مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی

دوره پنجم، شماره هجدهم – بهار ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021

شناسایی و تعیین هویت مولکولی ایزوله های کوکسی گرم مثبت عامل استرپتوکوکوزیس جدا شده از ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان در استان مرکزی

نام مولفان: نسرین فرهادزاده [۱] سید داود حسینی [۲*] احمد علی پوربابایی [۳]

۱.کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، واحد قم ، ایران.

۲.استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مرکزی، اراک، ایران.

۳.استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، واحد قم، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: یکی ازمهم ترین بیماری های ماهیان پرورشی به خصوص قزل آلا بیماری استرپتوکوکوزیس است که می تواند باعث مرگ و میر تعداد زیادی از ماهیان شده و خسارات سنگینی به مراکز پرورش ماهی وارد کند. در این تحقیق جهت شناسایی و تعیین هویت دقیق و مطمئن ایزوله های کوکسی گرم مثبت عامل استرپتوکوکوزیس از روش PCR و تعیین توالی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: طی بهار و تابستان ۱۳۹۰ از ۱۲ مزرعه استان مرکزی نمونه برداری به عمل آمد. از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد ماهی در حال مرگ یا دارای علائم کلینیکی انتخاب گردید. نمونه ها در محیط بلاد آگار کشت داده شد و به مدت۷۲ ساعت در دمای۳۷درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس آزمایشات متداول میکروبیولوژی برای تایید نمونه های مشکوک به استرپتوکوکوزیس صورت گرفت. جهت تعیین نوع آنتی بیوتیک موثر بر باکتری های شناخته شده آزمون آنتی بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. کلیه نمونه های مثبت میکروبی مورد آزمایش PCR و تعیین توالی قرار گرفتند.

یافته ها: در این طرح۱۲ جدایه کوکسی گرم مثبت از بافت های کلیه، مغز، کبد و طحال۱۲۰ ماهی قزل آلای بیمارتوسط آزمایشات میکروبیولوژی جدا سازی شد. تمامی نمونه های مثبت میکروبی در آزمایش PCR (براساس ژن۱۶SrRNA) مثبت تشخیص داده شد واین کوکسی های گرم مثبت پس از تعین توالی به عنوان لاکتوکوکوس گارویه شناسایی شدند و با استفاده از آنتی بیوگرام نمونه ها، مقاومت آن ها به کولیستین، لینکومایسین، کلوگزاسیلین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید تایید شد.

نتیجه گیری: لاکتوکوکوس گارویه یکی از عوامل اصلی بیماری استربتوکوکوزیس شایع در استان مرکزی است.

واژگان کلیدی: PCR، ماهی قزل آلای رنگین کمان، استرپتوکوکوزیس، ۱۶SrRNA

مقدمه

استرپتکوکوزیس یک بیماری عفونی سپتی سمیک شناخته شده در ماهیان آب های شور و شیرین است که به صورت حاد یا مزمن بروز می‌کند. از شناسایی این بیماری از سال ۱۹۵۸ میلادی تا به امروز بسیاری از کشور های صاحب صنعت آبزی پروری متحمل خسارات قابل‌توجهی شده‌اند و همچنان رو به افزایش است. این بیماری همچنین به عنوان مهم ترین مشکل بهداشتی پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور ما نیز محسوب می‌شود که سالانه خسارات زیادی به تولیدکنندگان وارد می‌کند. علاوه بر اهمیت بیماری در آبزی پروری این بیماری یک تهدید برای سلامت عمومی انسان هایی که با آبزیان سروکار دارند محسوب می‌شود. عوامل شایع این بیماری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه می باشد این باکتری ها جزء خانواده استرپتوکوکاسه هستند و در تمام طول سال در انواع مختلف آبی وجود دارند و در صورت ایجاد شرایط مناسب مانند فاکتور های محیطی و ضعف سیستم ایمنی می توانند باعث ایجاد بیماری در ماهی ها شوند. در سالیان اخیر واکسن این بیماری از خارج کشور وارد شده و برای

آدرس نویسنده مسئول: اراک، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی شعبه منطقه مرکزی

پست الکترونیکی : Hosseinida@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله :۹۳/۳/۶

