

جداسازی و شناسایی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مولد انتروتوکسین از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

- **مسعود حسین زاده:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، صندوق پستی: ۹۶۹
- **امیر توکمه‌چی*:** گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی آبزیان، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۶۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

چکیده

بیماری‌های عفونی یکی از عوامل مهم خسارات اقتصادی در صنعت پرورش آبزیان محسوب می‌شوند. در بین بیماری‌های عفونی آبزیان باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از عوامل بیماری‌زای مهم بوده که به‌طور اولیه سبب عفونت زخم و به‌طور ثانویه سبب بروز مشکلات عفونی به‌دنبال تغییر دما، دستکاری و پائین بودن کیفیت آب پرورشی آبزیان می‌گردد. در این بررسی تعداد شش سویه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از ماهی کپور معمولی بیمار از ده مزرعه پرورشی آذربایجان غربی جداسازی و براساس خواص فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وجود ژن مولد انتروتوکسین با سویه استاندارد مقایسه شدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که هیچ‌گونه تفاوت فنوتیپی و ژنتیکی بین این شش سویه با یکدیگر و با سویه استاندارد وجود ندارد. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که این شش سویه از نظر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با یکدیگر متفاوت بوده و بیش‌ترین و کم‌ترین مقاومت به‌ترتیب نسبت به انروفلوکساسین و سولفامتوکسازول وجود دارد. براساس اطلاعات به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپور معمولی آذربایجان غربی دارای ژن مولد انتروتوکسین و مقاومت در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد.

کلمات کلیدی: *آئروموناس هیدروفیلا*، ژن مولد انتروتوکسین، کپور معمولی



مقدمه

در ایران فراورده‌های شیلاتی یکی از محصولات مهم غذایی برای انسان به‌شمار می‌روند. فراورده‌های شیلاتی به سادگی و به راحتی می‌توانند به انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زا آلوده شوند. توزیع و فراوانی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در اکوسیستم آبی به خوبی اثبات شده و مشخص شده است این باکتری بخشی از فلور روده آبزیان می‌باشد که می‌تواند به هنگام ایجاد تنش بیماری‌زا گردد (Yogananth و همکاران، ۲۰۰۹).

آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری همه‌جایی، فرصت‌طلب، گرم منفی، میله‌ای شکل، به‌طور عمده متحرک، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز مثبت و تخمیر کننده گلوکز است (Yousr و همکاران، ۲۰۰۷). این باکتری سبب آلودگی زخم‌ها، عفونت خون و گاستروانتریت با منشاء آب و غذا در انسان می‌گردد (Ormen و همکاران، ۲۰۰۵). هم‌چنین نوعی از عوامل حدت و توکسین‌ها در این باکتری‌ها شناسایی شده‌اند. مطالعات نشان داده است که برخی از سویه‌ها با هجوم به لایه مخاطی روده‌ها سبب گاستروانتریت می‌شوند درحالی‌که سایر سویه‌ها از طریق تولید آئرولیزین باعث به‌وجود آمدن این عارضه در انسان می‌گردند (Lu و Chu، ۲۰۰۵). به‌طور کلی باکتری‌های جنس *آئروموناس* از طریق تولید سموم خارجی نظیر انتروتوکسین، همولیزین (آئرولیزین)، لیپاز و پروتئاز سبب بروز بیماری می‌گردند (Yogananth و همکاران، ۲۰۰۹).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که امروزه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* را می‌توان از ماهیان مختلفی جدا کرد، برای مثال Noor Al Deen و همکاران (۲۰۱۴) توانستند از ۴۰ نمونه ماهی پرورشی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تعداد ۱۰ سویه *آئروموناس هیدروفیلا* را در منطقه کفرالشیخ جدا نمایند. این محققان میزان شیوع سپتی سمی ناشی از این باکتری را ۲۵ درصد ارزیابی کرده و عمده‌ترین علائم بالینی را که توصیف کردند شامل از دست رفتن هوشیاری، آب آوردگی شکم، تیرگی پوست، بیرون زدگی چشم و زخم‌های پوستی بود. هم‌چنین Jayavignesh و همکاران (۲۰۱۱) توانستند این باکتری را از گربه‌ماهی دارای علائم بالینی سپتی سمی جدا نمایند، بررسی‌های تعیین حساسیت میکروبی سویه جدا شده توسط این محققان، نشان‌دهنده وجود مقاومت دارویی چند گانه در *آئروموناس هیدروفیلا* بود، طوری‌که بیش‌ترین مقاومت دارویی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کلیندامایسین، اریترومایسین، اکسی‌تتراسایکلین و استریتومایسین بود. Ahmad و همکاران (۲۰۱۳) توانستند در یک همه‌گیری باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

