

مطالعه مولکولی پراکنش بیماری‌های مشترک استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای رنگین کمان استان‌های چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد و تعیین فراوانی نسبی عوامل خطر ساز آن‌ها

مهدی سلطانی^۱، علی طاهری میرقاند^۲، اسماعیل پیرعلی خیرآبادی^۳، شفیق شفیعی^۳، سمیرا محمدیان^۲، شقایق روح الهی^۳

^۱ استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبریان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران

^۲ استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبریان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران

^۳ دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و بیماری‌های آبریان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران

نویسنده رابط: مهدی سلطانی، نشانی: تهران، خیابان دکتر محمد قریب، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، گروه بهداشت و بیماری آبریان، تلفن: ۶۱۱۱۷۰۹۴، نمابر: ۶۱۱۱۷۰۹۴

پست الکترونیک: msoltani@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۶؛ پذیرش: ۹۱/۱/۷

مقدمه و هدف: استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس از بیماری‌های مهم، پرهزینه و زئونوز در صنعت آبی‌پروری، به‌ویژه برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به‌شمار می‌آیند، به‌طوری‌که خسارات سالانه ناشی از آن‌ها به ده‌ها میلیون دلار می‌رسد. این مطالعه با هدف بررسی پراکنش این بیماری‌ها در ۵۰ کارگاه قزل‌آلای رنگین کمان در استان‌های چهارمحال و بختیاری (۲۵ کارگاه) و کهگیلویه و بویر احمد (۲۵ کارگاه) و همچنین، تعیین میزان فراوانی نسبی حضور ۲۰ عامل خطر ساز و مستعدکننده بروز این بیماری‌ها انجام گرفته است. روش کار: مطالعه به‌صورت توصیفی و در قالب بازرسی کارگاهی، نمونه‌گیری، کشت باکتریایی و مطالعه‌های مولکولی، برای تشخیص بیماری‌های پیش‌گفته انجام شده است.

نتایج: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که ۵۶٪ (۱۳ کارگاه) در استان چهارمحال بختیاری به لاکتوکوکوزیس با عامل لاکتوکوکوس گارویه و تعداد ۲۰٪ (۵ کارگاه) به استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی مبتلا بودند. در استان کهگیلویه و بویر احمد ۶۴٪ (۱۶ کارگاه) به لاکتوکوکوزیس و ۱۲٪ (۳ کارگاه) به استرپتوکوکوزیس مبتلا بودند. بررسی میزان فراوانی نسبی حضور عوامل خطر ساز در کارگاه‌های هر دو استان، به‌ترتیب برای ۱۰ و ۱۶ عامل مورد مطالعه، بیش از ۵۰٪ و ۸۰٪ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که این بیماری‌ها، به‌ویژه لاکتوکوکوزیس، در هر دو استان دارای پراکنش وسیع و میزان حضور عوامل خطر ساز در بروز و تشدید آن‌ها در این مزارع شایان توجه است.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس، عوامل خطر، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویر احمد

مقدمه

شده، تا حدی که بررسی‌های اولیه نشان‌دهنده خسارت ده‌ها میلیارد تومانی در سال است (۱) این بیماری که به‌طور عمده بیماری مرحله پرواری است می‌تواند خسارت‌هایی از ۵٪ تا ۷۵٪ در مزارع ماهیان ایجاد کند و از آنجا که یکی از بیماری‌های مشترک انسان و ماهی نیز محسوب می‌شود و از سویی، عمده تلفات در مراحل پرواری (سایزهای بالای ۱۰۰ گرم) است. به همین دلیل، خسارت‌های وارد شده قابل توجه است (۱، ۲، ۳).

نتایج مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهد که برخی گونه‌های

رشد روز افزون جمعیت موجب شده‌است که موضوع تأمین غذا و امنیت غذایی به یکی از مهم‌ترین نیازهای روزمره جوامع بشری بدل شود و از این رو، به صنعت آبی‌پروری برای تأمین بخشی از این نیاز غذایی بسیار توجه شده‌است (FAO, 2011). خوشبختانه در کشور ما نیز طی دو دهه اخیر این صنعت به‌خوبی رشد کرده‌است، اما متأسفانه بروز برخی بیماری‌ها و مشکلات بهداشتی، از جمله بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس موجب بروز مشکلات و خسارت‌های فراوان به صنعت قزل‌آلای کشور

۲- عملیات بازرسی کارگاهی و شناسایی عوامل خطر ساز

به منظور انجام بازرسی برای شناسایی عوامل خطر و با توجه به اپیدمیولوژی این بیماری‌ها در زمان بازرسی کارگاهی فراوانی نسبی حضور ۲۰ عامل خطر ساز برای هر یک از کارگاه‌های مورد مطالعه تعیین گردید. این عوامل شامل استفاده از رودخانه، به عنوان منبع آب، وجود دمای بالای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، نبود اکسیژن کافی (بالای ۷ میلی‌گرم در لیتر)، وجود کارگاه ماهی در بالادست، وجود روستا در بالادست، وجود فعالیت کشاورزی در بالادست، وجود فعالیت صنعتی در بالادست، کنترل نشدن گردشگران و تردد افراد در کارگاه و بالادست (از طریق ایجاد موانع فیزیکی و نهبانی)، نبود قرنطینه لازم، کنترل نشدن بهداشتی ورود و خروج تخم چشم‌زده و بچه ماهی به کارگاه (مانند ضد عفونی تخم و بچه ماهی پیش و پس از ارسال به کارگاه یا خروج از کارگاه، انجام دادن آزمایش‌های میکروبی مورد نیاز در مواقع لازم)، وجود جانوران خونگرم در کارگاه، کنترل نشدن بهداشتی تردد وسایل نقلیه به کارگاه، جمع‌آوری نکردن بهداشتی تلفات و دفن آن‌ها در کارگاه، انجام نشدن واکسیناسیون، به کارنگرفتن کارکنان ماهر و تحصیل کرده در کارگاه (افراد با تحصیلات فوق دیپلم و بالاتر)، رعایت نکردن نظافت و بهداشت فردی از سوی کارکنان کارگاه (مانند شست‌وشوی دست‌ها با مایع دستشویی پس از رفع حاجت و استفاده از چکمه و لباس کار تمیز، هنگام کار)، تراکم بالا در استخرها (تراکم قابل قبول برای پرورش قزل‌آلا از طریق تعیین بیومس در واحد سطح)، مشاهده ماهیان با علائم بالینی (کوری، سیاه شدن، کاتاراکت) و تلفات در کارگاه، استفاده از غذاهای تازه و خام و نگهداری نکردن بهداشتی آن‌ها در کارگاه و وجود استخرهای لجن‌زا در کارگاه بودند. در این مطالعه نقش هر یک از این عوامل در بروز و تشدید بیماری‌ها یکسان در نظر گرفته شده است.

