فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۷۱- ۷۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۳۱

مطالعه فراوانی و مقاومت دارویی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استان چهارمحال و بختیاری

مسعود شهرانی: دانش آموخته دکترای دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، masood.shahr@yahoo.com
مهدی رئیسی *: دانشیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، mehdi.raissy@iaushk.ac.ir
الهه تاجبخش: استادیار میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در ماهی است که قابلیت انتقال به انسان در صورت تماس یا مصرف ماهی آلوده را دارد. این عامل در سال‌های اخیر شیوع زیادی در مزارع پرورش ماهی داشته است .

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، فراوانی و مقاومت دارویی *لاکتوکوکوس گارویه* در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری بررسی شد. در مجموع ۱۰۰ عدد ماهی از ۳۳ مزرعه پرورش ماهی در تابستان ۱۳۹۲ جمع‌آوری و در شرایط مناسب به آزمایشگاه ارسال شد. جدایه‌ها پس از کشت و جداسازی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و سپس، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شناسایی شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که ماهیان ۲۳ از ۳۳ مزرعه پرورش ماهی بررسی شده به *لاکتوکوکوس گارویه* آلوده بودند. در مجموع ۴۹ جدایه از ماهیان جداسازی و تشخیص داده شد. همچنین، نتایج نشان دهنده مقاومت چندگانه همه جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بود. حداقل و حداکثر مقاومت دارویی در مورد آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و انروفلوکساسین به ترتیب ۳۰/۷ و ۶۵/۴ درصد مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: آلودگی بیش از ۷۶ درصد مزارع پرورش ماهی بررسی شده در این مطالعه و همچنین، مقاومت دارویی عامل بیماری به آنتی‌بیوتیک‌ها خطر جدی برای صنعت پرورش ماهی و همچنین بهداشت عمومی به حساب می‌آید. علاوه بر آن، قابلیت ایجاد آلودگی در انسان و مشکلات بی‌شمار ناشی از انتقال مقاومت دارویی به سایر باکتری‌ها اهمیت کنترل این بیماری و نظارت بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در مزارع پرورش ماهی را دوچندان می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوکوکوس گارویه*، لاکتوکوکوزیس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، قزل آلای رنگین کمان

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

باکتری‌های جنس *لاکتوکوکوس*[1] را در ابتدا به‌عنوان گونه‌ای از *استرپتوکوکوس*[2] می‌دانستند ولی این باکتری در سال ۱۹۸۵ از جنس *استرپتوکوکوس* تفکیک شد و در سال ۱۹۹۱ پس از جدا شدن از ماهی گیش دم زرد[3] در ژاپن با نام *انتروکوکوس*[4] خوانده شد و در نهایت با نام *لاکتوکوکوس گارویه*[5] نام‌گذاری شد (۱).

لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس، کوکوباسیل گرم مثبت و فاقد تحرک با همولیز آلفا است که از بسیاری از گونه‌های ماهی و به‌ویژه قزل آلای رنگین کمان به‌عنوان عامل بیماری‌زا گزارش شده است (۲). دامنه میزبانی این باکتری محدود به ماهیان نیست و از گاو، سگ، گربه و بوفالو (۳ و ۴) و همچنین، فراورده‌های خام دامی شامل شیر گاو (۵) و گوشت ماکیان (۶) نیز جدا شده است. این باکتری از عوامل بیماری‌زای مشترک محسوب می‌شود و می‌تواند منجر به بروز اندوکاردیت در انسان شود (۱) که اهمیت بیماری را دو چندان می‌کند.

در ماهی، باکتری یاد شده با بروز سپتی سمی در ماهی مبتلا همراه است که معمولاً با علایمی چون شنای غیرعادی، تیرگی بدن، اگزوفتالمی، خونریزی در داخل و یا اطراف کره چشم یا خونریزی های سطحی بدن در نواحی سرپوش آبششی، قاعده باله ها و همچنین، خونریزی های وسیع داخلی ظهور پیدا می‌کند (۷ و ۸). بیش‌ترین تلفات در ماهی قزل آلای رنگین کمان رخ می‌دهد به طوری که خسارات سالانه ناشی از آن ها به ده‌ها میلیون دلار می‌رسد (۹).

