University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 78, Number 2, 2023, 85-96

Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria, the Causative Agents of Bacterial Diseases in Farmed Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran

Mehdi Soltani[1,2]✉, Kambiz Rakhshanimehr[3]✉, Saeyd Saeed Mirzargar[2]✉, Ashkan Zargar[2]✉, Poulin Shohreh[4]✉, Sepideh Asadi[3]✉

[1] *Department of Fish Health Group, Center of Sustainable Aquatic Ecosystem, Harry Butler Institute, Murdoch University, WA, Australia*
[2] *Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[4] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran*

Received: *11 March 2023*, ***Accepted:*** *15 May 2023*

10.22059/jvr.2022.346130.3287 20.1001.1.20082525.1402.78.2.2.6

Abstract

BACKGROUND: Infectious diseases and microbial antibiotic resistance are the major problems of fish farming industry annually causing remarkable losses. Apart from the economic losses caused by these infections, some of these agents are zoonotic and may be transmitted to humans.

OBJECTIVES: This study was aimed to identify the common causative agents of infections in rainbow trout farms and to determine their antibiotic resistance toward some common antibiotics.

METHODS: Sampling was performed during a nine-month period between March and December 2021 by visiting and inspecting rainbow trout farms and the affected fish with disease symptoms were obtained from the farmed fish in Mazandaran, Lorestan, Chaharmahal and Bakhtiari and Zanjan provinces. Bacterial culture was undertaken from anterior kidney or spleen organs and the isolated bacterial strains were identified by phenotyping, biochemical and molecular assays. Antibiotic resistance pattern was evaluated by disk diffusion method (DDM) and minimum inhibition concentration against erythromycin, oxytetracycline, florfenicol, enrofloxacin and nitrofurantoin.

RESULTS: Seventy-four bacterial isolates of Gram-positive cocci or Gram-negative coccobacilli were isolated. In phenotyping, biochemical and molecular (PCR) assays *Lactococcus garvieae* (12 isolates, 16.2 %), *Aeromonas hydrophila* (9 isolates, 12.2 %), *Streptococcus iniae* (17 isolates, 23 %), *Streptococcus agalactiae* (20 isolates, 27 %), and *Yersinia ruckeri* (16 isolates, 21.7 %) were identified. The majority of these isolates were obtained from the fish farms in Mazandaran province. Erythromycin and oxytetracycline with 87.8 % resistance were antibiotics with the highest resistance, while enrofloxacin with 24.3 % resistance revealed the lowest level of resistance. Antibiotic resistance rates for florfenicol and nitrofurantoin were also 43.2 % and 44.4 %, respectively. The highest antibiotic resistance was detected in the bacterial isolates of *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* and *Yersinia ruckeri*, respectively.

CONCLUSIONS: This study shows that the spread of streptococcosis, lactococcosis, yersiniasis and *Aeromonas* septicemia and their frequent treatments has led to an increase in antibiotic resistance, especially against commonly used drugs such as erythromycin and oxytetracycline.

Keywords: Aeromonasis, Lactococcosis, Streptococcosis, Trout, Yersiniasis

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Mehdi Soltani, Tel/Fax: +9821-611117490

How to cite this article:

Soltani M, Rakhshanimehr K, Mirzargar S S, Zargar A, Shohreh P, Asadi S. Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria, the Causative Agents of Bacterial Diseases in Farmed Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. J Vet Res, 2023; 78(2): 85-96. doi: 10.22059/jvr.2022.346130.3287

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers used for PCR assay.
Table 2. Phenotypic and biochemical characteristics for diagnosis of isolated bacteria from diseased fish.
Table 3. Geographical distribution of bacterial species isolated in the present study.
Table 4. Number and percentage of isolated bacteria from the provinces in the present study.
Table 5. Antibiotic resistance of isolated bacteria using disk diffusion assay.
Table 6. The minimum inhibitory concentration of the isolated bacteria.
Table 7. Antibiotic resistance of the isolated bacteria based on the minimum inhibitory concertation.
Figure 1. Electrophoresis image of *Streptococcus agalactiae*, *Yersinia ruckeri*, and *Aeromonas hydrophila.*
Figure 2. Electrophoresis image of *Streptococcus iniae.*
Figure3. Electrophoresis image of *Lactococcus gtarvieae.*

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۸، شماره ۲، ۱۴۰۲، ۹۶-۸۵

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عوامل ایجاد بیماری‌های باکتریایی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* در برخی مزارع پرورشی کشور

مهدی سلطانی[۱،۲]، کامبیز رخشانی‌مهر[۳]، سید سعید میرزرگر[۲]، اشکان زرگر[۲]، پولین شهره[۴]، سپیده اسدی[۳]

[۱] گروه بهداشت ماهیان آب شیرین، مرکز اکوسیستم‌های پایدار آبزیان، مؤسسه تحقیقات هری باتلر، دانشگاه مرداک، استرالیای غربی، استرالیا
[۲] گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۲۰ اسفند ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۲۵ اردیبهشت ۱۴۰۲

10.22059/jvr.2022.346130.3287 20.1001.1.20082525.1402.78.2.2.6

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری‌های عفونی و مقاومت میکروبی از جمله معضلات پرورش ماهی می‌باشند که سالانه خسارات زیادی به این صنعت وارد می‌کنند. غیر از ضررهای اقتصادی ناشی از این عفونت‌ها، برخی از این عوامل زئونوز بوده و ممکن است به انسان منتقل شوند.

هدف: مطالعه حاضر با هدف شناسایی عوامل باکتریایی شایع در مزارع پرورش قزل‌آلا و تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها به برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در این صنعت می‌باشد.

روش‌کار: نمونه‌گیری‌ها در فصول بهار، تابستان و پاییز سال ۱۴۰۰ از طریق مراجعه و بازرسی مزارع و اخذ ماهیان با علائم بیماری در استان‌های مازندران، لرستان، چهارمحال و بختیاری و زنجان و کشت باکتریایی از اندام‌های کلیه قدامی یا طحال انجام و با آزمایش‌های فنوتایپینگ، بیوشیمیایی و مولکولار شناسایی شد. سپس مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌روش‌های انتشار از دیسک و تعیین حداقل دوز ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری‌ها و با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، اکسی‌تتراسایکلین، فلورفنیکل، انروفلوکساسین و نیتروفورانتوئین مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: تعداد ۷۴ جدایه باکتریایی از نوع کوکسی گرم مثبت و یا کوکوباسیل گرم منفی جداسازی گردید، که در آزمایش‌های فنوتایپینگ، بیوشیمیایی و مولکولار (Polymerase chain reaction) تعداد ۱۲ جدایه (۱۶/۲ درصد) *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*)، ۹ جدایه (۱۲/۲ درصد) *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)، ۱۷ جدایه (۲۳ درصد) *استرپتوکوکوس اینیایی* (*Streptococcus iniae*)، ۲۰ جدایه (۲۷ درصد) *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (*Streptococcus agalactiae*) و ۱۶ جدایه (۲۱/۷ درصد) *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*) تشخیص داده شد و بیشترین موارد جداسازی مربوط به مازندران بود. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین با ۸۷/۸ درصد بود در حالی‌که کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به انروفلوکساسین با ۲۴/۳ درصد به‌دست آمد. میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای فلورفنیکل و نیتروفورانتوئین نیز به‌ترتیب ۴۳/۲ و ۴۴/۴ درصد به‌دست آمد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌ترتیب در باکتری‌های *لاکتوکوکوس گارویه*، *آئروموناس هیدروفیلا*، *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *یرسینیا راکری* مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر نشان داد گسترش بیماری‌های استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس، یرسینیوزیس و سپتی‌سمی آئروموناسی و درمان‌های مکرر علیه این بیماری‌ها، منجر به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ویژه علیه داروهای رایج، نظیر اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین شده است.