تاریخ پذیرش :۹۳/۶/۲۲

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021

پیشگیری استفاده می شود ولی این واکسن در مواردی اثر بخشی کاملی ندارد که یکی از دلایل آن بومی نبودن سویه های باکتریایی استفاده شده در آن است. با توجه به اینکه بیماری مذکور از لحاظ اقتصادی و زئونوز بودن بسیار مهم می باشد لذا شناسایی و درمان این عوامل عفونی حائز اهمیت است(۷،۱۰،۱۱،۱۶،۱۷). ضرورت انجام این تحقیق جداسازی عوامل ایجاد کننده بیماری استرپتوکوکوزیس در مراکز پرورش ماهی استان مرکزی با روش PCR[۱]و تعیین توالی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های عامل بیماری با توجه به انجام نشدن پروژه‌ای مشابه در این استان است که از نتایج این تحقیق می توان برای بررسی تولید واکسن بومی بر علیه این باکتری ها استفاده کرد.مواد و روش کار

نمونه برداری از ۱۲ استخر پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در استان مرکزی در بهار و تابستان سال های ۱۳۹۰صورت پذیرفت(جدول ۱). از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد ماهی مشکوک به بیماری و دارای علائم ظاهری بیماری از جمله تیرگی پوست، شنای نا متعادل، بیرون زدگی و خونریزی در چشم و اتساع شکم انتخاب گردید. ماهیان در جعبه های حاوی یخ و در فاصله زمانی کمتر از۲۴ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در ابتدا برای انجام آزمایش باکتریایی شکم ماهیان در شرایط استریل شکافته و با یک آنس استریل از کلیه قدامی و مغز و در صورت مشاهده طحال و کبد غیر طبیعی، از این اندام ها نیز نمونه برداری به عمل آمد و در محیط کشتTSB[۲] کشت داده شد. این محیط در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. در صورت ایجاد کدورت از این محیط روی محیط بلاد آگار با ۵٪ خون گوسفندی دفیبرینه کشت چهار جهتی داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۷/۵٪ دی اکسید کربن تا ۷۲ ساعت قرار داده می‌شد. در مرحله بعد از کلونی های رشد یافته ابتدا رنگ آمیزی گرم و پس از اطمینان از نوع رنگ آمیزی و شکل باکتری(کوکسی گرم مثبت) از کلونی های مورد نظر پاساژ ثانویه انجام شد. سپس آزمایش کاتالاز روی کلونی های خالص صورت گرفت و کلونی های کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی شد. در مراحل بعد جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین نوع آنتی بیوتیک مناسب برای درمان، آزمون آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن[۳]صورت گرفت. از دیسک های آنتی بیوتیک آمپی سیلین(AM)[۴]، کانامایسین(K)[۵]، کولیسیتین(CL)[۶]، تری متوپریم سولفامتوکسازول(SXT)[۷]، اکسی تتراسایکلین(T)[۸]، لینکومایسین (L)[۹]، آمیکاسین(AK)[۱۰]، کلوگزاسیلین(CX)[۱۱]، پنی سیلین(P)[۱۲]، نیتروفورانتوئین(FM)[۱۳]، کاربنی سیلین(CB)[۱۴]، اریترومایسین (E)[۱۵]، استرپتومایسین(S)[۱۶]، تتراسایکلین(TE)[۱۷]، سیپروفلوکسازین(CP)[۱۸]، جنتامایسین (GM)[۱۹]، توبرامایسین (TOB)[۲۰]، نالیدیکسیک اسید (NA)[۲۱]، سفالوتین (CF)[۲۲]، نئومایسین (N)[۲۳] ، کلرامفنیکل(C)[۲۴]، وانکومایسین(V)[۲۵]جهت انجام آزمون آنتی بیوگرام استفاده گردید(۳،۵،۸،۹،۱۲). در مرحله آخرجهت تایید تشخیص میکروبی ایزوله‌های جدا شده، آزمون PCR بر پایه ژن ۱۶SrRNA انجام گرفت.

