مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۴، ۳۵۸ - ۳۵۳

بررسی مایکوباکتریوزیس در ماهیان آکواریومی: یک مطالعه مقطعی در اهواز

رحیم پیغان[1*] بختیار حیدری[2] مسعود رضا صیفی آبادشاپوری[1] محمد رشنو[3]

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
۲) دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
۳) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۱ اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۲۶ تیر ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری سل ماهی یک بیماری باکتریایی است که در اثر آلودگی به مایکوباکتریوم‌ها ایجاد می‌گردد. **هدف:** هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی آلودگی مایکوباکتریایی برخی ماهیان آکواریومی با آزمایش PCR بود. **روش کار:** در این تحقیق تعداد ۱۵۰ قطعه از ۵ گونه ماهی آکواریومی (اسکات، اسکار، سوروم، نئون‌تترا و ماکروزرد) (از هر گونه ۳۰ قطعه) از فروشندگان ماهیان آکواریومی شهر اهواز تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سعی گردید ماهیانی انتخاب شود که دارای علائمی از قبیل زخم‌های جلدی، بی‌اشتهایی، بی توجهی به اطراف و لاغری باشند. در بررسی کالبدگشایی ماهیان مورد مطالعه، هیچ موردی مبنی بر وجود ضایعات دانه‌ای یا بافت گرانوله که با چشم غیر مسلح دیده شود، مشاهده نگردید. جهت بررسی آلودگی مایکوباکتریایی، اندام های کبد، کلیه و طحال برداشت و پس از استخراج DNA به روش PCR مورد ردیابی مولکولی قرار گرفتند. **نتایج:** از ۵ گونه ماهی آزمایش شده در این مطالعه، تنها در یک قطعه ماهی (ماهی سورم)، وجود آلودگی به مایکوباکتریوم‌ها نشان داده شد. پس از انجام آزمایشات مربوط به تعیین سکانس، مایکوباکتریوم شناسایی شده از نوع مایکوباکتریوم بوویس تشخیص داده شد. بقیه ماهیان مورد بررسی از نظر آلودگی به مایکوباکتریوم‌ها منفی شناخته شدند. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به اینکه گونه بوویس در آبزیان بیماریزا نیست، این آلودگی می‌تواند در اثر انتقال آلودگی از فرد آلوده به سل و یا مواد غذایی آلوده به مایکوباکتریوم بوویس به ماهی مورد نظر باشد. هر چند نتیجه این تحقیق نشان داد آلودگی به مایکوباکتریوزیس ماهی (آلودگی به گونه های مایکوباکتریوم جانوران خونسرد) منفی بوده است اما در بیماری‌های مهم و زئونوز از جمله مایکوباکتریوزیس نتیجه منفی تحقیقات نیز مهم است زیرا نشانگر عدم آلودگی منطقه به بیماری مورد نظر می باشد.

واژه‌های کلیدی: ماهی آکواریومی، مایکوباکتریوم، روش PCR، شهرستان اهواز، مایکوباکتریوز.

