فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۶۵- ۷۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

شناسایی ژن‌های حدت *yrp1* و *yrpE* در باکتری یرسینیا راکری به روش PCR در استان چهارمحال و بختیاری

فیروز فدایی فرد: دانشیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد ،ایران، fadaeifard@gmail.com *
سعید سیمین: دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد ،ایران، saeed.simin_vet@yahoo.com

چکیده

مقدمه: یرسینیا راکری عامل بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی و از بیماری‌های مهم آزاد ماهیان پرورشی است. مطالعه حاضر با هدف شناسایی ژن‌های حدت *yrp1* و *yrpE* در باکتری یرسینیا راکری انجام شد.

مواد و روش‌ها: به منظور انجام این تحقیق، ماهیان ۱۰تا ۱۲ سانتی‌متری ۶ مزرعه پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری، بررسی باکتری‌شناسی شدند. به طوری‌که از هر مزرعه ۱۰ عدد ماهی مشکوک به بیماری (در مجموع ۶۰ عدد) به طور تصادفی انتخاب و نمونه برداری از انتهای روده آن‌ها، کشت بر روی محیط‌های غنی کننده (تریپتیکاز سوی آگار) و اختصاصی (واتمن- شاتس) یرسینیا راکری انجام شد. سپس سویه‌های مثبت باکتری یرسینیا راکری با آزمایش PCR شناسایی شد. در مرحله بعد بر روی باکتری‌های شناسایی شده با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به دو ژن حدت به نام‌های *yrp1* و *yrpE* آزمون PCR انجام شد.

نتایج: از تعداد کل نمونه‌های باکتریایی ۲۴ سویه به عنوان باکتری یرسینیا راکری شناسایی شدند که در بین آن‌ها ۱۲ سویه (۵۰ درصد) حامل ژن *yrp1* و ۱۱ سویه (۴۵/۸۳ درصد) حامل ژن *yrpE* بودند. به طور هم‌زمان نیز ۶ سویه (۲۵ درصد) هر دو ژن را داشته اند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان از وجود عامل‌های حدت *yrp1* و *yrpE* در سویه‌های یرسینیا راکری جدا شده دارد. *yrp1* به عنوان پروتئاز خارج سلولی شناخته شده یرسینیا راکری بوده و نقش مهمی در حدت و بیماری‌زایی این باکتری دارد.

واژه‌های کلیدی: PCR، یرسینیا راکری، *yrp1* و *yrpE*، قزل آلای رنگین کمان

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

یرسینیا راکری یک باکتری گرم منفی، میله ای شکل، کاتالاز مثبت وسیتوکروم اکسیداز منفی است و در ماهیان قزل آلای رنگین کمان به بروز بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی که شکل بالینی یک سپتی سمی خونریزی دهنده است منجر می‌شود (۱). واکسیناسیون، بهبود مدیریت بهداشتی، قرنطینه و ایجاد محدودیت حمل و نقل بهترین سیاست در کنترل این بیماری به شمار می‌رود (۲ و ۳). یرسینیا راکری دارای ۶ سرووار و ۴ سروتیپ شناسایی شده است که O1 حادترین سروتیپ آن به شمار می‌رود (۴). ماهیان حامل به واسطه انتشار باکتری از روده خود، نخستین منبع عفونت به شمار رفته و البته در این انتقال، ظرفیت سویه‌های وحشی در بقا و باقی ماندن عفونت در محیط‌های آبزی وگاهی اوقات تشکیل بیوفیلم باکتریایی نیز مطرح بوده و حائز اهمیت است (۵).

