگاه مستند سازی ژل[8] ترانس ایلومیناتور مدل DOC008.XD ساخت کمپانی UVI همراه با برنامه نرم‌افزاری UVI DOC Version V.99.04 ثبت و ذخیره گردید.

۸ – ٤ – ۲ - هضم آنزیمی محصولPCR

برای هضم آنزیمی محصول PCR مقدار ۸µl–۵ از محصول PCR را در یک میکروتیوپ ۵۰۰ میکرولیتری ریخته و مقدار ۱µl آنزیم محدودگرو ۲µl بافر آنزیم به آن اضافه و سپس با dH2O حجم نهایی به ۲۰µl رسانده شد. سپس لوله‌ها بمدت ۳–۲ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت، کلیه نمونه‌ها با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد، همراه با مارکر ۵۰bp DNA الکتروفورز و الگوهای هضم آنزیمی محصولات PCR با رنگ آمیزی نیترات نقره قابل مشاهده گردیدند.

[8]- Gel documentation

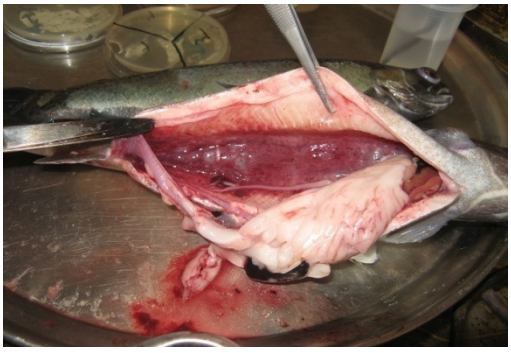
۳ – نتایج

۱ – ۳ – نتایج حاصل از ثبت علایم بالینی

بر اساس نتایج حاصل از ثبت علایم بالینی، ماهیان بیمار علایمی چون تیرگی رنگ، خونریزی در اطراف کره چشم، صفحات آبششی و قاعده باله ها، بیرون زدگی چشم بصورت یک یا دو طرفه، کدورت قرنیه، شنای نامتعادل، اتساع محوطه بطنی و زخم در سطح بدن داشتند. لیکن در بین نشانه های مشاهده شده خونریزی در صفحات آبششی، بیرون زدگی چشم و تیرگی رنگ اصلی ترین علایم بالینی مشاهده شده بود که در ۹۰٪ موارد ثبت شده وجود داشت. لیکن شنای نامتعادل علامتی بود که کمترین درصد مشاهده(کمتر از ۱۰٪) را بخود اختصاص داد.

تصویر ۱ – ۳ – نمایی از ماهیان بیمار

تصویر ۲ –۳ – نمایی از اگزافتالمی دو طرفی

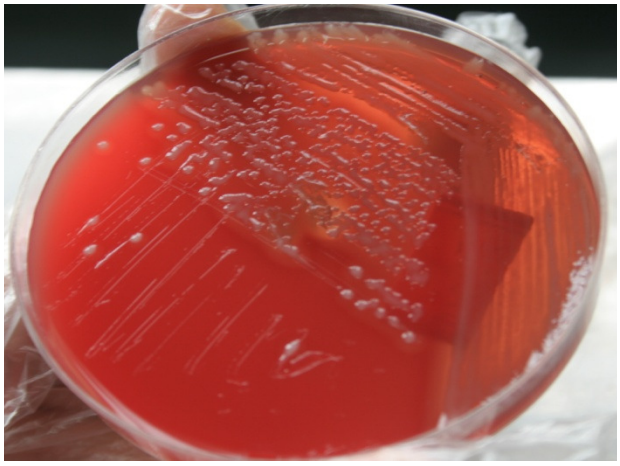


تصویر۳ –۳ – تجمع مایع خونابه ای در شکم

تصویر ٤ – ۳– وجود زخم در بدن

۲ – ۳ – نتایج حاصل از آزمایشات تشخیص تفریقی

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات باکتری شناسی ، از تعداد ۵۲۰ نمونه، ۲۰۶ نمونه یعنی ۴۰٪ عوامل باکتریایی جداسازی شده استرپتوکوک تشخیص داده شد که نتایج آزمایشات و گونه های تشخیص داده شده در ذیل آمده است(جدول ۱ –۳).



تصویر ۵ – ۳ – نمایی از کشت باکتری در محیط Blood agar

تصویر ٦ – ۳ – نمایی از باکتری رنگ آمیزی شده با رنگ گرم

جدول ۱ –۳ - خصوصیات بیوشیمیائی گونه های مختلف استرپتوکوکوس

	S. faecium	*S. uberis*	*S. agalactiae*	*S. dysgalactiae*	*S. iniae*
Gram - staining	+	+	+	+	+
Catalase production	-	-	-	-	-
haemolysis	α	γ	γ	β	β
Production of arginine dihydrolase			-		
Motility test	+	+	+	+	+
Nitrate reduction			-		-
Indole production	-		-		
Citrate utilization	-		-		
Urease production	-			-	
Vogesproskauer reaction	+	+	+	-	-
Aesculin hydrolases	+	+	-	v	+
Degradation of gelatin	-		-		-
Oxidative-fermentative test	F	F	F	F	F
Acid production from arabinose	+	-	-	-	-
Acid production from glucose	+	+	+	+	+
Acid production from inositol	-	-	-		-
Acid production from maltose	+	+	+		+
Acid production from manitol	+	+	-	-	+
Acid production from mannose	+	+	+		+
Acid production from salicin	+	+	-	v	+
Acid production from sorbitol	-	+	-	-	-
Acid production from trehalose	+	+	+	+	+
Acid production from xylose	-	-	-		-
Growth at macconkey			-		
Temperature	10^{oC}-50^{oC}	10 ^{oC} -37 ^{oC}	25 ^{oC} -37 ^{oC}	25 ^{oC} -37 ^{oC}	10 ^{oC} -37 ^{oC}
Growth on NaCl	0-%6.5	0-%6.5	0-%3	0-%4	2-%4
Hipporatesudium	+	+	+	-	-

