دو ماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال شانزدهم، شماره ۶، صفحه ۴۷۸ - ۴۶۷ (بهمن و اسفند ۱۳۹۲)
ISMJ 2014; 16(6): 467-478

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زای جداسازی شده از مراکز تکثیر میگو در استان بوشهر

اعظم مقیمی[۱]، محمد افشارنسب[۲]، عقیل دشتیان‌نسب[۳]، مهرزاد مصباح[۴]، وحید یگانه*[۳]

[۱] گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان
[۲] گروه بیماری‌های میگو، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران
[۳] گروه بیماری‌های میگو، پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر
[۴] گروه آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(دریافت مقاله: ۹۰/۶/۲- پذیرش مقاله: ۹۰/۹/۶)

چکیده

زمینه: توسعه سریع میگوپروری باعث گسترش جهانی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور پیشگیری و درمان بیماری‌ها شده است. در آبزی‌پروری و به‌خصوص در مراکز تکثیر میگو از آنتی‌بیوتیک‌ها در سطوح مختلف درمانی و تحت درمانی به‌عنوان پیشگیری و افزایش بهره‌وری غذا استفاده می‌شود. وجود باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در محیط زیست موجب توسعه و ایجاد جمعیت‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد. لذا هدف این تحقیق تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی دو باکتری بیماری‌زای میگو ***Vibrio harveyi*** و ***Vibrio alginolyticus*** که عامل تلفات میگو در مراکز تکثیر می‌باشند، بوده است.

مواد و روش‌ها: پس از جداسازی و شناسایی (توسط تست‌های بیوشیمیایی) دو گونه از باکتری‌های بیماری‌زا از سه مرکز تکثیر میگو در استان بوشهر، گونه‌های باکتری‌های جداسازی شده برای حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، استرپتومایسین، اکسی‌تتراسایکلین و تری‌میتوپریم به‌روش **Disk diffusion** مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که هر سه باکتری ***V. harveyi*** جداسازی شده در سه مرکز تکثیر به اکسی‌تتراسایکلین و تری‌متیوپریم حساس و به استرپتومایسین مقاوم بودند و نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در مرکز تکثیر**A** نیمه حساس، در مرکز **B** مقاوم و در مرکز **C** حساس بود. جدایه‌های ***V. alginolyticus*** شناسایی شده از سه مرکز تکثیر نسبت به استرپتومایسین مقاوم بودند. ولی نسبت به اریترومایسین، اکسی‌تتراسایکلین و تری‌میتوپریم نتایج به‌ترتیب در مرکز **A** مقاوم، نیمه حساس و نیمه حساس در مرکز **B** مقاوم، حساس و حساس و در مرکز **C** نیمه حساس، حساس و حساس را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: *باکتری‌های ویبریوی* جداسازی شده بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به استرپتومایسین و سپس اریترومایسین نشان می‌دهند. با توجه به اینکه این دو آنتی‌بیوتیک مصرف انسانی و دامی زیادی دارند. با ورود باکتری‌های انسانی و دامی مقاوم به این دو آنتی‌بیوتیک از طریق فاضلاب‌ها و روان آب‌ها به دریا و انتقال پلاسمید مقاومت به آنتی‌بیوتیک از باکتری‌های پلاسمیددار مقاوم به *ویبریوها* می‌تواند عامل مقاومت در *ویبریوها* باشد.

واژگان کلیدی: مرکز تکثیر میگو، *ویبریوهاروی*، *ویبریو آلجینولیتیکوس*، آنتی‌بیوتیک

* بوشهر، بهمنی، انتهای خواجه‌ها، پژوهشکده میگوی کشور
E-mail: v.yeganeh@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

از موضوعات مهم در توسعه آبزی‌پروری، بحث بهداشت و بیماری‌های آبزیان است به‌طوری‌که سالانه میلیون‌ها دلار ضایعات اقتصادی ناشی از بیماری‌ها به پرورش دهندگان ماهی و میگو خسارت وارد آمده و یکی از چالش‌های اساسی در تولید آبزیان محسوب می‌شود (۱).

صنعت پرورش میگو در سرتاسر دنیا تحت تأثیر عوامل بیماری‌زای عفونی از قبیل باکتری‌ها و ویروس‌ها می‌باشد. از این مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی می‌توان از ویبریوزیس نام برد که در همه جای دنیا وجود دارد و تمام سخت پوستان از جمله میگو به این بیماری حساس می‌باشند (۲). این بیماری توسط بسیاری از گونه‌های *ویبریو* شامل: *ویبریوهارویی، ویبریو ولنیفیکوس، ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو آلجینولتیکوس، ویبریو پناسیدا* و غیره ایجاد می‌شود (۳).

باکترهایی که در بروز بیماری در میگو درگیر هستند باکترهای فرصت طلب می‌باشند. در شرایط محیطی نامطلوب، باکترهای فرصت‌طلب منجر به بروز بیماری می‌گردند. ویبریوزیس در میگو می‌تواند باعث تلفات، ضایعات جلدی، نکروز، کدر و مات شدن عضلات بدن، تغییر رنگ آبشش‌ها، کاهش رشد، از دست دادن کوتیکول، ایجاد روده سفید، بی‌حالی و کاهش مصرف غذا شود.

مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی در میگو عبارتند از: بیماری ویبریوزیس، بیماری نکروز هپاتوپانکراس (NHP)، بیماری مایکوباکتریوم، بیماری ریکتزیا، بیماری باکتریایی کیتینوز پوسته میگو و بیماری باکتری‌های رشته‌ای میگو. ویبریوزیس در ایران در نقاط مختلف تلفات متفاوتی دارد و بین ۱۰تا ۱۵ درصد تلفات ایجاد می‌نماید. این میزان تلفات در جهان به‌دلیل نوع سیستم پرورشی مورد استفاده بیشتر می‌باشد و ۱۵ الی ۲۰ درصد می‌باشد (۱).

بیماری ویبریوزیس ممکن است با تعدادی سندرم بروز کند که عبارتند از: ویبریوزیس روده‌ای، ویبریوزیس کوتیکولی و اندام ثانویه، موضعی شدن زخم‌ها، بیماری پوستی، ویبریوزیس سیستمیک و عفونت هپاتونکراس (۴).

باکتری‌های خانواده ویبریوناسه، میله‌ای شکل، مستقیم، خمیده، متحرک و دارای تاژک قطبی بوده و در بعضی شرایط خاص محیط کشت، دارای چندین تاژک طرفین می‌باشند. فاقد کپسول، کموارگانوتروف و بی‌هوازی اختیاری هستند. متابولیسم آنها تنفسی و تخمیری است. اغلب آنها اکسیداز مثبت بوده، گلوکز را به‌عنوان منبع کربن و تولید انرژی مورد استفاده قرار می‌دهند. اکثر آنها برای حداکثر رشد نیاز به ۲ تا ۳ درصد کلرید سدیم دارند و در آب‌های شور و شیرین و همچنین حیوانات آبزی یافت می‌شوند (۵).

گونه‌هایی از جنس *ویبریو* که مرتبط با سیستم پرورش میگوی پنائیده می‌باشند، عبارتند از: *ویبریو هارویی، ویبریو اسپلندیدوس، ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو آلجینولیتیکوس، ویبریو آنگوئیلاروم، ویبریو ولنیفیکوس، ویبریو کامپلی، ویبریو فیشری، ویبریو دمسلا، ویبریو پلاژیکوس، و ویبریو اورینتالیس، ویبریو اوردالی، ویبریو لوجی، ویبریو پناسیدا، ویبریو فلوویالیس، ویبریو نرئیس و ویبریو کلرا* (۶).

نشانه‌های بیماری ویبریوزیس در میگوهای جوان و بالغ به دو صورت رفتاری و کلینیکی بروز می‌کند نشانه‌های رفتاری شامل گیجی، ناهماهنگی در شنا و بدون جهت‌یابی مشخص که به تناوب با حالت سستی

Archive of SID

www.SID.ir

و بی‌حالی همراه می‌شود. همچنین ضعف و بی‌اشتهایی و تجمع در مناطق کم عمق آب و لبه‌های استخر در میگوها دیده می‌شود. نشانه‌های کلینیکی به دو صورت عفونت‌های موضعی و عفونت‌های عمومی دیده می‌شود. عفونت‌های موضعی در لارو میگو، به شکل جراحات موضعی قهوه‌ای یا تیره و نکروز اندام‌های حرکتی دیده می‌شود. در میگوهای جوان و بالغ، باعث آلودگی بافت کوتیکول، بافت پوششی، دستگاه تنفس و بافت‌ها ضمیمه آن می‌شود.

همچنین باعث ایجاد جراحاتی به‌شکل نقاط سیاه و قهوه‌ای در قسمت‌های مختلف بافت پوششی و به‌ویژه در سطح پشتی می‌شود. تغییر رنگ پوست، نتیجه ملانین تولیدی توسط سلول‌های خونی میزبان می‌باشد که در روند التهابی دخیل است. عفونت‌های عمومی در لارو میگو با افزایش تعداد زیادی پرگنه باکتریایی در هموسل میگوهای در حال مرگ همراه است. میگوها به‌شدت بی‌اشتها می‌شوند، در نتیجه روده آنها عمو ماً خالی است و نوارهای مدفوع که نشانه تغذیه کامل میگوست، دیده نمی‌شود. نشانه‌ها در میگوهای جوان و بالغ عمو لاً با یک استرس شدید و کدورت رنگ عضلات شکمی، بی‌اشتهایی و انتشار رنگدانه‌های کروماتوفور قرمز در پاهای حرکتی و شنا و کروماتوفور سیاه در سطح شکمی همراه می باشد. همچنین، خم شدن قسمت پشتی در قطعه سوم شکمی بروز می‌کند (۷).

با توجه به پتانسیل ایجاد جهش در ژنوم باکتری مصرف مداوم آنتی‌بیوتیک در مدت زمان طولانی باعث ایجاد سویه‌های مقاوم باکتریایی در مقابل آنتی‌بیوتیک می‌شود (۲) که حاصل آن از کنترل خارج شدن باکتری بیماری‌زا است. از سوی دیگر باعث مصرف بیشتر آنتی‌بیوتیک و در نهایت مضرات اقتصادی و زیستی می‌گردد (۳). مقاومت باکتریائی باعث می‌شود که درمان بیماری‌ها دچار اختلال شده و پرورش‌دهندگان دچار زیان‌های اقتصادی شوند (۴).

