Archive of SID

تعیین الگوی پروتئینی جدایه‌های *یرسینیا راکری* به دست آمده از برخی مزارع قزل‌آلای پرورشی

نسترن بهادری[۱]، مهدی سلطانی[۲*]، مهناز فرهمند[۳]، سمیرا محمدیان[۴] و الهه سلطانی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۹

چکیده

یرسینیوزیس، یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی در ماهیان با عامل *یرسینیا راکری* می‌باشد که در ایران موارد بیماری‌زایی آن رو به افزایش است. این مطالعه با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین الگوی پروتئینی جدایه‌های *یرسینیا راکری* از برخی مزارع قزل‌آلای مبتلا صورت گرفته است. به دنبال کشت و جداسازی نمونه‌های باکتریایی از ماهیان مشکوک به یرسینیوزیس از تعداد ۱۶ مزرعه در استان‌های مازندران، چهارمحال و بختیاری و قزوین، تعداد شش جدایه *یرسینیا راکری* به روش‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی گردید. این جدایه‌ها روی محیط ژلوز خون در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده و پروتئین‌های مربوط به هر جدایه استخراج و تشابه آن‌ها با یکدیگر به روش SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که الگوی پروتئینی پنج جدایه مشابهت کاملی با یکدیگر داشته اما پروتئین‌های یک جدایه با بقیه به میزان ۵ درصد تفاوت نشان داد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که جدایه‌های *یرسینیا راکری* عامل یرسینیوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در این مناطق از هموولوژی بالایی برخوردار می‌باشند که می‌تواند در معیارهای پیش‌گیری مانند ایمن‌سازی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *یرسینیا راکری*، یرسینیوزیس، قزل آلای رنگین کمان و SDS-PAGE

مقدمه

یرسینیا راکری[۱] عامل (بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی[۲]) از بیماری‌های سیستماتیک در ماهیان است که باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت آبزی‌پروری به ویژه در آزاد ماهیان در سراسر جهان می‌شود (Fadaeifar and Simin 2014). اگر چه عفونت با این عامل در سایر گونه‌های ماهی گزارش شده است، اما آزاد ماهیان به ویژه قزل‌آلای رنگین کمان از حساس‌ترین گونه‌ها محسوب می‌شود (Ryckaert et al. 2010). این بیماری امروزه با نام یرسینیوزیس[۳] یا سپتی‌سمی یرسینیایی[۴] شناخته شده (Ross et al. 1966) و ماهیان مبتلا علائمی نظیر کندی حرکت، تیرگی رنگ همراه با قرمز شدن رنگ اطراف دهان، سرپوش آبششی و قاعده باله‌ها به همراه اگزوفتالمی از خود نشان می‌دهند. البته در مواردی ممکن است علائم قرمزی اطراف دهان مشاهده

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق

[۲*] استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران E-mail: msoltani@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق

[۴] دانشجوی دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۵] دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، دانشکده‌ی زیست شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران

1- *Yersinia ruckeri*
2- Enteric red mouth
3- Yersiniosis
4- Yersinia septicaemia

www.SID.ir

Archive of SID

نشود (Feranadez et al. 2007). بیماری به دو شکل حاد و مزمن رخ داده و از آن‌جا که ماهیان حامل بدون علامت، قادر به انتقال باکتری عامل بیماری هستند، لذا این بیماری به عنوان تهدیدی دائمی برای کارگاه‌های پرورش آزاد ماهیان به شمار می‌آید (Mendez et al. 2009). میزان خسارات ناشی از این بیماری بسته به درجه‌ی حدت سویه باکتری، گونه ماهی و نیز شرایط محیطی پرورشی به خصوص وضعیت کیفیت آب متفاوت می‌باشد، به طوری که در عفونت‌های حاد، خسارات اقتصادی بسیار بالا و قابل توجه بوده ولی در عفونت‌های مزمن خسارات وارده ممکن است پایین باشد (سلطانی ۱۳۷۶).

