

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 آهانگرزاده (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 آبی 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 خصوصاً خانواده کپورماهیان مطرح است. این باکتری عامل سپتی سمی خونریزی دهنده، پوسیدگی باله و دم 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 method 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 Veterinary Medicine, 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 fish especially Cyprinidae family has been known. *A. hydrophila* has been associated with tail and fin 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

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 اخیراً 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) نمونه برداری و جداسازی عامل

در طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ از از تعداد ۳۰ مزرعه پرورش کپور ماهیان واجد تلفات مشکوک به سپتی‌سمی *آئروموناس* در استان خوزستان نمونه برداری صورت گرفت. بدین صورت که تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی (شامل: ۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه *آمور*) با متوسط وزن $673 \pm 465/4$ گرم که دارای علائمی از قبیل خونریزی جلدی، خونریزی و تورم در اندام‌های داخلی، آسیت، آگزوفتالمی، بی‌حالی و بی‌اشتهایی، چسبندگی احشا، رنگ‌پریدگی کبد و بیرون زدگی مخرج و ... بودند، نمونه برداری شد. نمونه‌ها با رعایت شرایط استاندارد و با استفاده از کیسه‌های حمل ماهی و با تعبیه اکسیژن کافی در اسرع وقت به آزمایشگاه

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی شده و خسارات اقتصادی شدیدی را به صنعت آبی‌پروری وارد می‌کند. تاکنون باکتری‌های متعددی مانند ادواردزیلا ایکتالوری، ادواردزیلا تاردا^۱ و *آئروموناس هیدروفیلا* به عنوان عامل سپتی‌سمی گزارش شده‌اند. در بین عوامل باکتریایی آبیان، خصوصاً در ماهیان آب شیرین *آئروموناس هیدروفیلا* بسیار مورد توجه بوده است (Cao et al., 2011, Piratate et al., 2007).

آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری همه‌جا حاضر و فرصت طلب 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 سپتی‌سمی 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 به صورت باسیل‌های کوتاه گرم منفی با انتهای گرد و به صورت تکی، دوتایی و یا زنجیره‌های کوتاه مشاهده می‌شوند. این باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز و اکسیداز مثبت، تولیدکننده‌ی اسید و گاز، احیا کننده نیترات به نیتريت هستند. تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* بر اساس شکل کلونی، آزمون‌های بیوشیمیایی، سیستم ۲۰E Api و تشخیص مولکولی است (AL-Fatlawy et al., 2013).

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 کلونی‌های باکتریایی صورت گرفت (Nielsen et al., 2001 Porteen et al., 2006).

ج-۲) تعیین جنس PCR

جهت تشخیص جنس آئروموناس از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) ژن rRNA ۱۶S 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 ۱۰۰ bp (سیناژن، ایران) و محصول کنترل‌های مثبت (۷۹۶۵، انسیتیتو پاستور ایران) و منفی در ژل آگارز ۱/۱۵٪ حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داکيومنت (Uvitec، انگلستان) با نور UV باندهای تشکیل شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند مورد نظر (۵۹۹ bp) جدایه مورد

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 می‌یابد. برش دوم از مخرج شروع شده و از سطح پشتی جلویی به سمت خط جانبی ادامه می‌یابد. استخوانهای نزدیک کمان آبششی بریده شده و بوسیله برش سوم انتهای دو برش اول و دوم بهم متصل می‌شود. اما برای نمونه گیری استریل از کلیه یک برش از ناحیه پشتی داده می‌شود (شکل ۱). در نهایت از اندام‌های داخلی (کلیه، کبد و طحال) و ضایعات جلدی احتمالی نمونه‌برداری می‌گردد.



