JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره اول، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۰: ۵۸-۴۹

مطالعه عوامل خطر شیوع استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای رنگین کمان استان های فارس و لرستان

مهدی سلطانی[1*]، اسماعیل پیرعلی خیرآبادی[2]، علی طاهری میرقائد[3]، اشکان زرگر[3]، سمیرا محمدیان[2]، شقایق روح الهی[2]، مهدی زکیان[4]

۱- استاد گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- اداره کل سازمان دامپزشکی استان لرستان، خرم آباد، لرستان، ایران

تاریخ دریافت:۲۰ بهمن ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۳

چکیده

استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس از بیماری‌های مهم، اقتصادی و زئونوز در صنعت آبزی پروری بویژه برای ماهی قزل آلای رنگین کمان می باشند، به طوری که خسارات سالانه ناشی از آن‌ها به دهها میلیون دلار می رسد. با توجه به گسترش این بیماری در مزارع قزل آلای کشور در این مطالعه اقدام به شناسایی تعداد ۲۰ فاکتور خطر این بیماری‌ها در تعداد ۳۸ مزرعه قزل آلا واقع در دو استان فارس (۱۶ مزرعه) و استان لرستان (۲۲ مزرعه)، نمونه گیری و کشت باکتریایی از ماهیان بیمار و همچنین مطالعات مولکولی به منظور تایید بیماری در مزارع مذکور اقدام شد. نتایج حاصله نشان داد که ارتباط مستقیمی بین حضور عوامل خطر (۹۰٪) و بروز فرم بالینی بیماری (۱۰۰٪) در این مزارع وجود دارد. شناسایی و تایید بیماری‌ها در این مزارع نیز موجب تایید بیماری مذکور در ۳۰ مزرعه تحت مطالعه گردید. ۱۵ مزرعه واقع در استان فارس و ۱۵ مزرعه در استان لرستان مبتلا به فرم بالینی این بیماری‌ها بودند. بعلاوه نتایج این مطالعه نشان داد که موارد کانون های آلوده به لاکتوکوکوس گارویه به مراتب بیشتر از استرپتوکوکوس اینیایی می باشد. نتایج این مطالعه بیانگر حضور عوامل خطر به میزان قابل توجه همراه با انتشار این بیماری ها در مزارع استان‌های فارس و لرستان می باشد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس، فاکتورهای خطر، فارس، لرستان*

**نویسنده مسئول: مهدی سلطانی*

آدرس: استاد گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۷۰۹۴

پست الکترونیک: msoltani@ut.ac.ir

مقدمه

امروزه با رشد روزافزون جمعیت، موضوع تامین غذا و امنیت غذایی به عنوان یکی از مهمترین نیازهای روزمره می باشد. از اینرو توجه به صنعت آبزی پروری برای تامین بخشی از این نیاز غذایی مورد توجه جدی کشورها قرار گرفته است. کاهش تامین پروتئین حیوانی از طریق صید و صیادی موجب شده تا آبزی پروری با نگاه به افزایش سطح زیر کشت و افزایش تراکم در واحد سطح توسعه یابد و بدیهی است بکارگیری روشهای متراکم و فوق متراکم همراه با توسعه آبزی پروری موجب افزایش مشکلات ناشی از مسائل بهداشتی و بیماری ها می شود. توجه به موقع به روشهای پیش گیری و کنترلی موجب تضمین توسعه پایدار این صنعت می شود. طی دو دهه اخیر در کشور ما صنعت آبزی پروری از رشد خوبی برخوردار بوده است. اما متاسفانه بروز برخی بیماری‌ها و مشکلات بهداشتی موجب بروز خساراتی بر این صنعت گردیده است. در این راستا بروز برخی بیماری ها نظیر استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس موجب بروز خسارات فراوانی به صنعت قزل آلای کشور گردیده است. بیماری‌ها استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس که عمدتا بیماری مرحله پرواری (سایزهای بالای ۱۰۰ گرم) به شمار می روند، می توانند سبب بروز خسارات قابل توجه در مزارع قزل آلای کشور شوند و از آنجائی که عوامل این بیماری ها نیز قابل انتقال به انسان می باشند موضوع بهداشت آن‌ها می‌تواند حائز اهمیت باشد (۱،۳،۴،۷،۸). از طرف دیگر به دلیل مصرف بی رویه داروها و آنتی بیوتیک ها دامنه مقاومت دارویی گسترش یافته و می تواند سلامت مصرف کنندگان و محیط زیست را به خطر اندازد. فاکتورهای متعدد در بروز و گسترش این بیماری‌ها در مزارع قزل آلای کشور نقش دارند که بطور کلی به سه دسته فاکتورهای محیطی، میزبانی و عامل بیماری زا دسته بندی می شوند. لذا با توجه به تنوع سویه های باکتریایی عامل بیماری و مخازن متنوع آن و از طرفی حساس بودن گونه میزبان این گونه قزل آلا زمینه بروز و توسعه بیماری را کاملا فراهم می نماید. در ارتباط با نقش عوامل محیطی نیز مطالعاتی انجام شده که بیانگر نقش فاکتورهای کیفی آب، درجه حرارت بالا و کاهش اکسیژن در تشدید بیماری است (Soltani et al., 2005, 2007, 2009). لذا از آنجائی که شناخت کانون های آلوده و فاکتورهای خطرساز کمک شایانی به روند اقدامات پیش گیری از بیماری می نماید، در مطالعه حاضر ضمن شناسایی کانون های بیماری و تشخیص بیماری در این کانون ها نسبت به شناسایی فاکتورهای خطرساز و تعیین فراوانی نسبی آنها در دو استان پرتولید کشور (لرستان و فارس) اقدام گردیده است.

