بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در کوکسی‌های گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در استان ایلام

آمنه یاری[۱]، مصطفی نعمتی[۱*]، فاضل پور احمد[۱]

[*]m.nemati@ilam.ac.ir

۱- دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۶

چکیده

استرپتوکوکوزیس (Streptococcosis) و لاکتوکوکوزیس (Lactococcusis) از جمله بیماری‌های باکتریایی ماهیان هستند که انواع مختلف ماهیان وحشی و پرورشی به ویژه قزل‌آلای رنگین کمان را به صورت انفرادی و همه‌گیر در معرض خطر قرار داده و خسارات اقتصادی قابل توجهی را به دنبال دارند. در تحقیق حاضر، تعداد ۶۰ قطعه ماهی با علائم استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس جمع‌آوری و از آن‌ها نمونه‌برداری و کشت میکروبی انجام شد. هویت باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی تعیین و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) تأیید گردید. بدین منظور، تکثیر بخش هایی از ژن‌های tuf (کد کننده فاکتور امتداد Tu) جهت شناسایی جنس *استرپتوکوکوس* و 16S rRNA برای تعیین گونه *استرپتوکوکوس اینیایی* (*Streptococcus iniae*) و *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*) مورد استفاده قرار گرفت. آزمایشات مولکولی نشان داد که ۹۰ جدایه متعلق به جنس *استرپتوکوکوس* بودند، که از میان آن‌ها ۳۵ جدایه در آزمایش PCR، گونه *استرپتوکوکوس اینیایی*، ۵۵ جدایه متعلق به گونه *لاکتوکوکوس گارویه* و۲۰ جدایه متعلق به جنس *استافیلوکوکوس* تشخیص داده شدند. در آزمون PCR با هدف تکثیر حضور ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، از ۳۹ مورد مقاومت فنوتیپی نسبت به استرپتومایسین، ۳۰ مورد و از ۲۶ مورد مقاومت فنوتیپی در برابر اریترومایسین ۲۰ مورد، و از ۳۵ مورد مقاومت فنوتیپی در برابر اکسی تتراسایکلین، ۲۷ مورد تأیید واقع شدند. این مطالعه علاوه بر معرفی عوامل باکتریایی بوجود آورنده عفونت های همه‌گیر در بین استخرهای پرورش قزل آلای منطقه، خطر استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها را که منجر به ایجاد کوکسی‌های مقاوم به درمان شده اند را نیز نشان می دهد.

کلمات کلیدی: ماهی، *استرپتوکوکوس*، *لاکتوکوکوس*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مقاومت آنتی بیوتیکی

* نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

مقدمه

ایران با تولیدی در حدود ۱۳۰۰۰۰ تن قزل آلا تا پایان سال ۱۳۹۳ در دسته دومین کشورهای تولیدکننده قزل‌آلا در منطقه قرار داشت. استان ایلام نیز با تولید حدود ۲۰۰۰ تن قزل آلا سهم قابل توجهی در پرورش این نوع ماهی را دارد. با افزایش تولید میزان شیوع بیماری‌ها نیز اجتناب ناپذیر است.

لاکتوکوکوس گارویه[۱] عامل لاکتوکوکوزیس یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در ماهیان به حساب می‌آید. باکتری مذکور منجر به بروز سپتی سمی در ماهی مبتلا می‌شود که معمولاً با علایمی چون شنای غیر عادی، تیرگی بدن، اگزوفتالمی، خونریزی در داخل و یا اطراف کره چشم یا خونریزی‌های سطحی بدن در نواحی سرپوش آبششی، قاعده باله‌ها و همچنین خونریزی‌های وسیع داخلی مشخص می شود. بیماری تاکنون از گونه‌های مختلف شامل قزل آلای رنگین کمان، گیش دم زرد، تیلاپیا، مارماهی ژاپنی،کفشک ماهی، کفال خاکستری، گربه ماهی، زمرد ماهی، ماهی صخره، آمبرجک، شاه ماهی و همچنین میگوی آب شیرین گزارش شده است ولی به نظر می‌رسد که گونه‌هایی همانند کپور معمولی نسبت به بیماری مقاوم باشند (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۱). دامنه میزبانی این باکتری محدود به ماهیان نیست و باکتری از گاو، گاومیش، سگ و گربه و همچنین فراورده‌های خام دامی شامل شیر گاو و گوشت ماکیان نیز جدا شده است (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۱). بر اساس گزارشات متعدد، *لاکتوکوکوس گارویه* در موارد اندوکاردیت از انسان جداسازی شده است، به طوری که این باکتری امروزه به عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و ماهی به حساب آید (Wang *et al*., 2007). در بین ماهیان، گونه قزل‌آلای رنگین کمان از حساس‌ترین گونه‌ها محسوب می‌شود. با گسترش تولید آبزیان و بخصوص پرورش ماهی قزل آلا در سطح کشور و استان ایلام، مسائل و مشکلات مربوط به بیماری‌ها نیز افزایش یافته و برای کنترل بیماری‌ها و پیش گیری از ضرر و زیان اقتصادی، پرورش دهندگان از انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله انروفلوکساسین، اکسی تتراسایکلین و فلوروفنیکل استفاده می نمایند. یکی از مسائل عمده نگران کننده بین المللی در رابطه با مصرف آنتی بیوتیک‌ها، مصرف بی رویه و بدون بر نامه ی آن‌ها است که منجر به ایجاد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط آبی می شود (Ture & Halis, 2015). قابلیت انتقال بالقوه جدایه های باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط آبی و ارتباط انسان و ماهی و همچنین ارتباط انسان و حیوانات اهلی و ارتباط آن‌ها با آب و محیط آبی منجر به انتشار سریع باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و همچنین ژن‌های عامل مقاومت در بین باکتری‌های محیط های مختلف شده که خطر تهدید سلامت عمومی را در پی دارد (Ture & Halis, 2015). با توجه به گزارش موارد بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس از استان ایلام، مطالعه حاضر با هدف بررسی دقیق‌تر بیماری در ماهیان مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان استان و نیز بررسی وجود ژن مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در مزارع پرورش قزل آلای استان در جدایه های کوکسی های گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل آلای استان صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی

محیط‌های کشت: بلاد آگار، تریپتون سویا براث[۲]، تریپتون سویا آگار[۳]، محیط ووگس پروسکائر براث[۴]، محیط کشت OF[۵] (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany).

