ارزیابی آزمایشگاهی حساسیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، عامل استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل

بهنام پورمولایی[۱]، مسعود حقیقی[۲*]، حمیدرضا اشراقی[۱]، مهرداد حمیدی[۳]

*masoud126@yahoo.com

۱- گروه دامپزشکی علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تنکابن، ایران
۳- دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی، خدمات درمانی و بهداشتی زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵ **تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶**

چکیده

هدف از این تحقیق ارزیابی حساسیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*)، به دو داروی فلورفنیکل (FFC) و نانو فلورفنیکل (NFFC) در محیط آزمایشگاهی بود. استرپتوکوکوس اینیایی یکی از مهمترین باکتری های بیماری زا در صنعت پرورش ماهیان سرد آبی کشور است که هر ساله خسارات مالی زیادی را به این صنعت تحمیل می نماید. سوش باکتریایی از آزمایشگاه بهداشت و بیماری های پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تهیه شد. حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری، (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) و نیز نواحی قطر هاله عدم رشد به روش کربی- بائر (Kirby-Bauer) با استفاده از فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل تعیین و با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری با نانو فلورفنیکل ۰/۰۷۸ µg/ml و با فلورفنیکل ۰/۳۱۲ µg/ml بود و حداقل غلظت باکتری کشی نانو فلورفنیکل ۰/۱۵۶ µg/ml و فلورفنیکل۰/۳۱۲ µg/ml بود که از نظر آماری اختلاف معنی دار داشتند ($p<0/05$). هم چنین، اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری با نانو فلورفنیکل ۱/۱±۳۲/۸۰ میلی متر و با فلورفنیکل ۰/۴±۳۱/۶۳ میلی متر بود که اختلاف آماری معنی دار وجود نداشت ($p>0/05$). این نتایج نشان می دهد که باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مورد آزمایش به نانو فلورفنیکل نسبت به فلورفنیکل حساس تر است. نتیجه گیری می شود که این داروها به ویژه نانو فلورفنیکل، قدرت بالایی در کنترل عفونت استرپتوکوکوس اینیایی دارند. بنابراین نانو فلورفنیکل می تواند مبنای پایش باکترهای مقاوم به آنتی بیوتیک ها، مد نظر قرار گیرد.

لغات کلیدی: فلورفنیکل، نانو فلورفنیکل، استرپتوکوکوس اینیایی، قزل آلای رنگین کمان

* نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.220092/ISFJ.2018.116693]

مقدمه

استرپتوکوکوس اینیایی یکی از مهمترین باکتری های بیماری زا در صنعت پرورش ماهیان سرد آبی کشور است که سالانه خسارات مالی سنگینی را بر این صنعت تحمیل می نماید (Soltani *et al*., 2005؛ سپهداری و همکاران، ۱۳۹۲). استرپتوکوکوس اینیایی باکتری گرم مثبت کروی شکل، متعلق به جنس استرپتوکوک است. این باکتری غیر متحرک، کاتالاز منفی، تخمیر گلوکز و بدون اسپور است (Plumb, 1999). استرپتوکوکوس اینیایی نخستین بار در سال ۱۹۷۰ میلادی که موجب آبسه های زیرجلدی دلفین های آب شیرین (*Inia geoffrensis*) آمازون در آکواریوم های سانفرانسیسکو و نیویورک گردید، جدا سازی و گزارش شد (Pier and Madin, 1976; Pier *et al*., 1978). از اوایل دهه ۱۹۸۰، عامل مهم مرگ و میر در حوضچه های پرورش ماهی، مننگوآنسفالیت همه گیر یا منتشر توسط استرپتوکوک، شناخته شد (Kitao *et al*., 1981; Kaige *et al*., 1984; Perera *et al*., 1994; Eldar *et al*., 1994; Eldar *et al*., 1995). تاکنون گزارش شده است که ۲۷ گونه از ماهیان پرورشی از جمله ماهی قزل آلای رنگین کمان مستعد به عفونت استرپتوکوکوس اینیایی می باشند (Agnew and Barnes, 2007). استرپتوکوکوزیس به شکل مننگو آنسفالیت، سپتی سمی و ضایعات پوستی تظاهر می نماید (Soltani *et al*., 2005).