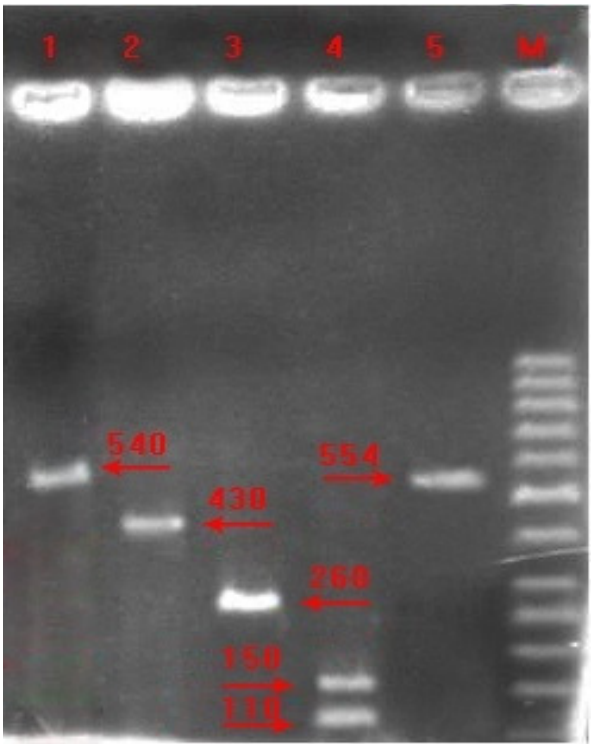
۳ – ۳ – نتایج حاصل از آزمایشات مولکولی

در این بررسی برای شناسائی نهائی گونه های مورد مطالعه از روش مولکولی استفاده گردید. برای این منظور از تک کلونی های کشت داده شده، برای استخراج DNA استفاده شد. در مجموع تعداد ۱۷۲ نمونه DNA از ۲۰۶ نمونه مثبت استرپتوکوک استخراج گردید و واکنش PCR برای کلیه نمونه ها با استفاده از ۵ پرایمر طراحی شده، انجام شد. پس از الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی برخی از نمونه ها ، وزن مولکولی قطعات DNA اندازه گیری و براساس آن شناسایی گونه ها انجام گرفت(شکل ۱) .

با توجه به نتایج جدول ۲-۳ ، محصول PCR نمونه های استان چهار محل بختیاری با پرایمرBacRNA ، ۶۷۵ باز بود که سپس با پرایمر STRP واکنش PCR انجام شد. محصول PCR با آنزیم *DraIII* قطع گردید و قطعه ای با ۲۶۰ جفت باز ایجاد گردید که نتیجه می شود نمونه مورد نظر *S.uberis* می باشد.

همچنین این محصول با پرایمر STRP واکنش PCR انجام و محصول آن با آنزیم *DraIII* قطع گردید و قطعه ای با ۲۶۰ جفت باز ایجاد گردید که در نتیجه نمونه های بدست آمده *S.uberis* تشخیص داده شد. همچنین این باکتری در نمونه های استانهای گیلان ، کهگیلویه وبویراحمد ، کرمانشاه و فارس نیز به همین ترتیب شناسایی شد.

محصول PCR بدست آمده با پرایمر ENR ، با آنزیم *XboI* برش داده شدند در هر واکنش که آنزیم فقط دریک جا محل قطع داشته باشد و در نتیجه قطعه ای با وزن مولکولی bp ۵۴۰ ایجاد گردد، گونه مورد نظر، *S.faecium* می باشد. محصول PCR بدست آمده با پرایمر ENR که در مجاورت آنزیم *DraIII* هضم آنزیمی گردد در صورتیکه دو قطعه با وزن مولکولی bp ۱۵۰ و bp ۱۱۰ بدست آید، به عنوان *S.dysgalactia* معرفی میگردد. نتایج حاصل از این شناسایی در شکل۷-۳ و جدول ۱ -۳ و ۲ -۳ آورده شده است. در نهایت طی این بررسی ۵ گونه *S.uberis*، *S.agalactiae* ، *S.dysgalactiae* ، *S.faecium* و *S. iniae* شناسایی شدند. بر اساس نتایج فوق بیشترین فراوانی مربوط به گونه *S. uberis* (جداسازی در ۵ استان از ۷ استان تحت بررسی) و بعد از آن *S. dysgalactiae* (در ۴ استان از ۷ استان)، *S. agalactiae* (در دو استان از ۷ استان) و *S. faecium* و *S. iniae* (در ا استان از ۷ استان) بود. همچنین قابل ذکر است گونه *S.iniae* فقط در استان فارس شناسایی شد.



