مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۲، ۱۲۵-۱۱۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,2:119-125, 2014

بیماریزایی استرپتوکوکوس اینیایی در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی

مهدی سلطانی[1*] محمد مازندرانی[2] سعید میرزرگر[1] حسینعلی ابراهیم زاده موسوی[1] علی طاهری میرقائد[1] حسینعلی خوشباور رستمی[3]

۱) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۲) گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان - ایران
۳) مرکز تحقیقات شیلاتی ذخایر آبزیان آب‌های داخلی کشور، گرگان - ایران

(دریافت مقاله: ۴ شهریور ماه ۱۳۹۲، پذیرش نهایی: ۳ دی ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیایی یکی از بیماریهای مهم صنعت‌آبزی پروری در مناطق مختلف دنیا می‌باشد. **هدف:** هدف از این مطالعه ارزیابی تجربی بیماریزایی استرپتوکوکوس اینیایی در بچه تاسماهی ایرانی با روش‌های تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی می‌باشد. **روش کار:** از بچه تاسماهی ایرانی به تعداد ۴۰۰ عدد و با دامنه وزنی ۳g ± ۱۷ استفاده شد. به‌طوری که برای هر یک از روش‌های تزریق عضلانی و صفاقی تعداد ۵ گروه ماهی در دو تکرار در نظر گرفته شد، (هرکدام از گروه‌ها نیز شامل ۱۲ ماهی). غلظت باکتری برای تیمارهای هر دو روش تزریقی شامل: $۴/۷\times۱۰^{۲}$، $۴/۷\times۱۰^{۳}$، $۴/۷\times۱۰^{۴}$، $۴/۷\times۱۰^{۵}$، $۴/۷\times۱۰^{۶}$ سلول به ازای هر ماهی بود. گروه‌های شاهد نیز تنها با سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۰/۹٪، به میزان ۰/۱mL به ازای هر ماهی مورد تزریق قرار گرفتند. **نتایج:** براساس نتایج در گروه‌های تیمار، تلفات پس از ۲۴ ساعت آغاز و علایم سستی و بیحالی، شنای مارپیچی، خونریزی‌های سرسوزنی در نقاط مختلف بدن بخصوص در قاعده باله‌ها و پلاک‌های استخوانی و نیز در زیر پوزه‌ها بخصوص در قاعده سبیلک‌ها، متورم‌شدن و خونریزی و برآمدگی ناحیه مخرج، پرخونی و التهاب در قسمت‌های انتهایی روده و تجمع مایع خونی، آب‌آوردگی شدید کلیه‌ها، اسکلیوزیس و لوردوزیس و نیز خونریزی‌های سرسوزنی در چشم در اکثر نمونه‌های تلف شده مشاهده شد. گروه‌های شاهد فاقد هرگونه تلفات تا ۱۴ روز پس از آزمایش بودند. در این مطالعه دوز LD50 در روش تزریق داخل صفاقی در زمان‌های ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت به ترتیب: $۳/۷\times۱۰^{۶}$، ۸×۱۰^{۳} و $۱/۱\times۱۰^{۳}$ سلول باکتری به ازای هرماهی محاسبه گردید، در حالی‌که میزان LD50 در روش تزریق عضلانی به ترتیب $۶/۴\times۱۰^{۵}$، $۱/۸\times۱۰^{۳}$ و $۴/۸۵\times۱۰$ سلول باکتری به ازای هر ماهی محاسبه شد که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که بچه تاسماهی ایرانی در برابر استرپتوکوکوس اینیایی از حساسیت بالایی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: تاسماهی ایرانی، استرپتوکوکوس اینیایی، بیماریزایی، LD50

