

تشخیص مولکولی غیر کشنده باکتری *Streptococcus agalactiae* در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهرنوش فرید^۱، علیرضا میرواقفی^{۲*}، حمید فرحمند^۱، محمد علی نعمت الهی^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استاد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۱۰

چکیده

بیماری استرپتوکوکوزیس به دلیل شیوع سریع به‌ویژه در فصل تابستان، مرگ و میر نسبتاً بالا، کاهش تولید و خسارات اقتصادی به آبی پروری یکی از مهمترین بیماری‌های باکتریایی در ماهیان سردآبی است. تشخیص به‌موقع بیماری در پیشگیری از همه‌گیری و اقدامات درمانی بسیار ضروری می‌باشد. نمونه برداری به‌صورت Non-destructive از خون و موکوس ماهی یکی از بهترین روش‌های تشخیصی می‌باشد که بدون نیاز به تلف کردن ماهی بیماری تشخیص داده می‌شود. در این بررسی شناسایی باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در ماهی قزل‌الای رنگین کمان انجام شده است که با وجود بیماری‌زایی بالای این باکتری، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. برای این بررسی از خون و موکوس ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان برداشت گردید و تشخیص مولکولی توسط پی سی آر انجام گردید. در بررسی مولکولی DNA موکوس و خون به‌طور مستقیم استخراج و وارد چرخه پی سی آر گردید. برای PCR از پرایمر طراحی شده بر پایه ژن scpB استفاده گردید که برای این جنس اختصاصی می‌باشد و از حساسیت بالایی برای تشخیص این گونه برخوردار است. نتایج نشان داد که در خون ماهیان قبل از بروز علائم بیماری می‌توان با استفاده از روش مولکولی باکتری را تشخیص داد اما در موکوس ماهیان باکتری مورد نظر یافت نشد. می‌توان با استفاده از این روش بیماری باکتریایی در حال گسترش در ماهیان مولد و ماهیان ارزشمند را بدون نیاز به تلف کردن ماهی تشخیص داد و به درمان آن پرداخت. واژگان کلیدی: روش تشخیص مولکولی، پی سی آر، خون، موکوس، بیماری.

۱. مقدمه

باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه یکی از باکتری‌های مهم بیماری‌زا در میان ماهیان آب شیرین، شور و لب‌شور می‌باشد که بیماری و مرگ و میر را در ماهیان ایجاد می‌کند. این گونه می‌تواند ماهی‌های زیادی از جمله تیلاپیا، مولت، شاینر طلائی، منهدن، گود و بالمینو را آلوده سازد. همه‌گیری این بیماری با مرگ و میر بالا به چندین عامل از جمله بالا رفتن دمای آب، افزایش سطح آمونیاک و کم شدن اکسیژن محلول مربوط می‌باشد. علائم بیماری شامل بی‌اشتهایی، قرار گرفتن بدن به صورت C، شنای نامنظم، بیرون‌زدگی چشم و آسیت می‌باشد (Evans et al., 2002). این گونه می‌تواند موجب سپتی سمی در تیلاپیا گردد و بر روی مغز، کلیه و دستگاه گوارش اثر گذار باشد. از شایع‌ترین علائم این بیماری می‌توان بی‌اشتهایی، بیرون‌زدگی چشم، تجمع مایع در حفره شکمی و شنای نامنظم را نام برد (Giordano et al., 2010).

در دهه گذشته مطالعات بسیار زیادی بر روی تشخیص بیماری‌های باکتریایی با استفاده از پروتکل پی‌سی‌آر انجام پذیرفته است. اساس اکثر این بررسی‌ها بر شناسایی ژن 16S rRNA بوده است و با نتایج قابل قبولی همراه نبوده است (Cunningham et al., 2002; Keya sen et al., 2000; Bridge et al., 2001; Cano-Gomez et al., 2010; Aila et al., 2009). بیشتر روش‌های تشخیصی پاتوژن برای برداشت نمونه نیاز به کشتن ماهی دارد، اما در این بررسی تشخیصی بدون نیاز به تلف ساختن ماهی نمونه برداری از خون و موکوس صورت پذیرفته است. این نوع روش برای تشخیص بیماری مخصوصاً در مورد ماهیان مولد و ماهیان ارزشمند روشی سودمند می‌باشد (Cipriano et al., 1996).