باکتری‌های استفاده شده: جدایه‌های مرجع *استرپتوکوکوس اینیایی* (ATCC ۲۹۱۷۸) و *لاکتوکوکوس گارویه* (ATCC۱۵۶۴۱) به عنوان کنترل در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌گیری: در مجموع از ۳۲ مزرعه پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان ایلام از ماهیان ۲۰مزرعه که

[۱] *Lactococcus garvieae*
[۲] Tryptone soy broth
[۳] Tryptone soy agar
[۴] Methyl red- vegessproskauerbroth
[۵] Oxidative-fermentativemedia

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

دارای بیشترین میزان علائم بیماری بودند نمونه‌گیری صورت پذیرفت؛ به طوری که در طول فصول بهار و تابستان ۱۳۹۵پس از مراجعه به مراکز پرورش ماهی، نمونه‌گیری از ماهیان مشکوک به بیماری و دارای علامت مانند شنای غیر عادی، تیرگی بدن، بیرون زدگی کره چشم، خونریزی در داخل و یا اطراف کره چشم یا خونریزی‌های سطحی بدن در نواحی سرپوش آبششی، قاعده باله‌ها و همچنین خونریزی‌های وسیع داخلی به عمل آمد. این نمونه‌ها از مناطق کلم (۶ مزرعه)، سرابکلان (۶ مزرعه)، میمه زرین آباد (۶ مزرعه)، ملکشاهی (۱ مزرعه) و روستای علی‌آباد سیروان (۱ مزرعه)، تعداد ۶۰ قطعه ماهی در وزن‌های ۱۲۰-۷۰ گرم (از هرمزرعه سه نمونه) جمع آوری گردید. ماهیان در جعبه‌های حاوی یخ و در فاصله زمانی کمتر از ۴ ساعت به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام انتقال داده شدند.

مطالعات باکتری شناسی و آنتی بیوگرام: نمونه بافت‌های کلیه، کبد و طحال ماهیان در شرایط استریل بر روی محیط کشت تریپتون سوی براث (TSB) و آگار خون‌دار کشت داده شد و محیط‌های کشت به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از رشد باکتری خالص‌سازی پرگنه‌ها و سپس رنگ آمیزی گرم صورت پذیرفت. پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی لازم (کاتالاز[۶]، همولیز[۷]، اکسیداسیون-فرمانتاسیون، اسکولین[۸]، نشاسته، ووگس پروسکوئر، لاکتوز، سوربیتول، مانیتول، ریبوز و ترهالوز) کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی، اوره‌آز منفی و سیترات منفی کشت مجدد داده شد. در مرحله بعد، برای تفکیک جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* از *استرپتوکوکوس اینیایی* از آزمایش سوربیتول، هیدرولیز نشاسته و ووگس پروسکوئر(vp) (روش‌های استاندارد بیوشیمیایی) استفاده شد. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* با روش دیسک دیفوزیون با استفاده از دیسک های شرکت MAST بر اساس دستورالعمل CLSI (جدول۱) مورد انجام قرار گرفت (CLSI, 2011).

جدول۱: تعیین درصد میزان مقاومت جدایه های کوکسی های گرم مثبت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها باروش دیسک دیفیوژن

Table 1: Estimation of resistance Gram-positive cocci isolates to antibiotics by disk diffusion method

آنتی بیوتیک	کد دیسک	غلظت (میکروگرم/ واحد)	مقاوم	متوسط	حساس
آموکسی سیلین	A	۲۵	۰	۲۵	۷۵
اکسی تتراسایکلین	OTC	۳۰	۴۰	۵۲	۳۰
انروفلوکساسین	ENF	۵	۲۷	۶۳	۱۹
اریترومایسین	E	۱۵	۲۳	۵۴	۲۱
استرپتومایسین	S	۱۰	۳۵	۴۴	۲۰
فلوروفنیکل	FFC	۳۰	۱۹	۶۰	۲۰
پنی سیلین G	PG	۱۰	۳۰	۳۹	۲۴

مطالعات مولکولی(PCR): جدایه‌های کوکسی گرم مثبت با مشخصات مشابه *استرپتوکوکوس* برای مطالعات PCR مورد استفاده قرار گرفتند. برای این کار ابتدا با استفاده از روش جوشاندن، DNA پرگنه‌های باکتری استخراج شد، سپس آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای strR و strF با اندازه محصول ۱۹۷ (جفت‌باز)[۹] برای شناسایی جنس *استرپتوکوکوس* و پرایمرهای sin1 و sin2 با اندازه محصول۳۰۰ جفت باز برای شناسایی گونه *استرپتوکوکوس اینیایی* (Picard *et al*., 2004) بر اساس روش توصیه شده توسط (Zlotkin *et al*., 1998) انجام پذیرفت. همچنین با استفاده از پرایمرهای PLG-F(5-CATAACAATGAGAATCGC-3) و PLG-R (5-GCACCCTCGCGGGTTG-3) به منظور تکثیر قطعه ژنی 16S rRNA و مشاهده باند ۱۱۰۰ bp برای شناسایی گونه *لاکتوکوکوس گارویه* PCR دیگری انجام شد. مراحل PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) و با برنامه واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه (۹۴ درجه سانتی‌گراد)، واسرشته‌سازی به مدت ۱ دقیقه (۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال به مدت ۱ دقیقه (۵۵ درجه سانتی‌گراد)، امتداد به مدت ۱ دقیقه (۷۲

