



مقاله علمی - پژوهشی:

بررسی عفونت‌های قارچی پوست و آبشش با استفاده از روش‌های آسیب شناسی، کشت و تعیین توالی ژنوم قارچی به روش مولکولی در ماهی‌های زینتی آب شیرین

مهدی ابراهیمی جعفری^۱، منصور بیات^۱، عادل حقیقی خیابانیان اصل^۱، سید جلال هاشمی هزاوه^۱

*dr_mansour_bayat@yahoo.com

۱- دانشکده پاتوبیولوژی، دانشکده علوم دامپزشکی تخصصی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۳

چکیده

در صنعت آبزی‌پروری، بیماری‌ها باعث زیان‌های اقتصادی عظیمی می‌شوند و عفونت‌های قارچی یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر و ضررهای اقتصادی در صنایع پرورش ماهیان زینتی و خوراکی هستند. در این مطالعه به جداسازی و شناسایی قارچ‌ها در ماهیان زینتی در مناطق مختلف تهران (ایران) پرداخته شده است. نتایج نشان داد، از میان ۹۲ ماهی زینتی مبتلا به علائم بالینی مورد بررسی، ۴۳ نمونه به قارچ‌های کپکی و مخمری آلوده بودند. نتایج آسیب‌شناسی نشان‌دهنده نفوذ عوامل بیماری‌زا به آبشش‌ها، پوست و زیرپوست بود. در ادامه نمونه‌ها با رنگ‌های خاص کشت داده شده و به صورت میکروسکوپی بررسی شدند و سپس با روش PCR توالی ژنی قارچ‌ها تعیین گردید. گونه‌های شناسایی شده شامل کلادوسپوریوم (۵۳٪)، کاندیدا (۱۸.۷٪)، پنی‌سیلیوم (۱۲.۵٪) و مخمر رودوترولا (۳٪) بودند. در این مطالعه، اطلاعات توالی‌های به‌دست آمده به‌وسیله ابزار بلاست با داده‌های منتشره قبلی در بانک ژن مقایسه شدند و در ۱۴ مورد (۶۳٪) هیچ نمونه مشابهی در پایگاه NCBI یافت نشد.

کلمات کلیدی: عفونت قارچی، ماهی زینتی، آسیب‌شناسی، PCR، تعیین توالی ژنوم

مقدمه

طی دو دهه گذشته بیماری‌های قارچی ماهی‌ها مورد توجه ویژه قرار گرفته و تعداد فزاینده‌ای از قارچ‌های محیطی فرصت‌طلب از ماهیان آلوده گزارش شده‌اند. در میان این قارچ‌ها، *آفانومیسیس* و *فوزاریوم* می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های سیستمیک یا تهاجمی شود که اغلب همراه با تغییرات عوامل محیطی نظیر دما و شوری بروز پیدا می‌کند. سایر قارچ‌ها مانند *یکتیوفونوس* هوفری می‌توانند به صورت مزمن و پنهان ظاهر شوند و تا حدی شبیه بیماری مایکوباکتریوزیس عمل کنند. به طور کلی، کنترل یا درمان بیماری‌های قارچی پس از وقوع آنها بسیار دشوار است (Yanong, 2003). قارچ‌ها می‌توانند موجب عفونت در ماهیان جوان و بالغ گردیده و تخریب تخم‌ها و از بین رفتن لاروها را به دنبال داشته باشند. عفونت‌های قارچی معمولاً عفونت‌های ثانویه هستند که پس از عفونت‌های اولیه انگلی، ویروسی یا باکتریایی رخ می‌دهند. هرچند برخی از قارچ‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های تهاجمی شناخته می‌شوند. منشأ عفونت قارچی در آبی‌پروری اسپورها هستند. همچنین تولید آنزیم‌هایی نظیر سوبتیلیناز، پروتئاز، گلیکوزیل هیدرولاز، کینازها و مهارکننده‌های کیناز از قارچ‌ها می‌تواند به بافت‌های میزبان آسیب وارد کنند (Sarkar et al., 2022). قارچ *سپروولگنیا*، یک قارچ با گسترش جهانی در آبهای شیرین و شور است که به عنوان مشکل اصلی در آبهای شیرین شناخته می‌شود. مشخصه‌های بالینی عفونت‌های سطحی قارچی شامل ضایعات پنبه‌ای سفیدرنگ روی پوست و کمان‌های آبششی است. پس از تهاجم هیف‌ها، ممکن است آروزیون یا اولس‌های کانونی در اپیدرم ایجاد شوند (Sakaguchi et al., 2019).

اطلاعات کمی درباره شناسایی و تعریف عفونت‌های قارچی در ماهیان زینتی ایران موجود است درحالی‌که این اطلاعات برای پیشگیری و کنترل بیماری‌ها ضروری است. در این رابطه در مطالعه‌ای در اصفهان، ایران، نشان داده شد که گونه‌های قارچی *آکرومونوم*، *آسپرژیلوس*، *آلترناریا*، *سپروولگنسا* و *پنی‌سیلیوم* دارای بیشترین میکروارگانیسم‌های قارچی آلوده‌کننده ماهی‌ها بوده و میزان شیوع در ماهی گورامی کوتوله ۲۳.۳۱٪ و در ماهی گویی ۶.۶۶٪ است (Shahraki et al., 2014). در مطالعه دیگری گونه‌های قارچی *پنی‌سیلیوم*، *موکور*، *آسپرژیلوس*، *ریزوپوس* و *فوزاریوم* از هشت ماهی خوراکی آب شیرین دودی‌شده جداسازی گردید (Fafioye et al., 2008).

مواد و روش‌ها

شناسایی موارد

از آن جایی که عفونت قارچی به سختی درمان می‌شود، تشخیص و اپیدمیولوژی آن چالش‌برانگیز است. بنابراین، هدف این مطالعه ارائه گزارشی از گونه‌های قارچی منطقه‌ای است تا امکان برنامه‌ریزی بهتر برای کنترل این عفونت‌ها فراهم شود. با توجه به آن که تشخیص دقیق برخی از عوامل بیماری‌زای قارچی به دلیل شباهت‌های ظاهری میکروسکوپی و حتی کلنی‌ها دشوار است (Ke et al., 2010)، استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی گونه‌های قارچی پیشنهاد شده است. در این رابطه توالی‌های DNA ریبوزومی برای تمایز قارچ‌های بیماری‌زا که در طول تکامل نسبتاً بدون تغییر باقی مانده، شناسایی شده‌اند. یکی از مهم‌ترین آنها توالی ITS ریبوزومی است. بنابراین PCR مبتنی بر ITS برای شناسایی عوامل قارچی کافی است (Hafez, 2016). در این مطالعه نیز تلاش شد تا به صورت تصادفی نمونه‌های مختلفی از ماهیان زینتی بیمار جداسازی شود و با استفاده از محیط‌های کشت و روش‌های PCR، شیوع بیماری‌های قارچی مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد.

در این مطالعه ۹۲ نمونه ماهی زینتی با علائم بالینی مرتبط با بیماری قارچی مورد بررسی قرار گرفتند که در ۳۲ مورد، عامل قارچی تشخیص داده شد. موارد مبتلا به قارچ از میان فروشندگان ماهیان زینتی، در بازه زمانی تیرماه ۱۴۰۰ لغایت دی ماه ۱۴۰۱ جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری از ماهیان آلوده تا حد ممکن از قسمت‌هایی که بیشترین احتمال جداسازی ارگانیسم وجود داشت، انجام شد. برای مثال، نواحی تغییر رنگ داده به همراه بافت‌های اطراف مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا، اسمیرها تهیه شدند تا ضایعات قارچی از سایر ضایعات تمایز داده شوند. نیمی از نمونه‌های اخذشده از پوست یا آبشش جهت بررسی‌های آسیب شناسی در فرمالین قرار گرفتند و نیمی دیگر برای کشت استفاده شدند.

