بررسی مایکوباکتریوز در دو گونه گلدفیش و گوپی در سمنان به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

الهام حسین‌پور[۱]، سارا مهدی‌زاده مود*[۱]، حمید استاجی[۱]، حسام‌الدین اکبرین[۲]، پیراسته نوروزی[۳]

*smehdizadeh@semnan.ac.ir

۱- دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲- گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- گروه فیزیولوژی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوز، مایکوباکتریوم غیر سلی، PCR، سمنان

مایکوباکتریوز که توبرکولوز (سل) ماهی نیز نامیده می‌شود، یکی از مهمترین بیماری‌های مزمن متداول ماهیان زینتی، از اواخر قرن نوزده که این آبزیان به جهان معرفی شدند بوده است (Pate *et al*., 2005) . با وجود این که تمام ماهیان زینتی آب شیرین و شور به این بیماری حساسند. خانواده‌های آنابانتیده (بتا وگورامی‌ها)، کاراسیده (تتراها) و کپور ماهیان (بارب، کوی و گلدفیش) حساسیت بیشتری نشان داده‌اند (Decostere *et al*., 2004; Zanoni *et al*., 2008). سل آبزیان اولین بار از کپورماهیانی (*Cyprinus carpio*) جدا شد که آب آنها به مایکوباکتریوم آلوده شده بود (Gauthier and Rhodes, 2009a). گونه‌های متداول ایجاد کننده توبرکلوز ماهی عبارتند از: *M. marinum* ، *M. chelonae* و *M. fortuitum* (Austin and Austin, 2007) . علایم بیماری در ماهی شامل لاغری مفرط، از بین رفتن رنگ بدن، زخم‌های جلدی سطحی یا عمیق و ندول‌های سفید رنگ در اندام‌های داخلی است. این بیماری گرانلوماتوزی سیستمیک به صورت مزمن یا حاد در ماهیانی آکواریومی و پرورشی و بویژه در آنهایی که تحت شرایط نامناسبی نگهداری می‌شوند، رخ می‌دهد (Beran *et al*, 2006). این بیماری قابل انتقال به انسان است و گرانولومای تانک ماهی یا گرانولوم استخر شنا نامیده می‌شود و معمولاً به صورت بیماری پوستی و التهاب گرانولوماتوز یا گرانولومای ندولی یا منتشر پوست، بافت زیر پوستی و غلاف تاندون انگشتان و دستان تظاهر می‌یابد. این آلودگی حین رسیدگی به ماهیان و تجهیزات آکواریوم باید به عنوان یک خطر بالقوه مطرح است (Tebruegge *et al*., 2016).

اگرچه ماهیان زینتی تنها بخش کوچکی از تجارت جهانی آبزیان را تشکیل می‌دهند، اما با این حال یکی از بخش‌های حیاتی این زمینه هستند (Monticini, 2010). بیماری‌ها بویژه بیماری‌های مزمن بدون نشانه‌های بالینی، می‌توانند به بازارپسندی ماهی و اقتصاد این تجارت ضربه وارد کنند. این بررسی با هدف ردیابی آلودگی‌های مایکوباکتریایی در دو گونه ماهی گوپی (*Poecilia reticulate*) از خانواده پویسلیده و گلدفیش

(*Carassius auratus*) از خانواده سیپرینیده، در شهر سمنان به روش PCR انجام شد.

۳۰ قطعه ماهی قرمز (گلدفیش) و ۳۰ قطعه ماهی گوپی، استفاده شده در این بررسی از پنج آکواریوم فروشی موجود در سطح شهر سمنان در نوبت‌های مختلفی خریداری و به آکواریوم مخصوص در آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان انتقال داده شدند. روز اول ماهیان مورد بررسی‌های ظاهری و بالینی قرار گرفتند و در روز دوم نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های ماهی قرمز از اندام‌های داخلی و حاوی مخلوط کبد، کلیه و طحال هر ماهی که با تیغ اسکالپل استریل اخذ و درون هاون همگن شد و نمونه‌های ماهی گوپی شامل ماهی کامل هم‌ن شده در هاون بود.