شکل ۱- دسترسی به کلیه از طریق برش از ناحیه پشتی

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

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار	منبع
۱۶ S rRNA F	5'-TCA TGG CTC AGA TTG AAC GCT-3'	<i>Aeromonas sp.</i>	۵۹۹	Porteen et al, ۲۰۰۶
۱۶ S rRNA R	5'-CGG GGC TTT CAC ATC TAA CTT ATC-3'	<i>Aeromonas sp.</i>	۵۹۹	
۱۶ SrRNA F	5'-GAA AGG TTG ATG CCT AAT ACG TA-3'	<i>A. hydrophila</i>	۶۸۵	Dorsch et al, ۱۹۹۴
۱۶ SrRNA R	5'-CGT GCT GGC AAC AAA GGA CAG-3'	<i>A. hydrophila</i>	۶۸۵	
Lipase F	5'-AAC CTG GTT CCG CTC AAG CCG TTG-3'	<i>A. hydrophila</i>	۷۶۳	Cascon et al, ۱۹۹۶
Lipase R	5'-TTG CTC GCC TCG GCC CAG CAG CT-3'	<i>A. hydrophila</i>	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 ۱۹۹۶ طراحی 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، زخم‌های جلدی، پرخونی و تورم اندام‌های داخلی) تعداد ۲۱۳

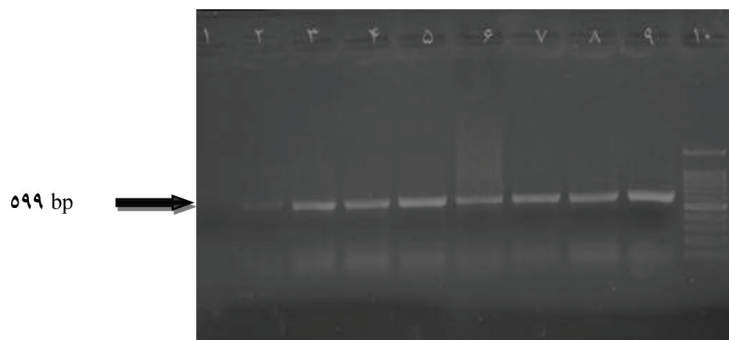
جدایه خالص سازی شد. نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که تعداد ۱۷۱ جدایه متعلق به جنس آئروموناس بود. همه این جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت بودند. با آزمون‌های بیوشیمیایی تعداد ۵۹ جدایه به عنوان باکتری آئروموناس هیدروفیلا شناخته شد. (باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) شناسایی شد.

نتایج تشخیص به روش مولکولی

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ۱۶s rRNA جنس آئروموناس (Porteen et al., 2006) سوییچ استاندارد منجر به ساخت محصولی به اندازه 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.

جدول ۲- برنامه دمایی PCR جهت تشخیص جنس آئروموناس و آئروموناس هیدروفیلا

ژن	ویژگی	باند مورد انتظار	دما (°C)	زمان	ژن
۱۶ S (<i>Aeromonas sp.</i>) ۱۶S (<i>A. hydrophila</i>)	سیکل اول	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		اتصال	۵۵	۳۰ ثانیه	۳۰
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۴۵ ثانیه	۳۰
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)

نشان داد که ۳۱ جدایه از بین ۵۹ جدایه تشخیص داده شده به روش بیوشیمیایی، باند ۷۶۳ bp (ژن لیپاز) را نشان دادند ولی از این تعداد (۳۱ جدایه)، ۲۱ جدایه دارای باند ۶۸۵ bp (۱۶ srRNA) بودند (شکل ۳ و ۴) (جدول ۳)، بعبارتی از این ۳۱ جدایه، تعداد 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 شده جنس *Aeromonas* و ۵۲/۵۴٪ از جدایه‌های *Aeromonas hydrophila* تشخیص داده شده با آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه به‌عنوان *Aeromonas hydrophila* در نظر گرفته شدند. مقایسه مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های تایید شده و تایید نشده از نظر گونه هیدروفیلا:

