مطالعه مولکولی *یرسینیا راکری*، عامل بیماری یرسینیوزیس در برخی از مزارع قزل‌آلای کشور

مهدی سلطانی[۱*]، شلاله موسوی[۲]، حسینعلی ابراهیم‌زاده‌موسوی[۱]، سیدسعید میرزرگر[۳]، علی طاهری‌میرقائد[۴]، شفیق شفیعی[۲]، پولین شهره[۲] و سمیرا محمدیان[۲]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱

چکیده

یرسینیا راکری عامل بیماری یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های جدی با زیان‌های اقتصادی بالا در صنعت پرورش قزل‌آلای رنگین-کمان است. موارد ابتلای ماهی‌ها در مزارع قزل‌آلای کشور به بیماری مذکور، از نظر بالینی در سال‌های اخیر نگران‌کننده بوده است. این مطالعه با هدف بررسی پراکنش *یرسینیا راکری* در مزارع ماهیان مبتلا به بیماری، برای نخستین بار در مزارع استان‌های مازندران (۲۲ مزرعه)، تهران (۱۸ مزرعه)، لرستان (۶ مزرعه) و زنجان (۶ مزرعه) طی سال‌های ۱۳۹۱- ۱۳۹۰و هم‌چنین تعیین بیوتیپ وتوالی‌یابی جدایه‌های ایرانی انجام گرفت. نتایج حاصل از مطالعات نمونه‌گیری و کشت باکتریایی، منجر به جداسازی و شناسایی ۳۴ جدایه‌ی *یرسینیا راکری* از مزارع استان‌های مازندران (۱۴ مزرعه)، تهران (۱۷مزرعه) و زنجان (۳ مزرعه) گردید. تمامی این جدایه‌ها در آزمایش آنتی‌بادی مونوکلونال ضد باکتری به روش آگلوتیناسیون مثبت بودند. هم‌چنین همگی جدایه‌ها متعلق به بیوتیپ ۱ بوده و دارای خواص تحرک و لیپاز مثبت بودند. به علاوه، در مطالعات تعیین توالی تمامی جدایه‌ها دارای تشابه توالی (۹۹)٪ بودند. حاصل مطالعات بیوشیمیایی، سرولوژیک و مولکولی، بیانگر پراکنش بالای یرسینیوزیس با عامل *یرسینیا راکری* بیوتیپ ۱ در مزارع ماهی قزل‌آلای مبتلا در کشور است؛ از این رو نیازمند اقدامات جدی پیشگیری از بیماری است.

کلمات کلیدی: *یرسینیا راکری*، یرسینیوزیس، قزل‌آلای رنگین کمان، ایران

مقدمه

یرسینیا راکری عامل یرسینیوزیس (سپتی‌سمی-یرسینیایی/بیماری دهان‌قرمز آنتروباکتریایی) یکی از بیماری‌های حاد با زیان‌های اقتصادی بالا در صنعت پرورش آزاد ماهیان، به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان است (Tobback et al. 2009, 2007). این باکتری که متعلق به خانواده‌ی انتروباکتریاسه است، میله‌ای، فاقد هاگ، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت و متحرک بوده و در ۳۷°C رشد می‌کند ولی قدرت تحرک خود را از دست می‌دهد. تا کنون ۵ سروتیپ O_1-O_5 باکتری گزارش شده، به علاوه باکتری دارای ۲ بیوتیپ می‌باشد. بیوتیپ ۱ متحرک و لیپاز مثبت بوده ولی بیوتیپ ۲ فاقد این دو ویژگی است (Bestor et al. 2010). بیوتیپ ۱ بیماری از غالب کشورهای اروپایی و آمریکایی و آسیایی، استرالیا و آفریقای جنوبی گزارش شده است. در سال‌های اخیر گونه‌های مربوط به بیوتیپ ۲ نقش شایان توجهی در شیوع و تلفات بیماری یرسینیوزیس در مزارع واکسینه شده با واکسن‌های تجاری

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

[۲] دانشجوی PhD بهداشت آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۳] دانشیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران

[۴] استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران

علیه این بیماری داشته‌اند؛ از آن جمله می‌توان به شیلی، آمریکا، اسپانیا، انگلستان و دانمارک و فنلاند، اسکاتلند، آلمان، ایرلند، فرانسه، سوئیس، لهستان و ایتالیا اشاره کرد (Arias et al. 2007, Bastardo et al. 2011b, Davies and Frerichs 1989, Fouz et al. 2006, Strom-Bestor et al. 2010, Sousa et al. 2001). واکسن‌های تجاری غالباً علیه بیوتیپ ۱ ساخته شده‌اند؛ در حالی که امروزه بیوتیپ ۲، در کشورهای اروپایی و آمریکایی نقش بیش-تری در بیماری‌زایی یافته است. واکسیناسیون علیه بیوتیپ ۱ سابقه‌ای طولانی در بسیاری از کشورهای اروپایی و آمریکایی دارد؛ اما واکسیناسیون علیه بیوتیپ ۲ برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ در اروپا انجام شد (Austin et al. 2003). بنابراین امروزه شناخت دقیق خواص جدایه‌های عامل بیماری و تعیین بیوتیپ آن‌ها برای انجام اقدامات پیشگیری ضروری است. در ایران، تنها گزارش مکتوب مربوط به جداسازی تعدادی از جدایه‌های باکتری از برخی مزارع قزل‌آلای مبتلا به بیماری از استان‌های چهارمحال و بختیاری و فارس می‌باشد (Sharifi and Akhlaghi 2008, Soltani et al. 1999). اگر چه در مطالعات مذکور عمدتاً به مشخصات فنوتیپی جدایه‌ها در تعداد محدودی از مزارع قزل‌آلای دو استان مذکور پرداخته شده، اما هیچ‌گونه اطلاعی در مورد سایر استان‌ها و نیز روابط ژنتیکی آن‌ها با هم‌دیگر وجود ندارد. از این رو هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی و مطالعات مولکولی و سرولوژیک و تعیین بیوتیپ جدایه‌های به دست آمده از ماهیان بیمار در تعدادی از مزارع برخی استان‌های درگیر و نیز تعیین توالی ژنی جدایه‌های جدا شده با جدایه‌های شناخته شده از سایر نقاط دنیا می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و کشت باکتریایی

طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۸ با مراجعه به مزارع قزل‌آلای کشور واقع در استان‌های تهران (۱۸ مزرعه)، مازندران (۲۲ مزرعه)، زنجان (۶ مزرعه) و لرستان (۶ مزرعه) نسبت به نمونه‌گیری از ماهیان مشکوک به بیماری با علایم بیرون‌زدگی چشم همراه با خون‌ریزی، پرولاپس مخرج، آسیت، قرمزی فک و دهان، از تعداد ۵۲ مزرعه قزل‌آلای کشور اقدام گردید (جدول ۱). نمونه‌گیری‌ها در ایام فصول بهار، تابستان و در برخی موارد در فصل زمستان بوده است. به علاوه از هر مزرعه تعداد ۱۰ ماهی با علایم بالینی، نمونه‌گیری به عمل آمد. عملیات کشت باکتریایی از بافت‌های کلیه به روش استریل روی محیط ژلوز خون‌دار یا در محل کارگاه یا پس از انتقال نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی آبزیان انجام شد . پلت‌های کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵-۲۰)°C نگهداری و از پرگنه‌های رشدیافته با انجام رنگ‌آمیزی گرم و تفکیک نمونه‌های گرم منفی باسیلی یا کوکوباسیلی برای مطالعات بعدی استفاده گردید.

مطالعات بیوشیمیایی

برای انجام مطالعات بیوشیمیایی از روش‌های استاندارد توصیه شده استفاده شد (Holt et al. 1993). نتایج آزمایش‌های مورد نظر برای تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی در جدول ۲ آمده است.

مطالعات تعیین بیوتیپ

برای تعیین بیوتیپ جدایه‌های به دست آمده، از روش Bastardo استفاده شد که شامل آزمایش‌های لیپاز و تحرک جدایه‌ها بود (Bastardo et al. 2011a). برای آزمایش لیپاز از محیط Egg yolk agar (Merck, Germany) و برای آزمایش تحرک از محیط SIM (Merck, Germany) استفاده شد.

