DOI: 10.22092/vj.2019.124138.1522
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

جداسازی و تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم از ماهیان قزل‌آلای پرورشی استخرهای سبزوار (فروردین – شهریور ماه ۱۳۹۶)

• **فائزه صدیقی**
آزمایشگاه رفرانس سل، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **نادرمصوری (نویسنده مسئول)**
آزمایشگاه رفرانس سل، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **حسن روان سالار**
دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دانشکده پزشکی
• **کیوان تدین**
بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۸-۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۲-۱۶
Email: nmosavari@gmail.com

چکیده

عامل مایکوباکتریوز، گونه‌های مختلف جنس مایکوباکتریوم، می‌باشد. مایکوباکتریوز یک بیماری مزمن و پیشرونده است که ممکن است تمام بافت‌های ماهی را درگیر کند. علائم کلینیکال در ماهی شامل از دست دادن پولک‌ها، زخم‌های پوستی، ناهنجاری‌های اسکلتی، و .... می‌باشد. مایکوباکتریوز یک بیماری زئونوز است و بیشتر افرادی که با ماهی سرو کار دارند، در معرض خطر هستند. با توجه به گسترش پرورش ماهی قزل‌آلا در شهرستان سبزوار و داشتن آگاهی از ایجاد بیماری توسط مایکوباکتریوم در ماهیان و در نتیجه مرگ و میر و ایجاد خسارات اقتصادی و همچنین امکان انتقال این باکتری از ماهی به انسان، ضروری می‌باشد که به بررسی مایکوباکتریوم در ماهیان قزل‌آلای سبزوار بپردازیم. هدف از این تحقیق جداسازی و تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم از ماهیان قزل‌آلای پرورشی استخرهای سبزوار می‌باشد. در این تحقیق تعداد ۵۰ ماهی قزل‌آلای پرورشی دارای علائم کلینیکال، از هفت استخر مختلف پرورش ماهی شهرستان سبزوار جمع‌آوری شد. پس از کالبدگشایی و کشت اختصاصی نمونه‌ها در شرایط استریل، به منظور تشخیص اسیدفست بودن باکتری، رنگ آمیزی ذیل نلسن انجام شد. سپس استخراج DNA صورت پذیرفت و PCR-rRNA ۱۶s برای تایید عفونت مایکوباکتریومی انجام شد. برای تعیین هویت، نتایج سکونسینگ محصول PCR با استفاده از برنامه BLAST بررسی شد. در این تحقیق، سه جدایه اسیدفست رشد نمود که سکانس هر سه جدایه با ۹۹ درصد شباهت به گونه *Mycobacterium peregrinum* تعلق داشت. با توجه به اینکه *M. peregrinum* از آبزیان و موارد عفونت تنفسی انسان جداسازی شده، لذا ضروری است به افرادی که به هر نحوی با ماهی سروکار دارند، هشدارهای لازم داده شود.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوز، ماهی قزل‌آلا، *Mycobacterium peregrinum*

Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 42-49

Isolation and molecular identification of *Mycobacterium* from Rainbow fishes in Sabzevar pools (April - September 2017)

By:Sedighi, F., Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mosavari, N., (Corresponding Author) Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Ravansalar, H., Sabzevar University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Sabzevar, Iran. and Tadayon, K., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2018-11-14 Accepted: 2019-05-06

Email: nmosavari@gmail.com

The members of the genus *Mycobacterium*, are the causative agents of mycobacteriosis, Mycobacteriosis is a chronic and progressive disease that may affect all tissues of the fish. Clinical signs include scale loss, dermal ulceration, spinal defects and etc. Mycobacteriosis is a zoonosis disease, and most people who deal with fish, are at risk. Due to the expansion of Rainbow fish breeding in the city of Sabzevar and having awareness the disease caused by *Mycobacterium* in fish and as a result of mortality and economic damage and also possibility of transferring this bacterium from fish to humans, it is necessary to study *Mycobacterium* in Sabzevar Rainbow fish. The purpose of this research is isolation and molecular identification of *Mycobacterium* from Rainbow fishes in Sabzevar pools. In this research 50 Rainbow fishes with clinical signs collected from seven different fish breeding pools in Sabzevar city. After autopsy and culture of the specimens in sterile conditions, in order to confirm acid-fast of the bacteria, was performed Ziel-Neelsen staining. Then, DNA extraction was performed and PCR-16s rRNA was performed to confirm mycobacterium infection. To determine identity, the results of the sequencing of the PCR product were evaluated using the BLAST program. In this research, three acidfast isolates grew, that the sequence of all three isolates belonged with 99% similar to *Mycobacterium peregrinum*. Given that *M. peregrinum* is isolated from aquatic and human respiratory tract infections, Therefore, it is necessary to warn people who deal with fish in any way.

Keywords: Mycobacteriosis, Rainbow, *Mycobacterium peregrinum*

مقدمه

عامل مایکوباکتریوز، گونه‌های مختلف جنس مایکوباکتریوم می‌باشد که باکتری‌های میله‌ای، گرم مثبت و اسیدفست هستند (۱۶). این باکتری‌ها در بیش از ۲۰۰ گونه ماهی باعث ایجاد این بیماری می‌شوند (۸) مایکوباکتریوز یک بیماری مزمن در جمعیت ماهی‌ها می‌باشد که با مرگ و میر پایین همراه است اما در برخی شرایط عفونت حاد شده و باعث تلفات زیادی می‌گردد (۱) و در نتیجه خسارات اقتصادی زیادی را به همراه خواهد داشت (۱۲). شیوع مایکوباکتریوز در برخی از جمعیت‌های ماهی ممکن است به بیشتر از ۱۵ درصد برسد (۱).