گونه‌های *آلجینولیتیکوس*، *پاراهمولیتیکوس*، *ولنیفیکوس*، *هاروئی* و *دمسلا* به‌عنوان پاتوژن‌های اصلی جنس *ویبریو* هستند که تحت شرایط مساعد (شرایط استرس‌زا در میگو) می‌توانند میگوهای خانواده پنائیده را تحت تأثیر قرار دهند. *ویبریو هارویی* مهم‌ترین گونه‌ی بیماری‌زای *ویبریو* می‌باشد. (۵) در سال‌های اخیر استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث بوجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانسیم‌ها و افزایش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهان شده است (۸) در بسیاری از هچری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان عامل پیشگیری بیماری‌های باکتریایی استفاده می‌شود. استفاده مداوم از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط باکتری‌های مقاوم می‌شود (۶). در مراحل لاروی و پست لاروی آنتی‌بیوتیک به‌عنوان عامل مؤثر در کنترل و کاهش تلفات ناشی از گونه‌های *ویبریو* به‌کار می‌رود. از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی که در تمام مراحل سیکل زندگی میگو به‌کار می‌روند استرپتومایسین، کلرامفنیکل و اکسی‌تتراسایکلین هستند در میگوهای جوان و بالغ از اکسی تتراسایکلین، نیتروفورازون‌ها، فوراسین و فوراناس به‌عنوان داروی مؤثر بر ضد *ویبریو* استفاده می‌شود (۷).

آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم باکتریواستاتیک و وسیع‌الطیف است و عامل ضد اسیدفولیک است که مهار کننده قدرتمند و انتخابی دی ئیدروفولات ردوکتاز باکتری می‌باشد. آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین از آمینوگلیکوزیدها است همه آنها با اتصال به ریبوزوم مانع سنتز پروتئین در باکتری می‌شوند در نتیجه اثر

Archive of SID

www.SID.ir

باکتریسیدی دارند. اکسی تتراسایکلین مانند تمامی اعضای گروه تتراسایکلین با اتصال به زیر واحد ۳۰s ریبوزوم و از طریق مهار سنتز پروتئین باکتری اثر می‌کند و متعلق به گروه باکتریواستاتیک‌ها می‌باشد (۹ و ۱۰) در ایران آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در آبزی‌پروری بیشترین استفاده را دارد (۱).

آنتی‌بیوتیک اریترومایسین باعث کاهش رشد و در مواقعی کشتن باکتری می‌شوند. این عمل از طریق کاهش تولید پروتئین‌های مهم مورد نیاز باکتری برای زنده ماندن انجام می‌شود اریترومایسین یک آنتی‌بیوتیک رایج است که برای درمان عفونت‌های گوناگونی مورد استفاده در انسان، دام، طیور و آبزیان قرار می‌گیرد (۹ و ۱۰).

آنتی‌بیوتیک‌هایی که به‌مقدار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرند در بسیاری از موارد بی اثر بوده و یا باعث افزایش بیماری‌زایی پاتوژن‌ها می‌شوند (۱۱). در حالت عادی در زمانی که باکتری‌های پاتوژن و یا ویروس‌ها ظاهر شدند، آبزی‌پرور باید برای مقابله با وضعیت موجود از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کند که متأسفانه این عمل حتی در زمانی که استخرهای پرورش میگو یا تانک‌های مراکز تکثیر در شرایط عادی نیز قرار دارد به وفور مشاهده می‌گردد (۱۲).

آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد استفاده در آبزی‌پروری که گونه‌های باکتری *ویبریو* (*Vibrio parahaemolyticus*، *Vibrio harveyi*، *Vibrio alginolyticus*، *Vibrio fluvialis*) نسبت به آن مقاومت نشان داده‌اند شامل: استرپتو مایسین، اکسی‌تتراسایکلین، کلرامفنیکل، فورازلیدن بودند. این باکتری‌ها بیماری‌زایی بیشتری را نسبت به ۴ سال گذشته نشان می‌دادند. (۴ و ۱۳). این تحقیق به‌منظور بررسی مقاومت دو باکتری بیماری‌زای *V. harveyi* و *V. alginolyticus* که در مراکز تکثیر میگو عامل تلفات هستند به رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در هچری‌ها انجام شده است.

مواد و روش‌ها

محل نمونه‌برداری در این پروژه سه مرکز تکثیر میگو در استان بوشهر بود که شامل یک کارگاه تکثیر در مرکز استان مربوط به پژوهشکده میگوی کشور (مرکز تکثیر B) واقع شده در بندرگاه بوشهر و دو کارگاه تکثیر در جنوب یکی در دلوار (مرکز تکثیر C) و دیگری در روستای کهری (مرکز تکثیر A) از توابع شهرستان دشتی بود.

نمونه‌برداری در سه مرحله انجام گرفت. مرحله اول نمونه‌برداری در اوایل دوره تکثیر و دو مرحله دیگر در اواسط و اواخر دوره تکثیر بود. طی سه مرحله نمونه‌برداری از مولد، تخم، مراحل لاروی و پست لاروی نمونه‌گیری صورت گرفت. در هر مرحله نمونه‌برداری، از سه تانک به‌طور تصادفی نمونه‌گیری صورت می‌گرفت. در این پروژه به‌طور تصادفی ۱۰ عدد مولد و ۱۰۰۰ عدد تخم، ۱۰۰۰ عدد لارو و ۱۰۰ عدد پست لارو از هر کدام از مراکز تکثیر انتخاب و درون ظروف استریل یک لیتری قرار داده شد. ظروف نمونه‌برداری را در یونولیت‌های ۴۲ لیتری که حاوی بسته‌هایی از خاک اره و یخ بودند جهت پایین نگه داشتن دمای محیط قرار داده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده میگوی کشور انتقال داده می‌شد. پس از نمونه‌برداری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ادامه پروژه که شامل آنالیز میکروبی می‌باشد صورت پذیرفت. به این‌منظور در ابتدا نمونه‌ها درون هموژنایزر دستی استریل هموژن شدند و از نمونه‌ها در لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر آب دریای استریل ۲/۵ درصد نمک با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی

Archive of SID

www.SID.ir

هموژن تهیه شده رقت تهیه شد و در نهایت از هر رقت ۱میلی‌لیتر بر روی دو محیط کشت نمکی (۲/۵ درصد) TSA (Trypticase Soy Agar) و (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucroseagar) TCBS نمکی (۲ درصد) کشت شد. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تعداد کلنی‌های رشد یافته بر روی پلیت‌های TSA و TCBS نمکی با کلنی کانتر شمارش شده و کلنی‌های متفاوت از نظر ظاهر از هم جدا گردید. و از کلنی‌ها رنگ‌آمیزی گرم به‌عمل آمد و از جدایه‌های گرم منفی باسیلی و کوکوباسیل جهت تست‌های بیوشیمیایی شناسایی *ویبریوها* و خالص‌سازی آنها به روی محیط TSA نمکی به‌طور خطی کشت شد و بعد از ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی مطابق جدول ۱ آنالیز میکروبی انجام گرفت (۱۴).

جدول ۱) تست‌های بیوشیمیایی شناسایی گونه‌های ویبریو

V. vulnificus	*V. parahaemolyticus*	*V. penaeicida*	*V. mimicus*	*V. metschnikovii*	*V. harveyi*	*V. furnissii*	*V. fluvialis*	*V. damsela*	*V. cincinnatiensis*	*V. cholerae*	*V. anguillarum*	*V. alginolyticuss*		
G	G	Y	G	Y	D	Y	Y	G	Y	Y	Y	Y		Growth in TCBS
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		Oxidase
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NaCl %0	Growth in
+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	NaCl %6	
+	-	-	+	+	D	+	+	-	+	+	+	-	ONPG	
-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	D	+	+	Voges-Proskauer	
+	+	+	+	+	D	-	-	D	+	+	-	+	Lysine decarboxylase	
+	-	D	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	Acid from D-cellobiose	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Swarming	
+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	Arginine dihydrolase	
-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Gas from D- glucose	
-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	+	4°C	
+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	30°C	Growth at
+	+	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	35°C	
+	+	-		+	D	+	+		-	+	-	+	40°C	
+	+	+	+	+	+	D	D	-	+	+	+	+	Gelatinase	

باکتری‌های *V. Alginolyticus* و *V. harveyi* شناسایی شده و به‌روش Disk diffusion و طبق استاندارد CLSI۲۰۰۸ سویه‌های جدا شده مورد بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی قرار گرفتند (۱۵).

به این منظور در ابتدا از محیط TSB نمک‌دار (۲/۵ درصد) به‌روش (Barium sulfate turbidity) McFarland Standards غلظت ۰/۵ از دو باکتری *V. harveyi* و *V. alginolyticus* که معادل

Archive of SID
www.SID.ir

$۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر است تهیه شد. با استفاده از سواپ استریل کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. به‌وسیله‌ی یک پنس استریل دیسک‌ها را بر سطح محیط کشت قرار داده و با نوک پنس آن را در جای خود محکم کرده. پلیت را در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت قرار داده و پس از آن با استفاده از خط‌کش دقیق، قطر هاله عدم رشد را برحسب میلی‌متر اندازه گرفته و با استفاده از جدول میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک به‌صورت، حساس- نیمه‌حساس و مقاوم گزارش شد.

به‌منظور محاسبه مقاومت آنتی‌بیوتیکی (ARI) Antibiotic resistance index از فرمول ARI=y/nx استفاده می‌شود که در آن yتعداد آنتی‌بیوتیک‌های است که باکتری نسبت به آن مقاوم است، n جمعیت مورد آزمایش و x تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش می‌باشد (۱۶). بررسی آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS (USA،Il ،Chicago،SPSS Inc) ویرایش ۱۸ و به‌روش analysis of two way tables و simpson's paradox انجام شد.

یافته‌ها

از هر مرکز تکثیر یک باکتری *ویبریو هاروی* و یک باکتری *ویبریو آلجینولیتیکوس* به‌عنوان نماینده این دو باکتری انتخاب شد. که جمعا سه باکتری *ویبریو هاروی* و سه باکتری *ویبریو آلجینولیتیکوس* از سه مرکز تکثیر بود. برای هر شش باکتری تست آنتی‌بیوگرام انجام شد و نتایج با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج آنتی‌بیوگرام دو باکتری جداسازی شده از هر مرکز مطابق جدول ۲ می‌باشد.

