نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ٦٦، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
۴۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۳

تشخیص مولکولی باکتری *Streptococcus agalactiae* در تخمدان مولدین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ژن *scpB*

سمیرا رشیدی منفرد؛ گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
علیرضا میرواقفی*؛ گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
حمید فرحمند؛ گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
محمدعلی نعمت‌الهی؛ گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
سیدعلی پوربخش؛ مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
عباس اشتری؛ مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

چکیده

باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه (group B, GBS) یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در ماهی، انسان و گاو است. در مطالعهٔ حاضر امکان انتقال عمودی این باکتری با استفاده از PCR ژن *ScpB* در مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. دو تیمار با جمعیت ٤٨ عدد ماهی در هر تیمار، در نظر گرفته شد؛ به ماهیان تیمار اول باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه با دوز ۱/۵×۱۰^۷ CFU/۰/۵ ml و به ماهیان تیمار شاهد، ۰/۵ ml نرمال سالین استریل، در عضلهٔ زیر بالهٔ پشتی تزریق شد. در این مطالعه نمونه‌برداری از بافت‌های کلیه، تخمدان و مایع تخمدانی از روز چهارم پس از تزریق صورت گرفت. استخراج DNA از نمونه‌های مذکور به دو صورت استخراج مستقیم از بافت و استخراج از محیط Brain-Heart Infusion که بافت در آن کشت داده شده بود، انجام شد. نمونه‌های استخراج‌شده به هر دو روش مورد تست PCR قرار گرفتند. نتایج PCR، DNA استخراج‌شده از بافت حضور باکتری را در(٤٤/٤٨) ٩١/٤٦٪ بافت کلیهٔ ماهیان و (٣٤/٤٨) ٧٠/٧٥٪ از بافت تخمدان ماهیان نشان داد که این نتایج در PCR، DNA استخراج‌شده از محیط کشت برای بافت‌های کلیه و تخمدان به ترتیب برابر (٤٦/٤٨) ٩٥/٨٣٪ و (٤٢/٤٨) ٨٧/٥٪ بود. نتایج جداسازی و توالی‌یابی حضور باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در بافت تخمدان را اثبات کرد.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس آگالاکتیه، PCR، ژن *ScpB*، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

* نویسنده مسئول تلفن: ۰۲۶۳۶۱۱۱۹۰۳۳
E. mail: avaghefi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

