شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

صفحات ۴۰۶-۳۹۷

# ارزیابی ژن‌های حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز) در بیماری‌زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

*مهتاب خلفیان*[1]، *مصطفی اخلاقی*[2]، *حسن شریفی یزدی*[3]، *مجتبی علیشاهی*[4]

۱. *دانشجوی دکتری بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.*

۲. *استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.*

۳. *دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.*

۴. *دانشیار گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، داشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.*

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۸/۱۷**

## چکیده

آئروموناس هیدروفیلا عامل بیماری سپتی سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین مخصوصاً کپورماهیان می‌باشد. این باکتری تحت تاثیر چندین فاکتور، ایجاد بیماری می‌کند که مکانیسم‌های ایجاد بیماری توسط این باکتری ناشناخته است. ژن‌های حدت مهمترین فاکتور بیماری‌زایی در باکتری آئروموناس هیدروفیلا می‌باشند. در این مطالعه ۳۰ جدایه باکتری با روش‌های بیوشیمیایی رایج و ردیابی ناحیه ژنی 16S rDNA از طریق PCR به‌عنوان آئروموناس هیدروفیلا شناسایی گردید. بعد از تایید ۳۰ جدایه، تشخیص و بررسی ژن‌های حدت (آئرولیزین *aerA*، الا ستاز *ahyB* و لیپاز *Lip*) با پرایمرهای اختصاصی هر ژن در آئروموناس هیدروفیلا صورت گرفت. بیشترین فراوانی (۷۰٪) متعلق به ژن الاستاز بوده و ژن آئرولیزین نیز کمترین فراوانی را (۵۳/۳٪) نشان داد. براساس وضعیت حضور این سه ژن حدت با روش PCR، هشت الگوی ژنی مختلف برای جدایه‌های باکتری حاصل گردید، به‌نحوی که الگوی ژنی $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ از بیشترین فراوانی (۳۳/۳٪) و الگوی ژنی $lip^{+}/ahyB^{-}/aerA^{+}$ از کمترین فراوانی (۳/۳٪) برخوردار بود. پس از چالش بچه ماهی‌های کپور معمولی با آئروموناس هیدروفیلاهای دارای هر یک از ۸ الگوی ژنی مختلف میزان تلفات در گروه ها مشخص گردید. بیشترین تلفات در بچه ماهی های تزریق شده با الگوهای ژنی $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{-}$ و $lip^{-}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ نسبت به دیگرگروه‌ها و گروه کنترل مشاهده شد. در ماهیان تلف شده علائم تیرگی بدن، کوتاه شدن سرپوش آبششی و خونریزی پتشی در ناحیه شکمی و مقعد مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌های حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز) بیماری زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا را افزایش می‌دهند. در این میان ژن الاستاز می‌تواند از اهمیت بیشتری در بیماری‌زایی جدایه‌های آئروموناس هیدروفیلا در آبزیان برخوردار باشد.

**واژگان کلیدی:** آئروموناس هیدروفیلا، آئرولیزین، الاستاز، لیپاز، PCR، ماهی کپور معمولی.

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۹۳۹۴۳۷۳۸۷۲+ ایمیل: m.khalafiyan@gmail.com

## ۱. مقدمه

آئروموناس‌ها از عوامل باکتریایی هستند که به صورت بسیار پنهان خسارات گسترده‌ای را به مزارع پرورش ماهی وارد می‌نمایند. در نتیجه برای کنترل تلفات آن‌ها علاوه بر رعایت اصول بهداشتی، جلوگیری از ایجاد استرس، عدم افزایش مواد آلی و رعایت اصول قرنطینه و افزایش سطح ایمنی در ماهی‌ها ضروری به نظر می‌رسد (Soltani, 2002; Mokhayer, 2006). آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری هتروتروف، گرم منفی، میله‌ای شکل و متحرک است که به‌وسیله یک تاژک قطبی حرکت می‌کند و به‌طور عمده در مناطقی با آب و هوای گرم یافت می‌شود. این باکتری در آب های شیرین و لب شور و همچنین محیط‌های هوازی و بی‌هوازی قادر به زندگی می‌باشد (Adanir and Turutoglu, 2007). بیماری‌زایی آئروموناس‌ها ترکیبی از یک سری فاکتورها می‌باشد که شامل ساختار لیپوپلی ساکاریدی سلول، لایه خارجی پروتئین، پیلی و تاژک است که این ساختار به باکتری در جهت چسبندگی به سطوح، مقاومت در برابر فاگو سیتوز و ترشح و تولید پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و سموم کمک می‌کند. مکانیسم بیماری‌زایی آئروموناس هیدروفیلا به شناسایی فاکتورهای حدت بستگی دارد (Yu *et al.*, 2004). بیماری‌زایی آئروموناس هیدروفیلا توسط ترشح پروتئین های خارج سلولی مثل آئرولیزین، لیپاز، الاستاز، آمیلاز، کیتیناز، گلاتیناز، همولیزین و انتروتوکسین ها ایجاد می‌شوند (Merino *et al.*, 1995, Pemberton *et al.*, 1997). تعدادی از این پروتئین‌ها توسط ژن های حدت در ژنوم آئروموناس هیدروفیلا کد می‌شوند. یکی از مهمترین فاکتور حدت در این باکتری آئرولیزین (همولیزین) است که توانایی لیز کردن گلبول‌های قرمز خون را دارد آئرولیزین در حدود ۹۱٪ در آئروموناس هیدروفیلا شناسایی شده است. از دیگر ژن‌های حدت مهم این باکتری می توان از الاستاز و لیپاز نام برد (Singh *et al.*, 2013). لیپاز نیز یکی از ژن‌های حدت مهم آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد زیرا این ژن ساختار غشایی سیتوپلاسمی را تغییر می‌دهد و در کنار ژن آئرولیزین حدتش افزایش می یابد (Nawaz *et al.*, 2010). لیپاز یکی از مهمترین فاکتورهای حدت آئروموناس هیدروفیلا در ایجاد اسهال در بچه ها می‌باشد (Kingombe *et al.*, 2010). الاستاز (*ahyB*) با فعالیت های الاستولایتیکی خود نقش مهمی در تهاجم و ایجاد عفونت بازی می‌کند (Janda and Abbott, 2010).