ژن scpB توسط دیمیتریو و همکاران (۲۰۰۶) برای بررسی نمونه‌های انسانی معرفی گردید و با آن شناسایی باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه به خوبی انجام پذیرفت. این ژن نقش مهمی در تولید پروتئین C5a دارا می‌باشد که نقش آن در چسبیدن به سلول اپیتلیال می‌باشد و به طور مستقیم با بیماری‌زایی باکتری در ارتباط می‌باشد.

بنابراین هدف این بررسی ایجاد روش پی‌سی‌آر با استفاده از پرایمرهای جدید برای تشخیص سریع و

اختصاصی باکتری بدون تلف‌سازی ماهی می‌باشد (Beaz-hidalgo et al., 2008).

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه ماهی

تعداد ۶۰ عدد ماهی قزل‌آلابی رنگین کمان از ماهی سرای کرج (کرج-ایران) خریداری شد و به دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردید. ماهیان متوسط وزن 230 ± 20 گرم را دارا بودند. ماهیان در ۶ مخزن ۱۰۰۰ لیتری حاوی آب شهری کلرزدایی شده جای گرفتند. دوره روشنایی به تاریکی ۱۲ ساعت به ۱۲ ساعت بود. ماهیان روزانه توسط بیومار شرکت بهپرور (کرج-ایران) غذادهی شدند. میانگین دمای آب تانک‌ها ۱۷ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید.

۲.۲. سویه باکتری و شرایط کشت

باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه با شناسه RTCC2051 از موسسه سرم سازی رازی (ایران-کرج) تهیه گردید. برای کشت باکتری محیط کشت بلاد آگار ۵ درصد از شرکت دارواش (ایران-تهران) خریداری شد. سپس از محیط کشت اولیه کلونی‌ها برداشت و به صورت خطی بر روی محیط کشت بلاد آگار کشت داده شد و برای مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. برای تهیه مخزن باکتری، کلونی باکتری در محیط کشت BHI که حاوی ۲۰ درصد گلیسرول بود حل گردید. پس از تهیه، محلول در دمای ۸۰- قرار داده شد.

برای تعیین دوز تزریقی از مخزن باکتری بر روی محیط بلاد آگار به صورت خطی کشت داده شده و داخل انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت کلونی‌های باکتری که رشد کرده‌اند برداشته شده و در سرم فیزیولوژی حل گردیدند و از محلول به دست آمده میزان ۱۰۰ ماکرولیتر بر روی محیط‌های کشت تازه ریخته شد و دوباره به صورت کامل بر روی سطح محیط کشت پخش گردید.

برای تعیین CFU از باکتری دوبار کشت داده شده بر روی محیط کشت بلاد آگار استفاده گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر کدورت سنجیده شد. در جذب ۶۲۳ نانومتر، برای کدورت عدد ۰/۲

این پرایمر براساس ناحیه پرایمر طراحی شده براساس ژن *scpB* استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمر معکوس نیز به صورت 5'ACCTGGTG' 3'-TTTGACCTGAACTA می‌باشد (Dimitriva *et al.*, 2004).

۷.۲. توالی یابی محصول پی سی آر

برای توالی‌یابی، محصول پی‌سی‌آر به شرکت فزایژوه فرستاده شد. برای بررسی توالی محصول پی سی‌آر از نرم‌افزار BLAST استفاده و توالی دریافتی مورد بررسی قرار گرفت و صحت آن ارزیابی شد. با این بررسی از چسبیدن درست پرایمر به جایگاه ژنی *scpB* در باکتری اطمینان حاصل گردید.