مطالعات سرولوژیک

برای انجام آزمایش‌های سرولوژیک از روش آگلوتیناسیون و کیت MONO-Yr (BIONOR,Norway) استفاده گردید. به طور خلاصه، این روش به شرح زیر انجام شد:

یک قطره از معرف آزمایش (test reagent)، به صفحات آنالیز واکنش اضافه شد؛ سپس از پرگنه‌های تازه هر جدایه‌ی باکتریایی، برداشته و به معرف آزمایش افزوده شد و به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط گردید و واکنش آگلوتیناسیون با تکان دادن صفحه و پس از حدود ۶۰ ثانیه قرائت شد. در موارد مثبت، همین مراحل با معرف کنترل تکرار شد (شکل۱). در این آزمایش از معرف کنترل منفی (معرف فاقد آنتی‌بادی مونوکلونال) و با استفاده از پرگنه‌های تازه باکتریایی استفاده گردید.

مطالعات مولکولی

آزمایش PCR

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت Biospin Bacteria Genomic DNA Extraction Kit (Bio Flux, Japan) استفاده شد. پس از استخراج، نسبت به مطالعه‌ی کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ اقدام شد.

آزمایش PCR برای شناسایی جدایه‌های *یرسینیا راکری*

برای شناسایی جدایه‌های *یرسینیا راکری* از روش توصیه شده توسط Lejeune and Ruramgirwa در سال ۲۰۰۰ استفاده شد. برای این کار از یک جفت پرایمر با توالی‌های Forward primer: 5′ -CAG CGG AAA GTA GCT TG-3′ و Reverse primer : 5′ -TGT TCA GTG CTA TTA ACA CTT AA-3′ استفاده شد که ناحیه‌ی ۴۰۹bp ژن 16SrRNA باکتری *یرسینیا راکری* را شناسایی می‌نماید (LeJeune and Rurangirwa 2000). مواد مورد استفاده برای واکنش PCR شامل ۲/۵µl بافر Dream Taq، ۱۰mM از مخلوط dNTP، ۱۰ pM از هر پرایمر، ۱۰۰ ng از نمونه‌ی DNA و ۵ u/ml آنزیم Dream Taq بود. حجم نهایی مخلوط واکنش را، با استفاده از آب مقطر به ۲۵µl افزایش داده و سیکل حرارتی PCR با دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad(USA)، شامل واسرشته‌سازی اولیه (یک دور به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴°C) و سپس ۳۵ دور واسرشته-سازی (۳۰ ثانیه در ۹۴°C)، اتصال (۳۰ ثانیه در ۵۵°c) و بسط (۱ دقیقه در ۷۲°C) و بسط نهایی (۱۰ دقیقه در ۷۲°C) بود. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪، الکتروفورز و باندهای حاصل از آن با استفاده از Bio-Safe Stain(Nano lytic,Germany) به میزان ۱µl رنگ‌آمیزی گردید و توسط دستگاه مستندساز ژل ترانس ایلومیناتور Bio-Rad,XR-Plus(USA)، عکس‌برداری شد. از جدایه‌ی *یرسینیا راکری* اهدایی آزمایشگاه Kurt Buchmann از دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه کوپنهاگ، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

تعیین توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های مثبت در PCR

برای تعیین توالی نوکلئوتیدی جدایه‌ها، از کیت Biospin PCR Purification Kit (Bio Flux, Japan) استفاده شد.

نتایج به دست آمده از طریق جست و جوی BLAST با توالی سویه‌های ثبت شده در Gene bank، مقایسه گردید و از برنامه‌ی CLC Workbench 6 برای تفسیر نتایج BLAST استفاده گردید.

نتایج

کشت و جداسازی

از مجموع ۵۲ مزرعه بررسی شده، تعداد ۳۴ مزرعه (۱۴ مزرعه از مازندران با فراوانی ۶۸/۱۸٪، ۱۷ مزرعه از تهران با فراوانی ۸۸/۸ ٪ و ۳ مزرعه از زنجان با فراوانی۵۰٪) از نظر علایم بالینی، مشابه فرم کلینیکی بیماری یرسینیوزیس تشخیص داده شد (بیرون‌زدگی چشم همراه با خون‌ریزی، پرولاپس مخرج، آسیت، قرمزی فک و دهان). نتایج کشت باکتریایی از ماهیان مرضی این مزارع، منجر به جداسازی باکتری‌های کوکوباسیل/ باسیل گرم منفی گردید (جدول ۱).

