شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

صفحات ۷۱-۶۲

تنوع ژنتیکی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* (*Lactococcus garvieae*) از ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بیمار در ایران با استفاده از روش *RAPD-PCR*

رضا سلیقه زاده[۱]، مصطفی اخلاقی[۲]، حسن شریفی یزدی[۳]، سیاوش سلطانیان[۳]*

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت آبزیان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۷/۲۵

چکیده

لاکتوکوکوس گارویه آ یکی از عوامل اصلی بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در مزارع ماهیان به ویژه ماهی قزل آلای رنگین کمان می باشد که هر ساله خسارات زیادی را موجب می‌شود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه *لاکتوکوکوس گارویه آ* بدست آمده از تلفات مزارع قزل آلای رنگین کمان در برخی استان‌های کشور به روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار گرفت. پس از کشت از بافت کلیه ماهیان بیمار و جداسازی کوکسی‌های گرم مثبت روی برین هارت آگار (BHI)، در ابتدا با استفاده از روش PCR اختصاصی، تشخیص گونه (با تولید محصول ۱۱۰۰ جفت بازی) جدایه های باکتریایی انجام گرفت. سپس ژنوتایپینگ جدایه ها با استفاده از روش RAPD-PCR و دو پرایمر P5 و M13 انجام شد. نتایج حاصل از روش RAPD-PCR نشان داد که پرایمر P5 در مجموع قادر به تولید حداکثر ۳ باند و ۴ الگوی باند در میان جدایه‌ها شد اما پرایمر M13 قادر به تولید حداکثر ۷ باند و ۵ الگوی باندی شد. همچنین نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس محصولات RAPD-PCR پرایمر P5 با استفاده از روش UPGMA موجب تفکیک این جدایه‌ها در ۲ کلاستر اصلی و ۴ گروه فرعی ژنتیکی شد، اما با استفاده از پرایمر M13 این جدایه‌ها در ۲ کلاستر اصلی و ۵ گروه فرعی ژنتیکی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که گرچه مشابهت‌های فنوتیپی بین جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* مناطق مختلف ایران وجود دارد ولی این جدایه‌ها با همدیگر دارای تفاوت‌های ژنتیکی نیز هستند. مطالعات بیشتری در آینده نیاز است تا نقش این تفاوت های ژنتیکی کسب شده در این مطالعه را در میزان حدت باکتری و ایمنی‌زایی بدنبال واکسناسیون نشان دهد.

واژگان کلیدی: ***لاکتوکوکوس گارویه آ*، لاکتوکوکوزیس، قزل آلای رنگین کمان، ایران، تنوع ژنتیکی.**

* نویسنده مسئول: تلفن: ۹۸۹۱۲۷۱۱۶۱۳۵+ ایمیل: sharifiy@shirazu.ac.ir

۱. مقدمه

لاکتوکوکوس گارویه آ عامل ایجاد کننده بیماری لاکتوکوکوزیس در آبزیان است و متعلق به باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد. اگرچه *لاکتوکوکوس گارویه آ* از منابع مختلفی مانند ماهی، محصولات غذایی، حیوانات خشکی زی و انسان نیز جدا شده است، اما یک عامل بیماری‌زای مهم در ماهیان بوده و باعث ایجاد سپتی سمی خونریزی دهنده کشنده و فوق حاد در ماهیان وحشی و پرورشی در آب شور و شیرین می‌شود، خصوصاً هنگامی که دمای آب به بالاتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسد (Vendrell *et al.*, 2006; Ture and Altinok, 2016).

این باکتری نخستین بار از ماهی دم زرد در ژاپن جدا شد (Kusuda *et al.*, 1991). بیشترین اثرات بالینی این باکتری بر صنعت پرورش آزاد ماهیان می‌باشد که باعث بروز خسارات اقتصادی سنگین در سرتاسر جهان (Eldar *et al.*, 1996) و همچنین ایران شده است که مطالعات به‌عمل آمده بیانگر انتشار بیماری در بسیاری از مزارع قزل آلای رنگین کمان کشور می باشد (Akhlaghi and Keshavarzi, 2002; Sharifiyazdi *et al.*, 2010; Haghighi Karsidani *et al.*, 2010; Erfanmanesh *et al.*, 2012).

