JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دهم، شماره دوم، ۱۳۹۳، پیاپی ۲۹: ۱۰۲- ۹۳

شناسایی سریع گونه‌های *سودوموناس* در ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) پرورشی در استان گیلان

متین وظیفه دوست[۱]، سمیه حقیقی کارسیدانی[۲*]، خسرو عیسی زاده[۳]، محدث قاسمی[۴] و محمد فائزی قاسمی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

۲- استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر انزلی، بندرانزلی، ایران

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

۴- کارشناس پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی کشور، بندر انزلی، ایران

تاریخ دریافت: ۲۷ مهر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۲۶ آبان ۱۳۹۲

چکیده

سودوموناس‌ها باکتری‌های مشترک انسان و ماهی اند که موجب باکتریمی همراه با خون ریزی در ماهیان می‌گردند که تشخیص سریع باعث درمان به موقع می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه دو کیت API 20NE و API 20E با آزمایش های متداول بیوشیمیایی در تشخیص گونه‌های سودوموناس می‌باشد. با شروع تلفات شدید ماهیان فیتوفاگ در استان گیلان در فصول بهار و تابستان که شرایط محیطی جهت بروز عفونت باکتریایی مناسب است، تعداد ۱۲۶ قطعه ماهی فیتوفاگ از ۲۵ کارگاه پرورشی ماهیان گرمابی شهر رشت به پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی انتقال یافت.از نمونه‌های کلیه، کبد، طحال و مایعات آسیتی ماهیان فیتوفاگ روی محیط آگار خوندار کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری و جدایه‌ها خالص سازی گردیدند. همزمان از روش بیوشیمیایی متداول و کیت‌های API جهت تشخیص استفاده شد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی تمام جدایه‌های سودوموناس به روش دیسک دیفیوژن روی محیط مولر هینتون آگار و طبق روش Bauer و همکاران (۱۹۶۶) اصلاح شده بر اساس NCCLS (۲۰۰۷) انجام شد. بر اساس نتایج از ۷۵ جدایه جداشده ۹ جدایه (۱۲٪) سودوموناس بودند. ۹ جدایه با استفاده از API 20NE بیش از ۹۸٪ در دو گونه سودوموناس آئرژینوزا و سودوموناس فلورسنس قرار گرفتند. در حالی که API 20E سودوموناس آئرژینوزا را تا حد بالای ۶۴٪ و سودوموناس فلورسنس را به صورت P. fluorescens/Putida تشخیص می‌داد و در آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی، جنتامایسین داروی انتخابی برای هر دو گونه بود و برای سودوموناس فلورسنس کانامایسین و نئومایسین نیز تأثیر ۱۰۰٪ داشتند. سودوموناس آئرژینوزا در این تحقیق برای اولین بار در کشور از ماهی جداسازی گردید. نتایج نشان داد از میان دو سیستم API، نوار API 20NE با دقت و قدرت تفکیک بالاتری نسبت به API 20E قادر به تشخیص گونه‌های سودوموناس در ماهی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *سودوموناس فلورسنس، سودوموناس آئرژینوزا، API 20NE، API 20E، فیتوفاگ*

*نویسنده مسئول: سمیه حقیقی کارسیدانی

آدرس: استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر انزلی، بندرانزلی، ایران. تلفن: ۰۱۸۱۳۲۴۱۰۵۱

