

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *آئروموناس هیدروفیلا* های جدا شده از

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرورشی در استان خوزستان

نغمه موری بختیاری^{۱*}، رحیم پیغان^۲، سیده فاطمه منزوی^۳

* n.moori@scu.ac.ir

- ۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

چکیده

گونه‌های *آئروموناس* پاتوژن‌های فرصت طلبی هستند که در پاره‌ای از موارد قابلیت ایجاد بیماری به عنوان عامل اولیه در انسان و ماهی را دارند. *آئروموناس هیدروفیلا* پاتوژن فرصت طلبی است که باعث ایجاد توکسین و عفونت در میزبان شده و مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداسازی شده آن از مناطق مختلف جهان گزارش شده است. بنابراین، یافتن میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) ارزشمند خواهد بود. تعداد ۱۰۰ ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از استخرهای پرورش ماهی در ۴ منطقه از استان خوزستان به عنوان نمونه جمع‌آوری گردید. قسمت انتهایی روده از هر نمونه جداسازی و هموژن شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در آگار خون‌دار تلقیح و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. از هر پلیت ۳ تا ۵ کلونی مشکوک به *آئروموناس هیدروفیلا* انتخاب و در محیط آگار خون‌دار خالص سازی گردید. هر کلونی به وسیله‌ی تست کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم ارزیابی و DNA جدایه‌های مشکوک، به روش جوشاندن استخراج گردید. سویه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* به روش PCR و با استفاده از ژن مربوط به جنس و گونه تایید قطعی شدند. در نهایت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در همه‌ی جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* تایید شده به روش دیسک دیفیوژن کربی-باور بررسی شد. بیست جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* از تمام کلونی‌های مشکوک به *آئروموناس* با روش PCR تایید قطعی گردید که بیشتر جدایه‌ها به چندین آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. کمترین مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و سیپروفلوکساسین (۲۵٪) و بیشترین مقاومت نسبت به ونکومايسين و کلیندامایسین (۹۰٪) مشاهده شد. در مقایسه با سایر مطالعات، مشخص گردید که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری در مناطق مختلف، متفاوت می‌باشد از این رو یافتن الگوی مقاومت در هر منطقه امری الزامی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *آئروموناس هیدروفیلا*، ماهی کپور، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استان خوزستان

* نویسنده مسئول

مقدمه

محیط‌های آبی به عنوان منبع اصلی باکتری‌های آئروموناس، مورد توجه هستند و ماهی را به عنوان منبع اصلی این میکروارگانیسم‌ها معرفی می‌کنند (Swaminathan et al., 2004). آئروموناس هیدروفیلا یکی از باکتری‌های مهم در صنعت پرورش ماهیان گرمابی است؛ ولی گاهی در ماهیان آب شور نیز باعث بروز بیماری می‌شود و علاوه بر ماهی، این باکتری در انسان نیز ممکن است باعث ایجاد عوارضی از قبیل گاستروانتریت و اسهال مسافرتی شود (Lee et al., 2000). این باکتری، عامل اصلی سیتیسمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین از قبیل کپور ماهیان، مار ماهی، شیر ماهی، گربه ماهی کانال، تیلپیا و آيو می‌باشد. همچنین با بیماری لکه قرمز، پوسیدگی باله و سندروم زخم همه گیر در ارتباط است. این عفونت‌ها ممکن است سبب مرگ و میر بالا در هجری‌های ماهی و سیستم آبی طبیعی شوند (Nielsen et al., 2001; Peyghan et al., 2010).

با توجه به این واقعیت که ماهی نقش مهمی در رژیم غذایی مردم جهان دارد، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریایی در ماهی‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در دهه‌های گذشته استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های انسانی، دامی، کشاورزی و شیلات سبب افزایش حضور این ترکیبات در محیط زیست و به تبع آن مقاومت شدن برخی از باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم منفی به آن‌ها شده است. با این حال مسائل زیادی همراه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری وجود دارد از جمله می‌توان به باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیک‌ها در بافت‌های آبزیان پرورشی پس از درمان، تولید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و عدم تعادل در میکروفلور طبیعی و مفید روده اشاره داشت. آنتی‌بیوتیک‌ها ارزش زیادی جهت اقدامات درمانی در برابر عفونت‌های باکتریایی دارند اما در مطالعات بسیاری مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مختلف آئروموناس گزارش گردیده است. از این جهت نیاز به پایش دوره‌ای مقاومت دارویی این ارگانیسم‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی امری ضروری می‌باشد (Yousr et al., 2007; Shome et al., 2005; Nam et al., 2007). در ایران نیز در بررسی‌های متعددی، جداسازی

این عامل از ماهی‌آمور و کپور ماهیان پرورشی به خصوص کپور معمولی گزارش شده است (پیغان و اسماعیلی، ۱۳۷۲؛ اخلاقی، ۱۳۷۹).

