

شناسایی مولکولی و پاتولوژیک *Lactococcus garvieae*

جداسازی شده از قزل آلاهی رنگین کمان

(*Oncorhynchus mykiss*) پرورشی ایلام

- ❖ **سعیده حیدری نژاد***: 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 دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام، ایران
- ❖ **احمد سواری**: استاد گروه زیست دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
- ❖ **بیبا ارچنگی**: استادیار گروه زیست دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران

چکیده

در مطالعه حاضر ۶۰ قطعه ماهی با علائم کلینیکی نظیر بی‌حالی، شنای نامنظم و اکزوفتالمی 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 درجه 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، آنوریسیم در مویرگ‌های لاملا، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال و افزایش لکوسیت‌ها در آبشش، ضخیم‌شدگی غشای پایه گلوامرولی، نکروز سلول‌های توبولی، افزایش مراکز ملانوماکروفاز، 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، *Streptococcus iniae*، *Lactococcus garvieae*.

۱. مقدمه

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 پایه 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 شبلات و دامپزشکی استان ایلام مکرراً، عفونت موسوم به استرپتوکوکوزیس با علائم ظاهری تیرگی پوست، تورم ناحیه شکم، کم‌حرکی و آگروفتالمی 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 ایجادشده باکتری بیماری‌زا در بافت‌های کلیه و آبشش قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

امروزه بیمای‌های عفونی عامل اصلی محدودیت توسعه و رشد صنعت آبی‌پروری 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 درجه سانتی‌گراد می‌رسد. شیوع بیماری در قزل‌آلای رنگین‌کمان در مناطق متعددی از جمله استرالیا، جنوب آفریقا، 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 ایجادکننده بیماری زئونوز (مشترک بین انسان و دام) به حساب آورد (Elliot and Facklam, 1996).

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه برداری

در تحقیق حاضر، ۶۰ قطعه ماهی (میانگین وزنی $23 \pm 141/47$ گرم و میانگین طول کل $63 \pm 20/07$ سانتی‌متر) به طور تصادفی از میان ماهیانی با نشانه‌های بالینی بیماری (اگزوفتالمی، هموراژی در باله، اتساع شکم و ...) و نیز ۱۰ قطعه قزل‌آلای رنگین کمان فاقد علائم کلینیکی بیماری به منزله شاهد (دارای میانگین وزن و طول مشابه ماهیان بیمار)، از ۵ مزرعه پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان واقع در اطراف ایلام در بهمن ۱۳۸۸، جمع‌آوری شدند.

۲.۲. جداسازی و شناسایی اولیه 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^۱ (TSB) منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از رشد باکتری‌ها، نمونه‌ای از محیط کشت مایع با آنس^۲ استریل برداشته و روی محیط کشت آگار خوندار (حاوی ۵ درصد خون گوسفند) کشت و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شد (Vendrell *et al.*, 2007). کشت مجدد در محیط کشت آگار خوندار تا به دست آوردن کلنی‌های خالص باکتری ادامه یافت؛ سپس، رنگ‌آمیزی گرم و تعدادی از آزمایش‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، اکسیداز و آسکولین انجام گرفت.

۳. ۲. استخراج DNA و انجام دادن PCR

برای شناسایی قطعی باکتری مولد بیماری از روش مولکولی multiplex PCR استفاده شد. برای انجام دادن PCR نخست DNA باکتری استخراج شد. استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن^۳ انجام شد (Afghani and Stutman, 1996). در کنار شعله، ۱۲۰-۱۰۰ میکرولیتر از محلول بافر تریس EDTA^۴ 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 درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه میکروتیوب‌ها با دور 13000 rcf 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 Cyler (Eppendorf) قرار داده شدند و آزمایش PCR طبق روش زیر صورت گرفت:

الف) دناتوره کردن اولیه^۵ در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه؛