آئروموناس هیدروفیلا عامل اصلی سپتی سمی هموراژیک در ماهیان آب‌شیرین از قبیل کپور ماهیان، مارماهی، شیرماهی، گربه‌ماهی کانالی، تیلاپیا و آیو می‌باشد. همچنین با بیماری لکه قرمز، پوسیدگی باله و سندروم زخم همه‌گیر (EUS) که در کشورهای آسیای جنوب شرقی، مشکل بزرگی محسوب می‌شود، در ارتباط است (Nielsen *et al.*, 2001; Peyghan *et al.*, 2010; Swaminathan *et al.*, 2004). اگر چه این باکتری معمولاً پاتوژن ثانویه است، اما در مواقعی نیز به‌صورت اولیه عامل مرگ و میر زیادی در مزارع پرورش ماهی می‌باشد و به‌عنوان یکی از عوامل مهم بیماری‌زا ماهی گرمابی مطرح است (Pridgeon *et al.*, 2011). آئروموناس‌ها از کپور معمولی در استان فارس جداسازی شده‌اند (Akhlaghi, 2001). همچنین باکتری آئروموناس هیدروفیلا از ماهی چشم قورباغه‌ای بیمار نیز جداسازی و با روش‌های بیوشیمیایی تایید گردیده است (Akhlaghi and vafaei, 2003). امروزه به سبب زمان بر بودن روش‌های بیوشیمیایی از تشخیص‌های مولکولی از جمله PCR به‌دلیل دقت و سرعت بالا به‌طور وسیعی جهت تشخیص گونه باکتری و ژن‌های حدت آن استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه شناسایی ژن‌های حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز) در جدایه‌های آئروموناس هیدروفیلا حاصل از آبزیان و همچنین ارزیابی بالقوه این ژن‌ها در بیماری‌زایی درون جاندار (*in vivo*) در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می‌باشد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. نمونه‌برداری و جداسازی باکتری

در این تحقیق ۳۰ جدایه باکتری مشکوک به آئروموناس هیدروفیلا که تمام جدایه‌ها از نمونه ماهی و سخت‌پوستان با نشانه‌های سپتی سمی هموراژیک و زخم در بدن جداسازی شده بود به بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز منتقل شدند.

**جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص آئروموناس هیدروفیلا و ژن‌های حدت آئرولیزین، الاستاز و لیپاز**

| ژن هدف | نام پرایمر | توالی پرایمر (5'→3') | وزن محصول (جفت باز) | منبع |
|---|---|---|---|---|
| 16S rDNA | 16S-rDNA-F<br>16S-rDNA-R | GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA<br>CGTGCTGGCAACAAAGGACAG | ۶۸۵ | Dorsch *et al.*, 1994 |
| *Elastase* | ahyB-F<br>ahyB-R | ACACGGTCAAGGAGATCAAC<br>CGCTGGTGTTGGCCAGCAGG | ۵۴۰ | Keya Sen, 2005 |
| *Lipase* | lip-F<br>lip-R | ATCTTCTCCGACTGGTTCGG<br>CCGTGCCAGGACTGGGTCTT | ۳۸۳ | Keya Sen, 2005 |
| *Aerolysin* | aerA-F<br>aerA-R | CAAGGAGGTCTGTGGCGACA<br>TTTCACCGGTAGCAGGATTG | ۲۰۹ | Xia *et al.*, 2004 |

جدایه‌ها در محیط اختصاصی TSA در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد، در صورت مثبت بودن کشت، باکتری‌های مظنون خالص‌سازی گردیدند و پس از انجام برر سی‌های اولیه شامل رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی رایج اقدام به جداسازی باکتری های مشکوک به آئروموناس هیدروفیلا شد.

