مطالعهٔ بیوتایپینگ و الگوی پروتئین‌های کل و غشای خارجی ایزوله‌های یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) جداسازی شده از برخی مزارع قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) کشور

علی طاهری میرقائد*[1]، سینا میرمظلومی[1]، مهدی سلطانی[1]، پولین شهره[2]، اشکان زرگر[1]، الهه سلطانی[3]

[1]گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

[2]دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

[3]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: mirghaed@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۶

چکیده

یرسینیا راکری عامل سپتی سمی یرسینیایی یا یرسینیوز و یکی از بیماری‌های با اهمیت اقتصادی در ماهیان پرورشی است. در مطالعه حاضر جداسازی، شناسایی، بیوتایپینگ و الگوی پروتئین‌های کل و غشای خارجی سلول یرسینیا راکری در تعدادی از مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان واقع در برخی استان‌های کشور مورد مطالعه قرار گرفت تا بتوان از اطلاعات به‌دست آمده در جهت ساخت و ارتقاء واکسن این بیماری استفاده کرد. تعداد هفت ایزوله طی بهار و تابستان ۱۳۹۷، از استان‌های مازندران، چهار محال و بختیاری، کهگیلویه و بویر احمد و زنجان به‌دست آمد، که با روش‌های فنوتایپینگ و مولکولی شناسایی شدند. این ایزوله‌ها همراه با پنج ایزوله ای که قبلاً از استان‌های خراسان شمالی و آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بود در آزمایش‌های فنوتایپینگ به‌عنوان بیوتیپ یک شناسایی شدند. به‌علاوه، همه این ایزوله‌ها دارای الگوهای الکتروفورزی مشابه برای پروتئین‌های کل و پروتئین‌های غشای خارجی سلول بودند. نتیجهٔ این مطالعه نشان می‌دهد که ایزوله‌های یرسینیا راکری عامل بیماری یرسینیوزیس در برخی مزارع قزل آلای کشور مورد بررسی قرار گرفته است، از تنوع پایینی برخوردارند که می‌تواند برای مطالعات پیشگیری مانند واکسیناسیون مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: یرسینیا راکری، پروتئین کل سلول، پروتئین غشای خارجی، بیوتایپینگ.

مقدمه

یرسینیا راکری عامل سپتی‌سمی یرسینیایی /یرسینیوزیس یا بیماری دهان قرمز، یکی از عوامل باکتریایی مهم بیماری‌زا در گونه‌های مختلفی از ماهیان با اهمیّت تجاری، به ویژه در آزادماهیان می باشد (Ormsby and Davies, 2017). از بین گونه‌های مختلف آزادماهیان، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از حساسیت بیشتری برخوردار بوده، بنابراین خسارات اقتصادی ناشی از بیماری در بسیاری از مناطقی که آزادماهیان به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورش داده می‌شود، قابل توجه است (Austin and Austin, 2016; Carson and Wilson, 2009). مطالعات متعددی پیرامون پراکنش جغرافیایی، روش-های درمان و کنترل و پیشگیری این بیماری توسط محققان متعدد انجام شده است (Ormsby *et al*., 2016; Soltani *et al*., 2014a, c; Wheeler *et al*., 2009; Calvez *et al*., 2014). در ایران اوّلین گزارش بیماری مربوط به مطالعات Soltani و همکاران (۱۹۹۹) می‌باشد. گزارش‌های سال‌های اخیر، حکایت از پراکنش بیماری و توسعهٔ آن در مناطق مختلف کشور دارد (Soltani *et al*., 2016; Bahadori *et al*., 2016; Zorriehzahra *et al*., 2017). با توجه به این‌که روش‌های درمان بیماری های باکتریایی از جمله یرسینیوزیس مشکلات متعدد زیست محیطی و بهداشتی مانند مقاومت باکتریایی ایجاد می‌نماید، بنابراین توجه به امر پیشگیری به‌ویژه با روش واکسیناسیون از اهمیّت بالایی برخوردار است. در روش‌های پیشگیری، شناخت نژادهای درگیر در بیماری و انجام مطالعات تنوّع زیستی آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به این که واکسیناسیون علیه این بیماری در مناطق مختلف دنیا و از جمله در ایران امری ضروری است، بنابراین شناخت تنوّع ایزوله‌های عامل بیماری و نیز شناسائی مناطق

جدول ۱ - مشخصات آغازگرهای مورد استفاده.

