مطالعه اپیدمیولوژیک بیماری دهان قرمز روده ای (Enteric Redmouth Disease) در مزارع قزل آلای رنگین کمان پرورشی در استان آذربایجان غربی و تعیین ارتباط عوامل محیطی با بروز بیماری

سید جلیل ذریه زهرا[۱]، شاپور کاکولکی[۱]، میلاد عادل[۱*]، مهرداد امیری کار[۲]، نیما بهبودی[۲]، عباسعلی مطلبی[۱]، داریوش آزادیخواه[۳]، علی نکوئی فرد[٤]، حسین یاوری[٥]

* miladadel85@yahoo.com

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، تهران صندوق پستی: ۱۳۱۸٦-۱۱٦

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، صندوق پستی: ۹٦۹

۳-دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، صندوق پستی: ۹٦۹

٤- مرکزتحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش وترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

۹- سازمان دامپزشکی کشور، اداره کل دامپزشکی استان خراسان شمالی، بجنورد صندوق پستی: ٤۷۲

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹٥

چکیده

باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) از مهمترین عوامل عفونی ایجاد کننده خسارات اقتصادی در مزارع پرورشی کشور می‌باشد. به منظور جداسازی و شناسایی باکتری یرسینیا راکری، عامل بیماری دهان قرمز روده ای، طی فروردین ماه ۱۳۹۱ تا مرداد ماه ۱۳۹۲، نمونه گیری از ۲۸۵ ماهی قزل آلای رنگین کمان با اوزان ۱ تا ۲۰۰ گرم، از ۱۹ مزرعه پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در سطح استان آذربایجان غربی به عمل آمد. نمونه-گیری از بافت‌های کلیه، یک سوم انتهایی روده و قسمت دهانی ماهی صورت گرفت و بر روی محیط کشت اختصاصی یرسینیا (Yersinia selective agar) کشت داده شد . پلیت ها در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ الی۷۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. با استفاده از رنگ آمیزی گرم، آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (PCR) مشخص گردید از ۲۸۵ نمونه مورد مطالعه، ۱۱۰ نمونه آلودگی به یرسینیا راکری، مربوط به بافت روده (با میانگین ۳۸/۵۹ درصدآلودگی)، ۷۶ نمونه مربوط به قسمت دهانی (با میانگین ۲۵/۶۶ درصد آلودگی) و ۲۵ نمونه در قسمت کلیه (با میانگین ۸/۷۷ درصد آلودگی) ماهیان بود. ضمن آنکه از ۱۹ مزرعه مورد مطالعه در سطح استان از ۷ مزرعه باکتری یرسینیا راکری جدا گردید و آلودگی معادل ۳۶/۸۴ درصد محاسبه گردید که نشان از بالا بودن میزان درصد آلودگی در مقایسه با سایر استان ها بوده که می‌تواند نشانگر وضعیت وخیم بیماری و تحت حاد بودن بیماری در سطح مزارع استان باشد. در خصوص اوزان مختلف، اندازه تا انگشت قدی با وزن ۲۰-۱ گرمی بیشترین آلودگی (۵۲/۶۳٪) و اندازه بازاری با وزن ۲۰۰ گرم به بالا (۲۴/۵۶ ٪) کمترین آلودگی را به باکتری یرسینیا راکری داشته که نشان از حساسیت بالای ماهیان در اوزان انگشت قدی نسبت به ماهیان با اوزان بالاتر داشت. همچنین مشخص شد که همبستگی معنی دار مستقیمی بین مقدار نیتریت و بروز بیماری وجود دارد (r=870 و p=0.03). چنین بنظر می‌رسد که مقادیر بالای نیتریت (از ۱/ ۰ ppm به بالا) به عنوان یک فاکتور مستعد کننده قوی در بروز بیماری فوق نقش کلیدی دارد. بنابراین انجام اقدامات مدیریتی و بهداشتی مناسب تا حد زیادی می‌تواند در کنترل بیماری در مزارع استان موثر واقع شود.

کلمات کلیدی: آذربایجان غربی، بیماری دهان قرمز روده ای، یرسینیا راکری، قزل آلای رنگین کمان، عوامل مستعد کننده

* نویسنده مسئول

مقدمه

بیماری دهان قرمز روده‌ای (Enteric red mouth) یا یرسینیوزیس (Yersiniosis) یکی از بیماری‌های باکتریایی مهم در صنعت پرورش ماهیان سردابی می باشد، که در چند سال اخیر باعث بروز تلفات در مزارع سردابی کشور شده است (Akhlaghi and Sharif Yazdi, 2008). عامل بیماری، باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) می باشد که دارای ۶ سروتیپ است، سروتیپ ۱ و ۲ آن قدرت بیماریزایی بیشتری دارند. این باکتری جزو خانواده انتروباکتریاسه بوده که به شکل کوکوباسیل های گرم منفی، میله ای، فاقد اسپور، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت می‌باشد و به عنوان یک عامل بیماریزا برای بسیاری از گونه های مختلف ماهیان از جمله خانواده آزادماهیان محسوب می گردد. حساسترین گونه به این بیماری قزل آلای رنگین کمان به ویژه در اندازه انگشت قد می‌باشد (Tobback *et al.*, 2007). ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از خانواده آزاد ماهیان، مهمترین گونه پرورشی کشور محسوب می‌شود که میزان تولید این ماهی در سال ۱۳۹۲، ۱۱۲۳۹۶ تن در کشور بوده است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۲). مهمترین علایم بالینی مشاهده شده در این بیماری شامل: خونریزی در داخل دهان، فکین، قاعده باله-ها و اندام‌های داخلی، بیرون زدگی چشم‌ها همراه با لکه های خونی در آن و نکروز در اندام‌های خونساز می‌باشد (Shaowu *et al.*, 2013; Altinok *et al.*, 2001).

