Archive of SID

نقش *آئرومونـاس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان پرورشی استان خوزستان

مینا آهنگرزاده[۱*]، مسعود قربانپور[۲]، رحیم پیغان[۳]، مصطفی شریف‌روحانی[۴] و مهدی سلطانی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۶

چکیده

آئرومونـاس هیدروفیلا یک باکتری همیشه حاضر و فرصت‌طلب است. در مورد بیماری‌زایی اولیه یا ثانویه بودن این باکتری، اختلاف نظر وجود دارد؛ اما به هر حال، تحت شرایط استرس‌زا، از قبیل تغییرات دمایی، دستکاری و یا کاهش کیفیت آب، تبدیل به یک پاتوژن می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند. این باکتری، عامل اصلی سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین است. در این مطالعه از تعداد ۲۰۰ قطعه کپور ماهیان پرورشی، شامل ۱۲۶ قطعه کپور معمولی، ۳۹ قطعه فیتوفاگ و ۳۵ قطعه آمور مشکوک به سپتی‌سمی آئرومونـاسی در استان خوزستان، نمونه‌برداری شد که از این تعداد، ۱۲۵ باکتری متعلق به جنس آئرومونـاس به روش بیوشیمیایی و PCR شناسایی شد که ۳۱ جدایه از ۱۲۵ جدایه با روش‌های بیوشیمیایی و ردیابی ژن‌های 16s rRNA و لیپاز به عنوان *آئرومونـاس هیدروفیلا* شناسایی گردیدند. نتایج نشان داد که میزان نقش آئرومونـاس‌ها و *آئرومونـاس هیدروفیلا* در ماهیان دارای علایم بررسی شده، به ترتیب معادل ۶۲/۵ درصد و ۱۵/۵ درصد بود و لازم است در خصوص پیشگیری از آن اقدام گردد. هم‌چنین مشخص شد که روش PCR در مقایسه با روش‌های بیوشیمیایی، روش سریع و دقیق در تشخیص *آئرومونـاس هیدروفیلا* می‌باشد.

کلمات کلیدی: *آئرومونـاس هیدروفیلا*، کپورماهیان، سپتی‌سمی هموراژیک، استان خوزستان

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی، باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی در صنعت آبزی‌پروری می‌شوند. در بین عوامل مسبب بیماری‌های باکتریایی، آئرومونـاس‌های متحرک به خصوص *آئرومونـاس هیدروفیلا* بسیار مورد توجه می‌باشد (Lee et al. 2000). آئرومونـاس‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتلاز مثبتی هستند که در خانواده‌ی آئرومونـاداسه قرار داشته و از دو گروه مجزای غیرمتحرک سرمادوست و گروه متحرک مزوفیلیک تشکیل شده‌اند (سلطانی ۱۳۷۵، Kingombe et al. 1999, Swaminathan et al. 2004). محیط‌های آبی به عنوان منبع اصلی باکتری‌های آئرومونـاس، مورد توجه هستند و ماهی را به عنوان منبع اصلی این میکروارگانیسم‌ها معرفی می‌کنند (Swaminathan et al. 2004).

آئرومونـاس هیدروفیلا یک باکتری همیشه حاضر و فرصت‌طلب است. در مورد پاتوژن اولیه یا ثانویه بودن این باکتری، اختلاف نظر وجود دارد (Nielsen et al. 2001)؛ اما به‌هرحال، تحت شرایط استرس‌زا، از قبیل

[۱*] دانش‌آموخته‌ی دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز E-mail: m.ahangarzadeh@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز

[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز

[۴] دانشیار پژوهشی مؤسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی کشور

[۵] استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات دمایی، دستکاری و یا کاهش کیفیت آب، تبدیل به یک پاتوژن می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (Lee et al. 2000, Yogananth et al. 2009). این باکتری، عامل اصلی سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین از قبیل کپور ماهیان، مار ماهی، شیر ماهی، گربه ماهی کانال، 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. این عفونت‌ها ممکن است سبب مرگ و میر بالا در هچری‌های ماهی و سیستم آبی طبیعی شوند (اخلاقی ۱۳۷۹، Nielsen et al. 2001, Peyghan et al. 2010, Swaminathan et al. 2004). *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از باکتری‌های مهم در صنعت پرورش ماهیان گرم‌آبی است؛ ولی گاهی در ماهیان آب شور نیز باعث بروز بیماری می‌شود و علاوه بر ماهی، این باکتری در انسان نیز ممکن است باعث بیماری‌هایی از قبیل گاستروانتریت و اسهال مسافرتی شود (اخلاقی ۱۳۷۹، Lee et al. 2000).