کلمات کلیدی: استرپتوکوکوزیس، آئروموناسیس، قزل‌آلا، لاکتوکوکوزیس، یرسینیوزیس

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *مهدی سلطانی، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*

مقدمه

نیاز جوامع بشری به منابع پروتئین حیوانی از طرفی و کمبود منابع پروتئین حیوانی خشکی‌زی از طرف دیگر، به علاوه رشد جمعیت جهانی، همگی موجب تسریع در توسعه صنعت آبزی‌پروری جهانی شده است به طوری که بر اساس آمار سازمان خواربار کشاورزی در سال ۲۰۲۲، تولید منابع پروتئینی از طریق پرورش گونه‌های آبزیان به ویژه ماهی و میگو به بیش از ۸۰ میلیون تن در سال ۲۰۲۰ رسیده است (۱). همزمان با رشد سریع صنعت، مشکلات بهداشتی و به ویژه شیوع بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی نیز افزایش یافته و لذا منجر به افزایش استفاده از داروهای درمانی به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش آبزیان شده است. در ایران نیز با وجود تولید بیش از ۱۸۰۰۰۰ تن قزل‌آلای پرورشی در سال ۱۴۰۰ (۲)، شاهد گسترش بیماری‌های باکتریایی و به دنبال آن مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در کشور افزایش یافته است (۳). مصرف بی‌رویه و غیرمسئولانه آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلات عدیده‌ای نظیر توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی، افزایش باقی‌ماندگی در لاشه و ایجاد مشکلات بهداشتی برای مصرف‌کنندگان و نیز تخریب اکوسیستم‌های آبی را موجب شده است (۳). مطالعات پراکنده اما اندک پیرامون ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مزارع گونه‌های مختلف ماهی در مناطق مختلف دنیا انجام شده است که از آن جمله می‌توان به اطلاعات آمده در مطالعه‌ای توسط Miller و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۴) اشاره نمود. در ایران نیز در این زمینه مطالعات اندکی صورت گرفته که بیان‌گر وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برخی مزارع ماهیان پرورشی می‌باشد که از آن جمله می توان به مطالعات Shahrani و همکاران در سال ۱۳۹۲ (۵) و Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۶) اشاره نمود که مقاومت آنتی‌بیوتیکی تعدادی از جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* را در مزارع قزل‌آلای استان چهارمحال و بختیاری مورد توجه قرار داده‌اند.

با توجه به گسترش بیماری‌های استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در مزارع قزل‌آلای کشور طی سال‌های اخیر و استفاده مکرر و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، ضرورت پایش بهداشتی مزارع و اعمال روش‌های پیشگیری و کنترلی، دوست‌دار محیط زیست را دو چندان نموده است. در این راستا هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی بیماریزا از ماهیان مزارع آلوده پرورش قزل‌آلا در برخی استان‌های کشور و تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده علیه این بیماری‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

بازرسی کارگاهی و نمونه‌گیری: عملیات بازرسی کارگاهی و نمونه‌گیری از تعدادی مزرعه قزل‌آلا واقع در استان‌های مازندران، لرستان، چهارمحال و بختیاری و زنجان طی ایام فصول بهار، تابستان و پاییز سال ۱۴۰۰ انجام شد. نمونه‌گیری از ماهیان مرضی با علائم غیرطبیعی از جمله تیرگی، کوری، بیرون‌زدگی چشم، تورم مخرج و شکم انجام شد. از نمونه‌های ماهی‌های بیمار جمع‌آوری شده در شرایط استریل از قسمت قدامی کلیه و یا طحال آن‌ها کشت باکتریایی بر روی محیط آگار تریپتیک سویا آگار (TSA) همراه یا بدون خون گوسفندی انجام و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۲۵ درجه سانتی گراد، نسبت به‌شناسایی اولیه پرگنه‌های رشد یافته با استفاده از روش‌های متداول فنوتایپی و بیوشیمیایی اقدام گردید (۷). برای این کار ابتدا از پرگنه‌های رشد یافته گسترش و رنگ‌آمیزی گرم و نیز آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز انجام، سپس آزمایشات بیوشیمیایی مورد نیاز از جمله تعیین الگوی همولیز آلفا، بتا، گاما و الگوی تخمیر قندها براساس روش‌های روتین باکتری‌شناسی انجام شد (۸). سپس جدایه‌های باکتریایی به‌دست آمده در گلیسرول ۳۰ درصد و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره و برای آزمایشات مولکولار (PCR) و تشخیص نهایی استفاده شد.

آزمایشات مولکولی: به‌منظور تأیید تشخیص جنس و گونه باکتریایی به‌دست آمده از پرگنه‌های خالص تأیید شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی برای پنج گونه *یرسینیا راکری*، *لاکتوکوکوس گارویه*، *آئروموناس هیدروفیلا*، *استرپتوکوکوس اینیایی* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* برای آزمایش‌های PCR استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت سینا کلون طبق پروتکل از پرگنه‌های باکتریایی انجام و از DNA استخراج شده به‌عنوان منبع ژنوم برای PCR استفاده شد. در مطالعه حاضر از سویه‌های *یرسینیا راکری*، *لاکتوکوکوس گارویه*، *آئروموناس هیدروفیلا*، *استرپتوکوکوس اینیایی* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. توالی پرایمرها، دمای آنلینگ، اندازه محصول و مقادیر ترکیبات PCR مربوط به گونه‌های باکتریایی جدا شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای آزمون PCR.