بسیاری از گونه‌های کند رشد و تند رشد مایکوباکتریوم از ماهی جداسازی شده است (۱۲). سه گونه *Mycobacterium marinum*، *Mycobacterium fortuitum* و *Mycobacterium chelonae* شایع‌ترین عوامل ایجادکننده مایکوباکتریوز می‌باشند (۲). این مایکوباکتریوم‌ها ساپروفیت طبیعی موجود در آب و خاک و هستند و می‌توانند سال‌ها در آنجا باقی بمانند و بنابراین از این طریق می‌توانند به ماهی‌ها انتقال یابند (۲). یکی دیگر از مسیرهای انتقال به ماهی بلع غذای آلوده می‌باشد. ماهی آلوده به عنوان مخزن باکتری محسوب شده و عفونت را به سایر ماهی‌ها انتقال دهد. عفونت در بین ماهی‌ها می‌تواند از طریق بلع ماهیان کوچک آلوده، مدفوع و بافت‌های آلوده و همچنین تماس‌های پوستی منتقل شود. در برخی از ماهی‌ها انتقال از طریق تخمدان نیز گزارش شده است (۵). با وجود مسیرهای مختلف ایجاد عفونت در بین ماهی‌ها، انتقال دهانی از طریق مدفوع یا لاشه ماهی آلوده بعنوان مسیر اصلی مایکوباکتریوز شناخته می‌شود (۲). از دیگر گونه‌های مایکوباکتریوم جدا شده از ماهی می‌توان به *Mycobacterium avium*، *Mycobacterium abscessus*، *Mycobacterium flavescens*، *Mycobacterium chesapeaki*، *Mycobacterium neoaurum*، *Mycobacterium shottsii*، *Mycobacterium gordonae ycobacterium homophile*، *Mycobacterium scrofulaceum*، *Mycobacterium szulgai* و ... اشاره کرد (۱).

بسیاری از ماهیان دوره طولانی حامل باکتری مایکوباکتریوم هستند، قبل از اینکه نشانه‌های بالینی بیماری بطور مشخص در آن‌ها تظاهر یابد. دوره کمون بیماری در ماهی‌ها متغیر است و دامنه‌ای از مرگ ناگهانی تا توسعه برای سال‌ها دارد. همه گونه‌های مایکوباکتریوم آبی می‌تواند موجب بیماری حاد یا مزمن در ماهی شوند که ممکن است با نشانه‌های بالینی متعدد و متنوع و اغلب شبیه به سایر بیماری‌ها همراه باشد (۱۳). علائم کلینیکال در ماهی غیراختصاصی و شامل از دست دادن پولک‌ها، زخم های پوستی، تغییرات رنگدانه، بیرون‌زدگی چشم‌ها، اتساع شکم، باله‌های خورده شده، رفتارهای غیرطبیعی، ناهنجاری‌های اسکلتی و .... می‌باشد (۱). علائم داخلی عفونت شامل بزرگ شدن کبد، طحال، کلیه و وجود ندول‌های سفید یا خاکستری رنگ گرانولومایی در اندام‌های داخلی می‌باشد. فرم حاد بیماری با تراکم بالای باکتری مرتبط است که بندرت اتفاق می‌افتد (۵). شدت علائم به عوامل مختلفی از جمله سن ماهی، شرایط تغذیه‌ای، فشار اکسیژن و ... بستگی دارد (۴).

مایکوباکتریوز یک بیماری زئونوز مرتبط با شغل است و بیشتر افرادی که با ماهی سرو کار دارند، در معرض خطر هستند. افراد ممکن است از طریق تماس پوست خراشیده با ماهی یا تماس وسیع با آب آکواریوم مبتلا شوند (۱). گرانولومای استخر شنا یک عفونت پوستی ناشی از *M. marinum* در انسان می‌باشد که بصورت التهاب حاد و مزمن تا گرانولومای توبرکولوئیدی دیده می‌شود. بیماری محدود به پوست بوده اما می‌تواند از طریق مسیرهای لنفی به غدد لنفاوی مجاور گسترش یابد. انتشار به مغز استخوان و احشاء شکمی به ندرت دیده می‌شود. انتشار عمومی نادر است اما در مورد افراد مبتلا به بیماری‌های تضعیف‌کننده ایمنی می‌تواند منجر به بیماری دستگاه تنفسی و در نهایت مرگ شود (۱۳، ۷). شواهدی از انتقال انسان به انسان مایکوباکتریوز وجود ندارد (۱۳). هدف از این تحقیق جداسازی و تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم از ماهی‌های قزل‌آلای پرورشی شهرستان سبزوار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۵۰ ماهی قزل‌آلای پرورشی که دارای علائم کلینیکال مانند بیرون‌زدگی چشم‌ها و از دست دادن پولک‌ها بودند، از هفت استخر پرورش ماهی از مناطق مختلف شهرستان سبزوار جمع‌آوری گردید. به منظور جمع آوری نمونه‌ها هفت استخر پرورش ماهی به طور همزمان مورد بررسی قرار گرفت. برای تعداد ۵۰ نمونه ماهی دارای علائم کلینیکال سه روز زمان سپری شد و از هر استخر پرورش ماهی تعداد مشخصی نمونه جمع‌آوری گردید (جدول۱). در حال حاضر، در شهرستان سبزوار در مجموع ۱۳ استخر پرورش ماهی بصورت فعال وجود دارد که این هفت استخر به دلیل گسترده‌تر بودن نسبت به سایر استخرها برای انجام تحقیق انتخاب شدند. این تحقیق در فاصله زمانی فروردین الی شهریورماه ۱۳۹۶ انجام شد.