مواد و روش کار

۱- انتخاب مزارع تحت مطالعه

با توجه به شرح خدمات پروژه و بر اساس هماهنگی و جلسات مشورتی با کارشناسان و مدیران شیلات استان های فارس و لرستان و نیز براساس نظر ناظر شیلاتی پروژه نسبت به شناسایی و تعیین کارگاه‌هایی که طی سال های گذشته سابقه بروز تلفات داشته و یا در معرض برخی فاکتورهای مهم مستعد کننده قرار دارند اقدام گردید. سپس تعداد ۱۶ کارگاه در استان فارس و ۲۲ کارگاه در استان لرستان انتخاب و مورد بازرسی کارگاهی به منظور شناسایی فاکتورهای خطر بروز بیماری و نیز انجام عملیات نمونه‌گیری و کشت باکتریایی قرار گرفتند. عملیات مذکور طی تابستان ۱۳۹۰ لغایت تابستان ۱۳۹۱ انجام گرفت. نام، تاریخ

نمونه گیری و بازرسی کارگاهی از هر یک کارگاه-های مورد مطالعه نیز ثبت گردید.

۲- عملیات بازرسی کارگاهی و شناسایی فاکتورهای خطر

با توجه به اپیدمیولوژی این بیماری ها تلاش گردید تا درصد حضور فاکتورهای خطر برای هر یک از کارگاه های تحت مطالعه با انجام بازرسی دقیق تعیین گردد. بدین منظور تعداد ۲۰ فاکتور عمده خطرساز تعیین و در بازرسی کارگاهی وضعیت حضور یا عدم حضور این فاکتور ها ثبت گردید. این فاکتورها شامل استفاده از رودخانه به عنوان منبع آب، وجود دمای بالای ۱۵ درجه سانتیگراد، عدم اکسیژن کافی (بالای ۷ میلی گرم در لیتر)، وجود کارگاه ماهی در بالادست، وجود روستا در بالادست، وجود فعالیت کشاورزی در بالادست، وجود فعالیت صنعتی در بالادست، عدم کنترل توریست و تردد افراد در کارگاه و در بالادست، عدم قرنطینه لازم، عدم کنترل بهداشتی ورود و خروج تخم چشم زده و بچه ماهی به کارگاه، وجود جانوران خونگرم در کارگاه، عدم کنترل بهداشتی تردد وسایل نقلیه به کارگاه، عدم جمع آوری بهداشتی تلفات و دفن آنها در کارگاه، عدم واکسیناسیون، عدم بکارگیری پرسنل ماهر و تحصیل کرده درکارگاه، عدم رعایت نظافت و بهداشت فردی توسط پرسنل کارگاه، وجود تراکم بالا در استخرها، مشاهده ماهیان با علائم بالینی (کوری، سیاه شدن، کاتاراکت) و تلفات درکارگاه، استفاده از غذاهای تازه و خام و عدم نگهداری بهداشتی آنها در کارگاه و وجود استخرهای لجن زا در کارگاه بودند. در این مطالعه نقش هر یک از این فاکتورها در بروز و تشدید بیماری‌ها بطور مساوی در نظر گرفته شده است.

۳- مطالعات میکروبیولوژیک

۳-۱- نمونه گیری و کشت باکتریایی

به منظور تایید بیماری در مزارع تحت مطالعه، ابتدا ماهیان دارای علایم بالینی شامل کوری، اگزوفتالمی، سیاه شدن و زخم های پوستی، تورم شکم و شنای کند انتخاب و به تعداد حداقل ۱۰ ماهی از هر مزرعه برداشت گردید. سپس در شرایط استریل و پس از کالبد گشایی، از کلیه قدامی آنها روی محیط ژلوز خوندار کشت باکتریایی انجام شد و پلیت‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. در مرحله بعد، از کلنی های رشد یافته ابتدا رنگ آمیزی گرم تهیه و پس از اطمینان از خلوص پرگنه و تعیین مورفولوژی و نوع رنگ آمیزی (گرم منفی و یا گرم مثبت) پاساژ ثانویه بعمل آمد. سپس آزمایش کاتالاز و تعیین نوع همولیز در پاساژ ثانوی مشخص و از هر یک از سویه های باکتری جدا شده تعداد ۸ نمونه منجمد (۲۰°C-) تهیه گردید تا در مراحل بعدی برای شناسایی آنها در سطح گونه با استفاده از روش های مولکولی PCR مورد استفاده قرار گیرند

۳-۲- مطالعات مولکولی PCR

به منظور تأیید تشخیص بیماری در مزارع هر یک از سویه های باکتریایی جدا سازی شده از نوع کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی، به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام آزمایش PCR به شرح زیر اقدام گردید.

