Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره دوم، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۷: ۹۴-۸۳

جداسازی، تعیین هویت و تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم از ماهیان آکواریومی تبریز

مهدی سیف احمدی[۱]، سید رضا مودب[۲*]، آذر سبکبار[۳]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۷ تاریخ پذیرش:۹۶/۱۱/۱۴

چکیده

مایکوباکتریوز ماهی یک بیماری پیش رونده مزمن است که توسط گونه های مختلف مایکوباکتریوم ها ایجاد می شود. تشخیص این بیماری در ماهی های زینتی، بطور معمول با استفاده از روش های هیستوپاتولوژی، کشت، انجام می شود. تعیین گونه نیز بر اساس خصوصیات رشد باکتری در دماهای مختلف، نوع پیگمان، مورفولوژی کلنی ها و تست های بیوشیمیایی می باشد. اگرچه تشخیص اولیه مایکوباکتریوز ماهی بر پایه علائم بالینی خارجی و حضور گرانولوم در بافت های احشایی با روش نمونه برداری است، اما برخی موراد، هیچ علائم بالینی بوده و یا توده های گرانولومی مشاهده نمی شود. با توجه به خصوصیت زئونوتیک بیماری، افزایش اهمیت آکواریوم و همچنین افزایش عفونت های فرصت طلب بواسطه مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی در افراد سالمند و بیماران مبتلا به نقص ایمنی، درمان بسیار دشوار و دوره های درمانی طولانی مدت این عفونت ها، و از طرفی اهمیت یافتن آن در ماهی ها که منجر به تلفات مالی می شود، موجب شد که در این تحقیق به جداسازی و شناسایی گونه های مایکوباکتریوم ها در ماهیان آکواریومی طراحی شود. وجود مایکوباکتریوم ها در ۵۳ ماهی که از آکواریوم فروشی های منطقه ای شهر تبریز تهیه شده بودند با روش های رنگ آمیزی ذیل _ نلسون و کشت روی محیط لوانشتاین_ جانسون مورد تحقیق قراگرفتند. شناسایی گونه های مایکوباکتریومی ایزوله شده با ویژگی های مورفولوژی و تست های بیوشیمیایی انجام شد. مقاومت دارویی ایزوله ها نسبت به داروهای ایزونیازید، استرپتومایسین، ریفامپین، اتامبوتول، کانامایسین، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین به روش نسبی در محیط کشت لوانشتاین- جانسون بررسی گردید. سویه حساس به همه داروها، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (H37Rv) جهت کنترل کیفی استفاده شد. در بررسی مستقیم میکروسکوپی با روش رنگ آمیزی ذیل- نلسون، باسیل های اسید فست در هفت نمونه شناسایی گردید. با استفاده از روش کشت باکتریایی در ۲۸/۳٪ از ماهی ها، گونه های مایکوباکتریوم ایزوله گردید. گونه های مختلف مایکوباکتریوم به شرح ذیل شناسایی گردید: *مایکوباکتریوم مارینوم*، *مایکوباکتریوم فورچئیتوم*، *مایکوباکتریوم اسمگماتیس*، *مایکوباکتریوم تره آ*، *مایکوباکتریوم فلاوسنس* و *مایکوباکتریوم آزیاتیکوم*. نتایج حاصل از بررسی نمونه ها نشان داد که، *مایکوباکتریوم فورچئیتوم* و *مایکوباکتریوم مارینوم* بیش از سایر گونه ها ایزوله گردید. در بررسی حساسیت دارویی ایزوله ها نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت دارویی به استرپتومایسین و کمترین مقاومت به سیپروفلوکساسین مربوط می شد. در این تحقیق، *مایکوباکتریوم مارینوم*، *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم*، *مایکوباکتریوم اسمگماتیس* و *مایکوباکتریوم فلاوسنس* که در ماهی و انسان بعنوان پاتوژن شناخته شده اند از ماهی های آکواریومی جدا شدند. سویه های ایزوله شده به بیشتر داروهای مورد استفاده در درمان مقاوم بودند، بنابراین ملاحظات بیشتری در خصوص حضور مایکوباکتریوم ها در ماهیان آکواریومی لازم است تا میزان انتقال باکتری به انسان کاهش یابد.

***کلمات کلیدی:* مایکوباکتریوز، ماهی آکواریومی، مقاومت دارویی، *مایکوباکتریوم فورچئیتوم و مایکوباکتریوم مارینوم*.**

*نویسنده مسئول: سید رضا مودب

آدرس: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی،دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۷۱۹۷۱

پست الکترونیک: seyyedreza_moaddab@yahoo.com

مقدمه

مایکوباکتریوز ماهی یک بیماری پیش رونده مزمن است. برخی از گونه های مایکوباکتریومی که بطور معمول باعث ایجاد مایکوباکتریوز در ماهی های زینتی می شوند عبارتند از *مایکوباکتریوم مارینوم* (*Mycobacterium marinum*)، *مایکوباکتریوم چلونی* (*Mycobacterium cheloni*)، و *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* (*Mycobacterium fortuitum*)، علاوه بر این چندین گونه دیگر از مایکوباکتریوم ها در ارتباط با این بیماری شناخته شده است (۲۶). گونه های مایکوباکتریوم علاوه بر ایجاد مرگ و میر در ماهی می تواند تحت شرایط خاصی به انسان منتقل شده و عفونت های پوستی تحت عنوان گرانولوم تانک ماهی و گرانولوم استخر شنا ایجاد کند (۲۸). مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی از قبیل *مایکوباکتریوم مارینوم* از ماهی های زینتی آلوده یا محیط مرتبط (آب آلوده) در هنگام تماس با آکواریوم در زمان تمیز کردن یا دست زدن به ماهی ها از طریق بریدگی ها یا خراشیدگی های روی پوست می تواند منتقل شده و منجر به آلوده شدن انسان شود (۴، ۷، ۱۲، ۱۶ و ۱۸). *مایکوباکتریوم چلونی* و *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* گونه های مهاجمی هستند که سریع رشد می کنند و به طور گسترده ای در محیط (خاک و آب) توزیع شده اند و به عنوان عاملان رایج عفونت های بیمارستانی هستند که معمولا باعث ضایعات سطحی و احتمالا بیماری ریوی و لنفادنوپاتی اولیه می شوند (۱۵، ۲۰، ۳۵ و ۳۶). تشخیص این بیماری در ماهی های آکواریومی، بطور معمول با استفاده از روش های هیستوپاتولوژی، کشت، تعیین خصوصیات رشد باکتری، نوع پیگمان، مورفولوژی کلنی ها و تست های بیوشیمیایی می باشد. اگرچه تشخیص اولیه مایکوباکتریوز ماهی بر پایه علائم بالینی خارجی و حضور گرانولوم در بافت های احشایی با روش نمونه برداری است، اما برخی مواقع، ماهی ها فاقد علائم بالینی بوده و توده های گرانولومی نیز مشاهده نمی شود (۸).

