

بررسی بروز استرپتوکوکوزیس و شناسایی باکتری‌های مسبب آن در مزارع منتخب تکثیر و پرورش قزل‌آلای رنگین کمان استان مازندران

سیده سمانه موسوی^{۱*}، حسین خارا^۲، علی اصغر سعیدی^۳، مریم قیاسی^۴، آذین زاهدی^۵

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، باشگاه پژوهشگران جوان، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳، ۴ و ۵- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران، صندوق پستی: ۹۶۱

sa_mosavi61000@yahoo.com

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی بروز استرپتوکوکوزیس و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت عامل این بیماری در مزارع منتخب تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در استان مازندران است. بسیاری از بیماری‌های باکتریایی ماهی، مسبب تلفات و ضرر اقتصادی بالا در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشند از این رو شناخت بیماری‌های باکتریایی و باکتری‌های بیماری‌زا یکی از مهمترین راه‌ها جهت کنترل و پیشگیری از بروز بیماری‌های باکتریایی است. مازندران یکی از بزرگترین مراکز تولید ماهیان سردآبی در ایران است و به همین دلیل شناخت انواع بیماری‌ها و عوامل آن‌ها در این استان دارای اهمیت ویژه‌ای است. در این تحقیق، ۱۲ مزرعه از ۵ شهر استان مازندران جهت نمونه‌گیری انتخاب گردید که شامل ۳ مزرعه در تنکابن (دوهزار)، ۱ مزرعه در چالوس (مرزن‌آباد)، ۱ مزرعه در نوشهر (کجور)، ۶ مزرعه در آمل (هراز) و ۱ مزرعه در ساری (دودانگه) بود. این بررسی در ۴ فصل سال از ۱۳۸۵ (پاییز و زمستان) تا ۱۳۸۶ (بهار و تابستان) انجام شد. در این بررسی از هر مزرعه، تعداد ۱۰ عدد ماهی دارای علائم ظاهری بیماری مانند: بی‌حالی، تیرگی پوست، بیرون‌زدگی چشم، خون‌ریزی در داخل و اطراف چشم و پایه باله‌ها انتخاب گردید. باکتری‌های کوکسی شکل گرم مثبت از بافت‌های کلیه و کبد جداسازی و در محیط کشت Blood agar یا TSA کشت داده شدند. تشخیص باکتری به وسیله رنگ‌آمیزی و انجام تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفت. بیماری استرپتوکوکوزیس در فصول پاییز، بهار و تابستان و در مزارع شهرستان‌های چالوس، آمل و ساری مشاهده گردید اما در فصل زمستان مشاهده نشد. عوامل باکتریایی شناسایی شده به عنوان عامل استرپتوکوکوزیس طی این تحقیق شامل *Streptococcus*، *Streptococcus iniae*، *Entrococcus faecalis* و *agalactiae* بوده‌اند. از بین نمونه ماهیان بیمار مورد مطالعه، ۳۳/۳۳٪ مبتلا به استرپتوکوکوزیس بوده‌اند.

کلمات کلیدی: باکتری، قزل‌آلای رنگین کمان، استرپتوکوکوزیس، مازندران، ایران.

مقدمه

عفونت‌های استرپتوکوکی در ماهی یک بیماری سپتی سمیک است که سبب مرگ و میر بالا (حتی بیش از ۷۵٪) در صنعت تولید ماهی می‌گردد (۱۵، ۱۶ و ۱۷). اولین عفونت استرپتوکوکی در ماهیان پرورشی در سال ۱۹۵۸ در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در ژاپن گزارش شده است (۵). این بیماری در مناطق مختلف جهان از جمله آفریقای جنوبی، ایتالیا، ژاپن، آمریکا، استرالیا، فیلیپین، تایوان، بحرین و ایران گزارش شده است (۳، ۴، ۱۱ و ۱۸). این بیماری در بیش از ۴۰ گونه ماهی اعم از ماهیان پرورشی و وحشی، ماهیان آب شور، شیرین و نیز ماهیان زینتی گزارش شده است (۱۷ و ۱۸) که می‌توان به کوسه سیاه دم قرمز (*Epalzeorhynchus bicolor*) (۱۸)، سیم دریایی قرمز (*Sparus ouratus*)، کفال وحشی (*klunzingeri Liza*) (۹)، تیلایپا (*Oreochromis niloticus*) (۸)، دلفین‌های آب شیرین (*Inia geoffrensis*) (۱۰)، گیش دم زرد (*Seriola quinqueradiata*) (۱۲) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۷ و ۴) اشاره نمود.