۸.۲. روش آماری

پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، برای بررسی تأثیر تیمارها و زمان نگهداری از طرح کاملاً تصادفی و تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون دانکن در سطح معنی‌دار پنج درصد استفاده شد. تجزیه تحلیل آماری داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. علائم و تلفات ماهیان پس از تزریق باکتری
از روز ششم پس از تزریق علائم بیماری ظاهر گردید. این علائم شامل زخم در باله دم، خونریزی در قاعده باله‌ها، تیرگی رنگ بدن، اگرزوفتالمی یک‌طرفه و دوطرفه و شنای نامنظم و علائم داخلی بدن ماهی شامل رنگ‌پریدگی کبد و خونریزی داخلی و تورم اندام‌های گوارشی بودند.

۲.۳. پی سی آر نمونه های غیر مخرب

در بررسی نمونه‌های خون بر روی ژل در نمونه‌های برداشتی از روز سوم پس از تزریق، باندهای حاصل از وجود ژن *scpB* در محدوده 245bp دیده شد که نشان دهنده وجود باکتری در نمونه خون مورد بررسی می‌باشد. برای یافتن باکتری بر روی موکوس از

خوانده شد و بر این اساس میزان CFU باکتری برابر با 8×10^9 محاسبه گردید.

۳.۲. تزریق ماهیان

برای تزریق باکتری این میزان CFU را به میزان 8×10^7 CFU برابر رقیق کرده و محلولی با میزان 8×10^7 CFU برای تزریق به ماهیان آماده شد. ماهیان در ظرف حاوی گل میخک بیهوش گردیده و تزریق به صورت داخل صفاقی به میزان ۰/۱ سی‌سی انجام پذیرفت. به ماهیان شاهد نیز به میزان ۰/۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل تزریق گردید.

۴.۲. نمونه برداری غیر کشنده

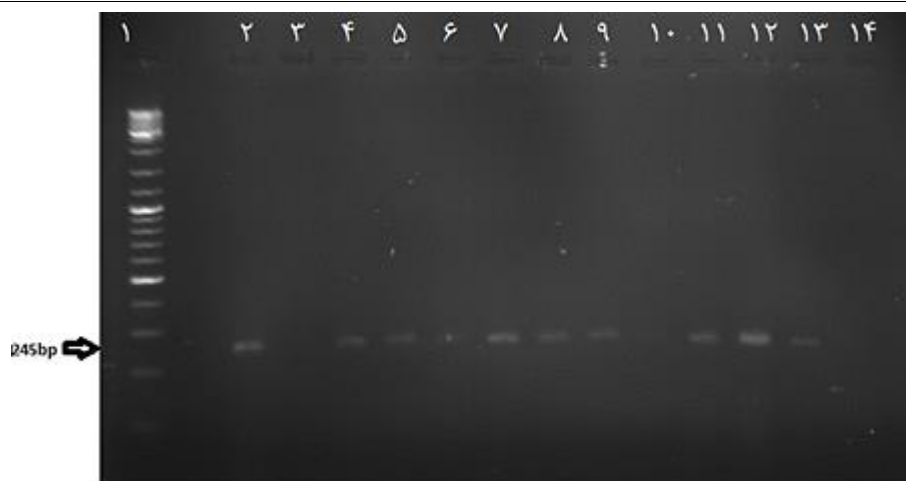
از ماهیان ۲۴ ساعت پس از تزریق با فاصله زمانی ۲۴ ساعته نمونه برداری انجام پذیرفت. میزان یک سی‌سی خون از ناحیه دم ماهیان برداشت و داخل لوله حاوی EDTA ریخته شد. خون گرفته شده تا هنگام بررسی و استخراج DNA در دمای ۷۰- نگهداری شدند. موکوس نیز توسط کشیدن لام بر روی بدن ماهی در جهت فلس‌ها برداشت شد. سپس از روی لام به داخل میکروتیوپ ریخته شده و برای جلوگیری از لیز شدن نمونه توسط آنزیم‌های موجود در موکوس، نمونه‌ها بر روی یخ جابجا شدند و سریعاً به دمای ۷۰- منتقل گردیدند.