جدول ۱: جدایه‌های** یرسینیا راکری **به دست آمده و سال جداسازی و استان مورد نظر

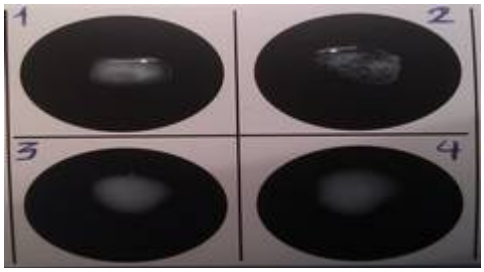
استان	سال جداسازی	کد جدایه
تهران	۱۳۸۸	۲۱۲
	۱۳۸۹	۲۲۷، ۲۲۶، ۲۲۵، ۲۲۴
	۱۳۹۰	۲۹۵B, ۲۹۴ A,۲۹۴, ۲۹۲, B۲۹۱, A۲۹۱, B۲۹۰, ۲۸۹, ۲۳۷, ۲۳۶, ۲۳۵, ۲۳۴
مازندران	۱۳۸۹	۲۲۳
	۱۳۹۰	۳۰۶, ۳۰۵, ۳۰۴, ۳۰۳, ۳۰۲, ۳۰۱, ۳۰۰, ۲۹۹, ۲۹۸, ۲۸۶, ۲۳۲, ۲۳۱, ۲۳۰
زنجان	۱۳۹۰	۳۰۸, ۳۰۷, ۲۳۳

مطالعات بیوشیمیایی و تعیین بیوتیپ

نتایج مطالعات بیوشیمیایی در جدول ۲ آمده است. بر اساس این نتایج تمام این جدایه‌ها از نوع اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و برای آزمایش‌های لیپاز و تحرک نیز مثبت و متعلق به بیوتیپ ۱ بودند (جدول ۲).

مطالعات سرولوژیک

نتایج آزمایش آگلوتیناسیون باکتریایی، منجر به آگلوتیناسیون کاملاً تیپیک در طی فاصله‌ی زمانی ۶۰ ثانیه برای همه جدایه‌های به دست آمده گردید (شکل ۱).

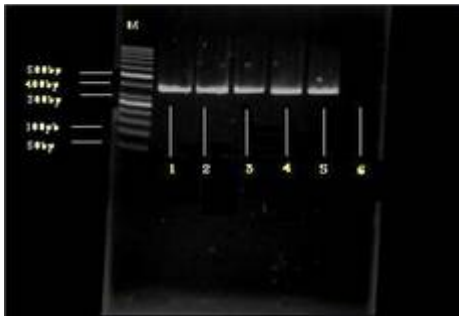


شکل ۱: (۲ و ۱) واکنش مثبت آگلوتیناسیون باکتریایی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضدیرسینیاراکری روی جدایه‌های یرسینیا راکری به دست آمده از مزارع ماهیان مرضی. شماره‌ی ۱- شروع واکنش. شماره‌ی ۲- پس از حدود ۶۰ ثانیه از گذشت واکنش. (۴ و۳) کنترل منفی.

مطالعات مولکولی

PCR

نتایج آزمایش PCR با استفاده از جفت پرایمر مورد اشاره منجر به تولید باند با وزن مولکولی ۴۰۹ bp برای کلیه‌ی ۳۴ جدایه گردید؛ در حالی که نمونه‌ی کنترل منفی هیچ‌گونه باندی ایجاد ننمود (شکل ۲).