۳- مطالعه‌های میکروبیولوژیک

۱-۳- نمونه‌گیری و کشت باکتریایی

پس از بازرسی کارگاهی در هر یک از کارگاه‌های مورد مطالعه و ثبت حضور یا نبود عوامل خطر مورد نظر، عملیات نمونه‌گیری و کشت باکتریایی به شرح زیر انجام شد. ابتدا ماهیان دارای علائم بالینی شامل کوری، اگزوفتالمی، تیرگی رنگ بدن، زخم‌های پوستی، تورم شکم و شنای کند، انتخاب و به تعداد حداقل ۱۰ ماهی از هر مزرعه برداشت گردید. سپس در شرایط استریل و پس

باکتریایی، شامل استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه، از عوامل اصلی بروز بیماری‌ها است و برخی عوامل محیطی و مدیریتی، مانند نوسانات درجه حرارت، تراکم بالا، آلودگی منابع آبی به فاضلاب‌های انسانی و دامی، تأثیری قابل توجه در تشدید این بیماری‌ها در مزارع ماهیان دارد. به هر حال، میزان تأثیر این عوامل، بسته به سیستم پرورشی و گونه‌های پرورشی و نیز سطح مدیریت بهداشتی مزارع، متفاوت است (۳). همچنین، از آنجاکه مخازن باکتریایی عامل بیماری نیز متنوع است، توجه به عوامل خطر ساز بیماری، مانند عوامل کیفی آب و راه‌های انتشار باکتری‌های عامل بیماری در منابع آبی، برای کنترل و پیش‌گیری از بروز خسارات در مزارع اهمیتی ویژه دارد (۴، ۵). به همین دلیل با شناسایی کانون‌های آلوده و عوامل خطر ساز می‌توان ضمن ارتقای سطح مدیریت بهداشتی مزارع به کارایی برخی روش‌های پیشگیری، مانند واکسیناسیون نیز کمک کرد، زیرا بدون شناخت عوامل خطر ساز و حذف آن‌ها، مبارزه با این گونه بیماری‌ها دشوار خواهد بود. بنابراین با توجه به ضرورت و اهمیت موضوع (خسارت‌های قابل توجه، مشترک بودن این بیماری‌ها و استفاده بی‌رویه مزرعه‌داران از داروها برای کنترل و درمان آن‌ها)، این مطالعه توصیفی با هدف تعیین پراکنش این بیماری‌ها در دو استان پر تولید کشور، به منظور شناسایی کانون‌های آلوده و نیز تعیین فراوانی نسبی عوامل خطر ساز و مستعدکننده بروز آن‌ها برای ارائه راهکارهای کنترلی و پیش‌گیری انجام شده است.

روش کار

۱- انتخاب مزارع مورد مطالعه

این مطالعه در قالب یک مطالعه توصیفی انجام شده است. بنابراین، ابتدا با هماهنگی و برگزاری جلسه‌های مشورتی با کارشناسان دامپزشکی و شیلات استان‌های چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد، کارگاه‌هایی که طی سال‌های گذشته سابقه بروز تلفات داشتند و یا در معرض برخی عوامل مهم خطر ساز قرار داشتند، شناسایی و تعیین شد. سپس تعداد ۲۵ مزرعه از هر استان انتخاب و برای شناسایی عوامل خطر و نیز انجام عملیات نمونه‌گیری و کشت باکتریایی و مطالعه‌های مولکولار، بازرسی کارگاهی شدند. این عملیات طی تابستان ۱۳۸۹ انجام گرفت. همچنین، برخی از عوامل کیفی آب مزارع، مانند درجه حرارت و اکسیژن که جزو عوامل خطر ساز محسوب می‌شوند، نیز اندازه‌گیری شد.

دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه انجام گشت و ستون‌های فیلتردار دور ریخته شد و بافر دربردارنده DNA جمع‌شده در تیوب برای مطالعه‌های بعدی در دمای 20°C- نگهداری شد. پس از استخراج DNA از ایزوله‌های باکتریایی کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ مطالعه شد.

ب- آزمایش PCR برای شناسایی ایزوله‌های لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی

برای شناسایی ایزوله‌های لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی، به ترتیب از روش‌های توصیه‌شده از سوی

