DOI: 10.22055/IVJ.2020.209578.2202
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.4.12.9

# تشخیص بیماری لاکتوکوکوزیس در یکی از مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) استان خوزستان

فریدون حسنی[1*]، رحیم پیغان [2]، طاهره عبیاوی[1]، داریوش غریبی[3] و تکاور محمدیان[4]

[1] دانشجوی دکترای تخصصی (PhD) بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران
[2] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران
[3] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران
[4] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت:۱۳۹۸/۹/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۰

چکیده

*لاکتوکوکوس گارویه* باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز و کاتالاز منفی، متعلق به باکتری‌های گروه اسید لاکتیک است. این باکتری عامل لاکتوکوکوزیس، یک بیماری فوق حاد با سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان است و باعث خسارت‌های اقتصادی فراوانی به صنعت آبزی‌پروری می‌گردد. در این مطالعه از تعداد ۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشکوک به لاکتوکوکوزیس از یکی از مزارع استان خوزستان واقع در مسجدسلیمان نمونه‌برداری و از کلیه قدامی و مغز آن‌ها کشت باکتریایی انجام گردید. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی (با پرایمرهای اختصاصی ژن 16S rRNA) ایزوله‌های به دست آمده مورد بررسی بیش‌تر قرار گرفتند. همچنین نمونه‌گیری از اندام‌های مختلف انجام و برای بررسی هیستوپاتولوژی در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. جهت بررسی ضایعات، از بافت‌ها مقاطع ۵ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی و بررسی گردیدند. نتایج کشت، تست‌های بیوشیمیایی و PCR موید وجود بیماری لاکتوکوکوزیس در مزرعه مورد بررسی بود. در بررسی ماکروسکوپی ضایعاتی در کبد، کلیه‌ها و روده‌ی ماهیان مبتلا مشاهده گردید. کبد رنگ پریده و کلیه‌ها نسبتاً متورم بودند. عوارض و ضایعات دیگر از جمله آب آوردگی شکم در ماهیان مبتلا مشاهده نگردید. در بررسی هیستوپاتولوژیک کبد، دژنرسانس خفیف و نکروز کانونی سلول‌های کبدی مشهود بود. در کلیه‌ها دژنره‌سانس لوله‌های کلیوی به همراه افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و در مواردی ادم خفیف گلومرول‌ها مشاهده گردید. در روده‌ها التهاب و تجمع سلول‌های التهابی در مخاط مشاهده گردید. با توجه به تایید حضور لاکتوکوکوزیس لازم است اقدامات مناسب در خصوص پیشگیری از بیماری (خصوصاً واکسیناسیون) انجام گردد.

**کلمات کلیدی:** *لاکتوکوکوس گارویه*، قزل‌آلای رنگین کمان، تست‌های بیوشیمیایی، PCR، هیستوپاتولوژی

## مقدمه

*لاکتوکوکوس گارویه* یکی از پاتوژن‌های مهم در صنعت آبزی‌پروری ماهیان آب‌های شیرین و دریایی است (Eldar et al,1996). باکتری‌های جنس *لاکتوکوکوس* را در ابتدا به عنوان گونه‌ای از *استرپتوکوکوس* می‌دانستند ولی این

*نویسنده مسئول : فریدون حسنی، دانشجوی دکترای تخصصی (PhD) بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز
E-mail: fredunhassani@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