مطالعه حاضر یک تحقیق توصیفی می‌باشد که به بررسی حضور و عدم حضور مایکوباکتریوم در ماهیان قزل‌آلای پرورشی استخرهای شهرستان سبزوار پرداخته است، لذا محاسبات آماری و آنالیز داده‌ها در این تحقیق صورت نگرفته است. با توجه به اینکه هدف از این تحقیق مطالعه و جداسازی مایکوباکتریوم و در صورت مثبت بودن تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم بوده است و تعیین شیوع از اهداف مطالعه نبوده لذا حجم نمونه تعیین نشده است.

نمونه‌های ماهی پس از شماره‌گذاری به شکل تازه و فریز شده به آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی سبزوار انتقال یافت و بر روی همه آن‌ها به صورت مجزا کالبدگشایی و کشت انجام شد. مراحل کشت شامل صلایه کردن، آلودگی زدایی، خنثی سازی، تغلیظ و کشت برای تمامی نمونه ها انجام پذیرفت.

الف) صلایه کردن

در شرایط استریل به وسیله تیغ اسکالپل قسمت‌هایی از احشاء (کبد، طحال، کلیه و روده)، سر و دم نمونه‌های ماهی برداشت گردید. سرو دم،

جدول۱- نتایج تحقیق بطور خلاصه

شماره استخر	تعداد نمونه ها	تعداد نمونه های مثبت	نتیجه رنگ آمیزی اسیدفست	نتیجه ۱۶s rRNA PCR	گونه شناسایی شده
۱	۷	۱	+	+	*M. peregrinum*
۲	۶	۱	+	+	*M. peregrinum*
۳	۷	۱	+	+	*M. peregrinum*
۴	۵	-	-	-	-
۵	۸	-	-	-	-
۶	۹	-	-	-	-
۷	۸	-	-	-	-

کبد، طحال و کلیه در یک هاون چینی و روده در هاون چینی دیگری (بعلت احتمال آلودگی بیشتر) قرار داده شد و با استفاده از شن استریل بصورت کامل صلایه گردید.

ب) آلودگی‌زدایی

به هر یک از هاون‌های حاوی تکه‌های نمونه، سود نرمال استریل به مقدار مساوی با حجم نمونه، اضافه شد و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت.

ج) خنثی‌سازی

در شرایط استریل و زیر هود ایمنی ۵ تا ۱۰ سی سی از مایع روئی هاون برداشت و به لوله فالکون استریل منتقل گردید. سپس بصورت قطره قطره، مخلوط معرف برموتیمول بلو و اسید کلریدریک (۱ تا ۲ قطره معرف برموتیمول بلو در۵ سی سی اسید کلریدریک نرمال) اضافه گردید تا زمانیکه pH محلول خنثی شد و محلول به سبز زیتونی تغییر رنگ داد.

د) تغلیظ

لوله‌های فالکون به مدت ۲۰ دقیقه در g ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و مایه رویی دور ریخته شد .

ه) کشت

به رسوب باقیمانده در هرلوله، حدود ۰/۵ میلی‌لیتر تامپون فسفاته اضافه و به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در هر یک از محیط‌های کشت شامل دو محیط کشت لونشتاین جانسون گلیسرول دار (LJG) و محیط کشت لونشتاین جانسون پیروات‌دار (LJP) تلقیح گردید و از هر محیط در دو دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از رشد باکتری‌ها برای اطمینان از اسید فست بودن آن‌ها رنگ‌آمیزی ذیل نلسن انجام شد. از باکتری‌های رشد یافته کشت مجدد تهیه و نمونه‌ها برای استخراج DNA به موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی منتقل گردید.

استخراج DNA و تعیین غلظت DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ

دستورالعملی که در این تحقیق برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت پروتکلی است که به وسیله ون سولینگن و همکاران او در سال ۱۹۹۷ طرح ریزی شد (۲۰).

مراحل استخراج DNA

برای کشتن باکتری از هر جدایه یک یا دو لوپ باکتری برداشت و به میکروتیوب حاوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر ۱X TE منتقل گردید و میکروتیوب‌ها به مدت یک ساعت در ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه مقدار ۵۰ میکرولیتر لیزوزیم به هر میکروتیوب اضافه و پس از ورتکس به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل ترمومیکسر قرار گرفت. سپس ۷۵ میکرولیتر مخلوط پروتئیناز K و SDS ۱۰ درصد به هر میکروتیوب اضافه و پس از ورتکس سریع به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. در ادامه به هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر محلول CTAB اضافه گردید و به مدت کوتاه ورتکس و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه ۷۵۰ میکرولیتر ایزوآمیل الکل-کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ترکیبات ذکر شده باعث ایجاد سه فاز آبی شد که لایه حاوی DNA درفاز بالایی قرار داشت. با کمک سمپلر به آهستگی فاز آبی که حاوی DNA بود برداشت و به یک میکروتیوب دیگرمنتقل گردید. ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به فاز آبی حاوی اسید نوکلئیک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میکروتیوب‌های حاوی DNA به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و مایع‌رویی دور ریخته شد. به هر میکروتیوب مقدار ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ و مایع‌رویی دور ریخته شد. میکروتیوب‌های حاوی رسوب DNA در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا خشک شود. در پایان به رسوب DNA، مقدار ۲۰ میکرولیتر بافر ۱x TE، ریخته شد تا کاملا حل شود. DNA استخراج شده برای تخمین میزان DNA و بررسی اولیه به وسیله الکتروفورز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعدی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ میزان و خلوص DNA به طور دقیق مشخص شد (۱).