جدول ۲) میزان قطر هاله و نتایج آنتی‌بیوگرام دو گونه *Vibrio harveyi* و *Vibrio alginolyticus*

مرکز تکثیر	نوع باکتری	اکسی تتراسایکلین	تری‌متیوپریم	استرپتومایسین	اریترومایسین
A	*V .harveyi*	۲۵ میلی‌متر (حساس)	۱۶ میلی‌متر (نیمه حساس)	۱۱ میلی‌متر (مقاوم)	۲۱ میلی‌متر (نیمه حساس)
	V. alginolyticus	۱۵ میلی‌متر (نیمه حساس)	۱۲ میلی‌متر (نیمه حساس)	۱۱ میلی‌متر (مقاوم)	۱۳ میلی‌متر (نیمه حساس)
B	*V. harveyi*	۲۹ میلی‌متر (حساس)	۲۰ میلی‌متر (حساس)	۰ (مقاوم)	۱۳ میلی‌متر (مقاوم)
	V. alginolyticus	۲۰ میلی‌متر (حساس)	۲۲ میلی‌متر (حساس)	۱۰ میلی‌متر (مقاوم)	۰ (مقاوم)
C	*V. harveyi*	۲۶ میلی‌متر (حساس)	۲۵ میلی‌متر (حساس)	۱۱ میلی‌متر (مقاوم)	۲۸ میلی‌متر (حساس)
	V. alginolyticus	۲۵ میلی‌متر (حساس)	۲۶ میلی‌متر (حساس)	۱۰ میلی‌متر (مقاوم)	۱۶ میلی‌متر (نیمه حساس)

هر سه جدایه ویبریوهاروی به اکسی‌تتراسایکلین حساس و به استرپتومایسین مقاوم بودند. جدایه ویبریوهاروی مرکز تکثیر A، B و C به‌ترتیب نسبت به اریترومایسین نیمه حساس، مقاوم و حساس بودند. در مرکز تکثیر A جدایه *ویبریو هاروی* به تری‌متیوپریم نیمه حساس و در دو مرکز تکثیر دیگر حساس بودند. جدایه ***V. alginolyticus*** جداسازی شده از سه مرکز تکثیر A، B و C به استرپتومایسین مقاوم بودند. همچنین این باکتری در دو مرکز تکثیر A و C به اریترومایسین نیمه حساس و در مرکز B مقاوم بود. نتایج نشان دادند که ***V. alginolyticus*** مرکز تکثیر A نسبت به هیچ‌یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد

Archive of SID
www.SID.ir

آزمایش حساسیت کامل نداشت و فقط به دو آنتی‌بیوتیک تری‌متیوپریم و اکسی‌تتراسایکلین نیمه حساس بود. در مرکز تکثیر B باکتری *V. alginolyticus* به دو آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و استرپتومایسین مقاوم و به دو آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم و اکسی تتراسایکلین حساس بود. همین نتایج برای باکتری *ویبریو هاروی* جداسازی شده نیز به‌دست آمد. در مرکز تکثیر C *V. harveyi* تنها نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین مقاومت نشان داد و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم و اکسی تتراسایکلین و اریترومایسین حساس بود.

باکتری *V. alginolyticus* و *V. harveyi* مرکز C نسبت به استرپتومایسین مقاوم و نسبت به اکسی‌تتراسایکلین و تری‌متوپریم حساس بود. مطابق جدول ۳ میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک در مراکز A، B و C به‌ترتیب ۷۵ درصد، ۵۰ درصد و ۵۰ درصد بود. نتایج شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سه مرکز تکثیر یکسان به‌دست آمد (۰/۲۵) و همچنین شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی دو باکتری نیز یکسان (۰/۲۵) به‌دست آمد.

جدول ۳) رتبه‌بندی مراکز تکثیر بر اساس درصد بروز هر یک از نتایج آنتی‌بیوگرام

	A	B	C
حساس	٪۵۰	٪۵۰	٪۷۵
نیمه حساس	٪۲۵	۰	۰
مقاوم	٪۲۵	٪۵۰	٪۲۵

بحث

نتایج تست آنتی‌بیوگرام در این تحقیق نشان داده است که هر سه باکتری *ویبریو هاروی* جداسازی شده در نقاط مختلف نسبت به استرپتومایسین مقاوم هستند اما تنها باکتری‌های جدا شده از مرکز تکثیر B مانند تحقیقی که تندنسیا (Tendencia) و همکاران (۱۶) انجام داده نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند. همچنین نشان دادند که *V. harveyi* که از میگوهای بیمار جدا شده است مقاوم در برابر آمپی‌سیلسن، کلروتتراسایکلین، اسپروفلوکساسین، اریترومایسین، فورازولیدون، جنتامایسین، نالیدیکسک اسید، نئومایسین، نیتروفورانشن، نیتروفورازول، نئوبیوسین، اُفلوکساسین، اُکسی تتراسایکلین، پنی‌سیلسن‌جی، پلی‌میکسین‌بی، ریفامپین، استرپتومایسین، سولفامتازول، سولفافورازول بودند. اما جدایه‌های *ویبریو هاروی* جداسازی شده در سه مرکز تحقیق فقط به استرپتومایسین مقاوم بودند و تنها در مرکز تکثیرB بود که به اریترومایسین نیز مقاوم بود.

لینو (Leano) و همکاران نشان دادند که گونه‌های مختلف *Vibrio* و*Aeromonas* جداسازی شده از ماهی و میگو، مقاوم در برابر استرپتومایسین و حساس به اُکسولینیک اسید بودند (۱۹).