تشخیص آئروموناس‌ها با روش‌های بیوشیمیایی زمان‌بر و در مواقعی گیج‌کننده می‌باشد، از این رو استفاده از روش PCR و شناسایی ژن‌های حدت علاوه بر ژن‌های اختصاصی جنس و گونه در این باکتری‌ها می‌تواند علاوه بر تأیید قطعی جنس و گونه هر جدایه، نشان‌دهنده‌ی بیماری‌زا بودن باکتری به همراه صرفه‌جویی در وقت و هزینه باشد (Nam et al., 2007).

با توجه به پتانسیل بالای آبی‌پروری در استان خوزستان و استفاده غیر اصولی برخی از پرورش‌دهندگان از آنتی‌بیوتیک‌ها، که ندانسته منتهی به ایجاد مقاومت می‌گردند، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر جهت پیشگیری و کنترل این گونه عفونت‌ها و ضرورت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آئروموناس هیدروفیلاهای جداسده از ماهی کپور معمولی پرورشی در استان خوزستان را آشکار می‌سازد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی عامل

نمونه برداری از مزارع پرورشی کپورماهیان واقع در شهرهای خرمشهر، شوش، سوسنگرد و شوشتر (۲۵ قطعه از هر مزرعه) و از ماهیان به ظاهر سالم در محدوده وزنی ۱۰۰-۵۰ گرم (متوسط وزن ۷۰ گرم) صورت گرفت. بچه ماهی‌های هر مزرعه با استفاده از کیسه‌های حمل ماهی و با شرایط اکسیژن کافی به آزمایشگاه منتقل و در آکواریوم‌هایی با دما و هوادهی مناسب تا زمان نمونه‌گیری نگهداری شدند. پیش از نمونه‌برداری، هر قطعه ماهی به وسیله پنس، قطع نخاع و سپس وزن‌گیری شد. جهت نمونه برداری ابتدا سطح بدن ماهی به وسیله الکل ۷۰ درصد، ضدعفونی و سپس با استفاده از یک تیغ اسکالپل استریل، از روی خط زیرین ناحیه شکمی کالبدگشایی صورت گرفت. پس از باز کردن محوطه بطنی، قطعه‌ی ۳-۲ سانتی‌متری از انتهای روده که با منفذ خروجی روده ۲ سانتی‌متر فاصله داشت، قطع و در یک پلیت استریل قرار داده شد. پس از همگن‌سازی بافت روده با تیغ اسکالپل

استریل، یک لوپ کامل از آن بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از طی این زمان، کلونی‌های مشکوک به *آئروموناس* (کلونی‌های سفید تا خاکستری رنگ محدب و نیمه شفاف با قطر حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر) انتخاب و بر روی محیط کشت جدید آگار خون دار، خالص‌سازی گردیدند.

تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های خالص‌سازی شده، جهت شناسایی جنس *آئروموناس* و گونه‌ی هیدروفیلا با تست‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌هایی که گرم منفی و اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند، به عنوان مظنون به جنس *آئروموناس* در نظر گرفته شدند. پس از آن، هر یک از جدایه‌ها از نظر تولید همولیز نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تشخیص دقیق تر جدایه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی مختلف و متداول از قبیل محیط‌های قندی ساده شامل گلوکز، سوربیتول، سالیسین، لاکتوز، مالتوز، ساکارز و همچنین محیط‌هایی نظیر نیترات، اوره، سیمون-سیترات، سولفور-این‌دول-موتیلیتی (SIM)، تحمل نمک، متیل‌رد (MR)، وژیروسکوئر (VP)، لیزین دکربوکسیلاز، استفاده و نتایج پس از ۲۴ ساعت قرائت گردید. تمامی محیط‌های استفاده شده در این تحقیق ساخت شرکت مرک آلمان بود و (Porteen et al., 2006) و جهت خواندن نتایج آن‌ها از منابع معتبر استفاده گردید (Austin & Austin, 2007; Buller, 2004). جدایه‌های مشکوک به *آئروموناس* هیدروفیلا در محیط شیرپرس‌چرخ (Skim Milk) کشت و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، جهت تأیید ژنومی با آزمایش PCR، نگهداری شدند.