گونه‌های مختلف جنس استرپتوکوکوس در اکثر ماهیان توانایی بیماری‌زایی دارند، از بین باکتری‌های این جنس گونهٔ استرپتوکوکوس آگالاکتیه (*Lance.eld group B GBS:*) یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌هاست که سبب بیماری‌زایی در گونه‌های مختلف ماهی، گاو و انسان می‌شود. این باکتری در گونه‌های پرورشی در اقلیم‌های گرم تولید بیماری می‌کند و عمدتاً توانایی بیماری‌زایی در گونه‌های آب شیرین، آب‌های دریایی و آب‌های مصبی را دارد (Evans *et al*., 2002; Mitchell, 2003; Oliveria *et al*., 2006; Mian *et al*., 2009). این گونه را برای اولین بار، در سال ۱۹۹۴ Eldar و همکاران با عنوان استرپتوکوکوس دیفیسیل از قزل‌آلای رنگین‌کمان جداسازی کردند و عنوان شد که این باکتری یک کوکسی گرم مثبت است که سبب بروز سپتی‌سمی و مننژیت در این ماهی می‌شود. بیماری ایجادشده توسط که باکتری‌های جنس استرپتوکوکوس در ماهی سبب بروز علائمی از جمله اگزوفتالمی یک‌طرفه یا دوطرفه، هموراژی در چشم، تیرگی رنگ و شنای نامنظم می‌شود (Rasheed *et al*., 1985). مطالعات بعدی نشان داد که گونهٔ استرپتوکوکوس دیفیسیل از نظر پروتئین‌های سطحی و ژنوم کاملاً مشابه گونهٔ استرپتوکوکوس آگالاکتیه است و هیچ گونه تفاوتی بین این دو گونه وجود ندارد (Vandamme *et al*., 1997). در بسیاری از گونه‌های آب شیرین، شور پرورشی و وحشی گزارش‌های بسیاری از آلودگی به باکتری‌های گروه GBS ارائه شده است که از جملهٔ این گزارش‌ها می‌توان به آلودگی گونه‌های گربه‌ماهی دریایی (*Arius felis*) (Plumb *et al*., 1974؛ باس راه‌راه (*Morone saxatilis*)، تروت دریایی (*Cynoscion regalis*) (Baya *et al*., 1990)؛ هیبرید تیلاپیا (Oreochromis niloticus × Oreochromis aureus)، (Eldar *et al*., 1994; Eldar *et al*., 1995)، سیم دریایی (Sparus auratus)، (Evans *et al*., 2002)، نیل تیلاپیا (O. niloticus)، (Suanyuk *et al*., 2005; Salvador *et al*., 2005) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (Akhlaghi *et al*., 1996) اشاره کرد. با توجه به مشکلات روش‌های معمول نظیر بررسی خصوصیات پرگنه‌ها در محیط کشت یا سایر مطالعات متداول استفاده از تکنیک‌های مولکولی در روش‌های تشخیصی بسیار گسترش یافته است؛ تکنیک‌های مولکولی خیلی سریع‌تر و حساس‌تر از روش‌های تشخیصی مانند کشت، سرولوژی و هیستولوژی قادر به شناسایی پاتوژن‌ها در ماهی هستند (Altinok and Kurt, 2003). با استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌توان پاتوژن را در موجوداتی که علائم بیماری در آنها بروز نیافته است، ولی پاتوژن در بدن آنها حضور دارد، تشخیص داد و از وقوع آن پیشگیری کرد؛ در نتیجه، استفاده از آنتی‌بیوتیک کاهش می‌یابد و می‌توان از وقوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها جلوگیری کرد (Versalovic and Schneid, 1994; Johnson, 2000; Altinok and Kurt, 2003). تشخیص باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه بر اساس خصوصیات فنوتیپی و تست‌های تشخیصی معمول مشکل است، به همین علت، خصوصیات ژنوتیپی برای تشخیص این باکتری به طور گسترده استفاده می‌شود (Berridge *et al*., 2001; Facklam, 2002; Yildirim *et al*., 2002). کپسول‌های پلی‌ساکاریدی و پروتئین‌های سطحی استرپتوکوکوس‌های GBS نقش مهمی در بیماری‌زایی باکتری‌های این گونه دارند (Kong *et al*., 2002; Austin and Austin, 2007). اگرچه در تست‌های PCR معمولاً از ژن ۱۶S rRNA برای تشخیص باکتری‌ها استفاده می‌شود (Gibello *et al*., 1999; Blanco *et al*., 2002)، اما سایر ژن‌ها نیز می‌توانند به‌منزلهٔ توالی هدف در تست‌های تشخیصی PCR استفاده شوند (Gustafson *et al*., 1992; Miriam *et al*., 1997; Aoki *et al*., 2000). باکتری‌های استرپتوکوکوس گروه B (GBS) حاوی ژن ScpB روی کروموزم خود هستند که پپتیداز سطحی C۵a را کد می‌کنند، پروتئین کدشوندهٔ این ژن دارای ۱۱۵۰ آمینو اسید و وزن مولکولی Da ۱۲۶۲۳۷ است. پروتئین‌های سطحی این گروه از باکتری‌ها سبب

چسبندگی باکتری به سطوح مختلف از جمله بافت موجودات زنده می‌شوند و از این طریق نقش مهمی در بیماری‌زایی این گروه ایفا می‌کنند. ساختار پپتیدازهای سطحی همچنین، ژن‌های کدکنندهٔ این پپتیدازها در گونه‌های مختلف جنس استرپتوکوکوس متفاوت‌اند که از این طریق می‌توان نوع گونه‌های این جنس از باکتری را به راحتی شناسایی کرد (Dmitrive *et al*., 2004).

یکی از مسائل مهم در بررسی و اعمال مدیریت بیماری‌ها بحث انتقال برخی از پاتوژن‌ها از ماهی مولد به نسل بعدی یا اصطلاحاً «انتقال عمودی» بیماری است. این نوع انتقال در مورد برخی بیماری‌ها مانند بیماری ویروسی Infectious Pancreatic Necrosis و بیماری باکتریایی کلیه(BKD) شناخته شده است (Miriam *et al*., 1997; Fasial and Eissa, 2010). آگاهی از وجود یا نبود انتقال عمودی بیماری‌ها، به خصوص برای کنترل بهداشت ماهیان مولدی که از جاهای دیگر خریداری می‌شوند، ضروری است. هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی وجود یا نبود انتقال عمودی باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان همچنین، بهینه‌سازی یک تست مولکولی دقیق در ناحیهٔ ژن ScpB با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شدهٔ Dmitrive و همکاران در سال ۲۰۰۴، به منظور تشخیص باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در بافت تخمدان و کلیهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است که می‌تواند در بررسی سلامت مولدین حائز اهمیت بسیار باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. ماهیان مورد آزمایش

