مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۱، ۵۵-۴۹
Journal of Veterinary Research. 71,1:49-55, 2016
Original Article

ردیابی مولکولی ژن مقاوم به کینولون‌ها (gyrA) درجدایه‌های باکتری یرسینیا رکری با آزمون PCR

فیروز فدایی فرد[۱*] شاهین ناهید[۲] منوچهر مومنی شهرکی[۳]

۱) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد-ایران
۲) فارغ التحصیل دانشکده دامپزشکی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد- ایران
۳) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد- ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ آذر ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۴ بهمن ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: یرسینیا رکری عامل بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی یا یرسینیوز (یکی از بیماریهای مهم آزاد ماهیان پرورشی) است. **هدف:** مطالعه حاضر باهدف ردیابی ژن مقاوم به کینولون‌ها (gyrA) در باکتری یرسینیا رکری صورت پذیرفت. **روش کار:** به منظور انجام این تحقیق شش مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان چهار محال و بختیاری مورد بررسی قرار گرفت. به طوریکه از هر مزرعه ۱۰ عدد و در مجموع ۶۰ عدد ماهی مشکوک به بیماری با اندازه ۱۲cm-۸ به طور تصادفی انتخاب و اقدام به نمونه برداری از انتهای روده آنها و کشت بر روی محیط TSA (Tripticase Soy Agar) گردید. سپس محیطها به انکوباتور انتقال و بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری در دمای ۲۲ °C، برروی پرگنه‌های رشد یافته آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز و رنگ گرم انجام شده وآنهایی که گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند به محیط کشت اختصاصی واتمن شاتس منتقل شدند. پس از گرم‌خانه گذاری در دمای ۲۲°C به مدت ۴۸ ساعت از پرگنه‌های رشد یافته تست PCR انجام شد. در مرحله بعد بر روی باکتری‌های یرسینیا رکری شناسایی شده ردیابی ژن gyrA با استفاده از آزمون PCR صورت پذیرفت. **نتایج:** نتایج آزمون‌های باکتری شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی تحقیق حاضرنشان داد که ۳ نمونه از کل باکتری‌های مورد بررسی، باکتری یرسینیا رکری بوده و در همه آنها ژن gyrA ردیابی گردید. **نتیجه‌گیری‌نهایی:** شناسایی ژن مقاومت به کینولون‌ها در باکتری یرسینیا رکری می‌تواند دلیلی بر کاهش کارایی درمانی این دسته آنتی بیوتیک‌ها در مزارع پرورش ماهی باشد و لذا بایستی سیاست کنترل و درمان بیماریهای عفونی به ویژه دهان قرمز آنتروباکتریایی تغییر کند.

واژه‌های کلیدی: PCR، gyrA، یرسینیا رکری، قزل آلای رنگین کمان، مقاومت باکتریایی

مقدمه

یرسینیا رکری یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، کاتالاز مثبت وسیتوکروم اکسیداز منفی است و در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به بروز بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی یا یرسینیوزکه شکل بالینی یک سپتی سمی خونریزی دهنده است می‌گردد. این باکتری تقریباً انتشار جهانی داشته و همه گونه‌های وحشی و پرورشی آزاد ماهیان بالقوه نسبت به همه گیری‌های این بیماری حساس هستند. یرسینیا رکری دارای اندازه ۳µm-۲×۱ بوده و توسط ۷یا ۸ تاژک تحرک دارد (۲). بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی در ماهیان پرورشی آب شیرین شایع بوده اما در آب دریا، سایر گونه‌های ماهیان و در ماهیان وحشی نیز دیده می‌شود. این بیماری به شکل حاد، تحت حاد و مزمن دیده شده و در مواقع بروز آن در مناطق بومی شده (اندمیک) میزان تلفات به ۷۰-۳۰٪ نیز می‌رسد. واکسیناسیون، بهبود مدیریت بهداشتی، قرنطینه و ایجاد محدودیت حمل و نقل بهترین سیاست در کنترل آن به شمار می‌رود (۲۱). با توجه به گسترش بیماری یرسینیوز در اکثر مزارع پرورش آزاد ماهیان در دنیا و همچنین مصرف بالای برخی آنتی بیوتیک‌ها در کنترل این بیماری به مرور مشکلاتی اعم از افزایش مقاومت این باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج به وجود آمده که دراین خصوص می‌توان به تحقیقات برخی محققین اشاره نمود (۱۹،۱۸،۱۷،۶،۵). از آزمایش‌های مختلفی که جهت تعیین میزان حساسیت انواع باکتری‌های بیماریزای آبزیان به آنتی بیوتیک‌ها انجام می‌گیرد می‌توان به انتشار دیسک (Disc diffusion)، برات میکرودیلوشن (Broth microdilution)، رقیق سازی آگار (Agar dilution) و تست‌ای (E-test) اشاره نمود (۱۲).