را از تعدادی کپورماهیان آب‌شیرین شامل کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*)، کپور کاتلا (*Catla catla*)، کپور روهو (*Labeo rohita*) و مریگال (*Cirrhinus mrigala*) جدا نمایند. در مطالعه دیگری Cuma و همکاران (۲۰۱۰) نیز توانستند در یک سپتی سمی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* را از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) جدا نمایند. این پژوهشگران توانستند وجود ژن‌های عامل حدت آئرولیزین و همولیزین را در سویه جداسازی شده به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز مشخص نمایند. آلوده شدن ماهی کپور معمولی به این باکتری علاوه بر ایجاد خسارات اقتصادی در صنعت آبزی‌پروری می‌تواند سبب بروز مشکلات بهداشتی در جامعه گردد. با توجه به همه‌جایی بودن باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و نیز توانایی آن در سازگاری با شرایط نامساعد به‌نظر می‌رسد باید بین سویه‌هایی که از موارد بالینی جدا می‌شوند تفاوت فنوتیپی، ژنتیکی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود داشته باشد (Yousr و همکاران، ۲۰۰۷). در ادامه برای تولید واکنش یا طراحی کیت‌های تشخیصی بیماری‌های با منشاء آب و غذا لازم است اطلاعات پایه‌ای از سویه‌های موجود در نقاط مختلف کشور وجود داشته باشد.

هدف اصلی این بررسی عبارت بود از شناسایی سویه‌های جدا شده از ماهی کپور معمولی که توانایی تولید سم انتروتوکسین را دارند. هم‌چنین در این مطالعه خواص فیزیکی، بیوشیمیایی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمامی جدایه‌ها با یکدیگر و با سویه استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جداسازی و شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* از ماهی کپور معمولی: در خرداد تا شهریور ماه سال ۱۳۹۲ تعداد ۵۰ نمونه ماهی از ده مزرعه پرورشی آذربایجان غربی جمع‌آوری و در کنار یخ و در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروب شناسی پژوهشکده آرتمیما و آبزیان، دانشگاه ارومیه منتقل شدند. بلافاصله سطح بدن ماهیان با اتانل ۷۰ درجه شستشو شده و کبد، طحال و کلیه آن‌ها در شرایط استریل از محوطه شکمی جداسازی و دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند. سپس به کمک دستگاه هموژنیزاتور بافتی اندام‌ها هموژن شده و بخش همگن شده بر روی محیط BHIA (آگار مغز و قلب) کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. پس از دو روز پرگنه‌های رشد یافته مجدداً بر روی محیط کشت BHIA پاسباز داده شدند. سپس باکتری‌های اکسیداز مثبت، متحرک و



تأیید جنس و گونه جدایه‌ها به کمک PCR و شناسایی ژن مولد انتروتوکسین: در این تحقیق از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز براساس آغازگرهای ژن هدف 16s rRNA برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد. هم‌چنین با این تکنیک وجود ژن مولد انتروتوکسین براساس روش Balsalobre و همکاران (۲۰۰۹) در جدایه‌های تأیید شده مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به توضیح است که پرایمرهای رفت و برگشت برای ژن‌های 16s rRNA و انتروتوکسین در جدول ۱ اشاره شده است.

تخمیرکننده گلوکز به‌عنوان *آئروموناس* انتخاب و مورد شناسایی دقیق‌تر قرار گرفتند.