مقاومت *ویبریو هاروی* به استرپتومایسین با نتایج لینو (Leano) و همکاران مطابقت دارد. اما با تأکید بر اینکه نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد *ویبریو الجینولیتیکوس* هم نسبت به استرپتومایسین مقاوم می‌باشد. اکسی‌تتراسایکلین با توجه به دسترسی آسان به آن پر مصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک کاربردی در مراکز تکثیر میگویی سفید غربی واقع در استان بوشهر است. مشکل عمده اکسی‌تتراسایکلین این است که باکتری‌های بیماری‌زا به راحتی در برابر آن مقاوم می‌شوند و آن را توسعه می‌دهند (۱۹) و همچنین اکسی تتراسایکلین می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در بین باکتری‌های مختلف در هچری‌ها و مزارع پرورشی رواج و افزایش دهد (۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

در نتایج تحقیقات دیگری نشان داد که *ویبریو هاروی* و به اکسی تتراسایکلین مقاوم است (۱۷) اما نتایج تحقیق حاضر به‌جز *ویبریو آلجینولیتیکوس* مرکز A که نیمه‌حساس بود حساسیت به اکسی تتراسایکلین را نشان می‌دهد، بودند. با توجه به‌نظر اندرسون (Anderson) و همکاران (۲۰) که انتشار و بالا رفتن سرعت سیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جوامع باکتریایی را به‌طور مستقیم مرتبط با میزان آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده می‌دانستند و نظر تورانزو (Toranzo) و همکاران (۲۱)، باید دلیل حساسیت باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق به اکسی‌تتراسایکلین و تری‌متیوپریم را با وجود مصرف این آنتی‌بیوتیک در مراکز تکثیر استان بوشهر، را این‌گونه توضیح داد که میزان آنتی‌بیوتیک مصرفی اکسی تتراسایکلین و تری‌متیوپریم در مراکز تکثیر به میزان دوز مؤثره بوده و همچنین تعداد دفعات استفاده به میزانی نبوده است که بتواند در طی مدت استفاده ایجاد مقاومت نماید.

با توجه به نظریه تورانزو (Toranzo) و همکاران (۲۱) که اعلام نمودند تماس مکرر باکتری با آنتی‌بیوتیک مقاومت آنتی‌بیوتیک ایجاد می‌نماید و عکس این رابطه نیز بر قرار می‌باشد یعنی در صورت عدم تماس مکرر باکتری با آنتی‌بیوتیک مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز ایجاد نمی‌شود به‌طوری که ثابت نمودند هیچ یک از گونه‌های *ویبریو* به‌جز *ویبریو هاروی* جدا شده از میگوهای که در معرض آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بودند مقاوم در برابر اکسی‌تتراسایکلین را نشان ندادند.

تحقیقات مانجوشا (Manjusha) و همکاران (۱۵) نشان داد سطح مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در آب‌های شور مزارع پرورش میگو در نزدیکی سواحل کمتر از آب‌های مناطق ساحلی نزدیک شهرها است. آنها اعلام کردند که این موضوع ممکن است به‌علت ورود روان آب‌های حاوی باکتری‌هایی با پلاسمیدهای حامل ژن مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک از خشکی به دریا رخ داده باشد و با انتقال پلاسمیدی بین باکتری‌های خشکی‌زی و دریایی در نهایت باکتری دریایی با پلاسمید مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایجاد می‌شود. بر این اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و اریترومایسین را می‌توان به انتقال پلاسمید از باکتری‌های خشکی به باکتری‌های دریایی مربوط دانست. زیرا این آنتی‌بیوتیک‌ها در موارد انسانی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند و آب‌های مشرف به هچری‌ای مورد بررسی، مانند هچری پژوهشکده میگوی کشور (B) که واقع در روستای هلیله و بندرگاه است و همچنین هچری A که در مجاورت روستای کری ار توابع شهرستان دشتی است به فاضلاب‌های انسانی نزدیک است و فاضلاب می‌تواند باکتری‌های دارای پلاسمید مقاوم و همچنین آنتی‌بیوتیک‌های باقی مانده مصرف انسان و دام را به دریا انتقال دهد و ایجاد مقاومت در باکتری‌های دریا نماید. مرکز تکثیر C که واقع در دلوار می‌باشد و به فاضلاب‌های انسانی دورتر می‌باشند دارای مقاومت کمتری است.

در این تحقیق دیده شد که هچری B که نسبت به دیگر هچری‌ها به مراکز مسکونی نزدیک‌تر است دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری نسبت به دو هچری دیگر است این رابطه تأثیر فاصله بین هچری و مرکز مسکونی که هر چه کمتر باشد مقاومت بیشتری دیده می‌شود در بین دو مرکز دیگر نیز دیده می‌شود.

کودری (Chowdhury) و همکاران نشان دادند برخی *ویبریوهای* جداسازی شده از محیط در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده‌ی انسان مقاومت دارند (۱۷). همچنین حمید (Hameed) و همکاران (۲۳)

Archive of SID
www.SID.ir

باکتری *ویبریو میمیکوسی* از محیط جداسازی نمودند که در برابر آنتی‌بیوتیک‌های انسانی مقاوم بود.