مقدمه

مایکوباکتریوزیس یا توبرکلوز ماهی یک بیماری زئونوز مرتبط با شغل می‌باشد که طیف وسیعی از گونه‌های مختلف ماهیان پرورشی، وحشی و آکواریومی را مبتلا می‌سازد (۵،۷). مایکوباکتریوم‌ها از خانواده مایکوباکتریاسه، باکتری‌های میله‌ای شکل، هوازی اجباری، صاف یا کمی خمیده، غیرمتحرک، بدون اسپور می‌باشند (۱،۱۲). مایکوباکتریوم‌ها را می‌توان به لحاظ اهمیت کلینیکی به سه گروه تقسیم کرد: گروه پاتوژن‌های اجباری که در محیط یافت نمی‌شوند، گروه مایکوباکتریوم‌های محیطی که در آب و خاک می‌توان آن‌ها را یافت و گروه دیگر، گونه‌های ساپروفیت غیر پاتوژن که تنها در شرایط خاصی می‌توانند پاتوژن باشند (۱۸). سه گونه متداول مایکوباکتریوم بیماریزا در ماهی شامل؛ مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم فورتویتوم و مایکوباکتریوم چلونئی می‌باشد (۱۲). این میکروارگانیسم‌ها از طریق آب و خاک، مواد غذایی آلوده و میزبان تک یاخته قابل انتقال هستند (۸،۱۵). سل ماهی یک بیماری مزمن می‌باشد و علائم کلینیکی ماهیان مبتلا به این بیماری شامل بی‌اشتهایی، بی‌توجهی به اطراف، ناهنجاری‌های اسکلتی، آسیت، بزرگ شدگی طحال، کبد و کلیه و همچنین ندول‌های سفید و خاکستری رنگ در اندام‌های داخلی می‌باشد. علائم کلینیکی خارجی در ماهی اختصاصی نیست و شکل حاد بیماری در مواردی که میزان آلودگی زیاد باشد مشاهده می‌شود (۵). علائم بالینی در انسان به صورت ضایعات جلدی شبیه بیماری سالک می‌باشد. ضایعات بیماری در انسان محدود به پوست بوده و به ندرت به قسمت‌های عمقی کشیده می‌شود، ولی در صورت مساعد بودن شرایط مثل ضعف سیستم ایمنی ممکن است به صورت عفونت منتشر دیده شود (۲،۷). هدف از تحقیق حاضر بررسی آلودگی مایکوباکتریایی در ۵ گونه ماهیان آکواریومی با آزمایش PCR بوده است.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری: ماهیان مورد بررسی در این مطالعه شامل ۵ گونه از جمله ماهی اسکات، اسکار، نئون‌تترا، ماهی سورم و ماکروزرد (هرکدام به تعداد ۳۰ قطعه) بوده‌اند. ماهی‌ها پس از تهیه از آکواریوم‌های مختلف سطح شهر اهواز، به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. پس از نگهداری ماهی‌ها به مدت ۲ تا ۳ روز در آکواریوم‌های بخش بیماریهای ماهی، عملیات نمونه‌برداری انجام شد. از مخلوط اندام‌های کبد، کلیه و طحال هر ماهی، مجموعاً به میزان ۱۰۰mg-۵۰ بافت برداشت شد. پس از آن نمونه‌ها به داخل میکروتیوب منتقل و تا زمان

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۷۳۸۰۹۸-۰۶۱۱ نمابر: ۳۳۶۰۸۰۷-۰۶۱۱ Email: rpeyghan@yahoo.com

شروع انجام آزمایشات لازم در فریزر $-20^{o}C$ نگهداری شدند.

استخراج DNA و بررسی کیفیت DNA استخراج شده در PCR: استخراج DNA با روش Talaat و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام شد (۱۶). بدین منظور در ابتدا ۵۰-۱۰۰mg از هر نمونه بافتی در ۳۰۰µL PBS حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۸۰ هموژن شد. سپس ۱۰۰µL از نمونه هموژن شده با ۴۰۰µL PBS رقیق شده و ۶ دقیقه سونیکاسیون انجام شد. پس از سونیکاسیون، نمونه هموژن شده بمدت ۱۰ دقیقه جوشانده و بعد ۲۰ ثانیه با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتها مایع روی رسوب حاصل از سانتریفیوژ، بعنوان نمونه قابل استفاده در PCR استفاده شد. برای اطمینان از کارایی روش استخراج DNA و کیفیت DNA استخراج شده جهت استفاده در PCR، تکثیر ژن سیتوکروم b ماهی ماکرو زرد در PCR مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی ژن سازنده سیتوکروم- ب، میتوکندری ماهی ماکرو زرد با شماره دسترسی AF370637 از بانک ژن استخراج و پرایمرهای (CTBF-GCCATACAYTACACCTCYGA و CTBR-GAGTTGCCAATATAAGGGACT) با استفاده از برنامه نرم افزار primer 3، طراحی گردید. برنامه حرارتی PCR شامل ۳۵ چرخه دمایی 95°، ۱،۹۵ دقیقه، 50°، ۱،۵۰ دقیقه و 72°، ۱،۷۲ دقیقه بود. پیش از آغاز این چرخه‌های دمایی یک مرحله حرارت در 95°، بمدت ۳ دقیقه و در پایان نیز یک مرحله حرارتی در $72^{o}C$ بمدت ۵ دقیقه اعمال گردید.