شکل ۷- ۳ - الگوی باندی محصول PCR گونه های مختلف استرپتوکوکوس بر روی ژل آگارز

ستون۱: S. Faecium ، ستون۲: S. agalactiae ، ستون۳: S. uberis ، ستون٤: S. dysgalactiae ، ستون۵: S. iniae ، ستون M : مارکر

جدول ۲- ۳ – نتایج مربوط به پراکندگی گونه های استرپتوکوکوس به تفکیک هر استان

استان	*S. uberis*	*S. agalactiae*	*S. faecium*	*S. dysgalactiae*	*S. iniae*
چهار محال بختیاری	۳۰				
مازندران		۱	۴		
گیلان	۳	۱۹		۸	
کهگیلویه و بویراحمد	۱۵			۳۵	
کرمانشاه	۳			۷	
لرستان				۲۰	
فارس	۱۶				۱۱
جمع	۶۷	۲۰	۴	۷۰	۱۱

جدول ۳ – ۳ – نتایج حاصل از تشخیص نهائی گونه های استرپتوکوکوس آزمایشات PCR با استفاده از پرایمرو آنزیمهای مختلف

استان	هضم آنزیمی	پرایمر					تعداد نمونه	گونه
		STRP1	STRP	STRA	ENR	Bac RNA		
چهارمحال بختیاری	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۳۰	*S. uberis*
مازندران	-	–	-	۴۳۰	–	-	۱	*S. agalactiae*
مازندران	بدون قطع :*XhoI*	–	-	–	۵۴۰	۶۷۵	۴	*S. faecium*
گیلان	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۳	*S .uberis*
گیلان	-	–	-	۴۳۰	–	-	۱۹	*S .agalactiae*
گیلان	۱۱۰و ۱۵۰ جفت باز :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۸	*S. dysgalactiae*
کهگیلویه وبویراحمد	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۱۵	*S. uberis*
کهگیلویه وبویراحمد	۱۱۰و ۱۵۰ جفت باز :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۳۵	*S. dysgalactiae*
کرمانشاه	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۳	*S .uberis*
کرمانشاه	۱۱۰ و ۱۵۰ جفت باز:*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۷	*S. dysgalactiae*
لرستان	۱۱۰و ۱۵۰ جفت باز :*DraIII*	–	۲۶۰	–	–	۶۷۵	۲۰	*S. dysgalactiae*
فارس	بدون قطع :*DraIII*	–	۲۶۰	-	-	۶۷۵	۱۶	*S .uberis*
فارس	-	۵۵۴	-	-	-	-	۱۱	*S. iniae*

٤- بحث

استرپتوکوکوزیس یکی از مهمترین باکتریهای بیماریزا است که موجب بروز تلفات شدید در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان دریایی و آب شیرین در گونه های سازگار با محیط های گرمابی و سردابی است. اطلاعات بدست آمده در خصوص مشاهدات بالینی در کنار روشهای تشخیصی معمول باکتری شناسی و مولکولی اطلاعات لازم در خصوص وضعیت اپیدمیولوژی استرپتوکوکوزیس در صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان را در اختیار قرار می دهد(Haghighi Karsidani و همکاران ۲۰۱۰). در این بررسی از استانهای مطرح در تولید قزل آلای رنگین کمان نمونه برداری شد. در این مطالعه از ۵۲۰ نمونه قزل آلا، ۲۰۶ نمونه به استرپتوکوک آلوده بودند که حدود ۴۰٪ کل نمونه های مورد بررسی را تشکیل می داد. از مجموع ۲۰۶ نمونه، ۱۷۲ نمونه مورد ارزیابی با آزمایش PCR قرار گرفتند و در نهایت ۵ گونه استرپتوکوک شناسایی شد که شامل *S.Faecium*، *S. agalactiae*، *S. uberis*، *S. dysgalactiae* ، *S. iniae* جداسازی و شناسایی شد. در این بررسی از بین گونه های شناسایی شده *S.Faecium* کمترین درصد فراوانی را داشت (۲/۳٪ از کل نمونه های بررسی شده) و فقط در استان مازندران شناسایی شد. بعضی مطالعات نشان داده اند که این باکتری تنها در شرایط آزمایشگاهی در آزاد ماهیان بیماریزا است(Astin و Astin ۲۰۰۷) و شاید به همین خاطر است که از بیماریزایی این باکتری اطلاعات کمی وجود دارد. لازم به ذکر است که در این زمینه پورغلام و همکاران(۱۳۸۹) اثرات و عوارض ناشی از عفونت تجربی با این باکتری را در ماهیان قزل آلا با انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی و مشابهت اثرات بافتی آن با سایر عوامل ایجاد کننده این بیماری نشان دادند. لیکن Bekker و همکاران(۲۰۱۱) بروز بیماری ناشی از این باکتری را که امروزه *Enterococcus faecium* نامیده می شود از ماهیان قزل آلای بیمار در آفریقای جنوبی گزارش کرده اند. در ایران نیز این باکتری از ماهیان قزل آلای رنگین کمان بیمار از استان مازندران گزارش شده است(قیاسی و همکاران ۱۳۷۹). *S. iniae* اگرچه اولین بار از دلفین های آب شیرین جداسازی شد لیکن امروزه یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان پرورشی است (Agnew و Barnes ۲۰۰۷). در گزارشاتی که در ایران در خصوص عوامل ایجاد کننده استرپتوکوکوزیس کار شده است نیز این باکتری از اهمیت بالایی برخوردار بوده است و از استانهای مازندران، تهران، چهارمحال بختیاری، لرستان و فارس جداسازی شده است (Haghighi Karsidani و همکاران ۲۰۱۰، Fadaeifard و همکاران ۲۰۱۱، Erfanmanesh