با توجه به نتایج، مشخص شد که ۲۴/۸ درصد از جدایه‌های جنس *Aeromonas* متعلق به گونه هیدروفیلا می‌باشند و همچنین از ۵۹ جدایه‌ای که توسط آزمون‌های بیوشیمیایی *Aeromonas hydrophila* تشخیص داده شد، ۳۱ جدایه (معادل ۵۲/۵۴٪) توسط آزمایش PCR تایید شده و ۲۸ جدایه (۴۵/۴۷٪) تایید نشدند. نتایج بیوشیمیایی ۳۱ جدایه تایید شده و ۲۸ جدایه تایید نشده با PCR با یکدیگر مقایسه شدند (جدول ۴ و ۵). نتایج نشان داد که، در بیش از ۸۷٪ جدایه‌های تایید شده، آزمون اندول

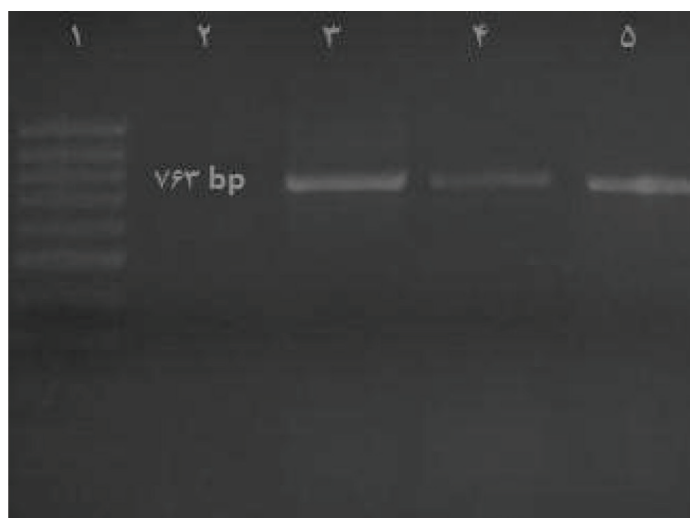
جدول ۳- مقایسه نتایج حاصل از تعیین هویت *Aeromonas* و *Aeromonas sp.* از *hydrophila* ۳۱۲ جدایه به روش بیوشیمیایی و مولکولی

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

۱۲۵ جدایه‌ای که از نظر جنس *Aeromonas* تایید شده بودند و شامل همه ۵۹ جدایه تشخیص داده شده به عنوان *Aeromonas hydrophila* با تست‌های بیوشیمیایی بودند، مورد آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *Aeromonas hydrophila* (ژن‌های لیپاز و ۱۶s rRNA) قرار گرفتند. نتایج



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۶ srRNA گونه‌ی *Aeromonas hydrophila* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. ستون ۱- کنترل منفی، ستون ۳- کنترل مثبت، ستون ۴: نردبان ژنی ۱۰۰(M) bp. ستون ۲: جدایه‌ی مظنون به *Aeromonas hydrophila* (۶۸۵ bp)



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR ژن لیپاز *Aeromonas hydrophila* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. ستون ۱- نردبان ژنی ۱۰۰(M) bp، ستون ۲- کنترل منفی، ستون ۵- کنترل مثبت. ستون‌های ۳ و ۴- جدایه‌های دارای ژن لیپاز (۷۶۳ bp)