(Zlotkin et al. 1998) و (Soltani et al. 2005) استفاده شد. برای این کار از دو جفت پرایمر نشان داده‌شده در جدول شماره ۱ استفاده گردید. این پرایمرها ناحیه ژن ۱۶-۲۳ rRNA S باکتری لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی را شناسایی می‌کنند. مواد مورد استفاده برای انجام واکنش PCR، شامل 2/5 μl بافر X10 PCR، U5/1 آنزیم تک پلیمرز Dream Taq، 30 پیکومول از پرایمرها، 15 μl از مخلوط (dNTP (0.2mM و 100 نانوگرم از نمونه‌های DNA بود و برای رساندن حجم نهایی به 125 μl از آب مقطر استفاده شد. برنامه PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (آمریکا)، به ترتیب شامل واسرشته‌سازی اولیه (یک دور به مدت ۳ دقیقه در 94°C) و سپس، ۳۵ دور واسرشته‌سازی (هر دور به مدت ۱ دقیقه در 94°C)، اتصال (هر دور به مدت ۱ دقیقه در 56°C) برای باکتری لاکتوکوکوس گارویه و 45°C) برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی) بسط (هر دور به مدت ۱/۵ دقیقه در 72°C) و بسط نهایی (یک دور به مدت ۱۰ دقیقه در 72°C) انجام گرفت. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و باندهای به‌دست‌آمده با استفاده از دستگاه مستندساز ژل ترانس ایلومیناتور (Bio-Rad USA، XR-plus) عکس‌برداری شد. افزون بر آن، از نشانگر bp50 نیز به‌عنوان کنترل استفاده شد.

یافته‌ها

۱- عوامل خطر ساز

نتایج فراوانی نسبی عوامل خطر در دو استان در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌است. فراوانی نسبی حضور تعداد ۱۶ عامل خطر

از کالبدشکافی، بافت کلیه قدیمی آن‌ها بر محیط ژلوز خون کشت باکتریایی داده شد و پلیت‌های کشت در دمای 25°C به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. در مرحله بعد از کلونی‌های رشدیافته ابتدا رنگ‌آمیزی گرم تهیه شد و پس از اطمینان از خلوص پرگنه و تعیین مورفولوژی و نوع رنگ‌آمیزی (گرم منفی و یا گرم مثبت) پاساژ ثانویه انجام شد. سپس آزمایش کاتالاز و تعیین نوع همولیز در پاساژ ثانوی مشخص و هر یک از سویه‌های جداشده لیوفلیزه گردید. از این نمونه‌ها در مراحل بعدی برای شناسایی گونه باکتری با روش‌های مولکولی PCR استفاده شد.

۲-۳- مطالعه‌های مولکولی PCR

برای تأیید تشخیص بیماری هر یک از سویه‌های باکتریایی جدا سازی شده از نوع کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی به روش PCR به شرح زیر مطالعه شدند:

الف- استخراج DNA

برای استخراج DNA از ایزوله‌های باکتریایی رشدیافته، از کیت (Bioflux) Biospin bacteria genomic DNA extraction ژاپن استفاده شد. برای این کار ابتدا کلونی‌های باکتری در 100 μl بافر EL به‌صورت سوسپانسیون در آمد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای 37°C انکوباسیون گردید. سپس به‌ترتیب مقدار 100 μl از بافر RS و 10 μl از محلول PK اضافه و ۵-۶ نوبت عمل وارونه‌سازی تیوب انجام و به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای 56°C انکوبه شد. در ادامه، مقدار 200 μl از بافر GA اضافه و پس از ۵-۶ نوبت وارونه‌سازی تیوب، عمل سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای 5°C انجام و در پایان، فاز مایع رویی به تیوب‌های ml5/1 انتقال داده شد. در مرحله بعد، 400 μl بافر BA افزوده شد و مخلوط به‌دست‌آمده به ستون فیلتردار انتقال یافت و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دمای 5°C سانتریفیوژ شد. سپس، مایع جمع‌شده در تیوب دور ریخته و 500 μl از بافر G ر به ستون فیلتردار اضافه شد و سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه انجام گردید. پس از آن، مایع جمع‌شده در تیوب دور ریخته شد. در ادامه، 500 μl از بافر شست‌وشو (Washing buffer) به ستون فیلتردار اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ صورت گرفت و مایع جمع‌شده در تیوب دور ریخته شد. این مرحله ۲ بار تکرار گردید. سپس، فیلترهای ستون‌دار به تیوب‌های استریل ml5/1 منتقل شد و 100 μl Elution buffer با ستون‌های فیلتر اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون شد. در پایان، عمل سانتریفیوژ با

(/۸) کارگاه هر دو سویه کوکسی گرم مثبت و کوکوباسیل گرم منفی، در یک (/۴) کارگاه هر دو سویه باسیل گرم مثبت و کوکسی گرم مثبت و در شش (/۲۴) کارگاه نتیجه کشت باکتریایی منفی بود. افزون بر آن، این سویه‌های باکتریایی برای ۲۱ (/۸۴) کارگاه فقط کاتالاز منفی و برای چهار (/۱۶) کارگاه از هر دو نوع کاتالاز مثبت و کاتالاز منفی بود. همچنین، در هفت (/۲۸) کارگاه سویه باکتریایی فقط از نوع آلفا، در سه (/۱۲) کارگاه فقط از نوع بتا، در پنج (/۲۰) کارگاه فقط از نوع گاما، در سه (/۱۲) کارگاه از هر دو نوع آلفا و بتا و در یک (/۴) کارگاه از هر دو نوع گاما و آلفا دیده شد (جدول شماره ۲).

۳- نتایج مطالعه‌های مولکولی (PCR)

نتایج مطالعه‌های مولکولی (PCR) بر ایزوله‌های کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی به دست آمده به شناسایی گونه‌های لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی، عوامل اصلی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس، منجر گردید، به طوری که رنگ‌آمیزی ژل‌های حاصل از محصول PCR باندهای با وزن مولکولی ۱۱۰۰ bp (شکل شماره ۲) و ۵۱۳ bp (شکل شماره ۳) تولید کردند. بر اساس این نتایج در ۱۸ کارگاه از مزارع مورد مطالعه در استان چهارمحال و بختیاری تعداد ۱۳ کارگاه (/۵۲) مبتلا به لاکتوکوکوزیس با عامل لاکتوکوکوس گارویه و ۵ کارگاه (/۲۰) مبتلا به استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی بودند. کارگاه‌های مبتلا به لاکتوکوکوزیس با عامل لاکتوکوکوس گارویه در مناطق بازفت سندگان لردگان، ناغان، اردل، کوهرنگ و بروجن و کارگاه‌های مبتلا به استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی در مناطق سندگان، اردل و کوهرنگ واقع شده‌اند. در مورد کارگاه‌های استان کهگیلویه و بویراحمد تعداد ۱۶ کارگاه (/۶۴) مبتلا به لاکتوکوکوزیس و ۳ کارگاه (/۱۲) مبتلا به استرپتوکوکوزیس بودند. در این استان کارگاه‌های مبتلا به لاکتوکوکوزیس در مناطق چی تاب، امامزاده خاتون، یاسوج (ده شیخ، سه تنگان، گنجگان، کریک و مزدک) و سی سخت و کارگاه‌های مبتلا به استرپتوکوکوزیس در مناطق یاسوج (گنجگان، کریک و مزدک) واقع شده‌اند.

