جداسازی و شناسایی *Yersinia ruckeri* با روش بیوشیمایی API 20E و تائید تشخیص با روش16SrDNA PCR- Sequencing در ماهی‌قزل‌آلای رنگین‌کمان در شمال ایران

مصطفی جعفرپور*[۱]، مرتضی موسی‌زاده سرقین[۲]، علی‌ناظمی[۳]، شیفته عربی[٤]، زهیر حشمتی‌پور[٥]

۱*، ۲، ۴، ۵ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی، تنکابن، ایران، صندوق پستی ۴۶۸۱۵/۶۴۶

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه ژنتیک، تنکابن، ایران، صندوق پستی ۴۶۸۱۵/۶۴۶

تاریخ دریافت: ۲۸ بهمن ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۹ اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

Yersinia ruckeri عامل بیماری Enteric Red Mouth (ERM) یا پرسینیوزیس می‌باشد و باعث سپتی سمی در بیشتر آزادماهیان می‌گردد. این بیماری گسترش جهانی زیادی دارد و باعث ضررهای اقتصادی در صنعت پرورش ماهی می‌شود. بنابراین شناسایی دقیق پاتوژن برای کنترل بیماری در ماهی ضروری است. بر اساس علائم بالینی اپیدمی از بیماری در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان در شهر تنکابن در ایران رخ داده است. در این تحقیق ما جهت شناسایی *Yersinia ruckeri* از کشت آزمایشگاهی از روش بیوشیمایی API 20E galleries و جهت تائید این تشخیص از روش16SrDNA PCR- Sequencing با استفاده از پرایمر universal استفاده کرده‌ایم. در مقایسه با تحقیق بیوشیمیایی مشابه در رومانی که *Yersinia ruckeri* را با استفاده از API20E galleries شناسایی کرده و مقادیر عددی مرتبط با هر گروه از ۵، ۱۰۴، ۱۰۰ در رومانی تا ۵، ۱۰۵، ۱۰۰ در ایران متغیر بود این تفاوت به واسطه تست VP مثبت در تحقیق ما و تست VP منفی در تحقیق رومانی بود.یکی از دقیق‌ترین روش‌های شناسایی 16Sr DNA PCR- Sequencing با استفاده از پرایمر universal می‌باشد. این تحقیق اولین شناسایی بیوشیمیایی *Yersinia ruckeri* توسط کیت API 20Egalleries را گزارش می‌دهد که تائید آن با روش 16SrDNA PCR- Sequencing امکان پذیر شده است.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، یرسینیاروکری ،API20E گالری،بیماری دهان قرمز، پی سی آر سکونسینگ.