به علت تنوع منابع و مخازن باکتری درگیر از جمله جانوران خون‌گرم، توجه به تنوع ژنتیکی جدایه‌های درگیر برای ارتقا اطلاعات اپیدمیولوژیک بیماری و اتخاذ روش های پیشگیری از اهمیت خاصی برخوردار است. مطالعاتی پیرامون مقایسه تنوع ژنتیکی برخی جدایه های بدست آمده از تعدادی کشورها نظیر ژاپن، استرالیا، تایوان، اسپانیا و انگلیس بیانگر تنوع جدایه های درگیر در بروز بیماری است (Eldar *et al.*, 1996). شریفی یزدی و همکاران (۲۰۱۰) با جداسازی و شناسایی مولکولی *لاکتوکوکوس گارویه آ* جداشده از مزارع قزل‌آلای کشور، ضمن مشخص نمودن مشابهت ۱۰۰ درصدی ترادف ژن ریبوزومی ۱۶ اس آن‌ها با باکتری‌های ثبت شده از ایران، بیشترین شباهت ژنتیکی این باکتری را با باکتری جداشده از ماهی مولت در تایوان و دم زرد در ژاپن گزارش نمودند (Sharifiyazdi *et al.*, 2010). در ایران علی‌رغم مطالعات مولکولی برای شناسایی مزارع و مناطق آلوده اطلاعات اندکی پیرامون تنوع ژنتیکی جدایه‌های درگیر در بروز بیماری در مناطق مختلف کشور وجود دارد. اهمیت این نوع مطالعات به ویژه از دیدگاه مباحث همه گیری‌شناسی و پیشگیری از بیماری قابل توجه است به خصوص در کشورهایی مانند ایران که سرزمینی بزرگ و از تنوع زیستی بالایی در ارتباط با منابع آبی برخوردار است. در میان روش های مولکولی برای مطالعات تنوع ژنتیکی، روش RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) به‌عنوان روشی با تفریق‌پذیری بالا و قابل دسترس می‌باشد، که براساس آن و با استفاده از انتخاب صحیحی از پرایمرهای انتخابی می‌توان بر اساس تولید الگوهای متفاوت از محصولات PCR، پلی‌مورفیسم را در سطح DNA میکروارگانیسم‌ها را شناسایی کرد (Williams *et al.*, 1990). در این خصوص تنها مطالعه صورت گرفته در داخل کشور توسط طاهری میرقائد و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از روش RAPD-PCR و شش پرایمر انتخابی (P1-P6) انجام شده است که نتایج آنها بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* مناطق شمالی و جنوبی کشور بود (Taherimirghaed *et al.*, 2013). محققین دیگری نیز با استفاده از روش RAPD-PCR به بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* در مناطق مختلف جهان پرداخته‌اند (Ravelo *et al.*, 2003; Foschino *et al.*, 2008; Ferrario *et al.*, 2012; Plumed-Ferrer *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2016).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* در بروز بیماری از تعدادی استان های کشور و نیز بررسی تنوع ژنتیکی آنها به روش RAPD-PCR با استفاده از دو پرایمر M13 و P5 می‌باشد. نتایج حاصله به ارتقا کارآیی واکسن تولید داخل و در نتیجه پیشگیری موثر از بروز بیماری و خسارات وارده کمک خواهد نمود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جدایه‌های باکتری و استخراج DNA

در ابتدا ۵۰ جدایه ی باکتری کوکوسی گرم مثبت از مزارع پرورش ماهیان قزل آلای رنگین کمان

بیمار در استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، لرستان و مازندارن در بهار و تابستان ۱۳۹۶ به‌دست آمدند. این جدایه‌های مشکوک با کشت از بافت کلیه ماهیان بیمار بر روی محیط برین هارت آگار (BHI) در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در محیط گرمخانه نگهداری شدند. به‌منظور استخراج DNA باکتری ها از روش جوشاندن استفاده گردید (Holmes and Quiqley, 1981)، به این صورت که پرگنه خالص از هر جدایه به طور جداگانه به میکروتیوپ حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر ۱X تریس استیک اسیدEDTA– (TAE) افزوده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. سپس تمامی میکروتیوپ‌ها با دور g ۶۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اجزا سلولی رسوب داده شوند. سپس مایع رویی که حاوی DNA ژنومی بودند به میکروتیوپ تازه منتقل گردیدند و تا زمان اجرای آزمایش در فریزر ۲۰- نگهداری شدند.

