



مروری بر مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌زایی باکتری *Aeromonas hydrophila* در آبریان و چگونگی عملکرد آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در مقابله با آن

سمیه پاک روان^{*}، آرش اکبرزاده

گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

نوع مقاله:	چکیده
مروری	آئروموناس هیدروفیلا <i>Aeromonas hydrophila</i> یکی از معمول‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در آبریان است و شیوع آن باعث کاهش محصولات آبی پروری می‌شود. بیماری آئروموناسی به دلیل ترشح نوعی پروتئین سمی به نام ارولیزین توسط باکتری آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. این پروتئین سمی از طریق ایجاد کانال در غشای سلول‌های هدف، فعالیت‌های طبیعی آنها را مختل می‌کند و موجب تخریب و مرگ این سلول‌ها می‌شود. پروتئین سمی ارولیزین در اثر بیان ژن ارولیزین در باکتری آئروموناس هیدروفیلا ایجاد می‌شود. ژن ارولیزین ۱۴۸۲ bp است و یک مارکر مولکولی مهم و پایدار برای شناسایی امکان آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. برای بررسی این مارکر مولکولی از تکنیک PCR استفاده می‌شود. برای کنترل و درمان بیماری آئروموناسی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی استفاده می‌شود که مهمترین آنها تتراسایکلین است. مکانیسم عملکرد ضد باکتریایی این آنتی‌بیوتیک از طریق ایجاد اختلال در ترجمه ژن ارولیزین و در نتیجه ممانعت از سنتز پروتئین در ریبوزوم باکتری می‌باشد، بنابراین با توقف ساخت پروتئین‌ها در آئروموناس هیدروفیلا، این باکتری‌ها محکوم به مرگ می‌شوند. آگاهی از نحوه عملکرد ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند نقش مهمی در یافتن مواد جایگزین مناسب برای این داروهای سنتتیک ایفا کند.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۴/۰۳/۰۵ اصلاح: ۹۴/۱۲/۰۴ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۴	
کلمات کلیدی:	
ارولیزین تتراسایکلین ضد باکتریایی <i>Aeromonas hydrophila</i>	

مقدمه

با افزایش تقاضا برای غذاهای تولید شده از طریق آبی‌پروری، نیاز به سیستم‌های تولید کارآمدتر محسوس شده است. اصلاحات عمده‌ای از طریق بهبود فرایندهای پرورش، بهبود تغذیه، تسهیل روش‌های تشخیص و درمان بیماری‌ها و کاربرد ژنتیک در مورد صفات تولیدی در آبی‌پروری حاصل شده است (Dunham, 2004). مطالعات مولکولی و ژنتیکی در آبریان در راستای رسیدن به این هدف است و کاربردهای فراوانی در آبریان دارد. از جمله این مطالعات، بررسی ژن‌های مهم و تاثیرگذار در بهبود تغذیه، رشد، تولید مثل، سیستم ایمنی و ... در ماهیان است. به عنوان مثال عملکرد ژن‌هایی از قبیل^۱GH،^۲IGF-1،^۳Ghrl^۴،^۵VEGF و^۶GULO که نقش تأثیرگذار در رشد، تغذیه، سیستم ایمنی و مقاومت به استرس‌های محیطی دارند

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: pacravan@yahoo.com

¹ Growth hormone

² Insulin-like growth factor-I

³ Ghrelin

⁴ Vascular endothelial growth factor

⁵ L-Gulon-gamma-lactone oxidase

⁶ Hypoxia inducible factors

در گونه‌های مختلف ماهیان توسط نویسندگان این مقاله مروری مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است (Akbarzadeh *et al.*, 2011, 2013; Rytikonen *et al.*, 2013; Kolangi Miandare *et al.*, 2013). مطالعات مولکولی در زمینه بیماری‌های آبزیان نیز مورد توجه قرار گرفته و کاربرد آنها باعث بهبود کنترل این بیماری‌ها و افزایش سطح بهداشتی در مزارع پرورشی شده است (Winton and Einer-Jensen, 2002; Astrofsky *et al.*, 2000; Joseph and Carnahan, 1994; Alonso *et al.*, 1999; Altinok *et al.*, 2000; Grizzle *et al.*, 2003).