آزمایش PCR بروی DNAهای استخراج شده برای شناسایی مایکوباکتریوم

از ژن ۱۶*S rRNA* اختصاصی مایکوباکتریوم و جفت پرایمر F: '۵ (ACGGTG GGTACTAGG TGTGGG TTTC) '۳ و R: '۵ (TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA) '۳ برای تکثیر قطعه pb ۵۴۳ استفاده شد. PCR با حجم نهایی ۱۶ میکرولیتر که با استفاده از Master mix و حجم هریک از پرایمرها یک میکرولیتر (۵ پیکو مول) و ۱۰۰-۱۵۰ نانوگرم DNA و تنظیم حجم نهایی با آب مقطر انجام شد.

برنامه حرارتی PCR به صورت واسرشت اولیه DNA به مدت سه دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۲۵ چرخه دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد بمدت یک دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه،۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت یک دقیقه انجام شد. در پایان نیز برای طویل نمودن نهایی یک مرحله حرارتی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید (۵). برای مشاهده محصول PCR از ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

تعیین سکانس

محصول PCR به همراه پرایمرهای ذکرشده به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، نتایج به دست آمده با برنامه BLAST مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

از تعداد هفت استخر پرورش ماهی در شهرستان سبزوار، از سه استخر شماره یک، دو و سه که درفاصله مکانی نزدیک به هم قرار داشتند

تعدادی نمونه ماهی دارای علائم کلینیکال (جدول۱) جداسازی شد، که از این تعداد از هر استخر تنها یک نمونه مثبت (آلوده به مایکوباکتریوم) گزارش شد و از چهار استخر باقی‌مانده نمونه مثبتی جداسازی نشد. پس از گذشت یک هفته از زمان کشت، کلنی‌هایی به شکل گل کلم روی محیط‌های کشت ظاهر شد که نشان دهنده احتمال وجود مایکوباکتریوم سریع‌الرشد می‌باشد.

به منظور تشخیص اسید فست بودن باکتری‌های رشدیافته، رنگ‌آمیزی ذیل نلسن انجام شد و نتیجه رنگ‌آمیزی برای سه نمونه مذکور، مثبت گزارش شد. سپس برای تایید عفونت مایکوباکتریومی، 16s rRNA-PCR انجام شد. با انجام PCR در ایزوله‌های اسید فست، تعلق داشتن هر سه نمونه جداشده به مایکوباکتریوم تائید گردید. اعمال این استراتژی در مورد تمام جدایه‌ها منجر به مشاهده یک باند الکتروفورزی مشخص به اندازه ۵۴۶ جفت باز روی ژل آگارز گردید (شکل۱).

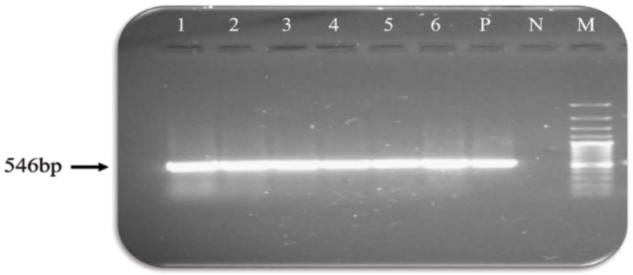
برای تعیین هویت، نتایج سکونسینگ محصول PCR با استفاده از برنامه BLAST بررسی شد. در این تحقیق، سه جدایه اسیدفست رشد نمود که سکانس هر سه جدایه با ۹۹ درصد شباهت به گونه سریع‌الرشد *Mycobacterium peregrinum* تعلق داشت (شکل ۲).

بحث

در سال‌های اخیرمطالعات متعددی در مورد آلودگی ماهیان به مایکوباکتریوم‌ها در نقاط مختلف دنیا صورت گرفته است. نتایج این تحقیقات نشان‌دهنده گسترش جهانی این میگروارگانیسم می‌باشد (۵).