در خصوص عوامل حدت و نقش آن در بیماری‌زایی باکتری در سال‌های اخیر مطالعات خوبی انجام شده است (۵- ۹). چنانچه از نخستین کارهای انجام شده در زمینه شناسایی عامل‌های حدت می‌توان به معرفی یک پلاسمید ۴۰ تا ۵۰ مگادالتونی در برخی از گونه‌های یرسینیای بیماریزای انسانی همچون یرسینیا انتروکولیتیکا، یرسینیا پستیس و یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و ارتباط آن با حدت باکتری اشاره کرد که این پلاسمید چندان مشابهت ساختاری با پلاسمید ۷۰-۸۸ کیلوبازی یافته شده در پروفایل پلاسمیدی سرووار I باکتری یرسینیا راکری نداشت اما پلاسمید یرسینیا راکری قادر به کاهش پاسخ‌های لومینسانس شیمیایی ماکروفاژهای ماهی باس راه راه[1] بوده اند. همچنین، بقاء باکتری در محیط خارج از بدن میزبان (که در مقایسه با میزبان، مواد غذایی کمتری دارد) در طولانی مدت باعث تسهیل در فرایند انتقال به میزبان و اهمیت بیماریزایی آن می‌شود و به محض انتشار باکتری از ماهیان بیمار یا حامل، آن‌ها در محیط استخرها باقی مانده و آماده شیوع در بین جمعیت ماهیان خواهند بود (۱۰). درخصوص نقش تهاجمی برخی پلاسمیدهای باکتری یرسینیا راکری می‌توان گفت که در سویه‌های یرسینیا راکری سروار I، پلاسمیدهای ۴۰ تا ۵۰ مگادالتونی (که حامل عامل حدت بوده) و برخی پلاسمیدهای کوچکتر ۲۰ تا ۳۰ مگادالتونی شناسایی شده اند ولی در سروار II، پلاسمیدهای بزرگ مشاهده نشد از همین رو شدت بیماری‌زایی این باکتری خیلی ضعیف‌تر از سروارI است. شواهد نشان می‌دهد که یرسینا راکری ممکن است دارای سیستم جذب آهن با واسطه سیدروفور (عامل شلاته کنندگی آهن در محیط و جذب بعدی آن توسط باکتری) باشد (۱). یکی از عوامل حدت این باکتری ظرفیت تشکیل ساختمان بیوفیلم است که ارتباط با تحرک ناشی از تاژک باکتری‌ها دارد و به افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک اکسولونیک اسید منجر می‌شود در نتیجه این ساختار باعث افزایش ماندگاری باکتری در محیط و حفظ قدرت بیماری‌زایی آن می‌شود (۵). پروتئازها به عنوان یکی از عامل‌های خارج سلولی مرتبط با حدت میکروارگانیسم‌ها معرفی شده و به ویژه در باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان تجارب علمی نشان از دخالت آنزیم‌های پروتئولیتیکی در بیماری‌زا بودن آن‌ها دارد (۱۱). بنابراین، ترشحات خارج سلولی باکتری اعم از لیپاز، پروتئاز وسیتوتوکسین و

همچنین، فعالیت‌های همولیتیک آن‌ها به بروز برخی علائم ویژه این بیماری همچون خونریزی در دهان و روده منجر می‌شود. همچنین، مشاهده شده که یرسینیا راکری قادر به تهاجم مؤثر به لاین‌های سلولی کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی است (۱۲). از ژن‌های حدت شناخته شده باکتری یرسینیا راکری می‌توان *yrp1* و *yrpE* را نام برد. این ژن‌ها در ساخت پروتئازهای خارج سلولی نقش داشته و آنزیم‌های پروتئولیتیکی قادرند اثرات زیادی از قبیل دژنرسانس بافتی، هجوم، فعالیت پروتوکسینی و غیره را داشته باشند. در باکتری یرسینیا راکری ژن *yrp1* انکود نمودن یک پروتئاز ۴۷ کیلودالتونی را بر عهده دارد؛ بنابراین، فعالیت‌های پروتئولیتیکی خارج سلولی این باکتری ارتباط با حدت آن دارد. همچنین، توالی نوکلئوتیدی ژن *yrp1*،انکودینگ یک پروتئین ۴۷۷ آمینواسیدی را بر عهده دارد. با توجه به شباهت زیاد در توالی آمینواسیدهای این پروتئین، آن را در زیر خانواده سرالیزین متالواندوپپتیداز معرفی کرده اند. پروتئاز *yrp1* سایر گونه‌های یرسینیا توسط یک سیستم ترشح پروتئینی اکسپورترABC باکتری گرم منفی تیپ I ترشح می‌شود که متشکل از سه ژن به نام‌های *yrpD*، *yrpE* و *yrpF* و یک ممانعت کننده پروتئاز به نام *inh* است (۱۳ و ۱۴). در مطالعه حاضر، سعی بر شناسایی دو ژن حدت *yrp1* و *yrpE* در باکتری یرسینیا راکری جدا شده از ماهیان قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری و شناخت بیشتر از وضعیت بیماری‌زایی این باکتری‌ها شده است تا بتوان از اطلاعات به دست آمده در زمینه کنترل شیوع بیماری ناشی از این باکتری بهتر تصمیم‌گیری کرد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق، در تابستان ۱۳۹۱ در مزارع پرورش ماهی استان چهار محال و بختیاری انجام شد. انتخاب این مزارع به علت وقوع قبلی بیماری یرسینیوز وگزارش‌های اعلام شده در خصوص بروز بیماری ذکر شده انجام شد. بنابراین، از ۶ مزرعه پرورشی و از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد ماهی مشکوک به بیماری با اندازه متوسط ۱۰ الی ۱۲سانتی‌متر به شکل تصادفی نمونه‌برداری شد که در مجموع تعداد کل نمونه‌ها برابر با ۶۰ عدد شد. قبل از انجام عملیات نمونه برداری نسبت به اخذ اطلاعات کامل مزرعه ای از قبیل عامل‌های مربوط به آب (عامل‌های کیفی از جمله دما و اکسیژن)، ماهی (مشاهدات بالینی و کالبدگشایی ماهیان تلف شده و زنده) و غذا (ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی غذا) و تکمیل پرسشنامه‌های مربوطه اقدام شد. سپس، ماهیان صید شده به اتاق اداری مزرعه برای نمونه برداری انتقال داده شدند و ابتدا با وارد نمودن چند ضربه به سر، آن‌ها را بی هوش و سپس با الکل اتیلیک سطح بدن ماهیان کاملاً ضد عفونی شد. در ادامه با باز کردن سطح شکمی ماهی و در کنار شعله توسط آنس استریل از انتهای روده نمونه برداری انجام شد به طوری که با تخلیه مواد مدفوعی داخل روده، بر روی سطح مخاط آن محل آنس کشیده شد. سپس نمونه‌ها به محیط کشت تریپتیک سوی آگار[۲] (به عنوان یک محیط اولیه وعمومی در باکتری‌های آبزیان) انتقال داده شدند. بر روی تمام محیط‌ها شماره و کد مربوطه درج شد. پس از اتمام عملیات نمونه‌گیری در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده، به مدت ۴۸ ساعت درانکوباتور با دمای۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدندتا رشد پرگنه‌های