از کارهای اولیه‌ای که در خصوص بررسی مقاومت (یا حساسیت) سویه‌های یرسینیا رکری به آنتی بیوتیک‌ها انجام پذیرفته می‌توان به تحقیق De Grandis و همکاران در سال۱۹۸۵ اشاره نمود. ایشان ۵۰ سویه یرسینیا رکری را جهت محاسبه میزان حساسیت به ۲۳ عامل ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار دادند و متوجه شدند که دو تا از ۵۰ سویه حامل یک پلاسمید ۵۰ مگادالتونی هستند که به عنوان مقاوم به تتراسیکلین‌ها و سولفونامیدها شناخته شده و قابل انتقال به گیرنده‌های باکتری ای کولای و یرسینیا رکری بوده‌اند. این سویه‌ها نیز از نظر پاسخ سرووارهای باکتری یرسینیا رکری به پلی میکسین B نیز با هم متفاوت بوده به طوری که سویه‌های سروار III، II و V فوق العاده مقاوم و سویه‌های سروار I حساس بوده اند (۵).

همچنین Rodgers و همکاران در سال ۲۰۰۱ حداقل غلظت

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۴۵ نمابر: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۴۵ Email: Fadaeifard@gmail.com

بازدارندگی (MIC) برای ۱۲۴ گونه باکتری یرسینیا رکری را با آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل اکسولونیک اسیدوسولفانامیدها مورد ارزیابی قرار دادند چنانچه بعد از ۱۵ بار کشت مجدد میزان MIC برای اکسولونیک اسید، اکسی تتراسیکلین و سولفانامیدها به ترتیب ۲۰، ۱۶ و ۱۶ برابر شده بود (۱۷). ژن gyrA از جمله عوامل شناخته شده مرتبط با مقاومت سویه‌های یرسینیا رکری به آنتی بیوتیک‌های دسته کینولون‌ها است که در سال‌های اخیر بر روی آن مطالعاتی صورت گرفته است به طوری که Gibello وهمکاران در سال ۲۰۰۴ با مطالعه ۷ گونه باکتری یرسینیا رکری جدا شده از ماهیان و مشاهده قطرهای منطقه ممانعتی (IZD) وحداقل غلظت ممانعتی (MICs) پی به کاهش حساسیت به برخی کینولون‌ها از جمله نالیدیکسیک اسید و اکسولونیک اسید بردند در این تحقیق نشان داده شد که با جایگزینی اسید آمینه آرژینین به جای سرین در موقعیت ۸۳ ژن *gyrA* امکان کاهش حساسیت به کینولون‌ها برای باکتری یرسینیا رکری فراهم شده است (۶). همچنین در مطالعه دیگری که به منظور بررسی ژن‌های مقاوم به کینولون‌ها در جدایه‌های یرسینیا رکری جمع آوری شده ازماهیان آزاد اقیانوس اطلس صورت گرفت مشخص شد که از چهار ژن مورد مطالعه (*parC*، *gyrB*، *gyrA* و *parE*) فقط در ژن gyrA یک موتاسیون تک جفت بازی (a single bp mutation) رخ داده که منجر به جایگزینی آرژینین به جای سرین در منطقه ۸۳ پروتیئن gyrA شده است و در سایر ژن‌ها چنین موتاسیونی صورت نگرفته است (۱۹). طی یک دوره یک ساله، چهار مزرعه پرورش ماهی واقع در غرب دانمارک از نظر میزان حساسیت باکتریایی فلاووباکتریوم سایکروفیلوم و یرسینیا رکری به پنج عامل ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش کاهش قابل ملاحظه‌ای در حساسیت جدایه‌های فلاووباکتریوم سایکروفیلوم به عوامل ضد میکروبی را نشان داد در صورتی که جدایه‌های یرسینیا رکری حساسیت بالایی به تمام داروها داشته‌اند. نتیجه این مطالعه تأثیر قابل توجه پرورش ماهی را در برخی از باکتری‌های مرتبط با محیط‌های آبزی پروری را نشان می‌دهد(۱۸).

با توجه به افزایش تولید قزل آلای رنگین کمان در کشورمان و احراز رتبه اول این تولید در سال‌های اخیر در استان چهارمحال و بختیاری، متأسفانه برخورد مزارع پرورشی در بروز بیماریهای عفونی استفاده بیش از اندازه ترکیبات آنتی بیوتیکی بوده است که در این میان بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی با درگیری برخی از این مزارع مصرف قابل توجهی از این عوامل ضد میکروبی را به خود اختصاص داده است که به مرور با کاهش حساسیت باکتری یرسینیا رکری به این گونه عوامل، اثر گذاری آنها را در درمان بیماری ذکر شده کاهش داده است و منجر به گسترش بیماریها و کاهش کارایی انواع آنتی بیوتیک‌ها شده است. از آنجایی که کینولون‌ها به دلیل برخورداری از اثر وسیع الطیف خود امروزه یکی از متداول‌ترین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در دامپزشکی به شمار می‌روند و بر اساس اطلاعات دریافتی از داروخانه‌های دامپزشکی و همچنین صاحبان مزارع پرورشی یکی از پرمصرف‌ترین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در سال‌های اخیر انروفلوکساسین و بعضاً نورفلوکساسین بوده است لذا در مطالعه حاضر سعی در ردیابی یکی از مهمترین ژن‌های دخیل در مقاومت باکتری یرسینیا رکری به کینولون‌ها به نام gyrA گردید تا بتوان نسبت به اتخاذ تدابیر لازم در کنترل بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی اقدام نمود.