فلورفنیکل آنتی بیوتیک وسیع الطیفی است که از طریق اتصال به تحت واحد 50S ریبوزوم باکتری عمل می کند و در نتیجه از ساخت پروتئین باکتریایی جلوگیری می کند (Plumb, 1999). فلورفنیکل بر علیه استرپتوکوکوس اینیایی در گونه های زیادی از ماهیان مؤثر است (حقیقی و همکاران، ۱۳۹۶؛ Bowker *et al*., 2010; Darwish, 2010; Gaunt *et al*., 2010). هدف از این مطالعه ارزیابی حساسیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به دو داروی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل در محیط آزمایشگاهی بود.

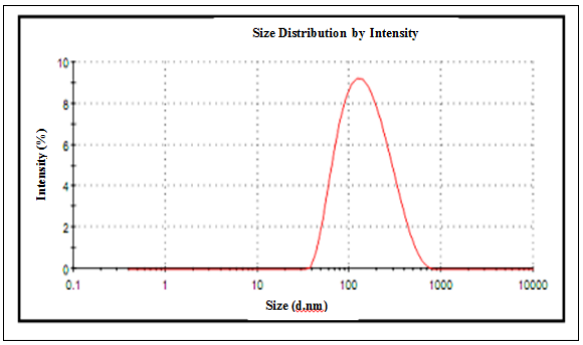
مواد و روش کار

ساخت داروی نانو فلورفنیکل

ساخت نانوسوسپانسیون فلورفنیکل در آزمایشگاه دارو سازی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام شد. به طور اجمال برای تهیه نانو فلورفنیکل از رویکرد پائین به بالا و به روش نانوکریستالیزاسیون استفاده گردید (پتنت شماره ۷۳۳۶۰ حمیدی و همکاران، ۱۳۹۰). در این روش ابتدا داروی فلورفنیکل در یک حلال آلی (ترکیبی از اتانول و متانول) حل گردید و محلول به یک ضد حلال قابل امتزاج با آب افزوده شد و چرخش داده شد. نتایج حاکی از انحلال پذیری کامل فلورفنیکل در حلال آلی بود. انحلال در دمای آزمایشگاه و طی مدت ۲ ساعت انجام پذیرفت. با این کار اشباع سریع رخ داده و موجب هسته زایی و ایجاد رسوب می‌گردد. پس از رسوب گذاری حلال را تبخیر نموده تا سمیت متانول از بین برود. برای جلوگیری از پدیده افزایش اندازه ذرات اغلب از افزودن پایدارکننده‌ها (پلیمرها) به فرمولاسیون استفاده می‌شود. این پلیمرها یک سر آب دوست و یک دم آب گریز دارند که این خصلت دوگانه موجب پایدار شدن نانو ذره می شود و مانع از نزدیک شدن ذرات به همدیگر و یا کلوخی شدن و نیز مانع از شروع حل شدن مجدد نانو ذره می شود. در این بررسی، از پلیمر پلی وینیل استات (PVA)، که یک ترکیب شیمیایی با جرم مولی ۸۶/۰۹ گرم/مول می باشد، به نسبت مناسب به فلورفنیکل افزوده شد. پس از این مرحله، محصول بدست آمده که شامل فلورفنیکل و پلیمر می باشد با سرعت ۱۵۰۰۰ rpm و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma-3k30) گردید. محصول بدست آمده، سوسپانسیونی متشکل از ذرات نانو فلورفنیکل بود. پس از تهیه سوسپانسیون، به منظور تأیید نانو ذره تولید شده و تعیین اندازه ذرات و محاسبه بار الکتریکی آنها، از دستگاه زتاسایزر (Zetasizer)، مدل ZEN3600 ساخت شرکت مالورن (Malvern Instruments) استفاده شد. برای تعیین اندازه ذرات در محیط مایع از روش تفرق نور پویا (Dynamic Light Scattering (DLS، که طیف سنجی همبستگی فوتون Photon Correlation Spectroscopy (PCS) نیز

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

نامیده می شود، استفاده شد. میانگین جمعیتی اندازه ذرات در حد بسیار قابل قبول در حدود ۱۲۴ نانومتر بود (شکل ۱).

