



## بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* جدا شده از ماهیان بیمار قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرورشی در استان چهارمحال و بختیاری

رضا افراشته<sup>۱</sup>، رضا سلیقه‌زاده<sup>۱\*</sup>، محسن پورنیا<sup>۲</sup>، مرجان مسافر<sup>۳</sup>

۱. گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد مسجدسلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجدسلیمان، ایران

۳. گروه بیولوژی دریا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

باکتری‌های *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* از مهمترین پاتوژن‌های ماهیان هستند. این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* جدا شده از ماهیان بیمار قزل آلی رنگین کمان پرورشی انجام گردید. با توجه به شیوع بیماری، نمونه برداری در فصول گرم سال از ۱۰۰ قطعه ماهی قزل آلی رنگین کمان که دارای علائم بالینی بیماری بودند انجام شد. کشت باکتریایی به روش استاندارد از بافت کلیه ماهیان انجام گردید. بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدا شده‌ها بر اساس پروتکل CLSI انجام گردید. نتایج مطالعات نشان داد که جدایه‌های *S. iniae* به ترتیب بیشترین حساسیت را نسبت به انروفلوکساسین، فلورفنیکل، اریترومایسین و لینکوسپکین، و بیشترین مقاومت را نسبت به سولفامتوکسازول-تری متوپریم، تتراسایکلین، فسفومایسین، آمپی سیلین، لینکومایسین و فلومکونین، و جدایه‌های *L. garvieae* به ترتیب بیشترین حساسیت را نسبت به اریترومایسین، انروفلوکساسین، فلورفنیکل، فلومکونین و لینکوسپکین، و بیشترین مقاومت را نسبت به سولفامتوکسازول-تری متوپریم، فسفومایسین، تتراسایکلین و آمپی سیلین داشتند.

### نوع مقاله

### پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۶

تاریخ چاپ الکترونیک:

\*نویسنده مسئول:

rezasalighehzadeh@yahoo.com

کلید واژه‌ها: آنتی بیوتیک، استرپتوکوکوزیس، باکتری، چهارمحال و بختیاری، قزل آلی رنگین کمان، لاکتوکوکوزیس

### مقدمه

در طی دهه‌های اخیر با گسترش تولید آبزیان و به خصوص تکثیر و پرورش ماهی قزل آلی رنگین کمان در سطح کشور مسائل و مشکلات مربوط به بیماری‌ها نیز افزایش پیدا کرده است. یکی از راه‌های مقابله با بیماری‌ها استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. اما مصرف بی رویه و بدون برنامه آنتی بیوتیک‌ها در مزارع تکثیر و پرورش آبزیان منجر به ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط آبی و امکان انتقال باکتری‌های مقاوم به انسان و به خطر افتادن سلامت عمومی جامعه می‌شود که یکی از مسائل عمده نگران کننده بین‌المللی در این رابطه خواهد بود (Alvesd'Azevedo et al., 2000; Akhlaghi and Keshavarzi, 2002). مشاهدات کارگاهی و گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که در حال حاضر بیماری‌های باکتریایی در

