JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۳: ۱۲-۱

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های باکتری مولد استرپتوکوکوزیس جدا شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استان کردستان

رئوف زندی[۱]، بهنام سلیمی*[۲]، هیوا کریمی دره آبی[۳]

۱- دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۲- استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۳- استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۹ خرداد ۹۴ تاریخ پذیرش: ۲۰ فروردین ۱۳۹۵

چکیده

در طی چند سال اخیر استرپتوکوکوزیس یکی از معضلات مهم مزارع ماهیان سردآبی کشور بوده است که مسبب تلفات و ضررهای اقتصادی هنگفتی شده است. در این پژوهش با توجه به شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس، نمونه برداری از ۱۵۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان که دارای علائم بالینی استرپتوکوکوزیس بودند در فصول گرم سال از مجتمع پرورش ماهیان سردآبی پالنگان واقع در استان کردستان اخذ گردید. کشت باکتریایی به روش استاندارد از کلیه، کبد و طحال ماهیان بر روی محیط‌های کشت BA و TSA انجام گردید، محیط‌های کشت بمدت ۵-۳ روز در انکوباتور ۲۲ درجه سانتیگراد گذاشته شد پس از خالص سازی و انجام تست‌های بیوشیمایی و مولکولی گونه‌های باکتری جداسازی گردید. پس از تهیه کشت باکتریایی نمونه‌های اخذشده در محیط کشت مولر هینتون براث، آن‌ها از نظر کدورت با لوله ۰/۵ مک فارلند مقایسه شدند (تعداد باکتری $۱۰^{۹}$-$۱۰^{۸}$). سپس جهت انجام تست آنتی بیوگرام برروی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. نتایج مطالعات نشان داد که گونه استرپتوکوکوس اینیایی بیشترین حساسیت را به ترتیب نسبت به انروفلوکساسین، فلورفنیکل، داکسی سایکلین، اریترومایسین، اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین، لینکواسپکتین، نئومایسین و کانامایسین دارد. همچنین بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به باسیتراسین، لینکومایسین، فلومکوئین، سولفادیازین/ترمتوپریم گزارش گردید. استرپتوکوکوس آگالاکتیه نسبت به لینکومایسین و باسیتراسین مقاومت داروئی داشته و نسبت به آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین، داکسی سایکلین، فلورفنیکل، لینکواسپکتین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، اریترومایسین، کانامایسین، نئومایسین، فلومکوئین، تری متوپریم، سولفادیازین وسولفامتوکسازول/ تری متوپریم حساسیت بالایی دارد. لاکتوکوکوس گارویه نسبت به باسیتراسین، سولفادیازین/تری متوپریم، لینکومایسین، نئومایسین مقاوم و نسبت به آنتی بیوتیک هائی مانند اریترومایسین، انروفلوکساسین، فلورفنیکل، داکسی سایکلین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، تری متوپریم، فلومکوئین، کانامایسین، لینکواسپکتین و سولفامتوکسازول/تری متوپریم حساسیت آنتی بیوتیکی دارد. نتایج مطالعات نشان داد که هر سه گونه باکتری جدا شده مولد استرپتوکوکوزیس که می‌توانند علائم بالینی مشابهی را در ماهیان قزل الا ایجاد نمایند نسبت به آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین، فلورفنیکل وداکسی سایکلین بیشترین حساسیت و نسبت به باسیتراسین، سولفادیازین/تری متوپریم و لینکومایسین بیشترین مقاومت را نشان داده‌اند. برای جلوگیری از افزایش مقاومت، باید از مصرف بی‌رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها ممانعت کرده و قبل از استفاده، کشت باکتریایی وتست آنتی بیوگرام صورت گیرد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوزیس، مقاومت آنتی بیوتیکی، ماهی قزل آلای رنگین، استان کردستان.*

* *نویسنده مسئول: بهنام سلیمی*

آدرس: دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران. . تلفن: ۰۹۱۸۳۷۴۰۰۶۹

پست الکترونیک: bsalimi@iausdj.ac.ir

مقدمه

بسیاری از بیماری‌های باکتریایی ماهی، از یک طرف مسبب تلفات و ضرر اقتصادی بالا در مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان شده و از طرفی دیگر موجب افزایش مصرف آنتی بیوتیک ها و کاهش کیفیت و سلامت گوشت ماهی بعنوان یک منبع پروتئینی با ارزش می گردد. از جمله بیماری‌های مهم باکتریایی در آبزی پروری، استرپتوکوکوزیس یا انتروکوکوزیس می‌باشد که یک بیماری عفونی سپتیسمیک در ماهیان آب‌های شیرین و شور است. این بیماری به صورت مزمن یا حاد و معمولاً در زمینه وجود استرس‌های مختلف بروز می کند (۱). طی چند سال اخیر بیماری استرپتوکوکوزیس یا انتروکوکوزیس یکی از معضلات مهم مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی بوده که مسبب تلفات و ضررهای اقتصادی هنگفتی شده است (۴).