نخستین همه‌گیری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی کشور اسپانیا و در سال ۱۹۸۸ گزارش شد (۱۰) و پس از آن همه گیری‌های متعددی از کشورهای مختلف گزارش شد (۱۱- ۱۴). بیماری ناشی از *لاکتوکوکوس گارویه* در ایران نیز نخستین بار در سال ۱۳۸۱ توسط اخلاقی و همکاران[6] (۱۵) از استان فارس گزارش شد. مشاهدات کارگاهی و گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که در حال حاضر بیماری در بیشتر نقاط کشور وجود دارد و عامل مهم مرگ و میر و بروز تلفات در ماهیان پرورشی قزل آلای رنگین کمان به‌ویژه در استان‌های پر تولید کشور است (۲۴). میزان شیوع لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلا در مطالعه سلطانی و همکاران[7] (۱۶) معادل ۶۵/۶ درصد و در مطالعه میرزاخانی[8] (۱۷) برابر با ۵۵ درصد گزارش شده است که همگی مقادیر زیادی را نشان می‌دهند.

استان چهارمحال و بختیاری با تولیدی بالغ بر ۱۵۰۰۰ تن ماهی قزل آلا در سال، رتبه اول کشور در تولید ماهی قزل آلای پرورشی را داراست. متاسفانه به نظر می‌رسد که با وجود توسعه کمی مزارع پرورش ماهی، کیفیت تولید از نظر دور بوده است. به‌طوری که برخی بیماری‌های با عامل باکتریایی و یا ویروسی در این مزارع به وفور مشاهده می‌شوند. از جمله این بیماری‌ها لاکتوکوکوزیس است که در این منطقه، به‌ویژه در فصل‌های گرم شیوع بالایی دارد و هر ساله منجر به خسارات اقتصادی فراوانی به پرورش دهندگان ماهی می‌شود. بروز بیماری در سال‌های اخیر همراه با مصرف زیاد و بی‌قاعده آنتی‌بیوتیک‌ها در مزارع پرورش ماهی با هدف پیشگیری و درمان بیماری بوده است که از دیدگاه بهداشت عمومی مشکلات زیادی را به‌همراه دارد (۱۸). از طرف دیگر، وجود گزارش‌های متعدد در خصوص بروز بیماری در انسان (۱۹و ۱۴)، اهمیت مطالعه بیماری را بیشتر می‌کند.

بررسی حاضر با هدف تعیین فراوانی بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری و همچنین، مطالعه مقاومت‌های دارویی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به‌منظور شناخت بیشتر پراکندگی بیماری و مبارزه موثر با آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی باکتری‌ها

به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌ها، نمونه‌گیری از ماهیان ۳۳ مزرعه پرورش ماهی در استان چهارمحال و بختیاری که در تابستان ۱۳۹۲ به‌عنوان موارد مشکوک به بیماری گزارش شده بودند، انجام شد. در مجموع، ۱۰۰ ماهی دارای علامت یا مشکوک به بیماری (۳ تکرار از هر مزرعه و از یک مزرعه ۴ نمونه اخذ شد) در مجاورت یخ و در حداقل زمان ممکن به مرکز تحقیقات شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد. پس از ضدعفونی ناحیه شکمی و باز کردن آن در کنار شعله، نمونه‌گیری از کلیه، طحال، کبد و قلب انجام شد. نمونه‌ها در محیط آگار قلب مغز[۹] و آگار خون دار[۱۰] (مرک[۱۱]، آلمان) کشت داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. تشخیص اولیه گونه‌های باکتری جدا شده، پس از رنگ‌آمیزی گرم، با آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل تحرک، کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، سیترات، سوربیتول، اندول، وگس-پرسکاور (VP[۱۲])، همولیز، سالیسین، آرژنین و آسکولین بر اساس دستورالعمل‌های موجود (۲۰) و تشخیص قطعی با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز انجام شد.