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

1. Tryptone soy broth
2. Loop

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در multiplex PCR

Primer pairs	Sequence (5' to 3')	Target gene	PCR amplicon(pb)	Pathogen	Reference
pIG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16SrRNA	۱۱۰۰	<i>L. garvieae</i>	Zoltkin <i>et al.</i> (1998)
pIG-2	GCACCCTCGCGGGTTG				
Lox-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	lctO	۸۷۰	<i>S. iniae</i>	Mata <i>et al.</i> (2004)
Lox-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA				
STRD-DYI	TGGAACACGTTAGGGTTCG	16S-23SrRNA	۲۵۹	<i>S. dysgalactia</i> subsp	Hassan <i>et al.</i> (2003)
Dys-16S-23S-2	CTTAAGTAGAAAACTCTTGAT TATTC			<i>dysgalactiae</i>	

به ابعاد ۰/۵ cm 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^۵ 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^۶ به گزیلول (Merck-آلمان) سپس، برای پارافینه‌شدن^۷ در داخل پارافین مذاب (Merck-آلمان) در دمای ۵۸-۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تمامی این مراحل با دستگاه هیستوکینت تحت برنامه زمان‌بندی شده انجام شد. پس از قالب‌گیری نمونه‌ها در پارافین با استفاده از دستگاه روتاری میکروتوم^۸ مدل LECA RM2245، برش‌هایی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر از نمونه بافتی تهیه شد سپس، مقاطع حاصل در حمام آب گرم با دمای حدود ۵۰ درجه

ب) دناتور کردن نهایی (ثانویه)^۱ شامل ۳۰ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، هر یک به مدت ۱ دقیقه؛ ج) اتصال (آنیلینگ)^۲ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه؛ د) امتداد^۳ در دمای ۷۲ درجه 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 مرحله آخر با استفاده از دستگاه ژل داکت^۴ مدل BioDoc-JT از ژل حاصل عکس‌برداری شد.

۲. ۴. مطالعات هیستوپاتولوژیک

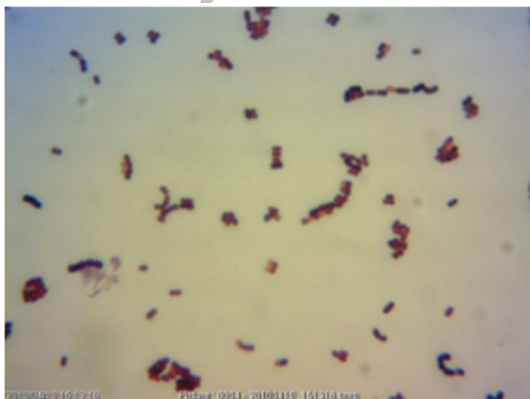
پس از نمونه‌برداری از ماهیان برای مطالعات باکتریولوژیک، برای مطالعه هیستوپاتولوژی، قطعاتی

5. Tissue processor
6. Clearance
7. Paraffin embedding
8. Microtome

1. Secondary Denaturation
2. Annealing
3. Extension
4. Gel document

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

از میان ۱۸۰ ایزوله جدا شده از کبد، کلیه و طحال ماهیان بیمار، پس از چندین بار تجدید کشت، ۱۴۱ ایزوله خالص باکتری با کلنی‌های تک رشد یافتند؛ سپس، نمونه‌های باکتری از هر یک از کلنی‌های خالص رنگ‌آمیزی گرم شدند که از میان ۱۴۱ ایزوله خالص، ۱۱۵ ایزوله (۸۲ درصد) گرم مثبت و ۲۶ ایزوله (۱۸ درصد) گرم منفی تشخیص داده شدند. همه ۱۱۵ ایزوله گرم مثبت کوکسی شکل 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 ایزوله گرم مثبت انجام شد و از میان ۱۱۵ ایزوله گرم مثبت کوکسی شکل، 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، اوره منفی، فنول رد مثبت، سیمون سیترات منفی، VP مثبت، TSI منفی، نیترات منفی، OF مثبت، H₂S منفی، اسکولین مثبت و غیر متحرک بود. تمامی این ایزوله‌ها برای تشخیص قطعی آزمایش PCR شدند.