استخراج DNA در این پژوهش به روش Van Helden و همکاران صورت گرفت (Helden *et al.*, 2001). در این روش پس از همگن شدن نمونه‌ها به آن محلول لیز سلولی اضافه و سانتریفیوژ شد، مایع رویی دور ریخته شد و پلت تشکیل شده، در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت دید. در بافر استخراج حل شد و به آن لیزوزیم ۱درصد افزوده شد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حرارت دید، بعد بافر پروتئیناز k و سپس پروتئیناز k اضافه شد. مخلوط حاصل در طول شب در انکوباتور در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در ادامه روند استخراج DNA ، هم حجم مخلوط به آن محلول فنل/ کلروفرم/ ایزوامیل الکل افزوده و همزده و پس از سانتریفیوژ دوباره، فاز آبی را برداشته و درون میکروتیوب استریل جدید ریخته به مایع درون میکروتیوب‌های جدید استات سدیم ۳ مولار و ایزوپروپانول الکل اضافه شد. حدود ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد دوباره سانتریفیوژ شد و در این مرحله DNA به صورت پلت بسیار ریزی در کف میکروتیوب رسوب کرد. مایع رویی را دور ریخته و DNA با الکل اتانول ۷۰درصد شستشو داده شد، منتظر مانده تا الکل کاملا تبخیر شد، پلت در آب مقطر استریل حل شد و با دستگاه نانودراپ غلظت DNA استخراج شده سنجیده شد. برنامه‌ی چرخه‌های دمایی بهینه برای تکثیر ژن *rpoB* در دستگاه ترموسایکلر در جدول ۱ آمده است.

آزمایش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) ساده با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. پرایمرها برای شناسایی قطعه‌ای ۳۶۰ جفت بازی از ژن *rpoB* از جنس مایکوباکتریوم اختصاصی بود. توالی پرایمرها عبارت است از :

Rpo.F (5'-TCA AGG AGA AGC GCT ACG A-3')

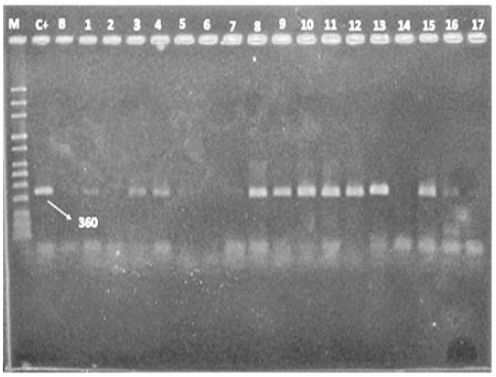
Rpo.R (5'-GGA TGT TGA GGG TCT GC-3')

جدول۱: شرایط بهینه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت شناسایی ژن *rpoB*

Table1- Optimal Polymerase Chain Reaction Conditions for detection of *rpoB* gene

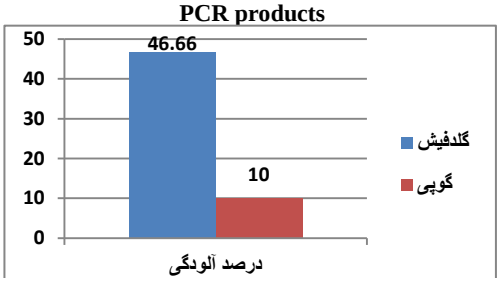
تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما
۱	واسرشت	۳ دقیقه	۹۴ °C
۳۵	واسرشت اولیه	۱ دقیقه	۹۴ °C
۳۵	اتصال	۱ دقیقه	۵۷/۷ °C
۳۵	ساخت	۱ دقیقه	۷۲ °C
۱	ساخت پایانی	۷ دقیقه	۷۲ °C

الکتروفورز فراورده‌های PCR در ژل آگارز ۱/۵- ۱/۲ درصد بوده است. ژل آگاروز حاوی ۲۰ گوده بود که در گوده اول نشانگر (مارکر)، در گوده‌های بعد به ترتیب کنترل مثبت، کنترل منفی و محصولات نمونه‌های PCR شده وارد می شد. رنگ‌آمیزی ژل آگارز، پس از اتمام الکتروفورز، با محلول اتیدیوم بروماید انجام شد. سپس برای زدودن رنگ اضافی یک دقیقه با آب مقطر شستوشو داده شد. به کمک دستگاه Gel–Doc تصاویری از ژل تهیه و مورد بررسی قرار گرفت، نمونه‌ای از تصاویر در شکل ۱ ارائه شده است. باندهای مشخصی با اندازه ۳۶۰ جفت باز در نتایج مشاهده می‌شود. برای توالی یابی DNA استخراج شده، ژل حاوی DNA به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد.