بررسی مستقیم

تهیه اسمیر از نمونه‌های ارسال‌شده سریع‌ترین روش برای تشخیص قارچ در ضایعات است. اسمیر نمونه‌ها از تمامی ۹۲ نمونه بالینی تهیه شد، درحالی‌که فقط هفت مورد قارچ رشته‌ای از طریق روش اسمیر تشخیص داده شد. سپس تمامی نمونه‌های بالینی در محیط‌های کشت مختلف، از جمله آگار سابورو

تعیین توالی DNA

۳۲ نمونه از نواحی بافت آلوده در محیط کشت SDA و سایر محیط‌های کشت‌های (در صورت نیاز) کشت داده شدند و DNA قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها با استفاده از روش‌های نیتروژن مایع و گوی‌های شیشه‌ای استخراج گردید (Van Burik et al., 1998; Kot et al., 2020). در این مرحله براساس مطالعات قبلی، توالی‌ها توسعه یافته و مورد استفاده قرار گرفتند (Rupp et al., 2019; Mohamed et al., 2021). DNA استخراجی از تمامی ۳۲ قارچ کشت داده شده، ژن‌های ITS4 و ITS1 برای شناسایی قارچ‌ها تقویت شدند. سایر پرایمرها برای شناسایی گونه‌های آفانومایسس استفاده شدند. مخلوط PCR شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۰.۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس PCR (پرمیکس ۲×) و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر بود. چرخه‌های PCR (۳۰ چرخه) شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۲ دقیقه)، اتصال در ۵۶ درجه (۲۰ ثانیه) و توسعه در ۷۲ درجه (۳۰ ثانیه) بود که با یک چرخه در ۷۲ درجه (۵ دقیقه) دنبال شد (Wang et al., 2017, Armwood et al., 2021). نتایج نهایی توالی‌ها با نرم‌افزار مگا-ایکس تحلیل و نتایج با پایگاه داده‌های NCBI مقایسه شدند. بررسی فیلوژنتیک برای هر ایزوله با استفاده از جایگاه ژنی مناسب برای هر گروه قارچی انجام شد. توالی‌های نهایی با نرم‌افزار مگا-ایکس (نرم افزار BLAST بانک ژن) تجزیه و تحلیل شدند تا نشان دهند که توالی ITS تقویت شده نزدیک‌ترین همولوژی را با جنس دارد. تاریخچه تکاملی با استفاده از روش حداکثر درستنمایی و مدل پیشنهادی Nei و Tamura (۱۹۹۳) به دست آمد و درختی با بیشترین احتمال ورود به سیستم (۲۱۴۵.۸۶-) نشان داده شد. درخت (های) اولیه رای جست و جوی هیوریستیک با استفاده از الگوریتم‌های Neighbor-Join و BioNJ بر ماتریسی از فواصل زوجی که با استفاده از روش احتمال مرکب بیشینه (MCL) تخمین زده شده بودند، به دست آمدند و سپس توپولوژی با مقدار برتری از احتمال لوگاریتمی انتخاب شد.

ارزیابی آسیب‌شناسی بافتی

از ۳۲ نمونه اسمیر مثبت با علت قارچی، نواحی با ضایعات ماکروسکوپی از آبشش و پوست در بافر خنثی فرمالین فسفات ۱۰٪ تثبیت شد، در پارافین جایگذاری شده و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. این برش‌ها با رنگ‌آمیزی

دکستروز (SDA) کشت داده شدند. برای تهیه اسمیرها از محلول‌های فیزیولوژیک، هیدروکسید پتاسیم، جوهر هند، رنگ کالکوفلور سفید و رنگ لاکتوفنول کاتن بلو استفاده شد.

شناسایی قارچ

در تمامی ۹۲ نمونه بالینی، نواحی ضایعه با الکل ۷۰٪ تمیز شدند تا باکتری‌ها و قطرات چربی حذف شوند. سپس از ابزارهای استریل در نزدیکی شعله و زیر هود استفاده شده تا از رشد میکروارگانیسم‌های غیر مرتبط در پلیت‌های آگار جلوگیری شود. محیط‌های کشت مورد استفاده شامل SDA، آگار مغذی و آگار گلوکز پپتون بودند. برای جداسازی تمامی نمونه‌های بیماری‌زا، ترکیبی از محیط‌های حاوی و فاقد آنتی‌بیوتیک به کار گرفته شد. محیط کشت طبق استاندارد و براساس روش Abdulrahman و همکاران (۲۰۲۲) آماده شد. برای این منظور ۶۵ گرم پودر محیط کشت (Invitrogen، ۳۱۶۰۰-۰۸۳) در یک استوانه مدرج یک لیتری با آب مقطر مخلوط شد. سپس در یک ارلن مایر دو لیتری حرارت داده شد تا به جوش برسد و هم‌زمان تکان داده شد. برای افزودن آنتی‌بیوتیک، ۵۰ میلی گرم کلرامفنیکل در ۱۰ میلی لیتر اتانول خالص حل و به محیط کشت ذوب شده اضافه شد. سیکلوهگزیمید در این آزمایش‌ها استفاده نشد تا قارچ‌های ساپروفیت نیز جداسازی شوند. سپس با فویل آلومینیومی بسته شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع اتوکلاو شد. در برخی موارد، محیط‌های کشت دوباره‌سازی شدند تا تشخیص بهبود یافته یا جداسازی تکمیل شود. در شرایط استریل، قارچ از محل ضایعه با یک حلقه تلقیح نزدیک شعله کشت و در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته نگهداری شدند و هر سه روز یک‌بار نمونه‌ها از نظر رشد بررسی شدند. در مطالعات اولیه، ویژگی‌های مختلف قارچ‌ها از نظر سرعت رشد، رنگ کلنی، تغییرات پشت کلنی، نوع کلنی و تفاوت رشد در محیط‌های مختلف مورد توجه قرار گرفتند. در طول بررسی کلنی در حال رشد، نمونه‌هایی برای بررسی میکروسکوپی ساختارهای مخصوص قارچ تهیه شد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× برای قارچ‌های کپک‌زده و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× برای مخمر مشاهده شد. ساختارهای تولیدمثلی، انواع هاگ، رنگ میسلیم، دیواره عرضی و خلوص کلنی مهمترین عوامل در نظر گرفته شده بودند.

هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شده و از نظر نکروز سلول‌های اپیتلیال، نفوذ لوکوسیت‌ها، هایپریمی و احتمالاً هایپرپلازی تحلیل شدند (Gjessing *et al.*, 2019).

تحلیل تکاملی با روش احتمال بیشینه

در تحلیل نمونه‌های 33F، 21F، 11F و 81F تاریخچه تکاملی با استفاده از روش احتمال بیشینه و مدل Tamura و Nei (۱۹۹۳) استنتاج شد و درخت با بیشترین احتمال لگاریتمی نشان داده شد (۲۱۴۵.۸۶، -۳۷۹۴.۰۰، -۱۱۳۰.۱۴ و -۱۴۵۲.۸۱). برای جستجوی هیورستیک، درخت‌های اولیه به صورت خودکار با استفاده از الگوریتم‌های Neighbor-Join و

BioNJ به یک ماتریس فاصله‌های جفتی که با روش احتمال مرکب بیشینه (MCL) تخمین زده شده بود، اعمال و سپس آسیب‌شناسی با بهترین مقدار احتمال لگاریتمی انتخاب شدند. درخت‌ها مقیاس‌بندی شده و طول شاخه‌ها بر اساس تعداد جانشینی‌ها در هر محل اندازه‌گیری شدند. این تحلیل شامل ۱۰ توالی نوکلئوتیدی با ۱۳۳۶ موقعیت در مجموعه داده نهایی بود. تحلیل‌های تکاملی با استفاده از نرم‌افزار مگا-ایکس انجام شدند (Kumar *et al.*, 2018).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

شیوع آلودگی با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد:

درصد شیوع عفونت قارچی در هر گونه ماهی = تعداد ماهیان آلوده به قارچ / کل تعداد ماهیان بررسی شده

شناسایی قارچ با روش PCR

پس از کشت ۳۲ قارچ در محیط‌های کشت، آن‌ها با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که گونه‌های شناسایی شده عبارت بودند از کلاوسپوریوم (۵۳٪)، کاندیدا (۱۸.۷٪)، پنی‌سیلیوم (۱۲.۵٪)، اورئوبازیدیوم پولولانس (۳٪) و مخمر رودوترولا (۳٪). هیچ قارچ متعلق به گونه آفانومایسس در محیط کشت و روش PCR شناسایی نشد (شکل ۳: د، جدول ۲).

