نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۱ تابستان ۱۳۹۵
DOI:10.22034/vj.2016.106057

کاربرد PCR با استفاده از پرایمرهای ۱۶srRNA و کد کننده لیپاز خارج سلولی جهت تعیین هویت *آئروموناس هیدروفیلا* و مقایسه آن با آزمون‌های بیوشیمیایی

• **مینا آهنگرزاده (نویسنده مسئول)**
دانش آموخته دکتری رشته بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز
• **رحیم پیغان**
استاد گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
• **مسعود قربانپور نجف‌آبادی**
استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز
• **مصطفی شریف‌روحانی**
دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
• **مهدی سلطانی**
استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: خرداد ۹۳ **تاریخ پذیرش: مهر ۹۴**
E-mail: M.ahangarzadeh@yahoo.com

چکیده

بیماری‌های ماهی یک خطر اصلی در آبزی پروری تجاری محسوب می‌شود که میلیون‌ها دلار ضرر اقتصادی را به این صنعت وارد می‌کنند. در این میان آئروموناس هیدروفیلا به عنوان عامل عفونی غالب در سپتی سمی‌های باکتریایی در سیستم پرورشی آب شیرین خصوصا خانواده کپورماهیان مطرح است. این باکتری عامل سپتی سمی خونریزی دهنده، پوسیدگی باله ودم و سندرم زخم همه‌گیر (EUS) در ماهی‌ها می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۲۱۳ جدایه بدست آمده از ۲۰۰ قطعه کپور ماهی پرورشی بیمار (۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه آمور) در استان خوزستان با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. در تست PCR برای تشخیص Aeromonas sp. از پرایمر ۱۶srRNA مخصوص جنس و جهت تشخیص *Aeromonas hydrophila* از پرایمر ۱۶srRNA و ژن لیپاز استفاده گردید. نتایج نشان داد که ۷۳٪ از جدایه‌های Aeromonas sp. تشخیص داده شده به روش بیوشیمیایی و ۵۲٪ جدایه‌های مظنون به *Aeromonas hydrophila* با آزمون PCR تأیید شدند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش PCR در مقایسه با روش‌های بیوشیمیایی به عنوان یک روش سریع و دقیق در تشخیص آئروموناس هیدروفیلا مطرح می‌باشد و دارای حساسیت بالایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: کپور ماهیان پرورشی، *آئروموناس هیدروفیلا*، بیوشیمیایی، PCR، ژن لیپاز

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 15-24

Application of PCR mrthod by using of 16srRNA and encoding extracellular lipase primer to ***Aeromonas hydrophila*** identification and comparison with biochemical tests

By: Ahangarzadeh, M. (Corresponding Author), PhD Graduate of Fish Health, Faculty of VeterinaryMedicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Peyghan, R., Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Ghorbanpour M., Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
Sharif Rohani M., Associated Professor, Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iran.
Soltani M., Professor, Department of Fish Health and Disease, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. Iran.

Received: May 2014 Accepted: September 2015

E-mail: M.ahangarzadeh@yahoo.com

Fish disease is the major risk factor in commercial aquaculture with millions of dollars lost annually. Among them, *Aeromonas hydrophila* as dominant infectious agent in bacterial septicemia in freshwater fsh especially Cyprinidae family has been known. *A. hydrophila* has been associated with tail and fn rot, haemorrhagic septicaemia and epizootic ulcerative syndrome (EUS).In this study 213 isolates were obtained from 200 pieces of patient cultured carp (126 common carp,39 silver carp and 35 grass carp) from Khuzestan province farms with biochemical and molecular tests were investigated. 16srRNA gene was used for Aeromonas sp. Detection and 16srRNA lipase genes was used for *Aeromonas hydrophila* detection. The result shown 73% of Aeromonas sp. and 52% of *Aeromonas hydrophila* which were detected by biochemical method were conformed by PCR assay. Also result of this study was shown, the PCR assay compared with biochemical methods, is a rapid and sensitive method for *Aeromonas hydrophila* detection and has a high sensitivity.

Key words: Cultured carp, *Aeromonas hydrophila*, biochemical method, PCR, lipase gene

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی شده و خسارات اقتصادی شدیدی را به صنعت آبزی‌پروری وارد می‌کند. تاکنون باکتری‌های متعددی مانند ادواردزیلا ایکتالوری[1]، ادواردزیلا تاردا[2] و *آئروموناس هیدروفیلا* به عنوان عامل سپتی‌سمی گزارش شده‌اند. در بین عوامل باکتریایی آبزیان، خصوصاً در ماهیان آب‌شیرین *آئروموناس هیدروفیلا* بسیار مورد توجه بوده است (Cao et al., 2011 , Piratate et al., 2007).

آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری همه‌جا حاضر و فرصت‌طلب است. در مورد پاتوژن اولیه یا ثانویه بودن این باکتری اختلاف نظر وجود دارد (Nielsen et al., 2001)، اما تحت شرایط استرس‌زا، تبدیل به یک پاتوژن شده و ایجاد بیماری می‌کند (Lee et al., 2000, Yogananth et al., 2009). این باکتری عامل سپتی سمی خونریزی دهنده، پوسیدگی باله و دم و سندرم زخم همه‌گیر (EUS) در ماهی‌ها است (Roberts, 1997).

اعضای جنس آئروموناس فاقد اسپور هستند که در رنگ‌آمیزی به‌صورت باسیل‌های کوتاه گرم منفی با انتهای گرد و به‌صورت تکی، دوتایی و یا زنجیره‌های کوتاه مشاهده می‌شوند. این باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز و اکسیداز مثبت، تولیدکننده‌ی اسید و گاز، احیا کننده نیترات به نیتریت هستند. تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* بر اساس شکل کلونی، آزمون‌های بیوشیمیایی، سیستم Api ۲۰E و تشخیص مولکولی است (AL-Fatlawy et al., 2013).

روش جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی پاتوژن‌های باکتریایی یک روند زمان بر است و برای تشخیص در حد گونه کافی و مناسب نیست (Swami-nathan et al., 2004)، به همین دلیل اخیرا روش‌های تشخیصی مولکولار از جمله PCR بنا شده‌اند که تشخیص سریع و دقیق میکروارگانیسم‌ها را باعث می‌شوند (Cascon et al., 1996, Swaminathan et al., 2004). در مطالعه حاضر برای تشخیص جنس آئروموناس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا*هم از روش بیوشیمیایی و هم از روش مولکولی استفاده گردید و هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان تفاوت در تشخیص با این دو روش و نشان دادن روش دقیق تر و سریعتر می‌باشد.

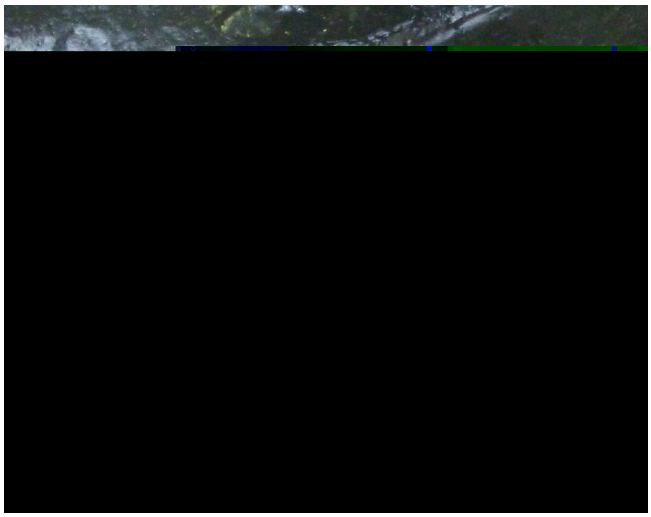
روش کار

الف) نمونه‌برداری و جداسازی عامل

در طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ از تعداد ۳۰ مزرعه پرورش کپور ماهیان واجد تلفات مشکوک به سپتی‌سمی آئروموناسی در استان خوزستان نمونه‌برداری صورت گرفت. بدین صورت که تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی (شامل: ۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه آمور) با متوسط وزن ۶۷۳±۴۶۵/۴ گرم که دارای علائمی از قبیل خونریزی جلدی، خونریزی و تورم در اندام‌های داخلی، آسیت، اگزوفتالمی، بی‌حالی و بی‌اشتهایی، چسبندگی احشا، رنگ‌پریدگی کبد و بیرون‌زدگی مخرج و ... بودند، نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها با رعایت شرایط استاندارد و با استفاده از کیسه‌های حمل ماهی و با تعبیه اکسیژن کافی در اسرع وقت به آزمایشگاه

منتقل شدند.