پست الکترونیک: Haghighikarsidani@yahoo.com

مقدمه

بیماری های زئونوز باکتریایی از با اهمیت ترین بیماری های عفونی بوده و در بین آنها بیماری‌های منتقله از غذا از اهمیت ویژه ای از نظر بهداشت عمومی برخوردار می‌باشند (۵). *سودوموناس*ها باکتری‌های گرم منفی هستند که به طور طبیعی در محیط‌های آبی و روده ماهیان سالم زندگی می کنند و در شرایط نامساعد محیطی می‌توانند بصورت عوامل ثانویه موجب بیماری انسان، جانوران و گیاهان گردند (۲۲ و ۱۰). گونه‌های *سودوموناس* مکرراً در ارتباط با ماهیان مطرح می‌شوند (۱۴). دمای مطلوب برای رشد بیوتیپ هایی که در ماهی بیماری زا هستند، بین ۲۰ °C تا ۲۵ °C است و دامنه درجه حرارت رشد سودوموناس‌ها ۴-۴۳ °C می‌باشد (۳و۲، ۱). سه گونه از*سودوموناس*ها شامل *سودوموناس فلورسنس*، *سودوموناس کلورافیس* و *سودوموناس آنگوئیلی سپتیکا* در بیماریزایی ماهی اهمیت دارند که این باکتری ها موجب باکتریمی همراه با خونریزی شده و بیماری ناشی از آنها با افزایش دما و مدیریت نامناسب ارتباط دارد (۷). *سودوموناس فلورسنس* که به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی سپتی سمی خون ریزی دهنده‌ی باکتریایی ماهی است، برای اولین بار به عنوان عامل بیماری زا در ماهی کپور آیینه ای و کپور چرمی توسط Plene گزارش شده است (۳). *سودوموناس آئرژینوزا*، گرم منفی و پاتوژن فرصت طلبی است که در تمام محیط‌ها قدرت زیست داشته و عامل بسیاری از عفونت‌های شدید در انسان مانند آندوکاردیت، منتژیت، سپتی سمی و عفونت‌های مزمن ریه در بیماران سیستیک فیبروزیس می‌باشد و هم چنین به عنوان عامل ایجاد سپتی سمی در ماهیان شناسایی شده است (۱۱). ماهیان مبتلا به *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس آئرژینوزا* دارای جراحات همراه با خونریزی روی پوست و در قاعده باله‌ها می‌باشند. بعلاوه گاهی تیرگی بدن و زخم‌های سطحی کروی و بیضوی رخ می‌دهد. از نظر داخلی آسیت، نقاط خونریزی نقطه ای روی آبشش‌ها، کلیه، کبد، طحال و در دیواره مخاط دستگاه گوارش وجود دارد که حاکی از یک سپتی سمی تیپیک باکتریایی می‌نماید. گاهی اوقات (در فرم سطی و جلدی بیماری) ضایعات داخلی قابل مشاهده نمی‌باشد (۱۱ و ۴). تلفات ماهیان فیتوفاگ با علائم آسیت و خونریزی‌های نقطه مانند روی پوست و آبشش به عنوان مشکل عمده پرورش دهندگان ماهیان گرمابی در سال های اخیر بویژه در فصول بهار و تابستان در استان گیلان بوده است که عمدتاً از اواخر خرداد ماه آغاز می‌گردد ولی در اواسط مرداد ماه که دما به شدت بالا رفته است، شدت تلفات افزایش می‌یابد.

در این تحقیق سعی بر آن شد تا از کیت‌های تشخیص سریع و دقیق جهت شناسایی عوامل باکتریایی در ماهیان بیمار استفاده گردد. انتخاب یک کیت تشخیص سریع از اهمیت بسیار بالایی برخورداراست. همچنین کیت‌های تشخیص سریع می‌توانند جایگزین مناسبی برای روش‌های وقت گیر و پر دردسر رایج آزمایشگاهی شوند. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های جنس *سودوموناس* به روش‌های کشت بر روی محیط های انتخابی و اختصاصی، روش‌های متداول بیوشیمیایی و مقایسه دو سیستم تشخیص سریع API 20E و API 20NE از ماهیان فیتوفاگ دارای علائم بالینی بود.

مواد و روش کار

نمونه برداری

در این مطالعه که از فروردین تا شهریور ۹۱ انجام شد طی هماهنگی‌های بعمل آمده با پرورش دهندگان

ماهیان گرمابی اطراف شهر رشت پس از مشاهده علائم و تلفات در استخرها و اندازه گیری دما (درجه سانتی گراد)، pH و تغییر اکسیژن آب (mg/l)، نمونه برداری از ۱۲۶ قطعه ماهی صورت گرفت. پس از انتقال ماهیان فیتوفاگ به صورت زنده به آزمایشگاه باکتری شناسی بخش بهداشت و بیماری های آبزیان پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی کشور در بندرانزلی، ابتدا علائم بالینی مورد بررسی قرار گرفته و بیومتری (زیست سنجی) ماهیان انجام شد. سپس ماهیان در زیر هود لامینار کلاس II در شرایط کاملاً آسپتیک پس از ضدعفونی سطح شکمی با اتانل ۷۰٪، کالبدگشایی شدند و از اندام های داخلی ماهی شامل کبد، طحال و کلیه در محیط آگار خوندار (تهیه شده از ۱۰٪ خون دفیبرینه گوسفند، شرکت داروا‌ش، ایران) کشت داده شد سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰°C قرار گرفتند.

