مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره سوم، پیاپی سی و پنجم، زمستان ۱۳۹۹ (۲۷-۱۹)

مقاله پژوهشی:

بررسی مولکولی و بیوشیمیایی نقش استرپتوکوکوس اینیایی در تلفات باس دریایی آسیایی پرورشی (*Lates calcarifer*) در قفس‌های پرورشی خلیج فارس

فریدون حسنی[۱*]، رحیم پیغان[۲]، مجتبی علیشاهی[۲]، مسعود قربانپور[۳]، مینا آهنگرزاده[٤]

۱. دکتری، بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز و قطب بهداشت و بیماریهای ماهیان گرمابی
۳. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
٤. استادیار، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/٦/۱۵)

چکیده

استرپتوکوکوس اینیایی باکتری گرم مثبتی است که باعث عفونت‌های تهاجمی همراه با سپتی‌سمی و مننژیت شدید و تلفات اقتصادی بالا در ماهیان آب شیرین و دریایی می‌شود. استرپتوکوکوزیس یکی از مهمترین بیماری‌های عفونی در ماهی باس دریایی آسیایی می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر، بررسی نقش این باکتری در تلفات ماهیان باس دریایی در قفس‌های پرورشی سواحل شمالی خلیج‌فارس بود. در این مطالعه در مجموع از تعداد ۱۵۰ قطعه ماهی باس‌دریایی‌آسیایی پرورشی (٦۰ قطعه ماهی مشکوک به عفونت باکتریایی و تعداد ۹۰ قطعه ماهی به ظاهر سالم) از مزارع فعال در استان‌های بوشهر، خوزستان و هرمزگان نمونه باکتریایی از کلیه قدامی و مغز تهیه گردید. بعد از جداسازی و خالص سازی باکتری‌ها، با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی (با پرایمرهای اختصاصی ژن lctO) حضور باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR و تعیین توالی محصول PCR نشان‌دهنده میزان شیوع بالای *استرپتوکوکوس اینیایی* در قفس‌های پرورش ماهی باس‌دریایی آسیایی در دریای خلیج فارس است. بنابراین لازم است اقدامات مؤثر در خصوص پیشگیری از بیماری استرپتوکوکوزیس (به‌ویژه واکسیناسیون) انجام گردد.

واژه‌های کلیدی: *استرپتوکوکوس اینیایی*، باس‌دریایی‌آسیایی، پرورش در قفس، PCR.

* نویسنده مسئول: فریدون حسنی Email: fredunhassani@yahoo.com

Molecular and biochemical investigation of the role of streptococcus iniae in mortality of *Lates calcarifer* cages culturing in the Persian Gulf

Fereydun Hassani[1*], Rahim Payghan[2], Mojtaba Alishahi[2], Masoud Ghorpanpour[3], Mina Ahangarzadeh[4]

1. Ph.D. of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2. Professor, Department of clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran and Excellence Center of Warm Water Fish Health and Disease
3. Professor, Department of pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4. Assistant Professor, Agricultural Education and Extension Research Organization, Fisheries Science Research Institute, South IRAN Aquaculture Research Center,Ahvaz, Iran

(Received: Nov. 26, 2019 - Accepted: Sep. 5, 2020)

Abstract

Streptococcus iniae is a gram-positive bacterium that causes invasive infections with severe septicemia and meningitis as well as high economic losses in freshwater and sea fish. It is one of the most infectious diseases in Asian sea bass. The purpose of the present study was to investigate the role of this bacterium in marine bass fish mortality in farmed cages on the northern coast of the Persian Gulf. In this study, a number of 150 cultured Asian sea bass (60 fish suspected of bacterial infection and 90 apparently healthy fish) were selected and bacterial sampling were taken from head kidneys and brain of fish from sea bass cages of Bushehr, Khuzestan and Hormozgan provinces. After isolation and purification of the bacteria, the presence of *Streptococcus iniae* was evaluated and confirmed via biochemical tests and molecular methods (with specific primers of lctO gene). The PCR results and sequencing of the PCR product indicate high prevalence of *Streptococcus iniae* in Asian sea bass cages culturing in the Persian Gulf. Therefore, effective measures should be taken to prevent Streptococcosis (especially vaccination).

