دوره پانزدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۳۹۸
DOI: 10.22055/ivj.2018.145196.2066

بررسی نقش باکتری *ویبریو هاروی* در تلفات ماهیان باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) در مزارع استان‌های جنوبی کشور به روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

اشکان اژدری[۱*]، مسعود قربانپور[۲]، رحیم پیغان[۳]، مینا آهنگرزاده[۴] و مریم میربخش[۵]

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱

چکیده

ویبریو هاروی به عنوان بخشی از فلور روده‌ی ماهیان دریایی گوشتخوار، یکی از عوامل اصلی ایجاد بیماری ویبریوز ماهی باس دریایی آسیایی در بسیاری از مزارع پرورش در قفس در دنیا محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی نقش این باکتری در تلفات ماهی باس دریایی آسیایی در مناطق جنوبی کشور بود. در این مطالعه در بررسی ۱۱ مورد تلفات ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی، تعداد ۱۱۰ قطعه ماهی (۸۰ قطعه ماهی بیمار و تعداد ۳۰ قطعه ماهی به ظاهر سالم) از مزارع استان‌های جنوبی کشور (خوزستان، بوشهر و هرمزگان) نمونه‌برداری و کشت باکتریایی از اندام‌های داخلی آن‌ها انجام گردید. باکتری‌های جدا شده از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و ملکولی (با پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه) مورد بررسی قرار گرفتند. ۹ مورد از تلفات (۸۱/۸۱ درصد)، عامل بیماری، جنس ویبریو (*Vibrio sp.*) تشخیص داده شد. نتایج نشان داد در ماهیان دارای علایم ویبریوز، در ۷۰/۷۶ درصد موارد، باکتری جدا شده، *ویبریو هاروی* بوده است. در همچنین در بررسی فصلی میزان شیوع *ویبریو هاروی*، تلفات ناشی از ویبریوز و بیش‌ترین میزان شیوع آلودگی به این باکتری در فصل بهار مشاهده شد. آزمایش سنجش حساسیت ضد میکروبی ۴۶ جدایه *ویبریو هاروی* جدا شده نیز بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان دهنده‌ی نقش قابل توجه *ویبریو هاروی* در تلفات ناشی از ویبریوز در مزارع پرورش ماهی باس دریایی آسیایی در استان‌های جنوبی است. این نتایج به منظور پیش‌گیری (مدیریت بهداشتی و واکسیناسیون) و درمان مؤثر بیماری ویبریوز در پروش ماهی باس دریایی آسیایی اهمیت زیادی دارد.

کلمات کلیدی: *ویبریو هاروی*، باس دریایی آسیایی، پرورش در قفس، ویبریوز، PCR

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی در صنعت آبزی‌پروری می‌شوند. در بین عوامل ایجاب‌کننده‌ی بیماری‌های باکتریایی در آبزی-پروری ماهیان دریایی، ویبریوها خصوصاً *ویبریو هاروی* (*Vibrio harveyi*) بسیار مورد توجه است به طوری که یکی از بیماری‌های شایع ماهی باس دریایی آسیایی در کشورهای استرالیا، مالزی و اندونزی (تولیدکنندگان اصلی این ماهی)، ویبریوز ناشی از باکتری *ویبریو هاروی* است (Gibson-Kueh 2012). خسارت اقتصادی ناشی از ویبریوز در کشور مالزی در سال ۱۹۹۰، ۷/۴ میلیون گزارش شده است (Ransangan and Mustafa 2009). همچنین گزارش‌های متعددی از بیماری ناشی از *ویبریو*

[۱*] دانش آموخته دکتری بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز و کارشناس پژوهشکده آبزی پروری میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران E-mail: a_arzhan@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۴] استادیار پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
[۵] استادیار مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

هاروی از سایر گونه‌های پرورشی ماهیان دریایی از جمله ماهی هامور معمولی ماهی شانک سیاه، شانک زرد باله، سوکلا، صبیتی پرورشی و غیره وجود دارد (Ransangan et al. 2012). اگر چه در مناطق مختلف، از ماهیان بیمار با علایم درمانگاهی مختلف، گزارش جداسازی گونه‌های مختلف *ویبریو* وجود دارد اما در منابع اشاره شده است که، فلس ریزی، بیماری آنتریت گوارشی و زخم‌های چشم در انواع گونه‌های ماهی در اثر *ویبریو هاروی* حادث می‌شود (Noga 2010).

