

مطالعه تنوع ژنتیکی استرپتوکوکوس اینیایی عامل استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای رنگین کمان برخی از استان‌های ایران

مهدی سلطانی^{۱*}، اسماعیل پیرعلی خیرآبادی^۱، حسینعلی ابراهیم زاده موسوی^۱، سعید میرزرگر^۱، سمیرا محمدیان^۱، پرویز شایان^۲

(۱) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(۲) گروه انگل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۰ بهمن ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۵ فروردین ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی یکی از بیماریهای مهم صنعت آبزی پروری در مناطق مختلف جهان از جمله ایران می‌باشد. **هدف:** در این مطالعه تنوع ژنتیکی ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی بدست آمده از مزارع قزل آلای تعدادی از استان‌های کشور مورد توجه قرار گرفته است. **روش کار:** پس از نمونه گیری، کشت باکتریایی و جداسازی کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی از یکصد مزرعه واقع در ۸ استان کشور، ایزوله‌های گونه اینیایی به روش PCR تأیید و سپس تنوع ژنتیکی آنها به روش RFLP مطالعه شد. **نتایج:** نتایج حاصله از کشت موجب جداسازی ۷۷ ایزوله کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی شد که در مطالعات PCR تنها ۲۷ ایزوله آنها متعلق به گونه اینیایی بود. نتایج RFLP با استفاده از ۹ آنزیم هضمی موجب شناسایی ۲۹ قطعه (باند) با وزن‌های مولکولی متفاوت (۶۲۵-۹۴۰) شد. مطالعه رابطه فیلوژنی این ایزوله‌ها، آنها را در دو خوشه قرار داد بطوریکه ۲۶ ایزوله در یک خوشه و یک ایزوله در خوشه دیگر قرار داشت. بجز یک ایزوله از استان مازندران، سایر ایزوله‌های استان‌های تهران، گیلان، مازندران، چهارمحال و بختیاری، لرستان و فارس از شباهت بسیار بالایی (بیش از ۹۹٪) برخوردار بودند. **نتیجه گیری نهایی:** ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی عامل استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای ایران از تنوع ژنتیکی اندکی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، قزل آلای رنگین کمان، RFLP، استرپتوکوکوس اینیایی، استرپتوکوکوزیس

مقدمه

باکتری در دو منطقه بود (۶). بعلاوه ایزوله اولیه استرپتوکوکوس اینیایی (ATCC۲۹۱۷۸T) بدست آمده از دولفین از سایر ایزوله‌های مورد مطالعه متفاوت بود. همچنین در مطالعه Dodson و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی بدست آمده از موارد مرضی دولفین و انسان به روش‌های بیوشیمیایی، RAPD و واکنش REP-PCR متوجه شدند که از نظر بیوشیمیایی بین ایزوله‌های ماهیان با ایزوله‌های انسانی تفاوت وجود دارد اما با استفاده از روشهای مولکولی مذکور قادر به شناسایی تفاوت ژنتیکی بین این ایزوله‌ها نشدند (۳). بعلاوه در مطالعه Colomni و Kvitt در سال ۲۰۰۴ (۷) تعداد ۲۶ ایزوله از این باکتری بدست آمده از ماهیان مرضی آبهای شیرین، لب شور و شور در سرزمین‌های فلسطین اشغالی را با تعداد ۹ ایزوله باکتری بدست آمده از سایر مناطق نظیر آمریکا، کانادا، استرالیا و ژاپن با روش‌های RAPD و AFLP مقایسه و متوجه شدند که این ایزوله‌ها در دو گروه ژنتیکی قابل تفکیک هستند و نامبردگان همچنین متوجه شدند که با استفاده از روش APLP در مقایسه با روش RAPD، بهتر می‌توان نسبت به تفکیک ژنتیکی و شناسایی ایزوله‌های متفاوت اقدام نمود. از آنجائیکه بیماری مذکور یکی از مهمترین بیماریهای باکتریایی شناخته شده در صنعت قزل آلای کشور میباشد و از طرفی طی سال‌های اخیر واکسن ضد این بیماری در داخل کشور تولید گردیده است، ضروری است تا با مطالعات تنوع ژنتیکی ایزوله‌های درگیر در بروز بیماری نسبت به ارتقاء کارایی واکسن تولیدی اقدام نمود. این موضوع بویژه از این نظر مهم

استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی یکی از بیماریهای مهم صنعت آبزی پروری محسوب می‌شود بطوریکه برآورد خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری طی سال‌های اخیر موجب گردیده تا به عنوان یکی از بیماریهای باکتریایی خطرناک در ماهیان مطرح شود (۱،۲،۳). این بیماری موجب بروز تلفات قابل توجه در بسیاری از گونه‌های با ارزش پرورشی نظیر قزل آلا، تیلاپیا، باس دریایی و کفشک ماهیان در هردو آبهای شور و شیرین می‌شود و برخی عوامل محیطی نظیر افزایش درجه حرارت آب، افزایش تراکم و کاهش اکسیژن بر شدت تلفات و خسارات وارده اثرات قابل توجهی دارد (۱،۳،۴). از زمان اولین گزارش‌های رسمی بیماری در مزارع قزل آلای کشور، این بیماری تاکنون موجب خسارات قابل توجهی به صنعت شده است طوری که برآورد خسارات حاصله به ده‌ها میلیارد تومان در سال می‌رسد (۵). بررسی منابع و مطالعات انجام شده بیانگر وجود ایزوله‌ها نژادهای متفاوت از این باکتری عامل بیماری، در گونه‌های ماهیان و نیز بین ایزوله‌های بدست آمده از ماهیان و موارد جدا شده از انسان‌ها در سایر کشورها می‌باشد (۲،۶،۷) در مطالعه Eldar و همکاران در سال ۱۹۹۷ ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی بدست آمده از قزل آلا و تیلاپیا در سرزمین‌های فلسطین اشغالی را با ایزوله‌های بدست آمده از مزارع ماهیان در آمریکا به روش RFLP مقایسه و نتایج حاکی از تفاوت ایزوله‌های این



۳ دقیقه در 94°C و سپس ۳۵ دور شامل واسرشته سازی (هر دور به مدت ۱ دقیقه در 94°C)، اتصال (هر دور به مدت ۱ دقیقه در 45°C) و بسط (هر دور به مدت ۱/۵ دقیقه در 72°C) و بسط نهایی (یک دور به مدت ۱۰ دقیقه در 72°C) انجام گرفت.

از محصول PCR با استفاده از مارکر 50bp و الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد پس از رنگ آمیزی، با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل ترانس ایلومیناتور Bio-Rad، XR - plus (USA) عکسبرداری شد. بعلاوه از ایزوله‌های استرپتو کوکوس اینیایی به عنوان استاندارد (مثبت) (Accession No AF048773)، و لاکتوکوکوس گاروبه (Accession No: X54262) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

۳- آزمایش RFLP: برای تکثیر قطعه $16S\text{ rDNA}$ از یک جفت پرایمر نشان داده شده در جدول ۱ و با استفاده از توالی ژن مورد مطالعه استرپتو کوکوس اینیایی در بانک ژن و با استفاده از نرم افزار BioEdit طراحی و استفاده شد. برنامه PCR در این مرحله مشابه روش ذکر شده در PCR برای شناسایی ایزوله‌های استرپتو کوکوس اینیایی بود با این تفاوت که دمای اتصال پرایمر در این مرحله 60°C بود.

۴- هضم آنزیمی محصول PCR: به منظور هضم آنزیمی محصول PCR از تعداد ۹ آنزیم شامل $HinfI$ ، $HinIII$ ، $RsaI$ ، $AluI$ ، $EcoRI$ ، $MspI$ و $TaqI$ ، $BsuRI$ ، $MboI$ و تولید قطعاتی می‌باشند. بنابراین برای هضم محصول PCR یک از آنزیم‌های برش دهنده محدود الاثر مذکور به میزان $2\mu\text{l}$ تهیه شده در $2\mu\text{l}$ بافر مربوطه و $18\mu\text{l}$ آب مقطر (جدول ۳) به $10\mu\text{l}$ محصول PCR اضافه گردید که این روش هضم آنزیمی بر اساس دستورالعمل شرکت تولید کننده آنزیم مربوطه انجام شد. مخلوط مذکور ابتدا در درجه حرارت مناسب (جدول ۴) به مدت ۱۲ ساعت در بن ماری نگهداری و پس از آن میزان $7\mu\text{l}$ از محصول هضم آنزیمی حاصله به همراه $1\mu\text{l}$ رنگ Novel Juice (GeneDirex, USA) به چاهک‌های ژل آگارز ۲٪ تزریق و پس از الکتروفورز باند حاصله با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل ترانس ایلومیناتور Bio-Rad، XR - plus (USA) عکسبرداری شد. همچنین مارکر 50bp نیز به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

۵- رسم درخت فیلوژنی: برای درک روابط تکاملی ایزوله‌های مورد مطالعه از درخت فیلوژنیک استفاده شد. این درخت مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهد. درخت فیلوژنی از روش جفت گروهی غیر وزنی از طریق میانگین حسابی (UFGMA) با کمک نرم افزار Mega ۴ ترسیم گردید. در این روش کمترین فاصله ژنتیکی را یک خوشه تشکیل می‌دهد و سپس فاصله سایر واحدها از این خوشه به صورت میانگین بدست می‌آید و واحدی که کمترین فاصله را از خوشه حاصله دارد همراه با خوشه قبلی خوشه بندی می‌گردد.

می‌باشد که طی سال‌های اخیر صدها میلیون تخم چشم زده قزل آلا از کشورهای مختلف اروپایی، آمریکا، استرالیا و کانادا وارد کشور گردیده است و لذا احتمال انتقال برخی ایزوله‌های این باکتری همراه این محموله وجود دارد. بنا بر این هدف از این تحقیق، مطالعه احتمال تنوع ژنتیکی ایزوله‌های درگیر در مزارع قزل آلا می‌باشد که در آن با نمونه گیری از ماهیان مرضی در استان‌های مختلف و شناسایی باکتری به روش PCR و سپس مطالعه ایزوله‌های شناسایی شده با روش RFLP به عنوان یکی از روش‌های حساس برای بررسی تنوع ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است.