مقدمه

استرپتوکوکوزیس از جمله بیماریهای مهم باکتریایی است که تاکنون مشکلات و خسارات فراوانی در ماهیان آب شیرین و دریایی در محیط های گرمابی و سردابی در مناطق مختلف دنیا ایجاد کرده است (۱،۲،۳،۱۰،۱۱،۱۴). در ایران وقوع این بیماری در مزارع قزل آلای رنگین کمان گزارش گردیده است (۱۲،۱۳) و تاکنون خسارات بسیار زیادی نیز به این صنعت وارد نموده است بر اساس مطالعات بعمل آمده تاکنون دو گونه استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه به عنوان عوامل مولد اصلی این بیماری در ایران شناخته شده‌اند (۱۳). زئونوز بودن و دامنه میزبانی متنوع این بیماری موجب شده تا بیماری از اهمیت بیشتری برخوردار باشد. مطالعات متعددی پیرامون دامنه میزبانی و بیماریزایی ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی در ماهیان انجام گرفته است که تاکنون بیش از ۲۷ گونه به این بیماری حساس بوده و خسارات حاصله بسته به شرایط محیطی و عوامل استرس زا از ۵٪ تا ۷۵٪ متفاوت می‌باشد (۱). اگر چه بر اساس گزارشات واصله برخی گونه ماهیان از جمله کپور ماهیان به این بیماری مقاوم می‌باشند اما مطالعات بیشتری نیاز است تا جنبه‌های بیماریزایی آن در گونه‌های با ارزش تجاری نظیر ماهیان خاویاری روشن شود. به‌ویژه که با توجه به کاهش چشمگیر صید ماهیان خاویاری در سال‌های اخیر و توجه به پرورش تجاری این ماهیان در سیستم بسته و باز (استخرها) و از طرفی توجه به منابع آلودگی بیماری، اهمیت اقتصادی این بیماری را دو چندان نموده است. تنها گزارش در مورد ماهیان خاویاری در این زمینه مربوط به بیماریزایی استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه در گونه ماهی خاویاری آمور (*Acipenser schrenckii*) توسط Yang و Li در سال ۲۰۰۹ در چین می باشد که نشان داده شد این گونه ماهی از حساسیت بالایی برخوردار است (۱۴). از آنجایی که بیماری ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی یکی از متداول ترین بیماریهای مزارع قزل‌آلای کشور می‌باشد و از طرفی موضوع توسعه و پرورش ماهیان خاویاری در برنامه توسعه شیلاتی کشور مورد توجه قرار گرفته است لذا ضروری است تا پیش بینی‌های لازم در زمینه مشکلات پیش روی آن مورد توجه قرار گیرد. لذا به نظر می‌رسد با توجه به رژیم غذایی این ماهیان که غذا را از کف بستر دریافت می‌کنند و انتشار وسیع بیماری در کشور و نیز آلودگی منابع آبی، این بیماری می‌تواند به عنوان یکی از مخاطرات این صنعت در کشور باشد. لذا در راستای مدیریت بهداشتی این مزارع،

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۹۴ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: msoltani@ut.ac.ir

انجام مطالعات در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد و هدف از این مطالعه‌ها ارزیابی میزان بیماریزایی استرپتوکوکوس اینیایی در بچه تاسماهیان ایرانی است.

مواد و روش کار

تهیه بچه ماهی: تعداد ۴۰۰ عدد بچه ماهی تاسماهی ایرانی با میانگین وزنی ۴g - ۶ از استخرهای خاکی مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گلستان تهیه شد و پس از بررسی و مانیتورینگ ظاهری با آب نمک ۳٪ به مدت ۱ دقیقه حمام داده شده و توسط پلاستیک حمل بچه ماهی به محل انجام تحقیق منتقل گردیدند. در ابتدا تراکم ۸۰ بچه ماهی به تانک‌های فایبرگلاس با ابعاد ۲×۲m با ارتفاع آب ۵۰Cm و با جریان ورودی آب ۳L در دقیقه معرفی شدند.

پرورش بچه ماهیان: بچه ماهیان در دو هفته اول با غذای زنده دافنی و گاماروس به میزان ۴ - ۳٪ وزن بدن بصورت دو بار در روز تغذیه شدند پس از آن کم کم غذای زنده دافنی از وعده غذایی حذف و تغذیه با گاماروس و غذای دستی بیومار ادامه یافت. بررسی‌های زیست سنجی و بیومتری هر دو هفته یکبار انجام گرفت، این بچه ماهیان به مدت ۹۰ روز در این ونیروها مورد پرورش قرار گرفتند. پس از رقم‌بندی بچه ماهیان به گروه‌های ۱۲ تایی در تانک‌های فایبرگلاس تقسیم و دو هفته دیگر روند پرورش آنها ادامه یافت به‌طوری‌که در زمان استفاده برای مطالعه بیماریزایی از میانگین وزنی ۳g±۱۷ برخوردار بودند.

کیفیت آب پرورش: آب دوره پرورش از آب چاه تأمین گردید. این آب به مدت ۱۲ ساعت در حوضچه رسوب‌گیر ذخیره و سپس مورد استفاده قرار می‌گرفت. در طول دوره پرورش دما، pH، شوری، و اکسیژن محلول به‌طور روزانه و نیتریت و آمونیاک بطور دو هفته یک بار اندازه‌گیری و ثبت گردید در این دوره دمای آب ^{o}C ۱±۲۶، شوری آب برابر PPT ۳، pH برابر ۰/۲±۷/۱ و اکسیژن محلول برابر ۰/۴±۵/۶ ثبت گردید. مقادیر نیتریت و آمونیاک نیز به ترتیب کمتر از ۰/۰۱mg/L و ۰/۱ ثبت گردید.