مواد و روش کار

این تحقیق در فصل تابستان۱۳۹۲و درمزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان چهار محال و بختیاری صورت گرفت. انتخاب این مزارع به دلیل وقوع قبلی بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی (یرسینیوز) وگزارشات اعلام شده از سوی مراجع دامپزشکی در خصوص بروز بیماری ذکر شده انجام پذیرفت. بدین منظور از ۶ مزرعه پرورشی و از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد ماهی مشکوک به بیماری با اندازه متوسط ۱۲cm-۸ به صورت تصادفی برداشت شد که مجموعاً تعداد کل نمونه‌ها برابربا ۶۰ عدد گردید. قبل از انجام عملیات نمونه برداری نسبت به اخذ اطلاعات کامل مزرعه‌ای از قبیل فاکتورهای مربوط به آب (فاکتورهای کیفی‌از جمله دما و اکسیژن)، ماهی (مشاهدات بالینی و کالبدگشایی ماهیان تلف شده و زنده)، غذا (ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی غذا)، سوابق مصرف آنتی بیوتیک (به ویژه انروفلوکساسین و نورفلوکساسین) و تکمیل پرسشنامه‌های مربوطه اقدام گردید. سپس با رعایت شرایط استاندارد نمونه گیری در همان محل مزرعه از ماهیان صید شده نمونه برداری به عمل آمد. به طوری که ابتدا با وارد نمودن چند ضربه به سر، آنها را بی هوش و سپس با الکل اتیلیک سطح بدن ماهیان کاملاً ضد عفونی گردید. در ادامه با باز کردن سطح شکمی ماهی و در کنار شعله توسط آنس استریل از انتهای روده نمونه برداری صورت گرفت به طوری که با تخلیه مواد مدفوعی داخل روده، آنس را بر روی سطح مخاط آن محل کشیده و به محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Difco, Mi, USA) به عنوان یک محیط اولیه انتقال داده شد. بر روی تمام محیطها شماره و کد مربوطه درج و پس از اتمام عملیات نمونه گیری در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده و به مدت ۴۸ ساعت درانکوباتور با دمای۲۲°C نگهداری شده تا رشد پرگنه‌های مشکوک صورت پذیرد. پس از رشد پرگنه‌ها از هر کدام آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و همچنین رنگ آمیزی گرم صورت گرفته و آنهایی که کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و گرم منفی بوده‌اند جهت انتقال به محیط کشت واتمن شاتس (Oxoid, canada) به عنوان محیط اختصاصی یرسینیا رکری انتخاب می‌شدند. در این محیط نیز بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری دردمای ۲۲°C پرگنه‌های رشد یافته در آنها جدا و به محیط آب پپتونه انتقال و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۲°C نگه‌داری گردید تا در ادامه از

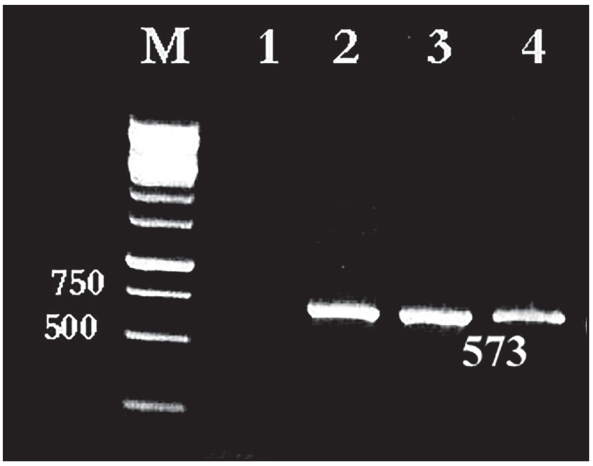
آن برای استفاده در آزمون PCR استفاده گردد.