مواد و روش کار

۱- کشت و جمع آوری ایزوله‌های باکتری و استخراج DNA: برای انجام این مطالعه طی ایام بهار و تابستان ۱۳۸۹ و نیز بهار و تابستان ۱۳۹۰ با مراجعه به مزارع قزل آلا رنگین کمان واقع در استان‌های گیلان، مازندران، چهارمحال و بختیاری، لرستان، تهران، فارس و کهگیلویه و بویراحمد ضمن بازرسی مزرعه‌ای نسبت به اخذ نمونه‌های مرضی از ماهیان دارای علائم بالینی بیماری (اگزوفتالمی، تیره شدن پوست، بی اشتها، آسیت، کاتاراکت) اقدام گردید. نمونه‌های ماهیان در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و از بافت کلیه آنها در شرایط استریل روی ژلوز خون در 30°C کشت داده شد. سپس با انجام رنگ آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز نسبت به انتخاب ایزوله‌های کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی برای مطالعات بعدی اقدام گردید. در این مطالعه از تعداد ۱۰۰ مزرعه قزل آلا نمونه‌گیری شد و از هر مزرعه تعداد ۱۰-۸ نمونه ماهی مریض نمونه‌گیری بعمل آمد. اضافه می‌نماید که برخی ایزوله‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه طی سال‌های قبل از ۱۳۸۹ اخذ و از ایزوله‌های لیوفیلیزه آنها استفاده شد. برای استخراج DNA از ایزوله‌های باکتریایی کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی رشد یافته از کیت Biospin Bacteria Genomic DNA Extraction Kit (شرکت سازنده Bioflux ژاپن) استفاده شد. پس از استخراج DNA از ایزوله‌های باکتریایی نسبت به مطالعه کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ اقدام شد.

۲- آزمایش PCR برای شناسایی ایزوله‌های استرپتو کوکوس اینیایی: برای شناسایی ایزوله‌های استرپتو کوکوس اینیایی از روش توصیه شده توسط Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۵ استفاده شد (۴). برای این کار از یک جفت پرایمر نشان داده شده در جدول ۱ استفاده گردید. مقادیر مورد استفاده برای انجام واکنش PCR شامل $2/5\mu\text{l}$ بافر $PCR\ X10$ ، (Fermentas لیتوانی) $1/5\text{ U}$ آنزیم تک پلیمراز LA Taq، هریک از پرایمرها به میزان 30 pmol ، مخلوط $dNTP$ ($0/4\text{ mM}$) به میزان $5\mu\text{l}$ و از هریک نمونه‌های DNA به میزان 100 ng و رساندن حجم نهایی به $25\mu\text{l}$ توسط آب مقطر استفاده شد. برنامه ترموسایکلر با استفاده از دستگاه (Bio-Rad USA) به ترتیب شامل واسرشته سازی اولیه (یک دور به مدت



جدول ۱. جایگاه، توالی، دمای اتصال پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی سویه‌های استرپتوکوکوس اینیایی با استفاده از ناحیه ژن rRNA ۱۶S و نیز برای تکثیر قطعه ۱۶S rDNA.

جایگاه	توالی پرایمر (۵'---۳')	دمای اتصال (°C)	اندازه باندی (bp)	رفرنس
F	GTCGTAACAAGGTAAGCCGTATCG	۴۵	۵۱۳	Soltani et al., ۲۰۰۵
R	CTTACCTTAGCCCCAGTCTAACGAC			
RF۱	TTCACCATTTGTTCCATCGGCACTTAAGCG	۶۰	۱۱۱۵ طول قطعه تکثیر شده	
RF۲	GCAAGCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCA			

جدول ۳. مشخصات مزارع قزل‌آلای مبتلا به استرپتوکوکوس اینیایی.

کد نمونه	نام مزرعه	منطقه	استان
LG۶، LG۵	لنگرود	لنگرود	گیلان
۱۹۶B، ۱۹۶A	جاده دوهزار	تنکلین	مازندران
۲۰۱C، ۲۰۱B، ۲۰۱A	هراز	هراز	مازندران
۱۹۴A	جاده دوهزار	تنکلین	مازندران
SH۳	یزدی	تنکلین	مازندران
۱۹۹B	واحدی	هراز	مازندران
۱۹۱B	جاده دوهزار	تنکلین	مازندران
L۱۰	علی زاده	دو آب	لرستان
L۱۲	بهمن مرادی	آبشارنوژیان	لرستان
L۱۶A	دولت‌شاهی	رباط	لرستان
L۱۷B	طرحانی	رباط	لرستان
F۵C	تعاونی شیرزاد جعفری	دزدکرد اقلید	فارس
F۸	نی سایه	بیضاء	فارس
F۱۰B، D	سر آب بیضاء	بیضاء	فارس
۴-CH۱۸، ۳-CH۱۸، ۲-CH۱۸، ۱-CH۱۸	مهران بابائیان	سرخون اردل	چهارمحال و بختیاری
LH۶	حسینی	سندگون	چهارمحال و بختیاری
۱۸۳، ۱۷۹B، ۱۷۹A	جاجرود	تهران	تهران

جدول ۳. نتایج الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR قطعه rDNA RFLP ۱۶S با استفاده از آنزیمهای محدوداثر.