تشخیص به روش PCR

استخراج DNA از باکتری: برای جداسازی و استخراج DNA جدایه‌ها از روش جوشاندن استفاده شد. بدین منظور یک کلونی از هر جدایه در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر تریس-EDTA (TE) استریل حاوی ۲ درصد ۲-مرکاپتواتانول تلقیح و در دمای جوش به مدت ۱۰ دقیقه

قرار داده شد. (Nielsen et al., 2001; Porteen et al., 2006). پس از این زمان، نمونه‌ها با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ، و نهایتاً ماده‌ی رویی به عنوان منبع DNA، در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل جمع‌آوری، و در دمای ۲۰- نگهداری گردید. تأیید جنس و گونه‌ی جدایه‌ها با PCR: با توجه به متغیر بودن برخی از واکنش‌های بیوشیمیایی در سویه‌های مختلف *آئروموناس* هیدروفیلا، تأیید مولکولی جنس و گونه‌های مشکوک بدست آمده از مرحله‌ی قبل، با PCR نیز انجام شد. بدین منظور از پرایمرهای اختصاصی جنس *آئروموناس* که هدف آن ژن rRNA ۱۶S می‌باشد و توسط Porteen و همکاران طراحی شده بود استفاده گردید (جدول ۱). واکنش PCR در این مطالعه از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) و در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول) (سیناژن، ایران) و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد (۵/۵ میکرولیتر آب) (Porteen et al., 2006). برنامه حرارتی استفاده شده جهت تکثیر ژن هدف شامل دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل، شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه بود. مرحله نهایی این تست در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

در ادامه جهت تأیید گونه‌ی هیدروفیلا در جدایه‌های مثبت شده از نظر جنس *آئروموناس*، از پرایمرهای اختصاصی گونه که هدف آن‌ها ژن لیپاز و ژن rRNA ۱۶S هیدروفیلا بود و به ترتیب توسط Cascon (1996) و Dorsch (1994) طراحی شده بودند، استفاده گردید (جدول ۱). سیکل حرارتی استفاده شده در این مرحله کاملاً مشابه مرحله تعیین جنس بود. در تمامی مراحل PCR از *آئروموناس* هیدروفیلا استاندارد حاوی ژن‌های مورد مطالعه (ATCC/۷۹۶۶) به عنوان کنترل مثبت و از آب دیپس به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جهت بررسی محصول PCR، از ژل آگارز ۱ درصد، حاوی ۳ درصد رنگ ایمن (safe stain) (سیناژن، ایران)

استفاده شد. پس از بارگذاری ژل در تانک حاوی بافرتریس- استیک اسید- EDTA (TAE) برای مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت، با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت (UV tec، آلمان) و نور فرابنفش، حضور و یا عدم حضور باندهای مورد نظر در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت‌بازی (سیناژن، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های تأیید شده‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* در مرحله قبل، از روش انتشار دیسک کربی-باور و بر اساس استاندارد CILS عمل گردید (CLSI, 2011). در این مطالعه از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استاندارد (شرکت پادتن‌طب- ایران) استفاده گردید. آنتی‌بیوتیک‌ها شامل ونکومايسين (V)، آموکسی‌سیلین (AMX)، سیپروفلوکساسین (CP)، تتراسایکلین (TE)، استرپتومايسين (S)، سولتریم (SXT)، سفوتاکسیم (CTX)، جنتامایسین (GM)، نالیدیکسیک اسید (NA)، اکسی‌تتراسایکلین (ترامایسین) (T)، کلیندامایسین (CC) و کلرامفنیکل (C) استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا هر جدایه از *آئروموناس هیدروفیلا*ی تأیید شده با PCR، در محیط آبگوشت مغز و قلب (BHI) به مدت ۱/۵ الی ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و گرم‌خانه‌گذاری شد تا کدورت آن برابر با کدورت نیم مک فارلند (1.5×10^8 cfu) شود. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) به صورت چمنی کشت و دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک در سطح محیط قرار داده شدند و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از این زمان، با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد مربوط به هر دیسک آنتی‌بیوتیکی و مقایسه آن با جدول شرکت مربوطه، حساسیت و مقاومت آن سویه از باکتری

به دیسک مورد نظر ارزیابی گردید. در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از سویه استاندارد *آئروموناس هیدروفیلا*ی اشاره شده جهت PCR استفاده شد.

نتایج

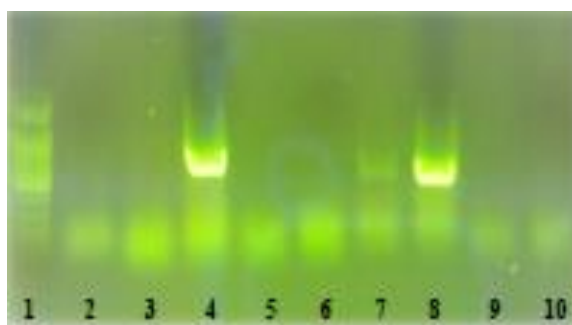
از ۱۰۰ قطعه ماهی مورد بررسی، ۴۰۰ کلونی با خصوصیات مشابه کلونی *آئروموناس*‌ها انتخاب و خالص‌سازی شد که در این میان ۳۲۵ جدایه با رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های کاتالاز و اکسیداز مظنون به جنس *آئروموناس* (باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) مشاهده شد (جدول ۲). از ۳۲۵ جدایه‌ی مشکوک، تنها ۲۰ جدایه در آزمون PCR از نظر داشتن قطعه‌ی اختصاصی جنس *آئروموناس* با طول ۵۹۹ جفت باز و باند اختصاصی گونه‌ی *هیدروفیلا* با داشتن قطعه‌ای به طول ۶۸۵ جفت باز برای ژن rRNA ۱۶s، مثبت بودند (تصویر ۱). اما از ۲۰ جدایه، تنها ۱۱ جدایه از نظر ژن لیپاز با داشتن قطعه‌ای به طول ۷۶۳ جفت باز مثبت بودند.