مورد مطالعه در استان چهارمحال بختیاری بیش از ۵۰٪ بوده است و در مورد ۸ عامل، این میزان بیش از ۹۰٪ بوده است (جدول شماره ۱). همچنین، فراوانی نسبی برای عوامل "استفاده از غذای خام"، "تراکم بالا" و "وجود فعالیت صنعتی در بالا دست" به ترتیب صفر، ۴/۵٪ و ۴/۵٪ بود. همچنین، در ۱۸/۸٪ کارگاه‌های مورد مطالعه در این استان عامل خطر "نبود اکسیژن کافی" دیده شد. در استان کهگیلویه و بویر احمد نیز، فراوانی نسبی ۱۷ عامل خطر بیش از ۵۰٪ بود، در حالی که این میزان برای عوامل خطر "استفاده از غذای خام و تر" و "وجود تراکم بالا" صفر و فراوانی نسبی عامل "وجود فعالیت صنعتی در بالا دست" ۲۴٪ بود. افزون بر آن، فراوانی نسبی حضور مربوط به ۱۰ عامل خطر در کارگاه‌های هر دو استان بیش از ۸۰٪ بوده است که از این میان می‌توان به عوامل خطر "انجام‌نشدن واکسیناسیون، رعایت‌نشدن نظافت و بهداشت فردی کارکنان، به کار نرفتن کارکنان ماهر، جمع‌آوری‌نشدن بهداشتی تلفات، کنترل‌نشدن تردد وسایل نقلیه، وجود جانوران خونگرم در کارگاه، نبود کنترل بهداشتی ورود و خروج تخم و بچه ماهی و کنترل‌نشدن ورود توریست به کارگاه" اشاره کرد.

۲- کشت باکتریایی

نتایج به دست آمده از کشت باکتریایی در استان چهارمحال و بختیاری نشان داد که از ۲۵ کارگاه مورد نمونه‌گیری در ۲۰ (فراوانی ۸۰٪) کارگاه سویه‌های کوکسی گرم مثبت، در یک (/۴) کارگاه سویه‌های کوکوباسیل گرم مثبت، در دو (/۸) کارگاه هر دو سویه‌های کوکسی گرم مثبت و باسیل گرم مثبت، در یک (/۴) کارگاه کوکوباسیل گرم منفی جداسازی شد و در یک (/۴) کارگاه نتیجه کشت باکتریایی منفی بود (جدول شماره ۲). این سویه‌های باکتریایی برای ۱۹ کارگاه فقط کاتالاز منفی، در سه (/۱۲) کارگاه فقط کاتالاز مثبت و برای دو (/۸) کارگاه باکتری‌های از نوع کاتالاز مثبت و کاتالاز منفی بودند. همچنین، از نظر خاصیت همولیز این سویه‌ها در شش (/۲۴) کارگاه فقط از نوع آلفا (α)، یک (/۴) کارگاه فقط از نوع بتا (β)، چهار (/۱۶) کارگاه فقط از نوع گاما (γ)، سه (/۱۲) کارگاه فقط آلفا و بتا، دو (/۸) کارگاه فقط گاما و آلفا، دو (/۸) کارگاه فقط بتا و گاما و در یک (/۴) کارگاه هر سه نوع آلفا، بتا و گاما دیده شد (جدول شماره ۲).

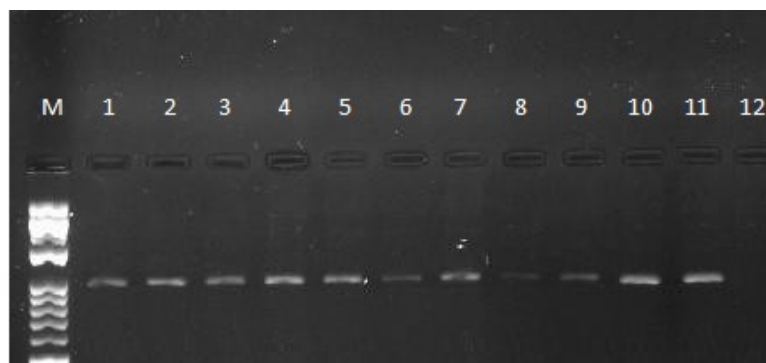
در استان کهگیلویه و بویراحمد از تعداد ۲۵ کارگاه مورد مطالعه در ۱۶ (/۶۴) کارگاه فقط سویه‌های کوکسی گرم مثبت، در دو

جدول شماره ۱- میزان فراوانی نسبی (درصد) حضور عوامل خطر ساز (مستعد کننده) در کل کارگاه‌های قزل آلای مورد مطالعه در استان چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد، ۱۳۸۹