شناسایی جدایه‌ها براساس تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی: در این بررسی برای شناسایی باکتری‌های جدا شده تست‌های تولید H_2S ، اوره‌آز، تولید گاز اندول، ذوب ژلاتین، احیای سیترات، رشد بر روی محیط مک‌کانکی، تحرک، احیای نیترات و تخمیر کربوهیدرات‌هایی نظیر گلوکز، مانیتول، اینوزیتول، سوربیتول، رامنوز، سوکرز، ملیبیوز و آرابینوز استفاده شد (Yousf و همکاران، ۲۰۰۷).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای تکثیر ژن‌های 16 S rRNA و انتروتوکسین

نام پرایمر	آغازگر	توالی	طول (جفت باز)	منبع
انتروتوکسین	رفت	5'-CGCCAACGGCGATCTCATT-3'	۱۹۱۱	کد دسترسی AF419157 از بانک ژنی
	برگشت	5'-TTTACCCGACGGGGTTTG-3'		
16 S rRNA	رفت	5'-AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	۱۲۰۰	Sakar و همکاران (۲۰۰۷)
	برگشت	5'-GGTTAC CTT GTT ACG ACT T-3'		

تعیین حساسیت میکروبی: در این بررسی برای تعیین حساسیت میکروبی جدایه‌ها از روش انتشار دیسک استفاده شد (Bauer و همکاران، ۱۹۶۶). برای این منظور ابتدا از کشت تازه همه جدایه‌ها به‌همراه سویه استاندارد به‌صورت کشت چمنی بر روی محیط کشت مولر آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. هم‌چنین دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل انروفلوکساسین، فلورفینیکول، جنتامایسین، اکسی‌تتراسیکلین، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، تریمتوپریم و سلفامتوکسازول از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت تفسیر حساسیت، مقاومت و منطقه مهار رشد همه سویه‌ها براساس روش استاندارد (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute (Laboratory Standards Institute) قضاوت شد (CLSI، ۲۰۰۹).

به‌طور خلاصه، ابتدا کلنی خالص و ۲۴ ساعته هر سویه به‌طور جداگانه به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شده و به مدت ۱۰ جوشانده شدند. سپس تمامی لوله‌ها با دور ۱۰۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اجزاء سلولی رسوب کنند، سپس محلول رویی که حاوی DNA ژنومی بود به میکروتیوب تازه منتقل شد. مخلوط واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر واکنش، ۱۰ نانومول از dNTP ها، ۱۰ نانومول از هر پرایمر، ۲/۵ واحد پلی‌مراز (فرمنتاز) و ۲۰ نانوگرم DNA مکمل بود. PCR به‌کمک ترمال سایکلر (اپندرف، آلمان) شامل سیکل‌های زیر انجام گرفت: گرمایش اولیه ۹۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه به‌دنبال آن ۳۵ دوره شامل ۹۵ درجه به‌مدت دو دقیقه، ۵۵ درجه به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه در خاتمه ۷۲ درجه به‌مدت ۷ دقیقه محصولات PCR به‌کمک الکتروفورز ژل ۱/۵ و ۱/۸ درصدی آگارز در بافر TBE مورد بررسی قرار گرفتند. ژل الکتروفورز به‌کمک رنگ سیف DNA (رد سیف، ژن راد) و نور فرابنفش مشاهده گردید.

نتایج

بررسی‌های باکتری‌شناسی نشان داد که باکتری‌های جدا شده به‌صورت گرم منفی و میله‌ای شکل بوده و نتایج مربوط به تست‌های بیوشیمیایی آن‌ها در جدول ۲ اشاره شده است.

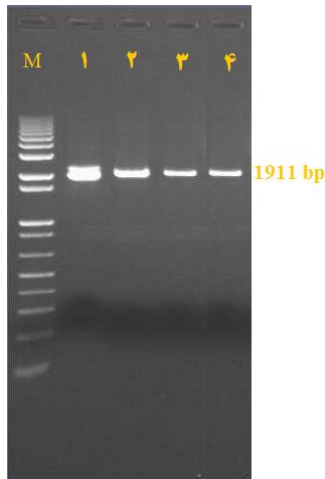
جدول ۲: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپور معمولی

رنگ آمیزی گرم	مورفولوژی	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اکسیداسیون و تخمیر	احیاء نیترات	تولید گاز اندول	تولید دی سولفید هیدروژن	ذوب ژلاتین	تخمیر گلوکز
گرم منفی	میله‌ای	مثبت	مثبت	مثبت	تخمیر	مثبت	منفی	منفی	مثبت	مثبت