باکتری در سال ۱۹۸۵ از جنس *استرپتوکوکوس* تفکیک شد و در سال ۱۹۹۱ پس از جدا شدن از ماهی گیش دم زرد در ژاپن با نام *انتروکوکوس* خوانده شد و در نهایت با نام *لاکتوکوکوس گارویه* نام‌گذاری شد (Wang et al., 2007). این باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، فاقد تحرک، بدون اسپور و غالباً آلفا همولتیک می‌باشد (Ravelo, 2001). این باکتری در خانواده‌ی انتروکوکوسه‌ها طبقه‌بندی شده است و بر اساس DNA دی اکسی‌ریبونوکلئیک اسید 16 S ریبوزومی (rDNA) توالی‌یابی می‌شود (Bekker et al, 2011). *لاکتوکوکوس گارویه* از منابع مختلفی مانند ماهی، محصولات غذایی، حیوانات خشکی‌زی و انسان نیز جدا شده است، اما یک عامل بیماری‌زای مهم در ماهیان بوده و باعث ایجاد سپتی‌سمی خون‌ریزی‌دهنده کشنده و فوق حاد در ماهیان وحشی و پرورشی در آب شور و شیرین می‌شود، خصوصاً هنگامی که دمای آب به بالاتر از ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌رسد (Wang et al., 2007). در ماهی، باکتری یاد شده با بروز سپتی سمی در ماهی مبتلا همراه است که معمولاً با علایمی چون شنای غیرعادی، تیرگی بدن، اگزوفتالمی، خونریزی در داخل و یا اطراف کره چشم یا خونریزی‌های سطحی بدن در نواحی سرپوش آبششی، قاعده باله‌ها و همچنین، خونریزی‌های وسیع داخلی ظهور پیدا می‌کند (Raissy & Ansari., 2007). بیش‌ترین تلفات در ماهی قزل آلای رنگین کمان رخ می‌دهد به طوری که خسارات سالانه ناشی از آن‌ها به ده‌ها میلیون دلار می‌رسد (Soltani et al., 2008). *لاکتوکوکوس گارویه* به عنوان عامل زئونوز (مشترک انسان و دام) قلمداد می‌شود (Gibello et al., 2016). اولین گزارش‌های انتقال عفونت از طریق مصرف آبزیان به اواخر دهه ۹۰ میلادی بر می‌گردد که افراد با مصرف ماهیان مبتلا به پاتوژن‌های مذکور مبتلا به عوارض متعددی از جمله اسهال و استفراغ، سلولیت، کوری و سپتی‌سمی کشنده شدند (Austin & Austin, 1999). در بین ماهیان، ماهیان، گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان از حساس‌ترین گونه‌ها محسوب می‌شود و تاکنون گزارشات متعددی از همه‌گیری آن در کشورهای مختلف منتشر شده است که می‌توان به گزارش بیماری در اسپانیا، ایتالیا، استرالیا و افریقای جنوبی، تایوان و انگلستان، پرتغال، فرانسه و کشورهای منطقه بالکان، ترکیه و کره اشاره کرد. در ایران نیز نخستین بار تشخیص قطعی بیماری در سال ۲۰۰۵ در مزارع پرورش قزل‌آلای استان‌های فارس و چهارمحال و بختیاری به عمل آمد (Sharifiyazdi et al, 2010). سپس در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ اپیدمیولوژی بیماری در برخی مزارع پرورش ماهی، استان‌های کشور از جمله استان‌های لرستان و مازندران، فارس و چهارمحال و بختیاری مطالعه شد (Soltani et al, 2005; Soltani et al, 2011). با توجه به ظهور و گسترش صنعت پرورش ماهی قزل‌آلا در شهرستان‌های مسجد سلیمان، ایذه، لالی و گتوند واقع در استان خوزستان و گزارش شیوع بیماری در این مزارع، هدف از مطالعه حاضر بررسی دقیق‌تر بیماری در تلفات یکی از مزارع ماهیان پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان استان به منظور شناخت عوامل بیماری و جلوگیری از شیوع در مزارع قزل‌آلای استان بوده است.

## مواد و روش کار

### نمونه برداری

در فروردین ماه سال ۱۳۹۸، نمونه‌گیری از ماهیان بیمار (دارای علایم سپتی‌سمی) از یکی از مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شهرستان مسجدسلیمان که از آب چشمه برای آبزی‌پروری خود استفاده می‌کند انجام شد. مزرعه فعالی که از آن‌ها نمونه برداری صورت گرفت، شامل یک مزرعه پرورش ماهی بزرگ با استخرهای سیمانی بود.

### جداسازی *لاکتوکوکوس*

به منظور جداسازی *لاکتوکوکوس*، ماهیان مشکوک به بیماری، به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل و کشت باکتریایی از کلیه، کبد، مغز، طحال، آبشش و انتهای روده آن‌ها طبق روش‌های استاندارد انجام گرفت (Buller, 2014). نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی

Tryptic Soy Agar (TSA) تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری کلونی‌های مشکوک به *لاکتوکوکوس* انتخاب و بر روی محیط TSA به روش کشت چهار منطقه‌ای خالص‌سازی گردیدند.