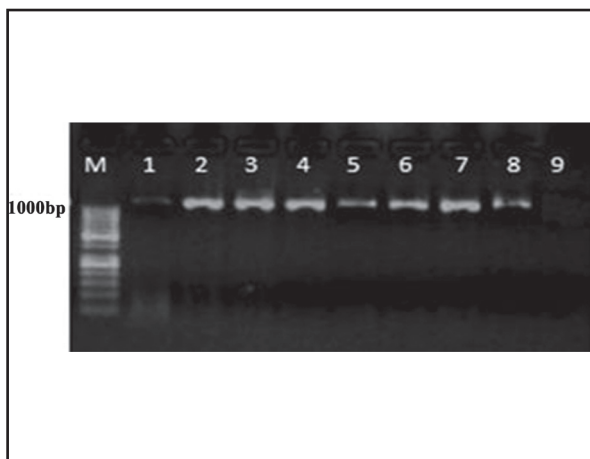
طول قطعه (bp)	آنزیم	بافر	دمای هضم (°C)	طول قطعات حاصل از هضم
۱۱۱۵	AluI	Tango	۳۷	۵۱۱، ۲۶۰، ۱۵۷، ۱۸۷
۱۱۱۵	EcoR۱	EcoR۱	۳۷	۷۳۵، ۳۸۰
۱۱۱۵	HinI	R	۳۷	۹۴۰، ۱۷۴
۱۱۱۵	HinII	G	۳۷	۴۶۴، ۲۹۱، ۱۹۳، ۱۶۷
۱۱۱۵	RsaI	Tango	۳۷	۶۲۰، ۳۴۵، ۱۵۰
۱۱۱۵	TaqI	TaqI	۶۵	۴۱۰، ۲۸۵، ۱۹۰، ۲۳۰
۱۱۱۵	BsuRI	R	۳۷	۵۰۰، ۴۵۵، ۹۸، ۶۲
۱۱۱۵	MboI	R	۳۷	۸۵۰، ۲۶۵
۱۱۱۵	MspI	Tango	۳۷	۴۹۰، ۳۰۰، ۱۹۰، ۱۳۵

نتایج

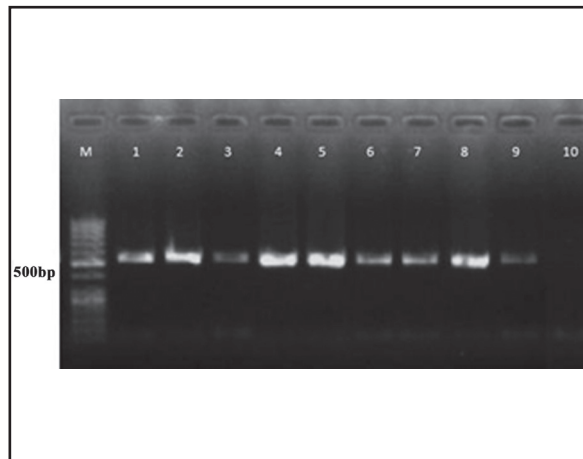
بطوریکه یک باند قوی و باریک روی ژل آگارز ۱٪ ایجاد شد، لذا با توجه به واضح بودن باندهای DNA روی ژل آگارز ۱٪ استفاده از کیت مربوطه دارای کیفیت مناسبی برای استفاده در این مطالعه تشخیص داده شد. نتایج حاصل از PCR ایزوله‌های مورد مطالعه ۷۷ ایزوله موجب شناسایی تنها ۲۷ ایزوله آنها به عنوان گونه اینیایی گردید (جدول ۳). بطوریکه الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۲٪ بیانگر قطعه ژن

۱- PCR برای شناسایی ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی: بطور کلی تعداد ۷۷ ایزوله کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی از ماهیان بیمار بدست آمد که همگی برای انجام آزمایش PCR به منظور شناسایی و تفکیک ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی مورد استفاده قرار گرفت. بررسی استخراج DNA نمونه‌های باکتریایی از کیفیت خوبی برخوردار بوده





تصویر ۲. ژل آگارز ۲٪ مربوط به PCR حاصل از قطعه M، ۱۶S rDNA RFLP = مارکر ۵۰۰ bp. ۱-۸ = ایزوله‌های مورد آزمایش، ۹ = کنترل منفی (لاکتو کوس گارویه (Accession No: X۵۴۲۶۲).



تصویر ۱. ژل آگارز ۲٪ مربوط به PCR حاصل از DNA برخی ایزوله‌های استرپتو کوس اینیایی بدست آمده در تحقیق، M = مارکر ۵۰۰ bp. ۱-۸ = ایزوله‌های مورد آزمایش، ۹ = کنترل مثبت (استرپتو کوس اینیایی: Accession No AF۰۴۸۷۷۳). ۱۰ = کنترل منفی (لاکتو کوس گارویه: Accession No: X۵۴۲۶۲).