مشکوک انجام شود. پس از رشد پرگنه‌ها از هر کدام آزمایش‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و همچنین، رنگ آمیزی گرم انجام شده و آن‌هایی که کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و گرم منفی بوده اند برای انتقال به محیط کشت واتمن شاتس[۳] (محیط اختصاصی یرسینیا راکری) انتخاب می‌شدند. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری دردمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های رشد یافته در آن‌ها جدا و به محیط آب پپتونه منتقل، سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا در ادامه از آن‌ها برای استفاده در آزمون PCR استفاده شود.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های باکتریایی بر اساس دستور العمل کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد.

انجام PCR برای تشخیص باکتری یرسینیا راکری

برای تشخیص باکتری یرسینیا راکری، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوطه و بر اساس دستورالعمل توصیه شده توسط دلسرو و همکاران [۴] انجام شد (۱۵). بدین منظور از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی که ردیابی قطعه ۵۷۳ جفت بازی ژن ۱۶SrRNA مربوط به باکتری یرسینیا راکری را بر عهده دارند استفاده شد (جدول۱). در این واکنش از برنامه حرارتی مرحله واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه (مراحل واسرشته‌سازی، اتصال و توسعه ۳۵ بار تکرار شدند) و مرحله توسعه نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. پس از انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌های مشکوک باکتریایی، تعداد ۲۴ سویه یرسینیا راکری شناسایی و نسبت به انجام واکنش ردیابی ژن‌های حدت آماده‌سازی شدند. در این مرحله با داشتن سویه‌های مثبت یرسینیا راکری نسبت به ردیابی ژن‌های *yrp1* و *yrpE* بر اساس پروتکل پیشنهادی فرناندز و همکاران[۵] اقدام شد (۱۳) (جدول۲). به‌طوری‌که در انجام واکنش PCR از برنامه دمایی واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۴۳ درجه (برای *yrp1*) و ۴۷ درجه (برای *yrpE*) به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه در ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه استفاده شد. مراحل دو تا چهار، ۲۵ بار تکرار شدند.

نتایج

طی بررسی مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان چهار محال و بختیاری و نمونه برداری از ۶۰ عدد ماهی مشکوک به بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی برای ردیابی ژن‌های حدت *yrp1* و *yrpE* باکتری یرسینیا راکری، ابتدا سویه‌های یرسینیا راکری شناسایی و در کنار سویه استاندارد این باکتری تعداد ۲۴ عدد باکتری نیز شناسایی شدند (شکل۱). سپس، این باکتری‌ها نیز برای ردیابی ژن‌های حدت استفاده شدند که در شکل۲ نشان داده شده است. نتیجه توزیع ژن‌های بررسی شده به نسبت درصد آن‌ها در باکتری‌های شناسایی شده نیز در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ۱۲ باکتری (۵۰ درصد) دارای *ژن yrp1* و ۱۱ باکتری (۴۵/۸۳ درصد) دارای ژن *yrpE* بوده، همچنین، ۶ سویه (۲۵ درصد) نیز به‌طور هم‌زمان دو ژن *yrp1* و *yrpE* را داشتند.