پس از بیومتری و ثبت علائم بالینی، ابتدا سطح بدن بوسیله الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد و سپس با استفاده از یک اسکالپل استریل کالبدگشایی صورت گرفت بدین صورت که یک برش عرضی جلوی مخرج داده شد، سپس بوسیله یک قیچی استریل ، برش را از قسمت جلوی مخرج به سمت ناحیه شکمی سر ادامه داده و تا سرپوش آبششی خاتمه می یابد. برش دوم از مخرج شروع شده و از سطح پشتی جلویی به سمت خط جانبی ادامه می یابد. استخوانهای نزدیک کمان آبششی بریده شده و بوسیله برش سوم انتهای دو برش اول و دوم بهم متصل می شود. اما برای نمونه گیری استریل از کلیه یک برش از ناحیه پشتی داده می شود (شکل ۱). در نهایت از اندام‌های داخلی (کلیه، کبد و طحال) و ضایعات جلدی احتمالی نمونه‌برداری می‌گردد.



شکل۱- دسترسی به کلیه از طریق برش از ناحیه پشتی

نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی Tryptic Soy Agar (TSA) تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرمخانه‌گذاری کلونی‌های مشکوک به آئروموناس(کلونی‌های سفید تا خاکستری رنگ محدب و نیمه شفاف با قطر حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر) انتخاب و بر روی محیط جدید خالص‌سازی گردیدند.

ب) تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های خالص‌سازی شده جهت شناسایی جنس آئروموناس و گونه هیدروفیلا مورد بررسی‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. جدایه‌هایی که گرم منفی و اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند به عنوان مظنون به جنس آئروموناس در نظر گرفته شدند و جهت تشخیص گونه، از روش Alishahi و همکاران (۲۰۰۹)، Soltani (۱۹۹۶)، Porteen و همکاران (۲۰۰۶) و Nielsen و همکاران (۲۰۰۱) استفاده گردید. پس از انجام آزمایشات، نتایج با منابع معتبر مقایسه گردید(Austin B. and Austin D. 2007,Buller 2004).

ج -۱) استخراج DNA از باکتری

استخراج DNA به روش مرسوم جوشاندن کلونی های باکتریایی صورت گرفت (Nielsen et al., 2001 Porteen et al., 2006).

ج- ۲) PCR تعیین جنس

جهت تشخیص جنس آئروموناس از پرایمرهای اختصاصی(جدول ۱) ژن ۱۶s rRNA آئروموناس (Porteen et al., 2006) پس از مورد بلاست قرار دادن، استفاده شد. انجام PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر استریل و فاقد DNAse و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر ،در دستگاه ترموسایکلر Corbet (استرالیا) انجام گردید. جهت تکثیر ژن هدف پس از بهینه‌سازی از برنامه دمایی درج شده در جدول ۲ استفاده شد. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن مورد هدف در نهایت محصول PCR در کنار نردبان ژنی bp ۱۰۰ (سیناژن، ایران) و محصول کنترل‌های مثبت (۷۹۶۵، انستیتو پاستور ایران) و منفی در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داکیومنت (Uvitec، انگلستان) با نور UV باندهای تشکیل شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند مورد نظر(۵۹۹ bp) جدایه مورد

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص جنس آئروموناس و آئروموناس هیدروفیلا

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار	منبع
16 S rRNA F	5'-TCA TGG CTC AGA TTG AAC GCT-3'	*Aeromonas sp.*	۵۹۹	Porteen et al, 2006
16 S rRNA R	5'-CGG GGC TTT CAC ATC TAA CTT ATC-3'	*Aeromonas sp.*	۵۹۹	
16 SrRNA F	5'-GAA AGG TTG ATG CCT AAT ACG TA-3'	*A. hydrophila*	۶۸۵	Dorsch et al, 1994
16 SrRNA R	5'-CGT GCT GGC AAC AAA GGA CAG-3'	*A. hydrophila*	۶۸۵	
Lipase F	5'-AAC CTG GTT CCG CTC AAG CCG TTG-3'	*A. hydrophila*	۷۶۳	Cascon et al, 1996
Lipase R	5'-TTG CTC GCC TCG GCC CAG CAG CT-3'	*A. hydrophila*	۷۶۳	

نظر آئروموناس در نظر گرفته می‌شد.