حجم بالای جابجایی تخم چشم زده و بچه ماهیان در بین پرورش دهندگان قزل‌آلای کشور گسترش این بیماری در کشور در حال افزایش است زیرا مطالعات بعمل آمده تا سال ۲۰۰۵ بیانگر تنها ابتلا مزارع استان فارس بوده است (۴). مطالعه تنوع ژنتیکی این ایزوله‌ها با استفاده از روش RFLP و با استفاده از ۹ آنزیم هضمی مجموعاً تولید ۲۹ باند متفاوت نمود. مطالعه رابطه فیلوزنی این ایزوله‌ها آنها را در ۲ خوشه جداگانه قرارداد بطوری که یکی از ایزوله‌های این باکتری که از یکی از مزارع جاده هراز مازندران جداسازی شده بود روی یک خوشه جداگانه قرار گرفت. علت یا علل تفاوت ژنتیکی این ایزوله با سایر ایزوله‌های باکتریایی بدست آمده از مزارع جاده هراز نامعلوم است اما یکی از علل احتمالی واردات تخم چشم زده در این مزارع است و از آنجائی که مزارع جاده هراز نسبت به سایر مزارع قزل‌آلای کشور از امکانات و توانایی‌های بیشتری برای واردات تخم چشم زده برخوردارند (به علت نزدیکی به پایتخت و قیمت بالاتر محصول) لذا احتمال وارداتی بودن این ایزوله باکتری همراه تخم چشم زده از خارج از کشور وجود دارد. از آنجائیکه تنوع ایزوله‌ها می‌تواند روی کارایی واکسن‌های ساخت تولید اثر گذار باشد لذا اقدامات پیش گیری برای جلوگیری از ورود ایزوله‌های جدید به کشور از طرفی و استفاده از ایزوله‌های متفاوت (از نظر تنوع ژنتیکی) در ساخت واکسن قابل توصیه است. با توجه به شیوع بیماری در تعداد قابل توجهی از مزارع قزل‌آلای کشور انجام مطالعات بعدی برای شناسایی تنوع ژنتیکی در بین ایزوله‌های عامل بیماری در مزارع قزل‌آلای سایر استان‌های کشور ضروری است. سایر ۲۶ ایزوله باکتری همگی در یک خوشه مادر و در دو زیر خوشه قرار گرفتند بطوری که برخی از ایزوله‌های جداسازی شده از استان‌های مازندران، گیلان و چهارمحال و بختیاری در یک زیر خوشه قرار گرفته اند به هر حال این دو زیر خوشه از درصد شباهت بسیار بالایی (بیش از ۹۹٪) برخوردار بودند. در مطالعه Kvitt و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۷) با استفاده از روش AFLP روی تعداد ۳۵ ایزوله از باکتری مذکور که از ماهیان

تکثیر شده ۱۶S rRNA استرپتو کوس اینیایی با اندازه باندی ۵۱۳bp می‌باشد و هیچیک از نمونه‌های کنترل منفی تولید باند نمودند (تصویر ۱).

برخی مشخصات مزارع مبتلا در جدول ۲ آمده است.

۲-RFLP: الکتروفورز قطعه ۱۶S rDNA RFLP روی ژل آگارز ۲ درصد موجب ایجاد باند ۱۱۱۵ bp گردید در حالیکه نمونه کنترل منفی نیز هیچ باندى را نشان نداد (تصویر ۲).