عفونت‌های استرپتوکوکی در ماهی یک بیماری سپتی سمیک است که سبب مرگ و میر بالا (حتی بیش از ۷۵٪) در صنعت تولید ماهی می گردد (۲۰، ۲۱ و ۲۴). اولین بار در سال ۱۹۵۷ سپتی سمی استرپتوکوکال در قزل آلای رنگین کمان پرورشی در شیزوکا واقع در ژاپن گزارش گردید (۱۶). ده سال بعد از آن مایر و رابینسون (۱۹۶۶) دو همه گیری از عفونت‌های استرپتوکوکسی در ماهی گلدن شاینر (*Notemigonus crysoleucus*) گزارش کردند. پس از آن پلمپ و همکاران (۱۹۷۲) گونه‌ای از استرپتوکوکوس را در بیش از ۵۰٪ ماهیان بیمار از یک همه گیری در مصب خلیج‌های واقع در فلوریدا و سواحل خلیج آلاباما مکزیکو در ایالات متحده آمریکا جداسازی کردند (۲۳). از آن پس بیماری به هر دو صورت انفرادی و همه گیری در ماهیان پرورشی آب شیرین و شور بسیاری مناطق دنیا اتفاق افتاده است. این بیماری در بیش از ۴۰ گونه ماهی اعم از ماهیان پرورشی و وحشی، ماهیان آب شور، شیرین و نیز ماهیان زینتی وجود دارد (۲۴ و ۲۵). علائم بالینی خارجی ماهیان مبتلا به استرپتوکوکوزیس شامل: بیرون زدگی چشم، کدورت قرنیه، شنای چرخشی، تیرگی پوست و خون ریزی در اطراف پایه باله‌ها و چشم است (۱). شنای ماهیان به صورت عمودی و یا به پهلو می‌باشد و ماهی تعادل در شنا ندارد. این موضوع مرتبط به تهاجم باکتری به مغز می‌باشد که همین تهاجم یکی از عوامل مرگ در ماهیان است. علائم بالینی داخلی شامل رنگ پریدگی کبد، پرخونی و اسپلینومگالی (تورم طحال)، خونریزی اطراف قلب و بعضاً سطح احشاء است. همچنین در بعضی از ماهیان، تخریب کامل کره چشم و کدورت قرنیه نیز وجود دارد (۱ و ۱۵). حدود ۱۵ گونه باکتری از چهار جنس *استرپتوکوکوس*، *لاکتوکوکوس*، *انتروکوکوس* و *واگوکوکوس* که همگی باکتری‌های کوکسی شکل گرم مثبت هستند، می‌توانند عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان باشند (۲۶). یکی از گونه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* مسبب این بیماری است که به عنوان یک گونه زئونوز شناخته شده است (۱۳ و ۲۵).

با توجه به گسترش روز افزون صنعت آبزی پروری در کشور و کمبود نیروهای متخصص لازم در زمینه پرورش، بهداشت و بیماری‌های آبزیان، کاربرد داروها و مواد شیمیایی خارج از سیستم صحیح تشخیص و تجویز رسمی صورت گرفته و بدون در نظر گرفتن اثرات این داروها بر روی فاکتورهای رشد، باقی مانده‌های دارویی، اثرات آلایندگی آن‌ها در طبیعت و عوارض سوء این مواد روی انسان (مانند اثرات سمی، واکنش‌های ازدیاد حساسیت، بروز عفونت‌های ثانویه،

اختلالات در سوخت و ساز و اختلالات روی اجزاء اکوسیستم آب و خاک) مصرف می‌شوند. جهت درمان استرپتوکوکوزیس هم استفاده از داروها خصوصاً آنتی بیوتیک ها توسط پرورش دهنده‌ها که بیشتر ناشی از عدم رعایت شرایط استاندارد بهداشتی و پرورشی می‌باشد، در حال گسترش است.

استان کردستان با تولید بالغ بر ۳۰۰۰ تن ماهی قزل آلا در سال، در کشور حائز اهمیت است. یکی از مراکز تولیدی مهم در این استان مجتمع ماهیان سردآبی پالنگان می‌باشد که سالیانه حدود هزار تن ماهی قزل آلای پرورشی را تولید می کند. متاسفانه به نظر می‌رسد که با وجود توسعه کمی مزارع پرورش ماهی، کیفیت تولید از نظر دور بوده است. بطوری که برخی بیماری‌های با عامل باکتریائی ویا ویروسی دراین مزارع مشاهده می‌شوند. ازجمله این بیماری‌ها استرپتوکوکوزیس است که دراین منطقه، به ویژه در فصل‌های گرم شیوع بالائی دارد وهرساله منجر به خسارات اقتصادی فراوانی به پرورش دهندگان ماهی می‌شود. بروزبیماری در سال‌های اخیر همراه با مصرف زیاد وبی قاعده آنتی بیوتیک ها در مزارع پرورش ماهی این مجتمع با هدف پیشگیری ودرمان بیماری بوده است که از دیدگاه بهداشت عمومی مشکلات زیادی را به همراه دارد. بررسی حاضر با هدف مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های باکتری مولد استرپتوکوکوزیس جدا شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان مجتمع ماهیان سردآبی پالنگان استان کردستان به منظور شناخت آنتی بیوتیک های مؤثر بر بیماری ومبارزه تأثیر گذار با آن انجام شده است.