یرسینیا راکری در گروه باکتری‌های گرم منفی و متعلق به خانواده‌ی آنتروباکتریاسه[1] بوده و عبارت از باکتری میله‌ای با انتهای گرد با ابعاد ۰/۷۵ میکرومتر قطر و بین ۳-۱ میکرومتر طول می‌باشد. این باکتری بدون اسپور و فاقد کپسول بوده، اما اغلب دارای تاژک است (Tobback et al. 2007). *یرسینیا راکری* را می‌توان بر اساس بیوتیپ، سروتیپ و انواع پروتئین‌های غشاء خارجی (OMP)[2] طبقه‌بندی کرد. به طوری که تا کنون ۶ سروار و ۴ سروتیپ و ۲ بیوتیپ I و II از باکتری شناسایی شده است که سروتیپ O1 حادترین سروتیپ آن به شمار می‌رود. همه‌ی سروارهای این باکتری بر اساس ساختارهای آنتی‌ژنیکی سطح سلول به (آنتی‌ژن‌های سوماتیک، آنتی‌ژن‌های تاژک و آنتی‌ژن‌های پوششی) قابل تفکیک می‌باشند (Romald and Toranzo 1993, Austin and Austin 2007).

برخی از پروتئین‌ها در حدت و بیماری‌زایی باکتری‌ها نقش اساسی دارند. از این رو، یکی از روش‌های مورد استفاده در تهیه‌ی واکسن‌ها، استخراج پروتئین‌های عامل بیماری‌زا می‌باشد. در مطالعه‌ی Davies در سال ۱۹۹۱ شناسایی پروفایل‌های پروتئین غشای خارجی *یرسینیا راکری* روی تعدادی از جدایه‌های آن به روش SDS-PAGE انجام و متوجه شدند که تفاوت‌های داخل سویه‌ای در پروتئین‌ها رخ می‌دهد که از وزن مولکولی kDa ۳۶/۵ تا kDa ۴۰ برخوردار بوده، به علاوه تحت تأثیر حرارت نیز می‌باشند.

بر این اساس، تفاوت‌های ۵ تیپ پروتئین غشای خارجی در این ایزوله‌ها مورد شناسایی قرار گرفته که در مطالعات اپیدمیولوژیک *یرسینیا راکری* حائز اهمیت بوده است (Davies 1991). Furones و همکاران در سال ۱۹۹۳ با هدف شناسایی فاکتورهای حدت و نقش آن‌ها در انتخاب محیط تفریقی با استفاده از سیستم API۲۰E تعدادی از جدایه‌های حاد یرسینیا راکری را شناسایی نمودند. البته این محققین اذعان داشتند که مطالعات بیش‌تری برای اثبات تفکیک جدایه‌های حاد از غیرحاد به روش بیوشیمیایی مورد نیاز است. Romalde و Toranzo در سال ۱۹۹۳ به منظور بررسی فعالیت بیماری‌زایی باکتری اقدام به مطالعه‌ی فاکتورهای چسبندگی، ظرفیت تهاجم باکتری به روش SDS-PAGE نموده و با این روش اقدام به آنالیز تنوع میان گونه‌های وابسته به سروتیپ و عدم وجود کشندگی ناشی از حضور لیپوپلی‌ساکارید و ترشحات خارج سلولی باکتری نمودند (Romalde and Toranzo 1993). Onuk و همکاران در سال ۲۰۱۱ برخی مشخصات مولکولی و فنوتیپی تعدادی ایزوله‌های *یرسینیا راکری* در ماهی قزل آلای رنگین کمان را به روش‌های آنتی‌بیوتایپینگ، RAPD-PCR و SDS-PAGE مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که تمام سویه‌های باکتری جدا شده از ماهیان مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا در ترکیه تفاوت‌هایی فنوتیپی و ژنوتیپی با یکدیگر داشته و لذا استفاده از این سه روش را به صورت توأم سه‌تایی و یا دوتایی در تبیین و تعیین این تفاوت‌ها مفید دانستند. در مطالعه‌ای Bastardo و همکاران در سال ۲۰۱۱ خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی برخی سویه‌های باکتری را در سیستم‌های پرورش ماهی قزل‌آلا رنگین