۱۰۲ ماهی مادهٔ قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزن ۱ kg و متوسط طول cm ۴۱ از یک مزرعهٔ پرورشی تجاری تهیه شدند؛ هیچ کدام از ماهیان علائم بیماری استرپتوکوکوزیس و سایر بیماری‌ها را نداشتند و از نظر ظاهری کاملاً سالم بودند. قبل از انجام‌دادن آزمایش برای اطمینان از آلوده‌نبودن ماهیان با باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه، ٦ عدد ماهی به صورت تصادفی از هر یک از تانک‌ها انتخاب شدند و نمونه‌های کلیه، تخمدان و مغز مورد تست PCR قرار گرفتند که نتایج منفی بود. قبل از شروع آزمایش از آب کارگاه نمونه‌گیری شد و نمونه‌های حاصل مورد تست PCR قرار گرفتند، نتایج تست آلوده‌نبودن آب کارگاه با باکتری مذکور را نشان داد. ماهیان به ۲ گروه با جمعیت ٤٨ عدد ماهی تقسیم شدند. یک گروه به‌منزلهٔ شاهد در نظر گرفته شد و به ماهیان گروه دیگر باکتری تزریق شد. به منظور ایجاد تراکم مناسب، ماهیان هر گروه در ۳ تانک ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس با تراکم ١٦ عدد ماهی در هر تانک ریخته شدند. شرایط این تانک‌ها کاملاً مشابه بود و هیچ گونه تفاوتی با هم نداشتند. روزانه ۵۰ درصد از آب تانک‌ها تعویض می‌شد و غذادهی حدود ۳ درصد وزن بدن با غذای تجاری صورت می‌گرفت. دورهٔ آداپتاسیون ۱۰ روزه به منظور سازگاری نمونه‌ها با شرایط کارگاه در نظر گرفته شد. دما طی آزمایش ۱۳±۱°C، اکسیژن در حد اشباع و pH برابر ۷/۲ بود.

۲.۲. آماده‌سازی باکتری برای تزریق

باکتری S. agalactiae RTCC ۲۰۵۱ از مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد. به منظور تهیهٔ دستورالعمل مناسب برای تست PCR و تعیین CFU، باکتری مورد نظر در محیط کشت BHI در دمای ۳۷° C به مدت ٢٤ ساعت کشت داده شد به منظور تعیین CFU از باکتری مورد نظر کشت جدید تهیه شد که به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری و از محیط کشت واجد باکتری رشدکرده سریال رقت به کسر ۱۰ تهیه شد. از لوله‌های شمارهٔ ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ بر روی بلاد آگار کشت داده شد به این ترتیب که از هر رقت ۳ پلیت برای دستیابی به میانگین کلنی‌های رشدکرده در رقت مورد نظر تهیه شد. پلیت‌های کشت‌داده‌شده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد و پس از رشد باکتری کلنی‌های مربوط به هر رقت شمارش و از میانگین کلنی‌های رشدکرده در ۳ پلیت مربوط به هر رقت CFU تعیین شد که برای باکتری مورد نظر

۸-۱۰×۳ بود.

۳.۲. آلوده‌سازی ماهیان با استرپتوکوکوس آگالاکتیه

آزمایش در یک دورهٔ ۳۰ روزه از ۱۵ آبان تا ۱۵ آذر سال ۱۳۸۹ انجام شد، پس از گذشت دورهٔ آداپتاسیون به ماهیان تیمارشده، ۰/۵ ml CFU ۱/۵×۱۰۷ باکتری S. agalactiae تزریق شد. دوز مورد نظر با استفاده از اسپکتوفتومتری در نرمال سالین تهیه شد. به ماهیان گروه شاهد ۰/۵ ml نرمال سالین استریل به صورت عضلانی زیر بالهٔ پشتی تزریق شد. ابتدا ماهیان هر تانک صید شدند و پس از بی‌هوشی در محلول پودر گل میخک با دوز ۱۶۰ ppm باکتری به صورت عضلانی زیر بالهٔ پشتی تزریق شد؛ سپس، برای بازگشت ماهیان به حالت عادی، در تانک‌های Recovery که دارای آب شفاف با هوادهی بالا بودند، قرار داده شدند. برای یکسان‌بودن شرایط به ماهیان گروه شاهد نیز ۰/۵ ml نرمال سالین استریل تزریق شد. پس از تزریق ماهیان ۳ بار در روز بررسی می‌شدند و علائم ظاهری و رفتاری ثبت می‌شد.

