

بررسی آسیب‌شناسی و باکتریولوژیک ضایعات گرانولوماتوز در ۱۰ گونه ماهی آکواریومی شهرستان اهواز

مریم حسین‌پورحموله^۱، رحیم پیغان^{۲*}، آناهیتا رضایی^۳ و مسعود قربانپور^۴

^۱ دانش‌آموخته دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران و عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۲

چکیده

در این مطالعه تعداد ۱۰ گونه از ماهیان زینتی آکواریومی (ماهی مولی‌آمازون، گویی، اسکار، آنجل، گورخرماهی یا زبرافیش، ماکرو، نئون‌تترا، ماهی‌طلایی یا حوض، ماهی برب‌بری و گورامی) در حال مرگ و با علائم ظاهری بیماری مزمن (مثل لاغری مفرط و بی‌اشتهایی) مورد بررسی قرار گرفتند. از هر گونه ماهی ۳۰ قطعه و در مجموع ۳۰۰ قطعه انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌گیری از اندام‌هایی که دارای ضایعات دانه‌ای یا گرانولوماتوز در احشا بودند، انجام شد. در مجموع از ۳۰۰ نمونه بررسی شده، در ۴۶ مورد (۱۲ درصد) ضایعات گرانولوماتوز در امعا و احشا مشاهده شد. بیش‌ترین ضایعات گرانولوماتوز در ماهیان گورامی (۵۶/۶ درصد)، گلدفیش (۳۳/۳ درصد) و نئون‌تترا (۲۳/۳ درصد) مشاهده گردید و در ماهیان گویی و زبرا هیچ ضایعه گرانولوماتوزی دیده نشد. بیش‌ترین درصد بروز ضایعات به ترتیب در طحال (۱۵/۳ درصد) و کبد (۳/۳ درصد) ثبت گردید. بررسی‌های مولکولی (PCR) بر روی ۲۰ نمونه بافت و ۵ نمونه باکتری مقاوم به اسید (رشد مثبت بر روی محیط لونشتاین-جانسون) نشان داد همه نمونه‌ها به جز یک نمونه، آلوده به جنس مایکوباکتریوم بوده‌اند. انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی آلودگی یک نمونه به گونه مایکوباکتریوم مارینوم، ۳ نمونه به مایکوباکتریوم فورچونیتوم و ۳ نمونه به مایکوباکتریوم چلونه را تأیید نمود. بر اساس نتایج PCR با پرایمرهای اختصاصی/یکتیوفونوس هوفری، وجود ژن اختصاصی این جرم در هیچ یک از نمونه‌ها اثبات نشد. این تحقیق نشان داد که آلودگی به سل ماهی در ماهیان آکواریومی ایران وجود دارد.

کلمات کلیدی: گرانولوماتوز، ماهی زینتی، اهواز، مایکوباکتریوم، ایکتیوفونوس

مقدمه

مایکوباکتریوز، که به عنوان سل نیز شناخته می‌شود، شایع‌ترین بیماری مزمن باکتریایی در ماهیان زینتی در گونه‌های ماهی متعلق به آب‌های مناطق معتدل و گرمسیری (آب شیرین و دریایی) می‌باشد. از آن جا که این بیماری جزء بیماری‌های زئونوز است لذا یک خطر بالقوه برای انسان محسوب می‌شود. مایکوباکتریوم مارینوم (*Mycobacterium marinum*).

* نویسنده مسئول: رحیم پیغان، استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران و عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: Peyghan_r@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

و دریایی از جمله گونه‌های آکواریومی به این جرم وجود دارد. علائم بالینی، شاخصه‌های دقیق بیماری نمی‌باشد اما به هر حال مواردی همچون شنای نامنظم و عدم تعادل مشاهده می‌شود. ماهی بسیار لاغر و بی‌توجه شده و همچنین ممکن است تیره شدگی در خط جانبی دیده شود. امکان آلودگی بسیاری از اندام‌ها مانند پوست وجود دارد. قسمت‌هایی از پوست که درگیر این بیماری می‌شوند، ظاهری گرانولار و زیر خواهند داشت. از لحاظ بافت-شناسی ضایعات شامل واکنش گرانولوماتوزی اطراف اجسام کروی با اندازه‌های مختلف (اسپور خفته) می‌باشند (Jafarizadeh et al, 2014). هدف از این تحقیق بررسی میزان فراوانی ضایعات و تعیین علت این ضایعات در ماهیان آکواریومی مهم اهواز بوده است. به دلیل اهمیت بیماری سل ماهی به عنوان یک بیماری مشترک، بررسی فراوانی این بیماری و تفریق آن از دیگر عوامل ایجاد کننده ضایعات گرانولوماتوز در ماهیان آکواریومی ضرورت دارد.