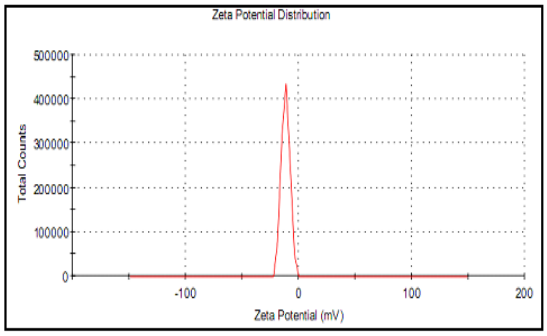


شکل ۱: توزیع اندازه نانو ذرات فلورفنیکل

Figure 1: The distribution of nano-florfenicol .

پارامتر دیگری که اندازه گیری شد، شاخص پراکندگی PDI (Poly Dispersity Index) اندازه زنجیرهای پلیمری است. این پارامتر نسبت متوسط جرم مولکولی عددی، M_n پلیمر به متوسط جرم مولکولی وزنی M_w پلیمر است. دامنه آن بین صفر و یک است. عدد یک یعنی طیف وسیعی از اندازه های ذرات می باشد. این پارامتر هر قدر به صفر نزدیک تر باشد، ایده آل تر است و جمعیت یک دست تر و نانو تولید شده دقیق تر خواهد بود. شاخص پراکندگی در این بررسی زیر ۰/۳ بود که فوق العاده خوب است زیرا نه همه دستگاه ها ایده آل است و نه مواد اولیه خالص هستند.

آنالیز دیگر تعیین بار الکتریکی سطحی است. نانو ذرات نسبت به داروی آزاد سطح بیشتری دارند و جذب بار سطحی دارند. برای تعیین سطح بار سطحی نمونه را در دستگاه زتاسایزر قرار داده و گراف داده شده عددی برابر ۱۱- میلی ولت را نشان داد. یعنی هر ذره، ۱۱- میلی ولت بار الکتریکی در سطح خودش داشته است (شکل ۲). این عدد قابل قبولی است زیرا هدف ما خشک کردن نانو فلورفنیکل بوده و نمی خواستیم که آن را طولانی مدت در آب نگه داریم که در این حالت باید این عدد بالاتر مثلاً ۳۰+ اختلاف داشته باشد.

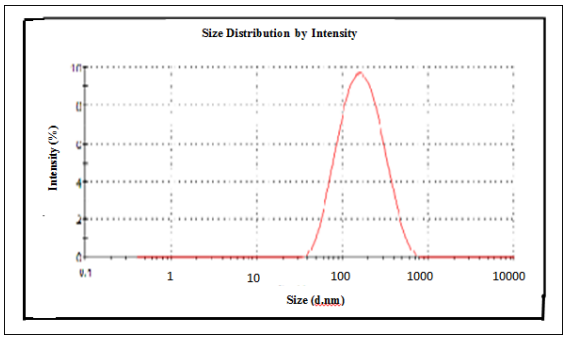


۲: بار الکتریکی سطحی نانو ذرات فلورفنیکل

Figure 2: Superficial electric charge of nono-florfenicol.

بررسی پراکندگی مجدد نانو فلورفنیکل خشک شده

غلظت مشخصی از نانو ذرات فلورفنیکل خشک شده در آب دیونیزه که معادل با غلظت نانوسوسپانسیون قبل از خشک کردن بود، تهیه و در دستگاه اوربیتال شیکر به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس برای تعیین اندازه نانو ذرات به غلظت معینی رقیق گشت. نمودار اندازه نانو ذرات فلورفنیکل خشک شده و باز پراکنده شده در شکل ۳ نشان داده شده است.



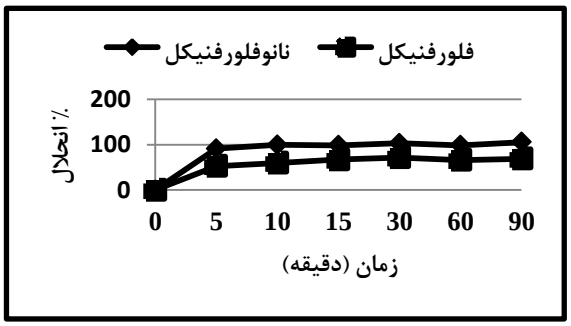
شکل ۳: توزیع اندازه نانو فلورفنیکل بعد از پراکندگی مجدد

Figure 3: The distribution of nano-florfenicol size after dispertion.