گونه جداسازی شده در این تحقیق، *M. peregrinum*، جزء کمپلکس *M. fortuitum* است (۶). یک گونه سریع‌الرشد و یک پاتوژن فرصت طلب می‌باشد. زیستگاه این گونه آب و خاک می‌باشد و می‌تواند بدون میزبان در محیط وجود داشته باشد (۳). مهاجری و همکاران (۱۴)، فراوانی گونه‌های مایکوباکتریوم آتیپیک استان کرمانشاه را در ۱۱۰ نمونه آب مورد بررسی قرار دادند که از این تعداد ۳۵ نمونه آلوده مشاهده شد و گونه‌های *Mycobacterium aurum*، *Mycobacterium goodi* و *Mycobacterium gastri* با فراوانی ۱۱/۵ درصد و گونه‌های *Mycobacterium smegmatis*، *M. peregrinum*، *Mycobacterium porcinum*، *Mycobacterium mucogenicum* و *M. chelonae* با فراوانی ۸ درصد جداسازی شد (۱۴). کرمانشاه منطقه‌ای سردسیر است و همان طور که گفته شد *M. peregrinum* از نمونه‌های آب این منطقه جداسازی شده، بنابراین به نظر می‌رسد که ماهی قزل‌آلا به عنوان یک ماهی سردآبی، می‌تواند میزبان مناسبی برای این گونه باشد. رهبر و همکاران (۱۸)، ۳۵۰ نمونه خاک و همچنین ۱۲۰ نمونه آب از شهرستان ارومیه را مورد بررسی قرار دادند که از این تعداد، ۶۵ نمونه خاک، آلوده به مایکوباکتریوم‌های غیرسلی بود و بیشترین درصد فراوانی مربوط به گونه *M. fortuitum* (۵/۱۴ درصد)، *M. peregrinum* (۳/۴ درصد)، *M. flavescens* (۲/۵۸ درصد)، *M. chelonae* و *M. mucogenicum* هر کدام با فراوانی ۱/۷۱ درصد، *Mycobacterium thermoresistible* (۱/۱۴ درصد)، *M. abscessus* (۰/۸۵ درصد)، M. *neoaurum* و *M. smegmatis* هر کدام با فراوانی ۰/۵۷ درصد و *M. fortuitum* third biovalant complex ۳ با فراوانی ۰/۸۵ درصد گزارش شد. از نمونه‌های آب نیز تنها در ۱۰ مورد مایکوباکتریوم غیرسلی جداسازی شد که *M. fortuitum* و *M. chelonae* با ۲/۵ درصد بیشترین فراوانی و *M. abscessus*، *M. peregrinum* و *M. smegmatis* هر کدام با فراوانی ۰/۸۴ درصد گزارش شد (۱۸). ارومیه منطقه سردسیر است که در این منطقه نیز *M. peregrinum* از آب و خاک جداسازی شده است. رعایایی و همکاران (۱۸)، به بررسی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی در خاک اهواز پرداخت که در این تحقیق *M. peregrinum* جداسازی نشد (۱۸). با توجه به اینکه گونه *M. peregrinum* از خاک اهواز به عنوان یک منطقه گرمسیر، جداسازی نشده اما از آب کرمانشاه و آب و خاک ارومیه (منطقه سردسیر) جداسازی شده است، می‌توان احتمال داد که این گونه تمایل بیشتری به مناطق سردسیر دارد و بنابراین ماهی قزل‌آلا که سردآبی است می‌تواند میزبان مناسبی برای این گونه نسبت به ماهیان گرم‌آبی باشد. اما به طور قطع نمی‌توان بیان کرد که این گونه به طور کلی در مناطق گرمسیر وجود ندارد و در این زمینه باید تحقیقات بیشتری در مناطق گرمسیر و سردسیر صورت پذیرد. همچنین فاکتورهای مختلفی از جمله روش‌های آلودگی‌زدایی می‌تواند بر نتایج گونه‌های به دست آمده موثر باشد. عوامل دیگری مانند شرایط آب و هوایی و پوشش گیاهی بر فلور موجود در آب و خاک یک منطقه موثر خواهد بود (۱۸). همانطور که بیان شد گونه *M. peregrinum* از آب و خاک کرمانشاه و ارومیه به عنوان مناطق سردسیر، جداسازی شده است و با توجه به تفاوت شرایط آب و هوایی این مناطق با منطقه گرمسیر سبزوار و اینکه از هفت استخر پرورش ماهی تنها در سه استخر، در فاصله مکانی نزدیک به هم، آلودگی وجود داشته است، به نظر می‌رسد این گونه جزء فلور شهرستان سبزوار نبوده و احتمال می‌رود که آلودگی از طریق دیگری به عنوان مثال غذای آلوده، به ماهیان منتقل شده است.

همان‌طور که گفته شد *M. peregrinum* گونه‌ای فرصت طلب است و در آب و خاک وجود دارد بنابراین در شرایط مناسب (استرس) می‌تواند برای حیوانات از جمله ماهی، بیماری‌زا باشد (۳). گونه *M. peregrinum* برای انسان نیز بیماری‌زا بوده و بخصوص در افراد دارای نقص ایمنی می‌تواند سبب عفونت‌های پوستی و بافت نرم، باکتریمی و پنومونی شود (۳، ۶، ۹، ۱۹، ۱۰). در داخل کشور این گونه تاکنون از موارد انسانی جداسازی نشده است اما در کشورهای دیگر، گزارش‌هایی مبنی بر عفونت انسان با



شکل۱- نتایج PCR . ستون ۶-۱ نمونه های جدا شده از ماهی. ستون P: کنترل مثبت. ستون N: کنترل منفی. ستون M: سایز مارکر استفاده شده. (اصلی)

این باکتری وجود دارد. کامیجو و همکاران (۱۰)، توانستند از یک عفونت پوستی گونه *M. peregrinum* را جداسازی کنند (۱۰). همچنین تادوروال و همکاران (۱۹)، این گونه را از ضایعات ریوی یک مرد ۷۲ ساله جداسازی کردند (۱۹).