در ایران، در سال ۱۳۷۲ در بررسی علل تلفات آمور، جداسازی آئروموناس‌های متحرک از آبشش و کلیه و کبد این ماهی صورت گرفته است (پیغان و اسماعیلی ۱۳۷۲). آئروموناس‌ها از کپور ماهیان پرورشی به خصوص کپور معمولی در استان فارس نیز جداسازی شده است (اخلاقی ۱۳۷۹). سلطانی و ابراهیم‌زاده‌موسوی در سال ۱۳۷۵ دو گونه *آئروموناس هیدروفیلا* و *آئروموناس ورونی* را از ماهیان تلف شده در دو کارگاه در استان‌های گیلان و تهران جداسازی کرده‌اند. هم‌چنین اخلاقی و وفایی در سال ۱۳۸۱ باکتری آئروموناس هیدروفیلا را از ماهی چشم قورباغه‌ای بیمار، جداسازی کردند که با آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت و نشان دادند که بیش‌ترین بیماری‌زایی آن در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد.

روش جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی پاتوژن‌های باکتریایی، یک روند زمان بر است و برای تشخیص در حد گونه کافی و مناسب نیست (Swaminathan et al. 2004)، به همین دلیل به تازگی، 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 مطالعه‌ی حاضر نیز از روش PCR برای تعیین نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان بهره‌گیری شده است. به همین منظور باکتری‌های مظنون به جنس آئروموناس و گونه‌ی هیدروفیلا از کپور ماهیان تلفاتی و در حال تلفات استان خوزستان، جدا و به وسیله‌ی PCR تشخیص قطعی داده شدند.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری و جداسازی عامل

نمونه‌برداری از مزارع کپور ماهیان دارای تلفات، صورت گرفت. برای این کار در طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ از تعداد ۳۰ کارگاه واجد تلفات، ۲۶۰ قطعه با متوسط وزن ۶۷۳ گرم در ۴ فصل و به خصوص فصل بهار و تابستان، نمونه‌برداری شد که از این تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی (جدول ۱) علایمی از قبیل خونریزی جلدی، خونریزی و تورم در اندام‌های داخلی، آسیت، اگزوفتالمی، بی‌حالی و بی‌اشتهایی، چسبندگی احشا، رنگ‌پریدگی کبد و بیرون‌زدگی مقعد داشتند و مابقی به ظاهر، سالم بودند. نمونه‌ها با استفاده از کیسه‌های حمل ماهی و با تعبیه‌ی اکسیژن کافی به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از بیومتری و ثبت علایم بالینی، نمونه‌برداری از اندام‌های داخلی انجام شد. برای این کار، ابتدا سطح بدن به وسیله‌ی الکل ۷۰ درصد، ضدعفونی شد و سپس با استفاده از یک اسکالپل استریل، کالبدگشایی صورت گرفت و از اندام‌های داخلی (کلیه، کبد و طحال) و ضایعات جلدی احتمالی، نمونه‌برداری شد.

جدول ۱: کپور ماهیان واجد علایم سپتی سمی آئروموناس مورد نمونه‌برداری شده به تفکیک گونه

تعداد ماهی دارای علایم	کپور	فیتوفاگ	آمور	سرگنده
۲۰۰	۱۲۶	۳۹	۳۵	۰

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی Tryptic Soy Agar (TSA) تلقیح و سپس در دمای ۳۷ درجه‌ی 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 محیط جدید، خالص‌سازی گردیدند.

تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های خالص‌سازی شده، برای شناسایی جنس آئروموناس و گونه‌ی 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 برای تشخیص دقیق‌تر از آزمایش‌های حرکت، تولید ایندول، مصرف سیترات، تولید اوره‌آز، واکنش در TSI، تحمل نمک، تولید آرژینین دهیدرولاز، تولید لایزین دکربوکسیلاز، تولید اورنیتین دکربوکسیلاز، واکنش در محیط MR-VP، احیای نیترات و تخمیر قندهای گلوکز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، مالتوز، اینوزیتول و لاکتوز (تمامی محیط‌ها ساخت مرک آلمان) استفاده گردید (علیشاهی و همکاران ۱۳۸۸، Nielsen et al. 2001, Porteen et al. 2006). پس از انجام آزمایش‌ها، نتایج با منابع معتبر، مقایسه شد (Austin and Austin 2007, Buller 2004).