۴.۲. نمونه‌گیری

نمونه‌گیری از بافت‌های کلیه و تخمدان (بخش خلفی کلیه و بخش‌های ابتدایی، میانی و انتهایی تخمدان‌ها)، مایع تخمدانی و تخمک‌ها از روز چهارم پس از تزریق آغاز شد. هر روز ۳ ماهی به صورت تصادفی از هر یک از تکرارهای گروه یک و ۳ ماهی از تکرارهای گروه شاهد انتخاب و در شرایط کاملاً استریل تشریح می‌شدند و بافت‌های کلیه و تخمدان با پنس استریل جدا و در میکروتیوب‌های استریل بلافاصله به فریزر ۲۰- منتقل می‌شدند. تلفات از روز نهم پس از تزریق آغاز شد که این نمونه‌ها نیز سریعاً تشریح و برای تست PCR فریز شدند. پس از طی دورهٔ تلفات به مدت ۳ روز نمونه‌برداری‌ها متوقف شد که در این دوره تلفاتی مشاهده نشد؛ پس از آن به منظور بررسی باکتریمی هر ۱۲ ساعت یک بار ۳ نمونه از گروه‌های شاهد و تزریق‌شده، برداشت و تشریح شدند. در هر نمونه، بخشی از تخمک‌ها همراه با مایع تخمدانی با فشار به شکم و بخشی پس از بازکردن شکم جمع‌آوری شدند.

۵.۲. مولکولی

استخراج DNA از نمونه‌ها به روش فنل‌کلروفرم انجام شد و به علت وجود پروتئین و چربی بالا در نمونه‌های بافتی پس از هموژن‌کردن بافت، ۱۵۰ میلی‌گرم از نمونه با ۱۵۰ µl PBS رقیق شد. برای مقایسهٔ نتایج PCR حاصل از DNA استخراجی از بافت هم‌زمان با استخراج DNA از بافت‌های کلیه و تخمدان به صورت مستقیم، حدود ۱۰ میکروگرم از بافت‌های مورد نظر در BHI کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون برای رشد باکتری موجود در بافت مورد نظر، کشت‌ها مورد تست PCR قرار گرفتند. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰٫۸ درصد و نانودراپ بررسی شد. برای تست PCR از پرایمرهای طراحی‌شدهٔ Dmitrive و همکاران در سال ۲۰۰۴، که برای تشخیص این باکتری در مایع تخمدانی انسان طراحی شده بودند، از جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش PCR

نام پرایمر	موقعیت*	توالی پرایمر
P_2	217 to 238	5´-ACAATGGAAGGCGCTACTGTTC-3´
P_3	471 to 450	5´ACCTGGTGTTTGACCTGAACTA-3´

* موقعیت و صحت پرایمر نسبت به باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه به شمارهٔ دسترسی CP000114.1 تعیین شده است.

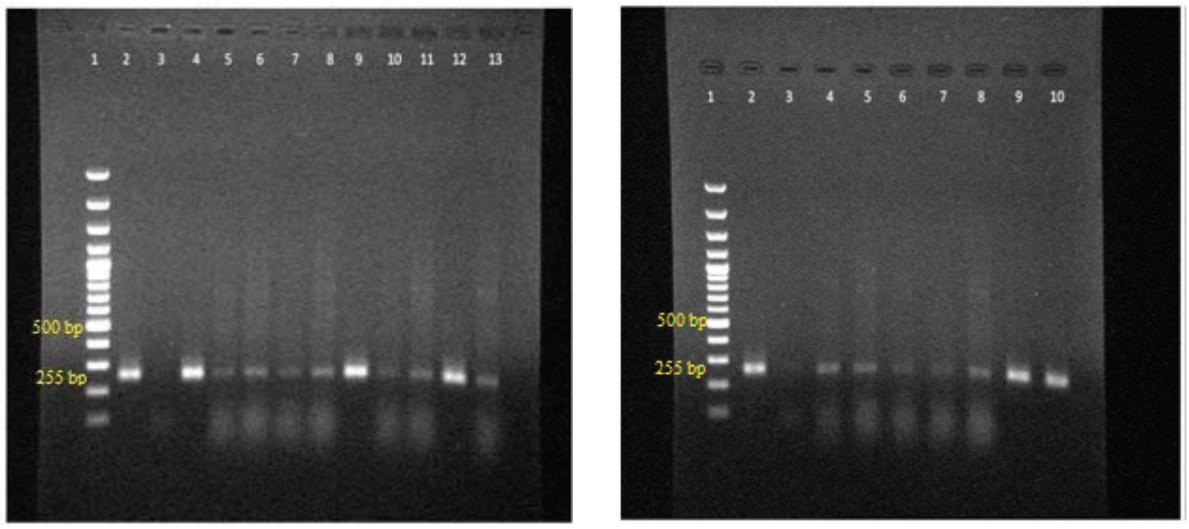
واکنش PCR با فرمول

(۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۲ میکرولیتر MgCL2، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، 1u taq DNA polymerase)

