شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

صفحات ۳۲۶-۳۱۹

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

مهرنوش فرید[۱]، علیرضا میرواقفی[۲]، حمید فرحمند[۲]، 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 به‌دلیل شیوع سریع به‌ویژه در فصل تابستان، مرگ و میر نسبتاً بالا، کاهش تولید و خسارات اقتصادی به آبزی‌پروری 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 آلای رنگین کمان برداشت گردید و تشخیص مولکولی توسط پی سی آر انجام گردید. در بررسی مولکولیDNA موکوس و خون به‌طور مستقیم استخراج و وارد چرخه پی‌سی‌آر 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، پی‌سی‌آر، خون، موکوس، بیماری.**

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۴-۳۲۲۲۳۰۴۴-۹۸۲۶+ ایمیل: avaghefi@ut.ac.ir

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 می باشد. علائم بیماری شامل بی‌اشتهایی، قرار گرفتن بدن به‌صورت 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 16SrRNA 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 به‌خوبی انجام پذیرفت. این ژن نقش مهمی در تولید پروتئین C5a دارا می‌باشد که نقش آن در چسبیدن به سلول اپیتلیال می‌باشد و به‌طور 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 قزل‌آلای رنگین کمان از ماهی سرای کرج (کرج-ایران) خریداری شد و به دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردید. ماهیان متوسط وزن ۲۳۰±۲۰ گرم را دارا بودند. ماهیان در ۶ مخزن ۱۰۰۰ لیتری حاوی آب شهری کلرزدایی شده جای گرفتند. دوره روشنایی به تاریکی ۱۲ساعت به ۱۲ ساعت بود. ماهیان روزانه توسط بیومار شرکت بهپرور (کرج-ایران) غذادهی شدند. میانگین دمای آب تانک ها 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 به‌صورت 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 به‌صورت 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 به‌دست آمده میزان ۱۰۰ ماکرولیتر بر روی محیط‌های کشت تازه ریخته شد و دوباره به‌صورت 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 اسپکتروفتومتر کدورت سنجیده شد. در جذب ۶۲۳ نانومتر، برای کدورت عدد ۰/۲

خوانده شد و بر این اساس میزان CFU باکتری برابر با ۸×۱۰۹ محاسبه گردید.

۳.۲. تزریق ماهیان

برای تزریق باکتری این میزان CFU را به میزان ۱۰۰ برابر رقیق کرده و محلولی با میزان CFU ۸×۱۰۷ برای تزریق به ماهیان آماده شد. ماهیان در ظرف حاوی گل میخک بیهوش گردیده و تزریق به‌صورت 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. نمونه‌برداری غیر کشنده

از ماهیان ۲۴ ساعت پس از تزریق با فاصله زمانی ۲۴ ساعته نمونه‌برداری 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 کلروفرم (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 پی‌سی‌آر

توالی نوکلئوتیدی پرایمر پیش رونده به‌صورت 5-ACAATGGAAGGCGCTACTGTTC-3´ بود. این پرایمر براساس ناحیه پرایمر طراحی شده براساس ژن scpB استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمر معکوس نیز به‌صورت ACCTGGTG ۵´ TTTGACCTGAACTA-3´ می‌باشد (Dimitrive *et al.*, 2004).

۷.۲. توالی‌یابی محصول پی سی آر

برای توالی‌یابی، محصول پی‌سی‌آر به شرکت فزاپژوه فرستاده شد. برای بررسی توالی محصول پی سی‌آراز 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 نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

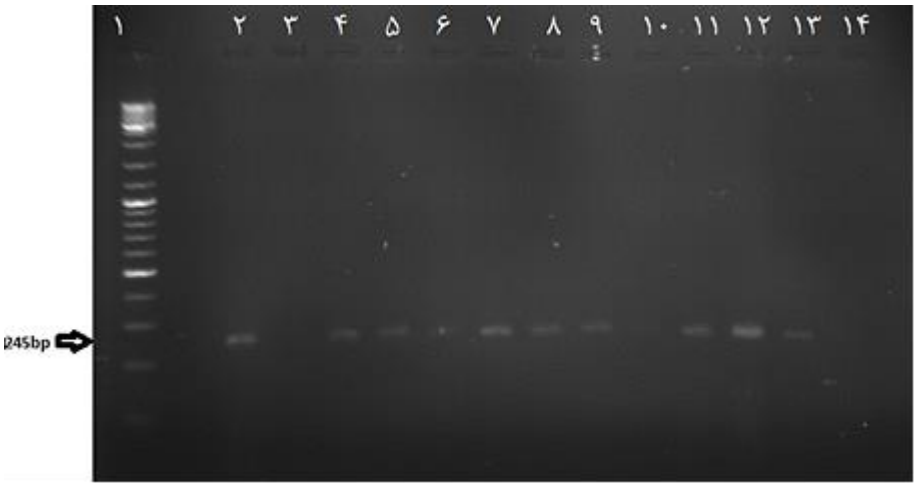
۳. نتایج

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 دمی، خونریزی در قاعده باله‌ها، تیرگی رنگ بدن، اگزوفتالمی 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 نمونه-های 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



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

DNA نمونه‌های موکوس برای واکنش پی‌سی‌آر برداشت شد (شکل‌های ۱ و ۲). نتایج حاصل از استخراج DNA هیچ‌گونه DNA استخراج شده ای را به ما نشان نداد. اما برای اطمینان از نبود باکتری پی-سی‌آر انجام گردید. در نمونه‌ها باندی مبنی بر وجود باکتری استرپتوکوکوس اگالاکتیه دیده نشد .