## ۲.۲. استخراج DNA

برای جداسازی و استخراج DNA باکتری‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد. بدین منظور یک کلونی از باکتری را به ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و به مدت ۱ دقیقه ورتکس کرده سپس به مدت ۷ دقیقه در دستگاه ترمو سایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده بعد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد آن گاه مایع رویی در میکروتیوپ های استریل برای انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Carvalho-Castro *et al.*, 2010). از آب مقطر استریل شده نیز جهت کنترل منفی، در مراحل استخراج استفاده شد.

## ۳.۲. پرایمرها

جهت تشخیص جنس و گونه آئروموناس هیدروفیلا از پرایمر اختصاصی 16S rDNA که قبلاً طراحی شده بود استفاده گردید و اختصاصیت پرایمر بر روی تمام توالی‌های موجود در پایگاه GenBank با استفاده از برنامه جستجوی (BLAST) بررسی گردید (جدول ۱). سه ژن حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز) باکتری آئروموناس هیدروفیلا نیز با استفاده از برنامه BLAST موجود در پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفتند (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (جدول ۱). در مطالعه حاضر استفاده از پرایمرهای حدت به‌منظور تکثیر ژن‌های حدت باکتری آئروموناس هیدروفیلا، در قالب روش PCR صورت گرفته شد. از جدایه‌های باکتری آئروموناس هیدروفیلا JF313402 و JF313401 جهت کنترل مثبت در این مطالعه استفاده شد.

## ۴.۲. PCR تعیین گونه و ژن‌های حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز)

برای PCR تعیین گونه آئروموناس هیدروفیلا و همچنین جهت شناسایی ژن های حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز) از حجم واکنش ۲۰ میکرولیتری استفاده گردید. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی ۱۰ میکرولیتر مستر میکس 2X، ۱۰-۱۵ پیکومول از هر پرایمر (سیناژن- ایران)، ۱ میکرولیتر از DNA باکتری (تقریبا معادل ۶۰ نانوگرم) و از آب مقطر استریل برای رساندن حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر استفاده گردید. مستر میکس‌های استفاده شده برای PCR مستر میکس قرمز 2X (Ampliqon, Denmark) که حاوی (Tris-HCl با پی اچ ۸/۵، (NH4) 2S04، ۳ میکرومولار $MgCl_2$ ، ۰/۲٪ Tween 20 ، ۰/۴ میکرومولار dNTPs ، ۰/۲ واحد بر میکرولیتر (Ampliqon Taq DNA polymerase) استفاده گردید. مقدار پرایمر برای PCR ژن های حدت به صورت جداگانه به شرح زیر است: ۱۵ پیکومول برای پرایمر های (آئرولیزین)

**جدول ۲- برنامه دمایی PCR برای تشخیص آئروموناس هیدروفیلا و ژن‌های حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز)**

| ردیف | مرحله | دما | زمان | تعداد سیکل |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | واسرشت سازی اولیه | ۹۴ | ۷ دقیقه | ۱ |
| ۲ | واسرشت سازی | ۹۵ | ۱ دقیقه | ۳۴ |
| ۳ | الحاق | ۶۳ | ۴۵ ثانیه | ۳۴ |
| ۴ | گسترش | ۷۲ | ۴۵ ثانیه | ۳۴ |
| ۵ | گسترش نهایی | ۷۲ | ۵ دقیقه | ۱ |

*aerAF* و *aerAR* و ۱۰ پیکومول برای پرایمر های (لیپاز) *lipF, lipR* و (الاستاز) *ahyBF*، *ahyBR*. جهت تکثیر ژن های هدف، پس از بهینه‌سازی از برنامه دمایی درج شده در جدول (۲) استفاده شد. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن‌های مورد هدف در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰bp(سیناژن- ایران) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ Red Safe (Intron Biotechnology, Korea) در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ترانس ایلومیناتور باندهای تشکیل شده، مشاهده و ثبت گردید.

## ۵.۲. شناسایی مشخصات مختلف جدایه‌های باکتری بر اساس ترکیب حضور ژن‌های مختلف حدت

بعد از انجام واکنش PCR و تعیین ژنهای حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز) با پرایمر های اختصاصی، اقدام به تعیین الگوهای مختلف حدت ژنی در جدایه‌های باکتری آئروموناس هیدروفیلا بر اساس حضور یا عدم حضور ژن‌های مورد مطالعه گردید.