بدین منظور ابتدا به کمک روش فنل‌وکلروفرم DNA را استخراج کرده و سپس به کمک آنزیم Taq DNA پلیمراز و پرایمر یونیورسال (ساخت شرکت سیناژن) (جدول ۲و۳) عملیات PCR طبق جدول ۴و۵ انجام و محصولات به دست آمده الکتروفورز گردید.پس از تکثیر قطعه مورد نظر، جهت تعیین هویت مولکولی ایزوله‌ها اقدام به تعیین توالی آن شد و توالی‌های حاصل(شرکت SOURCEBIOSCIENCE انگلیس) با توالی‌های گزارش شده در بانک ژنی NCBI و با استفاده از نرم افزار BIOEDIT بلاست گردید و گونه‌های عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان استان مرکزی مشخص شد .

کد	نام	تعداد مزرعه
A	اراک	۵
B	کمیجان	۲
C	شازند	۳
D	خمین	۱
E	خنداب	۱

جدول ۱- کد و نام ایستگاه های پرورش ماهی مورد مطالع

۱. Polymerase chain reaction
۲. Triptocase soy broth
۳. Disk diffusion
۴. Ampicillin
۵. Kanamycin
۶. Colistin
۷. Trimethoprim Sulphamethoxazol -
۸. Oxytetracyclin
۹. Lincomycin
۱۰. Amikacin
۱۱. Cloxacillin
۱۲. Penicillin
۱۳. Nitroforantoin
۱۴. Carbenicillin
۱۵. Erithromycin
۱۶. Streptomycin
۱۷. Tetracyclin
۱۸. Ciprofloxacin
۱۹. Gentamycin
۲۰. Tobramycin
۲۱. Nalidixicacid
۲۲. Cefalothin
۲۳. Neomycin
۲۴. Chloramphenicol
۲۵. Vancomycin

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021

´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-۳-´۵

Primer Name	OD	MW	100Pmol/µL	TM
Forward	5	6228	240/85	60/4

جدول ۲- پرایمرForward ساخت شرکت سیناژن

´GGTTACCTTGTTACGACTT-۳-´۵

PrimerName	OD	MW	100Pmol/µL	TM
Reverse	11	5864	562/76	53

جدول ۳- پرایمرReverse ساخت شرکت سیناژن

مقدار µ(l)	مواد
۱۳/۸	D.D.W
۲/۵	10X PCR buffer
۱/۵	(mgcl₂ (25mM
۰/۸	(dNTP Mix(10mM
۱	(Primer Forward(10mM
۱	(Primer Revers(10mM
۰/۴	Taq DNA polymerase unit/ul10
۴	DNA template
۲۵	حجم نهایی

جدول ۴ - ترکیبات واکنش PCR

تکرار	زمان	دما	مرحله	شماره
1	۳دقیقه	95°c	دناتوراسیون اولیه	۱
۱	۴۰ ثانیه	۹۴°c	دناتوراسیون	۲
۱	۴۰ ثانیه	۵۲°c	پرایمر	۳
۱	۴۰ ثانیه	۷۲°c	تکثیر ابتدایی	۴
۳۴			Goto2	۵
۱	۱۰دقیقه	۷۲°c	تکثیر نهایی	۶
۱		۴°c	Hold	۷

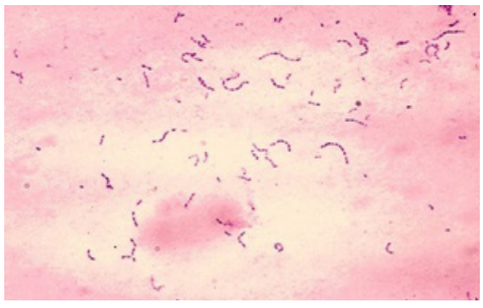
جدول ۵- برنامه واکنش PCR جهت ایزول های کوکسی گرم مثبت

