نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
ص ۲۵-۳۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱

شناسایی مولکولی و پاتولوژیک *Lactococcus garvieae* جداسازی‌شده از قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی ایلام *(Oncorhynchus mykiss)*

❖ **سعیده حیدری‌نژاد*:** کارشناس ارشد بافت‌شناسی آبزیان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و دانشجوی PhD آناتومی و جنین‌شناسی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
❖ **نگین سلامات:** استادیار گروه بافت‌شناسی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
❖ **فاضل پوراحمد:** استادیار دانشکدهٔ پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام، ایران
❖ **احمد سواری:** استاد گروه زیست دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
❖ **بیتا ارچنگی:** استادیار گروه زیست دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران

چکیده

در مطالعهٔ حاضر ۶۰ قطعه ماهی با علائم کلینیکی نظیر بی‌حالی، شنای نامنظم و اگزوفتالمی از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان واقع در اطراف ایلام در بهمن ۱۳۸۸ جمع‌آوری شدند. برای تشخیص عامل اصلی بیماری، نمونه‌هایی از کبد، کلیه و طحال برداشته شده و در محیط کشت آگار خوندار (blood agar) در دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. برای تأیید ایزوله‌ها از multiplex PCR و ژن‌های 16S rRNA ، lctO و 16S- 23S rRNA استفاده شد که به ترتیب برای شناسایی Lactococcus garvieae، Streptococcus iniae و S. dysgalactiae به کار می‌روند. در این مطالعه برای غالب ایزوله‌ها باندی به طول ۱۱۰۰ bp تشکیل شد که مربوط به باکتری L. garvieae است. بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که عامل اصلی بروز سپتی‌سمی L. garvieae بوده است. نتایج مطالعات هیستوپاتولوژیک در ماهیان مبتلا به لاکتوکوکوزیس شامل ایجاد فضای ادماتوز و بلندشدن اپیتلیوم لاملاها، آنوریسم در مویرگ‌های لاملا، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال و افزایش لکوسیت‌ها در آبشش، ضخیم‌شدگی غشای پایهٔ گلومرولی، نکروز سلول‌های توبولی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ، احتقان و خونریزی در کلیه بود. در نهایت به نظر می‌رسد multiplex PCR روش قطعی شناسایی سریع باکتری به ویژه در عفونت‌های ترکیبی است.

واژگان کلیدی: پاتولوژی، قزل‌آلای رنگین‌کمان، multiplex، PCR، *Lactococcus garvieae*، *Streptococcus iniae*.

* نویسندهٔ مسئول تلفن: ۰۹۱۸۹۴۱۰۸۱۷
Email: -S.Heidarinejad@gmail.com

۱. مقدمه

امروزه بیمای‌های عفونی عامل اصلی محدویت توسعه و رشد صنعت آبزی‌پروری است (Sharifuzzaman *et al.*, 2011). در سال‌های اخیر، این واقعیت که بسیاری از تغییرات محیطی شدید استرس‌زاست و باعث کاهش مقاومت و در نتیجه بروز بیماری‌های عفونی و غیر عفونی در ماهیان پرورشی و آکواریومی می‌شود، بیش از پیش مورد توجه واقع شده است. هر ساله بیماری‌های باکتریایی سبب بروز خساراتی بیش از صد میلیون دلار در کشورهای مختلف جهان می‌شوند (Shoemaker *et al.*, 2001).

لاکتوکوکوزیس با نشانه‌هایی بسیار شبیه به استرپتوکوکوزیس است که باکتری *Lactococcus garvieae* آن را ایجاد می‌کند. باکتری *L. garvieae* عامل بروز سپتی‌سمی در ماهیان آب شور و شیرین، به ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان، می‌شود؛ به خصوص زمانی که دمای آب به بالاتر از ۱۶ درجهٔ سانتی‌گراد می‌رسد. شیوع بیماری در قزل‌آلای رنگین‌کمان در مناطق متعددی از جمله استرالیا، جنوب افریقا، ژاپن، تایوان، انگلستان و کشورهای نواحی مدیترانه دیده شد که با خساراتی در حدود ۸۵-۵۰٪ از تولید کل همراه بوده است (Ghittino and Prearo, 1993). این بیماری در قزل‌آلای رنگین‌کمان به صورت عفونت حاد سیستمیک مشاهده می‌شود (Eldar and Ghittino, 1999). میزبان *L. garvieae* محدود به آبزیان نیست و این باکتری در سایر حیوانات و حتی انسان نیز گزارش شده است و به نظر می‌رسد که می‌توان آن را عامل ایجادکنندهٔ بیماری زئونوز (مشترک بین انسان و دام) به حساب آورد (Elliot and Facklam, 1996).

برای کنترل بیماری‌های باکتریایی، شناسایی و تشخیص دقیق و سریع عامل پاتوژن ضروری است و نیازمند روش‌های سریع، دقیق و اختصاصی عامل پاتوژن است. امروزه روش‌های مختلف میکروبیولوژی و بیوشیمیایی و محیط‌های کشت اختصاصی برای تشخیص و شناسایی عامل بیماری‌زا به کار می‌روند. در چند سال اخیر روش‌های مولکولی نظیر PCR، به خصوص بر پایهٔ ژن 16SrRNA، برای شناسایی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زا به کار می‌روند (Romalde and Toranzo, 2002).

multiplex PCR یکی از مفیدترین روش‌هایی است که برای شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا، به ویژه باکتری بیماری‌زای گرم مثبت، در ماهی به کار می‌رود (Edwards and Gibbs, 1994; Mata *et al.*, 2004).