علائم بالینی خارجی ماهیان مبتلا به استرپتو-کوکوزیس شامل: بیرون‌زدگی چشم، کدورت قرنیه، شنای چرخشی، تیرگی پوست و خون‌ریزی در اطراف پایه باله‌ها و چشم است (۱۶). مهمترین اندام‌های داخلی که در اثر ابتلا به استرپتوکوکوزیس صدمه می‌بینند عبارتند از: مغز، طحال، کلیه قدامی و قلب به طوری که طحال بزرگ و پر خون می‌شود اما کبد رنگ پریده می‌گردد (۲۰).

حدود ۱۵ گونه باکتری از ۴ جنس *Entrococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*

و *Streptococcus* که همگی باکتری‌های کوکسی شکل گرم مثبت‌اند می‌توانند عامل بیماری استرپتو-کوکوزیس در ماهیان باشند (۲۰).

Streptococcus iniae یکی از گونه‌های مسبب این بیماری است که به عنوان گونه‌ای زئونوز شناخته شده است (۱۷ و ۴).

هدف از این تحقیق، بررسی بروز استرپتو-کوکوزیس و شناسایی گونه‌های باکتریایی مسبب این بیماری در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان استان مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طی پاییز و زمستان ۱۳۸۵ و بهار و تابستان ۱۳۸۶ از ۱۲ مزرعه استان مازندران (۳ مزرعه در تنکابن (منطقه دوهزار)، ۱ مزرعه در چالوس (مرزن آباد)، ۱ مزرعه در نوشهر (کجور)، ۶ مزرعه در آمل (هراز) و ۱ مزرعه در ساری (دودانگه) نمونه‌برداری به عمل آمد. از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد ماهی دارای علائم ظاهری بیماری از جمله تیرگی پوست، شنای نامتعادل و بیرون‌زدگی و خون‌ریزی در چشم (شکل ۱) انتخاب گردید. شکم ماهیان در شرایط استریل شکافته و از کلیه قدامی و در صورت مشاهده طحال و کبد غیر طبیعی (شکل ۲)، از این اندام‌ها نیز نمونه‌برداری به عمل آمد و در محیط کشت TSA (شکل ۳) و یا Blood agar (شکل ۴) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۲ و ۵). باکتری‌های رشد یافته روی محیط کشت‌ها، خالص‌سازی شدند و سپس رنگ‌آمیزی گرم انجام شد.



شکل ۲: کبد رنگ پریده



شکل ۱: خونریزی و بیرون زدگی چشم



شکل ۴: محیط کشت Blood agar حاوی باکتری



شکل ۳: محیط کشت TSA حاوی باکتری

استفاده از نتایج بدست آمده در هر تست کاملاً شناسایی شدند.

نتایج

بیماری‌های استرپتوکوکوزیس در برخی از مزارع تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران مشاهده گردید که ۳ گونه باکتری گرم مثبت کوکسی شکل (شکل ۵) به عنوان عامل این بیماری در مزارع استان مازندران شناخته شدند.

این گونه‌ها عبارتند از: *Streptococcus* و *Streptococcus agalactiae iniae* و *Entrococcus faecalis*.

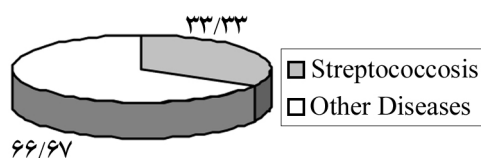
جهت شناسایی کامل گونه باکتری مسبب بیماری، از تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید. این تست‌ها شامل: اکسیداز، کاتالاز، $\text{KOH } 3\%$ ، O-Fglucose، کشت در محیط کشت Blood agar جهت تشخیص نوع همولیز، SIM جهت تشخیص حرکت باکتری و مشاهده H_2S ، انواع قندها از جمله: سوربیتول، رافینوز، ترهالوز، مانیتول، ریبوز، سالیسین، لاکتوز، تست هیپورات، نترات، اوره، Bile esculine، رشد در $\text{NaCl } 6/5\%$ و رشد در حرارت‌های ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. پس از انجام کلیه تست‌های مورد نیاز، با استفاده از کتاب تست‌های بیوشیمیایی برای تشخیص باکتری‌ها نوشته Jean F. MacFaddin (۱۳)، گونه‌های جداسازی شده، با



شکل ۵: باکتری‌های کروی شکل با آرایش زنجیره‌ای *Streptococcus sp.* جداسازی شده

همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، از بین نمونه ماهیان بیمار مورد مطالعه، ۳۳/۳۳٪ مبتلا به استرپتوکوکوزیس بوده‌اند.