حضور و توسعه بیماری در ماهیان نتیجه واکنش بین عامل بیماری‌زا، میزبان و محیط است. بنابراین شناخت ماهیت و مکانیسم عملکرد هر کدام از عوامل می‌تواند در پیشگیری و کنترل بروز بیماری‌ها نقش داشته باشد (Toranzo *et al.*, 2005). بیماری‌های ماهیان شامل بیماری‌های غیرعفونی (محیطی، تغذیه‌ای، ژنتیکی) و بیماری‌های عفونی می‌باشند. بیماری‌های عفونی به علت مسری بودن دارای جایگاه ویژه‌ای بوده و با احتساب خسارت ماهیان تلف شده، هزینه درمان و کاهش میزان رشد ماهیانی که بعد از بیماری بهبود می‌یابند، باعث افزایش هزینه تولید و کاهش سود آبی پروری می‌گردند. امروزه برای پیشگیری و کنترل به موقع بیماری‌ها، کاوش از طریق DNA و آزمایشات PCR با موفقیت جهت پایش حضور پاتوژن‌ها در محیط، بافت‌های بدن و تخم‌های ماهی گسترش یافته است (Hadi *et al.*, 2012; Rashidi Monfared *et al.*, 2013).

باکتری‌ها از جمله عوامل بیماری‌زا هستند که به طور معنی‌داری باعث کاهش محصولات آبی پروری می‌شوند. بیماری‌های باکتریایی را می‌توان با استفاده از درمان دارویی و واکسن‌ها کنترل نمود. بدن ماهی دارای ظرفیت فوق‌العاده‌ای جهت برخورد موثر با هجوم باکتریایی است. بیشتر عفونت‌ها بدون علائم یا نشانه‌های قابل مشاهده ایجاد می‌شوند و از بین می‌روند. بنابراین بیشتر عفونت‌ها نیاز به درمان دارویی ندارند. اما بعضی از عفونت‌ها نیاز به درمان دارد. هدف از درمان دارویی استفاده از اثرات سمی انتخابی یک دارو برای کمک به بیمار است که به سرعت و به طور فعال عفونت باکتریایی را بدون اثرات نامناسب در میزبان کنترل نماید. در حال حاضر آنتی‌بیوتیک‌ها داروهای اصلی مورد استفاده در درمان دارویی ضد باکتریایی هستند (Blanco *et al.*, 2000).

آئروموناس هیدروفیلا یکی از بیماری‌های شایع در آبی‌پروری است (Cipriano *et al.*, 2001) و برای درمان آن از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی استفاده می‌شود که تتراسایکلین یکی از مهمترین آنها می‌باشد. در این مقاله سعی بر این است که مکانیسم‌های مولکولی عمل این آنتی‌بیوتیک در برابر آئروموناس هیدروفیلا بیان شود تا با درک درست این مکانیسم‌ها به دنبال راه‌کارهایی برای استفاده از مواد جایگزین طبیعی برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک باشیم.

آئروموناس هیدروفیلا

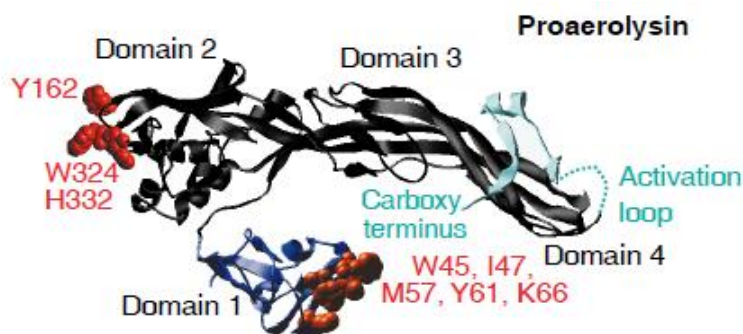
آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری هتروتروف، گرم منفی، میله‌ای شکل و متحرک است که به وسیله یک تاژک قطبی حرکت می‌کند و به طور عمده در مناطقی با آب و هوای گرم یافت می‌شود. این باکتری در آب‌های شیرین و لب‌شور و همچنین در محیط‌های هوازی و غیرهوازی قادر به زندگی می‌باشد (Adanir and Turutoglu, 2007). این باکتری وقتی وارد بدن قربانی می‌شود از طریق گردش خون وارد اندام‌های بدن می‌شود و تولید سم ارولیزین^۱ می‌کند که می‌تواند به بافت آسیب برساند (Hazen *et al.*, 1978). آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری فرصت طلب است و اغلب طی تغییرات محیطی، استرس‌ها، تغییرات دمایی، آلودگی‌های محیطی و همچنین هنگامی که میزبان از قبل با ویروس یا باکتری دیگری آلوده شده باشد اتفاق می‌افتد. این باکتری در ماهیان سبب ایجاد زخم، پوسیدگی دم و باله‌ها و سپتی‌سمی هموراژیک می‌شود (Adanir and Turutoglu, 2007; Pakravan *et al.*, 2011).