**شناسایی جدایه‌ها**

**مطالعات بیوشیمیایی**

پس از خالص‌سازی باکتری‌ها، تشخیص اولیه *لاکتوکوکوس گارویه* با به کارگیری آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام گرفت (پیغان و افتخار معنوی، ۱۳۸۹). پرگنه‌های خالص‌سازی شده، مورد انجام آزمون‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. جدایه‌هایی که گرم مثبت و اکسیداز و کاتالاز منفی بودند، به عنوان مظنون به جنس *لاکتوکوکوس* در نظر گرفته شدند و جهت تشخیص دقیق‌تر از آزمایش‌های مرسوم بیوشیمیایی مطابق جدول ۱ بهره‌گیری شد (Buller., 2014; Austin, & Austin,2014).

**مطالعات مولکولی**

جهت شناسایی مولکولی باکتری‌های جداسازی شده، ژنوم آن‌ها با حرارت استخراج گشت. برای این کار، از دو تا سه کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری، در آب مقطر سوسپانسیونی تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) جوشانده شد و پس از ۲ دقیقه سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰ rpm، مایع رو به عنوان DNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (Buller.,2014)). برای این کار از یک جفت پرایمر طبق اطلاعات مندرج در Table 2 استفاده شد.

**Table 1: Results of biochemical tests of suspected isolates of *Lactococcus garvieae***

| Character | Reaction | Character | Reaction |
|---|---|---|---|
| Gram | + | Haemolysis | *a* |
| Oxidase | - | Lactose | (+) |
| Catalase | - | Galactose | + |
| Indol production | - | Sorbitol | + |
| MR | - | Trehalose | + |
| VP | + | Raffinose | - |
| Motility | - | Arabinose | - |
| Salicin | + | Inositol | - |
| Citrate | - | Sucrose | V |
| H2S production | - | Ribose | V |
| TSI | A/A | Glycerol | - |
| Urea | - | Esculin | + |

V: variable / (): weak / A/A: acidic without hydrogen sulfide production

**Table 2: Primer information used**

| Primer | Primer sequence (5'- 3') | Target gene | Product size (bp) | Pathogens | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| pLG -1 | CATAACAATGAGAATCGC | 16S rRNA | 1100 | garvieae.L | (2014) Mata et al |
| pLG -2 | GCACCCTCGCGGGTTG | | | | |

مراحل PCR برای این کار، در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۶/۵ میکرولیتر آب مخصوص PCR، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۴ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از DNA استخراج شده برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف آلمان) و با برنامه واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، واسرشته‌سازی به مدت ۴۵ ثانیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال به مدت ۱ دقیقه (۵۶ درجه سانتی‌گراد)، طویل شدن به مدت ۱ دقیقه (۷۲ درجه سانتی‌گراد)، سپس تکرار مراحل ۲ الی ۴ به تعداد ۳۰ چرخه و در نهایت مرحله‌ی طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه (۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) انجام شد. پس از طی شدن چرخه‌های دمایی و تکثیر ژن مورد هدف، در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی bp ۱۰۰ (سیناژن، ایران) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (Uvitec، انگلستان) با نور UV، عکس‌برداری شد.

**مطالعات پاتولوژی**

در این بررسی ضمن بررسی ماکروسکوپی اندام‌های مختلف ماهیان مورد مطالعه، نمونه‌گیری از اندام‌های مختلف ماهی شامل کبد، کلیه و مغز صورت گرفت و بافت برای بررسی پاتولوژی در فرمالین ۱۰ درصد قرار فیکس شدند و پس از انجام مراحل پاساژ بافتی شامل آبگیری، شفاف کردن و آغشتگی به پارافین در نهایت مقاطع ۵ میکرون تهیه و با استفاده از رنگ‌آمیزی معمولی جهت بررسی ضایعات، با روش هماتوکسیلین–ائوزین رنگ‌آمیزی و بررسی گردیدند.

## نتایج

از بین ماهیان مشکوک به لاکتوکوکوزیس علایمی چون شنای غیرعادی، تیرگی بدن، اگزوفتالمی، خونریزی در داخل و یا اطراف کره‌چشم یا خونریزی‌های سطحی بدن در نواحی سرپوش آبششی، قاعده باله‌ها و همچنین، خونریزی‌های وسیع داخلی داشتند و پس از کشت باکتریایی تمام کلنی‌های خالص‌سازی شده از نظر شکل کلنی مشابه بودند.