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

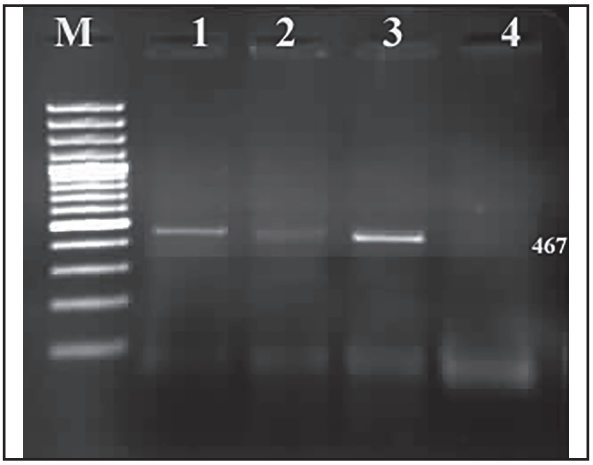
انجام PCR برای تشخیص باکتری یرسینیا رُکری: جهت تشخیص باکتری یرسینیا رُکری، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوطه و براساس دستورالعمل توصیه شده توسط Delcero و همکاران در سال ۲۰۰۲ صورت گرفت (۴). بدین منظور از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی که ردیابی قطعه ۵۷۳ جفت بازی ژن ۱۶SrRNA مربوط به باکتری یرسینیا رُکری را بر عهده دارند استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده دارای سکانس نوکلئوتیدی ´CGAGGAGGAAGGGTTAAGT۳´ ۵، yer۳ و ´AAGGCACCAAGGCATCTCT۳´ ۵، yer۴ بوده‌اند. در این واکنش از برنامه حرارتی مرحله واسرشته سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، مرحله واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۶۰°Cبه مدت ۴۰ ثانیه، توسعه در ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه (مراحل واسرشته سازی، اتصال و توسعه ۳۵ بار تکرار می‌گردد) و مرحله توسعه نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید. پس از انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌های مشکوک باکتریایی، سویه‌های یرسینیا رُکری شناسایی شده و نسبت به انجام واکنش ردیابی ژن مقاوم به کینولون‌ها (gyrA) آماده سازی گردیدند. در این مرحله با داشتن نمونه‌های مثبت یرسینیا رُکری نسبت به ردیابی ژن gyrA بر اساس پروتکل پیشنهادی Gibello و همکاران در سال ۲۰۰۴ اقدام گردید. بدین منظور از جفت پرایمر (´۵-ATGTGGCGGAATATTGGTTGC-´۳)، YER-AF و YER-AR(´۵-TCGGACGTGCGTTACCAGATGT-´۳) استفاده شد. به طوریکه در انجام واکنش PCR از برنامه دمایی واسرشته سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشته سازی در ۹۵°C به مدت یک دقیقه، اتصال در ۵۶°C به مدت یک ونیم دقیقه ، توسعه در ۷۲°C به مدت یک دقیقه و توسعه نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. البته مراحل دو تا چهار، ۳۰ بار تکرار گردید. در آخر نیز با انتقال محصول PCR درون ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی آن با اتیدیوم بروماید (با غلظت ۰/۵ µg/ml) و تصویر برداری از طریق دستگاه الکتروفورز اقدام به مشاهده نتایج در کنار نمونه کنترل منفی (آب مقطر) و مارکر ۱۰۰ جفت بازی گردید.

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 آنترو باکتریایی جهت ردیابی ژن مقاوم به کینولون‌ها (gyrA) در باکتری یرسینیا رُکری، ابتدا نسبت به شناسایی سویه‌های یرسینیا رُکری اقدام گردید که در این خصوص پس از انجام آزمایشات اولیه بیوشیمیایی اعم از کاتالاز، اکسیداز و رنگ آمیزی گرم آنهایی که کاتالاز مثبت،



تصویر۱. تصویر ژل آگارز: ردیابی ژن ۱۶SrRNAیرسینیا رُکری با تکنیک PCR. لاین M: مارکر۱۰۰ جفت بازی، لاین۱: کنترل منفی، لاین ۲و۳، نمونه‌های مثبت یرسینیا رُکری ، باند۴: کنترل مثبت.



تصویر ۲. تصویر ژل آگارز: ردیابی ژنgyrA یرسینیا رُکری با تکنیک PCR. لاین M: مارکر۱۰۰ جفت بازی، لاین‌های ۱، ۲ و ۳ : نمونه‌های مثبت ژنgyrA، لاین۴: کنترل منفی.