ارولیزین

در زیست‌شناسی مولکولی ارولیزین یکی از سمومی است که توسط باکتری آئروموناس هیدروفیلا تولید می‌شود (شکل ۱) و با استفاده از سیستم ترشحی نوع ۲ به فضای خارج سلولی انتقال یافته و به سلول‌های یوکاریوتیک متصل می‌شود و ایجاد

¹ Aerolysin

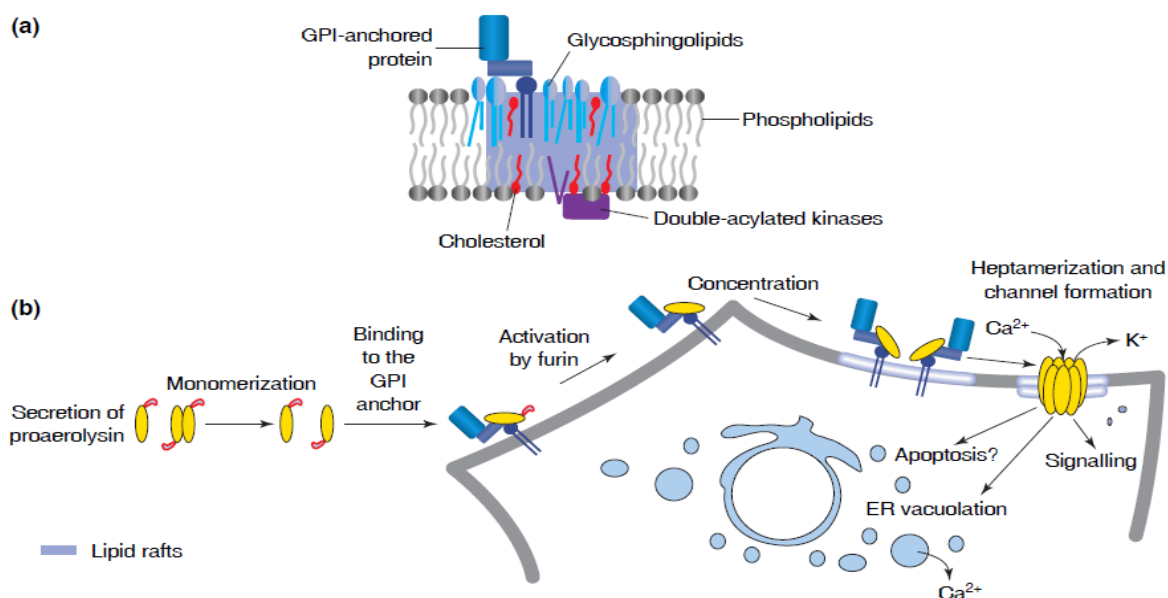
ترشح می‌شود. ساختار پروارولیزین شامل دو قسمت است (شکل ۳). قسمت اول با انتهای آمینی که شامل دومین^۱ است و قسمت دیگر با انتهای کربوکسیل که بزرگتر است و به سه دومین (۲ و ۳ و ۴) تقسیم می‌شود و پایداری کمتری دارد (Abrami *et al.*, 2000).



شکل ۳. ساختار پروارولیزین (Abrami *et al.*, 2000)