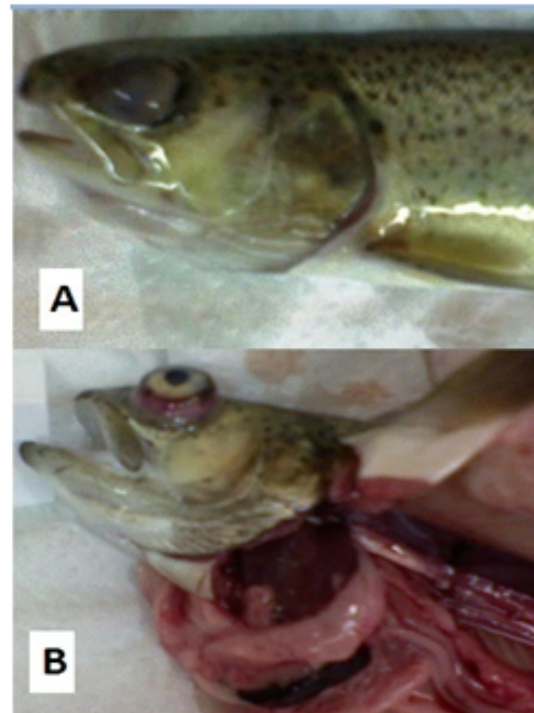
شکل ۲. کوکسی گرم مثبت (رنگ‌آمیزی گرم، ۱۰۰×)

سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از رفع چین‌های موجود در مقطع با فروبردن لام‌های آغشته به چسب گلیسرین - آلبومین، مقاطع تهیه شده 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).

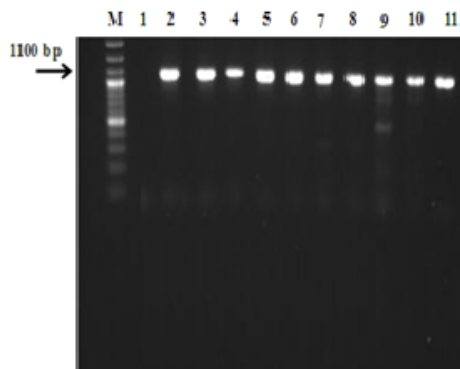
۳. نتایج

۱.۳. نتایج مطالعات بالینی

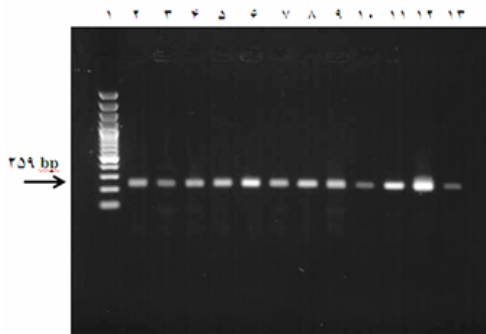
این تحقیق درباره ماهیان بیماری انجام شد که علائم بالینی بیماری نظیر اگزوفتالمی، کدر شدن قرنیه، تیره شدن رنگ پوست، خونریزی در باله‌ها، بزرگ شدن و رنگ‌پریدگی غیر طبیعی کبد، بزرگ شدن طحال، آسیت و خونریزی در حفره صفاقی در آنها کاملاً مشهود بود (شکل ۱ A و B).



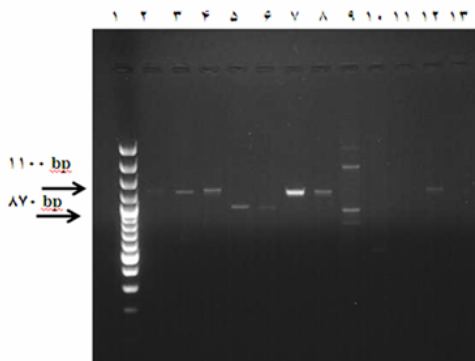
شکل ۱. A: کدر شدن قرنیه، B: اگزوفتالمی دو طرفه



