View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *آئروموناس هیدروفیلا*های جداشده از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرورشی در استان خوزستان

نغمه موری بختیاری[1*]، رحیم پیغان[2]، سیده فاطمه منزوی[3]

* n.moori@scu.ac.ir

۱-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
۲-گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

چکیده

گونه‌های آئروموناس پاتوژن‌های فرصت طلبی هستند که در پاره‌ای از موارد قابلیت ایجاد بیماری به عنوان عامل اولیه در انسان و ماهی را دارند. آئروموناس هیدروفیلا پاتوژن فرصت طلبی است که باعث ایجاد توکسین و عفونت در میزبان شده و مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداسازی شده آن از مناطق مختلف جهان گزارش شده‌است. بنابراین، یافتن میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) ارزشمند خواهدبود. تعداد ۱۰۰ ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از استخرهای پرورش ماهی در ۴ منطقه از استان خوزستان به عنوان نمونه جمع‌آوری گردید. قسمت انتهایی روده از هر نمونه جداسازی و هموژن شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در آگار خون‌دار تلقیح و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. از هر پلیت ۳ تا ۵ کلونی مشکوک به آئروموناس هیدروفیلا انتخاب و در محیط آگار خون‌دار خالص سازی گردید. هر کلونی به وسیله‌ی تست کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم ارزیابی و DNA جدایه‌های مشکوک، به روش جوشاندن استخراج گردید. سویه‌های آئروموناس هیدروفیلا به روش PCR و با استفاده از ژن مربوط به جنس و گونه تایید قطعی شدند. در نهایت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در همه‌ی جدایه‌های آئروموناس هیدروفیلای تایید شده به روش دیسک دیفیوژن کربی- باور بررسی شد. بیست جدایه آئروموناس هیدروفیلا از تمام کلونی‌های مشکوک به آئروموناس با روش PCR تایید قطعی گردید که بیشتر جدایه‌ها به چندین آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. کمترین مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و سیپروفلوکساسین (۲۵٪>) و بیشترین مقاومت نسبت به ونکومایسین و کلیندامایسین (۹۰٪) مشاهده‌شد. درمقایسه با سایرمطالعات، مشخص گردید که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری در مناطق مختلف، متفاوت می‌باشد ازاین رو یافتن الگوی مقاومت در هر منطقه امری الزامی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *آئروموناس هیدروفیلا*، ماهی کپور، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استان خوزستان

* نویسنده مسئول

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

مقدمه

محیط‌های آبی به عنوان منبع اصلی باکتری‌های آئروموناس، مورد توجه هستند و ماهی را به‌عنوان منبع اصلی این میکروارگانیسم‌ها معرفی می‌کنند (Swaminathan *et al*., 2004). *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از باکتری‌های مهم در صنعت پرورش ماهیان گرمابی است؛ ولی گاهی در ماهیان آب شور نیز باعث بروز بیماری می‌شود و علاوه بر ماهی، این باکتری در انسان نیز ممکن است باعث ایجاد عوارضی از قبیل گاستروانتریت و اسهال مسافرتی شود (Lee *et al*., 2000). این باکتری، عامل اصلی سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین از قبیل کپور ماهیان، مار ماهی، شیر ماهی، گربه ماهی کانال، تیلاپیا و آیو می‌باشد. همچنین با بیماری لکه قرمز، پوسیدگی باله و سندروم زخم همه گیر در ارتباط است. این عفونت‌ها ممکن است سبب مرگ و میر بالا در هچری‌های ماهی و سیستم آبی طبیعی شوند (Nielsen *et al*., 2001; Peyghan *et al*., 2010).