بیشتر نقاط کشور وجود دارند و یکی از علل مهم مرگ و میر و بروز تلفات در ماهیان پرورشی قزل آلاهی رنگین کمان به ویژه در استان‌های پرتولید کشور می‌باشند (Raissy and Ansari, 2011). استان چهارمحال و بختیاری با تولیدی بالغ بر ۱۵۰۰۰ تن ماهی قزل آلا در سال، رتبه اول در تولید این ماهی را در کشور دارد. اما برخی از آمارها نشان می‌دهد که با وجود توسعه کمی مزارع پرورش ماهی، کیفیت تولید از نظر دور بوده است به طوری که برخی از بیماری‌ها با عامل باکتریایی و یا ویروسی در مزارع این استان به وفور مشاهده می‌شوند. از جمله این بیماری‌ها استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس می‌باشند که در این منطقه، در فصل‌های گرم شیوع بالایی دارند و هر ساله منجر به خسارات اقتصادی فراوانی به پرورش‌دهندگان ماهی می‌شوند (Soltani et al., 2013). این بیماری‌ها، به عنوان سپتی‌سمی خون-ریزی‌دهنده و فوق حاد تعریف شده‌اند (Bercovier et al., 1997)، تکامل بیماری به شرایط محیطی که ماهی در آن نگهداری می‌شود بستگی دارد، که اساساً درجه حرارت آب و کیفیت میکروبیولوژیکی آب هستند (Chen et al., 2002). هنگامی که درجه حرارت آب از ۱۵ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد شیوع این عامل بیماری‌زا شروع می‌شود (Hurvitz et al., 1997). پاتولوژی ظاهری با ظهور بی‌اشتهایی سریع و عمومی، سیاه شدن، بی‌حالی، از دست دادن تعادل و شنای غیرطبیعی شروع می‌شود. نشانه‌های بیرونی معمول ماهی‌های آسیب دیده شامل: بیرون‌زدگی چشم (یک یا دو طرفه)، وجود خونریزی در اطراف و داخل چشم، پایه باله‌ها، اطراف مخرج، سرپوش آبششی و ناحیه دهانی هستند. همچنین ماهیان با شکم‌های متورم و بیرون‌زدگی مخرج نیز مکرراً دیده می‌شوند (Vendrell et al., 2006). در کالبد گشایی، تجمع مایع آسیت در حفره صفاقی معمولاً وجود دارد، که ممکن است چرکی یا خونابه‌ای باشد. مهمترین اندام‌های که تحت تاثیر قرار می‌گیرند شامل: طحال، کبد، مغز، روده، کلیه و قلب هستند (Afonso et al., 2003). انتقال بیماری عمدتاً به وسیله مکانیسم‌های افقی می‌باشد. انتقال مستقیم بین ماهیانی است که در حوضچه‌های یکسان زندگی می‌کنند، انتقال از طریق آب، به ویژه اگر ماهیان آسیب دیده وجود داشته باشد، یا از مسیر مقعدی-دهانی صورت می‌گیرد (Afonso et al., 2003). در گذشته، آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک روش موثر برای کنترل عفونت‌های ایجاد شده توسط این میکروارگانیسم‌ها در ماهی استفاده می‌شدند. با این حال، استفاده بی‌رویه از این مواد منجر به افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (Katae, 1982). اقدامات بهداشتی اولین مانع برای جلوگیری از معرفی عوامل بیماری‌زا در مزرعه ماهی هستند. کم کردن دستکاری ماهیان تا حد امکان، حذف ماهیان مرده یا بیمار و حفظ تراکم کم پرورش، مهمترین اقدامات هستند. علاوه بر این، تمیز کردن دوره‌ای مخازن و ضد عفونی مناسب تمام ظروف در مزرعه ماهی با ترکیباتی نظیر فرمالین، آمونیوم چهارتایی، کلرامین T، سولفات مس، پراکسید هیدروژن یا پرمنگنات پتاسیم، باعث کاهش توزیع عامل و تاثیر آن بر ماهی می‌شوند (Romalde et al., 2004). اگرچه بعضی از داروهای شیمیایی علیه *S. iniae* و *L. garvieae* موثر هستند، اما اقدامات درمانی معمولاً در شرایط مزرعه بی اثر هستند. بنابراین، واکسیناسیون جمعیت‌های حساس بهترین گزینه برای کنترل استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس می‌باشد (Vendrell et al., 2006). با توجه به گزارش موارد بیماری از استان چهارمحال بختیاری هدف از مطالعه حاضر جداسازی، شناسایی مولکولی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارائه مناسب‌ترین دارو جهت درمان بیماری‌های باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* جدا شده از ماهی قزل آلاهی رنگین کمان بود.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری

در این پژوهش با توجه به فصل شیوع بیماری، نمونه‌برداری در فاصله زمانی فروردین ماه ۱۴۰۰ تا شهریور ماه ۱۴۰۰ از ۱۶ مزرعه پرورش ماهی قزل آلاهی رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری صورت پذیرفت. نمونه‌گیری از ماهیان بیمار دارای محدوده وزنی ۵۰ تا ۲۵۰ گرم که دارای علائم خون‌ریزی، بیرون‌زدگی چشم، تیرگی رنگ، بی‌حالی و بی‌اشتهایی بودند و مورد درمان آنتی‌بیوتیکی قرار نگرفته بودند بعمل آمد. نمونه در کنار یخ سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور نمونه-

برداری بافتی، شکم ماهی پس از ضدعفونی در کنار شعله باز شده و با استفاده از فیلدوپلاتین استریل بافت کلیه قدیمی استحصال گردید. نمونه‌ها به روش استریل بر روی محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار به صورت خطی کشت داده شدند. محیط‌های کشت به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از بررسی کشت‌های میکروبی، تشخیص اولیه بر اساس مورفولوژی سلول باکتری، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز و کاتالاز صورت گرفت، جدایه‌هایی که کروی و گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز منفی بودند، به صورت احتمالی جنس *Lactococcus* و *Streptococcus* در نظر گرفته شدند. تشخیص نهایی از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد (Haghighi Karsidani *et al.*, 2010).

## استخراج DNA

به منظور استخراج DNA باکتری‌ها از روش جوشاندن استفاده گردید (Holmes and Quigley, 1981)، بدین منظور از کلونی تک باکتری‌های مشکوک به جنس *Streptococcus* و *Lactococcus*، به طور جداگانه به میکروتیوپ حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر 1X تریس استیک اسید (TAE)-EDTA افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. سپس تمامی میکروتیوپ‌ها با دور ۶۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اجزا سلولی رسوب داده شوند. سپس مایع رویی که حاوی DNA ژنومی بودند به میکروتیوپ تازه منتقل گردیدند و تا زمان اجرای آزمایش در فریزر ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

## انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و الکتروفورز روی ژل آگارز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تایید و شناسایی باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* انجام شد. برنامه حرارتی مربوط به آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است (Mata *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2016). پرایمرهای اختصاصی مربوط به ناحیه *lctO* و *rDNA* با توالی‌های ذکر شده در جدول ۲ طی سفارشی از طریق شرکت ژن فن آوران سنتز شدند. محصولات PCR در ژل ۱/۵ درصد و ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند (شکل‌های ۱ و ۲). و توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور روئیت شدند (Mata *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2016). در هر سری واکنش کنترل مثبت (سویه‌های *S. iniae* با شماره دسترسی GQ850377 و *L. garvieae* با شماره دسترسی EU727199) و منفی (آب مقطر) در کنار دیگر نمونه‌ها قرار می‌گرفتند تا ارزش نتایج حاصل از PCR قابل اعتماد باشد.