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

از مجموع ۳۱ جدایه			آزمون
وضعیت کلی آزمون	تعداد و درصد جدایه‌های منفی	تعداد و درصد جدایه‌های مثبت	
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	اکسیداز
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	کاتالاز
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	حرکت
±	۴ (۱۲/۹٪)	۲۷ (۸۷/۰۹٪)	اندول
±	۲۶ (۸۳/۸۷٪)	۵ (۱۶/۱۲٪)	تولید H ₂ S
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	آرژینین دکربوکسیلاز
±	۶ (۱۹/۳۵٪)	۲۵ (۸۰/۶۴٪)	لایزین دکربوکسیلاز
±	۲۱ (۶۷/۷۴٪)	۱۰ (۳۲/۲۵٪)	اورنیتین دهیدرولاز
±	۳۰ (۹۶/۷۷٪)	۱ (۳/۲۲٪)	اوره
±	۵ (۱۶/۱۲٪)	۲۶ (۸۳/۸۷٪)	سیمون سیترات
±	۲۰ (۶۴/۵۱٪)	۱۱ (۳۵/۴۸٪)	وگس پراسکور
±	۲۴ (۷۷/۴۱٪)	۷ (۲۲/۵۸٪)	متیل رد
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	O/F
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	احیای نیتрат
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	تحمل نمک ۳٪
±	۲۳ (۷۴/۱۹٪)	۸ (۲۵/۸۰٪)	تحمل نمک ۴٪
±	۳۰ (۹۶/۷۷٪)	۱ (۳/۲۲٪)	تحمل نمک ۶٪
±	۲۷ (۸۷/۰۹٪)	۴ (۱۲/۹٪)	رشد در دمای ۴ °C
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	رشد در دمای ۳۷ °C
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	رشد در دمای ۴۲ °C
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	تخمیر گلوکز
±	۲۱ (۶۷/۷۴٪)	۱۰ (۳۲/۲۵٪)	تخمیر اینوزیتول
±	۲ (۶/۴۵٪)	۲۹ (۹۳/۵۴٪)	تخمیر سوکروز
±	۲۴ (۷۷/۴۱٪)	۷ (۲۲/۵۸٪)	تخمیر سوربیتول
±	۲۷ (۸۷/۰۹٪)	۴ (۱۲/۹٪)	تخمیر لاکتوز
±	۲۳ (۷۴/۱۹٪)	۸ (۲۵/۸۰٪)	تخمیر سالیسین
±	۱ (۳/۲۲٪)	۳۰ (۹۶/۷۷٪)	تخمیر مانیتول
±	۲۲ (۷۰/۹۶٪)	۹ (۲۹/۰۳٪)	تخمیر مالتوز
±	۱۶ (۵۱/۶۱٪)	۱۵ (۴۸/۳۸٪)	تخمیر آرابینوز
±	۴ (۱۲/۹٪)	۲۷ (۸۷/۰۹٪)	تولید گاز از گلوکز