با توجه به این واقعیت که ماهی نقش مهمی در رژیم غذایی مردم جهان دارد، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریایی در ماهی‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در دهه‌های گذشته استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های انسانی، دامی، کشاورزی و شیلات سبب افزایش حضور این ترکیبات در محیط زیست و به تبع آن مقاوم‌شدن برخی از باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم منفی به آن‌ها شده است. با این حال مسائل زیادی همراه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری وجود دارد از جمله می‌توان به باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیک‌ها در بافت-های آبزیان پرورشی پس از درمان، تولید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و عدم تعادل در میکروفلور طبیعی و مفید روده اشاره داشت. آنتی‌بیوتیک‌ها ارزش زیادی جهت اقدامات درمانی در برابر عفونت‌های باکتریایی دارند اما در مطالعات بسیاری مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مختلف آئروموناس گزارش گردیده است. از این جهت نیاز به پایش دوره‌ای مقاومت دارویی این ارگانیسم‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی امری ضروری می‌باشد (Yousr *et al*., 2007؛ Shome *et al*., 2005؛ Nam *et al*., 2007). در ایران نیز در بررسی‌های متعددی، جداسازی این عامل از ماهی آمور و کپور ماهیان پرورشی به خصوص کپورمعمولی گزارش شده است (پیغان و اسماعیلی، ۱۳۷۲؛ اخلاقی، ۱۳۷۹).

تشخیص آئروموناس‌ها با روش‌های بیوشیمیایی زمان‌بر و در مواقعی گیج‌کننده می‌باشد، از این رو استفاده از روش PCR و شناسایی ژن‌های حدت علاوه بر ژن‌های اختصاصی جنس و گونه در این باکتری‌ها می‌تواند علاوه بر تأیید قطعی جنس و گونه هر جدایه، نشان‌دهنده‌ی بیماری‌زا بودن باکتری به همراه صرفه‌جویی در وقت و هزینه باشد (Nam *et al*., 2007).

با توجه به پتانسیل بالای آبزی‌پروری در استان خوزستان و استفاده غیر اصولی برخی از پرورش‌دهندگان از آنتی‌بیوتیک‌ها، که ندانسته منتهی به ایجاد مقاومت می‌گردند، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر جهت پیشگیری و کنترل این گونه عفونت‌ها و ضرورت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *آئروموناس هیدروفیلاهای* جداشده از ماهی کپور معمولی پرورشی در استان خوزستان را آشکار می‌سازد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی عامل

نمونه برداری از مزارع پرورشی کپورماهیان واقع در شهرهای خرمشهر، شوش، سوسنگرد و شوشتر (۲۵ قطعه از هر مزرعه) و از ماهیان به ظاهر سالم در محدوده وزنی ۱۰۰-۵۰ گرم (متوسط وزن۷۰ گرم) صورت گرفت. بچه ماهی‌های هر مزرعه با استفاده از کیسه‌های حمل ماهی و با شرایط اکسیژن کافی به آزمایشگاه منتقل و در آکواریوم‌هایی با دما و هوادهی مناسب تا زمان نمونه‌گیری نگهداری شدند. پیش از نمونه‌برداری، هر قطعه ماهی به وسیله پنس، قطع نخاع و سپس وزن‌گیری شد. جهت نمونه برداری ابتدا سطح بدن ماهی به وسیله‌ی الکل ۷۰ درصد، ضدعفونی و سپس با استفاده از یک تیغ اسکالپل استریل، از روی خط زیرین ناحیه شکمی کالبدگشایی صورت گرفت. پس از باز کردن محوطه بطنی، قطعه‌ی ۳-۲ سانتی‌متری از انتهای روده که با منفذ خروجی روده ۲ سانتی‌متر فاصله داشت، قطع و در یک پلیت استریل قرار داده شد. پس ازهمگن‌سازی بافت روده با تیغ اسکالپل

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

استریل، یک لوپ کامل از آن بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از طی این زمان، کلونی‌های مشکوک به آئروموناس (کلونی‌های سفید تا خاکستری رنگ محدب و نیمه شفاف با قطر حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر) انتخاب و بر روی محیط کشت جدید آگار خون دار، خالص‌سازی گردیدند.

تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های خالص‌سازی شده، جهت شناسایی جنس *آئروموناس* و گونه‌ی *هیدروفیلا* با تست‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌هایی که گرم منفی و اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند، به عنوان مظنون به جنس *آئروموناس* در نظر گرفته شدند. پس از آن، هر یک از جدایه‌ها از نظر تولید همولیز نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تشخیص دقیق ترجدایه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی مختلف و متداول از قبیل محیط-های قندی ساده شامل گلوکز، سوربیتول، سالیسین، لاکتوز، مالتوز، ساکارز و همچنین محیط¬هایی نظیر نیترات، اوره، سیمون¬سیترات، سولفور- ایندول- موتیلیتی (SIM)، تحمل نمک، متیل‌رد (MR)، وژپروسکوئر (VP)، لیزین دکربوکسیلاز، استفاده و نتایج پس از ۲۴ ساعت قرائت گردید. تمامی محیط‌های استفاده شده در این تحقیق ساخت شرکت مرک آلمان بود و (Porteen *et al.*, 2006) و جهت خواندن نتایج آن‌ها از منابع معتبراستفاده گردید (Austin & Austin, 2007; Buller, 2004). جدایه‌های مشکوک به *آئروموناس هیدروفیلا* در محیط شیرپس‌چرخ (Skim Milk) کشت و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، جهت تأیید ژنومی با آزمایش PCR، نگهداری شدند.