## آزمایش آنتی‌بیوگرام

مقاومت دارویی جدایه‌های حاصل به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به روش دیسک‌گذاری در محیط مولر هینتون آگار با استفاده از دستورالعمل CLSI و دیسک‌های سفارشی شرکت پادتن طب، ایران سنجیده شد (CLSI, 2018). برای باکتری‌های گرم مثبت آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلستین (۱۰ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، فلومکین (۳۰ میکروگرم)، فسفومایسین (۲۰۰ میکروگرم)، لینکومایسین+اسپکتینومایسین (لینکواسپکتین) (۱۵،۱۰۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم) و سولفومتوکسازول-تری متوپریم (۱،۲۵-۷۵،۲۳ میکروگرم) در نظر گرفته شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده با استفاده از آزمون انتشار از دیسک به روش کربی-بوئر بر اساس استانداردهای CLSI تعیین شد. در ابتدا سوسپانسیون باکتری کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند آماده و توسط سوآب استریل به صورت چمنی روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد، سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فواصل ۲ سانتیمتر روی محیط قرار داده و پلیت‌ها در ۲۵ درجه سانتی‌گراد

به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک آنتی‌بیوتیک به وسیله خط کش اندازه‌گیری شد و با استاندارد CLSI مقایسه و خوانده شد (CLSI, 2018).

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها پس از جمع‌آوری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ پردازش شده و از طریق آمارهای توصیفی و آزمون‌های استنباطی با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Nemati et al., 2020).

جدول ۱. برنامه حرارتی PCR جهت تشخیص باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* (Mata et al., 2004; Nguyen et al., 2016).

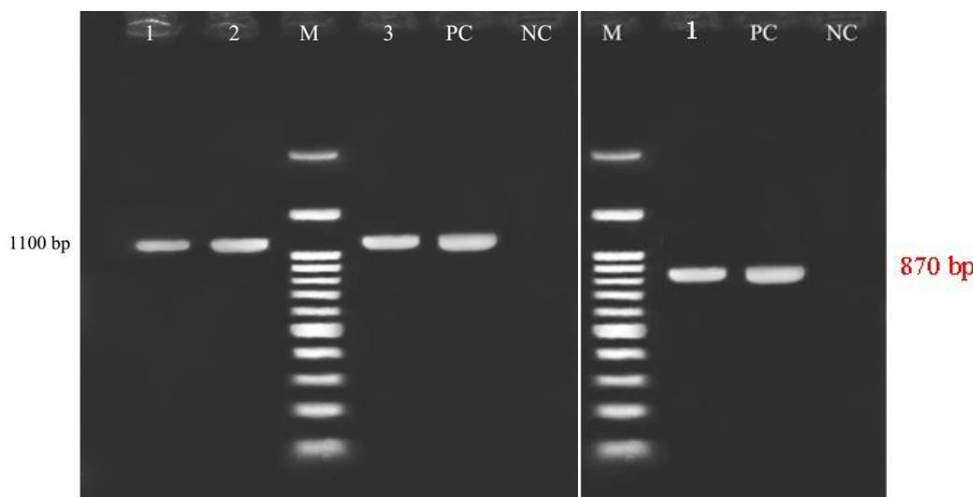
ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
۱	واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت‌سازی	۹۴	۴۵ ثانیه	۳۰
۳	الحاق	۵۵	۱ دقیقه	۳۰
۴	گسترش	۷۲	۱ دقیقه	۳۰
۵	گسترش نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae*.

ژن هدف	توالی پرایمر (۵' - ۳')	وزن محصول (bp)	منبع
<i>lctO</i>	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	۸۷۰	Nguyen et al., 2016
<i>16s rDNA</i>	CATAACAATGAGAATCGC GCACCCTCGCGGGTTG	۱۱۰۰	Mata et al., 2004

### نتایج

از بین ۱۰۰ قطعه ماهی مورد بررسی، ابتدا کشت مستقیم سواب بافت کلیه قدامی روی محیط برین هارت اینفیوژن آگار ۷۵ نمونه رشد کرد و سپس از کشت غیر مستقیم بافت کلیه قدامی روی محیط برین هارت اینفیوژن آگار رشد ۷۹ نمونه از کلونی‌های باکتری مشاهده گردید. کلونی‌ها با خصوصیتی مشابه کلونی باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* انتخاب و خالص‌سازی شده و مورد رنگ‌آمیزی گرم قرار گرفتند. از این تعداد ۵۸ نمونه از پلیت‌ها کروی گرم مثبت تشخیص داده شدند، و بر اساس تست‌های تفریقی ۲۵ نمونه باکتری گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز منفی مشاهده گردید که مطابق با خصوصیات باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* بودند. نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز نشان داد (شکل ۱) که از مجموع ۵۸ جدایه بررسی شده ۹ جدایه *S. iniae* و ۸ جدایه *L. garvieae* شناسایی شدند. فراوانی و درصد در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است.



شکل ۱. سمت راست الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی گونه‌ی *L. garvieae* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (M) نردبان ژنی ۱۰۰ جفت باز، ستون ۱، ۲ و ۳: جدایه‌های *L. garvieae* (۱۱۰۰ جفت باز)، (PC) کنترل مثبت، (NC) کنترل منفی. سمت چپ الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی گونه‌ی *S. iniae* (۸۷۰ جفت باز) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (M) نردبان ژنی ۱۰۰ جفت باز، ستون ۱ جدایه *S. iniae*، (PC) کنترل مثبت، (NC) کنترل منفی.