1- Enterobacteriaceae
2- Outer membrane protein

www.SID.ir

Archive of SID

کمان و پرو مطالعه نمودند و متوجه شدند که اگرچه بسیاری از جدایه‌های مورد مطالعه متحرک و لیپاز مثبت و از نوع بیوتیپ ۱ بوده‌اند ولی تنها پنج جدایه‌ی آن‌ها برای دو تست فوق‌الذکر منفی و در نتیجه از نوع بیوتیپ ۲ بودند. با توجه به بروز بیماری در مزارع قزل‌آلای کشور و با توجه به تنوع جدایه‌های باکتری عامل بیماری، انجام مطالعات تشخیصی و تفکیک جدایه‌های باکتری می‌تواند کمک قابل توجهی به مباحث تشخیصی، پیش‌گیری و درمانی بیماری نماید. زیرا برخی از جدایه‌ها از حدت بالاتر و برخی از حدت کمی برخوردارند و بنابراین نوع اقدامات درمانی، کنترلی و پیش‌گیری برای همه‌ی آن‌ها یکسان نمی‌باشد. لذا هدف از انجام این مطالعه، تعیین الگوی پروتئینی تعدادی از جدایه‌های *یرسنیا راکری* جداسازی شده از برخی مزارع پرورش قزل‌آلا در کشور می‌باشد.

مواد و روش کار

ابتدا با مراجعه به مزارع پرورشی ماهیان قزل‌آلای استان‌های مازندران (۶ مزرعه) چهار محال و بختیاری (۵ مزرعه) و قزوین (۵ مزرعه)، از بافت‌های کلیه و طحال ماهیان دارای علائم بالینی (از هر مزرعه تعداد ده نمونه از ماهیان بیمار اخذ شد)، و روی آگار خون‌دار کشت داده شد. سپس با انجام مطالعات فنوتیپی و بیوشیمیایی (جدول ۱) نسبت به شناسایی جدایه‌های *یرسنیا راکری* اقدام گردید. برای انجام مطالعات بیوشیمیایی از روش‌های استاندارد استفاده شد (Austin and Austin 2007). نمونه‌گیری‌ها در فصول بهار و تابستان انجام شد و دمای آب مزارع تحت مطالعه در دامنه‌ی ۱۴–۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد بود.

برای انجام مطالعات مولکولی (PCR) از دو جفت پرایمر شامل FP: 5'- CAG CGG AAA GTA GCT TG-3' FR: 5'- TGT TCA GTG CTA TTA ACA CTT AA-3'، طراحی شده توسط LeJeune and Rurangirwa در سال ۲۰۰۰ استفاده شد. این پرایمرها ناحیه‌ی ۴۰۹ جفت بازی از ژن 16 S rRNA باکتری *یرسنیا راکری* را شناسایی می‌نمایند.

مواد مورد استفاده برای انجام واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۱/۵ U آنزیم Taq پلی‌مراز (Qiagen, Germany)، ۳۰ pM از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر از مخلوط dNTP (۰/۲ mM) و ۱۰۰ng از نمونه‌های DNA بوده و برای رساندن حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر استفاده گردید. برنامه‌ی PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad USA) شامل واسرشته-سازی اولیه (یک دور به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴°C) و سپس ۳۵ دور واسرشته‌سازی (۳۰ ثانیه در ۹۴°C)، اتصال (۳۰ ثانیه در ۵۵°C) و بسط نهایی (۱ دقیقه در ۷۲°C) بود. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد، الکتروفورز و باندهای حاصله با استفاده از Bio-Safe Stain (Nano lytic, Germany) رنگ‌آمیزی و توسط دستگاه مستندساز ژل ترانس ایلومیناتور (Bio-Rad, XR Plus, USA) عکس‌بردری شد. از جدایه‌ی یرسینیا راکری دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه کوپنهاگ، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