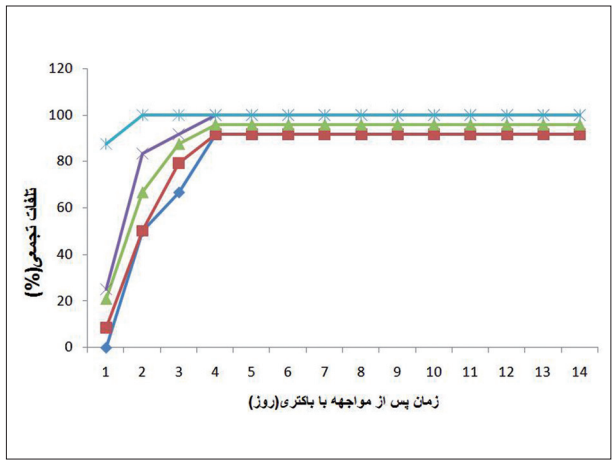
باکتری و نحوه مواجهه: باکتری استرپتوکوکوس اینیایی با کد 191B که قبلا از بافت کلیه ماهیان بیمار قزل‌آلای رنگین‌کمان جداسازی شده بود از کلکسیون ایزوله‌های لیوفیلیزه بخش میکروبیولوژی آبزیان از گروه بهداشت و بیماریهای دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و بر روی محیط کشت ژلوز خون کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ^{o}C ۳۰ نگهداری شد(۱۲). سپس پرگنه‌های باکتری از سطح پلیت کشت جمع‌آوری و در محلول نرمال سالین (حاوی ۰/۹٪ NaCl) سوسپانسیون یک نواخت با غلظت $۴/۷\times۱۰^{۶}$ cfu/mL تهیه گردید و سپس از این سوسپانسیون باکتریایی ۵ رقت سریالی از آن که شامل $۴/۷\times۱۰^{۶}$ (cfu/ mL)، $۴/۷\times۱۰^{۵}$، $۴/۷\times۱۰^{۴}$، $۴/۷\times۱۰^{۳}$ و $۴/۷\times۱۰^{۲}$ تهیه گردید. سپس ماهیان با اسانس گل میخک ۱۰۰mg/L بیهوش و به هر ماهی میزان ۰/۱mL از سوسپانسیون‌های باکتریایی مذکور به روش‌های داخل صفاقی یا عضلانی تزریق گردید.

برای هریک از تیمارهای داخل صفاقی و عضلانی تعداد ۱۲ ماهی در دو تکرار در نظر گرفته شد. به دو گروه شاهد نیز میزان ۰/۱mL نرمال سالین استریل به‌صورت عضلانی و صفاقی تزریق و در قسمت ایزوله و جداگانه‌ای نگهداری شدند. از هریک از رقت‌های باکتریایی مورد استفاده میزان ۰/۱mL بر روی محیط ژلوز خون کشت سطحی داده و نسبت به تعیین میزان تعداد سلول‌های زنده تزریق شده (صفاقی و عضلانی) اقدام گردید. بعد از تزریق باکتری بچه ماهیان به مدت ۱۴ روز مانیتورینگ شده و علایم رفتاری و کلینیکی آنها ثبت شد. ماهیان تلف شده بلافاصله از تانک خارج شده و محوطه بطنی آنها بصورت استریل باز شده و ضمن بررسی وضعیت اندام‌های داخلی، از بافت‌های کلیه و کبد ماهیان به‌صورت استریل بر روی محیط ژلوز خون کشت داده شد. برای محاسبه میزان LD50 روش آنالیز PROBIT (Syastem Institute Inc. 1985 Statistical Analysis) استفاده شد و مقادیر LD50 برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مواجهه محاسبه گردید.

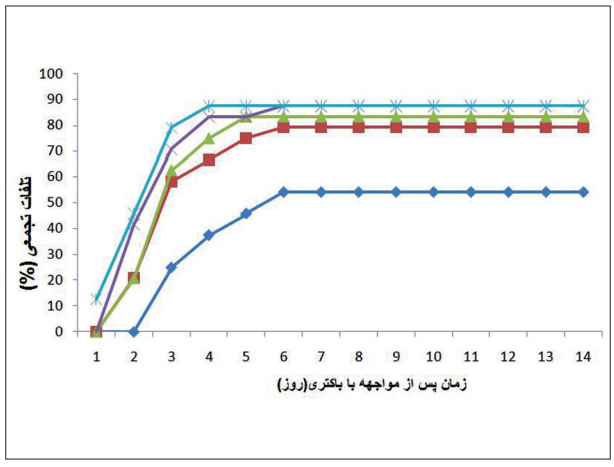
بررسی‌های آماری: برای محاسبات آماری از نرم افزار SPSS16 استفاده گردید. برای مقایسه بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای تشخیص معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از تست تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح معنی‌دار $p<۰/۰۵$ استفاده گردید.