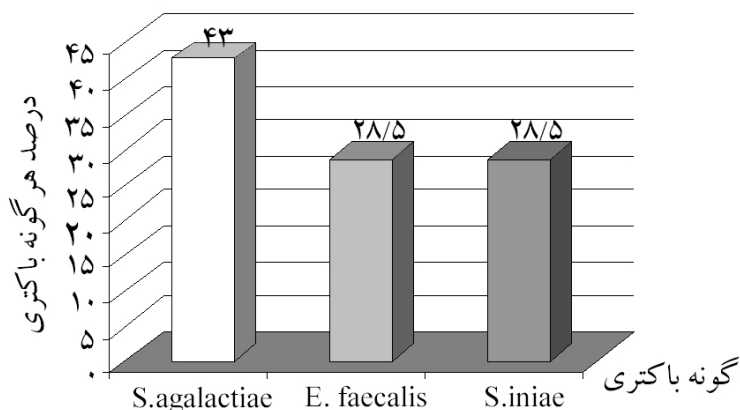
باکتری‌ها در فصول پاییز، بهار و تابستان و از مزارع شهرستان‌های آمل، چالوس و ساری جداسازی گردیدند اما در زمستان از هیچیک از مزارع، باکتری‌های مورد نظر جداسازی نگردید.



نمودار ۱: میزان ابتلا نمونه‌ها به استرپتوکوکوزیس

Enterococcus faecalis هر کدام ۲۸/۵٪ از کل باکتری‌ها را به خود اختصاص داده‌اند که درصد هر گونه باکتری به کل باکتری‌های شناسایی شده در نمودار ۲ نشان داده شده است.

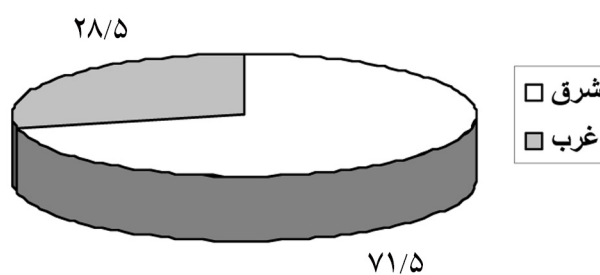
بیشترین فراوانی گونه جداسازی شده مربوط به *Streptococcus agalactiae* بوده است به طوری که ۴۳٪ از کل باکتری‌ها، مربوط به این گونه بوده و گونه‌های *Streptococcus iniae* و



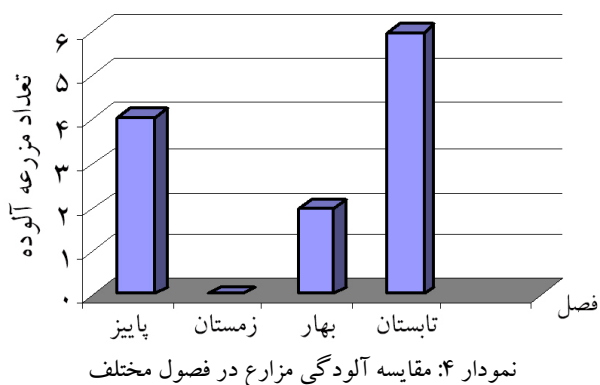
نمودار ۲: مقایسه درصد باکتری‌های جداسازی شده

و در فصل پاییز اگرچه با کاهش دما، میزان شیوع بیماری کاهش می‌یابد اما ماهیان آلوده همچنان در مزارع وجود دارند و بیماری مشاهده می‌گردد و با کاهش دما در فصل زمستان اثری از این بیماری دیده نمی‌شود اما با افزایش دما در فصل بهار، بروز مجدد بیماری مشاهده می‌گردد که در تابستان به اوج خود می‌رسد (نمودار ۴).