باکتری	توالی پرایمر 5′-3′	دمای آنلینگ (درجه سانتی‌گراد)	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
یرسینیا راکری	CAGCGGAAAGTAGCTTG	۵۵	۴۰۹	(۹)
	TGTTCAGTGCTATTAACACTTAA			
لاکتوکوکوس گارویه	GAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCG	۵۵	۸۵۳	(۳)
	TCCATTGTAGCACGAGTGTAGCC			
آئروموناس هیدروفیلا	GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA	۶۰	۶۸۵	(۶)
	CGTGCTGGCAACAAAGGACAG			
استرپتوکوکوس اینیایی	GTCGTAACAAGGTAAGCCGTATCG	۶۰	۵۱۳	(۳)
	CTTACCTTAGCCCCAGTCTAACGAC			
استرپتوکوکوس آگالاکتیه	TTTGGTGTTTACACTAGACTG	۵۵	۲۰۰	(۱۰)

جدول ۲. آزمایش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی برای تشخیص جدایه‌های باکتری به‌دست آمده از ماهیان مرضی.

تست	باکتری				
	یرسینیا راکری	*لاکتوکوکوس گارویه*	*استرپتوکوکوس اینیایی*	*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*	*آئروموناس هیدروفیلا*
شکل	باسیل	کوکسی	کوکسی	کوکسی	باسیل
رنگ آمیزی گرم	–	+	+	+	–
تحرک ۲۲ درجه سانتی‌گراد	+	–	–	–	+
تحرک ۳۷ درجه سانتی‌گراد	–	–	–	–	+
اکسیداز	–	–	–	–	+
کاتالاز	+	–	–	–	+
اندول	–	–	–	–	+(–)
متیل رد	–	+/- (+ /-)	+/- (+/-)	+	+(–)
وگس پرسکور	+	+	+	+	+(–)
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	–	–	+
دکربوکسیلاز آرژنین	–	+	+	؟	+(–)
دکربوکسیلاز لیزین	+	+	–	؟	+(–)
دکربوکسیلاز ارنیتین	–	–	+	؟	+(–)
تجزیه اوره	–	+	–	–	+(–)
تخمیر گلوکز	+	+	+	+	+
تخمیر ساکارز	(+)	–	+	؟	+(–)
تخمیر مانیتول	+	–	+	–	+(–)
تخمیر اینوزیتول	–	–	–	–	+(–)
تخمیر آرابیتوز	+	–	–	–	+(–)
تخمیر رامنوز	–	؟	؟	؟	+(–)
H2S	–	+	–	–	+(–)

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی (روش انتشار در آگار): حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به‌روش انتشار از دیسک Kirby-bauer انجام شد. برای این کار ابتدا از باکتری‌ها کشت ۲۴ ساعته در محیط تریپتیک سویا آگار تهیه و سپس با تهیه سوسپانسیون باکتریایی از پرگنه‌های رشد یافته در سرم فیزیولوژی استریل غلظتی معادل نیم‌مک‌فارلند تهیه شد. سپس با استفاده از سواپ استریل روی محیط آگار خوندار کشت چمنی انجام و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب) روی محیط با فواصل مناسب قرار داده شد. پلیت‌های محیط کشت به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و قطر هاله عدم رشد تعیین شد. بر اساس استاندارد شرکت خریداری شده مقادیر حساس، نیمه‌حساس و مقاوم برای هر جنس و گونه باکتری و هر آنتی‌بیوتیک تعیین شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شامل اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اکسی‌تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و نیتروفورانتوئین (۳۰ میکروگرم) بودند (۱۱، ۱۲).

جدول ۳. پراکنش جغرافیایی گونه‌های باکتریایی جدا شده در مطالعه حاضر.

باکتری	تعداد جدایه	شهر/ شهرهای اخذ نمونه
لاکتوکوکوس گارویه	۱۲ جدایه	مازندران (۱۲ جدایه)
آئروموناس هیدروفیلا	۹ جدایه	مازندران (۹ جدایه)
استرپتوکوکوس اینیایی	۱۷ جدایه	مازندران (۱۱ جدایه) لرستان (۲ جدایه) چهارمحال و بختیاری (۴ جدایه)
استرپتوکوکوس آگالاکتیه	۲۰ جدایه	مازندران (۹ جدایه) لرستان (۳ جدایه) زنجان (۴ جدایه) چهارمحال بختیاری (۴ جدایه)
یرسینیا راکری	۱۶ جدایه	مازندران (۷ جدایه) لرستان (۵ جدایه) چهارمحال بختیاری (۴ جدایه)

جدول ۴. استان محل نمونه‌گیری به تفکیک تعداد و درصد ایزوله‌های باکتریایی جدا شده در مطالعه حاضر.

استان نمونه‌گیری به تفکیک تعداد نمونه	تعداد نمونه	تعداد و درصد آلودگی
مازندران	۶۰ نمونه	۴۸ جدایه (۸۰ درصد)
لرستان	۱۵ نمونه	۱۰ جدایه (۶۶/۷ درصد)
زنجان	۷ نمونه	۴ جدایه (۵۷/۱ درصد)
چهارمحال بختیاری	۱۸ نمونه	۱۲ جدایه (۶۶/۷ درصد)

جدول ۵. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های باکتریایی بر اساس روش انتشار در آگار.

آنتی‌بیوتیک	الگوی مقاومت	*لاکتوکوکوس گارویه*	*آئروموناس هیدروفیلا*	*استرپتوکوکوس اینیایی*	*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*	*یرسینیا راکری*	کل
		(۱۲ جدایه)	(۹ جدایه)	(۱۷ جدایه)	(۲۰ جدایه)	(۱۶ جدایه)	(۷۴ جدایه)
اریترومایسین	حساس (درصد)	۰	۰	۱ (۵/۹)	۳ (۱۵)	۲ (۱۲/۵)	۶ (۸/۱)
	نیمه‌حساس (درصد)	۲ (۱۶/۷)	۱ (۱۱/۱)	۰	۰	۰	۳ (۴)
	مقاوم (درصد)	۱۰ (۸۳/۳)	۸ (۸۸/۹)	۱۶ (۹۴/۱)	۱۷ (۸۵)	۱۴ (۸۷/۵)	۶۵ (۸۷/۸)
اکسی‌تتراسایکلین	حساس (درصد)	۲ (۱۶/۷)	۲ (۲۲/۲)	۱ (۵/۹)	۲ (۱۰)	۰	۷ (٪۹/۵)
	نیمه‌حساس (درصد)	۰	۲ (۲۲/۲)	۰	۰	۰	۲ (۲/۷)
	مقاوم (درصد)	۱۰ (۸۳/۳)	۵ (۵۵/۶)	۱۶ (۹۴/۱)	۱۸ (۹۰)	۱۶ (۱۰۰)	۶۵ (۸۷/۸)
فلورفنیکل	حساس (درصد)	۵ (۴۱/۷)	۸ (۸۸/۹)	۱۲ (۷۰/۶)	۳ (۱۵)	۱۴ (۸۷/۵)	۴۲ (۵۶/۸)
	نیمه‌حساس (درصد)	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	مقاوم (درصد)	۷ (۵۸/۳)	۱ (۱۱/۱)	۵ (۲۹/۴)	۱۷ (۸۵)	۲ (۱۲/۵)	۳۲ (۴۳/۲)
انروفلوکساسین	حساس (درصد)	۸ (۶۶/۷)	۷ (۷۷/۸)	۱۲ (۷۰/۶)	۱۳ (۶۵)	۱۳ (۸۱/۲۵)	۵۳ (۷۱/۶)
	نیمه‌حساس (درصد)	۳ (۲۵)	۰	۰	۰	۰	۳ (۴)
	مقاوم (درصد)	۱ (۸/۳)	۲ (۲۲/۲)	۵ (۲۹/۴)	۷ (۳۵)	۳ (۱۸/۷۵)	۱۸ (۲۴/۳)
نیتروفورانتوئین	حساس (درصد)	۰	۵ (۵۵/۶)	۰	۰	۰	۵ (۵۵/۶)
	نیمه‌حساس (درصد)	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	مقاوم (درصد)	۰	۴ (۴۴/۴)	۰	۰	۰	۴ (۴۴/۴)