نتایج

الف) علایم بالینی و رفتاری: علایم بالینی و رفتاری در هر دو روش تجربی تزریق داخل صفاقی و تزریق عضلانی یکسان بود به‌طوری‌که پس از مواجهه میزان دریافت غذا به شدت کاهش یافت. اولین تلفات در طی ۱۲ ساعت اول در گروه تزریق عضلانی مشاهده شد و تنها علایم خونریزی و نکروز در عضلات محل تزریق قابل مشاهده بود اما پس از آن کم کم علایمی همچون سستی و بیحالی، شنای مارپیچی و بالا و پایین در برخی ماهیان مبتلا نمایان شد به‌علاوه خونریزی‌های سرسوزنی در نقاط مختلف بدن بخصوص در قاعده باله‌ها و پلاک‌های استخوانی و نیز در زیر پوزه‌ها بخصوص در قاعده سبیلک‌ها در برخی ماهیان مشاهده گردید. همچنین متورم شدن و خونریزی و برآمدگی ناحیه مخرج (تصویر A-1) پرخونی و التهاب در قسمت‌های انتهایی روده و تجمع مایع خونی در ناحیه بطنی بدون برآمدگی شکمی در اکثر نمونه‌های تلف شده مشاهده شد. در برخی نمونه‌ها آبشش‌ها رنگ پریده بودند اما در برخی دیگر پرخونی در آبشش‌ها بخصوص در آبشش‌های کاذب به‌وضوح قابل مشاهده بود. از علایم بارز دیگر آب آوردگی شدید کلیه‌ها، اسکلیوزیس و لوردوزیس و نیز خونریزی‌های سر سوزنی در چشم بود. در دو مورد نیز کوری دو طرفه با کدورت چشم‌ها ثبت گردید که برخلاف گزارشات سایر جنس‌ها و گونه‌ها چشم‌ها حالت فرو رفتگی در حدقه به خود گرفته بودند. نتایج کشت باکتریایی از بافت کلیه تمام نمونه‌های تلف شده منجر به جداسازی مجدد استرپتوکوکوس اینیایی شد.



نمودار۱. تلفات بچه ماهیان در مواجهه با استرپتوکوکوس اینیایی در مواجهه به روش تزریق داخل عضلانی {۱=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۲، ۲=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۳، ۳=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۴، ۴=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۵، ۵=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۶}. ۱ ۲ ۳ ۴ ۵



نمودار۲. تلفات بچه ماهیان در مواجهه با استرپتوکوکوس اینیایی در مواجهه به روش تزریق صفاقی {۱=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۲، ۲=cfu/fish ۴/۷×۳۱۰، ۳=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۴، ۴=cfu/fish ۴/۷×۱۰^۵، ۵=cfu/fish ۴/۷×۶۱۰}. ۱ ۲ ۳ ۴ ۵

ب) نتایج تلفات در مواجهه به روش تزریق داخل صفاقی: نتایج مربوط به بیماریزایی تجربی به روش تزریق داخل صفاقی در نمودار۱ آمده است بر اساس این نتایج در روش داخل صفاقی اولین تلفات در رقت $۴/۷\times۱۰^{۶}$ cfu/fish در ۲۴ ساعت پس از تزریق به میزان ۱۲/۵٪ ثبت گردید. روند تلفات در این دوز همچنان ادامه یافت تا اینکه روز ۴ پس از تزریق میزان تلفات به ۸۷/۵٪ رسید و پس از آن تا روز ۱۴ این میزان ثابت ماند. در سایر دوزها در ۲۴ ساعت اول هیچ تلفاتی ثبت نگردید. تلفات مربوط به دوزهای $۴/۷\times۱۰^{۵}$ cfu/fish، $۴/۷\times۱۰^{۴}$ cfu/fish و $۴/۷\times۱۰^{۳}$ cfu/fish از ۴۸ ساعت پس از مواجهه آغاز گردیده و به ترتیب ۴۱/۶۷٪، ۲۰/۸۳٪ و ۲۰/۸۳ ٪ ثبت شد و روند تلفات تا روز ۶ پس از مواجهه ادامه یافته و به ترتیب به میزان: ۸۷/۵٪، ۸۳/۳۳٪ و ۷۹/۱۷٪ رسید و تا روز ۱۴ پس از مواجهه ثابت ماند. تلفات برای دوز $۴/۷\times۱۰^{۲}$ cfu/fish در روز سوم پس از مواجهه آغاز و به ۲۵٪ رسید و سپس روند تلفات ادامه یافت تا در روز ۶ پس از مواجهه این میزان به ۵۴/۱۷٪ رسیده و تا روز ۱۴ پس از مواجهه این میزان ثابت ماند.