H آغازگر	توالی آغازگر J	ژن هدف
YER_1	5′-CAG CGG AAA GTA GCT TG-3′	16SrRNA
YER_2	5′-TGT TCA GTG CTA TTA ACA CTT AA-3′	16SrRNA

جغرافیایی درگیر بیماری امری بدیهی است. هدف از مطالعهٔ حاضر شناسائی، جداسازی، تعیین بیوتایپ و تعیین الگوهای پروتئینی یرسینیا راکری در تعدادی از مزارع قزل‌آلای کشور واقع در برخی از استان‌های پر تولید می‌باشد، که نتیجهٔ آن می‌تواند در انجام مطالعات آتی مانند روش‌های پیشگیری و واکسیناسیون مؤثر واقع شود.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های باکتریایی مورد مطالعه: تعداد دوازده ایزولهٔ یرسینیا راکری برای این مطالعه استفاده شد. تعداد هفت ایزوله از مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به بیماری، واقع در استان‌های مازندران (یک ایزوله)، زنجان (یک ایزوله)، چهار محال و بختیاری (چهار ایزوله) و کهگیلویه و بویر احمد (یک ایزوله) در سال ۱۳۹۷ و پنج ایزوله نیز قبلاً از مزارع استان‌های خراسان شمالی و اذربایجان غربی جمع‌آوری شده بود. به‌علاوه، از ایزولهٔ یرسینیا راکری مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (PTCC 1888) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

فنوتایپینگ و بیوتایپینگ: به‌منظور شناسائی برخی از مشخصات فنوتیپی و نیز تعیین بیوتایپ ایزوله‌ها، از روش توصیه شده Davies و Frerichs (۱۹۸۹) استفاده شد. پس از تهیهٔ کشت‌های تازهٔ ۴۸ ساعته روی محیط آگار تریپیتیک سویا (Merck) و انجام تعدادی آزمایشات بیوشیمیایی مانند رنگ آمیزی گرم، اکسیداز و کاتالاز و نیز انجام آزمایش حرکت به روشهای قطره‌ای و کشت در محیط حرکت (SIM)، هیدرولیز توئین ۲۰ و ۸۰ (آزمایش لیپاز) نسبت به تعیین بیوتیپ اقدام شد.

آزمایشات مولکولی (PCR): استخراج DNA با استفاده از کیت Rapid Genomic DNA Isolation Kit (MBST, Iran) و بر اساس دستورالعمل آن انجام شد. غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Eppendorf, Germany) تعیین و نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر جهت بررسی خلوص DNA تعیین شد این نسبت برای DNA خالص بین ۱/۷ و ۱/۹ می باشد.

برای شناسائی جدایه‌های یرسینیا راکری از روش توصیه شده توسط LeJeune و Rurangirwa (۲۰۰۰) استفاده شد. برای این کار از یک جفت پرایمر با توالی‌های بیان شده در جدول ۱ استفاده شد که ناحیهٔ bp ۴۰۹ ژن 16SrRNA باکتری یرسینیا راکری را شناسائی می‌نماید.

مواد مورد استفاده برای واکنش زنجیره ای پلی مراز شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (Amplicon, Denmark)، یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۹/۵ میکرولیتر از آب مقطر و یک میکرولیتر نمونهٔ DNA با حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر بود. سیکل حرارتی واکنش PCR با 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 (یک دقیقه در ۷۴°C) و یک سیکل بسط نهائی یک دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C بود. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز یک و نیم درصد، الکتروفورز شده و باندهای حاصله توسط دستگاه مستندساز ژل (KIA Gen (CCD-5), Germany)، عکسبرداری شد.

جداسازی پروتئین‌های کل باکتری: جداسازی پروتئین‌های کل باکتری بر اساس روش بیان شده توسط Tinsley و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. به طور خلاصه، باکتری‌ها بعد از کشت در محیط تریپیتیک سویا براث، در دمای ۳۰°C به مدت ۱۸ ساعت همراه با شیکینگ، ۱۰ دقیقه با دور rpm× ۴۰۰۰ سانتریفیوژ (Eppendorf, Germany) شدند. سپس از پلت باکتریایی در آب مقطر سوسپانسیون تهیه و جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر بدست آمد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مورد نظر به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm×۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به رسوب

باکتریایی میزان ۶۰ میکرولیتر بافر نمونه (DNA 5X Biotech, Iran) [(بتا مرکاپتواتانول (۵٪)، بروموفنول بلو (۰/۰۲٪)، گلیسرول (۳۰٪)، سدیم دودسیل سولفات (۱۰٪)، تریس هیدروکلراید mM ۲۵۰ (pH ۶,۸)] (Lammeli, 1970) اضافه و بعد از پنج دقیقه جوشاندن، میزان ۲۴۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه و نگه‌داری در آب جوش برای پنج دقیقهٔ دیگر، مایع رویی بعد از سانتریفیوژ (Sigma, USA) در دور rpm×۱۰۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه جمع آوری شد، که تا زمان آنالیز در ۲۰°C- نگهداری شد.