آبزیان از جمله ماهیان آکواریومی می توانند به عنوان منبع مواجهه با عوامل بیماری زای قابل انتقال به انسان عمل نمایند. نگهداری آکواریوم در زمره محبوب ترین سرگرمی های با میلیون ها نفر علاقمند در سراسر جهان می باشد. صنعت آبزی پروری به سرعت در حال رشد است و به طور بالقوه با افزایش تعداد پرورش دهندگان و کارگران فرآوری ماهی مواجهه است. گزارش های شیوع و بروز چنین عفونت های زئونوز اکتسابی از ماهی آکواریومی زیاد نیست، و اغلب شرح رویدادهای موارد تک گیر می باشند، در هر حال این ارگانیسم ها به عنوان نگرانی های بالقوه شناخته شده اند. بیماری های ناشی از پاتوژن های فرصت طلب و فقدان درمان مؤثر و نیاز به دوره های بلند مدت درمان، به علاوه زیان های اقتصادی ناشی از اثرات سوء مایکوباکتریوز ماهی از قبیل کاهش راندمان خوراک، کاهش رشد و افزایش تلفات، نیاز به شناسایی مایکوباکتریوز در ماهیان زینتی را برجسته می کند (۳۷).

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه : تعداد ۵۳ قطعه ماهی آکواریومی از ۸ گونه مختلف شامل: ۸ قطعه ماهی طلایی (*Carassius auratus*)، ۴ قطعه ماهی پلاتی (*Xiphophorus maculatus*)، ۴ قطعه ماهی سیچلاید (*Microgeophagus altispinosus*)، ۴ قطعه گرین تیلور (Andinoacara rivulatus)، ۳ قطعه ماهی سورم (*Heros severus*)، ۱۰ قطعه رزی بارب (*Puntius conchonius*)، ۱۲ قطعه مولی (*Poecilia latipinna*) و ۸ قطعه اسکار (*Astronatus ocellatus*) بصورت

تصادفی از آکواریوم فروشی های مختلف شهر تبریز نمونه گیری گردید. در برخی از ماهیان آکواریومی علایم بیماری از جمله بی حالی، از دست دادن پولک و زخم های پوستی دیده می شد و برخی از نمونه ها هیچگونه علایم بالینی نداشته و به ظاهر سالم بودند. نمونه های مذکور بلافاصله جهت انجام کارهای آزمایشگاهی به مرکز سل و بیماری های ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز منتقل گردیدند.

ب) رنگ آمیزی ذیل _ نلسون: اندام های کبد، طحال، کلیه، روده و قسمت های مختلف بدن ماهی با استفاده از قیچی استریل جدا شد و در اندازه های کوچک تکه تکه گردید و در لوله فالکون های استریل حاوی آب مقطر و پرل شیشه ای استریل ریخته و به مدت ۳ دقیقه در دستگاه ورتکس هموژن گردیدند و سپس نمونه را از ظروف فعلی به لوله های فالکون جدید با گذاشتن گاز استریل در داخل لوله ها فیلتر و از آن برای رنگ آمیزی ذیل _ نلسون جهت مشاهده باکتری های اسید فست استفاده گردید. در هر یک از لام های تهیه شده صد میدان دید زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت (۱).

ج) کشت باکتریایی: به منظور کشت باکتریایی مراحل هضم و آلودگی زدایی نمونه ها به روش پتروف (Petroff method) انجام گردید (۲۶). مقدار یک حجم از نمونه را با ۲ حجم از محلول هیدروکسید سدیم ۱ نرمال در لوله فالکون ریخته و سود ۱ نرمال اضافه شد بعد از هضم و آلودگی زدایی نمونه ها، نمونه ها را در دمای اتاق، به مدت نیم ساعت در دستگاه شیکینگ قرار داده تا نمونه ها هموژن شود وسپس به مدت نیم ساعت با دور g×۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد از سانتریفیوژ نمونه ها، در زیر هود، مایع رویی نمونه ها دور ریخته شد و با اضافه نمودن یک قطره فنل فتالئین ۰/۰۱ درصد به عنوان معرف رنگ و با کمک اسید کلریدریک ۱ نرمال خنثی سازی pH نمونه ها انجام گردید (pH ۶/۸). سپس در زیر هود مقدار ۲۰ میکرولیتر از رسوب مذکور در محیط های کشت لوا نشتاین- جانسون (Lowenstein-Jensen medium) تلقیح (هر نمونه در دو محیط کشت) و در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۸ هفته انکوبه گردیدند (۱۳). جهت مشاهده رشد و تعیین سرعت رشد مایکوباکتریوم ها، محیط های کشت، روزانه به مدت ۴ هفته و پس از آن، هفته ای یک بار به مدت ۳ ماه مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه هایی که گسترش آن ها مثبت بود ولی کشت آن ها تا پایان این مدت منفی مانده بود، ۴ هفته دیگر (جمعاً به مدت ۱۲ هفته) انکوبه شدند (۱۳ و ۲۲).