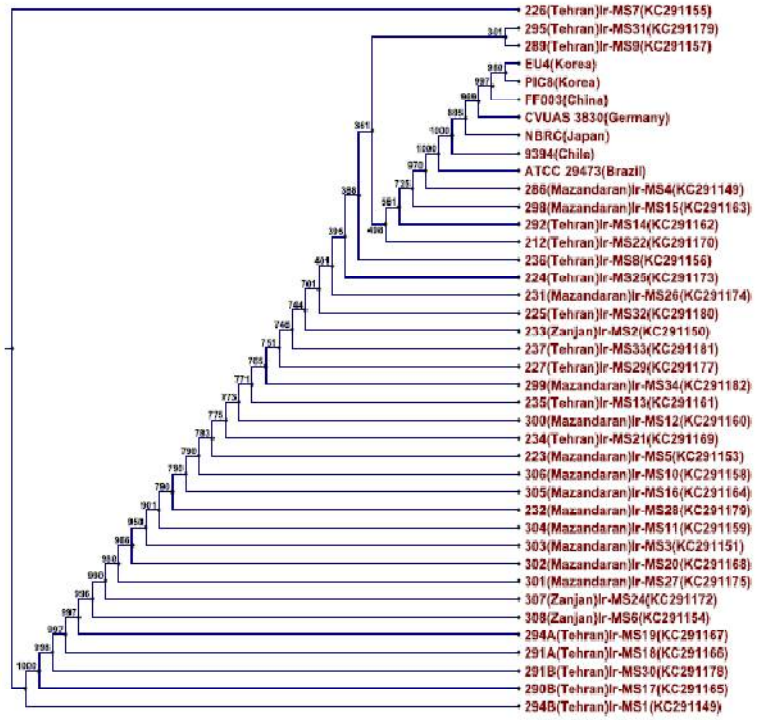
شکل ۲: ژل آگارز مربوط به PCR حاصل از DNA تعدادی از جدایه‌های یرسینیا راکری. ستون‌های ۴-۱- جدایه‌های مورد آزمایش، ستون ۵- کنترل مثبت، ستون ۶ - کنترل منفی(آب). M - مارکر.

تعیین توالی نوکلئوتیدی

در نتایج حاصل از توالی‌یابی سویه‌های به دست آمده و جست و جوی BLAST در NCBI ، تمام جدایه‌های ایرانی بیش‌ترین تشابه را (به جز جدایه‌ی ۲۳۰ که به دلیل حجم پایین DNA توالی‌یابی نشد) با درصد تشابه (۹۹)٪ با سویه‌های *یرسینیاراکری* سایر نقاط دنیا نشان دادند. این جدایه‌ها تحت کدهای با شماره‌های Ir-MS1 الی Ir-MS33 در بانک ژنی ثبت گردیده است. درخت فیلوژنیک رسم شد و همگی جدایه‌های ایران با یکدیگر و با سویه‌های سایر نقاط دنیا مقایسه شدند که در شکل ۳ آمده است که بیان‌گر تشابه ۹۹٪ بین این جدایه‌ها و نیز بین این جدایه‌ها و تعدادی از جدایه‌های *یرسینیا راکری* از سایر مناطق دنیا است.

جدول ۲: نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جدایه‌های ایرانی

ویژگی‌های بیوشیمیائی	نام سویه‌ها						
	Ir-MS (۳۱-۳۴)	Ir-MS (۳۰-۲۶)	Ir-Ms (۲۵-۲۱)	Ir-MS (۲۰-۱۶)	Ir-MS (۱۵-۱۱)	Ir-MS (۱۰-۶)	Ir-MS (۵-۱)
رنگ‌آمیزی گرم	–	–	–	–	–	–	–
تحرک در ۲۲°C	+	+	+	+	+	+	+
تحرک در ۳۷°C	–	–	–	–	–	–	–
اکسیداز	–	–	–	–	–	–	–
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+
اندول	–	(+)	–	–	–	–	–
MR		-	-	-	–	–	–
VP	+	+	+	+	+	+	+
0/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
هیدرولیز ژلاتین	+	(+)	+	(+)	+	+	+
هیدرولیز آرژنین	–	–	–	–	–	–	–
هیدرولیز لیزین	+	(+)	(+)	+	+	+	+
هیدرولیز ارنیتین	–	–	–	(+)	+	(+)	–
هیدرولیز تریپتوفان	–	–	–	–	–	–	–
اوره	–	–	–	–	–	–	–
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+
ساکارز	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
مانیتول	+		+	–	+	+	+
اینوزیتول	–	–	–	–	–	(+)	–
آرابینوز	+	+	+	+	+	+	+
رامنوز	–	–	–	–	–	–	–
H_2S	–	–	–	–	–	–	–
سیترات سیمون	+	(+)	+	+	(+)	+	+
قابلیت رشد در محیط مکانکی	+	+	+	+	+	+	+
قابلیت رشد در محیط شاتس	+	+	+	+	+	+	+
قابلیت رشد در محیط اختصاصی یرسینیا	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+
OIF(تولید گاز)	–	–	–	–	–	–	–
آگلوتیناسیون	+۴	+۱	+۱	+۴	+۳	+۴	+۴
IDFAT	+۴	+۲	+۲	+۴	+۳	+۴	+۴