۲.۲. شناسایی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه آ* با استفاده از PCR

به منظور شناسایی جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه آ* از پرایمرهای pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') و pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') به روش توصیه شده توسط Mata و همکاران (۲۰۱۴) استفاده شد. این پرایمرها ناحیه ژن 16S rRNA باکتری *لاکتوکوکوس گارویه آ* را به‌طور اختصاصی شناسایی و تولید باند ۱۱۰۰ جفت بازی می‌نمایند. پس از استخراج DNA از ۲۰ جدایه مورد مطالعه، واکنش PCR به میزان ۲۰ میکرولیتر مخلوط PCR شامل ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR (Ampliqon، دانمارک)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و DNA استخراج شده از جدایه‌های مورد نظر به میزان ۲۰ نانوگرم و رساندن حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر توسط آب مقطر به‌منظور تکثیر قطعه ژن مورد نظر انجام گرفت. از باکتری *لاکتوکوکوس گارویه آ* جدا شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان با شماره دسترسی EU727199 در بانک ژن به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و از آب مقطر نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. برنامه PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad، آمریکا) نیز به‌ترتیب شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشته سازی اولیه)، ۳۰ سیکل (دور) واسرشته سازی هر دور به‌مدت ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال هر دور به‌مدت ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد، بسط اولیه هر دور به‌مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن هدف در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (K-Plus DNA Ladder، هند) و محصول کنترل های مثبت و منفی (آب مقطر) در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ RedSafe (Intron Biotechnology، کره جنوبی) در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و با استفاده از دستگاه مستندساز ترانس‌ایلومیناتور عکس‌برداری شد.

۳.۲. آزمایش RAPD-PCR

برای انجام مطالعه تنوع ژنتیکی از روش RAPD-PCR توصیه شده توسط Foschino و همکاران (۲۰۰۸) با اندکی تغییرات استفاده شد (Foschino *et al.*, 2008). برای این کار ۲ پرایمر انتخابی نشان داده شده در جدول ۱ به‌طور مجزا مورد استفاده قرار گرفت.

مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری مورد استفاده برای آزمایش RAPD-PCR شامل: ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR (Ampliqon، دانمارک)، ۲/۵ میکرولیتر از پرایمر و DNA استخراج شده از جدایه‌های مورد نظر به میزان ۳۰ نانوگرم و رساندن حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر توسط آب مقطر بود.

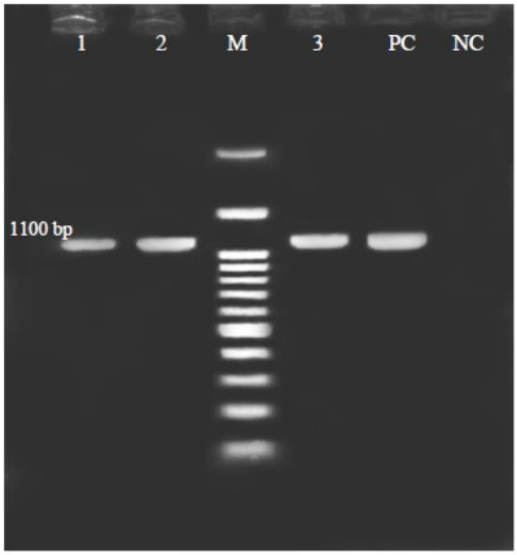
عملیات RAPD-PCR با استفاده از دستگاه دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad، آمریکا) نیز به‌ترتیب شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی اولیه)، ۴۰ سیکل (دور) واسرشته‌سازی هر دور به‌مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال هر

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمایش RAPD-PCR.

نام پرایمر	توالی پرایمر	منبع
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	Ferrario *et al.*, 2012
P5	5'-AACGCGCAAC-3'	Ravelo *et al.*, 2008

جدول ۲- الگوهای باندی تولید شده با استفاده از پرایمر P5 در جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه آ*.

الگوی باندی	تعداد باند	وزن مولکولی	استان	شکل
الگوی باندی I	یک	۴۰۰ جفت باز	فارس، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران، چهارمحال و بختیاری	شکل ۲ چاهک ۱
الگوی باندی II	سه	۳۰۰ تا ۶۵۰ جفت باز	لرستان	شکل ۲ چاهک ۲
الگوی باندی III	دو	۴۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز	مازندران، کهگیلویه و بویراحمد	شکل ۲ چاهک ۳
الگوی باندی IV	سه	۴۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز	فارس، چهارمحال و بختیاری	شکل ۲ چاهک ۴



شکل ۱ - الکتروفورز محصولات اختصاصی PCR حاصل از ژن 16S rRNA جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه آ* بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪، (M) نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱، ۲ و ۳ محصولات حاصل از جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* (۱۱۰۰ جفت بازی)، (PC) کنترل مثبت، (NC) کنترل منفی.

دور به‌مدت ۲ دقیقه در ۴۳ درجه سانتی‌گراد، بسط اولیه هر دور به مدت ۱/۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی-گراد و بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. محصول RAPD-PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ RedSafe (Intron Biotechnology، کره جنوبی) در ولتاژ ۱۰۰ ولت به-مدت ۹۵ دقیقه الکتروفورز شدند و با استفاده از دستگاه مستندساز ترانس ایلومیناتور عکس برداری شد.