جدول۱- مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در تشخیص باکتری یرسینیا راکری

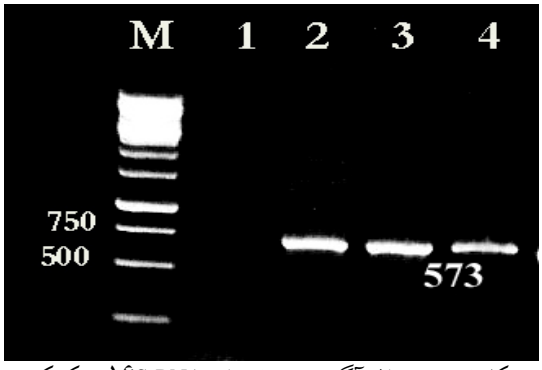
پرایمر	اندازه قطعه ژنی (جفت باز)	ژن هدف	منبع
yer3,5 CGAGGAGGAAGGGTTAAGT3 yer4,5 AAGGCACCAAGGCATCTCT3	۵۷۳	۱۶S rRNA	۱۵

جدول۲- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در ردیابی ژن‌های حدت *yrp1* و *yrpE*

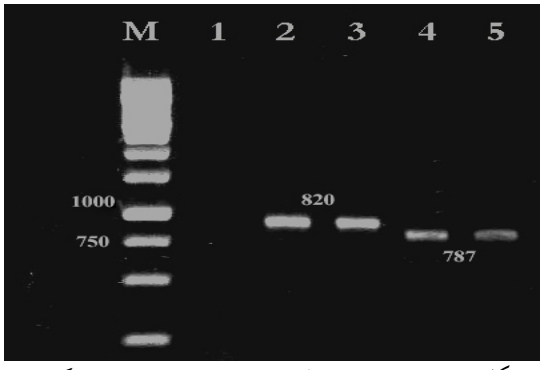
پرایمر	نام ژن	اندازه قطعه ژنی (جفت باز)	منبع
(F):5´GCCAAGATCTCATTACAATCTTGGGCA3´	*YRPP1*	۷۸۷	۱۳
(R):5´-CGTTAGATCTCGCACCATGTAATTCAT3´	*YRPP2*	۷۸۷	
(F):5´-GCCAAGATCTGGGTTGACTGCGCAATA-3´	*YRPE1*	۸۲۰	
(R):5´- CGTTAGATCTGTTTCACGGTGCCTTCT-3´	*YRPE2*	۸۲۰	

جدول ۳- توزیع ژن‌های بررسی شده در باکتری‌های یرسینیا راکری شناسایی شده

نوع ژن بررسی شده	تعداد	درصد
yrp1	۱۲	۵۰
yrpE	۱۱	۴۵/۸۳



شکل۱- تصویر ژل آگاروز: ردیابی ژن ۱۶SrRNA با تکنیک PCR، لاین M: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۱: کنترل منفی، لاین ۲و۳، : نمونه‌های مثبت یرسینیا راکری، باند۴: کنترل مثبت



شکل۲- شناسایی هم‌زمان ژن‌های حدت *yrp1* و *yrpE* باکتری یرسینیا راکری در ژل آگاروز با تکنیک PCR،
لاین M: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۱: کنترل منفی، لاین ۲و۳: باند ۸۲۰ جفت باز ژن *yrpE*، لاین ۴و۵: باند ۷۸۷جفت باز ژن *yrp1*

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی از بیماری‌هایی مهم باکتریایی در بین آزادماهیان پرورشی است که با توجه به پرورش گسترده ماهی قزل آلای رنگین کمان در کشورمان گاهی گزارش‌هایی از مشاهده تلفات ناشی از این بیماری از نقاط مختلف انجام شده است. بنابراین، با توجه به اهمیت همه‌گیرشناسی آن و از آن‌جایی که استان چهار محال و بختیاری از مناطق مهم اقتصادی و پر تولید این ماهی در کشورمان به شمار می‌رود، تحقیق حاضر در راستای شناسایی عوامل حدت باکتری‌های یرسینیا راکری و با هدف ردیابی دو ژن حدت *yrp1* و*yrpE* انجام شد. همان‌طور که در نتایج پژوهش نیز آمد درسویه‌های یرسینیا راکری جدا شده از ماهیان قزل آلای پرورشی ژن‌های یاد شده ردیابی شد. به طوری که ژن*yrp1* در۵۰ درصد سویه‌ها، *yrpE* در۴۵/۸۳ درصدسویه‌ها و هم‌زمان۲۵ درصد سویه‌ها هر دو ژن را داشته اند. شناسایی یرسینیا راکری در ایران نخستین بار در سال ۱۳۷۶ و از مزارع پرورشی استان چهار محال و بختیاری انجام شد در این مطالعه با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و سرولوژیک سویه‌های یرسینیا راکری از ماهیان قزل آلای رنگین کمان جداسازی و تشخیص داده شد. به طوری که با