شکل ۱: نمونه ای از نتایج مثبت محصولات PCR

Figure 1: A sample of the positive results of PCR products



شکل ۲: درصد آلودگی در هر گونه

Figure 2: Present of the infectious in each species

در بررسی‌های بالینی و کالبد گشایی، شرایط ظاهری و درمانگاهی تمامی گلدفیش‌ها طبیعی بود و بجز یک مورد که دچار نکروز بافت اطراف چشم بود، سایر ماهیان به ظاهر سالم بودند. در مورد ماهیانی گوپی ۴ قطعه ماهی درجات خفیفی از ناهنجاری‌های اسکلتی را نشان دادند، اما در بررسی‌های کالبدگشایی هیچ یک از ماهیانی دو گونه مورد بررسی، نشانه مشکوکی مشاهده نشد و اندام-های داخلی به ظاهر سالم و طبیعی بودند. نتایج آزمایش PCR نشان داد که از ۳۰ قطعه ماهی قرمز ۱۴ قطعه (۴۶/۶ درصد) و از ۳۰ قطعه ماهی گوپی، ۳ قطعه (۱۰ درصد)، وجود توالی ۴۶۰ جفت بازی مربوط به ژن *rpoB* را نشان دادند.

قطعات DNA استخراج شده از ژل آگاروز توالی‌یابی شد و برنامه Blast نشان داد که این قطعات متعلق به مایکوباکتریوم‌های محیطی از گروه مایکوباکتریوم فورتویتوم بودند که یکی از گونه‌های مطرح در ایجاد سل آبزیان است. مایکوباکتریوز یا سل ماهی یکی از رایج‌ترین بیماری‌هایی است که ماهیان پرورشی و ماهیان وحشی را درگیر می‌کند و انتشار جهانی دارد، بطوریکه در یک مطالعه مروری در سال ۱۹۶۳ میلادی مشخص شد که تا آن زمان ۱۵۱ گونه ماهی از ۴۰ خانواده مختلف، به مایکوباکتریوم‌ها آلوده شده‌اند (Nigrelli and Vogel, 1963; Gauthier and Rhodes, 2009b). اعضای این فهرست اکنون به طور چشمگیری افزایش داشته‌اند و ماهیانی با شرایط مختلف زیستی به آنها افزوده شده است (Gauthier and Rhodes, 2009; Shukla *et al.*, 2013).

در سال‌های گذشته در کشورهای مختلف مطالعات زیادی در مورد آلودگی مایکوباکتریایی آبزیان صورت گرفته و گسترش جهانی مایکوباکتریوز مشخص شده است (Gauthier and Rhodes, 2009) . با وجود اینکه در ایران نیز مطالعاتی در زمینه مایکوباکتریوم‌های غیر سلی انجام شده است، اما اغلب این مطالعات در نقاط جغرافیایی خاصی بوده و به ۱۴ استان از ۳۱ استان محدود می‌شود (Velayati *et al.*, 2015). با در نظر گرفتن خطر مایکوباکتریوم‌های غیر سلی در بیماران مبتلا به نقص یا ضعف سیستم ایمنی و اهمیت آنها از نظر بهداشت عمومی (McCarthy *et al.*, 2012) و با توجه به اینکه هنوز اطلاعات کاملی از آلودگی تمام نقاط کشور در دسترس نیست، این بررسی با هدف ردیابی آلودگی ماهیان زینتی سمنان به مایکوباکتریوم‌های محیطی انجام شد و نتایج بیانگر آلودگی این منطقه بود. این بررسی محدود به شهر سمنان بوده است.

در این بررسی از دو گونه گلدفیش و گوپی نمونه برداری شد. گونه گلدفیش متعلق به خانواده سیپرینیده یا کپورماهیان است (Monticini, 2010) که بنظر می‌رسد یکی از حساس‌ترین خانواده‌ها نسبت به آلودگی و عفونت با مایکوباکتریوم‌های غیر سلی باشد (Francis-Floyd, 2011)، نتایج این بررسی نیز بر درستی این نکته تاکید کرد، در حالیکه هر دو گونه مورد بررسی از فروشگاه‌های مشابهی در سطح شهر سمنان تهیه شده بودند و شرایط مدیریتی برای هر دو گونه تقریبا یکسان بود. همچنین در

زمان اخذ تاریخچه مشخص شد که دو گونه از شرکت پرورش ماهی مشابهی تهیه می‌شدند. با این حال آلودگی حدود ۴۷ درصدی گلدفیش به طور قابل توجهی نسبت به گوپی با ۱۰ درصد آلودگی بیشتر بود. در این بررسی ماهی گوپی به طور کامل همگن می‌شد ولی در مورد گلدفیش فقط اندام‌های کبد، کلیه و طحال اخذ می‌شد، با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی، می‌توان نتیجه گرفت که این امر می‌تواند بیانگر شرایط بهینه استریل سازی مواد و وسایل مورد استفاده باشد و نتایج متاثر از آلودگی-های محیطی نبوده و قابل استناد می‌باشد.