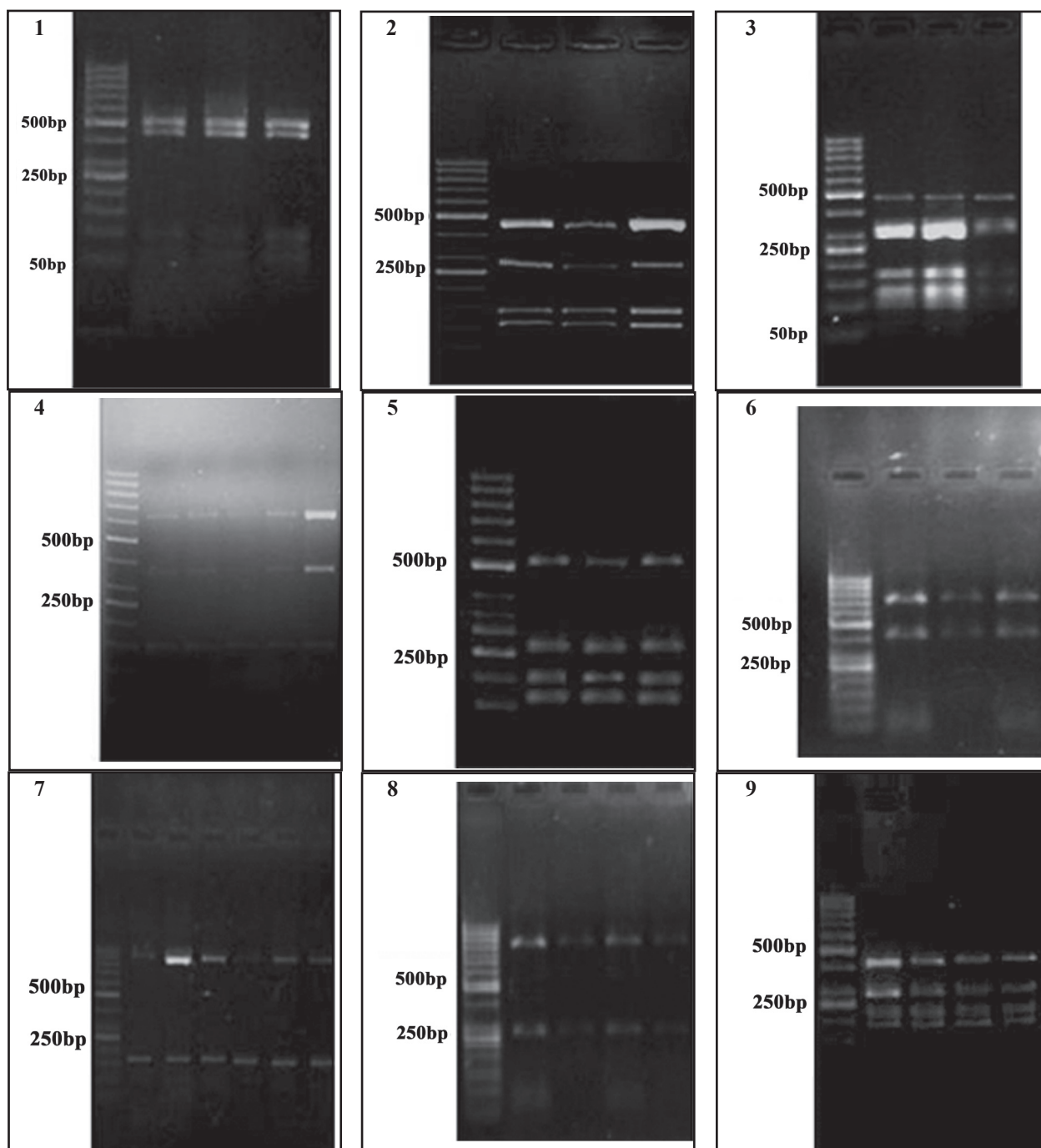
۳-نتایج هضم آنزیمی محصول PCR: نتایج حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR مربوط به قطعه ۱۶S rDNA RFLP در جدول ۳ و تصویر ۳ آمده است. بر اساس نتایج آمده در جدول ۳ آنزیم‌های AluI، HinVII، BsuRI و TaqI، MspI هر کدام موجب تولید ۴ قطعه با وزن‌های مولکولی مختلف گردید و آنزیم‌ها RsaI موجب ۳ قطعه و آنزیم‌های EcoRI، HinfI و MboII هر کدام موجب تولید ۲ قطعه با وزن‌های مولکولی متفاوت شدند. کوتاه‌ترین قطعه تولیدی برابر ۶۲bp و طولی‌ترین آن برابر ۹۴۰bp بود.

۴- رابطه فیلوزنی نمونه‌های استرپتوکوکوس اینیایی: نتایج حاصل از رسم درخت فیلوزنی با استفاده از نرم افزار UPGMA موجب قرار دادن این ایزوله‌ها در دو خوشه A و B گردید (تصویر ۴). خوشه A به دو زیر خوشه C و D قابل تقسیم بطوریکه که تقریباً تمامی نمونه‌ها در این زیر خوشه‌ها قابل گرفت، در خوشه B یک نمونه از مازندران با فاصله ژنتیکی ۰/۵٪ از سایر نمونه‌ها قرار گرفت.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که استرپتوکوکوس اینیایی عامل استرپتوکوکوزیس در برخی مزارع قزل‌آلای استان‌های لرستان، فارس، چهارمحال و بختیاری و مازندران پراکنده است بطوری که نتایج نمونه گیری و مطالعات PCR موجب جداسازی و شناسایی تعداد ۲۷ ایزوله این باکتری در مزارع قزل‌آلای استان‌های مذکور گردید. بنابراین با توجه به