به منظور استخراج پروتئین جهت تعیین الگوی پروتئینی جدایه‌ها ، کشت ۲۴ ساعته از جدایه‌ها روی آگار خون‌دار در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد تهیه و پروتئین‌های محلول و نامحلول جدایه‌های رشد یافته توسط کیت SMART™ Total Protein Extraction Kit استخراج و برای مطالعات بعدی در فریزر ۲۰°C– نگهداری شدند. برای الکترفورز به روش SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده داخل ژل به همراه مارکر تزریق شد و توسط جریان برق ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه ران شدند. پس از رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی، باندهای پروتئینی رویت گردید و توسط دستگاه Gel doc (XRt Bio-Rad, USA) تصویربرداری شد. سپس، وزن باندهای جدایه‌های باکتری در مقایسه با مارکر استفاده شده با استفاده از نرم‌افزار UVI DocMw تعیین گردید. اندازه‌ی باندهای حاصل از پروفایل‌های پروتئین‌های محلول جدایه‌های باکتری در

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه با مارکر توسط نرم‌افزار UVI tech تعیین و با استفاده از نرم‌افزار Gene Alex و MEGA۵.۱ درخت فیلوژنی بر اساس UPGMA برای تمام جدایه‌ها ترسیم شد.

نتایج

مطالعات فنوتیپی و بیوشیمیایی

نتایج حاصل از مطالعات بیوشیمیایی در جدول ۱ آمده است. بر اساس این نتایج، تعداد ۶ جدایه باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی، میله‌ای و متحرک به دست آمد. تمامی جدایه‌های مورد مطالعه تخمیر کننده‌ی گلوکز و از نظر تحرک و لیپاز مثبت بودند که متعلق به بیوتیپ ۱ *یرسینیا راکری* تشخیص داده شدند. این جدایه‌ها مربوط به مزارع چهار محال و بختیاری (۲ جدایه)، مازندران (۳ جدایه) و قزوین (یک جدایه) بودند. سایر مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ اشاره شده است.

جدول ۱: مشخصات بیوشیمیایی شش جدایه‌ی *یرسینیا راکری* به دست آمده از برخی مزارع قزل آلای کشور

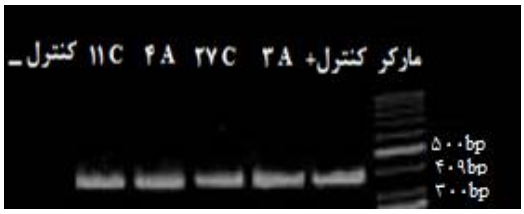
ویژگی‌های بیوشیمیایی	جدایه‌های جداسازی شده					
	۴A	۱۱C	۸۲C	۲۷C	۵۷C	۳A
رنگ آمیزی گرم	−	−	−	−	−	−
تحرک در ۲۲°C	+	+	+	+	+	+
تحرک در ۳۷°C	−	−	−	−	−	−
اکسیداز	−	−	−	−	−	−
کاتالاز	+	+	+	+	+	+
گلوکز	+	+	+	+	+	+
لیپاز	+	+	+	+	+	+
ساکارز	+	+	+	+	+	+
آرابینوز	−	−	−	−	−	−
رامنوز	−	−	−	−	−	−
H2S	−	−	−	−	−	−
قابلیت رشد در محیط مکانکی	+	+	+	+	+	+
قابلیت رشد در محیط شاتس	+	+	+	+	+	+
قابلیت رشد در محیط اختصاصی یرسینیا	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+
تولید گاز OFI	−	−	−	−	−	−

مطالعات مولکولی

نتایج حاصل از آزمایش PCR با استفاده از جفت پرایمر مورد استفاده نشان داد که تمامی ۶ جدایه، حاوی باندهای یکسان، برابر با bp ۴۰۹ بودند (تصویر ۱) که بیان‌گر وجود *یرسینیا راکری* است.