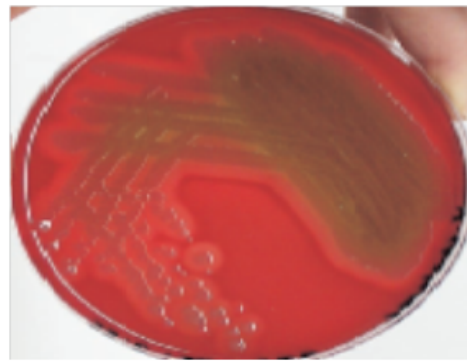
شکل ۴. A: الکتروفورز محصول حاصل از mPCR، DNA استخراج شده بکتری و پرایمرها. ستون ۱ از سمت چپ، DNA سایز مارکر به طول مضربی از ۱۰۰ bp، ستون ۲ کنترل منفی، ستون ۳ کنترل مثبت (لاکتوکوکوس گارویه (۱۷۰A) را نشان می‌دهد. تمامی ستون‌ها ایزوله‌هایی هستند که با پرایمرها تشکیل باند می‌دهند و در ۱۱۰۰ bp باند اختصاصی لاکتوکوکوس گارویه را تشکیل دادند.



شکل ۴. B: الکتروفورز محصول حاصل از mPCR. ستون ۱ از سمت چپ DNA سایز مارکر به طول مضربی از ۱۰۰ bp را نشان می‌دهد. در ستون ۲ تا ستون ۱۳ محصول PCR باندی در حدود ۲۵۹ bp تشکیل می‌دهد و به همین دلیل بکتری *Streptococcus dysgalactiae* است.



شکل ۴. C: الکتروفورز محصول حاصل از mPCR. ستون ۱ از سمت چپ، DNA سایز مارکر به طول مضربی از ۱۰۰ bp، ستون ۲ کنترل منفی (آب مقطر)، ستون ۳ کنترل مثبت (بکتری لاکتوکوکوس گارویه (۱۷۰A) را نشان می‌دهد، ستون ۴، ۷، ۸ و ۱۲ که محصول PCR باندی در حدود ۱۱۰۰ bp تشکیل می‌دهد، مربوط به بکتری *Lactococcus garvieae* و ستون ۵، ۶ و ۹ که محصول PCR باندی در حدود ۸۷۰ bp تشکیل می‌دهد، مربوط به بکتری *Streptococcus iniae* هستند.