تشخیص به روش PCR

استخراج DNA از باکتری: برای جداسازی و استخراج DNA جدایه‌ها از روش جوشاندن استفاده شد. بدین منظور یک کلونی از هر جدایه در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر تریس- EDTA (TE) استریل حاوی ۲ درصد ۲- مرکاپتواتانول تلقیح و در دمای جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد.(Nielsen *et al*., 2001; Porteen *et al*., 2006). پس از این زمان، نمونه‌ها با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ، و نهایتاً ماده‌ی رویی به عنوان منبع DNA، در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل جمع‌آوری، و در دمای ۲۰- نگهداری گردید.

تایید جنس و گونه‌ی جدایه‌ها با PCR: با توجه به متغیر بودن برخی از واکنش‌های بیوشیمیایی در سویه‌های مختلف *آئروموناس هیدروفیلا*، تأیید مولکولی جنس و گونه‌های مشکوک بدست آمده ازمرحله‌ی قبل، با PCR نیز انجام شد. بدین منظور از پرایمرهای اختصاصی جنس آئروموناس که هدف آن ژن ۱۶s rRNA می‌باشد و توسط Porteen و همکاران طراحی شده بود استفاده گردید (جدول ۱). واکنش PCR در این مطالعه از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) و درهر واکنش از ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول) (سیناژن، ایران) و۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد (۵/۵ میکرولیتر آب) (Porteen *et al*., 2006). برنامه حرارتی استفاده شده جهت تکثیر ژن هدف شامل دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل، شامل ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد، ۱ دقیقه بود. مرحله نهایی این تست در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

در ادامه جهت تأیید گونه‌ی هیدروفیلا در جدایه‌های مثبت شده از نظر جنس آئروموناس، از پرایمرهای اختصاصی گونه که هدف آن‌ها ژن لیپاز و ژن ۱۶s rRNA هیدروفیلا بود و به ترتیب توسط Cascon (1996) و Dorsch (1994) طراحی شده بودند، استفاده گردید (جدول ۱). سیکل حرارتی استفاده شده در این مرحله کاملا مشابه مرحله تعیین جنس بود. در تمامی مراحل PCR از آئروموناس هیدروفیلای استاندارد حاوی ژن‌های مورد مطالعه (ATCC/۷۹۶۶) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب دپس به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جهت بررسی محصول PCR، از ژل آگارز ۱ درصد، حاوی ۳ درصد رنگ ایمن (safe stain) (سیناژن، ایران)

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

استفاده شد. پس از بارگذاری ژل در تانک حاوی بافرتریس- استیک اسید- EDTA (TAE) برای مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت، با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت (UV tec، آلمان) و نور فرابنفش، حضور و یا عدم حضور باندهای مورد نظر در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت‌بازی (سیناژن، ایران) مورد ارزیابی قرارگرفت.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های تأیید شده‌ی *آئرومونـاس هیدروفیلا* در مرحله قبل، از روش انتشار دیسک کربی-باور و بر اساس استاندار CILS عمل گردید (CLSI, 2011). در این مطالعه از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استاندارد (شرکت پادتن‌طب- ایران) استفاده گردید. آنتی‌بیوتیک‌ها شامل ونکومایسین (V)، آموکسی‌سیلین (AMX)، سیپروفلوکساسین (CP)، تتراسایکلین (TE)، استرپتومایسین (S)، سولتریم (SXT)، سفوتاکسیم (CTX)، جنتامایسین (GM)، نالیدیکسیک اسید (NA)، اکسی‌تتراسایکلین (ترامایسین) (T)، کلیندامایسین (CC) و کلرامفنیکل (C) استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا هرجدایه از آئرومونـاس هیدروفیلای تأیید شده با PCR، در محیط آبگوشت مغز و قلب (BHI) به مدت ۱/۵ الی ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و گرم‌خانه‌گذاری شد تا کدورت آن برابر با کدورت نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$cfu) شود. سپس بر روی محیط مولرهینتون آگار(MHA) به صورت چمنی کشت و دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک در سطح محیط قرار داده شدند و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از این زمان، با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد مربوط به هر دیسک آنتی‌بیوتیکی و مقایسه آن با جدول شرکت مربوطه، حساسیت و مقاومت آن سویه از باکتری به دیسک مورد نظر ارزیابی گردید. در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی از سویه استاندارد آئرومونـاس هیدروفیلای اشاره شده جهت PCR استفاده شد.

