

گزارش یک مورد وقوع عارضه دهان قرمز زده ای (Yersiniosis) در ماهیان قزل

آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استان کهگیلویه و بویر احمد

محمدسعید گنجور^{۱*}، سیدجلیل ذریه زهرا^۲، محمدرضا مهربانی^۲؛ عین الله گرجی پور^۱؛
حبیب الله گندمکار^۱؛ محسن محمدپور^۱؛ محمدمیثم صلاحی^۱

*ganjoor.s@gmail.com

- ۱-مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
۲-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۲

لغات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، یرسینیوزیس، استان کهگیلویه و بویر احمد.

باکتریایی، دهان قرمز هگرم، بیماری دهان قرمز، بیماری لکه خونی چشم آزاد ماهی و بالاخره بیماری قرمز آنتریک معرفی شده است (ذریه زهرا، ۱۳۸۴؛ سلطانی، ۱۳۸۰؛ مخیر، ۱۳۷۴؛ گنجور، ۱۳۹۰؛ Eiras et al., 2008; Ispir et al., 2008). بیماری یرسینیوزیس از ۲۵ سال قبل شناخته شده و برای آن واکسن تجاری و موثر نیز در دسترس است (Horne and Barnes, 1999). بروز یرسینیوزیس تا بحال در کشورهای متعددی جهان از جمله ترکیه، ایالات متحده آمریکا، رومانی و ایران (استانهای مازندران، تهران، فارس) گزارش شده است (Altinok et al, 2001; Akhlaghi and Sharifi Yazdi, 2008; Guguianu et al., 2009; Seker et al., 2012; Tobback et al., 2007). هر چند که در سال ۱۳۷۶ در ایران (استان فارس) تحقیقی بمنظور شناسایی این بیماری انجام شد اما هیچگونه آلودگی گزارش نشد (اخلاقی، ۱۳۹۰؛ Sedaghati, 1997).
۱۳۳

میزان تولید قزل آلا به عنوان تنها ماهی پرورشی در استان کهگیلویه و بویر احمد طی سال های ۱۳۹۰ و ۹۱ بترتیب برابر با ۹۱۹۰ و ۱۱۱۳۰ تن بوده است (سالنامه آماری شیلات، ۸۹-۱۳۹۱). که با احتساب قیمت کیلویی ۷۸۳۹۰ ریال، ارزش تولید کل استان در سال ۹۱ معادل ۸۷ میلیارد ریال بوده است. کشت متراکم و استفاده از سیستمهای بازیافت آب به شیوع بیماری ها کمک می نماید (Akhlaghi & Sharifi Yazdi, 2008). یرسینیا روکری یکی از عوامل مهم بیماریزا در قزل آلای رنگین کمان است. این باکتری عامل ایجاد بیماری دهان قرمز زده ای (Enteric Redmouth Disease – ERM) می باشد که یکی از بیماریهای مهم آزاد ماهیان است و اولین بار در سال ۱۹۶۶ میلادی گزارش و توصیف گردید (Ross et al., 1966; Rucker, 1966). این بیماری با اسامی دیگر همچون یرسینیوزیس (سپتی سمی یرسینیایی)، بیماری دهان قرمز انترو

سال ۱۳۸۱ جداسازی یک عامل بیماریزا مشابه با یرسینیه، از استان تهران گزارش شد (Soltani and Tarahomi, 2002) (Zorriehzahra, 2002) همچنین عامل بیماری از ماهیان قزل آلائی رنگین کمان پرورشی استان چهار محال و بختیاری و شهرستانهای اقلید و سپیدان از استان فارس در سال ۱۳۸۳ نیز گزارش گردید (اخلاقی، ۱۳۹۰؛ Akhlaghi & Sharifi Yazdi, 2008؛ Soltani et al., 1999). مهمترین محل استقرار و منشاء این باکتری، ماهیان بیمار و میزبانان ناقل هستند و بنظر می‌رسد که انتقال بیماری از طریق جریان آب صورت می‌گیرد. گفته شده که باکتری در آبهای گل آلود و لجنی تا ۲ ماه زنده می‌ماند. عامل این بیماری، نوعی باکتری گرم منفی، میله‌ای، به اندازه تقریبی $2-3 \times 0.7-1$ میکرومتری باشد سایر خصوصیات این باکتری عبارت است از تحرک، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، بدون کپسول، و بیهوازی اختیاری است، ۲ بیوتایپ و ۶ سروتایپ دارد، درجه حرارت مناسب برای رشد آن ۲۲ الی ۲۵ درجه سانتیگراد است، احیاء کننده نیترات و اندول منفی است (گنجور، ۱۳۹۰؛ سلطانی، ۱۳۸۰؛ مخیر، ۱۳۷۴؛ Austin & Akhlaghi & Sharifi Yazdi, 2008؛ Austin, 1999). برای تشخیص این بیماری می‌توان از روشهای باکتری شناسی، سرولوژیکی، آسیب شناسی و مولکولی استفاده کرد (اخلاقی، ۱۳۹۰؛ سلطانی، ۱۳۸۰؛ مخیر، ۱۳۷۴؛ Akhlaghi & Sharifi Yazdi, 2008).