شکل ۳: درخت فیلوژنیکی یرسینیا راکری بر اساس توالی ژن 16SrRNA و با استفاده از برنامه‌ی CLC DNA Workbench 6 و مقایسه‌ی میزان تشابه جدایه‌های ایرانی با یکدیگر و با جدایه‌های مربوط به سایر نقاط دنیا

بحث

ارائه‌ی راه‌کارهای کنترلی و پیشگیری از بروز بیماری‌های عفونی، مستلزم مطالعات تشخیص و اپیدمیولوژیک می‌باشد. از آن‌جایی‌که در سال‌های اخیر شمار مزارع با علایم بالینی مشابه یرسینیوزیس رو به افزایش بوده، از این رو این مطالعه با هدف بررسی پراکنش بیماری در برخی استان‌های درگیر بیماری و نیز مطالعات مربوط به تعیین برخی ویژگی‌های جدایه‌های *یرسینیاراکری* عامل یرسینیوزیس در مزارع قزل‌آلای کشور انجام گرفته است. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، از ۵۲ مزرعه‌ی مورد مطالعه، ۳۴ مزرعه با فراوانی نسبی۶۵٪ مبتلا به بیماری یرسینیوزیس با عامل *یرسینیا راکری* بودند. فراوانی نسبی آلودگی به *یرسینیا راکری* در مزارع استان‌های مورد مطالعه، در استان تهران برابر ۸۸/۸٪، در استان مازندران برابر ۶۸/۱۸٪، در استان زنجان برابر ۵۰٪ بود؛ در حالی که موارد مشکوک به یرسینیوزیس بالینی دراستان لرستان از نظر تشخیصی صورت منفی داشت. نتایج آزمایش‌های تعیین بیوتیپ، نشان داد که همه‌ی ۳۴ جدایه از شباهت ۱۰۰٪ برخوردارند؛ به‌طوری‌که همگی جدایه-های حاصل از مزارع بررسی شده، متعلق به بیوتیپ ۱ باکتری *یرسینیا راکری* بودند. علت یا علل این موضوع نامعلوم است اما، با توجه به حجم بالای جابه‌جایی تخم چشم زده، و به‌ویژه بچه ماهیان بین مزارع استان‌های مختلف، ممکن است که بیماری در ابتدا تنها محدود به برخی مزارع در منطقه‌ی خاص بوده است و از طریق جابه‌جایی بین سایر مزارع پخش شده است. به‌علاوه از آن‌جایی‌که *یرسینیا راکری* دارای مخازن طبیعی نظیر موش آبی بوده و حتی باکتری به عنوان بخشی از فلور باکتریایی دستگاه گوارش برخی ماهیان شناخته شده

است، از این رو ممکن است که بیوتیپ ۱ باکتری *یرسینیا راکری* به عنوان بیوتیپ غالب در مزارع قزل‌آلای کشور باشد (Fouz et al. 2006) . به‌هرحال، مطالعات اپیدمیولوژیک بیش‌تری نیاز است تا ضمن اطلاع از وضعیت بیماری در مزارع سایر استان‌ها، نسبت به شناسایی بیوتیپ ۲ نیز اقدام شود. در این راستا هم‌چنین مطالعاتی توسط سلطانی و همکاران در سال ۲۰۰۱، در استان چهارمحال بختیاری و اخلاقی و همکاران در سال ۲۰۰۸، در استان فارس انجام گردید و آن‌ها برخی جدایه-های باکتریایی را گزارش نمودند که عمدتاً از نوع بیوتیپ ۱ بوده‌اند (Sharifi and Akhlaghi Soltani et al. 1999 ,2008). بروز یرسینیوزیس با عامل جدایه‌های بیوتیپ ۲ از اروپا و آمریکا طی سال‌های اخیر و عدم کارایی واکسن‌های موجود در بازار این کشورها موجب مشکلاتی برای پیشگیری این بیماری گردیده است و بدین دلیل انجام اقدامات پیشگیری و کنترل به روش واکسیناسیون در هر منطقه از کشور، مستلزم مطالعه‌ی جامع و کامل بیماری در آن منطقه خواهد بود تا بتوان با استفاده از جدایه‌های غالب و عامل بیماری‌زای آن منطقه از واکسن مورد نیاز استفاده نمود. بنابراین انجام این گونه مطالعات در سایر استان‌های کشور و برای انجام اقدامات پیشگیری (واکسیناسیون) امری ضروری است. از سایر کشورهای آسیایی نیز تاکنون گزارش مستندی از حضور بیوتیپ ۲ *یرسینیا راکری* نبوده است؛ برای مثال، بیوتیپ ۲ *یرسینیا راکری* از بسیاری از کشورهای اروپایی و آمریکایی از جمله از شیلی و پرو توسط Bastardo و همکاران در سال ۲۰۱۱، از آمریکا و اروپا توسط Welch و همکاران در سال ۲۰۱۱، از فنلاند توسط Bestor و همکاران در سال ۲۰۱۰، از آمریکا توسط Arias و همکاران در سال ۲۰۰۷، از اسپانیا توسط Fouz و همکاران در سال ۲۰۰۶، گزارش شده است. از جمله علل گسترش بیوتیپ ۲ در کشورهای اروپایی ارتباط نزدیک این کشورها به یکدیگر و حجم بالای انتقال ماهی و تخم آلوده بین این کشورهاست (Bestor et al. 2010).