شناسایی توالی DNA

از آنجایی که ویژگی‌های فیزیکی و روش PCR برای تمایز و شناسایی گونه‌های قارچی کافی نبودند، از ۴۰ آزمایش PCR انجام شده، برای نمونه‌های زیر، توالی‌سازی ژنی انجام شد و نتایج آن در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. آزمایش‌های توالی‌سازی ژنی نتایج مشابهی برای نمونه‌های کپور معمولی و ماهی رنگین کمانی نشان نداد، اما یکی یا هر دو توالی ITS1 (F) و ITS4 (R) در سایر نمونه‌ها پاسخ قابل شناسایی داد. یک خلاصه از نتایج توالی‌سازی ژن در جدول ۳ ارائه شده است.

توالی قارچ‌ها در درخت تکاملی ژن‌های نوکلئوتیدی

پس از توالی‌سازی ژن و ثبت آن در سیستم NCBI، مقایسه بین توالی‌های ثبت‌شده و نزدیک‌ترین قارچ‌های معرفی‌شده در پایگاه داده انجام شد. سپس با کمک نرم‌افزار درخت تکاملی مگا-ایکس، توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های آن‌ها در جدول ۳ ارائه و در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

نتایج

همه‌گیر شناسی^۱

ماهی‌های بررسی‌شده شامل گونه‌های کپور معمولی، گلدفیش، سیچلاید دهان آتشی، سیچلاید نواری، سیلور دالر، تترای ایکس ری، اسکار، چانا، کوتوله گورامی، گوپی، کوی، ماهی زبرا، رنگین کمانی، گرین‌ترور و دم‌شمشیری سبز بودند. در جدول ۱، تعداد ماهی‌های با علائم بالینی، تعداد ماهی‌های با اتیولوژی قارچی و درصد شیوع برای هر گونه ارائه داده شده است.

شناسایی موارد

ارزیابی ۹۲ نمونه نشان داد که در ۸۰ مورد از آن‌ها، هیچ‌گونه هیف قارچی از طریق روش اسمیر شناسایی نشد. با این حال، در ۳۲ نمونه (۳۴.۷٪)، رشد پاتوژن‌های قارچی در محیط کشت مشاهده گردید (شکل ۳: ب و ج). روش PCR گونه‌های تمامی ۳۲ مورد مثبت را شناسایی کرد. شیوع موارد مثبت کشت داده‌شده برای قارچ‌ها در گونه‌های ماهی به شرح زیر بود: ماهی زبرا (۲۹٪)، گوپی (۱۸٪)، گلدفیش (۳۳٪)، سیچلاید دهان آتشی (۱۰۰٪)، کوتوله گورامی (۳۰٪)، سیلور دالر (۳۳٪)، کوی (۶۶٪)، دم‌شمشیری سبز (۲۸.۵٪)، اسکار (۵۰٪)، سیچلاید نواری (۵۰٪)، گرین‌ترور (۵۰٪)، چانا (۵۰٪) و تترای ایکس ری (۵۰٪) (جدول ۱).

¹ Epidemiology

جدول ۱: شیوع بیماری قارچی در گونه‌های ماهیان بررسی شده (۹۲ مورد بالینی)

گونه ماهی	تعداد ماهی با علائم	تعداد ماهی با اتیولوژی قارچی بالینی	درصد شیوع
کپور معمولی (<i>Cyprinus carpio</i>)	۲	۰	۰
گلدفیش (<i>Carassius auratus</i>)	۹	۳	۳۳
سیچلاید دهان آتشی (<i>Thorichthys meeki</i>)	۳	۳	۱۰۰
سیچلاید نواری (<i>Heros severus</i>)	۲	۱	۵۰
سیلور دالر (<i>Metynnis argenteus</i>)	۶	۲	۳۳
تترای ایکس ری (<i>Pristella maxillaris</i>)	۲	۱	۵۰
اسکار (<i>Astronotus ocellatus</i>)	۲	۱	۵۰
چانا (<i>Clupisoma garua</i>)	۲	۱	۵۰
کوتوله گورامی (<i>Trichogaster lalius</i>)	۱۰	۳	۳۰
گوپی (<i>Poecilia reticulata</i>)	۲۲	۴	۱۸
کوی (<i>Cyprinus rubrofasciatus</i>)	۳	۲	۶۶
ماهی زبرا (<i>Danio rerio</i>)	۲۴	۷	۲۹
رنگین کمانی (<i>Melanotaeniidae</i>)	۲	۰	۰
گرین ترور (<i>Andinoacara rivulatus</i>)	۴	۲	۵۰
دم‌شمشیری سبز (<i>Xiphophorus hellerii</i>)	۷	۲	۲۸.۵
تعداد کل	۹۲	۳۲	۳۴/۷

جدول ۲: شیوع گونه‌های قارچی در ۳۲ مورد

گونه قارچ	ارگان	گونه ماهی	تعداد
کلادوسپوریوم	آبشش و پوست	زبرا	۷
گونه‌های کلادوسپوریوم	آبشش و پوست	کپور معمولی	۲
کلادوسپوریوم پراگوستوم	پوست	سیچلاید دهان آتشی	۱
گونه‌های کلادوسپوریوم	آبشش و پوست	سیچلاید نواری	۱
کلادوسپوریوم کلمبیائی	پوست	سیلور دالر	۱
کلادوسپوریوم سینوسوم	آبشش و پوست	کوتوله گورامی	۲
کلادوسپوریوم	آبشش و پوست	دم‌شمشیری سبز	۱
گونه‌های پنی‌سیلیوم	آبشش و پوست	گلدفیش	۲
گونه‌های پنی‌سیلیوم	آبشش و پوست	گرین ترور	۱
گونه‌های پنی‌سیلیوم	پوست	سیچلاید نواری	۱
گونه‌های پنی‌سیلیوم	پوست	سیچلاید دهان آتشی	۱
اورتوبازیدیوم پولوانس	آبشش و پوست	گلدفیش	۱
تریکوفیتون تونسورانس	آبشش و پوست	اسکار	۱
آلترناریا آلترناتا	آبشش و پوست	گوپی	۲
گونه‌های کاندیدا	آبشش و پوست	گوپی	۲
گونه‌های کاندیدا	آبشش و پوست	گرین ترور	۱
کاندیدا پالمیولوفیلا	آبشش و پوست	کوتوله گورامی	۱
کاندیدا زیلانوتیدس	پوست	سیلور دالر	۱
گونه‌های کاندیدا	آبشش و پوست	چانا	۱
مخمر رودوترولا	پوست	تترای ایکس ری	۲