برای درک روابط تکاملی جدایه‌های مورد مطالعه از درخت فیلوژنیک استفاده شد. درخت فیلوژنی از روش جفت گروهی غیر وزنی از طریق میانگین حسابی (UPGMA) با کمک نرم‌افزار PyElph 1.4 ترسیم گردید (Nei, 1972).

۳. نتایج

۱.۳. PCR برای شناسایی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ*

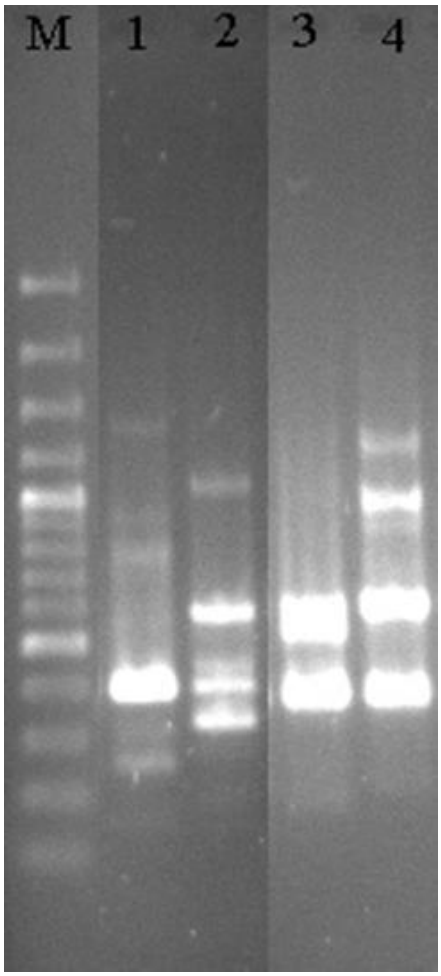
براساس نتایج حاصل از PCR جدایه‌های باکتریایی تعداد ۲۰ جدایه به‌عنوان گونه‌ی گارویه شناسایی شدند، به طوری‌که الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بیانگر قطعه‌ی ژن تکثیر شده‌ی 16S rRNA *لاکتوکوکوس گارویه آ* با اندازه باندی ۱۱۰۰ جفت بازی بود و هیچ یک از نمونه-های کنترل منفی تولید باند ننمودند (شکل ۱).

۱.۳. نتایج RAPD-PCR

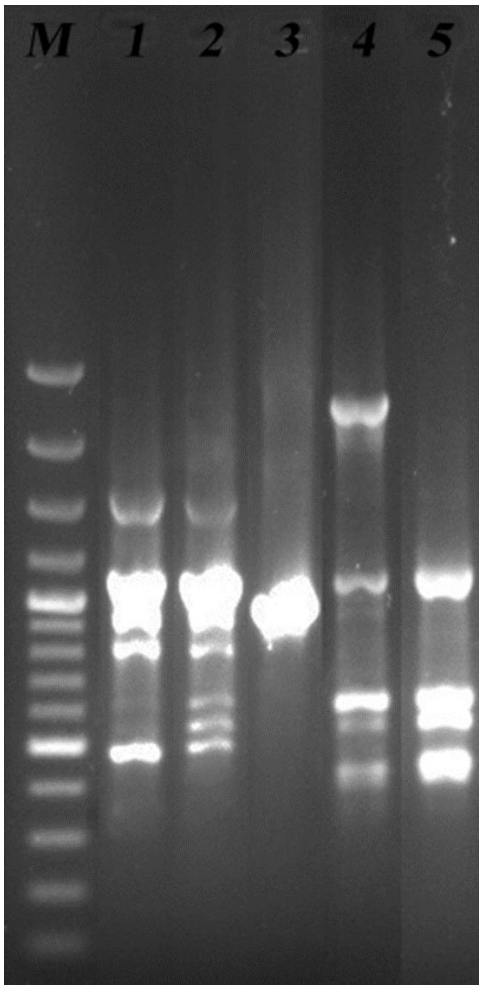
انجام RAPD-PCR با استفاده از جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه آ* و با استفاده از هر ۲ پرایمر انتخابی نشان داد که پرایمر P5 قادر به تولید حداکثر ۳ باند بود و پرایمر M13 قادر به تولید حداکثر ۷ باند بود. با تکرار آزمایش باندهای تولیدی قابل تولید مجدد بودند و تکرار پذیری الگوها بالا بود. جهت اطمینان بیشتر تمامی مراحل PCR برای پرایمرهای مورد استفاده حداقل دو بار تکرار شد و نتایج حاصله فاقد تفاوت خاصی بودند. در این مطالعه نتایج RAPD-PCR با استفاده از پرایمر P5 فقط منجر به تولید ۴ الگوی باندی شد (جدول ۲). در این مطالعه نتایج RAPD-PCR با استفاده از پرایمر M13 موجب تولید ۵ الگوی باندی و با تنوع ژنتیکی بیشتر شد (جدول ۳).