ویبریوها، به عنوان فلور غالب آب‌های دریایی به ویژه مناطق مصبی و خورها با تراکم (فراوانی) متوسط 10^2 تا 10^5 سلول در هر میلی‌لیتر آب گزارش شده است (Ransangan and Mustafa 2009, Gomez et al. 2004). *ویبریو هاروی* یک باکتری فرصت‌طلب است و در مورد پاتوژن اولیه یا ثانویه بودن این باکتری اختلاف نظر وجود دارد؛ اما به هر حال تحت شرایط استرس‌زا، از قبیل تغییرات دمایی، دست‌کاری و یا کاهش کیفیت آب تبدیل به یک پاتوژن شده و ایجاد بیماری می‌کند (Mirbakhsh et al. 2014). سویه‌های مختلف این عامل به مقدار زیادی از نظر حدت متنوع بوده و گزارش‌هایی نیز وجود دارد که برخی از سویه‌ها می‌توانند بدون دخالت استرس، باعث ایجاد بیماری شوند. این باکتری عامل اصلی بیماری ویبریوز در ماهیان دریایی از قبیل هامورماهیان، شانک ماهیان، سوکلا، باس دریایی، سرخو ماهیان و غیره بوده و در حال حاضر در آبزی‌پروری ماهیان دریایی کشورهای آسیای جنوب شرقی، به ویژه در سیستم پرورش در قفس مشکل بزرگی محسوب می‌شود (Austin and Austin 2016). ماهی باس دریایی آسیایی از خانواده‌ی *Latidae* (*Lates perches*) با نام علمی *Lates calcarifer* و با نام عمومی بارامونده‌ی (Barramundi) در استرالیا، هم اکنون در استان‌های جنوبی کشور در قفس و استخر خاکی پرورش داده می‌شود. با وجود ویژگی‌های بیولوژیک مطلوبی که این گونه برای آبزی‌پروری دریایی دارد، اما در برابر گونه‌هایی از جنس *ویبریو* مقاومت ضعیفی دارد، به طوری که در بیش‌ترین گزارش‌های مستند از تلفات آن در قفس‌های پرورشی در سایر کشورها، باکتری *ویبریو هاوری* و *ویبریو آلجینولیتیکوس* جدا شده است. افزایش بار مواد آلی و سایر عوامل استرس‌زا، می‌توانند باعث تسریع شیوع این بیماری شوند. این بیماری ممکن است، به صورت حاد و یا مزمن بروز نماید (Gibson-Kueh et al. 2012, Noga 2010).

بسیاری از محققین *ویبریو هاروی* را، یک گونه با ویژگی‌های ژنتیکی و پروفایل پروتئینی بسیار متنوع معرفی نموده‌اند و توصیه کرده‌اند که در بررسی‌های تشخیصی ویبریوها به روش‌های سنتی جداسازی و تشخیص بیوشیمایی اکتفا نشده و تأیید ملکولی نیز انجام گردد. مطالعه‌ی Ransangan و Mustafa در سال ۲۰۰۹ نیز نشان داده است که در تعیین عامل ویبریوز، نمی‌توان به نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی به خصوص در تشخیص *ویبریو هاروی* اکتفا کرد. در ایران با توجه به نوپا بودن صنعت تکثیر و پرورش ماهیان دریایی، هیچ مطالعه‌ی منتشر شده‌ای از وضعیت بهداشتی و بیماری‌های ماهی باس دریایی آسیایی وجود ندارد. از آن جا که تاکنون گزارشی از نقش *ویبریو هاروی* در تلفات ماهی باس دریایی در ایران مشخص نگردیده بود، در تحقیق حاضر، تلفات ناشی از این باکتری در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی در استان‌های جنوبی کشور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

از اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ تا اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶ به مدت یک سال نمونه‌گیری از ماهیان به ظاهر سالم و بیمار (دارای علایم ویبریوز) از مزارع فعال پرورش ماهی باس دریایی آسیایی در استان‌های هرمزگان، بوشهر و خوزستان به صورت فصلی و موردی (در صورت بروز تلفات و اطلاع رسانی مدیر مزرعه) انجام گردید (جدول ۲).

به منظور جداسازی *ویبریو*، ماهیان بیمار مشکوک به ابتلا به ویبریوز، به صورت زنده به آزمایشگاه بخش آبزیان گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل و کشت باکتریایی از کلیه، کبد، مغز، طحال، آبشش و انتهای روده‌ی آن‌ها طبق روش‌های استاندارد (Buller 2014, Ahangarzadeh et al. 2015) انجام گرفت. نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی Tryptic Soy Agar (TSA) حاوی ۲/۵ درصد نمک، تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری کلونی‌های مشکوک به *ویبریو* (کلونی‌های عسلی رنگ و نیمه شفاف با قطر حدود ۱ تا ۲ میلی‌متر) انتخاب و روی محیط TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar) و سپس روی محیط VHA *ویبریو هاروی* (*Vibrio Harveyi* Agar) اختصاصی – تفریقی *ویبریو هاروی* خالص‌سازی گردیدند.

پس از خالص‌سازی باکتری‌ها، جدایه‌هایی که گرم منفی (رنگ گرم و آزمایش 3%KOH)، اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند، به عنوان جدایه مظنون به جنس *ویبریو* در نظر گرفته شدند (Peyghan and Eftkhar manavi 2010) و جهت تشخیص جنس و گونه‌ی باکتری جدا شده، شناسایی ملکولی جدایه‌ها به روش PCR انجام گرفت. بعد از تشخیص ملکولی پرگنه‌های خالص‌سازی شده، با به کارگیری آزمون‌های بیوشیمیایی، واکنش جدایه‌های *ویبریو هاروی* به آزمایش‌های حرکت، تولید ایندول، مصرف سیترات، تولید اوره‌آز، تحمل نمک، تولید آرژینین دهیدرولاز، تولید لایزین دکربوکسیلاز، تولید اورنیتین دکربوکسیلاز و تخمیر قندهای گلوکز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، مالتوز، اینوزیتول و لاکتوز مشخص شد (Austin and Austin 2016, Buller 2014). جهت شناسایی مولکولی باکتری‌های جداسازی شده، ژنوم آن‌ها با حرارت استخراج شد (Ahangarzadeh et al. 2015). برای این کار، از دو تا سه کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری، در آب مقطر سوسپانسیونی تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) جوشانده شد و پس از ۲ دقیقه سانتریفوژ در دور ۱۳۵۰۰۰، مایع رویی از نظر کیفیت و کمیت DNA بررسی (Buller 2014, Tarr et al. 2007) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی جنس انجام شد.