شماره	عامل خطر ساز (عامل مستعد کننده)	فراوانی نسبی (درصد)		
		استان چهارمحال و بختیاری n=۲۵	استان کهگیلویه و بویر احمد n=۲۵	هر دو استان n=۵۰
۱	استفاده از رودخانه، به عنوان منبع آب	۵۹	۷۶	۶۸
۲	دمای بالای ۱۵°C	۵۹	۸۸	۷۳/۵
۳	نبود اکسیژن کافی (>۷ mg/l)	۱۸/۸	۵۶	۴۷
۴	وجود کارگاه ماهی در بالادست	۵۹	۶۸	۶۳/۵
۵	وجود روستا در بالادست	۶۸/۱۸	۸۰	۷۴
۶	وجود فعالیت کشاورزی در بالادست	۶۸/۱۸	۸۴	۷۶
۷	وجود فعالیت صنعتی در بالا دست	۴۵/۴	۲۴	۱۴/۳
۸	کنترل نشدن توریست و افراد در کارگاه و در بالادست	۹۵/۴۵	۹۲	۹۳/۷
۹	نبود قرنطینه لازم	۹۵/۴۵	۱۰۰	۹۷/۷
۱۰	کنترل نشدن بهداشتی ورود و خروج تخم چشم‌زده و بچه ماهی	۹۵/۴۵	۹۶	۹۵/۷
۱۱	وجود جانوران خونگرم، مانند سگ و گربه در کارگاه	۸۶/۳۶	۹۶	۹۱/۲
۱۲	نبود کنترل بهداشتی برای تردد وسایل نقلیه به کارگاه	۹۰/۹	۹۶	۹۳/۴
۱۳	جمع‌آوری نشدن بهداشتی تلفات و دفن آن‌ها	۹۰/۹	۸۴	۸۷/۴
۱۴	نبود واکسیناسیون	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۱۵	به کار نرفتن کارکنان ماهر و تحصیلکرده	۹۵/۴۵	۸۴	۸۹/۷
۱۶	رعایت نکردن نظافت و بهداشت فردی توسط کارکنان کارگاه	۹۵/۴۵	۹۲	۹۳/۷
۱۷	وجود تراکم بالا در کارگاه	۴۵/۴	۰	۲/۳
۱۸	مشاهده ماهیان با علائم بالینی، مانند کوری، سیاه شدن و کاناراکت	۸۶/۳۶	۸۰	۸۳/۳
۱۹	استفاده از غذاهای تر و خام و نگهداری غیر بهداشتی آن‌ها	۰	۰	۰
۲۰	وجود استخرهای لجن‌زار در کارگاه	۴۵/۴۵	۶۸	۵۶/۷

جدول شماره ۲- برخی مشخصات ایزوله‌های باکتریایی جداسازی شده از ماهیان مرضی و فراوانی نسبی (درصد) کارگاه‌های با موارد مثبت کشت باکتریایی، در استان‌های چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد

ردیف	مشخصه پرگنه باکتریایی جداسازی شده از ماهیان مرضی	فراوانی نسبی (درصد) کارگاه‌های با موارد مثبت کشت باکتریایی		
		استان چهارمحال و بختیاری n=۲۵	استان کهگیلویه و بویر احمد n=۲۵	هر دو استان n=۵۰
۱	کوکسی گرم مثبت	۸۰	۶۴	۷۲
۲	کوباسیل گرم مثبت	۴	۰	۲
۳	کوکسی گرم مثبت و کوکوباسیل گرم منفی	۰	۸	۴
۴	کوکوسی گرم مثبت و باسیل گرم مثبت	۸	۴	۶
۵	کوکوباسیل گرم منفی	۴	۰	۲
۶	کاتالاز منفی	۷۶	۸۴	۸۰
۷	کاتالاز مثبت	۱۲	۰	۶
۸	کاتالاز مثبت و کاتالاز منفی	۸	۱۶	۱۲
۹	همولیز از نوع آلفا	۴۸	۲۸	۳۸
۱۰	همولیز از نوع بتا	۴	۱۶	۱۰
۱۱	همولیز از نوع گاما	۱۶	۲۰	۱۸
۱۲	همولیز از نوع آلفا و بتا	۱۲	۱۲	۱۲
۱۳	همولیز از نوع گاما و آلفا	۸	۴	۶
۱۴	همولیز از نوع بتا و گاما	۸	۰	۴
۱۵	همولیز از نوع بتا و گاما	۴	۰	۲



شکل شماره ۱- ژل آگارز ۲٪ مربوط به PCR حاصل از DNA برخی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه به‌دست‌آمده از مزارع قزل‌آلای چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد، M = نشانگر، ۱-۱۰ = جدایه‌های مورد آزمایش، ۱۱ = کنترل مثبت (لاکتوکوکوس گارویه GQ8503761)، ۱۲ = کنترل منفی (استرپتوکوکوس اینیایی GQ8503771)



شکل شماره ۲- ژل آگارز ۲٪ مربوط به PCR به‌دست‌آمده از DNA برخی جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی به‌دست‌آمده از مزارع قزل‌آلای چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد، M = نشانگر، ۱-۸ = جدایه‌های مورد آزمایش، ۹ = کنترل مثبت (استرپتوکوکوس اینیایی GQ8503771)، ۱۰ = کنترل منفی (لاکتوکوکوس گارویه GQ8503761)

است. همچنین، ۷ کارگاه (۱۴٪) از مزارع دو استان در زمان نمونه‌گیری هیچ‌گونه بیماری باکتریایی نداشتند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزون بر بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس برخی کارگاه‌های قزل‌آلای این استان‌ها به برخی سپتی سمی‌های باکتریایی دیگر نیز مبتلایند. زیرا در ۶ کارگاه (۱۲٪) استان‌های پیش‌گفته نتایج نمونه‌گیری کشت باکتریایی به جداسازی ایزوله‌های باکتریایی از نوع گرم مثبت و گرم منفی منجر گردید که نیازمند مطالعه‌های بیشتر است.