جداسازی پروتئین‌های غشای خارجی باکتری: جداسازی پروتئین‌های غشای خارجی ایزوله‌های باکتریایی، براساس روش بیان شده توسط Davies (۱۹۹۱) با مختصری تغییر انجام شد. باکتری‌ها با شرایط ذکر شده در بالا کشت داده شدند و بعد از سانتریفیوژ با دور rpm×۴۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شدند. از باکتری‌ها در ۲۰ میلی‌لیتر بافر تریس-هیدروکلراید ۵۰ میلی‌مولار (pH=7.4) سوسپانسیون تهیه و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌دست آمد. نمونه‌های مورد نظر در کنار یخ در ۴ دورهٔ یک دقیقه‌ای با وقفه‌های ۳۰ ثانیه‌ای سونیکه (Hielscher, Germany) و سپس با دور rp×m۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به مایع رویی میزان ۲ میلی لیتر سارکوزیل (Sigma, USA) ۲۰٪ اضافه و بعد از انکوباسیون در ۲۲°C به مدت ۳۰ دقیقه، با دور rpm×۲۹۰۰۰ به مدت یک ساعت سانتریفیوژ (Beckman ultracentrifuge, USA) شدند. به رسوب باقی مانده میزان ۵۰ میکرولیتر بافر تریس-هیدروکلراید ۵۰ میلی‌مولار (pH=7.4) اضافه و در ۸۰°C- نگهداری شد. قبل از انجام SDS-PAGE، به پلت حاصله میزان ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰°C نگه‌داری شد.

تعیین الگوی پروتینی ایزوله‌ها: برای تعیین الگوی پروتینی ایزوله‌های باکتریایی از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد (Lammeli, 1970). میزان ۱۰-۳۰ میکرولیتر از هر نمونهٔ پروتئینی (پروتئین‌های کل و غشای خارجی) به چاهک‌های ژل اضافه شد و برای الکتروفورز از بافر متراکم کننده حاوی تریس-هیدروکلراید-سدیم دودسیل سولفات به‌همراه چهار درصد (v/v) پلی آکریل آمید و بافر جدا کننده حاوی ۱۲ درصد (v/v) پلی آکریل آمید استفاده شد. به‌علاوه میزان ۳ تا ۵ میکرولیتر از مارکر (SMOBIO, Taiwan) در یک چاهک استفاده شد. ژل جداکننده (۱۰ میلی‌لیتر) حاوی ۵۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات (APS) (Merck, Germany) ۱۰ و ۵ درصد میکرولیتر تترامتیل اتیلن دی‌آمین (TEMED) (Merck, Germany) بود. الکتروفورز در محفظهٔ الکتروفورز Mini Protean II (Bio-Rad, USA) در ولتاژ ۱۰۰ ولت در بافر الکترود (حاوی۳۰/۳ گرم تریس باز، ۱۴۴ گرم گلایسین و ۱۰ گرم SDS در یک لیتر آب مقطر که قبل از استفاده به نسبت ۱ به ۹ رقیق‌سازی شده بود) در دمای اتاق انجام گرفت. بعد از رسیدن باندهای پروتئین به یک سانتی‌متری انتهای ژل، جریان ولتاژ متوقف و باندهای پروتئینی توسط کوماسی بریلینت بلو رنگ‌آمیزی شدند.

نتایج

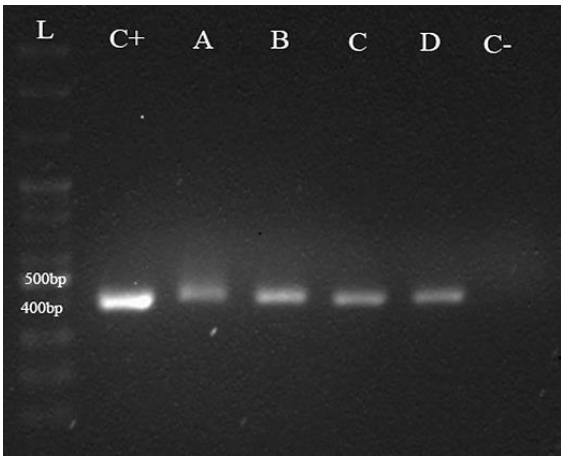
فنوتایپینگ و بیوتایپینگ: نتایج آزمایشات فنوتایپینگ نشان داد که همهٔ ایزوله‌ها از نظر مشخصات فنوتایپی شامل آزمایشات رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، تولید سولفید هیدروژن، آزمایش‌های لیپاز و اندول‌مشابه بودند. به‌علاوه، همهٔ ایزوله‌ها در محیط SIM و نیز به‌روش قطره‌ای متحرّک بوده و همچنین قادر به هیدرولیز توین ۲۰ و ۸۰ بودند که بیان‌گر شناسایی آن‌ها در گروه بیوتیپ یک می‌باشد (جدول ۲).