و همکاران ۲۰۱۲، موسوی ۱۳۸۶). لیکن در این بررسی این باکتری تنها ۶/۴٪ از کل نمونه های مورد ارزیابی مولکولی را بخود اختصاص داد و تنها از استان فارس جداسازی و شناسایی شد. در این بررسی *S. agalactiae* تنها از استانهای گیلان و مازندران (درصد فراوانی ۱۱/۶٪) جداسازی وشناسایی شد. این باکتری به عنوان یکی از مهمترین عوامل تلفات در گونه های مختلفی از ماهیان پرورشی آب شور و شیرین شناسایی شده است و حضور آن از ۷ کشور شامل آمریکا، اسراییل، ژاپن، کویت، تایلند، هندراس و برزیل بعنوان عامل تلفات ماهیان گزارش شده است(Amal و Zamir-saad ۲۰۱۱). این باکتری که متعلق به گروه B لانسفید است از سالیان پیش به عنوان باکتری بیماریزا در بین پستانداران شناسایی شده است. مطالعات نشان داده که این باکتری از موش به خزندگان قابل انتقال است و در مطالعه ای نشان داده شده ایزوله انسانی این باکتری قابلیت بیماریزایی در ماهیان تیلاپیا را داشته است(Evans و همکاران ۲۰۰۹). در بررسی دیگری در برزیل مشخص شده است که در بین ۲۹ نمونه باکتری *S.agalactiea* سه سویه وجود دارد که از قدرت حدت بالایی برخوردار هستند. بطوریکه میزان LD50 آنها برای ماهی تیلاپیای نیل فقط ۹۰ عدد باکتری است. این بالابودن حدت و پایین بودن میزان LD50 ظرفیت بالای باکتری را در عفونت زایی و قابلیت حمله و مقابله با سیستم ایمنی ماهی نشان میدهد(Mian و همکاران ۲۰۰۸). *S. dysgalactiae* با درصد فراوانی ۴۰/۷٪ مهمترین عامل بروز استرپتوکوکوزیس در این مطالعه بوده است که از استانهای گیلان، کهکیلویه و بویراحمد، کرمانشاه و لرستان جداسازی و شناسایی شده است. این در حالی است که در مطالعات دیگر بیماریزایی ایجاد شده توسط این باکتری کمتر گزارش شده و از فراوانی کمتری برخوردار بوده است. بر اساس مطالعات این باکتری تنها از ماهیان بیمار آمبرجک[9]، دم زرد[10]، پومفرت طلایی[11] و ماهی خاویاری رودخانه آمور[12] جداسازی و شناسایی شده است(Yang و Li ۲۰۰۹). همچنین این باکتری به عنوان یکی از مهمترین عوامل تلفات ماهیان در ژاپن نیز گزارش شده است(Nomoto و همکاران ۲۰۰۴). در این مطالعه بعد از *S. dysgalactiae*، باکتری *S. uberis* با درصد فراوانی ۳۸/۹٪ رایج ترین عامل استرپتوکوکوزیس بوده است و حضور آن در استانهای چهار محال بختیاری، گیلان، کهکیلویه و بویراحمد، کرمانشاه و فارس تایید شده است. این باکتری یکی از عوامل مهم ورم پستان در گاوهای شیری است و متاسفانه اطلاعات کمی از بیماریزایی

9 - Seriola dumerili
10 - Seriola quinqueradiata
11 - Trachinotus ovatus
12 - Acipencer schrenkii

و اپیدمیولوژی این باکتری در دسترس است(Coffy و همکاران ۲۰۰۶). در خصوص بیماریزایی این باکتری در ماهیان اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد و بنظر می رسد این برای اولین بار است که این باکتری به عنوان عامل بیماریزا در قزل آلای رنگین کمان گزارش شده است. در این مطالعه این باکتری از ماهیان بیمار با مرگ و میر زیاد از ۵ استان جداسازی شد.

از مهمترین علایم بالینی گزارش شده در بیماری استرپتوکوکوزیس میتوان به بیرون زدگی چشم۱۳یک و یا دو طرفه، اتساع محوطه بطنی و بروز آسیت و تجمع مایع خونابه ای در این ناحیه، تورم و تیرگی رنگ طحال۱۴ (گیلاسی شدن)، تورم و رنگ پریدگی کبد و نیز التهاب در بافت کلیه و اطراف قلب، بروز زخمهای خونریزی دهنده در پوست، تیرگی رنگ و شنای غیر عادی میتوان اشاره نمود(Amal و Zamri-saad ۲۰۱۱). در این بررسی رایج ترین علایم مشاهده شده در تمام نمونه ها از استانهای مختلف شامل تیرگی رنگ ،بیرون زدگی چشم اغلب دو طرفه و خونریزی در اطراف چشم ، کدورت قرنیه، خونریزی در برانش،قاعده باله ها و نقاط دیگر بدن، اتساع محوطه بطنی و آب آوردگی شکم، شنای نامتعادل عدم کنترل و وجود زخم در سطح بدن بود. خونریزی در صفحات آبششی، بیرون زدگی چشم و تیرگی رنگ اصلی ترین علایم بالینی مشاهده شده بود که در ۹۰٪ موارد ثبت شده وجود داشت. لیکن شنای نامتعادل علامتی بود که کمترین درصد مشاهده(کمتر از ۱۰٪) را بخود اختصاص داد. مطالعات نشان داده است که هرچند علایم ذکر شده در بروز بیماری استرپتوکوکوزیس عمومیت دارد لیکن با توجه به فرایند بیماریزایی میتوان علایم دیگری را نیز مشاهده کرد. بطور مثال در عفونت ماهیان تیلاپیا به *S.agalactiea* در کنار علایم ذکر شده بروز کست مدفوعی متصل به بدن(با طول بیشتر از ۲۰ سانتیمتر) بوده است که در مطالعه بافت شناسی روده تخریب شدید مخاط روده مشاهده شده است و عنوان شده شاید بتوان این علامت را به عنوان نشانه ای برای تشخیص استرپتوکوکوزیس با عاملیت این باکتری به حساب آورد(Pasnik و همکاران ۲۰۰۹). یکی از عوارضی که در بیماری استرپتوکوکوزیس مشاهده می شود شنای غیر طبیعی است که این علامت ناشی از بروز مننگوآنسفالیت در ماهی است(Amal و Zamri-saad ۲۰۱۱). لیکن به نظر می رسد که بروز این حالت با روند پاتوژنز باکتری مرتبط باشد بطوریکه عنوان شده که بروز علایم شنای غیر