جدول ۳ - الگوهای باندی تولید شده با استفاده از پرایمر M13 در جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه آ*.

الگوی باندی	تعداد باند	وزن مولکولی	استان	شکل
الگوی باندی I	پنج	۵۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز	چهارمحال و بختیاری، فارس، مازندران	شکل ۳ چاهک ۱
الگوی باندی II	هفت	۵۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز	کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری	شکل ۳ چاهک ۲
الگوی باندی III	یک	۹۰۰ جفت باز	لرستان	شکل ۳ چاهک ۳
الگوی باندی IV	پنج	۵۰۰ تا ۲۸۰۰ جفت باز	فارس، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران، چهارمحال و بختیاری	شکل ۳ چاهک ۴
الگوی باندی V	چهار	۵۰۰ تا ۱۱۰۰ جفت باز	کهگیلویه و بویراحمد	شکل ۳ چاهک ۵

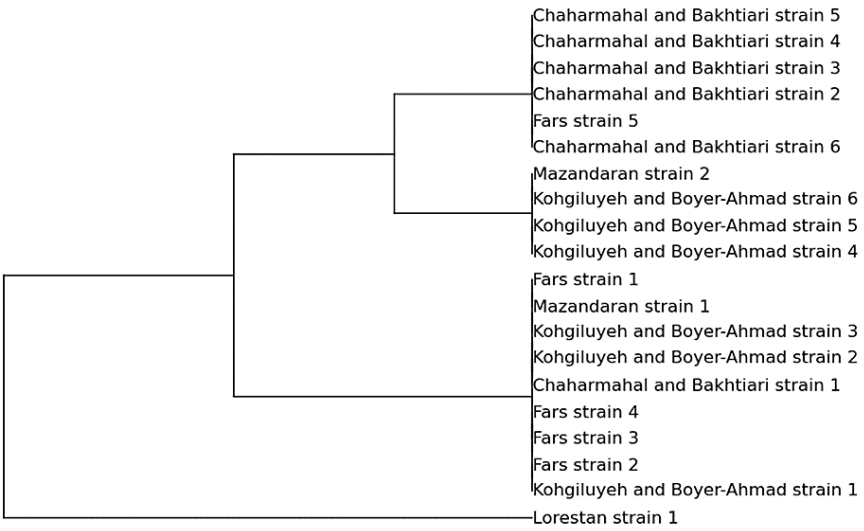


شکل ۲ - الگوهای باندی متفاوت به‌دست آمده با استفاده از پرایمر P5 در روش RAPD-PCR (M: نردبان مولکولی ۱۰۰ جفت بازی).

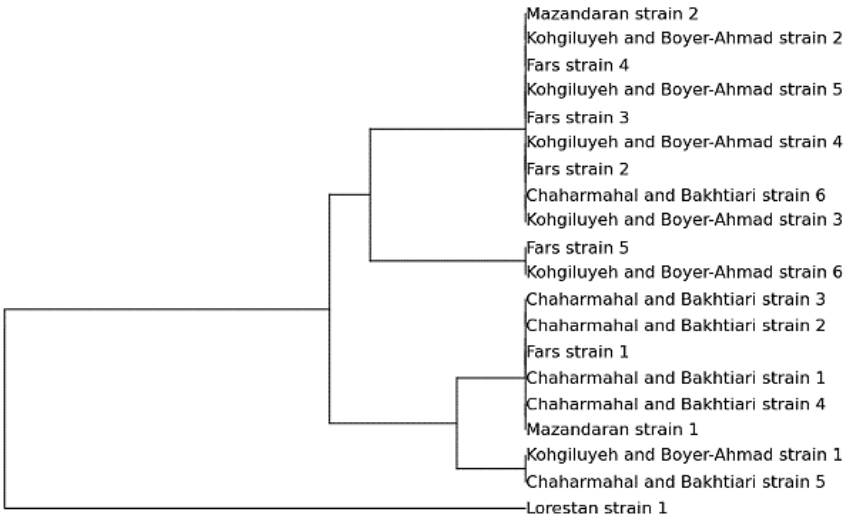


شکل ۳ - الگوهای باندی متفاوت بدست آمده با استفاده از پرایمر M13 در روش RAPD-PCR (M: نردبان مولکولی ۱۰۰ جفت بازی).