**نتایج جداسازی باکتریایی و مطالعات بیوشیمیایی**

نتایج کشت باکتریایی از اندام‌های داخلی (کلیه قدامی و مغز) و ضایعات جلدی ماهی های واجد علائم، جدایه‌های باکتریایی مظنون به *لاکتوکوکوس گارویه* (باکتری‌های گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز منفی و سایر تست‌های بیوشیمیایی) را نشان داد. نتایج مطالعات بیوشیمیایی بر روی جدایه‌های مظنون *لاکتوکوکوس گارویه* در Table 1 آمده است. براساس نتایج حاصل از آزمون‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی در تحقیق حاضر، از ۱۰ ماهی بیمار، مشخص گردید که ۳ ایزوله از کوکسی‌های گرم مثبت جدا شده در ارتباط با بیماری لاکتوکوکوزیس در ماهیان بوده که باعث آلودگی مزارع پرورشی استان شده‌اند.

**مطالعات مولکولی PCR جهت تایید جدایه‌ها**

نتایج آزمایش PCR با استفاده از جفت پرایمر مورد اشاره منجر به تولید باند با وزن مولکولی ۱۱۰۰bp برای جدایه‌های مظنون و کنترل مثبت گردید؛ در صورتی که در کنترل منفی هیچ باندی تشکیل نشد (Figure 1).

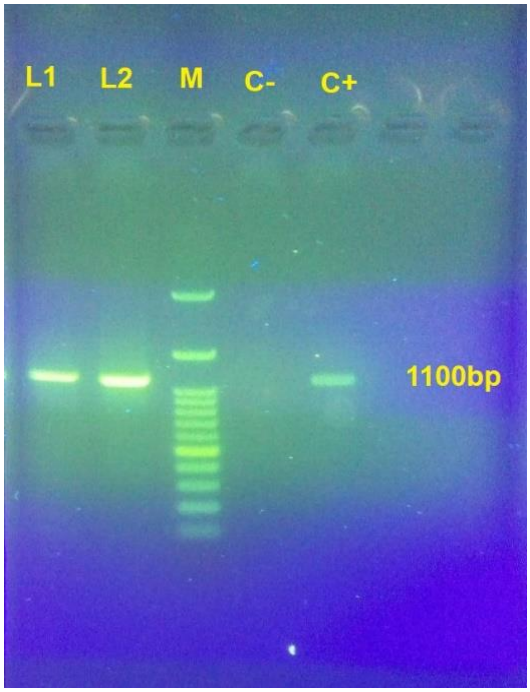


**Figure 1: agarose gel PCR analysis of *Lactococcus garvieae* DNA, M: 100 bp indicator, L1 and L2: our samples, C-: negative control, C+: positive control.**

## نتایج بررسی پاتولوژی

در بررسی ماکروسکوپی ماهیان مشکوک به لاکتوکوکوزیس ضایعاتی در کبد، کلیه‌ها و روده‌ی ماهیان مبتلا مشاهده گردید. کبد رنگ پریده و کلیه‌ها نسبتاً متورم بودند. عوارض و ضایعات دیگر از جمله آب آوردگی شکم در ماهیان مبتلا مشاهده نگردید. در بررسی هیستوپاتولوژیک کبد، دژنرسانس خفیف و نکروز کانونی سلول‌های کبدی مشهود بود. در کلیه‌ها دژنره سانس لوله-های کلیوی به همراه افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و در مواردی ادم خفیف گلومرول‌ها مشاهده گردید. در روده‌ها التهاب و تجمع سلول‌های التهابی در مخاط مشاهده گردید (Figures 2&3&4).

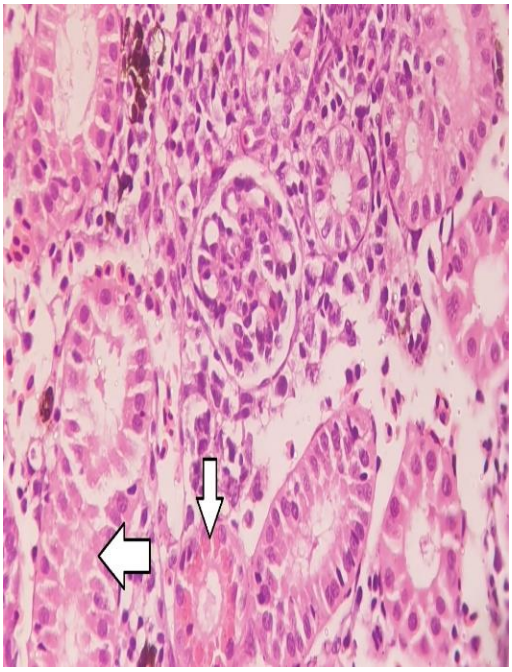

**Figure 2: Pathological changes of liver: degeneration of renal tubules (arrows) melanomacrophage aggregation and glomerulus edema, H & E staining, magnification: x400**