د) شناسایی گونه های مایکوباکتریومی ایزوله شده: تشخیص گونه های مایکوباکتریوم های ایزوله شده با استفاده از خصوصیت های فنوتیپی (سرعت رشد، رشد در دماهای مختلف، رشد در محیط مک کانکی آگار، مورفولوژی کلنی ها، آزمایش تولید پیگمان) و تست های بیوشیمیایی (تولید نیاسین و اوره آز، تست کاتالاز مقاوم به حرارت (۶۸درجه سلسیوس)، هیدرولیز توئین ۸۰، تست آریل سولفاتاز ۳ روزه، تست تحمل نمک طعام ۵٪ و تست احیای نیترات) انجام گردید (۱ و ۲۲).

برای آزمایش بررسی تولید پیگمان، گونه های ایزوله شده در دو محیط کشت لوانشتاین - جانسون تلقیح گردید، سپس یکی از آن ها را با کاغذ آلومینیومی پوشانده شد تا از نفوذ نور به داخل محیط کشت جلوگیری شود. نمونه ها به مدت ۱۸روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. گونه هایی که در

محیط کشت پوشانده شده با کاغذ آلومینیومی تولید پیگمان کرده بودند به عنوان سوش اسکوتوکروموژن شناسایی می گردید. سری های دیگر محیط کشت به مدت یک ساعت در مقابل نور چراغ مطالعه قرار داده شدند، سپس آن را به گرم خانه منتقل شدند، کلنی هایی که پس از ۲۴ ساعت پیگمان تولید می کردند به عنوان سوش فوتوتوکروموژن, و در غیر این صورت بعنوان غیر فوتوتوکروموژن شناسایی می شدند (۱).

برای انجام آزمون تست تولید نیاسین، حدود ۱میلی لیتر آب مقطر استریل بر روی محیط لوانشتاین- جانسون که حاوی کلنی باکتری است، ریخته شد، پس ازمدت ۳۰ دقیقه، مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول داخل محیط کشت را به یک لولهٔ آزمایش استریل منتقل کرده و بر روی آن ۰/۵ میلی لیتر معرف سیانوژن بروماید و ۰/۵ میلی لیتر معرف آنیلین اضافه گردید. با مشاهدهٔ رنگ زرد, تولید نیاسین توسط گونه، مثبت منظور می گردید. از سویه استاندارد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*Mycobacterium tuberculosis*) (H37Rv) به عنوان کنترل مثبت و از *مایکوباکتریوم اینتراسلولار* (*Mycobacterium intracellular*) (ATCC 13950) به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱).

برای آزمایش آریل سولفاتازیک قطره از سوسپانسیون باکتری مورد آزمایش را به محیط کشت دوبوس اولئیک آگار تلقیح کرده و به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. سپس مقدار ۱ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم به محیط کشت اضافه شد. با ظاهر شدن رنگ قرمز, تست مثبت تلقی می شد. از *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* (ATCC 6841) به عنوان کنترل مثبت و از *مایکوباکتریوم آویوم* (*Mycobacterium avium*) (ATCC 25291) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱).

برای آزمایش هیدرولیز توئین ۸۰، از مخلوط سه محلول بافر فسفات سدیم ۰/۰۶۷ مولار، توئین ۸۰ و محلول نوترال رد ۰/۱٪ استفاده گردید و پس از توزیع ۴ میلی لیتر از مواد مذکور در لوله های آزمایش، بمدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد و درمرحله بعد از کلنی های باکتری برداشته و در داخل لوله حاوی مخلوط بدست آمده از سه محلول فوق، سوسپانسیون آماده کرده و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. تغییر رنگ لوله ها را طی روزهای اول، پنجم، دهم و چهاردهم، کنترل می شد. چنانچه رنگ لوله بدون تکان دادن آن صورتی یا قرمز می شد, نتیجه مثبت تلقی می شد و عدم وجود تغییر رنگ بعد از روز چهاردهم، نتیجه منفی منظور می گردید. از *مایکوباکتریوم کانزاسی* (*Mycobacterium kansasii*) (ATCC 12478) به عنوان کنترل مثبت و از *مایکوباکتریوم آویوم* (ATCC 25291) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱).

در انجام آزمایش احیای نیترات، مقدار ۲ میلی لیتر از محلول حاوی نیترات سدیم ۰/۰۱ مولار، در یک لولهٔ آزمایش ریخته و مقداری از کلنی باکتری را در آن حل نموده و سوسپانسیون تهیه شده را به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده، سپس حدود ۲ یا ۳ قطره از محلول حاوی سولفانیلیک اسید، ان-۱-نفتیل- اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید و اسید تارتاریک، به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در صورت ظهور رنگ صورتی تا قرمز نتیجه تست مثبت منظور می گردید. از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (H37Rv) به عنوان کنترل مثبت و از *مایکوباکتریوم آویوم* (ATCC 25291) به عنوان کنترل منفی استفاده شد(۱).

در انجام آزمایش کاتالاز مقاوم به حرارت (دما ۶۸ درجه سلسیوس و بافر pH ۷)، مقداری از کلنی باکتری توسط لوپ از محیط کشت جوان برداشته شد و در لولهٔ آزمایش حاوی ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات، اضافه گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۶۸ درجه سلسیوس قرار داده و در مرحله بعد مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول پراکسید هیدروژن- توئین به آن اضافه گردید. با مشاهده ایجاد حباب در لولهٔ آزمایش نتیجه تست، مثبت تلقی می گردید. از *مایکوباکتریوم آویوم* (ATCC 25291) به عنوان کنترل مثبت و از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (H37Rv) به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱).