این نشان می دهد که عمل خشک شدن نتوانسته به نانو فلورفنیکل آسیبی برساند. در مرحله خشک کردن از ماده محافظ کرایوپروتکتور، Cryoprotector و از ترکیب گلوکوزیل ابیسل به جای مولکول آب حذف شده در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد استفاده گردید تا شکل نانو حفظ

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

گردد. در نانو فلورفنیکل تهیه شده به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم پودر، ۲۷ میلی گرم آن فلورفنیکل بود. سرعت انحلال که یکی از فاکتورهای مهم فارماکوپه می باشد، در این مطالعه بررسی شد که سرعت و میزان انحلال نانو فلورفنیکل بیشتر از داروی فلورفنیکل بود (شکل ۴).



شکل ۴: مقایسه سرعت و میزان انحلال فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل

Figure 4: Comparison of speed and rate of dissolution of florfenicol and nano-flofenicol.

آزمون اندازه گیری طیف عبور یا جذب نوری در ناحیه طیفی مادون قرمز Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) نشانگر عدم برهم کنش شیمیایی بین ذرات و آزمون Differential scanning calorimetry (DSC) نیز حاکی از عدم تولید ماهیت شیمیایی جدید اما تغییر شکل کریستالی دارو از کریستالی به آمرف بود. در شکل آمورف نسبت به شکل کریستال تنها پیوندها کمتر است و نقطه ذوب آن کمتر است و زودتر ذوب می شود. در نهایت، آزمون انحلال نانو پودر ذرات خشک شده (نانو فلورفنیکل) با قاطعیت نشانگر افزایش چشمگیر در سرعت و میزان انحلال دارو از نانو ذرات نسبت به پودر اولیه بود.

فعال سازی سوش میکروبی

در این مطالعه تجربی جهت فعال سازی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ابتدا سوسپانسیون سوش میکروبی (تهیه شده از آزمایشگاه بهداشت و بیماری های پژوهشکده اکولوژی دریای خزر) به صورت تازه تهیه گردید. برای انجام این عمل ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش، مقدار ۱ میلی لیتر از محیط کشت خالص نوترینت براث (مرک آلمان) به داخل ویال لیوفیلیزه باکتری تزریق و سپس ویال برای مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور یخچال دار در دمای ۳۷ درجه ساتتی گراد قرار داده شد. سپس به وسیله میکروسمپلر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول داخل ویال برداشته و در لوله آزمایش حاوی نوترینت براث کشت داده شد و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد. ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، به کمک آنس استریل از کشت ذخیره (مادر) به محیط کشت شیب دار نوترینت آگار (مرک آلمان) تلقیح گردید. پس از رشد باکتری بر سطح شیب دار آگار سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول فیزیولوژی استریل تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شده و توسط محلول فیزیولوژی استریل به اندازه کافی رقیق گردید تا کدورت آن با کدورت ۱ محلول استاندارد مک فارلند (۳×۱۰^{۸} واحد کلنی در میلی لیتر)، تنظیم شد و تا زمان مصرف در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2013).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

جهت تعیین و ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) از روش رقت سازی در لوله (ماکرودایلوشن) و طبق استاندارد NCCLS (1999) استفاده شد. برای انجام این کار از یک سری لوله های آزمایشگاهی که اتوکلاو و استریل شده بودند از سری دو برابر رقت های متوالی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل در محدوده غلظت ۱۰-۰/۰۱۹۵ میکروگرم در میلی لیتر در محیط کشت نوترینت براث یا مایع با سه تکرار استفاده شد. برای هر دارو از یک سری ۱۰ تایی از لوله های آزمایش استفاده شد. ۹ لوله برای آزمایش رقت های مختلف هر دارو و یک لوله به عنوان کنترل منفی (فاقد هر گونه دارو) در نظر گرفته شد. برای لوله اول ۱ میلی لیتر از هر دارو با غلظت