یافته‌های مربوط به تأیید گونه‌ها براساس تقویت ژن 16s rRNA در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از انجام

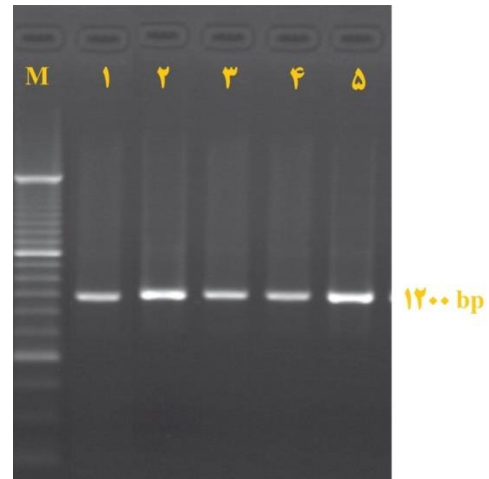


نشان داد که این ژن در همه آن‌ها وجود داشته و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آن باندی با اندازه ۱۹۱۱ جفت باز می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: تصویر الکتروفورز ژن انتروتوکسین باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از ژل ۱/۸ درصد آگارز. M: مارکر مولکولی به وزن یک کیلو جفت باز، ۱ تا ۴ سویه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپور معمولی دارای ژن انتروتوکسین

همان‌طور که مشاهده می‌شود تمامی جدایه‌ها به‌طور مثبتی *آئروموناس هیدروفیلا* تشخیص داده شده‌اند. هم‌چنین نتایج مربوط به بررسی وجود ژن انتروتوکسین در هر شش جدایه



شکل ۱: تصویر الکتروفورز ژن *16s rRNA* باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز. M: مارکر مولکولی به وزن یک کیلو جفت باز، ۱ تا ۴ سویه *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپور معمولی و ۵: سویه استاندارد *آئروموناس هیدروفیلا*

بحث

آئروموناس هیدروفیلا به‌طور معمول ساکن آب‌های شور بوده و می‌تواند سبب ایجاد بیماری در موجودات آبی، خشک‌زی و حتی انسان گردد. این باکتری یکی از عوامل مهم بیماری‌زا در سیستم‌های پرورشی ماهیان گرم‌آبی به‌شمار می‌رود و می‌تواند سبب سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده مشابه سایر باکتری‌های گرم منفی شود. در مطالعه حاضر نیز علائم خونریزی در اطراف پوزه، باله‌های سینه‌ای و سوراخ دفعی ماهیان کپور مشاهده گردید. بررسی‌های کالبد گشایی وجود خونریزی در محوطه شکمی، کم رنگ شدن کبد و تورم آن را ثابت کرد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که مواجه شدن آبزیان با شرایط تنش‌زا می‌تواند آن‌ها را در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* مستعد سازد، که در این حالت زخم‌های جلدی توام با مرگ و میر مشاهده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد تغییرات اسیدیته، دما و کیفیت آب، هم‌چنین تراکم، دستکاری و میزان اکسیژن محلول آب می‌تواند شرایط را برای شیوع بیماری مستعد نمایند (Casiano و همکاران، ۲۰۱۰). یکی از روش‌های مطمئن و قابل اعتماد جهت تأیید جنس و گونه باکتری‌ها واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌باشد. در بررسی حاضر نیز پس از شناسایی اولیه سویه‌های جدا شده از ماهی

نتایج مربوط به بررسی تعیین حساسیت میکروبی نیز در جدول ۳ آورده شده است. براساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت مشخصی از نظر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین این شش سویه وجود دارد. بررسی تعیین حساسیت میکروبی ثابت کرد که بیش‌ترین میزان مقاومت در برابر انروفلوکساسین و کم‌ترین آن نسبت به سولفامتوکسازول وجود دارد.