ترسیم درخت فیلوژنی حاصل از محصول RAPD-PCR به‌دست آمده روی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* با استفاده از پرایمر P5 و روش UPGMA نشان داد که ۲ کلاستر اصلی قابل تفکیک است، اولین کلاستر خود به ۳ گروه فرعی قابل تقسیم و در مجموع با استفاده از این پرایمر ۴ گروه ژنتیکی در بین جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۴)، به‌طوری‌که بیشترین جدایه‌ها در گروه ۳ ژنتیکی قرار داشتند که متعلق به نمونه‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران و چهارمحال و بختیاری بودند، اما ترسیم درخت فیلوژنی حاصل از محصول RAPD-PCR به‌دست آمده روی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* با استفاده از پرایمر M13 و روش UPGMA نشان داد که ۲ کلاستر اصلی قابل تفکیک است، اولین



شکل ۴ - دندروگرام فاصله ژنتیکی ایزوله های *لاکتوکوس گارویه آ* محصول RAPD-PCR با استفاده از پرایمر P5 جمع آوری شده از استان های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، مازندران و لرستان براساس UPGMA (Nei, 1972).



شکل ۵ - دندروگرام فاصله ژنتیکی ایزوله های *لاکتوکوس گارویه آ* محصول RAPD-PCR با استفاده از پرایمر M13 جمع آوری شده از استان های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، مازندران و لرستان براساس UPGMA (Nei, 1972).

کلاستر خود به ۲ گروه فرعی قابل تقسیم و در مجموع با استفاده از این پرایمر ۵ گروه ژنتیکی در بین جدایه-های مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۵)، به‌طوری‌که بیشترین جدایه‌ها در گروه‌های اول ژنتیکی قرار داشتند که متعلق به نمونه‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران و چهارمحال و بختیاری بودند. نمونه استان لرستان در این مطالعه در گروه چهارم و پنجم ژنتیکی قرار گرفت.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

لاکتوکوکوس گارویه آ یکی از عوامل مهم بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوزیس در صنعت آبزی‌پروری در مناطق مختلف می‌باشد (Eldar *et al.*, 1996; Eldar *et al.*, 1999; Vela *et al.*, 2000; Eyngor *et al.*, 2004; Soltani *et al.*, 2008). استفاده از روش‌های شیمیایی و مرسوم برای شناسایی باکتری عامل بیماری و تفکیک از آن‌ها از سایر عوامل مولد (*استرپتوکوکوس اینیایی*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* و سویه‌های شبه *انتروکوکوس*) کاری دشوار، زمان‌بر و پرهزینه است. به‌علاوه نتایج این گونه مطالعات بیوشیمیایی اغلب متغییر می‌باشد (Toranzo *et al.*, 1994; Eldar *et al.*, 1996; Soltani *et al.*, 2008). همچنین استفاده از این نوع

روش‌ها تنها موجب شناسایی باکتری در حد فنوتایپینگ می‌شود و بنابراین نیاز به مطالعات مولکولی برای اطلاع از موقعیت تاکسونومی جدایه‌های عامل بیماری می‌باشد، در این میان ژن هدف 16SrRNA از مزایای بیشتری برخوردار است (Zlotkin *et al.*, 1998).