۵.۲. استخراج DNA

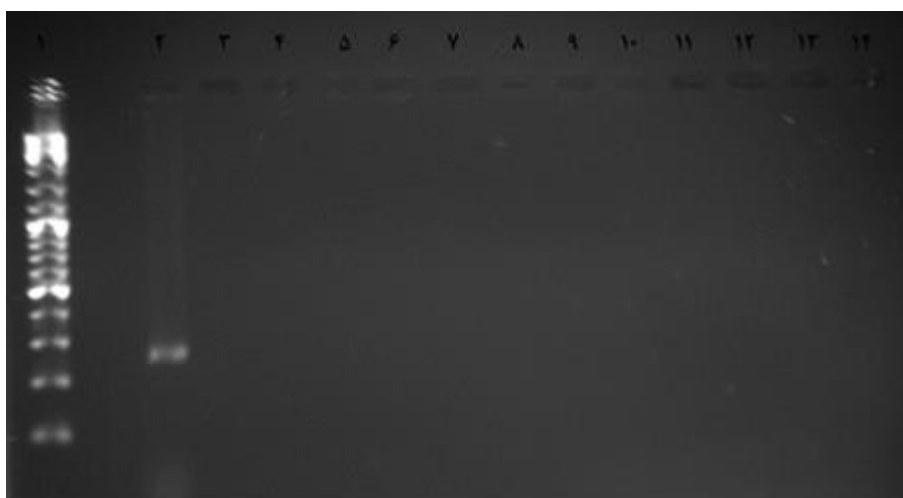
برای استخراج DNA از خون از کیت خون Cinnapure DNA KIT و برای موکوس از روش فنل و کلروفورم (Altinok *et al.*, 2001) استفاده گردید. پس از استخراج، DNA تا زمان بررسی در دمای ۲۰- قرار داده شد. به منظور استخراج DNA از باکتری، برای مدت ۱۰ دقیقه به میکروتیوپ حرارت ۹۶ درجه وارد گردید تا DNA استخراج گردد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه میکروتیوپ از داخل دستگاه برداشته شده و برای نگهداری به دمای ۷۰- انتقال یافتند.

۶.۲. پرایمر مورد استفاده و شرایط پی سی آر

توالی نوکلئوتیدی پرایمر پیش رونده به صورت 3-ACAATGGAAGGCGCTACTGTTC-5' بود.



شکل ۱ - ژل الکتروفورز محصولات پی سی آر نمونه های خون قبل از بروز علائم بیماری. (۱ DNA Ladder، ۲: کنترل مثبت، ۳: کنترل منفی و ۴ الی ۱۴: نمونه های خون از روز سوم پس از تزریق).



شکل ۲ - ژل الکتروفورز حاصل از نمونه های موکوس قبل از بروز علائم. ۱: DNA Ladder، ۲: کنترل مثبت و ۳: کنترل منفی ۴ الی ۱۴: نمونه های موکوس.

چسبیده است.

۴. بحث و نتیجه گیری

تکنیک پی سی آر به عنوان روش تشخیصی مولکولی امروزه در حال گسترش است. استفاده از پرایمرهای عمومی همانند 16SrRNA به علت در دسترس بودن و حفاظت شدگی بالا در گونه ها مورد استفاده می باشند (Zlotkin et al., 1998; Blanco et al., 2002). اما تشخیص توسط این پرایمرها بایستی با قدم های بعدی شامل توالی یابی و برش های آنزیمی اختصاصی تر شوند. زیرا به همراه نکات مثبتی که در این گونه پرایمرها وجود دارد، به علت این که احتمال ریسک نتایج مثبت اشتباه را بالا می برند و می توانند به گستره وسیعی از باکتری ها و انگل ها بچسبند، مورد اعتماد کامل نیستند.