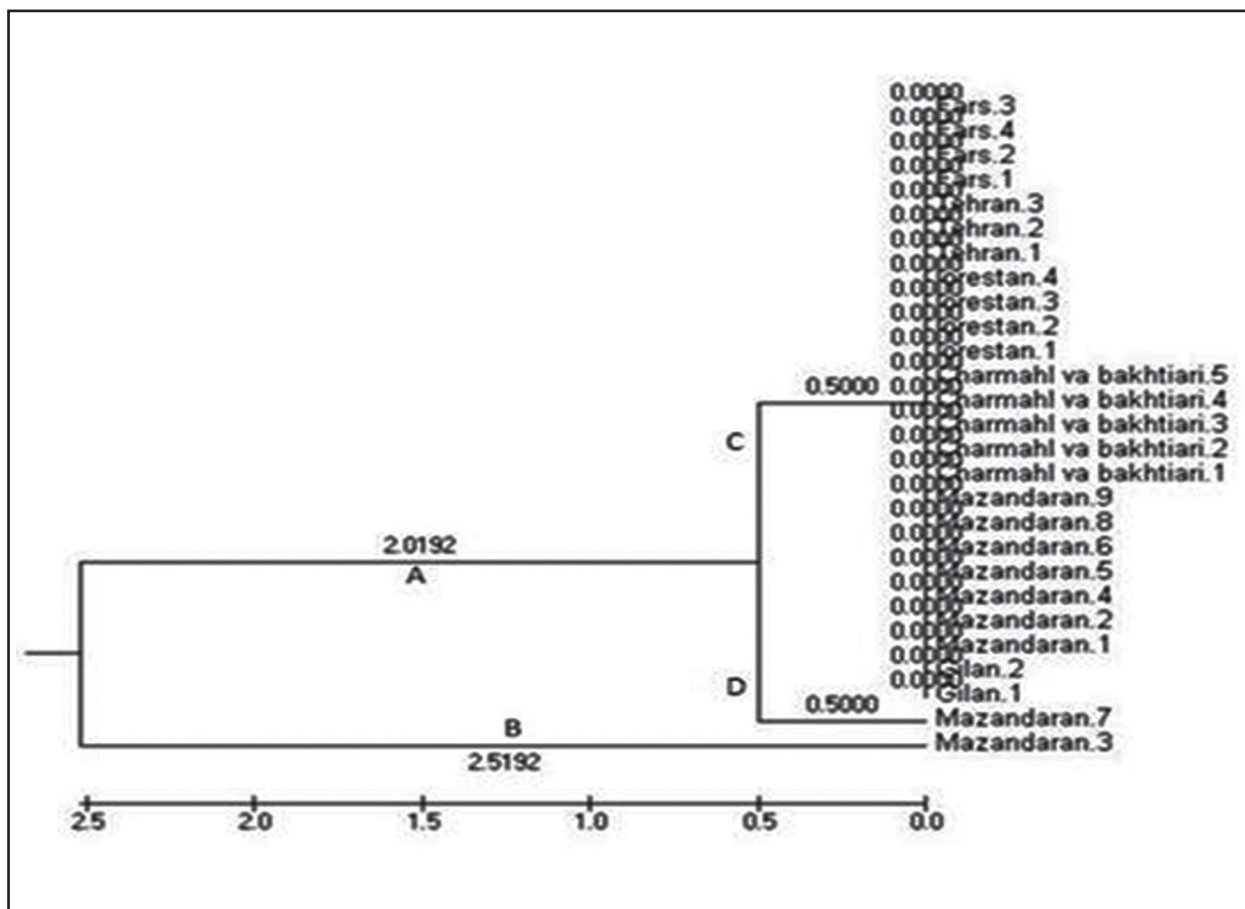
تصویر ۳. نتایج الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR مربوط به قطعه ۱۶S rDNA RFLP. تصویر ۳-۱. نتایج حاصل از هضم آنزیمی BsuRI. تصویر ۳-۲. نتایج حاصل از هضم آنزیمی HinII. تصویر ۳-۳. نتایج حاصل از هضم آنزیمی MspI. تصویر ۳-۴. نتایج حاصل از هضم آنزیمی RsaI. تصویر ۳-۵. نتایج حاصل از هضم آنزیمی AluI. تصویر ۳-۶. نتایج حاصل از هضم آنزیمی EcoRI. تصویر ۳-۷. نتایج حاصل از هضم آنزیمی HindIII. تصویر ۳-۸. نتایج حاصل از هضم آنزیمی MboI. تصویر ۳-۹. نتایج حاصل از هضم آنزیمی TaqI.

یک خوشه جداگانه قرار گرفت نتایج مطالعات محققان مذکور بیانگر تفاوت ژنتیکی بین ایزوله‌های این باکتری از نظر منطقه جغرافیایی و گونه میزبانی (گونه ماهی و انسان) می‌باشد.

در جمع بندی کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بجز یک ایزوله بقیه ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیبایی جداسازی شده از مزارع ماهیان قزل‌آلای کشور واقع در استان‌های فارس، تهران، مازندران، گیلان،

مرضی کشورهای مختلف نظیر آمریکا، کانادا، ژاپن، استرالیا و سرزمین‌های فلسطین اشغالی بدست آمده بودند مجموعاً تعداد ۴۸۳ باند قابل تفکیک بود اما همه این ایزوله‌ها به میزان ۹۰٪ از شباهت برخوردار بودند ایزوله‌های آب شیرین خاورمیانه در چندین زیر خوشه (۶ زیر خوشه) قرار گرفتند اما از ۹۴/۵٪ شباهت برخوردار بودند بعلاوه یک ایزوله بدست آمده از قزل‌آلا در خاورمیانه با سایر ایزوله‌های مورد مطالعه دارای تفاوت ژنتیکی بوده و در





تصویر ۴. دندروگرام فاصله ژنتیکی ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی محصول هضم آنزیمی RFLP جمع‌آوری شده از استان‌های تهران، لرستان، چهارمحال و بختیاری، گیلان، فارس و مازندران (UPGMA, Nei, ۱۹۷۲).