در سال‌های اخیر، ادارات شیلات و دامپزشکی استان ایلام مکرراً، عفونت موسوم به استرپتوکوکوزیس با علائم ظاهری تیرگی پوست، تورم ناحیهٔ شکم، کم‌تحرکی و اگزوفتالمی یک یا دوطرفه در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی را گزارش کرده‌اند که عامل آن، بدون استفاده از روش تشخیصی مطمئن و فقط با تکیه بر علائم بالینی و ضایعات پاتولوژیک، *Streptococcus iniae* معرفی شده است؛ غالباً پرورش‌دهندگان نیز برای پیشگیری یا درمان این بیماری روشی را به کار می‌برند که منجر به مقاومت‌های باکتریایی شده است. هدف ما در بررسی حاضر معرفی عامل اصلی این بیماری در منطقه با روش‌های مطمئن، همچنین بیان تغییرات پاتولوژیک ایجادشدهٔ باکتری بیماری‌زا در بافت‌های کلیه و آبشش قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه‌برداری

در تحقیق حاضر، ۶۰ قطعه ماهی (میانگین وزنی ۲۳±۱۴۱/۴۷ گرم و میانگین طول کل ۶۳ ±۲۰/۰۷ سانتی‌متر) به طور تصادفی از میان ماهیانی با نشانه‌های بالینی بیماری (اگزوفتالمی، هموراژی در باله، اتساع شکم و ...) و نیز ۱۰ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان فاقد علائم کلینیکی بیماری به‌منزلهٔ شاهد (دارای میانگین وزن و طول مشابه ماهیان بیمار)، از ۵ مزرعهٔ پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان واقع در اطراف ایلام در بهمن ۱۳۸۸، جمع‌آوری شدند.

۲.۲. جداسازی و شناسایی اولیهٔ باکتری

در شرایط کاملاً استریل، نمونه‌هایی از کبد، کلیه و طحال برای کشت باکتری برداشته و به اولین محیط کشت مغذی یعنی محیط کشت مایع تریپتون سوی[1] (TSB) منتقل و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از رشد باکتری‌ها، نمونه‌ای از محیط کشت مایع با آنس[2] استریل برداشته و روی محیط کشت آگار خوندار (حاوی ۵ درصد خون گوسفند) کشت و در دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شد (Vendrell *et al.*, 2007). کشت مجدد در محیط کشت آگار خوندار تا به‌دست‌آوردن کلنی‌های خالص باکتری ادامه یافت؛ سپس، رنگ‌آمیزی گرم و تعدادی از آزمایش‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، اکسیداز و آسکولین انجام گرفت.

1. Tryptone soy broth
2. Loop

۲ .۳. استخراج DNA و انجام‌دادن PCR

برای شناسایی قطعی باکتری مولد بیماری از روش مولکولی multiplex PCR استفاده شد. برای انجام‌دادن PCR نخست DNA باکتری استخراج شد. استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن[3] انجام شد (Afghani and Stutman, 1996). در کنار شعله، ۱۲۰–۱۰۰ میکرولیتر از محلول بافر تریس EDTA[4] به میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد سپس، با آنس استریل چند کلنی باکتری برداشته شد و میکروتیوب‌ها در دستگاه Comfort Eppendorf Thermomixer تنظیم و در دمای ۹۹ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه میکروتیوب‌ها با دور rcf ۱۳۰۰۰ و به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ (Centrifuge 5415D Eppendorf) شدند؛ پس از استخراج DNA باکتری، آزمایش PCR انجام گرفت به این صورت که ۴ میکرولیتر مسترمیکس (ساخت شرکت سیناژن)، ۶ میکرولیتر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول (برای هر گونه باکتری یک زوج پرایمر)، ۳ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده از باکتری‌ها درون میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری اضافه شدند و حجم محلول با آب مقطر دو بار تقطیر تا حجم ۲۰ میکرولیتر افزایش یافت؛ سپس، میکروتیوب‌ها در دستگاه Mastercycler gradient thermal Cycler (Eppendorf) قرار داده شدند و آزمایش PCR طبق روش زیر صورت گرفت:

الف) دناتوره‌کردن اولیه[5] در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه؛

3. Boiling
4. Trice EDTA buffer
5. Primary Denaturation

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در multiplex PCR

Primer pairs	Sequence (5′to 3′)	Target gene	PCR amplicon(pb)	Pathogen	Reference
plG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16SrRNA	۱۱۰۰	*L. garvieae*	Zoltkin *et al.* (1998)
plG-2	GCACCCTCGCGGGTTG				
Lox-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	lctO	۸۷۰	*S. iniae*	Mata *et al.* (2004)
Lox-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA				
STRD-DYI	TGGAACACGTTAGGGTCG	16S-23SrRNA	۲۵۹	*S.dysgalactia* subsp	Hassan *et al.*(2003)
Dys-16S-23S-2	CTTAACTAGAAAAACTCTTGATTATTC			*dysagalactiae*	

ب) دناتوره‌کردن نهایی (ثانویه)[1] شامل ۳۰ چرخه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، هر یک به مدت ۱ دقیقه؛

ج) اتصال (آنیلینگ)[2] در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه؛

د) امتداد[3] در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه.

پس از اتمام زمان PCR، الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ آمپر و به مدت ۴۵ تا ۵۰ دقیقه انجام شد سپس، ژل حاصل به مدت ۳۰ دقیقه درون تشتک حاوی اتیدیوم برماید و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه درون آب مقطر قرار گرفت. در مرحلهٔ آخر با استفاده از دستگاه ژل داکت[4] مدل BioDoc-JT از ژل حاصل عکس‌برداری شد.

۲ .۴. مطالعات هیستوپاتولوژیک

پس از نمونه‌برداری از ماهیان برای مطالعات باکتریولوژیک، برای مطالعهٔ هیستوپاتولوژی، قطعاتی به ابعاد cm ۰/۵ از کلیه و آبشش ماهی جدا و در محلول ثبوت بوئن قرار داده شدند؛ سپس، مراحل معمول پاساژ بافتی (آبگیری، شفاف‌سازی و پارافینه‌شدن) نمونه‌ها در دستگاه هیستوکینت[5] مدل RX-11B,tissue tek rotary, Japan انجام گرفت. آب‌گیری بافت‌های تثبیت‌شده در بوئن، با سری افزایشی اتانول (۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ ٪) انجام شد و در ادامه نمونه‌های بافتی برای شفاف‌سازی[6] به گزیلول (Merck- آلمان) سپس، برای پارافینه‌شدن[7] در داخل پارافین مذاب (Merck- آلمان) در دمای ۵۸-۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. تمامی این مراحل با دستگاه هیستوکینت تحت برنامهٔ زمان‌بندی‌شده انجام شد. پس از قالب‌گیری نمونه‌ها در پارافین با استفاده از دستگاه روتاری میکروتوم[8] مدل LECA RM2245، برش‌هایی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر از نمونهٔ بافتی تهیه شد سپس، مقاطع حاصل در حمام آب گرم با دمای حدود ۵۰ درجهٔ