نتایج آزمایش PCR: با توجه به‌ضرورت تشخیص نهایی ایزوله‌ها به‌عنوان یرسینیا راکری از آزمایش PCR برای تایید نهایی استفاده شد. نتایج حاصل از PCR با استفاده از جفت پرایمر مورد اشاره، منجر به تولید باندهای با وزن مولکولی ۴۰۹ جفت بازی برای همه ایزوله‌ها شد در حالی که نمونهٔ کنترل منفی هیچگونه باندی ایجاد نکرد (شکل ۱).

الگوی پروتئین کل جدایه‌ها: نتایج الگوی الکتروفورزی پروتئین کل مربوط به ایزوله‌های مورد مطالعه یکسان و شامل ۷ باند اصلی در فاصلهٔ ۷۲ تا

جدول ۲ - مشخصات بیوتایپینگ ایزوله‌های مورد مطالعه.

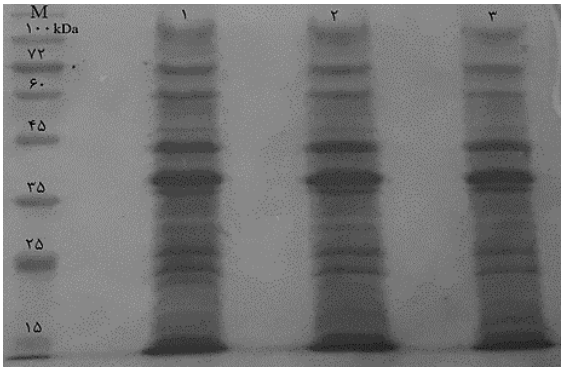
ایزوله	مکان جداسازی	هیدرولیز توئین ۲۰ (تولید لیپاز)	هیدرولیز توئین ۸۰ (تولید لیپاز)	تحرک در محیط SIM	تحرک به روش قطره ای	بیوتیپ
PTCC 1888 (کنترل)	گرگان	+	+	+	+	۱
MHG0297	مازندران	+	+	+	+	۱
PHA0297	کهگیلویه و بویر احمد	+	+	+	+	۱
ZAA0597	زنجان	+	+	+	+	۱
SHA0197	چهار محال و بختیاری	+	+	+	+	۱
SHB0197	چهار محال و بختیاری	+	+	+	+	۱
SHC0197	چهار محال و بختیاری	+	+	+	+	۱
SHD0197	چهار محال و بختیاری	+	+	+	+	۱
YER	خراسان شمالی	+	+	+	+	۱
PSA	خراسان شمالی	+	+	+	+	۱
Y3A	خراسان شمالی	+	+	+	+	۱
Y4A	خراسان شمالی	+	+	+	+	۱
A	آذربایجان غربی	+	+	+	+	۱



شکل ۱ - ژل حاصل ازمحصول PCR. ستون های A تا D: ایزوله‌های کار شده و ستون C+: کنترل مثبت (جدایهٔ یرسینیا راکری) و ستون L : مارکر و ستون C-: کنترل منفی.

۲۰ کیلو دالتون به‌ترتیب با وزن‌های ۷۱/، ۶۰، ۴۳/۸، ۳۷/۹، ۳۳/۱، ۲۴/۶و ۲۳ کیلودالتون و تعداد ۵ باند فرعی با اوزان ۵۳/۷، ۴۸/۴، ۳۰/۸، ۲۶/۸ و ۱۹ کیلودالتون بود (شکل ۲).