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

۱۰ میکروگرم در میلی لیتر با ۱ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث رقیق سازی شد و به همین ترتیب ۱ میلی لیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم که حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث بود انتقال داده و این کار تا لوله شماره ۱۰ انجام شد و از از آخرین لوله ۱ میلی لیتر برداشته و دور ریخته شد. در نهایت رقت هر لوله نصف رقت لوله قبلی شد. سپس ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی که دارای کدورت ۱ مک فارلند (۳×۱۰^{۸} CFU/ml) باکتری بود، انتقال داده شد. پس از کشت، تمام لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در گرم خانه نگه داری شدند. سپس، لوله ها از نظر رشد باکتری تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند. کم ترین غلظت فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل که مانع از رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی شدند و در آنها هیچ گونه کدورتی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) تعیین گردید.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از تمام رقت هایی که کدورتی در آنها مشاهده نشده بود، نمونه برداری شد و جهت تعیین MBC در پلیت نوترینت آگار یا جامد به روش سطحی کشت داده شد. برای انجام ۱۰۰ میکرولیتر از لوله هایی که عدم رشد باکتری را نشان می دادند بر روی محیط کشت نوترینت آگار ریخته شد و با پخش کننده بر روی محیط کشت پخش شد. پلیت های کشت داده شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در گرم خانه نگه داری شد. پس از طی گرم خانه گذاری پلیت ها از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شدند. رقتی که در آن ۹۹ درصد کلنی ها رشد نکرده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Espinel-Ingroff *et al*., 2002)

تعیین قطر هاله عدم رشد با استفاده از روش انتشار دیسک

برای تعیین حساسیت سویه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل از آزمون انتشار دیسک به روش کربی – بوئر، Kirby-Bauer استفاده شد. در این بررسی از دیسک های کاغذی استفاده شد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا CFU/ml ۳×۱۰^{۸} (معادل استاندارد ۱ مک فارلند) از کشت استاندارد سوش باکتری روی سطح محیط آگار کشت داده شد و توسط اسپریدر شیشه ای استریل (کشت چمنی) بر روی آگار پخش شد. دیسک هایی که قبلاً در غلظت های مشخص محلول های دارویی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل و نیز آب مقطر به عنوان شاهد منفی خیسانده شده بودند توسط پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت گردید. سپس پتری ها به داخل گرمخانه دارای دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. اثر ضد میکروبی بر اساس قطر هاله عدم رشد در مقیاس میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایش ها ۳ بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده های حاصل از تأثیر ۱۰ سطح متفاوت از غلظت های فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مورد بررسی با ۳ تکرار، جهت بررسی توزیع نرمال داده ها در تیمارهای مورد مطالعه از آزمون کولموگوروف-اسمیرنو Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده ها، جهت مقایسه آماری بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Anova) استفاده شد. برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه شماره ۱۳ و برای رسم نمودارها از برنامه Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه اثر بازدارندگی رشد و باکتری کشی دو داروی نانو فلورفنیکل و فلورفنیکل بر روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، *S. iniae* عامل استرپتوکوکوزیس ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) فلورفنیکل ۰/۳۱۲ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت بازدارندگی نانو فلورفنیکل ۰/۰۷۸ میکروگرم در

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

میلی لیتر بود (جدول ۱). این نتایج نشان می دهد که قدرت بازدارندگی رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نانو فلورفنیکل ۴ برابر فلورفنیکل بود (p< ۰/۰۵). همچنین، حداقل غلظت باکتری کشی فلورفنیکل ۰/۳۱۲ میکروگرم در میلی لیتر و نانو فلورفنیکل ۰/۱۵۶ میکروگرم در میلی لیتر بود (جدول ۱). این نشان می دهد که قدرت باکتری کشی نانو فلورفنیکل ۲ برابر فلورفنیکل بود (p<۰/۰۵). این نتایج نشان می دهد که حساسیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به نانو فلورفنیکل بیشتر از فلورفنیکل بود.

جدول ۱: نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) دو داروی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل

Table 1: The results of Minimum Inhibition Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) florfenicol and nano-florfenicol

نام دارو	نوع باکتری	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
فلورفنیکل	استرپتوکوکوس اینیایی *S. iniae*	۰/۳۱۲[a]	۰/۳۱۲[a]
نانو فلورفنیکل	استرپتوکوکوس اینیایی *S. iniae*	۰/۰۷۸[b]	۰/۱۵۶[b]

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد (p< ۰/۰۵)

MIC: Minimum Inhibition Concentration
MBC: Minimum Bactericidal Concentration

از دیگر نتایج این پژوهش تعیین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به دو داروی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بود. نتایج نشان داد که اندازه ی قطر هاله عدم رشد برای فلورفنیکل ۰/۴±۳۱/۶۳ میلی متر و برای نانو فلورفنیکل ۱/۱±۳۲/۸۰ میلی متر بود (جدول ۲). این نشان می دهد که هرچند اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به نانو فلورفنیکل بیشتر از فلورفنیکل بود؛ ولی از نظر آماری اختلاف معنی دار بین این اثر نانو فلورفنیکل و فلورفنیکل وجود نداشت (p>۰/۰۵).