جدول ۳: نتایج توالی‌های ژنی ثبت شده در پایگاه داده NCBI

درصد شباهت نوکلئوتید	ساختار مشابه	کد	شماره پیوست در NCBI	مشابه ترین ساختار ژنی
۹۵	GU065571	R 6	MZ201310	کلادوسپوریوم پرائگوستوم
۹۵	MG975642	9 F	MZ202361	کلادوسپوریوم کلمبیائی
۹۷	MK722299	R 9	MZ197779	کلادوسپوریوم کلمبیائی
۹۳	FR676936	11 F	MZ161202	کاندیدا زیلانوتیدس
۹۸	KY102089	11 R	MZ161827	کاندیدا زیلانوتیدس
۹۸	NR_163770	11 F-2	OL964278	کاندیدا زیلانوتیدس
۹۸	NR_163770	11 R-2	OL831172	گونه‌های قارچی
۹۵	JF289129	13 F	OL944303	گونه‌های قارچی
۸۶	MT236941	13 R	OL831192	گونه‌های قارچی
۹۶	MK394112	R 17	MZ272342	کاندیدا پالمیولوفیلا
۸۴	MT298917	21 F	OL891804	گونه‌های قارچی
۹۰	KY552628	21 R	OL912958	گونه‌های پنی‌سیلیوم
۹۸	MG025872	33 F	OL912959	گونه‌های پنی‌سیلیوم
۸۳	LC534379	49 R	OL912960	گونه‌های کاندیدا
۸۱	MH545914	F 49	OL990026	گونه‌های قارچی
۹۳	KY102539	50 F	OL912961	گونه‌های کاندیدا
۹۱	KY102539	50 R	OL912962	گونه‌های کاندیدا
۹۲	KY102539	53 R	OL912963	گونه‌های کاندیدا
۹۹	EU167591	68 F	MZ272063	کلادوسپوریوم سینوسوم
۹۹	MH863132	68 R	MZ272062	کلادوسپوریوم سینوسوم
۱۰۰	NR_158360	81 F	MZ270536	گونه‌های کلادوسپوریوم
۹۹	AY362000	81 R	MZ166573	کلادوسپوریوم کلادوسپوریئیدس

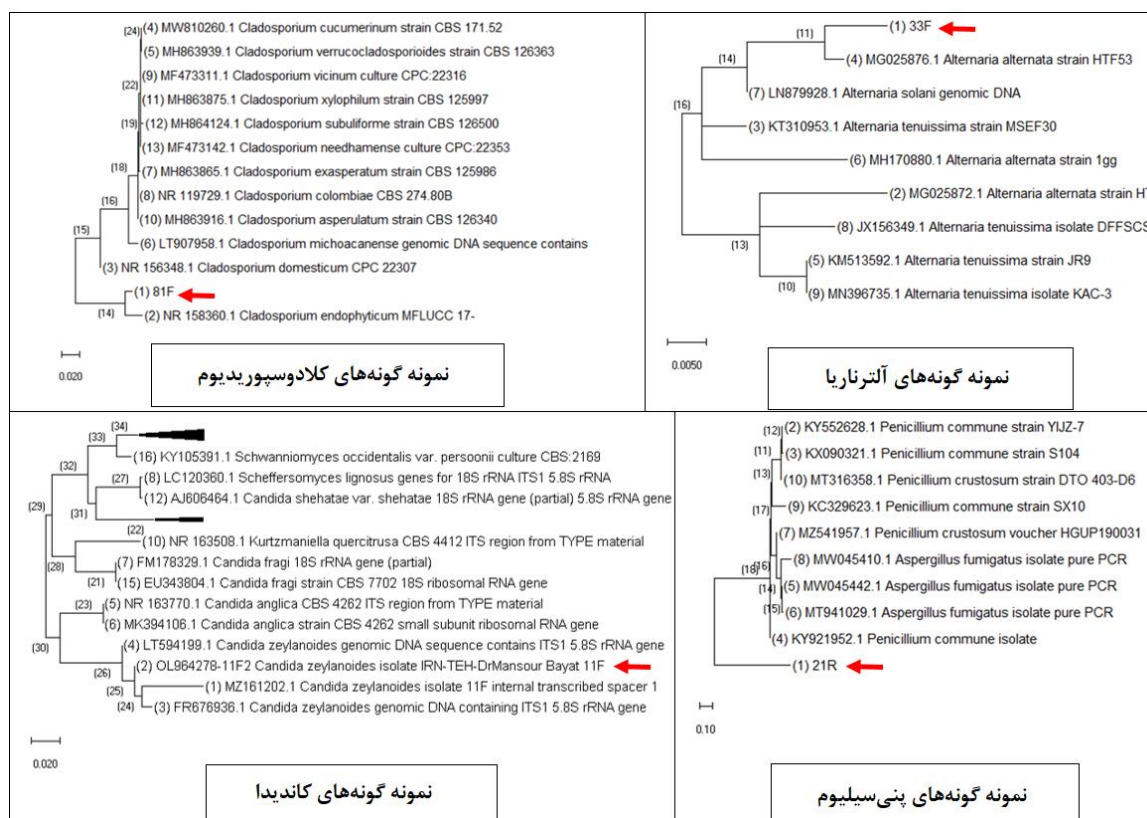
F= پیشرو، R= معکوس

شکل ظاهری

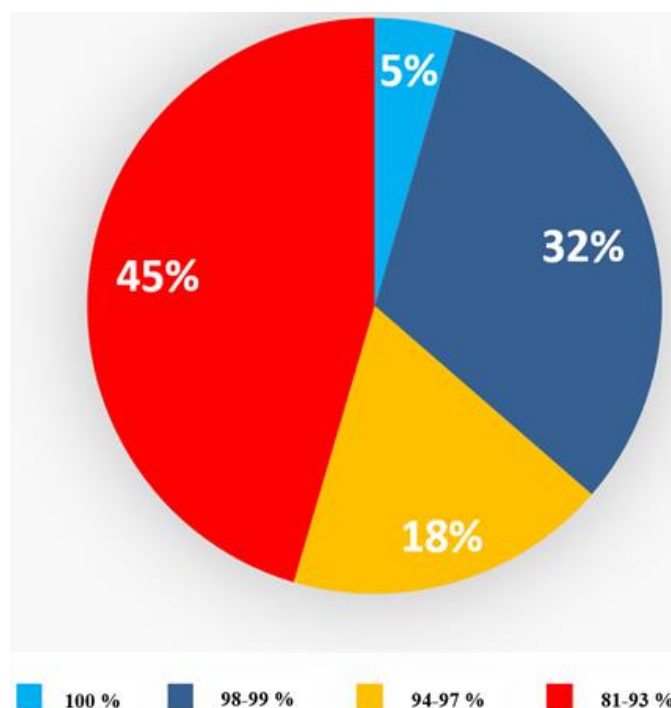
مشخص‌ترین ویژگی‌های یافته‌شده در پس از مرگ ماهیان، پوست بخشی از ماهی بود که دچار زخم جزئی اطراف آبشش‌ها یا باله‌ها شده بود. مقیاس‌ها در همه جا به‌ویژه از دم به شکمی افتاده بودند. آبشش‌ها به طور جزئی با هیف‌های قارچی آلوده شده بودند، باله‌های سینه‌ای و شکمی نیز ممکن بود، آسیب ببینند (شکل‌های ۳ و ۴).