ج-۳) PCR تعیین گونه

جهت تشخیص گونه هیدروفیلا از پرایمرهای اختصاصی گونه (جدول ۱) ژن ۱۶s rRNA هیدروفیلا و ژن لیپاز که به ترتیب توسط Dorsch و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Cascon و همکاران در سال ۱۹۹۶طراحی شده بودند، استفاده شد. شرایط PCR به جز چرخه‌های دمایی (جدول ۲) و پرایمرهای مورد استفاده دقیقاً مشابه شرایط PCR تشخیص جنس آئروموناس بود. در این مرحله، در صورت مشاهده باند ۶۸۵ bp برای ژن ۱۶srRNA و ۷۶۳ bp برای ژن لیپاز جدایه مورد نظر آئروموناس هیدروفیلا در نظر گرفته می‌شد.

نتایج

نتایج تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها

از اندام‌های داخلی و ضایعات جلدی احتمالی ۲۰۰ قطعه ماهی واجد علائم (آسیت، زخم های جلدی، پرخونی و تورم اندام های داخلی) تعداد ۲۱۳ جدایه خالص سازی شد. نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که تعداد ۱۷۱ جدایه متعلق به جنس آئروموناس بود. همه این جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت بودند. با آزمون‌های بیوشیمیایی تعداد ۵۹ جدایه به عنوان باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* شناخته شد. (باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) شناسایی شد.

نتایج تشخیص به روش مولکولی

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ۱۶s rRNA جنس آئروموناس (Porteen et al., 2006) سویه‌ی استاندارد منجر به ساخت محصولی به‌اندازه ۵۹۹ جفت باز شد (شکل ۲). این پرایمرها با DNA باکتری‌های غیر آئروموناس (اشرشیا کلی و پاستورلا مولتوسیدا) واکنش نداشتند. از ۱۷۱ جدایه تشخیص داده شده به عنوان جنس آئروموناس تعداد ۱۲۵ (معادل ۷۳/۰۹٪) جدایه در آزمایش PCR باند اختصاصی جنس آئروموناس (۵۹۹ bp) را نشان دادند.

جدول۲- برنامه دمایی PCR جهت تشخیص جنس آئروموناس و آئروموناس هیدروفیلا

ژن	ویژگی	باند مورد انتظار	دما (°C)	زمان	ژن
16 S (*Aeromonas sp.*) 16S (*A. hydrophila*)	سیکل اول	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		اتصال	۵۵	۳۰ ثانیه	۳۰
		تکثیر	۷۲	۴۵ ثانیه	۳۰
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱
Lipase	سیکل اول	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		اتصال	۶۵	۳۰ ثانیه	۳۰
		تکثیر	۷۲	۴۵ ثانیه	۳۰
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی جنس آئروموناس بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد
ستون ۱- کنترل منفی، ستون ۹: کنترل مثبت و ستون ۱۰- نردبان ژنی (100(M bp.
ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸- جدایه‌های متعلق به جنس آئروموناس (واجد باند 599 bp)

۱۲۵ جدایه‌ای که ازنظر جنس آئروموناس تأیید شـــده بودند و شامل همه ۵۹ جدایه تشـــخیص داده شده به عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* با تست‌های بیوشیمیایی بودند، مورد آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *آئروموناس هیدروفیلا* (ژن‌های لیپـــاز و ۱۶s rRNA) قرار گرفتند. نتایج نشـــان داد که ۳۱ جدایه از بین ۵۹ جدایه تشـــخیص داده شـــده به روش بیوشـــیمیایی، باند ۷۶۳ bp (ژن لیپاز) را نشان دادند ولی از این تعداد (۳۱ جدایه)، ۲۱ جدایه دارای باند ۶۸۵ bp (۱۶ srRNA) بودند (شـــکل ۳ و۴) (جـــدول ۳)، بعبارتی از این ۳۱ جدایه، تعـــداد ۲۱ جدایه هر دو ژن را دارا بودند و ۱۰ جدایه فقط ژن لیپاز را داشتند که مجموعاً ۳۱ (معادل ۲۴/۸٪ از کل نمونه‌های تایید شـــده جنس آئرومونـــاس و ۵۲/۵۴٪ از جدایه‌های آئروموناس هیدروفیلای تشـــخیص داده شـــده با آزمون‌های بیوشیمیایی) جدایه به‌عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* در نظر گرفته شدند.