در این تحقیق با مشاهده ماهیان بیمار و وقوع تلفات در استان کهگیلویه و بویر احمد، اقدام به شناسایی عامل بیماری شد. براین اساس ابتداء نمونه برداری از ماهیان واجد علائم بالینی صورت گرفت که مهمترین علائم شامل شنای نامتعارف، تیرگی رنگ و جدا افتادگی از سایر ماهیان بود در این رابطه طی سه نوبت از هر استخر که بیشترین تلفات را داشت، ۵ نمونه ماهی اخذ شد. سپس از کبد، طحال و کلیه آنها جمعا ۱۳۵ نمونه با رعایت اصول استریل و به کمک استریو میکروسکوپ باکتری ها جدا سازی و بر روی محیط های آگار خونی

(Blood Agar)، محیط تریپتیک سوی آگار (TSA)، محیط تیوسولفات سیترات بایل سوکروز آگار (TCBS) و محیط مک کانکی آگار (MacConkey A.) کشت داده شدند. محیط های کشت برای ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت سپس، نحوه رشد کلنی ها بر روی آنها ارزیابی گردید. در ادامه آزمونهای کاتالاز، اکسیداز، رنگ آمیزی گرم، کشت بر روی محیط تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، آزمون سیترات، متیل قرمز، تحرک، تولید H_2S ، ایندول، رشد در مجاورت ۶/۵ درصد نمک و آزمون OF انجام گرفت (نادری نسب و همکاران، ۱۳۷۵؛ خنafari و حسینی، ۱۳۷۹؛ Austin & Austin, 1999). بعلاوه، بروش متداول آسیب شناسی از کلیه، طحال و کبد ماهیان بیمار مقاطع بافتی تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و بکمک میکروسکوپ نوری بررسی بافتی صورت گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد کبد، کلیه و طحال کلیه ماهیان بیمار و در حال مرگ همگی دارای آثار التهابی ناشی از بروز یک عارضه سپنی سمیک بودند. گرم منفی بودن عامل بیماری با رنگ آمیزی گرم و رشد بر روی محیط مک کانکی آگار تایید گردید. از سوی دیگر هیچگونه رشدی روی محیط TCBS که محیط اختصاصی ویبریوها است مشاهده نشد. باکتری در شرایط عادی (هوازی) انکوباتور رشد نموده لذا جزء باکتریهای هوازی یا بیهوازی اختیاری می باشند. آزمون OF این موضوع را بطور دقیقتر نشان داد و مشخص نمود این باکتری بیهوازی اختیاری می باشد. برای انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه مشخص شد این باکتری براحتی در این دما بر روی محیط TSA رشد می نماید و در طی آزمونهای دیگر نیز مشخص شد که این باکتری حداقل تا ۹۶ ساعت در شرایط مذکور زنده و فعال باقی می ماند. نتایج سایر آزمونهای بیوشیمیایی در جدول ۱ آمده است. نتایج آسیب شناسی حاصل از بررسی مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری نشان از حضور تعدادی باکتری کوکوراد (میله ای کوتاه) در مقاطع بافتی و بخصوص در بافت کلیه ماهیان داشت.

جدول ۱: نتایج آزمونهای تکمیلی انجام شده (دمای ۳۰ درجه سانتیگراد).

نام آزمون:	این تحقیق:	نتیجه در خصوص کلنی های جداسازی شده از این تحقیق:	<i>Y. ruckeri</i> (Austin, 1999)	<i>Y. ruckeri</i> (Akhlaghi, 2008)
رنگ گرم	آمیزی گرم منفی	گرم منفی	گرم منفی	گرم منفی
رشد روی محیط آگار خوندار	+			
رشد روی محیط TSA	+			
رشد روی محیط مک کانکی آگار	+			+
رشد روی محیط TCBS	-			
ایجاد رنگدانه	-		-	-
نتیجه کشت بر روی محیط TSI	K/A ; No Gas ; No H ₂ S			
کاتالاز	+			+
اکسیداز	-		-	-
سیترات	+		+	-
MR	+		+	+
تحرك	+		+	+
ایندول	-		-	-
تولید H ₂ S	-		-	-
آزمون OF	F		F	F
رشد در ۶/۵ درصد نمک	-			-