مواد و روش کار

در این پژوهش باتوجه به شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس، نمونه برداری در فصول گرم سال از ۱۵۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان که دارای علائم بالینی استرپتوکوکوزیس بودند از مجتمع پرورش ماهیان سردآبی پالنگان واقع در استان کردستان اخذ گردید. نمونه‌ها بصورت زنده در حداقل زمان ممکن جهت انجام آزمایش به دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج انتقال داده شد. پس از ضدعفونی ناحیه شکمی و باز کردن آن درکنار شعله، نمونه گیری از کلیه، طحال، کبد و قلب انجام شد. نمونه‌ها در محیط BA و **TSA** کشت داده شدند محیط‌های کشت بمدت ۵-۳ روز در انکوباتور ۲۲ درجه سانتیگراد گذاشته شد. تشخیص اولیه گونه‌های باکتری جداشده، پس از رنگ آمیزی، براساس شکل باکتری (مورفولوژی) با آزمون‌های بیوشیمیائی از قبیل: تحرک، کاتالاز، اکسیداز، O/F و KOH سه درصد رشد دردمای ۱۰ درجه سانتیگراد، اوره آز، سیترات، سوربیتول، اندول، وگس- پروسکوئر (VP)، همولیز، لاکتوز، رافینوز، ریبوز، سوربیتول، تره هالوز، سالیسین، آرژینین وآسکولین براساس دستورالعمل‌های موجود انجام شد و تشخیص قطعی با استفاده از روش‌های استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلی مراز انجام شد (۱۴). استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت جداسازی سریع DNA (شرکت **MBST**، ایران) ازکلنی های خالص بوسیله آنزیم پروتئیناز K براساس دستورالعمل سازنده استخراج شد. DNA استخراج شده رادر ۱۰۰µl آب مقطر استریل حل نموده ودر دمای ۲۰°C- نگهداری گردید. بعد از استخراج DNA، طبق روش پیشنهادی (۱۷ و ۱۸)، دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad) را تنظیم نموده تا محصول PCR بدست آید (جداول ۲،۱ و ۳). الگوی پرایمرهای مورد استفاده (طراحی شده توسط سیناژن) در جدول ۴ آمده است. محصولات PCR روی ژل آگارز (٪ ۲-۱/۸) قرار داده

و بوسیله اتیدیوم بروماید ۰/۰۰۵٪ قابل روئیت شد. کنترل منفی (آب مقطر استریل فاقد RNAse و DNAse) و برای کنترل مثبت از (ATCC29178) *Streptococcus iniae*، *Streptococcus agalactiae* (TKS KG+)و *Lactococcus garvieae* (RTCC2051) استفاده گردید.

به منظور شناخت آنتی بیوتیک های مؤثر و مطالعه مقاومت داروئی گونه های جداشده آنتی بیوتیک های رایج به روش دیسک گذاری در محیط مولرهینتون آگار (Germany Merck,) با استفاده از دستورالعمل CLSI(Clinical and Laboratory Standard Institute) سنجیده شد (۱۱). دیسک‌های مورداستفاده در این تحقیق (شرکت پادتن طب ایران) شامل: تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اکسی تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، داکسی سایکلین (۳۰ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، فلوموکوئین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، لینکومایسین (۲ میکروگرم)، لینکواسپکتین (۱۵/۲۰۰ میکروگرم)، باسیتراسین (۰/۰۴ واحد بین المللی)، نئومایسین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم (۵ میکروگرم)، سولفامتوکسازول/تری متوپریم (۲۳/۷۵/ ۱/۲۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم) و سولفادیازین/ تری متوپریم (۲۳/۷۵/ ۱/۲۵ میکروگرم) می‌باشد.

نتایج

نتایج آزمایشات انجام شده روی باکتری‌های جدا شده از ماهیان دارای علائم بالینی که به روش بیوشیمیایی و PCR بررسی شدند، وجود سه گونه باکتری *استرپتوکوکوس اینیائی*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *لاکتوکوکوس گارویه* را تأیید نمود که میزان ابتلاء ماهیان به این سه گونه در جدول ۵ و نمودار ۱ بیان شده است.

نتایج بررسی حساسیت گونه‌های باکتری جداشده نسبت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده در جدول ۵ و نمودارهای ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. همچنین نتایج بررسی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی گونه‌های جدا شده درجدول ۵ و نمودارهای ۵، ۶ و ۷ بیان شده است.

جدول ۱-پروفایل حرارتی *استرپتوکوکوس اینیائی*

Stage	Temprature	Time	Cycle number
Primary denaturation	94	5Min	1
denaturation	92	1 Min	30
annealing	55	1 Min	30
extension	72	90sec	30
Final extension	72	5 Min	1

جدول ۲-پروفایل حرارتی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*

Stage	Temprature	Time	Cycle number
Primary denaturation	95	3Min	1
denaturation	94	1 Min	30
annealing	85	1 Min	30
extension	72	1 Min	30
Final extension	72	10 Min	1

جدول ۳-پروفایل حرارتی *لاکتوکوکوس گارویه*

Stage	Temprature	Time	Cycle number
Primary denaturation	95	4Min	1
denaturation	94	1 Min	30
annealing	57	1 Min	30
extension	72	1 Min	30
Final extension	72	5 Min	1