PCR به صورت دوگانه (دبل پلکس) انجام شد، به طوری که همزمان جنس و گونه (*ویبریو هاروی*) مشخص گردید. جهت تشخیص ملکولی مطابق روش Chatterjee و Haldar در سال ۲۰۱۲ از پرایمرهای اختصاصی ژن 16s rRNA (اختصاصی جنس *ویبریو*) و ژن همولایزین (اختصاصی *ویبرو هاروی*)، استفاده شد (جدول ۱). PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر استریلِ فاقد DNAse و در دستگاه ترموسایکلر (Master cycler, Eppendorf) انجام گردید. برای این کار، در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۹/۵ میکرولیتر آب مخصوص PCR، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از DNA استخراج شده برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید. جهت تکثیر ژن هدف پس از بهینه‌سازی، از برنامه‌ی دمایی شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای (۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۳۲ چرخه شامل واسرشته‌سازی ((۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمر ((۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه)، تکثیر (۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه) و تکثیر نهایی در دمای (۷۲°C به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن مورد هدف در نهایت، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰bp (سیناژن، ایران) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۲ درصد حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (Uvitec، انگلستان) با نور UV باندهای تشکیل شده مشاهده گردید. در صورت تولید محصول-های به ترتیب با طول ۶۶۸bp و ۲۱۵bp در کنار کنترل مثبت با کد (PTCC 1755)، جدایه مورد نظر *ویبریو*

هاروی در نظر گرفته شد؛ در صورت مشاهده‌ی باند ۶۶۸bp و عدم مشاهده‌ی باند ۲۱۵bp جدایه مورد نظر گونه‌ای از *ویبریو* در نظر گرفته می‌شد (Chatterjee and Haldar 2012).

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص باکتری‌های جنس *ویبریو* و *ویبریو هاروی*

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار(bp)	منبع
16 S rRNA F	5′-CGGTGAAATGCGTAGAGAT-3′	*Vibrio sp.*	۶۶۸	Tarr, et al, 2007
16 S rRNA R	5′- TTACTAGCGATTCCGAGTTC-3′	*Vibrio sp.*	۶۶۸	
Vibhar F	5′- TCAGTGCCTCTCAAGTAAGA -3′	*V. harveyi*	۲۱۵	Conejero and Hedreyda, 2004
Vibhar R	5′- GCTTGATAACACTTTGCGGT-3′	*V. harveyi*	۲۱۵	

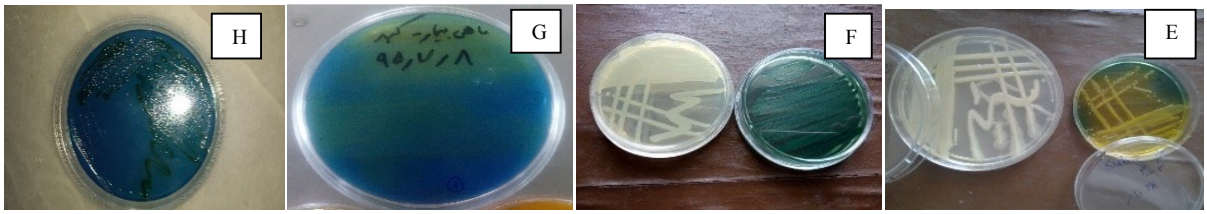
در مرحله‌ی بعد، پس از جداسازی جدایه‌های ویبریو هاروی بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام شد. برای سنجش حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها از روش انتشار دیسک استفاده شده و بر طبق دستورالعمل موجود در سند شماره M31-A3 مؤسسه‌ی استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI 2008) اقدام گردید. در این روش ابتدا پرگنه‌های رشد یافته در محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) (تصویر ۲) برداشته شده و به لوله‌های آزمایش حاوی محیط تریپتیک سوی براث (TSB) منتقل گردید. محیط به مدت ۴ تا ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد تا غلظت میکروبی معادل کدورت استاندارد نمره ۰/۵ مک فارلند به دست آید، این غلظت حاوی حدوداً ۳×۱۰^{۵} واحد تشکیل دهنده‌ی پرگنه (CFU) در میلی‌لیتر بود. با سواب استریل از تعلیق باکتری داخل لوله‌ها برداشته شده و در پلت حاوی محیط آگار مولر – هینتون کشت سفره‌ای داده شد. سپس دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک (شرکت پادتن طب) به فاصله‌ی ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفتند. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری هاله‌ی ممانعت از رشد و تفسیر نتایج به دست آمده نیز بر اساس دستورالعمل مؤسسه‌ی استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی اقدام شده و جدایه‌ها به صورت مقاوم (R)، با حساسیت متوسط (I) و حساس (S) توصیف گردیدند (جدول ۴). در طی این آزمایش، حساسیت جدایه‌ها نسبت به ۸ عامل ضد میکروبی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (Narouie et al. 2016).