علایم میکروسکوپی

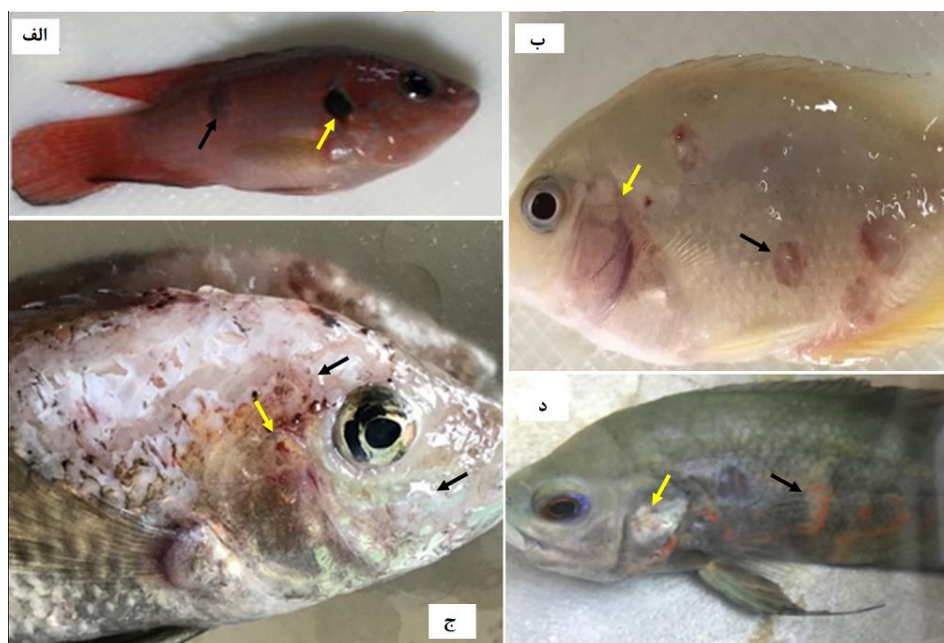
ضایعات در آبشش‌ها عمدتاً هایپریمی بودند و تعداد زیادی لوکوسیت در داخل فیلامنت‌ها و سینوزوئیدها نفوذ کرده بودند. سایر ضایعات شامل ریزش شدید سلول‌های اپیتلیال بودند. در ضایعات شدید، هایپرپلازی مشاهده نشد (شکل ۵، الف، ب، ج). درماتیت حاد با اولسر و نفوذ لوکوسیت‌ها به درم در حال گسترش بود (شکل ۵، د).



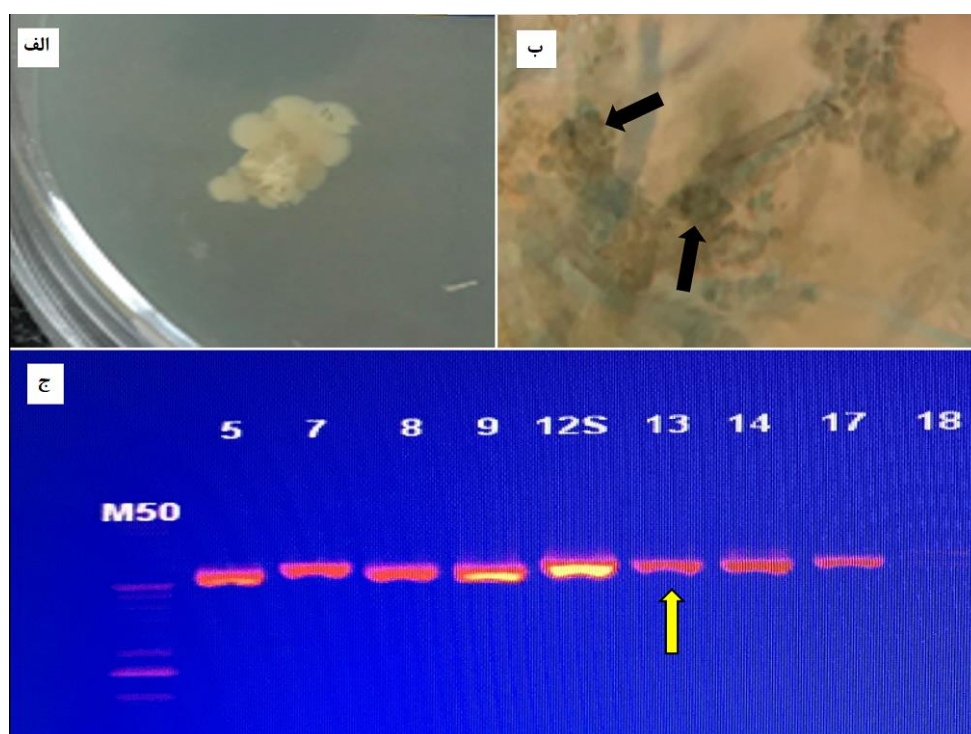
شکل ۱: فیلوگرام حداکثر احتمال با استفاده از ITS برای نشان دادن رابطه بین برخی از نمونه‌ها و گروه‌های نماینده متعلق به جنس‌های مختلف



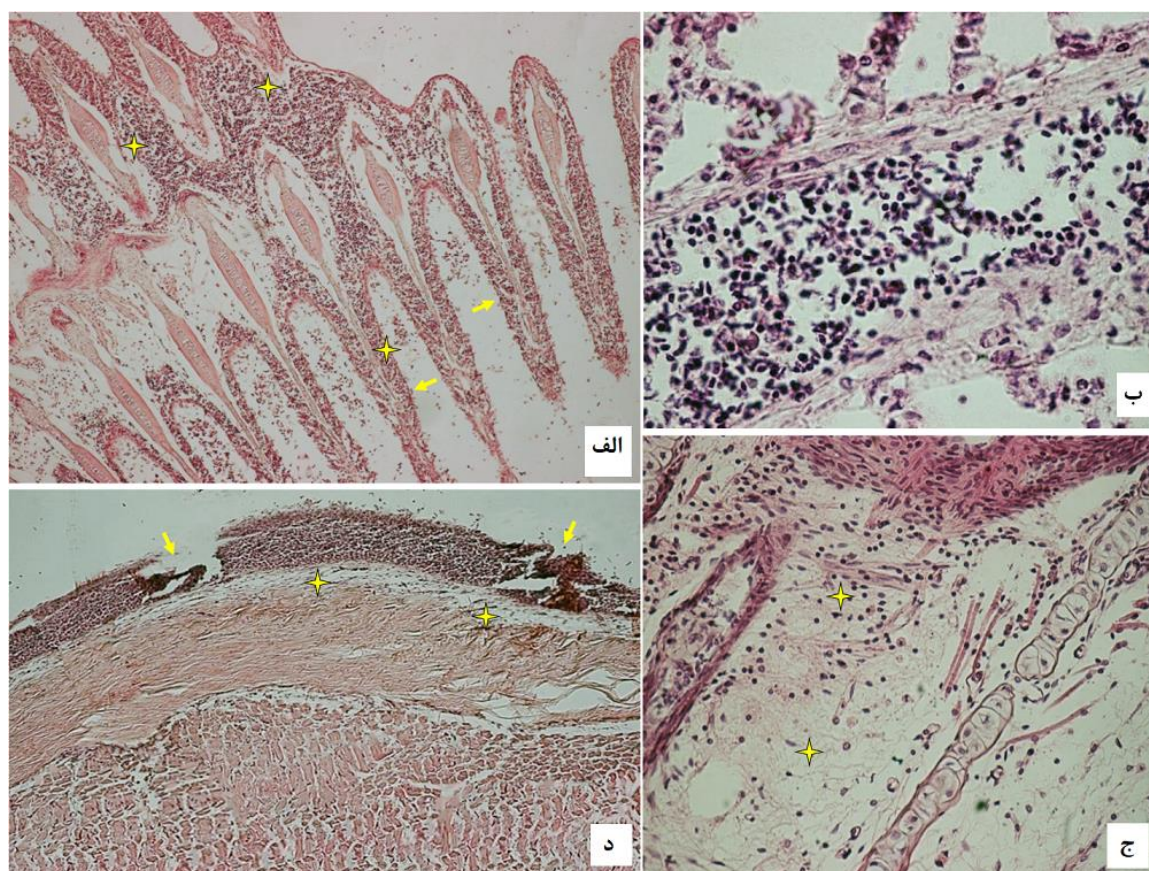
شکل ۲: مقایسه درصد تطابق نمونه‌های توالی یابی شده با ژن‌های قبلاً معرفی شده در پایگاه داده NCBI.