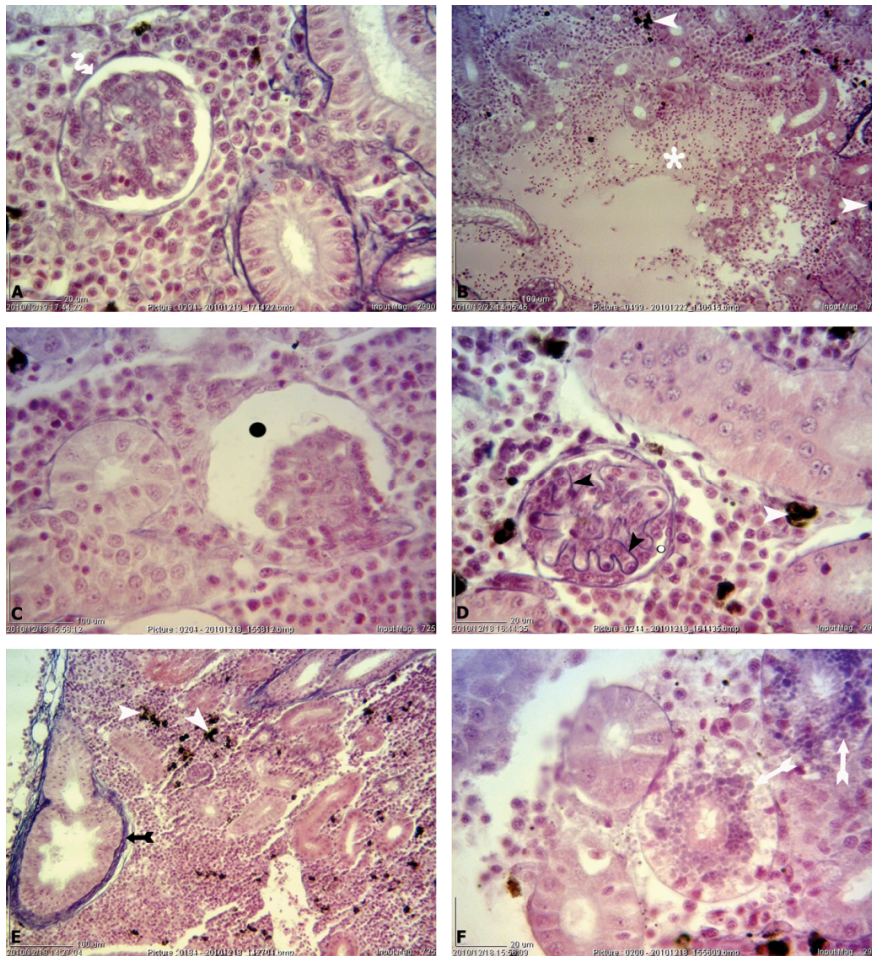


شکل ۳. بکتری گرم مثبت با توانایی ایجاد همولیز آلفا بر محیط کشت آگار خوندار

۳.۳. نتایج مولتی پلکس PCR

در مجموع از تعداد کل بکتری‌های خالص رشدیافته (۱۴۱ ایزوله) تعداد ۱۱۵ ایزوله گرم مثبت و بقیه گرم منفی بودند. در این آزمایش از ۱۱۵ نمونه DNA استخراج شده از ایزوله‌های باکتریایی و دو سویه جداشده از آبیان، یعنی *Lactococcus garvieae* (۱۷۰ A) و *Staphylococcus pasteurii* (۱۹۱ B) (اهدایی از دانشگاه تهران)، به منزله 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 ۱۱۰۰ bp تولید کردند و به طور قطعی *L. garvieae* تشخیص داده شدند. در این بین، ۴ بکتری که باندی به طول ۸۷۰ bp تولید کرده بودند *Streptococcus iniae* و ۱۶ بکتری با تولید باندی در حدود ۲۵۹ bp معرف بکتری گونه *Streptococcus dysgalactiae* بودند.

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



شکل ۵. تصویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی طبیعی (A) و تغییرات بافتی کلیه (B, C, D, E, F) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس؛ جسمک کلیوی (پیکان پیچیده سفید)، لوله پیچیده نزدیک (پیکان پیچیده خاکستری)، خونریزی (* سفید)، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی (رأس پیکان سفید)، اتساع فضای ادراری (دایره سیاه)، کاهش فضای ادراری (دایره سفید)، افزایش ضخامت GBM (رأس پیکان سیاه)، فیبروز پلازی (پیکان دوشاخه سیاه)، قطرات هیالین (پیکان دوشاخه سفید): B, C, E و (H&E; ×۲۲۵) D, E و (H&E; ×۲۹۰۰) F.