www.SID.ir

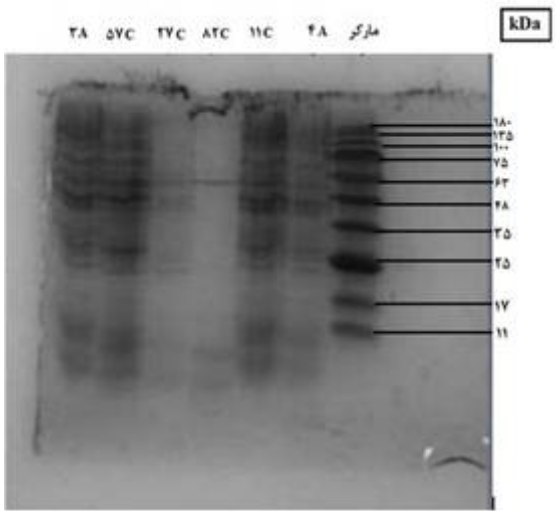
Archive of SID



تصویر ۱: باندهای حاصل از محصول PCR برای جدایه‌های *یرسینیا راکری* به دست آمده از ماهیان قزل‌آلای بیمار (نمونه‌های ۳A، ۲۷C، ۴A و ۱۱C مربوط به نمونه‌های آزمایشی است)

الگوی پروتئینی جدایه‌ها

الگوی پروتئینی ۶ جدایه مورد مطالعه در تصویر ۲ آمده است. همان طور که نشان داده شده است، جدایه‌های باکتری ۴A، ۱۱C، ۸۲C، ۲۷C، ۵۷C و ۳A حاوی ۱۳-۹ باند متفاوت با وزن مولکولی ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۳، ۲۵، ۳۰، ۴۵، ۴۹، ۶۳، ۷۰، ۷۵، ۹۲ کیلودالتون (kDa) بودند. بررسی الگوی پروتئینی این ۶ جدایه به روش SDS-PAGE نشان داد که این جدایه‌ها از یک الگوی پروتئینی مشابه برخوردار می‌باشند. لازم به ذکر است که جدایه‌ی ۸۲C تولید باند ننمود که علت آن احتمالاً ناشی از عدم لیز شدن دیواره‌ی سلول باکتری و یا کم بودن غلظت پروتئینی برای این جدایه در آزمایش باشد.

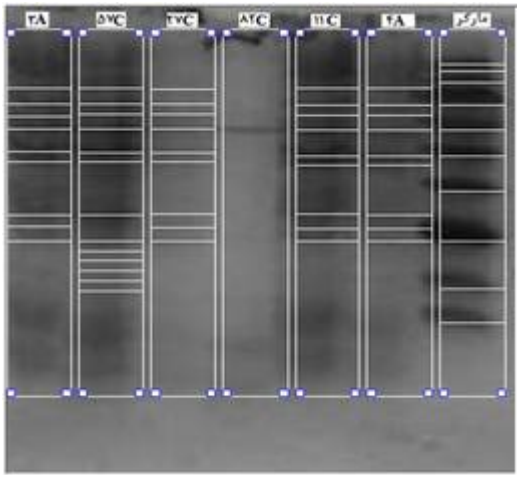


تصویر ۲: الگوی پروتئینی جدایه‌های *یرسینیا راکری* به دست آمده از مزارع قزل‌آلای بیمار به روش SDS_PAGE

وزن مولکولی (kDa) باندهای ایزوله‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آمده است. با توجه به تفکیک باندهای به دست آمده در تصویر ۳، جدایه‌های ۳A، ۲۷C، ۱۱C و ۴A، هر یک حاوی ۹ باند و جدایه ۵۷C، حاوی ۱۳ باند می‌باشد. جدایه ۵۷C در ۷ باند اول مشابه سایر جدایه‌ها است اما اندازه‌ی وزنی ۶ باند آخر آن با سایر جدایه‌ها متفاوت می‌باشد.