جدول ۳. فراوانی و درصد باکتری *S. iniae* جدا شده از ماهیان بیمار قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی در استان چهارمحال و بختیاری.

درصد	فراوانی نسبی	فراوانی	<i>S. iniae</i>
۵۲/۹	۱۵/۵۱	۹	مثبت
۴۷/۱	۱۳/۷۹	۸	منفی
۱۰۰	۲۹/۳۰	۱۷	کل

جدول ۴. فراوانی و درصد باکتری *L. garvieae* جدا شده از ماهیان بیمار قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی در استان چهارمحال و بختیاری.

درصد	فراوانی نسبی	فراوانی	<i>L. garvieae</i>
۴۷/۱	۱۳/۷۹	۸	مثبت
۵۲/۹	۱۵/۵۱	۹	منفی
۱۰۰	۲۹/۳۰	۱۷	کل

تحلیل نمودارهای حاصل از مطالعه حاضر به شرح ذیل بیان می‌شود، ۴ باکتری (۲۳/۵٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۵ باکتری (۲۹/۴٪) از جدایه‌های *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۹ باکتری (۵۲/۹٪) نسبت به فلورفنیکل مقاوم بودند. ۶ باکتری (۳۵/۳٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۸ باکتری (۴۷/۱٪) از جدایه‌های *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک فلومکین مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۱۴ باکتری (۸۲/۴٪) نسبت به فلومکین مقاوم بودند. ۶ باکتری (۳۵/۳٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۸ باکتری (۴۷/۱٪) از جدایه‌های *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک فسفومایسین مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۱۴ باکتری (۸۲/۴٪) نسبت به فسفومایسین مقاوم بودند. ۳ باکتری (۱۷/۶٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۵ باکتری (۲۹/۴٪) از جدایه‌های *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک لینکواسپکتین مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۸ باکتری (۵۲/۹٪) نسبت به لینکواسپکتین مقاوم بودند. ۳ باکتری (۱۷/۶٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۸ باکتری (۴۷/۱٪) از جدایه‌های *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۶ باکتری (۶۴/۷٪) نسبت به تتراسیکلین مقاوم بودند. ۴ باکتری (۲۳/۵٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۸ باکتری (۴۷/۱٪) از جدایه‌های *L.*

*garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک سولفومتوکسازول مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۱۲ باکتری (۷۰/۶٪) نسبت به سولفامتوکسازول-تری متوپریم مقاوم بودند. نتایج بررسی مقاومت گونه‌های باکتری جدا شده نسبت به آنتی-بیوتیک‌های مورد استفاده در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است.

جدول ۵. فراوانی و درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کلستین، انروفلوکساسین، اریترومایسین و فلورفنیکل.

درصد	فراوانی	<i>L. garvieae</i>		<i>S. iniae</i>		میزان حساسیت	آنتی‌بیوتیک
		درصد	فراوانی	درصد	فراوانی		
۲۹/۵	۵	۱۷/۷	۳	۱۱/۸	۲	حساس	آمپی‌سیلین
۵/۸	۱	۰	۰	۵/۸	۱	نیمه حساس	
۶۴/۷	۱۱	۲۹/۴	۵	۳۵/۳	۶	مقاوم	
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	کلستین
۰	۰	۰	۰	۰	۰	حساس	
۰	۰	۰	۰	۰	۰	نیمه حساس	
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	مقاوم	انروفلوکساسین
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	
۱۱/۸	۲	۰	۰	۱۱/۸	۲	حساس	
۲۳/۵	۴	۰	۰	۲۳/۵	۴	نیمه حساس	اریترومایسین
۶۴/۷	۱۱	۴۷/۱	۸	۱۷/۶	۳	مقاوم	
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	
۲۹/۵	۵	۱۷/۷	۳	۱۱/۸	۲	حساس	فلورفنیکل
۵/۸	۱	۰	۰	۵/۸	۱	نیمه حساس	
۶۴/۷	۱۱	۲۹/۴	۵	۳۵/۳	۶	مقاوم	
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	فلورفنیکل
۴۷/۱	۸	۱۷/۷	۳	۲۹/۴	۵	حساس	
۰	۰	۰	۰	۰	۰	نیمه حساس	
۵۲/۹	۹	۲۹/۴	۵	۲۳/۵	۴	مقاوم	فلورفنیکل
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	

**جدول ۶.** فراوانی و درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلومکین، فسفومایسین، لینکواسپکتین، تتراسیکلین و سولفامتوکسازول-تری متوپریم.