با بررسی نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام ۲۰ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا* و سویه‌ی استاندارد *آئروموناس هیدروفیلا* مشاهده شد که بیش‌ترین مقاومت در بین جدایه‌های مورد بررسی، مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين و کلیندامایسین (۹۰٪) و پس از آن نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومايسين (۷۰٪) می‌باشد و کم‌ترین مقاومت در بین جدایه‌ها در ارتباط با آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (۰٪) و سیپروفلوکساسین (۱۵٪) و پس از آن، نسبت به آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین، سولتریم و اکسی-تتراسایکلین (۲۵٪) مشاهده شد. همچنین مقاومت نسبی در ۴۰-۵۰ درصد از جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی چون آموکسی‌سیلین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین مشاهده گردید (جدول ۳).

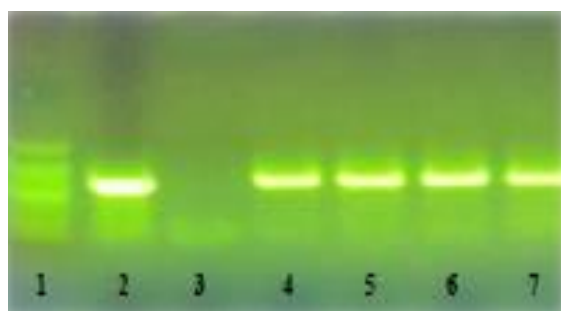
جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تأیید جنس آئروموناس و گونه‌ی هیدروفیلا

Table 1: Primers sequence of *Aeromonas* genuse and *hydrophila* species

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار	منبع
16 S rRNA F	5'-TCA TGG CTC A GA TTG AAC GCT-3'	<i>Aeromonas</i> sp.	۵۹۹	Porteen et al, 2006
16 S rRNA R	5'-CGG GGC TTT CAC ATC TAA CTT ATC-3'	<i>Aeromonas</i> sp.	۵۹۹	Porteen et al, 2006
16 SrRNA F	5'-GAA AGG TTG ATG CCT AAT ACG TA-3'	<i>A. hydrophila</i>	۶۸۵	Dorsch et al, 1994
16 SrRNA R	5'-CGT GCT GGC AAC AAA GGA CAG-3'	<i>A. hydrophila</i>	۶۸۵	Dorsch et al, 1994
Lipase F	5'-AAC CTG GTT CCG CTC AAG CCG TTG-3'	<i>A. hydrophila</i>	۷۶۳	Cascon et al, 1996
Lipase R	5'-TTG CTC GCC TCG GCC CAG CAG CT-3'	<i>A. hydrophila</i>	۷۶۳	Cascon et al, 1996



تصویر ۱: نتایج واکنش PCR تعیین گونه آئروموناس هیدروفیلا با پرایمر اختصاصی ۱۶srRNA: ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون ۲: کنترل منفی؛ ستون‌های ۳، ۵، ۶، ۹، ۱۰: نمونه منفی؛ ستون‌های ۷ و ۸: نمونه مثبت، ستون ۴: کنترل مثبت (حامل قطعه ۶۸۵ جفت بازی).



تصویر ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR تعیین گونه هیدروفیلا با ژن لیپاز: ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون ۲: کنترل مثبت؛ ستون ۳: کنترل منفی؛ ستون‌های ۴، ۵، ۶، ۷: نمونه مثبت (حامل قطعه ۷۶۳ جفت بازی).