نتایج

در این مطالعه در مجموع ۱۱ مورد تلفات ویبریوز ماهی باس دریایی بررسی گردید. ماهی‌های مبتلا دارای علایم مشخصه‌ی ویبریوز (تصویر ۱) شامل زخم‌های جلدی، التهاب روده (آنتریت)، خون‌ریزی (هموراژی) در چشم و قرمزی اطراف مخرج و تورم اندام‌های داخل از جمله طحال و کلیه و کبد بوده است.

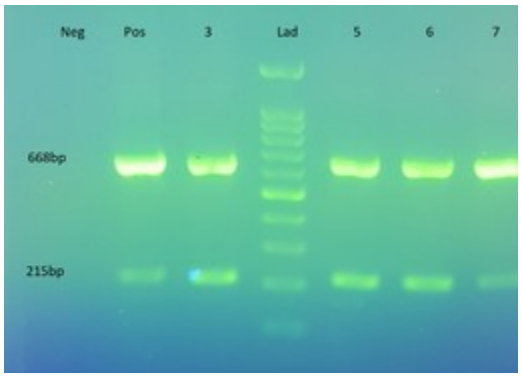
تصویر ۱: ماهی باس دریایی آسیایی پرورش در قفس با علایم زخم و خونریزی در پایه‌ی باله و سرپوش آبششی (A و B)، آنتریت روده‌ای و کبد رنگ پریده و بزرگ شدن طحال (C و D).

از اندام‌های داخلی و ضایعات جلدی احتمالی ۸۰ قطعه ماهی با علایم ویبریوز (تصویر ۱) و ۳۰ قطعه ماهی به ظاهر سالم در مجموع ۸۶ جدایه مشکوک به جنس *ویبریو* جدا شد (باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت که روی محیط TCBS (تصویر ۲ E و F) خالص-سازی شده بودند). از این ۸۶ جدایه‌ی مشکوک به *ویبریو*، تعداد ۶۵ جدایه روی محیط اختصاصی *ویبریو هاروی* VHA (تصویر ۲ G و H) رشد کردند.



تصویر ۲: جدایه ویبریو ساکارز مثبت و منفی (کاونی سبز و زرد) بر روی محیط TCBS (E و F). پرگنه با رنگ متفاوت بر روی محیط اختصاصی ویبروهاروی (G و H).

در بررسی ملکولی به روش PCR دوگانه از این تعداد تنها ۴۶ جدایه هر دو باند ۶۶۸bp و ۲۱۵bp به ترتیب اختصاصی جنس ویبریو و گونه هاروی را داشتند، که به طور قطعی جدایه‌های *ویبریو هاروی* در نظر گرفته شدند. تعداد ۱۹ جدایه در PCR فقط باند اختصاصی جنس *ویبریو* (۶۶۸bp) را داشتند که می‌تواند سایر گونه‌های ویبریو باشد. از ماهیان به ظاهر سالم باکتری مشکوک به *ویبریو هاروی* تنها از انتهای روده و مخرج، جداسازی گردید و از سایر اندام‌های داخلی هیچ جدایه‌ای مشاهده نگردید. غالب علایم بالینی ماهی مبتلا به *ویبریو هاروی* که در نمونه‌ها مشاهده گردید به شرح تصویر ۱ می‌باشد.



تصویر ۳: الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی چند جدایه‌ی مشکوک به *ویبریو هاروی* بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب کنترل منفی و مثبت، ستون‌های ۳، ۵، ۶ و ۷ چهار جدایه‌ی *ویبریو هاروی*. ستون ۴ (Lad): نردبان ژنی bp ۱۰۰.

نتایج نشان‌دهنده‌ی شیوع بالای *ویبریو هاروی* در نمونه‌های مورد بررسی بود. در مجموع در ۹ مورد از تلفات مشکوک به ویبریوز (۸۱/۸۱ درصد)، عامل بیماری، جنس *ویبریو* (*Vibrio sp.*) تشخیص داده شد.

بر اساس نتایج بیش‌ترین تعداد جدایه‌های *ویبریو هاروی* (جدول ۲) در نمونه‌های فصل بهار و در سیستم پرورش در قفس مشاهده گردید و کم‌ترین تعداد جداسازی از نمونه‌های مراکز تولید بچه ماهی مشاهده صورت گرفت. شایان ذکر است که مراکز تولید بچه ماهی و مزارع پرورش در استخر خاکی به صورت فصلی فعال بودند و لذا امکان نمونه‌برداری در تمام فصول مقدور نبود، اما مزارع پرورش در قفس، در طول سال فعال هستند و بنابراین نمونه‌گیری از آن‌ها در تمامی فصول و از ماهیان با اندازه‌های مختلف صورت گرفت که نتایج آن‌ها به شرح جدول ۲ است.

ویژگی‌های بیوشیمیایی ۴۶ جدایه *ویبریو هاروی* شناسایی شده به روش ملکولی و جدایه‌ی استاندار (کنترل مثبت) در جدول ۳ درج گردیده شده است.

نتایج حاصل از آزمایش سنجش حساسیت ضد میکروبی (جدول ۴) نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها حداقل به ۲ عامل ضد میکروبی مقاومت داشته و نسبت به ۶ ترکیب آنتی‌بیوتیکی مورد آزمایش حساس بودند.