کشت نمونه و تعیین هویت *سودوموناس*‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی

در این مطالعه از سویه استاندارد ATCC 27853 *سودوموناس آئرژینوزا* و *سودوموناس فلورسنس* تهیه شده از مرکز رفرانس بیماری های آبزیان اتحادیه اروپا استفاده شد. پس از اطمینان از خلوص کلونی‌ها، پرگنه‌های رشد یافته بر اساس رنگ، شکل و اندازه و همولیز بررسی شدند و رنگ آمیزی گرم انجام شده سپس کشت در محیط‌های اختصاصی GSP، *Pseudomonas* F agar، *Pseudomonas* P agar (شرکت Merck – آلمان) و تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، SIM، TSI، O/F، سیمون سیترات و رشد در درجه حرارت۴۲°C انجام شد (تمامی محیط‌ها از شرکت Merck – آلمان تهیه شد).

شناسایی باکتری های مشکوک به *سودوموناس* با کیت‌های API20E و API 20 NE

ابتدا سوسپانسیونی از پرگنه خالص شده باکتری با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. سپس با پی پت پاستور در حفره‌های کیت‌ها که حاوی ترکیبات و قندهای لیوفیلیزه شده می‌باشند وارد نموده و طبق دستورالعمل سازنده (Biomerieux، فرانسه) بقیه مراحل انجام شد. سپس با وارد کردن نتایج در جدول مربوط به این کیت‌ها یک پروفایل چند رقمی بدست آمده که از طریق نرم افزار اینترنتی Api web باکتری شناسایی شد.

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

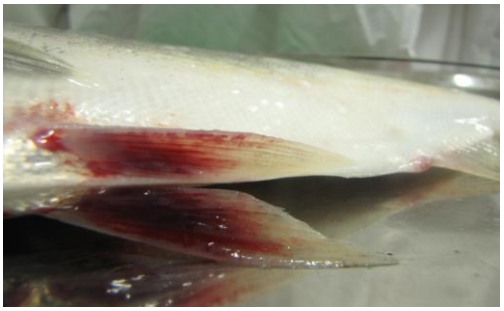
تمام جدایه‌های *سودوموناس* از نظر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با ۱۲ دیسک آنتی بیوتیک (شرکت پادتن طب) به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck – آلمان) طبق روش Bauer و همکاران (۱۹۶۶) اصلاح شده بر اساس NCCLS (۲۰۰۷) مورد بررسی قرار گرفتند (Nccls.2007). ابتدا سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. ۱۵ دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی در محیط مولر هینتون آگار، دیسک‌های پنی سیلین- جی(µg ۱۰)، آمپی سیلین(µg ۱۰)، آموکسی سیلین(µg ۲۵)، استرپتومایسین (µg ۱۰)، کانامایسین(µg ۳۰)، کلیندامایسین (µg ۲)، نئومایسین(µg ۳۰)، جنتامایسین (µg ۱۰)، تری متوپریم + سولفامتوکسازول (µg ۱/۲۵ + ۲۳/۷۵)، اریترومایسین(µg ۱۵)، اکسی تتراسایکلین(µg ۳۰)، فلورفنیکل (µg ۳۰) را با فاصله ۲/۵ سانتی متر از یکدیگر روی محیط قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای۳۷°C با استفاده از خط کش‌هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و با استانداردهای جهانی (CLSI) مقایسه شد و طبق

دستورالعمل شرکت سازنده نمونه‌های مورد نظر را به صورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) گزارش داده شد.