بهره‌جویی از آزمون‌های ایمونوفلورسانس آنتی بادی درخشان (به روش غیر مستقیم) ۶ سویه باکتری یرسینیا راکری شناسایی شدند (۱۶). در ادامه نیز با مطالعه بر روی ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی استان فارس و نمونه برداری از ماهیان مشکوک به بیماری با استفاده از آزمایش PCR این باکتری ردیابی وشناسایی شد. این کار نخستین گزارش شناسایی باکتری نامبرده با استفاده از تکنیک‌های مولکولی در استان فارس بوده است (۱۷). اما در ادامه روند شناسایی باکتری فوق یکی از تحقیقات انجام شده در زمینه ویژگی‌های ژنی باکتری یاد شده، کار انجام شده توسط فدایی فرد و همکاران[۶] بوده است که ایشان با بررسی ماهیان قزل آلای سه منطقه کیار، کوهرنگ و اردل استان چهارمحال و بختیاری موفق به ردیابی دو ژن حدت *yhlA* و *yhlB* شدند. این ژن‌ها ارتباط زیادی با فعالیت همولیزینی وسیتولیزینی باکتری یاد شده داشته و فرآیند خونریزی در اندام‌های داخلی و خارجی ماهی را می‌توان به عملکرد این ژن‌ها نسبت داد (۱۸). نتیجه تحقیق حاضر نیز به شناسایی ژن‌های حدت *yrp1* و *yrpE* در باکتری یرسینیا راکری منجر شد که توجیه کننده اثرات پروتئولیتیکی این باکتری بوده و در کنار تحقیقات قبلی تکمیل کننده فرآیند هجومی و آسیب‌شناسی آن است. در سال‌های اخیر گزارشات متعددی از سوی مراجع دامپزشکی در زمینه بروز و شیوع بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی در ماهیان قزل آلای پرورشی استان انجام شده است که شدت تلفات و ظهور علائم کلینیکی بیماری، تأیید کننده عوامل حدت در باکتری‌های یاد شده، است. هم راستا با تحقیق حاضر در ارتباط با حدت باکتری یرسینیا راکری و نقش آن در بیماری‌زایی این باکتری تحقیقات زیادی انجام شده است (۱، ۴، ۷، ۸ و ۱۳). یکی از اثرات مهم پروتئازهای خارج سلولی در بروز علائم ویژه دهان قرمز و خونریزی روی دهان و کام است که تورنزو و همکاران[۷] این علائم بالینی را به تأثیر سموم خارج سلولی باکتری یرسینیا راکری نسبت دادند. نظر به شناسایی ژن‌های *yrp1* و *yrpE* در تحقیق حاضر تأثیر این عوامل در بروز علائم آسیب شناختی بیماری تقویت پیدا می‌کند (۱۹). همچنین، موضوع چسبندگی[۸] و هجوم باکتریایی[۹] که از ویژگی‌های مهم حدت باکتری‌ها به شمار می‌روند نیز از جمله عامل‌های مؤثر در بیماری‌زایی باکتری یرسینیا راکری بوده و ثابت شده که این باکتری قدرت هجوم و چسبیدن به لاین‌های کشت‌های سلولی را دارد. این مسأله به نوعی شدت بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی و اثرات آسیب شناختی ناشی از آن را در مزارع پرورشی توجیه می‌کند (۲۰). مطالعات تکمیلی‌تر در زمینه ساختارشناسی ژن *yrp1* را فرناندز و همکاران انجام دادند. ایشان با بررسی سویه‌های یرسینیا راکری جمع آوری شده از مزارع مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان موفق به شناسایی و انکود نمودن این پروتئاز خارج سلولی شدند البته این کار به نوعی ارتباط با کارهای قبلی در خصوص وجود پروتئین ۴۷ کیلودالتونی مرتبط با حدت باکتری دارد (۱۳). مجموعه پژوهش‌های انجام شده بر روی عامل‌های حدت باکتری یرسینیا راکری و ردیابی ژن‌های حدت *yrp1* و *yrpE* در پژوهش حاضر گویای وجود عوامل ایجاد کننده ضایعات آسیب شناختی مهم در ایجاد علائم بالینی بیماری دهان قرمز و همچنین، بروز تلفات ناشی از آن است. به نظر می‌رسد که تجمع و تهاجم از مکانیسم‌های اصلی این باکتری‌ها در طول