DNA نمونه های موکوس برای واکنش پی سی آر برداشت شد (شکل های ۱ و ۲). نتایج حاصل از استخراج DNA هیچ گونه DNA استخراج شده ای را به ما نشان نداد. اما برای اطمینان از نبود باکتری پی سی آر انجام گردید. در نمونه ها باندی مبنی بر وجود باکتری استرپتوکوکوس اگالاکتیه دیده نشد.

۳.۳. توالی یابی محصول پی سی آر

نتایج توالی یابی نشان داد که محصول پی سی آر مربوط به سویه RTCC_2051 می باشد که باکتری مورد نظر ما در این بررسی می باشد. توالی مربوط به ژن پپتیداز C5a(sc pB) است و با Accession number JF831508.1 موجود می اشد. این نتایج نشان می دهد پرایمر طراحی شده و استفاده شده در این بررسی به قطعه مورد نظر در ژنوم باکتری

وارداتی که برنامه ارزیابی سلامت را بر روی آن‌ها انجام می‌دهند به کار گرفته می‌شود تا بدون تلف شدن ماهی بتوان سلامت آن را ارزیابی و پروانه واردسازی آن را صادر کرد. به علاوه برای نمونه‌گیری بدون کشتن و تلف کردن ماهی از موکوس و خون بهره گرفته شد که نمونه برداری از آنها راحت می‌باشد و کمترین استرس را به ماهی منتقل می‌کند.

باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در موکوس شناسایی نگردید و تمامی نمونه‌های موکوس منفی اعلام شدند. علت احتمالی این جواب به خصوصیات موکوس می‌تواند مرتبط باشد. موکوس یک جایگاه انتقالی بر روی بدن ماهی می‌باشد که به دلیل آنزیم‌های لیزکننده فراوان محیطی است که بار باکتریایی کمتری بر روی آن باقی می‌ماند. در بیماری استرپتوکوکوزیس محل تجمع باکتری در کلیه و سیستم عصبی ماهی می‌باشد. پس می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که باکتری بر روی فلور موکوس دیده نمی‌شود. نیکوکلایین و همکاران (۲۰۰۱) بررسی را بر روی چسبندگی موکوس انجام دادند و عنوان کردند که باکتری‌های خاصی می‌توانند به موکوس بچسبند. بر این اساس می‌توان گفت که باکتری مورد نظر ما بر روی موکوس نمی‌نشیند. برخلاف این بررسی سپریانو و همکاران (۱۹۹۶) برای تشخیص باکتری آئروموناس سالمونیسیدا از موکوس برداشت کردند و کشت دادند و عنوان کردند که موکوس می‌تواند محل مناسبی برای نمونه برداری از ماهیان مولد باشد. این تفاوت در نتیجه می‌تواند ناشی از این مسئله باشد که جایگاه اصلی این باکتری بر روی پوست ماهی و موکوس می‌باشد و از همین طریق ماهی را بیمار می‌سازد.

ماگارینوس و همکاران (۱۹۹۵) بر روی تاثیر باکتری پاستورلا پیسکیدا بررسی را انجام دادند و متوجه شدند که این باکتری بر روی موکوس ماهیان دریایی مثل باس دریایی دیده می‌شود اما بر روی موکوس ماهیان قزل‌آلا موجود نمی‌باشد. این محققین وجود موادی مانند لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئاز-ها و گلیکوپروتئین‌ها را در موکوس عاملی برای رشد نکردن میکروارگانیزم‌ها بر روی آن می‌دانند. همچنین به دلیل فعالیت زیاد آنتی‌باکتریال موکوس قزل‌آلا این باکتری پس از چسبیدن به موکوس از بین خواهد رفت. اوستین (۱۹۹۸) در طی بررسی عنوان کرد که موکوس