نتایج

علائم بالینی شامل خونریزی در سطح پوست، در پایه باله‌ها (تصویر۲) و در کل باله و آسیت (آب آوردگی) بوده و در کالبد گشایی مایع قرمز در محوطه بطنی مشاهده شد و هم چنین میزان آلودگی اندام‌های داخلی ماهیان بررسی شده به باکتری *سودوموناس* بیشترین تعداد به ترتیب در کلیه،کبد، طحال و مایعات آسیتی مشاهده شد(جدول شماره۱). میانگین دمای آب، اکسیژن و pH در مزارعی که باکتری‌های *سودوموناس* جدا گردیدند به ترتیب ۳۰/۵-۲۶/۵ °C، ۵/۷-۴/۳ mg/L و ۸/۶۲-۷/۴ بود. در کشت اولیه از ۱۲۶ نمونه فیتوفاگ از ۲۵ مزرعه پرورش ماهی گرمابی، ۷۵ جدایه جداسازی شد که با استفاده از محیط های کشت اختصاصی و تست‌های بیوشیمیایی و کیت‌های API 20E و API 20NE، نتایج آزمایشات نشان داد که از ۲۵ مزرعه،۴ مزرعه آلودگی به باکتری *سودوموناس* دارند و مجموعاً در ۴ مزرعه ۹ جدایه از دو گونه *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس آئرژینوزا* به ترتیب با شیوع ۸٪ و۴٪ جداسازی شدند. پرگنه‌های *سودوموناس فلورسنس* در روی محیط آگار خوندار برنگ خاکستری روشن،۱/۵ میلی متر و پرگنه‌های *سودوموناس آئرژینوزا* به رنگ خاکستری تیره بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شد. از بین ۷۵ جدایه، ۹ جدایه بروی محیط *Pseudomonas* P agar و *Pseudomonas* F agar رشد کرده ولی فقط ۳ جدایه در محیط PFA رنگدانه زرد ـ سبز و در محیط PPA رنگدانه آبی ـ سبز ایجاد کردند و سایر جدایه‌ها هیچگونه رنگدانه ای تولید نکردند. API 20NE تا ۹۸/۹٪ گونه‌های *سودوموناس آئرژینوزا* را تشخیص داد در حالی که API 20E تا ۶۴/۶٪ توانایی تشخیص گونه‌های مذکور را داشت. در خصوص *سودوموناس فلورسنس*، API 20NE تا ۹۹٪ *سودوموناس فلورسنس* را شناسایی نمود در حالی که این نمونه‌ها بوسیله API 20E به صورت *P. fluorescens/Putida* و *P. aeruginosa* تشخیص داده شدند (جدول ۲و۳).

نتایج آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* به کانامایسین و نئومایسین حساسیت ۱۰۰٪ داشته و۸۳.۳٪ آنها به تتراسایکلین حساس بوده و ۶۶.۶٪ آنها نیز نسبت به استرپتومایسین حساسیت متوسطی را نشان دادند. در حالی که ۳۳.۳٪ جدایه‌های *سودوموناس آئرژینوزا* نسبت به استرپتومایسین حساس بوده و ۳۳.۳٪ از آنها نسبت به اکسی تتراسایکلین حساسیت متوسطی نشان دادند. تمامی جدایه‌های *سودوموناس آئرژینوزا* و *سودوموناس فلورسنس* ۱۰۰٪ نسبت به جنتامایسین حساسیت نشان دادند (جدول ۴و۵).



تصویر۱- ماهی فیتوفاگ پرورشی (*Hypophthalmichthys molitrix*)، خونریزی در باله‌های سینه ای

جدول۱- میزان آلودگی اندام‌های داخلی ماهیان بررسی شده به باکتری *سودوموناس*

بافت نمونه برداری شده	کلیه	کبد	طحال	مایعات آسیتی	مجموع
تعداد نمونه دارای آلودگی(n =۱۲۶)	۹	۷	۶	۱	۹
نسبت آلودگی در بافت(٪)	۷/۱	۵/۵	۴/۷	۰/۷	۷/۱

جدول۲- مشخصات باکتری های شناسایی شده ازماهیان فیتوفاگ پرورشی با استفاده از کیت API 20E

مشخصه	نتایج		نتایج	
	استاندارد فلورسنس	باکتری جداشده از ماهی	استاندارد آیروجینوزا	باکتری جداشده ازماهی
بتا گالاکتوزیداز	-	-	-	-
آرژنین دهیدرولاز	+	+	+	+
لیزین دکربوکسیلاز	-	-	-	-
اورنتین دکربوکسیلاز	-	-	-	-
مصرف سیترات	+	+	+	+
تولید سولفیدهیدروژن	-	-	-	-
اوره آز	-	-	+	-
تریپتوفان دآمیناز	-	-	-	-
تولید اندول	-	-	_	-
تولید استن	+	+	+	-
ژلاتیناز	+	+	+	+
مصرف گلوکز	+	+	+	+
د- مانیتول	-	-	-	-
اینوزیتول	-	-	-	-
د- سوربیتول	-	-	-	-
ال- رامنوز	-	-	-	-
د- ساکاروز	-	+	+	-
د- ملیبوز	+	+	+	+
آمیگدالین	+	-	+	-
ال- آرابینوز	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+
نیتریت	+	+	+	-
گاز نیتروژن	-	-	+	-
SIMحرکت در	+	+	+	+
رشد در مکانکی	+	+	+	+
O/F	+/-	+/-	+/-	+/-