روش تعیین حداقل ممانعت‌کنندگی رشد Minimum Inhibitory Concentration (MIC): تعیین مقادیر کمترین غلظت مهارکنندگی رشد و کمترین غلظت کشندگی Concentration Minimum Bactericidal (MBC) آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری‌های جدا شده مطالعه شد. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد با استفاده از روش میکرودایلوشن براث (Broth Microdilution Method) و در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته صاف با سه بار تکرار انجام شد. برای این منظور پودر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه از شرکت سیگما با خلوص ۹۰ درصد خریداری شد. برای تهیه محلول آنتی‌بیوتیکی با غلظت نهایی

جدول ۶. مقادیر MIC به‌دست آمده جدایه‌های مورد مطالعه.

آنتی‌بیوتیک	مقادیر MIC بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر (تعداد جدایه)				
	لاکتوکوکوس گارویه	*آئروموناس هیدروفیلا*	*استرپتوکوکوس اینیایی*	*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*	*یرسینیا راکری*
	(۱۲ جدایه)	(۹ جدایه)	(۱۷ جدایه)	(۲۰ جدایه)	(۱۶ جدایه)
اریترومایسین	(۳) ۶۴ (۵) ۱۲۸ (۳) ۲۵۶ (۱) ۵۱۲	(۱) ۴ (۲) ۶۴ (۶) ۱۲۸	(۲) ۱۶ (۳) ۳۲ (۳) ۶۴ (۶) ۱۲۸ (۳) ۲۵۶	(۲) ۱۲۸ (۸) ۲۵۶ (۱۰) ۵۱۲	(۳) ۱۶ (۲) ۳۲ (۳) ۶۴ (۶) ۱۲۸ (۲) ۲۵۶
تتراسایکلین	(۱) ۸ (۱) ۱۶ (۲) ۶۴ (۳) ۱۲۸ (۳) ۲۵۶ (۲) ۵۱۲	(۱) ۴ (۱) ۸ (۴) ۶۴ (۳) ۱۲۸	(۱) ۴ (۶) ۶۴ (۵) ۱۲۸ (۳) ۲۵۶ (۲) ۵۱۲	(۲) ۶۴ (۴) ۱۲۸ (۷) ۲۵۶ (۷) ۵۱۲	(۱) ۸ (۴) ۶۴ (۶) ۱۲۸ (۳) ۲۵۶ (۲) ۵۱۲
فلورفنیکل	(۲) ۸ (۳) ۱۶ (۱) ۳۲ (۳) ۶۴ (۲) ۱۲۸ (۱) ۵۱۲	(۴) ۴ (۳) ۸ (۲) ۱۶	(۱) ۴ (۹) ۸ (۳) ۱۶ (۲) ۳۲ (۲) ۶۴	(۲) ۸ (۱) ۱۶ (۳) ۳۲ (۶) ۶۴ (۸) ۱۲۸	(۲) ۴ (۴) ۸ (۳) ۱۶ (۲) ۳۲ (۳) ۶۴ (۲) ۱۲۸
انروفلوکساسین	(۷) ۸ (۴) ۱۶ (۱) ۳۲	(۳) ۴ (۲) ۸ (۲) ۱۶ (۲) ۳۲	(۲) ۴ (۶) ۸ (۴) ۱۶ (۳) ۳۲ (۲) ۶۴	(۲) ۸ (۶) ۱۶ (۱) ۳۲ (۴) ۶۴ (۶) ۱۲۸ (۱) ۲۵۶	(۶) ۴ (۵) ۸ (۳) ۱۶ (۲) ۳۲
نیتروفورانتوئین	۰	(۳) ۴ (۴) ۸ (۲) ۱۶	۰	۰	۰

جدول ۷. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های باکتریایی بر اساس مقادیر حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد.

آنتی‌بیوتیک	الگوی مقاومت	*لاکتوکوکوس گارویه*	*آئروموناس هیدروفیلا*	*استرپتوکوکوس اینیایی*	*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*	*یرسینیا راکری*	کل
		(۱۲ جدایه)	(۹ جدایه)	(۱۷ جدایه)	(۲۰ جدایه)	(۱۶ جدایه)	(۷۴ جدایه)
اریترومایسین	غیرمقاوم (درصد)	۰	۱ (۱۱/۱)	۰	۰	۰	۱ (۱/۴)
	مقاوم (درصد)	۱۲ (۱۰۰)	۸ (۸۸/۹)	۱۷ (۱۰۰)	۲۰ (۱۰۰)	۱۶ (۱۰۰)	۷۳ (۹۸/۶)
اکسی‌تتراسایکلین	غیرمقاوم (درصد)	۱ (۸/۳)	۲ (۲۲/۲)	۱ (۵/۹)	۰	۱ (۶/۲)	۵ (۶/۸)
	مقاوم (درصد)	۱۱ (۹۱/۷)	۷ (۷۷/۸)	۱۶ (۹۴/۱)	۲۰ (۱۰۰)	۱۵ (۹۳/۸)	۶۹ (۹۳/۲)
فلورفنیکل	غیرمقاوم (درصد)	۲ (۱۶/۷)	۷ (۷۷/۸)	۹ (۵۲/۹)	۲ (۱۰)	۶ (۳۷/۵)	۲۶ (۳۵/۱)
	مقاوم (درصد)	۱۰ (۸۳/۳)	۲ (۲۲/۲)	۸ (۴۷/۱)	۱۸ (۹۰)	۱۰ (۶۲/۵)	۴۸ (۶۴/۹)
انروفلوکساسین	غیرمقاوم (درصد)	۷ (۵۸/۳)	۵ (۵۵/۶)	۸ (۴۷/۱)	۲ (۱۰)	۱۱ (۶۸/۷)	۳۳ (۴۴/۶)
	مقاوم (درصد)	۵ (۴۱/۷)	۴ (۴۴/۴)	۹ (۵۲/۹)	۱۸ (۹۰)	۵ (۳۱/۳)	۴۱ (۵۵/۴)
نیتروفورانتوئین	غیرمقاوم (درصد)	۰	۷ (۷۷/۸)	۰	۰	۰	۷ (۷۷/۸)
	مقاوم (درصد)	۰	۲ (۲۲/۲)	۰	۰	۰	۲ (۲۲/۲)

۲۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان ۰/۲ گرم از پودرهای آنتی‌بیوتیکی با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید. در این روش به هر کدام از چاهک‌های ردیف ۱ تا ۸ پلیت میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت BHI براث (مرک، آلمان) اضافه گردید. سپس به اولین چاهک هر ردیف میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت تهیه شده از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه (۲۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) به محیط کشت براث اضافه و از این غلظت تا گوده آخر رقت‌های متوالی (۲۰۲۴-۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه شد.