جدول ۳: نتایج مربوط به بررسی تعیین حساسیت میکروبی

سویه‌های جدا شده <i>آئروموناس هیدروفیلا</i>	حساسیت (درصد)	آنتی‌بیوتیک
انروفلوکساسین	۹۳/۲۲	
فلورفنیکول	۸۹/۱۲	
استرپتومایسین	۴۳/۰۶	
سیپروفلوکساسین	۸۴/۱۱	
جنتامایسین	۵۹/۲۱	
اکسی‌تتراسیکلین	۵۹/۴۴	
اریترومایسین	۳۴/۷۱	
تریمتوپریم	۲۴/۱۲	
سولفامتوکسازول	۲۱/۳۴	

خواهد بود (Chopra و همکاران، ۲۰۰۰). در بررسی حاضر پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده، اختصاص به ژن act داشته و این نشان می‌دهد که ژن مورد نظر در هر شش جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* وجود دارد. همان‌طور که ذکر شد با توجه به نقشی که انتروتوکسین بیان شده توسط ژن act در ایجاد اسهال انسان خونی دارد، می‌تواند زنگ خطری برای سلامت و بهداشت جامعه محسوب شود.

Yours و همکاران (۲۰۰۷) اظهار داشتند که جستجوی توکسین‌های سلول کش و همولیزین به‌عنوان عوامل حدت یکی از مفیدترین روش‌های تشخیص و شناسایی *آئروموناس هیدروفیلا* محسوب می‌شوند. مطالعات بسیاری ثابت کردند که این باکتری دارای چهره‌های بالینی مختلف بوده که از التهاب معده و روده گرفته تا عفونت زخم را شامل می‌شود، در همه موارد نیز سویه‌های درگیر دارای انتروتوکسین بودند. در مطالعه حاضر نیز سویه‌هایی که از کیور معمولی جدا شدند دارای ژن انتروتوکسین بودند. نتایج الکتروفورز محصولات این ژن بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد نشان‌دهنده وجود باندی به اندازه ۱۹۱۱ جفت باز بود که با یافته‌های به‌دست آمده توسط Yours و همکاران (۲۰۰۷) هم‌خوانی دارد. با توجه به نقش مهمی که آبزیان در سبب غذایی انسان دارند، بدون شک ایجاد اسهال خونی ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* دور از انتظار نمی‌باشد. بر این اساس افرادی که در تماس آبزیان هستند به‌خصوص ماهیانی که در سیستم‌های گرم آبی پرورش داده می‌شوند نظیر ماهی کیور معمولی، پرورش دهندگان، دامپزشکان و در نهایت مصرف‌کنندگان در معرض خطر ابتلا به اسهال خونی ناشی از این باکتری قرار دارند. در این راستا رسالت اصلی این پژوهش ارتقاء سطح آگاهی شهروندان و متولیان بهداشتی بوده تا هرچه بیش‌تر با خطرات و عواقب این عامل بیماری‌زا آشنا شوند.

بنابراین لازم است تلاش‌های چشمگیری در جهت کاهش میزان آلودگی با این باکتری به عمل آید. در این زمینه توصیه می‌شود نظارت بهداشتی دقیق‌تری بر تولید و عرضه ماهیان به خصوص ماهیان گرم آبی صورت گیرد. امروزه استفاده از روش‌های نوین در پرورش آبزیان در بسیاری از نقاط دنیا مرسوم شده که همگی در راستای افزایش تولید و بهبود سطح سلامتی آبزیان هستند، از جمله این روش‌ها می‌توان به استفاده از پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها اشاره کرد. در واقع پروبیوتیک‌ها موجوداتی هستند نظیر باکتری‌ها و قارچ‌ها یا فراورده‌های آن‌ها که از طریق ایجاد تعادل در محیط روده اثرات مفیدی بر سلامتی مصرف‌کننده دارند. پریبیوتیک‌ها نیز به نوبه خود ترکیباتی هستند از