* عهده دار مکاتبات (✉). s.jafarpour@tonekaboniau.ac.ir

مقدمه

Yersinia ruckeri عامل بیماری Enteric Red Mouth (ERM) و یا یرسینیوریس است که عفونتی به صورت سپتی سمی می‌باشد و بر آزادماهیان تاثیر می‌گذارد (Fernandez, *et al*., 2007). این بیماری گسترش زیادی دارد و باعث ضررهای اقتصادی در صنعت پرورش ماهی می‌شود (Altinok, *et al*., 2008; Austin, 2007). ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان بیشترین حساسیت را به عفونت دارند. منابع آلودگی ماهی‌های ناقل و بیمار هستندکه عامل بیماری رامی‌توان از مدفوع و آب و غذای آلوده آن‌ها جداسازی نمود (Guguianu, *et al*., 2009). *Yersinia* جزء باکتری‌های بدون اسپور و کوکوباسیلوس گرم منفی و متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که اغلب متحرک و میله‌ای شکل است (Roozbahani, *et al*., 2009; Tobback, *et al*., 2007). این باکتری باعث بروز سپتی سمی، علایم و آسیب همراه با بی‌اشتهایی، بی‌حسی، سیاهی غیر طبیعی پوست، آب آوردن شکم، بزرگی غیر طبیعی طحال می‌شود. آسیب‌های مشخص که توسط یرسینیوزیس ایجاد می‌شود عبارتند از: زردی روده، خونریزی در باله‌ها و چشم‌ها، انباشت مایع داخل معده و روده، بیرون زدگی دو جانبه چشم‌ها و بزرگی غیرطبیعی طحال می‌باشد (Altinok, *et al*., 2008; Tobback, *et al*., 2007). به طور مرسوم تشخیص بیماری براساس ویژگی‌های فنوتیپی و سرم‌شناسی عامل بیماری‌زا و یا آزمایشات بافت‌شناسی انجام می‌شود (Bernardet, *et al*., 1990). بعضی کوشش‌ها بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفته است اما این تکنیک‌ها عیوبی چون حساسیت کم جهت شناسایی عامل بیماری‌زا را دارا هستند (Falsey, *et al*., 2007). تشخیص دقیق و سریع در ماهیان بدون علامت بیماری جهت پیشگیری بسیار حیاتی است (Wilson and Carson, 2003). تکنیک ملکولی هم‌چون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) می‌تواند برای حل این مشکلات و افزایش حساسیت و شناسایی اختصاصی پاتوژن استفاده شود. روش‌های PCR متعددی برای تشخیص *ruckeri* پیشنهاد شده است که شامل PCR ساده، PCR- RFLP , ELISA PCR می‌باشند (Roozbahani, *et al*., 2009). در این تحقیق شناسایی بیوشیمیایی *Yersinia* ruckeri توسط API 20E galleries و تائید این تشخیص توسط روش 16Sr DNA PCR- Sequencing مورد آزمایش قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

منابع ماهی و جداسازی باکتری

ابتدا از ۳۳ مرکز مختلف پرورش ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان موجود در شهرستان تنکابن واقع در شمال ایران از موارد مشکوک به بیماری یرسینیوزیس که دارای علائم بالینی هم‌چون تیره‌گی غیر طبیعی پوست، رنگ پریده‌گی آبشش‌ها و مخاط دهان، خون مرده‌گی در زبان، خونریزی چشمی و بیرون زدگی دو جانبه چشم‌ها بودند از اندام‌های درونی مثل قلب، کبد، کلیه و طحال آن‌ها نمونه‌برداری شد و سپس این نمونه‌ها در محیط آگارخوندارکشت داده شدندو بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵^0c - ۲۲^0c انکوبه شدند.

آزمایش بیوشیمایی سویه‌های جدا شده

بعد از دوره انکوباسیون کلنی‌ها از لحاظ ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار

گرفتند و سپس جهت شناسایی سویه‌های جدا شده توسط کیت بیوشیمیایی API 20E galleries مورد آزمایش قرار گرفتند.

استخراج DNA از سویه‌های جدا شده

کلنی‌های باکتریایی جمع‌آوری شده از محیط کشت در سوسپانسیون ddH_2O 100µl حل شدند سپس DNA طی روش جوشاندن (Nazemi, *et al*., 2001) استخراج شده و سپس ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند و سپس supernatant برای استفاده در واکنش PCR جمع‌آوری شدند.

پرایمرها

از پرایمر 16S rRNA universal برای شناسایی باکتری‌های حقیقی استفاده شد:

Forward primer:
5′ – AGGAGGTGATCCAACCGCA- 3′
Reverse primer:
5′ – AACTGGAGGAAGGTGGGGA-3′