در ایران نیز تاکنون چندین گونه مایکوباکتریوم از ماهیان مختلف جداسازی شده است. قاضی سعیدی و همکاران (۷)، از ۱۱۳ آبشش ماهیان سردآبی خاویار بندر ترکمن، ۱۱ مورد مایکوباکتریوم شناسایی کردند که تنها دو مورد *M. marinum* و بقیه موارد سایر مایکوباکتریوم‌ها بجز *M. peregrinum* بوده است. روش خنثی‌سازی و محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق، مشابه تحقیق حاضر است، تنها تفاوت این دو تحقیق در نوع ماهی مورد بررسی می‌باشد (۷)، همچنین اکبری و همکاران (۱)، در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی از ماهیان زینتی استان البرز، گونه *M. fortuitum* را جداسازی کردند (۱)، که در روش آلودگی‌زدایی علاوه بر محلول سود، برای نمونه‌هایی با آلودگی کمتر از مخلوط سدیم نیترات و ان استیل ال سیستئین نیز استفاده شد. برای کشت علاوه بر محیط لونشتاین جانسون از محیط هرولد نیز استفاده شده است که می‌تواند در نتایج حاصل موثر باشد. علاوه براین نوع ماهی‌های مورد بررسی نیز متفاوت بوده است. امینی و همکاران (۱۳)، در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، ۵۰ نمونه ماهی سردآبی قزل‌آلا و همچنین ۵۰ نمونه ماهی گرم‌آبی استان البرز را مورد بررسی قرار داد، که از ماهیان سردآبی قزل‌آلا، علاوه بر *M. peregrinum*، گونه‌های *M. gordonae* و *Mycobacterium septicum* نیز جداسازی شد. اما از ماهیان گرم‌آبی سایر مایکوباکتریوم‌ها بجز گونه *M. peregrinum* جداسازی شد (۱۳). در این تحقیق نیز مشابه اکبری و همکاران (۱)، برای آلودگی‌زدایی، از مخلوط سدیم نیترات و ان استیل ال سیستئین و محلول سود و برای کشت، از محیط هرولد و لونشتاین جانسون استفاده شد. ماهی سردآبی مورد بررسی قزل‌آلا بود و مشابه تحقیق حاضر روی ۵۰ نمونه ماهی انجام شد که البته علاوه بر *M. peregrinum* دو گونه دیگر نیز جداسازی شد. علاوه بر تفاوت در روش خنثی‌سازی و نوع محیط کشت، عوامل دیگری از جمله وسعت بیشتر استان البرز نسبت به شهرستان سبزوار، وجود منابع آبی بیشتر و در نتیجه احتمال آلودگی بیشتر، باعث شد از ماهی قزل‌آلا گونه‌های دیگری نیز جداسازی شود. با توجه به مطالب گفته شده، در داخل کشور گونه *M. peregrinum* تنها از ماهیان سردآبی قزل‌آلا جداسازی شده است و در نمونه‌های ماهیان زینتی و گرم‌آبی مشاهده نشده است. البته این موضوع نمی‌تواند دلیل قطعی بر عدم وجود این گونه در ماهیان زینتی و گرم‌آبی باشد و به تحقیقات بیشتری نیاز دارد. در تحقیق حاضر اگر تعداد نمونه‌های مورد مطالعه بیشتر بود احتمال داشت گونه‌های بیشتری جداسازی شود. همچنین برای آلودگی‌زدایی تنها از سود نرمال و برای کشت نیز از محیط لونشتاین جانسون استفاده شد که در نتایج بدست آمده می‌تواند موثر باشد.

موتون و همکاران (۱۵)، از ۳۰ نمونه ماهی زینتی در آفریقای جنوبی *M. fortuitum* جداسازی کردند، در این تحقیق گونه *M. peregrinum*

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mycobacterium peregrinum strain B5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	MG757550.1
Mycobacterium peregrinum strain Y7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KU861818.1
Mycobacterium sp. DWMJ-1889A1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KU172920.1
Mycobacterium sp. DWMJ-1217B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KU172756.1
Mycobacterium sp. DWMJ-1217B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KU172755.1
Mycobacterium sp. DWMJ-1144A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KU172726.1
Mycobacterium peregrinum strain M1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KR827419.1
Mycobacterium arcueilense strain 269 16S ribosomal RNA, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	NR_151954.1
Mycobacterium arcueilense strain 082 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KP644744.1
Mycobacterium peregrinum strain DN74_7A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KP769442.1
Mycobacterium septicum strain WL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KP196814.1
Uncultured bacterium clone Reactor4_80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	JQ629815.1
Uncultured bacterium clone Reactor3_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	JQ629704.1
Uncultured bacterium clone Reactor3_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	JQ629660.1
Uncultured bacterium clone Reactor1_85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	JQ629545.1
Mycobacterium peregrinum strain JS-201205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	KC292269.1
Mycobacterium peregrinum strain AFP-000191 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	JX266704.1

شکل۲- بررسی نتایج تعیین توالی با برنامه BLAST

جداسازی نشده است. با توجه به اینکه محیط کشت استفاده شده در این تحقیق نیز لونشتاین جانسون است، تفاوت در گونه جداسازی شده در مطالعه می‌تواند علل دیگری داشته باشد (۱۵).