جدول ۲: نتایج اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، *S. iniae* به دو داروی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل

Table 2: The results of the diameter inhibition zone of *Streptococcus iniae* to florfenicol and nano-florfenicol

نام دارو	نوع باکتری	اندازه قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
فلورفنیکل	استرپتوکوکوس اینیایی *S. iniae*	۰/۴±۳۱/۶۳[a]
نانو فلورفنیکل	استرپتوکوکوس اینیایی *S. iniae*	۱/۱±۳۲/۸۰[a]

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار می باشد (p>۰/۰۵)

بحث

در این پژوهش فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان دارای اثر ضد میکروبی بودند (جدول ۱). مشاهدات نشان داد که هر دو داروی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بر باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی اثرات مهار کنندگی و میکروب کشی دارد. حداقل غلظت مهار رشد فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بر روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به ترتیب ۰/۳۱۲ و ۰/۰۷۸ میکروگرم در میلی لیتر بود که از نظر آماری معنی دار بود (p<۰/۰۵). این نشان می دهد که MIC نانو فلورفنیکل ۴ برابر کمتر از MIC فلورفنیکل بود. به عبارت دیگر قدرت بازدارندگی رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی داروی نانو فلورفنیکل ۴ برابر بیشتر از قدرت داروی فلورفنیکل بود. این نتایج با تعدادی از نتایج تحقیقات انجام شده با فلورفنیکل و در انواعی از گونه های آبزیان همخوانی دارد. حداقل غلظت مهار رشد فلورفنیکل بر روی سه گونه از باکتری های ویبریو آنگیلارم جدا شده از ماهی کاد بیمار، ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش گردید (Samuelsen *et al*., 2003). همچنین، حداقل غلظت مهار رشد باکتری ادواردزیلا ایکتالوری در گربه ماهی کانال با داروی فلورفنیکل، ۰/۲۵

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

میکروگرم در میلی لیتر گزارش شده است (Schering-Plough, 2007). در مطالعه ای دیگر، MIC فلورفنیکل در گونه های مختلف آئروموناده‌ای متحرک ۱۶-۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شده است (Godoy *et al*., 2008). در مطالعه ای که در ژاپن انجام شد، MIC فلورفنیکل در ۷۴ گونه از *Photopacterium damselae*، *piscicida* که همگی به فلورفنیکل حساس بودند ۰/۵- ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شده است (Kawanishi *et al*., 2006). در مطالعه ای دیگر حداقل غلظت مهاری فلورفنیکل بر روی انواعی از باکتری های بیماری زای جدا شده از ماهیان Koi Carp و Threespot Gourami (*Trichogaster trichopterus*)، ۲-۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شده است (Yanong and Curtis, 2005). همچنین، از دیگر نتایج پژوهش حاضر، تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بود که به ترتیب ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میکروگرم در میلی لیتر بود. این نشان می دهد که حداقل غلظت کشندگی نانو فلورفنیکل نصف حداقل غلظت کشندگی فلورفنیکل است. به عبارت دیگر قدرت باکتری کشی نانو فلورفنیکل، ۲ برابر قدرت باکتری کشی فلورفنیکل بود. همچنین، نتایج این بررسی نشان داد که MBC در نانو فلورفنیکل (۰/۱۵۶ میکروگرم در میلی لیتر) **۲** برابر MIC (۰/۰۷۸ میکروگرم در میلی لیتر) آن بود. این در حالی است که MIC و MBC فلورفنیکل یکسان بود (۰/۳۱۲ میکروگرم در میلی لیتر). تعدادی از تحقیقات در آبزیان نشان داده اند که MBC فلورفنیکل چندین برابر MIC فلورفنیکل بود که مغایر با تحقیق حاضر است. Choi و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که MBC فلورفنیکل ۳۲-۸ برابر MIC آن، در گونه های مختلف باکتری های حیوانی بود.

از دیگر نتایج این تحقیق، اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی توسط دو داروی نانو فلورفنیکل و فلورفنیکل بود. نتایج نشان داد که اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری با نانو فلورفنیکل بیشتر از فلورفنیکل بود ولی از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p > 0/05$). Godoy و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که قطر هاله عدم رشد انواعی از باکتری ها به فلورفنیکل ۳۲≥ میلی متر بود که این موافق با نتایج تحقیق حاضر است.