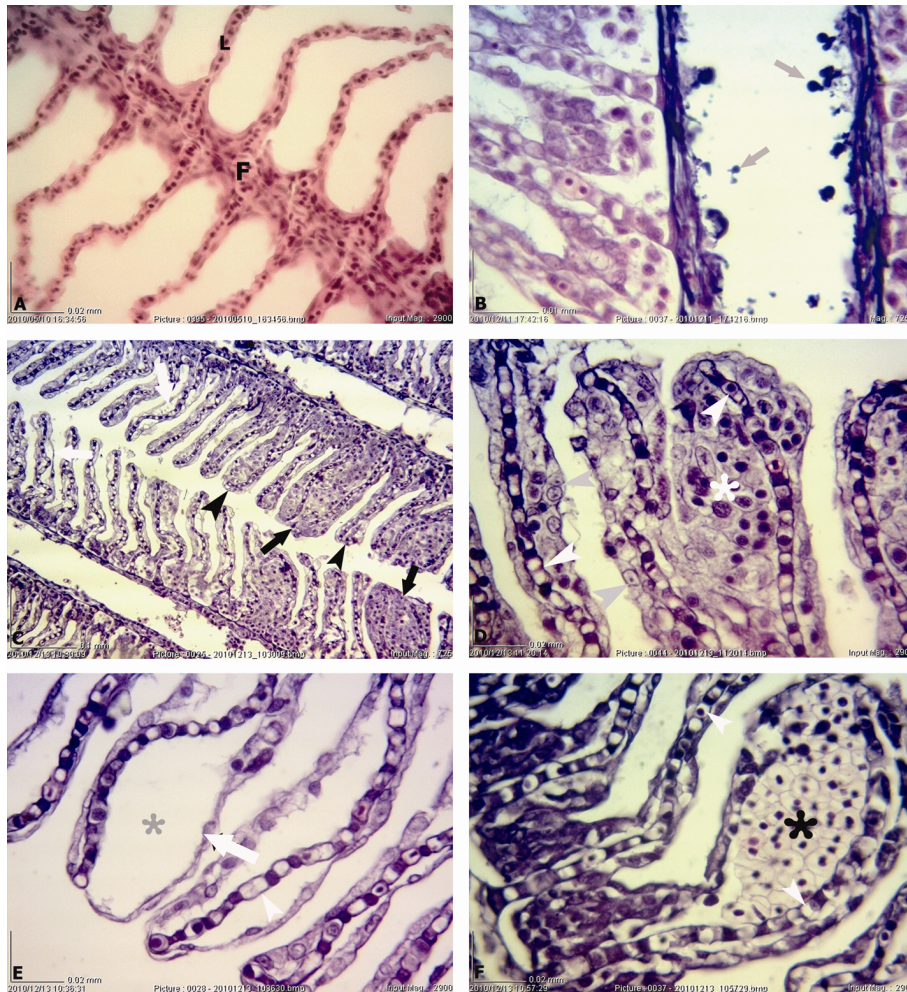
ملانوماکروفاژی^۳، ایجاد قطرات هیالین^۴ در سلول‌های اپیتلیوم لوله‌ای، فیبروپلازی لوله‌ای^۵ و عروقی و خونریزی اشاره کرد (شکل ۵). در نمونه‌های آبشش ماهیان مبتلا به لاکتوکوکوزیس ضایعات بافتی شدیدی مشاهده شد که برآمدگی (بلندشدن) اپیتلیوم^۶ تیغه آبششی و ایجاد فضای

۴.۳. نتایج مطالعات هیستوپاتولوژی

تغییرات بافتی درخور توجهی در کلیه ماهیان بیمار مشاهده شد که از جمله این ضایعات می‌توان به کاهش یا انسداد و در برخی موارد افزایش درخور توجه فضای ادراری جسمک‌های کلیوی، افزایش ضخامت غشای پایه گلومرولی (GBM)^۱، اتساع مویرگ^۲ گلومرولی جسمک‌های کلیوی، افزایش مراکز

3. Melanomacrophage centers
4. Hyaline droplets
5. Tubular fibrosis
6. Epithelial lifting

1. Glomerular basement membrane
2. Capillary dilation



شکل ۶. تصویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی طبیعی (A) و تغییرات بافتی آبنشش (B, C, D, E, F) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به لاکتوکوزیس؛ کلنی‌های باکتری‌های گرم مثبت درون عروق رشته آبنششی (پیکان خاکستری)، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم تیغه‌ای و اتصال تیغه‌های آبنششی (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, B و C و D (H&E;×۲۹۰۰)

افزایش تعداد سلول‌ها) سلول‌های اپیتلیومی، به هم چسبیدن (اتصال) تیغه‌ها، اتساع مویرگ‌های تیغه‌ای، خونریزی و وجود کلنی‌های باکتری گرم مثبت درون عروق خونی آبنششی از جمله ضایعات مشهود در نمونه‌های آبنششی این ماهیان بود (شکل ۶).