## ۶.۲. تهیه و ذخیره سازی بچه ماهی‌ها

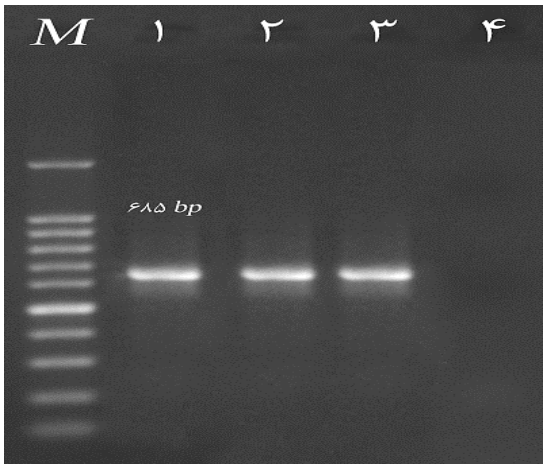
این تحقیق تعداد ۵۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۱۵ تا ۲۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهی کپور استان فارس خریداری و با تانکر مخصوص حمل بچه ماهی مجهز به کپسول اکسیژن به بخش آبزیان منتقل شد. قبل از شروع چالش باکتریایی بچه ماهیان به مدت ۱۰ روز نگهداری و با شرایط جدید سازش داده شدند، همچنین در طول این مدت ماهیان به‌طور مرتب غذادهی شده و با محلول نمک طعام ۵ درصد ضد عفونی شدند. در طول مدت نگهداری بچه ماهی‌ها آب حوضچه‌های پرورشی با دبی پنج لیتر در دقیقه جاری بوده و میانگین دما، اکسیژن محلول و pH آنها به‌صورت روزانه اندازه گیری و ثبت شد.

## ۷.۲. کشت باکتری با الگوهای حدت مختلف و آماده‌سازی آن جهت چالش باکتریایی

برای این منظور از یک ارلن ۲۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت (BHI) استفاده شد. پس از کشت باکتری، ارلن حاوی محیط کشت در شرایط هوازی درون انکوباتور شیکردار (ساخت شرکت N-Biotek, INC کره جنوبی)، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵ rpm به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از رشد باکتری محتویات ارلن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفیوژ و دو بار به کمک بافر PBS استریل شستشو داده شد. در مرحله آخر سوسپانسیونی از باکتری در بافر استریل PBS تهیه و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند تراکم باکتری $10^7$ تنظیم شد (Brunt and Austine, 2005).

## ۸.۲. چالش باکتریایی

جهت تزریق درون صفاقی، ماهی ها به ۹ گروه (۸ گروه برای تزریق و یک گروه کنترل) ۱۰ قطعه‌ای (از هر گروه ۳ تکرار) تقسیم‌بندی شدند. سپس به میزان ۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون ازحجم باکتری در دوز $10^7$ در ۰/۹ درصد سالین به صورت داخل صفاقی



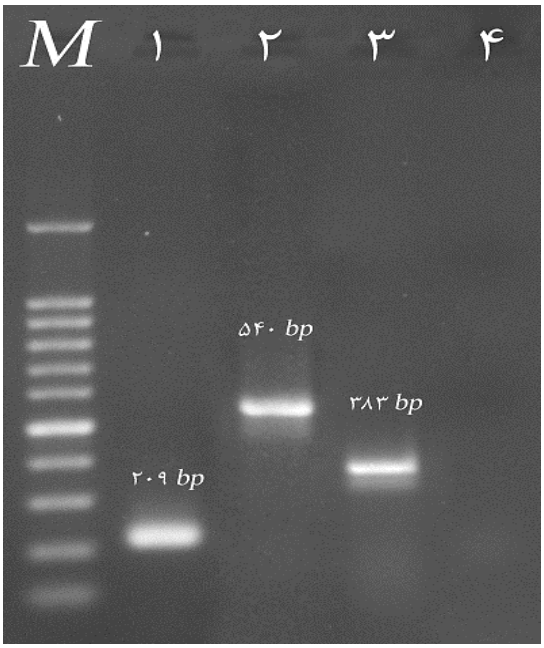

**شکل ۱- الکتروفورز محصولات اختصاصی PCR حاصل از ژن 16S rDNA گونه‌ی آئروموناس هیدروفیلا بر روی ژل آ گارز ۱/۵٪ (M) نرد بان ژ نی bp ۱۰۰ چا هک ۲و ۳: محصـــولات حاصـــل از جدایه های آئروموناس هیدروفیلا (bp ۶۸۵) چاهک ۱: کنترل مثبت چاهک ۴: کنترل منفی.**

از الگو های مختلف حدت به ماهی تزریق شـــد (Orozova *et al.*, 2009). در روش غوطه‌وری هم هر گروه در معرض باکتری با دوز $۱۰^{۷}$ به مدت ۳ دقیقه قرار داده شد. در روش خوراکی هر گروه با دوز $۱۰^{۷}$، با انتقال لوله با درون دستگاه گوارش و خوراندن به ماهی کپور چالش داده شـــد. غذادهی در زمان بعد از چالش طبق روند قبل صورت گرفت. ماهی‌ها پس از چالش مرتباً تغذیه و تا پنج روز بعد رفتارها و حالات آنها زیر نظر گرفته شـــد و تلفات هر روز شـــمارش و ثبت گردید (Akhlaghi and vafaei, 2003).