بر اساس گزارش سازمان دامپزشکی کشور این بیماری از نظر میزان خسارات اقتصادی و گسترش بیماری بعد از استرپتوکوکوزیس به عنوان دومین بیماری مهم مزارع سردآبی کشور مطرح می باشد (عبدی، ۱۳۹۱). با عنایت به گزارش جداسازی و شناسائی عامل این بیماری از بسیاری از استان های کشور همچون استان فارس (Akhlaghi and Sharif Yazdi, 2008)، چهارمحال و بختیاری (Fadaeifard *et al.*, 2014)، مازندران (Adel *et al.*, 2015)، تهران (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۳)، همدان (Zorriehzahra *et al.*, 2012)، کهکیلویه و بویر احمد (گنجور و همکاران، ۱۳۹۴) و عدم گزارش رسمی این بیماری از مزارع سردابی استان آذربایجان غربی، این تحقیق برای اولین بار در کشور صورت پذیرفت. شایان ذکر است بر اساس آخرین یافته‌های علمی این بیماری جزو بیماری های قابل انتقال میان انسان و حیوان طبقه بندی شده است و جداسازی و شناسائی آن از نظر بهداشت عمومی نیز حائز اهمیت می باشد (kumar *et al.*, 2015). بیماری مزبور در انسان بصورت عفونت های گوارشی- روده ای بروز می نماید و در صورت وجود زخم در دست و آلودگی زخم با آب مزرعه یا ماهیان مبتلا، منجر به بروز عفونت‌های گوارشی با تب های شدید در انسان می‌گردد. این بیماری جزء عفونت های ثانویه در انسان مطرح می‌باشد و بویژه در افرادی که از ضعف سیستم ایمنی برخوردارند، بروز می‌نماید (kumar *et al.*, 2015).

هدف از انجام این تحقیق این بوده است تا نسبت به وضعیت بیماری باکتریائی دهان قرمز روده ای در مزارع استان آذربایجان غربی و ارتباط بروز این بیماری عفونی با عوامل محیطی موثر در مزارع مورد مطالعه پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی و شناسایی باکتری یرسینیا راکری، طی فروردین ماه ۱۳۹۱ تا مرداد ماه ۱۳۹۲، نمونه گیری از ۲۸۵ ماهی قزل آلای رنگین کمان با اوزان ۱ تا ۲۰۰ گرم و دارای علائم مشکوک به یرسینیوزیس، از ۱۹ مزرعه پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در سطح استان آذربایجان غربی (مزارع شهرستان های ارومیه ، اشنویه ، نقده ، پیرانشهر، سردشت، میاندوآب و شاهیندژ) صورت گرفت. نمونه‌ها در مجاورت یخ و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه باکتری شناسی مرکز تحقیقات ملی آرتمیای کشور منتقل شدند. نمونه‌گیری از قدام کلیه، ثلث روده، محوطه دهانی و آب صورت گرفت و بر روی محیط اختصاصی یرسینیا (Yersinia selective agar) کشت داده شد و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری و پرگنه‌ها جمع آوری شدند. در این مطالعه بعد از رنگ آمیزی گرم و انجام آزمایشات بیوشیمیایی توصیه شده توسط Austin و Austin (۲۰۰۷) باسیل‌های گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت جهت استخراج DNA و تشخیص قطعی با واکنش

زنجیره ای پلی مراز (Polymerase chain reaction) مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA جدایه‌ها، بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA (MBST, Iran) صورت گرفت. تشخیص قطعی جدایه‌ها با طراحی و تولید آغازگرهای اختصاصی F (5′- GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG –3′)و R (5′- GAAGGCACCAAGGCATCTCTG –3′) بر پایه ژن 16S rRNA صورت گرفت و اندازه محصول مورد انتظار ۵۹۰ جفت باز (bp) بود (LeJeune and Rurangirwa, 2000). برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر (متابیون، آلمان) در ۳۵ سیکل حرارتی شامل: مرحله واسرشت سازی اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به DNA الگو در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله گسترش نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه بود. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۳ U DNA Taq Polymerase، ۶۰ پیکو مول از هر یک از پرایمرها، ۰/۶ میکرولیتر از مخلوط $dNTP_s$ (۱۰mM)، ۲۰۰ نانو گرم از نمونه‌های DNA استخراج شده بود و حجم نهایی محصول PCR توسط آب مقطر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. در پایان محصول PCR با استفاده از از ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و باند حاصله توسط دستگاه UVI tec (مدل BTS-20.MS) عکس برداری شد و نتیجه آزمایش قرائت گردید. در این مطالعه از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و از نمونه توالی شده یرسینیا راکری با شماره دستیابی KC291153 جهت کنترل مثبت استفاده شد.