از نظر استانی نیز، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که از ۲۵ کارگاه مورد مطالعه در هر استان، فراوانی نسبی ابتلا مزارع در چهارمحال بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد، به ترتیب ۷۲٪ (۱۸ کارگاه) از ۲۵ تا و ۷۶٪ (۱۹ کارگاه) از ۲۵ تا است. از نظر مکانی، کارگاه‌های مبتلا در مناطق مختلف، به ویژه در چهارمحال بختیاری، بیشتر در مناطقی قرار دارند که از تراکم بالای مزارع قزل‌آلای برخوردارند، مانند مناطق سنگدان و سبز کوه ناغان در چهارمحال و بختیاری و مناطق چی‌تاب و اطراف یاسوج در استان

بحث

از جمله موانع جدی توسعه پایدار آبی‌پروری در مناطق مختلف دنیا و از جمله ایران، می‌توان به بروز بیماری‌های عفونی و به لحاظ اقتصادی تأثیرگذار، مانند بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس اشاره کرد. انجام مطالعه‌های دقیق برای شناسایی کانون‌های مبتلا و تعیین میزان حضور عوامل خطر ساز و مستعدکننده در طراحی و اجرای راه‌های پیش‌گیری، کنترل و درمان بسیار کمک‌کننده است.

نتایج مطالعه‌های باکتریولوژیک و مولکولار این پژوهش نشان می‌دهد که از کل کارگاه‌های قزل‌آلای مورد مطالعه (۵۰ کارگاه) در هر دو استان چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد تعداد ۳۷ کارگاه آن‌ها با فراوانی نسبی ۷۴٪ به بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس با عوامل مولد استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه مبتلا بودند. از این میزان، فراوانی نسبی کارگاه‌های مبتلا در این استان‌ها، به ترتیب ۳۶٪ و ۳۸٪

کهگیلویه و بویراحمد.

بنابراین، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نخست، میزان ابتلا مزارع قزل‌آلای رنگین کمان این استان‌ها به بیماری‌های مشترک استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس قابل توجه است و دوم، این بیماری‌ها، به‌ویژه لاکتوکوکوزیس از پراکنش جغرافیایی قابل توجهی در هر دو استان برخوردارند. مقایسه اجمالی موارد ابتلا به لاکتوکوکوزیس با استرپتوکوکوزیس نشان می‌دهد که بیشتر مزارع مورد مطالعه در هر دو استان به لاکتوکوکوزیس با عامل لاکتوکوکوس گارویه مبتلایند، به طوری که موارد ابتلا به لاکتوکوکوزیس و استرپتوکوکوزیس در استان چهارمحال و بختیاری به ترتیب ۱۳ کارگاه (۵۶٪) و ۵ کارگاه (۲۰٪) و در استان کهگیلویه و بویراحمد، به ترتیب ۱۶ کارگاه (۶۴٪) و ۳ کارگاه (۱۲٪) بود. اگرچه علت یا علل فراوانی بیشتر لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای این دو استان ناشناخته است، اما یکی از علل آن می‌تواند امکان انتشار سریع‌تر لاکتوکوکوس گارویه، عامل لاکتوکوکوزیس، توسط جانوران خونگرم (سگ، گربه، گاو، انسان، پرند و موش) باشد که به‌عنوان منابع و مخازن اصلی این عامل باکتریایی عمل می‌کنند، درحالی‌که در مورد منابع و مخازن گونه اینیایی عامل استرپتوکوکوزیس به مطالعه‌های بیشتر نیاز است (۳). نتایج بررسی فراوانی نسبی حضور عوامل خطرناک مورد مطالعه در کارگاه‌های هر دو استان نشان می‌دهد که این میزان برای ۱۰ فاکتور بیش از ۸۰٪ است که از آن جمله می‌توان به "انجام‌نشدن واکسیناسیون، رعایت‌نکردن نظافت و بهداشت فردی کارکنان، به‌کار نرفتن کارکنان ماهر، جمع‌آوری غیر بهداشتی تلفات، کنترل‌نشدن تردد وسایل نقلیه، وجود جانوران خونگرم در کارگاه، نبود کنترل بهداشتی ورود و خروج تخم و بچه ماهی و کنترل‌نشدن حضور توریست در کارگاه" اشاره کرد. درحالی‌که فراوانی نسبی حضور عوامل "استفاده از غذای خام" و "تراکم بالای ماهیان در استخر پرورشی" استان کمتر از ۵٪ بود.

در استان چهارمحال و بختیاری نتایج فراوانی نسبی حضور عوامل خطرناک نشان داد که حضور تعداد ۱۶ عامل خطرناک مورد مطالعه بیش از ۵۰٪ و حضور ۸ عامل خطر بیش از ۹۰٪ بود، درحالی‌که فراوانی نسبی حضور برخی عوامل خطر، شامل "استفاده از غذای خام و تر، تراکم بالای ماهی در استخرهای پرورشی و فعالیت صنعتی در بالادست" کمتر از ۵٪ بود.

با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده در جدول ۱، نتایج فراوانی نسبی حضور فاکتورهای خطرناک در استان کهگیلویه و بویراحمد

مشابه استان چهارمحال و بختیاری است. یکی از علل اصلی و کلی تشابه فراوانی حضور عوامل خطرناک در مزارع این دو استان می‌تواند ناشی از شرایط جغرافیایی و اکولوژیکی مشابه در هر دو استان باشد که از جمله، می‌توان به منابع آبی مورد استفاده برای پرورش قزل‌آلا از نظر چشمه‌های آبی، دمای آب، میزان اکسیژن آب، شرایط اکولوژیک رودخانه‌ها، حضور ایلات در منطقه، دسترسی دام‌های عشایری آن‌ها به منابع آبی مورد استفاده برای پرورش قزل‌آلا، هم‌جوار بودن دو استان و تحرک عشایر (بیلاق و قشلاق) در فصول بهار و تابستان اشاره کرد. همه این عوامل در ایجاد و تثبیت حضور عوامل خطرناک به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم، نقش و اهمیت دارند. برای نمونه، حضور عشایر در این استان‌ها و دسترسی دام‌های آن‌ها به منابع آبی بالادست مزارع پرورش ماهی، به‌راحتی موجب انتشار لاکتوکوکوس گارویه از طریق ستون آب به مزارع ماهیان می‌شود.