بیشترین میزان آلودگی در شرق مازندران (آمل و ساری) بود به طوری که در هر ۳ فصل پاییز، بهار و تابستان از این مناطق، نمونه آلوده جداسازی شد و کمترین میزان آلودگی در غرب مازندران (تنکابن، نوشهر و چالوس) مشاهده شد به طوری که تنها در فصل تابستان، نمونه آلوده جداسازی گردید (نمودار ۳).
طی این تحقیق مشاهده شد که با افزایش دمای آب در فصل تابستان، میزان شیوع بیماری نیز افزایش می‌یابد



نمودار ۳: مقایسه آلودگی در شرق و غرب مازندران



نتایج تست‌های به عمل آمده جهت شناسایی گونه‌های باکتری در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: نتایج تست‌های انجام شده برای شناسایی گونه‌های *Streptococcus sp.*

<i>Entrococcus faecalis</i>	<i>Streptyococcus milleri</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	تست
کروی - زنجیره کوتاه	کروی - زنجیره ای	کروی - زنجیره ای	کروی - زنجیره ای	شکل سلول و مرفولوژی
+	+	+	+	رنگ آمیزی گرم
+	+	+	+	KOH 3%
F	F	F	F	تست O-F glucose
α	α	α	α	همولیز
-	-	-	-	کاتالاز
-	-	-	-	اکسیداز
G	NG	NG	NG	رشد در NaCl ۶/۵٪
G	NG	NG	G	رشد در ۱۰ C°
G	NG	NG	NG	رشد در ۴۵ C°
+	-	+	-	هیدرولیز هیپورات
+	-	-	+	هیدرولیز اسکولین
-	-	-	-	حرکت
-	-	-	-	تولید H ₂ S
A	A	-	-	تولید اسید از قندهای لاکتوز
-	-	-	-	رافینوز
A	-	A	A	ریبوز
ND	A	-	A	سالیسین
-	-	-	-	سوربیتول
A	A	-	A	مانیتول
ND	A	A	A	ترهالوز

انجام نشده = ND همولیز $\alpha = \alpha$ رشد نمی‌کند = NG رشد می‌کند = G تولید اسید از قند = A تخمیر کننده = F

بحث

طی چند سال اخیر بیماری استرپتوکوکوزیس یا انتروکوکوزیس یکی از معضلات مهم مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی بوده است، بروز این بیماری اولین بار در استان مازندران (۴) و پس از آن در استان فارس (۱) بوده است.

عوارض بالینی خارجی مشاهده شده در ماهیان شامل شنای نامنظم، تیرگی پوست، بی‌حالی، بیرون‌زدگی چشم‌ها (یک‌طرفه یا دوطرفه)، آبسه جلدی، خون‌ریزی در اطراف چشم‌ها و در سطح قاعده باله‌ها است (۳، ۶، ۸ و ۱۸). شنای نامنظم یکی از رایج‌ترین علائم این بیماری است. شنای ماهیان به صورت عمودی و یا به پهلو می‌باشد و ماهی تعادل در شنا ندارد. این موضوع مرتبط به تهاجم باکتری به مغز می‌باشد که همین تهاجم یکی از عوامل مرگ در ماهیان است (۱۶). همان‌طور که اشاره شد از دیگر علائم رایج در این بیماری اگزوفتالمی (بیرون‌زدگی چشم) یک یا دو طرفه یا چشم برآمدگی است. علت اصلی بروز این عارضه تجمع زیاد اکسودای موکوسی - چرکی در پشت کره چشم است (۵). طبق بررسی‌های به عمل آمده، علائم بالینی داخلی شامل رنگ پریدگی کبد، پرخونی و اسپلنومگالی (تورم طحال)، خون‌ریزی اطراف قلب و بعضاً سطح احشاء است (۱۹ و ۲۰). که همه این علائم در تمام ماهیانی که کشت از کلیه آن‌ها مثبت بوده، مشاهده گردید. همچنین در بعضی از ماهیان، تخریب کامل کره چشم و کدورت قرنیه نیز وجود داشت.