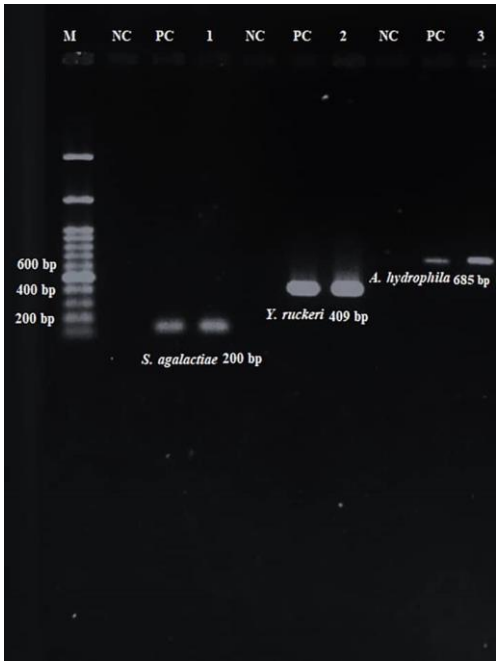
سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل غلظت ۰/۵ مک‌فارلند به‌همه گودهها اضافه شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و میزان کمترین غلظت مهارکنندگی از رشد با مشاهده عدم وجود کدورت تعیین شد (۱۲-۱۴). بر اساس انستیتو آزمایشگاهی و بالینی استاندارد (CLSI 2019) and Laboratory Standards Institute Clinical مقادیر کمترین غلظت مهارکنندگی رشد ۸ و کمتر از آن به‌عنوان غیرمقاوم و بیشتر از ۸ به‌عنوان مقاوم گزارش شد (۱۲-۱۴). به‌منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بالاتر) که رشدی در آن صورت نگرفته بود، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل و زیر هود میکروبی برداشته و بر روی محیط ژلوز خون‌دار کشت و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اولین غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های آماری مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

مشاهدات کارگاهی و علائم بالینی نمونه اخذ شده: ماهیان بیمار دارای علائم متعدد از جمله تیرگی پوست، بیرون زدگی چشم، پرخونی در چشم‌ها، تورم شکم، کوری، کاهش تحرک، کاهش شدت تغذیه، پرخونی مخرج و در کالبدگشایی پرخونی روده‌ها، تیرگی کبد، نقاط خون‌ریزی در اندام‌های داخلی، تجمع مایع در محوطه شکمی بودند.

نتایج باکتری‌شناسی فنوتایپینگ و بیوشیمیایی: نتایج حاصل از کشت باکتری‌ها منجر به رشد پرگنه‌های خالص برای تعداد ۷۴ نمونه گردید. رنگ‌آمیزی گرم پرگنه‌های خالص از نوع کوکسی گرم مثبت و یا کوکوباسیل گرم منفی بودند. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی در جدول ۲ آمده است. بر اساس داده‌های فنوتایپینگ و بیوشیمیایی این جدایه‌ها در جنس‌های *آئروموناس*، *یرسینیا*، *استرپتوکوکوس* و *لاکتوکوکوس* قرار گرفتند.

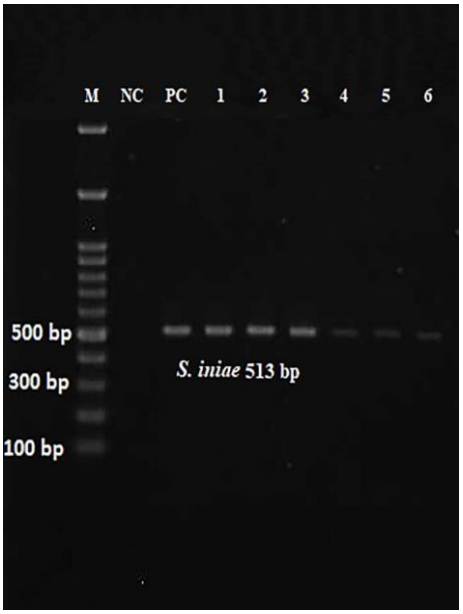


تصویر ۱. تصویر الکتروفورز مربوط به *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *یرسینیا راکری* و *آئروموناس هیدروفیلا* (M: نردبان ژنی، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، لاین ۱: *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، لاین ۲: *یرسینیا راکری* و لاین ۳: *آئروموناس هیدروفیلا*).

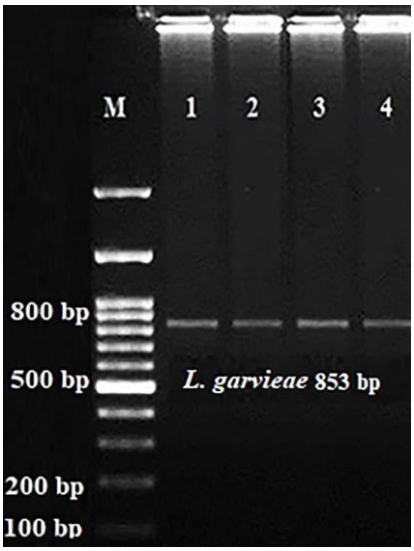
نتایج مطالعات مولکولی (PCR): نتایج مطالعات مولکولی منجر به شناسایی ۱۲جدایه *لاکتوکوکوس گارویه*، ۹ جدایه *آئروموناس هیدروفیلا*، ۱۷ جدایه *استرپتوکوکوس اینیایی*، ۲۰ جدایه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و ۱۶ جدایه *یرسینیا راکری* گردید. تصاویر الکتروفورز مربوط به نتایج PCR در تصاویر ۱ و۲ آورده شده است. باندهای مورد انتظار برای *آئروموناس هیدروفیلا* (۶۸۵ جفت باز)، *استرپتوکوکوس اینیایی* (۵۱۳ جفت باز)، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (۲۰۰ جفت باز)، *لاکتوکوکوس گارویه* (۸۵۳ جفت باز) و *یرسینیا راکری* (۴۰۹ جفت باز) بود (۳، ۶، ۹، ۱۰).