در مطالعه حاضر که روی تعداد ۲۰ جدایه‌ی *لاکتوکوکوس گارویه آ* از تلفات ماهیان قزل آلا در برخی از مزارع استان های فارس، مازندران، لرستان، کهگیلویه و بویراحمد و چهارمحال و بختیاری انجام شد، با استفاده از دو پرایمر مورد استفاده به ترتیب ۴ و ۵ تیپ مختلف بدست آمد. علی‌رغم مطالعات متعدد پیرامون فنوتایپینگ جدایه‌های به‌دست آمده از تلفات ماهیان، مطالعات اندکی در خصوص جنبه‌های اپیدمیولوژیک آن و با استفاده از روش‌های مولکولی صورت گرفته است. Eldar و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از روش ریبوتایپینگ تعداد ۱۵ جدایه‌ی این باکتری به-دست آمده از مناطق آسیا، اروپا و استرالیا متوجه تعداد ۲ ریبوتایپ با استفاده از آندونوکلئاز *EcoR1* و ۷ ریبوتایپ با استفاده از آندونوکلئاز *HindIII* شده‌اند. در این مطالعه و با استفاده از هر دو آندونوکلئاز فوق الذکر ارتباط نزدیکی بین جدایه‌های ژاپنی و ایتالیایی مشاهده شد. در مطالعه Vela و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از الکتروفورز ژل آکریل آمید (PFGE) روی تعداد ۸۴ جدایه این باکتری بدست آمده از انسان، گاو، ماهی و آب موفق شدند تا ۱۹ تیپ باکتریایی را از همدیگر تفکیک کنند. همچنین این محققین نشان دادند که ۳ کلون ژنتیکی متفاوت از این باکتری وجود دارد. در مطالعه Ravelo و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از روش RAPD اقدام به بررسی تنوع ژنتیکی تعداد ۵۷ جدایه این باکتری به‌دست آمده از ماهیان قزل آلا، گیش دم زرد و گربه ماهی در کشورهای مختلف (فرانسه، پرتقال، ترکیه، اسپانیا، ایتالیا و ژاپن) نمودند. آنها جدایه‌ها را در ۳ گروه ژنتیکی طبقه بندی نمودند و درصد مشابهت هر سه گروه را ۷۵-۱۰۰ درصد گزارش کردند. Taherimirghaed و همکاران (۲۰۱۳) بر روی تعداد ۴۴ جدایه‌ی *لاکتوکوکوس گارویه آ* از تلفات ماهیان قزل آلای رنگین کمان در برخی از مزارع استان‌های تهران، مازندران، لرستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد و چهارمحال و بختیاری مطالعه‌ای انجام دادند، با استفاده از پرایمر P4 تعداد ۴ تیپ (پروفایل) مختلف بدست آمد. در این مطالعه و بر خلاف مطالعه Ravelo و همکاران (۲۰۰۳)، پرایمر P5 در مقایسه با سایر پرایمرها قادر به تولید بیشترین باند بود. در این مطالعه و مشابه با مطالعه Foschino و همکاران (۲۰۰۸)، پرایمر M13 ۵۲ ژنوتایپ را تشخیص داد در حالی‌که پرایمر P5 قادر به تشخیص ۲۷ ژنوتایپ بود، پرایمر M13 قادر به تولید بیشترین باند بود. Ferrario و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از پرایمر M13 از ۴۹ سویه جدا شده ۲۳ پروفایل مختلف را بدست آوردند. Duman و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از پرایمرهای M13 و P5 از ۱۳۷ جدایه این باکتری به‌ترتیب ۵ و ۴ ژنوتایپ را تشخیص دادند. در این مطالعه نیز مانند سایر مطالعات قبلی پرایمر M13 قادر به شناسایی ۵ ژنوتایپ شد در حالی‌که پرایمر P5 فقط ۴ ژنوتایپ را شناسایی نمود. علت این‌که پرایمر M13 قادر به تولید باند بیشتری می باشد می تواند به این دلیل باشد که پرایمر M13 دارای مکان های پیوندی بیشتری در DNA می باشد و بنابراین قدرت تفکیک کننده پرایمر M13 بالاتر از P5 می‌باشد.

به علاوه تولید الگوی (پروفایل) RAPD-PCR در بین جدایه‌های ایرانی می‌تواند ناشی از تفاوت در منطقه جغرافیایی کشور باشد، زیرا ایران کشوری پهناور و مناطق شمالی و غربی آن از نظر تنوع زیستی و جغرافیایی و گردشگری که همگی در منابع و انتشار باکتری عامل بیماری نقش دارند، با همدیگر متفاوت هستند (Taherimirghaed *et al.*, 2013). به علاوه در این مطالعه الگوی RAPD-PCR با استفاده از پرایمر M13 و P5 بیانگر وجود پنج و چهار گروه ژنتیکی در میان ۲۰ جدایه *لاکتوکوکوس گارویه آ* به-دست آمده از مزارع قزل آلا در استان های تحت مطالعه است. قابل توجه است که برخی جدایه‌های استان‌های مختلف کشور با یکدیگر مشابه هستند. یکی از این علل این امر می‌تواند ناشی از مخزن باکتری (جانوران خونگرم)، حمل و نقل ماهیان بازاری، مولدین و بچه ماهیان و تخم چشم زده آلوده بین استان‌های مختلف مورد مطالعه باشد، بنابراین نتایج این مطالعه

نشان می‌دهد که جدایه‌های هر منطقه از شباهت بالایی با یکدیگر برخوردار بوده و با جدایه‌های سایر مناطق متفاوت هستند که از نظر اپیدمیولوژیک بیانگر هتروژنیسیتی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* در مزارع قزل آلای ایران است. از آن‌جایی که این بیماری به لحاظ تنوع منابع باکتری‌های درگیر نیازمند اتخاذ روش‌های پیشگیری است و در سال‌های اخیر واکسن ساخت داخل علیه آن در حال استفاده است. بنابراین نتایج این مطالعه به ارتقا کارآیی این واکسن کمک شایانی خواهد نمود.