جدول ۲: شیوع فصلی *ویبریو هاروی* در مزارع ماهی باس دریایی آسیایی طی یک سال (۱۳۹۵-۱۳۹۶)

تعداد جدایه در سیستم پرورش	فصل			
	تابستان ۱۳۹۵	پاییز ۱۳۹۵	زمستان ۱۳۹۵	بهار ۱۳۹۶
قفس(۲مزرعه)	۱۱	۲	۲	۲۳
استخر خاکی(۵ مزرعه)	۱	۲	۰	۳
استخر بتونی (۱ مرکز تولید بچه ماهی)	۰	۰	۰	۲
مجموع	۱۲	۴	۲	۲۸

جدول ۳: ویژگی‌های بیوشیمیایی تأیید شده *ویبریو هاروی* جداسازی شده در این تحقیق

واکنش	کنترل مثبت PTCC 1755	از مجموع ۴۶ جدایه	
		تعداد (درصد) جدایه‌های مشابه کنترل مثبت	تعداد (درصد) جدایه‌های متفاوت از کنترل مثبت
رنگ کلنی روی محیط TCBS	زرد	۴۳ (۹۳/۵)	۳ (۶/۵)
نور افشانی (بیولومیناس)	–	۴۴ (۹۵/۶)	۲ (۴/۶)
لیپاز	+	۳۹ (۸۴/۸)	۷ (۱۵/۲)
تولید H_2S	_	۳۴ (۷۳/۹)	۱۲ (۲۶/۱)
حرکت	+	۳۹ (۸۴/۸)	۷ (۱۵/۲)
تولید ژلاتیناز	+	۳۶ (۷۸/۳)	۱۰ (۲۱/۷)
اوره	+	۱۶ (۳۴/۸)	۳۰ (۶۵/۲)
تولید ژلاتیناز	+	۱۴ (۳۰/۴)	۳۲ (۶۹/۶)
رشد در حضور ۱۰ درصد نمک	_	۳۸ (۸۲/۶)	۸ (۱۷/۴)
تخمیر سالیسین	_	۲۹ (۶۳/۱)	۱۷ (۳۶/۹)

* واکنش همه جدایه‌ها به تست‌های بیوشیمیایی حساسیت به O/129 (+۱۰۰ درصد)، تولید ایندول (+۱۰۰ درصد)، مصرف سیترات(-۱۰۰ درصد)، تحمل نمک، تولید آرژینین دهیدرولاز (-۱۰۰ درصد)، تولید لایزین دکربوکسیلاز (+۱۰۰ درصد)، تولید اورنیتین کربوکسیلاز (+۱۰۰ درصد، OF (+۱۰۰ درصد)، رشد در حضور ۸ درصد نمک (+۱۰۰ درصد) و تخمیر قندهای گلوکز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، مالتوز، اینوزیتول و لاکتوز (+۱۰۰ درصد) مشابه کنترل مثبت بود.

جدول ۴: نتایج آزمایش سنجش حساسیت ضد میکروبی ۴۶ جدایه *ویبریو هاروی* جدا شده در این مطالعه

ردیف	عامل ضد میکروبی	ماده موثره در دیسک (میکروگرم)	تعداد و درصد جدایه		
			حساس(S)	متوسط(I)	مقاوم(R)
۱	فلورفنیکل	۳۰	۴۶(٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
۲	تریمتوپریم	۳۰	۴۶(٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
۳	اموکسی سیلین	۲۵	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۴۶(٪۱۰۰)
۴	آمپی سیلین	۱۰	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۴۶(٪۱۰۰)
۵	اریترومایسین	۱۵	۰ (٪۰)	۴۶(٪۱۰۰)	۰ (٪۰)
۶	سیپروفلوکساسین	۵	۴۲(٪۹۱/۳۰)	۴ (٪۸/۷۰)	۰ (٪۰)
۷	کلرامفنیکل	۳۰	۴۶(٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)
۸	اکسی تتراسایکلین	۳۰	۴۱ (٪۸۹/۱۳)	۵ (٪۱۰/۸۷)	۰ (٪۰)

بحث

تا کنون باکتری‌های متعددی مانند *استرپتوکووس اینیایی*، *ویبریو هاروی* (Tendenica 2002, Ransangan 2009, Dong et al. 2017)، *ویبریو آلجینولیتیکوس* (Sharma et al. 2012)، *ویبریو آنگوئیلاروم*، *فتو باکتریوم دمسلا دمسلا* و *تناسی باکولوم مارینوم* به عنوان عامل سپتی‌سمی باکتریایی باس دریایی آسیایی گزارش شده‌اند، که در بین این عوامل باکتریایی، مانند سایر ماهیان دریایی گوشتخوار ویبریو هاروی به عنوان بخشی از فلور روده بسیار مورد توجه بوده است (Chatterjee and Haldar 2012). بر اساس مرور منابع، ویبریوز ناشی از *ویبریو هاروی*، هر ساله خسارت سنگینی به اقتصاد تولید این ماهی وارد می‌کند (Lal and Ransangan 2013). تلفات ۳-۲ درصد در روز در فرم مزمن و تلفات ۸۰ درصدی در طی ۳ الی ۴ روز در اثر ویبروز ناشی از *ویبریو هاروی* گزارش شده است (Gibson kueh et al. 2012). در بررسی مقایسه‌ای علایم بالینی ماهیان بیمار در طی این مطالعه (تصویر ۱) با علایم گزارش شده در اثر بیماری ویبریوز این ماهی در استرالیا، ویتنام و مالزی (Humphrey et al. 2010, Ransangan and Mustafa 2009)، علایم مشابهی مشاهده گردید. عوارض بالینی بیماری ویبریوز شامل ظهور نقاط قرمز رنگ روی پوست، نواحی جانبی و شکمی ماهی، تورم شکم و در بیش‌تر موارد ریزش فلس و زخم‌های پوستی که در آن ناحیه نیز دیده می‌شود و در حالت مزمن فلس ریزی به همراه تیرگی (سیاه شدن) رنگ ماهی، کبد کم رنگ و کبد چرب می‌باشد. همچنین اشاره شده است که با گسترش زخم-های قرنیه‌ای در ماهی، محتویات چشم از بین می‌رود. در فرم حاد فرآیند ابتلا به بیماری سریع بوده و ماهی عوارض بالینی خاصی را نشان نمی‌دهد. اما عدم تعادل ماهی و شنای چرخشی گزارش شده است (Dong et al. 2017). گزارش شده است باکتری *ویبریو هاروی* ابتدا در طحال یافت می‌شود ولی همچنان که تعداد سلول‌ها در این اندام افزایش می‌یابد، باکتری در کلیه، کبد و حتی مغز نیز مستقر می‌شود (Gibson kueh et al. 2012). در این مطالعه نیز از اندام‌های داخلی (انتهای روده، طحال، کبد، کلیه، مغز) و چشم *ویبریو هاروی* جداسازی شد.