درصد	فراوانی	<i>L. garvieae</i>		<i>S. iniae</i>		میزان حساسیت	آنتی‌بیوتیک
		درصد	فراوانی	درصد	فراوانی		
۱۷/۶	۳	۰	۰	۱۷/۶	۳	حساس	فلومکین
۰	۰	۰	۰	۰	۰	نیمه حساس	
۸۲/۴	۱۴	۴۷/۱	۸	۳۵/۳	۶	مقاوم	
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	فسفومایسین
۳	۳	۰	۰	۱۷/۶	۳	حساس	
۰	۰	۰	۰	۰	۰	نیمه حساس	
۱۴	۱۴	۴۷/۱	۸	۳۵/۳	۶	مقاوم	
۱۷	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	
۲۳/۵	۴	۰	۰	۲۳/۵	۴	حساس	
۲۹/۴	۵	۱۷/۷	۳	۱۱/۸	۲	نیمه حساس	
۵۲/۹	۸	۲۹/۴	۵	۱۷/۶	۳	مقاوم	
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	تتراسیکلین
۱۱/۸	۲	۰	۰	۱۱/۸	۲	حساس	
۲۳/۵	۴	۰	۰	۲۳/۵	۴	نیمه حساس	
۶۴/۷	۶	۴۷/۱	۸	۱۷/۶	۳	مقاوم	
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	سولفامتوکسازول-تری متوپریم
۲۹/۴	۵	۰	۰	۲۹/۴	۵	حساس	
۰	۰	۰	۰	۰	۰	نیمه حساس	
۷۰/۶	۱۲	۴۷/۱	۸	۲۳/۵	۴	مقاوم	کل
۱۰۰	۱۷	۴۷/۱	۸	۵۲/۹	۹	کل	

## بحث

در طی دهه‌های اخیر، باکتری‌های کروی گرم مثبت به مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در ماهی تبدیل شده‌اند (Chang *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002; Nomoto *et al.*, 2004; Meyburgh *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020; Kotzent *et al.*, 2021). مطالعات بسیاری از نقاط مختلف جهان ابتلا آبریان به بیماری‌های ناشی از باکتری‌های کروی گرم مثبت را گزارش کرده‌اند (Ghittino and Prearo, 1992; Carson *et al.*, 1993; Palacios *et al.*, 1993; Bark and McGregor, 2001; Eynogor *et al.*, 2004; Baeck *et al.*, 2006)، از اینرو ایران نیز از این امر مستثنی نبوده و هم‌زمان با توسعه مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان این همه‌گیری در بسیاری از مراکز پرورش ماهی مشاهده شده است (Raissy *et al.*, 2016). نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که از ۱۶ مزرعه مورد بررسی، ماهیان ۵ مزرعه به *L. garvieae* آلوده بودند و همچنین، ۸ مزرعه به *S. iniae* آلوده بودند که رقم قابل توجهی است. هنگامی که شیوع استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس رخ می‌دهد، نمونه‌ها باید از ماهیان آلوده‌ای که به تازگی تلف شده‌اند یا از ماهیان مرده نگهداری شده در یخچال گرفته شوند. مناسب‌ترین اندام‌ها کلیه و مغز هستند اگرچه عامل را نیز می‌توان از کبد، طحال، چشم، روده یا خون جدا کرد (Vendrell *et al.*, 2006). آزمایش‌های بیوشیمیایی کلاسیک روش‌های معمول شناسایی این عامل هستند، که بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی آن می‌باشد. سیستم‌های مینیاتوری تشخیصی API-20 Strep و API-32 Strep شامل مجموعه‌ای مختلف از آزمایش‌های بیوشیمیایی هستند که استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی عامل را نیز امکان‌پذیر می‌کنند. با این حال، براساس محیط کشت استفاده شده برای جدایه باکتری ممکن است برای همان آزمایش نتایج مختلفی بدست آید و نتایج همیشه با نتایج بدست آمده از آزمایشات بیوشیمی کلاسیک یکسان نیستند (Ravelo *et al.*, 2001). در سال‌های اخیر، چندین پروتکل برای تشخیص مولکولی بسیاری

از عوامل بیماری‌زای اصلی ماهی توسعه یافته است، که نشان‌دهنده مفید بودن این روش‌ها برای تشخیص بیماری‌های ماهی هستند (Vendrell et al., 2006). اخیراً یک روش مبتنی بر مولتی‌پلکس PCR برای تشخیص همزمان عوامل اصلی دخیل در استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس آب‌های گرم در ماهی شامل *S. iniae* و *L. garvieae* طراحی شده است. این روش نه فقط برای تشخیص خاص دو عامل بیماری‌زا در کشت خالص، بلکه از بافت هموژن شده ماهیان تلقیح شده و ماهیان طبیعی آلوده شده موثر بود (Fadaeifard et al., 2012).

در بررسی Haghghi Karsidani و همکاران (۲۰۱۰) بر روی ۱۰۸ باکتری گرم مثبت جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در استان‌های لرستان، فارس، چهارمحال و بختیاری، کرمانشاه، تهران، گیلان، مازندران، میزان جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* را به ترتیب ۶۴ (۵۹/۲٪) و ۴۴ (۴۰/۸٪) گزارش شد. Mirzakhani (2009) طی بررسی ماهیان مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری بیان نمود از مجموع ۲۰ جدایه باکتری کروی گرم مثبت، ۱۱ مورد *L. garvieae* بوده است. بر اساس بررسی صورت گرفته از ۴۳ مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری، ماهیان ۳۶ (۸۳/۷٪) مزرعه آلوده بودند، در این مطالعه *L. garvieae* از ۳۰ مزرعه و *S. iniae* از ۹ مزرعه جدا شدند Raissy و همکاران (2016). در مطالعه صورت گرفته توسط Soltani و Tarahomi (2008) ۲۰٪ از مجموع ۶۰۰ باکتری کروی گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی را گونه *L. garvieae* و مابقی را جنس *Streptococcus* شامل شد.