نتایج

از ۱۰۰ قطعه ماهی مورد بررسی، ۴۰۰ کلونی با خصوصیاتی مشابه کلونی *آئرومونـاس*ها انتخاب و خالص-سازی شد که در این میان ۳۲۵ جدایه با رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های کاتالاز و اکسیداز مظنون به جنس آئرومونـاس (باکتری های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) مشاهده شد (جدول ۲). از ۳۲۵ جدایه‌ی مشکوک، تنها ۲۰ جدایه در آزمون PCR از نظر داشتن قطعه‌ی اختصاصی جنس *آئرومونـاس* با طول ۵۹۹ جفت باز و باند اختصاصی گونه‌ی هیدروفیلا با داشتن قطعه‌ای به طول ۶۸۵ جفت باز برای ژن ۱۶s rRNA، مثبت بودند (تصویر۱). اما از ۲۰ جدایه، تنها ۱۱ جدایه از نظر ژن لیپاز با داشتن قطعه‌ای به طول ۷۶۳ جفت باز مثبت بودند.

با بررسی نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام ۲۰ جدایه *آئرومونـاس هیدروفیلا* و سویه‌ی استاندارد *آئرومونـاس هیدروفیلا* مشاهده شد که بیش‌ترین مقاومت در بین جدایه‌های مورد بررسی، مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و کلیندامایسین (۹۰٪) و پس از آن نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۷۰٪) می‌باشد و کم‌ترین مقاومت در بین جدایه‌ها در ارتباط با آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (۰٪) و سیپروفلوکساسین (۱۵٪) و پس از آن، نسبت به آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین، سولتریم و اکسی-تتراسایکلین (۲۵٪) مشاهده شد. همچنین مقاومت نسبی در ۵۰-۴۰ درصد از جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی چون آموکسی‌سیلین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین مشاهده گردید (جدول ۳).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تأیید جنس آئروموناس وگونه‌ی هیدروفیلا

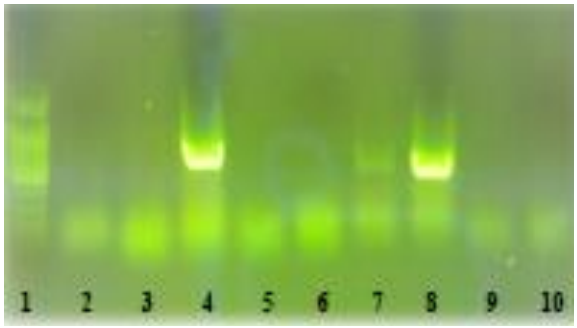
Table 1: Primers sequence of *Aeromonas* genuse and *hydrophila* species

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار	منبع
16 S rRNA F	5′-TCA TGG CTC AGA TTG AAC GCT-3′	*Aeromonas sp.*	۵۹۹	Porteen et al, 2006
16 S rRNA R	5′-CGG GGC TTT CAC ATC TAA CTT ATC-3′	*Aeromonas sp.*	۵۹۹	
16 SrRNA F	5′-GAA AGG TTG ATG CCT AAT ACG TA-3′	*A. hydrophila*	۶۸۵	Dorsch et al, 1994
16 SrRNA R	5′-CGT GCT GGC AAC AAA GGA CAG-3′	*A. hydrophila*	۶۸۵	
Lipase F	5′-AAC CTG GTT CCG CTC AAG CCG TTG-3′	*A. hydrophila*	۷۶۳	Cascon et al, 1996
Lipase R	5′-TTG CTC GCC TCG GCC CAG CAG CT-3′	*A. hydrophila*	۷۶۳	