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

وضعیت کلی آزمون	از مجموع ۲۸ جدایه		آزمون
	تعداد و درصد جدایه‌های منفی	تعداد و درصد جدایه‌های مثبت	
+	-	۲۸ (۱۰۰٪)	اکسیداز
+	-	۲۸ (۱۰۰٪)	کاتالاز
±	۵ (۱۷/۸۵٪)	۳ (۸۲/۱۴٪)	حرکت
±	۱۴ (۵۰٪)	۱۴ (۵۰٪)	اندول
±	۱۳ (۴۶/۴۲٪)	۱۵ (۵۳/۵۷٪)	تولید H ₂ S
±	۷ (۲۵٪)	۲۱ (۷۵٪)	آرژنینین دکربوکسیلاز
±	۸ (۲۸/۵۷٪)	۲۰ (۷۱/۴۲٪)	لایزین دکربوکسیلاز
±	۱۰ (۳۵/۷۱٪)	۸ (۲۴/۶۴٪)	اورنیتین دهیدرولاز
±	۲۴ (۸۵/۷۱٪)	۴ (۱۴/۲۸٪)	اوره
±	۷ (۲۵٪)	۲۱ (۷۵٪)	سیمون سیترات
±	۲۰ (۷۱/۴۲٪)	۸ (۲۸/۵۷٪)	وگس پراسکور
±	۲۵ (۸۹/۲۸٪)	۳ (۱۰/۷۱٪)	متیل رد
+	-	۳۱ (۱۰۰٪)	O/F
±	۳ (۱۰/۷۱٪)	۲۵ (۸۹/۲۸٪)	احیای نیترات
±	۱۰ (۳۵/۷۱٪)	۱۸ (۶۴/۲۸٪)	تحمل نمک ۳٪
±	۱۷ (۶۰/۷۱٪)	۱۱ (۳۹/۲۸٪)	تحمل نمک ۴٪
±	۲۳ (۸۲/۱۴٪)	۵ (۱۷/۸۵٪)	تحمل نمک ۶٪
±	۲۸ (۱۰۰٪)	-	رشد در دمای ۴°C
+	-	۲۸ (۱۰۰٪)	رشد در دمای ۳۷°C
±	۲۰ (۷۱/۴۲٪)	۸ (۲۸/۵۷٪)	رشد در دمای ۴۲°C
±	۷ (۲۵٪)	۲۱ (۷۵٪)	تخمیر گلوکز
±	۲۲ (۷۸/۵۷٪)	۶ (۲۱/۴۲٪)	تخمیر اینوزیتول
±	۱۰ (۳۵/۷۱٪)	۱۸ (۶۴/۲۸٪)	تخمیر سوکروز
±	۱۶ (۵۷/۱۴٪)	۱۲ (۴۲/۸۵٪)	تخمیر سوربیتول
±	۲۰ (۷۱/۴۲٪)	۸ (۲۸/۵۷٪)	تخمیر لاکتوز
±	۲۳ (۸۲/۱۴٪)	۵ (۱۷/۵۸٪)	تخمیر سالیسین
±	۸ (۲۸/۵۷٪)	۲۰ (۷۱/۴۲٪)	تخمیر مانیتول
±	۲۲ (۷۰/۹۶٪)	۹ (۲۹/۰۳٪)	تخمیر مالتوز
±	۲۳ (۸۲/۱۴٪)	۵ (۱۷/۵۸٪)	تخمیر آرابینوز
±	۱۶ (۵۷/۱۴٪)	۱۲ (۴۲/۸۵٪)	تولید گاز از گلوکز

مثبت بود، در حالی که فقط نیمی از جدایه های تأیید نشده، اندول مثبت بودند. در بررسی نمونه های تأیید شده، به ترتیب ۱۰۰، ۸۱ و ۳۲٪ آرژنین و لایزین دکربوکسیلاز 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 سیترات 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 پیشگیری از بروز بیماری های عفونی مستلزم مطالعات تشخیصی دقیق می باشد. از آنجائی که در سال های اخیر تلفات زیادی در کپور ماهیان پرورشی در سطح استان خوزستان گزارش شده است و نیز به علت اهمیت باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ایجاد سپتی سمی در ماهیان گرمابی، مطالعه حاضر با هدف شناسایی دقیق جدایه های *آئروموناس هیدروفیلا*، در کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و به دنبال آن، معرفی راههای پیشگیری از این بیماری انجام گردید. تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* بر اساس شکل کلونی، آزمون های بیوشیمیایی، سیستم E Api ۲۰ و تشخیص مولکولی است. کلونی های این باکتری حدود ۲ الی ۳ میلی متر قطر دارند و در محیط کشت آگار خون دار ظاهر گرد، محدب و صاف دارند. *آئروموناس هیدروفیلا* باکتری گرم منفی کوکو باسیل تا باسیلی با انتهای گرد است که معمولاً به صورت تکی یا زنجیره کوتاه دیده می شود و گونه های متحرک *آئروموناس* ها تولید یک تاژک قطبی می کنند (AL-Fatlawy et al., 2013).