پرایمر پیشرو به میزان pm ۱۰، پرایمر معکوس pm ۱۰ و DNA استخراج‌شده از هر نمونه به میزان ۱ gμ در حجم ۲۵ lμ انجام شد. برای بهینه‌سازی تست PCR باکتری مورد نظر، با الگوبرداری از مقالهٔ مرجع و با استفاده از DNA استخراج‌شده از نمونهٔ استرپتوکوکوس آگالاکتیهٔ استاندارد، چندین مرحله واکنش PCR تکرار شد تا بهترین شرایط واکنش برای تشخیص باکتری از بافت‌های مورد بررسی حاصل شود. پس از تست‌های متوالی برنامهٔ PCR برای اعمال تست‌ها به صورت ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه سپس، ۳۰ سیکل به صورت: ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه (°C ، (denaturing ۵۸ به مدت ۱ دقیقه (°C ،(annealing ۷۲ به مدت ۱ دقیقه (extending) و سیکل نهایی °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه طراحی شد. واکنش مورد نظر در دستگاه (Eppendorf master cycler gradient, Germany) انجام شد. پس از انجام‌دادن واکنش، ۱۰ lμ از محصول PCR برای الکتروفورز استفاده شد. برای بررسی صحت تشخیص و مطابقت باکتری تزریق‌شده با باکتری جداشده از بافت، از باکتری مخزن اولیه که برای تزریق استفاده شد یک کلنی در محیط BHI کشت داده شد و از محصول کشت استخراج DNA و یک نمونه از محصول PCR بافت پایهٔ گناد به منظور توالی‌یابی استفاده شد. پس از الکتروفورز و جداسازی باند از روی ژل زیر نور UV، باند مورد نظر همراه با ژل درون میکروتیوب استریل ریخته شد و با استفاده از کیت High Pure PCR template preparation kit شرکت Roche آلمان خالص شد و برای تعیین توالی به صورت خوانش دوطرفه به شرکت MWG آلمان فرستاده شد.

۳. نتایج

حضور باکتری S. agalactiae در بافت‌های کلیه و تخمدان با تست PCR در ناحیهٔ ژن ScpB اثبات شد (جدول ۲، شکل ۱). علائم بیماری در ماهیان تیمارشده،



(ب) (الف)

شکل ۱. (الف)، نتایج تست PCR ژن ScpB باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه جداشده از بافت کلیهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

۱. 100 bp ladder (Fermentas)

۲. کنترل مثبت (S. agalactiae RTCC 2051)

۳. کنترل منفی، ٤ الی۱۳ نمونه‌های کلیهٔ ماهیان مورد آزمایش؛ (ب)، نتایج تست PCR ژن ScpB باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه جداشده از بافت تخمدان؛ ۱. (100 bp ladder (fermentas، ۲. کنترل مثبت (S. agalactiae RTCC 2051)، ۳. کنترل منفی، ٤ الی ۱۰ نمونه‌های جداشده از بافت تخمدان ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

جدول ۲. نتایج PCR نمونه‌های کلیه و تخمدان ماهیان تیمارشده

روزهای نمونه‌برداری	PCR، DNA استخراجی از بافت		PCR، DNA استخراجی از بافت کشت داده‌شده	
	بافت کلیه	بافت تخمدان	بافت کلیه	بافت تخمدان
روز چهارم	−	−	+*	−
	−	−	−	−
	−	−	−	−
روز پنجم	+	−	+	+
	+	−	+	−
	−	−	+	−
روز ششم	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	−	+	+
روز هفتم	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
روز هشتم (بروز علائم)	+	+	+	+
	+	+	+	+
روز نهم	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
روز دهم	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	−	+	+
	+	+	+	+
روز یازدهم	+	+	+	+
روز سیزدهم	+	+	+	+
روز هفدهم ۱۲ ساعت اول	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	−	+	+
روز هفدهم ۱۲ ساعت دوم	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
روز هجدهم ۱۲ ساعت اول	+	−	+	+
	+	+	+	+
	+	−	+	+
روز هجدهم ۱۲ ساعت دوم	+	−	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
روز نوزدهم ۱۲ ساعت اول	+	+	+	+
	+	−	+	−
	+	+	+	+
روز نوزدهم ۱۲ ساعت دوم	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
روز بیستم ۱۲ ساعت اول	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
روز بیستم ۱۲ ساعت دوم	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	−	+	+
درصد کل	۹۱/۶۶	۷۰/۸۳	۹۵/۸۳	۸۷/۵

*نمونه‌های PCR مثبت؛ حضور باکتری *S. agalactiae* در این بافت‌ها تأیید شده است.

۸ روز پس از تزریق، در دو مورد از ماهیان به صورت زخم عمیقی در ناحیهٔ ساقهٔ دمی مشاهده شد. تلفات از روز نهم پس از تزریق شروع شد و تا روز چهاردهم ادامه داشت. در این گروه پس از سپری‌شدن دورهٔ تلفات از روز هفدهم پس از تزریق هر ۱۲ ساعت یک بار، نمونه‌گیری از بافت‌ها از ۳ عدد ماهی صورت گرفت که نتایج نمونه‌گیری‌ها در جدول ۲ مشاهده می‌شود. در ماهیان گروه شاهد علائم بیماری و تلفات مشاهده نشد، نبود باکتری S. agalactiae در این گروه با تست CRP تأیید شد. نتایج PCR تخمک‌ها و مایع تخمدانی در هر دو روش استخراجی DNA منفی بود.