اکسیداز منفی و گرم منفی بوده (که این مشخصات از ویژگی‌های اولیه باکتری یرسینیا رُکری به شمار می‌رود) را جدا نموده و به محیط کشت اختصاصی یرسینیا رُکری یعنی واتمن شاتس انتقال داده شد. در این محیط نیز تعداد ۱۰ نمونه مشکوک به یرسینیا رُکری شناسایی شد که نهایتاً جهت شناسایی قطعی آنها از آزمون PCR استفاده گردید. بدین منظور در کنار سویه استاندارد یرسینیا رُکری (*Yesinia ruckeri* No:۰۴۰۸۱۱-۱/۳B) و با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدیاقدام شد که نتیجه آن شناسایی ۳ جدایه یرسینیا رُکری از بین کل نمونه‌ها بوده است (تصویر۱). مجدداً این باکتری‌ها نیز با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *gyrA* جهت ردیابی ژن مربوطه مورد آزمون PCR قرار گرفته و نتیجه آن ردیابی ژن مذکور در تمام باکتری‌هایی مورد شناسایی می‌باشد که در تصویر ۲ نشان داده شده است. در ضمن میانگین دمایی مزارع مورد بررسی بین ۱۴°C-۱۱ بوده و هر کدام سابق حداقل مصرف یک بار آنتی بیوتیک را داشته‌اند.

بحث

DNA ژیراز که از آنزیم‌های لازم در ساختار DNA باکتری‌ها به شمار می‌رود حاوی دو پروتئین به نام‌های GyrA و GyrB است که با هم تشکیل مجموعه‌ای به نام A_2B_2 را می‌دهد. ژیراز با شکستن مارپیچ DNA باعث باز شدن دو رشته DNA می‌شود به طوری که با تشکیل پله‌های ۴ بازی و گسسته شدن اتصال بین دو رشته، آنها را از هم دیگر جدا می‌نماید. اثر سمی کینولون‌ها بر روی سلول باکتری با تثبیت وضعیت گسستگی به وجود آمده در دو رشته DNA صورت می‌گیرد. چنانچه با مختل شدن عمل رونویسی در DNA باعث متوقف شدن تکثیر آن و نهایتاً از بین رفتن باکتری می‌شود (۹). با توجه به موتاسیون‌هایی که در ساختار ژن gyrA به وجود آمده و منجر به جایگزینی اسید آمینه آرژینین به جای سرین در موقعیت ۸۳ ژن gyrA شده، امکان کاهش حساسیت به کینولون‌ها برای باکتری یرسینیا رکری فراهم شده است (۶). نتیجه تغییرات ذکر شده، کاهش اثر این دسته آنتی بیوتیک‌ها در مهار باکتری یرسینیا رکری و نهایتاً کاهش کنترل بیماری یرسینیوز گردیده است. ردیابی ژن مقاوم به کینولون‌ها (gyrA) در تحقیق حاضر نیزمؤید کاهش کارایی این عوامل آنتی بیوتیکی بوده است که نیاز به بررسی بیشتر در زمینه وجود سایر عوامل مقاومت در این باکتری دارد. استان چهارمحال و بختیاری با تولید نزدیک به ۱۸ هزار تن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سال ۹۱ همچنان بالاترین میزان تولید این ماهی را در چند ساله اخیر به خود اختصاص داده است. به موازات این تولید و در راستای درمان بسیاری از بیماریهای عفونی، صاحبان مزارع پرورشی نیز متوسل به استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌های رایج به ویژه گروه کینولون‌ها (از جمله انروفلوکساسین)شده اند و متأسفانه به موازات افزایش مصرف این ضد میکروب‌ها کاهش اثر آنها در مهار بیماری مشهود است. در زمینه مطالعه بر روی عوامل مقاومت باکتریایی در نقاط مختلف دنیا کارهای زیادی صورت گرفته است که تحقیق حاضر نیز با همان دیدگاه و در راستای دستیابی به وضعیت موجود باکتری‌های بیماریزای ماهیان از منظر مقاومت یا حساسیت به برخی آنتی بیوتیک‌های پر مصرف بوده است. البته برخی کشورها در سیاست برخورد با بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی و از طریق کنترل مصرف آنتی بیوتیک‌ها، بطور جدی موفق به مهار آن شده‌اند. به طوری که در سال ۲۰۰۳ با بررسی میزان حساسیت چند پاتوژن مهم ماهیان از جمله یرسینیا رکری به انواع آنتی بیوتیک‌ها در برخی مزارع پروشی فرانسه متوجه شدند که علیرغم استفاده زیاد از آمفنیکل‌هایی نظیر کلرامفنیکل و فلورفنیکل در بین مزارع پرورشی، مقاومتی در باکتری یرسینیا رکری نسبت به آنتی بیوتیک‌های ذکر شده مشاهده نگردید (۱۲). همچنین در مار ماهیان پرورشی چند پاتوژن مقاوم به برخی آنتی بیوتیک‌ها اعم از گونه سالمونلا (*Salmonella* spp)، ویبریو کلرا (*Vibrio cholerae*) به عنوان پاتوژن‌های انسانی و ویبریوولنیفیکوس (*V.vulnificus*) سروار E به عنوان پاتوژن ماهی مورد شناسایی قرار گرفت. در گربه ماهی نیز ژن‌های مقاوم به تتراسیکیلین‌ها مورد شناسایی قرار گرفته و ذکر شده که وجود این گونه ژن‌ها باعث افزایش میزان مقاومت باکتری‌ها به عوامل آنتی بیوتیکی از جمله تتراسیکیلین‌ها می‌شود (۱۴).