Keywords: Streptococcus iniae, Asian sea bass, cages culture, PCR.

مقدمه

استرپتوکوکوزیس، بیماری سیستمیک حاد می‌باشد که در محیط‌های آبی (آب شیرین، آب لب شور و آب شور) و در گونه‌های بومی و پرورشی ایجاد بیماری می‌کند. بطوریکه این دو بیماری در گونه‌های مختلف ماهی شامل تیلاپیا، گربه ماهی، کپور، هامور، شاه ماهی، پومفرت، قزل‌آلا، ماهی آزاد، کفشک، سیم دریایی، ماهی دندان دار قرمز، باراماندی، خرگوش ماهی، باس راه‌راه، ماهی دم‌زرد، تاس ماهیان و صخره ماهی بیماری‌زاست، بنابراین استرپتوکوکوزیس از جمله بیماری‌های بسیار مهم باکتریایی در تمام کشورهایی که صنعت آبزی‌پروری فعال دارند، می‌باشند (Klesius *et al*., 1999). استرپتوکوکوزیس در ماهی به شکل مجموعه‌ای از بیماری‌های مشابه است و توسط جنس‌ها و گونه‌های مختلفی از باکتری‌های کوکسی که در رنگ‌آمیزی گرم مثبت هستند و از باکتری‌های لاکتیک اسید می‌باشند ایجاد می‌شود (Bercovier *et al*., 1999). این کوکسی‌های گرم مثبت کوچک بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که اغلب در زنجیره‌های طولانی به‌اندازه ۰/۵–۰/۳ میکرومتر دیده می‌شوند (Brousseau *et al*., 2001). ماهی سی‌باس‌آسیایی (*Lates calcarifer*) متعلق به خانواده Latidae، یکی از بهترین ماهیان دریایی پرورشی دنیا به‌شمار می‌رود. این ماهی آنادروموس است و قابلیت سازگاری در هر دو محیط آب شور و شیرین را دارد (Paterson *et al*., 2003). عمده پراکنش این ماهی در بسیاری از مناطق حاره و نیمه‌حاره، اقیانوس هند، اطلس، شمال استرالیا و جنوب شرقی آسیا است (Whitehead *et al*., 1990). پرورش این گونه در سال ۱۹۷۰ در تایلند آغاز و به‌سرعت در سراسر آسیای جنوب شرقی گسترش یافته است (Mathew, 2009). تولید این ماهی در سال ۲۰۱۷ بیش از ۹۰ هزار تن بوده که بیشتر در کشورهای جنوب شرقی آسیا تولید می‌شود (FAO, 2018). سازش‌پذیری با غذای دستی، تکثیر در شرایط اسارت، نرخ رشد سریع و قیمت بالای محصول در بازار به‌واسطه کیفیت بالای گوشت از عواملی است که ماهی سی‌باس را به یک گونه مناسب برای آبزی‌پروری تبدیل می‌کند (Mathew, G. 2009). سی‌باس دارای رشد سریع است، وزن ایده‌آل این‌گونه در حدود ۶۰۰ تا ۷۰۰ گرم برای هر قطعه است و در طول مدت شش ماه تا دو سال به‌اندازه قابل برداشت (۳۵۰ گرم تا ۳ کیلوگرم) می‌رسد (Allen & Neely, 2011). این ماهی دارای محدوده تحمل حرارتی بسیار گسترده (۱۵–۴۰ درجه سانتی‌گراد) است و پرورش آن‌ها در درجه حرارت ۳۵–۲۲ درجه صورت می‌گیرد (Robins *et al*., 2003). رشد سریع، تکثیر آسان، تحمل شوری بالا، توانایی در پذیرش غذای فرموله و قابلیت پرورش در استخرهای خاکی و قفس از مهم‌ترین ویژگی‌های این ماهی است (Allen & Neely, 2011). در ایران با توجه به نوپا بودن صنعت تکثیر و پرورش ماهیان دریایی، هیچ مطالعه منتشرشده‌ای از وضعیت بهداشتی و بیماری‌های ماهی باس‌دریایی آسیایی یا باراموندی وجود ندارد، زیرا در طی همین سال‌های اخیر به کشور وارد شده و به‌عنوان گونه اصلی پرورشی، به‌ویژه در سیستم‌های پرورشی در قفس، پرورش داده می‌شود. در حال حاضر پرورش ماهیان دریایی بیشتر به‌صورت پرورش در قفس در دریا انجام می‌شود که امکان هیچ‌گونه ضدعفونی آب (حذف پاتوژن) و حتی دارو درمانی وجود ندارد (به دلایل تأثیرات زیست‌محیطی مخرب بر اکوسیستم و هزینه) و با توجه به این‌که باکتری جنس استرپتوکوکوس فلور باکتریایی آب‌های شور نیز می‌باشد بدین جهت در این تحقیق جداسازی، شناسایی و تعیین هویت بیوشیمیایی، مولکولی (PCR) و تعیین توالی باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* از منطقه پرورش ماهی باس دریایی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از دی‌ماه سال ۱۳۹۵ تا اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۸، به‌مدت یک سال نمونه‌برداری از ماهیان به ظاهر سالم و بیمار (دارای علایم اختصاصی و غیراختصاصی) از مزارع فعال پرورش ماهی باس‌دریایی‌آسیایی در استان‌های بوشهر، هرمزگان و خوزستان به صورت مداوم و موردی (در صورت بروز تلفات و اطلاع‌رسانی مدیر مزرعه) انجام گردید. مزارع فعال که از آن‌ها نمونه برداری مداوم صورت گرفت، شامل سه مجموعه پرورش ماهی در قفس و دو مزرعه در استان هرمزگان، یک مرکز تکثیر و چندین مزرعه در بوشهر و دو مزرعه در استان خوزستان بود. البته در صورتی‌که مزرعه با تلفات مواجه بود، بر اساس اعلام مدیر مزرعه، نمونه‌گیری موردی نیز انجام می‌گردید.