13 - exophtalmia
14 - cheery speline

معمول ناشی از مننگوآنسفالیت یکی از علایم ناشی از عفونت باکتری *S.agalactiea* است و این باکتری بدون توجه به اینکه در کدام ماهی ایجاد بیماری نموده است یکی از اندامهای که مورد حمله قرار می دهد مغز است(Yang و Li ۲۰۰۹) و شاید بروز کم این علامت در این بررسی به درصد فراوانی پایین این باکتری بتوان مرتبط دانست. در بروز بیماریهای آبزیان یکی از عوامل مهم وجود استرس است که میتواند ناشی از شرایط گله و یا شرایط محیطی باشد. بیماری استرپتوکوکوزیس نیز از این امر مستثنی نیست. با توجه به زمان نمونه برداری و بالا بودن درجه حرارت آب (بیش از ۱۸ درجه سانتیگراد) عوامل فوق جداسازی شده اند و مطاعات نشان داده است که تمام عوامل جداسازی شده باکتریهایی هستند که در حرارت بیش از ۱۵ درجه سانتیگراد فعال و قادر به بیماریزایی هستند(Eldar و Ghittino ۱۹۹۹). مطالعات نشان داده است که افزایش حرارت نه تنها در ماهیان سردابی موجب افزایش حساسیت به عفونت استرپتوکوکی میگردد بلکه در ماهیان گرمابی نظیر تیلاپیا نیز افزایش درجه حرارت و در حرارت بیش از ۳۰ درجه سانتیگراد بروز بیماری و تلفات ناشی از آن بسیار بیشتر از حرارت زیر ۳۰ درجه سانتیگراد است(Rodkhum و همکاران ۲۰۱۱). مطالعات نشان میدهد میزان لکوسیتها در ماهی تیلاپیا در حرارت اپتیموم رشد(۲۷ درجه سانتیگراد) در بیشترین حد خود است لیکن با افزایش و کاهش دما تعداد لکوسیتها کاهش می یابد. همچنین میزان انفجار تنفسی، فاگوسیتوزیس و اندیس با کاهش و افزایش دما نسبت مستقیم دارد. تغییرات حرارتی موجب بروز استرس و افزایش ترشح کورتیزول و کاته کول امینها می شوند. از طرفی اثرات تضعیفی کورتیزول بر فاگوسیتوزیس با واسطه رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی در ماهیان گزارش شده است. بنابر این طبیعی است که در دمای پایین و بالاتر از حد اپتیموم حدت بیماری و تلفات افزایش یابد بنابر این به غیر از حدت دار بودن باکتری عوامل محیطی نیز بر شدت بیماریزایی باکتری می افزایند(Blv و Clem ۱۹۹۲). یکی دیگر از عوامل مستعد کننده این بیماری که با حرارت نیز در ارتباط است میزان pH آب می باشد. در مطالعه ای در بیماریزایی *S. iniae* در ماهی تیلاپیا مشخص گردید تلفات این ماهیان در مواجهه با این باکتری در pH قلیایی بسیار بیشتر از pH اسیدی است. اطلاعات نشان میدهد که کاهش pH با کاهش مرگ و میر همراه است و این مسئله ممکن است به اثرات مضر آمونیاک بر برانش مرتبط باشد زیرا با افزایش میزان آمونیاک و تخریش در بافت آبششی که یکی از ارگانها و مسیر ورود باکتری به بدن ماهی است احتمال آلودگی ماهیان افزایش می یابد. مرتبط باشد(Mian و همکاران ۲۰۰۸، Perera و همکاران ۱۹۹۷). توسعه در تجارت آبزیان زنده با

بهبود بخشیدن ابزار نقل و انتقال، امروزه به عنوان مهمترین عامل، در معرفی و انتشار عوامل بیماریزا و بیماریها به سیستمهای پرورش شناخته شده است(Subasinghe ۲۰۰۵). لذا به نظر می رسد نقل و انتقال تخم چشم زده، لارو، بچه ماهی، ماهیان در سن پرواری و حتی در مواردی نقل و انتقال مولدین و نیز عدم توجه به قرنطینه مهمترین منبع انتقال آلودگی باشد. در مرحله بعد منابع آبی مورد استفاده در مزارع نقش مهمی را در این امر ایفا میکنند چراکه معمولا مزارعی که آب مصرفی آنها در امر پرورش رودخانه است بیش از مزارعی که از آب چاه و یا چشمه استفاده می کنند در معرض خطر هستند(عمادی ۱۳۸۴). همچنین غذای آلوده و عدم توجه به دفع بهداشتی لاشه ماهیان مرده نیز از مهمترین منابع گسترش بیماری در یک مزرعه است(Amal و Zamri-saad ۲۰۱۱).