## ۳. نتایج

### ۱.۳. نتایج تشـــخیص آئرومو ناس هیدروفیلا و رد یابی ژن های حدت (آئرولیزین، الاســـتاز و لیپاز) با استفاده از PCR

پس از تایید مولکولی ۳۰ جدا یه آئرومو ناس هیدروفیلا با ا ستفاده از پرایمرهای اخت صا صی ناحیه ژنی 16S rDNA، حضور و فراوانی هر سه ژن حدت به کمک PCR مشخص شد (شکل‌های ۱ و ۲). میزان فراوانی ژن الاســـتاز، ۷۰٪ (۲۱ جدایه از ۳۰ جدایه)، ژن لیپاز، ۶۳/۳٪ (۱۹ جدا یه از ۳۰ جدا یه) و ژن آئرولیزین، ۵۳/۳٪ (۱۶ جدایه از ۳۰ جدایه) مشـــخص




**شکل ۲- الکتروفورز مح صولات PCR حا صل از ژن های حدت (آئرولیزین، الا ستاز و لیپاز) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ (M) نرد بان ژنی bp ۱۰۰ چا هک ۱: جدا یه دارای ژن آئرولیزین (bp ۲۰۹)؛ چاهک ۲: جدایه دارای ژن الاســـتاز (bp ۵۴۰)؛ چا هک ۳: جدا یه دارای ژن لیپاز (bp ۳۸۳)؛ چاهک ۴: کنترل منفی.**

شـــد. در مجموع هشـــت الگوی ژنی مختلف از ژن‌های حدت (آئرولیزین، الا ستاز و لیپاز) در میان جدایه‌های مورد مطالعه به‌دست آمد که این الگوهای ژنی مختلف شامل: $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ با فراوانی ۳۳/۳ در صد (۱۰ جدا یه از ۳۰ جدا یه)، $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{-}$ با فراوانی ۲۳/۳ درصـــد (۷ جدایه از ۳۰ جدایه) ، $lip^{-}/ahyB^{-}/aerA^{-}$ با فراوانی ۱۶/۶ درصـــد (۵ جدایه از ۳۰ جدا یه) ، $lip^{-}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ با فراوانی ۱۰ درصد (۳ جدایه از ۳۰ جدایه)، $lip^{-}/ahyB^{-}/aerA^{+}$ با فراوانی ۶/۶ درصـــد (۲ جدا یه از ۳۰ جدا یه)، $lip^{-}/ahyB^{+}/aerA^{-}$ و $lip^{+}/ahyB^{-}/aerA^{-}$ و $lip^{+}/ahyB^{-}/aerA^{+}$ هر کدام در ۱ جدایه با فراوانی ۳/۳ درصـــد بودند (شکل ۲).

### ۲.۳. عفونت تجربی (چالش باکتریایی)

در طول چالش باکتر یایی، هیچ نشـــا نه‌ای از بیماری و مرگ و میر در گروه کنترل مشـــاهده نشـــد. میزان تلفات در گروه های مختلف متفاوت بوده و از گروه‌های بدون تلفات در روز اول تا ۷۰٪ تلفات متغیر بود. تجزیه و تحلیل نهایی چالش حاصـــل از تزریق باکتریایی نشان داد، گروهی که با باکتری دارای الگوی

**شکل ۳- کوتاه شدن سرپوش آبششی در بچه ماهیان کپور تزریق شده با باکتری که دارای ژن الاستاز.**

ژنی $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{-}$ تزریق شدند در روز اول بیشترین میزان تلفات (۷۰٪) را نشان دادند و سپس به ترتیب گروه‌هایی که با باکتری‌های دارای مشخصات ژنی $lip^{-}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ و $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ تزریق شدند در روز اول تلفات ۵۰٪ و ۴۰٪ داشتند. در ماهی‌های تلف شده علائم تیرگی بدن، کوتاه شدن سرپوش آبششی (شکل ۳) و خونریزی پتشی در ناحیه شکمی و مخصوصاً مقعد دیده شده. سایر گروه هایی که در الگوی ژنی باکتری های تزریقی آن ژن الاستاز مثبت بود نیز کوتاه شدن سرپوش آبششی مشخصاً وجود داشت. در گروهی که با باکتری بدون هیچ یک از ژن‌های حدت چالش داده شد در روز اول تنها ۱۰٪ تلفات مشاهده شد ولی تمامی ماهی‌های تلف شده فاقد علائم بیماری بودند. باکتری های دارای الگوی ژنی $Lip^{+}/ahyB^{-}/aerA^{-}$ و $Lip^{+}/ahyB^{-+}/aerA$ کمترین تلفات را به دنبال تزریق در ماهی داشتند. سه گروه از باکتری با الگوی ژنی $lip^{-}/ahyB^{+}/aerA^{+}$، $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ و $lip^{+}/^{-}/ahyB^{+}/aerA$ را به‌صورت خوراکی و غوطه‌وری به ماهی داده شد. در چالش باکتری‌های دارای الگوهای ژنی مختلف $lip^{-}/ahyB^{+}/aerA^{+}$، $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ و $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{-}$ در ماهی در روش خوراکی و غوطه‌وری هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نشد.