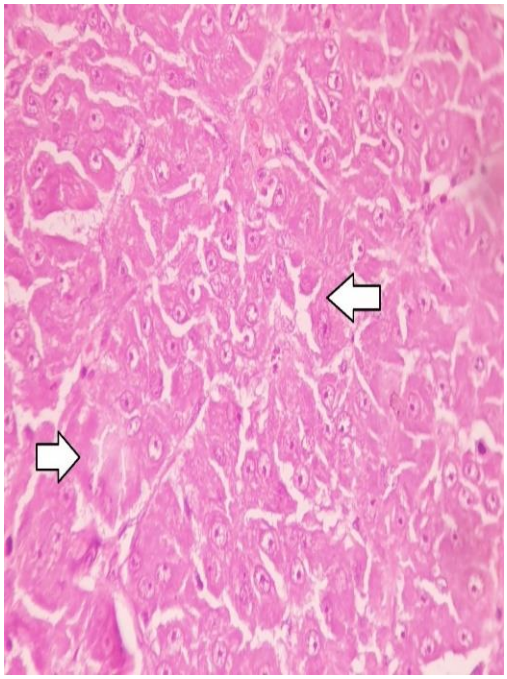

**Figure 3: Pathological changes of liver: degeneration and focal necrosis (arrows), H & E staining, magnification: x400**

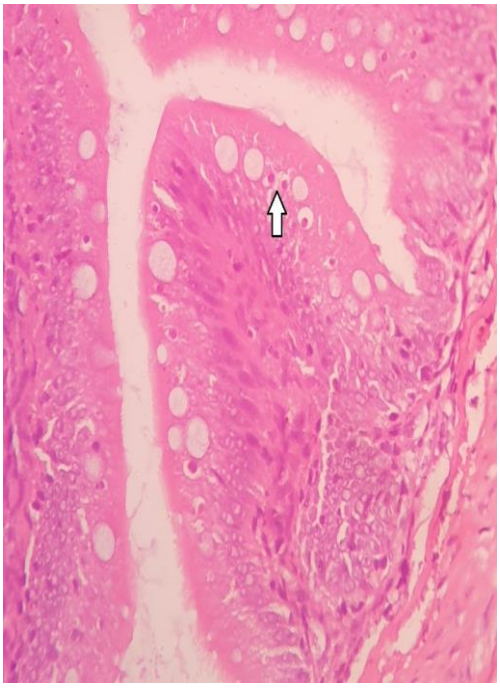

**Figure 4: Pathological changes of intestinal epithelium:
aggregation of inflammatory cells (arrow), H & E staining, magnification: x400**

