ردیابی باکتری زئونوز *لاکتوکوکوس گارویه* در گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان عرضه شده به بازار و ارزیابی ژنتیکی حدت جدایه‌ها

مهدی رئیسی*[1]، مهسا انصاری[2]

1. گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

2. سازمان جهاد کشاورزی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: *mehdi.raissy@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت: 1394/7/2 تاریخ پذیرش: 1394/9/10

چکیده

بیماری لاکتوکوکوزیس ناشی از باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* می‌باشد که امروزه پراکندگی جهانی دارد. این باکتری در گروه عوامل بیماریزای مشترک قرار می‌گیرد و قادر است بخصوص در افراد با سیستم ایمنی ضعیف ایجاد اندوکاردیت نماید. مطالعه حاضر با هدف ردیابی باکتری زئونوز *لاکتوکوکوس گارویه* در گوشت ماهیان قزل آلای رنگین کمان عرضه شده به بازار و ارزیابی حدت آنها انجام پذیرفت. بمنظور انجام این مطالعه تعداد 90 عدد ماهی تازه بصورت تصادفی انتخاب شد و نمونه برداری از گوشت صورت پذیرفت. تشخیص باکتری در ابتدا با کشت بر روی محیط BHIA و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز انجام پذیرفت. وجود ژن حدت باکتری مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج مطالعه نشان داد که از مجموع 9 جدایه شناسائی شده، 4 جدایه دارای ژن *cap* (44/4 درصد) مرتبط با حدت بودند. بر اساس نتایج بدست آمده، گوشت ماهیان قزل آلای عرضه شده به بازار می‌توانند به باکتری لاکتوکوکوس آلوده باشند که خطری برای مصرف کننده به حساب می‌آید. اگرچه میزان خطر به شرایط نگهداری و همچنین به عادات غذائی و روش پخت گوشت نیز بستگی دارد.

واژگان کلیدی: *لاکتوکوکوس گارویه*، گوشت، قزل آلای رنگین کمان، حدت.

مقدمه

لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری مهم لاکتوکوکوزیس امروزه یکی از مهمترین باکتری های مولد سپتی سمی در ماهیان به حساب می‌آید. در حال حاضر این بیماری را می‌توان مهمترین بیماری باکتریائی در ماهیان پرورشی ایران و همچنین بسیاری از نقاط دنیا دانست. بروز این گونه معمولاً با علائم حادی همانند رفتارهای عصبی، تیرگی بدن، بیرون زدن چشم‌ها همراه با خونریزی داخل چشم یا خونریزی داخلی یا سطحی بخصوص در نواحی آبششی، باله ها ظهور پیدا می‌کند. آسیب به ارگان‌های داخلی بخصوص کلیه، کبد و طحال مشهود است و بیماری معمولاً با تلفات زیادی همراه است. اگرچه نوع و شدت علائم به حدت سویه نیز بستگی دارد (Prieta et al., 2004). بیماری مذکور تاکنون در گونه‌های مختلف ماهی شامل مارماهی ژاپنی، کفال، کفشک، گیش دم زرد، تیلاپیا، گربه ماهی، زمرد ماهی و ماهی صخره گزارش شده است (Colorni et al., 2003., Lee et al., 2001., Chen et al., 2002., Ravelo et al., 2003., Colorni et al., 2003). یکی از حساسترین گونه ها قزل آلای رنگین کمان است و کپور معمولی نسبت به این بیماری مقاوم هستند (Eldar et al., 1995., Prieta et al., 2004). باکتری مورد اشاره از غیر آبزیان همانند بوفالو، گاو، سگ و گربه و یا فراورده‌های خام آنها همانند شیر گاو یا گوشت پرندگان نیز جدا شده است (Carvalho et al., 1997., Deveriese et al., 1999., Rantsiou et al., 2005., Barakat et al., 2000). بیماری لاکتوکوکوزیس در ماهی قزل آلا دارای پراکندگی جهانی است و در سالهای اخیر گزارشات فراوانی از شیوع آن در مناطق مختلف