[۶] Catalase test
[۷] Haemolysis
[۸] Aesculin
[۹] . Base pair (bp)

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

درجه سانتی‌گراد)، سپس تکرار مراحل ۲ الی ۴ به تعداد ۳۰ چرخه و در نهایت مرحله امتداد نهایی به مدت ۵ دقیقه (۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید عکسبرداری از ژل با استفاده از دستگاه Gel Documentation انجام شد. برای بررسی حضور ژن-های مقاومت آنتی بیوتیکی برای آنتی بیوتیک‌های (اریترومایسین، استرپتومایسین و اکسی تتراسایکلین) از زوج پرایمرهای*ermB*، *tet*، *strA* مطابق جدول۲ استفاده شد. برنامه زمانی و همچنین دمایی مطالعات PCR مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* مطابق جدول ۳ انجام شد.

جدول ۲ : مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصولات مورد انتظاربرای آزمون PCR ژنهای مقاومت

Table 1: Primers used in this study and expected PCR product lengths

آنتی بیوتیک	کد دیسک	غلظت (میکروگرم/ واحد)	مقاوم	متوسط	حساس
آموکسی سیلین	A	۲۵	۰	۲۵	۷۵
اکسی تتراسایکلین	OTC	۳۰	۳۰	۵۲	۲۰
انروفلوکساسین	ENF	۵	۲۷	۶۳	۱۹
اریترومایسین	E	۱۵	۲۳	۵۴	۲۱
استرپتومایسین	S	۱۰	۳۵	۴۴	۲۰
فلوروفنیکل	FFC	۳۰	۱۹	۶۰	۲۰
پنی سیلین G	PG	۱۰	۳۰	۳۹	۲۴

جدول ۳: برنامه دمایی و زمان بندی برای شناسایی ژن مقاومت(*tetS,strA,ermB*)

Table 3: PCR thermal profile for detection of resistance genes (*tetS ,strA, ermB*)

مراحل PCR	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل‌ها
واسرشته کردن آغازین	۹۴	۵	۱
واسرشته کردن در هر چرخه	۹۴	۱	
جفت کردن پرایمرها	۵۸، ۵۸ و ۵۹	۱	۳۵
امتداد	۷۲	۱	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰	۱

نتایج

نتایج باکتری شناسی: نتایج کشت باکتریایی منجر به جداسازی تعداد ۱۸۰ جدایه باکتریایی از بافت‌های کلیه،کبد و طحال ماهیان مورد مطالعه جدا شد. از این تعداد ۱۱۰ نمونه در گروه کوکسی‌های گرم مثبت قرار داشتند. بر اساس نتایج آزمایشات کاتالاز، اوره‌آز و سیترات تعداد ۵۵ جدایه مشخصات مربوط به گونه *لاکتوکوکوس گارویه* و تعداد ۳۵ جدایه خصوصیات *استرپتوکوکوس اینیایی* را داشتند. ۲۰ جدایه متعلق به جنس *استافیلوکوکوس* بودند. نتایج آزمایش سوربیتول نشان داد که تمامی ۵۵ جدایه قادر به تخمیر قند سوربیتول بودند که دارای خصوصیات شبیه به گونه *لاکتوکوکوس گارویه* بودند و ۳۵ جدایه قادر به تخمیر قند سوربیتول نبودند و مشخصات گونه *استرپتوکوکوس* اینیایی تعلق داشتند. سایر نتایج خواص بیوشیمیایی این جدایه‌ها در جدول ۴ آمده است. نتایج تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن نیز منجر به شناسایی میزان حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها بدین شرح بود که از ۱۱۰جدایه کوکسی گرم مثبت، ۳۹مورد (۳۵٪) به استرپتو مایسین، ۲۶مورد (۲۳٪) به اریترومایسین، ۳۵ مورد (۳۱٪) به اکسی تتراسایکلین، ۳۰ مورد (۲۷٪) به انروفلوکساسین، ۲۱ مورد (۱۹٪) به فلوروفنیکل و ۳۳ مورد (۳۰٪) به پنی سیلین G مقاوم بودند. همچنین ۵۵ جدایه به آموکسی سیلین حساس و ۲۵ جدایه نیمه حساس بودند (جدول۴).

جدول ۴: نتایج برخی خواص بیوشیمیایی مربوط به جدایه های *استرپتوکوکوس اینیایی* (A) و *لاکتوکوکوس گارویه* (B) به دست آمده از مزارع قزل آلای رنگین کمان استان ایلام

Table 4: Results of biochemical characteristics of *streptococcus iniae*(A) and *Lactococcus garvieae* (B) obtained from rainbow trout fish farms of Ilam province

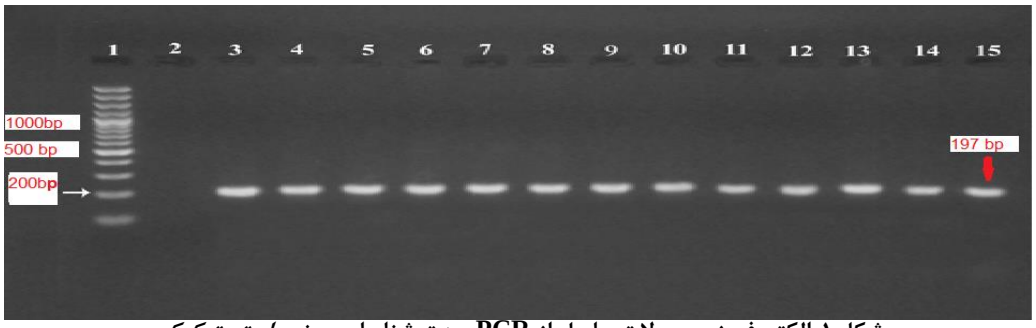
	باکتری	کاتالاز	هموليز	OF	اسکولین	نشاسته	VP	لاکتوز	سوربیتول	مانیتول	ریبوز	ترهالوز
A		-	آلفا	F	+	-	+	-	_	+	+	+
B		-	آلفا	F	+	-	-	-	-	+	+	+

نتایج مولکولی: پس از بررسی نمونه‌ها درآزمایش مولکولی (PCR) هویت جدایه‌های متعلق به جنس

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

استرپتوکوکوس، که درآزمایشات باکتری شناسی به صورت ۳۵ جدایه گونه استرپتوکوکوس *اینیایی* و ۵۵ جدایه متعلق به گونه *لاکتوکوکوس گارویه* تشخیص داده شده بودند، تأیید گردید (شکل‌های ۲،۱و۳).