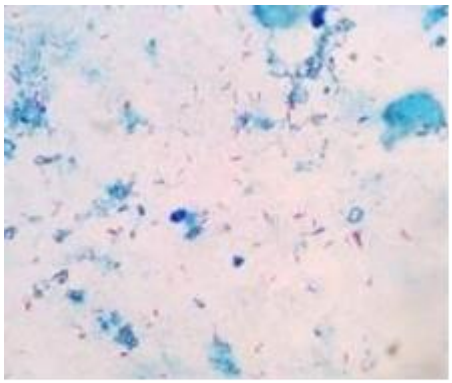
جهت انجام تست اوره آز، یک بخش از کونسانتره پایه آگار اوره را با ۹ قسمت از آب مقطر استریل مخلوط شد و مقدار ۳ میلی لیتر در داخل لوله های سرپیچ دار استریل توزیع گردید، سپس یک لوپ کامل از مایکوباکتریوم به داخل لوله تلقیح و در ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد و در روز های اول و سوم و هفتم بررسی گردید، تغییر رنگ لوله ها از زرد به صورتی یا قرمز بعنوان مثبت تلقی می گزدید (۱).

ه) بررسی مقاومت دارویی ایزوله ها: مقاومت دارویی سویه های ایزوله شده به روش نسبی (proportional) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا رقتی برابر نیم مک فارلند از سوسپانسیون گونه های مایکوباکتریوم های ایزوله شده تهیه گردید و سپس از آن غلظت ۰/۰۱ تهیه گردید و مقدار ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق شده به هر یک از محیط های کشت لوانشتاین- جانسون حاوی آنتی بیوتیک های ایزونیازید، اتامبوتول، ریفامپین، استرپتومایسین، کانامایسین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین به ترتیب با غلظت های ۰/۲، ۲، ۴۰، ۴، ۲۰، ۴ و ۲۰ میکروگرم در هر میلی لیتر و در محیط کشت لوانشتاین- جانسون بدون آنتی بیوتیک (بعنوان شاهد) تلقیح گردید و به مدت ۶ هفته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. در صورتی که میزان رشد باکتری (تعداد کلنی ها) در محیط های حاوی آنتی بیوتیک در مقایسه با محیط کشت شاهد کمتر از ۱٪ بود سویه مورد نظر حساس و در صورتی که میزان رشد مساوی یا بیشتر از ۱٪ نسبت به محیط کشت شاهد بود سویه مقاوم در نظر گرفته شد. از سویه استاندارد H37Rv *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* که به تمامی داروهای استفاده شد در این تست حساسیت دارد به عنوان شاهد استفاده گردید (۵، ۹، ۲۹ و ۳۴).

یافته ها

در بررسی مستقیم میکروسکوپی با روش رنگ آمیزی ذیل- نلسون (شکل ۱)، باسیل های اسید فست در هفت نمونه (۱۳/۲٪) شناسایی گردید. پس از کشت نمونه ها در محیط کشت لوانشتاین – جانسون، در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند، نتایج کشت نشان داد که در ۱۲ نمونه، مایکوباکتریوم ها در هر دو دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس رشد داشتند و در ۳ نمونه مایکوباکتریوم ها فقط در دمای ۳۰ درجه سلسیوس رشد کرده بودند. نتایج آزمون تولید پیگمان نشان داد که تعداد ۴ نمونه، آلوده به مایکوباکتریوم های فوتوتوکروموژن، تعداد ۱۰ نمونه، آلوده به مایکوباکتریوم های غیر فوتوتوکروموژن تشخیص داده شدند و تنها ۱ نمونه آلوده به مایکوباکتریوم اسکوتوکروموژن بود. گونه های مایکوباکتریومی آلوده کننده نمونه های مورد بررسی در ۱۰ مورد جزو تند رشدها و در ۵ مورد جزو کند رشدها شناسایی شدند، همچنین با استفاده از روش کشت باکتریایی

(شکل ۲)، از ۲۸/۳٪ نمونه های مورد بررسی، مایکوباکتریوم ها ایزوله گردید (۱۵ مورد).



(شکل ۱): رنگ آمیزی ذیل – نلسون-۱۰۰x

(شکل ۲): آزمایش بررسی پیگمان و کلنی مایکوباکتریوم ها در محیط لوانشتاین _ جانسون

شناسایی گونه های مختلف مایکوباکتریوم از ۱۵ ایزوله بدست آمده از طریق کشت براساس خصوصیات فنوتیپیک و انجام تست های بیوشیمیایی به شرح ذیل انجام گردید (جدول ۱ و ۲): *مایکوباکتریوم فورچئیتوم* ۶ مورد، *مایکوباکتریوم مارینوم* ۳ مورد، *مایکوباکتریوم اسمگماتیس* (*Mycobacterium smegmatis*) ۳ مورد، *مایکوباکتریوم فلاوسنس* (*Mycobacterium flavescens*) ۱ مورد، *مایکوباکتریوم تره آ* (*Mycobacterium terrea*) ۱ مورد و *مایکوباکتریوم آزیاتیکوم* (*Mycobacterium asiaticum*) ۱ مورد.

جدول ۱: خصوصیات فنوتیپیک و تست های بیوشیمیایی

گونه های *مایکوباکتریومی* شناسایی شده	تست های بیوشیمیایی: رشد در مک کانکی آگار	تحمل نمک طعام ۵ درصد	اوره آز	آریل سولفاتاز (۳ روزه)	هیدرولیز توئین ۸۰	کاتالاز مقاوم به ۶۸°C	احیاء نیترات	نیاسین	زمان رشد	نوع پیگمان	مورفولوژی کلنی	رشد در دماهای ۳۰°C	رشد در دماهای ۳۷°C
مایکوباکتریوم فورچئیتوم	+	+	+	+	-	+	+	-	رشد < ۷ روز	*غیر فوتوکروموژن*	*صاف*	+	+
مایکوباکتریوم مارینوم	–	–	+	-	+	-	-	-	رشد > ۷ روز	*فوتوکروموژن*	*صاف*	+	-
مایکوباکتریوم اسمگماتیس	–	+	v	-	+	+	+	v	رشد < ۷ روز	*غیر فوتوکروموژن*	*صاف*	+	+
مایکوباکتریوم تره آ	v	–	-	-	+	+	+	-	رشد > ۷ روز	*غیر فوتوکروموژن*	*صاف*	+	+
مایکوباکتریوم آزیاتیکوم	v	–	-	-	+	+	-	-	رشد > ۷ روز	*فوتوکروموژن*	*صاف*	+	+
مایکوباکتریوم فلاوسنس	–	+	+	-	+	+	+	-	رشد < ۷ روز	*اسکوتوکروموژن*	*صاف*	+	+