مقایسه مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های تأیید شده و تأیید نشده از نظر گونه هیدروفیلا:

با توجه به نتایج، مشـــخص شـــد کـــه ۲۴/۸ درصـــد از جدایه‌های جنس آئروموناس متعلق به گونه هیدروفیلا می‌باشـــند و همچنین از ۵۹ جدایه‌ای که توسط آزمون‌های بیوشیمیایی آئروموناس هیدروفیلا تشخیص داده شد، ۳۱ جدایه (معادل ۵۲/۵۴٪) توسط آزمایش PCR تأیید شده و ۲۸ جدایه (۴۵/۴۷٪) تأیید نشـــدند. نتایج بیوشـــیمیایی ۳۱ جدایه تأییدشده و ۲۸ جدایه تأیید نشده با PCR با یکدیگر مقایسه شدند (جدول ۴ و ۵).

نتایج نشـــان داد که، در بیش از ۸۷٪ جدایه های تأیید شده، آزمون اندول

جدول ۳- مقایسه نتایج حاصل از تعیین هویت *Aeromonas sp* و *Aeromonas hydrophila* از ۳۱۲ جدایه به روش بیوشیمیایی و مولکولی

نوع جدایه	روش بیوشیمیایی	روش مولکولی (PCR)
Aeromonas sp.	۱۷۱	۱۲۵
Aeromonas hydrophila	۵۹	۳۱

شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن srRNA ۱۶ گونه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪
ستون ۱- کنترل منفی، ستون ۳- کنترل مثبت ، ستون ۴: نردبان ژنی bp 100(M)
ستون ۲: جدایه‌ی مظنون به *آئروموناس هیدروفیلا* (۶۸۵ bp)

شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR ژن لیپاز *Aeromonas hydrophila* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪
ستون ۱- نردبان ژنی bp 100(M)، ستون ۲- کنترل منفی، ستون ۵ - کنترل مثبت
ستون‌های ۳ و ۴- جدایه‌های دارای ژن لیپاز (bp 763)

جدول ۴- ویژگی‌های بیوشیمیایی ۱۳ جدایه‌ی *آئرومونا‌س هیدروفیلا* تشخیص داده شده با آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR

آزمون	از مجموع ۳۱ جدایه		
	تعداد و درصد جدایه‌های مثبت	تعداد و درصد جدایه‌های منفی	وضعیت کلی آزمون
اکسیداز	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
کاتالاز	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
حرکت	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
اندول	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	۴ (٪۱۲/۹)	±
تولید H۲S	۵ (٪۱۶/۱۲)	۲۶ (٪۸۳/۸۷)	±
آرژینین دکربوکسیلاز	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
لایزین دکربوکسیلاز	۲۵ (٪۸۰/۶۴)	۶ (٪۱۹/۳۵)	±
اورنیتین دهیدرولاز	۱۰ (٪۳۲/۲۵)	۲۱ (٪۶۷/۷۴)	±
اوره	۱ (٪۳/۲۲)	۳۰ (٪۹۶/۷۷)	±
سیمون سیترات	۲۶ (٪۸۳/۸۷)	۵ (٪۱۶/۱۲)	±
وگس پراسکور	۱۱ (٪۳۵/۴۸)	۲۰ (٪۶۴/۵۱)	±
متیل رد	۷ (٪۲۲/۵۸)	۲۴ (٪۷۷/۴۱)	±
O/F	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
احیای نیترات	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
تحمل نمک ٪۳	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
تحمل نمک ٪۴	۸ (٪۲۵/۸۰)	۲۳ (٪۷۴/۱۹)	±
تحمل نمک ٪۶	۱ (٪۳/۲۲)	۳۰ (٪۹۶/۷۷)	±
رشد در دمای ۴ °C	۴ (٪۱۲/۹)	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	±
رشد در دمای ۳۷°C	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
رشد در دمای ۴۲°C	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
تخمیر گلوکز	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
تخمیر اینوزیتول	۱۰ (٪۳۲/۲۵)	۲۱ (٪۶۷/۷۴)	±
تخمیر سوکروز	۲۹ (٪۹۳/۵۴)	۲ (٪۶/۴۵)	±
تخمیر سوربیتول	۷ (٪۲۲/۵۸)	۲۴ (٪۷۷/۴۱)	±
تخمیر لاکتوز	۴ (٪۱۲/۹)	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	±
تخمیر سالیسین	۸ (٪۲۵/۸۰)	۲۳ (٪۷۴/۱۹)	±
تخمیر مانیتول	۳۰ (٪۹۶/۷۷)	۱ (٪۳/۲۲)	±
تخمیر مالتوز	۹ (٪۲۹/۰۳)	۲۲ (٪۷۰/۹۶)	±
تخمیر آرابینوز	۱۵ (٪۴۸/۳۸)	۱۶ (٪۵۱/۶۱)	±
تولید گاز از گلوکز	۲۷ (٪۸۷/۰۹)	۴ (٪۱۲/۹)	±