باند شدن به رسپتور و فعال سازی

پروارولیزین هنگامی که از باکتری آزاد می‌شود به رسپتورهایی با میل ترکیبی بالا که در روی سلول های هدف قرار دارند و تحت عنوان پروتئین های لنگر^۲ (GPI) شناخته شده اند، باند می‌شوند (شکل ۴). زمانی که پروارولیزین به رسپتور باند می‌شود توسط آنزیم های خاص تبدیل به ارولیزین می‌شود. این پروتئازها عبارتند از تریپسین^۳، آلفا-کیموتریپسین^۴ و فورین^۵. مونومرهای پروارولیزین به پروتئین های لنگر متصل می‌شود و سپس توسط فورین به ارولیزین تبدیل می‌شود. این توکسین‌های بالغ حلقه های ۷ ضلعی را تشکیل می‌دهند. کانال ارولیزین غشای سلول را به طور انتخابی به یون های کوچک نفوذ پذیر می‌کند و به دنبال آن در داخل سلول اتفاقاتی می‌افتد: ۱. کلسیم از داخل شبکه آندوپلاسمی آزاد می‌شود، ۲. شبکه آندوپلاسمی واکوئوله می‌شود، ۳. در بعضی از سلول ها از قبیل Tcell مرگ سلولی اتفاق می‌افتد (Abrami *et al.*, 2000).



شکل ۴. (a) شکل شماتیک لیپید رفت (lipid raft). (b) تشکیل کانال توسط ارولیزین و اثرات داخل سلولی آن.

¹ domain

² glycosyl-phosphatidyl-inositol

³ trypsin

⁴ α -chymotrypsin

⁵ furin

وقتی ارولیزین با میل ترکیبی بالا به رسپتورهایش می‌چسبد، این سم در سطح سلول تغلیظ می‌شود. باند شدن به مولکول‌های لنگر GPI نسبت به رسپتورهای انتقال دهنده غشایی، نه تنها باعث انتشار سریع تر پروارولیزین از ناحیه گلیسروفوسفولیپیدی غشای پلازما که فورین در آن جایگزین شده است می‌شود، بلکه اجازه می‌دهد که ارولیزین به طور موقت با میکرو دومین‌های^۱ غنی از کلاسترول (مناطق کوچک غنی از کلاسترول) که در غشای پلاسمایی وجود دارند و به اصطلاح، لیپید رفت^۲ نامیده می‌شوند، ترکیب شوند. این ترکیب شدن منجر به افزایش غلظت سم می‌شود که همزمان اجازه می‌دهد الیگومر شدن^۳ سم حتی در غلظت‌های خیلی پایین در سطح غشای سلول میزبان اتفاق افتد. بنابراین ارولیزین‌های بالغ کمپلکس‌های هپتامری^۴ پایداری تشکیل می‌دهند که به شکل کانال‌هایی هستند. هپتامر ارولیزین به طور خود بخودی از طریق قسمت‌های آب‌گریز خود وارد دو لایه چربی می‌شود (Abrami *et al.*, 2000; Knapp *et al.*, 2010).

پیامدهای ایجاد کانال

تشکیل منافذ در غشا توسط سموم، تهدید مهمی برای سلول‌هاست و می‌تواند دامنه‌ای از اتفاقات را تحریک کند که بستگی به نوع سلول هدف، نوع توکسین، غلظت توکسین و زمان مواجه شدن این توکسین‌ها با سلول میزبان دارد (شکل ۴). با ایجاد کانال‌ها در غشا، یک سلول به راحتی یون‌ها، آب و مولکول‌های کوچک (از قبیل قندها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک) غیر از پروتئین را از دست می‌دهد. در این حالت علاوه بر اینکه شیب سدیم-پتاسیم شکسته می‌شود، نفوذ کلسیم نیز در سلول‌ها قابل مشاهده است که به نظر می‌رسد واسطه علامت‌دهی به سلول^۵ باشد و سلول را از وضعیت ایجاد شده آگاه کند. از دست رفتن یون پتاسیم اثرات مخرب بر فعالیت طبیعی سلول‌ها دارد. در Tcell‌ها (نوعی لنفوسیت) تشکیل کانال توسط ارولیزین باعث قطعه‌قطعه شدن DNA و در نتیجه تحریک مرگ سلولی می‌شود که احتمالاً نتیجه نفوذ توده‌ای کلسیم است. توانایی آنها برای از بین بردن ناگهانی اریتروسیت‌ها از طریق کاهش اسمزی است. تاثیر دیگر عبارت است از واکوئوله شدن شبکه آندوپلاسمی که در سلول‌های اپیتلیال قابل مشاهده است. شبکه آندوپلاسمی از چین‌خوردگی‌های فراوانی تشکیل شده که یک غشا آنها را در بر گرفته است. شبکه آندوپلاسمی وظیفه دارد تا پروتئین‌ها و سایر کربوهیدرات‌ها را به دستگاه گلژی، غشاء سلولی، لیزوزوم و هر جای دیگری که لازم باشد، منتقل کند. واکوئوله شدن منجر به جلوگیری از انتقال پروتئین‌های تازه سنتز شده به خارج از شبکه آندوپلاسمی می‌شود.