طی بررسی میزان مقاومت باکتریایی به اکسی تتراسیکلین در کشور شیلی با نمونه برداری از آب، غذا وماهی میزان بالایی از مقاومت باکتریایی در نمونه‌های غذا و آب خروجی و میزان پائینی از مقاومت در نمونه‌های ورودی آب مزرعه مشاهده شد. در بین انواع باکتری‌هایی که در ماهیان یافته شد، سودوموناس فلورسنس و آئروموناس هیدورفیلا بیشترین درصد را داشته‌اند. این مطالعه حضور جمعیت مهمی از باکتری‌های مقاوم به اکسی تتراسیکلین را در میکروفلور مزارع آزاد ماهیان شیلی نشان می‌دهد. لذا محیط این مزارع ممکن است نقش مهمی به عنوان مخازن باکتری‌های حامل عوامل ژنتیکی افزایش دهنده مقاومت به تتراسیکلین را ایفا نموده و نهایتاً منجر به بروز خطرات بهداشت عمومی در مزارع به ویژه کارگران شاغل در این مزارع گردند (۱۳).

مطالعات زیادی در خصوص ارتباط بین یافته‌های به دست آمده از مقادیر مقاومت باکتریایی افزایش یافته داخل و اطراف مزارع پرورش ماهی و عوامل ضدمیکروبی استفاده شده در مزارع وجوددارد (۱۷،۱۶،۱۳،۱۰،۷،۳،۱). از آنجایی که حضور باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها تهدیدی برای بهداشت عمومی به شمار رفته و تأثیر منفی بر روی محیط زیست دارد امروزه همه توجهات به سمت تولید ترکیباتی است که این گونه اثرات سوء را نداشته باشد. با توجه به صید بی رویه ماهیان دریایی و کاهش پیش رونده جمعیت ماهیان خوراکی از یک طرف و همچنین افزایش جمعیت انسانی از طرف دیگر تقاضا بر تأمین غذاهای دریایی با احداث مزارع پرورش متراکم ماهی افزایش یافته و به موازات آن میزان مصرف آنتی بیوتیک‌ها نیز افزایش یافته است (۲۲).

متأسفانه امروزه اکثر مزارع پرورش ماهی پساب خروجی مزرعه خود را بدون هر گونه اصلاح و تصفیه‌ای وارد محیط زیست می‌نمایند و امکان آن که در این خروجی همچنان مقادیری از آنتی بیوتیک‌های مورد مصرف در درمان بیماریها وجود داشته باشد هست. مطالعات گوناگون نشان داده که ارتباط مستقیمی بین افزایش میزان مقامت باکتریایی، محیط اطراف مزارع پرورشی و استفاده از عوامل ضد میکروبی در مزارع وجود دارد (۲۰). از طرفی استفاده از داروهای ضد میکروبی در آبزی پروری در دو دهه گذشته نیز تحت نظارت دقیق بوده است که از مهمترین دلایل آن می‌توان به مسمومیت بالقوه داروها و متابولیت‌های آنها در مصرف کنندگان اشاره نمود که عموماً در این خصوص بحث حداکثر باقی مانده دارویی (MRLs) را مد نظر قرارمی‌دهند. در حال حاضر خطر انتخاب داروهای مورد استفاده برای بیماریهای آبزیان نه تنها منجر به باقی ماندن باکتری‌های بیماریزای مقاوم به داروها می‌گردد. بلکه در باکتری‌های بیماریزای انسانی نیز باعث یک نگرانی رو به افزایش شده است. به همین لحاظ استفاده از داروهای ضد

میکروبی دامپزشکی در آبزی پروری به دلایل گفته شده فوق و همچنین اثر سوء بر روی افراد دارای ضعف ایمنی محدود شده است. حتی در کشوری مثل آمریکا استفاده از برخی داروها مثل فلورکینولون‌ها در حیواناتی که منشأ غذایی برای انسان دارند ممنوع شده است. لذا در انتخاب داروی ضد میکروبی مناسب در بیماریهای ماهی بایستی دقت زیادی به عمل آورد و پیشنهاد می‌گردد که از داروهایی که دارای حداقل میزان باقی ماندگی باشند استفاده نمود (۸). متعاقباً علام گزارشات متعددی از افزایش محسوس مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در میان باکتری‌ها در سال‌های اخیر وپیامدهای احتمالی آن برای بهداشت عمومی جامعه، در بسیاری از کشورها مقررات نظارت بر مقاومت آنتی بیوتیکی تشدید شده است. همچنین طی بررسی سیستم‌های تولید چندگانه ماهی، طیور وکشاورزی (Integrated fish farming) افزایش میزان مقاومت باکتری‌ها به عوامل آنتی بیوتیکی بعد از استفاده کود مرغی در آب استخر (به منظور غنی سازی آب) مشاهده گردید (۱۵). بحث مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در زمینه آبزی پروری از دو نگاه درمانی و زیست محیطی قابل بررسی است. به طوری که خیلی از داروهای ضد میکروبی طی عملیات درمان بیماریهای باکتریایی وارد محیط زیست نیز می‌گردند. به دلیل پیچیدگی محیط زیست ارزیابی تأثیر این مواد برروی میکروفلور ساکن در آن محیطها مشکل است. اما الگوی مقاومت باکتریایی پاتوژن‌های ماهی اغلب نشان دهنده استفاده شدید از ترکیبات ضد میکروبی است. برخی از محققین در زمینه بروز و تداوم مقاومت آنتی بیوتیکی در ماهیان پرورشی به ویژه آزاد ماهیان تلاش‌های زیادی کرده‌اند (۲).