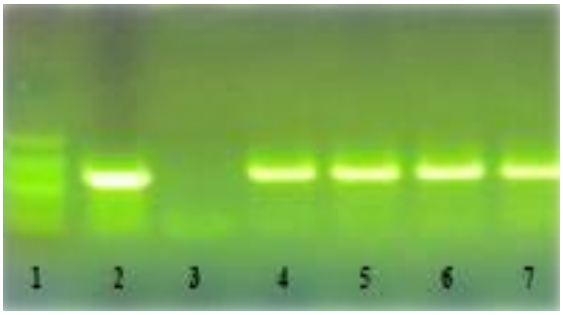
جدول ۲: نتایج بررسی جدایه‌ها با آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم

Table 2: Results of identification of isolates with catalase, oxidase and gram staining

گرم منفی	اکسیداز مثبت	کاتالاز مثبت	همولیز مثبت
۴۰۰	۳۲۵	۴۰۰	۳۵۵



تصویر ۱: نتایج واکنش PCR تعیین گونه آئروموناس هیدروفیلا با پرایمر اختصاصی 16srRNA: ستون۱: نردبان ژنی ۱۰۰جفت بازی؛ ستون۲: کنترل منفی؛ ستون‌های۳، ۵، ۶، ۹، ۱۰: نمونه منفی؛ ستون‌های۷ و ۸: نمونه مثبت، ستون۴: کنترل مثبت (حامل قطعه ۶۸۵ جفت بازی).



تصویر ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR تعیین گونه هیدروفیلا با ژن لیپاز: ستون۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون۲: کنترل مثبت؛ ستون۳: کنترل منفی؛ستون۴، ۵، ۶، ۷: نمونه مثبت (حامل قطعه ۷۶۳ جفت بازی).

جدول۳: نتایج ارزیابی هاله عدم رشد ایجادی در آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه‌ها

Table 3: Results of inhibitory zone study in antibiogram test

نوع و مقدار آنتی-بیوتیک استاندارد	درصد جدایه‌های مورد بررسی		
	حساس	متوسط	مقاوم
آموکسی‌سیلین (۳۰µg)	۲۵	۵۰	۲۵
ونکومایسین(۳۰µg)	۱۰	-	۹۰
استرپتومایسین(۲۰µg)	۳۰	-	۷۰
سفوتاکسیم (۲۵ µg)	۵۵	۴۵	۰
جنتامایسین(۱۵µg)	۵۰	۵۰	-
نالیدیکسیک اسید(۳۰µg)	۶۰	۴۰	-
سیپروفلوکساسین(۲۵µg)	۴۵	۳۵	۱۵
کلیندامایسین(۳۰µg)	۱۰	-	۹۰
کلرامفنیکل (۲۰µg)	۵۷	۴۳	-
سولتریم(۱۰µg)	۷۵	-	۲۵
تتراسایکلین (۳۰µg)	۷۵	-	۲۵
اکسی‌تتراسایکلین (۲۰µg)	۷۵	-	۲۵

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

بحث

دستگاه گوارش مهره داران از جمله ماهی‌ها، اکوسیستمی پیچیده از جمعیت‌های مختلف باکتری‌های فرصت طلب و همزیست می‌باشد (Bjorksten, 2006). تلفات ماهیان گرم آبی پرورشی در کشور به‌عنوان یکی از معضل‌های بهداشتی مهم صنعت پرورش ماهیان گرم آبی به خصوص در دو دهه ی اخیر شناخته شده است. اگرچه حضور این باکتری‌ها با بیماری ماهی یا بیماری روده‌ای همیشه همراه نیست ولی به طور حتم به دلیل آلودگی مداوم آب‌ها با مدفوع ماهی‌ها، این میکروارگانیسم‌ها پایدار خواهند ماند (LeChevallier *et al*., 1980). آئروموناس‌های خاص به عنوان شاخص آلودگی در ارزیابی کیفیت آب آشامیدنی، مهم می‌باشد (Cesar, 1999).