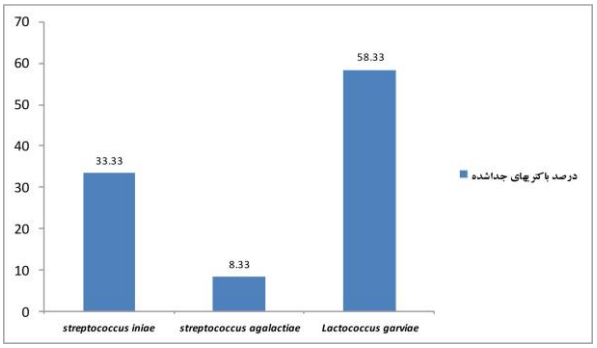
جدول ۴- جفت نوکلئوتیدهای استفاده شده درآزمایش PCR

جفت پرایمر	توالی پرایمر	ژن هدف	PCR Amplicon طول جفت باز (bp)	Pathogen	منبع
LOX-1 LOX-2	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	IctO	۸۷۰	S.iniae	Mata et al., 2004
PlG-1 PlG-2	CATAACAATGAGAATCGC GCACCCTCGCGGGTTG	16S rRNA	۱۱۰۰	L.garvieae	Mata et al., 2004
FW/BW (V1/V2)	V1:5′-TTTGGTGTTTACACTAGACTG-3 V2: 5′-TGTGTTAATTACTCTTATGCG-3′	16S rRNA	۱۲۰	S.agalactiae	Meiri-Benedek et al., 2002

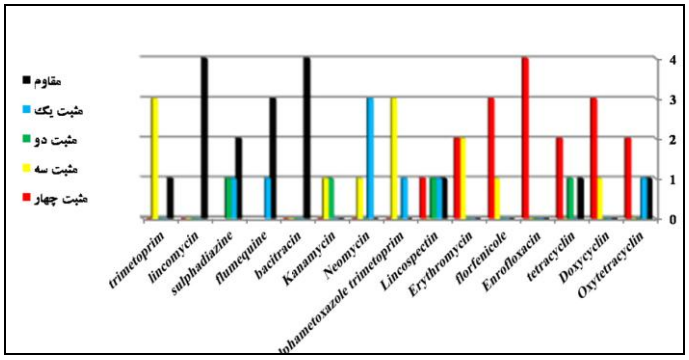
جدول ۵- جدول درصد ابتلا ودرصد مقاومت آنتی بیوتیکی وحساسیت آنتی بیوتیکی گونه‌های پاتوژن استرپتوکوکوزیس

	درصد ابتلا	تایید تشخیص توسط PCR	Trimethoprim	Sulphadiazin/ Trimethoprim	Kanamycin	Enrofloxacin	Doxycycline	Florfenicol	Lincospectin	Lincomycin	Bacitracin	Tetracycline	Oxytetracycline	Flumequine	Erythromycin	Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	Neomycin
Lactococcus garviea	58.3%	+	S4	R 85.7%	S3	S4	S4	S4	R 28.%	R 71.4%	R 85.7%	S4	S4	S4	S4	S1	R 28.2 ٪
Streptococcus iniae	33.3%	+	R 25%	R 50%	S2	S4	S4	S4	S2	R 100%	R 100%	S4	S4	R 75%	S4	S3	S1
Streptococcus agalactiae	8.3%	+	S4	S4	S4	S4	S4	S4	S4	R 100%	R 100%	S4	S4	S4	S4	S4	S4

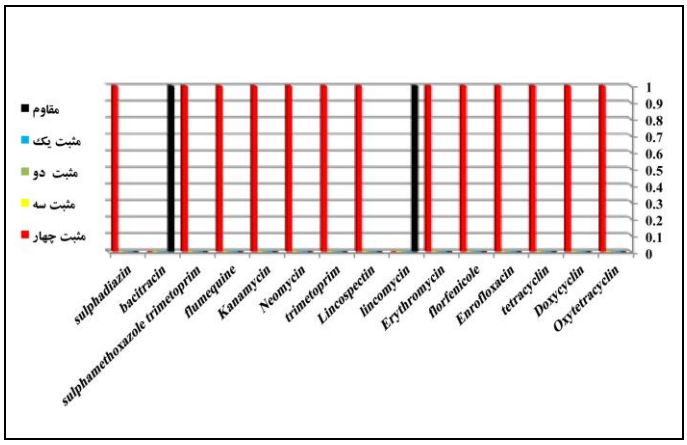
R=Resistance S=Sensitivity



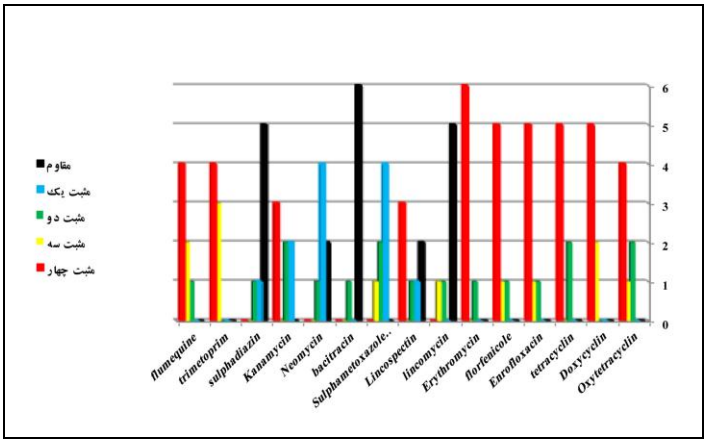
نمودار ۱- مقایسه درصد باکتری‌های جداشده عامل استرپتوکوکوزیس