روند رو به رشد تولید آبزیان به ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشورمان و وجود شرایط بالقوه برای پرورش این ماهی باعث شده که این ماهی حجم بالایی از تولید پرورشی آبزیان را در کشورمان به خود اختصاص دهد اما متأسفانه در راستای این افزایش تراکم و به دلیل شیوع برخی بیماریهای عفونی، مزرعه داران از انواع آنتی بیوتیک‌ها جهت کنترل و درمان آنها استفاده نموده که یکی از این ترکیبات ضد میکروب گروه کینولون‌ها همچون انروفلوکساسین بوده است که علاوه مشکلات باقی ماندگی دارو در بافت‌های ماهی و همچنین رها شدن آنها در محیط زیست و در معرض خطر قرار دادن موجودات زنده موجود در اکوسیستم رودخانه‌ها یا احیاناً مزارعی که مجدداً از این پساب به عنوان منبع آبی خود استفاده می‌کنند، مشکل بحث برانگیز افزایش مقاومت باکتری‌های بیماریزای ماهی به این آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد که با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق لزوم توجه هر چه بیشتر به سیاست‌گذاری بهداشت و درمان مزارع پرورش ماهی از سوی مراجع زیربط و همچنین محققین دانشگاهی احساس می‌شود که نگارندگان این پژوهش پیشنهاد ارائه نظام سلامت و مدیریت بهداشتی مزارع اعم از نظارت بر انتقال تخم و بچه ماهی در مزارع، رعایت پروتکل قرنطینه و ارزیابی ماهانه مزارع، تجویز واکسن‌های به دست آمده از سویه‌های بومی یرسینیا رکری، توجه جدی به خروج پساب‌ها، رعایت فاصله دقیق بین مزارع، صدور گواهی بهداشتی برای مزارع پرورشی و تکثیر و همچنین ترویج استفاده از ترکیبات ایمنی‌زا اعم از پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها را می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام گرفت بدین وسیله از کارشناسان محترم این مرکز تشکر می‌گردد.

References

1. Austin, B., Austin, D.A. (2007) Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. (4th ed.). Springer Praxis. New york, USA.
2. Bruun, M.S., Schmidt, A.S., Madsen, L., Dalsgaar, I. (2000) Antimicrobialresistancepatterns in danish isolates of flavobacterium psychrophilum. Aquaculture.187: 201-212.
3. Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G., Banat, I.M. (2003) Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. Aquaculture. 219: 83-97.
4. Delcero, A., Marquez, I., Guijarro, J.A. (2002) Simultaneous detection of *Aeromonassalmonicida*, *Flavobacteriumpsychrophilum*, and *Yersinia ruckeri,* three major fish pathogen, by Multiplex PCR, Appl Environ Microbiol. 68: 5177-5180.
5. De Grandis, S.A., Stevenson, R.W. (1985) Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*, antimicroba gents chemother. 27: 938-942.
6. Gibello, A., Porrero, M.C., Blanco, M.M., Vela, A.I., Liebana, P., Moreno, M.A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Dominguez. L. (2004) Analysis of the *gyrA* gyrA gene of clinical *Yersinia ruckeri* isolates with reduced susceptibility to quinolones. Appl Environ Microbiol. 70: 599-602.
7. Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Raffatellu, M., Olsen, J.E. (2000) Increasein the prevalence of oxolinic acid resistant Acinetobacter spp. ob-

served in astream receiving the effluent from a freshwater trout farm following treatmentwith oxolinic acid-medicated feed. Aquaculture. 188: 205-218.