نکته‌ی قابل توجه در این مطالعه، واکنش مثبت تمامی جدایه‌های ایرانی به آنتی‌بادی مونوکلونال چند ایزوله‌ای اروپایی (نروژی) است که بیان‌گر وجود واکنش‌های متقاطع قوی بین جدایه‌های ایران و حتی با برخی جدایه‌های اروپایی است. از این رو با این نوع آنتی‌بادی می‌توان به راحتی نسبت به تشخیص سریع یرسینیوزیس در مزارع قزل‌آلای کشور اقدام کرد.

از جنبه‌های مولکولار نیز، در غالب مطالعات انجام گرفته برای تشخیص سریع *یرسینیا راکری*، از ژن 16S rRNA برای تأیید تشخیصی استفاده می‌شود. در این مطالعه نیز، با استفاده از این ژن تمام جدایه‌ها باندی با وزن مولکولی 409 bp تولید کردند که مشابه نتایج به دست آمده از سایر مطالعات است (Austin et al. 2002, Bastardo et al. 2011b, Strom-Bestor et al. 2010, LeJeune and Rurangirwa 2000).

از نظر فیلوژنی نیز، مقایسه‌ی جدایه‌های ایرانی مطالعه شده در این تحقیق، با سویه‌های برزیل (ATCC 29473)، شیلی (9394)، آلمان (CVUAS3830)، ژاپن (NBRC)، چین (FF003)، کره (EU4) و کره (PIC8) بیان‌گر تشابه بالای ۹۹ ٪ این جدایه‌ها با یکدیگر و با سویه‌های *یرسینیاراکری* ذکر شده است (شکل ۳) . در درخت فیلوژنیکی تمام جدایه‌های ایرانی (به استثنای ایزوله شماره‌ی ۲۹۵) به همراه سویه‌های کشورهای دیگر در یک گروه مجزا قرار گرفتند. به هر حال، جدایه‌ی شماره‌ی ۲۹۵ از تهران، در یک گروه قرار گرفت؛ اما با توجه به نتایج BLAST، تشابه جدایه‌ی ۲۹۵ نیز، با سایر جدایه‌ها، ۹۹٪ بود. در هر صورت، علت قرارگیری این جدایه در گروهی مجزا نیاز به بررسی بیش‌تر و توالی‌یابی مجدد این جدایه دارد. بیش‌ترین شباهت جدایه‌های ایرانی به سویه مربوط به کشور برزیل است.

در جمع‌بندی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری یرسینیوزیس در استان‌های مورد بررسی، در حال توسعه می‌باشد و با توجه به افزایش قابل توجه بیماری در مزارع قزل‌آلای کشور و خسارت قابل توجه، به ویژه این

که این بیماری در مراحل مختلف پرورش خود باعث بروز بیماری می‌شود، بنابراین انجام مطالعات بعدی برای روشن شدن وضعیت بیماری و جدایه‌های درگیر در بروز بیماری در دیگر استان‌ها به منظور اتخاذ سیاست‌های عملی پیش‌گیری و کنترلی از بیماری، ضروری است که در قالب طرح‌های تحقیقاتی در حال اجراست. به علاوه، از آن جایی که از نظر تعیین توالی شباهت ۹۹٪ بین این جدایه‌ها با برخی از جدایه‌های سایر کشورها وجود دارد، از این رو احتمال ورود این پاتوژن از طریق واردات تخم چشم‌زده به کشور وجود دارد که نیاز به مطالعه‌ی بیش‌تر و اعمال مقررات قرنطینه‌ی دقیق‌تر است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب گرنت شماره‌ی ۷۵۰۸۰۰۲/۶/۲۲ معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و نیز حمایت مالی قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران و طرح کلان تولید دانش فنی ساخت واکسن‌های آبزیان انجام گرفته است، که از مسئولان آن سپاسگزاری می‌نماییم. هم‌چنین از زحمات آقای مهندس مهدی باقری به دلیل کمک‌های آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