واکنش PCR

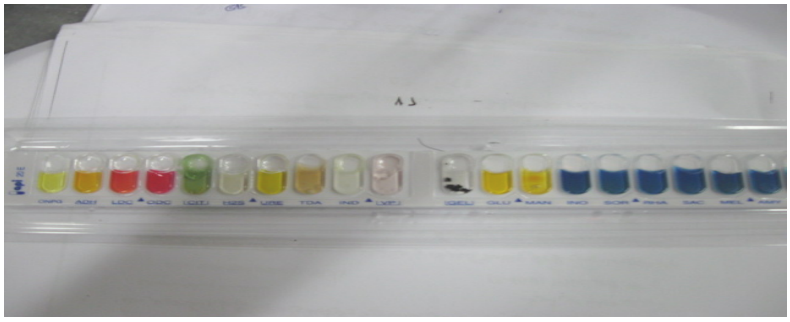
حجم نهایی واکنش 25µl می باشد محتویات PCR شامل ddH_2O: 14µl و 2/5µl بافر 10X و 1µl $Mgcl_2$ (50mM) و 1µl dNTPs (10mM) و پرایمر MiX (10 pmol) و 5µl Template DNA است واکنش PCR را به صورت زیر تنظیم شد. Denaturation به مدت ۴ دقیقه در 95^0C، ۳۵ سیکل از دناتوره شدن در 95^0C به مدت ۱۰ ثانیه، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و extension به مدت ۴۰ ثانیه در دمای 72^0C و در انتها واکنش به مدت ۵ دقیقه در 72^0C صورت گرفت.

Sequeneing

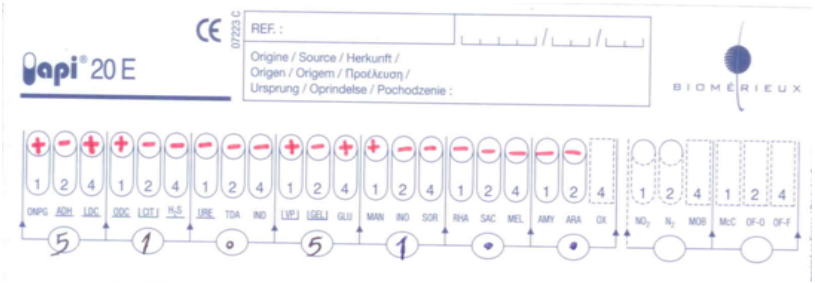
در این مرحله محصول PCR (ژن سنتز شده) را به شرکت ماکروژن کره ارسال کردیم تا تعیین توالی نوکلئوتیدها یا Sequencing صورت گیرد و بعد از تعیین توالی توسط این شرکت جواب حاصله را در سایت NCBI در قسمت BLAST ارزیابی کردیم.

نتایج

در بررسی قسمت‌های خارجی ماهی، آسیب عمومی در همه ماهی‌ها عبارت بود از: رنگ پریده‌گی آبشش‌ها و مخاط دهان خون مردگی در زبان و خونریزی چشمی بود. آسیب درونی با فقدان جیره غذایی و نفخ و انبساط گازی مجرای هضمی، بزرگی غیر طبیعی طحال، خون مرده‌گی در کبد به نمایش در می‌آید. بعد از این‌که از اندام‌های داخلی مثل کبد، کلیه، قلب و طحال نمونه‌برداری شد این نمونه‌ها را وارد محیط بلادآگار نمودیم بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم بعد از دوره انکوباسیون کلنی‌ها سفید و خاکستری و کوچک و واحد بودند و هم‌چنین حالت "S" داشتند و در بررسی میکروسکوپی گرم منفی، با اندازه متوسط که گرده‌های خاصی از باسلیوس و کوکوباسلیوس بودند. و براساس تست اکسیداز منفی و تست کاتالاز مثبت برای میکروب‌های جدا شده کیت بیوشیمیایی API20Egalleris انتخاب شد ویژگی متابولیک برای باکتری‌های ایزوله شده با استفاده از کیت API20E در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