8. Gustafson, R.H., Bowen, R.E. (1997) Antibiotic use in animalagriculture. J Appl Microbiol. 83: 531-541.
9. Heddle, J.G., Barnard, F.M., Wentzell, L.M., Maxwell, A. (2000)The interaction of drugs with DNA gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. Nucleos Nucleot Nucl. 19: 1249-1264.
10. Herwig, R.P., Gray, J.P., Weston, D.P. (1997) Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. Aquaculture. 149: 263-283.
11. Huang, M.B., Baker, C.N., Banerjee, S., Tenover F.C. (1992) Accuracy ofthe E-test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejuni* and *Gramnegativebacteria* resistant to antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 30: 3243-3248.
12. Michel, C., Kerouault, B., Martin, C. (2003) Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France:comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. J Appl Microbiol. 95: 1008-15.
13. Miranda, C.D., Zemelman, R. (2002) Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. Aquaculture. 212: 31-47.
14. Nawaz, M., Khan, A.A., Khan, S., Sung, K., Kerdahi, K., Steele, R. (2009)Molecular characterization of tetracycline-resistant genes and integrons from avirulent strains of *Escherichia coli* isolated from catfish. Foodborne Pathog Dis. 6: 553-9.
15. Petersen, A., Andersen, J.S., Kaewmak, T., Somsiri, T., Dalsgaard, A. (2002) Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. Appl Environ Microbiol. 68: 6036-42.
16. Qin, Z., Baker, A.T., Raab, A., Huang, S., Wang, T., Yu, Y., Jaspars, M., Secombes, C.J., Deng, H. (2013) The Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Produces Holomycin and Uses an RNA Methyltransferase for Self-resistance. J Biol Chem. 288: 14688-14697.
17. Rodgers, C.J. (2001) Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. Aquaculture. 196: 325-345.
18. Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L. (2000) Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. Appl Environ Microbiol. 66: 4908-4915.
19. Shah, S.Q.A., Karatas, S., Nilsen, H., Steinum, T.M., Colquhoun, D.J., Sørum, H. (2012) Characterization and expression of the *gyrA* gene from quinolone resistant *Yersinia ruckeri* strains isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. Aquaculture. 350: 37-41.
20. Smith, P., Donlon, J., Coyne, R., Cazabon, D. (1994) Fate ofoxytetracycline in a freshwater fish farm: influence of effluenttreatment systems. Aquaculture. 120: 319-325.
21. Soltani, M. (2012) Salmonid Diseases. (2nd ed.) University of Tehran press, Tehran, Iran.
22. Wassenaar, T.M. (2005) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implications for human health. Crit Rev Microbiol. 31:155-69.

Molecular detection of quinolone resistance gene (gyrA) in *Yersinia ruckeri* isolates by PCR test

Fadaeifard, F.[1*], Nahid, Sh.[2], Momeni Shahraki, M.[3]

[1]*Department of Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran*

[2]*Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran*

[3]*Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord -Iran*

(Received 19 December 2015, Accepted 13 February 2016)

Abstract:

BACKGROUND: *Yersinia ruckeri* is the etiological agent of enteric red mouth (ERM) or yersinioisis disease, one of the important bacterial diseases in the cultured salmonids. **OBJECTIVES:** The purpose of present study was detection of gyrA gene (quinolone resistance) in the *Y. ruckeri* bacterium. **METHODS:** In this study fish were evaluated in average size 8-12 cm from six rainbow trout farms in Chahar Mahal va Bakhtiyari province (Iran). In each farm 10 fish (totally 60) suspected to yersinioisis were randomly selected; sampling was done from lower part of intestine and cultured on Trpticase Soy Agar (TSA). The mediums were transferred to incubator and kept at 22 °C for 48 hours. Pure colonies which are grown on the mediums were tested by catalase, oxidase and gram staining, then those of gram-negative, catalase positive and oxidase negative were diagnosed, and cultured on Waltman- Shots medium (as specific medium for *Y. ruckeri*). These mediums were incubated at 22 °C for 48 h. Colonies that were grown were tested by PCR method for *Y.ruckeri* detection. Then, in the identified strains of *Y.ruckeri* gyrA gene were detected by PCR test. **RESULTS:** The results of bacteriological, biochemical and molecular tests showed that three cases out of total isolates were identified as *Y. ruckeri*. In all isolates of *Y. ruckeri*, gyrA gene was identified by molecular test. **CONCLUSIONS:** Identification of quinolone resistance gene in *Y. ruckeri* isolates can be the reason of low efficacy of these classes of antibiotics in the aquaculture. Therefore, the policy of treatment should be changed specially in enteric red mouth disease.

Keyword: bacterial resistance, gyrA, PCR, rainbow trout, *Yersinia ruckeri*

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Gel electrophoresis results: detection of 16SrRNAgene of *Yersinia ruckeri* by PCR test, lane M: 100 bp DNA ladder, lane 1: negative control, lane 2, 3: *Yersinia ruckeri* positives, lane 4: positive control.

Figure 2. Gel electrophoresis results: detection of gyrA gene of *Yersinia ruckeri* by PCR test, lane M: 100 bp DNA ladder, lane 1, 2, 3: gyrA positives, lane 4: negative control.

***Corresponding author's email: Fadaeifard@gmail.com, Tel: 038-33361045, Fax: 038-33361045**