از آن جایی که تشخیص سریع باکتری‌های بیماری‌زا در تشخیص به موقع بیماری‌ها اهمیت فراوان دارد و روش‌های معمول جداسازی و شناسایی در تشخیص باکتری‌ها خسته کننده و وقت‌گیر است، تکثیر ردیف نوکلئوتیدی اختصاصی DNA به وسیله‌ی آزمایش PCR یک روش حساس، دقیق و اختصاصی جهت تشخیص میکروارگانیسم‌ها فراهم آورده است (Chatterjee and Haldar 2012, Pang et al. 2006). به دلیل این که بعضی جدایه‌های *ویبریو هاروی* ساکارز مثبت و بعضی ساکارز منفی هستند و پرگنه‌های متفاوتی روی محیط TCBS و VHA تشکیل می‌دهند (تصویر ۲) در مطالعه‌ی حاضر برای تعیین هویت ملکولی جدایه‌های *ویبریو* و *ویبریو هاروی*، از پرایمرهای اختصاصی ژن 16s RNA و ژن همولایزین ***vhh*** این ارگانیسم‌ها با توجه به استفاده‌ی قبلی Conejero و همکاران در سال ۲۰۰۴ با روش PCR دوگانه استفاده گردید . با وجود معرفی محیط‌های اختصاصی TCBS و VHA به ترتیب برای تشخیص ویبریو و *ویبریو هاروی*، نتایج شناسایی ملکولی کلونی-های برداشته شده از روی محیط‌های اختصاصی ذکر شده در این تحقیق مشخص کرد که جدایه‌های دیگری نیز می-توانند در این محیط‌های اختصاصی (تفریقی) رشد کنند در حالی که ویبریو و *ویبریو هاروی* نباشند. Harris و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که محیط اختصاصی تفریقی VHA قابلیت تفکیک *ویبریو هاروی*، از ۱۵ گونه دیگر ویبریو را دارد (Harris et al. 1996).

نتایج نشان داد که در ۷۰/۷۶ درصد از موارد ویبریوز ماهی باس دریایی آسیایی عامل *ویبریو هاروی* بوده است و در مجموع نقش ویبریوها در سپتی‌سمی‌ها، در مطالعه‌ی

حاضر ۸۱/۲۵ درصد (۶۵ مورد از ۸۰ مورد) برآورد گردید . Ransangan و Lal در سال ۲۰۱۳ و Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز از پرایمرهای اختصاصی ژن *vhh* برای تفریق *ویبریو هاروی* از سایر گونه‌های ویبریو از روش PCR چندگانه استفاده کرده‌اند. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که همه‌ی جدایه‌های *ویبریو هاروی*، به دلیل تنوع فنوتیپی و ژنتیکی این باکتری الگوی بیوشیمیایی مشابهی ندارند (جدول ۳) (Buller 2014, Ransangan and Mustafa 2009). در بررسی شیوع *ویبریو هاروی* در ماهیان بیمار در مزارع پرورش ماهیان دریایی کشور چین گزارش شده است که از ۳۵ جدایه مظنون به *ویبریو هاروی* بعد از انجام PCR تعداد ۶ جدایه *ویبریو هاروی* نبوده‌اند (Chatterjee and Haldar 2012). بنابراین در شناسایی *ویبریو هاروی* تکیه بر روش‌های مرسوم بیوشیمیایی کافی نیست (Gomez-Gil et al. 2004). همچنین از نتایج مندرج در جدول ۳ مشخص است که برخی از ویژگی‌ها برای تشخیص بیوشیمیایی *ویبریو هاروی* می‌توانند آزمایشات کلیدی و مهم‌تری محسوب شوند، چون از آن جهات تفاوتی بین جدایه‌ها وجود ندارد.

انتخاب صحیح آنتی‌بیوتیک و نحوه‌ی مصرف مناسب آن از موارد ضروری در کنترل بیماری می‌باشد. حساسیت بالای جدایه‌های *ویبریو هاروی* به سه آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل، کلرامفنیکل و اکسی تتراسایکلین، ارزش این داروها را در مبارزه با این بیماری در صورت اجرای روش درمانی مناسب تأیید می‌کند، به طوری که در منابع مورد بررسی نیز کم‌ترین مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک در بیماری ویبریوز ماهیان دریایی گزارش شده است (Ransangan et al. 2012).