یافته ها

نتایج کشت باکتریایی منجر به جداسازی تعداد ۱۲ ایزوله کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی از بافت های کلیه، کبد و مغز ماهیان مورد مطالعه شد. کلونی های ظاهر شده و تصویر مشاهده شده از باکتری زیر میکروسکوپ بعد از رنگ آمیزی گرم در اشکال ۱ و ۲ نمایش داده شده است. پس از انجام آنتی بیوگرام مشخص شد که۱۰۰درصد نمونه ها به کولیستین، لینکومایسین، کلوگزاسیلین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید مقاوم و به اریترومایسین، جنتامایسین، توبرامایسین، ونکومایسین، کلرامفنیکل وکاربنی سیلین حساس می‌باشند(نمودار ۱). PCR روی ۱۲ ایزوله جدا شده از ماهیان بیمار صورت پذیرفت و در نتیجه مثبت بودن این۱۲ ایزوله میکروبی(کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی عامل استرپتوکوکوزیس) با استفاده از آزمایش PCR تایید شد. الکتروفورز محصولPCR با ایجاد باند (bp۱۵۰۰) نشان دهنده تکثیر صحیح ژن۱۶SrRNA بود (شکل۳).

نتایج تعین توالی محصول PCR نشان می‌دهد که همه ایزوله ها در زیر مجموعه لاکتوکوکوس گارویه قرار می‌گیرند. در تحقیق حاضر سویه های لاکتوکوکوس گارویه به دست آمده از نظر تنوع ژنتیکی با هم مقایسه شدند که بعد از بلاست در نرم افزار Bioed-it، ۲ تا از نمونه ها (S۷,S۱۰)، با سایر نمونه ها در دو نوکلئوتید ناحیه ۱۱۱۵و۱۳۴۴متفاوت بودند و در نتیجه ۱۲ ایزوله جدا شده در دو دسته ژنتیکی قرار گرفتند. نمونه های S۱,S۲,S۳,S۴,S۵,S۶ (,S۸,S۹,S۱۱,S۱۲) با ایزوله های جدا شده از چین مانند (strain, IMAU۵۰۱۴۵ IMAU۵۰۰۹۴ strain) و ژاپن مانند(strain Ni۱۰۹ , strain Ni۱۰۸۹) ۱۰۰٪شباهت و نمونه های (S۷,S۱۰) با این ایزوله ها ۹۹٪ شباهت دارند.(شکل ۴و۵) .

شکل ۱- کلنی های ظاهر شده بعداز نمونه برداری بر روی محیط کشت غنی آگار خوندار



شکل ۲- تصویر مشاهده شده از باکتری زیر میکروسکوپ بعد از رنگ آمیزی گرم

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021

AK=Amikacin، AM=Ampicillin، CL=Colistin، CX=-Cloxacillin، CB=Carbenicillin، CP=Ciprofloxacin ،

CF=Cefalothin، C=Chloramphenicol، E=Erithromycin، GM=Gentamycin، K=Kanamycin، L= Lincomycin

FM= Nitroforantoin

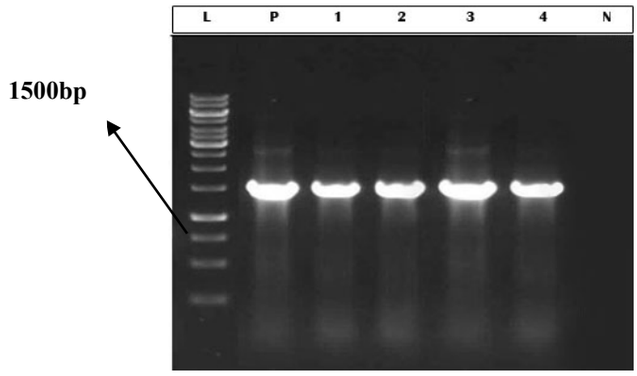
،N=Neomycin، NA=Nalidixicacid ،T= Oxytetracyclin ،P=Penicillin، S=Streptomycin،

SXT= Tri- ،TE= Tetracyclin ،TOB= Tobramycin

.V= Vancomycin، methoprimSulphamethoxazol

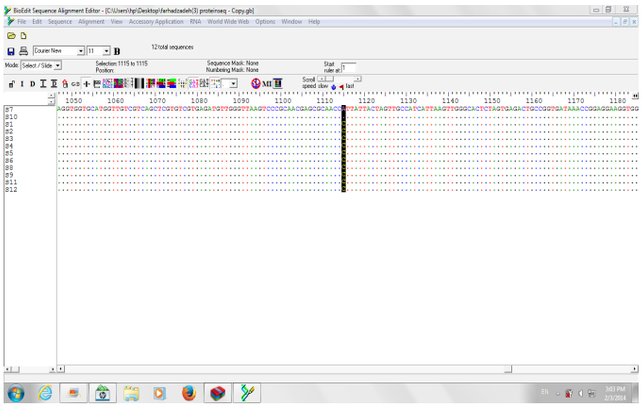
نمودار ۱- نتایج حساسیت و مقامت آنتی‌بیوتیکی(, I= Intermediate