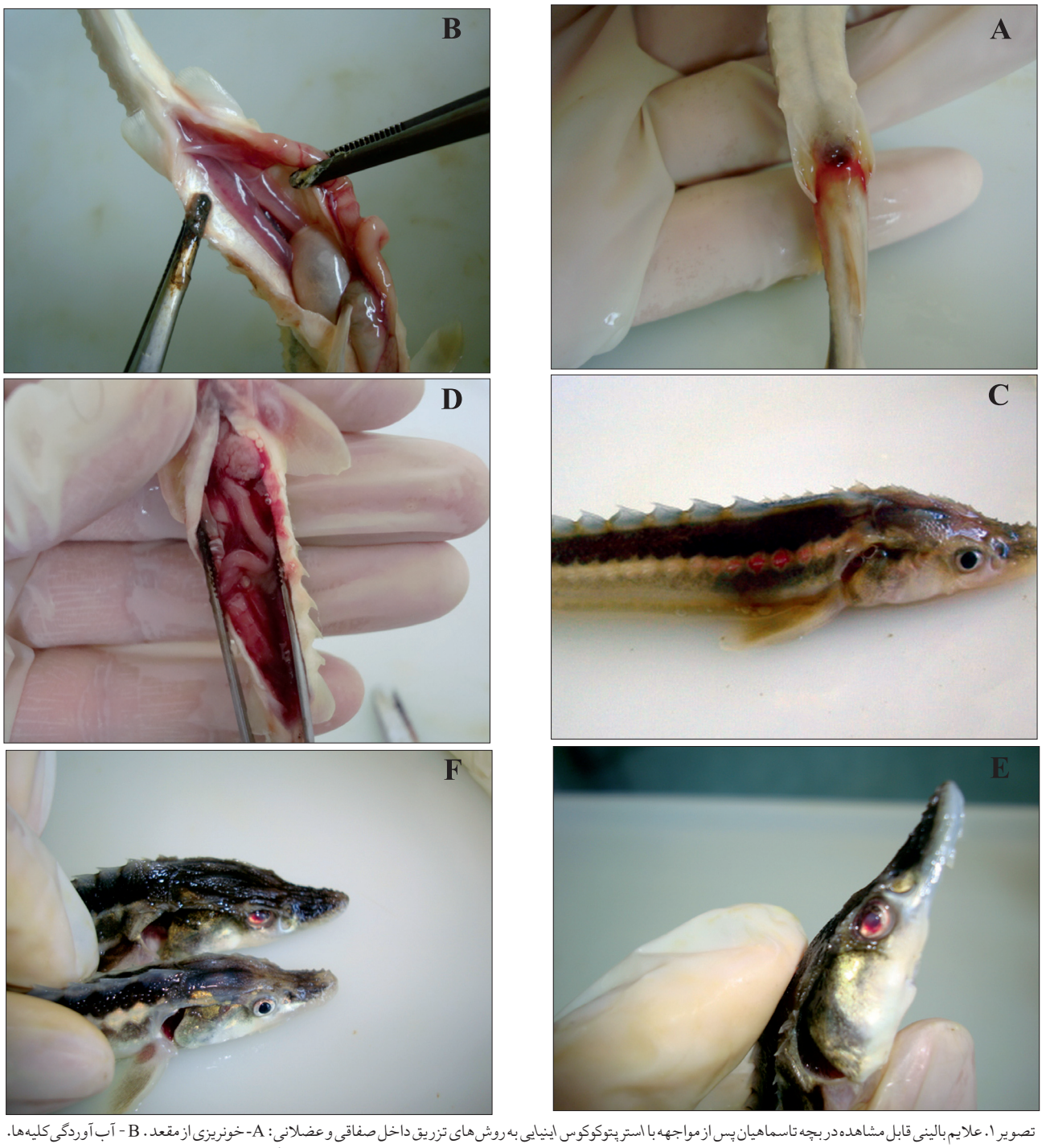
ج) نتایج تلفات در مواجهه به روش تزریق داخل عضلانی: نتایج مربوط به بیماریزایی تجربی به روش تزریق داخل صفاقی در در نمودار۲ آمده است. در این مطالعه ماهیان به تزریق عضلانی حساسیت بسیار بالایی از خود نشان دادند طوری که اولین تلفات در دوز $۴/۷\times۱۰^{۶}$ cfu/fish حدود ۱۰ ساعت پس از مواجهه ثبت گردید و این روند به سرعت ادامه یافت به گونه ای که در طی ۲۴ ساعت اول ۸۷/۵٪ از ماهیان این گروه تلف شدند؛ و در طی ۴۸ ساعت به ۱۰۰٪ رسید. روند تلفات در مواجهه با دوزهای $۴/۷\times۱۰^{۵}$ cfu/fish، $۴/۷\times۱۰^{۴}$ cfu/fish و $۴/۷\times۱۰^{۳}$ cfu/fish نیز از ۲۴ ساعت پس از تزریق مشاهده گردید به گونه ای که در ۲۴ ساعت اول برای هر گروه از ماهیان بترتیب ۲۵٪، ۲۰/۸۳٪ و ۸/۳۳٪ ثبت گردید. این روند تلفات در ۹۶ ساعت پس از مواجهه به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۵/۸۳٪ و ۹۱/۶۶٪ برای هر گروه ثبت گردید. برای گروهی که با دوز تزریقی $۴/۷\times۱۰^{۲}$ cfu/fish مواجهه داده شده بوند در ۲۴ ساعت اول هیچ تلفاتی مشاهده نگردید اما ۴۸ ساعت پس از مواجهه به ۵۰٪ افزایش یافت و این روند در ۹۶ ساعت پس از مواجهه به ۹۱/۶۶٪ رسید پس از آن تا روز ۱۴ پس از مواجهه تلفاتی مشاهده نشد.