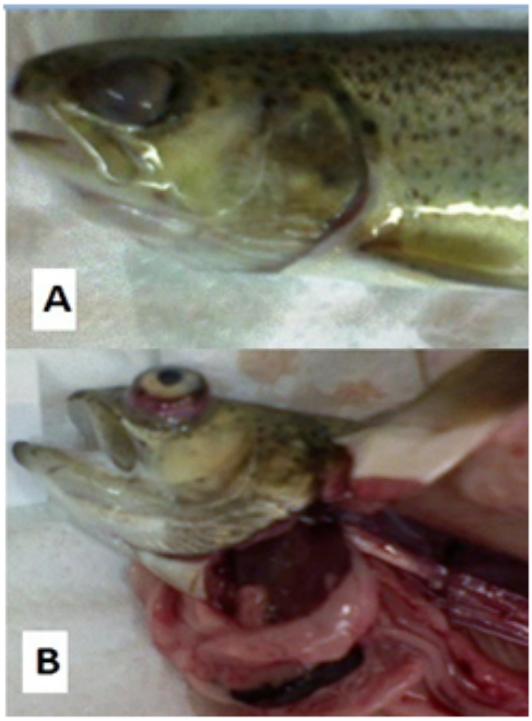
1. Secondary Denaturation
2. Annealing
3. Extension
4. Gel document
5. Tissue processor
6. Clearance
7. Paraffin embedding
8. Microtome

سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از رفع چین‌های موجود در مقطع با فروبردن لام‌های آغشته به چسب گلیسیرین- آلبومین، مقاطع تهیه‌شده روی لام انتقال داده شدند. پس از رنگ‌آمیزی H&E اسلایدهای حاصل با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند؛ هماتوکسیلین (Merck: 1.09253.2500) و ائوزین (Merck: 1.15935.2500) (Bancroft and Gamble, 2002).

۳. نتایج

۳.۱. نتایج مطالعات بالینی

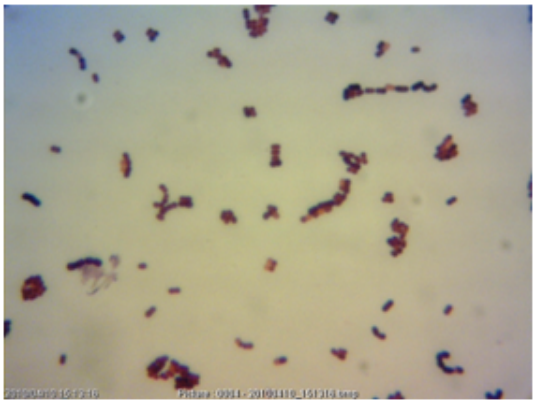
این تحقیق دربارهٔ ماهیان بیماری انجام شد که علائم بالینی بیماری نظیر اگزوفتالمی، کدرشدن قرنیه، تیره‌شدن رنگ پوست، خونریزی در باله‌ها، بزرگ‌شدن و رنگ‌پریدگی غیر طبیعی کبد، بزرگ‌شدن طحال، آسیت و خونریزی در حفرهٔ صفاقی در آنها کاملاً مشهود بود (شکل ۱ A و B).



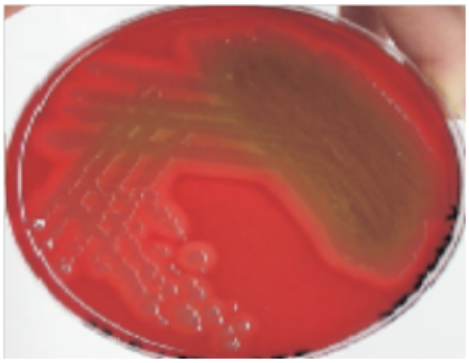
شکل ۱. A: کدرشدن قرنیه، B: اگزوفتالمی دوطرفه

۲.۳. نتایج مطالعات مورفولوژی (کشت و رنگ‌آمیزی گرم) باکتری و آزمایش‌های بیوشیمیایی

از میان ۱۸۰ ایزولهٔ جداشده از کبد، کلیه و طحال ماهیان بیمار، پس از چندین بار تجدید کشت، ۱۴۱ ایزولهٔ خالص باکتری با کلنی‌های تک رشد یافتند؛ سپس، نمونه‌های باکتری از هر یک از کلنی‌های خالص رنگ‌آمیزی گرم شدند که از میان ۱۴۱ ایزولهٔ خالص، ۱۱۵ ایزوله (۸۲ درصد) گرم مثبت و ۲۶ ایزوله (۱۸ درصد) گرم منفی تشخیص داده شدند. همهٔ ۱۱۵ ایزولهٔ گرم مثبت کوکسی‌شکل بودند (شکل ۲) که تعدادی از آنها روی محیط کشت آگار خوندار همولیز آلفا (شکل ۳) ایجاد می‌کردند. برای تشخیص قطعی، آزمایش‌های بیوشیمیایی روی ۱۱۵ ایزولهٔ گرم مثبت انجام شد و از میان ۱۱۵ ایزولهٔ گرم مثبت کوکسی‌شکل، ۸۸ ایزوله به عنوان *Lactococcus garvieae* در نظر گرفته شدند که دارای قابلیت ایجاد همولیز آلفا روی محیط کشت آگار خوندار بودند و نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی آنها شامل کاتالاز منفی، اکسیداز منفی، اندول منفی، اورهٔ منفی، فنول رد مثبت، سیمون سیترات منفی، VP مثبت، TSI منفی، نیترات منفی، OF مثبت، H_2S منفی، اسکولین مثبت و غیر متحرک بود. تمامی این ایزوله‌ها برای تشخیص قطعی آزمایش PCR شدند.