نتایج به دست آمده همچنین نشان داد که ماهیان ۱۶ مرکز پرورش ماهی از مجموع ۲۰ مرکز بررسی شده (۸۰٪) مبتلا به لاکتوکوکوزیس / استرپتوکوکوزیس بودند. مزارع مبتلای مذکور در مناطق کلم (۶ مزرعه)، سرابکلان (۵ مزرعه)، ملکشاهی (۱ مزرعه)، میمه زرین آباد (۳ مزرعه) روستای علی آباد (۱ مزرعه) قرار داشتند. نتایج بررسی مولکولی (PCR) حضور ژن مقاومت آنتی بیوتیکی برای سه آنتی بیوتیک (استرپتومایسین، اریترومایسین و اکسی تتراسایکلین) که درتست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن مقاومت فنوتیپی آن‌ها مشخص شده بود نشان داد که از ۳۹ مورد مقاومت فنوتیپی استرپتومایسین ۳۰مورد، و از ۲۶ مورد مقاومت فنوتیپی اریترومایسین ۲۰ مورد، و از ۳۵ مورد مقاومت فنوتیپی اکسی تتراسایکلین ۲۷ مورد در آزمایش PCR تأیید گردیدند (شکل‌های ۴، ۵ و ۶)



شکل ۱: الکتروفورز محصولات حاصل از PCR جهت شناسایی جنس *استرپتوکوکوس*

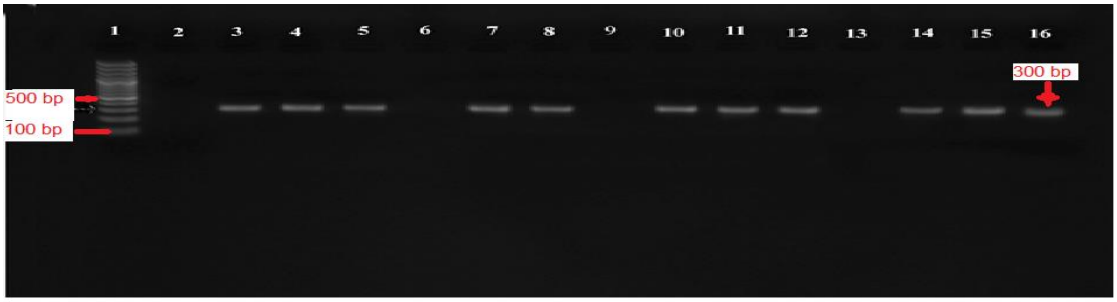
Figure 1: Electrophoresis of PCR products for detection of *Streptococcus genus*

ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی

ستون ۲: کنترل منفی (فاقد DNA الگو)

ستون ۳: کنترل مثبت، *استرپتوکوکوس اینیایی* (ATCC ۲۹۱۸۷)

ستون‌های۱۵- ۴ : محصولات PCR جدایه ها واجد قطعه DNA به طول ۱۹۷ جفت باز



شکل ۲: الکتروفورز محصول حاصل از PCRجهت شناسایی گونه *استرپتوکوکوس اینیایی*

Figure 2: Electrophoresis of PCR products for detection of *Streptococcus iniae* genus

ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی

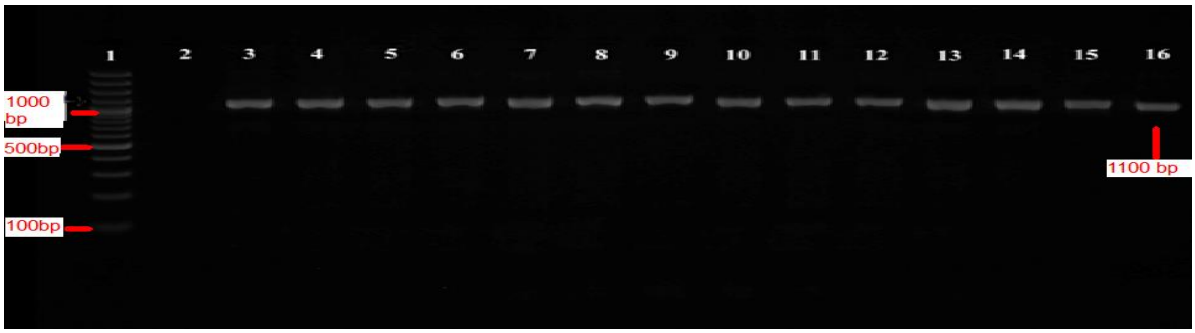
ستون ۲: کنترل منفی (فاقد DNA الگو)

ستون ۳: کنترل مثبت، *استرپتوکوکوس اینیایی* (ATCC ۲۹۱۸۷)

ستون‌های ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۶: محصولات PCR جدایه ها واجد قطعه DNA به طول ۳۰۰ جفت باز

ستون‌های ۶، ۹، ۱۳: نمونه های منفی (نمونه هایی بودند که با آزمایشات بیو شیمیایی *لاکتوکوکوس گارویه* شناسایی شده اند)