سن و همکاران (۲۰۰۰) از نسخه ژن ریبوزومی 16SrRNA استفاده کردند. آن‌ها نقص کار خود را این‌طور عنوان کردند که این محدوده ژنی بین باکتری‌ها مشترک است و آلودگی با انواع باکتری‌های موجود در محیط وجود دارد و احتمال دارد نتایج مثبت اشتباهی به دست بیاید. موارد متعددی از اشتباه در تشخیص توسط این محدوده ژنی در جنس مورد نظر ما رخ داده است از جمله بریدج و همکاران (۲۰۰۱) براساس ژن 16SrRNA توالی باکتری استرپتوکوکوس اینیه را با استرپتوکوکوس دیفیسیل را نزدیک هم گزارش کردند و حسن و همکاران (۲۰۰۰) این دو گونه را یکسان تشخیص دادند. با توجه به این مسئله که باکتری‌های جنس استرپتوکوکوس در ماهیان بیماری‌زا هستند، احتیاج به محدوده ژنی اختصاصی برای تشخیص این باکتری الزام می‌یابد.

در این بررسی از محدوده ژنی scpB استفاده گردید. دیمیترویو و همکاران (۲۰۰۴) گروه B استرپتوکوک‌ها را با استفاده از پرایمر طراحی شده براساس ژن scpB شناسایی کردند و کارایی این ژن را در پی‌سی‌آر بالا دانستند و آن را جایگزین مناسبی برای 16SrRNA دانستند. فرانکن و همکاران (۲۰۰۱) نیز بر روی ژن scpB تحقیقی را انجام دادند و نشان دادند این محدوده ژنی از کارایی بالاتری برخوردار است و می‌تواند در پی‌سی‌آر به‌عنوان محدوده مناسبی مدنظر قرار بگیرد. نتایج نیز نشان داد که توالی مورد نظر، توالی ژن scpB در باکتری با سویه RTCC2051 می‌باشد. این نتیجه دقت بالای پرایمر را در چسبیدن به جایگاه مورد نظر و نیز شرایط بسیار مناسب و بهینه پی‌سی‌آر را نشان می‌دهد.

نمونه برداری برای تشخیص باکتری عمدتاً منوط به کشتن ماهی می‌باشد. برای تشخیص از ارگان‌های کبد، کلیه و مغز استفاده می‌شود که همه مستلزم تلف نمودن ماهی است. در این بررسی با استفاده از خون و موکوس نمونه برداری برای تشخیص باکتری انجام پذیرفت. استفاده از این دو منبع تشخیصی این امکان را فراهم می‌کند که بدون احتیاج به تلف نمودن ماهی بتوان از خون و موکوس نمونه برداشت کرد. این مزیت در برنامه‌های تشخیص سلامت ماهیان مولد و نیز ماهیان ارزشمندی که نسل آنها در خطر می‌باشد بسیار کاربرد دارد. این روش همچنین در مورد ماهیان

وجود ندارد. در شرایط پرورشی ماهیان در صورت داشتن این باکتری در خون خود به احتمال بسیار زیادی بیمار می‌شوند، زیرا مسلماً شرایط پرورش در تراکم بالا محیط استرس‌زایی را نسبت به محیط آزمایشی ما دارا می‌باشد. در سال ۲۰۱۰ اوانس و همکاران آنتی ژن باکتری استریپتوکوکوس آگالاکتیه را ۳ روز پس از تزریق در نمونه‌های مغز ماهیان تشخیص دادند. اما ۷ روز پس از تزریق آنتی ژن باکتری در بافت یافت نشد که این مسئله ممکن است به خاطر پاک شدن ارگان مورد نظر از ارگانیزم‌های بیماری‌زا باشد.