همانطور که بحث شد ارولیزین اثراتی دارد که وابسته به نوع سلول است. این اثرات ممکن است توسط ایجاد سوراخ و به دنبال آن دپلاریزه شدن، نفوذ کلسیم یا هر دوی اینها ایجاد شود. در حضور ارولیزین، سلول‌ها برای چندین ساعت زنده می‌مانند و این مدت بستگی به غلظت سم دارد (Abrami *et al.*, 2000; Knapp *et al.*, 2010).

ژن ارولیزین در باکتری آئروموناس هیدروفیلا

سم ارولیزین در باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط ژن ارولیزین کد می‌شود و این ژن ۱۴۸۲ bp است. ژن ارولیزین یک مارکر مولکولی مهم و پایدار برای شناسایی امکان آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. برای بررسی این مارکر مولکولی از تکنیک PCR استفاده می‌شود. PCR ابزار مولکولی حساس، اختصاصی و سریع برای کشف وجود باکتری‌ها است. تکنیک‌های وابسته به PCR برای تشخیص زودهنگام و کنترل انتشار سم آئروموناس هیدروفیلا در مناطق جدید مفید است و مدیریت بهداشتی ماهیان را ارتقا می‌دهد (Singh *et al.*, 2008; Yousr *et al.*, 2007).

جداسازی باکتری‌ها و ژنوم آنها

باکتری آئروموناس هیدروفیلا از بافت‌های ماهیان بیمار جدا شده، در آزمایشگاه در داخل محیط کشت باکتری، کشت داده می‌شود. سپس ژنوم باکتری جداسازی می‌شود (Singh *et al.*, 2008; Yousr *et al.*, 2007).

¹ Micro domain

² Lipid raft

³ Oligomerization

⁴ Heptamerization

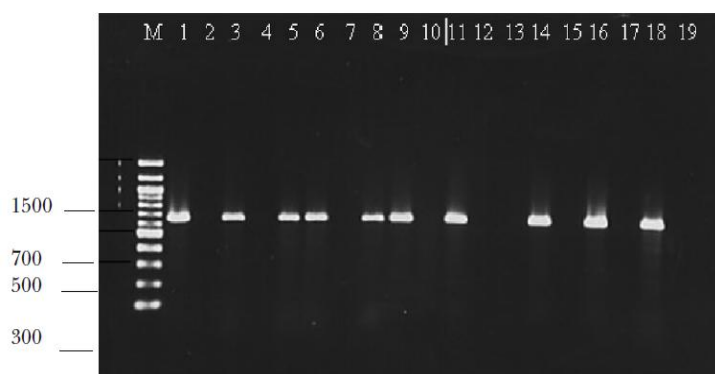
⁵ Cell signaling

استراتژی طراحی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن ارولیزین

توالی های ژن ارولیزین باکتری آئروموناس هیدروفیلا از سایت NCBI جمع آوری می شود. این توالی های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار ClustalX مرتب می شود و چارچوب خواندن ژن ارولیزین^۱ انتخاب می شود. پرایمرها با نرم افزار طراحی شده و برای ساخت سفارش داده می شوند. برای طراحی پرایمر از مناطقی از ژن استفاده می شود که بیشترین محافظت را در اکثر ژن های ارولیزین داشته باشد (Singh *et al.*, 2008; Yousr *et al.*, 2007).

PCR

ژنوم باکتری با پرایمرهای طراحی شده و سایر مواد لازم PCR می شود و سپس برای بررسی و تائید محصول PCR، بر روی ژل آگاروز الکتروفورز انجام می گیرد (شکل ۵). در صورت مشاهده باند در ژل، حضور ژن ارولیزین اثبات می شود (Singh *et al.*, 2008; Yousr *et al.*, 2007).



شکل ۵. ردیابی ژن ارولیزین در باکتری آئروموناس هیدروفیلا در روی ژل آگاروز (Yousr *et al.*, 2007).