نتایج توالی‌یابی نشان داد که باکتری‌های جداشده با باکتری‌های تزریقی کاملاً مطابقت دارند. نتایج توالی‌یابی با شمارهٔ دسترسی‌های JF۸۳۱۵۰۷ و JF۸۳۱۵۰۸ به ترتیب برای باکتری تزریق‌شده و باکتری جداشده از بافت پایهٔ گناد در GenBank ثبت شد.

٤. بحث

باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه سبب بروز بیماری در گونه‌های مختلف ماهی می‌شود و از این طریق در اقتصاد آبزی‌پروری بسیار تأثیرگذار است (Evans *et al*., 2002; Mitchell, 2003; Oliveria *etal*., ۲۰۰٦). تاکنون مطالعاتی به منظور تشخیص علائم بیماری ناشی از گونهٔ استرپتوکوکوس آگالاکتیه در گونه‌های مختلف ماهی از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شده است که در این میان روش تزریق باکتری به علت دقت و صحت بالای نتایج، توصیه شده است (Eldar *et al*., 1994; Eldar *et al*., 1995; Pretto-Giordano *et al*., 2010; Faisal and Eissa, 2010). Eldar و همکاران در سال ۱۹۹۵، در آزمایش باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، در صورت دو بار کشت متوالی باکتری در محیط BHI، میزان LD۵۰ را برابر با CFU ۱۰۸-۱۰۷ عنوان و بیان کردند که مرگ و میر ماهیان در دورهٔ ٦-۸ روزه اتفاق خواهد افتاد، که نتایج گزارش‌شده با نتایج مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد. Pretto-Giordano و همکاران در سال ۲۰۱۰ طی تحقیقی دوز LD۵۰ در ماهیان تیلاپیا را CFU ۱/۵×۱۰٦ تا ۱,۵×۱۰۷ اعلام و ذکر کردند که دوز تزریقی و درصد تلفات در گونه‌های مختلف، متفاوت است و نوع گونهٔ پرورشی، شرایط پرورش و دوز تزریق باکتری در میزان تلفات تأثیرگذارند.

اگرچه در تست‌های PCR معمولاً از ژن ۱٦S rRNA برای تشخیص باکتری‌ها استفاده می‌شود (Gibello *et al*., 1999; Blanco *etal*., 2002)، سایر ژن‌ها نیز می‌توانند به‌منزلهٔ توالی هدف در تست‌های تشخیصی PCR به کار روند (Gustafson *et al*., 1992; Miriam *et al*., 1997; Aoki *et al*., 2000). برای تشخیص در حد گونه بهتر است از ژن‌هایی که در سطح گونه‌های مختلف یک جنس با هم تفاوت دارند، استفاده شود که ژن ScpB از جمله ژن‌هایی است که در سطح گونه‌های مختلف جنس استرپتوکوکوس تفاوت دارد؛ توالی استفاده‌شده در طراحی پرایمرهای این تحقیق صرفاً برای تشخیص گونهٔ استرپتوکوکوس آگالاکتیه کاربرد دارد و می‌توانند این گونه را از سایر گونه‌های جنس استرپتوکوکوس جدا کنند که شناسایی پاتوژن‌ها در حد گونه در تهیهٔ شناسنامهٔ پاتوژن ضروری است.

با استفاده از تکنیک PCR طراحی‌شده در ناحیهٔ ژن ScpB می‌توان باکتری را در ماهیان حامل شناسایی و از بروز بیماری جلوگیری کرد. با توجه به جداسازی باکتری مورد نظر از بافت تخمدان ماهیان مولد قزل‌آلای رنگین‌کمان برای اولین بار، نتایج این تحقیق در صنعت پرورش مولدین بسیار کارآمد خواهد بود. در این مطالعه ماهیان مولد یک‌ساله برای بررسی انتقال عمودی باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه با استفاده از تکنیک PCR بررسی شدند و باکتری از بافت پایهٔ گناد و بافت کلیه جدا شد. در پایان درصد بالاتری از نمونه‌های بافت کلیه نسبت به بافت تخمدان مثبت تشخیص داده شد، علت این امر توزیع نابرابر پاتوژن‌ها در بافت‌های مختلف است (Miriam *et al*., 1997). به‌رغم مشکلاتی از جمله بالابودن پروتئین و چربی در بافت، که می‌تواند

عامل منفی در استخراج و هم در PCR و الکتروفورز باشد، جداسازی باکتری از بافت‌ها برای تعیین تراکم واقعی باکتری صورت گرفت (Miriam *et al*., 1997). در نهایت مقایسه‌ای بین استخراج مستقیم از بافت و استخراج از روی محیط کشت صورت گرفت که در برخی از نمونه‌ها در استخراج مستقیم از بافت نتیجه منفی بود، ولی پس از کشت و افزایش تراکم باکتری نتیجه مثبت شد و در نهایت درصد بیشتری از نمونه‌ها در استخراج از بافت کشت داده‌شده مثبت شد.