در مطالعه حاضر شناسایی باکتری ها هم به وسیله آزمایش های بیوشیمیایی و هم توسط آزمایش PCR انجام گردید. آزمون های بیوشیمیایی تعداد ۱۷۱ جدایه را به عنوان جنس *آئروموناس* و ۵۹ جدایه را به عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* معرفی کرد. بعد از انجام آزمایش PCR مشخص گردید که حدود ۲۶ درصد از موارد تعیین شده به عنوان جنس *آئروموناس*، به وسیله آزمایش PCR تأیید نشدند و همچنین از ۵۹ جدایه ای که توسط آزمون های بیوشیمیایی *آئروموناس هیدروفیلا* تشخیص داده شد ۳۱ جدایه (معادل ۵۲/۵۴٪) توسط آزمایش پی سی آر تأیید شده و ۲۸ جدایه (۴۷/۴۵٪) تأیید نشدند. حدس زده می شود که این تعداد متعلق به سایر *آئروموناس* های متحرک هستند. با توجه به نتایج، مشخص شد که ۲۴/۸ درصد از جدایه های تأیید شده جنس *آئروموناس* متعلق به گونه *هیدروفیلا* می باشد. بررسی نتایج بیوشیمیایی جدایه ها با منابع مورد استفاده نشان داد که آزمایش هایی از قبیل: حرکت، تولید اندول، آرژنین دکربوکسیلاز، لایزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دهیدرولاز، اوره، سیمون سیترات، احیای نیترا، تحمل نمک تا ۳٪ و تخمیر قندهایی مانند گلوکز، سوکروز، مانیتول، اینوزیتول در ۳۱ جدایه تأیید شده با PCR با جداول معتبر تطابق کامل دارد (Austin B. and Austin D. 2007, Buller, 2004). اما در ۲۸ جدایه تأیید نشده در بعضی از تست ها با جداول موجود در منابع تطابق کمتر دیده شد. همانطور که در نتایج مشاهده شد در ۱۰۰٪ جدایه های تأیید شده آرژنین دکربوکسیلاز مثبت بود ولی در ۷۵٪ از جدایه های تأیید نشده این تست مثبت گزارش شد. Buller در سال ۲۰۰۴ عنوان کرد که بیش از ۹۲٪

جدایه های *آئروموناس هیدروفیلا* از نظر این تست مثبت هستند. همچنین Austin در سال ۲۰۰۷ و Buller در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که از ۵۵ تا ۹۷٪ جدایه های *آئروموناس هیدروفیلا* از نظر تست لایزین دکربوکسیلاز مثبت هستند که با نتایج ما کاملاً مشابهت 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 نشان داد که حتی در بین جدایه های تأیید شده از نظر بعضی از آزمایش های بیوشیمیایی و تخمیر قندها تفاوت هایی وجود دارد به طوری که ۱۳ جدایه از نظر حداقل ۸ آزمایش اصلی شامل: حرکت (+)، تولید ایندول (+)، مصرف سیترات (+)، تولید اوره آز (-)، تحمل نمک (تا ۳٪)، تولید آرژنین دهیدرولاز (+)، تولید لایزین دکربوکسیلاز (+)، تولید اورنیتین دکربوکسیلاز (-) و احیای نیترا (+) کاملاً مشابه می باشند. همانگونه که مشخص شد جدایه ها از نظر تست های بیوشیمیایی دارای تنوع هستند که خود چالش بزرگی در تشخیص های باکتریولوژیکی معمول می باشد.