جدول۳- مشخصات باکتری های شناسایی شده از ماهیان فیتوفاگ پرورشی با استفاده از کیت API 20NE

مشخصه	نتایج		نتایج	
	استاندارد گونه فلورسنس	باکتری جداشده از ماهی	استاندارد گونه *آئروژینوزا*	باکتری جداشده ازماهی
تولید نیتریت و نیتروژن	+	+	+	-
تولید اندول	-	-	-	-
تخمیر گلوکز	-	-	-	-
آرژنین دهیدرولاز	+	+	+	+
اوره آز	+	-	+	-
هیدرولیز بتا گالاکتوزیداز	+	-	+	-
هیدرولیز پروتئاز	+	+	+	+
بتا گالاکتوزیداز	+	-	+	-
د- گلوکز	+	+	+	+
ال- آرابینوز	+	+	+	-
د- مانوز	+	+	+	-
د- مانیتول	+	+	+	+
ان- استیل- گلوکز آمین	+	+	+	+
د- مالتوز	+	-	+	-
گلوکونات پتاسیم	+	+	+	+
کاپریک اسید	+	+	+	+
آدیپک اسید	+	-	+	+
مالیک اسید	+	+	+	+
سیترات تری سدیم	+	+	+	+
فنیل استیک اسید	+	-	+	-
اکسیداز	+	+	+	+

جدول٤- نتایج آنتی بیوگرام *سودوموناس فلورسنس* جدایه شده از نمونه ماهی فیتوفاگ

نوع آنتی بیوتیک	نتیجه آنتی بیوگرام(تعداد ۶ مورد)			کل
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	
پنی سیلین- جی(µg ۱۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(٪۱۰۰)	۶(۱۰۰)
آمپی سیلین(µg ۱۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(٪۱۰۰)	۶(۱۰۰)
آموکسی سیلین(µg ۲۵)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(٪۱۰۰)	۶(۱۰۰)
استرپتومایسین(µg ۱۰)	۰(٪۰/۰)	۴(٪۶۶/۶)	۲(٪۳۳/۳)	۶(۱۰۰)
کاناماپسین(µg ۳۰)	۶(٪۱۰۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(۱۰۰)
کلینداماپسین(µg ۲)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(٪۱۰۰)	۶(۱۰۰)
نئومایسین(µg ۳۰)	۶(٪۱۰۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(۱۰۰)
جنتامایسین(µg ۱۰)	۶(٪۱۰۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(۱۰۰)
تری متوپریم + سولفامتوکسازول(µg ۱/۲۵ + ۲۳/۷۵)	۱(٪۱۶/۶)	۱(٪۱۶/۶)	۴(٪۶۶/۶)	۶(۱۰۰)
اریترومایسین(µg ۱۵)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(٪۱۰۰)	۶(۱۰۰)
اکسی تتراسایکلین(µg ۳۰)	۵(٪۸۳/۳)	۱(٪۱۶/۶)	۰(٪۰/۰)	۶(۱۰۰)
فلورفنیکل(µg ۳۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۶(٪۱۰۰)	۶(۱۰۰)

جدول٥- نتایج آنتی بیوگرام *سودوموناس آئروژینوزا* جدایه شده از نمونه ماهی فیتوفاگ

نوع آنتی بیوتیک	نتیجه آنتی بیوگرام(تعداد ۳ مورد)			کل
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	
پنی سیلین- جی(µg ۱۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
آمپی سیلین(µg ۱۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
آموکسی سیلین(µg ۲۵)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
استرپتومایسین(µg ۱۰)	۱(٪۳۳/۳)	۲(٪۶۶/۶)	۰(٪۰/۰)	۳(۱۰۰)
کاناماپسین(µg ۳۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
کلینداماپسین(µg ۲)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
نئومایسین(µg ۳۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
جنتامایسین(µg ۱۰)	۳(٪۱۰۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(۱۰۰)
تری متوپریم + سولفامتوکسازول(µg ۱/۲۵ + ۲۳/۷۵)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
اریترومایسین(µg ۱۵)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)
اکسی تتراسایکلین(µg ۳۰)	۰(٪۰/۰)	۱(٪۳۳/۳)	۲(٪۶۶/۶)	۳(۱۰۰)
فلورفنیکل(µg ۳۰)	۰(٪۰/۰)	۰(٪۰/۰)	۳(٪۱۰۰)	۳(۱۰۰)