References

1. Agnew, W., Barnes, A.C. (2007) *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet Microbiol.* 122: 1-15.
2. Austin, B., Austin, D.A. (2007) *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, Springer Praxis, Chichester, UK.
3. Dodson, S.V., Maurer, J.J., Shotts, E.B. (1999) Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. *J Fish Dis.* 22: 331-336.
4. Soltani, M., Jamshidi, S., Sharifpour, I. (2005) Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.* 25: 95-106.
5. Soltani, M., Alishahi, M., Mirzargar, S., Nik-

چهارمحال و بختیاری و لرستان فاقد تنوع ژنتیکی بوده و لذا بیماری حاصله ناشی از حدت ایزوله‌های مشابهی است که موجب بروز بیماری در این مناطق می‌شود. به هر حال با توجه به جداسازی یک ایزوله متفاوت از استان مازندران انجام مطالعات بیشتر بویژه در سایر استانها برای شناسایی ایزوله‌های احتمالی متفاوت ضروری است. بدیهی است لحاظ نمودن چنین تفاوت‌های ژنتیکی در کارآیی واکسن‌های تولیدی امری ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح مصوب شورای پژوهشی دانشگاه تهران و نیز قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران انجام گرفته است.



- bakhat, G.H.R. (2007) Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iran J Fish Sci. 7: 129-140.
6. Eldar, A., Lawhon, S., Frelief, P.F. (1997) Restriction fragment length polymorphisms of 16s rDNA and of whole rRNA genes (ribotyping) of *Streptococcus iniae* strains from the United States and Israel, FEMS Microbiology Letters. 151: 155-162.
7. Kvitt, H., Colorni, A. (2004) Strain variation and geographic endemism in *Streptococcus iniae*,” Diseases of Aquatic Organisms. 61: 67-73.



Genetic diversity of *Streptococcus iniae*; the cause of streptococcosis in farmed rainbow trout in Iran

Soltani, M.^{1*}, Pirali Khairabadi, E.¹, Ebrahimzadeh Mossavi, H.A.¹, Mirzargar, S.¹, Shayan, P.²

¹Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received 30 January 2016, Accepted 13 April 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* is one of the important emerging bacterial diseases in aquaculture sector worldwide. **OBJECTIVES:** In this study, the genetic diversity of *S. iniae* strains was assessed in some rainbow trout farms in Iran. **METHODS:** Gram positive and catalase negative bacterial isolates were first obtained from 100 trout fish farms in 8 states using routine bacteriological and molecular (PCR) works. The genetic diversity of these bacterial isolates was then assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. **RESULTS:** Seventy-seven strains of Gram positive and catalase negative cocci were isolated from diseased trout. PCR analysis resulted in identification of 27 strains as *S. iniae*. RFLP analysis of these strains using 9 digestive enzymes resulted in production of 29 bands with different molecular weight (62-940bp). Phylogenetic relationship of these strains grouped them in two distinct clusters. Twenty-six strains from Tehran, Mazandaran, Gilan, Lorstan, Fars and Charmaha-va-Bakhtiari provinces showed high homogeneous similarity above 99%, while one strain from Mazandaran province showed some differences with other strains. **CONCLUSIONS:** *S. iniae* isolates in trout aquaculture in Iran possess low genetic diversity.

Keyword: genetic diversity, rainbow trout, RFLP, *Streptococcus iniae*, streptococcosis

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The primers and temperatures used for detection of *Streptococcus iniae* isolates using 16S rRNA gene and also for multiplication of 16SrDNA.

Table 2. Some features of affected trout farmed to *S. iniae*.

Table 3. Results of electrophoresis of 16s rDNA RFLP PCR product digested by enzymes.

Figure 1. Agarose gel (2%) of DNA PCR product of some *Streptococcus iniae* isolates obtained from farmed trout. M=marker (50bp), Lines 1-8= test isolates, Line 9= positive control (*S. iniae* Accession No AF048773zzz), Line 10= negative control (*Lactococcus garviae* Accession No:X54262).

Figure 2. Agarose gel (2%) of 16S rDNA RFLAP product. M=marker (50bp), Lines 1-8= test isolates, Line 9= negative control (*Lactococcus garviae* Accession No:X54262).

Figure 3. Results of electrophoresis of 16S rDNA RFLP PCR product digested by enzymes. Figure 3-1: Results of digestion by BsuRI enzyme. Figure 3.2 Results of digestion by Hin 1 II enzyme. Figure 3.3 Results of digestion by MspI enzyme. Figure 3.4. Results of digestion by RsaI enzyme. Figure 3.5 Results of digestion by AluI enzyme. Figure 3.6. Results of digestion by EcoRI enzyme. Figure 3.7. Results of digestion by HinfI enzyme. Figure 3.8. Results of digestion by MboI enzyme. Figure 3.9. Results of digestion by TaqI enzyme.

Figure 4. Dendrogram of genetic distance of *S. iniae* isolates using RFLP. The bacterial isolates were obtained from Tehran, Charmahal -va-Bakhteyari, Gilan, Fars and Mazandaran states.

*Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-61117094, Fax: 021-66933222