منتشر شده است که از جمله می‌توان به گزارش بیماری در اسپانیا (Palacios et al., 1993)، ایتالیا (Ghittino et al., 1992)، استرالیا و افریقای جنوبی (Carson et al., 1993)، تایوان و انگلستان (Bark et al., 2001)، پرتغال (Pereira et al., 2004)، فرانسه و کشورهای منطقه بالکان (Eyngor et al., 2004)، ترکیه و کره جنوبی (Baeck et al., 2006) اشاره کرد. بیماری مذکور در ایران در سال 1381 برای نخستین بار در استان فارس گزارش شد (اخلاقی و کشاورزی، 1381) و سپس در سالهای 1387و 1388 نیز در استان فارس و چهارمحال و بختیاری (Soltani and Tarahomi, 2008; Raissy et al., 2009) گزارش گردید. پس از آن گزارشات مکرری از همه گیری بیماری در ایران وجود دارد. صرف نظر از بروز بیماری در ماهی، باید توجه داشت که این باکتری در انسان نیز توان بیماریزائی دارد بطوریکه *لاکتوکوکوس گارویه* را در گروه عوامل مشترک بیماریزای انسان و ماهی قرار می‌دهند چراکه این باکتری یکی از عوامل بروز اندوکاردیت بخصوص در افراد مسن، کودکان و یا افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف می‌باشد و موارد وقوع آن قبلا گزارش شده است (Fefer et al., 1998). مطالعه حاضر با هدف ردیابی باکتری ژئونوز *لاکتوکوکوس گارویه* در گوشت ماهیان قزل آلای رنگین کمان عرضه شده به بازار و ارزیابی حدت آنها با توجه به احتمال بیماریزائی برای انسان انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

بمنظور انجام این مطالعه تعداد 90 عدد ماهی بصورت تصادفی از سطح بازار انتخاب شد و در شرایط مناسب و در کنار یخ و در کوتاهترین زمان به آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. در آزمایشگاه نمونه برداری از گوشت ماهی بصورت استریل صورت پذیرفت. تشخیص باکتری در ابتدا با کشت بر روی محیط BHIA انجام پذیرفت. آزمونهای بیوشیمیایی بر اساس روش Austin and austin,1999 بمنظور شناسایی اولیه باکتری از بین کوکو باسیل های گرم مثبت جدا شده از ماهیان انجام شد. در نهایت بمنظور تشخیص قطعی باکتری‌های مشکوک از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز استفاده شد. برای این منظور، استخراج DNA از جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج فرمنتاز و با توجه به دستورالعمل کیت انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل یک درصد آگارز مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از زوج پرایمر مندرج در جدول 1 با هدف تکثیر قطعه ژنی *16S rRNA* بر اساس دستورالعمل (Zlotkin et al., 1998) و در کنار نمونه مثبت انجام شد. مراحل PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکر Eppendorf و با برنامه واسرشته سازی اولیه بمدت 4 دقیقه (95 درجه سانتی گراد)، واسرشته سازی بمدت 1 دقیقه (94 درجه سانتی گراد)، اتصال بمدت 1 دقیقه (57 درجه سانتی گراد)، طویل شدن بمدت 1 دقیقه (72 درجه سانتی گراد)، سپس تکرار مراحل 2 الی 4 به تعداد 30 چرخه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی بمدت 5 دقیقه (72 درجه سانتی گراد) طی شد. سپس الکتروفورز انجام شد و پس از مطالعه باند بدست آمده، نتیجه با عکسبرداری از ژل ثبت گردید. بمنظور صحت سنجی واکنش زنجیرهای پلی مراز اقدام به تعیین توالی باند بدست آمده و بلاست توالی محصول در بانک جهانی ژن گردید که نتایج بدست آمده صحت پروسه فوق را تائید نمود. در ادامه بمنظور مطالعه حدت جدایه‌ها اقدام به بررسی ژن حدت آنها با استفاده از PCR و زوج پرایمرهای مندرج در جدول 1 و با دستورالعمل Miyauchi et al., 2012 شد.