بحث

*سودوموناس*ها پاتوژن‌های گرم منفی فرصت طلب‌اند که به طور طبیعی در محیط‌های آبزی و به عنوان فلور نرمال روده ماهیان سالم می‌باشند و زمانی که شرایط محیطی نرمال تغییر یابد باعث شیوع بیماری می‌گردند (۲۳و۱۰). نتایج نشان داد که استفاده از کیت API 20NE در مقایسه با کیت API 20E و روش های بیوشیمیایی در تشخیص گونه‌های *سودوموناس* خطای تشخیصی را به میزان زیادی کاهش می‌دهد. با توجه به تعدد تست‌های بیوشیمیایی و هزینه و زمانی که برای ساخت و انجام آزمون صرف می‌شود، جایگزین نمودن یک کیت تشخیص سریع از نظر هزینه تمام شده (محیط کشت، شیشه آلات، تجهیزات و پرسنل) مقرون به صرفه است. همچنین جهت انجام آزمون زمان کمتری صرف می‌گردد و نیازی به آماده سازی محیط و مواد لازم نبوده و تعداد زیادی نمونه را در زمانی کوتاه و با پرسنل کم می‌توان انجام داد و نیز میزان خطا هم کاهش می‌یابد. با کیت API 20NE قابلیت تشخیص گونه‌های مختلف *سودوموناس* با دقت بالا در ماهی امکانپذیر می‌باشد. تمامی نمونه‌ها با استفاده از API 20NE و API 20E مورد بررسی قرار گرفته و API 20NE بیش از ۹۸٪ گونه‌های *سودوموناس آئرژینوزا* و *سودوموناس فلورسنس* را تشخیص داد، درحالی که API 20E نمی‌توانست به خوبی گونه‌های این دو *سودوموناس* را از هم دیگر تفکیک نماید و به صورت *fluorescens/Putida P.* تشخیص می‌داد.

سوزا (۲۰۰۱) باکتری های *سودوموناس* را به همراه *آئروموناس* از اندام های داخلی(کلیه و کبد) و محیط محل زندگی ماهیان آب شیرین با استفاده از دو سیستم API 20E و API 20NE در برزیل جداسازی نمود. بیشترین جداسازی باکتری *سودوموناس* از کلیه (۷/۱)، کبد (۵/۵)، طحال (۴/۷) و مایعات آسیتی (۰/۷) بود که با سایر مطالعات انجام شده تطابق دارد (۹، ۱۵،۱۶ و ۱۷). اندامهای داخلی ماهیان سالم باید استریل باشد اما جداسازی باکتری از کلیه، کبد و طحال بارها گزارش شده است (۲۴ و ۲۲، ۲۱، ۱۵). مشخصات کشت و بیوشیمیایی جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس آیروژینوزا* نیز مشابه با مطالعات قبلی که این ارگانیسم‌ها را از سایر گونه‌های ماهی جدا کرده بودند، بود (۱۵ و ۱۳، ۱۱).

نتایج این مطالعه نشان داد که علائم کلینیکی در ماهیانی که باکتری *سودوموناس* از آنها جداسازی شد شامل خونریزی نقطه ای پراکنده در سطح بدن، خونریزی قاعده باله‌ها و آسیت بود که به طور کامل با نتایج دیگران تطابق نداشت (۲۶ و ۱۵، ۱۱، ۹) و در مطالعات آنها خونریزی نقطه ای، تیرگی پوست، کنده شدن فلس‌ها، آسیت در محوطه شکمی و اگزوفتالمی دیده شده بود.

عوامل ایجاد سپتی سمی در ماهیان در بعضی از گونه‌های *سودوموناس* شامل *سودوموناس فلورسنس*، *سودوموناس آنگوئیلی سپتیکا*، *سودوموناس سودوموناس آئرژینوزا*، *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس کلورافیس* شناسایی شده اند (۲۰ و ۱۸، ۱). در این تحقیق شیوع بیماری در استان گیلان عمدتاً در فصل بهار و تابستان بوده که دمای آب به شدت بالا رفته و بدلیل کمبود منابع آبی امکان تعویض مناسب آب به مدت طولانی وجود ندارد و کاهش کیفیت آب، شرایط محیطی را جهت بروز عفونت باکتریایی مناسب می‌نماید. در مطالعه Eissa و همکاران (۲۰۱۰) حساسیت آنتی بیوتیکی بالایی به آمیکاسین و آواتریل داشته و حساسیت متوسطی به جنتامایسین، اریترومایسین، نوبیوسین و سولفامتوپریم داشتند. نتایج آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی در مطالعه حاضر نشان داد که هر دو گونه از *سودوموناس* جداشده، حساسیت ۱۰۰٪ به جنتامایسین دارند و *سودوموناس فلورسنس* به کانامایسین و نئومایسین نیز حساسیت ۱۰۰٪ داشته و ۸۳/۳٪ جدایه‌ها به اکسی تتراسایکلین حساس بوده و ۶۶/۶٪ جدایه‌ها حساسیت متوسط به استرپتومایسین نشان دادند. در حالی که *سودوموناس آئرژینوزا* حساسیت ۳۳/۳٪ به استرپتومایسین و ۳۳/۳٪ حساسیت متوسط به اکسی تتراسایکلین داشتند.