تعیین میزان LD50: نتایج مربوط به میزان LD50 با ضریب اطمینان ۹۵٪ با نرم افزار PROBIT برای هر دو روش تزریق داخل عضلانی و تزریق داخل صفاقی نشان داد که دوز LD50 در روش تزریق داخل صفاقی در زمان های ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت به ترتیب: $۳/۷\times۱۰^{۶}$ cfu/fish، ۸×۱۰^{۳} cfu/fish و $۱/۱\times۱۰^{۳}$ cfu/fish محاسبه گردید. همچنین در روش عضلانی میزان LD50 در زمان های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به ترتیب $۶/۴\times۱۰^{۵}$ cfu/fish، $۱/۸\times۱۰^{۳}$ cfu/fish و $۴/۸۵\times۱۰$ cfu/fish محاسبه شد.

بحث

همان طوری که نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است بچه تاسماهیان ایرانی به هر دو روش تزریق عضلانی و داخل صفاقی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی حساس هستند. در این مطالعه این ماهیان به تزریق عضلانی حساسیت بیشتری از خود نشان دادند در نهایت در روش تزریق عضلانی حتی برای کمترین دوز یعنی $۴/۷\times۱۰^{۲}$ cfu/fish پس از ۱۴ روز ۹۱/۶۶٪ تلفات مشاهده شد.

در مواجهه با روش تزریق داخل صفاقی به غیر از دوز $۴/۷\times۱۰^{۶}$ cfu/fish در سایر رقت ها در ۲۴ ساعت اول تلفاتی مشاهده نگردید. در بررسی های آماری اختلاف معنی داری بین این دو روش مواجهه وجود دارد به گونه ای که این بچه ماهیان خاویاری نسبت به روش



تصویر ۱. علایم بالینی قابل مشاهده در بچه تاسماهیان پس از مواجهه با استرپتوکوکوس اینیایی به روش های تزریق داخل صفاقی و عضلانی: A- خونریزی از مقعد. B - آب آوردگی کلیه ها. C - خونریزی و نکروز در محل تزریق. D - تجمع مایع و خونابه در محوطه شکمی E - خونریزی در شبکیه .F - حالت خونریزی و فرو رفتگی چشم ها در مقایسه با نمونه سالم.

تزریق عضلانی از حساسیت بیشتری برخوردارند.

مطالعات متعددی پیرامون بیماریزایی و ارزیابی حدت استرپتوکوکوس اینیایی در گونه های مختلف ماهیان انجام شده است که بیانگر حاد بودن این گونه باکتریایی است. نتایج این مطالعه نشان می دهد که استرپتوکوکوس اینیایی قادر است در روش تزریقی موجب بروز علایم بالینی مشابه سایر گونه های ماهیان شود بطوریکه علایمی مانند: خونریزی محل تزریق، کاتاراکت و پرخونی در حدقه چشم، پرولاپس مخرج همراه با خونریزی، تجمع مایع در محوطه بطنی و... از جمله علایم قابل مشاهده بود که در بچه تاسماهیان مبتلا همانند سایر گونه های حساس مشاهده شد (۴،۶،۷،۸،۱۰،۱۴). البته در بررسی به عمل آمده روی ماهی خاویاری ایرانی حالت بیرون زدگی چشم ها که علایم تیپیک برخی گونه ها است دیده نشد بلکه در دو مورد حتی چشم ها کاملاً در حدقه