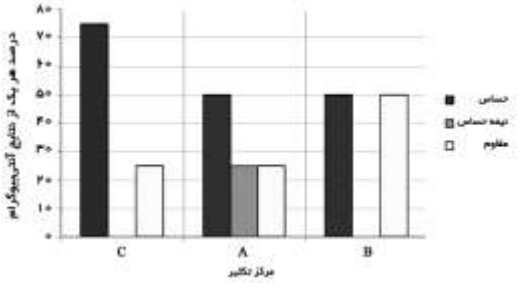
نتایج تحقیق دیگری نشان داد که بالاترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک در برابر آموکسی‌سلین، آمپی‌سیلین، کربنسیلین، سفوروکسیم، ریفامپین و استرپتومایسین است. این آنتی‌بیوتیک‌هاعمو لاً در برابر موجودات خشکی‌زی مختلف از جمله انسان استفاده می‌گردد(۱۵). توانزو (Toranzo) و همکاران نشان دادند که بین میزان غلظت آنتی‌بیوتیکی مصرفی در مزارع پرورش میگو و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی رابطه مستقیم هست (۲۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داده است که بالاترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک در ابتدا نسبت به استرپتومایسین و سپس اریترومایسین است. این آنتی‌بیوتیک‌هاعمو لاً مصرف انسانی دارند.

در بررسی حاضر نیز، دو گونه باکتری مورد آزمون در هچری‌های مختلف مقاوم به استرپتومایسین و حساس به اکسی‌تتراسایکلین و تری‌متیوپریم بودند و فقط در یک مورد باکتری *ویبریو الجینولیتیکوس* مرکز تکثیر A به اکسی‌تتراسایکلین و تری‌متیوپریم نیمه حساس بود.

در این تحقیق نیز مانند نتایج مانجاشا (Manjusha) و همکاران (۱۵) با تغییر نقاط نمونه‌برداری در نتایج آنتی‌بیوگرام تغییر در نتایج ایجاد می‌شد، البته بیشترین تغییرات در نتایج اریترومایسین دیده می‌شود و در دیگر نتایج آنتی‌بیوگرام تغییرات در نتایج فقط در مورد باکتری *ویبریو الجینولیتیکوس* مرکز A دیده می‌شود.

مقاومت‌هایی که در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها توسط باکتری به‌دست می‌آید یا توسط پلاسمیدهای خارج کروموزومی ایجاد می‌شوند و به نسل بعد انتقال می‌یابد (انتقال عمودی ژن) و یا در میان جمعیت‌های باکتریایی مختلف به‌روش افقی انتقال می‌یابد (از باکتری به باکتری دیگر) (۲۳).



نمودار۱) رتبه‌بندی نتایج آنتی‌بیوگرام در سه مرکز تکثیر مورد مطالعه

تحقیقاتی که جهت شناسایی ژن SXT (ژنی که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های متعددی را رمزگذاری می‌کند) در ۸۳ ویبریو جدا شده از میگوی پرورشی انجام شد نشان داد که تنها هفت جدایه *ویبریو* ژن مقاومت به تتراسایکلین را دارند (۲۴). رابطه زیر در نتایج مقاومت به آنتی‌بیوتیک در مراکز مورد بررسی به‌دست آمد (نمودار ۱). بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک به‌ترتیب در مرکز تکثیر B سپس مرکز تکثیر A و در نهایت مرکز C مشاهده شد.

اما با بررسی شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سه هچری مورد بررسی و همچنین دو باکتری مورد آزمون بدون در نظر گرفتن مناطق جداسازی آنها یکسان و برابر ۰/۲۵ بود که این عدد هر چه از یک کوچک‌تر باشد نشان‌دهنده بروز مقاومت کمتری به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

References:

1.Afsharnsb M, Dashtiannasab A, Abedian A, et al. Status of health and disease Shrimp hatcheries and farms in Iran(Persian). Project final report: Iran shrimp research center-Bushehr,. 2010.