جداسازی استرپتوکوکوس

به‌منظور جداسازی استرپتوکوکوس، ماهیان مشکوک به بیماری، به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل و کشت باکتریایی از کلیه، کبد، مغز، طحال، آن‌ها طبق روش‌های استاندارد انجام گرفت (Buller, 2014). نمونه‌ها روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی Tryptic Soy Agar (TSA) با نمک ۱/۵ درصد، تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان انکوباسیون کلونی‌های مشکوک به استرپتوکوکوس انتخاب و بر روی محیط TSA حاوی ۱/۵ درصد نمک به‌روش کشت چهار منطقه‌ای خالص‌سازی شدند.

پس از خالص‌سازی، تشخیص اولیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی بر روی پرگنه‌های خالص‌سازی شده، انجام شد. جدایه‌های گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی به‌عنوان مظنون به جنس استرپتوکوکوس در نظر گرفته شدند و جهت تشخیص دقیق‌تر از آزمایش‌های مرسوم بیوشیمیایی مطابق جدول ۱ بهره‌گیری شد. در نهایت نتایج آزمایش‌های فوق با جداول موجود در منابع معتبر تطبیق داده شد (Austin & Robertson, 1993).

برای انجام مطالعات بیوشیمیایی از روش‌های استاندارد توصیه شده استفاده شد (Holt *et al*., 1993). نتایج آزمایش‌های مورد نظر برای تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی در جدول ۲ آمده است.

شناسایی مولکولی باکتری‌های جداسازی شده، ابتدا با استخراج ژنوم آنها در درجه حرارت بالا انجام گرفت، برای این کار از دو تا سه کلنی کشت ۲۴ ساعته باکتری، در آب مقطر سوسپانسیونی تهیه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) حرارت داده شد در مرحله بعد سوسپانسیون فوق ۲ دقیقه در دور ۱۳۵۰۰ سانتریفوژ شد و مایع رو از نظر کیفیت و کمیت DNA بررسی گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه انجام شد (Buller, 2014).

برای شناسایی جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* از روش توصیه شده توسط Nguyen *et al*. (2014) استفاده شد. برای این کار از یک جفت پرایمر که ناحیه ۸۷۰bp ژن lctO باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* را شناسایی می‌نماید استفاده شد (جدول ۱).

مراحل و مواد برای آزمایش PCR ، در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۶/۵ میکرولیتر آب مخصوص PCR، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۴ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از DNA استخراج‌شده برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید.