بر اساس نتایج بیش‌ترین شیوع ویبریوز، در فصل بهار بود که با گزارش بسیاری از محققین بهداشت آبزیان مبنی بر این که که شیوع بیماری ناشی از ویبریوها با افزایش درجه‌ی حرارت آب افزایش می‌یابد مطابقت دارد، به طوری که بیش‌تر در بهار و تابستان به علت وجود استرس‌هایی از قبیل دمای بالای، عفونت‌های بالای انگلی و میزان پایین‌تر اکسیژن محلول در آب رخ می‌دهد (Albert and Ransangan 2013, Bellos et al. 2015, Sharma et al. 2012). در ارتباط با نوع سیستم پرورش بیش‌ترین موارد ویبریوز، مربوط به سیستم پرورش در قفس بود که با مطالعات سایر محقیقین نیز هم‌خوانی دارد. Tendica (۲۰۰۲)، Ransangan، همکاران (۲۰۱۲) و Ransangan و Mustafa (۲۰۰۹) و Dong و همکاران (۲۰۱۷) نیز در تطابق با مطالعه‌ی حاضر عامل اصلی ویبریوز ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی در مزارع قفس را *ویبریو هاروی* گزارش کرده‌اند . اگر چه سایر گزارش‌ها از ویبریوز ماهی باس دریایی آسیایی در مناطقی متفاوت از نظر شرایط پرورش و موقعیت جغرافیایی با مطالعه‌ی حاضر بوده است، ولی از نظر برآورد نقش ویبریوها و *ویبریو هاروی* در ماهیان دارای علایم، هم‌خوانی دارد (Gibson Kuh et al. 2012). با توجه به نقش پر رنگ (۷۰/۸ درصد) *ویبریو هاروی* در ویبریوز ماهی باس دریایی آسیایی و از طرفی دیگر، با توجه به رشد سریع آبزی‌پروری ماهیان دریایی در کشور به خصوص سیستم پرورش در قفس، علاوه بر این که استفاده از روش مولکولی به کار گرفته شده در این تحقیق به عنوان یک روش سریع و دقیق شناسایی عامل بیماری ویبریوز به منظور پیاده‌سازی اقدامات پیش‌گیرانه و روش‌های درمانی توصیه می‌گردد، به منظور پیش‌گیری باید مطالعات تهیه‌ی واکسن مزرعه‌ای (اتوژنوس) جهت ایمن‌سازی ماهی باس دریایی آسیایی که نسبت به بیماری ویبریوز حساس است در دستور کار سازمان‌های متولی توسعه‌آبزی پروری ماهیان دریایی و همین طور واحدهای توسعه و تحقیق شرکت‌هایی که هم اکنون مبادرت به پرورش این ماهی در سیستم قفس نموده‌اند، قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه‌ی دکتری در دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید. از دانشگاه شهید چمران به سبب حمایت مالی و از پژوهشکده‌ی آبزی‌پروری جنوب کشور، پژوهشکده‌ی میگوی کشور، مدیریت محترم مجموعه‌های پرورش در قفس از جمله شرکت نیکسا، مرکز تکثیر پارس آبزیستان و پرورش دهندگان ماهی باس دریایی آسیایی آقایان اسماعیل‌زاده و کوچک‌زاده در سایت چوئیبده (آبادن) که نهایت همکاری را با مجریان تحقیق داشته‌اند، تشکر و قدرانی می‌گردد.

منابع

Ahangarzadeh, M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Sharif rohani, M. and Soltani, M. (2015). Role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of cultured carps in khouzestan province. Iranian Veterinary Journal, 11(3): 5-16.

Albert, V. and Ransangan, J. (2013). Effect of water temperature on susceptibility of culture marine fish species to Vibriosis. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3(3): 48-52.

Austin, B. and Austin, D.A. (2016). Bacterial fish pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish Heidelberg: Springer, P: 652.

Bellos, G.; Angelidis, P. and Miliou, H. (2015). Effect of Temperature and Seasonality Principal Epizootiological Risk Factor on Vibriosis and Photobacteriosis Outbreaks for European Sea Bass in Greece (1998-2013). Journal of Aquaculture Research and Development, 6(5): 338.

Buller, N.B. (2014). Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. 2nd ed. CABI Publishing, Pp: 1-37.

Chatterjee, S. and Haldar, S. (2012). Vibrio Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. Journal of Marine Science: Research and Development S1:002. doi:10.4172/2155-9910.S1-002

Conejero, M.J.U. and Hedreyda, C.T. (2004). PCR Detection of Hemolysine (*vhh*) Gene in *Vibrio harveyi* Journal of General and Applied Microbiology, 50 (2004), Pp: 137-142.

Dong, H.T.; Taengphu, S.; Sangsuriya, P.; Charoensapsri, W.; Phiwsaiya, K.; Sornwatana, T. et al. (2017). Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, Lates calcarifer in Vietnam. Aquaculture, 473, 89-96.

Gibson-Kueh, S.; Chee, D.; Chen, J.; Wang, Y.H.; Tay, S.; Leong, L.N. et al. (2012). The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. Journal of Fish Diseases, 35 (1): 19-27.