شکل ۳: اولسر و ریزش فلس‌ها در روی پوست و آبشش‌های برخی از ماهیان زینتی. الف) سیچلاید دهان آتشی و ب) سیچلاید نواری که هر دو دچار کلادوسپوریومیوم بودند؛ ج) گرین ترور که به کاندیدا مبتلا بود؛ د: اسکار که به تریکوفیتون مبتلا بود. فلش زرد: زخم آبشش؛ فلش سیاه تیره: زخم پوست



شکل ۴: الف) کلنی گونه‌های کلادوسپوریوم در پلت آگار YGC. ب) گونه‌های کلادوسپوریوم دارای رنگدانه بسیار تیره سبز مایل به سیاه یا آبی مایل به سیاه. د) ژل الکتروفورز PCR برای تشخیص قارچ از موارد مختلف. به عنوان مثال، گونه‌های کلادوسپوریوم در ماهی سیچلاید نواری در خط شماره ۱۳ (پیکان) شکل گرفته است. خطوط دیگر متعلق به موارد دیگر است. فلش سیاه: رنگدانه سبز مایل به سیاه یا آبی مایل به سیاه. فلش زرد: مربوط به پاتوژن گرفته شده از ماهی شکل ۳، ب



شکل ۵: پوست و آبشش برخی از ماهیان زینتی آلوده به قارچ (H&E). الف) اپیتلیوم ترابکولار که به شدت ریزش کرده و با نفوذ لوکوسیت‌ها همراه است (۱۰۰×). ب) ورید هایپرسمیک در ترابکولای آبشش (۱۰۰۰×). ج) ادم شدید و نفوذ لوکوسیت‌ها در ترابکولا (۴۰۰×). د) اولسر پوست با سلول‌های ریزش کرده بر روی درم. ستاره: نفوذ لوکوسیت‌ها و ادم، فلش: نکروز سلول‌های اپیتلیال

بحث

ریبوزومی هستند که در حین بلوغ قارچ‌ها قطع می‌شود و برای تحقیقات فیلوژنتیکی جهت شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود (Wang et al., 2017).

شناسایی سویه‌های قارچی که وارد پوست، آبشش‌ها و سایر بافت‌های ماهی‌ها می‌شوند، برای درمان‌های ضدقارچی ضروری است. استفاده از کشت‌ها به دلیل شناسایی نادرست بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، زمان رشد طولانی، حساسیت پایین و نتایج مثبت کاذب، مناسب نیست. بررسی‌های آسیب‌شناسی با استفاده از رنگ‌آمیزی PAS می‌تواند ضایعات قارچی را در نمونه‌های بافتی نشان دهد. با این حال، گونه‌های میکروارگانیسم‌ها نمی‌توانند به طور دقیق از طریق آسیب‌شناسی شناسایی شوند. بنابراین، این نتایج برای انجام درمان ضدقارچی مفید نیستند. آزمایش‌های سرولوژیک و PCR از بافت‌ها یا خون برای تشخیص، بدون وجود یک استاندارد حساس، ممکن است دشوار باشند. نمونه‌های PCR منفی می‌توانند با استفاده از

تنظیم اسمزی می‌تواند از عفونت‌های قارچی خطرناک و تهدیدکننده جلوگیری کند. تهیه نمونه از ناحیه ضایعه یک روش سریع برای تشخیص افتراقی است. بیماری‌های قارچی دریایی نادر هستند، مگر در موارد بیماری کاغذ سمباده‌ای ناشی از /یکتیوفونوس هوفری (Storesund et al., 2022). ضایعات ظاهری آنها شامل رنگ‌پریدگی‌های متعدد با پاپول‌های سفید با یا بدون التهاب گرانولوماتوزی پوست است. پوست به طور معمول با تومورهای کیستی گرانولوماتوزی درم قابل مشاهده است. درمان عفونت‌های قارچی به‌ویژه در گرانولوم‌ها، پیچیده و غیرممکن است (LaDouceur et al., 2020, Özcan and Arserim, 2022). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که موش‌های تحت مواجهه با گونه‌های کلادوسپوریوم دچار احتقان گلومرولی، احتقان کبدی و نوکلئومگالی شدند (Abdallah et al., 2020). اسپیسرهای رونویسی داخلی، نواحی در رونویسی RNA

آزمایش هیبریداسیون فلورسانس در جاساسایی شوند. استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی عوامل بیماری‌زای قارچی از بافت‌های تثبیت شده در فرمالین و جاسازی شده در پارافین ممکن است به تشخیص ضایعات قارچی کمک کند و درمان‌های ضدقارچی مناسب را تسهیل نماید. عوامل قارچی به عنوان بیماری‌های نوظهور در میزبان‌های حیوانی مختلف تحت شرایط همه‌گیر شناسی متفاوت شناخته می‌شوند. در میان سیستم‌های طبیعی و آکواریومی آب شیرین، موارد بیماری در شرایط طبیعی بیشتر از ماهی‌های نگهداری شده در آکواریوم‌ها مشاهده شده است. در برخی از مطالعات قبلی، اکثر موارد قارچ‌ها از پوست، آبشش، کبد و کلیه ماهی‌ها جداسازی شده‌اند که نشان‌دهنده وجود گونه‌های *آسپرژیلوس* به عنوان رایج‌ترین قارچ‌ها و سپس گونه‌های *کلادوسپوریوم*، *آلترناریا*، *آلترناتا* و گونه‌های *پنی‌سیلیوم* هستند. همچنین مخمرهای *کاندیدا* بیشترین تعداد عفونت‌های قارچی را از آبشش‌ها و پوست ماهی‌ها نشان داده‌اند (Tartor et al., 2018).

سaproولگنیا قارچ جهانی است که در آب شیرین و شور رشد می‌کند و به عنوان مشکل اصلی در آب‌های شیرین شناخته می‌شود. *سaproولگنیا* در دما و pH پایین و در حضور موجودات یا گیاهان در حال فساد رشد می‌کند. *سaproولگنیا* در پوست و آبشش‌های ماهیان زندگی می‌کند و به بافت‌های عمقی عضلات نفوذ نمی‌کند. سیستم ایمنی می‌تواند از نفوذ هیف‌های تهاجمی جلوگیری کند (Sarkar et al., 2022). در مقابل، هیف‌ها به بافت‌های ماهی‌های مرده آسیب‌دیده وارد می‌می‌کنند. سد مخاطی در جلوگیری از نفوذ قارچ‌های اوومیسیت به بافت‌های سالم اهمیت زیادی دارد. اسپوره‌های *سaproولگنیا* بر روی پوست سالم نمی‌توانند زنده بمانند و از بین می‌روند. کاهش دمای آب، آلودگی با مواد آلی، حمل‌ونقل، تغذیه ضعیف و مدیریت نادرست از عواملی هستند که باعث کاهش توانمندی‌های ایمنی ماهی و در نتیجه تشکیل و نفوذ کلنی‌های قارچی می‌شوند. با وجود تلاش‌های نگارندگان هنوز *سaproولگنیا* در ماهی‌های آلوده در سطح شهر مشاهده نشد. تنوع قارچ‌های شناسایی شده در این تحقیق نسبتاً محدود بود، زیرا دقت نتایج به دلیل استفاده از روش تعیین توالی ژنی افزایش یافته است. در این مطالعه، چهار نمونه از *کلادوسپوریوم*، چهار نمونه از *کاندیدا*، دو نمونه از *پنی‌سیلیوم* و دو نمونه از قارچ‌ها با کمک توالی ژنی معکوس شناسایی شدند و ویژگی‌های آنها در بانک ژن جهانی ثبت شد. این موضوع در تکمیل اطلاعات همه‌گیر شناسی عفونت‌های