Nielsen و همکاران در سال ۲۰۰۱ از پرایمر ۱۶srRNA طراحی شده توسط Dorsch و همکاران (۱۹۹۴) برای شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* در تلفات ماهیان گرمابی استفاده کردند و نشان دادند که ۳۵ جدایه با آزمون های بیوشیمیایی به عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* شناخته شد ولی ۲۹ جدایه (۸۲٪) از این تعداد، با آزمایش PCR تأیید گردید. و عنوان کردند که هیچ تکثیر ژنی از DNA سایر *آئروموناس* های متحرک با این پرایمر مشاهده 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 نشان داد که دو ژن لیپاز و ۱۶srRNA در تشخیص با هم تطابق کامل ندارند. همانطور که از نتایج مشخص است همه ۳۱ جدایه دارای ژن لیپاز (۱۰۰٪) ولی در ۲۱ جدایه از ۳۱ جدایه (معادل ۶۷/۷۴٪) هر دو ژن حضور داشتند که احتمالاً با شرایط آزمایش PCR که در این مطالعه استفاده گردید، پرایمرهای مربوط به ژن لیپاز حساسیت بیشتری برای تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* دارد. در مطالعه حاضر هنگامیکه از DNA سایر باکتری ها استفاده گردید هیچ محصولی با این پرایمر تولید نشد. Cascon و همکاران (۱۹۹۶) از ژن لیپاز برای تشخیص این باکتری استفاده کرد. و عنوان نمود که یک قطعه ۷۶۰ bp فقط در جدایه های *آئروموناس هیدروفیلا* شناسایی شد که مربوط به تکثیر ژن لیپاز می باشد. Swaminathan و همکاران نیز (۲۰۰۴) از همین پرایمر ژن لیپاز که توسط Cascon طراحی شده بود جهت تشخیص و ردیابی *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده نمود و این پرایمر را برای ردیابی اختصاصی این باکتری موفقیت آمیز دانست و یک محصول PCR خوب و مطلوب با وزن ۷۶۰ bp بدست آورد و هنگامیکه از DNA ارگانیزم های دیگر همراه این پرایمر استفاده گردید هیچ محصولی با این وزن تولید نشد. که با نتایج مطالعه حاضر کاملاً تطابق دارد.

در مطالعه ای که Castro-Escarpulli و همکاران (۲۰۰۳) بر روی تشخیص *آئروموناس* های جدا شده از ماهی های منجمد در مکزیک انجام دادند، نشان

- 3- Austin, B. and Austin, D.A. 2007. Bacterial Fish Pathogens. 4th edition. Chichester, UK: Springer-Praxis.
- 4 -Buller, N.B.2004. . Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI publishing . p: 361.
- 5- Cao, H.P., HeSLu, L. and Hou, L. 2010. Characterization and phylogenetic analysis of the bitrichous pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Journal of Aquaculture Bamidgeh*. 62: 182-189.
- 6- Cascon, A., Anguita, J., Hernanz, C., Sanchez, M., Fernandez, M. and Naharro, G. 1996. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 :1167 -1170.
- 7- Castro-Escarpulli, G.; Figueras, MJ.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Ferná ndez-Rendo ´ n, E.; Aparicio, GO.; Guarro, J. and Chaco ´ n, MR. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 41 – 49.
- 8- Dorsch, M., Ashbolt, N.J., Cox, P.T. and 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 Bacteriology*. 77:722–726.
- 9- Jun J.W., Kim J.H., Gomez D.K., Choresca Jr C.H., Han J.E., Shin S.P. and Park S.C. (2010) *African Journal of Microbiology Research*, 4(9), 849-855.
- 10- Khosravi A, Abbasi E, Hashemi A, Eskandari M, Kamaee F. Application of PCR for detection of *Vibrio cholerae* using primers targeted against the gene of outer membrane protein ompW and comparison with conventional methods. *Iran J Med Microbiol*. 2007; 1 (2) :15-20 (In Persian).
- 11- Lane D.J., Stackebrandt E., Goodfellow M. (1991) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, New York, 115-175.
- 12- Lee, S., Kim, S., Oh, Y., and Lee, Y. 2000. Characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from Rainbow Trouts in Korea. *The Journal of Microbiology*. 38(1):1-7.
- 13- MaccFadin J.K. (2000) *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed., Awolter Klumer Company Philadelphia Baltimor, New York.
- 14- Nielsen, M.E., Høi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., and 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?. *Disease of Aquatic Organism*. 46(22): 23–29.
- 15- Pirarat, N., Maita, M., Endo, M. and Katagiri, T. 2007. Lym-

دادن که تفاوت زیادی بین روش مولکولی و روش بیوشیمیایی وجود دارد و نتایج آنها نشان داد که فقط ۲۸٪ از جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* به روش بیوشیمیایی درست تشخیص داده شد.

مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* از لحاظ کشت و خصوصیات بیوشیمیایی با سایر گونه‌های *آئروموناس* متحرک و همچنین سایر باکتری‌ها از جمله ویبریوها، خصوصیات مشابهی را نشان می‌دهند و احتمال می‌رود که در تشخیص متداول آزمایشگاهی اشتباه شوند. در واقع اشکال زمانی رخ می‌دهد که روش‌های دقیق و مطمئن تشخیصی به کار گرفته نشود (Khosravi et. al., 2007).

عنوان کرده‌اند که استفاده از ژن‌های ریبوزومی خصوصاً 16srRNA به عنوان مارکرهای ثابت و اختصاصی برای تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* اثبات شده است (Lane 1991, Jun et. al 2010, و MaccFadin, 2010). (et. Al

از آنجاییکه تشخیص سریع باکتری‌های بیماریزا در تشخیص به موقع بیماری‌ها اهمیت فراوان دارد و روش‌های معمول جداسازی و شناسایی در تشخیص باکتری‌ها خسته کننده و وقت گیر است، تکثیر ردیف نوکلئوتیدی اختصاصی DNA بوسیله آزمایش PCR یک روش حساس و دقیق و اختصاصی جهت تشخیص میکروارگانیسم‌ها فراهم آورده است (Swaminathan et al 2004).

در مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران برای تعیین هویت جدایه‌های مظنون به *آئروموناس* از PCR و با استفاده از دو پرایمر استفاده گردید که نتایج نشان داد روش فوق روشی سریع، دقیق و حساس است که قابل جایگزین شدن بجای روش‌های بیوشیمیایی است. با توجه به رشد سریع آبی پروری در کشور به خصوص سیستم پرورش گرم‌آبی و همچنین گسترش بیماری‌های عفونی از جمله سپتی‌سمی‌های *آئروموناس* دست‌یابی به روش‌های سریع و دقیق شناسایی عوامل بیماریزا کمک شایانی به پیاده سازی پروتکل‌های درمانی و پیشگیرانه مناسب دارد، بنابراین در تشخیص بیماری‌های عفونی آبیان، توصیه به استفاده از روش‌های مولکولی سریع از جمله PCR است. با توجه به نقش قابل توجه *آئروموناس* ها و *آئروموناس هیدروفیلا* در تلفات کپورماهیان استان خوزستان توصیه به تهیه واکسن در این خصوص می‌گردد.

پاورقی‌ها

- 1-*Edwardsiella ictaluri*
2-*Edwardsiella tarda*

منابع مورد استفاده

- 1-AL-Fatlawy, H.N.K. and AL-Ammar, MH. 2013. Molecular study of *Aeromonas hydrophila* isolated from stool samples in najaf (IRAQ). *International Journal of Microbiology Research*. 5(1):363-366.
- 2 -Alishahi, M., Soltani, M., Zargar, A., 2009. Survey on bacterial mortality of grass carp in the Khuzestan province. *Iranian veterinary journal*. Vol:5, No:1, P:25-34. (In Persian).

phoid apoptosis in *Edwardsiella tarda* septicemia in Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 608-616.

16- Porteen, K., Agarwal, R.K. and Bhilegaonkar, K.N. 2006. PCR Based Detection of Aeromonas from Milk Samples. *Journal of food technology*. 4(2):111-115.

17- Roberts, RJ (1997) Epizootic ulcerative syndrome (EUS): progress since 1985. In: Flegel TW, MacRae IH (eds) Diseases in Asian aquaculture III. *Asian Fisheries Society, Manila*, p 125–128.

18- Soltani, M., 1996. Bacterial Diseases of Fish., Iranian Veterinary Organization Pub. P: 231. (In Persian).

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

20- Yogananth, N., Bhagyaraj, R., Chanthuru, A., Anbalagan, T. and Mullai Nila, K. 2009. Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 4 (1): 51-53.