## بحث

فعالیت‌های آبزی‌پروری نقش مهمی در تولید مواد غذایی از جمله پروتئین مورد نیاز جامعه بشری دارند. با توجه به شرایط اقلیمی مناسب در استان خوزستان و همچنین بسترهای بهینه، از جمله وجود رودخانه‌های فراوان با میزان آب فراوان، پرورش ماهی می‌تواند نقش مهمی در اقتصاد این استان داشته باشد. از آن جایی که بیماری مهم‌ترین عامل بازدارنده‌ی این صنعت می‌باشد پیش‌گیری، کنترل و واکسیناسیون بهترین گزینه‌های جلوگیری از تلفات در ماهیان و رونق بخشیدن به این صنعت به شمار می‌رود. با توجه با این که نشانه‌های بالینی در اکثر بیماری‌های خون‌ریزی‌دهنده‌ی غیراختصاصی است جهت تعیین هویت و کنترل سریع عوامل بیماری‌زا برای کاهش تلفات ناشی از آن، استفاده از تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌شناسی و آزمایش مولکولی PCR ضروری است. لاکتوکوکوس گارویه در سال‌های اخیر به عنوان عامل بروز تلفات و خسارت‌های اقتصادی فراوان به صنعت تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا در کل مطرح شده است (fereidouni et al, 2013). در تحقیق حاضر بعد از جداسازی ۸ کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی و اکسیداز منفی سایر تست‌های بیوشیمیایی روی جدایه‌ها انجام گرفت. Soltani و همکاران ۱۳۹۱، با تحقیقی که بر روی تعیین فراوانی لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری و تعیین توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های حاصله داشتند نتایج نشان داد که نمونه‌های جدا شده در بررسی آن‌ها بیش‌ترین قرابت را با نمونه‌های جدا شده از چین، ژاپن و استرالیا و کم‌ترین قرابت را با نمونه‌های گزارش شده از کشور تونس دارند و موارد بروز لاکتوکوزیس (استرپتوکوکوزیس) در مزارع قزل آلای چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۸۸ نسبت به سال‌های قبل افزایش یافته است. در این تحقیق نیز برای تعیین هویت مولکولی کوکسی‌های گرم مثبت از آزمایش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی بر اساس ژن 16S rRNA صورت گرفت تا بتوان تمام گونه‌های عامل لاکتوکوکوزیس را *لاکتوکوکوس گارویه* شناسایی کرد. بیماری ناشی *لاکتوکوکوس گارویه* در ایران نیز نخستین بار در سال ۱۳۸۱ از استان فارس توسط اخلاقی و همکاران گزارش شد. مشاهدات کارگاهی و گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که در حال حاضر بیماری در بیش‌تر نقاط کشور وجود دارد و عامل مهم مرگ و میر و بروز تلفات در ماهیان پرورشی قزل آلای رنگین کمان به ویژه در استان‌های پر تولید کشور است (Carson et al, 1993). بیماری لاکتوکوکوزیس در کشورهای مختلف گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به گزارش بیماری در اسپانیا (Palacios et al., 1993)، ایتالیا (Ghittino et al, 1992)، استرالیا و افریقای جنوبی (Austin & Austin., 2014)، تایوان و انگلستان (Bark & McGregor, 2001)، پرتغال (Pereira et al., 2004)، فرانسه و کشورهای منطقه بالکا (Eyngor et al, 2004)، ترکیه و کره (Baeck et al., 2006) اشاره کرد. در ایران نیز در سال‌های اخیر هم زمان با توسعه مزارع پرورش ماهی قزل آلای

رنگین کمان شاهد بروز همه‌گیری با عوامل فوق در مراکز پرورش ماهی هستیم. بررسی Soltani and Tarahomi در سال ۲۰۰۸ نشان داد که ۲۰ درصد از مجموع ۶۰۰ کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل آلای پرورشی در استان فارس را گونه *لاکتوکوکوس گارویه* تشکیل می‌دهد و مابقی مربوط به جنس *استرپتوکوکوس* و عمدتاً گونه اینیائی بوده است (Soltani et al, 2011). مطالعه Mirzakhani نشان داد که از مجموع جدایه کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری، ۱۱ مورد *لاکتوکوکوس گارویه* بوده است (Mirzakhani, 2009). مطالعه Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد ۴/۶ درصد از ماهیان استان مازندران مبتلا به *لاکتوکوکوس گارویه* بودند (Soltani et al, 2011). پژوهش Shahrani و همکاران در سال ۲۰۱۴ در استان چهارمحال و بختیاری مشخص کرد ۷۶ درصد از ماهیان مورد مطالعه در ۲۳ مزرعه مبتلا به لاکتوکوکوزیس بودند. نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که از بررسی موردی تنها یک مزرعه بیمار در سطح استان و بررسی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری به دست آمده، ماهیان مزرعه به لاکتوکوکوزیس آلوده بودند. مطالعه Sharifiyazdi و همکاران در سال ۲۰۱۰، در استان فارس نشان داد که ۱۶ درصد از کل نمونه‌های قزل‌آلای مورد مطالعه مبتلا به لاکتوکوکوس گارویه بودند (Sharifiyazdi., 2010). باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به همراه برخی باکتری‌های جنس *استرپتوکوکوس* که از آن جمله می‌توان به *استرپتوکوکوس* اینیائی اشاره کرد متعلق به خانواده استرپتوکوکاسه می‌باشند و عامل مهم بروز سپتی سمی و تلفات بالا در مزارع پرورش ماهی به ویژه در قزل‌آلای رنگین کمان محسوب می‌شوند (Austin & Austin, 1999). موارد گزارش‌های بالا نشان از شیوع گسترده لاکتوکوزیس در کشور دارد بنابراین، با توجه به رشد سریع صنعت آبزی پروری و تامین مواد غذایی به ویژه پروتئینی در کشور و همچنین احتمال گسترش بیماری‌های عفونی لاکتوکوکوزیس و حدت‌دار شدن آن ، یافتن روش‌های سریع و دقیق شناسایی عوامل بیماری‌زا کمک شایانی به انجام روش‌های درمانی و پیشگیرانه مناسب خواهد بود، بنابراین توصیه به استفاده از روش‌های مولکولی سریع نظیر PCR جهت شناسایی دقیق در تشخیص عوامل بیماری‌زا می‌گردد. بر اساس نتایج پیش‌بینی از رشد صنعت آبزی‌پروری در خشکی و استفاده بیش از حد از توان استخرهای پرورشی با ازدیاد تراکم ماهی در استخرها و افزایش احتمال تلفات ماهیان در اثر بیماری با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* وجود دارد همچنین گسترش و انتقال عامل بیماری وابسته به عوامل مختلفی است که از جمله می‌توان به انتقال از طریق آب، تغذیه، مدفوع و ادرار دام و احشام ورود ماهیان آلوده به آب اشاره کرد. در کل بروز و شیوع بیماری‌های باکتریایی در مزارع پر تولید کشور با همیشه با ضرر و زیان‌های زیادی برای صنعت پرورش ماهیان سردآبی کشور همراه بوده است. به غیر از ضررهای اقتصادی، باید در نظر داشت که بیماری ناشی از *لاکتوکوکوس گارویه* در گروه بیماری‌های قابل انتقال به انسان قرار دارد که این مسئله خود اهمیت بیماری را دو چندان می‌کند. در چنین شرایطی نیاز به تعیین سیاست‌های موثر و عملی در جهت مقابله با بیماری که شامل پیشگیری، کنترل و در آخر درمان است، می‌باشد. به منظور پیشگیری از شیوع این بیماری باید مطالعات تهیه واکسن جهت ایمن-سازی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه در اعطای پژوهانه (شماره SCU.vC98.413) کمک به اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