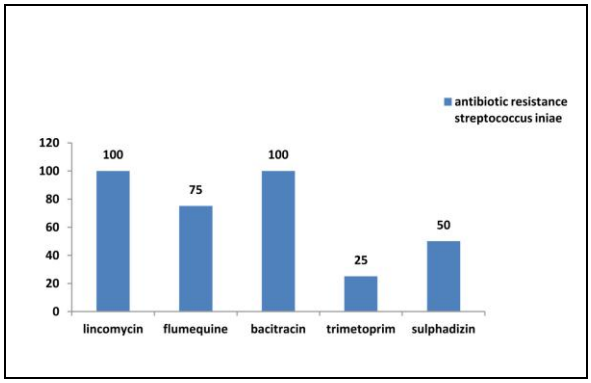
نمودار ۲- حساسیت آنتی بیوتیکی *Streptococcus iniae*



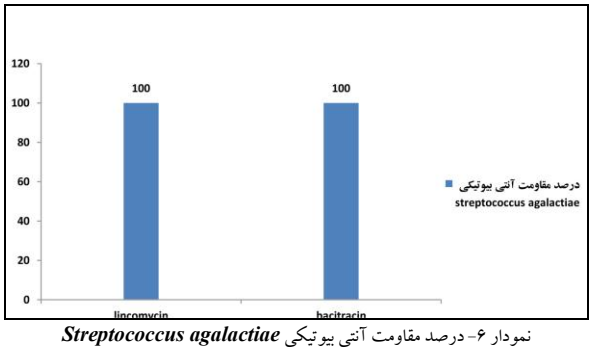
نمودار ۳- حساسیت آنتی بیوتیکی *Streptococcus agalactiae*



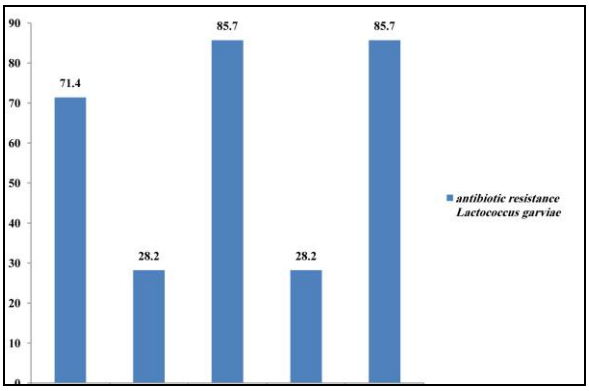
نمودار ۴- حساسیت آنتی بیوتیکی ***Lactococcus garviea***



نمودار ۵- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی *Streptococcus iniae*



نمودار ۶- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ***Streptococcus agalactiae***



نمودار ۷- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی *Lactococcus garvieae*

بحث و نتیجه گیری

استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس از جمله بیماری‌های باکتریایی هستند که با تلفات و خسارات فراوانی در ماهیان آب شیرین و شور همراه هستند. باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به همراه برخی باکتری‌های جنس *استرپتوکوکوس* که از آن جمله می‌توان به *استرپتوکوکوس اینیائی* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* اشاره کرد متعلق به خانواده استرپتوکوکاسه می‌باشند و عامل مهم بروز سپتی سمی و تلفات بالا در مزارع پرورش ماهی به ویژه در قزل آلای رنگین کمان محسوب می‌شوند (۷). تحقیقات نشان داده است که استرپتوکوکوزیس در ماهیان پس از بروز یک استرس شدید اتفاق افتاده است. یکی از عوامل استرس زا تغییر درجه حرارت آب می‌باشد. بطوری که در تحقیقی روی ماهی تیلاپیا موزامبیکا (*Oreochronis mossambicus*)، باکتری *استرپتوکوکوس اینایی* با دز ۱×۱۰^{۷} به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و ماهیان آلوده در ۵ رژیم دمائی مختلف شامل ۱۹،۲۳،۲۷،۳۱ و ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان مرگ ومیر ماهیان در دمای ۱۹ و ۳۵ درجه سانتیگراد بطور معنی داری بیش از سایر دماها بوده است. قابل ذکر است که درجه حرارت مناسب رشد تیلاپیا ۲۲-۳۰ درجه سانتیگراد است بیماری ممکن است بصورت حاد سبب مرگ و میر بالائی طی ۳-۲ هفته در فصول با درجه حرارت بالای آب می‌گردد. با این وجود، بیماری ممکن است به صورت مزمن وقتی دمای آب پایین‌تر است وجود داشته باشد و مرگ ومیر کمتر اما مداوم ماهیان را به دنبال داشته باشد (۱۹). همچنین در بررسی بروز استرپتوکوکوزیس و شناسائی باکتری‌های مسبب آن در مزارع منتخب تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان مازندران نتایج نشان دادن که استرپتوکوکوزیس در فصول بهار، تابستان وپائیز که افزایش دمای آب وجود دارد بیماری مشاهده گردید اما در فصل زمستان که دمای آب کاهش می‌یابد، اثری از این بیماری دیده نمی‌شود که با افزایش دما در فصل بهار بروز مجدد بیماری مشاهده می‌گردد و در تابستان به اوج خود می‌رسد (۳).