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]



شکل ۳: الکتروفورز محصول حاصل از PCR جهت شناسایی گونه *لاکتوکوکوس گارویه*

Figure 3: Electrophoresis of PCR products for detection of *Lactococcus garvieae* genus

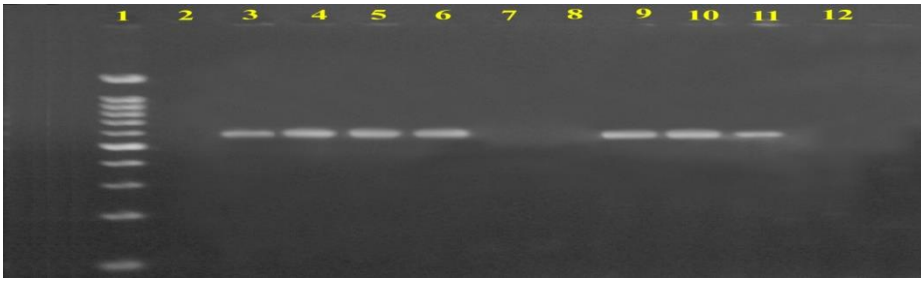
ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی

ستون ۲: کنترل منفی (فاقد DNA الگو)

ستون ۳: کنترل مثبت، *لاکتوکوکوس گارویه* (ATCC ۱۵۶۴۱)

ستون‌های ۱۶- ۴: محصولات PCR جدایه ها واجد قطعه DNA به طول ۱۱۰۰ جفت باز

به علاوه به منظور تأیید تشخیص ژن مقاومت به آنتی بیوتیک اریترو مایسین برای جدایه‌های کوکسی های گرم مثبت شناسایی شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی، آزمون PCR دیگری با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی این آنتی بیوتیک انجام شد. این آزمون PCR موجب تکثیر یک قطعه DNA به اندازه ۶۴۰ جفت باز شد. نتایج این PCR نشان داد که از ۱۱۰ جدایه کوکسی گرم مثبت مورد بررسی تعداد ۲۰ جدایه (۱۸/۱۸٪) واجد باند ۶۴۰ جفت بازی و مثبت بودند. شکل۴ نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات این PCR را نشان می‌دهد.



شکل ۴: الکتروفورز محصولات حاصل از PCR جهت شناسایی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک اریترومایسین

Figure 4: Electrophoresis of PCR products for detection of resistance genes to Erythromycin antibiotic

ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی

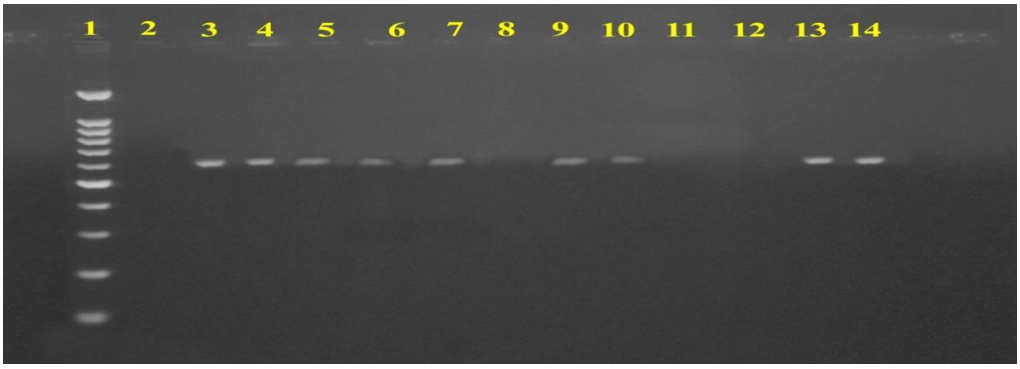
ستون ۲: کنترل منفی (فاقد DNA)

ستون‌های۴،۳، ۵، ۶، ۹،۱۰،۱۱: محصولات PCR جدایه‌ها واجد قطعه DNA به طول ۶۴۰جفت باز.

ستون‌های ۷، ۸، ۱۲: منفی.

به علاوه به منظور تأیید تشخیص ژن مقاومت به آنتی-بیوتیک تتراسایکلین برای جدایه‌های کوکسی‌های گرم مثبت شناسایی شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی، آزمون PCR دیگری با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی این آنتی‌بیوتیک انجام شد. این آزمون PCR موجب تکثیر یک قطعه DNA به اندازه ۵۹۰ جفت باز می‌شد. نتایج این PCR نشان داد که از ۱۱۰ جدایه کوکسی گرم مثبت مورد بررسی، تعداد ۲۷ مورد (۲۴/۵٪) واجد باند ۵۹۰ جفت بازی بودند. شکل ۵ نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات این PCR را نشان می‌دهد.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]



شکل ۵: الکتروفورز محصولات حاصل از PCR جهت شناسایی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین

Figure 5: Electrophoresis of PCR products for detection of resistance genes to Oxytetracycline antibiotic

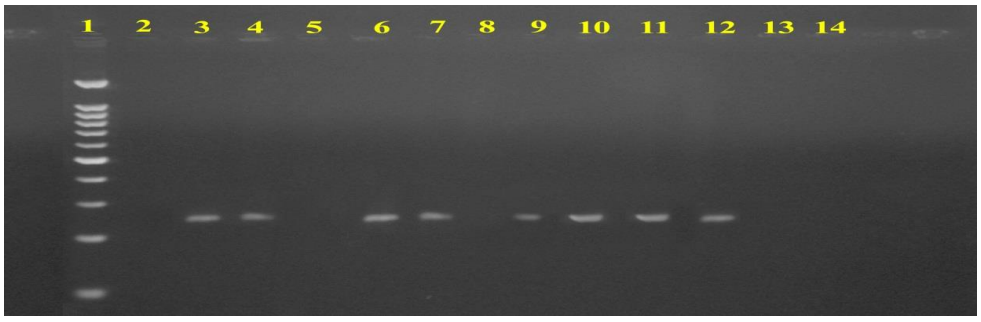
ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی

ستون ۲: کنترل منفی (فاقد DNA)

ستون‌های ۳، ۴، ۵،۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴. : محصولات PCR جدایه‌ها واجد قطعه DNA به طول ۵۹۰ جفت باز.