عوامل میکروبی جداسازی شده در این بررسی که شامل *Streptococcus*، *Streptococcus iniae* و *Enterococcus faecalis* و *agalactiae*

بوده‌اند که از نواحی دیگر دنیا نیز گزارش شده‌اند (۵)، ۶، ۱۱، ۱۵ و ۱۸). همچنین باکتری *Vagococcus salmoninarum* به عنوان عامل مرگ و میر ناشی از استرپتوکوکوزیس در زمان تخم‌ریزی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در اسپانیا (۲۲) و *Streptococcus dysgalactiae* به عنوان عامل مرگ و میر ماهیان پرورشی *yellow tail* و *Amberjack* (*Seriola dumerili*) در ژاپن جداسازی و شناسایی گردیدند (۱۶).

تحقیقات نشان داده است که استرپتوکوکوزیس در ماهیان پس از بروز یک استرس شدید اتفاق افتاده است. یکی از عوامل استرس‌زا تغییر درجه حرارت آب می‌باشد. به طوری که در تحقیقی بر روی ماهی تیلپیا موزامبیکا (*Oreochromis mossambicus*)، باکتری *Streptococcus iniae* با دوز 1×10^7 به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و ماهیان آلوده در ۵ رژیم دمایی مختلف شامل ۱۹، ۲۳، ۲۷، ۳۱ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان مرگ و میر ماهیان در دمای ۱۹ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری بیش از سایر دماها بوده است. قابل ذکر است که درجه حرارت مناسب رشد تیلپیا ۲۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد است (۱۴). بیماری به صورت حاد سبب مرگ و میر بالایی طی ۲-۳ هفته در فصول با درجه حرارت بالای آب می‌گردد. با این وجود، بیماری ممکن است به صورت مزمن، وقتی دمای آب پایین‌تر است وجود داشته باشد و مرگ و میر کمتر اما مداوم ماهیان را به دنبال داشته باشد.

بروز استرپتوکوکوزیس در مزارع تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استان مازندران عمدتاً از

در این بررسی، کلیه مراحل تشخیص و شناسایی باکتری با استفاده از روش‌های متداول میکروبیولوژی (رنگ آمیزی، تست‌های عمومی و تست‌های بیوشیمیایی تفریقی) انجام گردید.

سپاسگزاری

از حمایت‌های جناب آقای دکتر پورغلام، ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و راهنمایی و همکاری‌های جناب آقای مهندس صفری مدیر تحقیقات ژنتیک مولکولی و خانم مهندس نصیری، کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

- آذری تاکامی، ق.، ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روش‌های پیشگیری و درمان بیماری‌های ماهی. انتشارات پرپور. ویرایش دوم با ضمیمه بیماری استرپتوکوکوس. ۳۱۲ صفحه.
- اینگیس، ر.ج.؛ روبرت، ن.ر. و برومیج، ؟ . بیماری‌های باکتریایی ماهی. سلطانی، م. ۱۳۷۵. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور. ۵۳۱ صفحه.
- قیاسی، م.؛ زاهدی، آ. و خوشباور رستمی، ح.، ۱۳۷۹. بررسی اپیدمی استرپتوکوکوزیس در ماهیان مولد قزل‌آلای رنگین کمان در استان مازندران. اولین همایش بهداشت و بیماری‌های آبزیان. ۲۵-۲۷ بهمن اهواز.

اواخر خرداد ماه تا اوایل شهریور رخ می‌دهد. لیکن وجود آلودگی در گله تا اواخر آبان قابل ردیابی است. در زمان بروز بیماری درجه حرارت آب معمولاً ۱۷ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد بود، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در استان مازندران، استرپتوکوکوزیس یک بیماری فصلی است و با افزایش درجه حرارت آب، احتمال بروز آن افزایش می‌یابد و انتظار روبرو شدن با این بیماری از اواخر بهار تا اواخر تابستان می‌باشد و در زمستان به دلیل کاهش دما، امکان بروز بیماری وجود ندارد.

یکی از راه‌های انتقال این بیماری، ورود ماهی‌های آلوده به مزارع است که به نظر می‌رسد با ورود ماهی آلوده به منطقه هراز و با توجه به در امتداد هم قرار داشتن مزارع این منطقه بیماری شیوع گسترده‌ای یافته و با گذشت زمان و انتقال ماهی بیمار به سایر مناطق، کم‌کم رد پای این بیماری در مناطق دیگر نیز مشاهده شده‌است.