شکل ۲. کوکسی گرم مثبت (رنگ‌آمیزی گرم,100×)

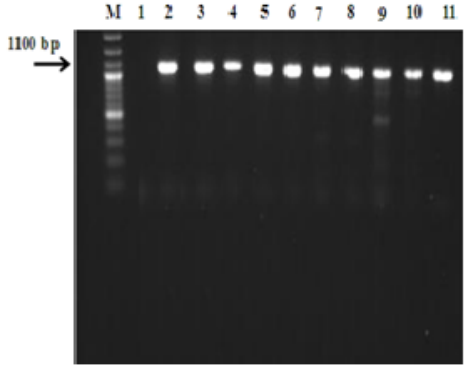


شکل ۳. باکتری گرم مثبت با توانایی ایجاد همولیز آلفا بر محیط کشت آگار خوندار

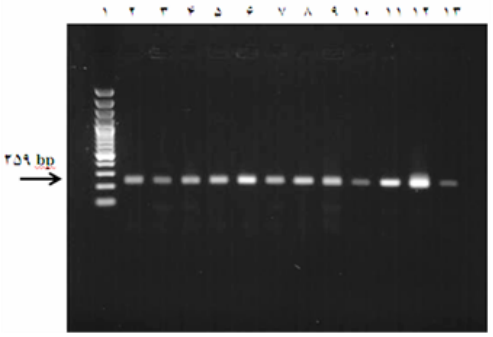
۳.۳. نتایج مولتی پلکس PCR

در مجموع از تعداد کل باکتری‌های خالص رشدیافته (۱۴۱ ایزوله) تعداد ۱۱۵ ایزوله گرم مثبت و بقیه گرم منفی بودند. در این آزمایش از ۱۱۵ نمونه DNA استخراج‌شده از ایزوله‌های باکتریایی و دو سویهٔ جداشده از آبزیان، یعنی *Lactococcus garvieae* (۱۷۰ A) و *Staphylococcus pasteuri* (۱۹۱ B) (اهدایی از دانشگاه تهران)، به‌منزلهٔ موارد کنترل مثبت و منفی استفاده شد. از ۸۸ ایزوله‌ای که در آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان *L. garvieae* در نظر گرفته شده بودند، تعداد ۸۴ ایزوله با پرایمر اختصاصی *L. garvieae*، محصولی به طول ۱۱۰۰bp تولید کردند و به طور قطعی *L. garvieae* تشخیص داده شدند. در این بین، ۴ باکتری که باندی به طول ۸۷۰ bp تولید کرده بودند Streptococcus iniae و ۱۶ باکتری با تولید باندی در حدود ۲۵۹ bp معرف باکتری گونهٔ *Streptococcus dysagalactiae* بودند.

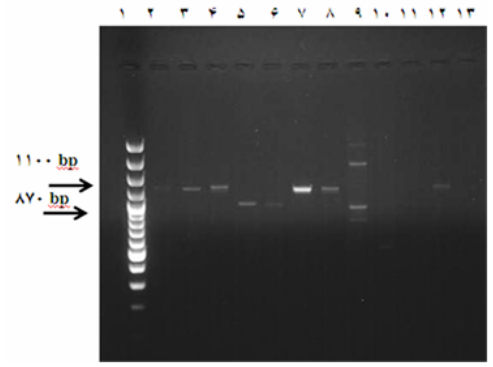
در تمامی موارد آزمون PCR *L. garvieae* (A ۱۷۰) واجد محصول فوق (۱۱۰۰bp) و *S. pasteuri* (۱۹۱ B) فاقد هر گونه باند روی ژل آگارز بود. در شکل‌های ۴ A، B و C نتیجهٔ الکتروفورز ژل آگارز مواردی از محصولات PCR نشان داده شده است.



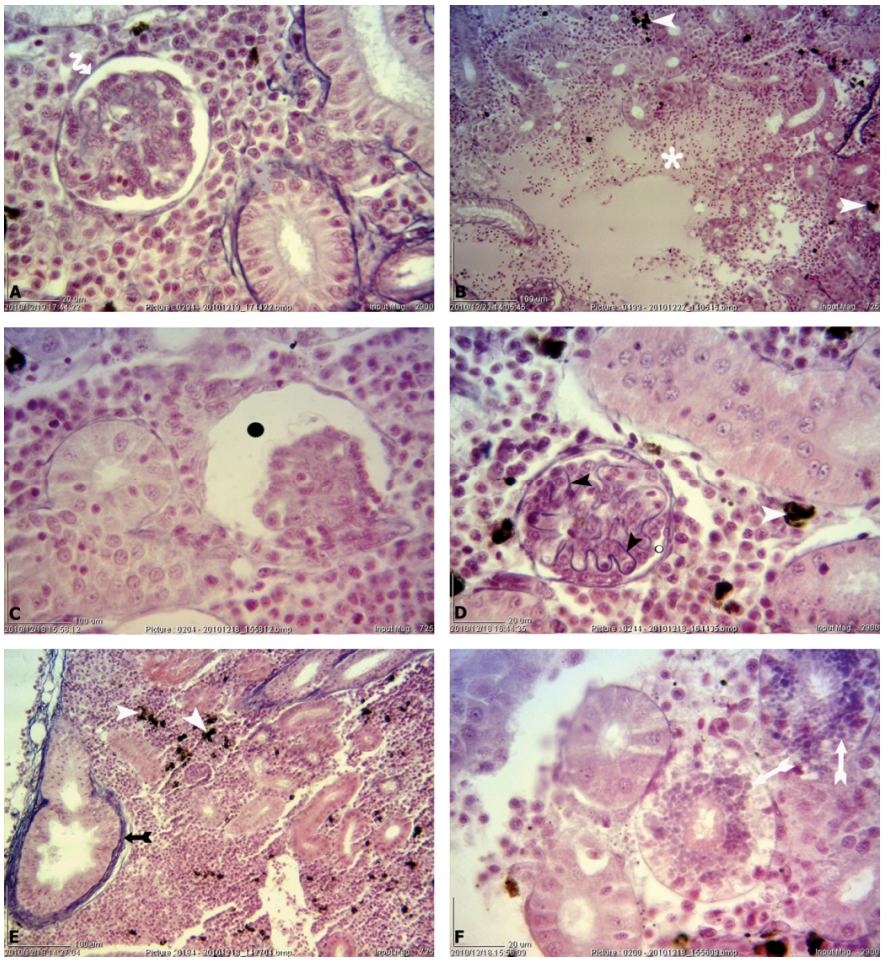
شکل ٤. A: الکتروفورز محصول حاصل از mPCR ، DNA استخراج‌شدهٔ باکتری و پرایمرها. ستون۱ از سمت چپ، DNA سایز مارکر به طول مضربی از bp ۱۰۰، ستون ۲ کنترل منفی، ستون ۳ کنترل مثبت (لاکتوکوکوس گارویه (۱۷۰A) را نشان می‌دهد. تمامی ستون‌ها ایزوله‌هایی هستند که با پرایمرها تشکیل باند می‌دهند و در ۱۱۰۰bp باند اختصاصی لاکتوکوکوس گارویه را تشکیل دادند.