الف- استخراج DNA

DNA جدایه‌های باکتریایی رشد یافته، بر اساس دستورالعمل کیت Biospin Bacteria Genomic DNA Extraction (Bioflux ژاپن) استخراج و DNA

بدست آمده در تیوب‌های cc ۱/۵ برای مطالعات بعدی در دمای $-20^{o}C$ نگهداری شد. پس از استخراج DNA از جدایه‌های باکتریایی نسبت به مطالعه کمیّت و کیفیت نمونه های DNA با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفوتومتر اقدام شد.

ب- آزمایش PCR برای شناسایی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی*

برای شناسایی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* به ترتیب از روش های توصیه شده توسط Zlotkin et al.1998 و Soltani et al. 2005 استفاده شد. برای این کار از دو جفت پرایمر نشان داده شده در جدول ۱ استفاده گردید. این پرایمرها ناحیه ژن 16S rRNA باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* را شناسایی می نمایند. مواد مورد استفاده برای انجام واکنش PCR شامل µl ۲/۵ بافر PCR ۱۰X ، U ۱/۵ آنزیم تک پلیمراز Dream Taq، µl ۰.۵ از هریک از پرایمرها (30 pmol)، ۲µl از مخلوط dNTP (0.2mM) و ۱۰۰ نانوگرم از نمونه های DNA بوده و برای رساندن حجم نهایی به µl ۲۵ از آب مقطر استفاده گردید. برنامه PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (آمریکا) به ترتیب شامل واسرشته سازی اولیه (یک دور به مدت ۳ دقیقه در $94^{o}C$) و سپس ۳۵ دور شامل واسرشته سازی (۱ دقیقه در $94^{o}C$)، اتصال (۱ دقیقه در $56^{o}C$ برای باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* و $45^{o}C$ برای باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*) بسط (۱/۵ دقیقه در $72^{o}C$) و سپس بسط نهایی (۱۰ دقیقه در $72^{o}C$) انجام گرفت.

محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و باندهای حاصله با استفاده از رنگ Biosafe stain (آلمان)رنگ‌آمیزی و توسط دستگاه مستند ساز ژل ترانس ایلومیناتور Bio-Rad ،XR – plus (USA) عکسبرداری شد.

نتایج

۱-فاکتورهای خطر ساز

نتایج فراوانی نسبی فاکتورهای خطر در دو استان در جدول ۱ نشان داده شده است. فراوانی نسبی حضور تعداد ۱۶ فاکتور خطر مورد مطالعه در استان لرستان بیش از ۵۰٪ بوده است و در مورد ۳ فاکتور آنها این میزان بیش از ۹۰٪ بوده است. (جدول ۲). بعلاوه فراوانی نسبی برای فاکتور " استفاده از غذای خام" و نیز برای فاکتورهای"تراکم بالا" به ترتیب ۴٪ و ۹٪ بود. در خصوص استان فارس نیز فراوانی نسبی مربوط به تعداد ۱۴ فاکتور خطر ۵۰٪≤ بوده است در حالیکه این میزان برای فاکتورهای خطر "استفاده از غذای خام و تر" و "وجود تراکم بالا" به ترتیب ۶٪ و ۱۲٪ بود. بعلاوه فراونی نسبی حضور مربوط به ۹ فاکتور خطر در کارگاه‌های هر دو استان بیش از ۸۰٪ بوده است که از این میان می توان به فاکتورهای خطر وجود دمای بالای $15^{o}C$، عدم کنترل توریست و افراد در کارگاه و در بالادست، عدم قرنطیه لازم، عدم کنترل بهداشتی ورود و خروج تخم چشم زده و بچه ماهی، وجود جانوران خونگرم مانند سگ و گربه در کارگاه، عدم واکسیناسیون، عدم وجود بکارگیری پرسنل ماهر و تحصیل کرده، عدم رعایت نظافت و بهداشت فردی توسط پرسنل کارگاه و مشاهده ماهیان با علائم بالینی مانند کوری، سیاه شدن و کاناراکت اشاره نمود.