## تعارض منافع

تلاقی منافع وجود ندارد.

## منابع مالی

اعتبار مالی پژوهش از پژوهانه سال ۱۳۹۸ نویسندگان مقاله تأمین شده است.

## منابع

Austin, B., & Austin, D. A. (1999). Vibrionaceae representatives: characteristics of the disease. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, *29*(30), 108-115.

Austin, B., Austin, D.A. (2014) Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish. Fifth Edition, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, ISBN .978-94-007-4884-2 (eBook)

Bark, S., & McGregor, D. (2001). The first occurrance of Lactococcosis in farmed trout in England. Trout News, 9-10.

Baeck, 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.

Bekker, A., Hugo, C., Albertyn, J., Boucher, C. E., & Bragg, R. R. (2011). Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, *34*(6), 483-487.

Buller, N. B. (2014). *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. Cabi.

Carson, J., Gudkovs, N., & Austin, B. (1993). Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, *16*(4), 381-388.

Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Goria, M., Prearo, M., & Bercovier, H. (1996). Enterococcus seriolicida is a junior synonym of Lactococcus garvieae, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current microbiology*, *32*(2), 85-88.

Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D. G., Chilmonczyk, S., & Eldar, A. (2004). Clonality and diversity of the fish pathogen Lactococcus garvieae in Mediterranean countries. *Appl. Environ. Microbiol.*, *70*(9), 5132-5137.

Fereidouni, M. S., Akhlaghi, M., & Alhosseini, A. K. (2013). Antibacterial effects of medicinal plant extracts against Lactococcus garvieae, the etiological agent of rainbow trout lactococcosis. *International Journal of Aquatic Biology*, *1*(3), 119-124.

Ghittino, P., & Prearo, M. (1992). Report of Streptococcosis in rainbow trout(Oncorhynchus mykiss) in Italy: Preliminary note. *Bollettino Societa Italiana di Patologia Ittica*, (8), 4-9.

Gibello, A., Galán-Sánchez, F., Blanco, M. M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2016). The zoonotic potential of Lactococcus garvieae: an overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science*, *109*, 59-70.

Holt, J.G.; Krieg, R.N.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1993). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, PP: 221-251.

Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R., & Fryer, J. L. (1991). Enterococcus seriolicida sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *41*(3), 406-409.

Mata, A. I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M. M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, *70*(5), 3183-3187.