امروزه از روش‌های مختلفی برای شناسایی استرپتوکوک‌های بیماری‌زا در ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از متداول‌ترین روش‌ها استفاده از تست‌های افتراقی بیوشیمیایی است (۴).

RAPD PCR (rapid amplified polymorphic DNA) از جمله روش‌های مناسبی است که معمولاً در جهت تشخیص تفاوت‌های بین گونه‌ای در بین نمونه‌های جدا شده استرپتوکوک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). در کنار روش‌های مولکولی از روش‌های ایمنی شناسی خصوصاً تکنیک آنتی بادی فلورسنت غیر مستقیم IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Technique) نیز استفاده می‌شود (۱۱).

4. Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination, *Journal of Veterinary Microbiology*, Vol.122, pp.1-15.
5. Austin, B. and Austin, D., 1993. Bacterial fish pathogens diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood limited. pp.27-37 and 70.
6. Bowser, P.R.; Wooster, G.A.; Getchell, R.G. and Timmons, M.B., 1998. *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility, *Journal of the World Aquaculture Society*. vol. 29, no. 3, pp. 335-339.
7. Eldar, A. and Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases, *Journal of Diseases of Aquatic Organisms*. vol. 36, no. 3, pp. 227-231.
8. Eldar, A.; Perl, S.; Frelier, P.F. and Bercovier, H., 1999. Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection, *Journal of Diseases of Aquatic Organisms*. vol. 36, no. 2, pp. 121-127.
9. Evans, J.; Klesius, P.H.; Gilbert, P.M.; Shoemaker, C.A.; Alsarawi, M.A.; Landsberg, J.; Duremdez, R.; Almarzouk, A. and Alzenki, S., 2002. Characterization of beta-haemolytic Group B streptococcus *agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* l. and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait. *Journal of fish diseases*.vol.25, pp.505-513.
10. George, T.T., 1999. Canadian doctors confirm the infection and effects of *Streptococcus iniae* in fish and humans, *Contributed-papers-Aquaculture-Canada* no. 98-2, pp. 87-89.
11. Klesius, P.; Evans, J.; Shoemaker, C.; Yeh, H.; Goodwin, A.E.; Adams, A. and Thompson, K., 2006. Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique, *Journal of Aquaculture*, Vol. 258, pp.180-186.
12. Kusuda, R.; Kawai, T.; Toyoshima, T. and Komatus, I., 1976. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Vol. 42, pp.1345-1352.
13. MacFaddin, J.F., 2000. *Biochemical Testes for Identification of medical Bacteria*. Williams and Wilkins. pp. 912.
14. Ndong, D.; Chen, Y.Y.; Lin, Y.H.; Vaseeharan, B. and Chen, J.C., 2006. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Journal of Fish and Shellfish Immunology*. Vol.22, pp. 686–694.
15. Nguyen, H.T.; Kanai, K. and Yoshikoshi, K., 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. *Journal of Aquaculture*, Vol. 205, pp. 7-17.
16. Nomoto, R.; Munasinghe, L.I.; Jin, D.H.; Shimahara, Y.; Yasuda, H.; Nakamura, A.; Misawa, N.; Itami, T. nad Yoshida, T., 2004. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *Journal of Fish Diseases*, Vol.27, pp.679-686.
17. Roach, J.C.M.; Levett, P.N. and Lavoie, M.C., 2006. Identification of *Streptococcus iniae* by Commercial bacterial identification systems, *Journal of Microbiological Methods*, Vol.67, pp.20-26.
18. Romalde, J.L. and Toranzo, A.E., 1999. Streptococcosis of marine fish. *Gilles Oliver*, No. 56.
19. Russo, R.; Mitchell, H. and Yanong, R.P.E., 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models, *Journal of Aquaculture*. Vol.256, pp. 105 – 110.
20. Sako, H., 1998. Studies on *Streptococcus iniae* infection in Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Nansi Natl. Fish. Res. Inst.* 31, 63-120.

21. Yanong, R.P.E. and Floyd, R.F., 2002. Streptoccal infection of fish. Florida Cooperative Extension Service. IFAS, University of Florida, p. 3. Circular FA057.
22. Zarzuela, R.I.; Bias, I.; Girones, O.; Ghittino, C. and MuAzquiz, J., 2005. Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Veterinary Research Communications, Vol. 29, pp. 553-562.