جدول ۲: وزن مولکولی باندهای پروتئینی به دست آمده از جدایه‌های *یرسینیا راکری* با استفاده از نرم‌افزار UVI DocMW

	MW-RF					
	۳A	۵۷C	۲۷C	۱۱C	۴A	مارکر
1	0.929	0.929	0.915	0.929	0.929	1.800
2	0.759	0.759	0.759	0.750	0.750	1.350
3	0.699	0.709	0.709	0.704	0.704	1.000
4	0.636	0.636	0.636	0.630	0.630	0.750
5	0.503	0.497	0.497	0.480	0.480	0.630
6	0.457	0.457	0.457	0.443	0.443	0.480
7	0.301	0.301	0.303	0.303	0.301	0.350
8	0.278	0.250	0.276	0.273	0.273	0.250
9	0.250	0.232	0.250	0.250	0.250	0.170
10		0.217				0.110
11		0.200				
12		0.183				
13		0.166				

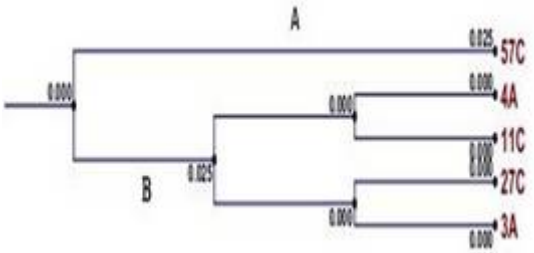


تصویر ۳: تفکیک پروفایل‌های پروتئینی جدایه‌های *یرسینیا راکری* با استفاده از نرم‌افزار UVI DocMW

www.SID.ir

Archive of SID

ترسیم درخت فیلوژنی حاصل از جدایه‌های باکتری با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۵.۱ و Gene Alex در تصویر ۴ نشان داده شده است. بر اساس درخت فیلوژنی جدایه-های مورد مطالعه از شباهت بسیار بالایی با یکدیگر برخوردار بودند. این سویه‌ها در دو کلاستر A و B قرار گرفته، به طوری که جدایه‌ی ۵۷C با سایر نمونه‌ها تنها ۵ درصد اختلاف را نشان داد.



شکل ۴: درخت فیلوژنیک حاصل از الگوی پروتئینی جدایه‌های *یرسینیا راکری* به دست آمده از مزارع قزل‌آلای کشور با استفاده از نرم‌افزار UPGMA

بحث

امروزه یرسینیوزیس به عنوان یکی از بیماری‌های عمدتاً حاد با زیان‌های اقتصادی قابل توجه در صنعت پرورش آزاد ماهیان، به ویژه قزل‌آلای رنگین کمان مطرح بوده (Tobback et al. 2007) و اولین گزارش آن در کشور در سال ۱۹۹۹ (Soltani et al. 1999) و پس از آن مواردی از بیماری در برخی مزارع قزل‌آلای کشور گزارش شده است (Akhlaghi and Sharifi Ydzdi 2008). نظر به این که عامل بیماری دارای سروتیپ‌های مختلف است که از نظر حدت با همدیگر متفاوت هستند، لذا شناسایی وضعیت آلودگی مزارع کشور و تعیین وضعیت بروز بیماری به لحاظ نوع درگیری به تیپ‌های مختلف باکتری درگیر می‌تواند در جهت پیش‌گیری و کنترل آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد (Soltani et al. 1999).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری در برخی مناطق کشور در حال توسعه است، زیرا از تعداد ۱۶ مزرعه مورد مطالعه، تعداد ۶ مزرعه واقع در سه استان مبتلا به این بیماری بودند. مطالعه‌ی تعیین الگوهای پروتئینی این جدایه‌ها از جنبه‌های اپیدمیولوژیک بیماری و نیز مطالعات پیش‌گیری و کنترلی بسیار با اهمیت می‌باشد، زیرا این نوع مطالعات می‌تواند ما را تا حدی در شناسایی نیای مشترک و یا متفاوت عامل بیماری هدایت نماید. نتایج الگوی پروتئینی این ایزوله‌ها نشان می‌دهد که همگی آن‌ها (به جز ایزوله‌ی ۸۲C که تشکیل باند نداد)، دارای الگوی پروتئینی مشابه می‌باشند. البته جدایه‌ی ۵۷C به میزان ۵ درصد با بقیه تفاوت نشان داد. شاید بتوان این گونه استنتاج نمود که مورد استثنا در این مطالعه می‌تواند دارای تغییرات اندک داخل گونه‌ای باشد ولی به لحاظ شباهت کلی با سایر جدایه‌ها با یکدیگر مشابه می‌باشند. در تحقیق نسبتاً مشابهی توسط Davise در سال ۱۹۹۱ الگوی پروتئینی غشای خارجی تعدادی از جدایه‌های *یرسینیا راکری* مربوط به نقاط مختلف دنیا از جمله کشورهای اروپایی، آمریکای شمالی، استرالیا و آفریقا مورد بررسی قرار گرفته و متوجه شدند که به استثنای یک مورد پپتیدوگلیکانی با پروتئین ۳۹/۵ کیلودالتون تفاوت قابل ملاحظه‌ای در پروفایل غشای خارجی آن‌ها وجود نداشته است. آن‌ها نتیجه گرفتند که تفاوت داخل سویه‌ای می‌تواند در پروتئینی رخ دهد که وزن حدود ۴۰-۳۶/۵ کیلودالتون داشته و تحت تأثیر حرارت نیز قرار می‌گیرد (Davies 1991). به علاوه، نتایج حاصل از مطالعه‌ی Bastardo و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی (الگوی پروتئینی، لیپو پلی‌ساکاریدی و غشای خارجی) تعدادی از ایزوله‌های این باکتری در پرو نشان داد که تعداد قابل توجهی از آن‌ها، از شباهت بالایی برخوردار بوده‌اند.