جدول ۱. توالی پرایمر لاکتات اکسیداز (lctO)

پرایمر	توالی (5'- 3')	ژن هدف	اندازه آمپلیکون	پاتوژن	رفرنس
LOX-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	lctO	870	S. iniae	Nguyen *et al*. (2014)
LOX-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA				

با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف آمریکا) با برنامه دمایی، واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، واسرشته‌سازی به‌مدت۳۰ ثانیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، اتصال به‌مدت ۳۰ ثانیه (۵۵ درجه سانتی‌گراد)، طویل شدن به‌مدت ۱ دقیقه (۷۲ درجه سانتی‌گراد)، سپس تکرار مراحل ۲ تا ۴ به تعداد ۳۵ چرخه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی به‌مدت ۵ دقیقه (۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت. پس از طی شدن چرخه‌های دمایی و تکثیر احتمالی ژن مورد هدف، از محصول PCR به اندازه ۵ میکرولیتر در کنار نردبان ژنی bp ۱۰۰ (سیناژن، ایران) به صورت جداگانه در چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) به همراه کنترل‌های مثبت و منفی بارگذاری گردید در نهایت در ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز انجام و در دستگاه ژل داک (Uvitec، انگلستان) با نور UV تشکیل باندها عکس‌برداری شد.

نتایج

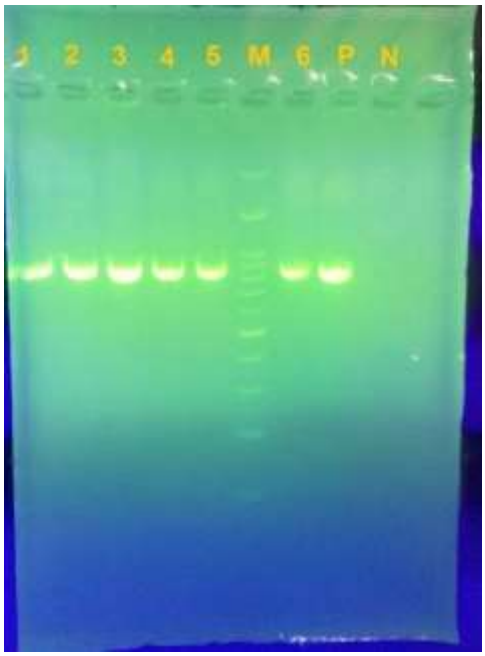
از اندام‌های داخلی و ضایعات جلدی احتمالی ۶۰ قطعه ماهی واجد علایم (تیره شدن پوست بدن، از دست دادن تعادل، اگزوفتالمی و کدورت چشم‌ها، از دست دادن اشتها، بی‌حالی و حرکات نامنظم) و ۹۰ قطعه ماهی به ظاهر سالم در مجموع۳۰ جدایه‌ی باکتریایی جدا شد که آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای تشیخص قطعی عامل بیماری‌زا روی آنها انجام شد. جدایه‌هایی که بعد از الکتروفورز باند ۸۷۰bp تشکیل دادند به‌عنوان سویه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* در نظر گرفته شدند.

نتایج مطالعات بیوشیمیایی در جدول ۲ آمده است. بر اساس این نتایج تمام این جدایه‌ها از نوع اکسیداز منفی، کاتالاز منفی و دیگر خصوصیات بیوشیمیایی آنها نیز مشابه بوده است.

نتایج آزمایش PCR با استفاده از جفت پرایمر مورد اشاره منجر به تولید باند با وزن مولکولی ۸۷۰bp برای نمونه‌های مورد مطالعه و کنترل مثبت گردید، درصورتی‌که در کنترل منفی هیچ باندی تشکیل نشد (شکل ۱). همچنین بررسی نتایج تعیین توالی قطعه تکثیرشده با استفاده از بانک ژنی NCBI، نشان داد که عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان مراکز پرورش ماهی در قفس در استان‌های حاشیه دریای خلیج فارس *استرپتوکوکوس اینیایی* می‌باشد.

جدول ۲. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جدایه‌هایی کوکسی گرم مثبت که PCR آنها مثبت بوده است.