جدول ۲: نتایج بررسی جدایه‌ها با آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز و رنگ آمیزی گرم

Table 2: Results of identification of isolates with catalase, oxidase and gram staining

گرم منفی	اکسیداز مثبت	کاتالاز مثبت	همولیز مثبت
۴۰۰	۳۲۵	۴۰۰	۳۵۵

جدول ۳: نتایج ارزیابی هاله عدم رشد ایجاد در آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه‌ها

Table 3: Results of inhibitory zone study in antibiogram test

نوع و مقدار آنتی-بیوتیک استاندارد	درصد جدایه‌های مورد بررسی	حساس	متوسط	مقاوم
آموکسی‌سیلین (۳۰ μg)	۲۵	۵۰	۲۵	۲۵
ونکومايسين (۳۰ μg)	۱۰	-	۹۰	۹۰
استرپتومايسين (۲۰ μg)	۳۰	-	۷۰	۷۰
سفتوتاكسيم (۲۵ μg)	۵۵	۴۵	۰	۰
جنتامايسين (۱۵ μg)	۵۰	۵۰	-	-
نالییدیكسیك اسید (۳۰ μg)	۶۰	۴۰	-	-
سیپروفلوکساسین (۲۵ μg)	۴۵	۳۵	۱۵	۱۵
کلیندامایسین (۳۰ μg)	۱۰	-	۹۰	۹۰
کلرامفنیکل (۲۰ μg)	۵۷	۴۳	-	-
سولتریم (۱۰ μg)	۷۵	-	۲۵	۲۵
تتراسایکلین (۳۰ μg)	۷۵	-	۲۵	۲۵
اکسی‌تتراسایکلین (۲۰ μg)	۷۵	-	۲۵	۲۵

بحث

دستگاه گوارش مهره داران از جمله ماهی‌ها، اکوسیستمی پیچیده از جمعیت‌های مختلف باکتری‌های فرصت طلب و همزیست می‌باشد (Bjorksten, 2006). تلفات ماهیان گرم آبی پرورشی در کشور به‌عنوان یکی از معضله‌های بهداشتی مهم صنعت پرورش ماهیان گرم آبی به خصوص در دو دهه ی اخیر شناخته شده است. اگرچه حضور این باکتری‌ها با بیماری ماهی یا بیماری روده‌ای همیشه همراه نیست ولی به طور حتم به دلیل آلودگی مداوم آب‌ها با مدفوع ماهی‌ها، این میکروارگانیسم‌ها پایدار خواهند ماند (LeChevallier et al., 1980). آئروموناس‌های خاص به عنوان شاخص آلودگی در ارزیابی کیفیت آب آشامیدنی، مهم می‌باشد (Cesar, 1999).

در مطالعه Uddini و Al-Harbi در سال ۲۰۱۲ آئروموناس هیدروفیلا به عنوان یکی از باکتری‌های غالب با فراوانی بیش از ۲۰ درصد گزارش گردید (Uddin & Al Harbi, 2012). در مطالعه‌ای که در ایالات متحده آمریکا بر روی آئروموناس‌ها به عنوان پاتوژن اولیه در عفونت‌های روده‌ای و در موارد کمتر عفونت خارج روده‌ای نظیر عفونت‌های سیستمیک، اندوکاردیت و غیره انجام شد، جنس آئروموناس را به عنوان عامل ایجاد ۱۳ درصد از عفونت‌ها در انسان اعلام کردند (Cesar, 1999). تشخیص به‌موقع، نیاز به روش‌های سریع و اختصاصی در شناسایی باکتری در نمونه‌های کلینیکی، مواد غذایی و محیطی را آشکار می‌سازد چرا که مصرف آب و غذای آلوده، از مهم‌ترین راه‌های انتقال آلودگی در انسان می‌باشد.

مطالعات متعددی مبنی بر تشخیص حضور آئروموناس هیدروفیلا در نمونه‌های مختلف با روش‌های کشت و جداسازی صورت گرفته‌است از جمله تحقیق صورت گرفته توسط علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۸، که در آن نقش این باکتری در تلفات ماهی‌های آمور در استان خوزستان، ۱۱ درصد گزارش شده است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸). مطالعات بسیاری بر اساس تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفته و با مقایسه‌ی نتایج حاصل از این تحقیقات، علاوه بر زمان‌بر بودن روش کشت، تنوع بسیاری در توانایی استفاده از سیتрат، تولید H_2S ، دکربوکسیله کردن لیزین و تحمل نمک در جدایه‌های آئروموناس هیدروفیلاهای

مورد بررسی در این مطالعات، مشاهده گردید (Agniswar et al., Carnahan & Joseph, 2005). بر این اساس استفاده از روش‌های تشخیصی سریع‌تر و دقیق‌تر، بیشتر مورد توجه است.