۲-کشت باکتریایی

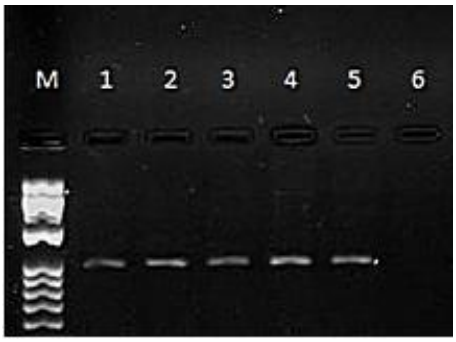
نتایج حاصل از کشت باکتریایی در استان لرستان نشان داد که از ۲۲ کارگاه مورد نمونه گیری در تعداد

۱۲ (فراوانی ۵۰٪) کارگاه سویه های کوکسی گرم مثبت، در یک کارگاه (فراوانی ۴/۵٪) سویه های باسیل گرم منفی، در یک کارگاه (فراوانی ۴/۵٪) هر دو سویه های کوکوباسیل گرم منفی و باسیل گرم منفی ، در دو کارگاه (فراوانی ۹/۰۹٪) هر دو سویه های کوکوسی گرم مثبت و کوکوباسیل گرم منفی جداسازی و در شش کارگاه (فراوانی ۲۷/۲٪) نتیجه کشت باکتریایی منفی بود (جدول ۲). سویه های باکتریایی مذکور برای شانزده کارگاه (۷۲/۷۲) فقط کاتالاز منفی، در سه کارگاه (۱۳/۶٪) فقط کاتالاز بودند. بعلاوه از نظر خاصیت همولیز این سویه ها در هفت کارگاه (۳۱/۸٪) فقط از نوع بتا(β)، هفده کارگاه (۷۲/۲۷٪) فقط از نوع گاما(γ) و هفت کارگاه (۳۱/۸۱٪) هر دو نوع بتا و گاما مشاهده شد (جدول ۳).

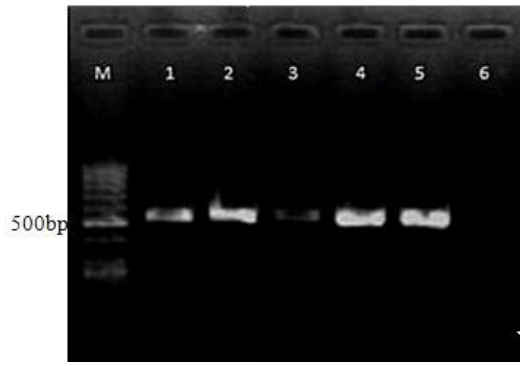
در استان فارس از تعداد ۱۶ کارگاه مورد مطالعه در نه کارگاه (۶۰٪) فقط سویه های کوکسی گرم مثبت، در یک کارگاه (۶/۶٪) کوکوباسیل گرم مثبت در دو کارگاه (۱۳/۳٪) باسیل گرم منفی، در یک کارگاه (۶/۶٪) هر دو سویه کوکوسی گرم مثبت و باسیل گرم مثبت، در یک کارگاه (۶/۶٪) باسیل گرم مثبت و در یک کارگاه (۶/۶٪) نتیجه کشت باکتریایی منفی بود. بعلاوه سویه های باکتریایی مذکور برای ۱۲ (۸۰٪) کارگاه فقط کاتالاز منفی و برای سه کارگاه (۲۰٪) فقط کاتالاز مثبت بود. همچنین در دو کارگاه (۱۳/۳٪) فقط از نوع بتا، در هشت کارگاه (۵۳/۳٪) فقط از نوع گاما، در چهار کارگاه (۲۶/۰۶٪) ازهر دو نوع بتا و گاما مشاهده شد (جدول ۲).

۳-نتایج مطالعات مولکولی (PCR)

نتایج مطالعات مولکولی (PCR) روی جدایه‌های کوکسی گرم مثبت و کاتلاز منفی بدست آمده منجر به شناسایی گونه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* عوامل اصلی استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس گردید. بطوری که رنگ آمیزی ژل های حاصل از محصول PCR تولید باندهای با وزن مولکولی ۱۱۰۰bp (شکل ۱) و ۵۱۳ bp (شکل ۲) نمودند. بر اساس این نتایج در استان لرستان تعداد سیزده کارگاه (۸۶/۶٪) مبتلا به لاکتوکوکوزیس با عامل *لاکتوکوکوس گارویه* و دو کارگاه (۱۳/۳٪) مبتلا به استرپتوکوکوزیس با عامل *استرپتوکوکوس اینیایی* بودند. کارگاه‌های مبتلا به لاکتوکوکوزیس با عامل *لاکتوکوکوس گارویه* در مناطق ازنا، الیگودرز، ناوه کش، الشتر و خرم آباد و کارگاه‌های مبتلا به استرپتوکوکوزیس با عامل *استرپتوکوکوس اینیایی* در مناطق ازنا و خرم‌آباد واقع شده‌اند. در مورد کارگاه‌های استان فارس تعداد دوازده کارگاه (۸۵/۷۱٪) مبتلا به لاکتوکوکوزیس و سه کارگاه (۲۱/۴۲٪) مبتلا به استرپتوکوکوزیس بودند. در این استان کارگاه‌های مبتلا به لاکتوکوکوزیس‌در مناطق مرودشت، کامفیروز، اقلید، سپیدان، خرم بید، چشمه سرخون و ممسنی و کارگاه‌های مبتلا به استرپتوکوکوزیس در مناطق اقلید و سپیدان واقع هستند.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* بدست آمده از مزارع قزل آلای لرستان و فارس، M= مارکر، ۴-۱= جدایه های مورد آزمایش، ۵= کنترل مثبت (*لاکتوکوکوس گارویه* GQ8503761)، ۶= کنترل منفی (*استرپتوکوکوس اینیایی* GQ8503771)