شکل ٤. B: الکتروفورز محصول حاصل از mPCR . ستون۱ از سمت چپ DNA سایز مارکر به طول مضربی از bp ۱۰۰ را نشان می‌دهد. در ستون ۲ تا ستون ۱۳ محصول PCR باندی در حدود bp ۲۵۹ تشکیل می‌دهد و به همین دلیل باکتری *Streptococcus dysagalactiae* است.



شکل ٤.C: الکتروفورز محصول حاصل از mPCR . ستون۱ از سمت چپ، DNA سایز مارکر به طول مضربی از bp ۱۰۰، ستون ۲ کنترل منفی (آب مقطر)، ستون۳ کنترل مثبت (باکتری لاکتوکوکوس گارویه (۱۷۰A) را نشان می‌دهد، ستون ٤، ۷، ۸ و ۱۲ که محصول PCR باندی در حدود bp ۱۱۰۰ تشکیل می‌دهد، مربوط به باکتری *Lactococcus garvieae* و ستون ٥، ٦ و ۹ که محصول PCR باندی در حدود bp ۸۷۰ تشکیل می‌دهد، مربوط به باکتری *Streptococcus iniae* هستند.

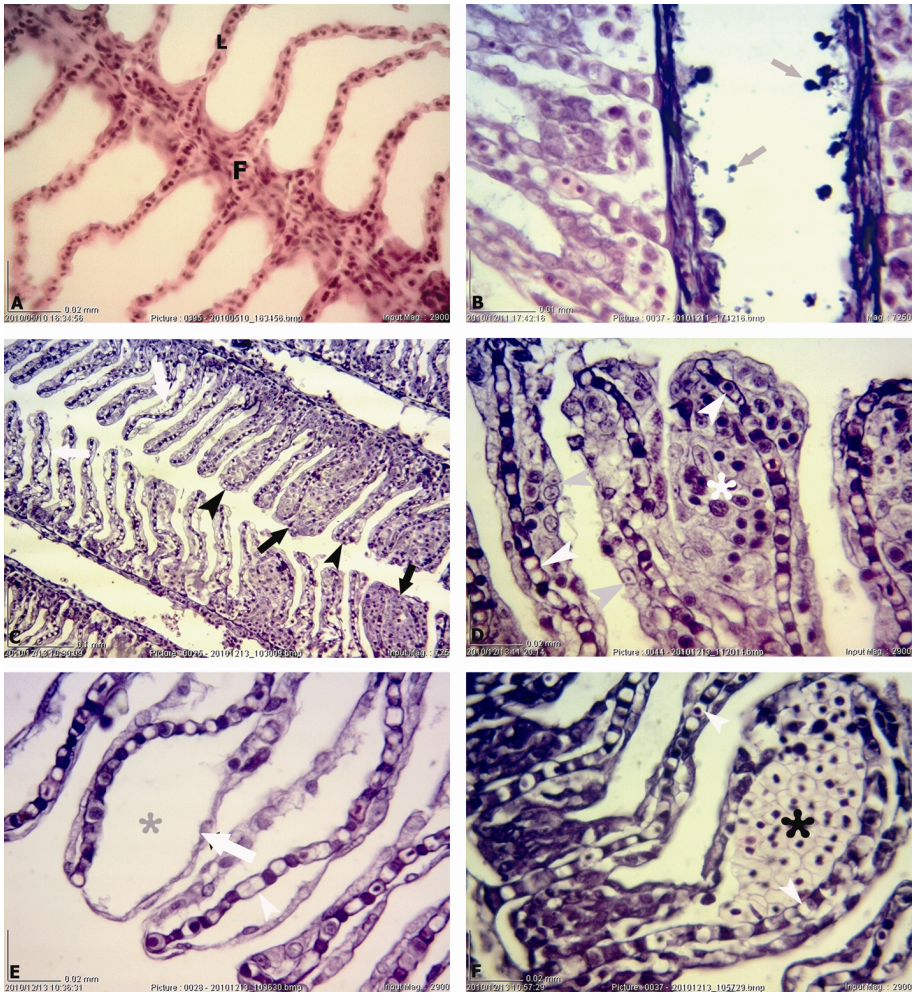


شکل ۵. تصویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی طبیعی (A) و تغییرات بافتی کلیه (B، C، D، E و F) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس؛ جسمک کلیوی (پیکان پیچیدهٔ سفید)، لولهٔ پیچیدهٔ نزدیک (پیکان پیچیدهٔ خاکستری)، خونریزی (*سفید)، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی (رأس پیکان سفید)، اتساع فضای ادراری (دایرهٔ سیاه)، کاهش فضای ادراری (دایرهٔ سفید)، افزایش ضخامت GBM (رأس پیکان سیاه)، فیبروزپلازی (پیکان دوشاخهٔ سیاه)، قطرات هیالن (پیکان دوشاخهٔ سفید)؛ B، C و E (H&E;×۷۲۵)، D، E و F (H&E;×۲۹۰۰).

۴.۳. نتایج مطالعات هیستوپاتولوژی

تغییرات بافتی درخور توجهی در کلیهٔ ماهیان بیمار مشاهده شد که از جملهٔ این ضایعات می‌توان به کاهش یا انسداد و در برخی موارد افزایش درخور توجه فضای ادراری جسمک‌های کلیوی، افزایش ضخامت غشای پایهٔ گلومرولی (GBM)[1]، اتساع مویرگ[2] گلومرولی جسمک‌های کلیوی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی[3]، ایجاد قطرات هیالن[4] در سلول‌های اپیتلیوم لوله‌ای، فیبروپلازی لوله‌ای[5] و عروقی و خونریزی اشاره کرد (شکل ۵). در نمونه‌های آبشش ماهیان مبتلا به لاکتوکوکوزیس ضایعات بافتی شدیدی مشاهده شد که برآمدگی (بلندشدن) اپیتلیوم[6] تیغهٔ آبششی و ایجاد فضای