به منظور بررسی شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب مزارع، در ابتدای مزرعه شاخص‌های درجه حرارت و میزان اکسیژن محلول (DO) آب ورودی مزارع با استفاده از دستگاه متحرک مولتی مدل (YK-2001DO) اندازه گیری شد. همچنین نمونه برداری از آب ورودی هر مزرعه به صورت ماهانه و با استفاده از ظروف پلاستیکی استریل درب دار با حجم ۱۰۰ لیتر صورت گرفت و نمونه‌ها به منظور تعیین وضعیت آلودگی آب مزارع به باکتری یرسینیا راکری و تعیین میزان آلودگی به آزمایشگاه‌های باکتری شناسی و آب مرکز تحقیقات ملی آرتمیای کشور انتقال یافتند. در آزمایشگاه آب شاخص‌های نیتریت به روش برن اشنایدر و رابینسون، میزان آمونیوم با استفاده از روش فنات، میزان نیترات به روش ستون کاهشی کادمیوم و سختی کل به روش کمپلکسومتری با استفاده از EDTA اندازه گیری شد (APHA, 2005). بررسی و محاسبه میزان آلودگی ماهی ها بر طبق فرمول: (تعداد کل ماهیان/تعداد ماهیان مبتلا) صورت گرفت.

به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۸، اختلاف میزان آلودگی در بافت‌های مختلف با استفاده از آزمون تی مستقل تعیین گردید. در این مطالعه آماره های توصیفی از جمله مقادیر کمینه و بیشینه نیز تعیین گردیدند.

نتایج

نتایج رنگ آمیزی گرم، آزمایش‌های بیوشیمیایی و PCR بر روی نمونه‌های باکتریایی جدا شده از بافت‌های ماهیان مورد مطالعه در جدول ۱ و شکل شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج مطالعات تایید کننده بیماریزائی باکتری یرسینیا راکری در ماهیان قزل آلای رنگین کمان در مزارع منتخب مورد بررسی است.

جدول ۱: نتایج رنگ آمیزی و آزمایش‌های بیوشیمیایی در باکتری یرسینیا راکری جداسازی شده از ماهیان بیمار

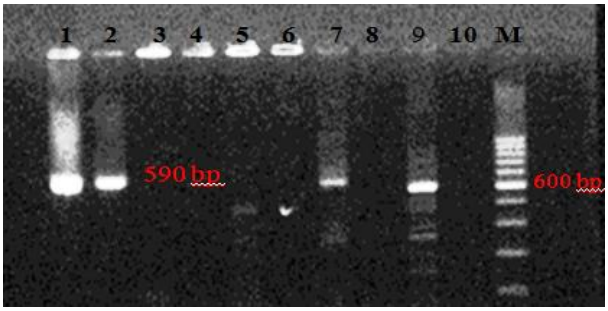
Table 1: Results of staining and biochemical tests of *Yersinia ruckeri* isolated from infected fish

آزمایش	مشخصات
رنگ کلنی	سفید رنگ
رنگ آمیزی گرم	گرم منفی
حرکت (دمای ۳۰-۱۲ درجه سانتیگراد)	+
حرکت (دمای ۳۷ درجه اسنتیگراد)	-
واکنش OF	F
کاتالاز	+
اکسیداز	-
تولید H_2S	-
تولید اندول	-
متیل رد	+

آزمایش	مشخصات
واکنش واگوس پر اسکور	+
احیای نیترات	+
رشد در آگارسیمون سیترات	+
رشد در مک کانگی آگار	+
اوره	-

+ : واکنش مثبت - : واکنش منفی

F: تخمیر کننده



شکل ۱: PCR حاصل از DNA برخی جدایه‌های یرسینیا راکری مورد استفاده در این مطالعه (M: مارکر ۱۰۰ bp ، جدایه‌های ۱-۸: جدایه های مورد آزمایش، جدایه ۹: کنترل مثبت، جدایه ۱۰: کنترل منفی).

Figure 1: PCR from the DNA of *Yersinia ruckeri* used in this study (M: Marker 100 bp, 1-8: isolates tested , 9: positive control, 10: negative control).

میزان آلودگی بافت‌های مختلف کلیه، یک سوم انتهایی روده و قسمت دهانی ماهیان قزل آلای رنگین کمان مورد مطالعه در مزارع منتخب به باکتری یرسینیا راکری در جدول‌های ۲ تا ۴ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، از ۲۸۵ نمونه مورد مطالعه، ۱۱۰ نمونه آلودگی به یرسینیا راکری مربوط به بافت روده (با میانگین ۳۸/۵۹ درصدآلودگی)، ۷۶ نمونه مربوط به قسمت دهانی (با میانگین ۲۵/۶۶ درصد آلودگی) و ۲۵ نمونه مربوط به قسمت کلیه (با میانگین ۸/۷۷ درصد آلودگی) ماهیان بود. ضمن آنکه از ۱۹ مزرعه مورد مطالعه در سطح استان از ۷ مزرعه باکتری یرسینیا راکری جدا گردید که آلودگی معادل ۳۶/۸۴ درصد محاسبه شد. تعداد و ضریب میانگین نمونه های آلوده به یرسینیا راکری در اوزان مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان به باکتری یرسینیا راکری در جدول ۵ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، اندازه زیر گرم تا انگشت قدی با دامنه وزنی ۲۰-۱ گرمی بیشترین درصد آلودگی (۵۲/۶۳٪) و اندازه بازاری با وزن ۲۰۰ گرم به بالا (۲۴/۵۶ ٪) کمترین آلودگی را به باکتری یرسینیا راکری نشان داد.