جدول 1- خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه بمنظور تشخیص باکتری

توالی پرایمر	اندازه باند	ژن هدف
PLG-F (5-CATAACAATGAGAATCGC-3) PLG-R (5-GCACCCTCGCGGGTTG-3)	1100 جفت باز	16S rRNA
F (5'-GCTGTCATCATATTGTGTCCA-3') F (5'-CTATGGCATTAGTCAGGAAG-3')	747 جفت باز	*Cap*

نتایج

نمونه گوشت 90 ماهی تازه جمع آوری شده از سطح بازار مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نتایج حاصل، تعداد 16 عدد کوکوباسیل گرم مثبت با خصوصیات بیوشیمیائی منطبق با *لاکتوکوکوس گارویه* جداسازی شد (جدول 2) که تشخیص 9 جدایه (56/2 درصد موارد مشکوک) با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و و مشاهده باند 1100 جفت بازی به اثبات رسید. در ادامه جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* برای ژن حدت مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که از مجموع 9 جدایه بدست آمده، چهار جدایه دارای ژن حدت می‌باشد.

جدول 2- خصوصیات بیوشیمیائی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه

آزمون	*لاکتوکوکوس گارویه*
گرم	+
شکل	کوکوباسیل
کاتالاز	-
اکسیداز	-
همولیز	آلفا
تحرک	-
VP	-
گلوکز	+
مالتوز	+
مانیتول	+
آرابینوز	-
آرژنین	+
سوربیتول	+
آسکولین	+
اوره	-
سوکروز	+

بحث

در بین بیماری‌های باکتریائی در ماهیان، لاکتوکوکوزیس هم از لحاظ شیوع جهانی و هم بدلیل تلفات زیاد اهمیت خاصی دارد. این گونه بهمراه باکتری‌های جنس استرپتوکوکوس همانند *استرپتوکوکوس یوبریس*، *استرپتوکوکوس پارایوبریس*، *استرپتوکوکوس اینیائی*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *استرپتوکوکوس دیفیسیل* عامل مهم بروز سپتی سمی و تلفات بالا در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شوند. بدلیل شباهت زیاد علائم ظاهری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس، تشخیص تفریقی تنها با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و بخصوص مولکولی امکان پذیر است ولی در هر صورت بدلیل شباهت زیاد در منظره بالینی، معمولا هر دو بیماری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس با هم مورد اشاره قرار می‌گیرند. این شباهت در حدی است که باکتری

لاکتوکوکوس را در ابتدا بعنوان گونه ای از جنس استرپتوکوکوس شناسائی می کردند در سال 1985 از جنس استرپتوکوکوس تفکیک شد (Schleifer et al., 1985). نخستین همه گیری بیماری در مزارع پرورش ماهی کشور اسپانیا در سال 1988 گزارش شد (Palacios et al., 1993) و پس از آن همه گیری های متعددی از کشورهای مختلف گزارش شد (Bark et al., 2001; Eyngor et al., 2004; Pereira et al., 2004; Baeck et al., 2006). در ایران نیز تاریخچه بروز این بیماری به سال 1381 باز می گردد که نخستین بار در استان فارس گزارش گردید (اخلاقی و کشاورزی، 1381). با گسترش پرورش متراکم ماهی قزل آلا در سالهای اخیر شاهد افزایش درگیری ماهیان با این بیماری بوده‌ایم. در حال حاضر بیماری در اکثر نقاط کشور وجود دارد و عامل مهم مرگ و میر و تلفات در ماهیان پرورشی قزل آلای رنگین کمان بخصوص در استانهای پرتولید کشور محسوب می-شود (Soltani et al., 2008). مطالعه سلطانی و همکاران در سال 1387 نشان داد که 20 درصد از مجموع 600 کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل آلای پرورشی را گونه *لاکتوکوکوس گارویه* تشکیل می دهد و مابقی مربوط به جنس استرپتوکوکوس بوده است. مطالعه میرزاخانی (1387) نشان داد که از مجموع 20 جدایه کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری 11 مورد *لاکتوکوکوس گارویه* و 3 مورد *استرپتوکوکوس اینیائی* بودند.