دوره تعامل پاتوژن- میزبان[۱۰] باشند. بنابراین، وجود آنزیم‌هایی مثل کلاژنازها، الاستازها و ژلاتینازها در این باکتری‌ها به بروز ضایعات در بافت‌های هم بندی و عضلات منجر شده و نقش مهمی در بیماری‌زایی ماهیان دارند(۲۱). به علاوه، ابزارهای ژنتیکی همچون برش (کوتاه نمودن) ژن‌های پروتئولیتیکی انکود کننده، نشان داده که آنزیم‌های پروتئویکی، درگیر در حدت باکتری‌های بیماریزای ماهی هستند (۲۲). در کنار ژن *yrp1* و *yrpE* ژن‌های شناخته شده دیگری همچون *yhlA* و *yhlB* نیز نقش در بیماری‌زایی دارند چنانچه *yhlA* سیتولیزین خارج سلولی نقش داشته و فعالیت آن توسط دما و آهن تنظیم می‌شود که در مجموع در حدت باکتریایی و خاصیت سیتوتوکسینی آن اثر ویژه‌ای دارد. فعالیت همولیزین yhlA ارتباط زیادی با فعالیت سایتوپاتیکی باکتری داشته و به احتمال زیاد از آهن موجود در سلول‌های میزبان استفاده می‌کند، *yhlB* نیز در تولید همولیزین نقش مهمی دارد (۸). آهن یک پیش نیاز برای تجمع موفق و در نهایت تهاجم بسیاری از پاتوژن‌های میکروبی به شمار می‌رود. تحقیقات در زمینه باکتری یرسینیا راکری نیز ثابت کرده که این باکتری نیز برای رشد نیاز به ترکیبات شلاته کننده آهن دارد تا بتواند آهن مورد نیاز خود را از محیط دریافت کند. ژن‌های درگیر در ساخت کاته کولات سیدروفور به نام راکر باکتین معروف هستند که برخی از این ژن‌ها در همان منطقه کروموزومی تشکیل دهنده خوشه ژنی قرار می‌گیرند که شبیه خوشه ژنی آنتروباکتین باکتری‌ای کولای است (۷ و ۲۳). همچنین، نشان داده شده که باکتری یرسینیا راکری حاوی فراورده‌های خارج سلولی اعم از لیپاز، پروتئاز و فعالیت‌های همولیتیکی و خواص سیتوتوکسیکی در برخی محیط‌های کشت سلولی است (۴). از نتایج مهم ردیابی عامل‌های حدت استفاده از آن‌ها در ساخت واکسن و اثر آن‌ها در میزان ایمنی ماهی است. بنابراین، شناخت این ژن‌هادر آگاهی از میزان بیماری‌زایی آن‌ها و همچنین، استفاده از سویه‌های مشخص در ساخت واکسن مهم خواهد بود. که در این میان می‌توان به یکی از عامل‌های خارج سلولی حدت میکروارگانیسم‌ها یعنی پروتئازها اشاره کرد (۲۴). با وجود واکسن‌هایی با قدرت اثر مناسب و تجویز برای دوره‌های طولانی مدت، همچنان شیوع بیماری دهان قرمز را در مناطقی که به صورت بومی (اندمیک) درآمده اند، می‌توان مشاهده کرد. چنانچه این واکسن‌ها قادر به ایجاد محافظت لازم علیه بیوگروه‌های جدیدی که به تازگی در کشورهای مختلف جداسازی شده اند نیستند(۱۲ و ۲۵). باکتری یرسینیا راکری به طور مداوم باعث خسارات اقتصادی زیاد در صنعت آبزی پروری شده است ولی توسعه ابتدایی واکسن این باکتری باعث کنترل نسبی بیماری می‌شود. بنابراین، ممکن است این یکی از دلائلی باشد که چرا مکانیسم‌های اختصاصی بیماری‌زایی این باکتری تا کنون به شکل دست نیافتی باقی مانده است. ثابت شده که کسب آهن توسط سیدروفور راکر باکتین، فعالیت‌های پروتئولیتیکی و همولیتیکی و مقاومت در برابر مکانیسم‌های ایمنی میزبان از عوامل درگیر در بیماری‌زایی این باکتری به شمار می‌روند. شناخت و اطلاعات به دست آمده از این باکتری در دراز مدت به روشن شدن وضعیت بحث‌برانگیز طبقه بندی آن کمک کرده و راهکارهای جدید مقابله با شیوع بیماری با توجه به ناکارآمد بودن واکسن‌های تجاری در برابر برخی از سویه‌های جدید را ارائه خواهد داد (۲۶).