Arias, C.R.; Olivares, F.; Hayden, K.; Shoemaker, C.A.; Grizzle, J.M. and Klesius, P.H. (2007). First report of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the USA. Journal of Aquatic Animal Health , 19(1): 35-40.

Austin, D.A.; Robertson, P.A.W. and Austin, B. (2003). Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). System and Applied Microbiology, 26: 127-131.

Bastardo, A.; Bohle, H.; Ravelo, C.; Toranzo, A.E. and Romalde, J.L. (2011a). Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in chile. Diseases of Aquatic Organims, 93(3):207-214.

Bastardo, A.; Sierralta, V.; Leon, J.; Ravelo, C. and Romalde, J.L. (2011b). Corrigendvm 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. and FRERICHS, G.N. (1989). Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. Fish Diseases, 12: 357-365.

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

Holt, J.G.; Krieg, R.N.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1993). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, PP: 221-251.

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.

Sharifi, Y. and Akhlaghi, M.H. (2008). Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University, 9(4): 347-352.

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

Sousa, J.A.; Magarinos, B.; Eiras, J.C.; Toranzo, A.E. and Romalde, J.L. (2001). Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. Journal of Fish Diseases, 24:151-159.

Strom-Bestor, M.; Mustamaki, N.; Heinikainen, S. and Hirvela-Koski, V. (2010). Introduction of *Yersinia ruckeri* biotype 2 into Finnish fish farm. Aquaculture, 308:1-5.

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

Tobback, E.; Decostere, A.; Hermans, K.; Ryckarert, J.; Duchateau, L.; Haesebrouck, F. et al. (2009). Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms, 84:219-228.

Welch, T.; Verner-Jeffreys, D.; Dalsgaard, I.; Wiklund, T.; Evenhuis, J.; Garcia Cabrera, J. et al. (2011) Independent Emergence of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the United States and Europe. Applied and Environmental Microbiology, 77(10): 3493–3499.

Molecular study of *Yersinia ruckeri* distribution, the causative agent of yersiniosis in some farmed rainbow trout of Iran

Soltani, M.[1]; Mousavi, Sh.[2]; Ebrahimzadeh Mousavi, H.A.[1]; Mirzargar, S.S.[3]; Taheri Mirghaed, A.[4]; Shafiei, Sh.[2]; Shohreh, P.[2] and Mohammadian, S.[2]

Received: 11.02.2013 Accepted: 23.07.2013

Abstract

Yersinia ruckeri is the causative agent of yersiniosis, one of the most serious bacterial diseases in rainbow trout culture industry with high economic losses. Outbreaks of clinical forms of the disease have been considerable in Iranian rainbow trout farms. This study was aimed to evaluate the molecular epidemiology of yersiniosis caused by *Y. ruckeri*, affected farmed trout in Mazandaran (22 farms), Tehran (18 farms), Lorestan (6 farms) and Zanjan (6 farms) provinces during 2011 to 2013. Furthermore, biotyping and sequencing of the recovered Iranian isolates was performed. Totally, 34 *Y. ruckeri* isolates were identified in Mazandaran (14 farms), Tehran (17 farms) and Zanjan (3 farms). All isolates were strongly positive in latex bacterial agglutination using monoclonal antibody to *Y. ruckeri*. Also, all isolates were identified as biotype 1 showing motility and having lipase activity. In addition, all isolates showed high sequencing similarity (99%). These biochemical, serological and molecular studies all together confirmed the increasing distribution of yersiniosis casued by *Y. ruckeri* biotype 1 in farmed trout in Iran and so require preventive measures.

Key words: *Yersinia ruckeri*, Yersiniosis, Rainbow trout, Iran

1- Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
2- PhD Student of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
3- Associate Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
4- Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
Corresponding Author: Soltani, M., E-mail: msoltani@ut.ac.ir