تشخیص به روش PCR

استخراج DNA از باکتری

برای جداسازی و استخراج DNA باکتری‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد. برای این کار، یک کلونی از باکتری در ۱ میلی‌لیتر محیط آبگوشت TSA تلقیح شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی در ظرف ضدعفونی ریخته شد و سپس ۱ سی‌سی PBS به رسوب تشکیل شده، اضافه گردید و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. در نهایت، پس از تخلیه‌ی مایع رویی، ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب اضافه و سوسپانسیون حاصل در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و سوسپانسیون، در دور ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. آن‌گاه ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی در میکروتیوب‌های استریل برای انجام PCR در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Nielsen et al. 2001, Porteen et al. 2006).

PCR تعیین جنس

برای تشخیص جنس آئروموناس از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۲) ژن 16s rRNA آئروموناس (Porteen et al. 2006) استفاده شد. انجام دادن PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر استریل و فاقد DNAse و در دستگاه ترموسایکلر Corbet (استرالیا) انجام گردید. برای این کار، هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۸/۵ میکرولیتر آب DEPS، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید. برای تکثیر ژن هدف، پس از بهینه‌سازی از برنامه‌ی دمایی درج شده در جدول ۲ استفاده شد. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن مورد هدف در نهایت ۸ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی bp ۱۰۰ (سیناژن، ایران) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داکیومنت (Uvitec، انگلستان) باندهای تشکیل شده، مشاهده گردید. در صورت مشاهده‌ی باند مورد نظر (bp ۵۹۹) جدایه‌ی مورد نظر، آئروموناس در نظر گرفته می‌شد.

www.SID.ir

Archive of SID

PCR تعیین گونه

برای تشخیص گونه‌ی هیدروفیلا از پرایمرهای اختصاصی گونه (جدول ۲) ژن 16s 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 ۳) و پرایمرهای مورد استفاده، دقیقاً مشابه شرایط PCR تشخیص جنس آئروموناس بود. در این مرحله، در صورت مشاهده‌ی باند ۶۸۵ bp برای ژن 16srRNA و ۷۶۳ bp برای ژن لیپاز جدایه‌ی مورد نظر، *آئروموناس هیدروفیلا* در نظر گرفته می‌شد.

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده برای 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	

جدول ۳: برنامه‌ی دمایی PCR برای تشخیص جنس آئروموناس و *آئروموناس هیدروفیلا*

ژن	سیکل‌ها		دما (°C)	زمان	تعداد سیکل‌ها
16 S (*Aeromonas* sp.) 16S (*A. hydrophila*)	سیکل اول	واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	واسرشته‌سازی	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	واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	واسرشته‌سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		اتصال	۶۵	۳۰ ثانیه	۳۰
		تکثیر	۷۲	۴۵ ثانیه	۳۰
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

نتایج

از اندام‌های داخلی و ضایعات جلدی احتمالی ۲۰۰ قطعه ماهی واجد علایم (آسیت، زخم‌های جلدی، پرخونی و تورم اندام‌های داخلی) ۱۷۱ جدایه‌ی مظنون به جنس آئروموناس (باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) جداسازی شد (جدول ۴). از اندام‌های داخلی هیچ یک از ۶۰ قطعه ماهی سالم، باکتری مظنون

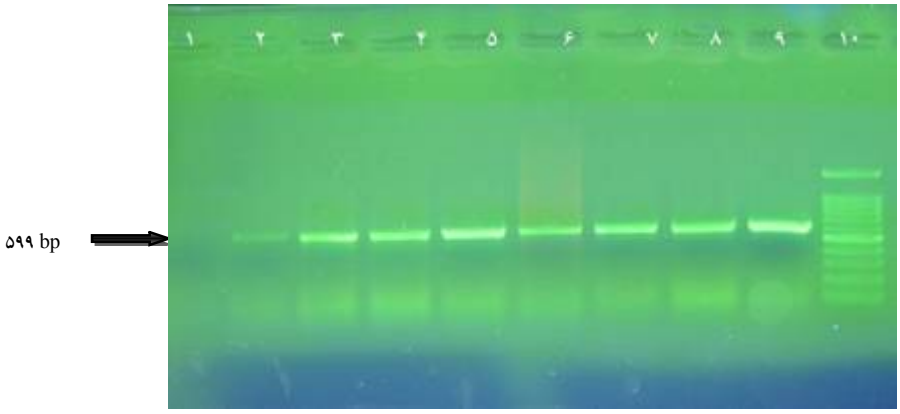
www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی نگردید. از تعداد ۱۷۱ جدایه‌ی مورد اشاره، تعداد ۱۲۵ جدایه در PCR باند اختصاصی جنس آئروموناس (599 bp) را نشان دادند (تصویر ۱).