Michel و همکاران با ارزیابی حداقل غلظت مهاری با استفاده از روش رقت آگار نشان دادند که علیرغم استفاده گسترده از داروی فلورفنیکل، مقاومت دارویی در مزارع پرورش ماهی فرانسه نسبت به این دارو زیاد نبوده و مقاومت دارویی در برابر داروی کلرامفنیکل معمولاً شایع تر است (Michel *et al*., 2013).

نتیجه گیری می شود که این داروها به ویژه نانو فلورفنیکل، قدرت بالایی در کنترل عفونت استرپتوکوکوس اینیایی دارند. بنابراین نانو فلورفنیکل می تواند مبنای پایش باکترهای مقاوم به آنتی بیوتیک ها، مد نظر قرار گیرد.

منابع

حقیقی، م.، فخار زاده، س.م.ا.، نجار لشگری، س. و پورمولایی، ب.، ۱۳۹۶. بررسی *in vitro* فعالیت ضد باکتریایی عصاره و نانو عصاره مرزنگوش (*Origanum vulgare*) در مقایسه با فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بر ضد استرپتوکوکوس اینیایی. مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۳): ۵۱-۴۱.

DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113521

حمیدی، م.، رستمی زاده، ک.، مصلحی، م.، سواری، ج.، نظیری مهربانی، ا.ح. و صنعتی، ا.، ۱۳۹۰. فرآیند تولید نانوذرات از ترکیبات نامحلول در آب. ثبت اختراع به شماره ۷۳۳۳۶۰. دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان.

سپهداری، ا.، سعیدی، ع. ا.، کاکولکی، ش.، حبیبی کوتنایی، ف. و بابا علیان، ع.، (۱۳۹۲). بررسی میزان شیوع استرپتوکوکوزیس در ماهیان قزل آلای رنگین کمان در مزارع پرورشی شرق استان مازندران (حوضه رودخانه هراز). مجله علمی شیلات ایران، ۲۲(۴):۵۱-۴۱

DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110147.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122: 1–15. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.03.002

Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Golian, M.M. and Vasiee, A., 2013. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences*, 4(3): 89-99.

Bowker, J., Ostland, V.E., Carty, D. and Bowman, M.P., 2010. Effectiveness of Aquaflor (50% florfenicol) to control mortality associated with *Streptococcus iniae* in freshwater-reared subadult sunshine bass. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22: 254-265. DOI: 10.1577/H09-010.1

Choi, M.j., Lee, E.M., Lee, S.J., Reza, Md. A., Lee, J.S., Gebru, E., Rhee, M.H. and Park, S.C., 2011. The *in vitro* antibacterial activity of florfenicol in combination with amoxicillin or cefuroxime against pathogenic bacteria of animal origin. *Pakistan Veterinary Journal*, 31: 1-4.

Darwish, A., 2010. Effectiveness of intervention with florfenicol on a *Streptococcus iniae* infection in blue tilapia. *North American Journal of Aquaculture*, 72: 354-360. DOI: 10.1577/A09-074.1

Eldar, A., Bejerano, Y. and Bercovier, H., 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile:* two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 28: 139-143. DOI: 10.1007/BF01571054

Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H., 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Veterinary Microbiology*, 43:33-40. DOI:10.1016/0378-1135(94)00052-X

Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. and Walsh, T., 2002. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergiluus* app: NCCLS collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9): 3204-3208.

Gaunt, P.S., Endris, R., McGinnis, A., Baumgartner, W., Camus, A., Steadman, J., Sweeney, D. and Sun, F.S., 2010. Determination of florfenicol dose rate in feed for control of mortality in Nile tilapia infected with *Streptococcus iniae*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(3): 158-166. DOI : 10.1577/H09-044.1

Godoy, D.T., Mian, G.F., Zanalo, R., Yuhara, T.Y., Faria, F.C. and Figueiredo, H.C.P., 2008. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilianstrains of motile aeromonads. *Aquaculture*, 285(1-4): 255-259. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.014

Kaige, N., Miyazaki, T. and Kubota, S., 1984. The pathogen and histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail *Seriola-quinqueradiata. Fish Pathology*, 19: 173-180. DOI: 10.3147/jsfp.19.173

Kawanishi, M., Kijima, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Yagyu, K., Takahashi, T., Suzuki, S. and Tamuara,