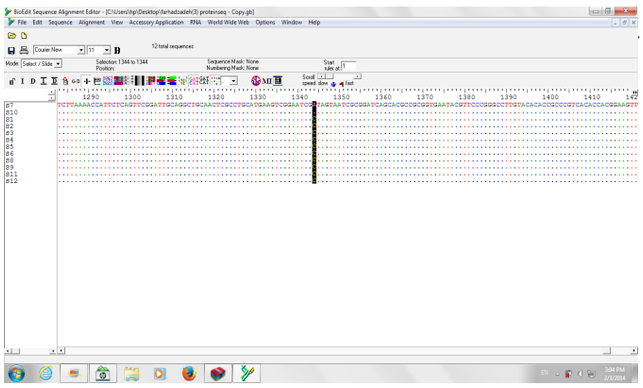
(R= Resistant, S= Sensitive



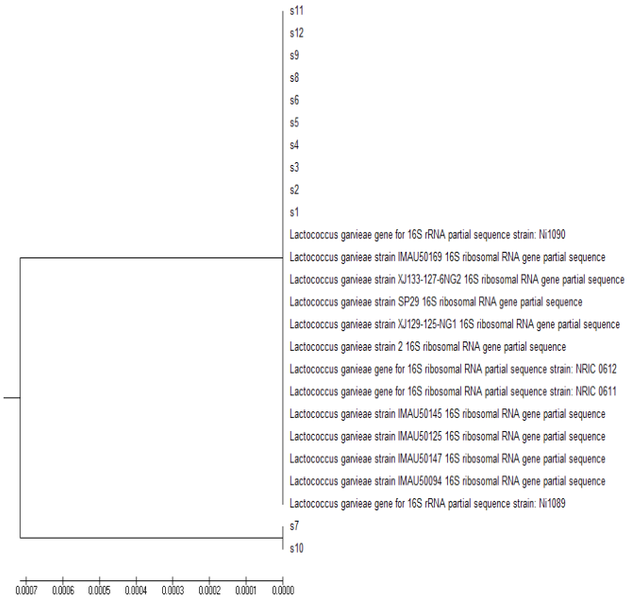
شکل۳ - به ترتیب از چپ به راست L=Ladder ۱ KB ، P =کنترل مثبت ،

۱ ,۲ ,۳,۴ = ایزوله های مورد مطالعه، N= کنترل منفی





شکل ۴- بلاست توالی نمونه ها درBioeditواختلاف آنها در دو موقعیت ۱۱۱۵ و ۱۳۴۴



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی های ژن۱۶SrRNAوبرطبق روش UPGMAکه موقعیت سویه های لاکتوکوکوس گارویه استان مرکزی (S۱تا S۱۲) و ایزوله های سایرمناطق را نشان می‌دهد.

بحث

نکته قابل توجه در مورد کوکسی های گرم مثبتی که در ارتباط با بیماری های ماهیان می‌باشند این است که علائم کلینیکی همگی درماهیان بیمار بسیار شبیه به هم بوده و باعث ایجاد یک سری علائم مشترک می‌گردند اما عوامل ایجاد کننده بیماری از لحاظ جنس وگونه می‌توانند متفاوت باشند(۱۴،۲). مطالعات زیادی بر روی کوکسی های گرم مثبت عامل استرپتوکوکوزیس انجام شده که هدف این مطالعات شناخت عامل بیماری، تعیین گونه و حتی کشف تفاوت سویه ها باهم بوده است. معمولا از علائم بالینی، کشت و آزمایشات میکروبیولوژی برای تشخیص اولیه عامل بیماری و در ادامه جهت تایید تشخیص از روش های مولکولی استفاده شده است.