شکل۲- الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* بدست آمده از مزارع قزل آلای لرستان و فارس ، M= مارکر، ۴-۱= جدایه های مورد آزمایش، ۵= کنترل مثبت (*استرپتوکوکوس اینیایی* GQ850377)، ۶= کنترل منفی (*لاکتوکوکوس گارویه* GQ8503761)

جدول۱- جایگاه، توالی، دمای اتصال پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی سویه های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی*

جایگاه	توالی پرایمر ('3→'5)	دمای اتصال(°C)	رفرنس
PLG1	CATAACAATGAGAATCGC	56	Zlotkin *et al*., 1998
PLG2	GCACCCTCGCGGGTTG		
I1	GTCGTAACAAGGTAAGCCGTATCG	45	Soltani *et al*., 2005
I2	CTTACCTTAGCCCCAGTCTAACGAC		

جدول۲. میزان فراوانی نسبی (درصد) حضور فاکتورهای خطر ساز (مستعد کننده) بروز بیماری های استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس در کل کارگاهای قزل آلای تحت مطالعه در استان های لرستان و فارس

شماره	فاکتور خطر ساز (عامل مستعد کننده)	فراوانی نسبی (درصد)		
		استان لرستان n=۲۲	استان فارس n=۱۶	هر دو استان n=۳۸
۱	استفاده از رودخانه به عنوان منبع آب	۷۸	۱۲	۵۰.۲۱
۲	وجود دمای بالای ۱۵ºC	۸۶	۸۱	۸۳.۸۸
۳	عدم اکسیژن کافی (>۷ mg/l)	۸۲	۶۲	۷۳.۵۷
۴	وجود کارگاه ماهی در بالا دست	۷۷	۱۲	۴۹.۶۳
۵	وجود روستا در بالادست	۸۶	۶۲	۷۵.۸۹
۶	وجود فعالیت کشاورزی در بالادست	۸۲	۵۰	۶۸.۵۲
۷	وجود فعالیت صنعتی در بالا دست	۱۴	۱۸	۱۵/۶۸
۸	عدم کنترل توریست و افراد در کارگاه و در بالادست	۸۶	۸۸	۸۶/۸۴
۹	عدم قرنطیه لازم	۸۲	۹۴	۸۷/۰۵
۱۰	عدم کنترل بهداشتی ورود و خروج تخم چشم زده و بچه ماهی	۷۷	۸۷	۸۱/۲۱
۱۱	وجود جانوران خون گرم مانند سگ و گربه در کارگاه	۹۵	۹۳	۹۴/۱۵
۱۲	عدم کنترل بهداشتی تردد وسایل نقلیه به کارگاه	۷۷	۸۱	۷۸/۶۸
۱۳	عدم جمع آوری بهداشتی تلفات و دفن آنها	۷۲	۵۰	۶۲/۷۳
۱۴	عدم واکسیناسیون	۹۶	۱۰۰	۹۷/۶۸
۱۵	عدم وجود بکارگیری پرسنل ماهر و تحصیل کرده	۹۱	۸۱	۸۶/۷۸
۱۶	عدم رعایت نظافت و بهداشت فردی توسط پرسنل کارگاه	۸۶	۸۱	۸۲/۳۱
۱۷	وجود تراکم بالا در کاراه	۹	۱۲	۱۰/۲۶
۱۸	مشاهده ماهیان با علائم بالینی مانند کوری، تیرگی پوست و کاتاراکت	۸۲	۸۸	۸۴/۵۲
۱۹	استفاده از غذاهای تر و خام و عدم نگهداری بهداشتی آنها	۴	۶	۴/۸۴
۲۰	وجود استخرهای لجن زار در کارگاه	۱۴	۱۹	۱۴/۸۴

جدول ۳. برخی مشخصات ایزوله های باکتریایی جداسازی شده از ماهیان مرضی و فراوانی نسبی (درصد) کارگاه‌های با موارد مثبت کشت باکتریایی در استانهای لرستان و فارس