جدول ۲: میزان آلودگی به باکتری یرسینای راکری در نمونه های جدا شده از ناحیه دهان (تعداد=۱۵)

Table 2: The prevalence of isolates of *Yersinia ruckeri* bacteria from the mouth area (n = 15)

شماره مزرعه	موقیعت مکانی	تعداد نمونه مثبت	ضریب آلودگی
۱	ارومیه	۳	۰/۲۰
۲	ارومیه	۴	۰/۲۶
۳	ارومیه	۵	۰/۳۳
۴	ارومیه	۳	۰/۲۰
۵	ارومیه	۱	۰/۰۶
۶	ارومیه	۷	۰/۴۶
۷	ارومیه	۶	۰/۴۰
۸	مهاباد	۲	۰/۱۳
۹	پیرانشهر	۷	۰/۴۶
۱۰	پیرانشهر	۲	۰/۱۳
۱۱	پیرانشهر	۵	۰/۳۳
۱۲	اشنویه	۶	۰/۴۰
۱۳	اشنویه	۷	۰/۴۶
۱۴	شاهیندژ	۳	۰/۲۰

شماره مزرعه	موقیعت مکانی	تعداد نمونه مثبت	ضریب آلودگی
۱۵	نقده	۱	۰/۰۶
۱۶	میاندوآب	۲	۰/۱۳
۱۷	سردشت	۶	۰/۴۰
۱۸	سردشت	۲	۰/۱۳
۱۹	سردشت	۴	۰/۲۶
تعداد کل نمونه های مثبت		**۷۶**	**۰/۲۶**

جدول ۳: میزان آلودگی به باکتری یرسینای راکری درنمونه های بررسی شده در قسمت روده (تعداد=۱۵)

Table 3: The prevalence of isolates of Yersinia ruckeri bacteria from the intestine (n = 15)

شماره مزرعه	موقیعت مکانی	تعداد نمونه مثبت	ضریب آلودگی
۱	ارومیه	۶	۰/۴۰
۲	ارومیه	۷	۰/۴۶
۳	ارومیه	۶	۰/۴۰
۴	ارومیه	۴	۰/۲۶
۵	ارومیه	۳	۰/۲۰
۶	ارومیه	۱۰	۰/۶۶
۷	ارومیه	۷	۰/۴۶
۸	مهاباد	۴	۰/۲۶
۹	پیرانشهر	۸	۰/۵۳
۱۰	پیرانشهر	۴	۰/۲۶
۱۱	پیرانشهر	۷	۰/۴۶
۱۲	اشنویه	۸	۰/۵۳
۱۳	اشنویه	۹	۰,۶۹
۱۴	شاهیندژ	۴	۰/۲۶
۱۵	نقده	۳	۰/۲۰
۱۶	میاندوآب	۴	۰/۲۶
۱۷	سردشت	۵	۰/۳۳
۱۸	سردشت	۴	۰/۲۶
۱۹	سردشت	۷	۰/۴۶
تعداد کل نمونه های مثبت		**۱۱۰**	**۰/۳۸**

جدول ۴: میزان آلودگی به باکتری یرسینای راکری درنمونه های بررسی شده در قسمت کلیه (تعداد=۱۵)

Table 4: The prevalence of isolates of *Yersinia ruckeri* bacteria from the kidney (n = 15)

شماره مزرعه	موقیعت مکانی	تعداد نمونه مثبت	ضریب آلودگی
۱	ارومیه	۱	۰/۶۰
۲	ارومیه	۲	۰/۱۳
۳	ارومیه	۲	۰/۱۳
۴	ارومیه	۰	۰/۰
۵	ارومیه	۰	۰/۰
۶	ارومیه	۴	۰/۲۶

شماره مزرعه	موقیعت مکانی	تعداد نمونه مثبت	ضریب آلودگی
۷	ارومیه	۳	۰/۲۰
۸	مهاباد	۰	۰/۰
۹	پیرانشهر	۳	۰/۲۰
۱۰	پیرانشهر	۱	۰/۰۶
۱۱	پیرانشهر	۲	۰/۱۳
۱۲	اشنویه	۱	۰/۰۶
۱۳	اشنویه	۳	۰/۲۰
۱۴	شاهیندژ	۰	۰/۰
۱۵	نقده	۰	۰/۰
۱۶	میاندوآب	۰	۰/۰
۱۷	سردشت	۲	۰/۱۳
۱۸	سردشت	۰	۰/۰
۱۹	سردشت	۱	۰/۰۶
تعداد کل نمونه های مثبت		**۲۵**	**۰/۰۸**

جدول ۵: تعداد و ضریب میانگین نمونه های آلوده به یرسینیا راکری در اوزان مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان

Table 5: Number and average coefficient of samples contaminated with *Yersinia ruckeri* in different weights of rainbow trout

اندازه ماهی	وزن ماهی (گرم)	تعداد نمونه های بررسی شده	تعداد نمونه های آلوده	درصد آلودگی
تا انگشت قدی	۱-۲۰	۵۷	۳۰	۰/۵۲
انگشت قدی	۲۰-۶۰	۵۷	۲۸	۰/۴۹
پیش رشد	۶۰-۱۰۰	۵۷	۲۲	۰/۳۸
رشد	۱۰۰-۲۰۰	۵۷	۱۷	۰/۲۹
بازاری	۲۰۰ به بالا	۵۷	۱۴	۰/۲۴

میانگین مقادیر حاصل از بررسی شاخص‌های مورد مطالعه آب مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان آذربایجان غربی در مدت بررسی در جدول ۶ آمده است. کمینه و بیشینه درجه حرارت آب در مزارع مورد مطالعه به ترتیب ۱۱/۵ و ۱۴ درجه سانتیگراد برای دمای صبح و ۱۲ تا ۱۶/۵ درجه سانتیگراد برای دمای عصر بوده است (جدول ۶). یکی از مهمترین پارامترهای هیدروشیمی آب، اکسیژن محلول بوده که در مدت بررسی مقدار کمینه و بیشینه آن ۵/۷ و ۸/۰ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید.