در مطالعه‌ی حاضر نیز الگوهای پروتئینی هر ۶ جدایه بسیار مشابه بودند. با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که ابتلا مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان در کشور خصوصاً مناطق شمالی کشور (مزارع تحت مطالعه) مربوط به یک نوع سروتیپ باکتری می‌باشد. این تشابه به منزله‌ی هم گروهی این جدایه‌ها در یک بیوتیپ (بیوتیپ I) بوده و لذا می‌تواند بیان‌گر آن باشد که این جدایه‌ها به

www.SID.ir

Archive of SID

سویه‌ای تعلق دارند که بیوتیپ آن غالب بوده و احتمال آلوده شدن مزارع را بر اساس یک عامل اتیولوژیک مشترک نشان می‌دهد. به هر حال مطالعات بیش‌تری نیاز است تا با جداسازی و شناسایی تعداد بیش‌تری از جدایه‌های باکتریایی از مناطق مختلف کشور روی ساختارهای آنتی‌ژنی و الگوی پروتئینی آن‌ها نسبت به میزان تفاوت داخل گونه‌ای (وجود سویه‌های متفاوت) در مزارع ماهی کشور پرداخته شود. شباهت بالای باندهای مشاهده شده در الگوی پروتئینی این جدایه‌ها می‌تواند کمک قابل توجهی به اتخاذ روش‌های پیش‌گیری مانند ایمن‌سازی (واکسیناسیون) نماید زیرا هر چه عامل بیماری‌زا از همولوژی بالاتری برخوردار، باشد واکسن تهیه شده از یک جدایه آن آسان‌تر می‌باشد. به هر حال، همان گونه که ذکر شد، مطالعات بیش‌تری نیاز است تا هتروژنی این باکتری را در مزارع درگیر کشور مورد ارزیابی قرار دهد. در جمع‌بندی نهایی، نتیجه‌ی این مطالعه نشان می‌دهد که درگیری مزارع قزل‌آلای کشور به یرسینیوزیس در حال افزایش بوده و جدایه‌های باکتریایی شناسایی شده از نوع بیوتیپ I و از الگوی پروتئینی مشابهی برخوردار هستند، که به انجام اقدامات پیش‌گیری مانند ایمن‌سازی علیه بیماری را فراهم می‌آورد. با این حال مطالعات بیش‌تری برای ارزیابی ساختارهای آنتی‌ژنی این جدایه‌ها نیاز است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح کلان ملی تولید دانش فنی ساخت واکسن‌های دام و طیور وآبزیان انجام شده است.

منابع

سلطانی، مهدی . (۱۳۷۶) . بیماری‌های باکتریایی ماهی، تالیف اینلگیش، روبرت، برومبیج، مؤسسه‌ی نشر جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، صفحه ۴۵۲.

Akhlaghi, M. and Sharifi Yazdi, H. (2008). Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 9: 347-352.