بیماری ناشی از این باکتری در انسان قبلا با علائمی همچون درگیری دستگاه ادراری، خون، ضایعات جلدی و آسیب‌های تنفسی و همچنین مواردی از ادنوکاردیت گزارش شده است که بنظر می‌رسد پس از مصرف فراورده‌های خام یا تازه دریائی بوده است. با توجه به اینکه لاکتوکوکوزیس یک سپتی سمی حاد در ماهیان محسوب می‌شود، لذا در صورتی‌که بطور ناقص درمان شوند و به بازار عرضه گردند می توانند منجر به بروز آلودگی در شخص مصرف کننده شوند. بطوریکه باکتری در گوشت ماهی تازه باقی می‌ماند و از راه گوارشی به بدن شخص وارد می‌شود. در این مطالعه، گوشت 90 ماهی تازه جمع آوری شده از سطح بازار مورد مطالعه قرار گرفت و 9 جدایه *لاکتوکوکوس گارویه* جداسازی و تشخیص داده شد که حاکی از این است که این باکتری می‌تواند از طریق مصرف ماهی خام به بدن انسان راه یابد. باید توجه داشت که باکتری مذکور در شرایط انجماد و یا تحت تاثیر دمای پخت از بین می‌رود لذا کامل پختن ماهی در این زمینه نقش مهمی دارد.

منابع

1. اخلاقی، م. و کشاورزی، م. (1381). وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلای استان فارس. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران. 3 (2): 183-189.
2. میرزاخانی، ع. (1387). تشخیص *Streptococcus iniae* و *Lactococcus iniae* با استفاده از روش Multiplex PCR در ماهیان قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری. پایان نامه برای دریافت دکترای دامپزشکی، دانشگاه آزا داسلامی واحد شهرکرد.
3. Austin, B., Austin, D. A. (1999) Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish, Fourth ed. Springer, Bristol. pp: 121-129.
4. Baeck, G. W., Kim, J. H., Gomez, D. K., Park, S. C. (2006) Isolation and characterization of *Streptococcus sp*. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. J Vet Sci. 7: 53–8.
5. Barakat, R. K., Griffiths, M. W., Harris, L. J. (2000) Isolation and characterization of Carnobacterium,