1. Glomerular basement membrane
2. Capillary dilation
3. Melanomacrophage centers
4. Hyaline droplets
5. Tubular fibrosis
6. Epithelial lifting



شکل ٦. تصویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی طبیعی (A) و تغییرات بافتی آبشش (B، C، D، E و F) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس؛ کلنی‌های باکتری‌های گرم مثبت درون عروق رشتهٔ آبششی (پیکان خاکستری)، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم تیغه‌ای و اتصال تیغه‌های آبششی (پیکان سیاه)، چماقی‌شدن رأس تیغه‌ها (رأس پیکان سیاه)، برآمدگی اپیتلیوم تیغه‌ای (پیکان سفید) و ایجاد فضای ادماتوس (* خاکستری)، اتساع کانال مارژینال (رأس پیکان سفید)، هیپرپلازی (*سفید) و هیپرتروفی (رأس پیکان خاکستری) سلول‌های اپیتلیوم تیغه‌ای،آنوریسم (*سیاه)،A، D، E وC:B و D (H&E:×۲۹۰۰)

ادماتوز[1]، آنوریسم[2] (اتساع موضعی دیوارهٔ عروق خونی بزرگ یا چند رگ خونی کوچک)، چماقی‌شدن[3] انتهای تیغه‌های آبششی به دلیل هیپرتروفی[4] (افزایش حجم سلول) و هیپرپلازی[5] (افزایش تعداد سلول‌ها) سلول‌های اپیتلیومی، به هم چسبیدن (اتصال) تیغه‌ها[6]، اتساع مویرگ‌های تیغه‌ای[7]، خونریزی و وجود کلنی‌های باکتری گرم مثبت درون عروق خونی آبششی از جمله ضایعات مشهود در نمونه‌های آبششی این ماهیان بود (شکل ۶).

1. Oedematus
2. Aneurysm
3. Club shaping
4. Epithelial hypertrophy
5. Epithelial hyperplasia
6. Lamellar fusion
7. Capillary dilation

۴. بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های ماهیان، به ویژه عفونت‌های باکتریایی، نه تنها سبب بروز خسارات فراوان به صنعت آبزی‌پروری می‌شوند، بلکه ممکن است بهداشت انسانی را نیز به مخاطره اندازند. *L. garvieae* از مهم‌ترین کوکسی‌های گرم مثبت است که سبب بروز بیماری در گونه‌های مختلف ماهیان و حتی در مواردی باعث بروز بیماری در انسان می‌شود (Eldar *et al.*, 1996). در تحقیق حاضر اگرچه علائم کلینیکی مشاهده‌شده در ماهیان جمع‌آوری‌شده از مزارع پرورشی آلوده (اگزوفتالمی یک‌طرفه یا دوطرفه، خونریزی در چشم، خونریزی در بالهها، تورم شکم، تیره‌شدن رنگ پوست، شنای نامنظم و ...)، با نشانه‌های بالینی گزارش‌شدهٔ سایر محققان از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به گونه‌های مختلف باکتری استرپتوکوکوس (Eldar *et al.*, 1997; Bromage *et al.*, 1999; Eldar and Ghittino, 1999) تشابه فراوانی داشت، ولی با علائم کلینیکی مشاهده‌شده در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس (Chang *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004) نیز بسیار همسان بود. از طرفی، این علائم با علائم گزارش‌شدهٔ محققان دربارهٔ قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به سایر عوامل باکتریایی (Akhlaghi and Mahjor, 2004) همچنین، علائم گزارش‌شده در سایر ماهیان مبتلا به عوامل بیماری‌زای متفاوت (Chen *et al.*, 2002) نیز تشابه بسیاری داشت. بنابراین، با توجه به غیر اختصاصی بودن نشانه‌های بالینی، نمی‌توان از آنها به‌منزلهٔ روش تشخیص قطعی بیماری استفاده کرد (Eldar and Ghittino, 1999).

در مطالعهٔ حاضر نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده از ماهیان بیمار با نتایج گزارش‌شدهٔ محققان دیگر (Austin and Austin, 2007; Soltani *et al.*, 2008; Sharifiyazdi *et al.*, 2010) هماهنگی دارد. تمایز بین باکتری‌های *S. iniae*، *S. dysgalactiae* و *L. garvieae* فقط از طریق آزمایش‌های بیوشیمیایی دشوار است. علاوه بر این، این باکتری‌ها غالباً عفونت ترکیبی ایجاد می‌کنند بنابراین، شناسایی آنها دقت و زمان بسیاری را می‌طلبد (Zlotkin *et al.*, 1998). روش m-PCR به‌منزلهٔ روشی تشخیصی مولکولی، با استفاده از ژن‌های اختصاصی باکتری‌ها، تشخیص و شناسایی بسیاری از باکتری‌ها را آسان کرده است. Williams *et al.*,(1999) از روش m-PCR برای شناسایی ویروس‌ها استفاده کردند. علاوه بر این، del Cerro *et al.*, روش m-PCR را برای شناسایی *Aeromonassalmonicida*، *Yersinia rockeri* و *Flavobacteriumpsychrophilum* در سال ۲۰۰۲ پایه‌گذاری کردند. در تحقیق حاضر این تکنیک بر اساس روش Mortada و Hatai (۲۰۰۶) برای شناسایی و تشخیص قطعی *L. garvieae* از *S. iniae* و *S. dysgalactiae* به کار برده شد. در این پژوهش با استفاده از سه زوج پرایمر مربوط به سه ژن 16S rRNA، *lcto* و 16S-23SrRNA، باندهای ویژه‌ای در ۱۱۰۰ bp، ۸۷۰bp و ۲۵۹ bp تشکیل شد که به ترتیب به *L. garvieae*، *S. iniae* و *S. dysgalactiae* اختصاص داشت و به تشخیص قطعی آنها انجامید. این نتایج با تحقیق Zlotkin *et al.,*(1998) برای *L. garvieae*، Mata *et al.,* (2004) برای *S. iniae* و Hassan *et al.,*(2003) برای *S. dysgalactiae* مطابقت داشت که همگی از single PCR برای

شناسایی باکتری‌های ذکرشده استفاده کرده بودند. همچنین Mortada and Hatai (2006) برای شناسایی و تشخیص باکتری‌های *L. garvieae*، *S. iniae* و *S. dysagalactia* در عفونت ترکیبی، از m-PCR استفاده و محدودهٔ تشکیل باند برای سه باکتری را به ترتیب ۱۱۰۰ bp، ۸۷۰bp و ۲۵۹ bp ذکر کردند. فدایی‌فرد و همکاران (۲۰۰۹) با جداسازی باکتری از بافت‌های کلیه، کبد و مغز قزل‌آلای رنگین‌کمان از مزارع پرورشی چهارمحال و بختیاری با استفاده از آزمایش‌های باکتریایی و بیوشیمیایی دو باکتری *L. garvieae* و *S. iniae* را جداسازی و برای تأیید نهایی از m-PCR استفاده کردند.