ادماتوز، آنوریسم^۲ (اتساع موضعی دیواره عروق خونی بزرگ یا چند رگ خونی کوچک)، چماقی‌شدن^۳ انتهای تیغه‌های آبنششی به دلیل هیپرتروفی^۴ (افزایش حجم سلول) و هیپرپلازی^۵

6. Lamellar fusion
7. Capillary dilation

1. Oedematus
2. Aneurysm
3. Club shaping
4. Epithelial hypertrophy
5. Epithelial hyperplasia

۴. بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های ماهیان، به ویژه عفونت‌های باکتریایی، نه تنها سبب بروز خسارات فراوان به صنعت آبی‌پروری 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 (آگزوفتالمی یک‌طرفه یا دوطرفه، خونریزی در چشم، خونریزی در باله‌ها، تورم شکم، تیره‌شدن رنگ پوست، شنای نامنظم و ...)، با نشانه‌های بالینی گزارش‌شده 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 گزارش‌شده محققان درباره 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 به‌منزله روش تشخیص قطعی بیماری استفاده کرد (Eldar and Ghittino, 1999).

در مطالعه حاضر نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده از ماهیان بیمار با نتایج گزارش‌شده محققان دیگر (Austin and Austin, 2007; Soltani et al., 2008; Sharifiyazdi et al., 2010) هماهنگی دارد. تمایز بین باکتری‌های *S. iniae* و *S. dysgalactiae* 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 به‌منزله 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., (2003) روش m-PCR را برای شناسایی *Yersinia Aeromonassalmonicida rockeri* و *Flavobacterium psychrophilum* 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 و *lct* rRNA و 16S-23SrRNA، باندهای ویژه‌ای در ۱۱۰۰ bp، ۸۷۰ bp 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* و مطابقت داشت که همگی از single PCR برای

ماهیان بیمار ۸۴ ایزوله در محدوده ۱۱۰۰ bp تشکیل باند دادند که پیش از این، نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی همه این ایزوله‌ها به *L. garvieae* شبیه بود. این نتایج مؤید این مطلب است که عامل اصلی ایجادکننده 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 مشاهده شده 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 پتشی‌هایی در سطح اندام‌های داخلی می‌انجامد. به‌همین علت، لاکتوکوکوزیس اساساً سپتی‌سمی هموراژیک قلمداد می‌شود (Avcı et al., 2010). Michel et al. (1996) طی مطالعه بیماری لاکتوکوکوزیس در قزل‌آلای رنگین‌کمان، آسیب‌های بافتی نظیر تغییرات عروق خونی مانند ادم، خونریزی و آنوریزم را در آبشش ماهیان بیمار گزارش کردند که تغییرات خونی گزارش شده در آبشش ماهیان بیمار در تحقیق حاضر با نتایج گزارش شده 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

شناسایی باکتری‌های ذکر شده 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 محدوده تشکیل باند برای سه باکتری را به ترتیب ۱۱۰۰ bp، ۸۷۰ bp و ۲۵۹ bp ذکر کردند. فدایی فرد 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 به منزله مولکول هدف استفاده می‌شود (Blanco et al., 2002). عملکرد این ژن دائم و همیشگی است و دارای ساختمانی موزائیکی از توالی‌های حفظ شده و تغییر یافته در همه موجودات است. بخش حفاظت شده آن طی تکامل به ندرت 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 PLG₁ و PLG₂ مربوط به ژن 16sr RNA، باکتری جدا شده از قزل‌آلای بیمار جمع‌آوری شده از مزارع پرورشی قزل‌آلا از آسیا، اروپا و استرالیا را *L. garvieae* شناسایی کردند و گزارش دادند که باندهای باکتری تشکیل داد در محدوده ۱۱۰۰ bp 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 جدا شده از

کلیه شامل قطرات هیالین و افزایش مراکز ملانو ماکروفاژ، وجود کلنی‌های باکتری در عروق خونی و نیز خونریزی در اندام‌های مختلف مانند کلیه و آبشش را طی مطالعه درباره 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 می‌تواند در ابتدا به منزله 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، می‌تواند 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 به منزله 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 به *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.

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 دوره 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 فاصله 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

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 rainbow trout (*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 Microbiological 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., Gorla, 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., Horovitz, A., Bercovier, H., 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 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 bacterium of 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 iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the united 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 SM2 induce 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 inactivated 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.