مطالعات زیادی در خصوص تشخیص جنس و گونه و با عوامل حدت آئروموناس هیدروفیلا با PCR صورت گرفته است از جمله مطالعه‌ی Sen و Rodges در سال ۲۰۰۴، که در آن به بررسی پراکندگی ۶ فاکتور حدت در گونه‌های آئروموناس در آب آشامیدنی به وسیله PCR در ایالت متحده آمریکا پرداخته شد (Sen و Rodges, ۲۰۰۴). آهنگرزاده و همکاران (۱۳۹۲)، به بررسی نقش آئروموناس هیدروفیلا در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی باکترین جدایه‌ی حاد آن پرداختند، آن‌ها با بررسی حضور ژن 16SrRNA، ۲۱ جدایه و با بررسی حضور ژن لیپاز ۳۱ جدایه از ۲۱۵ نمونه ماهی دارای علائم، آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا را تأیید کردند (آهنگرزاده، ۱۳۹۲). در مطالعه حاضر نیز از روش PCR جهت تأیید جدایه‌های مشکوک به آئروموناس هیدروفیلا که پس از جداسازی با تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شده بودند، استفاده گردید و تنوع در برخی تست‌ها در ۲۰ جدایه آئروموناس هیدروفیلا مشاهده شد.

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های ماهی، به دلیل تماس دارو با محیط و مشکلات ایجاد کننده در سلامت انسان اهمیت خاصی یافته و موجب نگرانی دست‌اندرکاران صنعت پرورش آبزیان در دنیا گشته‌است. متأسفانه در حال حاضر به دلایل نامعلوم، کاربرد داروها و مواد شیمیایی، خارج از سیستم صحیح تشخیص و تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها بدون در نظر گرفتن باقی‌مانده‌های دارویی و اثرات آلاینده‌ی آن‌ها در طبیعت و عوارض سوء این مواد بر انسان افزایش یافته است (Porteen et al., 2006). با بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و امکان انتقال میکروب‌های مقاوم به انسان، سلامت عمومی جامعه به خطر افتاده و خسارت جبران‌ناپذیری ایجاد می‌گردد. مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که مقاومت این باکتری از گذشته تا به امروز رو به افزایش بوده که احتمالاً به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌-

Chhabra در سال ۲۰۱۰ که میزان مقاومت دارویی آئروموناس هیدروفیلا را در ماهی در هندوستان مورد ارزیابی قرار دادند، هم‌خوانی دارد (مهرابیان و همکاران، ۱۳۹۱؛ Kashhedikar & Chhabra, 2010). در نهایت با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مختلف، تفاوت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر اساس منطقه جغرافیایی یا محل جداسازی و میزبان در سویه‌های مختلف از این باکتری وجود دارد از این جهت به منظور حفظ بهداشت و سلامت عمومی و جلوگیری از زیان‌های اقتصادی، توصیه می‌شود که پیش از درمان و به صورت دوره‌ای الگوی مقاومت این باکتری در هر منطقه مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت تأمین بودجه مورد نیاز جهت انجام این پروژه.

منابع

آهنگرزاده، م.، ۱۳۹۲. نقش آئروموناس هیدروفیلا در سبستی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی باکترین جدایی (های) حاد آن، پایان نامه دکتری تخصصی بیماری‌های آبزیان، صفحات ۱۰۵-۱۰۶.

اخلاقی، م.، ۱۳۷۹. ایمنی زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۱، صفحات ۵۷-۶۲.

پیغان، ر. و اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۲. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانوسمهای شبیه آئروموناسهای، متحرک، مجله علمی شیلات ایران، سال ۶، شماره ۲، صفحات ۸-۱.

علیشاهی، م.، سلطانی، م. و زرگر، الف.، ۱۳۸۸. بررسی باکتریایی تلفات ماهی امور (*Ctenopharyngodon idella*) در استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۵، شماره ۱ بهار، صفحات ۳۴-۲۵.

مهرابیان، س.، طهماسبی، ح.، ممتاز، ح.، غلام-حسینی، الف. و ریاحی‌چولیچه، ح.، ۱۳۹۱.

باشد. مطالعات زیادی در خصوص بررسی مقاومت آنتی-بیوتیکی آئروموناس هیدروفیلاهای جداسازی شده از حیوانات مختلف انجام شده است (Igbinsosa, 2013; Gray, 1984) اما با توجه به تفاوت نمایی آنتی‌بیوگرام در مناطق مختلف جغرافیای استفاده از الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی منطقه‌ای در درمان تجربی و اختصاصی لازم می‌باشد (Var et al., 2015).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی ۲۰ جدایه‌ی آئروموناس هیدروفیلا، نسبت به ۱۲ آنتی-بیوتیک نشان داد که جدایه‌ها مقاومت ۹۰ درصدی نسبت به کلیندامایسین (لینکوزامیدها) و ونکومایسن (گلیکوپپتیدها) داشتند که با نتایج مطالعه Isoken هم‌خوانی داشت (Isoken, 2013) همچنین در ۷۰ درصد از جدایه‌های مورد بررسی، مقاومت نسبت به استرپتومایسین (آمینوگلیکوزید) مشاهده گردید. این یافته با نتایج حاصل از مطالعات دیگر محققین که در آن‌ها استفاده از سفالوسپورین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، نیتروفرانتوئین مانعی جهت رشد بیش‌تر سویه‌های آئروموناس هیدروفیلا اعلام شده، هم‌خوانی دارد (Soliman, 1999; Motyle et al., 1985; Yucel & Ctak, Chandrakanthi et al., 2000; Emekdas et al., 2006).