در این میان، در بسیاری از موارد PCR از ژن 16S rRNA به‌منزلهٔ مولکول هدف استفاده می‌شود (Blanco *et al.*, 2002). عملکرد این ژن دائم و همیشگی است و دارای ساختمانی موزائیکی از توالی‌های حفظ‌شده و تغییریافته در همهٔ موجودات است. بخش حفاظت‌شدهٔ آن طی تکامل به‌ندرت دچار تغییر شده و هر جا این تغییرات صورت گرفته قرابت و خویشاوندی دستخوش تغییر شده است و گونه‌ها از هم جدا شده‌اند. پیش از این، Zlotkin *et al.*,(1998) نیز با استفاده از پرایمرهای PLG_1 و PLG_2 مربوط به ژن 16sr RNA، باکتری جداشده از قزل‌آلاهای بیمار جمع‌آوری‌شده از مزارع پرورشی قزل‌آلا از آسیا، اروپا و استرالیا را *L. garvieae* شناسایی کردند و گزارش دادند که باندی را که باکتری تشکیل داد در محدودهٔ ۱۱۰۰bp قرار دارد. Eldar *et al.,*(1999) نیز با استفاده از پرایمر ژن 16S rRNA مربوط به باکتری *L. garvieae* نتایج مشابهی را ارائه دادند.

با توجه به نتایج، از میان باکتری‌های جداشده از ماهیان بیمار ۸۴ ایزوله در محدودهٔ bp ۱۱۰۰ تشکیل باند دادند که پیش از این، نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی همهٔ این ایزوله‌ها به *L. garvieae* شبیه بود. این نتایج مؤید این مطلب است که عامل اصلی ایجادکنندهٔ بیماری در قزل‌آلای پرورشی در تحقیق حاضر، *L.garvieae* است، در حالی که فقط تعداد کمی از ایزوله‌ها به گونه‌های مختلف باکتری استرپتوکوکوس تعلق داشتند. بنابراین، به نظر می‌رسد باید این بیماری را تحت عنوان لاکتوکوکوزیس معرفی کرد و درمان مناسبی را برای کنترل *L. garvieae* به کار گرفت.

یکی از عمده‌ترین علائم پاتولوژیک مشاهده‌شده در اندام‌های مختلف ماهیان بیمار هموراژی (خونریزی) بود. *L. garvieae*، عامل بیماری لاکتوکوکوزیس، منجر به آسیب آندوتلیوم عروق خونی و نشت خون از عروق می‌شود که به خونریزی و ایجاد پتشی[1]هایی در سطح اندام‌های داخلی می‌انجامد. به‌همین علت، لاکتوکوکوزیس اساساً سپتی‌سمی هموراژیک قلمداد می‌شود(Avci *et al.*, 2010).Michel *et al.*,(1996) طی مطالعهٔ بیماری لاکتوکوکوزیس در قزل‌آلای رنگین‌کمان، آسیب‌های بافتی نظیر تغییرات عروق خونی مانند ادم، خونریزی و آنوریسم را در آبشش ماهیان بیمار گزارش کردند که تغییرات خونی گزارش‌شده در آبشش ماهیان بیمار در تحقیق حاضر با نتایج گزارش‌شدهٔ این محققان هماهنگ بود.

ضایعات پاتولوژیکی نظیر هیپرپلازی سلول‌های پوششی تیغه‌ها و اتصال جزئی یا کامل تیغه‌ها به یکدیگر همچنین، وجود دسته‌های باکتری در عروق

1. Petechia

خونی آبشش عوارضی است که محققان دیگری نیز گزارش کرده‌اند (Michel, 1996; Chen *et al.*, 2002). به نظر می‌رسد که دهان مسیر اصلی انتقال *L. garvieae* است (Nakai, 1999)، ولی بنا به گزارشی، آبشش‌ها مکان اصلی اتصال و تکثیر *L. garvieae* طی دورهٔ عفونت است. پس از نفوذ به عروق خونی آبششی، باکتری در عروق خونی منتشر و نهایتاً منجر به سپتی‌سمی می‌شود (Eldar and Ghittino, 1999). بسیاری از عوامل استرس‌زا، از جمله عوامل بیماری‌زا، در غلظت‌های کم معمولاً اپیتلیوم آبشش را متأثر می‌کنند در حالی که، با حدت و شدت بیشتر، منجر به تغییراتی در عروق خونی آبششی می‌شوند. در این موارد، غالباً سلول‌های ستونی (پیلار) تیغه‌ها آسیب می‌بیند و باعث افزایش جریان خون درون تیغه‌ها و در نتیجه گشادشدن کانال مارژینال، احتقان خون یا حتی آنوریسم می‌شود (Ghittino and Prearo, 1993). به نظر می‌رسد ضایعاتی نظیر هیپرتروفی، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیومی و ادم حاصل از ایجاد فضای ادماتوزی در زیر اپیتلیوم تیغه‌ها، که در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد، از پاسخ‌های دفاعی آبشش باشند که منجر به افزایش فاصلهٔ انتشار گاز میان خون و آب، کاهش سطح و در نتیجه کاهش تبادلات گازی می‌شوند. برآمدگی اپیتلیوم باعث می‌شود فاصله‌ای که عامل استرس‌زا برای رسیدن به جریان خون باید طی کند، افزایش یابد (ibid).

محققان آسیب‌های پاتولوژیک مشاهده‌شده در کلیه شامل قطرات هیالن و افزایش مراکز ملانو ماکروفاژ، وجود کلنی‌های باکتری در عروق خونی و نیز خونریزی در اندام‌های مختلف مانند کلیه و آبشش را طی مطالعه دربارهٔ ماهیان آلوده به *L. garvieae* ذکر کرده بودند (Eldar *et al.*, 1996; Prieta *et al.*, 1993; Avci *et al.*, 2010).