در این بررسی ۴ قطعه ماهی گوپی دچار ناهنجاری خفیف اسکلتی حضور داشتند و مشکوک به مایکوباکتریوز بودند، اما در نتایج آزمایش PCR هیچ یک از آنها DNA دارای سکانس مورد نظر تکثیر نیافت. همانطوریکه در منابع نیز بیان شده است، نشانه‌های بالینی مربوط به مایکوباکتریوز در ماهی معمولاً غیر اختصاصی است و شامل علایم کلی مربوط به بیماری‌ها می‌شود و از نظر بهداشت عمومی همواره باید این نکته را در نظر داشت (Novotny *et al*., 2010). ضمن اینکه مطالعات نشان داده‌اند که نداشتن نشانه‌های بالینی و به ظاهر سالم بودن ماهیان دلیلی بر نبود بیماری نیست (Beran *et al*., 2006; Zanoni *et al*., 2008)، حتی ماهی سالم ممکن است مانند چیزی که در مورد گلدفیش‌های این بررسی مشاهده شد و همگی به ظاهر سالم بودند، مسئول انتقال میکروب به سایر ماهیان و محیط باشد (Sampaio *et al*., 2015).

مایکوباکتریوم‌های غیر سلی معمولا در هر آکواریومی می-توانند یافت شوند و برای نگهدارندگان آنها خطرساز باشند (Novotny *et al*., 2010). بعلاوه، هنوز درمانی قطعی برای مایکوباکتریوز وجود ندارد و موثرترین راه مبارزه با این بیماری و پیشگیری از آلودگی جمعیت‌های سالم، حذف کامل جمعیت مبتلا می‌باشد (سلطانی، ۱۳۹۴، Noga, 2011) که این امر می‌تواند به پرورش‌دهندگان و فروشندگان ماهیان زینتی و ماهیان پرورشی ضرر و زیان-های اقتصادی وارد کند. بنابراین، در دسترس بودن اطلاعاتی جامعی از تمامی نقاط ایران برای پیشگیری از زیان‌های احتمالی مفید خواهد بود.

به طور کلی، حساسیت آزمایش‌های مولکولی برای ردیابی آلودگی‌های مایکوباکتریایی کافی است و نسبت به سایر روش‌ها ارجحیت دارد و معمولاً مواردی از کشت منفی می‌توانند وجود داشته باشند که در آزمایش PCR مثبت شوند (Pourahmad *et al*., 2009). در این بررسی نیز از روش مولکولی PCR بهره گرفته شد و پس از توالی‌یابی DNAهای تکثیر شده، نتایج مطلوبی بدست آمد و بر حساسیت آزمایش PCR تأکید می‌شود، البته روش‌های تکمیلی مانند رنگ‌آمیزی و کشت در کنار روش مولکولی می‌توانند نتایج را بهبود بخشند. با توجه به اینکه مایکوباکتریوم‌های محیطی در توالی‌یابی DNA نمونه‌های مورد بررسی و آلودگی شهر سمنان به اثبات رسید، بررسی سایر نقاط استان نیز پیشنهاد می‌شود.

منابع

سلطانی, م.، ۱۳۹۴. بیماری‌های آزادماهیان. نشر دانشگاه تهران.

Austin, B. and Austin, D., 2007. Characteristics of the diseases. In *Bacterial Fish Pathogens* (pp. 15–46). Dordrecht: Springer Netherlands.

Beran, V., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P. and Pavlik, I., 2006. Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *Journal of Fish Diseases*, *29*(7), 383–393. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2006.00729.

Decostere, A., Hermans, K. and Haesebrouck, F., 2004. Piscine mycobacteriosis: A literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary Microbiology*, *99*(3–4), 159–166. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.07.011

Francis-Floyd, R., 2011. Mycobacterial Infections of Fish. *SRAC Publication*, (4706), 1–12.

Gauthier, D.T. and Rhodes, M.W., 2009a. Mycobacteriosis in fishes: A review. *The Veterinary Journal*, *180*(1), 33–47. DOI:10.1016/j.tvjl.2008.05.012.

Gauthier, D.T. and Rhodes, M.W., 2009b. Mycobacteriosis in fishes: A review. *Veterinary Journal*, *180*(1), 33–47. DOI:10.1016/j.tvjl.2008.05.012.

Helden, P.D. Van, Victor, T.C., Warren, R.M. and Helden, E.G. Van. (n.d.), 2001. Isolation of DNA from Mycobacterium tuberculosis, *54*(15).