کد سویه‌ها / تست‌های بیوشیمیایی	BKA1	BKA2	BR1	BR2	HN1	HN2
رنگ‌آمیزی گرم	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	−	−	−	−	−	−
کاتالاز	−	−	−	−	−	−
اندول	−	−	−	−	−	−
MR	+	+	+	+	+	+
VP	−	−	−	−	−	−
سوربیتول	−	−	−	−	−	−
اینولین	−	−	−	−	−	−
لاکتوز	−	−	−	−	−	−
رافینوز	−	−	−	−	−	−
آرابینوز	+	+	+	+	+	+
سیمون‌سیترات	−	−	−	−	−	−
سولفید هیدروژن	−	−	−	−	−	−
تحرک	−	−	−	−	−	−
TSI	K/A	K/A	K/K	K/A	K/K	K/k



شکل ۱. ژل آگاروز مربوط به PCR محصول DNA جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی (۱تا ۶)، مارکر (M)، کنترل مثبت (P) و کنترل منفی (N)

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی انجام‌شده بر کوکسی‌های گرم مثبت عامل استرپتوکوکوزیس درنهایت باعث شناخت عامل بیماری، تعیین گونه در ماهیان سی‌باس آسیایی پرورشی در قفس‌های بوده است. معمولاً از علایم بالینی، کشت و آزمایش‌های میکروبیولوژی برای تشخیص اولیه عامل بیماری و در ادامه جهت تأیید تشخیص از روش‌های مولکولی استفاده شده است. نکته قابل‌توجه در مورد کوکسی‌های گرم مثبتی که در ارتباط با بیماری‌های ماهیان می‌باشند این است که علایم کلینیکی همگی درماهیان بیمار بسیار شبیه به هم بوده و باعث ایجاد یک سری علایم مشترک می‌گردند، اما عوامل ایجادکننده بیماری از لحاظ جنس و گونه می‌توانند متفاوت باشند (Altinok *et al*., 2011).

در تحقیق حاضر بعد از جداسازی ۳۰ کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی و اکسیداز منفی سایر تست‌های بیوشیمیایی روی جدایه‌ها انجام گرفت. براساس نتیج حاصل از آزمون‌های میکروبیولوژی و علایم بیماری در تحقیق حاضر، مشخص گردید که تمامی کوکسی‌های گرم مثبت جدا شده در ارتباط با بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان بوده که باعث آلودگی قفس‌های پرورشی شده اند. در این تحقیق برای تعیین هویت مولکولی کوکسی‌های گرم مثبت از آزمایش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی بر اساس ژن lctO صورت گرفت تا بتوان تمام گونه‌های عامل استرپتوکوکوزیس را شناسایی کرد و محصول به‌دست‌آمده از PCR تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی قطعه تکثیرشده در پایگاه داده‌های بانک ژنی NCBI، مشخص نمود که عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان سی‌باس پرورشی در قفس استان‌های جنوبی حاشیه دریای خلیج فارس *استرپتوکوکوس اینیایی* می‌باشد. در ایران با توجه به نوپا بودن صنعت تکثیر و پرورش ماهیان دریایی، تنها یک گزارش مستند از بررسی وضعیتی بهداشتی تکثیر و پرورش گونه‌های ماهیان هامور، صبیتی و شانک وجود دارد که توسط مرتضایی در سال ۱۳۸۹ انجام شده است. از طرفی ماهی باراموندی یا سی‌بس آسیایی چون در طی همین سال‌های اخیر به کشور وارد شده و پرورش می‌شود هیچ مطالعه منتشر شده‌ای از وضعیت بهداشتی و بیماری‌های آن وجود ندارد. اطلاعات منتشره تنها در خصوص پرورش آن می‌باشد.

در ایران ابتدا Akhlaghi & Keshavarzi (2002) باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* را از برخی مزارع پرورش قزل‌آلای استان فارس گزارش نمودند. سپس Soltani *et al*. (2005) بروز تلفات (بین ۲۰ تا ۴۰٪) در برخی مزارع پرورش قزل‌آلای کشور در سال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ را به علت *استرپتوکوکوس اینیایی* دانستند.