جدول ۵ - ویژگی‌های بیوشیمیایی ۲۸ جدایه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* تشخیص داده شده با آزمون بیوشیمیایی

آزمون	از مجموع ۲۸ جدایه		
	تعداد و درصد جدایه‌های مثبت	تعداد و درصد جدایه‌های منفی	وضعیت کلی آزمون
اکسیداز	۲۸ (٪۱۰۰)	-	+
کاتالاز	۲۸ (٪۱۰۰)	-	+
حرکت	۳ (٪۸۲/۱۴)	۵ (٪۱۷/۸۵)	±
اندول	۱۴ (٪۵۰)	۱۴ (٪۵۰)	±
تولید H۲S	۱۵ (٪۵۳/۵۷)	۱۳ (٪۴۶/۴۲)	±
آرژینین دکربوکسیلاز	۲۱ (٪۷۵)	۷(٪۲۵)	±
لایزین دکربوکسیلاز	۲۰(٪۷۱/۴۲)	۸ (٪۲۸/۵۷)	±
اورنیتین دهیدرولاز	۸ (٪۶۴/۲۸)	۱۰ (٪۳۵/۷۱)	±
اوره	۴ (٪۱۴/۲۸)	۲۴ (٪۸۵/۷۱)	±
سیمون سیترات	۲۱ (٪۷۵)	۷(٪۲۵)	±
وگس پراسکور	۸ (٪۲۸/۵۷)	۲۰ (٪۷۱/۴۲)	±
متیل رد	۳ (٪۱۰/۷۱)	۲۵ (٪۸۹/۲۸)	±
O/F	۳۱ (٪۱۰۰)	-	+
احیای نیترات	۲۵(٪۸۹/۲۸)	۳(٪۱۰/۷۱)	±
تحمل نمک ۳٪	۱۸ (٪۶۴/۲۸)	۱۰ (٪۳۵/۷۱)	±
تحمل نمک ۴٪	۱۱ (٪۳۹/۲۸)	۱۷ (٪۶۰/۷۱)	±
تحمل نمک ۶٪	۵ (٪۱۷/۸۵)	۲۳ (٪۸۲/۱۴)	±
رشد در دمای ۴°C	-	۲۸ (٪۱۰۰)	±
رشد در دمای ۳۷°C	۲۸ (٪۱۰۰)	-	+
رشد در دمای ۴۲°C	۸ (٪۲۸/۵۷)	۲۰ (٪۷۱/۴۲)	±
تخمیر گلوکز	۲۱ (٪۷۵)	۷(٪۲۵)	±
تخمیر اینوزیتول	۶ (٪۲۱/۴۲)	۲۲ (٪۷۸/۵۷)	±
تخمیر سوکروز	۱۸ (٪۶۴/۲۸)	۱۰ (٪۳۵/۷۱)	±
تخمیر سوربیتول	۱۲ (٪۴۲/۸۵)	۱۶ (٪۵۷/۱۴)	±
تخمیر لاکتوز	۸ (٪۲۸/۵۷)	۲۰ (٪۷۱/۴۲)	±
تخمیر سالیسین	۵ (٪۱۷/۵۸)	۲۳(٪۸۲/۱۴)	±
تخمیر مانیتول	۲۰(٪۷۱/۴۲)	۸ (٪۲۸/۵۷)	±
تخمیر مالتوز	۹ (٪۲۹/۰۳)	۲۲ (٪۷۰/۹۶)	±
تخمیر آرابینوز	۵ (٪۱۷/۵۸)	۲۳ (٪۸۲/۱۴)	±
تولید گاز از گلوکز	۱۲ (٪۴۲/۸۵)	۱۶ (٪۵۷/۱۴)	±

مثبت بود، درحالی که فقط نیمی از جدایه های تأیید نشـــده ، اندول مثبت بودنـــد. در بررســـی نمونه ها ی تأیید شـــده، به ترتیـــب ۱۰۰ ،۸۱ و ۳۲٪ آرژنین و لایزین دکربوکســـیلاز مثبت و اورنیتین دهیدرولاز منفی بودند ولی در نمونه های تأیید نشده با PCR به ترتیب ۷۱، ۶۴ و ۶۴٪ آرژنین و لایزین دکربوکسیلاز مثبت و اورنیتین دهیدرولاز منفی بودند.
آزمون ســـیترات در جدایه های تأیید شده و تأیید نشده با PCR به ترتیب ۸۳ و ۷۵٪ مثبت بودند و نتایج آزمون اوره در این دو دسته جدایه، به ترتیب ۹۶ و ۸۵٪ منفی بودند.