آزمایش PCR بر روی DNAهای استخراج شده برای جستجوی آلودگی مایکوباکتریایی: جهت انجام این آزمایش از پرایمرهای عمومی مایکوباکتریوم (Tb11-ACCAACGATGGTGTGTCCAT و Tb12-CTTGTCGAACCGCATACCCT) استفاده شد (۱۷). در این آزمایش برنامه حرارتی PCR شامل ۴۰ چرخه دمایی 95°، ۱،۹۵ دقیقه، 60°، ۱ دقیقه و 72°، ۱،۷۲ دقیقه و غلظت مواد لازم برای واکنش PCR، تماماً براساس روش تلنتی و همکاران تعیین گردید (۱۷). مواد لازم برای واکنش PCR در مجاورت یخ و در زیر هود کلاس II درون میکروتیوب‌های ۰/۲mL مخصوص PCR که عاری از DNAase و RNAase بودند با یکدیگر مخلوط شدند. جهت اطمینان از صحت آزمایش‌های PCR، از DNA استخراج شده از واکسن BCG به عنوان کنترل مثبت و از آب دو بار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای مشاهده محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید.

تعیین سکانس: جهت تعیین توالی محصول PCR مایکوباکتریایی، DNA تولید شده در PCR که دارای طول قابل انتظار بود در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و سپس با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل ساخت شرکت کیاژن آلمان خالص گردید. DNA خالص شده به همراه پرایمرهای Tb11 و Tb12 جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی بدست آمده با برنامه Blast مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

بررسی ظاهری و درمانگاهی: وضعیت ظاهری اکثر ماهیان مورد مطالعه نسبتاً طبیعی بوده و فقط در چند مورد زخم‌های جلدی در ناحیه باله سینه‌ای و مواردی از بی‌اشتهایی، بی‌توجهی به اطراف و لاغری مشاهده شد. در بررسی کالبدگشایی ماهیان مورد مطالعه هیچ ضایعه آسیب شناختی که با چشم غیر مسلح دیده شود مشاهده نگردید.

اطمینان حاصل کردن از صحت استخراج DNA: پس از استخراج DNA از اندام‌های کبد، کلیه و طحال کیفیت DNA استخراج شده با آزمایش PCR بر روی ژن سیتوکروم b ماهی‌های ماکرو زرد بررسی گردید. نتایج الکتروفورز محصولات PCR تعدادی از نمونه‌های مورد آزمایش در تصویر ۱ نشان داده شده است. با توجه به محل اتصال پرایمرهای مورد استفاده طول محصول PCR قابل انتظار ۳۲۰ جفت باز بود. نتایج نشان داد که محصول مورد انتظار بخوبی تولید شده بود و لذا روش بکار رفته برای استخراج DNA قابل اطمینان بود.

پس از اطمینان از موثر بودن روش استخراج DNA، تمام DNAهای استخراج شده از ۵ گونه ماهی آکواریومی یا استفاده از پرایمرهای عمومی مایکوباکتریایی مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به محل اتصال پرایمرهای مورد استفاده طول محصول قابل انتظار در این روش PCR ۴۳۰ جفت باز بود.

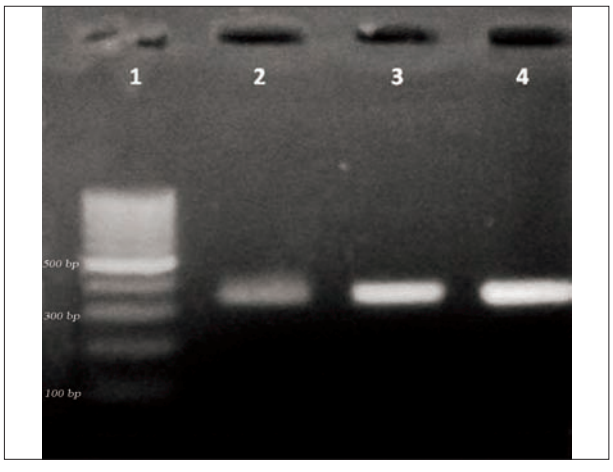
نتایج آزمایش PCR: پس از انجام PCR و بررسی محصولات PCR تمامی نمونه‌ها در ژل آگارز، در هیچ یک از ماهیان اسکار، ماکرو، نئون تترا و ماهی اسکات آلودگی به مایکوباکتریوم‌ها مشاهده نشد. تنها در یک قطعه ماهی از گونه سورم (هروس سوروس) آزمایش PCR منجر به ساخت قطعه ایی DNA با طول قابل انتظار (۴۳۰bp) شده بود (تصویر ۲).