گزارش‌های اندکی در مورد وضعیت ژن‌های حدت در سویه‌های یرسینیا راکری وجود دارد و مطالعه حاضر از معدود مطالعاتی است که در کشور انجام شده است. اگرچه همه سویه‌های یرسینیا راکری در این مطالعه، واجد ژن‌های حدت بررسی شده نبودند، اما به علت رخداد بالقوه سویه‌های حاد و احتمال بروز خسارات اقتصادی و عدم شناسایی این سویه‌ها با روش‌های مرسوم در آزمایشگاه‌های کشور، بکارگیری روش‌های مولکولی با سرعت، دقت و ویژگی بالا، به منظور شناسایی موارد مشکوک به یرسینیوز حاد ضروری به نظر می‌رسد. از این رو توصیه می‌شود مطالعه بیشتری در زمینه بررسی عوامل تأثیرگذار در بروز یرسینیوز حاد که در این مطالعه، بررسی نشده اند، انجام شود. با توجه به رشد سریع آبزی پروری در کشور ما به ویژه قزل آلای رنگین کمان و افزایش تراکم این ماهی در مزارع پرورش ماهی، بروز بیماری‌های عفونی در آینده چندان دور از انتظار نیست. بنابراین، وظیفه کارشناسان و متخصصان بخش آموزشی، تحقیقاتی و اجرایی این است که در برای ساماندهی این مزارع و اجرای فرآیندهای کنترلی و بهداشتی، بیش از پیش فعالیت نموده و در این میان توجه به تنوع ژنتیکی باکتری‌ها و همچنین، شناسایی ژن‌های حدت آن‌ها کمک شایانی به پیاده‌سازی پروتکل‌های پیشگیرانه دارد.

References

(1) Austin B, Austin DA. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish.* 4th ed, UK, Chichester: Praxis Publishing, 2007: 112-127.

(2) Jalali Jafari B, Miar M. *Salmonid and Trout diseases*. Tehran: Noorbakhsh publisher; 1999: 87-93.

(3) Soltani M. *Bacterial diseases of fishes*. Tehran: Veterinary Organization publisher; 1996; 136-166.

(4) Romald JL, Toranzo AE. Pathological activities of *Yersiania rucker*, the Enteric Redmouth Bacterium, *FEMS Microbiol Lett*. 1993; 112 (3): 291-99.

(5) Coquet L, Cosette P, Quillet L, Petit F, Junter GA, Jouenne T. Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002 ; 68 (2): 470-75.

(6) Fernández L, López JR, Secades P, Menéndez A, Márquez I, Guijarro JA. *In vitro* In vitro and *in vivo* in vivo studies of the *Yrp1* protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric redmouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microbiol*. 2003; 69 (12): 7328-35.

(7) Fernández L, Márquez I, Guijarro JA. Identification of specific in vivo-induced)ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004;70 (9): 5199–207.

(8) Fernández L, Prieto M, Guijarro ,JA. The iron and temperature regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*, *Microbiology*. 2007a; 153 (pt 2): 483-89.

(9) Furones MD, Gilpin ML, Alderman DJ, Munn CB. Virulence of Yersinia ruckeri serotype 1 strains is associated with a heat sensitive factor (HSF) in cell extracts. *FEMS Microbiol Lett*,. 1990; 66 (1-3): 339–44.

(10) Stave JW , Cook TM , Roberson BS. Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum) , phagocytes to strains of *Yersin ia ruckeri. J Fish Dis*. 1987; 10 (1): 1–10.

(11) P, Alvarez B , Guijarro JA. Purification and characterization of a psychrophilic calcium induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen Flavobacterium psychrophilum. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67 (6): 2436-44.

(12) Secades Fouz B, Zarza C , Amaro C. First description of non-motile Yersinia ruckeri serovar I strains causing disease in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum) , cultured in Spain. *J fish dis*. 2006; 29 (6): 339-46.

(13) Fernández L, Secades P, Lopez JR, Marquez I ,Guijarro JA. Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogene *Yersinia rackeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. *Microbiology*. 2002: 148 (pt7): 2233-43.