بحث

ارائه راهکارهای کنترلی و پیشـــگیری از بروز بیماری‌های عفونی مســـتلزم مطالعات تشخیصی دقیق می‌باشـــد. از آنجائی که در سال‌های اخیر تلفات زیادی در کپور ماهیان پرورشی در سطح استان خوزستان گزارش‌شده است و نیز به علت اهمیت باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ایجاد سپتی‌ســـمی در ماهیـــان گرمابی، مطالعه حاضـــر با هدف شناســـایی دقیق جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا*، در کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و به دنبال آن، معرفی راههای پیشگیری از این بیماری انجام گردید.
تشـــخیص *آئروموناس هیدروفیلا* بر اســـاس شـــکل کلونـــی، آزمون‌های بیوشـــیمیایی، سیستم ۲۰E Api و تشخیص مولکولی است. کلونی‌های این باکتری حدود ۲ الی ۳ میلی‌متر قطر دارند و در محیط کشت آگار خون‌دار ظاهـــر گرد، محدب و صاف دارند. *آئروموناس هیدروفیلا* باکتری گرم منفی کوکو باســـیل تا باســـیلی با انتهای گرد اســـت که معمولاً به‌صورت تکی یا زنجیره کوتاه دیده می‌شـــود و گونه هـــای متحرک آئروموناس‌ها تولید یک تاژک قطبی می‌کنند (AL-Fatlawy et al., 2013).
در مطالعه حاضر شناسایی باکتری‌ها هم به‌وسیله آزمایش‌های بیوشیمیایی و هم توســـط آزمایش PCR انجام گردید. آزمون‌های بیوشـــیمیایی تعداد ۱۷۱ جدایه را به‌عنوان جنس آئروموناس و ۵۹ جدایه را به‌عنوان آئروموناس هیدروفیـــلا معرفی کرد. بعـــد از انجام آزمایش PCR مشـــخص گردید که حدود ۲۶ درصد از موارد تعیین‌شـــده به‌عنوان جنس آئروموناس، به‌وسیله آزمایش PCR تأیید نشدند و همچنین از ۵۹ جدایه‌ای که توسط آزمون‌های بیوشـــیمیایی *آئروموناس هیدروفیلا* تشـــخیص داده شد ۳۱ جدایه (معادل ۵۲/۵۴٪) توسط آزمایش پی‌سی‌آر تأیید شده و ۲۸ جدایه (۴۵/۴۷٪) تأیید نشـــدند. حدس زده می‌شـــود که این تعداد متعلق به سایر آئروموناس‌های متحـــرک هســـتند. با توجه به نتایج، مشـــخص شـــد کـــه ۲۴/۸ درصد از جدایه‌های تأییدشده جنس آئروموناس متعلق به گونه هیدروفیلا می‌باشد.
بررسی نتایج بیوشـــیمیایی جدایه‌ها با منابع مورد اســـتفاده نشان داد که آزمایش‌هایی از قبیل: حرکت، تولید اندول، آرژنین دکربوکســـیلاز، لایزین دکربوکســـیلاز، اورنیتین دهیدرولاز، اوره، سیمون سیترات، احیای نیترات، تحمل نمـــک تا ۳٪ و تخمیر قندهایـــی مانند گلوکز، ســـوکروز، مانیتول، اینوزیتول در ۳۱ جدایه تأیید شـــده بـــا PCR با جداول معتبر تطابق کامل دارد (Austin B. and Austin D. 2007, Buller, 2004). امـــا در ۲۸ جدایه تأیید نشده در بعضی از تست‌ها با جداول موجود در منابع تطابق کمتر دیده شـــد. همانطور که در نتایج مشاهده شـــد در ۱۰۰٪ جدایه‌های تأیید شده آرژنین دکربوکســـیلاز مثبت بود ولی در ۷۵٪ از جدایه‌های تأیید نشده این تست مثبت گزارش شد. Buller در سال ۲۰۰۴ عنوان کرد که بیش از ۹۲٪ جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* از نظر این تست مثبت هستند. همچنین Austin در ســـال ۲۰۰۷ و Buller در ســـال ۲۰۰۴ نشان دادند که از ۵۵ تا ۹۷٪ جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* از نظر تســـت لایزین دکربوکسیلاز مثبت هســـتند که با نتایج ما کاملا مشـــابهت دارد. Nielsen و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که متغیر بودن توانایی تخمیر قندها در هر دو گروه تأیید شده و نشده *آئروموناس هیدروفیلا* به وسیله PCR وجود دارد که این نتیجه در مطالعه حاضر نیز مشاهده گردید.