در تحقیق حاضر بعد از جداسازی ۱۲ کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021

از ماهیان قزل آلای بیمار در استان مرکزی آزمون آنتی بیوگرام انجام شد. نتایج از این قرار بود که ۱۰۰درصد نمونه های جدا شده به آنتی بیوتیک های کولیستین، لینکومایسین، کلوگزاسیلین، استرپتومایسین و نالیدیکسیک اسید مقاوم و به اریترومایسین، جنتامایسین، توبرامایسین، ونکومایسین، کلرامفنیکل وکاربنی‌سیلین حساس بودند(۹).

در تحقیق کفیل‌زاده، نامداری و بناکار در سال۱۳۸۹ نشان داده شد که کوکسی های گرم مثبت جدا شده شمال غرب استان فارس بیشترین حساسیت را به کلرامفنیکل نشان می دهند و SXT از نظر حساسیت در درجه بعدی اهمیت قرار می‌گیرد در صورتی که در تحقیق ما ٪۹۱/۷ از نمونه ها به SXT مقاومت نشان دادند. همچنین در تحقیق مومنی و همکاران بر روی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از ماهیان قزل آلای استان های چهار محال و بختیاری و اصفهان نمونه ها بیشترین حساسیت را به کلرامفنیکل نشان دادند و کمترین حساسیت مربوط به اریترومایسن بود در صورتی که در تحقیق ما ۱۰۰٪ نمونه‌ها به اریترومایسین حساس بودند(۱).

بنابراین با استناد بر نتایج بدست آمده از آزمون های میکروبیولوژی و علائم بالینی بیماری در تحقیق حاضر، مشخص گردید که تمامی کوکسی های گرم مثبت جدا شده در ارتباط با بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان بوده که باعث آلودگی مزارع شده‌اند. در این تحقیق برای تعیین هویت مولکولی کوکسی های گرم مثبت از آزمایش PCR با استفاده از پرایمر یونیورسال بر اساس ژن ۱۶srRNA که در بین باکتری ها توالی حفاظت شده دارد صورت گرفت تا بتوان تمام گونه های عامل استرپتوکوکوزیس را شناسایی کرد. و محصول به دست آمده ازPCR تعیین توالی شد. همچنین بررسی نتایج تعیین توالی قطعه تکثیر شده، با استفاده از بانک ژنی NCBI ونرم افزار BIOEDIT نشان داد که عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان ۱۲ مرکز پرورش ماهی در استان مرکزی لاکتوکوکوس گارویه می‌باشد .

در تحقیقی پور غلام و همکاران نشان دادند نمونه های قزل آلای رنگین کمان ۸ استان در ایران آلوده به استرپتوکوکوس بوده و براساس آزمایشPCR ژن ۱۶srRNA با استفاده از چند جفت پرایمر اختصاصی مشخص شد که استان فارس آلوده به استرپتوکوکوس اینیایی است ولی غالب گونه ها در ۷ استان دیگر به ترتیب شامل آگالاکتیه، دیسگالاکتیه و استرپتوکوکوس اوبریس بوده است(۱۳).

کفیل‌زاده، نامداری، بناکار در سال۹۰-۸۹ توانستند کوکسی های گرم مثبت بیماری زا در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در شمال غربی استان فارس را با استفاده از روش های کشت و PCR شناسایی کنند. از مزارع مشکوک به بیماری تعداد ۹۰ نمونه ماهی قزل آلای رنگین کمان برداشته شد. پس از نمونه برداری و انجام کشت و آزمون های بیوشیمایی از بین۴۳ نمونه که کوکسی گرم مثبت شناخته شدند، ۴/۶٪ باکتری شامل استرپتوکوکوس اینیایی، ۲۳/۳٪ لاکتوکوکوس گارویه و ۷۲/۱٪ استرپتوکوکوس میلری تشخیص داده شدند. با انجام آزمون PCR مشخص شد که ۸۳/۷ درصد از کوکسی های گرم مثبت مورد نظر باکتری های عامل استرپتوکوکوزیس بوده و ۱۶/۳٪ از کل نمونه ها درآزمایش PCR جواب منفی دادند این دلیلی است که می‌تواند استفاده مطلق از شناسایی بر پایه آنالیز بیوشیمایی را رد نماید(۱).