استفاده از تستهای بیوشیمیایی و محیط های افتراقی و یا کیتهای تجاری یکی از روشهای رایج در شناسایی باکتریهی بیماریزا خصوصا گونه های استرپتوکوک هستند(Roach و همکاران ۲۰۰۶). لیکن در مواردی متغییر بودن نتایج حاصل از آنها موجب تشخیص صحیح در شناسایی باکتری مورد نظر می گردد. لذا امروزه استفاده از روش PCR راهی مطمئن در شناسایی دقیق باکتری در کنار روشهای رایج می باشد. با استفاده از روشهایی چون RLFP – PCR و یا mutiplex-PCR شناسایی دقیق باکتری انجام می گیرد و یا در مطالعات اپیدمیولوژیکی از روش RAPD – PCR در جهت تعیین مشابهت نمونه باکتریهای مختلف بدست آمده از نواحی مختلف جغرافیایی و یا گونه های مختلف ماهی استفاده می گردد(Eldar و همکاران ۱۹۹۷، Romald و همکاران ۱۹۹۹، Mata و همکاران ۲۰۰۴b). با توجه به مطالعات انجام شده در ایران که صرفا بر اساس شناسایی عوامل ایجاد کننده استرپتوکوکوزیس متمرکز بوده است و خصوصا مطالعات مولکولی، به نظر می رسد بهتر است در قالب یک پروژه واحد کلیه نمونه های فوق از نظر بحث اپیدمیولوژی و شناسایی کانونها اصلی عفونت مورد بررسی قرار گیرند و با شناسایی تشابهات بین گونه ای چگونگی خط سیر عفونت در استانهای اصلی تولید کننده قزل آلا مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته و بر اساس آن تمهیدات مناسب اتخاذ گردد.

منابع

۱ - اخلاقی. مصطفی، محمد کشاورزی، ۱۳۸۱، وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلای استان فارس، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، دوره سوم، شماره دوم، ۱۹۰ – ۱۸۳

۲ – سلطانی، مهدی و غلامرضا نیکبخت بروجنی، ۱۳۸۶، استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای ایران، مجموعه خلاصه مقالات پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران، ۲۵ – ۲۳ بهمن ۱۳۸۶، اهواز، ایران، ۴

۳- عمادی، حسین، ۱۳۸۴، تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا و آزاد، نشر آبزیان

۴ - قلی پور کنعانی، حسنا، داور شاهسونی، احمد رضا موثقی، ۱۳۸۶، مجموعه خلاصه مقالات پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران، ۲۵ – ۲۳ بهمن ۱۳۸۶، اهواز، ایران،۱۵

۵ – قیاسی، مریم وآذین زاهدی، ۱۳۸۶، شناسایی عوامل بیماریزا در مزارع تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران، سمیتار ملی زیست شناسی، ۲۴ – ۲۶ اردیبهشت ۱۳۸۶، مرند، ایران، ۱۱۱

۶ - قیاسی، مریم ، آذین زاهدی، حسینعلی خوشباور رستمی، ۱۳۷۹، بروز اپیدمی استرپتوکوکوزیس (Streptococcosis) در ماهیان مولد قزل آلای رنگین کمان، اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان، ۲۷ – ۲۵ بهمن، اهواز، ایران، ۵۲

۷ – موسوی، سید سمانه،۱۳۸۶ بررسی بروز استرپتوکوکوزیس و استافیلوکوکوزیس در مزارع منتخب تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

۸ - پورغلام، رضا، علی مکرمی رستمی، علی اصغرسعیدی، عیسی‌شریف‌پور، احمد غرقی، حمزه پورغلام،۱۳۸۹. بررسی اثرات حاد باکتری استرپتوکوکس فسیوم (Streptococcus faecium) روی بعضی از بافت‌ها و مشخصه‌های خونی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران. سال نوزدهم، شماره ۲ ، ۱۸ – ۹

۹ – هوشمند، الهام و حمید حقیقی، ۱۳۸۸، استرپتوکوکوس دیسگالاکتیه عامل استرپتوکوکوزیس در یک مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان در غرب گیلان، نخستین همایش ملی ماهیان سردآبی، ۲۴ – ۲۲ اردیبهشت ۱۳۸۸، تنکابن، ایران، ۱۱۴