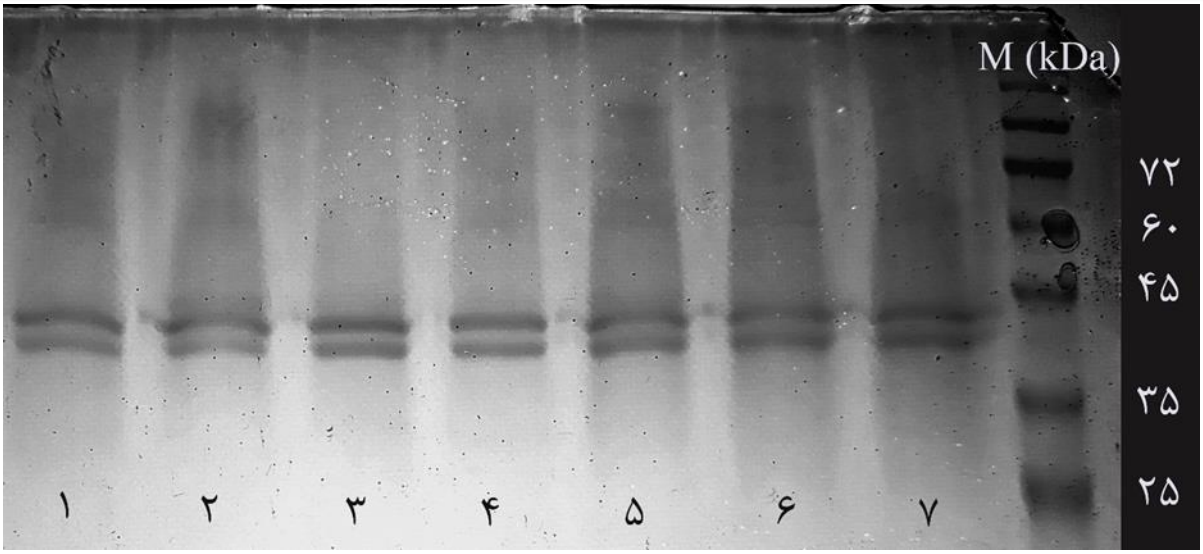
الگوی پروتئینی غشای خارجی جدایه‌ها: نتایج حاصل از مطالعه الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای خارجی شامل دو باند اصلی با اوزان ۴۱/۶ و ۳۸ کیلودالتون و تعداد ۵ باند فرعی با اوزان ۸۱/۲، ۷۱/۲، ۶۸، ۶۲/۱ و ۵۷/۹۷ کیلودالتون بود (شکل ۳).



شکل ۲ - الگوی الکتروفورزی پروتئین کل جدایه‌های یرسینیا راکری رنگ آمیزی شده با کوماسی بریلینت بلو. M: مارکر، ۱-۳: جدایه‌های مورد مطالعه.

بحث

گسترش بیماری یرسینیوزیس در مزارع پرورش ماهی طی سال‌های اخیر، موجب افزایش در تنوع ایزوله‌های عامل بیماری شده است، به‌طوری که طی دههٔ اخیر، بیوتیپ ۲ یرسینیا راکری از مزارع آزادماهیان در اروپا، آمریکا و استرالیا رو به افزایش است. بنابراین انجام مطالعات مستمر برای تعیین تایپینگ این ایزوله‌ها با هدف به‌روز نمودن روش‌های پیشگیری نظیر واکسیناسیون امری ضروری است، به‌ویژه که واکسن‌های موجود در بازار عمدتاً بر علیه بیوتیپ ۱ کارایی داشته، در حالی که بر علیه ایزوله‌های بیوتیپ



شکل ۳ - الگوی الکتروفورزی پروتئین غشای خارجی جدایه‌های یرسینیا راکری رنگ آمیزی شده با کوماسی بریلینت بلو. M: مارکر، ۱-۷: ایزوله های مورد مطالعه.

۲ از کارایی لازم برخوردار نمی‌باشند (Ormsby *et al.*, 2016; Tinsley *et al.*, 2011). در مطالعهٔ حاضر، تعداد ۱۲ ایزولهٔ جداسازی شده از پنج استان کشور از مشابهت فنوتیپی بالایی برخوردار بودند، به‌علاوه، در آزمایشات بیوتایپینگ، همهٔ این ایزوله‌ها در گروه بیوتیپ ۱ قرار گرفتند. در مطالعات قبلی انجام شده توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۶) و Bahadori و همکاران (۲۰۱۶)، ایزوله‌های مورد مطالعه از برخی استان‌های کشور نیز متعلق به بیوتیپ ۱ بودند. نتایج این مطالعه همراه با مطالعات قبلی، این احتمال را شدّت می‌بخشد، که ایزوله‌های یرسینیا راکری عامل سپتی‌سمی یرسینیایی در مزارع قزل‌آلای کشور، همگی از نوع بیوتیپ ۱ باشند، اگرچه که این موضوع نیازمند مطالعات بیشتری است. بنابراین، از دیدگاه پیشگیری به روش واکسیناسیون، توصیه می‌شود، که از واکسن‌های موثر علیه ایزوله‌های بیوتیپ ۱ استفاده شود.