در سال ۱۹۹۸EVI.ELDER و همکاران سویه های لاکتوکوکوس گارویه در ماهی ها را با روش PCR براساس ۱۶SRNAتعیین هویت کردند و همچنین سویه های لاکتوکوکوس گارویه از آسیا و اروپا و استرالیا را بررسی کردند و مشاهده نمودند همه آن ها از یک سویه منشاء گرفته‌اند و نشان دهنده این است که یک ارتباط اپیدمیولوژیک وجود دارد(۶).

در سال ۲۰۰۹ QASEMA.JAFAR و همکاران سویه استرپتوکوکوس آگالاکتیه را از ماهیان قزل آلای رنگین کمان کویت با استفاده از PCR براساس ژن ۱۶SRNA تعیین هویت مولکولی نمودند. ۶۴ نمونه از ۹۰ نمونه که با روش بیوشیمیایی به عنوان استرپتوکوکوس آگالاکتیه شناسایی شده بودند مثبت گردیدند. سپس با روش PCR ۱۴ نمونه‌ای که به روش شیمیایی تشخیص داده نشدند به عنوان استرپ آگالاکتیه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی شدند. سپس نمونه های جدا شده از ماهیان و نمونه های جدا شده از فاضلاب که پس از روش میکروبیولوژی و مولکولی به عنوان استرپتوکوک آگالاکتیه شناسایی شده بودند از لحاظ مولکولی مقایسه شدند و تشابه بین آگالاکتیه جدا شده از فاضلاب با برخی گونه های آگالاکتیه جدا شده از ماهیان نشان دهنده این بود که فاضلاب می‌تواند به عنوان منبع عفونت باشد(۸). از آنجایی که بیش از ۱۱ گونه باکتریایی از ۴ جنس استرپتوکوکوس، لاکتوکوکوس، واگوکوکوس و انتروکوکوس می توانند در ماهیان بیماری مشابهی ایجاد کنند و افتراق این جنس ها و گونه ها به دلیل شباهت زیادشان به یکدیگر از طریق بیوشیمایی مشکل و پر هزینه است و آزمون های بیوشیمیایی رایج به دلیل نتایج متنوع و مختلف در یک گونه توان شناسایی صد در صد باکتری را نداشته و حتی امکان تشخیص غلط نیز وجود دارد، از روش مولکولیPCR و تعیین توالی۱۶SrRNA برای تعیین هویت باکتری های جدا شده استفاده می‌کنیم که دارای نتایج بسیار دقیق و مطمئنی است. به هرحال با توجه به دامنه متنوع عامل بیماری همواره امکان تغییر در جدایه های عامل بیماری در مناطق وجود دارد که مستلزم مطالعات مستمر می‌باشد. تاثیر دما و وضعیت کیفی آب به عنوان عوامل مستعد کننده در بروز بیماری مورد تایید قرار گرفته است و باکتری همزمان با افزایش

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021

دمای آب فعالیت بیشتری می‌یابد و بیماری زایی خود را به خصوص در شرایط بد بهداشتی و مدیریتی نشان می‌دهد که این نشان دهنده شیوع بیشتر بیماری در فصل تابستان می باشد(۴۱۵،) . همچنین در این تحقیق شیوع بیماری در فصل بهار و تابستان (اوج شیوع) بود ولی هیچ گزارشی از بیماری در زمستان صورت نگرفت. در نهایت انجام آنتی بیوگرام قبل از اقدام به درمان جهت یافتن آنتی بیوتیک مناسب و در نتیجه جلوگیری از مقاومت آنتی بیوتیکی توصیه می شود و به نظر می رسد با انجام آزمایشPCR و تعیین‌توالی، تشخیص دقیق و سریع ودرمان به موقع گونه های شایع بیماری امکان پذیر می‌گردد .