با توجه به اینکه بر روی محیط های کشت، تنها یک نوع کلنی رشد نموده بود لذا احتمال Mix Infection محتمل نبود. از سوی دیگر رنگ آمیزی گرم و رشد روی محیط مک کانکی آگار نشان داد که عامل سپتی سمی مذکور نوعی باکتری گرم منفی روده ای بوده است. در رنگ

آمیزی گرم، باکتریها به شکل کوکو-راد و گرم منفی مشاهده شدند. بنابراین با توجه به این موضوع و با توجه به نتیجه آزمون کاتالاز چنین استنباط شد که باکتری مذکور نمی تواند استرپتوکوک یا لاکتوکوک باشد. عدم رشد بر روی محیط اختصاصی ویبریوها (TCBS) سبب

- پرورشی. موسسه تحقیقات شیلات ایران، گزارش نهایی شماره ۸۴/۴۷۰، ۲۹۱ صفحه.
- سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۱-۱۳۸۹. سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و توسعه مدیریت، دفتر برنامه و بودجه، ۶۴ صفحه.
- سلطانی، م.، ۱۳۸۰. بیماریهای آزاد ماهیان. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. شماره ۲۵۴۹، ۴۴۴ صفحه.
- گنجور، م.س.، ۱۳۹۰. باکتری شناسی جامع. ناشر مولف. ۲۲۰ صفحه.
- مخیر، ب.، ۱۳۷۴. بیماریهای ماهیان پرورشی. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران. شماره ۱۸۶۹، ۴۲۸ صفحه.
- نادری نسب، م.، راشد، ی. و ناظم، م.، ۱۳۷۵. باکتری شناسی آزمایشگاهی. انتشارات آستان قدس رضوی- بنیاد فرهنگی رضوی، ۴۶۴ صفحه.
- Akhlaghi, M. and Sharifi Yazdi, H., 2008.** Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, Vol. 9, No. 4, Ser. No. 25.
- Altinok, I., Grizzle, J.M. and Liu, Z., 2001.** Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Dis Aquat Org. 44, 29-34.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1999.** Bacterial fish pathogens-diseases of farmed and wild fish. 2nd Ed., Springer-Verlag, pp. 188-226.
- Eiras, J.C., Segner, H., Wahli, T. and Kapoor, B.G., 2008.** Fish Disease. Vol 1. Science Publisher, USA. 612P.
- Guguianu, E., Vulpe, V., Lazar, M. and Rimbu, C., 2009.** Yersiniosis outbreak in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at a

شد تا احتمال وجود بیماری ویبریوزیس نیز مردود شمرده شود. با توجه به علائم بالینی و آزمونهای تفریقی انجام شده باید اذعان داشت باکتری جداسازی شده از نظر خصوصیات شبیه به *Yersinia ruckeri* بود. هر ۱۴ آزمون تشخیصی تکمیلی انجام شده بر روی کلنی ها نشان داد که نتایج با خصوصیات باکتری یرسینیا روکری جداسازی شده توسط سایر محققین منطبق است (اخلاقی، ۲۰۰۸ و Austin & Austin, 1999). از طرفی نتایج آسیب شناسی و مشاهده باکتری در مقاطع بافتی نیز صحت وجود عفونت باکتریایی را تایید می نمود.

در منابع آمده است که این بیماری به دو حالت حاد و مزمن در ماهیان بروز می نماید و در تمام سنین قزل آلا ی رنگین کمان سبب بیماری می گردد (اخلاقی، ۱۳۹۰)، یافته های این تحقیق نیز نشان داد که برخی از ماهیان علام بیماری را بصورت بارزتری نشان می دهند و برخی دیگر علائم خفیف تری دارند و دارای تحرک بیشتری در مقایسه با سایر ماهیان بیمار هستند. به عبارت دیگر دیرتر به بیماری مبتلا می شوند شاید علت پلکانی بودن تلفات نیز همین امر باشد بدین معنی که ماهیان ضعیفتر زودتر و ماهیان قوی تر دیرتر آلوده و بیمار می شوند. بعلاوه، در تحقیق حاضر، هم از بچه ماهیان و هم از ماهیان بالغ، عامل بیماری جداسازی شد بنابراین چنین استنباط می شود که این باکتری قادر است در تمام سنین ماهی قزل آلا عفونت زایی داشته باشد. لیکن، میزان تلفات در ماهیان بالغ به مراتب کمتر از بچه ماهیان می باشد که دلیل آن حساس تر بودن بچه ماهیان به این بیماری است (Guguianu et al., 2009).