۳.۳. توالی‌یابی محصول پی سی آر

نتایج توالی‌یابی نشان داد که محصول پی‌سی‌آر مربوط به سویه RTCC_2051 می‌باشد که باکتری مورد نظر ما در این بررسی می‌باشد. توالی مربوط به ژن پپتیداز C5a(scpB) است و با Accession number شماره JF831508.1 موجود می‌اشد. این نتایج نشان می‌دهد پرایمر طراحی شده و استفاده شده در این بررسی به قطعه مورد نظر در ژنوم باکتری چسبیده است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

تکنیک پی‌سی‌آر به‌عنوان روش تشخیصی مولکولی امروزه در حال گسترش است. استفاده از پرایمرهای عمومی همانند 16SrRNA به‌علت در دسترس بودن و حفاظت شدگی بالا در گونه‌ها مورد استفاده می‌باشند (Zlotkin *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2002). اما تشخیص توسط این پرایمرها بایستی با قدم‌های بعدی شامل توالی‌یابی و برش‌های آنزیمی اختصاصی‌تر شوند. زیرا به‌همراه نکات مثبتی که در این گونه پرایمرها وجود دارد، به علت این‌که احتمال ریسک نتایج مثبت اشتباه را بالا می‌برند و می‌توانند به گستره وسیعی از باکتری‌ها و انگل‌ها بچسبند، مورد اعتماد کامل نیستند.

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 به‌دست 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 احتصاصی برای تشخیص این باکتری الزام می یابد.

در این بررسی از محدوده ژنی scpB استفاده گردید. دیمیتریوو همکاران (۲۰۰۴) گروه B استرپتوکوک‌ها را با استفاده از پرایمر طراحی شده براساس ژن scpB شناسایی کردند وکارآیی این ژن را در پی‌سی‌آر بالا دانستند و آن را جایگزین مناسبی برای 16SrRNAدانستند. فرانکن و همکاران (۲۰۰۱) نیز بر روی ژن scpB تحقیقی را انجام دادند و نشان دادند این محدوده ژنی از کارآیی 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 می-اشد. این نتیجه دقت بالای پرایمر را در چسبیدن به جایگاه مورد نظر و نیز شرایط بسیار مناسب و بهینه پی سی آر را نشان می‌دهد.

نمونه‌برداری 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 نمونه‌برداری 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 وارداتی که برنامه ارزیابی سلامت را بر روی آن‌ها انجام می‌دهند به‌کار گرفته می شود 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 آنزیم-های لیز کننده 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 نتیجه گیری کرد که باکتری بر روی فلور موکوس دیده نمی‌شود. نیکوکلاینن و همکاران (۲۰۰۱) بررسی را بر روی چسبندگی موکوس انجام دادند و عنوان کردند که باکتری های خاصی می‌توانند به موکوس بچسبند. بر این اساس می‌توان گفت که باکتری مورد نظر ما بر روی موکوس نمی‌نشیند. برخلاف این بررسی سیپریانو 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 قزل آلا موجود نمی‌باشد. این محققین وجود موادی مانند لیزوزیم، ایمونوگلوبولین ها، پروتئاز-ها و گلیکوپروتئین ها را در موکوس عاملی برای رشد نکردن میکروارگانیزم ها بر روی آن می‌دانند. همچنین به‌دلیل فعالیت زیاد آنتی باکتریال موکوس قزل‌آلا این باکتری پس از چسبیدن به موکوس از بین خواهد رفت. اوستین (۱۹۹۸) در طی بررسی عنوان کرد که موکوس

ماهی قزل آلا 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 باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را دارا می‌باشد. در تایید این نتایج در سال ۲۰۱۰ کانتو عنوان کرد که موکوس در ماهی قزل آلا حاوی موادی می‌باشد که به سرعت باکتری های گرم مثبت و منفی را از بین می‌برد. این نتایج می‌تواند دلیلی باشد برای این ادعا که باکتری بر روی موکوس ماهی قزل آلا به سرعت لیز شده و هضم می‌شود و در نتیجه در هیچ‌یک از تست ها دیده نمی‌شود.

در این بررسی برای گرفتن نتایج دقیق از کل خون برداشت گردید تا باکتری در قسمت‌های ساتنریفیوژ 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 اندام های داخلی درگیر گردیده و از اشتهای 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 به‌دست نمی-آید.

گرچه در سیر طبیعی بیماری زمان هایی 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 این‌که 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 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 استرس‌زاتری را نسبت به محیط آزمایشی ما دارا می‌باشد. در سال ۲۰۱۰ اوانس و همکاران آنتی ژن باکتری استرپتوکوکوس 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 نمونه های 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 ELIZA 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 بافت های ماهی می باشد.

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 می-باشد 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.

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., Frelier, P.F., 2001. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dificile* 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 devlelopment 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 Jyvaskyla.

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., Ouwehand, 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 the59 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 Microbiolog*y, 64, 4065-4067.