مشخصه پرگنه باکتریایی جداسازی شده از ماهیان مرضی	فراوانی نسبی (درصد) کارگاههای با موارد مثبت کشت باکتریایی		
	استان لرستان n=۲۲	استان فارس n=۱۶	هر دو استان n=۳۸
کوکسی گرم مثبت	۵۰	۶۰	۵۴/۲۱
کوکوباسیل گرم مثبت	۰	۶/۶	۲/۷۷
باسیل گرم منفی	۴/۵	۱۳/۳	۸/۲۰
کوکوسی گرم مثبت بعلاوه باسیل گرم مثبت	۰	۶/۶	۲/۷۷
کوکوباسیل گرم منفی بعلاوه باسیل گرم منفی	۴/۵	۰	۲/۶۰
کوکوسی گرم مثبت بعلاوه کوکوباسیل گرم منفی	۹/۰۹	۰	۵/۲۶
باسیل گرم مثبت	۰	۶/۶	۲/۷۷
منفی (عدم رشد)	۲۷/۲	۶/۶	۱۸/۵۲
کاتالاز منفی	۷۲/۷۲	۸۰	۷۵/۷۸
کاتالاز مثبت	۱۳/۶	۲۰	۱۶/۲۹
همولیز از نوع بتا	۳۱/۸۱	۱۳/۳	۲۴/۰۱
همولیز از نوع گاما	۷۲/۲۷	۵۳/۳	۶۴/۵۴
همولیز از نوع بتا و گاما	۳۱/۸۱	۲۶/۰۶	۲۹/۳۸

بحث و نتیجه گیری

بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس از جمله مهمترین بیماری‌های باکتریایی شناخته شده در صنعت ماهی قزل آلای رنگین کمان، بویژه در مناطقی که از نوسانات شرایط محیطی (مانند درجه حرارت آب) در ایام گرم سال برخوردارند، محسوب می شود. لذا انجام مطالعات مربوط به شناسایی عوامل محیطی مستعدکننده در بروز و تشدید بیماری نقش تعیین کننده در اتخاذ برنامه های پیشگیری و کنترلی این بیماری ها دارد. نتایج حاصل از این مطالعات نشان می دهد که از کل مزارع قزل آلای تحت مطالعه (۳۶ مزرعه) در مورد استان‌های لرستان و فارس، تعداد ۳۰ مزرعه با فراوانی نسبی ۸۰/۹۶٪ به بیماری‌های مذکور با عوامل استرپتوکوکوس اینیایی و *لاکتوکوکوس گارویه* مبتلا بودند. بعلاوه فراوانی نسبی مزارع فاقد بیماری باکتریایی در این دو استان ۱۹/۳٪ بدست آمد. همچنین مطالعات باکتریولوژیک و مولکولی نشان داد که برخی از مزارع قزل آلای استان‌های مذکور علاوه بر وجود فلور باکتریاییطبیعی به بیماری‌های باکتریایی از نوع کوکسی و باسیل گرم مثبت و گرم منفی مبتلا هستند که نیازمند انجام مطالعات بعدی به منظور شناسایی گونه باکتریایی درگیر در این مزارع می باشد. حتی در برخی مزارع تحت مطالعه بروز عفونت های همزمان کوکسی گرم مثبت، باسیل گرم مثبت و یا کوکوباسیل گرم منفی وجود داشته است. در استان لرستان تعداد فراوانی نسبی ابتلا به لاکتوکوکوزیس و استرپتوکوکوزیس به ترتیب برابر ۸۶/۳۶٪ و ۱۳/۳٪ بدست آمد که عمدتا در مناطقی از ازنا، خرم آباد، الیگودرز، ناوه کش بوده است. این فراوانی نسبی در استان فارس بترتیب برابر ۸۵/۷۱٪ (لاکتوکوکوزیس) و ۲۱/۴۲٪ (استرپتوکوکوزیس) بود که در مناطق مختلفی از استان مانند محسنی، سپیدان، خرم بید، اقلید، کامفیروز و مرودشت پراکنده اند. با توجه به نتایج فراوانی نسبی ۸۰/۹۶٪ ابتلا مزارع تحت مطالعه، تعداد قابل توجهی از مزارع قزل آلای این دو استان، درگیر این بیماری ها می باشند. در مطالعه سلطانی و همکاران (۱۳۹۲) نتایج مشابهی برای استانهای چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد بدست آمده است. از جمله علل فراوانی بیشتر ابتلا به لاکتوکوکوزیس با عامل لاکتوکوکوس گارویه در مقایسه با استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی می توان به تنوع بالای مخازن لاکتوکوکوس گارویه که شامل انواعی از جانوران خون گرم می باشد اشاره نمود و از آنجایی که جانوران خونگرم (مانند سگ، گاو، گوسفند و پرنده) به راحتی به منابع آبی مورد استفاده این مزارع دسترسی دارند، لذا به راحتی موجب آلودگی منابع آبی مورد استفاده می شوند. بعلاوه بسیاری از مزرعه داران قزل آلای کشور اقدام به نگهداری و حتی پرورش برخی موجودات خونگرم در کنار مزارع ماهی خود می نمایند که این موضوع خود موجب تشدید آلودگی مزرعه می شود. بنابراین از دیدگاه مدیریت بهداشتی و پیش گیری با توجه به تنوع مخازن باکتری و عدم امکان ضدعفونی آب ورودی به مزارع به دلایل هزینه های بالا و بروز مشکلات محیطی، انجام برنامه های واکسیناسیون بچه ماهیان سالم بر اساس برنامه های زمانی مشخص از جمله مهمترین و بهترین شیوه پیشگیری و کنترل این بیماری‌ها است. بهرحال با توجه به اینکه ماهیان جزء جانوران مهره‌دار خونسرد بوده و سیستم ایمنی آن‌ها مانند جانوران مهره‌دار خونگرم کاملا توسعه یافته نمی باشد، لذا توجه ویژه به شناخت فاکتورهای مستعد کننده در جهت مهار و حذف این فاکتورها نه تنها به پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی از جمله بیماری‌های مذکور کمک

می نماید، بلکه موجب بهبود و کارایی واکسن ها نیز می‌شود. در مطالعه حاضر فراوانی نسبی تعداد ۲۰ فاکتور مستعد کننده ی بروز این بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است و نتایج حاصله نشان می دهد که فراوانی نسبی حضور عوامل مستعد کننده مورد مطالعه در مزارع هر دو استان برای تعداد ۲۰ عامل خطرساز بیش از ۶۲/۹۶٪ بوده است. در حالی که فراوانی عامل استفاده از غذای خام در حدود ۴-۶٪ بوده است. در استان لرستان فراوانی نسبی عوامل مستعد کننده خطرساز برای ۱۶ فاکتور بیش از ۷۰٪ و برای ۱۱ فاکتور خطر بیش از ۸۰٪ بوده است. این در حالیست که فراوانی نسبی حضور بیش از ۱۱ فاکتور در مزارع استان فارس برابر ۶۰٪ و برای ۱۰ فاکتور بیش از ۷۰٪ بوده است (جدول۱). با توجه به بررسی کلی داده ها، فراوانی نسبی حضور عوامل مستعد کننده در مزارع قزل آلای هر دو استان می توان اینگونه نتیجه گیری نمود که اولا وجود عوامل مستعد کننده بروز این بیماری‌ها در مزارع هر دو استان تا حدودی مشابه بوده، ثانیا فراوانی نسبی حضور این عوامل در مزارع هر دو استان بالا می باشد که این خود بیانگر وجود شرایط تقریبا مشابه اکولوژیک، جغرافیایی و محیطی حاکم بر مزارع دو استان تحت مطالعه است که از آن جمله می توان به منابع آبی مورد استفاده برای پرورش قزل آلا مانند منبع آب (چشمه یا رودخانه، دمای آب، اکسیژن آب، حضور ایلات لر و قشقایی در منطقه و دسترسی آسان آنان و دامهای پرورشی برای تامین آب بویژه در ایام ییلاق و قشلاق و افزایش دمای هوا و باطبع دمای آب در ایام اواخر بهار تا اوایل پاییز اشاره نمود. همگی عوامل مذکور بوبژه افزایش دمای آب مزارع در تابستان و فراوانی های حضور مخازن باکتریایی عامل بیماری در مزارع، عدم واکسیناسیون و عدم آموزش های لازم بهداشتی توسط مزرعه داران موجب افزایش بروز بیماری ها در ایام بهار و تابستان می شود. مطالعات Yanong و همکاران (۲۰۰۲) نیز به برخی از این عوامل خطرساز مانند افزایش دمای آب، افزایش تراکم، دستکاری‌ها، کمبود اکسیژن، افزایش مواد معلق آب و نقش آنها در تشدید این بیماری‌ها اشاره داشته است. بعلاوه نامبردگان عدم جمع آوری به موقع تلفات، وجود لجن زارها در استخرها و افزایش رسوبات کف استخرها را به عنوان مخازن باکتریهای عامل بیماری مطرح کرده اند. علاوه بر فاکتورهای مذکور، عواملی مانند فاضلاب های کشاورزی بالادست، عدم کنترل تردد افراد انسانی و جانوران خونگرم به مزارع، عدم اعمال مقررات قرنطینه در موقع نقل و انتقال تخم چشم زده، بچه ماهی و وسایل نقلیه حمل و نقل بین مزارع موجب افزایش ابتلا آنها به این بیماری‌ها می شود (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۲). این موضوع بویژه در مورد کارگاه‌هایی که پشت سر هم واقع شده اند و از منابع آبی یکدیگر استفاده می نمایند حائز اهمیت است. زیرا آب مزارع پایین دست از بار میکروبی بالا از جمله باکتری‌های عامل لاکتوکوکوزیس و استرپتوکوکوزیس، مواد معلق آب، فقدان اکسیژن و دمای بالاتر برخوردار بودند که همگی موجب ایجاد استرس و در نتیجه سبب بیماری‌های مذکور می شود. در جمع بندی کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که اولا مزارع قابل توجهی از کارگاه‌های تحت مطالعه در هر دو استان لرستان و فارس مبتلا به بیماری‌های با عوامل کوکسی گرم مثبت بویژه با عامل *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوزیس اینیایی* درگیر هستند، ثانیاعوامل مستعد کننده متعددی در بروز تشدید این بیماری‌ها در مزارع نقش دارند، ثالثا به علت عدم امکان کنترل و حذف تمامی عوامل مستعد کننده بروز