عوامل مختلفی در گسترش و انتقال بیماری دخیل می‌باشند که از آن جمله می‌توان به انتقال مستقیم از طریق آب، جابجایی و ورود ماهیان آلوده به کارگاه و یا تغذیه اشاره کرد. بر اساس مطالعات انجام شده دما و وضعیت کیفی آب از اصلی‌ترین عوامل بروز بیماری می‌باشند (Mohd-Aris et al., 2019). میزان فعالیت باکتری با میزان دمای آب رابطه مستقیم دارد از اینرو با افزایش دمای آب فعالیت باکتری‌ها نیز افزایش می‌یابد. در حال حاضر انتقال آلودگی از طریق مسیر رودخانه‌ها مهم‌ترین راه انتقال بیماری در مزارع پرورش ماهی است. بررسی‌های صورت گرفته بیان می‌دارند که مزارع واقع در بخش‌های پایین دست رودخانه که از پساب سایر مزارع پرورش ماهی استفاده می‌کنند در مقایسه با مزارعی که به شکل مستقیم از آب سرچشمه استفاده می‌کردند آلودگی باکتریایی بالاتری دارند. (Gholizadeh and Alinejad, 2018) این امر به واسطه ورود باکتری به آب از طریق پساب کارگاه‌های پرورش ماهی سبب ایجاد تغییراتی در شاخص‌های کیفی آب می‌شود. این موضوع به علت عدم رعایت فاصله مجاز بین مزارع پرورش ماهی تشدید می‌شود. در نهایت ضرر و زیان‌های زیادی برای صنعت پرورش ماهیان سردآبی کشور می‌شود (Shahrani et al., 2014).

شیوع بیماری در سال‌های اخیر همراه با مصرف زیاد و بی‌قاعده آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا با هدف پیشگیری و یا درمان بیماری بوده است که مشکلات زیادی را به دنبال دارد. نتایج این بررسی نشان‌دهنده مقاومت بالای دارویی جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* است، به طوریکه میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از ۳۳/۸ تا ۶۲/۷ تغییر می‌کند، ضمن اینکه اغلب جدایه‌ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند. میزان مقاومت جدایه‌های *L. garvieae* و *S. iniae* جدا شده از ماهیان بیمار در استان چهارمحال و بختیاری قبلاً در محدوده ۲۵ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است (Raissy and Ansari, 2011). در پژوهش حاضر ۶ (۳۵/۳٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۵ (۲۹/۴٪) از جدایه‌های *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده، ۱۱ (۶۴/۷٪) نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم بودند. همچنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کلستین در جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* به ترتیب ۹ (۵۲/۹٪) و ۸ (۴۷/۱٪) بود. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۱۷ (۱۰۰٪) نسبت به کلستین مقاوم بودند. مقادیر ذکر شده در جداول این پژوهش نشان می‌دهند که ۳ (۱۷/۶٪) از جدایه‌های *S. iniae* و ۸ (۴۷/۱٪) از جدایه‌های *L. garvieae* نسبت به آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین مقاوم بودند. در کل جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* تشخیص قطعی داده شده ۱۱ (۶۴/۷٪) نسبت به انروفلوکساسین مقاوم بودند.

Shahrani و همکاران (2014) در مطالعه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در استان چهارمحال و بختیاری بیان نمودند باکتری *L. garvieae* بیشترین مقاومت دارویی را نسبت به آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین (۶۵/۴٪) داشتند که مشابهت زیادی با یافته‌های مطالعه حاضر دارد. علی‌رغم اینکه اریترومایسین به عنوان داروی انتخابی بیماری و با پاسخ مناسب شناخته شده است. اما پژوهش‌های زیادی

مقاومت نسبی به این آنتی‌بیوتیک را گزارش کرده اند که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همخوانی دارد (Fefer et al., 1998; Alves d'Azevedo et al., 2000; Diler et al., 2002; Raissy and Ansari, 2011).

نتیجه مطالعات Yari و همکاران (2017) نشان داد که تمام جدایه‌های *S. iniae* و *L. garvieae* از مزارع پرورشی مزارع ماهی قزل‌آلا در استان ایلام دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به اریترومايسين به میزان ۲۳٪ بوده است که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد. علت آن می‌تواند به دلیل روش بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطالعه مذکور، PCR باشد این در حالیست که در مطالعه حاضر به بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پرداخته شده است. به طور خلاصه بیشترین حساسیت جدایه‌های *S. iniae* به ترتیب شامل انروفلوکسازین، فلورفنیکل، اریترومايسين و لینکواسپکتین بود، همچنین این جدایه بیشترین مقاومت را نسبت به سولفامتوکسازول-تری متوپریم، تراسایکلین، فسفومايسين، آمپی‌سیلین، لینکومايسين و فلومکوئین نشان داد. جدایه‌های *L. garvieae* بیشترین حساسیت و مقامت را به ترتیب نسبت به اریترومايسين، انروفلوکسازین، فلورفنیکل، فلومکوئین و لینکواسپکتین و سولفامتوکسازول-تری متوپریم، فسفومايسين، تراسایکلین و آمپی‌سیلین داشتند.