جدول ۲: گونه های مایکوباکتریومی ایزوله شده از نمونه ها

گونه های ماهی آکواریومی	تعداد نمونه	موارد آلوده	گونه های مایکوباکتریومی ایزوله شده					
			Mfl	Ma	Mm	Mfo	Ms	Mt
Poecilia latipinna	۱۲	۵	-	+	+	++	+	-
Xiphophorus maculatus	۴	۰	–	–	–	–	–	–
Carassius auratus	۸	۳	-	-	+	+	+	-
Microgeophagus altispinosus	۴	۰	–	–	–	–	–	–
Andinoacara rivulatus	۳	۰	–	–	–	–	–	–
Puntius conchonius	۱۰	۴	-	-	+	++	+	-
Heros severus	۴	۰	–	–	–	–	–	–
Astronatus ocellatus	۸	۳	+	-	-	+	-	+
جمع	۵۳	۱۵	۱	۱	۳	۶	۳	۱

Mfl = *M. flavescens*; Ma = *M. asiaticum*; Mm = *M. marinum*; Mfo = *M. fortuitum*; Ms = *M. smegmatis*; Mt = *M. terrae*

در بررسی حساسیت دارویی، جدایه های رشد یافته به ترتیب (۱۴ مورد) ۹۳/۳۳٪ به استرپتومایسین، (۱۲ مورد) ۸۰٪ به ایزونیازید، (۱۲ مورد) ۸۰٪ به ریفامپین، (۱۰ مورد) ۶۶/۶۶٪ به اتامبوتول، (۹ مورد) ۶۰٪ به کانامایسین، (۶ مورد) ۴۰٪ به آمیکاسین و(۳ مورد) ۲۰٪ به سیپروفلوکساسین مقاومت داشتند. نتایج حاصله از این بررسی نشان داد که استرپتومایسین بیشترین میزان مقاومت دارویی را داشته است و کم ترین میزان مقاومت دارویی، به سیپروفلوکساسین اختصاص داشت.

بحث

در بررسی مستقیم میکروسکوپی با روش رنگ آمیزی ذیل- نلسون باسیل های اسید فست در ۱۳/۲٪ شناسایی گردید که در مقایسه با روش کشت باکتریایی (۲۷/۳٪) میزان کمتری از باکتری های اسید فست جدا گردید، اگرچه حساسیت میکروسکوپی مستقیم کمتر از آزمایش کشت است اما ممکن است اطلاعات با ارزشی به ما دهد، خصوصا زمانی که نتایج کشت باکتریایی منفی شود. نتایج منفی کشت باکتریایی ممکن است به علت کشته شدن باکتری ها توسط سیستم دفاعی میزبان آلوده یا مقدار خیلی کم باکتری های زنده در بافت میزبان باشد (۲۶).

مایکوباکتریوم ها دارای توزیع جهانی هستند و این ارگانیسم ها به طور گسترده ای محیط های آبزی را نیز اشغال کرده اند. مایکوباکتریوز یکی از عفونت های شایع ماهی های زینتی است که در بیش از ۱۵۰ گونه گزارش شده است (۱۴، ۲۰ و ۲۳). در هنگام آلودگی ماهی با مایکوباکتریوم ها معمولا رفتاری متفاوت از ماهی های غیر عفونی ندارد و تنها، زمانی مشکوک به آلودگی می شویم که تحرکشان ضعیف شود، رنگ پوست ماهی ها کم رنگ شود و علائم بالینی دیگر نظیر التهاب پوست، ایجاد ضایعات و یا زخم های پوستی، اگزوفتالمی و ... رخ دهد (۳۱، ۳۲ و ۳۳). با توجه به این که گونه های مختلف مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی از ماهی و آب محیط زیست آنها مانند آکواریوم و مخازن و استخرهای پرورش ماهی ظرفیت آن را دارند که بطور بالقوه به انسان منتقل شوند و عفونت های پوستی تحت عنوان گرانولومای تانک ماهی و گرانولومای استخر شنا ایجاد کند (۷، ۱۲، ۱۶ و ۱۸)، بنابراین افراد شاغل در آکواریوم فروشی ها و هر فردی که به نحوی در ارتباط با ماهیان زینتی است باید جنبه های احتیاطی و پیشگیرانه را حتی در هنگام تماس با ماهی های به ظاهر سالم، در نظر داشته باشد.

در ماهی درمان دارویی توصیه نشده و ارزش محدودی برای این بیماری دارد، زیرا درمان، مایکوباکتریوم ها را از جمعیت ماهیان آلوده حذف نمی نماید (۱۰). با در نظر گرفتن توسعه صنعت آبزی پروری و افزایش اهمیت ماهیان زینتی خانگی و پرورشی، لازم است ابزار های سریع و دقیق تشخیص عوامل بیماری زایی و درمان گونه های آن ها نیز ارائه شود، لازم است دامپزشکان و متخصصین حوزه آبزی پروری از نشانه های بالینی بیماری های قابل انتقال بین ماهی و انسان و راه های به حداقل رساندن خطر ابتلا مواجهه با این ارگانیسم ها آگاه باشند (۱۹). ویژگی مهم بسیاری از گونه های مایکوباکتریومی ایجاد کننده این بیماری خصوصیت فرصت طلبی آنها است و بیماری اغلب در افرادی که دارای سیستم ایمنی تضعیف شده باشد، ارتباط دارد (۱۷ و ۱۹). بیشتر عفونت ها در بین افرادی که آکواریوم در خانه نگهداری می نمایند، ویا پرورش دهندگان و صیادان اتفاق می افتد و ممکن است یک خطر شغلی برای افراد خاص و در معرض خطر ابتلا به این عفونت باشد (۱۰ و ۱۹).