مطالعات انجام‌شده در ایران، نمایانگر گسترش استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل‌آلا است (Soltani *et al*., 2005). در این بررسی‌ها، *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* به منزلهٔ عمده‌ترین گونه‌های بیماری‌زای مزارع کشور مطرح شده‌اند. بنابراین پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی

این بیماری ضروری است. بررسی Soltani & Tarahomi (2008) نشان داد که ۲۰ درصد از مجموع ۶۰۰ کوکسی گرم مثبت جداشده از ماهیان قزل‌آلای پرورشی در استان فارس را گونه *لاکتوکوکوس گارویه* تشکیل می‌دهد و مابقی مربوط به جنس *استرپتوکوکوس* و به‌طور عمده از گونه اینیائی بوده است. مطالعه Mirzakhani (2009) نشان داد که از مجموع ۲۰ جدایه کوکسی گرم مثبت جداشده از ماهیان مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری ۹ مورد *لاکتوکوکوس گارویه* و ۱۱ مورد *استرپتوکوکوس اینیائی* بودند. استرپتوکوکوس اولین بار از فلور باکتریایی ماهی سالم در نروژ در سال ۱۹۴۳ گزارش شد. استرپتوکوکوس آلفا همولیتیک، بتا همولیتیک، گاما همولیتیک یا غیر همولیتیک از ماهیان بیمار گزارش شده‌اند. Bromage *et al.* (1999) عامل تلفات در سی‌باس آسیایی را به روش تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شناسایی و با بررسی عفونت تجربی در این ماهی به تلفات بیش از ۴۰ درصد رسیدند، این اولین گزارش چاپ‌شده از وقوع *استرپتوکوکوس اینیایی* در استرالیا و گزارش تأییدی از عامل تلفات در باراموندی در اثر ابتلا به این باکتری بود. در مطالعه حاضر علاوه بر استفاده از تست‌های بیوشیمیایی برای به حداقل‌رساندن تعداد باکتری‌های مظنون به *استرپتوکوکوس اینیایی*، در نهایت از روش تشخیص قطعی به وسیله PCR نیز استفاده شد. Suanyuk *et al.* (2010) وقوع استرپتوکوکوزیس در ماهی باس آسیایی پرورشی در جنوب کشور تایوان را که ناشی از باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* بود گزارش کردند در این تحقیق باکتری مذکور به‌وسیله روش مولکولی PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 16S rRNA و lctO، به ترتیب با تشکیل باند در ناحیه ۳۰۰bp و ۸۷۰bp با ژن‌های DNA باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* شناسایی شد، در این تحقیق استفاده از پرایمر ژن لاکتات اکسیداز (lctO) و تشکیل باند روی ژل آگاروز در ناحیه ۸۷۰bp حاکی از وقوع استرپتوکوکوزیس در ماهیانی پرورشی در قفس و مزارع خاکی در استان‌های حاشیه دریای خلیج‌فارس است. طبق گزارش‌ها، ژن‌های کدکننده لاکتات‌اکسیداز در بین گونه‌های استرپتوکوکوس خیلی غیرمعمول است علاوه بر آن ژن لاکتات اکسیداز قابلیت تشخیص *استرپتوکوکوس اینیایی* با خصوصیات بیشتر از ژن 16S rRNA دارد. در تحقیقی که توسط Kayansamruaj *et al.* (2015) روی حساسیت ماهی سی‌باس‌آسیایی به عفونت تجربی با پاتوژن‌های باکتریایی *استرپتوکوکوس اینیایی* انجام شد، از پرایمرهایی که ژن lctO باکتری را در ناحیه ۸۷۰ bp شناسایی کردند جهت تأیید نهایی باکتری استفاده شد و هر سه ایزوله *استرپتوکوکوس اینیایی* در نهایت باعث ایجاد تلفات بالا (۹۰ تا ۱۰۰٪) طی ۷ روز بعد از ایجاد عفونت در ماهی سی‌باس آسیایی شد. در مجموع بر طبق یافته‌های مطالعات قبلی محققین کشور (Akhlaghi & Keshavarzi, 2002; Soltani *et al.*, 2005) *استرپتوکوکوس اینیایی* در مزارع پرورشی داخل خشکی به‌ویژه در استخرهای سیمانی پرورش قزل‌آلا وجود دارد و بر اساس این تحقیق در قفس‌های پرورشی ماهی سی‌باس در دریا نیز میزان شیوع بالا است. بنابراین با توجه به رشد سریع صنعت آبزی‌پروری در قفس و احتمال گسترش بیماری عفونی استرپتوکوکوزیس و حدت‌دار شدن آن برای ماهیان پرورشی در قفس و انتقال به استخرهای خشکی، یافتن روش‌های سریع و دقیق شناسایی عوامل بیماری‌زا کمک شایانی به انجام روش‌های درمانی و پیشگیرانه خواهد بود، بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی سریع نظیر PCR جهت به قطعیت رسیدن در تشخیص عوامل بیماری‌زا توصیه می‌گردد. براساس نتایج این تحقیق و پیش‌بینی که از رشد چشمگیر صنعت کیج‌کالچر در حوزه دریای خلیج فارس می‌شود و در صورت استفاده بیش از حد از توان قفس‌های پرورشی با ازدیاد تراکم نگهداری ماهی و