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

Y., 2006. Drug resistance and random amplified polymorphic DNA analysis of Photobacterium damselae ssp. piscicida isolates from cultured Seriola (yellowtail, amberjack and lingfish) in Japan. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 648–653. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01820.x

Kitao, T., Aoki, T. and Sakoh, R., 1981. Epizootic caused by *b*-hemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathology*, 15: 301-307. DOI: 10.3147/jsfp.15.301

Michel, C., Kerouault, B. and Martin, C., 2003. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France. Comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5): 1008-1015. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02093.x

National committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1999. Performance standards for antibacterial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals approved standard M31-A (ISBN 1-56238-377-9). NCCLS, Wayne, PA.

Perera, R.P., Johnson, S.K., Collins, M.D. and Lewis, D.H., 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* and *T. aurea* hybrids. *Journal of Aquatic Animal Hea*lth, 6(4): 335-340. DOI: 10.1577/1548-8667(1994)006<0335:SIAWMO>2.3.CO;2

Pier, G.B. and Madin, S.H., 1976. *"Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon Freshwater Dolphin, *Inia geoffrensis"*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26 (4): 545–53. DOI:10.1099/00207713-26-4-545.

Pier, G.B., Madin, S.H. and Al-Nakeeb, S., 1978. Isolation and characterization of a second isolate of *Streptococcus iniae. International Journal of Systematic Bacteriology*, 28: 311-314. DOI: 0020-77 13/78/0028-03 1 1 $02.00/0

Plumb, J.A., 1999. Tilapia bacterial diseases. In-Health: maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: Iowa State University, pp. 297-305.

Samuelsen, O.B., Øivind, B. and Arne, E., 2003. Pharmacokinetics of florfenicol cod Gadus morhua and in vitro antibacterial activity again st Vibrio anguillarum. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56: 127-133. DOI: 10.3354/dao056127

Schering-Plough Animal Health Corporation (SAHC), 2007. AQUAFLOR® (florfenicol) approved for freshwater-reared Salmonids.

Soltani, M., Jamshidi, Sh. and Sharifpour, I., 2005. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) in Iran: Biophysical Characteristics and Pathogenesis. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 25(3): 95-106.

Yanong, R.P.E., Curtis, E.W., Simmons, R., Bhattaram, V.A., .Gopalakrishnan, M. and Ketabi, N., 2005. Pharmacokinetic studies of florfenicol in koi carp and threespot gourami Trichogaster trichopterus after oral and intramuscular treatment. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17(2): 129–137. DOI: 10.1577/H03-065.1.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

In vitro evaluation of the susceptibility of *Streptococcus iniae*, etiological agent of streptococcusis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to florfenicol and nano-florfenicol

Pourmolaee B.[1]; Haghighi M.[2*], Eshraghi H.R.[1]; Hamidi M.[3]

[*]masoud126@yahoo.com

1 - Department of Veterinary Basic Sciences, Science and Research Branch, Azad University, Tehran, Iran
2- Iranian Fisheries Science Research Institute, Cold-water Fishes Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tonekabon, Iran
3- School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan-Iran

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-31]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.2.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116693]

Abstract

In vitro studies were conducted to assess the sensitivity of *Streptococcus iniae,* the etiological agent of streptococcusis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the antibacterial drugs florfenicol (FFC) and nano florfenicol (NFFC). The isolates originated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Streptococcus iniae* through natural outbreaks of streptococcusis. The minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and Kirby- Bauer zones of inhibition (in mm) for FFC and NFFC against *S. iniae* were determined. The results showed that the MIC for NFFC and FFC tested with *S. iniae* were 0.078µg/ml and 0.312µg/ml respectively. The MBC for NFFC were 0.156µg/ml and for FFC 0.312µg/ml. There were statistically significant difference in the MIC and the MBC between NFFC and FFC ($p<0.05$). The diameter of inhibition zone for NFFC and FFC were 32.80±1.1mm and 31.63±0.4 mm respectively that there was no significant differences statistically ($p>0.05$). It is concluded that these drugs, especially nano-florfenicol, have a high potential for controlling *Streptococcus iniae*. Therefore, nano-florfenicol can be considered as the basis for antibiotic-resistant bacteria.

Keywords: Florfenicol, Nano-florfenicol, *Streptococcus iniae*, Rainbow trout

[*]Corresponding author