همچنین، تمام کارگاه‌هایی که از آب رودخانه استفاده می‌کنند، در ایام تابستان با افزایش دما مواجه می‌شوند و به‌دنبال آن با مشکل کمبود اکسیژن مواجه‌اند. در مطالعه Francis-Floyd و Yanong در سال ۲۰۰۲ افزایش درجه حرارت آب، افزایش تراکم، دستکاری و جابه‌جایی بیش از حد، کمبود اکسیژن و افزایش مواد جامد معلق در آب، به‌عنوان بخشی از عوامل خطر بروز این بیماری‌ها مطرح شده‌اند. همچنین، نامبردگان افزایش رسوبات و لجن‌زارهای اطراف ماهیان، همراه با جمع‌آوری‌نشدن ماهیان بیمار و تلف‌شده را به‌عنوان مخازن حامل بیماری‌ها بیان کرده‌اند. در مطالعه حاضر، افزون بر مشاهده برخی از این عوامل، عوامل دیگر، مانند فعالیت‌های کشاورزی مزارع بالادست، کنترل‌نشدن تردد افراد و توریست به مزارع، وجود جانوران خونگرم به‌عنوان مخازن این بیماری‌ها، نبود قرنطینه لازم و کنترل‌نشدن ورود وسایل نقلیه در مزارع دیده شد. افزون بر این، برخی از این مزارع به علت بارش‌های پاییزه، زمستانه و بهاره دچار مشکل گل‌آلودگی می‌شوند که خود می‌تواند عامل استرس‌زا و تشدیدکننده بیماری‌های پیش‌گفته باشد. کارگاه‌هایی که از آب چشمه استفاده می‌کنند، معمولاً از آب با کیفیت مناسب برخوردارند، زیرا دمای آب این نوع کارگاه‌ها نسبتاً پایین ۱۰-۱۴°C است و از سوی دیگر نیز، با تدابیر هوادهی توسط مزرعه‌داران مشکل گازهای مضر و تأمین اکسیژن آنها برطرف می‌شود. بنابراین، در صورت دسترسی‌نیافتن جانوران خونگرم (مخازن باکتری‌ها) به آب سرچشمه، این کارگاه‌ها کمتر دچار این بیماری‌ها می‌شوند.

و بویر احمد (۷۶٪) است، اما تمام کارگاه‌های مورد مطالعه استان چهارمحال و بختیاری به استثنای یک مورد به سپتی سمی‌های باکتریایی از نوع کوکسی/کوکو باسیل گرم مثبت یا منفی مبتلا بودند. یکی از دلایل عمده این تفاوت می‌تواند ناشی از استفاده بیشتر از منابع آب چشمه توسط مزرعه‌داران مورد مطالعه در استان چهارمحال و بختیاری باشد، به‌گونه‌ای که در بیشتر موارد در بالا دست این گونه منابع آبی فعالیت‌های کشاورزی، روستاها، مناطق گردشگری و جانوران خون‌گرم وجود دارد که همگی از عوامل مستعدکننده و انتشاردهنده عامل بیماری‌اند، درحالی‌که در استان کهگیلویه و بویر احمد، آن دسته از کارگاه‌هایی که فاقد هر گونه سپتی سمی باکتریایی تشخیص داده شدند، به‌طور عمده از آب چاه یا چشمه‌ای استفاده می‌کنند که غیر قابل دسترس برای دیگر مصارف کشاورزی و گردشگری است. همچنین، نکته قابل توجه این است که در مزارع هر دو استان بیشترین عامل خطر انجام‌نشدن واکسیناسیون است. بنابراین از آنجا که امروزه واکسیناسیون مناسب‌ترین و کم هزینه‌ترین راه پیش‌گیری از بروز این بیماری‌ها است، در حال حاضر ع اجرانشدن برنامه واکسیناسیون، موجب خسارت‌های قابل توجه به کارگاه‌های این دو استان می‌شود.

نتیجه‌گیری

جمع‌بندی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در این دو استان در حال توسعه است و عوامل خطر ساز در بروز آن‌ها قابل توجه است. ضعف مدیریت بهداشتی (بی‌توجهی به حذف عوامل خطر ساز مورد اشاره در این مطالعه)، به‌ویژه انجام‌نشدن واکسیناسیون به‌هنگام، موجب توسعه این بیماری‌ها شده‌است. افزون بر آن، با توجه به شناسایی دیگر سپتی سمی‌های باکتریایی در برخی از این کارگاه‌ها، لزوم مطالعه‌های بعدی برای شناسایی دقیق این بیماری‌ها، ارتقای مدیریت بهداشتی برای حذف عوامل خطر ساز مورد اشاره و انجام واکسیناسیون برای پیشگیری از خسارت‌های وارد امری اجتناب‌ناپذیر است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت سازمان شیلات ایران (طرح کاربردی) و قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران انجام شده‌است.