پراکنش عوامل پاتوژن شناسایی شده: پراکندگی جغرافیایی گونه‌های باکتریایی در جداول ۳ و ۴ آمده است. بیشترین تعداد مربوط به *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* با تعداد ۲۰ جدایه (۲۷ درصد) و کمترین آن مربوط به *لاکتوکوکوس گارویه* با تعداد ۱۲ جدایه (۱۶/۲ درصد) بود. لازم به ذکر است که براساس استان اخذ نمونه، بیشترین تعداد عوامل باکتریایی از مزارع استان مازندران (از ۶۰ نمونه ۴۸ جدایه برابر ۸۰ درصد) جداسازی شد.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده در جدول ۵ آورده شده است. در مورد کل باکتری‌ها بیشترین میزان مقاومت مربوط به اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین با ۸۷/۸ درصد مقاومت بود. همچنین کمترین میزان مقاومت مربوط به انروفلوکساسین با ۲۴/۳ درصد مقاومت بود. در مورد *لاکتوکوکوس گارویه* بیشترین مقادیر مقاومت با ۸۳/۳ درصد مربوط به اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین بود. در مورد *آئروموناس هیدروفیلا* بیشترین میزان مقاومت مربوط به اریترومایسین (۸۸/۹ درصد) بود. در مورد *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *یرسینیا راکری* هم بیشترین میزان مقاومت برای اریترومایسین ثبت شد. انروفلوکساسین برای اکثر گونه‌های باکتریایی جدا شده، آنتی‌بیوتیک مؤثری بود و بیشترین میزان حساسیت مربوط به این آنتی‌بیوتیک بود. همچنین نتایج مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد در جداول ۶ و ۷ آورده شده است. نتایج مربوط به حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد با نتایج انتشار در آگار همپوشانی داشت که بیانگر مشابهت الگوی مقاومت در دو آزمایش بود.



تصویر ۲. تصویر الکتروفورز مربوط به باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*، M: نردبان ژنی، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت و لاین ۱ تا ۵: نمونه‌های مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی*.



تصویر ۳. تصویر الکتروفورز مربوط به *لاکتوکوکوس گارویه*، M: نردبان ژنی، لاین ۱: کنترل مثبت و لاین ۲ تا ۴: نمونه‌های مثبت *لاکتوکوکوس گارویه*.

بحث

توسعه صنعت آبزی‌پروری موجب گسترش و افزایش بیماری‌های باکتریایی و در نتیجه باعث افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در این صنعت به‌ویژه در کشورهایی که فاقد برنامه‌های سراسری واکسیناسیون می‌باشند، گردیده است. نتایج بازرسی‌های کارگاهی با مطالعات باکتری‌شناسی و مولکولی در این مطالعه نشان داد که بیماری‌های استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس، یرسینیوزیس و تا حدی سپتی‌سمی آئروموناسی از بیماری‌های شایع باکتریایی در ماهیان قزل‌آلای پرورشی مزارع کشور (استان‌های مورد مطالعه) می‌باشند که می‌توانند هر سال موجب خسارت هنگفتی به‌صنعت ماهیان سردابی کشور شوند (۳). مصرف مکرر و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها علیه این بیماری‌ها، می‌تواند موجب مشکلات متعددی از جمله بروز و توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه عوامل بیماریزا گردد (۱۵).

نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های بیماریزا در این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان مقاومت به اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین اتفاق افتاده است، در حالی‌که در انروفلوکساسین و فلورفنیکل مقاومت کمتری دیده شد. به‌نظر می‌رسد که پرورش‌دهندگان به دلیل قیمت ارزان‌تر و دسترسی بیشتر به اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین، از این دو آنتی‌بیوتیک به مراتب استفاده بیشتری می‌نمایند، به‌علاوه از آن‌جایی‌که اریترومایسین از جمله آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی علیه بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس می‌باشد (۳، ۱۶) و از طرف دیگر موارد شیوع این بیماری‌ها در مزارع قزل‌آلا بیشتر می‌باشد، لذا مصرف مکرر و بیشتر اریترومایسین موجب توسعه شدید مقاومت آنتی‌بیوتیکی شده است. همچنین از آن‌جایی‌که بیماری‌های استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس به‌علت ایجاد واکنش‌های گرانولوماتوز و قدرت بقا باکتری در داخل سلول‌های میزبان، به خوبی به درمان‌های دارویی جواب ندادند و لذا در اغلب موارد درمان این بیماری‌ها موقتی بوده و نیازمند تکرار درمان می‌باشد که می‌تواند موجب گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به اریترومایسین شود. در خصوص علت احتمالی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای باکتری‌های بیماریزا به اکسی‌تتراسایکلین نیز می‌توان به دسترسی آسان‌تر، قیمت ارزان‌تر و استفاده مکرر آن برای درمان انواع عوامل باکتریایی بیماریزای گرم منفی و گرم مثبت و همچنین احتمال استفاده آن به‌عنوان یک عامل اشتهاآور و ارتقاء دهنده رشد اشاره نمود. بنابراین استفاده مکرر و بی‌رویه دو آنتی‌بیوتیک مذکور، موجب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مرحله اول در کوکسی‌های گرم مثبت (*استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *لاکتوکوکوس گارویه*) و در مرحله بعدی در کوکوباسیل‌های گرم منفی بیماریزا (*یرسینیا راکری* و *آئروموناس هایدروفیلا*) در ماهیان قزل‌آلای مزارع کشور شده است (۳).

گرچه مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای فلورفنیکل و انروفلوکساسین کمتر از اریترومایسین و اکسی‌تتراسایکلین بود، اما جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در برابر هر دو آنتی‌بیوتیک مقاومت ۹۰ درصدی از خود نشان داده است. همچنین جدایه‌های *لاکتوکوکوس*

گارویه (۸۳/۳ درصد) و *یرسینیا راکری* (۶۲/۵ درصد) مقاومت قابل توجهی در برابر فلورفنیکل از خود نشان دادند که علت آن می‌تواند ناشی از روند افزایشی استفاده از این دو آنتی‌بیوتیک در طی سال‌های اخیر در مزارع قزل‌آلای کشور باشد. مقایسه نتایج دو روش انتشار و حداقل دوز ممانعت‌کنندگی از رشد نشان داد که روش تعیین حداقل دوز ممانعت‌کنندگی برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی دقیق‌تر می‌باشد. به‌هرحال نتایج هر دو روش باهم همخوانی داشته و تأییدکننده نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه پاتوژن‌های مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به تولید سالیانه میزان قابل توجه ماهی قزل‌آلا و شیوع فراوان بیماری‌های استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در فصول بهار، تابستان و اوایل پاییز، که می‌تواند منجر به خسارات قابل توجه در تولید سالیانه شود، لذا ضروری است تا سازمان دامپزشکی کشور اقدام به اعمال برنامه‌های پیشگیری سراسری علیه این بیماری‌ها نماید که در این میان با توجه به منابع متعدد و راه‌های انتقال این عوامل بیماریزا اعمال واکسیناسیون به‌موقع از بهترین، ارزان‌ترین و سالم‌ترین روش‌های پیشگیری می‌باشد، به‌طوری که در بسیاری از کشورهای درگیر، انجام واکسیناسیون به‌موقع، نه تنها از بروز خسارات سنگین جلوگیری نموده، بلکه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را به حداقل رسانده و از این طریق موجب کاهش باقی‌ماندگی دارو در لاشه و در نتیجه ارتقاء کیفیت و سلامت مصرف‌کننده و نیز جلوگیری از تخریب فون و فلور اکوسیستم‌های آبی می‌شود.