ژو و همکاران (۲۰۱۰) بر روی تشخیص باکتری در خون بررسی انجام دادند و نتایج منفی که در مورد پی‌سی‌آر در نمونه‌های مستقیم از خون داشتند به میزان کم باکتری در خون و همچنین ناکارآمدی استخراج DNA نسبت دادند. همچنین این محققین برای افزایش کارایی پی‌سی‌آر خود نمونه‌های خون گرفته شده را در محیط کشت مخصوصی کشت دادند تا میزان باکتری به حدی که قابل تشخیص باشد برسد. بایستی توجه داشت که تفاوت در نتایج، ممکن است به علت تفاوت در میزان پخش شدگی بیماری در داخل بدن ماهی و ارگان‌های مختلف آن باشد. در بررسی دیگری توسط برونو و همکاران (۲۰۰۷)، نتایج حاصل از تشخیص توسط ELISA از بافت کلیه همخوانی با نتایج گرفته شده در خون نداشت که این امر نشان دهنده سیر طبیعی و مزمن بیماری در میزبان و یکسان پراکنده نشدن باکتری در بدن و بافت‌های ماهی می‌باشد.

براساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان داشت که استفاده از این محدوده ژنی در بین جمعیت ماهیان مولد و نیز ماهیان در خطر انقراض حائز اهمیت می‌باشد و با استفاده از این تکنولوژی می‌توان از همه گیری بیماری در جمعیت این ماهیان جلوگیری کرد.

References

- Altinok, I., Grizzle, J.M., Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of polymerase chain reaction. *Disease of Aquatic Organisms*, 44, 29-34.
- Beaz-Hidalgo, R., Magi, G.E., Balboa, S., Barja, J.L., Romalde, J.L., 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology*, 128, 386-394.

ماهی قزل آلابی حاوی مواد آنتی باکتریال می‌باشد. همسو با این نتایج برگسون و همکاران (۲۰۰۵) بر روی موکوس ماهی آتلانتیک کاد بررسی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که موکوس این ماهی فعالیت شدید آنتی میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را دارا می‌باشد. در تایید این نتایج در سال ۲۰۱۰ کانتو عنوان کرد که موکوس در ماهی قزل آلابی حاوی موادی می‌باشد که به سرعت باکتری‌های گرم مثبت و منفی را از بین می‌برد. این نتایج می‌تواند دلیلی باشد برای این ادعا که باکتری بر روی موکوس ماهی قزل آلابی به سرعت لیز شده و هضم می‌شود و در نتیجه هر یک از تست‌ها دیده نمی‌شود.

در این بررسی برای گرفتن نتایج دقیق از کل خون برداشت گردید تا باکتری در قسمت‌های ساترنیفیوژ شده و ته نشین شده برای برداشت پلاسما یا سرم باقی نماند. با استفاده از DNA استخراجی و PCR طراحی شده در روز سوم پس از تزریق و بیمار-سازی ماهی قبل از شروع علائم و تلفات باکتری تشخیص داده شد. در این روز ماهیان هیچ‌گونه علائمی را از خود نشان نمی‌دادند. بر این اساس می‌توان بیان کرد که ماهیان در قبل از بیمار شدن خود میزانی از باکتری را در خون خود دارا هستند که بسته به میزان پیشرفت بیماری تعداد آنها افزایش می‌یابد تنها غذاگیری آنها کمتر گردیده بود که این مسئله با توجه به شروع استرس ازدیاد باکتری در بدن امری توجیه پذیر است. در واقع با افزوده شدن سیر پیشرفت باکتری در بدن ماهی به تدریج اندام‌های داخلی درگیر گردیده و از اشتها ماهی کم می‌گردد. بررسی سن و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که بررسی در خون می‌تواند در روزهای اول بیماری و در میزان کم باکتری نتایج خوبی را بدهد. همچنین خاطر نشان کردند این نتایج مثبت در روز اول و دوم بیماری به احتمال زیاد به دست نمی‌آید.