توالی یابی ژن ارولیزین

بعد از الکتروفورز، توالی یابی ژن ارولیزین انجام می شود و سپس توالی به دست آمده با برنامه BLAST آنالیز می شود. نتایج نشان دهنده میزان شباهت توالی ژن ارولیزین در باکتری آئروموناس هیدروفیلا با توالی های دیگر مستند شده در بانک ژنی مربوط به ژن ارولیزین می باشد (Singh *et al.*, 2008; Yousr *et al.*, 2007).

درمان

آئروموناس هیدروفیلا را می توان با استفاده از محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم و محلول ۲ درصد هیپوکلریت کلسیم حذف نمود. همچنین می توان از آنتی بیوتیک هایی نظیر تتراسایکلین، کلرامفنیکول، سولفونامید و ... برای حذف و کنترل این باکتری استفاده نمود (<http://en.wikipedia.org>). آنتی بیوتیک ها از مکانیسم های خاصی برای مقابله با باکتری ها استفاده می کنند. در این مقاله مکانیسم عملکرد تتراسایکلین که از آنتی بیوتیک های معمول مورد استفاده برای درمان بیماری آئروموناسی است، شرح داده می شود.

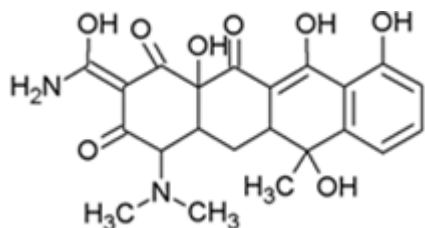
تتراسایکلین ها

تولیدات طبیعی هستند که از اکتینومیست های خاک یا از مشتقات نیمه مصنوعی آنها به دست می آیند. اکتینومیست ها ارگانسیم های گرم مثبتی هستند که به صورت رشته های نازکی رشد می کنند. در واقع مدت های مدیدی تصور بر این بود که اینها جزو قارچ ها هستند و به آنها اکتینومیست گفته می شد اما قارچ ها جزو یوکاریوت ها هستند در حالی که اکتینوباکتری ها جزو این گروه نیستند. اکتینوباکتری ها در خاک زندگی میکروبی دارند و نقش مهمی را در پوسیدگی مواد آلی مرده ایفا می کنند. بسیاری از آنها به عنوان منبع با ارزش آنتی بیوتیک هایی از قبیل استرپتومايسين، اريترومايسين و تتراسایکلین هستند.

¹ Open reading frame

ساختار شیمیایی تتراسایکلین

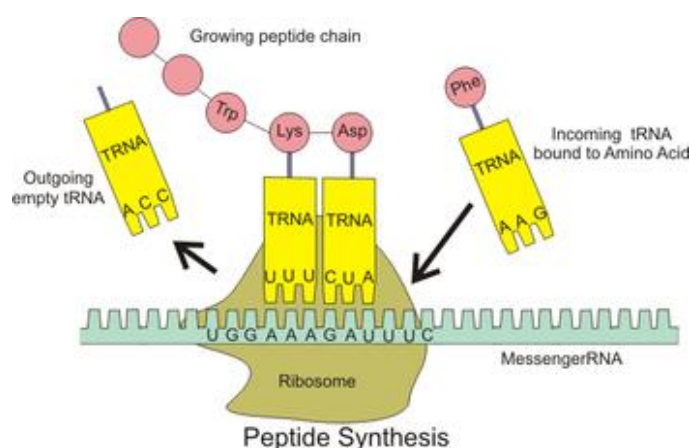
تتراسایکلین ساختار حلقوی دارد و به دلیل داشتن ۴ حلقه در ساختارش (تترا)، به این نام معروف شده است (IUPAC¹, 1997).



شکل ۶. ساختار شیمیایی تتراسایکلین
(<http://buyingantibioticsonline.us>)

مکانیسم عملکرد تتراسایکلین

تتراسایکلین‌ها به زیر واحد 30S ریبوزوم باکتری‌ها باند می‌شوند و مانع انتقال اسیدهای آمینه فعال به ریبوزوم می‌شوند، بنابراین سنتز پروتئین متوقف می‌شود. ریبوزوم کمپلکس مولکولی بزرگی است که در همه سلول‌های زنده وجود دارد و نخستین جایگاه سنتز بیولوژیکی پروتئین‌ها است (شکل ۷). واحد سنجش ریبوزوم واحد اسودبرگ^۲ است و براساس این واحد سنجش، ریبوزوم پروکاریوت‌ها 70S است که به ۲ زیر واحد 50S و 30S تقسیم می‌شود. هر زیر واحد از یک یا تعداد بیشتری مولکول rRNA و یک نوع پروتئین تشکیل شده است. زیر واحد کوچکتر به یک زنجیره mRNA باند می‌شود و از آن به عنوان الگو استفاده می‌کند تا توالی دقیق اسیدهای آمینه را در یک پروتئین خاص تعیین کند. اسیدهای آمینه در زیر واحد بزرگتر ریبوزوم به همدیگر متصل می‌شوند. پس از اینکه پروتئین تولید شد فولد می‌شود و ساختار سه بعدی آن شکل می‌گیرد (Benne and Sloof, 1987).