Austin, B. and Austin, D.A. (2007). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Four Edition, New York. P: 552.

Bastrado, A.; Sierralta, V.; Leon, J.; Ravelo, C. and Romalde, J.L. (2011). Corrigendum to "phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) in Peru". Aquaculture, 317: 229-232.

Davies, R.L. (1991). Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. Veterinary Microbiology, 26: 125-140.

Fadaeifard, F. and Simin, S. (2014). Detaction of virulence genes (Yrp1 and YrpE) in the *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction test in Charmahal-Va-Bakhtiary provin, Iran. Biological Journal of Microorganism, 3(9): 65-73.

Feranadez, L.; Mendez, J. and Guijarro, J.A. (2007). Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Veterinary Microbiology. 125: 1-10.

Furones, M.D.; Gilpin, M.L. and Munn, C.B. (1993). Culture media for the differentiation of isolates of *Yersinia ruckeri*, based on detection of a virulence factor. Journal of Applied Bacteriology, 74: 360-366.

LeJeune, J.T. and Rurangirwa, F.R. (2000). Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri.* Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 12(6): 558-561.

www.SID.ir

Archive of SID

Mendez, J.; Fernandez, L.; Menendez, A.; Reimundo, P.; Pérez-Pascual, D.; Navais, R. and Guijarro, J.A. (2009). A chromosomally located tra HIJKCLMN operon encoding a putative type IV secretion system is involved in the virulence of *Yersinia ruckeri*. Applied and Environmental Microbiology, 75: 937-945.

Onuk, E.E.; Ciftci, A.; Findik, A.; Ciftci, G.; Altun, S.; Balta, F. et al. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey.Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 124(7-8): 320-328.

Romalde, J.L. and Toranzo, A.E. (1993). Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiology Letters, 112: 291-300.

Ross, A.J.; Rucker, R.R. and Ewing, W.H. (1966). Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo girdneri*). Canadian Journal of Microbiology, 12: 763-770.

Ryckaert, J.; Bossier, P.; D'Herde, K.; Diez-Fraile, A.; Sorgeloos, P. et al. (2010). Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. Journal of Fish & Shellfish Immunology, 29: 648-655.

Soltani, M.; Fadaiifard, F. and Mehrabi, M.R. (1999). First report of a yersinosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. Bulletin European Association of Fish Patthology, 9(4): 173-176.

Tobback, E.; Decostere, A.; Hermans, K.; Haesebrouck, F. and Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in Salmonia, fish. Journal of Fish Disease, 30: 257-268.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 12, No. 1, Spring, 2016

Protein pattern of *Yersinia ruckeri* isolates in some farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*)

Bahadori, N.[1]; Soltani, M.[2]; Farahmand, M.[3]; Mohammadian, S.[4] and Soltani, E.[5]

Received: 06.02.2015 Accepted: 20.09.2015

Abstract

Yersiniosis is one of the most important fish bacterial diseases cause by of *Yersinia ruckeri*. Isolation, characterization and of protein profile of *Yersinia ruckeri* were studied in some affected rainbow trout farms in Iran. The kidney and spleen samples from 16 fish farms in Charmahal-va-Baakhteyiari, Mazandaran and Qazvin provinces were cultured on blood agar at 22^0C for 48 hours and the grown bacteria were characterized by phonotypical and molecular studies. Biochemical and molecular works resulted in identification of six isolates of *Yersinia ruckeri*. The whole proteins of the six recovered isolates of *Yersinia ruckeri* subjected to sodium dodecyl sulphat - poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that the protein profiles of 5 isolates were highly similar to each other and only one isolates showed 5% difference with other isolates. Therefore, these results show that some farmed trout in Iran are affected by *Yersinia ruckeri* isolates of high homology. Also, such results could be useful for protection aims such as immunization.

Key words: *Yersinia ruckeri*, Yersiniosis, Rainbow trout, SDS-PAGE

1- MSc Student of Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran
4- PhD Student of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
5- BSc Student of Microbiology, Facullty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Soltani, M., E-mail: msoltani@ut.ac.ir

www.SID.ir