جدول ۴: جدایه‌های باکتریایی جدا شده از کپور ماهیان واحد علایم سپتی سمی آئروموناس

تعداد کل ماهی دارای علایم	تعداد کل جدایه‌های باکتریایی جدا شده	تعداد جدایه‌های مظنون به جنس آئروموناس	تعداد جدایه‌های آئروموناس	تعداد جدایه‌های آئروموناس هیدروفیلا
۲۰۰	۲۱۳	۱۷۱	۱۲۵	۳۱

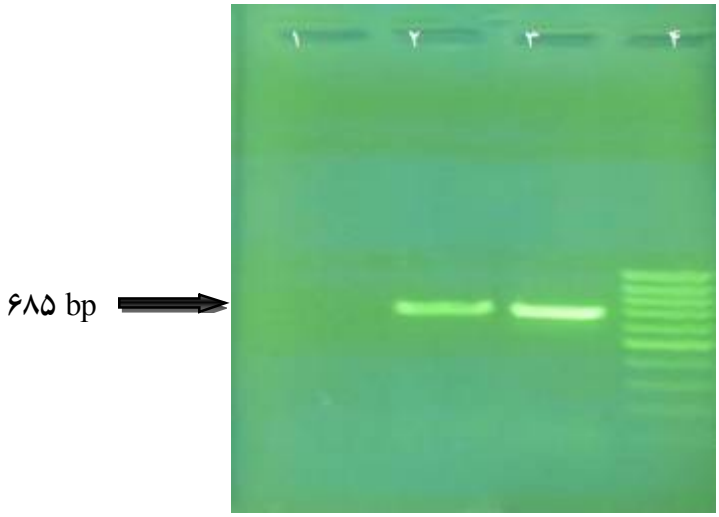


تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR جهت جستجوی ژن اختصاصی جنس آئروموناس در تعدادی از جدایه‌های مورد بررسی
ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸: جدایه‌های متعلق به جنس آئروموناس (واجد باند ۵۹۹bp) ستون ۹: کنترل مثبت و ستون ۱۰: نردبان ژنی ۱۰۰ bp (M) می‌باشد.

از تعداد ۱۲۵ جدایه‌ای که از نظر جنس آئروموناس تایید شده بودند با پرایمرهای اختصاصی *آئروموناس هیدروفیلا* (ژن‌های لیپاز و 16srRNA) تعداد ۲۱ جدایه، باند ۶۸۵ bp (16s rRNA) و ۳۱ جدایه، باند ۷۶۳bp (ژن لیپاز) را نشان دادند. تعداد ۲۱ جدایه، هر دو ژن را دارا بودند و ۱۰ جدایه فقط ژن لیپاز را داشتند (تصویر ۲ و ۳). با توجه به نتایج، در مجموع می‌توان ۱۵/۵ درصد از سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان را به سپتی‌سمی ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت داد. از ۳۱ آئروموناس هیدروفیلای جدا شده، به ترتیب ۲۲، ۵، ۳ و ۱ جدایه از کلیه، کبد، پوست و آبشش جدا شده بودند.