یکی از راه‌های تشخیص انتقال عمودی بیماری‌ها شناسایی عامل بیماری در مایع تخمدانی مولدین ماده است؛ با توجه به اینکه محققان مختلف از جمله Evelyn و همکاران در سال ۱۹۸٦ نشان دادند که انتقال عمودی از طریق جنس نر بی‌اهمیت است و امکان‌پذیر نیست، برای این منظور می‌توان از تکنیک‌های مولکولی استفاده کرد که تلفیقی از قدرت تفکیک بالا و قابلیت بالای تست‌های فنوتیپی‌اند؛ از جمله امتیازات این تکنیک‌ها این است که قدرت و توانایی تشخیص کوچک‌ترین اختلافات ژنوم را دارند و مقایسهٔ مولکولی پروفایل فنوتیپ برای برخی گونه‌ها از ثبات بالایی برخوردار است (Aoki *et al*., 2000; Altinok and Kurt, 2003). در اکثر تحقیقاتی که محققان به منظور بررسی انتقال عمودی بسیاری از باکتری‌ها و ویروس‌ها در گونه‌های مختلف ماهی انجام داده‌اند، روش‌های مولکولی در دقت و سرعت بالای تشخیص روش‌هایی برتر معرفی شدند و استفاده از این گونه روش‌ها به‌منزلهٔ جایگزینی مناسب برای سایر تکنیک‌های تشخیصی توصیه شده است (Morga, 1995; Miriam *etal*., 1997; Ronald *et al*., 1998; Fasial and Eissa, 2009). انتقال عمودی باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در مایع تخمدانی انسان را قبلاً Dmitriev و همکاران در سال ۲۰۰٤ انجام داده بودند و توانسته بودند باکتری مورد نظر را از مایع تخمدانی انسانی جداسازی کنند؛ نتایج این بررسی در ماهی نشان داد که باکتری مورد نظر می‌تواند خود را به بافت تخمدان مولدین ماده برساند، در آنجا رشد کند و برای مدتی طولانی باقی بماند و از این طریق به تخمک‌ها منتقل شود؛ اگرچه باکتری مورد نظر همانند حالتی که در ویروس‌های مولد بیماری‌های IPN و Viral Hemorrhagic Septicemia، از تخمک‌های استحصال‌شده جداسازی نشد ولی این امر نمی‌تواند دلیلی بر نبود باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در تخمک‌ها باشد؛ اگرچه در بسیاری از مطالعات، برای بررسی انتقال عمودی پاتوژن‌ها، به بررسی حضور پاتوژن در بافت یا مایع تخمدانی مولدین ماده اکتفا می‌شود، ولی بررسی لاروهای حاصل از این مولدین می‌تواند نتایج جامع‌تری ارائه کند که پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده این نکته مد نظر قرار گیرد.

References

[1]. Akhlaghi, M., Munday, B.L., Whittington, R.J., 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (entrococcosis). Journal of Fish Disease 19, 251-258.

[2]. Altinok I., Kurt, I., 2003. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 3, 131-138.

[3]. Aoki, T., Park, C.I., Yamashita, H., Hirono, I., 2000. Species-specific polymerase chain reaction primers for Lactococcus garvieae. Journal of Fish Disease 23, 1–6.

[4]. Austin, B., Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish (fourth ed.), Praxis Publishing Ltd., Chichester, UK. Journal of Microbiological Methods 41, 201-209.

[5]. Baya, A.M., Lupiani, B., Hetrick, F.M., Roberson, B.S., May, R.E., Poukish, C., 1990. Association of Streptococcus sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. Journal of Fish Disease 13, 251–253.

[6]. Berridge, B.R., Bercovier, H., Frelier, P.F., 2001. Streptococcus agalactiae and Streptococcus difficile 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. Veterinary Microbiology Journal 78, 165–173.

[7]. Blanco, M.M., Gibello, A., Vela, A.I., Moreno, M.A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2002. Winter Disease outbreak in sea bream (Sparus aurata) associated with Pseudomonas anguilliseptica infection. Disease Aquatic Organization Journal 50, 19–27.

[8]. Dmitriev, A., Shen, A.D., Tkaaikova, A., Mikula, I., Yang, Y.H., 2004. Structure of scpB-lmb Intergenic Region as Criterion for Additional Classification of Human and Bovine Group B Streptococci. Acta Veterinary Brno 73, 215-220.