Gomez-Gil, B.; Soto-Rodríguez, S.; Garcı´a-Gasca, A.; Roque, A.; Vazquez-Juarez, R.; Thompson, F.L. et al. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. Microbiology 150, 1769-1777.

Harris, L.; Owens, L. and Smith S.A. (1996). Selective and Differential Medium for *Vibrio* harveyi. Applied and Environmental Microbiology, 62: 3548-3550.

Humphrey, J.D.; Benedict, S. and Small, L. (2010). Streptococcosis, trypanosomiasis, vibriosis and bacterial gill disease in sea-caged barramundi at Port Hurd, Bathurst Island, July-August 2005. Industry, Fisheries and Mines, Northern Territory Government, 98.

Lal, M.T. and Ransangan, J. (2013). Taxonomic classification of Vibrio harveyi using 16S rDNA and atpAgene sequencing method, International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3(1): 17-24.

Mirbakhsh, M., Afsharnasab, M., Khanafari, A., & Razavi, M. R. (2014). Molecular identification of *Vibrio harveyi* from larval stage of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea: Decapoda) by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 13(2): 384-393.

Narouie, A.; Mirdar, J.; Gharaie, A. and Sanchooli, N. (2016). In vitro antibacterial effects of several plant essential oils on *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio damsel*. Iranian Veterinary Journal. 12(3), Autumn, 2016.

Noga, E.J. (2010). Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Second ed. Wiley-Blackwell.

Pang, L.; Zhang, X.H.; Zhong, Y.; Chen, J.; Li, Y. and Austin, B. (2006). Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. Letters in applied microbiology, 43(3), 249-255.

Peyghan, R. and Eftekhar manavi, Sh. (2010). Finfish and shellfish bacteriology manual: techniques and procedures, Shahid Chamran University of Ahvaz. 284 Pages. (In Persian).

Raissy, M.; Rahimi, E.; Azargun, R.; Moumeni, M.; Rashedi, M. and Sohrabi, H.R. (2015). Molecular Detection of Vibrio spp. in Fish and Shrimp from the Persian Gulf. Journal of Food Biosciences and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, 5(2): 49-52.

Ransangan, J. and Mustafa, S. (2009). Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass Lates calcarifer by use of 16S ribosomal DNA sequencing. Journal of Aquatic Animal Health, 21(3), 150-155.

Ransangan, J.; Lal, M.T. and Al-Harbi, H.A. (2012). Characterization and experimental infection of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass (Lates calcarifer). Malaysian Journal of Microbiology. 8, 104-115.

Sharma, S.R.K.; Rathore, G.; Verma, D.K.; Sadhu, N. and Philipose, K. (2012). *Vibrio alginolyticus* infection in Asian seabass (*Lates calcarifer*) reared in open sea floating cages in India. Aquaculture Research. 44: 86-92.

Tarr, Cl.; Patel, J.; Puher, Nd.; Sowers, Eg.; Bopp, Ca and Strockbine, Na. (2007). Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. Journal of Clinical Microbiology, 45(1): 134-140.

Tendencia, E.A. (2002). *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured Asian seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. Aquaculture Research, 33(6): 455-458.

Vol. 15, No. 4, Winter, 2020
DOI: 10.22055/ivj.2018.145196.2066

Investigation on *Vibrio harveyi* bacteria association in mortality of cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) in farm located in Iran Southern provinces with culture and PCR method

Ajdari, A.[1]; Ghorbanpour, M.[2]; Peyghan, R.[3]; Ahangarzadeh, M.[4] and Mirbakhsh, M.[5]

Received: 05.09.2018 Accepted: 22.12.2018

Abstract

Vibrio harveyi is of the bacterial flora of omnivorous fish intestine that is considered as one of the main causes of the Asian seabass (Barramundi) fish vibriosis disease in many cage farms in the world. The purpose of this study was to investigate the role of this bacterium in the mortality of Asian seabass fish in southern regions of the Iran. In this study, in 11 cases of Asian seabass mortality, a total of 110 Asian seabass fish (80 suspected vibriosis fishes and 30 healthy fish species) from southern provinces (Khuzestan, Bushehr and Hormozgan) were sampled and bacterial culture from the internal organs was done. Biochemical and molecular characteristics (with specific primers of genus and species) of isolates were investigated. Nine (81.81%) cases of vibrios (Vibrio sp). Were diagnosed as causative of mortality. The results showed that in fish with symptoms of vibriosis, 70.76% of the isolates were *V. harveyi*. Also, in the seasonal study, the prevalence of *V.harveyi*, the losses due to vibriosis and the highest prevalence of infection with this bacterium were observed in spring. The antimicrobial susceptibility test of 46 isolates of *V. harveyi* isolates was also investigated. The results of this study indicate the significant role of *Vibrio harveyi* in the mortality caused by vibriosis in Asian seabass fish farms in Iran. The results are important for prevention perspective (health management and vaccination) and the effective treatment of Vibriosis disease in Asian seabass fish, these results are important.

Key words: *Vibrio harveyi*, Asian seabass, Cage culture, Vibriosis, PCR

1- PhD Graduated of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran and Expert of Iranian Shrimp Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute, Bushehr, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Clinical Sciences. Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Assistant Professor, South of Iran Aquaculture Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Iranian Fisheries Science Research Institute, Ahvaz, Iran
5- Assistant Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Corresponding Author: Ajdari, A., E-mail: a_arzhan@yahoo.com