## ۴. بحث و نتیجه گیری

آئروموناس هیدروفیلا به‌طور گسترده در همه محیط ها یافت می‌شود و با ایجاد علائمی چون زخم‌های جلدی قرمز، بیرون‌زدگی چشم، ادم، سپتی-سمی خونریزی دهنده و بیرون زدگی فلس‌ها در فرم حاد با ایجاد سپتی سمی سبب مرگ در ماهی‌ها می‌شود (Citarasu *et al.*, 2011). این باکتری تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کند. همچنین عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در انسان با منشا مواد غذایی سبب گاستروانتریت، عفونت زخم، پنومونی و مننژیت می‌شود (Aberoum and Jooyandeh, 2010). آئروموناس ها در تلفات ماهی گرمابی و خرچنگ ۷۲/۶ درصد و آئروموناس هیدروفیلا ۳۰/۵ درصد حضور داشته‌اند و نقش آئروموناس‌ها و آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان دارای علائم کاملاً هم خوانی دارد (Nielsen *et al.*, 2001). در بررسی علت تلفات در ماهی آمور، علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) به این نتیجه رسیدند که ۱۱ درصد تلفات ناشی از آئروموناس هیدروفیلا و ۱۷/۶ درصد تلفات ناشی از آئروموناس‌ها می‌باشد. با استفاده از تکنیک PCR اقدام به شناسایی ایزوله‌های آئروموناس هیدروفیلا از طریق تعیین توالی ژن هدف 16S rDNA با وزن ۶۸۵ جفت باز گردید که از این پرایمر در مطالعات زیادی استفاده گردیده است (Dorsch *et al.*, 1994; Keya Sen, 2005; Chu and Lu, 2005; Mousavi *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر به کمک PCR میزان فراوانی هر یک از ژن های حدت (آئرولیزین، الاستاز و لیپاز) به‌دست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن الاستاز در مقایسه با سایر ژن‌های حدت در میان جدایه‌های حاصل از آبزیان از فراوانی حضور بیشتری (۷۰٪) برخوردار بود. کمترین فراوانی (۵۳/۳٪) نیز متعلق به ژن حدت آئرولیزین بود. باکتری های دارای ژن الاستاز دارای فعالیت‌های الاستولایتیکی بوده و یک فرم جهش یافته ایزوژنیک از آن کاهش حدت در ماهی قزل آلای رنگین کمان را نشان داده است (Song *et al.*, 2004). در تزریق آئروموناس هیدروفیلاهایی که الاستاز آنها مثبت است به گربه ماهی کانالی باعث ایجاد گنجیدگی در سلول ها و مرگ و میر شد (Chabot and Thune, 1991). میزان فراوانی این ژن در آئروموناس هیدروفیلا های جدا شده از بچه ماهی تیلاپیا نیل در برزیل ۴۶/۴۹٪ گزارش شد، پرایمر به کار رفته در این تحقیق مشابه پرایمر این مطالعه می باشد (Oliveira *et al.*, 2012). تمامی گروه‌های تزریق شده با باکتری که دارای ژن الاستاز بود تلفات سنگینی را در همان روزهای اول نشان دادند و علائم تیرگی رنگ بدن، بیرون‌زدگی فلس‌ها، خونریزی پتشی در نواحی شکمی و مقعد و کوتاه شدن سرپوش آبششی را از خود نشان