نتایج آزمایشات بیوشیمیایی نشـــان داد که حتی در بین جدایه‌های تایید شـــده از نظر بعضی از آزمایش‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندها تفاوت‌هایی وجـــود دارد به‌طوری‌که ۱۳ جدایه از نظر حداقل ۸ آزمایش اصلی شـــامل: حرکت(+)، تولید ایندول (+)، مصرف سیترات (+)، تولید اوره‌آز (-)، تحمل نمـــک (تا ۳٪)، تولید آرژنینین دهیدرولاز (+)، تولید لایزین دکربوکســـیلاز (+)، تولیـــد اورنیتین دکربوکســـیلاز(-) و احیای نیترات (+) کاملا مشـــابه می‌باشند. همانگونه که مشخص شد جدایه‌ها از نظر تست‌های بیوشیمیایی دارای تنوع هستند که خود چالش بزرگی در تشخیص‌های باکتریولوژیکی معمول می‌باشد.
Nielsen و همـــکاران در ســـال ۲۰۰۱ از پرایمر ۱۶srRNA طراحی شـــده توســـط Dorsch و همکاران (۱۹۹۴) برای شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* در تلفات ماهیان گرمابی اســـتفاده کردند و نشـــان دادند که ۳۵ جدایه با آزمون های بیوشـــیمیایی به عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* شناخته شد ولی ۲۹ جدایـــه (۸۲٪) از این تعداد، با آزمایـــش PCR تأیید گردید. و عنوان کردند که هیچ تکثیر ژنی از DNA ســـایر آئروموناس های متحرک با این پرایمر مشـــاهده نگردید و همچنین در حین انجام کار نیز قطعه ای بزرگتر یا کوچکتر از ۶۸۵ bp ساخته نشد و حساسیت این روش را برای شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* ۱۰۰٪ گزارش نمودند. که این نتیجه با مطالعه حاضر مطابقت دارد.
نتایج مطالعه حاضر نشـــان داد که دو ژن لیپاز و ۱۶srRNA در تشـــخیص با هم تطابق کامل ندارند . همانطور که از نتایج مشـــخص اســـت همه ۳۱ جدایـــه دارای ژن لیپـــاز(۱۰۰٪) ولی در ۲۱ جدایـــه از ۳۱ جدایه (معادل ۶۷/۷۴٪) هر دو ژن حضور داشـــتند که احتمالا با شرایط آزمایش PCR که در این مطالعه اســـتفاده گردید، پرایمرهای مربوط به ژن لیپاز حساســـیت بیشـــتری برای تشـــخیص *آئروموناس هیدروفیـــلا* دارد. در مطالعه حاضر هنگامیکه از DNA ســـایر باکتری ها اســـتفاده گردید هیچ محصولی با این پرایمر تولید نشـــد. Cascon و همکاران (۱۹۹۶) از ژن لیپاز برای تشخیص این باکتری اســـتفاده کـــرد. و عنوان نمود که یک قطعـــه ۷۶۰bp فقط در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* شناســـایی شـــد که مربوط به تکثیر ژن لیپاز می‌باشـــد. Swaminathan و همکاران نیز (۲۰۰۴) از همین از پرایمر ژن لیپاز که توســـط Cascon طراحی شـــده بود جهت تشخیص و ردیابی آئروموناس هیدروفیلا استفاده نمود و این پرایمر را برای ردیابی اختصاصی این باکتری موفقیت‌آمیز دانســـت و یـــک محصول PCR خوب و مطلوب با وزن ۷۶۰bp بدســـت آورد و هنگامیکه از DNA ارگانیسم‌های دیگر همراه این پرایمر استفاده گردید هیچ محصولی با این وزن تولید نشد. که با نتایج مطالعه حاضر کاملا تطابق دارد.
در مطالعه‌ای که Castro-Escarpulli و همکاران (۲۰۰۳) بر روی تشـــخیص آئروموناس‌های جدا شده از ماهی‌های منجمد در مکزیک انجام دادند، نشان

phoid apoptosis in *Edwardsiella tarda* septicemia in Tilapia, *Oreochromis niloticus*.