11 - 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
12 - Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M., 2011, Streptococcosis in Tilapia (Oreochromis iloticus): A Review, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci*. 34 (2): 195 – 206
13 - Austin, B. and Austin, D.A. 1999. Third ed .Chapter 2: Characteristics of the diseases. In Bacterial Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. Springer-Praxis, Praxis Publishing, Ltd .Chichester, cUK. pp 13-15.
14 - Beack. G. W; Kim. J. H; Gomez. D. K; Park. S. C; 2006, Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, *Journal of Veterinary Science*, 7(1), 53 – 58
15 - Bekker. A, Hugo. C, Albertyn. J, Boucher. C. E, Bragg. R. R, Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 34: 483–487
16 - Blv.J. E and Clem. L. W, 1992, Temperature and teleost immune functions, *Fish & Shellfish Immunology*,2, 159-171
17 - Bragg. R.R. and Broere J.S.E., 1986, Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* , 6: 89–91.
18 - Carson. J; Judkovs. N; Austin. B;1993, Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, (*Oncorhychus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Disease*, 16:381-388
19 - Coffey. T. J. ,Pullinger. G. D, Urwin. R, Jolley. K. AWilson. S. M, Maiden. M. C, Leigh. J. A, 2006, First Insights into the Evolution of Streptococcus uberis: a Multilocus Sequence Typing Scheme That Enables Investigation of Its Population Biology, *Applied and Environmental Microbiology*, 1420–1428
20 - Eldar A, Ghittino C., 1999, Lactococcus garvieae and Streptococcus iniae infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): similar but different diseases. *Disease of Aquatic Organisms* ;36:227–31.
21 - Eldar. A., Frealier P.F., Asanta L., Varner P.W., Lawhon S., 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.
22 - Erfanmanesh. A, Soltani. M, Pirali. E, Mohammadian. S, Taherimirghaed. A, 2012, Genetic Characterization of Streptococcus iniae in Diseased Farmed Rainbow Trout (Onchorhynchus mykiss) in Iran, *The ScientificWorld Journal*, 1 -6
23 - Evans, J.J., Klesius, P.H.,Gilbert, P.M., Shoemaker, C., Al-Sarawi,M., Landsberg, J., Durumdez,R., Al-Marzouk, A., Al-Zenki, S., 2002. Characterization of β-haemolytic Group B Strep−tococcus agalactiae in cultured seabream, Sparus auratus and wildmullet, Liza klunzin−geri (Day) in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, 25: 505–513.
24 - Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., & Al-Ablani, S, 2006b, First report of Streptococcus agalactiae and Lactococcus garviae from wild bottlenose dolphin (Tursiops truncates). *Journal of Wildlife Diseases*, 45: 561-569
25 - Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., & Shoemaker, C.A., 2006a, Identification and epidemiology of Streptococcus iniae and Streptococcus agalactiae in tilapia, Oreochromis spp. International Symposium on Tilapia in Aquaculture 7 (pp. 25-42). Charles Town, WV, USA, American Tilapia Association.
26 - Evans. J. J, Klesius. P. H, Pasnik. D. J, Bohnsack. J. F, 2009, Human Streptococcus agalactiae Isolate in Nile Tilapia(Oreochromis niloticus), Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid, 15(5): 774 -,776
27 - Fadaeifard. F, Momtaz. H, Rahimi. E, Mirzakhani. A, 2011, Detection of streptococcus iniae and Lactococcus garvieae by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran, *African Journal of Biotechnology*, 11(2): 260-263
28 - Filho. C. I; Muller. E. E; Pretto-Giordano. L. G; Bracarense. F. R. L;, 2009, Histological finding of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in nile tilapia (Oreochromis nilotocus), *Brazilian Journal Veterinary Patology*, 2(1): 12 – 15
29 - Foo. J.T.W., Ho. B; Lam. T.J;,1985, Mass mortality in Siganus canaliculatus due to streptococcal infection. *Aquaculture*, 49: 185–195
30 - Ghittino. C., Praero. M., 1992, Report of streptococcosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Italy: preliminary note.*Bolletino Della Societa Italiana di Patologia Ittica* , 8: 4–11.
31 - Gholipour. H., Shahsavani. D., Rad. M., 2009, Streptococcal septicemia in raibow trout farms in Sabzevar, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 174
32 - Habibipour.R, Bayat.S., 2009, Study of streptococcosis in rainbow trout farm in Hamedan Province, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, , 174

33 - Haghighi Khiabanian Asl. A, Soltani. M, Kazemi. B, Sohrabi Haghdost. E, Sharifpour, 2007, Use of immunohistochemichal and PCR methods of infectious heamatopoietic necrosis disease in some rainbow trout hatcheris in Iran, *Pakistan journal of Biology Sciences*, 10 (2): 230 – 234

34 - Klesius. P.H., Evans, J.J., Shoemaker, C.A.,Yeh, H., Goodwin, A.E., Adams, A., Thompson K., 2006, Rapid detection and identification of S. iniae using a monoclonal antibody based indirect flourescent antibody technique. *Aquaculture*, 258:180-186.

35 - Mata, A. I, Gibello. A, Casamayor. A., Blanco. M. M., Domínguez. L, Ferna´ndez-Garayza´bal .J. F., 2004b, Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish, *Applide and Environmental Microbiology*: 3183–3187

36 - Mata. A. I, Blanco. M. M, Dom´ınguez. L, Fernández-Garayzábal. J. F, Gibello. A, 2004a, Development of a PCR assay for Streptococcus iniae based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value, *Veterinary Microbiology* 101:109–116

37 - Mian. G. F., Godoy. D. T, Leal. C. A. G,Yuhara. T. Y, Costa. G. M,. Figueiredo. H. C. P., 2008, Aspects of the natural history and virulence of S. agalactiae infection in Nile tilapia, *Veterinary Microbiology*, 136(1 – 2): 180 – 183

38 - Michel. C., Nougayre`de P., Eldar A., Sochon E., De Kinkelin. P., 1997, Vagococcus salmoninarum, a bacterium of pathological significance in rainbow trout Oncorhynchus mykiss farming. *Diseases of Aquatic Organisms* , 30:199–208.

39 - Mohammadi Arani. M., Moghadas.m B., 2009, Infection of rainbow trout with Streptococcus spp. in Isfehan Province, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 126

40 - Nguyen. H.T., Kanai. K., Yoshikoshi, K., 2002, Ecological investigation of S. iniae isolated incultured Japanese Flouder, Paralicthys olivaceus using selective isolation procedure. *Aquaculture*, 205: 7-17.

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

42 - Pasnik. D. J., Evans. J. J, Klesius. P. H., 2009, Fecal Strings Associated with Streptococcus agalactiae Infection in Nile Tilapia, Oreochromis niloticus, *The Open Veterinary Science Journal*, 3: 6-8

43 - Perera. R.P., Johnson. S.K., Collins. M.D., Lewis D.H., 1994, Streptococcus iniae associated with mortality of Tilapia nilotica × T. aurea hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health* ,6: 335–340.