انواع ضایعات در بافت‌های مختلف می‌توانند در ابتدا به‌منزلهٔ مکانیسمی دفاعی برای حفظ شرایط پایدار بدنی در برابر ورود عامل بیماری‌زا صورت پذیرد، اما با تکثیر و افزایش شدت و حدت آن، خود این واکنش‌های دفاعی، با افزایش ضایعات بافتی، می‌توانند مانعی در برابر عملکردهای معمول سلولی و در نتیجه بافتی باشند و در نهایت کل بدن موجود زنده را درگیر کنند (Pereira *et al.*, 2004).

در کل، بسیاری از تغییرات بافتی مشاهده‌شده در تحقیق حاضر با آسیب‌های پاتولوژیک حاصل از عوامل بیماری‌زای دیگر به ویژه *S. iniae* مشابه است؛ بنابراین، نمی‌توان فقط از نشانه‌های پاتولوژیک به‌منزلهٔ روش تشخیص قطعی استفاده کرد، هر چند بنا به گزارش‌های (Eldar and Ghittino(1999) هیستوپاتولوژی دو بیماری دارای تفاوت‌های درخور ملاحظه‌ای است و *L. garvieae* بیماری سیستمیک بسیار حادتری نسبت *S. iniae* ایجاد می‌کند. در مجموع، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که multiplex PCR روش تشخیصی مفیدی برای شناسایی هم‌زمان عامل یا عوامل اصلی بیماری در عفونت‌های میکس باکتریایی است.

References

[1]. Afghani, B., Stutman, H.R., 1996. Polymerase chain reaction for diagnosis of a conventional method for DNA extraction. Biochemical and Molecular Medicine 57, 14-18.

[2]. Akhlaghi, M., Mahjor, A.A., 2004. Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss).* Bulletin of European Association of Fish Pathologists 24, 132-136.

[3]. Austin, B., Austin, D., 2007. Bacterial fish pathogens Disease of farmed and wild fish. 4 th edition, Praxis pub،16-56-57-58-155-156-284-347-386 PP.

[4]. Avci, H., Aydogan, A., Tanrikul, T.T., Birincioglu, S.S., 2010. Pathological and Microbiologyical investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*, 1792) naturally infected with *lactococcus garvieae*. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 16, 313-318

[5]. Bromage, E.S., Thomas, A., Owens, L., 1999. *Streptococcus iniae,* a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer.* Diseases of Aquatic Organisms 36, 177-181.

[6]. Chang, P.H., Lin, C.W., Lee, Y.C., 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. Bulletin of European Association of Fish Pathologists 22(5), 319-326.

[7]. Chen, S.C., Liaw, L.L., Ko, S.C., Wu, C.Y., Chaung, H.C., Tsai, Y.H., Yang, K.L., Chen, Y.C., Chen, T.H., Lin, G.R., Cheng, S.Y., Lin, Y.D., Lee, J.L., Weng, Y.C., Chu, S.Y., 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. Journal of Fish Diseases 25, 727-732.

[8]. Edwards, M.C., Gibbs, R.A., 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. PCR Methods Applied 3, 65–75.

[9]. Elliot, J.A., Facklam, R.R., 1996. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. Journal of Clinical Microbiology 34, 1296–1298.

[10]. 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, 85–88.

[11]. Eldar, A., Horovitcz, A., Bercovier, H., 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopatholgy 56, 175– 183.

[12]. Eldar, A., Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss:* Similar, but different diseases. Disease of Aquatic Organisms 36, 227-231.

[13]. Fadaeifard, F., Momtaz, H., Rahimi, E., Mirzakhani, A., 2012. Detection of Streptococcus iniae and Lactococcus garvieae by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran. African Journal of Biotechnology 11(2), 260-263.

[14]. Ghittino, C., Prearo, M., 1993. Comparison of some strains isolated from rainbow trout affected by streptococcosis. Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica 11, 30–43.

[15]. Hassan, A.A., Khan, I.U., Lammler, C., 2003. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* strains of Lancefield's group C, G and L by polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Medical science B 50, 161-165.

[16]. Kang, S., Shin, G., Shin, Y., Palaksha, K.J., Kim, Y., Yang, H., 2004. Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). Journal Veterinary Science 5, 387–390.

[17]. Michel, C., Nougayrede, P., Sochon, E., de Kinkelin, P., 1996. *Lactococcus garvieae*, a bacteriumof pathological significance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farming. Diseases of Aquatic Organisms 22, 145–153.

[18]. Mata, A.I., Blanco, M.M., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., Gibello, A., 2004. Development of PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. Veterinary Microbiology 101, 109-116.

[19]. Mortada, M.A.H., Hatal, K., 2006. Multiplex PCR for detection of *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae* and *S.dysgalactiae* in cultured yellowtail. Aquaculture Science 53, 269-274.

[20]. Prieta, J., Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Collins, M.D., Rodriguez, U.M., Jones, D., Rodriguez, A., Dominguez, L., 1993. Lactococcosis de la trucha arco iris. Medical Veterinary 10, 363-373.

[21]. Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Evan, J.J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniea* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in theunited states. American Journal Veterinary Research 62,174-177.

[22]. Soltani, M., Nikbakht, G.H., Ebrahimzadeh, H.A., Ahmadzadeh, N., 2008. Epizootic outbreaks of *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin of European Association of Fish Pathologists 28, 209-214.

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

[24]. Sharifuzzaman, S.M., Abbass, A., Tinsley, J.W., Austin, B., 2011. Subcellular components of probiotics Kocuria SM1 and Rhodococcus SM2induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Walbaum*) against *Vibrio anguillarum*. Fish & Shellfish Immunol 30, 347-353.

[25]. Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S., Barja, J.L., 1994. Streptococcosis in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like bacterium. Bulletin of European Association of Fish Pathologists 14, 19–23.

[26]. Vendrell, D., Luis Balcazar, J., Ruiz-Zarauela, I., de Blas, I., Girones, O., Luis Muzquiz, J., 2007. Safety and efficacy of an inctivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Preventive Veterinary Medicine 80, 222-229.

[27].Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Journal of Clinical Microbiology 36(4), 983–985.