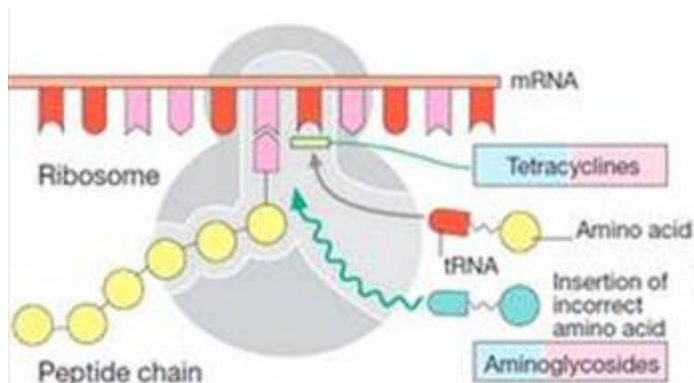


شکل ۷. ساختار شماتیک ریبوزوم و عملکرد آن در سلول (<http://en.wikipedia.org>)

ریبوزوم سه جایگاه اتصال به RNA دارد که عبارتند از: جایگاه A (برای tRNA همراه با اسید آمینه)، جایگاه P (برای tRNA باند شده به زنجیره پپتیدی در حال ساخت) و جایگاه E (برای tRNA آزاد قبل از خروج از ریبوزوم) (Czernilofsky, 1976). عملکرد ضد باکتریایی تتراسایکلین‌ها با باند شدن به زیر واحد 30S در جایگاه A است (شکل ۸). در طول ساخته شدن پروتئین‌ها، tRNA جدید همراه با اسید آمینه مبادرت به باند شدن به جایگاه A ریبوزوم می‌کند. هنگامی که جایگاه A با تتراسایکلین اشغال می‌شود، aminoacyl-tRNA دیگر نمی‌تواند به آن باند شود. بنابراین بدون الصاق مداوم tRNA در جایگاه A، سنتز پروتئین نمی‌تواند اتفاق افتد. به این ترتیب تتراسایکلین‌ها (تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین، مینوسایکلین و ...) با ممانعت از بیوسنتز پروتئین باعث مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شوند (<http://pharmaxchange.info>).

¹ International Union of Pure and Applied Chemistry

² Svedberg



شکل ۸. مکانیسم عملکرد ضد باکتریایی تتراسایکلین در ریبوزوم. تتراسایکلین به زیر واحد 30S ریبوزوم باکتری ها باند می‌شود و مانع انتقال اسیدهای آمینه فعال به ریبوزوم می‌شود، بنابراین سنتز پروتئین متوقف می‌شود (http://www.medchrome).