در تحقیقی که توسط Zandi و همکاران (2016) بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های مولد استرپتوکوکوزیس جدا شده از مزارع ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان کردستان نشان داد *S. iniae* بیشترین مقاومت را نسبت به فلومکوئین، سولفامتوکسازول-تری متوپریم باسیتراکسین، لینکومايسين، داشتند. آگاهی از طیف اثر، مقدار و دستور ترکیبی دارو، استفاده از آب با کیفیت مناسب، کاهش استرس و استفاده از جیره‌های مناسب، استفاده از داروهای ضد میکروبی تحت نظر دامپزشک و تحت کنترل سیستم نظارتی و علمی و استفاده از ضد عفونی کننده‌های مناسب از راه کارهای مهم در غلبه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. ایمن‌سازی به عنوان موثرترین روش در درمان و پیشگیری بیماری و به خصوص در مورد بروز مقاومت‌های چندتابی توصیه می‌گردد (Yari et al., 2017).

### نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر اهمیت این موضوع را نشان می‌دهد که آلودگی در استان چهارمحال و بختیاری با باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* مانند سایر نقاط در کشور از میزان بالایی برخوردار بوده 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. پرورش دهندگان باید به این موضوع توجه ویژه داشته باشند که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی که یکی از دغدغه‌های مهم در دنیا می‌باشد به راحتی می‌تواند بهداشت انسانی را با مخاطره جدی روبرو سازد. با توجه به بالا بودن میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های جدا شده مشخص می‌شود مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها بالا بوده و 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.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس ملتجی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

### منابع

- Afonso, A., Silva, J., Gomes, S. 2003. *Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: a new challenge on fish vaccinology. *IBMC News*. 7: 4-6.
- Akhlaghi, M., Keshavarzi, M. 2002. Streptococcosis outbreaks in rainbow trout farms of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2: 183-189.
- Alves d'Azevedo, P., Perin, C., Becker, F.L., Ramos, G.Z. 2000. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae*. *Revista amrgs*. 44: 81- 84.
- Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K., Park, S.C. 2006. Isolation and characterization of *streptococcus sp.* from disease flounder (*Paralichthysolivaceous*) in Jeju Island. *Journal of Veterinary science*. 7: 53-58.
- Bark, S., McGregor, D. 2001. The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. *Journal of Trout News*. 31: 9-11.

- Bercovier, H., Ghittino, C., Eldar, A. 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in biological standardization*. 90: 153-160.
- Carson, J., Gudcovs, N., Austin, B. 1993. Characteristics of an *Enterococcus* like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Disease*. 6: 381-388.
- Chang, P. H. Lin, C. W. Lee, Y. C. 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology, *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 22: 319-327.
- Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C., Wu, C.Y., Chaung, H.C., Tsai, Y.H., Yang, K.L., Chen, Y.C., Chen, T.H., Lin, G.R. 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *Journal of fish diseases*. 25(12), pp.727-732.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. M100, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28nd ed. Wayne: Clinical and laboratory standards institute; 2018:30 -40, 5 4 -61, 77 - 80.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A., Isikli, B. 2002. First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout in Turkey. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 22 (1): 21-26.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G., Chilomunczyk, S. 2004. Clonality of the diversity of the fish Mediterranean countries. *Applied Environmental Microbiology*. 70: 32-41.
- Fadaeifard, F., Momtaz, H., Rahimi, E., Mirzakhani, A. 2012. Detection of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran. *African Journal of Biotechnology*. 11 (2): 260-263.
- Fefer, J. J., Ratzan, K. R., Sharp, S. E., Saiz, E. 1998. *Lactococcusgarvieae* endocarditic: report of a case and review of the literature. *Diagn Microbial Infectious Disease*. 32 (2): 127-130.
- Ghittino, C., Prearo, M. 1992. Report of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 8: 4-11.
- Gholizadeh, M., Alinejad, M. 2018. Assessment of spatial variability of some affecting parameters on water quality of Zarin Gol river in Golestan province. *Environmental Sciences*. 16 (1): 111-126.
- Haghighi Karsidani, S., Soltani, M., Nikbakhat-Brojeni, G., Ghasemi, M., Skall, H.F. 2010. Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis/lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2 (4): 198-209.
- Holmes, D. S., Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*. 114 (1): 193-197.
- Hurvitz, A., Bercovier, H., Van Rijn, J. A. A. P. 1997. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology*. 7 (1): 45-53.
- Katae, H. 1982. Erythromycin: the application to streptococcal infections in yellowtails. *Fish Pathology*. 17 (1): 77-85.
- Kotzent, S., Gallani, S.U., Valladão, G.M.R., Alves, L.D.O., Pilarski, F. 2021. Probiotic potential of autochthonous bacteria from tambaqui *Colossomamacropomum*. *Aquaculture Research*. 52 (5): 2266-2275.
- Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Domínguez, L., Fernández-Garayzabal, J.F. 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and environmental microbiology*. 70 (5): 3183-3187.
- Meyburgh, C.M., Bragg, R.R., Boucher, C.E. 2017. *Lactococcusgarvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Diseases of aquatic organisms*. 123 (1): 67-79.
- Mirzakhani, A. 2009. Isolation of *Streptococcusiniae* and *Lactococcusgarvieae* in rainbow trout farms in ChahramahalvaBakhtiari Province by Multiplex PCR. DVM thesis. Department of Veterinary. Islamic Azad University Shahrekord Branch. 103 p. (in Persian).
- Mohd-Aris, A., Muhamad-Sofie, M.H.N., Zamri-Saad, M., Daud, H.M., Ina-Salwany, M.Y. 2019. Live vaccines against bacterial fish diseases: A review. *Veterinary world*. 12(11): 1806-1815.
- Nemati, S., Mojtahedi, A., Soltanipour, S., Sharifigar Mavari, M., Rouhi, S. 2020. Evaluation of Bacterial Species to Determine Antimicrobial Resistance in Patients with Chronic Rhinosinusitis after Surgery of Paranasal Sinuses Referring to Amiralmomenin Hospital in Rasht, 2018. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 25 (2): 1-13. (in Persian).
- Nguyen, H.T., Kanai, K., Yoshikoshi, K. 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthysolivaceus*) using selective isolation procedures. *Aquaculture*. 205 (1-2): 7-17.
- Nguyen, T.L.; Lim, Y.J.; Kim, D.H.; Austin, B. 2016. Development of realtime PCR for detection and quantitation of *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases*. 39 (1): 31-39.