مطالعات اندکی پیرامون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عوامل باکتریایی بیماریزا، در مزارع پرورش ماهی کشور انجام شده است. Shahrani و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تعداد ۴۹ جدایه *لاکتوکوکوس گارویه* به‌دست آمده از مزارع قزل‌آلای چهارمحال و بختیاری نشان دادند که ۶۵/۴ درصد جدایه‌ها به انروفلوکساسین، ۵۵/۲ درصد آن‌ها به فلورفنیکل، ۴۸/۹ درصد آن‌ها به اریترومایسین، ۳۸/۸ درصد آن‌ها به تتراسایکلین مقاوم بودند، به‌علاوه همه ۴۹ جدایه‌ها درجاتی از مقاومت چندگانه دارویی از خود نشان دادند (۵). در مطالعه Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیشترین میزان مقاومت جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* جدا شده از ماهی قزل‌آلا در برابر تتراسایکلین (۷۹/۱ درصد) و آمپی‌سیلین (۸۷/۵ درصد) بود (۶). به‌علاوه Mortezaei و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که عمده جدایه‌های جنس *لاکتوکوکوس* به‌دست آمده از روده قزل‌آلا به تتراسایکلین مقاوم بودند (۱۷) درحالی‌که جدایه‌های مورد مطالعه توسط Ture و همکاران در سال ۲۰۱۶ به هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، فلورفنیکل و انروفلوکساسین مقاومت نشان ندادند (۱۸). Mammeri و همکاران در سال ۲۰۰۶ با مطالعه جدایه‌های *یرسینیا راکری* به‌دست آمده از ماهیان بیمار نشان دادند همگی آن‌ها در درجاتی به اکسی‌تتراسایکلین، اکسولونیک اسید و سولفونامیدها مقاوم بودند (۱۹). در مطالعه Duman و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی ۱۴۲ جدایه *یرسینیا راکری* به‌دست آمده از ماهیان مرضی، میزان ۲۰ درصد آن‌ها به تتراسایکلین و فلورفنیکل مقاوم بودند (۲۰). در مطالعه Orozova و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۱۲ جدایه *یرسینیا راکری* مطالعه شده در مزارع ماهی بلغارستان، همگی به اکسی‌تتراسایکلین، اریترومایسین و فلورفنیکل درجاتی از مقاومت نشان دادند (۲۱). از ۱۱۶ جدایه *یرسینیا راکری* به‌دست آمده از مزارع قزل‌آلا در ترکیه، تعداد ۱۴۴ جدایه حاوی ژن‌های مقاومت tetA و tetB به اکسی‌تتراسایکلین بودند (۲۲) در حالی‌که جدایه‌های مورد مطالعه توسط Schmidt و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Ture و همکاران در سال ۲۰۱۶ به اکسی‌تتراسایکلین و فلورفنیکل و انروفلوکساسین حساس بودند (۱۸، ۲۳). Schmidt و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* به فلورفنیکل، اکسی‌تتراسایکلین، اکسولونیک اسید و آموکسی‌سایکلین مقاوم بودند (۲۳). بروز مقاومت به اکسی‌تتراسایکلین در *آئروموناس هیدروفیلا* ده روز پس از درمان گربه ماهیان پرورشی، قابل سنجش بود (۲۴) در حالی‌که جدایه‌های مورد مطالعه توسط Ture و همکاران در سال ۲۰۱۶ هیچ‌گونه مقاومتی در برابر اکسی‌تتراسایکلین، فلورفنیکل و انروفلوکساسین نشان ندادند، همچنین هیچ یک از جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* مورد آزمایش به اکسی‌تتراسایکلین، فلورفنیکل و انروفلوکساسین مقاومت نشان ندادند (۱۸).

همچنین Deng و همکاران در سال ۲۰۱۹، در مطالعه‌ای میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را بر روی ماهیان پرورشی در چین نشان دادند که بیشترین میزان مقاومت برای اریترومایسین و پنی‌سیلین به‌ترتیب با ۴۲/۹ درصد و ۳۵/۷ درصد بود. به‌علاوه جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* جدا شده از ماهی‌های مرضی بیشترین میزان مقاومت به داکسی‌سایکلین با ۳۷/۱ درصد را نشان دادند در حالی‌که به لوفلوکساسین و ونکومایسین حساس بودند (۲۵).

در مطالعه دیگری که توسط Sapugahawatte و همکاران در سال ۲۰۲۲ و با استفاده از آزمایش حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* جدا شده از ماهی‌ها نشان دادند که بیشترین میزان مقاومت مربوط به داکسی‌سایکلین با ۳۷/۱ درصد

می‌باشد. محققین این مطالعه گزارش کردند که همه باکتری‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در مطالعه آن‌ها نسبت به لوفلوکساسین و ونکومایسین حساس بودند (۲۶).

در مطالعه مشابه توسط Alazab و همکاران در سال ۲۰۲۲ جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* اخذ شده از ماهیان تیلا پیا در مصر اریترومایسین و آمپی‌سیلین با ۹۵ درصد (۲۰ از ۲۱ جدایه) بیشترین میزان مقاومت را از خود نشان دادند در حالی‌که این جدایه‌ها حساسیت بالایی به ایمی‌پنم (۵۰ درصد مقاومت) و تا حدی سیپروفلوکساسین (۴۳ درصد مقاومت) داشتند (۲۷). در مطالعه دیگری که توسط Auzureen و همکاران در سال ۲۰۱۶، روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* جدا شده از ماهی تیلا پیا در مالزی نیز نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر آمپی‌سیلین، اریترومایسین و آموکسی‌سیلین دیده شد در صورتی که این جدایه‌ها حساسیت بالایی به ایمی‌پنم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید داشتند. بنابراین به‌نظر می‌رسد توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج در مناطق دیگر هم در حال ایجاد می‌باشد (۲۸).