McCarthy, K.D., Cain, K.P., Winthrop, K.L., Udomsantisuk, N., Lan, N.T.N., Sar, B. and Varma, J.K., 2012. Nontuberculous Mycobacterial Disease in Patients with HIV in Southeast Asia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *185*(9), 981–988. DOI: 10.1164/rccm.201107-1327OC.

Monticini, P., 2010. Globefish Research Programme The Ornamental Fish Trade The Ornamental Fish Trade Production andCommerce of Ornamental Fish: technical-managerial and legislative aspects, *102*(102).

Nigrelli, R. and Vogel, H., 1963. Spontaneous tuberculosis in fishes and in other cold-blooded vertebrates with special reference to Mycobacterium fortuitum Cruz from fish and human . *Zoologica, 1963*. 48: 131–144.

Noga, E.J., 2011. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*.

Novotny, L., Halouzka, R., Matlova, L., Vavra, O., Bartosova, L., Slany, M. and Pavlik, I., 2010. Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *Journal of Fish Diseases*, *33*(12), 947–955. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2010.01202.x.

Pate, M., Jencic, V., Zolnir-Dovc, M. and Ocepek, M., 2005. Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. *Diseases of Aquatic Organisms*, *64*(1), 29–35. DOI: 10.3354/dao064029.

Pourahmad, F., Thompson, K.D., Adams, A. and Richards, R.H., 2009. Detection and identification of aquatic mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded fish tissues. *Journal of Fish Diseases*, *32*(5), 409–419. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01030.x.

Sampaio, F.D.F., Freire Carolina, A., Sampaio Tony Vinícius, M., Vitule Jean, R.S. and Fávaro Luís, F., 2015. The precautionary principle and its approach to risk analysis and quarantine related to the trade of marine ornamental fishes in Brazil. *Marine Policy*, *51*, 163–168. DOI: 10.1016/j.marpol.2014.08.003.

Shukla, S., Sharma, R. and Shukla, S.K., 2013. Detection and identification of globally distributed mycobacterial fish pathogens in some ornamental fish in India. *Folia Microbiologica*, *58*(5), 429–436. DOI: 10.1007/s12223-013-0225-y.

Tebruegge, M., Pantazidou, A., MacGregor, D., Gonis, G., Leslie, D., Sedda, L. and Curtis, N., 2016. Nontuberculous mycobacterial disease in children - Epidemiology, diagnosis and management at a tertiary center. *PLoS ONE*, *11*(1), 1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0147513.

Velayati, A.A., Farnia, P., Mozafari, M. and Mirsaeidi, M., 2015. Nontuberculous Mycobacteria Isolation from Clinical and Environmental Samples in Iran: Twenty Years of Surveillance. *BioMed Research International*, DOI:10.1155/2015/254285.

Zanoni, R.G., Florio, D., Fioravanti, M.L., Rossi, M. and Prearo, M., 2008. Occurrence of Mycobacterium spp. in ornamental fish in Italy. *Journal of Fish Diseases*, *31*(6), 433–441. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2008.00924.x.

Survey on mycobacteriosis on goldfish and guppy species in Semnan, using PCR assay

Hosseinpour E.[1]; Mehdizade Mooe S.[1*]; Staji H.[1]; Akbarein H.[2]; Pirasteh N.[3]

[*]smehdizadeh@semnan.ac.ir

1- Faculty of veterinary medicine, Semnan University, Semnan, Iran
2- Department of Food hygiene, Faculty of veterinary medicine, Tehran University, Tehran, Iran
3- Department of physiology, Faculty of medicine, Shahroud university of medical science, Shahroud, Iran

Abstract

Mycobacteriosis or fish tuberculosis a chronic or acute, systemic, granulomatous disease in fish that occurs due to nontuberculous mycobacteria and affect all fish species. Families of Cyprinidae, Anabantidae and Characidae appears to be more susceptible to mycobacteriosis. This survey was was carried out to investigate the mycobacterial infection of ornamental fish of Semnan. 30 pieces of goldfish and 30 pieces of guppy were collected from aquarium shops of Semnan and sampled. These samples contain kidney liver and spleen. Detection of mycobacteria from extracted DNA was done, using PCR assay. Partial primer was used to identify the *rpo*B gene. Results showed contamination of 10% of guppies and 46.66% of goldfish. In DNA sequencing some of the bacterial species was recognized as *Mycobacterium fortuitum*. In conclusion ornamental fish of Semnan are contaminated with nontuberculous mycobacteria. Considering the zoonotic risk of this disease, results of this survey is important to the general hygiene. Investigating the other areas of Semnan province is offered.

Keywords: Mycobacteriosis, Nontuberculous mycobacteria, PCR, Semnan

[*]Corresponding author