در مطالعه ویپس و همکاران (۲۱، ۲۲)، روی ماهی زینتی گورخری با استفاده از روش ستیل پریدینیوم کلراید برای آلودگی‌زدایی و محیط‌های کشت میدل بروک و لونشتاین جانسون گونه‌های مختلفی شامل, *M. haemophilum, M. marinum, M. chelonae, M. fortuitum* و *M. abscessus* و *M. peregrinum* جداسازی شد (۲۲، ۲۱). آراناز و همکاران (۳)، گونه *M. peregrinum* را در ۱۴ نمونه از یک نوع ماهی پرورشی سردآبی (*Tinca tinca*) جداسازی کردند که در این روش برای آلودگی‌زدایی از هگزا دسیل پیریدینیوم کلراید و برای کشت از محیط‌های لونشتاین جانسون و میدل بروک استفاده شد، با این تفاوت که نوع ماهی سردآبی قزل‌آلا نبود و روش آلودگی‌زدایی نیز با تحقیق حاضر متفاوت بود، بنابراین می‌توان نتیجه گیری کرد که این نوع ماهی سردآبی هم می‌تواند میزبان این گونه از باکتری باشد و این باکتری نسبت به دو روش آلودگی‌زدایی مقاوم است (۳). هانگسلو و همکاران (۹)، در سوئد به بررسی وجود مایکوباکتریوم در ۱۲۰ ماهی زینتی پرداختند که *M. marinum* با فراوانی ۵۰ درصد، M. fortuitum و *M. peregrinum* هر کدام با فراوانی ۲۹ درصد، *M. gordonae* با فراوانی ۲۱ درصد و *M. chelonae* با فراوانی ۱۳ درصد جداسازی شد. برای آلودگی‌زدایی از ان استیل ال سیستئین سدیم کلراید استفاده شده است و نسبت به محلول سود مورد استفاده در تحقیق حاضر قدرت کمتری دارد و برای کشت علاوه بر محیط لونشتاین جانسون از میدل بروک هم استفاده شده است که در نتایج حاصل می‌تواند موثر باشد (۹).

کوسار و همکاران (۱۱)، در یک بررسی جداسازی مایکوباکتریوم از ۱۰۷ ماهی زینتی را انجام دادند که۹۰ درصد از جدایه‌ها شامل گونه های *M. marinum, M. fortuitum* و *M. chelonae* و ۱۰ درصد گونه‌های دیگر شامل *M. peregrinum/ septicum, M. gordonae, Mycobacterium arupense, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium setense* بود. برای آلودگی‌زدایی از فنوکسی اتانول و برای کشت از محیط میدل بروک و لونشتاین جانسون استفاده شده است، در این تحقیق ماهیان مورد بررسی زینتی بوده و *M. peregrinum* جداسازی شده است، بنابراین این گونه، به این روش آلودگی‌زدایی نیز مقاوم بوده است (۱۱).

پوک و همکاران (۱۷)، *M. fortuitum*، *M. peregrinum*، *M. marinum* و *M. abscessus* را از۲۷ ماهی زینتی جداسازی کردند، برای آلودگی‌زدایی از تری‌کائین متانوسولفونات و برای کشت از لونشتاین جانسون استفاده شده است (۱۷)، که در این تحقیق *M. peregrinum* همراه با گونه‌های شایع آلوده‌کننده ماهی‌ها نیز جداسازی شده، علیرغم اینکه تعداد ماهیان مورد بررسی زیاد نبوده با این وجود گونه *M. peregrinum* جداسازی شده است که به این روش آلودگی‌زدایی نیز مقاوم بوده است.

با توجه به مطالب فوق، در خارج از کشور بیشتر موارد آلودگی به مایکوباکتریوم‌ها در ماهیان زینتی بوده و *M. peregrinum* با وجود روش‌های آلودگی‌زدایی متفاوت، گونه شایع در بیشتر موارد آلودگی‌ها بوده است اما در داخل کشور این گونه تاکنون از ماهیان زینتی جداسازی نشده و فقط از ماهیان سردآبی جداسازی شده است که این به معنای عدم وجود این گونه در ماهیان زینتی نمی‌باشد و نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه دارد. به طورکلی در داخل کشور در مقایسه با خارج از کشور در زمینه آلودگی ماهیان به مایکوباکتریوم‌ها تحقیقات کمی صورت گرفته، که می‌تواند باعث تفاوت در نتایج شود.

با توجه به اینکه *M. peregrinum* در داخل کشور و نیز در خارج از کشور از ماهی‌ها جداسازی شده و دو مورد هم عفونت پوستی و عفونت ریوی از نمونه انسانی گزارش شده است (۱۹، ۱۰)، بنابراین تحقیق حاضر در مورد جداسازی این گونه از ماهیان قزل‌آلا حائز اهمیت بوده و به افراد بخصوص دارای نقص ایمنی که در تماس با ماهی هستند، ضروری است هشدارهای لازم داده شود.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق، منشاء آلودگی ماهیان قزل‌آلای شهرستان سبزوار مشخص نشده است و اینکه آیا گونه جداسازی شده جزء فلور منطقه بوده و یا آلودگی در نتیجه سایر عوامل ایجاد شده است یا خیر، در هاله‌ای از ابهام قرار دارد. پاسخ به این سوال و بسیاری سوالات مشابه نیاز به بررسی بیشتر و گسترده تر دارد.