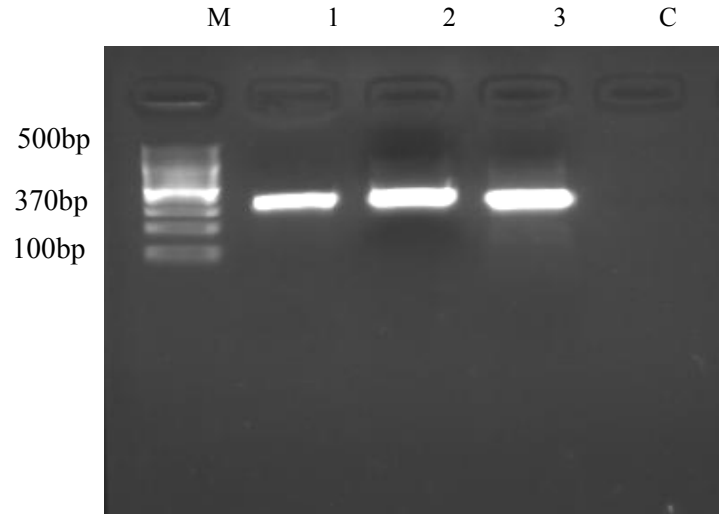


شکل ۱: نمای ظاهری کیت بعد از ۲۴ ساعت از تلقیح کلن



شکل۲: نتایج حاصله از کیت بیوشیمیایی API20E Galleries

در نتیجه مقادیر عددی وابسته به واکنش مثبت هر گروه ما نسبت‌های ترکیبی روبرو را به دست آورده‌ایم: ۵، ۱۰۵ و ۱۰۰ از آن‌جا که در جدول API20Egalleris این نمودار عددی مربوط به *Hafnia alvei* و *Yersinia ruckeri* تست کاملی از تخمیر گزیلوز را برای تفکیک این دو باکتری اجراء کردیم. بعد از تائید بیوشیمیایی *Yersinia ruckeri* آزمایشات استخراج DNAصورت پذیرفت و واکنش PCR توسط پرایمرهای16Sr RNA universal انجام شد و محصول PCR را به ژل آگارز ۱/۵٪ منتقل کردیم و قطعه ۳۷۰bp را بعد از رنگ‌آمیزی با ایتدیوم بروماید مشاهده کردیم (شکل۳) نمونه‌های مشاهده شده در این قطعه برای Sequencing یا تعیین توالی نوکلئوتید به شرکت کره‌ای ماکروژن فرستاده شد.



شکل۳: Detection of *Yesinia ruckeri* by 16SrRNAuniversal primer Lane M, 100bp ladder marker;Lane1,2,3 positive sample ; lane C Negative control containing PCR reagent alone

نتیجه حاصل از sequencing توسط شرکت ماکروژن را در سایت اینترنتی NCBI در قسمت BLAST مورد ارزیابی قرار دادیم نتیجه تائید *Yersinia ruckeri* به صورت زیر می‌باشد (شکل ۴).

> ref|NZ_ACCC01000097.1| *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 contig00382, whole genome shotgun sequence

gb|ACCC01000097.1| *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 contig00382, whole g> ref|NZ_ACCC01000097.1| Yersinia ruckeri ATCC 29473 contig00382, whole genome shotgun sequence

gb|ACCC01000097.1| Yersinia ruckeri ATCC 29473 contig00382, whole genome shotgun sequence

Length=950

Score = 588 bits (318), Expect = 2e-165

Identities = 318/318 (100%), Gaps = 0/318 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query                                                                 1
TACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTA        60
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                                                               856
TACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTA        797