این قطعه DNA پس از خالص سازی از ژل آگارز تعیین توالی گردید. بررسی توالی این بدست آمده با برنامه Blast نشان داد که این محصول متعلق به گونه مایکوباکتریوم بویس بود.

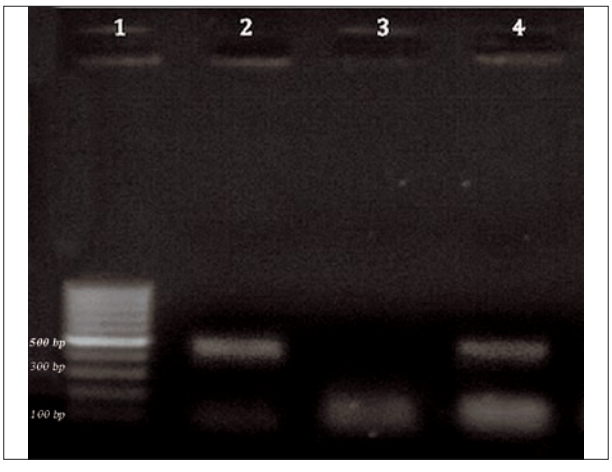
بحث

بیماری سل ماهی گسترش جهانی دارد و تمامی ماهیان آب شیرین و دریایی گرمسیری به آن حساسند. با این حال بیماری در بعضی از ماهیان از جمله نئون تترا، کپور، ماهی حوض، گورامی و ماهی آزاد بیشتر گزارش شده است. اولین گزارش عفونت مایکوباکتریوم ماهی به باتالون در سال ۱۸۹۷ نسبت داده می‌شود، آنها باکتری را از جراحات توبرکلوزی ماهی کپور معمولی جدا نمودند (۱۱). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی بررسی میزان آلودگی ماهیان به مایکوباکتریوم‌ها در نقاط مختلف دنیا از جمله ایران انجام گرفته است که نتایج این مطالعات نشان دهنده گسترش گسترش جهانی این میکروارگانیسم دارد (۵).

هدف از این مطالعه بررسی وضعیت پنج گونه ماهی آکواریومی



تصویر ۱ـ نتایج الکتروفورز محصولات PCR ماهیان مورد آزمایش جهت تایید استخراج DNA. ردیف ۱- نردبان ژنی استاندارد (۱۰۰bp). ردیف‌های ۲، ۳ و ۴: محصول PCR بر روی ژن سیتوکروم b نمونه‌های DNA ماهیان ماکرو زرد.



تصویر ۲ـ نتایج الکتروفورز محصولات PCR ماهیان مورد آزمایش. ردیف ۱: نردبان ژنی استاندارد (۱۰۰ bp). ردیف‌های ۲: شاهد مثبت، ردیف ۳: شاهد منفی، ردیف ۴: نمونه مثبت آلوده به مایکوباکتریوم.

سورم، اسکار، نئون تترا، اسکات و ماکرو از نظر آلودگی باکتریایی به مایکوباکتریوم بود. این باکتری بارها از ماهیان پرورشی و آکواریومی در نقاط مختلف دنیا گزارش شده است. گزارش هایی در رابطه با سرایت آن‌ها به انسان نیز وجود دارد، اما در ایران گزارش تایید شده‌ای از این بیماری در ماهیان آکواریومی وجود ندارد. این مطالعه بر روی ۱۵۰ ماهی آکواریومی از پنج گونه مختلف سورم، ماکرو، نئون تترا، اسکار و اسکات و از هر گونه به تعداد ۳۰ قطعه انجام شد. آلودگی به مایکوباکتریوم فقط در گونه ماهی سورم (۱مورد) تشخیص داده شد، که این می تواند در اثر انتقال آلودگی از فرد آلوده به سل و یا مواد غذایی آلوده به مایکوباکتریوم بوویس به ماهی مورد نظر باشد. در بررسی ماهی اسکار، ماکرو، نئون تترا و ماهی اسکات آلودگی به مایکوباکتریوم‌ها مشاهده نشد.