Mirzakhani, A. (2009). Isolation of Streptococcus iniae and Lactococcus garvieae in rainbow trout farms in Chahramahal va Bakhtiari Province by Multiplex PCR [Dissertation]. *Shahrekord, Islamic Azad University*.

Palacios, M. A., Zamora, M. J., Velazquez, J., Zamora, E., & Duran, A. (1993). Streptococcosis in rainbow trout(Oncorhynchus mykiss) in Spain. *Bollettino Societa Italiana di Patologia Ittica*, *5*(13), 11-16.

Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (2004). Lactococcus garvieae, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *24*(6), 274-279.

Ravelo, C., Magariños, B., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of Lactococcus garvieae strains. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, *21*(4), 136-144.

Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M., & Mostafavi Zadeh, S. M. (2010). Isolation and characterization ofLactococcus garvieae from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) cultured in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *11*(4), 342-350.

Soltani, M., Jamshidi, S., & Sharifpour, I. (2005). Streptococcosis caused by Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (Oncorhynchys mykiss) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *25*(3), 95-106.

Soltani, M., Nikbakht, G., Ebrahimzadeh Moussavi, H. A., & Ahmadzadeh, N. (2008). Epizootic outbreak of lactococcosis caused by Lactococcus garvieae in farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *28*(5), 95-106.

Soltani, M., Raissy, M., Goodarzi, M. A., & Momtaz, H. (2011). Isolation of Lactococcus garvieae in rainbow trout farms and 16S rRNA gene sequencing in Chahramahal va Bakhtiari Province. *Journal of Veterinary Medicine*, *8*, 61-67.

Soltani, M., & Tarahomi, M. (2008). Study of streptococcosis/lactococcosis in some farmed rainbow trout in Fars Province, Iran. In *1st International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases* (pp. 29-30).

Tarr, C. L., Patel, J. S., Puhr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A., & Strockbine, N. A. (2007). Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. *Journal of clinical microbiology*, *45*(1), 134-140.

Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2006). Lactococcus garvieae in fish: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, *29*(4), 177-198.

Wang, C. Y. C., Shie, H. S., Chen, S. C., Huang, J. P., Hsieh, I. C., Wen, M. S., ... & Wu, D. (2007). Lactococcus garvieae infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International journal of clinical practice*, *61*(1), 68-73.

Received: 08.12.2019
Accepted: 30.05.2020

Vol. 17, No. 4, Winter, 2022
DOI: 10.22055/IVJ.2020.209578.2202
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.4.12.9

**Case Report**

# Diagnosis of lactococcosis in one of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Khuzestan province

Fereydun Hassani[1*], Rahim Payghan[2], Tahere Abyavi[1], Dariush Gharibi[3] and Takavar Mohammadian[4]

[1] PhD student of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 08.12.2019 Accepted: 30.05.2020

## Abstract

*Lactococcus garviea* is a gram positive, facultative anaerobic, oxidase and catalase negative that belong to the lactic acid group bacteria. This bacterium is the cause of Lactococcosis, an acute disease with hemorrhagic septicemia in rainbow trout and causes a lot of economic damage to the aquaculture industry. In this study, 10 diseased rainbow trout were bacteriologically sampled from head kidney and brain in one of fish farms of Khuzestan province, Located in Masjed Soleyman. The obtained isolates were further evaluated by biochemical tests and molecular method (with 16S rRNA specific primers). Samples were also taken from different organs and fixed in formalin 10% for pathological examination. To investigate the lesions, sections were prepared from 5 μm and stained with Hematoxylin-Eosin. The results of bacterial culture, biochemical tests and PCR confirmed the presence of Lactococcosis in the studied farms. Macroscopic examination revealed lesions in the liver, kidneys and intestine of affected fish. The liver was pale and the kidneys were relatively swollen. No other complications or lesions, including abdominal discharge, were observed in affected fish. In histopathologic examination of liver, degeneration, and focal necrosis were seen. In kidneys, tubules degeneration and melanomacrophage cells accumulation were seen. In intestines, moderate inflammation and inflammatory cells aggregation was seen. According to the confirmation of the presence of lactococcosis, it is necessary to take measures to prevent lactococcosis (especially vaccination).

**Keywords**: *Lactococcus garvieae*, Rainbow trout, Biochemical tests, PCR, Histopathology

[*] **Corresponding Author**: Fereydun Hassani, PhD Student of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
E-mail: basiri@shirazu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).