بروز استرپتوکوکوزیس در مزارع مجتمع تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان پالنگان استان کردستان عمدتاً از اواخر خرداد ماه تا اوایل شهریور رخ می‌دهد. لیکن وجود آلودگی در گله تا اواخر آبان قابل ردیابی است. در زمان بروز بیماری درجه حرارت آب معمولاً ۱۶ تا ۲۱ درجه سانتیگراد بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در استان کردستان، استرپتوکوکوزیس یک بیماری فصلی است و با افزایش درجه حرارت

آب، احتمال بروز آن افزایش می‌یابد و انتظار روبرو شدن با این بیماری از اواخر بهار تا اواخر تابستان می‌باشد ودر زمستان به دلیل کاهش دما بروز بیماری کمتر مشاهده می‌شود.

به دلیل شباهت زیاد علایم ظاهری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس تشخیص تفریقی تنها با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و به ویژه مولکولی امکان پذیر است؛ ولی در هر صورت به دلیل شباهت زیاد در منظره بالینی، معمولاً هر دو بیماری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس با هم اشاره می‌شوند. این دو بیماری در کشورهای مختلف گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به گزارش بیماری در اسپانیا (۲۲)، ایتالیا (۱۵)، استرالیا وآفریقای جنوبی (۱۰)، تایوان و انگلستان (۹)، فرانسه و کشورهای منطقه بالکان (۱۲) وکره (۸) اشاره کرد. در ایران نیز در سال‌های اخیر هم زمان با توسعه مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان شاهد بروز همه گیری با عوامل فوق در مراکز پرورش ماهی هستیم. در مطا لعه ای که حقیقی وهمکاران در سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در خصوص شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس ولاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در هفت استان کشور انجام شد، نشان دادند که میزان آلودگی به *استرپتوکوکوس اینیایی* ۵۹/۲٪ و میزان آلودگی به *لاکتوکوکوس گارویه* ۴۰/۸٪ بوده است (۱۴). همچنین در مطالعه‌ای که شریف زاده وهمکاران روی میزان شیوع لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان‌های جنوب و جنوب شرقی ایران انجام دادند، نشان دهنده میزان آلودگی به *لاکتوکوکوس گارویه* به میزان ۱۶٪ است و نتایج تست‌های آنتی بیوگرام حاکی از حساسیت این گونه به اریترومایسین، انروفلوکساسین، کلرامفنیکل و کلاریترومایسین است (۵). همچنین در مطالعه فراوانی ومقاومت داروئی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* که توسط رئیسی و همکاران (۱۳۹۲) روی ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استان چهارمحال وبختیاری انجام دادند، نشان دهنده مقاومت چندگانه همه جدایه ها به آنتی بیوتیک های رایج بود. حداقل و حداکثر مقاومت داروئی در مورد آنتی بیوتیک های جنتامایسین و انروفلوکساسین به ترتیب ۳۰/۷ و ۶۵/۴ مشاهده شد (۲). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که از ۱۵۰ قطعه ماهی زنده بیمار مورد بررسی سه گونه باکتری مولد استرپتوکوکوزیس جدا شد که ۵۸/۳۳٪ آلودگی مربوط به *لاکتوکوکوس گارویه*، ۳۳/۳۳٪ مربوط به *استرپتوکوکوس اینیائی* و ۸/۳۳٪ مربوط به *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* می‌باشد. همه مطالعات بالا نشان دهنده گسترش بیماری یاد شده در مزارع پرورش قزل آلاست. عوامل مختلفی را در گسترش و انتقال دخیل می‌دانند که از آن جمله می‌توان به انتقال مستقیم از طریق آب، جابجایی و ورود ماهیان آلوده به کارگاه و یا تغذیه اشاره کرد. تأثیر دما و وضعیت کیفی آب به عنوان عامل مستعد کننده بروز بیماری قبلاً توسط اوستین و همکاران نیز تاکید شده است (۷). باکتری هم زمان با افزایش دمای آب فعالیت بیشتری می‌کند و بیماری‌زایی خود را به ویژه در شرایط نامناسب بهداشتی و مدیریتی نشان می‌دهد به ویژه اینکه در برخی مناطق حداقل فاصله مجاز بین مزارع پرورش ماهی رعایت نشده است که خود باعث مضاعف شدن مشکل می‌شود در کل بروز همه گیری به ویژه در مناطق پر تولید کشور با ضرر و زیان‌های زیادی برای صنعت پرورش ماهیان سرد آبی کشور همراه است. همچنین باید در نظر داشت که بیماری ناشی از *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیائی* در گروه بیماری‌های قابل انتقال