کیور معمولی از روش PCR برای تأیید جنس و گونه جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده شد. در این راستا با تقویت ژن 16s rRNA در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز سویه‌های جدا شده شناسایی شدند چون این ژن به شدت محافظت شده طوری که در طول زمان جهش در آن اتفاق نمی‌افتد. به‌طور مشابه نیز Sarkar و همکاران (۲۰۱۲) از ژن 16s rRNA برای تأیید جنس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده کردند، نتایج به‌دست آمده از تحقیقات این محققان موافق یافته‌های به‌دست آمده در این بررسی بود. در واقع الکتروفورز محصولات پلی‌مرز این ژن در ژل آگارز ۱/۵ درصد باندی به اندازه ۱۲۰۰ جفت باز تولید کرد. در بررسی حاضر تعداد شش جدایه از باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از ۱۰ مزرعه پرورشی ماهی کیور معمولی جدا شد. سویه‌های جدا شده نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم بوده طوری که اریترومیسین، تریمتوپریم و سولفاکتوکسازول از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی بوده که مقاومت در مورد آن‌ها مشاهده شد. به‌طور مشابه Laith و Najiah (۲۰۱۳) وجود مقاومت دارویی را در *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) را ثابت کردند. نتایج بررسی این دو محقق نشان داد که آمپی‌سیلین و کلستین داروهای هستند که مقاومت در مورد آن‌ها در سویه جدا شده وجود دارد. همچنین نتایج هر دو بررسی نشان داد که اتروفلوکسازین دارویی است که مقاومت در برابر آن در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کم‌تر است. بررسی انجام شده توسط Sha و همکاران (۲۰۰۲) رابطه اسهال ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* دارای ژن انتروتوکسین در انسان را ثابت کرد. همچنین این پژوهشگران توانستند ثابت کنند که سویه‌های مولد این ژن عامل اصلی اسهال خونی در انسان محسوب می‌شوند. مطالعاتی که توسط Asao و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد نشان می‌دهد انتروتوکسین سیتوتوکسیک عامل اصلی اسهال خونی بوده و در تحقیقات جدیدتر چندین نوع از این سم در *آئروموناس هیدروفیلا* مشخص نمود که هر کدام توسط ژن‌های جداگانه‌ای بیان می‌شوند. از جمله این ژن‌ها باید به act، alt و ast اشاره نمود که در بین این سه نوع، ژن act مهم‌تر از بقیه می‌باشد.

انتروتوکسین‌های *آئروموناس هیدروفیلا* مشابه همولیزین سبب ایجاد منافذی در سلول‌های پوششی روده انسان و سایر موجودات می‌شوند. علاوه بر این انتروتوکسین‌ها سبب فعال شدن سیتوکین‌های پیش التهابی و آیشار ایکوزانوئیدی در ماکروفاژها و سلول‌های پوششی دیواره روده می‌شوند، نتیجه این اتفاق آسیب سلولی و افزایش تراوش سلولی