گرچه در سیر طبیعی بیماری زمان‌هایی وجود دارد که باکتری در داخل یک ارگان جای می‌گیرد و شاید میزان باکتری در خون موقتی کاهش یابد اما هیچگاه عاری از باکتری نمی‌شود مگر این که سیستم دفاعی ماهی بتواند باکتری را از پای درآورد که این مسئله در سیستم‌های پرورشی ما همواره استرس بر ماهیان وارد می‌شود و بیماری در کمین آن‌ها است.

- Altinok, I., Grizzle, J.M., Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of *polymerase chain reaction*. *Disease of Aquatic Organisms*, 44, 29-34.
- Beaz-Hidalgo, R., Magi, G.E., Balboa, S., Barja, J.L., Romalde, J.L., 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology*, 128, 386-394.
- Berridge, B.R., Bercovier, H., Frelie, P.F., 2001. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difcile* 16S±23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*, 78, 165-173.
- Bergsson G., Agerberth B., 2005. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal the FEBS*, 272, 4960-4969.
- Blanco, M.M., Gibello, A., Vela, A.I., Moreno, M. A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2002. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50, 19-27.
- Bruno, D., Collet, B., Turnbull, A., Kilburn, R., Walker, A., Pendrey, D., McIntosh, A., Urquhart, K., Taylor, G., 2007. Evaluation and development of diagnostic methods for *Renibacterium salmoninarum* causing bacterial kidney disease (BKD) in the UK. *Aquaculture*, 269, 114-122.
- Cano-Gomez, A., Bourne, D.G., Hall, M.R., 2009. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Journal of Aquaculture*, 287, 1-10.
- Cipriano R.C., Ford L.A., Teska J.D., Schachte J.H., 1996. Use of non-lethal procedures to detect and monitor *Aeromonas salmonicida* in potentially endangered or threatened populations of migrating and post-spawning salmon. *Journal of Diseases of Aquatic Organisms*, 27, 233-236.
- Cunningham, C.O., 2002. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture*, 206, 19-55.
- Dmitriev, A., Suvorov, A., Shen, A.D., Yang, Y.H., 2004. Clinical diagnosis of group B streptococci by *scpB* gene based PCR. *Indian Journal of Medical Research*, 119, 233-236.
- ElAila, N.A., Emler, S., Kaijalainen, T., Baere, T.D., Saerens, B., Alkan, E., Deschaght, P., Verhelst, R., Vaneechoutte, M., 2010. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumonia* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infectious Diseases*, 104, 1-8.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Glibert, P.M., Shoemaker, C.A., Al Sarawi, M.A., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A., Al Zenki, S., 2002. Characterization of beta-hemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal of Fish Disease*, 25, 505-513.
- Evans, J.J., Pasnik, D.J., P.H., 2010. A commercial rapid optical immunoassay detects *Streptococcus agalactiae* from aquatic cultures and clinical specimens. *Veterinary Microbiology* 144, 422-428
- Franken, C., Haase, G., Brandt, C., Weber-Heynemann, J., Martin, S., Lämmler, C., Podbielski, A., Lütticken, R., Spellerberg, B., 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Molecular Microbiology*, 41, 925-935.
- Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Yildirim, A.Ö., Fink, K., Lämmler, C., Schlenstedt, R., 2000. Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP-factor genes. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 946-951.
- Kunttu H., 2010. Characterizing the bacterial fish pathogen *Flavobacterium columnare*, and some factors affecting fish pathogenicity. University of Jyväskylä.
- Pretto-Giordano L.G., Muller E.E., Freitas J.C., 2010. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 87-92.
- Magarinus, B., Pazos, F., Santos, Y., 1995. Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Journal Disease of Aquatic Organisms*, 12, 103-108.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouweland, A.C., 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2430-2435.
- Sen, K., 2000. Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 59 nuclease PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1953-1958.
- Zhou, L., Pollard, A., 2010. A fast and highly sensitive blood culture PCR method for clinical detection of *Salmonella entericaserovar Typhi*. *Journal of Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9, 1-7.
- Zlotkin, A., Hershko, H., Eldar, A., 1998. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild to cultured marine fish. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4065-4067.