منابع

- Abrami, L., Fivaz, M., Vander Goot, F.G. 2000. Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiology*. 8:168-172.
- Adanir, D.O.R., Turutoglu, H. 2007. Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* in a carp (*Cyprinus carpio*) hatchery farm. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 51: 361-364.
- Akbarzadeh, A., Farahmand, H., Mahjoubi, F., Nematollahi, M.A., Leskinen, P., Rytkonen, K., Nikinmaa, M. 2011. The transcription of l-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbate, during development of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 158: 282-288.
- Akbarzadeh, A., Haghbeen, K., Farahmand, H., Nematollahi, M.A., Nikinmaa, M. 2013. The time course of L-gulono-gamma-lactone oxidase expression during the larval ontogeny of fish (*Acipenser persicus*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 45: 349-355.
- Alonso, M., Rodríguez, S., Pérez Prieto, S.I. 1999. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology Methods*. 81(1-2): 1-9.
- Altinok, I., Grizzle, J.M., Liu, Z. 2000. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of polymerase chain reaction. *Disease of Aquatic Organism*. 44: 29-34.
- Astrofsky, K.M., Schrenzel, M.D., Bullis, R.A., Smolowitz, R.M., Fox, J.G. 2000. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp. infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities. *Comparative Medicine*. 50(6): 666-72.
- Benne, R., Sloof, P. 1987. Evolution of the mitochondrial protein synthetic machinery. *BioSystems*. 21(1): 51-68.
- Blanco, M.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Gibello, A. 2000. Influence of fish health management: Bases, procedures and economic implications. *Global quality assessment in Mediterranean aquaculture*. Zaragoza: CIHEAM. 51: 45-49.
- Cipriano, R.C., Bullock, G.L., Pyle, S.W. 2001. *Aeromonas Hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Revision of fish disease leaflet 68 (1984). United States department of the interior fish and wildlife service division of fishery research Washington, D.C. 20240.
- Czernilofsky, A., Collatz, E., Stöffler, G., Czernilofsky, P. 1976. Site of reaction on ribosomal-protein 127 with an affinity label derivative of transferrin (met). *FEBS Letters*. 63(2): 283-286.
- Dunham, R.A. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: genetic approaches*. CAB International, Wallingford, UK.
- Grizzle, J.M., Altinok, I., Noyes, A.D. 2003. PCR method for detection of largemouth bass virus. *Disease of Aquatic Organism*. 54: 29-33.
- Hadi, F., Ghasemi, M., Faezi Ghasemi, M., Eisazadeh, Kh., Haghghi Karsidani, S., Khara, H. 2012. Identification of *Aeromonas hydrophila* isolated from cultured silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) via molecular technique. *Journal of Veterinary Laboratory Research*. 4(1): 79-79. (in Persian).

- Hazen, T.C., Fliermans, C.B., Hirsch, R.P., Esch, G.W. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 36(5): 731-738.
- Howard, S.P., Garland, W.J., Green, M.J., Buckley, J.T. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*. 169(6): 2869-71.
- IUPAC 1997. Compendium of Chemical Terminology. 2nd edition (the "Gold Book"). Online corrected version: (2006) "tetracyclines".
- Joseph, S.W., Carnahan, A. 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annual Review of Fish Diseases*. 4: 315-343.
- Knapp, O., Stiles, B., Popoff, M.R. 2010. The aerolysin-like toxin family of cytolytic, pore-forming toxins. *The Open Toxinology Journal*. 3: 53-68.
- Kolangi Miandare, H., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytönen, K., Nikinmaa, M. 2013. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*. 182: 41-47.
- Korotkov, K.V., Sandkvist, M., Hol, W.G. 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology*. 10(5): 336-51.
- Pakravan, S., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R. 2011. Effect of dietary willow herb, *Epilobium hirsutum* extract on growth performance, body composition, haematological parameters and *Aeromonas hydrophila* challenge on common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Research*. 43(6): 861-869.
- Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., Tsernoglou, D. 1994. Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature*. 367(6460): 292-295.
- Rashidi Monfared, S., Mirvaghefi, E., Farahmand, H., Neematollahi, M., Poorbakhsh, M., Ashtari, E. 2013. Molecular detection of the bacterium *Streptococcus agalactiae* in ovarian broodstock rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) based on polymerase chain reaction (PCR) of scpB gene. *Journal of Fisheries*. 66(1): 49-58. (in Persian).
- Rytönen, K.T., Akbarzadeh, A., Kolangi, H., Kamei, H., Duan, C., Leder, H., Williams, T.A., Nikinmaa, M. 2013. Subfunctionalization of cyprinid hypoxia-inducible factors for roles in development and oxygen-sensing. *Evolution*. 67: 873-882.
- Singh, V., Rathore G., Kapoor, D., Mishra, B.N., Lakra, W.S. 2008. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 453-458.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Romalde, J. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. 246: 37-61.
- Winton, J.R., Einer-Jensen, K. 2002. Molecular Diagnosis of Infectious Hematopoietic Necrosis and Viral Hemorrhagic Septicemia. *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. 3: 49-79.
- Yours, A.H., Napis, S., Rusul, G.R.A., 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*. 14(2): 115-122.
- <http://en.wikipedia.org>
<http://buyingantibioticsonline.us>
<http://www.eubacteria>
<http://www.bakersfieldcollege.edu>
<http://pharmaxchange.info>
<http://www.medchrome>