5. **Bauer, A.W.; Kirby, M.M.; Sherris, J.C. and Truck, M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 45, pp: 493-6.
 6. **Casiano, H.; Choresca, J.R.; Dennis, K.; Jee-Eun Han, G.; Sang-Phil, S.; Ji-Hyung, K.; Jin-Woo, J. and Se-Chang, P., 2010.** Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* isolated from albino catfish, *Clarias sp.* reared in an indoor commercial aquarium. Korean J. of Veterinary Research. Vol. 50, No. 4, pp: 331-333.
 7. **Chopra, A.K.; Xu, D.; Ribardo, M.; Gonzalez, K.; Kuhl, J.; Peterson, W. and Houston, C.W., 2000.** The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. Infection and Immunity. Vol. 68, pp: 2808-2818.
 8. **Chu, W.H. and Lu, C.P., 2005.** Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Journal of Fish Diseases. Vol. 28, pp: 437-441.
 9. **Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2009.** Document M39-A3. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline. 3th Edition. CLSI, 940 p.
 10. **Jayavignesh, V.; Sendesh Kannan, K. and Bhat, A.D., 2011.** Biochemical characterization and cytotoxicity of the *Aeromonas hydrophila* isolated from Catfish. Arch. Appl. Sci. Res. Vol. 3, No. 3, pp: 85-93.
 11. **Laith, A.R. and Najiah, M. 2013.** *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial Susceptibility and Histopathology of Isolates from Diseased Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture Research and Development. Vol. 5, No. 2, pp: 215-222.
 12. **Noor El Deen, A.E.; Dorgham, S.M.; Hassan A.H.M. and Hakim, A.S., 2014.** Studies on *Aeromonas hydrophila* in Cultured *Oreochromis niloticus* at Kafr El Sheikh Governorate, Egypt with Reference to Histopathological Alterations in Some Vital Organs. World Journal of Fish and Marine Sciences. Vol. 6, No. 3, pp: 233-240.
 13. **Ormen, O.; Granum, P.E.; Lassen, J. and Figueras, M.J., 2005.** Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. APMIS. Vol. 113, pp: 203-207.
 14. **Sarkar, A.; Saha, M. and Roy, P., 2012.** Identification and Typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR Fingerprinting. Aquaculture Research and Development. Vol. 3, No. 6, pp: 146-149.
 15. **Sha, J.; Koslova, E. and Chopra, A., 2002.** Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila* induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. Infection and Immunity. Vol. 70, pp: 1924-1935.
 16. **Uma, A.; Rebecca, G.; Meena, S. and Saravanabava, K., 2010.** PCR Detection of putative aerolysin and hemolysin genes in an *Aeromonas hydrophila* isolate from infected Koi carp (*Cyprinus carpio*). Tamilnadu Journal Veterinary and Animal Sciences. Vol. 6, No. 1, pp: 31-33.
 17. **Yogananth, N.; Bhagyaraj, R.; Chanthuru, A.; Anbalagan, T. and Nila, K.M., 2009.** Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. Vol., 4, pp: 51-53.
 18. **Yousr, A.H.; Napis, S.; Rusul, G.R.A. and Son, R., 2007.** Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. ASEAN Food Journal. Vol. 14, No. 2, pp: 115-122.
- دسته کربوهیدرات‌ها که تاثیر مشابهی بر سلامتی دارند. از روش‌های نوین دیگری که می‌تواند به محدود نمودن جمعیت باکتری در آب کمک نماید باکتریوفازها هستند. خوشبختانه در حال حاضر مطالعات بسیاری پیرامون استفاده درمانی و پیشگیرانه از باکتریوفازها برای عوامل بیماری‌زای باکتریایی وجود دارد. همه این روش‌ها علاوه بر کمک در جهت پیشگیری و درمان می‌توانند به نوبه خود مصرف داروهای ضد میکروبی را کاهش دهند. همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد سویه‌های جدا شده *آئروموناس هیدروفیلا* درجات متفاوتی از مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج را نشان می‌دهند. این می‌تواند ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط پرورش‌دهندگان و عدم انجام آزمایش‌های تعیین حساسیت میکروبی باشد. مصرف طولانی مدت و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها علی‌رغم ایجاد مشکلات بهداشتی و زیست محیطی نظیر باقی‌مانده‌های دارویی می‌تواند در به‌وجود آمدن سویه‌های نوظهور مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها موثر باشد.
- براساس یافته‌های به‌دست آمده از این تحقیق نتیجه‌گیری می‌شود که باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* عامل ایجاد سپتیسمی کشنده در ماهیان کپور بوده و این جدایه‌ها دارای ژن انتروتوکسین می‌باشند. هم‌چنین می‌توان گفت در صورت ورود باکتری با زنجیره غذایی انسان از طریق ماهیان آلوده خطر ابتلا انسان به اسهال خونی ناشی از این باکتری وجود دارد. از طرف دیگر می‌توان نتیجه گرفت که مصرف بدون ضوابط آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزبان پرورشی سبب به‌وجود آمدن سویه‌های مقاوم در *آئروموناس هیدروفیلا* شده است.

منابع

1. **Ahamad, B.; Punniamurthy, D.; Senthil Kumar, N.; Malmarugan, V.; Suresh, S.; Ranganathan, R.V and Purushothaman, V., 2013.** Outbreak of Bacterial Haemorrhagic Septicaemia in Fresh Water Carps in
2. **Asao, T.; Kinoshita, Y.; Kozaki, S.; Uemura, T. and Sakaguchi, G., 1984.** Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysine. Infection and Immunity. Vol. 46, pp: 122-127.
3. **Balsalobre, L.C.; Dropa, M.; Matte, G.R. and Matte, M.H., 2009.** Molecular detection of enterotoxin in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. Journal of Water and Health. Vol. 7 pp: 685-691.
4. **Basheer Ahamad, D.; Punniamurthy, N.; Senthil Kumar, V.; Malmarugan, S.; Suresh, R.; Ranganathan, V. and Purushothaman, V., 2013.** Outbreak of Bacterial Haemorrhagic Septicaemia in Fresh Water Carps in Thanjavur Region of Tamil Nadu. Supplement to Advanced Biological Technique. Vol. 12, No. 7, pp: 12-15.