در بررسی انجام شده مقدار آمونیاک کل مزارع اندازه گیری شده که بیشینه و کمینه آن به ترتیب ۰/۳۷و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین، بیشینه و کمینه نیترات این مزارع به ترتیب ۰/۹ و ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر و برای نیتریت ۰/۱۷ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد. در بررسی انجام شده میزان سختی کل در مزارع مختلف بین۱۹۰و۴۵۰ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد (جدول ۶).

جدول ۶: میانگین پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب مزارع پرورشی منتخب استان آذربایجان غربی

Table 6: Average physico-chemical parameters of selected fish farms of West Azerbaijan province

دما صبح (درجه سانتیگراد)	دما عصر (درجه سانتیگراد)	اکسیژن صبح (میلی گرم/لیتر)	اکسیژن عصر (میلی گرم/لیتر)	سختی کل (میلی گرم/لیتر)	آمونیاک (میلی گرم/لیتر)	نیترات (میلی گرم/لیتر)	نیتریت (میلی گرم/لیتر)
۱۲/۸۳±۰/۸	۱۳/۴۴±۱/۲	۷/۱۱±۰/۴۲	۷/۰۳±۰/۲۸	۲۶۲/۴±۸۲/۶	۰/۱۱±۰/۰۸	۰/۲۱±۰/۱۸	۰/۰۶±۰/۰۴

همبستگی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب مزارع پرورش ماهی استان آذربایجان غربی با آلودگی مزارع به یرسینیوزیس در جدول شماره ۷ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، ارتباط بین افزایش غلظت نیتریت و آلودگی آب مزارع پرورشی به باکتری یرسینیا راکری با احتمال ۹۹ درصد، شدیدا همبستگی (r= 0.935) دارد و کمترین میزان همبستگی در بین فاکتورهای شیمیائی آب با آلودگی آب مزارع به باکتری یرسینیا راکری متعلق به دمای آب است (r= 0.341). بیشترین همبستگی بین فاکتورهای شیمیائی آب (r= 0.980)، بین غلظت آمونیاک با نیترات محلول آب مشاهده گردید. همبستگی بین دمای آب در بعدازظهر (r= 0.011) و صبح (r= 0.020) با میزان اکسیژن محلول آب معنی دار نیست. در این بررسی ارتباط بین مقادیر نیتریت، نیترات و آمونیاک با اکسیژن محلول آب همبسته و منفی بود (به ترتیب ضریب همبستگی عبارت است از ۰/۷۳۲- ، ۰/۷۶۵- و ۰/۸۰۰-)، بطوری‌که با کاهش اکسیژن محلول آب بر میزان آمونیاک، نیتریت و نیترات افزوده می شود. در این بررسی، ضریب همبستگی بین اکسیژن محلول آب و آلودگی آب به یرسینیا راکری ارتباطی نسبتا قوی و منفی مشاهده گردید (r= -0.732).

جدول ۷: همبستگی پارامترهای فیزیکی وشیمیایی آب مزارع پرورش ماهی استان آذربایجان غربی با آلودگی مزارع به یرسینیوزیس

Table 7: Correlation between physico-chemical parameters of water in Western Azerbaijan province fish farms with pollution to yersiniosis

		میزان آلودگی	NO_2	NO_3	NH_3	O_2صبح	O_2 عصر	دمای صبح	دمای عصر
آلودگی یرسینیا	ضریب همبستگی	۱	۰/۹۳۵**	۰/۸۶۱**	۰/۸۷۹**	-۰/۷۳۲**	-۰/۷۳۷**	۰/۳۴۱	۰/۳۴۲
NO_2	ضریب همبستگی	۰/۹۳۵**	۱	۰/۹۱۵**	۰/۹۲۹**	-۰/۷۶۵**	-۰/۷۷۷**	۰/۳۳۰	۰/۳۲۶
NO_3	ضریب همبستگی	۰/۸۶۱**	۰/۹۱۵**	۱	۰/۹۸۰**	-۰/۸۰۰**	-۰/۸۲۱**	۰/۲۳۵	۰/۲۹۷
NH_3	ضریب همبستگی	۰/۸۷۹**	۰/۹۲۹**	۰/۹۸۰**	۱	-۰/۸۰۶**	-۰/۷۸۹**	۰/۲۶۵	۰/۲۸۷
صبح O_2	ضریب همبستگی	-۰/۷۳۲**	-۰/۷۶۵**	-۰/۸۰۰**	-۰/۸۰۶**	۱	۰/۸۸۰**	-۰/۱۱۷	۰/۰۰۳
عصر O_2	ضریب همبستگی	-۰/۷۳۷**	-۰/۷۷۷**	-۰/۸۲۱**	-۰/۷۸۹**	۰/۸۸۰**	۱	۰/۰۲۰	۰/۰۱۱
دما صبح	ضریب همبستگی	۰/۳۴۱	۰/۳۳۰	۰/۲۳۵	۰/۲۶۵	-۰/۱۱۷	۰/۰۲۰	۱	۰/۶۴۷**
دما عصر	ضریب همبستگی	۰/۳۴۲	۰/۳۲۶	۰/۲۹۷	۰/۲۸۷	۰/۰۰۳	۰/۰۱۱	۰/۶۴۷**	۱