به انسان قراردارد (۱۳ و ۲۷). که این مسئله خود اهمیت بیماری را دو چندان می کند. در چنین شرایطی نیاز به اتخاذ سیاست‌های مؤثر و عملی در جهت مقابله با بیماری از قبیل واکسیناسیون و برنامه ریزی در راستای ریشه کنی بیماری ضروری است. از سوی دیگر شیوع بیماری در سال‌های اخیر همراه با مصرف زیاد و بی‌قاعده آنتی بیوتیک های مختلف در مزارع پرورش ماهی قزل آلا باهدف پیشگیری و یا درمان بیماری بوده است که مشکلات زیادی را به دنبال دارد. نتایج این بررسی نشان دهنده مقاومت بالای دارویی گونه *لاکتوکوکوس* و گونه های *استرپتوکوکوس* است، به طوری که میزان مقاومت جدایه ها درمورد *لاکتوکوکوس گارویه* که درصد بیشتری از آلودگی رانشان داده است نسبت به آنتی بیوتیک های رایج از ۲۸/۲٪ مربوط به نئومایسین و لینکواسپکتین تا ۸۵/۷٪ مربوط به باسیتراسین و سولفادیازین/ تری متوپریم تغییر می کند و در مورد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* نسبت به دو نوع آنتی بیوتیک لینکومایسین و باستراسین بیشترین مقاومت داروئی راداشته است. همچنین درمورد *استرپتوکوکوس اینیائی* میزان مقاومت داروئی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج از ۲۵٪ مربوط به تری متوپریم تا ۱۰۰٪ مربوط به لینکومایسین و باسیتراسین متغیراست، ضمن اینکه تمامی جدایه ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند. لازم به ذکر است که هر سه گونه باکتری جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین، فلورفنیکل و داکسی سایکلین بیشترین حساسیت را نشان داده‌اند. انصاری و همکاران (۲۰۱۱) هم مقاومت‌های آنتی بیوتیکی را از گونه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* جداسازی شده از مزارع پرورشی استات چهار محال بختیاری گزارش نمودند (۶).

بدیهی است که مصرف زیاد آنتی بیوتیک ها در سال‌های اخیر منجر به پدید آمدن مقاومت‌های دارویی و انتقال آن به سایر باکتری‌ها می‌شود که خطر ناشی از آن نیازی به تاکید مجدد ندارد. نتایج این مطالعه نشان دهنده آلودگی زیاد مزارع پرورش ماهی قزل آلادر مجتمع پالنگان استان کردستان با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بود که با توجه به شرایط نامناسب مدیریتی و فاصله کم مزارع پرورش ماهی از یکدیگر، بیماری به آسانی به مزارع هم جوار منتقل می‌شود. در این میان واکسیناسیون ماهیان علیه *لاکتوکوکوس* ودوگونه *استرپتوکوکوس* جداشده از این مجتمع به عنوان یکی از راهکارهای مؤثر پیشگیری از بیماری پیشنهاد می‌شود. علاوه بر آن باید توجه داشت چنانچه استفاده بی قاعده از آنتی بیوتیک ها ادامه یابد شاهد بروز مقاومت‌های بیشتر آنتی بیوتیکی در گروه‌های مختلف باکتری‌ها خواهیم بود که برای صنعت پرورش ماهی و همچنین سلامت مصرف کنندگان خطر بزرگی محسوب می‌شود.

منابع

۱. آذری تاکامی، ق. (۱۳۸۵). *مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری ودرمان بیماری‌های ماهی*. چاپ اول، انتشارات پریور، صفحات ۳۱۲-۳۰۵.

۲. تاجبخش، ا.، رئیسی، م.، شهرانی، م. (۱۳۹۳). مطالعه فراوانی ومقاومت داروئی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استان چهارمحال و بختیاری. *فصلنامه علمی- پژوهشی زیست شناسی میکروارگانیسمها*، سال سوم، شماره ۱۱، صفحات ۷۸-۷۱.

۳. قیاسی، م.، زاهدی، ا.، خوشباور، ح.، رستمی، ب. (۱۳۷۹). بررسی اپیدمی *استرپتوکوکوزیس* در ماهیان مولد قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران. اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان، ۲۷-۲۵ بهمن ۱۳۷۹، اهواز.

۴. مظلومی، م. (۱۳۸۲). *استرپتوکوکوز، آنتروکوکوز بیماری‌های مهم اقتصادی در پرورش ماهی*، چاپ اول، انتشارات نوید شیراز، صفحات ۱۰-۲.