منابع

- اخلاقی، م. ۱۳۹۰. بیماریهای باکتریایی شایع در پرورش ماهی - مدیریت بهداشتی و پیشگیری. انتشارات دانشگاه شیراز. شماره ۴۱۸، ۱۲۲ صفحه.
- خانفاری، آ. و حسینی، ف.، ۱۳۷۹. میکروب شناسی عملی. انتشارات پورسینا. ۲۳۲ صفحه.
- ذریه زهرا، ج.، ۱۳۸۴. بررسی مقدماتی امکان ردیابی علل عفونی (ویروسی، باکتریایی) سندروم تلفات نوزادان و ماهیان جوان قزل آلا ی رنگین کمان

- fish farm from northern Romania – Yersiniosis in rainbow trout. Cercetări Agronomice în Moldova, XLII(3), 139.
- Horne, M.T. and Barnes, A.C., 1999.** Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Woo, PTK and Bruno, DW (Eds.), Fish diseases and disorders-viral, bacterial and fungal infections. 3, 455-477.
- Ispir, U., Gokhan, H.B., Ozcan, M., Dorucu, M. and Saglam, N., 2008.** Immune Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Selected Antigens of *Yersinia ruckeri*. ACTA VET. BRNO, 78, 145-150.
- Ross, A.J., Rucker, R.R. and Ewing, W.H., 1966.** Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Microbiology. 12, 763-770.
- Rucker, R.R., 1966.** Remouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin of office International of Epizooties. 5, 825-830.
- Sedaghati, V., 1997.** Study of enteric red mouth (ERM) in rainbow trout in north of Fars province. School of Veterinary Medicine DVM thesis, No:651. Veterinary School of Shiraz University.
- Şeker, E., Karahan, M., İspir, U., Çetinkaya, B., Saglam, N. and Sarieyyupoglu, M., 2012.** Investigation of *Yersinia ruckeri* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) Farms by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Bacteriological Culture. Kafkas Univ Vet Fak Derg 18 (6), 913-916. "Journal Home-Page: <http://vetdergi.kafkas.edu.tr> "
- Soltani, M., Fadaifard, F. and Mehrabi, M.R., 1999.** First report of a yersiniosis-like infection in farmed rainbow trout. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 19, 173-176.
- Soltani, M. and Tarahomi, M., 2002.** Experimental infection of *Yersinia ruckeri* like bacterium isolated from rainbow trout farms in Tehran province. Third convention of Iranian Veterinary Clinicians. Mashhad, Iran. 29-31 October, P: 37.
- Tobback E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F. and Chiers, K., 2007.** *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis. 30, 257-268.
- Zorriehzahra, M.J., Soltani, M., Fallahi, R., Rezvani, S. and Kargar-Moakhar, R., 2002.** Observation of a case of Enteric Redmouth morbidity in fry rainbow trout propagation farm around Tehran province in Iran, Abstracts book of 26th Annual Larval Fish Conference, Bergen, Norway.

A case report of Enteritis Redmouth Disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Kohgiluyeh va Boyer-Ahmad province in Iran

Ganjoor M.S.^{*1}; Zorriehzahra M.J.²; Mehrabi M.R.²; Gorgipour E.¹;
Gandomkar H.¹; Mohammadpour M.¹; Salahi M. M.¹

* ganjoor.s@gmail.com

1-Genetic and Breeding Research center for Cold Water Fishes, Shahid- Mottahari, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization

2-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization

Key words: Rainbow trout, Yersiniosis, Kohgiluyeh-&-Boyer-Ahmad

Abstract

An unknown mortality was occurred in some ponds of a farm in an area of Kohgiluyeh-&-Boyer-Ahmad province. Three ponds showed the highest mortality rate, about 5 to 20 dead fish were reported daily for 45 days. Afflicted fish have darkening in the skin and swimming near surface or at the floor of pond and swam unmatched with flock. Some fish showed hemorrhages around and within the oral cavity and exophthalmia occasionally. About 45 moribund rainbow trout were sampled for dissection and bacteriological examination. Kidney, liver and spleen of the fishes were examined for the detection and identification of bacteria causative agent of disease in rainbow trout. They cultivated aseptically on different media (Blood Agar, Tryptic soy Agar, TCBS Agar and MacConkey Agar). All fish have been infected and suffered septicemia. A type of gram's negative bacteria was responsible of infection and mix infection was not confirmed. The bacterium was being able to grow on MacConkey agar. It was a bacterium very similar with *Yersinia ruckeri* which induced infection. Detection was based on clinical finding and bacteriological laboratory results so using of some confirmation methods such as FAT or PCR would be recommended strongly.

*Corresponding author