قارچی ماهیان زینتی و پرورشی اهمیت زیادی دارد. از میان ۴۰ نمونه مورد بررسی در این مطالعه، تقریباً ۸۰٪ از آنها به‌طور قابل تشخیصی توالی‌یابی شدند و در بانک ژن ثبت گردیدند. در برخی از موارد، باوجود ضایعات مشابه به *سaproولگنیا* اولسراتیو، نمونه قارچی جداسازی نشد یا از نظر ژنتیکی تایید نگردید. در نمونه شماره 11F، آزمایش توالی‌سازی در دو مرحله انجام شد و نمونه‌های OL964278 و MZ161202 به عنوان *کاندیدا* زیلانوئیدس در بانک NCBI معرفی شدند. توالی این مخمر ۹۸٪ مشابه با NR-163770 و FR676936 بود که پیش‌تر ثبت شده‌اند. نمونه 21R به عنوان گونه *پنی‌سیلیوم* با کد OL912958 در NCBI ثبت شد که ۹۰٪ مشابه KY552628 بود، که نوعی از *پنی‌سیلیوم* است. به همین ترتیب، نمونه 33F با کد OL912959 به عنوان گونه *پنی‌سیلیوم* معرفی شد، اما بیشترین شباهت را به کد MG025872 در NCBI داشت که ۹۸٪ مشابه به *آلترناریا* بود. نمونه 81F به عنوان گونه *کلادوسپوریوم* معرفی شد که ۱۰۰٪ با نمونه NR-158360 مطابقت داشت. عدم شناسایی دقیق گونه‌های عامل بیماری قارچی در نمونه‌های توالی‌شده شماره‌های ۱۱، ۲۱، ۳۳، ۴۹ و ۵۰ نشان‌دهنده وجود شکاف‌های علمی در تشخیص دقیق عوامل بیماری‌زا و تنوع وسیع این موجودات زنده است. در این رابطه، یافته‌های نگارندگان با گزارش‌های محققانی که اعلام کرده‌اند قارچ *سaproولگنیا* دارای بیشترین شیوع در ماهی‌های زینتی است، همخوانی ندارد. *کلادوسپوریوم* یک قارچ جهانی، مقاوم و ساپروفیت است. این قارچ می‌تواند در محیط مناسب رشد یابد و پوست، آبشش‌ها، اولسرها و زخم‌ها را آلوده کند. این در حالی است که بهبود زخم در محل‌هایی که هیف‌ها از طریق عروق پوستی حمله کنند، متوقف می‌شوند (Polglase, 2019). در مطالعه دیگری *آسپرژیلوس*، *موکور*، *پنی‌سیلیوم*، *سaproولگنیا*، *اسکوپولاریوپسیس*، *فوزاریوم*، *کرولاریا* و *ریزوپوس* در دو ماهی زینتی گرمسیری شناسایی شدند (Iqbal and Sajjad, 2013). محققان ایرانی گونه‌های *آلترناریا*، گونه‌های *آسپرژیلوس*، گونه‌های *پنی‌سیلیوم*، *سaproولگنیا* و سایر گونه‌های قارچ جداسازی شده از تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد مطالعه قرار دادند (Shahbazian et al., 2010). برخی از کپک‌های فرصت‌طلب مانند گونه‌های *فوزاریوم*، *موکور*، *سaproولگنیا* و *پنی‌سیلیوم* می‌توانند باعث عدم لقاح و مرگ ۲۲ درصد از تخم‌های ماهی استرلیاد شوند (Novakov et al., 2018; Magray et al., 2020). شیوع بالا در کپور معمولی، گلدفیش،

همچنین مشاهدات نشان داد که بیماری‌های قارچی در مراکز فروش ماهیان زینتی بیشتر ناشی از سوء مدیریت است تا یک عامل بیماری‌زای خاص، زیرا بیشتر عوامل عفونی ناشی از استرس‌های مختلف بوده است. این گزارش هشدار ضروری به صنعت پرورش ماهیان زینتی تهران بود.

منابع

- Abdallah, M.T., Khalaf, H.M. and Muhsin, A.H., 2020. Histopathological study of *Cinnamomum zeylanicum* aqueous extract and *Cladosporium* sp. Extract on different albino male mice organs. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 928(6), 062007. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/928/6/062007>
- Abdulrahman, M.S., Hefny, H.M., Mansy, M.S. and Mekawey, A.A., 2022. Genetic Diversity Of *Cladosporium* Species Isolated From Air Of Cairo, Egypt Using Microsatellite Primed Pcr (Mp-pcr) And Universally Primed Pcr (Up-pcr) Techniques. *Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University*, 60(1), 7-21. <https://doi.org/10.54634/2090-9101.1028>
- Armwood, A.R., Cañete-Gibas, C.F., Dill-Okubo, J.A., Wiederhold, N.P. and Camus, A.C., 2021. Retrospective study of phaeohyphomycosis in aquarium-housed fish, with first descriptions of *Exophiala lecanii-corni* and *Neodevriesia cladophorae* in fish. *Journal of fish diseases*, 44(10), 1563-1577. <https://doi.org/10.1111/jfd.13477>
- Fafioye, O.O., Fagbohun, T.R. and Olubanjo, O.O., 2008. Fungal infestation and nutrient quality of traditionally smoke-dried freshwater fish. *Turkish Journal of fisheries and Aquatic sciences*, 8(1), 7-13.

سیچلاید دهان آتشی، دم شمشیری سبز، گرین ترور، سیلور دالر، اسکار و گوپی احتمالاً با توجه به حجم کم نمونه‌ها اغراق آمیز است. در نتیجه، اندازه نمونه بزرگتر امکان تعیین دقیق‌تر میزان شیوع گونه‌های قارچی را فراهم می‌کند. بسیاری از قارچ‌ها مانند گونه‌های کلادوسپوریوم، آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم فلور قارچی طبیعی هستند که باعث بیماری قارچی می‌شوند. همچنین بیشتر قارچ‌ها پاتوژن‌های فرصت‌طلب در نظر گرفته می‌شوند که به‌ندرت باعث ایجاد بیماری‌هایی مانند آسپرژیلوزیس و عفونت پنی‌سیلیوم می‌شوند (Seyedmousavi et al., 2013). این عوامل قارچی احتمالاً از طریق محیط زیست و عمدتاً از طریق خوراک ماهی پخش می‌شوند (Saleem et al., 2012).

نتیجه‌گیری

عوامل قارچی در عفونت‌های آکواریومی به عنوان عامل مهمی در تشخیص ضایعات مزمن ماهیان زینتی مطرح هستند. اگرچه گونه‌های کانید/ در این مطالعه بیشتر دیده شدند، اما چندین جنس دیگر از قارچ‌ها نیز نقش مهمی در عفونت‌های فرصت‌طلب دارند. به دلیل تنوع این قارچ‌ها و محدودیت‌های روش‌های شناسایی سنتی، روش‌های تشخیصی مولکولی جامع و کمی، مؤثرترین و کارآمدترین راه‌ها برای شناسایی و شفاف‌سازی عفونت‌های قارچی پیچیده هستند. با بررسی بیشتر ضایعات با استفاده از این تکنیک‌های تشخیصی، ارگان‌سِم‌هایی که قبلاً با عفونت‌های بالینی ارتباط داده نشده بودند، گزارش خواهند شد و قارچ‌هایی که قبلاً ناشناخته و غیرقابل شناسایی بودند، شناسایی خواهند شد. گونه‌های قارچی که در حال حاضر به عنوان عوامل بیماری‌زا شناخته نمی‌شوند، ممکن است در آینده به عنوان عوامل مهم در عفونت‌های پوست یا آبشش ماهیان شناسایی شوند. این بررسی میکروبی نشان می‌دهد که قارچ‌ها به عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب اهمیت بیشتری نسبت به آنچه که قبلاً گزارش شده‌اند، دارند و مطالعه حاضر تأثیر این عوامل بیماری‌زا کمتر گزارش شده را نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه، تعیین این مساله بود که هر قارچ بیشتر کدام ماهی‌های تهران را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در این رابطه تفاوتی ندارد که عامل جزو فلور یا عامل بیماری‌زای اولیه باشد. همچنین در این مطالعه در نظر بود که گونه و جنس‌های جدید قارچی شناسایی و معرفی گردند.