intramammary infections in dairy cows.Vet Microbiol. 70:87–94.
13. Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitcz, A., Bercovier, H. (1995) Experimental *streptococcal* meningoencephalitis in cultured fish. Vet Microbiol. 43: 33–40.
14. Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D. G., Chilmonczyk, S., et al. (2004) Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. Appl Environ Microbiol. 70:5132–7.
15. Fefer, J. J., Ratzan, K. R., Sharp, S. E., Saiz, E. (1998) *Lactococcus garvieae* endocarditic: report of a case and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 32:127–30.
16. Ghittino, C., Prearo, M. (1992) Report of *Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: preliminary note. Boll Soc It Patol Ittica. 8:4–11.
17. Kang , S., Shin, G., Shin, Y., Palaksha, K. J., Kim, Y., Yang, H., et al. (2004) Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). J Vet Sci. 5(4):387–90.
18. Kawanishi, A., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., et al. (2005) Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured Seriola (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. Lett Appl Microbiol. 40: 322–8.
19. Lee, D. C., Lee, J. I., Park, C. I., Park, S. I. (2001) The study on the causal agent of *streptococcosis* (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fish. J Fish Pathol. 14:71–80.
20. Palacios, M. A., Zamora, M. J., Va squez, J., Zamora, E., Duran, A. *Lactococcus*, and *Enterococcus sp*. from cooked, modified atmosphere, packaged, refrigerated poultry meat. Int J Food Microbiol. 62:83–94.
6. Bark, S., Mc Gregor, D. (2001) The first occurrence of *lactococcosis* in farmed trout in England. Trout News. 31: 9–11.
7. Carson, J., Gudkovs, N., Austin, B. (1993) Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). J Fish Dis. 6: 381–8.
8. Carvalho, M. G., Vianni, M. C., Elliot, J. A., Reeves, M., Facklam, R. R., Teixeira, L. M. (1997) Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. Adv Exp Med Biol. 418:401–4.
9. Chen, S. C., Lin, Y. D. (2001) *Lactococcus garvieae* infections in the giant fresh water prawn *Macrobranhium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing, Dis. Aqua. Org; 45: pp. 45-52.
10. Chen, S. C., Liaw, L. L., Su, H. Y., Ko, S. C., Wu, C. Y., Chaung, H. C., et al. (2002) *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, Mugil cephalus L., in Taiwan. J Fish Dis. 25:727–32.
11. Colorni, A., Ravelo, C., Romalde, J. L., Toranzo, A. E., Diamant, A. (2003) *Lactococcus garvieae* in wild Red Sea wrasse *Coris aygula* (Labridae). Dis Aquat Org. 56:275–8.
12. Deveriese, L. A., Hommez, J., Laevens, H., Ban˜ adme, P., Haesebrouck, F. (1999) Identification of aesculinhydrolyzing *streptococci* and *enterococci* from subclinical

(1993) *Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. Boll Soc It Patol Ittica. 13:11–6.

21. Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. (2004) *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. Bull Eur Ass Fish Pathol. 24:274–9.
22. Raissy, M., Ansari, M., Goudarzi, M. A. (2009) Using PCR for Detecting *Lactococcus garvieae*, Asian Pacific Aquaculture 2009, Malaysia.
23. Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., et al. (2005) Culture-dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. Appl Environ Microbiol. 71:1977–86.
24. Ravelo, C., Magarin˜ os, B., Lo´ pez-Romalde, S., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. (2003) Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol. 41: 751–6.
25. Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D., Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related *streptococci* to the genus *Lactococcus* gen nov. Syst Appl. 6:183–95.
26. 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.
27. Soltani, M., Nikbatht, GH., Mousavi, H., Ahmadzadeh, N. (2008) Epizootic outbreak of *lactococcosis* caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 28 (5): 207-212.
28. Zlotkin, A., Eldar, C., Ghittino, H., Bercovier. (1998) Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol. 36:983-985.

Detection of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout meat with genetic evaluation of virulence gene

Raissy M[*1]., Ansari M[2]

1. Department of Aquatic Animals Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Agricultural Association, Shahrekord, Iran.

[*]**Corresponding author:** *mehdi.raissy@iaushk.ac.ir*

Abstract

Lactococcosis which is caused by *Lactococcus garvieae* is now widespread. This species is categorized in zoonosis agents and is able to cause endocarditis especially in immunosuppressed persons. This study was done to detect *Lactococcus garvieae* in rainbow trout meat collected from market and to evaluate the virulence of the isolates. A total of 90 fresh fish were randomly selected and were transferred to the laboratory in appropriate conditions. The bacteria were investigated in meat samples by culture on BHIA and then PCR. Presence of virulence gene in the isolates were studied and the results revealed that 4 isolates of a total of 9 collected isolates harbored *cap* virulence gene (44.4%). According to the results, rainbow trout meat can be contaminated with *Lactococcus garvieae* which is a danger for consumer. However, it depends on the nutritional habits and methods of reservation.

Keywords: *Lactococcus garvieae*, Rainbow trout, meat, virulence.