در نتیجه‌گیری کلی می‌توان اظهار داشت که جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه آ* عامل تلفات مزارع قزل آلای ایران از تنوع ژنتیکی قابل توجه برخوردار بوده و این تنوع با روش RAPD-PCR قابل مطالعه است زیرا در مقایسه با سایر روش‌ها این روش ارزان، سریع و ساده بوده و با ابزارهای متداول قابل اجرا است. به‌علاوه نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که به‌دلیل تنوع ژنتیکی جدایه‌های درگیر در بیماری ضروری است تا برای ارتقا و کارآیی واکسن ساخت داخل به گونه‌ای عمل شود تا واکسن تولیدی قدرت ایجاد محافظت علیه همه جدایه‌های با تنوع زنتیکی متفاوت را داشته باشد و از آن‌جایی که منابع این باکتری متعدد و شماری از جانوران خونگرم را در بر می‌گیرد لذا انجام مطالعات مستمر در استان‌های مبتلا به بیماری برای شناسایی جدایه‌های جدید و هتروژن و مقایسه تفاوت در حدت و بیماری‌زایی ژنوتیپ های مختلف قابل توصیه است.

References

Akhlaghi, M., Keshavarzi, M., 2002. Streptococcosis outbreaks in rainbow trout farms of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2(3), 183-189.

Duman, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Buyukekiz, A.G., 2016. Genotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from rainbow trout by RAPDPCR using M13 and P5 primers in turkey. Conference AquaEpi I, Oslo, Norway.

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(2), 85-88.

Eldar, A., Goria, M., Ghittino, C., Zlotkin, A., Bercovier, H., 1999. Biodiversity of lactococcus garvieae isolated frome fish in Europe, Asia, and Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3), 1005-1008.

Erfanmanesh, A., Soltani, M., Pirali, E., Mohammadian, S., Taherimirghaed, A., 2012. Genetic characterization of *Streptococcus iniae* in diseased farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. *The Scientific World Journal* 2012, 2012.

Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G., Chilmonczyk, S., Eldar, A., 2004. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9), 5132-5137.

Ferrario, C., Ricci, G., Borgo, F., Rollando, A., Fortina, M.G., 2012. Genetic investigation within *Lactococcus garvieae* revealed two genomic lineages. *FEMS Microbiology Letters* 332(2), 153-161.

Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M., Bottero, M.T., 2008. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *Journal of Applied Microbiology* 105(3), 652-662.

Haghighi Karsidani, S., Soltani, M., Nikbakhat-Brojeni, G., Ghasemi, M., Skall, H.F., 2010. Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis/lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2(4), 198.

Holmes, D.S., Quigley, M., 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114(1), 193-197.

Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Fryer, J.L., 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41(3), 406-409.

Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5), 3183-3187.

Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3), 583-590.

Plumed-Ferrer, C., Barberio, A., Franklin-Guild, R., Werner, B., McDonough, P., Bennett, J., Gioia, G., Rota, N., Welcome, F., Nydam, D.V., Moroni, P., 2015. Antimicrobial susceptibilities and random amplified polymorphic DNA-PCR fingerprint characterization of *Lactococcus lactis* ssp. lactis and *Lactococcus garvieae* isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science* 98(9), 6216-6225.

Ravelo, C., Magarinos, B., López-Romalde, S., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2003. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 41(2): 751-756.

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* 11(4), 342-350.

Soltani, M., Nikbakht, G., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., 2008. Epizootic outbreaks of lactococcusis caused by *lactococcus garveae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *European Association of Fish Pathologists* 28(5), 207-212.

Taherimirghaed, A., Soltani, M., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Mohammadian, S., 2013. Genetic diversity of isolated *Lactococcus garvieae* from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) mortality in Iran. *Journal of Veterinary Research* 68(2), 127-133. (In Persian)

Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, A., Riaza, A., Nunenz, S., Barja, J.L., 1994. Streptococcosis in cultured turbot caused by an entrococcus-like bacterium. *European Association of Fish Pathologists* 14(1), 19-23.

Ture, M., Altinok, I., 2016. Detection of putative virulence genes of *Lactococcus garvieae*. *Diseases of Aquatic Organisms* 119(1), 59-66.

Vela, A.I., Vázquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liébana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks and Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10), 3791-3795.

Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 29(4), 177-198.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Raflaski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22), 6531-6535.

Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittimo, C., Bercovier, H., 1998. Identification of Lactococcus garvieae by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 36(4), 983-985.