Query                                                                61
CCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA        120
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 796 CCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA
737
```

Query 121
CGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAG 180
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 736 CGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAG 677

Query 181
TTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGTGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTC 240
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 676 TTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGTGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTC 617

Query 241
GCTTCACTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATG 300
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 616 GCTTCACTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATG 557

Query 301 ACTTGACGTCATCCCCAC 318
||||||||||||||||||
Sbjct 556 ACTTGACGTCATCCCCAC 539

شکل ٤: نتیجه حاصل از تجزیه وتحلیل توالی توسط نرم افزار بلاست

بحث

تحت شرایط ایده‌آل، ماهی که به نظر سالم است و نشان بالینی از آسیب ندارد می‌تواند حامل پاتوژن‌هایی باشد که خطرات جدی برای شیوع بیماری واگیر باشد و به نظر می‌رسد که یرسینوزیس در بین جمعیت‌های ماهی‌ها گسترش جهانی دارد (Roozbahani, *et al*., 2009). بیماری زمانی رخ می‌دهد که شرایط استرس‌زا رخ دهد بنابراین شناسایی دقیق پاتوژن از ماهی برای کنترل اثر بخشی بیماری موجود در ماهی ضروری است (Altinok, *et al*., 2008). یک اپیدمی حاصل از بیماری در شهر تنکابن ایران رخ داد. در این تحقیق ما جهت شناسایی *Yesinia ruckeri* از کشت آزمایشگاهی علاوه بر روش بیوشیمیایی API20E galleries از روش 16SrDNA PCR-Sequencing با استفاده از پرایمر universal برای تائید تشخیص استفاده کرده‌ایم در مقایسه با تحقیق بیوشیمیایی مشابه در رومانی *Yesinia ruckeri* را با استفاده از API 20 Egalleris شناسایی کرده و مقادیر عددی مرتبط با هرگروه ۵، ۱۰۴ و ۱۰۰ در رومانی تا ۵، ۱۰۵ و ۱۰۰ در ایران متغیر بود این تفاوت به واسطه تست VP مثبت در تحقیق ما و تست VP منفی در تحقیق رومانی‌بود. ملاحظه نتایج بدست آمده نشان دادکه سویه‌های جدا شده در ایران از سویه‌های جدا شده در رومانی متفاوتند. PCR توانایی شناسایی سلول‌های زنده کشت پذیر و غیر قابل کشت را دارند. یکی از دقیق‌ترین روش‌های شناسایی با 16SrDNA PCR- Sequencing استفاده از پرایمر universal می‌باشد. این تحقیق اولین شناسایی بیوشیمیایی *ruckeri* توسط کیت API 20E galleries را گزارش می‌دهد و تائید آن با 16 Sr DNA PCR-Sequencing امکان‌پذیر ساخته است.

منابع

1. Altinok, I., Capkin, E., Kayis, S., 2008. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. VeterinaryMicrobiology, vol. 131, pp. 332-338.
2. Austin, B., Austin, D. A., 2007. Bacterial Fish pathogens diseases of farmed and wild Fishes. fourth ed. Praxis Publishing Ltd.,chichester.uk.
3. Bernardet, J.F., Campbell,A.C., Buswell,J.A., 1990. *Flexibacter maritimus* is the agent of black patch necrosis in *dovor sole* in Scotland, Dis. Aquat. Org. vol. 8, pp. 233-237.
4. Fernandez, L., Mendez, J., Agustin, J., 2007. Mulecular virulence mechanisms of the fish pathogen yersinia ruckeri. Veterinary microbiology. vol. 125, pp. 1-10.
5. Falsey, A., Y. Murata., E. Walsh., 2007. Impact of rapid diagnosis on management of adults hospitalized with influenza. Arch.Intern.Med. vol. 167, pp. 354-360.
6. Guguianu, E., Vulpe, V., Lazar, M., 2009. Yersiniosis outbreak in rain bow trout at afish farm from northern Romania. Cercetari agronomice in moldova . vol. xll, no. 3, pp.75-80.
7. Nazemi, A., Mirinargasi, Merikhi, N., 2001. Distribution of pathogenic genes astA, aaP, aggR, among uropathogenic E.coli and their linkage with stab gene, Indian. J. Microbiol. vol. 51, pp. 355-388.
8. Roozbahani, M. R., Bandehpour, M., Haghighi, A., 2009. PCR- Based Detection of *Yersinia ruckeri* infection in rain bow trout fish,Asian. Journal of Animal and Veterinary Advances, vol. 4, pp. 258- 262.
9. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, F., 2007. *Yersinia Ruckeri* infections in salmonid fish. J. Fish. Dis, vol. 30, pp. 257-268.
10. Wilson, T., Carson, J., 2003. Development of sensitive, high- throughput one-tube RT-PCR – enzyme hybridization assays to detect selected bacterial fish pathogens. Dis. Aquat. Organ, vol. 54, pp. 127-134.