منابع مورد استفاده

1- Akbari, Sh., N. Mosavari, K. Tadayon, and H. Rahmati-Holasoo. 2014. Isolation of *Mycobacterium fortuitum* from fish tanks in Alborz, Iran. *Iranian journal of Microbiology*. 6(4): p. 234–239.

2- Antuofermo, E., A. Pais, M. Polinas, T. Cubeddu, M. Righetti, M.A. Sanna, and M. Prearo. 2017. Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in reared mullets: first evidence from Sardinia (Italy). *Journal of Fish Diseases*. 40(3): p. 327-337.

3- Aranaz, A., A. J. Gibello, J. Alvarez, and A. I. Mata. 2008. *Mycobacterium peregrinum* infection in farmed European tench (Tinca tinca L). *Veterinary Microbiology*.131: p. 393-399.

4- Bragg, R. R., Hildegard, F. A. K. Huchzermeyer, and Monica A. M. Hanisch. 1990. *Mycobacterium fortuitum* Isolated from three species of fish in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* 57: p.101-102.

5- Gauthier, D.T. and M. W. Rhodes. 2009. Mycobacteriosis in fishes: A review. *The Veterinary Journal*. 180(1): p. 33-47.

6- Gcebe, N., A. L. Michel., and T. M. Hlokwe. 2018. Non-tuberculous *Mycobacterium* species causing mycobacteriosis in farmed aquatic animals of South Africa. *Biology Medicine Central.* 18: (32).

7- Ghazi-Saeidi, K., R. Hashemzadeh, M. Mohammadi, F. D. Fatemi-Nasab, and E. Ghaemi. 2006. *Mycobacterium mainum* infection in caviar fishes and fishermans in Ashorada of Golestan province in North of Iran. *Journal of Gorgan University of Medicl Sciences.* 8(2): p. 60-62. (In Farsi).

8- Hashish, E., A. Merwad, Sh. Elgaml, A. Amer, H. Kamal, A.

Elsadek, A. Marei, and M. Sitohy. 2018. Mycobacterium marinum infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review. *Veterinary Quarterly.* 38(1): p. 35-46.

9- Hongslo, T. and E. Jansson. 2014. Occurence of different species of mycobacteria in aquarium fish from Swedish pet-shops. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 34(3): p. 78-86.

10- Kamijo, F., H. Uhara, and H. Kubo. 2012. A Case of Mycobacterial Skin Disease Caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a Review of Cutaneous Infection. *Case Reports in Dermatology.* 4(1): p. 76-79.

11- Kusar, D., U. Zajc, V. Jencic, M. Ocepek, J. Higgins, M. Zolnir-Dovc, and M. Pate. 2017. Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *Journal of Fish Diseases.* 40(6): 773-784.

12- Lescenko, P., L. Dvorska, L. Matlova, and I. Pavlik. 2003. Mycobacterial infection in aquarium fish. *Veterinary Medicina*. 48(3): p. 71-78.

13- Mobasher-Amini, A. 2017. Isolation, Molecular identification and DNA fingerprinting of Mycobacterium from fish culture farms offer in Karaj city. MSc thesis. Tabriz Higher Education Institude of Rab- rashidgraduation. Tabriz, Iran.

14- Mohajeri, P., L. Yazdani, A. Hashemi shahraki, A. Alvandi, S. Atashi, A. Farahani, A. Almasi, and M. Rezaei. 2016. Verification of Frequency in Speceis of Nontuberculous Mycobacteria in Kermanshah Drinking Water Supplies Using the PCR-Sequencing Method. *Microbial Drug Resistance.* 23(3): p. 359-364.

15- Mouton, E., L. Basson, D. Impson. 2001. Healthstatus of ornamental freshwater fishes imported to South Africa: a pilot study. *Aguarium Science and Conservation*. 3(4): p. 313- 319.

16- Pourahmad, F., M. Nemati, and R.H. Randolph. 2013. Comparison of three methods for detection of *Mycobacterium marinum* in goldfish (Carassius auratus). *Aquaculture*. 422-423: p. 42-46.

17- Puk, K., T. Banach, A. Wawrzyniak, and L. Adaszek. 2017. Detection of *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium fotuitum*, *Mycobacterium abscessus* in aquarium fish. *Journal of Fish Diseases.* 4(1): p. 1-5.

18- Rahbar, F., A. Lamei, and H. Babazadeh. 2010. Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. *African Journal of Biotechnology.* 24(9): p. 3618-3621.

19- Todorval, T. T., V. Kaludova, G. Tsankoval, and N. Ermenlieva. 2015. A pulmonary infection caused by *Mycobacterium peregrinum*- a case report. *Journal of IMAB.* 21(4): p. 1000-1002.

20- Van Soolingen, D. T., T. Hoogenboezem, PE. deHaas, PW. Hermans, MA. Koedam, KS. Teppema, PJ. Brennan, GS. Besra, F. Portaels, J. Top, LM. Schouls, and JD. van Embden. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacyetium tuberculosis* complex, canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Sestematic Bacteriology.* 47: p. 1236- 1245.

21- Whipps, C.M., S. T. Dougan, and M. L. Kent. 2007. *Mycobacterium haemophilum* infection of zebrafish in research facilities. *Federation of European Microbiological Societies Microbiolog Letters.* 270(1): p.21-26.

22- Whipps, C.M., C. Lieggi, and R. Wagner. 2012. Mycobacteriosis in Zebrafish Colonies. *Institude for Laboratory Aminal Research.* 53(2): p. 95–105.