- Gjessing, M.C., Steinum, T., Olsen, A.B., Lie, K.I., Tavoranpanich, S., Colquhoun, D.J. and Gjevre, A.G., 2019. Histopathological investigation of complex gill disease in sea farmed Atlantic salmon. *PLoS One*, 14(10), e0222926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222926>
- Hafez, E., 2016. Saprolegniosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Identification, molecular characterization and phylogenetic analysis of two novel pathogenic *Saprolegnia* spp. strains. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29, 43-49. <https://doi.org/10.1080/08997659.2016.1259691>
- Iqbal, Z. and Sajjad, R., 2013. Some pathogenic fungi parasitizing two exotic tropical ornamental fishes. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15 (30).
- Ke, X., Wang, J., Li, M., Gu, Z. and Gong, X., 2010. First report of *Mucor circinelloides* occurring on yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) from China. *FEMS Microbiology Letters*, 302(2), 144-150. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01841.x>
- Kot, A.M., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S. and Kurcz, A., 2020. Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. *Journal of Microbiological Methods*, 176, 105999. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105999>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- LaDouceur, E.E., Leger, J.S., Mena, A., Mackenzie, A., Gregg, J., Purcell, M., Batts, W. and Hershberger, P., 2020. *Ichthyophonus* sp. Infection in Opaleye (*Girella nigricans*). *Veterinary Pathology*, 57(2), 316-320. <https://doi.org/10.1177/0300985819900015>
- Magray, A.R., Ganai, B.A. and Ahmad, F., 2020. Isolation, identification and pathogenicity patterns of *Mucor hiemalis* in cultured *Cyprinus carpio communis* using challenged system. *Aquaculture*, 518, 734837. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734837>
- Mohamed, O.G., Khalil, Z.G. and Capon, R.J., 2021. N-Amino-l-Proline Methyl Ester from an Australian Fish Gut-Derived Fungus: Challenging the Distinction between Natural Product and Artifact. *Marine Drugs*, 19(3), 151. <https://doi.org/10.3390/md19030151>
- Novakov, N., Mandić, V., Kartalović, B., Vidović, B., Stojanac, N., Kovačević, Z. and Plavša, N., 2018. Comparison of the efficacy of hydrogen peroxide and salt for control of fungal infections on brown trout (*Salmo trutta*) eggs. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46, 5. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.82813>
- Özcan, F. and Arserim, N.B., 2022. Fungal Diseases in Fish. *Black Sea Journal of Agriculture*, 5(1), 48-52. <https://doi.org/10.47115/bsagriculture.983345>
- Polglase, J.L., 2019. Cephalopod Diseases Caused by Fungi and Labyrinthulomycetes. In: GESTAL, C., PASCUAL, S., GUERRA, Á., FIORITO, G. & VIEITES, J. M. (eds.) *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, 113-122.
- Rupp, M., Pilo, P., Müller, B., Knüsel, R., von Siebenthal, B., Frey, J., Sindilariu, P.D. and Schmidt-Posthaus, H., 2019. Systemic infection in European perch with thermoadapted virulent *Aeromonas salmonicida* (*Perca fluviatilis*). *Journal of Fish Diseases*, 42(5), 685-691. <https://doi.org/10.1111/jfd.12970>
- Sakaguchi, S.O., Ogawa, G., Kasai, H., Shimizu, Y., Kitazato, H., Fujikura, K. and Takishita, K., 2019. Molecular identification of water molds (oomycetes) associated with chum salmon eggs from hatcheries in

- Japan and possible sources of their infection. *Aquaculture International*, 27, 1739-1749 .
- Saleem, M.J., Hannan, A. and Qaisar, T.A., 2012.** Occurrence of Aflatoxins in Maize Seed under Different Conditions. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14(3), 473-476.
- Sarkar, P., Raju, V.S., Kuppusamy, G., Rahman, M.A., Elumalai, P., Harikrishnan, R., Arshad, A. and Arockiaraj, J., 2022.** Pathogenic fungi affecting fishes through their virulence molecules. *Aquaculture*, 548, 737553. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737553>
- Seyedmousavi, S., Guillot, J. and De Hoog, G.S., 2013.** Phaeohyphomycoses, Emerging Opportunistic Diseases in Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 19-35. <https://doi.org/10.1128/cmr.00065-12>
- Shahbazian, N., Ebrahimzadeh, M.H., Soltani, M., Khosravi, A.R., Mirzargar, S. and Sharifpour, I., 2010.** Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on Saprolegniaceae. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9 (1), 151-160 .
- Shahraki, M.M., Asgari, M.R., Khamesipour, F. and Raissy, M., 2014.** Prevalence of *Argulus foliaceus* and fungal infections in some ornamental fishes [discus (*Symphysodon discus*), dwarf gourami (*Trichogaster lalius*) and guppy (*Poecilia reticulata*)] in Isfahan City of Iran. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 20, 817-820. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.10844>
- Storesund, J.E., da Silva Nylund, C., Karlsbakk, E., Giulietti, L., Bao, M., Cipriani, P. and Levsen, A., 2022.** High prevalence of *Ichthyophonus* sp. infections in Northeast Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Journal of Fish Diseases*, 45(8), 1243. <https://doi.org/10.1111/jfd.13652>
- Tamura, K. and Nei, M., 1993.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tartor, Y., Taha, M., Mahboub, H. and El Ghamery, M., 2018.** Yeast species associated with diseased fish: Occurrence, identification, experimental challenges and antifungal susceptibility testing. *Aquaculture*, 488, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.033>
- Van Burik, J.A., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A. and Myerson, D., 1998.** Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*, 36(5), 299-303. <https://doi.org/10.1080/02681219880000471>
- Wang, M.M., Shenoy, B. D., Li, W. and Cai, L., 2017.** Molecular phylogeny of *Neodevriesia*, with two new species and several new combinations. *Mycologia*, 109(6), 965-974. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1415075>
- Yanong, R.P., 2003.** Fungal diseases of fish. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 6(2), 377-400. [https://doi.org/10.1016/s1094-9194\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/s1094-9194(03)00005-7)

Evaluation of the various fungal infection of the skin and gills using pathology, culturing, and molecular fungal DNA sequencing of the freshwater ornamental fish

Ebrahimi Jafari M.¹; Bayat M.^{1*}; Haghighi Khiabani Asl A.¹; Hashemi Hazaveh S.J.¹

*dr_mansour_bayat@yahoo.com

1- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Specialized Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

In aquaculture, diseases cause tremendous economic losses, and fungal infections are one of the main factors responsible for mortality and economic losses among the ornamental and food fish farming industries. This study focuses on isolating and identifying fungi from different parts of Tehran (I.R. of Iran). The 92 ornamental fish from some pet fish supply stores with clinical signs were selected. The study demonstrated that only 43 of those 92 samples were infected with mold and yeast. The histopathological results revealed that the pathogen established initial infection on and inside the gills, cutaneous and subcutaneous. The special stains were cultured and microscopically examined, followed by PCR and sequencing to detect the fungi. They identified *Cladosporium* spp. (53%), *Candida* spp. (18.7%), *Penicillium* spp. (12.5%), *Aureobasidium pullulans* (3%), and *Rhodotorula* yeast (3%). The sequence data were compared with previously published data for identification with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) via GenBank. According to the presented study, in 14(63%) cases, there was no similar sample in the NCBI.

Keywords: Mycotic infection, Ornamental fish, Pathology, Culturing, PCR, DNA Sequencing