5. Akhlagi, M., Mostafavizadeh, S.M., Sharifiyazdi, H., Tabatabaei, M. (2010). Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from disease rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* **11**: 342-50.
6. Ansari, M., Raissy, M. (2011). Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *African Journal of Biotechnology* **8**:1473-76.
7. Austin, B., Austin, D. (1993). *Bacterial Fish Pathogen, Diseases in Farmed and Wild Fish.* Ellis Horwood Limited, Springer, Germany. pp: 27-37 and 70.
8. Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K., Park, S.C. (2006). Isolation and characterization of *streptococcus sp*. from disease flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. *Journal of Veterinary science* **7**: 53-8.
9. Bark, S., McGregor, D. (2001). The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. *Journal of Trout News* **31**: 9-11.
10. Carson, J., Gudcovs, N., Austin, B. (1993). Characteristics of an *Enterococcus* like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Disease* **6**: 381-8.
11. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). *Preformance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing*, 15th Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania, USA.
12. Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G., Chilomonczyk, S., (2004). Clonality of the diversity of the fish Mediterranean countries. *Applied Environmental Microbiology* **70**: 32-41.
13. George, T.T. (1999). Canadian doctors confirm the infection and effects of *Streptococcus iniae* in fish and humans. *Contributed Papers Aquaculture Canada* **98**: 87-9.
14. Haghighi Karsidani, S., Soltani, M., Nikbakhat Brojeni, G., Ghasemi, M., Skall, H.F. (2010).Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis/lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* **2**: 198-209.
15. Ghittino, C., Prearo, M. (1992). Report of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **8**: 4-11.
16. Hoshina, T., Sano,T. Morimoto, Y. (1958). A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of Tokyo University of Fisheries* **44**: 57-68.
17. Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F. (2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied Environmental Microbiology* **70**: 3183-7.
18. Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedmann, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S., (2002). PCR-Based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Journal of Dairy Science* **85**: 1717-23.
19. Ndong, D., Chen, Y.Y., Lin, Y.H., Vaseeharan, B., Chen, J.C. (2006). The immune response of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Journal of fish and shellfish Immunology* **22**: 686-94.
20. Nguyen, H.T., Kanai, K., Yoshikoshi, K. (2002). Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichtyus olivaceus*) using selective isolation procedures. *Journal of Aquaculture* **205**: 7-17.
21. Nomoto, R., Munasinghe, L.I., Jin, D.H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T., Yoshida, T. (2004). Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *Journal of Fish Diseases* **27**: 679-86.
22. Palacios, M.A., Zamora, M.J., Vasquez, J., Zamora, E., Duran, A. (1993). Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Bollettino Societa' Italiano Patologia Ittica* **13**: 6-11.

23. Plumb, J.A., Schachte, J.H., Gaines, J.L., Peltier, W. **(**1974**)**. *Streptococcus sp.* from marine fishes along the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archive of Biology and Technology* **53**: 87-92.
24. Romalde, J.L., Toranzo, A.E. (2002). Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. *Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries* **3**: 211-33
25. Roach, J.C.M., Levett, P.N. and Lavoie, M.C. (2006). Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems. *Journal of Microbiological Methods* **67:** 20-6.
26. Sako, H. (1998). Studies on *Streptococcus iniae* infection in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Bulletin Nansei Natural Fisheries Research Institute* **31**: 63-120.
27. Wang, C.Y.C., Shie, H.S., Chen, S.C., Hung, J.P., Hsie, H. T.C., Wen, F.C., Wu, D. (2007). *Lactococcus garvieae* infections in human: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice* **61**: 68-73.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 2, 2016

Investigating Antibiotic Susceptibility in Species of Bacteria Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) with Streptococcosis in Kurdistan Province

Zandi, R.[1], Salimi, B.[2*], Karimi Dareh Abi, H.[3]

1. Graduated Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of veterinary medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
2. Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of veterinary medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
3. Assistant Professor , Department of Food Hygiene, Faculty of veterinary medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Received Date: 9 June 2015 *Accepted Date:8 April 2016*

Abstract

Over the last few years, Streptococcus has been one of the serious difficulties in the cold-water fish farms and caused massive economic losses. With respect to outbreak of Streptococcus disease, the survey was carried out in warm seasons using 150 rainbow trout fish with clinical symptoms of streptococcosis. The specimens were randomly collected from Palanghan cold-water fish farm complex located in Kurdistan province. Specimens for bacteria culture were obtained from kidney, liver, and spleen of fish and were cultured on culture media of TSA and BA. Bacterial culture was implemented at the temperature of 220°C for 3-5 days. Species of bacteria were determined following purification using biochemical and molecular tests. The opacity resulted from the culture of specimens in Muller Hinton Broth's culture medium were compared with McFarland's tube 5% (the number of bacteria 108-109). Then, Muller Hinton Agar's medium was used for performing antibiogram. It was observed that Streptococcus iniae was sensitive to Enrofloxacine, Florfenicole, Doxycycline, Erythromycin, Oxytetracycline, Tetracycline, Lincomycin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Kanamycin and Neomycin, and resistant to Bacitracin, Lincomycin, Flumequine and Sulfadiazine / Trimethoprim. Streptococcus agalactiae was resistant to Lincomycin and Bacitracin. Moreover, Streptococcus agalactiae was sensitive to Enrofloxacine, Doxycycline, Florfenicole, Lincomycin, Tetracycline, Oxytetracycline, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin, Flumequine, Sulfadiazine/Trimethoprim and Sulfamethoxazole /Trimethoprim. Additionally, Lactococccus garvieae was resistant to Bacitracin, Sulfadiazine/Trimethoprim, Lincomycin and Neomycin, and sensitive to Erythromycin, Enrofloxacin, Florfenicole, Doxycycline, Tetracycline, Oxytetracycline, Trimethoprim, Flumequine, Kanamycin, Lincospectin and Sulfamethoxazole/Trimethoprim. The results indicated that the three isolated species of bacteria causing streptococcosis disease, which could create similar clinical signs in trout, were resistant to Bacitracin, Sulfadiazine/Trimethoprim and Lincomycin. In conclusion, in order to avoid growing bacterial resistance and to take the most effective decision in terms of antibiotic therapy, usage of antibiotics without antibiogram must be avoided.

Keywords: *Streptococcosis; Antibiotic Resistances; Rainbow trout; Kurdistan province*

**Corresponding author: Salimi, B.*
Address: Department of Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of veterinary medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. Tel: 09183740069
Email:Bsalimi@iausdj.ac.ir