افزایش مدت استفاده از قفس‌های پرورشی در دریا احتمال تلفات ماهیان در اثر بیماری با باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* وجود دارد، لذا به‌منظور پیشگیری باید مطالعات تهیه واکسن جهت ایمن‌سازی ماهی باس‌دریایی‌آسیایی در دستور کار قرار گیرد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه در اعطای پژوهانه (شماره SCU.vC98.413) کمک به اجرای این تحقیق در غالب بخشی از پایان‌نامه دکتری، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Akbary, P.; Mirvaghefi, A.R.; Akhlaghi, M.; Fereidouni, M.S. (2015). Influence of Maternal and Larval Immunisation against Lactococcus garviae Infection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walaum) Lysozyme Activity and IgM Level. *Open Journal of Animal Sciences*; 3: 258-265.

Akhlaghi, M.; Keshavarzi, M. (2002). The occurrence of streptococcosis in the cultured rainbow trout of Fars province, *Iranian Journal of Veterinary Research*; 3: 183-189.

Akhlaghi, M.; Mahjor, A.A. (2004). Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin European Association of Fish*; 24(3): 132-136.

Al Harbi, A.H. (2011). Molecular characterization of *Streptococcus iniae* isolated from hybrid tilapia [*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*]. *Aquaculture*; 312: 15-18.

Allen, J.P.; Neely, M.N. (2011). The Streptococcus iniae transcriptional regulator CpsY is required for protection from neutrophil-mediated killing and proper growth in vitro. *Infection and Immunity*; 79: 4638-48.

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

Austin, B.; Robertson, P.A. (1993). Recovery of Streptococcus milleri from ulcerated koi carp (*Cyprinus carpio* L.) in the UK. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*; 13: 207-209.

Bercovier, H.; Ghittino, C.; Eldar, A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in Biological Standardization*; 90: 153-160.

Bromage, E.S. (1997). Streptococcus iniae, a bacterial infection in barramundi. Lates calcarifer Bloch. *Diseases of Aquatic Organisms dis Aquat Org.*; 36: 177-181

Brousseau, R.; Hill, J.E.; Préfontaine, G.; Goh, S.H.; Harel, J.; Hemmingsen, S.M. (2001). Streptococcus suis serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*; *67*(10), 4828-4833.

Buller, N. (2014). Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual, Department of Agriculture and Food Western Australia. (2nd edi.). Includes bibliographical references and index. ISBN 978-1-84593-805-5

Candice, M.; Justice, C.F.; Baiano, C.C.; Benedict, Y.; Fabian, A. (2012). Evolution of the Capsular Operon of Streptococcus iniae in Response to Vaccination. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 8219-8226.

Foo, J.T.; Ho, B.; Lam, T.J. (1985). Mass mortality in Siganus canaliculatus due to streptococcal infection. *Aquaculture*; 49: 185-196.

Holt, J.G.; Krieg, R.N.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (1993). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (9th ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, PP: 221-251.

Kayansamruaj, P.; Dong, H.T.; Nguyen, V.V.; Le, H.D.; Pirarat, N.; Rodkhum,

C. (2017). Susceptibility of freshwater rearing Asian seabass (Lates calcarifer) to pathogenic Streptococcus iniae. *Aquaculture Research*; *48*(2): 711-718.

Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A.; Evans, J.J. (1999). Efficacy of a killed Streptococcus iniae vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*; 19: 39-41.