دادند. که این حالت می‌تواند به دلیل تخریب بافت الاستین و استخوانی سرپوش آبششی توسط این ژن می‌باشد. فراوانی ژن لیپاز به میزان ۶۳/۳٪ گزارش شده است. از ژن لیپاز برای تشخیص آئروموناس هیدروفیلا نیز استفاده می‌شود (Cascon *et al.*, 1996). Swaminathan و همکاران (۲۰۰۴) برای تشخیص و ردیابی آئروموناس هیدروفیلا از این ژن استفاده کردند و یک محصول PCR مطلوب به دست آوردند. در ایران هم برای اولین بار با استفاده از دو پرایمر 16S rDNA و لیپاز در آئروموناس های جدا شده از ماهی‌های گرمابی اقدام به شناسایی آئروموناس هیدروفیلا کردند (Ahangarzadeh *et al.*, 2015). ژن لیپاز در کنار دیگر ژن‌های حدت مخصوصا الاستاز و آئرولیزین میزان بیماری‌زایی باکتری را افزایش می‌دهد. در باکتری آئروموناس هیدروفیلا انواع مختلفی از همولیزین وجود دارد که شامل آئرولیزین یا همان (β-hemolysin) می‌باشد که باعث لیز شدن کامل گلبول‌های قرمز می‌شود و α-hemolysin که بخشی از گلبول‌های قرمز را لیز می‌کند (Seshadri *et al.*, 2006). در مطالعه حاضر ژن آئرولیزین میزان فراوانی اش تنها ۵۳/۳٪ در میان جدایه های آبزیان تخمین زده شد. در حالی‌که این ژن در انسان عامل اصلی بیماری روده ای و اسهال ناشی از آئروموناس *هیدروفیلا* می‌باشد (Bloch and Monteil, 1989). Erdem و همکاران (۲۰۱۰) ۱۲۰ ماهی را از نظر وجود آئروموناس مورد ارزیابی قرار دادند و از میان آئروموناس های جدا شده ۳۶ آئروموناس هیدروفیلا شناسایی شد و از این ۳۶ جدایه، ۳۲ جدایه ژن آئرولیزین آنها به میزان ۸۹٪ مثبت گزارش شد. این ژن در ۸۳٪ از سویه‌های آئروموناس جدا شده از غذا و منابع کلینیکی در ایتالیا گزارش شده است (Ottaviani *et al.*, 2010). در عمده مطالعات انسانی گذشته آئرولیزین به‌عنوان یک فاکتور حدت مهم در بیماری زایی آئروموناس هیدروفیلا اعلام شده است (Baloda *et al.*, 1995). نتایج مطالعه حاضر نشان داد از میان الگوهای حدت ژنی مختلف به‌دست آمده با روش PCR بیشترین فراوانی (۳۳/۳٪) متعلق به مشخصه ژنی $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ است که در تزریق باکتری با همین الگوی ژنی به بچه ماهی کپور میزان تلفات تا پایان روز روز پنجم به ۶۰٪ رسید. فراوانی الگوی ژنی $lip^{+}/ahyB^{+}/aerA^{-}$ به میزان ۲۳/۳٪ بود. در تزریق باکتری با این مشخصه ژنی به بچه ماهی کپور معمولی میزان تلفات تا پایان روز پنجم به ۱۰۰٪ رسید و تلفات در روز اول ۷۰٪ و در روز دوم به میزان ۳۰٪ بود ماهی های تلف شده علائم خونریزی در ناحیه شکمی و مقعد، فراوانی موکوس در آبشش و کوتاه شدن سرپوش آبششی را داشتند. مشخصه ژنی $lip^{-}/ahyB^{+}/aerA^{+}$ با فراوانی به میزان ۱۰٪، تلفات ۱۰۰٪ را به‌دنبال داشته به‌طوری که در روز اول ۵۰٪ ماهی‌ها و در روز دوم ۳۰٪ بعد از تزریق تلف شدند. نکته قابل تأمل در این مطالعه آن بود که بچه ماهی‌هایی که در گروه چالش تزریقی با باکتری که هیچ یک از ژن های حدت مورد مطالعه را نداشت نیز تلفات نشان دادند. این امر نشان دهنده آن است که آئروموناس هیدروفیلا می‌تواند ژن‌های حدت و مکانیسم‌های متنوع‌تری در بیماری‌زایی داشته باشد و احتمالاً ژن‌های حدت دیگری باعث این تلفات شده‌اند که در این مطالعه بررسی نشده‌اند. بنابراین به‌نظر می‌رسد نیاز به مطالعات تکمیلی جهت ارزیابی حضور سایر ژن‌های حدت از قبیل (*aopB* و *ascV*) T3SS با توجه به مطالعه Carvalho-Castro و همکاران (۲۰۱۰) وجود دارد. در کل نتیجه به‌دست آمده از چالش باکتریایی و آزمایش عفونی باکتری آئروموناس هیدروفیلا نشان می‌دهد که این باکتری می‌تواند با داشتن زیرمجموعه هایی از پاتوتیپ های مختلف، توانایی متغیری برای آلوده کردن میزبان و ایجاد علائم بالینی داشته باشد. در آینده با شناسایی دقیق و جامع‌تر ژن های حدت در جدایه های آئروموناس هیدروفیلا شاید بتوان به سوش هایی از باکتری به صورت طبیعی دست یافت که بتوان به‌دلیل حدت کم بیماری‌زایی، آن ها را به‌عنوان کاندید واکسن استفاده نمود.

## References


Aberoum, A., Jooyandeh, H., 2010. A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2(10), 519-523.

Adanir, D.O.R., Turutoglu, H., 2007. Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* in a carp. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 51, 361-364.

Ahangarzadeh, M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Sharif rohani, M., Soltani, M., 2015. Role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of cultured carps in khouzestan province. *Iranian Veterinary Journal* 3, 5-14. (In Persian).

Akhlaghi, M., 2001. *Aeromonas hydrophila* immunization in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Research* 55(1), 57-62. (In Farsi)

Akhlaghi, M., Vafaei, S., 2003. Evaluating the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in aquarium fish. *Iranian Journal of Veterinary research* 1, 83. (In Farsi)

Alishahi, M., Soltani, M., Zargar, A., 2009. Evaluation of bacterial mortality in Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in khouzestan province. *Iranian Veterinary Journal* 1, 25-34. (In Farsi)

Baloda, S.B., Krovacek, K., Eriksson, L., Linné, T., Månsson, I., 1995. Detection of *aerolysin* gene in Aeromonas strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 18(1), 17-26.

Bloch, S., Monteil, H., 1989. Purification and characterization of *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin. *Toxicon* 27(12), 1279-1287.