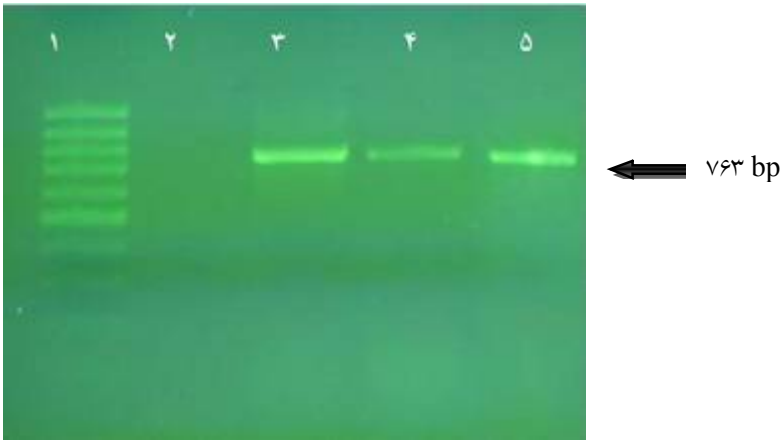
www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR جهت جستجوی ژن 16s rRNA گونه‌ی *آئرومونـاس هیدروفیلا* در یک جدایه‌ی مورد بررسی

ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: جدایه‌ی تأیید شده‌ی *آئرومونـاس هیدروفیلا* (۶۸۵bp) ستون ۳: کنترل مثبت و ستون ۴: نردبان ژنی bp ۱۰۰ (M)



تصویر ۳: الکتروفورز محصول PCR جهت جستجوی ژن لیپاز *Aeromonas hydrophila* در دو جدایه‌ی مورد بررسی

ستون ۱: نردبان ژنی bp ۱۰۰(M)، ستون ۲: کنترل منفی، ستون‌های ۳ و ۴: جدایه‌های دارای ژن لیپاز (bp ۷۶۳) و ستون ۵: کنترل مثبت.

مقایسه‌ی مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های تأیید شده و تأیید نشده از نظر گونه‌ی هیدروفیلا

پس از تشخیص جنس آئروموناس به روش PCR، جدایه‌های تأیید شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی برای یافتن جدایه‌های مظنون به *آئرومونـاس هیدروفیلا* مورد بررسی قرار گرفتند. از تعداد ۱۲۵ جدایه‌ی تأیید شده، تعداد ۵۹ جدایه مظنون به *آئرومونـاس هیدروفیلا* بودند که براساس نتایج PCR ، ۳۱ جدایه تأیید و ۲۸ جدایه تأیید نشد (جدول ۵ و ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵: ویژگی‌های بیوشیمیایی ۳۱ جدایه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* (تأیید شده با PCR) جدا شده از کپورماهیان استان خوزستان

آزمایش	مجموع ۳۱ جدایه	
	تعداد و (درصد) جدایه‌های مثبت	تعداد و (درصد) جدایه‌های منفی
اکسیداز	۳۱ (۱۰۰)	–
کاتالاز	۳۱ (۱۰۰)	–
حرکت	۳۱ (۱۰۰)	–
اندول	۲۷ (۸۷/۰۹)	۴ (۱۲/۹)
تولید H_2S	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)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶ : ویژگی‌های بیوشیمیایی ۲۸ جدایه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* (تأیید نشده با PCR) جدا شده از کپورماهیان استان خوزستان

آزمایش	مجموع ۲۸جدایه	
	تعداد و (درصد) جدایه‌های مثبت	تعداد و (درصد) جدایه‌های منفی
اکسیداز	۲۸ (۱۰۰)	–
کاتالاز	۲۸ (۱۰۰)	–
حرکت	۲۳ (۸۲/۱۴)	۵ (۱۷/۸۵)
اندول	۱۴ (۵۰)	۱۴ (۵۰)
تولید H_2S	۱۵ (۵۳/۵۷)	۱۳ (۴۶/۴۲)
آرژینین دکربوکسیلاز	۲۱ (۷۵)	۷ (۲۵)
لایزین دکربوکسیلاز	۲۰ (۷۱/۴۲)	۸ (۲۸/۵۷)
اورنیتین دهیدرولاز	۱۸ (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)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