ب) استخراج ژنوم و انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز

به‌منظور استخراج ژنوم، باکتری‌های مشکوک در محیط TSB[۱۳] به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شده و بخش سلولی در ۵۶۷ میکرولیتر بافر با اسیدیته ۸، یک میلی‌مول EDTA و ۱۰ میلی‌مول تریس[۱۴] (مرک، آلمان) حل شد. سپس، ۳۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات[۱۵] ۱۰ درصد (مرک، آلمان) و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر (سیناژن، ایران) به آن اضافه و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر نمک (۵ میلی‌مول) و ۸۰ میکرولیتر هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید[۱۶]/نمک (سیگما، آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ژنوم به‌وسیله فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (v/v۲۵:۲۴:۱) استخراج، با ایزوپروپانول (سیگما، آلمان) رسوب داده و با الکل ۷۰ درصد شسته شد. پس از خشک شدن در دمای محیط به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول TE با اسیدیته ۷/۸ (۱۰۰ میلی‌مول EDTA، ۱۰ میلی‌مول تریس (مرک، آلمان)) قرار داده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت DNA در هر نمونه در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. تشخیص قطعی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی میسر شد. توالی پرایمرها F (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') و R (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') بر پایه ژن *16S rRNA* و اندازه محصول مورد انتظار ۱۱۰۰ جفت باز بود. برنامه دمایی نیز به شکل واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، واسرشته‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال ۵۷ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکرار مراحل ۲ تا ۴ به تعداد ۳۰ چرخه و در پایان مرحله طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد (۱۰ و ۲۱). جهت کنترل مثبت، از نمونه تعیین توالی شده با کد دستیابی KJ997915 استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از ژنوم باکتری (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X (Triton X-100) یک درصد، ژلاتین ۰/۱ درصد، ۶۰ میلی‌مول کلرید منیزیوم، ۵۰۰ میلی‌مول کلرید پتاسیم، پی اچ ۸/۳، ۱۰۰ میلی‌مول تریس)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مول) dNTP، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک پلی مراز [۶] (۵ واحد در میکرولیتر) و ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. به‌منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز از دستگاه ترموسایکلر PTC-100 (اپندورف، آلمان) استفاده شد. در نهایت، ژل آگاروز ۱/۵ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت ۵۰ دقیقه قرار گرفت و باند ظاهر شده در کنار مارکر ۱۰۰ جفت بازی (ویوانتیس[۱۷]، مالزی) اندازه‌گیری شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، باند به دست آمده تعیین توالی شد و در بانک جهانی ژن بلاست شد تا صحت نتایج تایید شود.

مطالعه مقاومت دارویی

مقاومت دارویی جدایه‌های حاصل به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به روش دیسک‌گذاری در محیط مولر هینتون آگار (هایمدیا[۱۸]، هند) با استفاده از دستورالعمل CLSI سنجیده شد (۲۲). دیسک‌های مورد استفاده (شرکت پادتن طب ایران) شامل: پنی‌سیلین (۱۰ واحد بین المللی)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول (۲۳/۷ میکروگرم) و انروفلوکساسین (۵ میکروگرم) بودند.

نتایج

نتایج تعیین توالی

باند به دست آمده بر روی ژل آگاروز تعیین توالی شد و سپس، در بانک جهانی ژن بلاست شد که صحت آزمون را نشان داد. توالی در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی KJ997915 ثبت شد.