[9]. Eldar, A., Bejerano, Y., Bercovier, H., 1994. Streptococcus shiloi and Streptococcus difficile: two new streptococcal species causing a meningo-encephalitis in fish. Current Microbiology Journal 28, 139–143.

[10]. Eldar, A., Bejerano, Y., Livoof, A., 1995, Experimental Streptococcal Meningo-encephalitis in cultured fish. Veterinary Microbiology Journal 43, 33-40.

[11]. Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius P.H., Al-Ablani, S., 2002. First report of Streptococcus agalactiae and Lactococcus garviae from a wild bottlenose dolphin (Tursiops truncatus). Journa of Wildlife Journal 42, 561–569.

[12]. Evelyn, T.P.T., Ketcheson, J.E., Pposperiporta, L., 1986. Further evidence for the presence of Renibacterium salmoninarum in salmonid eggs and for the failure of providon-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in the water. Journal of Fish Disease 7, 173–182.

[13]. Facklam, R., 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clinical Microbiology Reviews 15, 613–630.

[14]. Faisal, M., Eissa, A. E., 2010. Diagnostic testing patterns of Renibacterium salmoninarum in spawning salmonid stocks in michigan, Journal Wildfie Disease 45, 447–456.

[15]. Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Cutuli, M.T., Doménech, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 1999. Development of a PCR assay for detection of Yersinia ruckeri in tissues of inoculated and naturally infected trout. Applied and Environmental Microbiology 65, 346–350.

[16]. Gustafson, C.E., Thomas, C.J., Trust, T., 1992. Detection of Aeromonas salmonicida from

fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. Applied and Environmental Microbiology 58, 3816–3825.

[17]. Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H.W., Wu, R.S.S., 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. Journal of Water Research 36, 1173–1177.

[18]. Lancefield R C., 1993. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. Journal of Experimental Medicine 57, 406–409.

[19]. Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa G.M., Figueiredo, H.C.P., 2009. Aspects of the natural history and virulence of S. agalactiae infection in Nile tilapia. Veterinary Microbiology Journal 136, 180–183.

[20]. Miriam, A., Griffiths, S.G., Lovely, J.A., Lynch, W., 1997. PCR and probe-PCR assays to monitor broodstock Atlantic salmon (Salmo salar L.) ovarian fluid and kidney tissue for presence of DNA of the fish pathogen Renibacterium salmoninarum. Journal of Clinical Microbiology 35, 1322–1326.

[21]. Mitchell, T.J., 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. Journal of Nature Reviews Microbiology 1, 219–230.

[22]. Oliveira, I.C., de Mattos, M.C., Pinto, T.A., Ferreira-Carvalho, B.T., Benchetrit, L.C., Whiting, A.A., Bohnsack, J.F., Figueiredo, A.M., 2006. Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. Journal of Clinical Microbiology Infection. 12, 887–893.

[23]. Plumb, J. A., Schachte, J. H., Gaines, J. L., Peltier, W., Carroll, B., 1974. Streptococcus sp. from marine fishes along the pathogenesis of Streptococcus agalactiae in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus). Brazilian Archive of Biology and Technology 53, 87-92.

[24]. Pretto-Giordano, L.G.; Muller, E.E.; Freitas, J.C.; Da Silva. V.G., 2010. Evulation on the pathogenesis of Streptococcus agalactiae in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus). Brazilian Archive of Biology and Technology 53, 87-92.

[25]. Rasheed, V., Plumb, J. A., 1985, Pathognicity of a non-haemolytic group B Streptococcus sp. In gulf killifish. Aquaculture 37, 97–105

[26]. Salvador, R., Muller, E.E., de Freitas, J.C., Leonhadt, J.H., Pretto-Giordano, L.G., Dias, J.A., 2005. Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile tilapias (Oreochromis niloticus) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State. Brazillian Cieˆncia Rural Santa Maria Journal 35, 1374–1378.

[27]. Suanyuk, N., Kanghear, H., Khongpradit, R., Supamattaya, K., 2005. Streptococcus agalactiae infection in tilapia (Oreochromis niloticus). Brazilian Archive of Biology and Technology 27, 307–319.

[28]. Vandammel, P., Devriese, A., Pot, B., Kersters, K., Melin, P., 1997. Streptococcus difficile is a nonhemolytic Group B, Type Ib Streptococcus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 47, 81-85.

[29]. Versalovic, J., Schneider, M., 1994. Methods in Molecular and cellar biology Methods. MEL Cell Journal 5, 25-40.

[30]. Yildirim, A.O., Lämmler, C., Weiss R., Kopp, P., 2002b. Pheno- and genotypic properties of streptococci of serological group B of canine and feline origin. FEMS Microbiology Journal 212,187–192.