در استان چهارمحال و بختیاری کارگاه‌های واقع‌شده در فازهای ۳ و ۲ سندگان، کارگاه‌های پایین‌دست در منطقه اردل (مجتمع قزل‌آلای کاج، اسلامی در عالی کوه، کارگاه غریب شاهی)، کوه‌رنگ (کارگاه اسلامی در باغ الکی)، کارگاه یوسفی در بازفت و نیز کارگاه‌های پایین‌دست رودخانه سبز کوه از آب رودخانه استفاده می‌کنند که به‌علت گل‌آلودگی ناشی از بارش‌های پاییزه، زمستانه و بهاره، افزایش دما در ایام بهار و تابستان و آلودگی رودخانه‌ها به فاضلاب‌های انسانی و دامی با مشکلات بیشتر، از نظر بروز تلفات ناشی از این بیماری‌ها، مواجه‌اند، به‌طوری‌که در ایام بازرسی کارگاهی و نمونه‌گیری‌ها، موارد مرضی و تلفات در برخی از این کارگاه‌ها، مانند کارگاه بازفت، حدود ۷۰٪ بود. در بقیه مزارع مورد مطالعه، به‌علت استفاده از آب چشمه و نزدیکی کارگاه‌ها به سرچشمه‌ها بروز بیماری کمتر بود. از جمله علل اصلی بروز بیماری در کارگاه‌هایی که از آب چشمه استفاده می‌کنند، دسترسی‌های محلی روستاییان، عشایر و دام‌های آن‌ها و نیز توریست (گردشگران) به سرچشمه‌های آب است و از آنجا که این افراد ر مسایل زیستی و بهداشتی محیط را رعایت نمی‌کنند، به‌عنوان ناقلان (انتقال‌دهندگان منابع باکتری‌های عامل این بیماری‌ها) عمل می‌کنند و از این طریق موجب آلودگی آب سرچشمه‌ها و در نتیجه، انتقال عامل بیماری‌ها به کارگاه‌ها می‌شوند. البته رعایت‌نکردن بهداشت فردی کارگران کارگاه‌ها و نگهداری جانوران خونگرم، مانند سگ، گربه، مرغ و اردک در محل کارگاه‌ها نیز، از منابع انتشار این بیماری‌ها محسوب می‌شوند. زیرا جانوران خون‌گرم از جمله مخازن باکتری‌های عامل این بیماری‌ها پند (۳).

در استان کهگیلویه و بویر احمد بروز بیماری در کارگاه‌های پایین‌دست منطقه چی تاب، مانند کارگاه چرخ انداز، کارگاه ظفریان و کارگاه اسلامی، به‌علت میزان آلودگی بالای آب و افزایش درجه حرارت تا 23°C در ایام بهار و تابستان به‌طور قابل توجه مشهود است. اما در کارگاه‌هایی که از آب چشمه استفاده می‌کنند، مانند کارگاه قله دنا (محمدی)، به‌علت آلوده‌نبودن بالادست چشمه و دمای پایین آب (10-13°C) از وجود این بیماری‌ها پاکند. همچنین، کارگاه‌های نزدیک به شهر یاسوج به‌علت استفاده از آب رودخانه به‌شدت دچار مشکل این بیماری‌ها بودند، زیرا آلودگی‌های انتقالی ناشی از فاضلاب شهر از طریق آب رودخانه به ماهیان این کارگاه‌ها راه می‌یابد که این امر، ضرورت انجام اقدامات به‌هنگام برای حذف و یا اصلاح این گونه مزارع را نمایان می‌سازد.

اگرچه درصد مزارع استان چهارمحال و بختیاری که از آب رودخانه استفاده می‌کنند (۵۹٪)، به‌مراتب کمتر از استان کهگیلویه

منابع

1. Soltani M, Mousavi HA, Mirzargar S. Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran", 1th international congress on aquatic animal, Islamic Republic of Iran, Tehran; 2009; book of abstracts, 27-28.
2. Muzquiz JL, Royo FM, Ortega C, De Blas I, Ruiz I, Alonso JL. Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: dependence on age of diseased fish. Bull. Eur 1999.
3. Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuola I, Blas I, Olivia-Gironés O, Múzquiz JL. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Journal of Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2006, 29, 177-198.
4. Agnew W, Barnes AC. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Journal of Veterinary Microbiology 2007; 122: 1-15.
5. Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish Springer Praxis Publication, Chichester 2007, 239.
6. Yanong RPE, Francis-Floyd R. Streptococcal Infections of Fish. Circular FA-57. University of Florida IFAS Cooperative Extension Service 2002; 5.

Original Article

Molecular Study of *Streptococcus/Lactococcus* Distribution in Farmed Rainbow Trout in Charmahal-va-Bakhteyari and Kohgiluyeh-va-Boyerahmad Provinces, Iran

Soltani M¹, Pirali Kheirabadi E², Taherimirkahead A³, Shafie SH³, Mohamadian S³, Roholahi SH³

1-Prpfessor Department of aquatic animal health, faculty of veterinary medicine, university of Tehran, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of aquatic animal health, faculty of veterinary medicine, university of Tehran, Tehran, Iran

3-PhD Student, Associate Professor, Department of aquatic animal health, faculty of veterinary medicine, university of Tehran, Tehran, Iran

Corresponding author: Soltani M., msoltani@ut.ac.ir

Background & Objectives: *Sterpococcus/lactococcus* is an economically important zoonotic disease in aquaculture industry particularly in farmed rainbow trout. The annual loss due to the disease is tens millions US dollars. This descriptive study was aimed to identify the regional distribution of these economically important bacterial diseases in 50 farmed trout in Charmahal-va-Bakhteyari (25 fish farms) and Kohgiluyeh-va-Boyerahmad (25 fish farms) provinces plus detection of the relative prevalence of the presence of 20 risk factors.

Methods: Each trout farm was clinically inspected to identify the risk factors, followed by sampling of the clinically affected fish for bacteriological and molecular studies.

Results: The results showed that form 25 fish farms examined in Charmah-va-Bakhteyari, 56.% (13 fish farms) were affected with *Lactococcus garvieae* and 20%(5 fish farms) were affected with *Streptococcus iniae*, while these were 64% (16 fish farms) and 12% (3fish farms) in Kohgiluyeh-va-Boyerahmad, respectively. The relative prevalences of the presence of 10 and 16 risk factors were above 80% and 50% in the trout farms of both provinces.

Conclusion: These results clearly demonstrated that occurrence of *streptococcus* and *lactococcus* in farmed trout has a wide regional distribution in trout farms of these provinces and the presence of risk factors are remarkable in the examined fish farms.

Keywords: *Streptococcus, Lactococcus*, Risk factors, Charmahal-va-Bakhteyari, Kohgiluyeh-va-Boyerahmad