44 - Roach, J.C., Levett, P.N., & Lavoie, M.C.,2006,Identification of S. iniae by commercial bacterial identification systems. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 20-26.

45 - Rodkhum. C, Kayansamruaj. P, Pirarat. N, 2011, Effect of Water Temperature on Susceptibility to Streptococcus agalactiae Serotype Ia Infection in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus), *Thai J Vet Med*,41(3): 309-314.

46 - Romalde. J. Magarinos. L, Villar. C, Barja. J. L, Toranzo. A. E, 1999, Genetic analysis of turbot pathogenic Streptococcus parauberis strains by ribotyping and random amplifed polymorphic DNA, *FEMS Microbiology Letters*, 459: 297-304

47 - Salvador, R., Muller, E.E., Freitas, J.C., Leonhadt, J.H., Giordano, L.G.P., Dias, J.A ,2005, Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) reared in hapas nets and earth nurseries in the northen region of Parana State, *Brazil. Ciencia Rural. Santa Maria*, 35: 1374-1378.

48 - Shahbazian , N,Maghsudifard, A, E., Abdi, K. Sheikhzadeh, N, 2010, Study the status of Streptococcosis in Rainbow trout fish farms in kermanshah province in 2009, 2nd International congress on aquatic animal health maneagment and disese, October 26 – 27 2010, Tehran, Iran

49 - Soltani.M., Tarahomi. M, 2009, Study of streptococcosis/Lactoccosis in some farmed rainbow trout in Fars province, Iran, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 113

50 - Subasinghe. R. P, 2005, Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture, *Preventive veterinary medicine*, 67, 117 – 124

51 - Toranzo. A. E; Devesa. S; Heinen. P; Riaza. A; Nuñez. S; Barja. J. L;, (1994), Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium, *Bulltan of European Association of Fish Pathology*, 14:19–23

52 - Vendrell. D., Balcazar. J. L., Ruiz-Zarzuela. I., Blas. I., Girones. O, Muzquiz. J. L., 2006, Lactococcus garvieae in fish: A review, Comparative *Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 29: 177–198

53 - Xu, D.H., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2007, Evaluation of the link between grodactylosis andStreptococcus of Nile tilapia (*O. niloticus*). L . *Fish Diseases*, 30: 230-238

54 - Yang. W, Li. A, 2009, Isolation and characterization of Streptococcus dysgalactiae from diseased Acipenser schrenckii, *Aquaculture*, 294:14–17

55 - Yanong. R. P. E. and Francis-Floyd. R., 2002, Yanong Streptococcal infections of fish. Report from University of Florida. Series from the Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. http://edis.ifas.ufl.edu

56 - Zlotkin, A., Hershko, H., & Eldar, A., 1998, Possible transmission of Streptococcus iniae from wild fish to cultured marine fish, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4065-4067.

Abstract

Streptococcosis is an acute infectious disease that causes mortality in marine and freshwater aquacultures. One of the most important hosts is susceptible to the disease of rainbow trout and during the past decade its industrial production has been growing in Iran. According to FAO, Iran is among the 10 countries producing fish in the world. The most important bacteria causing Strptococcosis includes Strptococcus, Vagococcus and Enterococcus genera. But in all cases, the clinical sings are the same. More than a decade has passed since the first report of this disease in Iran and unfortunately, this disease has become the most important problems of trout production in Iran. Therefor, 72 farms were selected in 8 provinces including Mazandaran, Gilan, Lorestan, Charmahal-Bakhtiyari, Fars, Kermanshah, Tehran and Kokiloye-Boyer Ahmad and a total 520 moribund and apparently healthy rainbow trout (weight 50 – 200gr) were collected during summer 2008 to 2009. Fish kidney, spleen and liver samples were culture aseptically and finally 206 isolates were identified as gram positive cocci. Using conventional biochemical test, *S.uberis*, *S.agalactiae*, *S.dysgalactiae*, *S.faecium* and *S.inia*. Additionally, 172 from 206 isolates were confirmed as *S.uberis* ،*S.agalactiae* ، *S.dysgalactiae* ، *S.faecium* and *S.inia* using a PCR assay.

Based on the results, the most prevalent is belong to *S.uberis* (isolated from 5 of 7 province), *S.dysgalactiae* (isolated from 4 of 7 province), *S.agalactiae* (isolated from 2 of 7 province) and *S.faecium* and *S.inia* (from 1 of 7 province) respectively. It is necessary to mention, *S.inia* was identified just to Fars and any gram positive cocci was isolated from Tehran.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION –
Caspian Sea Ecology Research Center

Title : Molecular identification of some causative agents of streptococcosis isolated in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, walbaum*) in Iran
Approved Number: 2-76-12-89182
Author: Reza Pourgholam
Executor *:* Reza Pourgholam
Collaborator *:*F. Laloei, A.A.Saeidi, A. Ghoroghi,M.J. Taghavi, A. Zahedi, R.Safari, E.Sharifpour, A.Sepahdari
Advisor(s): -
Supervisor: H.A.Khoshbavarrostami
Location of execution : Mazandaran province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 6 Months
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Date of publishing : ***2013***

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION - Caspian Sea Ecology Research Center

Title:

Molecular identification of some causative agents of streptococcosis isolated in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, walbaum*) in Iran

Executor :
Reza Pourgholam

Registration Number
41974