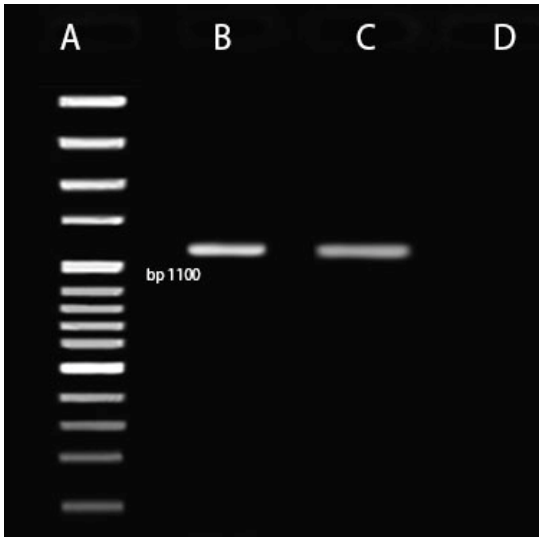
نتایج بررسی ماهیان

در این بررسی، ماهیان دارای علامت (۱۰۰ قطعه) جمع آوری شده از ۳۳ مزرعه پرورش قزل آلای رنگین کمان به‌روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بررسی شدند. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و مشاهده باند ۱۱۰۰ جفت بازی نشان داد که ماهیان ۲۳ از ۳۳ مزرعه بررسی شده به بیماری *لاکتوکوکوزیس* آلوده بودند. همچنین، ۴۹ جدایه *لاکتوکوکوس* از مجموع ۱۰۰ نمونه ماهی بررسی شده جداسازی و شناسایی شد. شکل ۱ نتیجه الکتروفورز جدایه‌ها را نشان می‌دهد.

مقاومت دارویی ۴۹ جدایه *لاکتوکوکوس گارویه* به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بررسی شد. نتایج این بررسی نشان دهنده مقادیر بالای مقاومت دارویی در جدایه‌های *لاکتوکوکوس* است. بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مورد انروفلوکسازین و

فلورفنیکل به ترتیب معادل ۶۵/۴ و ۵۵/۲ درصد و کم‌ترین میزان در مورد جنتامایسین و سولفامتوکسازول معادل ۳۰/۷ و ۴۰/۹ درصد مشاهده شد. میزان مقاومت دارویی در مورد سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به شرح زیر بود: استرپتومایسین (۴۲/۹ درصد)، کلرامفنیکل (۴۰/۹ درصد)، تتراسیکلین (۳۸/۸ درصد)، آمپی‌سیلین (۴۴/۹ درصد)، آموکسی‌سیلین (۴۴/۹ درصد)، پنی‌سیلین (۴۶/۹ درصد)، کانامایسین (۴۹/۱ درصد) و اریترومایسین (۴۸/۹ درصد).

نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که تمامی ۴۹ جدایه به دست آمده در این بررسی دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند به‌طوری‌که ۲۱ جدایه به بیش از نیمی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ۵ جدایه نیز به ۱۰ آنتی‌بیوتیک از ۱۲ آنتی‌بیوتیک مطالعه شده مقاوم بودند.



شکل ۱- نتیجه الکتروفورز ژن *16S rRNA* باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بر روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز. **A:** نشانگر bp۱۰۰. **B, C:** نمونه‌های مورد مطالعه. **D:** کنترل منفی بدون DNA.

بحث و نتیجه‌گیری

لاکتوکوکوزیس و استرپتوکوکوزیس از جمله بیماری‌های باکتریایی هستند که با تلفات و خسارات فراوانی در ماهیان آب شیرین و شور همراه هستند. باکتری *لاکتوکوکوزیس گارویه* به همراه برخی باکتری‌های جنس *استرپتوکوکوس* که از آن جمله می‌توان به *استرپتوکوکوس اینیائی* اشاره کرد متعلق به خانواده استرپتوکوکاسه می‌باشند و عامل مهم بروز سپتی سمی و تلفات بالا در مزارع پرورش ماهی به‌ویژه در قزل‌آلای رنگین کمان محسوب می‌شوند (۲۰). به دلیل شباهت زیاد علایم ظاهری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس تشخیص تفریقی تنها با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و به‌ویژه مولکولی امکان‌پذیر است؛ ولی در هر صورت به دلیل شباهت زیاد در منظره بالینی، معمولا هر دو بیماری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس با هم اشاره می‌شوند.

این دو بیماری در کشورهای مختلف گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به گزارش بیماری در اسپانیا (۱۰)، ایتالیا (۲۳)، استرالیا و افریقای جنوبی(۲۴)، تایوان و انگلستان (۱۲)، پرتغال (۱۴)، فرانسه و کشورهای منطقه بالکان (۱۳)، ترکیه و کره (۱۱) اشاره کرد. در ایران نیز در سال‌های اخیر هم‌زمان با توسعه مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان شاهد بروز همه‌گیری با عوامل فوق در مراکز پرورش ماهی هستیم (۸). نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که از ۳۳ مزرعه مورد بررسی، ماهیان ۲۳ مزرعه به لاکتوکوکوزیس آلوده بودند (۷۶/۶ درصد) که رقم قابل توجهی است. مطالعه سلطانی نشان داد که ۲۰ درصد از مجموع ۶۰۰ کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل‌آلای‌پرورشی را گونه *لاکتوکوکوس گارویه* تشکیل