ستون‌های ۸، ۱۱، ۱۲: منفی.

به علاوه به منظور تأیید تشخیص ژن مقاومت به آنتی-بیوتیک استرپتومایسین برای جدایه‌های *کوکسی‌های گرم* مثبت شناسایی شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی، آزمون PCR دیگری با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی این آنتی‌بیوتیک انجام شد. این آزمون PCR موجب تکثیر یک قطعه DNA به اندازه ۲۶۷ جفت باز می‌شد. نتایج این PCR نشان داد که از ۱۱۰ جدایه کوکسی گرم مثبت مورد بررسی، تعداد ۳۰ جدایه (۲۷/۲ ٪) واجد باند ۲۶۷ جفت بازی و مثبت بودند. شکل ۴- ۱۲ نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات این PCR را نشان می‌دهد.



شکل۶: الکتروفورز محصولات حاصل از PCR جهت شناسایی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک استرپتومایسین

Figure 6: Electrophoresis of PCR products for detection of resistance genes to Streptomycin antibiotic

ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی

ستون ۲: کنترل منفی (فاقد DNA)

ستون‌های ۳، ۴، ۶، ۷،۹،۱۰،۱۱،۱۲،: محصولات PCR جدایه‌ها واجد قطعه DNA به طول ۲۶۷ جفت باز.

ستون‌های ۵، ۸، ۱۳، ۱۴: منفی.

بحث

استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس از جمله بیماری‌های باکتریایی هستند که با تلفات و خسارات قابل توجه در ماهیان آب شیرین و شور همراه هستند. *لاکتوکوکوس گارویه* به همراه برخی باکتری‌های جنس *استرپتوکوکوس* که از آن جمله می‌توان به *استرپتوکوکوس اینیایی* اشاره

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

کرد متعلق به خانواده *استرپتوکوکاسه* می‌باشد و عامل مهم بروز سپتی سمی و تلفات بالا در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شود (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۱). نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که ماهیان ۱۶ مرکز پرورش ماهی از مجموع ۲۰ مزرعه پرورش بررسی شده (۸۰٪) مبتلا به لاکتوکوکوزیس / استرپتوکوکوزیس بودند. بررسی (Soltani & Tarahomi, 2009) نشان داد که ۲۰ درصد از مجموع ۶۰۰ کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل آلای پرورشی در استان فارس را گونه *لاکتوکوکوس گارویه* تشکیل می‌دهد و مابقی مربوط به جنس *استرپتوکوکوس* و عمدتاً گونه *استرپتوکوکوس اینیه* بوده است. مطالعه میرزاخانی (۱۳۸۷) نشان داد که از مجموع ۲۰ جدایه کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری ۹ مورد *لاکتوکوکوس گارویه* و ۱۱ مورد *استرپتوکوکوس اینیایی* بودند. با توجه به مخزن و منبع باکتری که شامل جانوران خون گرم می‌باشد و از طرفی با توجه به خشکسالی‌های اخیر به نظر می‌رسد روند بیماری نسبت به سال‌های گذشته تغییر کرده است و *لاکتوکوکوس گارویه* نقش بیشتری در بروز بیماری در برخی مزارع ایفا نماید (سلطانی و همکاران،۱۳۹۱). به هر حال چنان که اشاره شد با توجه به دامنه متنوع عامل بیماری (گونه‌های درگیر) همواره امکان تغییر در جدایه‌های عامل بیماری در مناطق مختلف وجود دارد که مستلزم مطالعات مستمر می‌باشد و عوامل مختلفی در انتقال بیماری دخیل هستند که از آن جمله می‌توان به انتقال مستقیم از طریق آب، جابجایی و ورود ماهیان آلوده به کارگاه و یا تغذیه ماهیان با ضایعات کشتارگاهی آلوده اشاره کرد (Austin & Austin, 2008).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ماهیان تمامی کارگاه‌های پرورش ماهی بررسی شده واقع در بخش‌های پائین دست منابع آبی به باکتری آلوده بودند و بالعکس کارگاه‌های بالا دست از آلودگی کمتری برخوردار بودند که نقش شاخص‌های کیفی آب و همچنین احتمال انتقال باکتری از مزارع بالادست به کارگاه‌های پائین دست را نشان می‌دهد. تأثیر دما و وضعیت کیفی آب نیز به عنوان عوامل مستعد کننده در بروز بیماری توسط(Soltani & Tarahomi, 2009) مورد تاکید قرار گرفته است. باکتری همزمان با افزایش دمای آب فعالیت بیشتری (رشد و تکثیر سریع‌تری دارد) می‌یابد و بیماری‌زایی خود را به خصوص در شرایط بد بهداشتی و مدیریتی نشان می‌دهد. در این میان کارگاه‌هایی که در بخش‌های پایینی رودخانه قرار دارند به دلیل استفاده از پساب سایر مزارع نسبت به بیماری مستعدتر هستند. به نظر می‌رسد انتقال آلودگی در مسیر رودخانه در حال حاضر مهم‌ترین راه انتقال بیماری در مزارع پرورش ماهی است؛ این امر به واسطه ورود باکتری به آب از طریق پساب کارگاه‌های پرورش ماهی و همچنین به احتمال زیاد تغییراتی که در شاخص‌های کیفی آب اعمال می‌شود آشکار می‌شود. در بسیاری مناطق که حداقل فاصله مجاز بین مزارع پرورش ماهی رعایت نشده است باعث مضاعف شدن مشکل می‌شود (Soltani & Tarahomi, 2009). بروز همه‌گیری بیماری به خصوص در مناطق پر تولید کشور با ضرر و زیان‌های بالاتری برای صنعت پرورش ماهیان سردآبی کشور شده است به طوری که نتایج بررسی‌های Soltani & Tarahomi(2009) بیانگر خسارات فراوان ناشی از بیماری در صنعت قزل آلا است. با توجه به این‌که این بیماری در گروه بیماری‌های قابل انتقال به انسان قرار دارد، لذا این مسئله خود اهمیت بروز و انتقال بیماری را دو چندان می‌سازد. بنابراین، در چنین شرایطی نیاز به اتخاذ سیاست‌های مؤثر و عملی در جهت مقابله با بیماری از قبیل ایمن سازی و برنامه‌ریزی در راستای ریشه‌کنی بیماری بیش از پیش احساس می‌شود. به علاوه با توجه به این‌که جانوران خون گرم از مخازن متداول باکتری عامل بیماری محسوب می‌شوند، اتخاذ روش‌های پیش‌گیری برای جلوگیری از ورود فاضلاب‌های انسانی و دامی به منابع آبی مورد استفاده در تکثیر و پرورش مزارع قزل آلا امری ضروری است. بیماری‌های باکتریایی ازجمله استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس به دلیل پرورش متراکم قزل آلا شیوع یافته و انتشار بیماری‌ها در بین مزارع پرورش قزل‌آلا باعث شده تا پرورش دهنده به