همچنین مقاومت ۵۰ درصدی نسبت به کلرامفنیکل مشاهده شد در حالی که مطالعات مهرابیان و همکاران (۱۳۹۱) و Kaskhedikar و Chhabra (۲۰۱۰) مقاومت ۱۰۰ درصدی به کلرامفنیکل را نشان دادند. در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های اکسی-تتراسایکلین، سولتریم و آموکسی‌سیلین در ۲۵ درصد سویه‌ها، مشاهده شد. این در حالی است که در مطالعه صورت گرفته توسط محققین مختلف، عنوان شده است که اکثر گونه‌های آئروموناس هیدروفیلا به تتراسایکلین حساس می‌باشند (Kashhedikar & Chhabra, 2010).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در جدایه‌ها هیچ مقاومتی نسبت به سفوتاکسیم مشاهده نگردید که این یافته با مطالعه مهرابیان و همکاران در سال ۱۳۹۱ که به بررسی میزان مقاومت آئروموناس هیدروفیلاهای جدا شده از کبوتر در شهرکرد و یافته‌های Kashhedikar و

- Cesar, I., Geert, H., Mauro, T., Albert, M.J., Swings, J., Raffaele, P. and Jemmi, T., 1999. PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. pp: 5293-5302. PMID: PMC91719
- Chandrakanthi, W.H.S., Pathiratne, A. and Widanapathirana, G.S., 2000. Characteristics and virulence of *Aeromonas hydrophila* isolates from Freshwater fish with Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). *Diagnostics Microbiology of Infectious Diseases*. 28: 29-42.
- Clinical Institute and Laboratory Standards, 2011. Performance standards for 170 antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement. CLSI M100-S21.
- Dorsch, M., Ashbolt, N.J., Cox, P.T. and Goodman, A.E., 1994. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 722-726. DOI:10.1111/j.1365-2672.1994.tb02825.x
- Emekdas, G., Aslan, G., Tezcan, S., Serin, M.S., Yildiz, C., Ozturhan, and Durmaz, R., 2006. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility and genotypic discrimination of *Aeromonas* strain isolated from municipally treated tap water sample by cultivation and Ap-PCR in بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در آئروموناس هیدروفیلاهای جداسازی شده از کبوترهای خانگی در شهرکرد. ششمین کنگره میکروبیولوژی بالینی ایران و اولین کنگره بین‌المللی میکروبیولوژی بالینی.
- Agnishwar, S., Mousumi, S. and Pranab, R., 2013. Detection of 232bp virulent gene of *Aeromonas hydrophila* through PCR technique: (A rapid molecular diagnostic approach). *Advances in Microbiology*, 3: 83-87. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.31013>
- Austin, B. and Austin, D.A., 2007. *Bacterial Fish Pathogens*, 4th ed. Chichester, UK: Springer- Praxis. 81P. DOI: 10.1007/978-1-4020-6069-4.
- Bjorksten, B., 2006. The gut microbiota: a complex ecosystem. *Clinical Experimental Allergy*. 36: 1215-1217. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2006.02579.x
- Buller, N.B., 2004. *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. CABI publishing. 361 P. DOI: 10.1079/9780851997384.0000
- Carnahan, A.M. and Joseph, S.W., 2005. "Aeromonadaceae," in *The Proteobacteria*, Part B, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, D. J. Brenner, Krieg, and G. M. Garrity, Eds., Springer, New York, NY, USA.
- Cascon, A., Anguita, J., Hernanz, C., Sanchez, M., Fernandez, M. and Naharro, G., 1996. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1167-1170. PMID: PMC167882