در ایران چندین مطالعه در رابطه با بررسی شیوع مایکوباکتریوم، در ماهیان آکواریومی و پرورشی انجام شده است. مطالعات منتشر نشده بر روی بررسی بیماری سل ماهی در ماهیان آکواریوم شهرستان اهواز نظیر گوپی، گلدفیش، نئون تترا و مولی با استفاده از کشت باکتریایی، انجام گرفت که در هیچکدام از ماهی‌های مورد بررسی گزارشی مبنی بر وجود بیماری مشاهده نشد با اینحال در کشورهای دیگر گزارشات متعددی در مشاهده آلودگی ماهی و انسان به مایکوباکتریوم‌های ماهی وجود دارد (۳). با توجه به اینکه در مطالعه مذکور از ماهیانی نمونه برداری شده بود که علائم بیماری را نشان داده بودند و از آنجا که صاحبان آکواریوم معمولاً ماهی‌های دارای علائم بیماری را از آکواریوم حذف می‌کنند، در نتیجه احتمال مواجه شدن با ماهیان آلوده که بتوان وجود مایکوباکتریوم در آن را به اثبات رساند نیز کاهش می یابد. اما در مطالعه حاظر نمونه برداری از ماهی‌ها، بدون در نظر گرفتن هرگونه علائم کلینیکی و به طور تصادفی صورت گرفت، پس احتمال حذف ماهی‌های آلوده نیز توسط صاحبان آکواریوم کاهش یافت.

مطالعه‌ای توسط Ghazi-Saeidi و همکاران در سال ۱۳۸۵ بر روی فراوانی مایکوباکتریوم مارینوم در ماهیان صید شده در شیلات آشوراده استان گلستان انجام شد که از ۱۱۳ نمونه آبشش ماهیان خاویاری ۲ مورد (۱/۷۶٪) مایکوباکتریوم مارینوم جدا شد (۷). مطالعات مختلف دیگری در ایران در زمینه وجود مایکوباکتریوم مارینوم و سایر مایکوباکتریوم‌های محیطی انجام شده است و فراوانی مایکوباکتریوم مارینوم در آن‌ها از ۷/۲٪ در خاک‌های مرطوب استان مازندران، ۵/۷۴٪ در استخرهای پرورش ماهی گیلان و مازندران، ۱/۶٪ در ماهیان پرورشی گیلان و مازندران و ۱/۲٪ در خاک‌های استان گلستان گزارش شده است. فراوانی آلودگی در ماهی‌ها در شیلات آشوراده مشابه فراوانی آلودگی در ماهیان پرورشی در گیلان و مازندران و نیز فراوانی میکروب در خاک‌های استان گلستان می‌باشد (۷) که این می تواند به علت تشابه نسبی آب و هوا، رطوبت و پوشش گیاهی در این مناطق باشد. زیرا مطالعات به خوبی نشان داده است که عوامل فوق به همراه pH خاک در تعیین فلور طبیعی هر منطقه تأثیر به سزایی دارند (۶).

مطالعاتی که در خاک اهواز و آذربایجان شرقی انجام شد به ترتیب وفور مایکوباکتریوم‌های محیطی در خاک این شهرها را برابر ۲۴/۱٪ و ۱۲/۱٪ برآورد نموده‌اند که آشکارا پایین تر از یافته‌های مناطق شمالی می‌باشد. مقایسه مناطق شمالی به لحاظ فلور طبیعی نیز حاکی از این می‌باشد که در مناطقی که آب و هوای گرم‌تر و رطوبت پایین‌تر دارند میزان فراوانی مایکوباکتریوم‌های محیطی نیز پایین می‌باشد (۶) در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی بررسی میزان آلودگی ماهیان به مایکوباکتریوم‌ها در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته است که نتایج این مطالعات نشان دهنده گسترش گسترش جهانی این میکروارگانیسم می‌باشد (۱۴).

مطالعه‌ای توسط Pate و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی تشخیص

آلودگی مایکوباکتریایی در گونه‌های مختلفی از ماهیان زینتی انجام شد که از ۳۵ ماهی مورد مطالعه، در ۲۹ مورد (۸۲/۹٪) آلودگی به مایکوباکتریوم تشخیص داده شد (۱۰). Chang و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Whipps و همکاران در سال ۲۰۰۷ به ترتیب توانستند مایکوباکتریوم آبسزوس از ماهی خامه ماهی و مایکوباکتریوم هموفیلوم را از ماهی گورخری جداسازی کنند (۴،۱۹).

Mouton و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ای آلودگی چهار ماهی آکواریومی گوپی، گلدفیش، کاردینال تترا و کویی را به مایکوباکتریوم در آفریقای جنوبی بررسی کردند. نتیجه بدست آمده جداسازی مایکوباکتریوم فورتویتوم از ماهی کویی و گلدفیش بود در حالی که باکتری از ماهی نئون تترا و گوپی جدا نشد (۹). Seok و همکاران در سال ۲۰۰۶ گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم شامل مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم چلونی، مایکوباکتریوم پرگرینوم را از ماهی گورخری جدا نموده و بیماریزایی مایکوباکتریوم مارینوم آن را بررسی کرده‌اند (۱۳).

به طور کلی با توجه به اینکه روش PCR یک روش بسیار دقیق و حساس در مشخص نمودن آلودگی به مایکوباکتریوم‌ها است، این یافته که آلودگی از ماهی سوروم جداسازی شده است یافته مهمی است، اما برای اثبات وجود بیماری لازم است بررسی‌های دقیق‌تری بر روی این گونه ماهی انجام شود و با بررسی‌های پاتولوژی و باکتری‌شناسی وجود آلودگی و ضایعات اثبات شده و اقدام به خالص سازی باکتری شود.

تشکر و قدردانی

از کارکنان محترم دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد. این تحقیق در قالب پژوهانه سال ۱۳۹۰، اعطایی از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران و پایان نامه دانشجویی انجام گردیده است.

References

1. Al-e-Hashem, S., Dara, M., Aghajani, R., Mohammadi, S. (1372) Javet's Microbiology. Vol (2). (19th ed.). Ayandeh sazan publisher. Tehran, Iran.
2. Aubry, A., Chosidow, O., Caumes, E., Robert, J., Cambau, E. (2002) Sixtythree cases of *Mycobacterium marinum* infection: clinical features, treatment, and antibiotic susceptibility of causative isolates. Arch .Intern. Med. 162: 1746-52.
3. Bhatty, M.A., Turner, D.P.J., Chamberlain, S.T. (2000) *Mycobacterium marinum* hand infection: case reports and review of literature. Br. J. Plast. Surg. 53: 16 l-165.
4. Chang, T.C., Hsieh, C.Y., Chang, C.D., Shen, Y.L., Huang, K.C., Tu, C., et al. (2006) Pathological and molecular studies on mycobacteriosis of milkfish *Chanos chanos* in Taiwan. Dis. Aqua. Org. 72: 147-151.
5. Gauthier, D.T., Rhodes, M.W. (2009) Mycobacteriosis in fishes: A review. VET. J. 180: 33-47.
6. Ghaemi, E., Ghazi-Saeidi, K., Kohsari, H., Khodabakhshi, B., Kohsar, F. (1381) Comparision of environmental mycobacteria in low and high prevalence area of tuberculosis in Golestan province. J. Gorgan. Uni. Med. Sci. 10: 48-53.
7. Ghazi-Saeidi, K., Hashemzadeh, R., Mohammadi, M., Fateminesab, F., Ghaemi, E. (1385) Prevalence of swimming pool granoluma and *mycobacterium marinum* in fisheries industry personals and captured fishs in Ashuradeh, Golestan province. J. Gorgan. Uni. Med. Sci. 8: 60-62.
8. Hoffmann, R., Michel, R. (2001) Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. Int J. Hyg. Environ. Health. 203: 215-219.
9. Mouton, A., Basson, L., Impson, D. (2001) Health status of ornamental freshwater fishes imported to South Africa: a pilot study. Aqua. Sci. Cons. 3: 327-333.
10. Pate, M., Jencic, V., Zolnir-Dovc, M., Ocepek, M. (2005) Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. D.A.O.

64: 29-35.

11. Peyghan, R. (1386) Fish Diseases. (1st ed.) Shahid Chamran University Publication. Ahvaz, Iran.
12. Peyghan, R., Mahjour, A. (1386) Fish Pathology. (1st ed.) Shahid Chamran University Publication. Ahvaz, Iran.
13. Seok, S.H., Koo, H., Kasuga, A., Kim, Y., Lee, H. (2006) Use of PCR-restriction fragment length polymorphism for identification of zoonotic mycobacteriosis in Zebrafish caused by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. Vet. Microbiol. 114: 292-297.
14. Soltani, M. (1375) Fish Bacterial Diseases. (1st ed.) Nashre Jahad Institue. Tehran, Iran.
15. Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L., Block, J.C. (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. Appl Environ. Microbiol. 64: 197-202.
16. 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. Vet. Microbiol. 58: 229-237.
17. 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. J. Clin. Microbiol. 31: 175-178.
18. Vaerewijck, M.J.M., Huys, G., Palomino, J.C., Swings, J., Portaels, F. (2005) Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. F.E.M.S. Microbiol Rev. 29: 911-934.
19. Whipps, C.M., Dougan, S.T., Kent, M.L. (2007) *Mycobacterium haemophilum* infections of zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities. F.E.M.S. Microbiol. Lett. 270: 21-22.

Investigation on Mycobacteriosis in aquarium fish: A periodic study in Ahvaz

Peyghan, R.[1*], Heydari, B.[2], Seifiabad Shapouri, M.R.[1], Rashnoo, M.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.*

[2]*Graduted Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.*

[3]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.*

(Received 30 April 2012 , Accepted 16 July 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Mycobacterial infection or Mycobacteriosis is one of the most important zoonotic bacterial diseases in fish, especially in aquarium fish, worldwide. Despite the importance of this disease, there is no record about the surveillance of this disease in Ahvaz region-Iran. **OBJECTIVES:** In this investigation the occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish was studied using PCR technique. **METHODS:** In this survey, 150 fish were obtained from aquarium shops of Ahvaz. The fish was belonged to 5 species, i.e. *Scatophagus argus*, *Astronotus ocellatus*, *Heross severus*, *Caesioteres* sp. and *Symphysodon aequifasciatus*. The fish were transferred to the laboratory and examined after dissection. Meanwhile, liver, kidney and spleen samples were collected for PCR analysis. **RESULTS:** 80% of the examined fish showed no gross lesions at necropsy. However, only in a few fish some symptoms such as emaciation and anorexia were observed. In this study only 1 out of 150 fish (*Heros severus*) was detected as positive in PCR examination. Meanwhile, in DNA sequencing the bacterial species was recognized as *Mycobacterium bovis*. Other fish species showed no infection with Mycobacteria in PCR examination. **CONCLUSIONS:** Due to no pathogenesis of *M. bovis* in fish, this positive specimen can be considered as a transmission to fish from infected persons or feed products. These negative findings show that this Iranian region can be considered as a freeone for these particular pathogens.

Key words: mycobacterial infection, PCR, aquarium fishes, Ahvaz, mycobacteriosis.

Figure Legends and Tabel Captions

Figure 1. The electrophoresis results of PCR products in tested fish in order to confirm DNA extraction. Column 1: Ladder standard gene (100bp), Column 2, 3, 4: the PCR products of cytochrome b gene in DNA samples of yellow macro fish.

Figure 2. The electrophoresis results of PCR products in tested fish. Column 1: Ladder standard gene (100bp), Column 2: Positive control, Column 3: negative control, Column 4: Positive sample infected to *mycobacterium*.

***Corresponding author's email: rpeyghan@yahoo.com, Tel: 0611-3738098, Fax: 0611-3360807**