مایکوباکتریوم مارینوم یک پاتوژن فرصت طلب است و چندین مورد از عفونت انسان به *مایکوباکتریوم مارینوم* در سراسر دنیا از جمله ایران گزارش شده است (۳ و ۱۱). در سال ۱۳۹۰، حسینی فرد و همکارانش(۱۱)، ابتلا یک فرد شاغل در آکواریوم فروشی به به گرانولوم تانک ماهی که توسط مایکوباکتریوم مارینوم ایجاد شده بود را، در بابل گزارش کردند، همچنین در همان سال علائین و همکارانش(۳)، یک مورد دیگر از ابتلا به بیماری گرانولوم تانک ماهی در اراک گزارش کردند.

افزایش گزارش های عفونت ناشی از پاتوژن های فرصت طلب از جمله مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی در افراد مسن یا بیماران مبتلا به نقص ایمنی از یک طرف و از طرف دیگر درمان بسیار دشوار و نیاز به دوره های درمانی طولانی مدت این عفونت ها، این موضوع را به یک مسئله جدی در ارتباط با سلامت عمومی جامعه تبدیل کرده است (۶ و ۱۴).

نتایج حاصل از بررسی نمونه ها نشان داد که، *مایکوباکتریوم مارینوم و مایکوباکتریوم فورچئیتوم* بیش از سایر گونه ها ایزوله گردید (۹ مورد از ۱۵)، در بسیاری از مطالعات در خارج از ایران و مطالعاتی که در این خصوص در ایران شده است، نشان داده شده است که گونه های ذکر شده، به صورت شایعی موجب مایکوباکتریوز در ماهی زینتی می شود. در سال ۱۳۹۲ مصوری و همکارانش(۲) وجود آلودگی به مایکوباکتریوم ها، در ۵۰ قطعه ماهی زینتی با استفاده از روش های کشت و مولکولی و آنالیز توالی ژنومی در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، بررسی نمودند و از ۲۰٪ نمونه های مورد بررسی گونه *مایکوباکتریوم فورچئیتوم* ایزوله و شناسایی گردید. سه گونه *مایکوباکتریوم فورچئیتوم*، *مایکوباکتریوم گوردونی* (*Mycobacterium gordonae*) و *مایکوباکتریوم تره آ* در ارتباط با مایکوباکتریوز ماهی در جمهوری قزاقستان گزارش شده است (۱۷ و ۳۰). بسیاری از عفونت هایی که از طریق *مایکوباکتریوم مارینوم* در انسان ایجاد می شود یک بهبودی آهسته و خودبخودی برای دوره های ۱ تا ۶ سال دارد، ضایعات کوچک ممکن است خود به خود التیام یابد اما در سایر موارد دوره های درمان آنتی بیوتیکی متعدد برای چند ماه نیاز می باشد (۱۴ و ۲۵). درمان آنتی بیوتیکی ممکن است پیشگیری از پیشرفت عفونت عمقی را تضمین نماید ولی در هر حال باکتری به درمان بسیار مقاوم است (۱۰). درمان آنتی بیوتیکی برای انسان شامل

ایزونیازید، ریفامپین، پیرازینامید، اتامبوتول، استرپتومایسین، کانامایسین، سیپروفلوکساسین، آزیترومایسین و برخی از کوئینولون ها می شود، عفونت به آهستگی به درمان آنتی بیوتیکی مناسب پاسخ می دهد و بسته به وسعت و شدت عفونت دوره درمان آنتی بیوتیکی ممکن است از ۲ هفته تا بیش از ۱۸ ماه متغییر باشد (۱۴، ۲۳ و ۲۹).

به طور معمول، عفونت بسیار تهاجمی نیست و به درمان پاسخ می دهد، هر چند ماه ها درمان ممکن است لازم باشد. گاهی اوقات، عفونت می تواند به بافت های عمیقی تر از جمله استخوان گسترش یابد، که به درمان بسیار سخت تر پاسخ می دهد (۲۹و ۳۰). عفونت های عمقی بطور معمول هم به درمان آنتی بیوتیکی و هم جراحی نیاز دارد، برداشت بافت های نکروزه از جمله سینوویال مفصلی، تنوسینوویال مفصلی و یا برداشت مفصل ضروری است و همچنین قطع عضو به منظور کنترل عفونت علی رغم درمان آنتی بیوتیکی مناسب و برداشت متعدد بافت نکروزه ممکن است نیاز باشد (۲۵، ۲۹ و ۳۰). با توجه به استفاده از داروهای مذکور در درمان و نتایج حاصله از بررسی حساسیت و مقاومت دارویی گونه های مایکوباکتریومی ایزوله شده، استرپتومایسین با ۹۳/۳۳٪ بیشترین میزان مقاومت دارویی را داشته است و کم ترین میزان مقاومت دارویی، به آمیکاسین (۴۰٪) و سیپروفلوکساسین (۲۰٪) اختصاص داشت بنابراین از سیپروفلوکساسین و آمیکاسین می توان به عنوان داروهای انتخابی برای درمان بهره برد، با این حال این مسئله یک چالش جدی در خصوص درمان بیماری های ناشی از گونه های مختلف مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی می باشد. احتمالا یکی از عوامل میزان بالای مقاومت نسبت به استرپتومایسین، استفاده از این دارو در درمان سایر بیماری های عفونی می باشد (۲۹،۶ و ۳۴).