** اختلاف در سطح ۱ درصد معنی دار است.

بحث

در سال‌های اخیر یرسینیوزیس به عنوان یکی از مهمترین علل بروز تلفات و خسارات اقتصادی در مزراع سردابی کشور مطرح شده است(عبدی، ۱۳۹۱). علایم بالینی مشاهده شده در مطالعه حاضر شامل اگزوفتالمی یک یا دو طرفه، خونریزی در چشم، اندام‌های داخلی و قاعده باله‌ها، فکین و اطراف دهان، تیرگی بدن، تورم شکم و شنای نامنظم بود که با نشانه‌های بالینی گزارش شده توسط محققین مختلف در ماهیان قزل آلای رنگین کمان مبتلا به یرسینیوزیس تشابه فراوانی دارد (گنجور و همکاران،

۱۳۹۴ ; Adel *et al.*, 2015). باتوجه به غیر اختصاصی بودن نشانه‌های بالینی در اکثر بیماری‌های خونریزی دهنده باکتریایی و به منظور کنترل و شناسایی دقیق و سریع عوامل ایجاد کننده تلفات در ماهیان استفاده همزمان از آزمایشات بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی از قبیل PCR ضروری به نظر می‌رسد (Nelson *et al.*, 2015). نتایج بررسی حاضر نشان دهنده آن است که ۳۶/۸۴ درصد از مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی، در ۷ مرکز پرورشی استان آذربایجان غربی مبتلا به یرسینیوزیس می‌باشند که نشان از بالا بودن میزان درصد آلودگی در مقایسه با سایر استان ها بوده و می‌تواند نشانگر وضیعت وخیم بیماری و تحت حاد بودن بیماری در سطح مزارع استان باشد. در مطالعه صورت گرفته توسط سلطانی و همکاران (۱۳۹۳)، ۶۵ درصد از ماهیان پرورشی در مزارع منتخب استان‌های مازندران، تهران، زنجان و لرستان مبتلا به یرسینیوزیس بودند که از درصد ابتلای بیشتری نسبت به مطالعه حاضر برخوردار بودند. در مطالعه صورت گرفته توسط Fadaeifard و همکاران (۲۰۱۴) در استان چهارمحال و بختیاری، ۳٪ از ماهیان مورد مطالعه مبتلا به یرسینیوزیس بودند. این در حالی است که در بررسی Akhlaghi و Sharifiyazdi (۲۰۰۸) در استان فارس، ۵/۵ درصد از کل نمونه‌های مورد مطالعه مبتلا به یرسینیوزیس بودند. در مطالعه Adel و همکاران (۲۰۱۵) نیز ۱۷ درصد از ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران از نظر باکتری یرسینیا راکری مثبت بودند. کلیه مطالعات ذکر شده نشان دهنده گسترش و پراکندگی زیاد باکتری یرسینیا راکری در مزارع مهم قزل‌آلای کشور است. از طرفی با توجه به این که بیماری ناشی از این باکتری، در گروه بیماری‌های قابل انتقال به انسان قرار گرفته است لازمه اتخاذ برنامه-های موثر و کاربردی به منظور مقابله و کنترل این بیماری پیش از پیش نمایان می‌شود (Kumar *et al.*, 2015).

بر اساس نتایج به دست آمده، ۳۸/۵۹ درصد آلودگی به یرسینیا راکری مربوط به یک سوم انتهایی بافت روده، ۲۵/۶۶ درصد آلودگی مربوط به قسمت دهانی و ۸/۷۷ درصد آلودگی ماهیان مربوط به قسمت کلیه بود. این باکتری به طور معمول در روده ماهیان حامل حضور داشته و هنگامی که جمعیت ماهیان تحت تاثیر شرایط استرس زا از قبیل صید، حمل و نقل، تغییر در میزان هورمون استرس (کورتیزول) و شرایط نامطلوب محیط پرورشی (کمبود اکسیژن محلول در آب، افزایش گاز آمونیاک، نیتریت و نیترات و افزایش میزان تراکم و رسیدن به دمای ۱۸-۱۵ درجه سانتیگراد) دردسر ساز شده و منجر به شیوع بیماری و تلفات در ماهیان می‌گردد (Fouz *et al.*, 2006). نتایج مطالعه Busch و Lingg (۱۹۷۵) نشان داد که بیشتر از ۲۵ درصد جمعیت ماهیان قزل آلای رنگین کمان می‌توانند حامل باکتری یرسینیا راکری در بخش انتهای روده خود باشند. بر اساس نتایج فوق به نظر می-رسد که ماهیان پرواری و بچه ماهیان به ظاهر سالم به عنوان حاملین باکتری (در یک سوم خلفی روده) عمل کرده و می‌توانند نقش مهمی را در انتقال بیماری در بین مزارع استان بازی کنند که این امر لزوم انجام تمهیدات بهداشتی و مراقبت‌های بیشتر را در هنگام انتقال ماهیان در بین مزارع استان پر رنگ‌تر می‌کند.