عفونت‌های باکتریایی، باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی می‌شوند و خسارات اقتصادی شدیدی را به صنعت آبزی‌پروری وارد می‌کنند. در بین عوامل باکتریایی آبزیان، *آئروموناس هیدروفیلا* بسیار مورد توجه است. این باکتری، باعث سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین و گاهی دریایی می‌شود (Nielsen et al. 2001). همچنین این بیماری، باعث مرگ و میر بالا در سیستم‌های پرورشی و سیستم آبی طبیعی می‌شود (Swaminathan et al. 2004). تلفات ماهیان گرم‌آبی پرورشی در کشور به عنوان یکی از معضل‌های بهداشتی مهم صنعت پرورش ماهیان گرم‌آبی به خصوص در دو دهه‌ی اخیر شناخته شده است و اگر چه علل متفاوتی از قبیل عفونت‌های ویروسی، عوامل محیطی، تغذیه‌ای و باکتریایی به عنوان عوامل احتمالی آن ذکر شده‌اند (پیغان و اسماعیلی ۱۳۷۲، سلطانی و ابراهیم‌زاده موسوی ۱۳۷۵، غواص ۱۳۸۱، کارگر و همکاران ۱۳۷۵)؛ ولی در برخی از مطالعات (پیغان و اسماعیلی ۱۳۷۲، سلطانی و ابراهیم‌زاده‌موسوی ۱۳۷۵) نقش آئروموناس‌های متحرک در این تلفات برجسته بوده است. Nielsen و همکاران در سال ۲۰۰۱ عنوان کردند که شیوع بیماری ناشی از آئروموناس‌های متحرک، بیش‌تر در تابستان به علت وجود استرس‌هایی از قبیل عفونت‌های بالای انگلی، دمای بالا و اکسیژن پایین آب است. هم‌چنین در تحقیقی که در سال ۱۹۹۴ توسط Eissa و همکاران انجام شده است، نشان داده که شیوع سپتی‌سمی‌های آئروموناس‌های متحرک در بین تیلاپیاهای پرورشی و وحشی به ترتیب ۱۰ و ۲/۵ درصد و در گربه ماهیان پرورشی و وحشی ۱۸/۷۵ و ۶/۲۵ درصد می‌باشد که این، نشان دهنده‌ی تأثیر استرس در بروز این بیماری است.

در این تحقیق که به منظور تعیین نقش سپتی‌سمی ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* در تلفات کپور ماهیان صورت گرفت، با PCR نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در حداقل ۱۵/۵ درصد از سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان، مورد اثبات قرار گرفت و در مجموع، نقش آئروموناس‌ها در سپتی‌سمی‌ها در مطالعه‌ی حاضر، ۶۲/۵ درصد (۱۲۵ مورد از ۲۰۰ مورد) برآورد گردید. Nielsen و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ی خود، روی تلفات ماهیان گرمابی و خرچنگ‌ها چنین گزارش کردند که آئروموناس‌ها در ۷۲/۶ درصد و *آئروموناس هیدروفیلا* در ۳۰/۵ درصد موارد حضور داشته‌اند، که اگرچه مطالعه‌ی فوق از نظر شرایط پرورش و موقعیت جغرافیایی با مطالعه‌ی حاضر تفاوت دارد، ولی از نظر برآورد نقش آئروموناس‌ها و *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان دارای علایم تقریباً هم‌خوانی دارد. علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۸ در مطالعه‌ی خود، روی بررسی علت تلفات ماهی آمور در استان خوزستان، نتیجه‌گیری کردند که ۱۱ درصد تلفات، ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* و در مجموع ۱۷/۶ درصد تلفات، ناشی از آئروموناس‌ها است که باز تا حدود زیادی با نتایج مطالعه‌ی حاضر، مطابقت دارد.

بررسی نتایج بیوشیمیایی جدایه‌ها با منابع مورد استفاده، نشان داد که آزمایش‌هایی از قبیل "حرکت، تولید اندول، آرژنین دکربوکسیلاز، لایزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دهیدرولاز، اوره، سیمون سیترات، احیای نیترات، تحمل نمک تا ۳ درصد و تخمیر قندهایی مانند گلوکز، سوکروز، مانیتول، اینوزیتول" در ۳۱ جدایه‌ی تأیید شده با PCR با جدول‌های معتبر، تطابق کامل دارد (Austin and Austin 2007, Buller 2004). اما در ۲۸ جدایه‌ی تأیید نشده در بعضی از آزمون‌ها با جدول‌های موجود در منابع، تطابق کم‌تری دیده شد. همان طور که در نتایج مشاهده شد، در ۱۰۰ درصد جدایه‌های تأیید شده، آرژنین دکربوکسیلاز مثبت بود؛ ولی در ۷۵ درصد از جدایه‌های تأیید نشده، این آزمون مثبت گزارش شد. Buller در سال ۲۰۰۴ عنوان کرد که بیش از ۹۲ درصد جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* از نظر این آزمایش، مثبت هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