Brunt, J., Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 28(12), 693-701.

Carvalho-Castro, G.A., Lopes, C.O., Leal, C.A.G., Cardoso, P.G., Leite, R.C., Figueiredo, H.C.P., 2010. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology* 144(3), 371-376.

Cascón, A., Anguita, J., Hernanz, C., Sánchez, M., Fernandez, M., Naharro, G., 1996. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4), 1167-1170.

Chabot, D.J., Thune, R.L., 1991. Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 14(2), 171-183.

Chu, W.H., Lu, C.P., 2005. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 28(7), 437-441.

Citarasu, T., Dhas, A., Velmurugan, K., Viji, T.V., Kumaran, T., Babu, M.M., Selvaraj, T., 2011. Isolation of Aeromonas hydrophila from infected ornamental fish hatchery during massive disease outbreak. *International Journal of Current Research* 2, 37-41.

Dorsch, M., Ashbolt, N.J., Cox, P.T., Goodman, A.E., 1994. Rapid identification of Aeromonas species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *Journal of Applied Microbiology* 77(6), 722-726.

Erdem, B., KARİPTAŞ, E., Kaya, T., 2010. Siderophore, hemolytic, protease, and pyrazinamidase activities and antibiotic resistance in motile Aeromonas isolated from fish. *Turkish Journal of Biology* 34(4), 453-462.

Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews* 23(1), 35-73.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews, Microbiology* 2(2), 123.

Kingombe, C.I.B., D'Aoust, J.Y., Huys, G., Hofmann, L., Rao, M. and Kwan, J., 2010. Multiplex PCR method for detection of three Aeromonas enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology* 76(2), 425-433.

Merino, S., Rubires, X., Knøchel, S., Tomás, J.M., 1995. Emerging pathogens: Aeromonas spp. *International Journal of Food Microbiology* 28(2), 157-168.

Modarres Mousavi Behbahani, S.M., Akhlaghi, M., Sharifiyazdi, H., 2014. Phenotypic and genetic diversity of motile aeromonads isolated from diseased fish and fish farms. *Iranian Journal of Veterinary Research* 15(3), 238-243.

Mokhayer, B., 2006. Diseases of cultured fishes, *Tehran University Press*, Iran, pp. 229-230. (In Farsi)

Nawaz, M., Khan, S.A., Khan, A.A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., Steele, R., 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiology* 27(3), 327-331.

Nielsen, M.E., Høi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L., 2001. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile Aeromonas species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Diseases of Aquatic Organisms* 46(1), 23-29.

Oliveira, S.T., Veneroni-Gouveia, G., Costa, M.M., 2012. Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(8), 701-706.

Orozova, P., Barker, M., Austin, D.A., Austin, B., 2009. Identification and pathogenicity to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of some aeromonads. *Journal of Fish Diseases* 32(10), 865-871.

Ottaviani, D., Parlani, C., Citterio, B., Masini, L., Leoni, F., Canonico, C., Sabatini, L., Bruscolini, F., Pianetti, A., 2011. Putative virulence properties of Aeromonas strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology* 144(3), 538-545.

Pemberton, J.M., Kidd, S.P., Schmidt, R., 1997.

Secreted enzymes of Aeromonas. *FEMS Microbiology Letters* 152(1), 1-10.

Peyghan, R., Khadjeh, G.H., Mozarmnia, N., Dadar, M., 2010. Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, *cyprinus carpio*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1(01), 26.

Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., Mu, X., Carter, D., Fleming, K., Xu, D., Srivastava, K., Reddy, G., 2011. Identification of unique DNA sequences present in highly virulent 2009 Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Microbiology* 152(1), 117-125.

Sen, K., 2005. Development of a rapid identification method for Aeromonas species by multiplex-PCR. *Canadian Journal of Microbiology* 51(11), 957-966.

Seshadri, R., Joseph, S.W., Chopra, A.K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Madupu, R., 2006. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *Journal of Bacteriology* 188(23), 8272-8282.

Singh, V., Chaudhary, D.K., Mani, I., Jain, R., Mishra, B.N., 2013. Development of diagnostic and vaccine markers through cloning, expression, and regulation of putative virulence-protein-encoding genes of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Microbiology* 51(3), 275-282.

Soltani, M., 2002. Salmonid diseases. *Tehran university press*, Iran, pp. 63-84. (In Farsi)

Song, T., Toma, C., Nakasone, N., Iwanaga, M., 2004. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii biovar sobria*. *Journal of Medical Microbiology* 53(6), 477-482.

Swaminathan, T.R., Rathore, G., Abidi, R., Kapoor, D., 2004. Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Fisheries* 51(2), 251-254.

Yu, H.B., Rao, P.S., Lee, H.C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J.M., Leung, K.Y., 2004. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and Immunity* 72(3), 1248-1256.

Xia, C., Ma, Z.H., Rahman, M.H., Wu, Z.G., 2004. PCR cloning and identification of the *β-haemolysin* gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. *Aquaculture* 229(1), 45-53.