می‌دهد و مابقی مربوط به جنس *استرپتوکوکوس* بوده است (۲۵). مطالعه میرزاخانی[۸] نشان داد که از مجموع ۲۰ جدایه کوکسی گرم مثبت جدا شده از ماهیان مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری، ۱۱ مورد *لاکتوکوکوس گاروِیه* بوده است (۱۷). همه مطالعات بالا نشان دهنده گسترش بیماری یاد شده در مزارع پرورش قزل آلاست.

عوامل مختلفی را در گسترش و انتقال بیماری دخیل می‌دانند که از آن جمله می‌توان به انتقال مستقیم از طریق آب، جابجایی و ورود ماهیان آلوده به کارگاه و یا تغذیه اشاره کرد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ماهیان تمامی کارگاه‌های پرورش ماهی واقع در بخش‌های پایین دست رودخانه که از پساب سایر مزارع پرورش ماهی استفاده می‌کردند به باکتری آلوده بودند و بر عکس کارگاه‌هایی که به شکل مستقیم از آب سرچشمه استفاده می‌کردند آلودگی بسیار کمتری داشتند که نقش شاخص‌های کیفی آب و همچنین، احتمال انتقال باکتری از مزارع بالادست به کارگاه‌های نواحی پایین تر رودخانه را نشان می‌دهد. تاثیر دما و وضعیت کیفی آب به‌عنوان عوامل مستعد کننده بروز بیماری قبلا توسط اوستین و همکاران[۱۹] نیز تاکید شده است (۲۰). باکتری هم‌زمان با افزایش دمای آب فعالیت بیشتری می‌کند و بیماری‌زایی خود را به‌ویژه در شرایط بد بهداشتی و مدیریتی نشان می‌دهد. بنظر می‌رسد در حال حاضر انتقال آلودگی در مسیر رودخانه 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، تغییراتی که در شاخص‌های کیفی آب اعمال می‌شود نمود پیدا می‌کند. به‌ویژه اینکه در برخی مناطق حداقل فاصله مجاز بین مزارع پرورش ماهی رعایت نشده است که خود باعث مضاعف شدن مشکل می‌شود. در کل بروز همه‌گیری به ویژه در مناطق پر تولید کشور با ضرر و زیان‌های زیادی برای صنعت پرورش ماهیان سردآبی کشور همراه است. همچنین، باید در نظر داشت که بیماری ناشی از *لاکتوکوکوس گاروِیه* در گروه بیماری‌های قابل انتقال به انسان قرار دارد (۱۴) که این مسئله خود اهمیت بیماری را دو چندان می‌کند. در چنین شرایطی نیاز به اتخاذ سیاست‌های موثر و عملی در جهت مقابله با بیماری از قبیل واکسیناسیون و برنامه‌ریزی در راستای ریشه کنی بیماری ضروری است.

از طرف دیگر شیوع بیماری در سال‌های اخیر همراه با مصرف زیاد و بی قاعده آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در مزارع پرورش ماهی قزل آلا با هدف پیشگیری و یا درمان بیماری بوده است که مشکلات زیادی را به دنبال دارد. نتایج این بررسی نشان دهنده مقاومت بالای دارویی جدایه‌های *لاکتوکوکوس* است، به‌طوری‌که میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از ۳۳/۸ تا ۶۲/۷ تغییر می‌کند، ضمن اینکه تمامی جدایه‌ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند. میزان مقاومت جدایه‌های *لاکتوکوکوس گاروِیه* جدا شده از ماهیان بیمار در استان چهارمحال و بختیاری قبلا در محدوده ۲۵ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۸). اگرچه اریترومایسین به‌عنوان داروی انتخابی بیماری و با پاسخ مناسب گزارش شده است (۲۶ و ۱۹) ولی مقاومت نسبی به آن نیز قبلاً گزارش شده است (۲۷). میزان مقاومت نسبت به اریترومایسین در برخی مطالعات قبلی ۴۶/۱ درصد بوده است و در این مطالعه ۴۷/۴ درصد گزارش می‌شود که تشابه زیادی با نتایج مطالعات قبلی دارد (۸). بدیهی است که مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها

در سال‌های اخیر منجر به پدید آمدن مقاومت‌های دارویی و انتقال آن به سایر باکتری‌ها می‌شود که خطرات ناشی از آن نیازی به تاکید مجدد ندارد. نتایج این مطالعه نشان دهنده آلودگی زیاد مزارع پرورش ماهی قزل آلا در استان چهارمحال و بختیاری با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بود که با توجه به شرایط نامناسب مدیریتی و فاصله کم مزارع پرورش ماهی از یکدیگر، بیماری به آسانی به مزارع هم‌جوار در طول رودخانه منتقل می‌شود. در این میان واکسیناسیون ماهیان علیه لاکتوکوکوس به‌عنوان یکی از راهکارهای موثر پیشگیری از بیماری پیشنهاد می‌شود. علاوه بر آن باید توجه داشت چنانچه استفاده بی‌قاعده از آنتی‌بیوتیک‌ها ادامه یابد شاهد بروز مقاومت‌های بیشتر آنتی‌بیوتیکی در گروه‌های مختلف باکتری‌ها خواهیم بود که برای صنعت پرورش ماهی و همچنین سلامت مصرف کنندگان خطر بزرگی محسوب می‌شود.

References

(1) Wang CY, Shie HS, Chen SC, Huang JP, Hsieh IC, Wen MS, et al. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice*. 2007; 61 (1): 68-73.

(2) Ravelo C, Magarin˜os B, Lo´pez-Romalde S, Toranzo AE, Romalde JL. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic Lactococcus garvieae strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41 (2): 751-6.

(3) Carvalho MG, Vianni MC, Elliot JA, Reeves M, Facklam RR. Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1997; 418: 401-4.

(4) Deveriese LA, Hommez J, Laevens H, Ban adme P, Haesebrouck F. Identification of aesculinhydrolyzing *streptococci* and *enterococci* from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 1999; 70 (1-2): 87-94.

(5) Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni C, Cattaneo P. Culture-dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied Environmental Microbiology*. 2005; 71 (4): 1977-86.

(6) Barakat RK, Griffiths MW, Harris L J. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* sp. from cooked, modified atmosphere, packaged, refrigerated poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 62 (1-2): 83–94.

(7) Chen SC, Liaw LL, Su HY, Ko SC**,** Wu CY. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, Mugil cephalus L, in Taiwan. *Journal of Fish Disease*. 2002; 25 (12): 727–32.

(8) Raissy M, Ansari M. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *African Journal of Biotechnology*. 2011; 8(10): 1473-76.

(9) Soltani M, Nikbatht GH, Mousavi H, Ahmadzadeh N. Epizootic outbreak of *lactococcosis* caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 2008; 28 (5): 209-14.

(10) Palacios MA, Zamora MJ, Vasquez J, Zamora E, Duran A. *Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Bollettino societa' italiana patologia ittica*. 1993; 13:11-6.

(11) Baeck GW, Kim JH, Gomez DK, Park SC. Isolation and characterization of *Streptococcus sp*. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. *Journal of Veterinary Science*. 2006; 7(1): 53–8.

(12) Bark S, McGregor D. The first occurrence of *lactococcosis* in farmed trout in England. *Trout News*. 2001; 31: 9-11.

(13) Eyngor M, Zlotkin A, Ghittino C, Prearo M, Douet DG, Chilmonczyk, S, et al. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Applied Environmental Microbiology*. 2004; 70(9): 5132-7.

(14) Pereira F, Ravelo C, Toranzo AE, Romalde JL. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 2004; 24(6):274-9

(15) Akhlaghi M, Keshavarzi M. Occurrence of streptococcosis in rainbow trout fish farms in Fars Province. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2003; 3: 183-9.