2.Brock J, Lightner DV. Diseases of

Archive of SID
www.SID.ir

Crustacean. In: Kinne O, editor. Diseases of Marine Animals. Hamburg: 2th ed.Anstalt Helgoland; 1990, 245-349.
3.Ishimaru K, Akarawa M, Muroga K. Vibrio penaeicida sp. a pathogen of kuruma prawns (Penaeus japonicus). Int J Syst Bacteriol 1995; 45: 134-8.
4.Nash G, Nithimathahoke C, Tungmandi C, et al. Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand. In: Shariff IM, Subsainghe RP, Arthur JR, editors. Diseases in Asian Aquaculture. I. Fish Health Section. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society; 1992: p. 143-55.
5.Lavilla-Pitogo CR, Baticados MC, Cruz-Lacierda ER, et al. Occurrences of luminous bacterial disease of Penaeus monodon larvae in the Philippines. Aquaculture 1990; 91: 1-13.
6.Lightner DV, editor. Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. Baton Rouge, La, USA: World Aquaculture Society; 1996: p.17-27.
7.Lightner DV. Diseases of cultured Penaeid shrimp and prawns. In: Sindermann CJ, Lightner DV, editors. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. 2nd ed. New York: Elsevier; 1988: p. 8-127.
8.Derakhshesh B, Yousefzadi M, Afshar nasab M, et al. In vitro Antibacterial Activities of the Marine Macroalgae" Laurencia Snyderiae" and "Sargassum Angustifolium" Against Human Pathogens. ISMJ 2011; 14: 17-22.
9.Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. USA: McGraw-Hill; 2005: p. 457-79.
10.Le TX, munekage Y, kato S. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. Sci Total Environ 2005; 349: 95-105.
11.Kapetanaki M, Kerry J, Hiney M, et al. Emergence, in oxytetracycline-free marine mesocosms, of microorganisms capable of colony formation on oxytetracycline-containing media. Aquaculture 1995; 134: 227-36.
12.Roque A, Molina-Aja A, Bolan-Mejia C, et al. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. Inter J Antimicrob Agents 2001; 17: 383-7.
13.Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW, editors. Bergey's Manual Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer; 2005: p. 520-6.
14.Watts JL, Shryock TR, Apley M, et al, editors. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved standard. 3rd ed. Pennsylvania, USA: NCCLS; 2008; 222: 103-7.
15.Manjusha S, Sarita GB, Elyas KK, et al. Multiple Antibiotic Resistances of Vibrio Isolates from Coastal and Brackish Water Areas .Am J Biochem Biotechnol 2005; 1: 201-6.
16.Tendencia EA, de la Pena LD. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 2001; 195: 193-204.
17.Chowdhury MA, Aziz KM, Rahim Z, et al. Antibiotic resistance patterns of Vibrio mimicus isolated from human and environmental sources in Bangladesh. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30:622-3.
18.Sasmal D, Qureshi T, Jawahar A. Comparison Of Antibiotic Resistance In Bacterial Flora Of Shrimp Farming Systems. Int J Microbiology 2005; 11: 58-63.
19.Leano EM, Inglis VLM, MacRae IH. Antibiotic resistance of Vibrio spp. and Aeromonas spp. isolated from fish and shrimp tissues and rearing water in Panay Island, Philippines. UPV J Nat Sci 1999; 3: 1-8.
20.Anderson IG, Shamsudin MN, Nash G. A preliminary study on the aerobic heterotrophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. Aquaculture 1989; 81:213-23.
21.Toranzo AE, Novoa B, Romalde JL, et al. Microflora associated with healthy and diseased turbot (Scophthalmus maximus) from three farms in Northwest Spain. Aquaculture 1993; 114: 189-202.
22.Hameed ASS, Balasubramanian G. Antibiotic resistance in bacteria isolated from Artemia nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. Aquaculture 2000; 183: 195-205.
23.Hameed ASS, Rahaman KH, Alagan A, et al. Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery reared larvae and post larvae of Macrobrachium rosenbergii. Aquaculture 2003; 217: 39-48.
24.Baticados MCL, Paclibare JO. The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In: Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR editors. Diseases in Asian

Archive of SID

www.SID.ir

1990 Nov 26-29, Bali, Indonesia. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 1992: p. 531-46.

Aquaculture Proceedings of the First symposium on diseases in Asian aquaculture.

Archive of SID

www.SID.ir

ISMJ 2014; 16(6): 467-78

Original Article

Evaluation of antibiotic resistance among isolated pathogenic bacteria from shrimp hatcheries in Bushehr province

A. Moghimi [1], M. Afsharnasab [2], A. Dashtiannsab [3], M.Mesbah [4], V. Yeganeh [* 3]

[1]Department of Fishery, Islamic Azad University, Science and Research Branch of Khuzestan, Khuzestan, IRAN
[2]Department of Shrimp Diseases, Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, IRAN
[3]Department of Shrimp Diseases, Shrimp Research Center, Bushehr, IRAN
[4]Department of Aquaculture, School of Veterinary, Shahid Chamran University, Ahvaz, IRAN

(Received 24 Aug, 2011 Accepted 27 Nov, 2011)

Abstract

Background: Rapid development of shrimp aquaculture has resulted in widespread use of antibiotics for preventing and curing diseases. In aquaculture, particularly shrimp hatcheries antibiotics are routinely used at therapeutic levels to treat disease and at sub-therapeutic levels as prophylactic agents to increase feed efficiency. Antibiotic residues in the environment are likely to lead to the development and maintenance of antibiotic resistance in microbial populations. The aim of this study was determine of antibiotic resistance to two shrimp pathogens *Vibrio harveyi*, *V.alginolyticus*, that they are agents of mortality in shrimp hatcheries.

Material and Methods: After isolation and detection(by biochemical tests) of two species of bacterial pathogens from three hatcheries of Bushehr province, bacterial strains were tested for sensitivity to antibiotics including erythromycin, streptomycin, oxytetracyclin, and trimetoprim by disk diffusion method.

Results: Results showed that all isolated bacteria *Vibrio harveyi* from three hatcheries were sensitive to oxytetracyclin and trimetoprim, but to streptomycin were resistant, and to erythromycin in hatcheries A, B, C was intermediate, resistance, sensitive respectively. Bacteria *Vibrio alginolyticus* isolated from three hatcheries were resistant to streptomycin. But they isolated from a hatchery to the other antibiotics erythromycin, oxytetracyclin and trimetoprim were resistant, intermediate and intermediate, respectively. Also they isolated from B hatchery were resistant, sensitive and sensitive to erythromycin, oxytetracyclin and trimetoprim, respectively And from C hatchery were intermediate, sensitive and sensitive to antibiotics, respectively.

Conclusion: Isolated bacteria showed the most resistance to streptomycin and erythromycin respectively. These antibiotics is used frequently in medicine and veterinary, with entrance of human and animal's bacteria resistance via waste and fluid water to the sea, maybe transferred the resistant plasmid from resistant bacteria to *Vibrio spp*.

Keywords: shrimp hatchery, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, antibiotics

**Address for correspondence*: Department of Shrimp Diseases, Shrimp Research Center, Bushehr, IRAN.
E-mail: v.yeganeh@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir