

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

رئوف زندی<sup>۱</sup>، بهنام سلیمی\*<sup>۲</sup>، هیوا کریمی<sup>۳</sup> دره آبی<sup>۳</sup>

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 پذیرش: ۲۰ فروردین ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۹ خرداد ۹۴

### 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 آلاهی 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 TSA و BA انجام گردید، محیط‌های کشت بمدت ۵-۳ روز در انکوباتور ۲۲ درجه سانتیگراد گذاشته شد پس از خالص سازی و انجام تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی گونه‌های باکتری جداسازی گردید. پس از تهیه کشت باکتریایی نمونه‌های اخذ شده در محیط کشت مولر هیتون براث، آن‌ها از نظر کدورت با لوله ۰/۵ مک فارلند مقایسه شدند (تعداد باکتری ۱۰<sup>۹</sup>-۱۰<sup>۸</sup>). سپس جهت انجام تست آنتی بیوگرام بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. نتایج مطالعات نشان داد که گونه استرپتوکوکوس اینیایی بیشترین حساسیت را به ترتیب نسبت به انروفلوکساسین، فلورفنیکل، داکسی سایکلین، اریترومايسين، اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین، لینکوسپکتین، نئومايسين و کانامایسین دارد. همچنین بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به باسیتراسین، لینکومايسين، فلومکوئین، سولفادiazین/تری متوپریم گزارش گردید. استرپتوکوکوس آگالاکتیه نسبت به لینکومايسين و باسیتراسین مقاومت دارویی داشته و نسبت به آنتی بیوتیک‌های انروفلوکساسین، داکسی سایکلین، فلورفنیکل، لینکوسپکتین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، اریترومايسين، کانامایسین، نئومايسين، فلومکوئین، تری متوپریم، سولفادiazین و سولفامتوکسازول/تری متوپریم حساسیت بالایی دارد. لاکتوکوکوس گارویه نسبت به باسیتراسین، سولفادiazین/تری متوپریم، لینکومايسين، نئومايسين مقاوم و نسبت به آنتی بیوتیک‌هایی مانند اریترومايسين، انروفلوکساسین، فلورفنیکل، داکسی سایکلین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، تری متوپریم، فلومکوئین، کانامایسین، لینکوسپکتین 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 آلا ایجاد نمایند نسبت به آنتی بیوتیک‌های انروفلوکساسین، فلورفنیکل و داکسی سایکلین بیشترین حساسیت و نسبت به باسیتراسین، سولفادiazین/تری متوپریم و لینکومايسين بیشترین مقاومت را نشان داده‌اند. برای جلوگیری از افزایش مقاومت، باید از مصرف بی‌رویه و خودسرانه آنتی بیوتیک‌ها ممانعت کرده و قبل از استفاده، کشت باکتریایی و تست آنتی بیوگرام صورت گیرد.

**کلمات کلیدی:** استرپتوکوکوزیس، مقاومت آنتی بیوتیکی، ماهی قزل آلاهی 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 قزل‌آلای رنگین کمان شده و از طرفی دیگر موجب افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و کاهش کیفیت و سلامت گوشت ماهی بعنوان یک منبع پروتئینی با ارزش می‌گردد. از جمله بیماری‌های مهم باکتریایی در آبزی پروری، استرپتوکوکوزیس یا انتروکوکوزیس می‌باشد که یک بیماری عفونی سپتسمیک در ماهیان آب‌های شیرین و شور است. این بیماری به صورت مزمن یا حاد و معمولاً در زمینه وجود استرس‌های مختلف بروز می‌کند (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 سپتیسمیک است که سبب مرگ و میر بالا (حتی بیش از ۷۵٪) در صنعت تولید ماهی می‌گردد (۲۰، ۲۱ و ۲۴). اولین بار در سال ۱۹۵۷ سپتیسمی استرپتوکوکال در قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی در شیزوکا واقع در ژاپن گزارش گردید (۱۶). ده سال بعد از آن مایر و راینسون (۱۹۶۶) دو همه‌گیری از عفونت‌های استرپتوکوکی در ماهی گلدن شاینر (*Notemigonus crysoleucas*) گزارش کردند. پس از آن پلمپ و همکاران (۱۹۷۲) گونه‌ای از استرپتوکوکوس را در بیش از ۵۰٪ ماهیان بیمار از یک همه‌گیری 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 همه‌گیری 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 واگنوکوکوس 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 آلاینده‌گی آن‌ها در طبیعت و عوارض سوء این مواد روی انسان (مانند اثرات سمی، واکنش‌های ازدیاد حساسیت، بروز عفونت‌های ثانویه،

### بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های باکتری... ۳

۱۵۰ قطعه ماهی قزل آلائی 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 ضد عفونی ناحیه شکمی و باز کردن آن در کنار 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 جدا شده، 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، سترات، سوربیتول، اندول، و گس - پروسکوئر (VP)، همولیز، لاکتوز، رافینوز، ریبوز، سوربیتول، تری هالوز، سالیسین، آرژنین و آسکولین براساس دستورالعمل‌های موجود انجام شد و تشخیص قطعی با استفاده از روش‌های استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلی مرز انجام شد (۱۴). استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت جداسازی سریع DNA (شرکت MBST، ایران) از کلنی‌های خالص بوسیله آنزیم پروتیناز K براساس دستورالعمل سازنده استخراج شد. DNA استخراج شده رادر  $100 \mu\text{l}$  آب مقطر استریل حل نموده و دردمای  $20^\circ\text{C}$  نگهداری گردید. بعد از استخراج DNA، طبق روش پیشنهادی (۱۷ و ۱۸)، دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad) را تنظیم نموده تا محصول PCR بدست آید (جدول ۱، ۲ 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

اختلالات در سوخت و ساز و اختلالات روی اجزاء اکوسیستم آب و خاک) مصرف می‌شوند. جهت درمان استرپتوکوکوزیس هم استفاده از داروها خصوصاً آنتی بیوتیک‌ها 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 آلائی پرورشی را تولید می‌کند. متأسفانه 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 در این مزارع مشاهده می‌شوند. از جمله این بیماری‌ها استرپتوکوکوزیس است که در این منطقه، به ویژه در فصل‌های گرم شیوع بالائی دارد و هر ساله منجر به خسارات اقتصادی فراوانی به پرورش دهندگان ماهی می‌شود. بروز بیماری در سال‌های اخیر همراه با مصرف زیاد ویی قاعده آنتی بیوتیک‌ها در مزارع پرورش ماهی این مجتمع با هدف پیشگیری و درمان 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 آلائی رنگین کمان مجتمع ماهیان سردآبی پالنگان استان کردستان به منظور شناخت آنتی بیوتیک‌های مؤثر بر بیماری و مبارزه 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

میکرو گرم)، تری متوپریم (۵ میکرو گرم)، سولفامتوکسازول/تری متوپریم (۱/۲۵ / ۲۳/۷۵) میکرو گرم)، کانامایسین (۳۰ میکرو گرم) و سولفادیازین / تری متوپریم (۱/۲۵ / ۲۳/۷۵) میکرو گرم) 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 جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در جدول ۵ و نمودارهای ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. همچنین نتایج بررسی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی گونه‌های جدا شده در جدول ۵ و نمودارهای ۵، ۶ و ۷ بیان شده است.

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

به منظور شناخت آنتی بیوتیک‌های مؤثر و مطالعه مقاومت دارویی گونه‌های جدا شده آنتی بیوتیک‌های رایج به روش دیسک گذاری در محیط مولر هینتون آگار (Germany Merck) با استفاده از دستورالعمل Clinical and Laboratory Standard (CLSI Institute) سنجیده شد (۱۱). دیسک‌های مورد استفاده در این تحقیق (شرکت پادتن طب ایران) شامل: تتراسایکلین (۳۰ میکرو گرم)، اکسی تتراسایکلین (۳۰ میکرو گرم)، داکسی سایکلین (۳۰ میکرو گرم)، انروفلوکساسین (۵ میکرو گرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکرو گرم)، فلوموکوئین (۳۰ میکرو گرم)، اریترومایسین (۱۵ میکرو گرم)، لینکومایسین (۲ میکرو گرم)، لینکواسپکتین (۱۵/۲۰۰ میکرو گرم)، باسیتراسین (۰/۰۴ واحد بین المللی)، نئومایسین (۳۰

جدول ۱- پروفایل حرارتی استرپتوکوکوس اینیائی

| Stage                | Temperature | 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                | Temperature | 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            |

## بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های باکتری... ۵

جدول ۳- پروفایل حرارتی لاکتوکوکوس گارویه

| Stage                | Temperature | 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            |

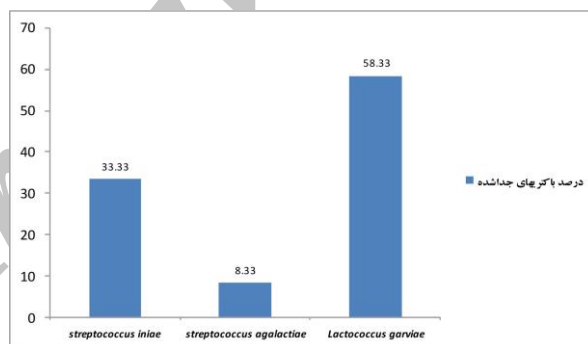
جدول ۴- جفت نوکلئوتیدهای استفاده شده در آزمایش PCR

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

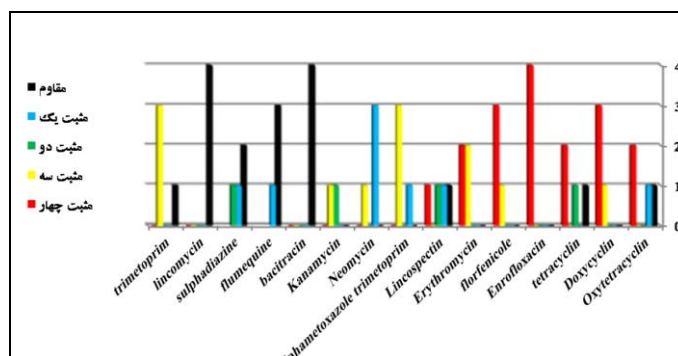
جدول ۵- جدول درصد ابتلا و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی و حساسیت آنتی بیوتیکی گونه‌های پاتوژن استرپتوکوکوزیس

| درصد ابتلا                      | PCR مثبت تشخیص توسط | Trimethoprim | Sulphadiazin/ Trimethoprim | Kanamycin | Enrofloxacin | Doxycycline | Florfenicol | Lincospectin | Lincomycin | Bactracin | Tetracycline | Oxytetracycline | Flumequine | Erythromycin | Sulfamethoxazole/ Trimethoprim | Neomycin |         |
|---------------------------------|---------------------|--------------|----------------------------|-----------|--------------|-------------|-------------|--------------|------------|-----------|--------------|-----------------|------------|--------------|--------------------------------|----------|---------|
| <i>Lactococcus garvieae</i>     | 58.3%               | +            | S4                         | R 85.7%   | S3           | S4          | S4          | S4           | R 28.9%    | R 71.4%   | R 85.7%      | S4              | S4         | S4           | S4                             | S1       | R 28.2% |
| <i>Streptococcus iniae</i>      | 33.3%               | +            | R 25%                      | R 50%     | S2           | S4          | S4          | S4           | S2         | R 100%    | R 100%       | S4              | S4         | R 75%        | S4                             | S3       | S1      |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 8.3%                | +            | S4                         | S4        | S4           | S4          | S4          | S4           | S4         | R 100%    | R 100%       | S4              | S4         | S4           | S4                             | S4       | S4      |

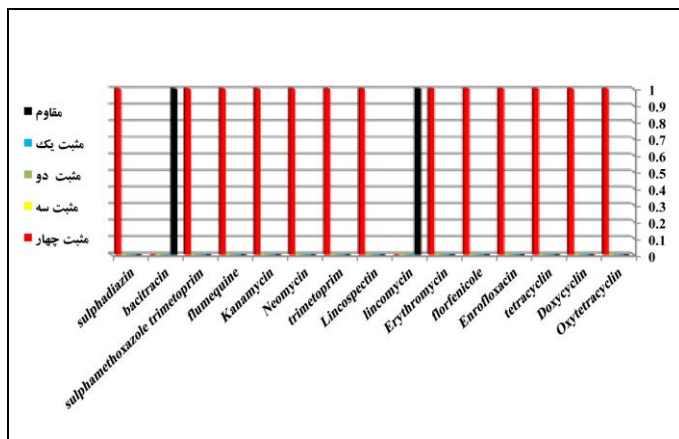
R=Resistance S=Sensitivity



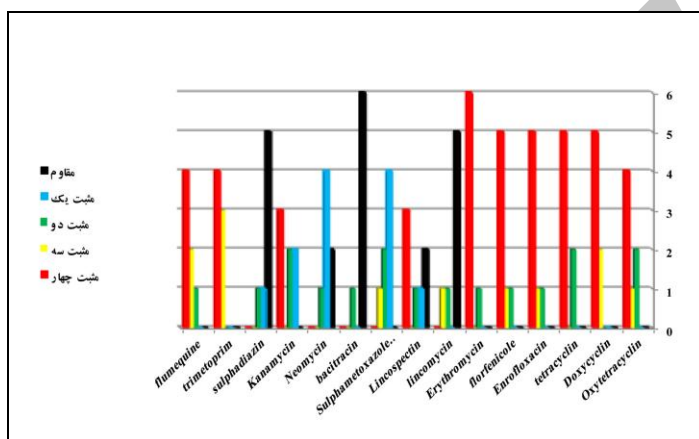
نمودار ۱- مقایسه درصد باکتری‌های جدا شده عامل استرپتوکوکوزیس



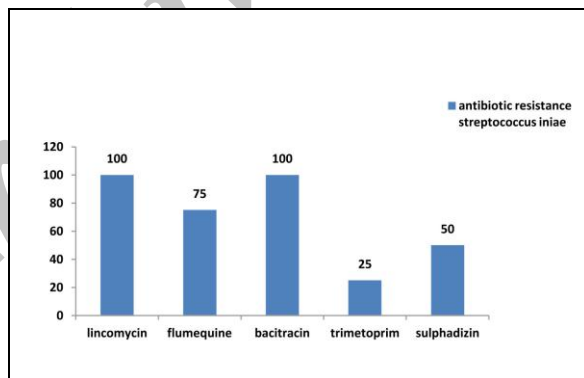
نمودار ۲- حساسیت آنتی بیوتیکی Streptococcus iniae



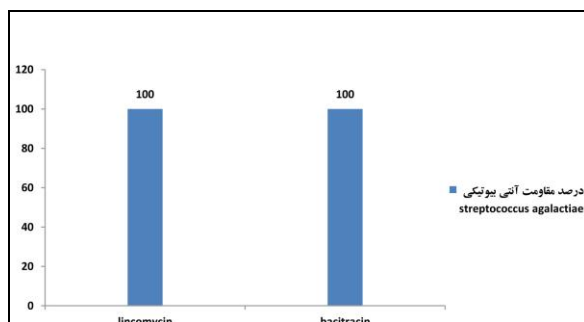
نمودار ۳- حساسیت آنتی بیوتیکی *Streptococcus agalactiae*



نمودار ۴- حساسیت آنتی بیوتیکی *Lactococcus garviea*

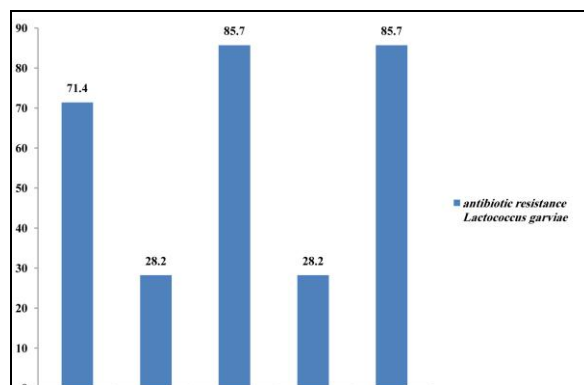


نمودار ۵- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی *Streptococcus iniae*



نمودار ۶- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی *Streptococcus agalactiae*

## بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های باکتری... ۷



نمودار ۷- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی *Lactococcus garvieae*

بیماری ممکن است بصورت حاد سبب مرگ و میر بالائی طی ۲-۳ هفته در فصول با درجه حرارت بالای آب می‌گردد. با این وجود، بیماری ممکن است به صورت مزمن وقتی دمای آب پایین تر است وجود داشته باشد و مرگ و میر 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 آلائی رنگین کمان استان مازندران نتایج نشان داد که استرپتوکوکوزیس در فصول بهار، تابستان و پاییز 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 آلائی 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

## 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 آگلالتیه اشاره کرد متعلق به خانواده استرپتوکوکاسه می‌باشند و عامل مهم بروز سپتی سمی و تلفات بالا در مزارع پرورش ماهی به ویژه در قزل آلائی 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 (*Oreochromis mossambicus*)، باکتری استرپتوکوکوس اینیائی با دز  $1 \times 10^7$  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 و میر 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

کلاریترومایسین است (۵). همچنین در مطالعه فراوانی و مقاومت دارویی باکتری لاکتوکوکوس گارویه که توسط رئیسی و همکاران (۱۳۹۲) روی ماهیان قزل آلاي رنگين کمان در استان چهارمحال و بختیاری انجام دادند، نشان دهنده مقاومت چندگانه همه جدایه ها به آنتی بیوتیک های رایج بود. حداقل و حداکثر مقاومت دارویی در مورد آنتی بیوتیک های جنتامایسین و انروفلوکساسین به ترتیب ۳۰/۷ و ۶۵/۴ مشاهده شد (۲). نتایج پژوهش حاضر نشان می دهد که از ۱۵۰ قطعه هاهی 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 می باشد. همه مطالعات بالا نشان دهنده گسترش بیماری یاد شده در مزارع پرورش قزل آلاست. عوامل مختلفی را در گسترش و انتقال دخیل می دانند که از آن جمله می توان 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 تأکید شده است (۷). باکتری هم زمان با افزایش دمای آب فعالیت بیشتری می کند و بیماری زایی خود را به ویژه در شرایط نامناسب بهداشتی و مدیریتی نشان می دهد به ویژه اینکه در برخی مناطق حداقل فاصله مجاز بین مزارع پرورش ماهی رعایت نشده است که خود باعث مضاعف شدن مشکل می شود در کل بروز همه گیری به ویژه در مناطق پر تولید کشور با ضرر و زیان های 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 بیماری های قابل انتقال

آب، احتمال بروز آن افزایش می یابد و انتظار روبرو شدن با این بیماری از اواخر بهار تا اواخر تابستان می باشد و در زمستان به دلیل کاهش دما بروز بیماری کمتر مشاهده می شود. به دلیل شباهت زیاد علائم ظاهری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس تشخیص تفریقی تنها با استفاده از روش های 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 می شوند. این دو بیماری در کشورهای مختلف گزارش شده است که از آن جمله می توان به گزارش بیماری در اسپانیا (۲۲)، ایتالیا (۱۵)، استرالیا و آفریقای جنوبی (۱۰)، تایوان و انگلستان (۹)، فرانسه و کشورهای منطقه بالکان (۱۲) و کره (۸) اشاره کرد. در ایران نیز در سال های اخیر هم زمان با توسعه مزارع پرورش ماهی قزل آلاي رنگين کمان شاهد بروز همه گیری با عوامل فوق در مراکز پرورش ماهی هستیم. در مطالعه ای که حقیقی و همکاران در سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در خصوص شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلاي رنگين کمان در هفت استان کشور انجام شد، نشان دادند که میزان آلودگی به استرپتوکوکوس اینیائی ۵۹/۲٪ و میزان آلودگی به لاکتوکوکوس گارویه ۴۰/۸٪ بوده است (۱۴). همچنین در مطالعه ای که شریف زاده و همکاران روی میزان شیوع لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلاي رنگين کمان استان های جنوب و جنوب شرقی ایران انجام دادند، نشان دهنده میزان آلودگی به لاکتوکوکوس گارویه به میزان ۱۶٪ است و نتایج تست های آنتی بیوگرام حاکی از حساسیت این گونه به اریترومایسین، انروفلوکساسین، کلرامفنیکل و



بدیهی است که مصرف زیاد آنتی بیوتیک‌ها 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 قزل‌آلادر 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 و دو گونه استرپتوکوکوس جدا شده از این مجتمع به عنوان یکی از راهکارهای مؤثر پیشگیری از بیماری پیشنهاد می‌شود. علاوه بر آن باید توجه داشت چنانچه استفاده بی‌قاعده از آنتی بیوتیک‌ها 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 و درمان بیماری‌های ماهی. چاپ اول، انتشارات پریور، صفحات ۳۱۲-۳۰۵.
۲. تاجبخش، ا.، رئیسی، م.، شهرانی، م. (۱۳۹۳). مطالعه فراوانی و مقاومت دارویی باکتری لاکتوکوکوس گارویه در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در استان چهارمحال و بختیاری. فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسمها، سال سوم، شماره ۱۱، صفحات ۷۸-۷۱.
۳. قیاسی، م.، زاهدی، ا.، خوشباور، ح.، رستمی، ب. (۱۳۷۹). بررسی اپیدمی استرپتوکوکوزیس در ماهیان مولد قزل‌آلای رنگین کمان در استان مازندران. اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان، ۲۷-۲۵ بهمن ۱۳۷۹، اهواز.

به انسان قرارداد (۱۳ و ۲۷). که این مسئله خود اهمیت بیماری را دو چندان می‌کند. 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 بیوتیک‌های مختلف در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا 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 گونه‌های استرپتوکوکوس است، به طوری که میزان مقاومت جدایه‌ها در مورد لاکتوکوکوس گارویه که درصد بیشتری از آلودگی را نشان داده است نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج از ۲۸/۲٪ مربوط به نئوماکسین و لینکواسپکتین تا ۸۵/۷٪ مربوط به باستیراسین و سولفادیازین / تری متوپریم تغییر می‌کند و در مورد استرپتوکوکوس آگالاکتیه نسبت به دو نوع آنتی بیوتیک لینکوماکسین و باستیراسین بیشترین مقاومت دارویی را داشته است. همچنین در مورد استرپتوکوکوس اینیائی میزان مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج از ۲۵٪ مربوط به تری متوپریم تا ۱۰۰٪ مربوط به لینکوماکسین و باستیراسین متغیر است، ضمن اینکه تمامی جدایه‌ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند. لازم به ذکر است که هر سه گونه باکتری جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک‌های 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).

۴. مظلومی، م. (۱۳۸۲). استرپتوکوکوز، آنتروکوکوز بیماری‌های مهم اقتصادی در پرورش ماهی، چاپ اول، انتشارات نوید شیراز، صفحات ۱۰-۲.
14. Haghghi 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 (*Paralichthys 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.
  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 olivaceus*) 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). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing*, 15<sup>th</sup> 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., Chilomunczyk, 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.

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.

Archive

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

Zandi, R.<sup>1</sup>, Salimi, B.<sup>2\*</sup>, Karimi Dareh Abi, H.<sup>3</sup>

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 Enrofloxacin, Florfenicol, 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 Enrofloxacin, Doxycycline, Florfenicol, Lincomycin, Tetracycline, Oxytetracycline, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin, Flumequine, Sulfadiazine/Trimethoprim and Sulfamethoxazole /Trimethoprim. Additionally, *Lactococcus garvieae* was resistant to Bacitracin, Sulfadiazine/Trimethoprim, Lincomycin and Neomycin, and sensitive to Erythromycin, Enrofloxacin, Florfenicol, 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