(14) Secades P, Guijarro JA. Purification and characterisation of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999; 65 (9): 3969–75.

(15) Delcero A, Marquez I, Guijarro JA. Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida* , *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three major Fish Pathogen , by MultiplexPCR, *Appl. Environ. Microbiol*. 2002; 68 (10): 5177-80.

(16) Soltani M, Fadaifard F , Mehrabi MR. First report of a yersiniosis-like infection in farmed rainbow trout. *Bull Eur Assn Fish Pathol*. 1999; 19 (4): 173-76.

(17) Akhlaghi M , Sharifi Yazdi H. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian J Vet Res*. 2008; 9 (4): 347-52.

(18) Fadaeifard F, Momtaz H,Raissy M,Seemin S. Molecular detection of virulence genes (yhlA, yhlB) in the *Yersinia ruckeri*. *J Mod Vet Res*. 2011; 3 (3): 7-11.

(19) Toranzo AE, Barja JL, Colwell RR, Hetrick FM. Characterisation of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun*. 1983; 19: 184–92.

(20) Kawula TH, Lelivelt MJ , Orndorff PE. Using a new inbred fish model and cultured fish tissue cells to study Aeromonas hydrophila and Yersinia ruckeri pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*. 1996; 20: 119-25.

(21) Binet R, Létoffé S, Ghigo J, Delapelaire P, Wandersman C. Protein secretion by gram negative bacteria *ABC export: a review. Gene*. 1997; 192 (1): 7-11.

(22) Cascón A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Hernanz C, Luengo JM et al. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of Aeromonas hydrophila. *Infect Immun*. 2000; 68 (6); 3233-41.

(23) Faraldo-Gomez J, Sanson MSP. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews*. 2003; 4 (2): 105-16.

(24) Secades P ,Alvarez B ,Guijarro JA. Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 226 (2): 273–79.

(25) Arias CR, Olivares-Fuster O. Hayden, K. First report of Yersinia ruckeri biotype 2 in the USA. *J Aquat Anim Health*. 2007; 19 (1): 35–40.

(26) Fernández L, Méndez J, Guijarro JA. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Vet Microbiol*. 2007b; 125 (1-2): 1-10.

---

[1]. Striped bass
[2]. TSA
[3]. Waltman-Shotts
[4]. Delcero et al
[5]. Fernandez et al
[6]. Fadaeifard et al
[7]. Torenzo et al
[8]. Adhesion
[9]. Invasion
[10]. Host-Pathogen interaction

Detection of virulence genes (*yrp1* and *yrpE*) in the *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction test in Chaharmahal-Va-Bakhtiary province, Iran

Firooz fadaeifard *
Associated professor of Aquatic animal health and disease, Shahrekord Branch,Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, fadaeifard@gmail.com
Saeed Simin
Student of veterinary medicine, Shahrekord Branch,Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, saeed.simin_vet@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Yersinia ruckeri* is the etiological agent of enteric redmouth (ERM) disease, one of the important bacterial diseases in the cultured salmonids. The aim of present study was detection of virulence genes (*yrpE* and *yrp1*) in the *Y.ruckeri* bacterium

Materials and methods In this study fish were evaluated in average size 10-12 Cm from six rainbow trout farms in Chaharmahal-Va-Bakhtiary province. In each farm 10 fish (totally 60) suspected to ERM were randomly selected, sampling was done from lower part of intestine and cultured on general (trypticase soy agar) and specific (Waltman-Shots) mediums. Finally, colonies that were isolated on these mediums tested by PCR method for *Y.ruckeri* detection. Then, in the identified strains of *Y.ruckeri* virulenc genes (*yrp1*and *yrpE*) were detected by PCR test.

Results: In the all strains of *Y.ruckeri* two virulence genes (*yrp1*and *yrpE*) were identified by molecular test. 24 strains out of total isolates were identified as *Y.ruckeri*, and among them 12 cases (50%) and 11 cases (45.83%) had *yrp1* and *yrpE* genes, respectively. Also, 6 samples (25%) had both genes simultaneously.

Discussion and conclusion: The study revealed that virulence factor yrp1 is as extracellular protease presence in *Y.ruckeri* strains. This factor plays an important role in the bacterial virulence and pathogenesis of ERM disease. Data obtained in this study help to control disease especially in development of current vaccines.

Key words: Rainbow trout, PCR, *Yersinia ruckeri*, *yrp1*, *yrpE*

* Corresponding author
Received: August 6, 2013 / **Accepted:** November 6, 2013