نتایج نشان داد که گونه‌های *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس آئرژینوزا*، تنها ۱۲٪ جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند لذا گونه‌های بیماریزای ثانویه در تلفات ماهیان فیتوفاگ پرورشی استان گیلان بوده و داروهای جنتامایسین داروی انتخابی برای هر دو گونه می‌باشند و برای گونه *سودوموناس فلورسنس* کانامایسین و نئومایسین نیز مناسبند. از میان دو سیستم API، نوار API 20NE با دقت و قدرت تفیک پذیری بالاتری نسبت به API 20E قادر به تشخیص گونه‌های *سودوموناس* می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای دکتر زهرائی، استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، سرکار خانم دکتر فلاحی ریاست محترم پژوهشکده آبزی پروری انزلی و کارشناسان محترم بخش بهداشت و بیماری های آبزیان پژوهشکده قدردانی می گردد.

منابع

۱. اینگلیس، و.، روبرت، ر.، برومیج، ن. (۱۳۷۶). *بیماریهای باکتریایی ماهی*. ترجمه سلطانی، م. انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران، ۴۵۴ صفحه.

۲. جرج، پ. (۱۳۷۸). *بهداشت ماهی*. ترجمه ستاری، م.، روستایی، م. انتشارات دانشگاه گیلان، ۲۸۴ صفحه.

۳. روبرتس، آ.ر.ژ. (۱۳۸۶). *آسیب شناسی ماهی*. ترجمه پیغان، ر.، مهجور، ا. انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۱۰۰ صفحه.

۴. سلطانی، م. (۱۳۸۰). *بیماری های آزاد ماهیان*. انتشارات دانشگاه تهران، ۴۴۴صفحه.

۵. طباطبائیان، ع.ح.، فیروزی، ر. (۱۳۸۰). *کتاب بیماری های دام*. انتشارات دانشگاه تهران. صفحات ۲۵۹- ۲۵۵.

۶. لاسلوه، گ.، کریس، س. (۱۳۸۴). *تکثیر و پرورش و سایر ماهیان پرورشی*. ترجمه خوش خلق، م. انتشارات دانشگاه گیلان، ۲۵۰صفحه.

۷. مخیر، ب. (۱۳۸۹). *بیماری‌های ماهیان پرورشی*. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۳۵۰.

8. Al-Dughaym, A.M. (2000). Recovery and antibiogram studies of *A. hydrophila* and *P. fluorescens* from naturally and experimentally infected Tilapia fishes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **3**: 2185-7.

9. Altinok, I., Kayis, S., Capkin, E. (2006). *P. putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture* **26**: 850-5.

10. Angelini, N.M., Seigneur, G.N. (1988). Disease of the fins of Rhamdia sapo. Isolation of the etiological agents and experimental infection. *Revista-Argentina-de-Microbiolog* **20**: 37-48.

11. Austin, B., Austin, D.A. (2007). *Bacterial Fish Pathogens*. *Diseases of Farmed and Wild Fish.* Springer-Praxis Publishing, Ltd., United Kingdom.

12. Bauer, A.W., Kirbee, W.M., Turch, J.C.M. (1966). Antibiotic sensitivity testing by standard single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* **45**: 493-6.

13. Buller, N.B. (2004). *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals*. A practical identification manual, 36-107.

14. Cahill, M.M. (1990). Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* **19**: 21-41.

15. Eissa, N.M.E., Abou El-Ghiet, E.N., Shaheen, A.A., Abbass, A. (2010). Characterization of *Pseudomonas* Species isolated from Tilapia *"Oreochromis niloticus*" in Qaroun and Wadi-El-Rayan lakes, Egypt. *Global Veterinaria* **5**: 116-21.