با توجه به گزارش ایجاد بیوتیپ ۲ بدنبال جهش‌های اختصاصی در ژن‌های مربوط به‌ترشح تاژک (*fliR, flhA* و *flhB*) در میان سروتیپ‌های O1 (Welch *et al.*, 2011)، احتمال این که واکسیناسیون یک فشار انتخابی بر جمعیت باکتریایی تحمیل و منجر به از دست دادن تحرّک در ایزوله‌های یرسینیا راکری شده باشد، وجود دارد (Welch *et al.*, 2011; Wheeler *et al.*, 2009). این نوع جهش باکتریایی ناشی از پاسخ به واکسیناسیون در برخی عوامل بیماری‌زای ماهی و همچنین باکتری‌های با اهمیت پزشکی نیز گزارش شده است (Wheeler *et al.*, 2009). همچنین مطالعهٔ Welch و همکاران (۲۰۱۱) مدرک مستدلّی را برای انتشار بین قارّه‌ای بیوتیپ دو یرسینیا راکری ارائه می‌نماید. مطالعات ژل الکتروفورز در مورد برخی سویه‌های بیوتیپ ۲ از آمریکای شمالی، بریتانیا، فنلاند و دانمارک حاکی از درجات بالایی از ارتباط ژنتیکی بین آن‌ها است هرچند مکانیسم این انتشار ناشناخته است. برای مثال در مورد ظهور بیوتیپ ۲ در فنلاند (Strom-Bestor *et al.*, 2010) واردات لاروها و بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده را به عنوان عامل این بیوتیپ معرفی نموده‌اند. اگرچه در مطالعهٔ حاضر بیوتیپ ۲ یرسینیا راکری از برخی مزارع قزل‌آلای کشور جداسازی نشد، اما به علت واردات حجم بالای تخم چشم زده از کشورهای اروپایی، احتمال ظهور بیوتیپ ۲ در آیندهٔ نزدیک دور از انتظار نیست.

مطالعات تعیین الگوی پروتئین‌های باکتری یرسینیا راکری از جنبه های اپیدمیولوژیک بیماری و نیز مطالعات پیشگیری و کنترل بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است (Bahadori *et al.*, 2016). نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد، که الگوی پروتئین کل جدایه‌های مورد بررسی از استان‌های مختلف از تشابه بالایی برخوردارند. در مطالعهٔ Tinsley و همکاران (۲۰۱۱)، پروفایل پروتئین کل بیوتیپ ۱ و

۲ پرسینیا راکری مشابه بود، هر چند یک تفاوت جزئی در بیان پروتئینی در محدودهٔ وزنی ۴۰ کیلودالتون مربوط به بیوتیپ ۲ وجود داشت. در مطالعهٔ حاضر نیز با در نظر گرفتن این که ایزوله‌های مورد مطالعه همگی از بیوتیپ ۱ هستند، این انتظار می‌رفت که الگوهای پروتئینی آن‌ها نیز مشابه باشند. تفاوت بیان پروتئین‌ها در بین بیوتیپ‌های پرسینیا راکری توسط Wheeler و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش شده است. به هر حال با توجه به درجه حساسیت این نوع آزمایشات، مواردی مانند SDS-PAGE و نیز شرایط نگه‌داری و تعداد پاساژ ایزوله‌ها تا قبل از آزمایش همگی در نتایج حاصله تاثیر گذار است (Tinsley *et al.*, 2011). مطالعهٔ حاضر می‌تواند بیانگر این واقعیت نیز باشد که این جدایه‌ها به سویه‌ای تعلق دارند که بیوتیپ آن غالب بوده و احتمال آلوده شدن مزارع را با یک عامل اتیولوژیک مشترک نشان می‌دهد.

Davies (۱۹۹۱) نشان داد که تعیین پروتئین‌های غشای خارجی با استفاده از روش SDS-PAGE، روشی مناسب برای مطالعات اپیدمیولوژیک پرسینیا راکری می‌باشد. در مطالعهٔ مذکور پروتئین‌های غشای خارجی مربوط به ۱۳۵ جدایهٔ پرسینیا راکری از اروپا (۱۰۰ جدایه)، آمریکای شمالی (۲۳ جدایه)، استرالیا (شش جدایه) و آفریقای جنوبی (دو ایزوله) و چهار سویهٔ رفرانس، با استفاده از این روش بررسی شده و همگی واجد یک پروتئین مرتبط با پپتیدوگلیکان با وزن مولکولی ۳۹/۵ کیلودالتون بودند که در طی مرحلهٔ لگاریتمی رشد باکتری‌ها تولید نمی‌شد، اما با پیشرفت مرحلهٔ ایستایی رشد باکتریایی، بر مقدارش افزوده می‌شد. تنوع داخل گونه‌ای پرسینیا راکری به علت وجود یک پروتئین قابل تغییر در اثر حرارت (۳۶/۵ یا ۳۸ کیلودالتونی) و همچنین پروتئین‌های مرتبط با پپتیدوگلیکان (در محدودهٔ ۳۶/۵ تا ۴۰/۵ کیلودالتونی) اتفاق می‌افتد. براساس تنوع این پروتئین‌ها، پنج نوع پروتین غشا خارجی در میان ۱۳۵ ایزولهٔ مورد آزمایش، تشخیص داده شد. در مطالعهٔ حاضر نیز دو باند اصلی از پروتئین‌های غشای خارجی در محدودهٔ ۳۵ تا ۴۵ کیلودالتون وجود داشت (۳۸ و ۴۱/۶ کیلودالتون) (تصویر شمارهٔ ۴) که با یافته‌های مطالعهٔ Davies (۱۹۹۱) مطابقت دارد.