- Nam, I.Y. and Joh, K., 2007.** Rapid Detection of Virulence Factors of *Aeromonas* Isolated from a Trout Farm by Hexaplex-PCR. The Journal of Microbiology, 45(4): 297-304. PMID: 17846582
- Nielsen, M.E., Høi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y. and Larsen, J.L., 2001.** Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile aeromonas species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of china?. Disease of Aquatic Organisms, 46(22): 23-29. DOI: 10.3354/dao046023
- Peyghan, R., Khadjeh, G.H., Mozarmnia, N. and Dadar, M., 2010.** Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, *Cyprinus carpio*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 1: 26-29. DOI: 10.4236/abb.2010.11004
- Porteen, K., Agrawal, R.K. and Bhilegaonkar, K.N., 2006.** PCR Based Detection of *Aeromonas* from Milk Samples. Journal of Food Technology, 4(2): 111-115. URL: <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=jftech.2006.111.115>
- Sen, K. and Rodgers, M., 2004.** Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. U.S. Environmental Protection Agency Paper 153 P. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x
- turkey. International Journal of Food Microbiology. 107: 310-314. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.012
- Gray, S.J., 1984.** *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. J. Hyg., Camb. 92: 365-375.
- Igbinsosa, I.H., 2013.** Antibigram Profiling and pathogenic status of *Aeromonas* species recovered from Chicken. Saudi Journal of Biological Sciences 21: 481-485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.06.003>
- Kashhedikar, M. and Chhabra, D., 2010.** Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. Veterinary World. 3(2): 76-77.
- LeChevallier, M.W., Seidler, R.J. and Evans, T.M., 1980.** Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. Applied Environmental Microbiology; 40: 922-930. PMCID: PMC291691
- Lee, S., Kim, S., Oh, Y. and Lee, Y., 2000.** Characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout in Korea. The Journal of Microbiology, 38(1): 1-7.
- Motyl, M.R., Mckinley, G. and Janda, J.M., 1985.** In Vitro susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 28: 151-153. doi: 10.1128/AAC.28.1.151

milk samples in Turkey. Journal of Food Safety, 23: 189-200.

Shome, B.R., Shome, R., Mazumder, Y., Das, A., Kumar, A., Rahman, H. and Bujarbaruah, K.M., 2005. Abdominal dropsy disease in major carps of Meghalaya: Isolation and characterization of *Aeromonas hydrophila*. Current Science, 88(12): 1897-1900.

Soliman, Z.I., 1999. Antibigram of some bacteria contaminating tilapia fish at El-Manzala lake in port said governorate. Vet. Med. J. Giza, 47: 19-27.

Swaminathan, T.R., Rathore, G., Abidi, R. and Kapoor, D., 2004. Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. Indian Journal of Fisheries, 51(2): 251-254.

Uddin, N. and Al-Harbi, A.H., 2012. Bacterial Flora of polycultured common carp (*Cyprinus carpio*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). International Aquatic Research, 4: 10.

Var, S.K., Hadi, R. and Khardori, N.M., 2015. Evaluation of regional antibiograms to monitor antimicrobial resistance in hampton roads, Virginia. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 14: 22. DOI 10.1186/s12941-015-0080-6

Yousr, A.H., Napis, S., Rusul, G.R.A. and Son, R., 2007. Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. ASEAN Food Journal, 14(2): 115-122.

Yucel, N. and Ctak, S., 2003. The occurrence, hemolytic activity and antibiotic susceptibility of motile *Aeromonas* spp. Isolated from meat and

Determination of isolated *Aeromonas hydrophila* antibiotic resistance profile from farmed common carp (*Cyprinus carpio*) in khuzestan province

Moori Bakhtiari N.^{*1}; Peyghan R.²; Monzavi S.F.³

* n.moori@scu.ac.ir

1- Pathobiology Department of Veterinary School of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2-Clinical Sciences Department of Veterinary School of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3- Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Abstract

Aeromonas are an example of emerging bacterial pathogens. Even though they have been recognized as primary fish and human pathogens. *Aeromonas hydrophila* are opportunistic pathogens that are at the same time infectious and enterotoxigenic and multiple antibiotic resistances (MAR) among *Aeromonas hydrophila* strains has been reported from many parts of the world. Under these circumstances, it will be worthwhile to find out the prevalence of antibiotic resistance of the *Aeromonas hydrophila* strains. The one hundred pieces of fish samples were collected from 4 common carp training pool in Khuzestan province. The part of intestine was collected in sterile plate and was homogenized. The samples were cultured in blood agar and incubated in 37centigrade degree temperature. Three to five *Aeomonas hydrophila* suspected colony, were selected from any plate and purified in blood agar. After initial evaluation of each colony by catalase, oxidase and gram staining, suspected strains DNA was extracted by boiling. *Aeromonas hydrophila* strains were confirmed by PCR assay and using of genus and species specific primers. Finally, multiple antibiotic resistance (MAR) of confirmed *Aeromonas hydrophila* isolates was evaluated by Kirby-Bauer disc diffusion method. Twenty *Aeromonas hydrophila* strains of *Aeromonas* suspected colonies were confirmed by PCR assay and the most of isolates had a multiple resistance. The least and the most resistance was observed regarding to cefotaxim and ciprofloxacin (<25%), vancomycin and clindamycin (90%), respectively. Compared with results of other studies, antibiotic resistance pattern of these bacterial strains is variable in different geographical areas; therefore resistant pattern of each group of bacteria must be determined in each area.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Common carp (*Cyprinus carpio*), Antibiotic resistance, Khouzeestan province

*Corresponding author