مواد و روش کار

برای این مطالعه از ۱۰ گونه از ماهیان زینتی آکواریومی (هر گونه ماهی ۳۰ قطعه در مجموع ۳۰۰ قطعه) مورد بررسی قرار گرفتند. گونه‌های ماهی مورد مطالعه عبارتند بودند از: ماهی مولی آمازون^۱، گویی^۲، اسکار^۳، آنجل^۴، گورخرماهی (زبرافیش)^۵، ماکرو^۶، نئون تترا^۷، ماهی طلائی (حوض)^۸، ماهی بارب بیری^۹ و گورامی^{۱۰}. از ماهیانی در حال مرگ که دارای علائم ظاهری بیماری (مثل لاغری مفرط و بی‌اشتهایی . . .) بودند، نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌برداری از مراکز مختلف توزیع، پرورش و تکثیر

مایکوباکتریوم چلونه (*Mycobacterium chelonae*) و مایکوباکتریوم فورتویتوم (*Mycobacterium fortuitum*) رایج‌ترین گونه‌های جدا شده هستند. همه آن‌ها با ایجاد ضایعات گرانولوماتوز که به طور کلی در اندام‌ها ایجاد می‌شوند، قادر به ایجاد عفونت‌های پوستی انسان هستند. در ماهی‌ها، علائم دیرتر ظهور کرده و بیش‌تر شامل کاهش رشد، بی‌حالی، بی‌اشتهایی و لاغری مفرط، ضایعات پوست و بروز گرانولوم‌ها در احشاء می‌باشد. درمان این بیماری به دلیل تشخیص دیرهنگام معمولاً سخت و به دلیل مقاومت دارویی و همچنین امکان انتقال آلودگی به انسان، معمولاً امکان‌پذیر نمی‌باشد (Uma and Ronald, 2016). مایکوباکتریوم‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل صاف یا کمی خمیده و غیرمتحرک هستند. این باکتری‌ها مقاوم به ترکیبات اسیدی و الکلی بوده و با روش زیل - نیلسون (ZN) رنگ‌آمیزی می‌شوند که به عنوان خصوصیت اصلی برای شناسایی این باکتری محسوب می‌شود. باکتری سل ماهی مدت‌ها در آب زنده باقی می‌ماند، بنابراین می‌تواند از طریق خراش‌های ایجاد شده روی دست، پا، سر و صورت به بدن انسان‌هایی که در معرض این آب‌های آلوده قرار داشته باشند نفوذ کرده و ایجاد گرانولوم نماید که تا مدت‌ها باقی مانده و بهبودی پیدا نمی‌کند. این ضایعه را در انسان، بیماری آکواریوم می‌نامند (Soler et al, 2018).

ایکتیوفونوس^۱ یک عامل شبه قارچ است که بیماری گرانولوماتوز مزمن سیستمیک را در گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین و دریا ایجاد می‌کند (Roca et al, 2019). عامل بیماری یک انگل اجباری بنام ایکتیوفونوس هوفری می‌باشد. عامل انگل اجباری با چرخه زندگی به نسبت ساده است. امکان آلودگی بسیاری از گونه‌های آب شیرین

- 1 Ichthyophonus
- 2 Amazon molly
- 3 Guppy
- 4 Oscar
- 5 Angel
- 6 Zebra fish
- 7 Macrofish
- 8 Neon tetra
- 9 Gold fish
- 10 Tiger barb
- 1 Gourami

سپس اسلایدهای بافتی تهیه شده، با استفاده از چهار روش رنگ‌آمیزی: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)، گیمسا و پرئودیک اسید شیف (PAS) و زیل-نلسون رنگ‌آمیزی شد.

سپس بافت‌های دارای ضایعات مشکوک را جدا کرده جهت مطالعات آسیب‌شناسی داخل فرمالین ۱۰ درصد گذاشته شدند. نمونه‌های دارای ضایعات گرانولوماتوز مشکوک دو قسمت مساوی تقسیم شده، یک بخش آن در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و بخش دوم تا زمان آزمایش در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از استخراج DNA جهت بررسی PCR مورد استفاده قرار گرفتند (Talaat et al, 1997).

جهت انجام این آزمایش از پرایمر Table 1 استفاده شده، در این آزمایش برنامه حرارتی PCR شامل ۴۰ چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، مواد لازم برای واکنش PCR در مجاورت یخ و در زیر هود کلاس II درون میکروتیوب‌های ۰/۲ mL مخصوص PCR که عاری از DNAase و RNAase بودند با یکدیگر مخلوط شدند. جهت اطمینان از صحت آزمایش‌های PCR از واکسن BCG به عنوان کنترل مثبت و از آب دوبار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای مشاهده محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید (Talaat et al, 1997).

جهت تعیین توالی محصول PCR مایکوباکتریایی، DNA تولید شده در PCR که دارای طول قابل انتظار بود، در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و سپس با استفاده از کیت استخراج DNA و ژل ساخت شرکت (رهازیست پادتن، ایران)، خالص سازی صورت گرفت

ماهیان آکواریومی اهواز انجام گرفت. ماهی‌ها با پلاستیک حمل ماهی و به طور زنده به بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه با فنوکسی اتانل بیهوش و آسان‌کشی شدند. ماهی‌ها بعد از وزن شدن، تشریح شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

در این بررسی برای تفریق دو بیماری مایکوباکتریوز و ایکتیوفونوزیس، از دو محیط کشت لونشتین-جانسن و محیط حداقل مغذی (MEM) استفاده شد. جهت کشت در محیط کشت جامد لونشتین-جانسن، ابتدا نمونه در ظرف استریل با آب مقطر استریل له شده، با ترکیبات اسیدی یا بازی ضعیف باکتری‌ها و سایر اجرام غیراسید فست رفع آلودگی شده و بر روی محیط فوق کشت داده شدند. در صورت آلودگی به مایکوباکتریوم، پس از ۱ تا ۲ هفته کلنی‌های باکتری بررسی شدند.

جهت تشخیص باکتری جدا شده پس از رنگ‌آمیزی زیل-نلسون (ZN) و در صورت اسید فست بودن، استخراج DNA صورت گرفته و با پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه‌های رایج مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم چلونه و مایکوباکتریوم فورتویوم، مورد تشخیص قرار گرفت. برای بررسی باکتری‌های گرم منفی ایجاد کننده ضایعات گرانولوماتوز، بررسی تفریقی اولیه (رنگ‌آمیزی گرم و اسیدفست و در صورت مشکوک شدن کشت بر روی محیط TSA) بر روی ضایعات صورت گرفت (Seema, 2014).

برای بررسی آلودگی به ایکتیوفونوس، نمونه له شده، در محیط MEM حاوی آنتی‌بیوتیک (استرپتومایسین و جنتامایسین)، نیز کشت داده شدند و پس از گذشت ۲ تا ۷ روز (دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتی‌گراد)، از نظر اجرام جوانه-دار^۲ و ریشه‌های کاذب /یکتیوفونوس بررسی شدند (Jafarizadeh et al, 2014).

Table 1: Polymerase chain reaction (PCR) data for detecting *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* and *Ichthyophonus hofferi*

Target gene	Specificity	Primer	Sequence	Length (base pair)	Temperature cycle	Ref.
16 S rRNA	All <i>mycobacteria</i> spp.	Forward	5'- AGCTCGTAGGTGGTTTGTGCG-3'	611	95°C- 3 min; 35 × (95°C- 30 s, 58°C-30 s, 72°C- 45 s); 72°C- 3 min.	Delghandi et al. (2020)
		Reverse	5'- CCACCTTCCTCCGAGTTGAC-3'			
hsp65	<i>Mycobacterium marinum</i>	Forward	5'- CAACCCGCTCGGTCTGAA -3	82	95°C- 3 min; 35 × (95°C- 30 s, 60°C-30 s, 72°C- 30 s); 72°C- 3 min.	Santos, E. (2021)
		Reverse	5'- CGACCTCTTTGGCCGACTT -3'			
its	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Forward	5'-GTTACTCGCTTGGTGAATAT-3'	93	95°C- 3 min; 35 × (95°C- 30 s, 50°C-30 s, 72°C- 30 s); 72°C- 3 min.	Park et al. (2000)
		Reverse	5'-TCAATAGAATTGAAACGCTG-3'			
its	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Forward	5'- CCGTGAGGAACCGTTGCCT-3'	223	95°C- 3 min; 35 × (95°C- 30 s, 58°C-30 s, 72°C- 30 s); 72°C- 3 min.	Park et al. (2000)
		Reverse	5'- TAGCACGCAGAATCGTGTGG-3'			
16 S rRNA	<i>Ichthyophonus hofferi</i>	Forward	5'- GCTCTTAATTGAGTGTCTAC-3'	371	95°C- 3 min; 35 × (95°C- 30 s, 54°C-30 s, 72°C- 30 s); 72°C- 3 min.	Whipps et al. (2006)
		Reverse	5'- CATAAGGTGCTAATGGTGTGTC-3'			

نتایج

شد (Table 2). همان طوری که در Figure 1 نیز مشاهده می‌شود بیشترین ضایعات گرانولوماتوز به ترتیب در ماهیان گورامی، گلدفیش و نئون تترا مشاهده شد و در ماهیان گوپی و زبرا هیچ ضایعه‌ای مشاهده نشد.

از مجموع ۳۰۰ قطعه ماهی بررسی شده (از ۱۰ گونه ماهیان آکواریومی در سطح شهرستان اهواز) در ۴۶ مورد (۱۵ درصد) ضایعات گرانولوماتوز در اندام‌های مختلف مشاهده شد و ماهی گورامی آلوده‌ترین ماهی تشخیص داده

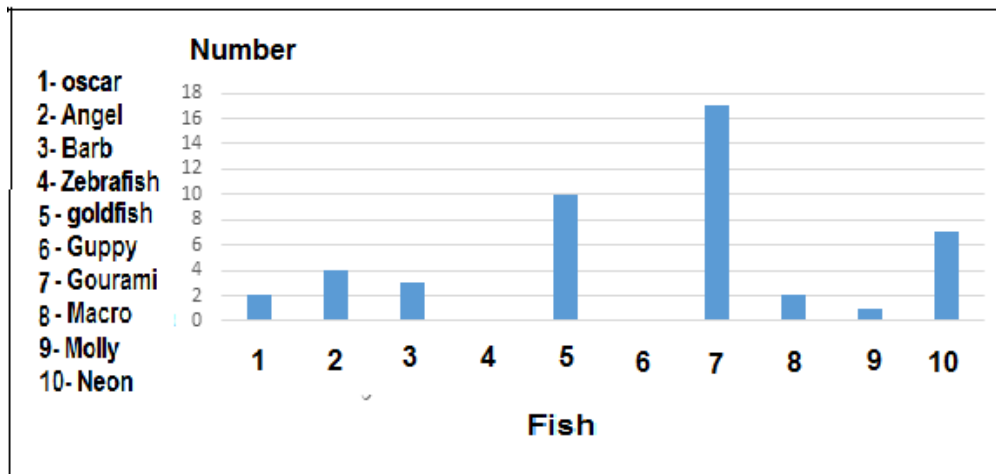


Figure 1: Prevalence of granulomas in naturally infected aquarium fishes of Ahvaz

Table 2: Number and percentage of granulatose lesion that were seen in different organs

Number and percentage of granulatose lesion									
Kidney		Liver		Spleen		Positive cases	Total number of fish	Fish	No.
%	NO.	%	NO.	%	NO.				
0	0	6.7	2	6.7	2	2	30	oscar	1
0	0	13.3	4	13.3	4	4	30	angel	2
0	0	0	0	10	3	3	30	tiger barb	3
0	0	0	0	0	0	0	30	zebra fish	4
20	6	20	6	33.3	10	10	30	gold fish	5
0	0	0	0	0	0	0	30	guppy	6
0	0	0	0	56.7	17	17	30	gourami	7
0	0	6.7	0	6.7	2	2	30	macro	8
0	0	0	0	3.3	1	1	30	molly	9
0	0	0	0	23.3	7	7	30	neon tetra	10

اطراف آن چندین ردیف ماکروفاژ، ملانوماکروفاژ و فیروبلاست قابل رویت بود. در ۵ گونه ماهی گرانولوم‌ها در طحال دیده شد. گونه‌هایی که در طحال آن‌ها بیش‌ترین میزان گرانولوم دیده شد عبارت بودند از: آنجل و گلدفیش. در ۲ مورد از نمونه‌هایی که دارای گرانولوم بودند، در رنگ‌آمیزی زیل نلسون باکتری دیده شد. در ۴ قطعه ماهی، گرانولوم در کلیه‌ها دیده شد. در ۶ قطعه ماهی، گرانولوم‌ها در کبد، محوطه شکمی، تخمدان‌ها و چربی‌های اطراف، و دیواره روده دیده شدند اما بیش‌ترین میزان آلودگی در طحال ماهیان مشاهده گردید (Table 2).

از مجموع تعداد ۳۰۰ ماهی که مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند، بر اساس مشاهده ضایعات قابل مشاهده با چشم غیر مسلح و استریومیکروسکوپ، در نهایت ۱۱۶ نمونه جهت بررسی پاتولوژی و تهیه مقاطع بافتی به آزمایشگاه ارسال شدند، که از این تعداد ۴۶ نمونه واجد ضایعات گرانولوماتوز بودند (Figure 2 and 3).

نمونه‌ها به چهار روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین (H&E)، گیمسا و پرئودیک اسید شیف (PAS) و زیل نلسون (ZN) رنگ‌آمیزی شدند. در بررسی میکروسکوپی، از ماهیان به ظاهر سالم، ۹ ماهی دارای گرانولوم‌های میکروسکوپی بودند (Figure 4). در قسمت مرکزی هر گرانولوما، نکروز پنیری قابل مشاهده بود و در

لونشتاین جانسون (Figure 7) نشان داد همه نمونه‌ها به جز یک نمونه، آلوده به باکتری‌های متعلق به جنس مایکوباکتریوم بوده‌اند، زیرا با پرایمر اختصاصی جنس فوق محصول ۶۱۱ جفت بازی تولید شده بود. در ضمن نتایج این بخش از کار دلالت بر درستی روش استخراج DNA نیز داشت. در این تحقیق ضایعات گرانولوماتوز ناشی از دیگر باکتری‌ها مشاهده نشد.

در آزمایش PCR با پرایمرهای اختصاصی مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم فورچوئیتوم و مایکوباکتریوم چلونه به ترتیب در ۳، ۳ و ۱ نمونه آلودگی به باکتری‌های یاد شده تایید گردید (Figure 5 and 6). اساس نتایج PCR با پرایمرهای اختصاصی/ایکتیوفونوس هوفری، وجود ژن اختصاصی این جرم در هیچ یک از نمونه‌ها اثبات نشد.

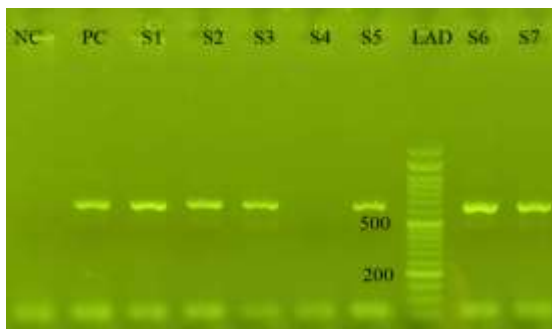


Figure 5: Electrophoresis of PCR products for Mycobacteria on the 1.5% Agarose gel. LAD: size marker 50bp, PC: Positive control, Line S1 to S7 unknown specimens that only s4 was negative. NC= Negative control.

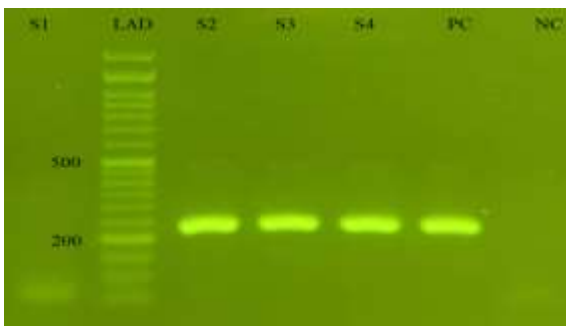


Figure 6: Electrophoresis of PCR products for Mycobacterium fortuitum on the 1.5% Agarose gel. LAD: size marker 50bp, PC: Positive control, Line S1 to S4 unknown specimens that only s1 was negative. NC= Negative control.

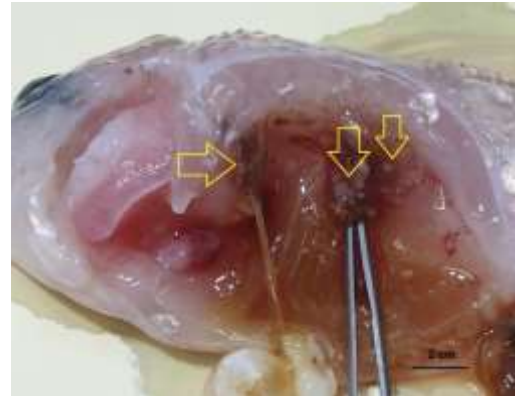


Figure 2: Granulomatous nodules in infected gold fish viscera (arrows).



Figure 3: Fresh Squash preparation showing thick walled nodules in infected goldfish spleen.

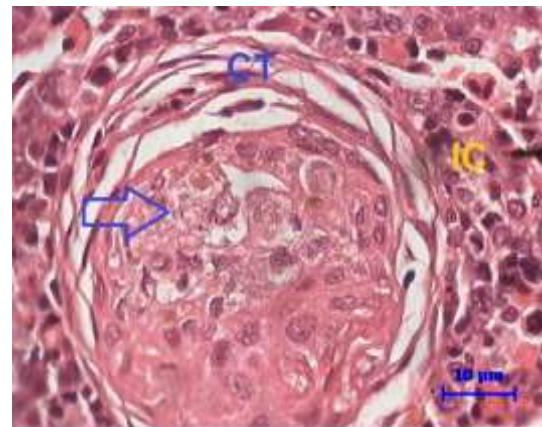


Figure 4: Encapsulated tuberculosis lesion., inside well-defined host cellular granulomas in infected oscar spleen, Bacteria (arrow), connective tissue (CT) and inflammatory white blood cells (IC) can be seen in the section (H&E Staining).

بررسی‌های مولکولی (PCR) بر روی ۲۰ نمونه بافت و ۵ نمونه باکتری مقاوم به اسید رشد نموده بر روی محیط

فاگولیزوزوم، و مقاومت در برابر متابولیت‌های فعال نیتروژن و اکسید نیتریک است. علاوه بر این، این پاتوژن‌ها می‌توانند باعث کاهش بیان مولکول‌های MHC II برای جلوگیری از تولید یا آزادسازی آنتی‌ژن از طریق این مسیر شوند (Soler et al, 2018).

این نکته حائز اهمیت است که استرس مداوم در طول تولیدمثل ممکن است باعث شود ماهیان ماده مستعد ابتلا به عفونت‌های محیطی مایکوباکتریوم شوند که در نهایت منجر به ظهور علائم بالینی و گرانولوم در اندام‌های داخلی می‌شود.

در یک پژوهش انجام شده در اسلوانیا (Pate et al, 2005) محققان حضور مایکوباکتریوم چلونی، فورچونینوم و پرگرینوم را در ماهیان گویی، آنجل، گورامی و ماهی حوض گزارش کردند. اما در این تحقیق، موارد کمی از وجود این باکتری را در بافت‌هایی با گرانولوم رنگ‌آمیزی شده با زیل نیلسون مشاهده شد. این می‌تواند به دلیل تغییرات بافت گرانولوماتوز از طریق بررسی مستقیم با میکروسکوپ باشد، که می‌تواند منجر به تخریب مایکوباکتری‌ها شود (Zanoni et al, 2008). Rallis و همکاران (۲۰۰۷) در معاینات بافت‌شناسی، نشان دادند که ماهی آلوده به مایکوباکتریوم دارای نفوذ التهابی غیر اختصاصی سلول‌های اپیتلیوئید، لنفوسیت‌ها و سلول‌های غول پیکر است که در این مطالعه نیز مشاهده شده است. مطالعه آسیب‌شناسی ضایعات، بیشتر در جهت تشخیص وجود ضایعه گرانولوماتوز بوده است و نوع ضایعه و تغییرات آن همان طوری که انتظار داشتیم با تحقیقات قبلی در زمینه بیماری سل ماهی تفاوت خاصی نداشته است. در مطالعات آسیب‌شناسی پژوهش حاضر مراکز ملانوماکروفاژ به عنوان یک یافته غیراختصاصی ولی مهم دیده شد، مشابه با یافته تحقیق حاضر پژوهشگران زیادی بیان می‌کنند مراکز ملانوماکروفاژ اغلب در گرانولوم‌های بافت‌های آلوده به مایکوباکتریوم‌ها و سایر باکتری‌های بیماری‌زای مزمن شناسایی می‌شوند.



Figure 7: *Mycobacterium fortuitum* colonies (arrows) on the Lowenstein-Jensen medium.

بحث

بیماری‌های باکتریایی مانع اصلی توسعه آبی پروری هستند. بیماری‌های گرانولوماتوز ناشی از باکتری‌ها منجر به از بین رفتن آبزیان با نرخ مرگ و میر بالا و رشد آهسته می‌شوند. باکتری‌های متعلق به جنس‌های، *Francisella sp*, *Nocardia sp*, *Mycobacterium sp*. عوامل قارچی در ایجاد فرآیندهای گرانولوماتوز نقش دارند. در مطالعه حاضر مایکوباکتریوم‌های جدا شده از ۱۰ گونه از ماهیان زینتی به روش آسیب‌شناسی و مولکولی بررسی شدند. تشکیل گرانولوم و پاسخ ایمنی ماهیان همچنان موضوع تحقیقات علمی است. در ماهیان، اولین خط دفاعی از عوامل هومورال غیر اختصاصی مانند ترانسفرین و آنتی-پروتئازها یا عوامل لیتیک به عنوان لیزوزیم و پپتیدهای ضد میکروبی و ارتباط با پاسخ‌های فاگوسیت غیر اختصاصی تشکیل می‌شوند. اگر خط اول دفاعی شکسته شود، ماهیان ترکیبات آنتی‌بادی برای دفاع هومورال خاص که مانع از چسبیدن باکتری‌ها می‌شود، و همچنین بسیج سلول‌های میزبان غیرفاگوسیتیک و مقابله با سموم باکتری‌ها را تولید می‌کند. با این حال، باکتری‌هایی که باعث بیماری‌های گرانولوماتوز می‌شوند، می‌توانند میکروارگانیزم‌های پایداری باشند که از بین بردن آن‌ها دشوار است چرا که با استفاده از برخی از اجزای سیستم ایمنی برای زنده ماندن مقابله با میزبان عمل کرده و می‌توانند باعث بیماری‌های مزمن شوند. نمونه‌هایی از این مکانیسم‌ها اختلال در فرایند آپوپتوز ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T، مهار تشکیل

میوکوندا مقاوم هستند که باید با توجه به جنبه بهداشت عمومی به طور جدی مورد توجه قرار گیرند.

عفونت‌های حاصل از مایکوباکتریوم به دلیل پتانسیل انتقال به انسان، خطر بهداشت عمومی را نیز نشان می‌دهد. تماس بافت آسیب دیده با محیط‌های آلوده ممکن است مسئول عفونت در انسان و حیوانات باشد (Tortoli, 2009). بنابراین، افراد هنگام کار با ماهی‌های بیمار یا تمیز کردن آکواریوم‌ها آلوده می‌شوند (Yacisin, 2017). با توجه به این که این مایکوباکتریوم‌ها بخشی از محیط و همچنین تنوع باکتریایی طبیعی ماهی هستند و علیرغم این واقعیت که در میزبان‌های سالم نسبتاً بدون حدت ایجاد می‌شوند، تمام گونه‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر قبلاً در بیماران انسانی گزارش شده‌اند (Silva Neto et al, 2019). برخی به عنوان ضایعات غیر سلی گزارش شده‌اند (Napaumpaiporn and Katchamart, 2019; Gharbi et al, 2019). عموماً این ضایعات به دنبال وجود یک ضایعه اولیه در انسان بوده‌اند (Cowman et al, 2018; Ko et al, 2017). با این حال تماس با ماهی آلوده از اشتراکات همه موارد بوده است (Kušar et al, 2017). برخی ضایعات نیز اشتبهاً سل تشخیص داده شده‌اند (Dodiuk-gad et al, 2007; Cowman et al, 2018).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد گسترش سل ماهی در ماهیان آکواریومی قابل توجه است. با توجه به گونه‌های شناسایی شده در تحقیق حاضر که پتانسیل زئونوز بودن را نشان می‌دهند، بنابراین ماهیان بیمار ممکن است منبع بالقوه عفونت برای افرادی باشد که با ماهی و آکواریوم کار می‌کنند.

نکروز ماکروفاژهای آلوده یک رویداد حیاتی در طول پاتوژنز سل است زیرا باعث آزاد شدن مایکوباکتریوم‌ها به محیط خارج سلولی و در نتیجه باعث رشد و تکثیر بیش‌تر آن‌ها می‌شود. به عنوان مثال، در ماهی زبرا آلوده به مایکوباکتریوم مارینوم، TNF (فاکتور نکروز بافتی) اضافی با تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) باعث نکروز ماکروفاژهای آلوده می‌شود (Roca et al, 2019).

Beran و همکاران (۲۰۰۶) *M. fortuitum* و *M. chelonae* را در ماهیان بدون ضایعات ماکروسکوپی معمولی جدا کردند، زیرا آن‌ها ساپروفیت‌های رایج در محیط آبی هستند. به نظر می‌رسد حضور آن‌ها به شدت به شیوه‌های مدیریتی ضعیف مرتبط است که منجر به استرس غیرعادی ماهی‌ها و کاهش مقاومت طبیعی آن‌ها می‌شود. Zaroni و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که ضایعات ماکروسکوپی حاکی از مایکوباکتریوز تنها در ۱۰/۸ درصد از نمونه‌های ماهی دیده شده و فقط در ماهیانی گزارش گردیده که در بررسی میکروسکوپی مثبت بودند. طبق گزارش Seema (۲۰۱۴)، ۷۰/۶ درصد از نمونه‌های ماهی‌های آکواریومی جمع‌آوری شده در یک مطالعه، مایکوباکتریوم از اندام‌های پارانشیمی دارای گرانولوم رشد کرده است.

در مطالعه دیگری Uma و Ronald (۲۰۱۶) گزارش کردند باکتری *M. fortuitum* جدا شده از ماهی طلایی دارای زخم جلدی، خصوصیات بیوشیمیایی و توالی srNA۱۶ مشابه موارد جدا شده از ماهی‌های دیگر داشته است. نتایج مطالعه نشان داد که مایکوباکتریوزیس می‌تواند در ماهی طلایی شایع باشد. آزمایش آنتی‌بیوگرام نشان داد که ایزوله‌ها به پیرازینامید، ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول و

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان محترم بخش آبیان و میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز همچنین کارشناسان و مدیران پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

این پژوهش با استفاده از اعتبار پژوهانه شماره (SCU.V1403.413) دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد.

منابع

- Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., & Pavlik, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 51(7), 365-389.
- Cowman, S.A., James, P., Wilson, R., Cookson, W.O.C., Moffatt, M.F., & Loebinger, M.R. (2018). Profiling mycobacterial communities in pulmonary nontuberculous mycobacterial disease. *PLoS One*, 13(12), 8018-8019.
- Delghandi MR, Waldner K, El-Matbouli M, Menanteau-Ledouble S. (2020). Identification *Mycobacterium* spp. in the Natural Water of Two Austrian Rivers. *Microorganisms*.; 8(9):1305.
- Dodiuk-gad, R., Dyachenko, P., Ziv, M., Shani-adir, A., Oren, Y., Mendelovici, S., Shafer, J., Chazan, B., Raz, R., Keness, Y. & Rozenman, D. (2007). Nontuberculous mycobacterial infections of the skin: a retrospective study of 25 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(3), 413-420.
- Gharbi, R., Mhenni, B., Fraj, S.B., & Mardassi, H. (2019). Nontuberculous mycobacteria isolated from specimens of pulmonary tuberculosis suspects, Northern Tunisia: 2002–2016. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 819-823.
- Jafarizadeh, M., Peyghan, R. & Eftekhar Manavi, S. (2014). The detection of *Ichthyophonus hoferi* in naturally infected fresh water ornamental fishes. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(7), 289-294.
- Ko, J.S., Kim, S.K., Yong, D.E., Kimm, T. I., & Kim, E.K. (2017). Delayed onset *Mycobacterium* intracellular keratitis after laser in situ keratomileusis. *Medicine*, 96(51), 9356-9359.
- Kušar, D., Zajc, U., Jenčič, V., Očepek, M., Higgins, J., Žolnirdovč, M., & Pate, M. (2017). Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3-year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *Journal of Fish Diseases*, 40(6), 773-784.
- Napaumpaiporn, C., & Katchamart, W. (2019). Clinical manifestations and outcomes of musculoskeletal nontuberculous mycobacterial infections. *Rheumatology International*, 39(10), 1783-1787.
- Park H., Jang H., Kim C., Chung B., Chang C. L., Park S. K. (2000). Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus- and species-specific PCR primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 4080–4085.
- Pate, M., Jenčič, V., Žolnir-dovč, M., & Očepek, M. (2005). Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(1), 29-35.
- Rallis, E., & Koumantaki-mathioudaki, E. (2007). Treatment of *Mycobacterium marinum* cutaneous infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(17), 2965-2978.
- Roca, F.J., Whitworth, L.J., Redmond, S., Jones, A.A., & Ramakrishnan, L. (2019). TNF induces pathogenic programmed macrophage necrosis in tuberculosis through a mitochondrial-lysosomal-endoplasmic reticulum circuit. *Cell*, 178, 1344–1361.
- Seema, S. K. (2014). Aquarium Fish: Study on Mycobacterial Infection. *Indian Journal of research*, 3 (7): 215 – 216.

- Silvaneto, J.P., Machado, K.N.C., & Roisman, L. (2019). Choroidal granuloma caused by *Mycobacterium fortuitum*. *International Journal of Retina and Vitreous*, 5(37), 185-188.
- Soler, G., Forrellat, M., & Romero, Y. (2018). Evasion of the immune system by *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms. *Tecnología de la Salud*, 9 (2), 190-199.
- Santos, E. (2021). Detection of *Mycobacterium* sp. by multiplex PCR directly from suspicious granulomas from cold chambers in the state of Bahia, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 88, 1-8.
- Talaat, A.M., Reimschuessel, R., & Trucksis, M. (1997) Identification of mycobacteria infection fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Veterinary Microbiology*, 58: 229-237
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E., & Bodmer, T. (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 175-178
- Tortoli, E. (2009). Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(10), 906-910.
- Uma, A., & Ronald, B. S. (2016). Drug resistance in *Mycobacterium fortuitum* isolated from gold fish, *Carassius auratus*. *International Journal of Science and Environment*, 5, 4411-4417.
- Yacisin, K., Hsieh, J.L., Weiss, D., Ackelsberg, J., Lee, E., Jones, L., Leung, Y.L., Li, L., Yung, J., Slavinski, S., Hanson, H., Ridpath, A., Kornblum, J., Lin, Y., Robbe-austerman, S., Rakeman, J., Siemetzki-kapoor, U., Stuber, T., & Greene, S.K. (2017). Outbreak of non-tuberculous mycobacteria skin or soft tissue infections associated with handling fish – New York City, 2013–2014. *Epidemiology and Infection*, 145(11), 2269-2279.
- Zanoni, R. G., Florio, D., Fioravanti, M. L., Rossi, M., & Prearo, M. (2008). Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy. *Journal of fish diseases*, 31(6), 433-441.
- Whipps, C.M., Burton, T. & Watral, V.G. (2006) Assessing the accuracy of a polymerase chain reaction test for *Ichthyophonus hoferi* in Yukon River Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 68: 141–147.

Received: 03.11.2023

Accepted: 03.07.2024

Pathological, microbiologic and molecular investigation of granulomatous lesions in 10 species of ornamental fish in Ahvaz

Maryam Hoseinpour hamoleh¹, Rahim Peyghan^{2*}, Anahita Rezaie³, Masood Ghorbanpoor⁴

¹ PhD Graduate in Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Livestock Animal, Poultry and Fish Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran and Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 03.11.2023

Accepted: 03.07.2024

Abstract

In the present study thirty pieces of ten species of ornamental aquarium fish (Amazon molly fish, guppy, oscar, angel, zebra fish, macro, neon tetra, gold fish, tiger barb and gourami) that were moribund with symptoms of chronic disease (300 fish in total) were examined. Sampling was done from grossly positive organs (with granular lesions in viscera). In total, out of 300 examined samples, granulomatous lesions were observed in the intestine and viscera in 46 cases (12%). The most granulomatous lesions were observed in gourami, goldfish and neon tetra. No lesions were observed in guppy and zebra fish. The highest percentage of lesions was recorded in the spleen and liver, respectively. Also, the spleen was found to be the most infected organ of fish to tuberculosis lesions. Finally, using PCR method, 1 isolates were identified as *Mycobacterium marinum*, 3 isolate as *Mycobacterium chelonae* and 3 isolates as *Mycobacterium fortuitum*. In this study, no infection to *Ichthyophonus* was detected. Based on the results of PCR with specific primers for *Ichthyophonus hoferi*, the presence of the specific gene for this organism was not proven in any of the samples. This study showed that fish tuberculosis infection exists in aquarium fish in Iran.

Key words: Granulomatosis, Ornamental fish, Ahvaz, Mycobacterium, Ichthyophonus

* **Corresponding Author:** Rahim Peyghan, Professor, Department of Livestock Animal, Poultry and Fish Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran and Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: Peyghan_r@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).