هم‌چنین Austin در سال ۲۰۰۷ و Buller در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که از ۵۵ تا ۹۷ درصد جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* از نظر آنزیم لایزین دکربوکسیلاز مثبت هستند که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی، نشان داد که حتی در بین جدایه‌های تایید شده از نظر بعضی از آزمایش‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندها تفاوت‌هایی وجود دارد؛ به طوری که ۱۳ جدایه از نظر حداقل ۸ آزمایش اصلی شامل "حرکت (+)، تولید ایندول (+)، مصرف سیترات (+)، تولید اوره‌آز (-)، تحمل نمک (تا ۳ درصد)، تولید آرژینین دهیدرولاز (+)، تولید لایزین دکربوکسیلاز (+)، تولید اورنیتین دکربوکسیلاز (-) و احیای نیترات (+)" کاملاً مشابه می‌باشند. همان گونه که مشخص شد، جدایه‌ها از نظر آزمون‌های بیوشیمیایی، دارای تنوع هستند که خود چالش بزرگی در تشخیص‌های باکتریولوژیکی معمول می‌باشد. از آن‌جایی که تشخیص سریع باکتری‌های بیماری‌زا در تشخیص به موقع بیماری‌ها اهمیت فراوان دارد و روش‌های معمول جداسازی و شناسایی در تشخیص باکتری‌ها خسته‌کننده و وقت‌گیر است، تکثیر ردیف نوکلئوتیدی اختصاصی DNA به وسیله‌ی آزمایش PCR یک روش حساس، دقیق و اختصاصی برای تشخیص میکروارگانیسم‌ها فراهم آورده است (Swaminathan et al. 2004).

نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که دو ژن لیپاز و Sr ۱۶RNA در تشخیص باهم تطابق کامل ندارند. همان طور که از نتایج مشخص است، همه‌ی ۳۱ جدایه، دارای ژن لیپاز (۱۰۰ درصد) ولی در ۲۱ جدایه از ۳۱ جدایه (معادل ۶۷/۷۴ درصد) 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* دارند.

Cascon و همکاران در سال ۱۹۹۶ از ژن لیپاز برای تشخیص *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده کرده و عنوان نمودند که یک قطعه ۷۶۰bp فقط در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* تشکیل می‌شود. Swaminathan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ از همین پرایمر ژن لیپاز که توسط Cascon طراحی شده بود، برای تشخیص و ردیابی *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده کرد و این پرایمر را برای ردیابی اختصاصی باکتری آئروموناس هیدروفیلا موفقیت‌آمیز دانسته و یک محصول PCR خوب و مطلوب با وزن ۷۶۰bp به دست آورد. هنگامی که از DNA ارگانیسم‌های دیگر همراه این پرایمر استفاده شده است هیچ محصولی با این وزن، تولید نشد که با نتایج مطالعه‌ی حاضر کاملاً تطابق دارد.

در مطالعه‌ی حاضر، 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 به جای روش‌های بیوشیمیایی است. با توجه به رشد سریع آبزی‌پروری در کشور، به خصوص سیستم پرورش گرم‌آبی و هم‌چنین گسترش بیماری‌های عفونی از جمله سپتی‌سمی‌های آئروموناسی، دست‌یابی به روش‌های سریع و دقیق شناسایی عوامل بیماری‌زا کمک شایانی به پیاده‌سازی پروتکل‌های درمانی و پیش‌گیرانه‌ی مناسب دارد؛ بنابراین در تشخیص بیماری‌های عفونی آبزیان، به استفاده از روش‌های مولکولی سریع از جمله PCR توصیه می‌شود. با توجه به نقش برجسته‌ی آئروموناس‌ها و *آئروموناس هیدروفیلا* در تلفات کپورماهیان استان خوزستان، به تهیه‌ی واکسن در این خصوص، توصیه می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

اخلاقی، مصطفی (۱۳۷۹). ایمنی‌زایی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۱، صفحات ۶۲- ۵۷ .

اخلاقی، مصطفی و وفایی، سیف‌اله (۱۳۸۱). بررسی *بیماری‌زایی آئروموناس* هیدروفیلا در ماهیان آکواریومی، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز)، دوره ۳، شماره ۱، صفحات ۸۷- ۸۲ .

پیغان، رحیم و اسماعیلی، فریبا (۱۳۷۲). آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسم‌های شبیه آئروموناس‌های متحرک، مجله علمی شیلات ایران، سال ۶، شماره ۲، صفحات ۸-۱.