چشم حالت فرو رفته به خود گرفته بودند. همچنین حالت آب آوردگی کلیه‌ها بصورت تیپیک در اغلب نمونه‌های تلف شده در این بررسی مشاهده گردید که در سایر بررسی‌ها به این گستردگی گزارش نشده بود. از طرفی نمودارهای تلفات در ۴ - ۳ روز اول پس از مواجهه بیشترین شیب را دارد که این خود نشان دهنده حدت و بیماریزایی این باکتری در این گونه است. در این تحقیق بچه تاسماهیان در مواجهه به روش تزریق عضلانی حساسیت بیشتری از خود نشان دادند. به گونه ای که LD50در این روش طی زمان ۷۲ساعت برابر $۴/۸۵\times۱۰$ cfu/fish محاسبه شد و این خود می‌تواند به عنوان یک هشدار در مزارع پرورش خاکی برای این صنعت نوپا در ایران و سایر نقاط دنیا باشد. زیرا در صورت آلودگی این مزارع به این باکتری ممکن است از طریق جراحات ناشی از دستکاری و یا انگل‌های خارجی موجب بروز و تشدید بیماری شود. در بررسی استرپتوکوکوزیس توسط محققین مختلف در گونه‌های مختلف حساسیت‌های متفاوتی ثبت گردیده است. به عنوان مثال Shawn و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه‌ای ماهیان باس راه راه با میانگین وزنی ۲۳/۸g را به‌طور تجربی با ۴ دوز ۵×۱۰^{۵} cfu/fish، $۲/۶\times۱۰^{۶}$ cfu/fish، ۵×۱۰^{۶} cfu/fish و ۱×۱۰^{۸} با استرپتوکوکوس اینیایی به روش تلقیح آبشش (حمام) آلوده و تلفاتی بین ۱۰۰٪ - ۱۳٪ گزارش کردند(۱۱). در یک بررسی دیگر مقادیر LD50 ۹۶ و ۱۶۸ ساعته در روش داخل صفاقی و در ماهی Fundulusgrandis توسط Rasheed و plumb در سال ۱۹۸۴ به ترتیب: $۱/۴\times۱۰^{۴}$ cfu/fish و $۷/۵\times۱۰$cfu/fish گزارش شد(۹). همچنین Kusuda و همکاران در سال ۱۹۸۱ مقدار LD50 باکتری را در ۱۶۸ ساعت برای ماهی آیو (Plecoglossusaltivelis) $۳/۴\times۱۰^{۷}$ cfu/fish گزارش کردند (۵). Wu و همکاران در سال ۲۰۱۰ این میزان را در ماهی گورخری (zebra fish) در مواجهه با استرپتوکوکوس سوئیس $۳/۸\times۱۰^{۸}$ محاسبه کردند(۱۵). در بررسی دیگری Perera و همکاران در سال ۱۹۹۷ مقادیر LD50 باکتری در ماهی تیلاپیای ۹۰g - ۳۰ به روش داخل صفاقی در ۹۶ و ۱۶۸ ساعت به ترتیب $۴/۹\times۱۰^{۵}$ cfu/fish و $۳/۱۸\times۱۰^{۵}$ cfu/fish گزارش شد(۷). در مطالعه Yang و همکاران در سال ۲۰۰۹ با تزریق داخل صفاقی ۴×۱۰^{۷} cfu/fish استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه به ماهی خاویاری آمور (Acipenser schrenckii) با میانگین وزنی ۶۰g مشاهده کردند که ۸ ماهی از ۱۰ ماهی طی ۱۴ روز تلف شدند اما میزان دقیق LD50 توسط این محققین برای این گونه ثبت نگردید(۱۴). از طرفی همین محققین علت کاهش ۴۰۰۰ تن ماهی خاویاری آمور در سال ۲۰۰۶ را باکتری استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه عنوان کرده‌اند(۱۵). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که روند زمانی و شدت علایم حاصله و نیز تلفات در بچه تاسماهیان ایرانی تزریق شده با استرپتوکوکوس اینیایی سریع‌تر و شدیدتر از سایر گونه‌ها می‌باشد زیرا در هر دو روش مواجهه به روش‌های تزریق عضلانی و داخل صفاقی در طی ۲۴ ساعت تلفات آغاز گردید حتی در روش تزریق عضلانی تلفات قبل از ۱۲ ساعت مشاهده گردید به‌طوری که در دوز بالا به روش داخل عضلانی پس از ۴۸ ساعت تلفات به ۱۰۰٪ رسید. از طرفی مقایسه مقادیر گزارش شده LD50 در این گونه ماهیان نشان می‌دهد که بچه تاسماهیان ایرانی از حساسیت بیشتری به استرپتوکوکوس اینیایی در مقایسه با سایر گونه‌ها برخوردارند. اگرچه عوامل متعددی در میزان مقاومت یک گونه ماهی به پاتوژن خاص دخیل است اما با توجه به اینکه استرپتوکوکوس اینیایی در دمای بالاتر از قدرت رشد و تکثیر بالاتری برخوردار است لذا چنانچه گونه‌های حساس مانند تاسماهی ایرانی در دمای بالای $۲۰^{o}C$ در معرض بیماری قرار بگیرند می‌تواند منجر به تلفات وسیع شود. در نهایت نتایج حاصل از بیماریزایی تجربی و تعیین LD50 ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی در بچه تاسماهیان ایرانی نشان می‌دهد که این گونه تاسماهی در دوران انگشت قدی به استرپتوکوکوزیس بسیار حساس بوده و با توجه به راه‌های انتقال بیماری و منابع آلودگی توصیه می‌شود از هم اکنون راه‌های پیشگیری از بیماری همزمان با توسعه صنعت ماهیان خاویاری مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و قطب علمی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشگاه تهران انجام گرفته است.

References

1. Agnew, W., Barones, A.C. (2007) *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate forreliable vaccination. Vet Microbiol. 122: 1-15.
2. Eldar, A., Ghittino, C. (1999) Lactococcusgarvieae and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis Aquat Org. 36: 227-231.
3. Chen, S., Hu, Y., Jiao, X., Sun, L. (2010) Identification and immunoprotective analysis of a *Streptococcus iniae* subunit vaccine candidate. Vaccine. 28: 2636-2641.
4. Ferguson, H.W., Morales, J.A., Ostland, V.E. (1994) Streptococcosis in aquarium fish. Dis Aquat Org. 19: 1-6.
5. Kusuda, R., Sugiyama, A., Kawai, K., Inada, Y., Yoneda, M. (1981) Pathogenicity of *Streptococcus* sp. and *Vibrio anguillarumin* cultured Ayu. Bull Jap Soc Sci Fish. 47: 993-997.

6. Neely, M.N., Pfeifer, J.D., Caparon, M. (2002) *Streptococcus*- zebrafish model of bacterial pathogenesis. Infect Immun. 70: 3904-3914.
7. Perera, R.P., Fiske, R.A., Johnson, S.K. (1998) Histopathology of hybrid tilapia infected with a biotype of *Streptococcus iniae*. J Aquat Anim Health. 10: 294-299.
8. Perera, R.P., Johnson, S.K., Lewis, D.H. (1997) Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. Aquaculture. 152: 25-33.
9. Rasheed, V., Plumb, J.A. (1984) Pathogenicity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp, in Gulf killifish (*Fundufus grandis* Baird and Girard). Aquaculture. 37: 97-105.
10. Russo, R., Mitchell, H., Yanong, Roy, P.E. (2006) Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture. 256: 105-110.
11. Shawn, T.M., Phillip, H.K., Craig, A.Sh., Joyce, J.E. (2003) *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Moronechrysops* × *Moronesaxatilis*) following inoculation of the gills. Aquaculture. 220:165-173.
12. Soltani, M., Jamshidi, Sh., Sharifpour, I. (2005) Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*O. Mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 25: 95-106.
13. Soltani, M., Nikbakht, Gh., Mousavi, H.A.E., Ahmadzade, N., (2008) Epizootic outbreak of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*O. Mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 28: 207- 212.
14. Yang, W., Li, A. (2009) Isolation and characterization of *Streptococcus dysagalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. Aquaculture. 294: 14-17.
15. Wu, Z., Zhang, W., Lu, Y., Lu, C. (2010) Transcriptome profiling of zebrafish infected with *Streptococcus suis*. Microb Pathog. 48: 178-187.

Pathogenicity of *Streptococcus iniae* in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling

Soltani, M.[1*], Mazandarani, M.[2], Mirzargar, S.[1], Ebrahimzade Mousavi, H.A.[1], Taheri-Mirghaed, A.[1], Khoshbavar-Rostami, H.A.[3]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Univarsity of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan-Iran*

[3]*Fisheries Research Center of Golestan province, Gorgan-Iran*

(Received 26 August 2013, Accepted 24 December 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* is one the most important bacterial diseases in aquaculture industry worldwide. **OBJECTIVES:** This study was aimed to assess the experimental pathogenicity of *Streptococcus iniae* in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling. **METHODS:** A number of 400 Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling weighting 17±3 g were used. Fish were challenged with a virulent strain of *Streptococcus iniae* via both intraperitoneal and intramuscular injections at dosage of 4.7×10^6, 4.7×10^5 , 4.7×10^4, 4.7×10^3, 4.7×10^2 cells/fish. Each treatment group included 12 fish in two replicates. Control fish received 0.1 mL per fish sterile normal saline (0.9% NaCl). **RESULTS:** Clinically mortality started after 24 hours post-challenge and the affected fish showed listless, spiral swimming, spot haemorrhages on different parts of bodies particularly at the base of fins, the lateral line around the bone columns, on the base of barbells, mouth and around anal area. Also signs of abdominal distention, hyperemia of intestine, accumulation of bloody fluid in abdominal cavity, lordosis and scoliosis as well as hemorrhages in eyes were seen. The lethal concentration (LD50) of intraperitoneal injection was calculated 1.1×10^3, 8×10^3, 3.7×10^6 cells/fish after 48, 72 and 96 hours post-challenge, respectively. The LD50 of intramuscular injection was 4.8×10^2, 1.8×10^3 and 6.4×10^5 cells/fish at 48, 72 and 96 hours post-challenge, respectively ($p<0.05$). No mortality or abnormal signs was seen in control fish up to 14 days post-experiment. **CONCLUSIONS:** The results of this study showed that Parisian sturgeon fingerling is highly susceptible to Streptococcosis.

Key words: *Acipenser persicus*, *Streptococcus iniae*, pathogenicity, LD50

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Juvenile Persian sturgeon mortality rate challenging with *Streptococcos iniae* via intramuscular injection (treatment 1: 4.7×10^2 cells/fish, treatment 2: 4.7×10^3 cells/fish, treatment 3: 4.7×10^4 cells/fish, treatment 4: 4.7×0^5 cells/fish, treatment 5: 4.7×10^6 cells/fish).

Graph 2. Juvenile Persian sturgeon mortality rate challenging with *Streptococcos iniae* via intraperitoneal injection (treatment 1: 4.7×10^2 cells/fish, treatment 2: 4.7×10^3 cells/fish, treatment 3: 4.7×10^4 cells/fish, treatment 4: 4.7×10^5 cells/fish, treatment 5: 4.7×10^6 cells/fish).

Figure 1. Figures of Clinical signs of juvenile Persian sturgeon experimentally challenged with *Streptococcus iniae* via intraperitoneal and intramuscular injections. A: anal haemorrhage. B: hydronephrosis. C: heamorrhage in the site of injection in intra- muscular method. D: congestion and hemorrhage in distal part of intestine. E: petechia in eyes. F: corneal opacity and sunken eyes compared to healthy fish.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-61117094, Fax: 021-66933222**