(16) Soltani M, Raissy M, Goodarzi MA, Momtaz H. Isolation of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout farms and *16S rRNA* gene sequencing in Chahramahal VA Bakhtiari Province. *Journal of Veterinary Medicine*. 2011; 8(1): 61-67.

(17) Mirzakhani A. Isolation of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae in* rainbow trout farms in Chahramahal va Bakhtiari Province by Multiplex PCR [Dissertation]. Shahrekord: Islamic Azad Univ.; 2009.

(18) Ansari M, Raissy M, Rahimi M. Determination of florfenicol residue in rainbow trout muscles by HPLC in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran. *Comparative Clinical Pathology*. 2012; 23(1): 61-2.

(19) Fefer JJ, Ratzan KR, Sharp SE, Saiz E. *Lactococcus garvieae* endocarditic: report of a case and review of the literature. *Diagn Microbial Infectious Disease*. 1998; 32(2): 127–30.

(20) Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish. 4rd ed. Bristol: springer; 1999.

(21) Zlotkin A, Eldar C, Ghittino H, Bercovier H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of clinical Microbiology*. 1998; 36(4): 983-5.

(22) CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania; 2007.

(23) Ghittino C, Prearo M. Report of *Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: preliminary note. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 1992; 8: 4-11.

(24) Carson J, Gudkovs N, Austin B. Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). *Journal of Fish Disease*. 1993; 6(4): 381-8.

(25) Soltani M, Tarahomi M. Study of *streptococcosis/lactococcosis* in some farmed rainbow trout in Fars Province, Iran. The first International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran. 2008.

(26) Diler O, Altun S, Adiloglu AK, Kubilay A, Isıklı B. First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout in Turkey. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 2002; 22: 21-6.

(27) Alves d'Azevedo P, Perin C, Becker FL, Ramos GZ. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae*. *Revista amrigs*. 2000; 44: 81- 4.

---

[1]- *Lactococcus*
[2]- *Streptococcus*
[3]- *Seriola quinqueradiata*
[4]- *Enterococcus*
[5]- *Lactococcus garvieae*
[6]- Akhlaghi M et al
[7]- Soltani M et al
[8]- Mirzakhani A et al
[9]- Brain Heart Infusion Agar (BHIA)
[10]- Blood Agar
[11]- Merck
[12]- Voges Proskauer
[13]- Tryptic Soy Broth
[14]- Tris-HCl
[15]- Sodium dodecyl Sulphate
[16]- Hexadecyl trimethyl Ammonium Bromide
[17]- Vivantis
[18]- Himedia
[19]- Austin et al

Study of frequency and antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout fish in Chaharmahal va Bakhtiari Province

Masoud Shahrani
Graduated from Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, masood.shahr@yahoo.com
Mehdi Raissy *
Associate Professor of Aquatic Animal Health, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, mehdi.raissy@iaushk.ac.ir
Elahe Tajbakhsh
Assistant Professor of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Lactococcus garvieae* is the causative agent of lactococosis in fish which is transmittable to human in the case of contact or consumption of infected fish. The bacteria has been highly prevalent in fish farms.

Materials and methods: In this study, frequency and antimicrobial resistance of *L. garvieae* was studied in rainbow trout fish farms in Chaharmahal va Bakhtiari Province. A total of 100 fish from 33 fish farms were collected in summer 2013 and were transmitted to the laboratory in appropriate conditions. The isolates were identified using biochemical tests and PCR.

Results: The results indicated that fish from 23 out of 33 studied farms were infected with *L. garvieae* and 49 isolates were collected from the fish. The results also represented multi drug resistance of all isolates to common antibiotics. Minimum and maximum resistance was 30.7 and 65.4% for gentamicin and enrofloxacin, respectively.

Discussion and conclusion: Infection of fish in more than 76 percent of the studied fish farms and high drug resistance of Lactococcus is a serious danger for aquaculture and for public health. Moreover, ability to infect humans and countless problems due to transmission of antimicrobial resistance to other bacteria reduplicates the importance of controlling the disease and surveillance on using antimicrobials in fish farms.

Key words: *Lactococcus garvieae,* lactococosis, Antimicrobial resistance, Rainbow trout

* Corresponding author
Received: March 10, 2014 / **Accepted:** June 21, 2014