سلطانی، مهدی (۱۳۷۵). بیماری‌های باکتریایی ماهی، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد، صفحه ۲۳۱ .

سلطانی، مهدی و ابراهیم‌زاده‌موسوی، حسین‌علی (۱۳۷۵). جداسازی *آئروموناس ورونی* و *آئروموناس هیدروفیلا* از تلفات آمور ماهیان پرورشی در دو کارگاه پرورش ماهی واقع در استان‌های گیلان و تهران، مجله علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، سال سوم، شماره چهارم، صفحات ۲۹-۲۴.

علیشاهی، مجتبی؛ سلطانی، مهدی و زرگر، اشکان (۱۳۸۸). بررسی تلفات باکتریایی ماهی آمور در استان خوزستان، مجله دامپزشکی ایران، دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۳۴- ۲۵.

غواص، علی (۱۳۸۱). بررسی دلیل تلفات ماهی آمور و فیتوفاگ در استان گیلان، دومین کنگره ملی بهداشت و بیماری‌های آبزیان.

کارگر، روحانی؛ پیغان، رحیم و جهانشاهی، علی‌اکبر (۱۳۷۵). جداسازی یک رئوویروس از ماهیان علفخوار در استان خوزستان، پژوهش و سازندگی، شماره ۳۳، صفحات ۱۰۵-۱۰۴.

Austin, B. and Austin, D.A. (2007). Bacterial Fish Pathogens, 4th ed. Chichester, UK: Springer-Praxis. P: 81.

Buller, N.B. (2004). Bacteria from fish and other aquatic animals : a practical identification manual. CABI publishing. p: 361.

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 Enviromental Microbiology, 62: 1167 -1170.

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.

Eissa, I.A.M., Badran, A.F.; Moustafa, M. and Fetaih, H. (1994). Contribution to motile Aeromonas septicaemia in some cultured and wild freshwater fish. Veterinary Medical Journal Giza, 42: 63-69.

Kingombe, C.I.B.; Huys, G.; Tonolla, M.; Albert, M.J.; Swings, J.; Peduzzi, R. and Jemmi, T. (1999). PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in Aeromonas spp. Applied and Enviromental Microbiology, 65 (12): 5293-5302.

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.

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 Organisms, 46(22): 23-29.

www.SID.ir

Archive of SID

Peyghan, R.; Khadjeh, G.H.; Mozarmnia, N. and 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, 1:26-29.

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.

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

Yogananth, N.; Bhakyaraj, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 11, No. 3, Autumn, 2015

Role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of cultured carps in khouzestan province

Ahangarzadeh, M.[1]; Ghorbanpour, M.[2]; Peyghan, R.[3]; Sharif rohani, M.[4] and Soltani, M.[5]

Received: 08.07.2014 Accepted: 27.12.2014

Abstract

Aeromonas hydrophila is a ubiquitous and opportunistic aquatic microorganism, that conflicting views have been expressed concerning whether *Aeromonas hydrophila* is a primary pathogen of freshwater fish or a secondary opportunistic pathogen. Under stress condition, such as temperature changes, handling or poor water quality, this bacterium becomes a pathogen. *Aeromonas hydrophila* has been associated to the dominant infectious agent of hemorrhagic septicemia in freshwater cultured fishes. In this study, a total of 200 pieces of patient cultured carp (126 common carp, 39 silver carp and 35 grass carp) were taken from Khuzestan province farms. A total of 125 and 31 isolates were identified as *Aeromonas* sp. and *Aeromonas hydrophila* respectively by biochemical methods and PCR analysis by specific primers such as 16srRNA for aeromonas sp., and 16srRNA and lipase for detection of *Aeromonas hydrophila*. The results showed that Aeromonas sp. and *Aeromonas hydrophila* are responsible for 62.5% and 15.5% of carp septicemia respectively and prophylactic measures should be considered. It also concluded that PCR assay provides a highly sensitive and specific tool for the detection of *Aeromonas hydrophila* compared with biochemical methods.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, Cultured carp, Haemorrhagic septicaemia, Khouzestan province

1- PhD Graduated of Fish Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Iranian Fisheries Reseach Organization, Tehran, Iran
5- Professor, Department of Fish Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
Corresponding Author: Ahangarzadeh, M., E-mail: m.ahangarzadeh@yahoo.com

www.SID.ir