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل و پیشگیری از بیماری رو بیاورند. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها به نوبه خود منجر به پیدایش وگسترش مقاومت آنتی بیوتیکی بخصوص آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف می شود (Raissy & Ansari , 2011).

نتیجه این مطالعه نشان می‌دهدکه از تمامی جدایه های مورد آزمایش همگی به یک یا دو آنتی بیوتیک از آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه در بررسی فنوتیپی مقاوم بودند ودارای یک تا دو ژن مقاومت(*tets,strA,ermB*) برای یکی یا دو تا از سه آنتی بیوتیک اریترومایسین، استرپتومایسین واکسی تتراسایکلین نیز بودند. مقاومت به تتراسایکلین در جدایه های *لاکتوکوکوس گارویه* جدا شده از شیر گاو توسط (Walter *et al.*, 2008) گزارش شده است. آن‌ها نشان دادند که جدایه های مقاوم دارای ژن-های مقاومت *tets* و *tetm* بوده اند.

یک گروه پژوهشی با مطالعه حضور ژن مقاومت آنتی بیوتیکی *لاکتوکوکوس گارویه* جداشده از ماهی دم زرد در ژاپن و مطالعه گونه های باکتری *ویبریو* در آب دریاهای کره موفق به تعیین حضور ژن *tets* مسئول مقاومت به تتراسایکلین شدند (Kim *et al.*, 2004). طی مطالعه ای بر روی *لاکتوکوکوس گارویه* جداشده از قزل آلای رنگین کمان در چهارمحال و بختیاری انجام گردید، نشان داده شد که از ۲۴ جدایه *لاکتوکوکوس گارویه*، ۱۸جدایه به تتراسایکلین و۱۰جدایه به اریترومایسین مقاوم بوده و دارای ژن مقاومت بودند (Raissy & Momeni, 2016). در مطالعه Ture & Halis(2015) که بر روی *لاکتوکوکوس گارویه* جداشده از قزل آلای رنگین کمان در ترکیه انجام شد، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به اریترومایسین بیشتر از تتراسایکلین گزارش گردید. در مطالعه حاضر از ۱۱۰جدایه کوکسی گرم مثبت، ۳۹ مورد به استرپتو مایسین (۳۵٪)، ۲۶ مورد به اریترومایسین (۲۳٪)، ۳۵ مورد به اکسی تتراسایکلین (۳۱٪)، ۳۰ مورد به انروفلوکساسین (۲۷٪)، ۲۱ مورد به فلوروفنیکل (۱۹٪) و ۳۳ مورد به پنی سیلین G مقاوم بودند (۳۰٪). همچنین ۵۵ جدایه به آموکسی سیلین حساس و ۲۵ جدایه نیمه حساس بودند. نتایج بررسی مولکولی (PCR) حضور ژن مقاومت آنتی بیوتیکی برای سه آنتی بیوتیک (استرپتومایسین، اریترومایسین و اکسی تتراسایکلین) که در آزمایش آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن مقاومت فنوتیپی آن‌ها مشخص شده بود نشان داد که از ۳۹ مورد مقاومت فنوتیپی استرپتومایسین ۳۰ مورد، و از ۲۶ مورد مقاومت فنوتیپی اریترومایسین ۲۰ مورد، و از ۳۵ مورد مقاومت فنوتیپی اکسی تتراسایکلین ۲۷ مورد در آزمایش PCR تأیید گردیدند.

البته به نظر می‌رسد که این تفاوت‌ها در بروز ژن مقاومت آنتی بیوتیکی بخصوص در مورد گونه *لاکتوکوکوس گارویه* مربوط به متفاوت بودن گونه های *لاکتوکوکوس گارویه* و نیز متفاوت بودن مکان‌های بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باشد (Raissy and Ansari., 2011).

آگاهی از طیف اثر، مقدار و دستور ترکیبی دارو، استفاده از آب با کیفیت مناسب، کاهش استرس و استفاده از جیره های مناسب، استفاده از داروهای ضد میکروبی تحت نظر دامپزشک و تحت کنترل سیستم نظارتی و علمی و استفاده از ضد عفونی کننده های مناسب از راه کارهای مهم در غلبه بر مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد. ایمن سازی به عنوان مؤثرترین روش در درمان و پیشگیری بیماری و به خصوص در مورد بروز مقاومت های چند تایی توصیه می گردد. همچنین می توان با استفاده از روش‌های نوین در تولید داروها اقدام به تولید یک سری داروهای ضد میکروبی اختصاصی نمود. هم طور می توان به انجام یک سری تحقیقات در جهت کاهش تولید و آزاد شدن و انتقال باکتری‌های مقاوم اقدام کرد (عبدی و همکاران، ۲۰۰۲).