متناسب با نتایج حاصله چنین به نظر می رسد، عوامل اصلی تاثیر گذار شیمیائی بر آلودگی آب مزارع پرورشی به باکتری یرسینیا راکری، نیتریت، نیترات، آمونیاک، اکسیژن محلول و دمای آب می باشند. بیشترین و کمترین میزان همبستگی در بین فاکتورهای شیمیائی آب با آلودگی آب به یرسینیا راکری، به ترتیب متعلق به نیتریت و دمای آب می باشد. همانطور که نتایج نشان می دهند، بین مقادیر نیتریت و آلودگی آب مزارع پررشی ماهی به یرسینیا راکری ارتباط معنی داری وجود دارد ($p<0.05$) و مقادیر بالای نیتریت (از ۰/۱ ppm به بالا) به عنوان یک فاکتور مستعد کننده قوی در بروز بیماری فوق نقش کلیدی دارد. علیرغم همبسته بودن دمای آب با آلودگی آب به یرسینیا راکری، این ارتباط حداقل در دمای مزارع مورد بررسی ضعیف است. چنین بنظر می رسد به دلیل همبستگی منفی، با کاهش اکسیژن محلول آب میزان آلودگی آب به باکتری یرسینیا راکری افزایش یابد. این کاهش اکسیژن می تواند در فصول گرم سال که میزان BOD افزایش می یابد و تقاضای اکسیژنی ارتقا می یابد مشهود گردد. از طرفی دیگر فاکتور دما نیزکه در فصل تابستان و مناطقی که در این فصل نوسانات دمائی

بیشتری دارند موجب افزایشBOD، مصرف بیشتر اکسیژن و کاهش مقدار محلول آن و بروز استرس در ماهی شده و افزایش احتمال آلودگی ماهیان به یرسینیوزیس را به همراه داشته باشد (Tobback *et al.*, 2007). Fernandez و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه خود نشان دادند که بین استرس‌های محیطی به ویژه درجه حرارات و بروز یرسینیوزیس ارتباط معنی داری وجود دارد و در دمای ۱۸ درجه سانتیگراد نسبت به ۲۸ درجه سانتیگراد بروز یرسینیوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان بیشتر بوده است.

بر اساس نتایج به دست آمده، باکتری یرسینیا راکری از تمامی سنین ماهی قزل آلای رنگین کمان جداسازی شد. هر چند که اندازه زیر گرم تا انگشت قدی (دامنه وزنی ۲۰-۱ گرمی) بیشترین درصد آلودگی (۵۲/۶۳٪) و اندازه بازاری با وزن ۲۰۰ گرم به بالا (۲۴/۵۶ ٪) کمترین آلودگی را به باکتری یرسینیا راکری نشان داد. نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مشابه نتایج گزارش شده توسط گنجور و همکاران (۱۳۹۴) و Zorriehzahra و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد که تایید کننده بیشترین حساسیت ماهی قزل آلای رنگین کمان به یرسینیوزیس در مرحله انگشت قدی می‌باشد.

با توجه به گسترش یرسینیوزیس در سطح مزارع پرورشی استان آذربایجان غربی و نقش مهم پارامترهای محیطی در شیوع این بیماری، انجام اقدامات مدیریتی و بهداشتی از قبیل قرنطینه نمودن ماهیان قبل از عرضه ماهیان به حوضچه‌ها وکنترل شرایط استرس‌زا از طریق بهبود شرایط محیطی، از قبیل بهبود کیفیت مناسب آب و تعویض به موقع آن، تغذیه مناسب، کاهش بار مواد آلی، اجتناب از تراکم بیش از حد ماهیان، دستکاری‌های بی-مورد، استفاده از محرک‌های ایمنی و ضدعفونی کننده‌های مناسب و نمونه گیری‌های دوره ای می‌تواند در کنترل و کاهش تلفات و ضررهای اقتصادی ناشی از این بیماری، مفید و سازنده واقع شود. در این راستا می‌توان با ترویج فرهنگ مدیریت بهداشتی، ارتقای سطح علمی تولیدکنندگان و توصیه های بهداشتی به مزرعه داران استان در کنترل و پیشگیری از شیوع این بیماری در این استان کمک کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از تلاش‌ها و زحمات همکاران و مسئولان محترم در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز ملی تحقیقات آرتمیای کشور، سازمان دامپزشکی کشور و پرورش دهندگان پرتلاش مزارع تحت بررسی در استان آذربایجان غربی که بدون مساعدت و همکاری ایشان اجرای این مطالعه میسر نبود، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۲. سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و توسعه مدیریت، دفتر برنامه و بودجه، ۶۴ صفحه.

سلطانی، م.، موسوی، ش.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، میرزرگز س. س.، طاهری میرقائد، ع.، شفیعی، ش.، شهره، پ. و محمدیان، س.، ۱۳۹۳. مطالعه مولکولی یرسینیا راکری، عامل یرسینیوزیس در برخی از مزارع قزل آلای کشور. مجله دامپزشکی ایران، ۶۷-۵۹ :(۱)۱۰.

عبدی، ک.، ۱۳۹۱. ارائه گزارش در جلسه خردادماه ۹۱ درکانون آبزی پروری در محل سازمان دامپزشکی کشور.

گنجور، م.س.، ذریه زهرا، س. ج.، مهرابی، م.، گرجی پور، ع.، گندم کار، ح.، محمد پور، م. و صلاحی م. م.، ۱۳۹۴. گزارش یک مورد وقوع عارضه دهان قرمز روده ای (Yersiniosis) در ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استان کهکیلویه و بویر احمد. مجله علمی شیلات ایران، ۱۳۸-۱۳۳ :(۱)۲۴.