نتیجه گیری

در سال های اخیر توجه زیادی به عفونت های مایکوباکتریایی در ماهیان آکواریومی شده است که به دلیل افزایش اهمیت آکواریوم در دنیا و توجه بیشتر به بهداشت عمومی می باشد. در این تحقیق، برخی از باکتری های ایزوله شده از قبیل *مایکوباکتریوم مارینوم*، *مایکوباکتریوم فورچئیتوم*، *مایکوباکتریوم اسمگماتیس* و *مایکوباکتریوم فلاوسنس* که پاتوژن های شناخته شده در ماهی و انسان هستند، از ماهی های آکواریومی جداسازی گردیده است و همچنین نشان داده شد که سویه های ایزوله شده به بیشتر داروهای مورد استفاده در درمان مقاومت دارند، با توجه به زئونوز بودن بیماری و مشکل بودن درمان و نیاز داشتن به دوره درمان طولانی مدت، افرادی که با آکواریوم و تجهیزات آبزی پروری سرو کار دارند و یا حتی افرادی که در خانه برای سرگرمی اقدام به نگهداری ماهی زینتی می نمایند، خصوصاً در افراد دارای نقص ایمنی، ملاحظات بیشتری در خصوص نگهداری ماهیان آکواریومی، جهت جلوگیری و یا کاهش انتقال بیماری به انسان لازم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از تمامی همکاران در مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که در انجام این تحقیق کمک های ارزشمندی را نموده اند، کمال تشکر و امتنان را دارند.

منابع

۱- رفیع، ع.، مودب، س.ر. (۱۳۸۲). *اصول مایکوباکتریولوژی*. چاپ اول، انتشارات ستوده، تبریز، صفحات ۲۸۷-۲۴۵.

2. Akbari, Sh., Mosavari, N., Tadayon, K., Rahmati-Holasoo H. (2014). Isolation of Mycobacterium fortuitum from fish tanks in

Alborz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* **6**: 234-239.

3. Alaeen, Am., Alaeen, Az., Alaeen, H. (2011). A case report of fish tank granuloma in Khomein. *Arak Medical University Journal* **14**: 113-117.
4. Beran, V., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Pavlik, I. (2006). Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *Journal of Fish Diseases* **29**: 383-393.
5. Chen, C.C., Chen, S.Y., Chen, Y.S., Lo, C.Y., Cheng, P.W. (2007). *Mycobacterium fortuitum*-induced persistent parotitis: successful therapy with clarithromycin and ciprofloxacin. *Head Neck* **29**: 1061-4.
6. Decostere, A., Hermans, K. (2004). Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary microbiology*. **99**: 159–166.
7. Enzensberger, R., Hunfeld, K.P., Elshorst-Schmidt, T., Boer, A., Brade, V. (2002). Disseminated cutaneous Mycobacterium marinum infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Infection* **30**: 393–395.
8. Gauthier, D.T., Rhodes, M.W. (2009). Mycobacteriosis in fishes: a review. *The Veterinary Journal* **180**: 33−47.
9. Gayathri, R., Therese, K.L., Deepa, P., Mangai, S., Madhavan, H.N. (2010). Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. *Journal of postgraduate medicine* **56**: 76-8.
10. Haenen, O.L., Evans, J.J., Berthe, F. (2013). Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Revue scientifique et technique* **32**: 497-507.
11. Hosseinifard, S.M., Yossefi, M.R., Esfandiari, B., Sefidgar, S.A. (2011). *Mycobacterium marinum* as a cause of skin chronic granulomatous in the hand. *Caspian Journal of Internal Medicine* **2**: 198-200.
12. Jernigan, J.A., Farr, B.M. (2000). Incubation period and sources of exposure for cutaneous *Mycobacterium marinum* infection: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* **31**: 439−443.
13. Kane, A., Stine, C., Hungerford, L., Matsche, M., Driscoll, C., Baya, A. (2007). Mycobacteria as environmental potent in Chesapeake Bay fish species. *Emerging Infectious Disease* **13**: 329-331.
14. Kankya, C., Muwonge, A., Djonne, B., Munyeme, M., Opuda-Asibo, J., Skjerve, E., Oloya, J., Edvardsen, V., Johansen, T. (2011). Isolation of non-tuberculous Mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda Public Health significance. *BMC Public Health* **11**:1–9.
15. Kent Michael, L, Watral Virginia, G., Kirchoff Nicole, S., Spagnoli Sean, T., Sharpton Thomas, J. (2016). Effects of subclinical *Mycobacterium chelonae* infections on fecundity and embryo survival in Zebrafish. *Zebrafish* **13**: 88-95.
16. LeBlanc, J., Webster, D., Tyrrell, G.J., Chiu, I. (2012). *Mycobacterium marinum* infection from sea monkeys. *The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **23**: 106–108.
17. Lescenko, P., Matlova, L., Dvorska, L., Bartos, M. (2003). Mycobacterial infection in aquarium fish. *Veterinarni Medicina* **48**: 71-78.
18. Lewis, F.M.T., Marsh, B.J., von Reyn, C.F. (2003). Fish tank exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: Tuberculin skin testing, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases* **37**:390–397.
19. Lowry, T., Smith, S.A. (2007). Aquatic zoonoses associated with food, bait, ornamental, and tropical fish. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **231**:876-80.
20. Mainous, M.E., Smith, S.A. (2005). Efficacy of common disinfectants against *Mycobacterium marinum*. *Journal of Aquatic Animal Health* **17**: 284−288.
21. Marzouk, M.S.M., Essa M.A.A., El-seedy, F.R., Kenawy, A.M., AbdEl-Gawad, D.M. (2009). Epizootiological and histopathological studies on mycobacteriosis in some ornamental fishes. *Global Veterinaria* **3**:137-143.
22. Moghim, S., Sarikhani, E., Nasr Esfahani, B., Faghri, J. (2012). Identification of nontuberculous mycobacteria species isolated from water samples using phenotypic and molecular methods and

determination of their antibiotic resistance patterns by e-test method, in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **15**:1076–1082.

23. Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I. (2004). Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic)* **49**: 343–358.
24. Novotny, L., Halouzka, R., Matlova, L., Vavra, O., Bartosova, L., Slany, M., Pavlik, I. (2010). Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *Journal of Fish Diseases* **33**:947–955.
25. Papavlasopoulou, I., Vardakas, L., Perdikaris, C., Kommatas, D., Paschos, I. (2014). Ornamental fish in pet stores in Greece: a threat to biodiversity. *Mediterranean Marine Science* **15**, 126-134.
26. Pate, M., Jencic, V., Zolnir-Dovc, M., Ocepek, M. (2005). Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. *Diseases of Aquatic Organisms* **64**: 29-35.
27. Petroff, S.A. (1915). A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *Journal of Experimental Medicine* **21**, 38–42.
28. Pourahmad, F., Thompson, K.D., Adams, A., Richards, R.H. (2009). Detection and identification of aquatic mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded fish tissues. *Journal of Fish Diseases* **32**, 409-419.
29. Rallis, E., Koumantaki-Mathioudaki, E. (2007). Treatment of *Mycobacterium marinum* cutaneous infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **17**:2965-2978.
30. Rehulka, J., Kaustova, J., Rehulkova, E. (2006). Causal agents of mycobacterial diseases in freshwater ornamental fish and their importance for human health in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* **75**, 251–258.
31. Salawudeen, M.T., Kazeem, H.M., Raji, M.A., Oniye, S.J., Kwanashie, C.N., Ibrahim, M.J. (2017). Isolation and identification of fungi from apparently healthy and diseased Clarias gariepinus from freshwater in Zaria, Kaduna State, Nigeria. *Microbiology Research International* **5**:8-15.
32. Shukla, S., Sharma, R., Shukla, S.K. (2013). Detection and identification of globally distributed mycobacterial fish pathogens in some ornamental fish in India. *Folia Microbiologica* **58**: 429-436.
33. Toranzo, A.E., Maqarinos, B., Romalde, J.C. (2005). A review of the main bacterial diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**: 37−61.
34. Wang, H.X., Yue, J., Han, M., Yang, J.H., Gao, R.L., Jing, L.J. (2010). Nontuberculous mycobacteria: susceptibility pattern and prevalence rate in Shanghai from 2005 to 2008. *Chinese medical journal* **2**:184-7.
35. Watral, V., Kent Michael, L. (2007). Pathogenesis of *Mycobacterium* spp. in zebrafish (Danio rerio) from research facilities. *Comparative Biochemistry and Physiology* **145:** 55-60.
36. Woods, G.L., Bergmann, J.S., Witebsky, F.G., Fahle, G.A., Boulet, B., Plaunt, M., Brown, B.A., Wallace, R.J., Wanger, A. (2000). Multisite reproducibility of etest for susceptibility testing of Mycobacterium absessus, Mycobacterium chelonae, and Mycobacterium fortuitum. *Journal of Clinical Microbiology* **38:** 656-661.
37. 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**: 433-441.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue 2, 2018

Isolation, identification and determination of the drug resistance in Tabriz aquarium fish mycobacteria

Seyfahmadi, M.[1], Moaddab, S.R.[2]*, Sabokbar, A.[3]

1. Ph.D. Student, Department of Microbiology, College of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Associate Professor, Department of Laboratory Sciences, Paramedical Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Department of Microbiology, College of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received: 29 October2017 Accepted: 3 February2018

Abstract
Fish mycobacteriosis is a chronic progressive disease that caused by different species of mycobacteria. Diagnosis of the disease in ornamental fish is usually done by bacterial culture and histopathology. Identification is also based on the rate of growth at different temperature, the pigmentation type, the morphology of colony and by biochemical tests. Although the primary diagnosis of fish mycobacteriosis is based on clinical symptoms and the presence of granuloma in visceral tissues by sampling, but in some cases no any clinical symptoms or no granulomas masses are seen. Due to the zoonotic character of the disease, increasing importance of aquariology, and also increasing of opportunistic infections via Non-tuberculous mycobacteria in older persons or immunocompromised patients, also existence of some extremely difficulties to treat like to require the long course of therapy, and on the other hand, the financial losses, so; the present study planned to detection and identification of mycobacterial species in aquarium fish. Existence of Mycobacterial species in 53 fishes were investigated that they were obtained from some local aquarium shops in Tabriz by Ziehl-Neelsen staining and culture on Lowenstein-Jensen (LJ) medium. Identification of isolates was done by morphological characters of mycobacteria on LJ and using of biochemical tests. For drug susceptibility testing, the proportional method on LJ were used for isoniazid, ethambutol, rifampin, streptomycin, kanamycin, ciprofloxacin, and amikacin. The susceptible (H37Rv) standard Mycobacterium tuberculosis strain was used as a control. Acid-fast bacilli were detected on the 7 smears of samples by direct microscopic examination method of Ziehl-Neelsen. In using of the culture method, Mycobacterium spp. were isolated from 28.3% of the fishes. The isolated species were identified as M. marinum, M. fortuitum, M. smegmatis, M. terrea, M. flavescens and M. asiaticum. The study showed that M. fortuitum and M. marinum are more than other species. In the drug susceptibility testing; the streptomycin had the highest resistance (93.33%) and the lowest drug resistance was diagnosed to ciprofloxacin (20%). In the investigation, Mycobacterium marinum, M. fortuitum, M. smegmatis and M. flavescens that are well known as pathogens in fish and humans were isolated, which were resistant to most drugs that are used in the treatment. Therefore, more attention should be paid to the presence of mycobacteria in aquarium fish for reducing the rate of bacterial transmission to human.

Keywords: mycobacteriosis, aquarium fish, drug resistance, Mycobacterium marinum and Mycobacterium fortuitum.

**Corresponding author: Moaddab, S.R.*
Address: Department of Laboratory Sciences, Paramedical Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Tel: +98 4133371971.
E-mail address: seyyedreza_moaddab@yahoo.com