16. El-Ashram, A.M.M., Azza, M.M.A. (2006). A contribution on bacterial pathogins infecting mullet (*Mugil capito*) cultured in fresh water farms in Sharkia governorate. *Egyptian Journal of Agricultural Research* **84**: 23-6.

17. El-Moghazy, D.F. (2004). Studies on *Pseudomonas* septicemia in cultured *Oreochromis niloticus* fish. M.V.Sc. thesis, Fish Disease and Management, Faculty of Veterinary Medicine, Suez Canal University.

18. El-Nagar, R.M.A. (2010). Bacteriological studies on *Pseudomonas* microorganisms in cultured. M.V.Sc. thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb University.

19. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Seventeenth informational supplement, Nccls (2007). Vol. **27**, 1.

20. Post, G. (1987). Textbook of fish health T.F.H. Publications Inc Neptune city, New Jersey, U.S.A. for revised and expanded Edition, 41-44; 159- 214.

21. Lindsay, G.J.H. (1986). The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. *Aquaculture* **51**: 169-73.

22. Nieto, T.P., Toranzo, A.E., Barja, J.L. (1984). Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different

hatcheries in the north-west of Spain. *Aquaculture* **42**:193-206.
23. Roberts, R.J. (1989). *Fish Pathology*. Bailliere Tindall, London, Second edition.
24. Sousa, J.A., Eiras, J.C., Alexandrino, A.C., Ishikawa, C.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Eiras, A.C. (1996). Preliminary bacteriological evaluation of semi-intensively farmed fish (*Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus scrofa* and *Colossoma macropomum*) in São Paulo State, Brazil. *Revista UNIMAR* **18**: 299-309.
25. Sousa, J.A., Souza, A.T.S. (2001). Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja. *Paraná Brazil* **44**: 373-81.
26. Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**: 37-61.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 10, Issue 2, 2014

Rapid identification of *Pseudomonas* species in reared *Hypophthalmichthys molitrix* in Guilan province

VazifehDoost, M.[1], Haghighi-Karsidani, S.[2*], Issazadeh, Kh.[3], Ghasemi, M.[4], Faezy-Ghasemi, M.[3]

1- MS Graduated, *Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Gilan, Iran*

2- Assistant Professor, Department of Fisheries, Anzali Branch, Islamic Azad University, Gilan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Fish Diseases, Inland water aquaculture institute, Iranian Fisheries Research Organization, Anzali, Gilan, Iran

4-

Received date: 19 October 2013 *Acceptance date: 17 November 2013*

Abstract: *Pseudomonas spp. are zoonotic bacteria associated with human and fish accompanied to hemorrhage in the fish. Rapid detection of this disease leads to in time treatment. Present study was performed aiming to compare two kits including API 20 NE and API 20 E with routine biochemical tests to detect pseudomonas species. With occurrence of serious losses in the reared Hypophthamichthys molitrix in Guilan province during spring and summer when environmental conditions were suitable for bacterial infection outbreak, 126 fish from 25 warm water farms locating in Rasht were transferred to the fish health and disease department of Inland water aquaculture institute. After carefully dissection, Samples of kidney, liver, spleen and ascetic fluid of each fish were aseptically streaked onto blood Agarthen incubated for 24-48 hours at 30 ºC. Simultaneously, routine biochemical techniques and API kits were used for characterization. Antibiotic resistance pattern for all pseudomonas isolates was determined using disk diffusion technique on Moller- Hinton agar according to Bauer, et al method (1966) modified based on NCCLS (2007). Based on the results of 75 isolates, 9 isolates (12%) were pseudomonas spp.. Nine isolates were placed in 2 species of P. aeruginisa and P. fluoresences using API 20NE with 98% accuracy While API 20E detected P. aeruginisa with 64% accuracy and P. fluoresences was defined as P. fluoresences/putida. In the antibiotic sensitivity test, gentamycin was the choice drug for both species and for P. fluoresences, Kanamycin and neomycin also had 100% influences. Results indicated that among 2 API systems, API 20NE strip is capable to detect pseudomonas species in fish with higher precision and dissociation ability compared to API 20E.*

Keywords*: P. fluoresences, P. aeruginisa, API 20NE, API 20E, Hypophthalmichthys molitrix.*

[*] *Corresponding author: Haghighi-Karsidani, S.*
Address: Assistant Professor, Department of Fisheries, Anzali Branch, Islamic Azad University, Gilan, Iran.
Email: Haghighikarsidani@yahoo.com