Adel, A., Salimi, M., Dadar, M. and Hashemi, S.A., 2015. Isolation and characterization of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in north of Iran by biochemical tests and polymerase chain reaction (PCR) assay. 16th International

Fernandez, L., Marquez, I. and Guijarro, J.A., 2004. Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. Applied and Environmental Microbiology, 70: 5199–5207. DOI: 10.1128/AEM.70.9.5199–5207.2004.

Fouz, B., Zarza, C. and Amaro, C., 2006. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. Journal of Fish Diseases, 29: 339-346. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2006.00723.x.

Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M. and El-Matbouli, M., 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Veterinary Research, 46: 103–113. DOI: 10.1186/s13567-015-0238-4.

LeJeune, J.T. and Rurangirwa, F.R., 2000. Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 12: 558-561.
DOI: 10.1177/104063870001200611.

Nelson, M.C., LaPatra, S.E., Welch, T.J. and Graf, J., 2015. Complete genome sequence of *Yersinia ruckeri* strain CSF007-82, etiologic agent of red mouth disease in salmonid fish. Genome Announc, 3: 491–514. DOI: 10.1128/genomeA.01491-14.

Shaowu, L., Di ,W., Hongbai, L. and Tongyan, L., 2013. Isolation of *Yersinia* and Iranian Congress of Microbiology. Tehran, Iran, pp: 23–25.

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, 9: 347-352.

Altinok, I., Grizzle, J.M. and Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Disease Aquatic Organism, 44: 29–34. DOI: 10.3354/dao044029.

APHA, American Public Health Association, 2005. Standard method for examination of water and wastewater. Washington, 324 P.

Austin, B. and Austin, D.A., 2007. *Bacterial fish pathogens-diseases of farmed and wild fish*. 2nd Ed., Springer Verlag, 226P.

Busch, R.A. and Lingg, A.J., 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Fish Research Board Canada, 32: 2429–2432. DOI: 10.1139/f75-279.

Fadaeifard, F., Sharifzadeh, A., Raissy, M., Mazrooi, H., Safari, S. and Moumeni, M., 2014. Molecular identification of *Yersinia ruckeri* isolates by polymerase chain reaction test in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. European Journal of Experimental Biology, 4: 1–4.

DOI: 10.1111/j.1365-2761.2007.00816.x.

Zorriehzahra, M.J., Hassan, H.M.D., Nazari, A., Gholizadeh, M. and Farahi, A., 2012. Assessment of environmental factors effects on enteric redmouth disease occurrence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Hamedan province, Iran. Journal of Comparative Clinical Pathology Research, 3: 79–85.

ruckeri strain H01 from farm-raised amur sturgeon *Acipenser schrencki* in China. Journal of Aquatic Animal Health, 25: 9–14. DOI: 10.1080/08997659.2012.728169.

Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F. and Chiers, K., 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. Journal of Fish Diseases, 30: 257–268.

Epidemiologic study on Enteric Redmouth Disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured farms in West Azerbaijan province and relation this disease with environmental parameters

Zorriehzahra S.J. [1]; Kakoolaki S.[1]; Adel M. [1*]; Amirikar M. [2]; Behboudi N.[2]; Motallebi A.A. [1]; Azadikhah D. [3]; Nekuie Fard A. [4]; Yavari H.[5]

[*] miladadel85@yahoo.com

1-Aquatic animal Health & Diseases Dept., Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization(AREEO), , P.O.Box:13185-116 Tehran, Iran

2-DVM Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Azad Islamic University of Urmia Branch, P.O.Box:969 Urmia, Iran

3-Faculty of Veterinary Medicine, Azad Islamic University of Urmia Branch, P.O.Box:969 Urmia, Iran

4-National Artemia Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmieh, Iran.

5- Iranian Veterinary Organization, North Khorasan, Bojnord , P.O.Box: 472 Bojnord, Iran

Abstract

Yersinia ruckeri is the one of the most important causative agents of economic losses in fish farms in Iran. During April-August 2012، sampling was done from 285 rainbow trout weighing from 1-200 g up، from 19 coldwater farms that located in west-Azerbaijan province in order to isolate and identify the pathogenic bacterium *Y. ruckeri*, as causative agent of enteric redmouth disease. Samples from the fish's mouth, kidney tissue and the last third of intestine were cultured on yersiana selective agar media and then incubated at the 25°C for 48-72 hours. Using gram staining, biochemical tests and molecular assay (PCR) from 285 studied samples, 110 samples were infected to *Y. ruckeri* in the intestine (with an average of 59.38% contamination), 76 in mouth (with an average of 25.66% contamination)، and 25 in kidney tissue (with an average of 8.77% contamination). Moreover, *Y. ruckeri* were isolated from 7 farms out of 19 studied farms so the contamination rate about 36.84 percent was estimated. The results show that the average amount of contamination in west-Azerbaijan is higher than other provinces in the country، therefore; it can be the indicator of the deterioration and acuteness of the disease in west-Azerbaijan's farms. Regarding different weights, the samples in finger size weighing 1-20 g were the most infected ones (52.63%) and the market size weighing up to 200 grams (24.56%) had minimal contamination with bacteria. This result revealed that fish with fingerling size are the most sensitive compare to higher weights. Also, significant correlation was observed between high rate of nitrite and disease occurrence (r=870 and p=0.03). It seems that amount of nitrite more than 0.1 ppm could be played important role as susceptibility factor in occurrence of ERM disease. So, doing proper health management could control the rate of disease outbreak in west-Azerbaijan's farms.

Keywords: West Azerbaijan province, Enteric redmouth disease, *Yersinia ruckeri*, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Susceptibility factors

*Corresponding author