پیشنهادات این پژوهش عبارتند از:

۱- بررسی عامل مقاومت باکتری های جدا شده در این تحقیق به آنتی بیوتیک های کولیستین، لینکومایسین، کلوگزاسیلین، استرپتومایسین و نالیدیکسیک اسید به روش PCR

۲- تهیه و تولید واکسن بومی بر علیه بیماری استرپتوکوکوزیس

تشکر و قدردانی:

نگارندگان از کارشناسان موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و مدیرگروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد قم سر کار خانم دکتر فراهانی سپاسگزاری بعمل می‌آورند.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021

منابع

(۱) کفیل‌زاده ف, بناکار ی, نامداری ا. جداسازی و شناسایی باکتری‌های کوکسی شکل بیماری‌زا در ماهیان قزل آلای رنگین‌کمانی در مزارع پرورشی شمال غرب استان فارس با استفاده از روش‌های کشت و PCR. فصلنامه علمی- پژوهشی زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان،۸۹۱۳؛ سال چهارم، شماره سوم:۵۷-۶۵.

(2) Altinok I. Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease. Dis Aquat Org, 2011;93(3):199-206.

(3) ALTUN S, ONUK EE, ÇİFTÇİ A, BÜYÜKEKİZ AG, DUMAN M. Phenotypic, Genotypic Characterisation and Antimicrobial Susceptibility Determination of Lactococcus garvieae Strains. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2013;19(3):375-381.

(4) Amal MNA, Zamri-Saad M. Streptococcosis in Tilapia (Oreochromis niloticus) :A Review. Pertanika J. Trop. Agric. Sci.,2011;34(2):195-206.

(5) Baeck GW, Kim JH, Gomez DK, Park SC. Isolation and characterization of Streptococcus sp. from diseased flounder (Paralichthys olivaceus) in Jeju Island. J Vet Sci,2006;7(1):53-58.

(6) Eldar A, Goria M, Ghittino C, Zlotkin A, Bercovier H. Biodiversity of Lactococcus garvieae strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. Appl Environ Microbiol, 1999;65(3):1005-1008.

(7) Haghighi Karsidani S, Soltani M, Nikbakhat-Brojeni G, Ghasemi M, Skall H. Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis/lactococcosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) aquaculture in Iran. Iran J Microbiol, 2010;2(4):198-209. (Persian in text full).

(8) Jafar QA, Sameer AZ, Salwa AM, Samee AA, Ahmed AM, Al-Sharifi F. Molecular investigation of Streptococcus agalactiae isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. Pak J Biol Sci: PJBS,2008;11(21):2500-2504.

(9) Kav K, Erganis O. Antibiotic susceptibility of Lactococcus garvieae in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) farms. B VET I PULAWY, 2008;52:223-226.

(10) Kia ER, Mehrabi Y. Detection and Identification of Different Streptococcosis Strains in Farmed Rainbow Trout in Boyerahmad and Dena Regions (North South of Iran). World J. Fish & Marine Sci, 2013;5(3):315-321. (Persian in text full).

(11) Mata AI, Blanco MM, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF, Gibello A. Development of a PCR assay for Streptococcus iniae based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. Vet Microbiol,2004 21;101(2):109-116.

(12) PIER GB, MADIN SH. Streptococcus iniae sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, Inia geoffrensis. Int J Syst Bacteriol, 1976;26(4):545-553.

(13) Pourgholam R, Laluei F, Saeedi A, Zahedi A, Safari R, Taghavi M, et al. Distribution and Molecular identification of some causative agents of streptococcosis isolated from farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) in Iran. Iran J Fish Sci, 2011;10(1):109-122. (Persian in text full).

(14) Sharifiyazdi H, Akhlaghi M, Tabatabaei M, Mostafavi Zadeh S. Isolation and characterization of Lactococcus garvieae from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) cultured in Iran. Iran J Vet Res, 2010;11(4).(Persian in text full).

(15) Soltani M, Jamshidi S ,Sharifpour I. Streptococcosis caused by Streptococcus iniae in farmed rainbow trout Oncorhynchus mykiss in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. BULL EUR ASSN FISH P, 2005;25(3):95-106. (Persian in text full).

(16) Soltani M, Pirali E, Shayan P, Eckert B, Rouholahi S, Sadr SN. Development of a Reverse Line Blot Hybridization method for Detection of some Streptococcal/Lactococcal Species, the causative agents of Zoonotic Streptococosis/Lactococosis in farmed fish. Iran J Microbiol, 2012;4(2):70-74. (Persian in text full).

(17) Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H. Identification of Lactococcus garvieae by PCR. J Clin Microbiol , 1998;36(4):983-5.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:06 +0430 on Sunday June 20th 2021