نتیجه‌گیری نهایی: در جمع‌بندی با توجه به‌گسترش بیماری‌های مذکور در مزارع قزل‌آلای کشور و استفاده مکرر آنتی‌بیوتیک‌ها انجام اقدامات نظارتی با هدف جلوگیری از مصرف بی‌رویه داروها و نیز اقدامات پیشگیری مقرون به‌صرفه و دوست‌دار محیط زیست مانند واکسیناسیون امری ضروری است.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و همکاری سازمان دامپزشکی کشور انجام شده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Towards Blue Transformation.1th ed. FAO. Rome, Italy; 2022.
2. Abdolhay H A, Asgari R. Analysis of the latest status of aquaculture in the Islamic Republic of Iran. J Agric Nat Resour. 2020;5(2):190-205.
3. Soltani M, Kheirabadi A, Taherimirkahead E, Shafie S, Mohamadian S, Roholahi S. Molecular study of Streptococcosis/Lactococcosis distribution in farmed rainbow trout in Charmahal-va-Bakhteyari and Kohgiloyeh-va-Boyerahmad provinces, Iran. Iran J Epidemol. 2013;9(2).
4. Miller RA, Harbottle H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. Microbiol Spectr. 2018;6(1). PMID: 29372680
5. Shahrani M, Raissy M, Tajbakhsh E. Study of frequency and antimicrobial resistance of Lactococcus garvieae in rainbow trout fish in Chaharmahal va Bakhtiari Province. Biol J microorganism. 2014;3(11):71-8.
6. Raissy M, Moumeni M. Detection of antibiotic resistance genes in some Lactococcus garvieae strains isolated from infected rainbow trout. Iran J Fish Sci. 2016,15(1):221-229. In persian.
7. Buller NB. Aquatic animal species and organism relationship. In: Buller NB. editor,. 2nd ed. Bacteria from fish and other aquatic animals: A Practical Identification Manual. CABI publishing, Wallingford. England. 2014.p.165-366.
8. Odds F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. J Clin Pathol. 1981;34(5):572.
9. Sharifi A, Ahmadi A, Mohammadzadeh A. Streptococcus pneumoniae quorum sensing and biofilm formation are affected by Thymus daenensis, Satureja hortensis, and Origanum vulgare essential oils. Acta Microbiol Immunol Hung. 2018;65(3):345-59. doi: 10.1556/030.65.2018.013 PMID: 29471691
10. Sharifi A, Nayeri Fasaei B. Selected plant essential oils inhibit biofilm formation and luxS-and pfs-mediated quorum sensing by Escherichia coli O157: H7. Lett Appl Microbiol. 2022;74(6):916-23. doi: 10.1111/lam.13673 PMID: 35152462

11. LeJeune JT, Rurangirwa FR. Polymerase chain reaction for definitive identification of Yersinia ruckeri. J Vet Diagn. 2000;12(6):558-61. doi: 10.1177/104063870001200611 PMID: 11108457

12. Meiri-Bendek I, Lipkin E, Friedmann A, Leitner G, Saran A, Friedman S, et al. A PCR-based method for the detectionof Streptococcus agalactiae in milk. J Dairy Sci. 2002;85(7):1717-23. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74245-8

13. Ranjbar R, Salighehzadeh R, Sharifiyazdi H. Antimicrobial resistance and incidence of integrons in Aeromonas species isolated from diseased freshwater animals and water samples in Iran. Antibiotics. 2019;8(4):198. doi: 10.3390/antibiotics8040198 PMID: 31661794

14. Humphries RM, Hindler JA, Shaffer K, Campeau SA. Evaluation of ciprofloxacin and levofloxacin disk diffusion and Etest using the 2019 Enterobacteriaceae CLSI breakpoints.J Clin microbiol. 2019;57(3):e01797-18. doi: 10.1128/JCM.01797-18 PMID: 30567744

15. Suzuki S, Pruden A, Virta M, Zhang T. Antibiotic resistance in aquatic systems. 1th ed. Frontiers Media SA. Lausanne, Switzerland; 2017.

16. Park Y-K, Nho S-W, Shin G-W, Park S-B, Jang H-B, Cha I-S, et al. Antibiotic susceptibility and resistance of Streptococcus iniae and Streptococcus parauberis isolated from olive flounder (Paralichthys olivaceus). Vet Microbiol. 2009;136(1-2):76-81. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.002

17. Mortezaei F, Royan M, Pourebrahim M, Babakhani A. Assessment of antibiotic resistance patterns in two potential probiotic bacteria, Lactococcus lactis subsp. cremoris NABRII64 and Lactococcus lactis subsp. cremoris NABRII66 isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) intestine. Aquat Biol. 2020;8(1):1-18.

18. Türe M, Alp H. Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. J Vet Res. 2016;60(2):141-6.

19. Mammeri H, Poirel L, Nazik H, Nordmann P. Cloning and functional characterization of the ambler class C β-lactamase of Yersinia ruckeri. FEMS Microbiol Lett. 2006;257(1):57-62. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00148.x

20. Duman M, Altun S, Cengiz M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG, Sahinturk P. Genotyping and antimicrobial resistance genes of Yersinia ruckeri isolates from rainbow trout farms. Dis Aquat Org. 2017;125(1):31-44. doi: 10.3354/dao03132

21. Orozova P, Chikova V, Sirakov I. Diagnostics and antibiotic resistance of Yersinia ruckeri strains isolated from trout fish farms in Bulgaria. Int J Dev Res. 2014;4(12):2727-33.

22. Balta F, Sandalli C, Kayis S, Ozgumus O. Molecular analysis of antimicrobial resistance in Yersinia ruckeri strains isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) grown in commercial fish farms in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol. 2010;30(6):211-9.

23. Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Pedersen K, Larsen JL. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. Appl Environ Microbiol. 2000;66(11):4908-15. doi: 10.1128/aem.66.11.4908-4915.2000

24. Depaola A, Peeler JT, Rodrick GE. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. Appl Environ Microbiol. 1995;61(6):2335-40.

25. Deng L, Li Y, Geng Y, Zheng L, Rehman T, Zhao R, et al. Molecular serotyping and antimicrobial susceptibility of Streptococcus agalactiae isolated from fish in China. Aquac. 2019;510:84-9. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.05.046

26. Sapugahawatte DN, Li C, Dharmaratne P, Zhu C, Yeoh YK, Yang J, et al. Prevalence and characteristics of Streptococcus agalactiae from freshwater fish and pork in hong kong wet markets. Antibiotics. 2022;11(3):397. doi: 10.3390/antibiotics11030397

27. Alazab A, Sadat A, Younis G. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genotyping of Streptococcus agalactiae in Tilapia fish (Oreochromis niloticus) in Egypt. J Adv Vet Anim Res. 2022;9(1):95. doi: 10.5455/javar.2022.i573

28. Auzureen MZA, Hamdan RH, Jamaludin MH. Identification and antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) in local wet markets. Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology. 2016;2016:561-566. doi: 10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.561-566