Locke, J.B.; Aziz, R.K.; Vicknair, M.R.; Nizet, V.; Buchanan, J.T. (2008). Streptococcus iniae M-ike protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PloS One*; 3: 2824-2829.

Locke, J.B.; Colvin, K.M.; Varki, N.; Vicknair, M.R.; Nizet, V.; Buchanan, J.T. (2007). Streptococcus iniae beta-hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. Diseases of Aquatic Organisms; 76: 17-26.

Lowe, B.A.; Miller, J.D.; Neely, M.N. (2007). Analysis of the polysaccharide capsule of the systemic pathogen Streptococcus iniae and its implications in virulence. Infection and Immunity; 75: 1255-1264.

Lu, M. (2010). Review of research on streptococcosis in tilapia. South China Fisheries Science; 6: 75-79.

Mathew, G. (2009). Taxonomy, identification and biology of seabass (Lates calcarifer).

Mirzakhani A. (2009). Isolation of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae in* rainbow trout farms in Chahramahal va Bakhtiari Province by Multiplex PCR [Dissertation]. Shahrekord: Islamic Azad Univ.

Molloy, S. (2009). Bacterial immune evasion: an evasive surface. Nature Reviews Microbiology; 7: 762-772.

Nakanishi, T.; Kiryu, I.; Ototake, M. (2002). Vaccine development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. Vaccine; 20: 3764-9.

Nayak, S.K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research; 41: 1553-1573.

Nguyen, T.L.; Lim, Y.J.; Kim, D.H.; Austin, B. (2016). Development of real-time PCR for detection and quantitation of Streptococcus parauberis. *Journal of Fish Diseases*; *39*(1), 31-39.

Ooyama, T.; Kera, A.; Okada, T.; Inglis, V.; Yoshida, T. (1999). The protective immune response of yellowtail Seriola quinqueradiata to the bacterial fish pathogen Lactococcus garvieae. Diseases of Aquatic Organisms; 37: 121-126.

Paterson, B.D.; Rimmer, M.A.; Meikle, G.M.; Semmens, G.L. (2003). Physiological responses of the Asian sea bass, Lates calcarifer to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*, *218*(1-4), 717-728.

Robins, J.B.; Halliday, I.A.; Staunton-Smith, J.; Mayer, D.G.; Sellin, M.J. (2005). Freshwater-flow requirements of estuarine fisheries in tropical Australia: a review of the state of knowledge and application of a suggested approach. *Marine and Freshwater Research*; *56*(3), 343-360.

Singh, R.K. (2000). Growth, survival and production of Lates calcarifer in a seasonal rain fed coastal pond of the Konkan region. *Aquaculture*; *8*: 55-60.

Soltani, M.; Tarahomi, M. (2008). Study of *streptococcosis/lactococcosis* in some farmed rainbow trout in Fars province, Iran. The first International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran. p.124.

Soltani, M.; Alishahi, M.; Mirzargar, S.; Nikbakht, G. (2007). Vaccination of rainbow trout against Streptococcusiniae infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*; 7: 129-140.

Soltani, M.; Jamshidi, S.; Sharifpour, I.

(2005). Streptococcosis caused by Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (Oncorhynchys mykiss) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish*; 25(3): 95-106.

Suanyuk, N.; Sukkasame, N.; Tanmark, N.; Yoshida, T.; Itami, T.; Thune, R.L.; ...; Supamattaya, K. (2010). Streptococcus iniae infection in cultured Asian sea bass (Lates calcarifer) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. Songklanakarin Journal of Science & Technology, 32(4).

Wanman, C.H.; Tanmark, N.; Supamattaya, K. (2007). Production of killed vaccine from Streptococcus sp. and its application in sea bass (*Lates calcarifer*). *Songklanakarin* Journal of *Science* and *Technology*; 29: 1251-61.

Whitehead, P.J.; Wilson, B.A.; Bowman, D.M.J.S. (1990). Conservation of coastal wetlands of the Northern Territory of Australia: the Mary River floodplain. *Biological Conservation*; *52*(2): 85-111.

Wozniake, M. (1996). The Role of carotenoids in fish. *Protectio Aquarum Et Piscatoria*; 22: 65-75.