نتایج حاصل از مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که الگوی پروتئینی سلول کامل این ایزوله‌ها شامل ۱۲ باند با وزن مولکولی در دامنهٔ ۲۰-۷۲ کیلو دالتون می‌باشد. در مطالعهٔ Bahadori و همکاران (۲۰۱۶)، که بر روی شش ایزولهٔ پرسینیا راکری انجام شد، تعداد ۱۳ باند برای پروتئین سلول کامل گزارش شد، که از وزن مولکولی ۱۶-۷۵ کیلودالتون برخوردار بودند. بنابراین، از نظر الگوی پروتئینی سلول کامل، شباهت بالایی بین ۱۲ ایزولهٔ مورد مطالعهٔ حاضر و مطالعه Bahadori و همکاران (۲۰۱۶)، دیده می‌شود. به‌علاوه، الگوی پروتئینی غشای خارجی ایزوله‌های مورد مطالعه توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۶) شامل ۲ باند با وزن مولکولی ۲۸ تا ۳۵ کیلودالتون بود. در مطالعهٔ حاضر نیز تعداد ۲ باند با وزن مولکولی ۳۸ و ۴۱/۶ کیلودالتون در ایزوله‌های مورد مطالعه شناسائی شد، که بیانگر تشابه بالایی بین این ایزوله‌ها و ایزوله‌های قبلاً گزارش شده از مزارع قزل آلای کشور می‌باشد.

در مطالعهٔ Ormsby و همکاران (۲۰۱۶)، از راهکارهای فنوتیپی برای شناسائی ۱۰۹ ایزولهٔ پرسینیا راکری جدا شده در طی یک دورهٔ ۱۴ ساله از آزادماهیان اطلس بیمار در اسکاتلند استفاده شد؛ ۲۶ ایزوله از قزل‌آلای رنگین کمان بیمار نیز مورد بررسی قرار گرفت. بیوتایپینگ، سروتایپینگ و پروفایل‌های پروتئین غشای خارجی، ۱۹ کلون پرسینیا راکری را در ارتباط با آزادماهی اطلس شناسائی کرد، در حالی که فقط ۵ کلون مرتبط با قزل آلای رنگین کمان بود؛ هیچ کدام از کلون‌های مربوط به آزادماهی اطلس، در قزل‌آلای رنگین کمان نبود و برعکس. این یافته‌ها بیان داشت، که زیر جمعیت‌های مجزای پرسینیا راکری در ارتباط با هر دو جمعیت وجود دارد. در مطالعهٔ حاضر پروفایل پروتئینی جدایه‌های این باکتری از تشابه بالایی برخوردار بوده که با نتایج یافته‌های فنوتیپی نیز هم خوانی دارد.

در جمع بندی کلی، نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که ایزوله‌های پرسینیا راکری همگی از بیوتیپ یک بوده و از تشابه الگوی الکتروفورزی بالایی در پروتئین‌ها برخوردار هستند که این موضوع از جهت کنترل بیماری و تولید واکسن اهمیت دارد. با این

وجود، مطالعات مستمر و در سطح وسیع‌تری نیاز است تا تنوع جدایه‌های یرسینیا راکری در مزارع قزل‌آلای کشور را دقیق‌تر مورد مطالعه قرار داده و زمینه را برای ارتقای واکسن موجود فراهم نمود.

منابع

Austin B., Austin D.A. 2016. Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish (6th Ed.). Switzerland: Springer.

Bahadori N., Soltani M., Farahmand M., Mohammadan S., Soltani E. 2016. Protein pattern of *Yersinia ruckeri* isolates in some farmed rainbow trout (*onchorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Veterinary Research* 12 (1), 5-12.

Calvez S., Gantelet H., Blanc G., Douet D.G., Daniel P. 2014. *Yersinia ruckeri* biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. *Disease of Aquatic Organism* 109, 117-126.