بیماری‌ها، استفاده از روش واکسیناسیون به عنوان یکی از مهمترین راه‌های پیشگیری و کنترل مدیریت بهداشتی در این مزارع محسوب می شود. بر این اساس ایجاد یک سازوکار عملی برای واکسیناسیون منظم مزارع قزل آلای کشور مورد توجه اکید می باشد. با توجه به بروز هر دو گونه *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* در بروز بیماری‌ها، استفاده از واکسن های دو و چند ظرفیتی قابل توصیه است بویژه واکسن هایی که با استفاده از سویه‌های همان منطقه تهیه شده باشد (انو واکسن ها)، زیرا جدایه‌های باکتریایی از هتروژنیتیکی برخوردارند. البته با توجه به شناسایی نسبتاً کامل عوامل مستعد کننده به این بیماری‌ها در این تحقیق، با افزایش سطح آگاهی پرورش دهندگان، استفاده از نیروی متخصص و آموزش‌های لازم می‌توان تا حدودی در کنترل، پیشگیری و بهبود اثرات واکسیناسیون گام‌های جدی و موثری برداشت.

منابع

1. Agnew, W., Barnes A.C. (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Journal of Veterinary Microbiology* **122:** 1-15.
2. FAO (2011). *The State of Food and Agriculture*. 10/12/2011.
3. Goh, S.H., Driedger, D., Gillett, S., Low, D.E., Hemmingsen, S.M., Amos, M., Chan, D., Lovgren, M., Willey, B.M., Shaw, C., Smith, J.A. (1998). *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 2164-6.
4. Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Orgega, C., Deblas, I., Ruiz, I., Alonso, J.L. (1999). Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*O. mykiss*): dependence on age of diseased fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **19**: 114-9.
5. Soltani, M., Jamshidi, S., Sharifpour, I. (2005). Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin Europian Association of Fish Pathologists* **25**: 95-106.
6. Soltani, M., Alishahi, M., Mirzargar, S., Nikbakhat, Gh.R. (2007). Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **7**: 129-40.
7. Soltani, M., Mousavi, H.A., Mirzargar, S. (2009). Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran. The First International Congress on Aquatic Animal ,f IranIslamic Republic o , Tehran, pp. 27-8.
8. Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I., Olivia-Gironés, O., Múzquiz, J.L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Journal of Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **29**, 177-98.
9. Yung, W., Li, A. (2009). Isolation and characterization of *Streptococcus dysagalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture* **294**: 14-7.
10. Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., Bercovier, H. (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 983-5.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 1, 2015

Study on Streptococcosis and Lactococcosis Outbreaks in Rainbow Trout Farms in Fars and Lorestan Provinces

Soltani, M.[1*], Pirali Kheirabadi, E.[2], Taheri Mirghaed, A.[3], Zargar, A.[3], Mohamadian, S.[2], Roohollahi, Sh.[2], Zakian, M.[4]

1- Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Ph.D. Student, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Lorestan province Veterinary Organization Office, Khoram Abad, Lorestan, Iran

Received date: 9 February 2014 *Acceptance date: 6 May 2014*

Abstract: *Strepococcosis and lactococcosis are economically important zoonotic diseases in aquaculture industry particularly in farmed rainbow trout. The annual loss due to the disease is tens millions USD. Because of the disease occurrence in farmed rainbow trout in Iran, this study was aimed to identify 20 risk factors in 38 trout farm in Fars (16 farms) and Lorestan (22 farms) provinces. Infected fish were sampled for the confirmation of the disease occurrence by bacteriological and molecular methods. The obtained results showed that there was a closed correlation between the presence of the risk factors (90%) and clinical signs (100%) of the disease. Also, bacteriological and molecular diagnosis methods, confirmed that the disease occurrence in 30 trout farms (15 fish farms in Lorestan and 15 fish farms in Fars) were involved in clinical farm of diseases. The results of this study also showed that the number of fish farms infected with Lactococcus garvieae was higher than Streptococcus iniae. Also, presence of both risk factors and clinical signs of the disease were significant in the trout farms of Fars and Lorestan provinces.*

Keywords: *Streptococcosis, Lactococcosis, Risk factors, Fars, Lorestan.*

**Corrosponding author: Soltani, M.*
Address: Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Tel: 021-61117094.
Email: msoltani@ut.ac.ir