نتایج تحقیق حاضر اهمیت این موضوع را نشان می دهد که آلودگی در استان ایلام مانند سایر نقاط در کشور از میزان بالایی برخوردار بوده و پرورش دهندگان باید به این موضوع توجه ویژه داشته باشند که مقاومت های آنتی بیوتیکی که یکی از دغدغه های مهم در دنیا می باشد به راحتی می‌تواند بهداشت انسانی را با مخاطره جدی روبرو سازد. با توجه به بالا بودن میزان مقاومت های آنتی

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

بیوتیکی در نمونه های جداشده مشخص می شود مصرف بی رویه آنتی بیوتیک بالا بوده و حتماً محققین بعدی باید به میزان این آنتی بیوتیک ها در گوشت ماهی توجه ویژه ای داشته باشند.

منابع

سلطانی، م.، رئیسی، م.،گودرزی، م.، ممتاز، ح. و مؤمنی، م.، ۱۳۹۱. تعیین فراوانی *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری و تعیین توالی ژن 6S rRNA جدایه‌های حاصله. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۶۱-۶۷.

میرزاخانی، ع .، ۱۳۸۷. تشخیص *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* با استفاده از روش Multiplex PCR در ماهیان قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری. پایان‌نامه برای دریافت دکترای دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد شهرکرد. شماره ۱۳۵.

عبدی. ک.، مرادی، م. و محمدی، ف.، ۲۰۰۲. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و اهمیت آن در آبزیان. پایگاه اطلاع رسانی سازمان دامپزشکی کشور.

Austin, B. and Austin, D.A., 2007. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish, 4th ed. Bristol: Springer. pp:15-46. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6069-4_2

CLSI, 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute

Kim, S.R., Lisa, L. and Suzuki, S., 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. FEMS Microbiology Letters, 237: 147-156. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09690.x

Picard, F.J., Ke, D., Boudreau, D.K., Boissinot, M., Huletsky, A., Richard, D., Ouellette, M. and Bergeron, M.G., 2004. Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. Journal of Clinical Microbiology, 42: 3686_3695. doi: 10.1128/JCM.42.8.3686-3695.2004

Raissy, M. and Ansari, M., 2011. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms. African Journal of Biotechnology, 8: 1473-1476.

Raissy, M. and Moumeni, M., 2016. Detection of antibiotic resistance genes in some *Lactococcus garvieae* strains isolated from infected rainbow trout.URL: http;//jifro.ir/article-1-1489-en.html

Ture, M. and Halis, B., 2015. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus* sp. strains isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Bull Vet Inst Pulawy. 59: 37-42. doi: 10.1515/bvip-2015-0006.

Soltani , M. and Tarahomi, M., 2009. Study of streptococcosis/lactococcosis in some farmed rainbow trout in Fars province, Iran1st International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran, 231 p.

Walther, C., Rossano, A., Thomann, A. and Perreten, V., 2008. Antibiotic resistance in species from bovine milk: Presence *Lactococcus* of a mutated multidrug transporter *mdt*(A) gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. Veterinary Microbiology, 131: 348-357. doi:10.1016/j.vetmic.2008.03.008.

Wang, C.Y., Shie, H.S., Chen, S.C., Huang, J.P., Hsieh, I.C., Wen, MS., Lin, F.C. and Wu, D., 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice*, 61: 68-73. doi:10.1111/j.1742-1241.2006.00855.x

Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 36(4): 983–985.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

Phenotypic and genotypic evaluation of resistance to broad –range antimicrobial drugs in Gram- positive cocci isolated from rainbow trout in Ilam

Yari A.[1]; Nemati M.[1*]; Pourahmad F.[1]

[*]m.nemati@ilam.ac.ir

1-Faculty of Medicine, Ilam University

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.6.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113517]

Abstract

Streptococci and lactococci are among bacterial diseases of wild and farmed fish especially rainbow trout and accounted for significant economical losses in the aquaculture industry. In this study, 60 fish from rainbow trout farms in Ilam, were collected and sampled for bacterial and molecular analyses. Identification of the isolated bacteria was determined using biochemical tests and confirmed by polymerase chain reaction (PCR). For this purpose, using primer sets targeting portions of the *tuf* (code along factor Tu) and 16S rRNA gene sequences were performed to determine the genus *Streptococcus* and *Streptococcus iniae*, respectively. In total, 110 isolates belonging to the genus *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Staphylococcus* were detected. Molecular tests showed that 90 isolates were *Streptococcus* genus, of which 35 isolates tested by species-specific primers were identified as *Streptococcus iniae* and the rest (55 isolates) belonged to the species *Lactococcus garvieae*. Subsequently, phenotypic and genotypic evaluations of antibiotic-resistance of the isolates were performed, using disk diffusion method and PCR targeting *tet*, *erm* and *str* genes. The results showed that of the 110 isolates of Gram-positive cocci, 39 isolates were resistant against streptomycin (35%), 26 to erythromycin (23%), 35 to oxytetracycline (31%), 30 to enrofloxacin (27%), 21 to florfenicol (19%) and 33 isolates were resistant to penicillin G (30%). The presence of streptococcosis / lactococcosis was confirmed among fish farms in Ilam within this study. Moreover, it seems that the indiscriminate use of antibiotics has led to stablish resistant against such infectious agents.

Keywords: Fish, *Streptococcus*, *Lactococcus*, Polymerase Chain Reaction, Antibiotic Resistance

*Corresponding author