- Nomoto, R., Munasinghe, L.I., Jin, D.H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T., Yoshida, T. 2004. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *Journal of fish diseases*. 27 (12): 679-686.
- Palacios, M.A., Zamora, M.J., Vasquez, J., Zamora, E., Duran, A. 1993. Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Bollettino Societa' Italiano Patolo giaIttica*. 13: 6-11.
- Raissy, M., Ansari, M. 2011. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *African Journal of Biotechnology*. 8 (10): 1473-1476.
- Raissy, M., Sarshoughi, M., Moumeni, M. 2016. Molecular identification of some causative agents of warm-water streptococcosis by M-PCR in cultured rainbow trout, Chaharmahal - Bakhtiari Province, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 15(2): 836-845.
- Ravelo, C., Magariños, B., Romalde, J. L., Toranzo, A. E. 2001. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 21 (4): 136-144.
- Rodrigues, R.A., do Nascimento Silva, A.L., Siqueira, M.S., Pilarski, F., Leal, C.R.B., Kuibida, K.V., de Campos, C.M., Fernandes, C.E. 2020. Hematological, biochemical, and histopathological responses in sorubim *Pseudoplatystoma* spp. experimentally infected with *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture International*. 28 (5): 1907-1923.
- Romalde, J. L., Luzardo-Alvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A. E., Blanco-Méndez, J. 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*. 236 (1-4): 119-129.
- Shahrani, M., Raissy, M., Tajbakhsh, E. 2014. Study of frequency and antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout fish in Chaharmahal va Bakhtiari Province. *Biological Journal of Microorganism*. 11 (11): 71-78. (in Persian)
- Soltani, M., Tarahomi, M. 2008. Study of streptococcosis/lactococcosis in some farmed rainbow trout in Fars Province, Iran, In *The first International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases*, Tehran, Iran.
- Soltani, M., Piralí Kheirabadi, A., Taherimirkahead, E., Shafie, S., Mohamadian, S., Roholahi, S. 2013. Molecular study of Streptococcosis/Lactococcosis distribution in farmed rainbow trout in Chaharmahal–va-Bakhteyari and Kohgiluyeh-va-Boyerahmad provinces, Iran. *Iranian Journal of Epidemiology*. 9 (2): 59-68. (in Persian)
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuola, I., De Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J. L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 29 (4): 177-198.
- Yari, A., Nemati, M., Pourahmad, F. 2017. Phenotypic and genotypic evaluation of resistance to broad –range antimicrobial drugs in Gram- positive cocci isolated from rainbow trout in Ilam. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 26 (3): 1-10. (in Persian)
- Zandi, R., Salimi, B., Karimi Dareh Abi, H. 2016. Investigating Antibiotic Susceptibility in Species of Bacteria Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) with Streptococcosis in Kurdistan Province. *Journal of Veterinary Microbiology*. 12 (2): 1-11. (in Persian)



**Evaluation of antibiotic resistance pattern of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed fish in Chaharmahal and Bakhtiari province**

Reza Afrashteh<sup>1</sup>, Reza Salighehzadeh<sup>1\*</sup>, Mohsen Pournia<sup>2</sup>, Marjan Mosafer<sup>3</sup>

1. Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
2. Department of Microbiology, Masjed-Soleiman Branch, Islamic Azad University, Masjed-Soleiman, Iran
3. Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Abstract**

*Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* bacteria are among the most important fish pathogens. The aim of this study was to determine antimicrobial resistance patterns of *S. iniae* and *L. garvieae* isolated from diseased rainbow trout. With respect to outbreak of disease, the survey was carried out in warm seasons using 100 rainbow trout fish with clinical symptoms of disease. Bacteria were cultured from Kidney tissue of fish using standard methods. The antibiotic resistance pattern of strains was studied based on CLSI protocol. The results of the research showed that *S. iniae* isolates were more sensitive to enrofloxacin, florfenicol, erythromycin and lincospectin, and more resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim, tetracycline, fosfomycin, ampicillin, lincomycin and flemequine, respectively. Furthermore, *L. garvieae* isolates were more sensitive to erythromycin, enrofloxacin, florfenicol, flemequine and lincospectin, and more resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim, fosfomycin, tetracycline and ampicillin.

**ARTICLE TYPE**  
**Research**

Received: 16 December 2022  
Accepted: 26 April 2023  
ePublished: 16 May 2023

\* Corresponding Author:  
[rezasalighehzadeh@yahoo.com](mailto:rezasalighehzadeh@yahoo.com)

**Keywords:** Antibiotic, Streptococcosis, Bacteria, Chaharmahal and Bakhtiari, Rainbow trout, Lactococcosis