Carson J., Wilson T. 2009. Yersiniosis in fish. *Aust New Zeal Stand Diagnostic Procedure* 1-19.

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

Davies R.L., Frerichs G.N. 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases* 12, 357-365.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

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

Ormsby M.J., Caws T., Burchmore R., Wallis T., Verner-Jeffreys D.W., Davies R.L. 2016. *Yersinia ruckeri* isolates recovered from diseased Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Scotland are more diverse than those from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and represent distinct sub-populations. *Applied and Enviromental Microbiology* 82, 5785-5794.

Ormsby M., Davies R. 2017. *Yersinia ruckeri*. In: P.T.K. Woo, R.C. Cipriano (ed.), *Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection*. UK: CABI. 339 p.

Soltani M., FadaiiFard F., Mehrabi M.R. 1999. First report of a yersiniosis-like infction in iranian farmed rainbow trout. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19(4), 173-175.

Soltani M., Mousavi Sh., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Mirzargar S.S., Taheri Mirghaed A., Shafiei Sh., Shohreh P., Mohammadian S. 2014a. Molecular study of *Yersinia ruckeri* distribution, the causative agent of yersiniosis in some farmed rainbow trout of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 10(1), 59-67.

Soltani M., Shafiei Sh., Mirzargar S.S., Ebrahimzadeh Musavi H.A., Ghodratnama M. 2014b. Study of efficacy of vaccination against yersinosis in rainbow trout using local strains of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Veterinary Research* 69(1), 57-63.

Soltani M., Shafiei Sh., Yosefi P., Mosavi Sh., Mokhtari A. 2014c. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 37, 60-65.

Soltani M., Mousavi S., Shafiei S., Taheri M. 2016. Electrophoresis pattern of total protein, outer membrane protein and lipopolysaccharide of *Yersinia ruckeri* isolates in some farmed rainbow trout (*onchorhynchus mykiss*) in Iran. *Scientific-Research Journal* 5(1), 131-140.

Strom-Bestor M., Mustamaki N., Heinikainen S., Hirvela-Koski V., Verner-Jeffreys D., Wiklund T. 2010. Introduction of *Yersinia ruckeri* biotype 2 into Finnish fish farms. *Aquaculture* 308, 1-5.

Welch T.J., Verner-Jeffreys D.W., Dalsgaard I., Wiklund T., Evenhuis J.P., Garcia Cabrera J.A., Hinshaw M.J., Drennan J.D., LaPatra S.E. 2011. Independent Emergence of *Yersina ruckeri* Biotype 2 in the United States and Europe. *Applied and Enviromental Microbiology* 77(10), 3493-3499.

Wheeler R.W., Davies R.L., Dalsgaard I., Garcia J., Welch T.J., Wagley S., Bateman K.S., Verner-Jeffreys D.W. 2009. *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. *Diseas of Aquatic Organisms* 84, 25-33.

Zorriehzahra M.J., Adel M., Torabi Delshad S. 2017. Enteric redmouth disease: Past, present and future: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16(4), 1135-1156.

Bio-typing and characterization of whole cell and outer membrane proteins of *Yersinia ruckeri* isolates recovered from some rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) farms in Iran

Ali Taheri Mirghaed[*1], Sina Mirmazlumi[1], Mehdi Soltani[1], Pulin Shohreh[2], Ashkan Zargar[1], Elahe Soltani[3]

[1]Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
[2]Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
[3]Department of microbiology, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding author: mirghaed@ut.ac.ir
Received: 2018/12/14 Accepted: 2019/2/5

Abstract

Yersinia ruckeri is the etiological agent of *Yersinia* septicemia or yersiniosis of farmed fishes. In this study, *Y. ruckeri* isolates were isolated and characterized in the case of phenotype, biotype as well as their patterns of whole cell and outer membrane proteins. Seven isolates were recovered from rainbow trout farms in the Mazandaran, Chaharmahal-va-Bakhtiari, Kohgiluyeh-va-Boyerahamad, and Zanjan provinces during spring and summer 2018. These isolated *Yersinia* plus five previously recovered isolates form the North Khorasan and Western Azarbaijan Gharbi were identified as *Y. ruckeri* based on their phenotype, biotype and molecular characterization. All isolates were biotype one with the high identical patterns of whole cell proteins and outer membrane proteins in electrophoresis. These results illustrated that *Y. ruckeri* as the cause of yersiniosis in farmed rainbow trout in Iran *Y. ruckeri* isolates are mostly homogenous showing low diversity and thus, could be useful in further preventive studies such as vaccination.

Keywords: Yersinia ruckeri, Whole cell protein, Outer membrane protein, Bio type.