در مطالعه Uddini و Al-Harbi در سال ۲۰۱۲ آئروموناس هیدروفیلا به عنوان یکی از باکتری‌های غالب با فراوانی بیش از ۲۰ درصد گزارش گردید (Uddin & Al Harbi, 2012). در مطالعه‌ای که در ایالات متحده آمریکا بر روی آئروموناس‌ها به عنوان پاتوژن اولیه در عفونت‌های روده‌ای و در موارد کمتر عفونت خارج روده‌ای نظیر عفونت‌های سیستمیک، اندوکاردیت و غیره انجام شد، جنس آئروموناس را به عنوان عامل ایجاد ۱۳ درصد از عفونت‌ها در انسان اعلام کردند (Cesar, 1999). تشخیص به‌موقع، نیاز به روش‌های سریع و اختصاصی در شناسایی باکتری در نمونه‌های کلینیکی، مواد غذایی و محیطی را آشکار می‌سازد چرا که مصرف آب و غذای آلوده، از مهم-ترین راه‌های انتقال آلودگی در انسان می‌باشد.

مطالعات متعددی مبنی بر تشخیص حضور آئروموناس هیدروفیلا در نمونه‌های مختلف با روش‌های کشت و جداسازی صورت گرفته‌است از جمله تحقیق صورت گرفته توسط علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۸، که در آن نقش این باکتری در تلفات ماهی آمور در استان خوزستان، ۱۱ درصد گزارش شده است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸). مطالعات بسیاری بر اساس تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفته و با مقایسه‌ی نتایج حاصل از این تحقیقات، علاوه بر زمان‌بر بودن روش کشت، تنوع بسیاری درتوانایی استفاده از سیترات، تولید H_2S، دکربوکسیله کردن لیزین و تحمل نمک در جدایه‌های آئروموناس هیدروفیلاهای مورد بررسی در این مطالعات، مشاهده گردید (Carnahan & Joseph, 2005؛ Agniswar *et al*., 2013). بر این اساس استفاده از روش‌های تشخیصی سریع‌تر و دقیق‌تر، بیشتر مورد توجه است.

مطالعات زیادی در خصوص تشخیص جنس و گونه و یا عوامل حدت آئروموناس هیدروفیلا با PCR صورت گرفته است از جمله مطالعه‌ی Sen و Rodges در سال ۲۰۰۴، که در آن به بررسی پراکندگی ۶ فاکتور حدت در گونه-های آئروموناس در آب آشامیدنی به وسیله PCR در ایالت متحده آمریکا پرداخته شد (Sen و Rodges، ۲۰۰۴). آهنگرزاده و همکاران (۱۳۹۲)، به بررسی نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت کنندگی باکترین جدایه‌ی حاد آن پرداختند، آن‌ها با بررسی حضور ژن 16SrRNA، ۲۱ جدایه و با بررسی حضور ژن لیپاز ۳۱ جدایه از ۲۱۵ نمونه ماهی دارای علائم، آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا را تأیید کردند (آهنگرزاده، ۱۳۹۲). در مطالعه حاضرنیزاز روش PCR جهت تأیید جدایه‌های مشکوک به آئروموناس هیدروفیلا که پس از جداسازی با تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شده بودند، استفاده گردید وتنوع در برخی تست‌ها در۲۰ جدایه آئروموناس هیدروفیلا مشاهده شد.

استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان بیماری‌های ماهی، به دلیل تماس دارو با محیط و مشکلات ایجاد کننده در سلامت انسان اهمیت خاصی یافته و موجب نگرانی دست‌اندرکاران صنعت پرورش آبزیان در دنیا گشته‌است. متأسفانه در حال حاضر به دلایل نامعلوم، کاربرد داروها و مواد شیمیایی، خارج از سیستم صحیح تشخیص و تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها بدون در نظرگرفتن باقی-مانده‌های دارویی و اثرات آلایندگی آن‌ها در طبیعت و عوارض سوء این مواد بر انسان افزایش یافته است (Porteen *et al*., 2006). با بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و امکان انتقال میکروب‌های مقاوم به انسان، سلامت عمومی جامعه به خطر افتاده و خسارت جبران ناپذیری ایجاد می-گردد. مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که مقاومت این باکتری از گذشته تا به امروز رو به افزایش بوده که احتمالاً به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می-

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

باشد. مطالعات زیادی در خصوص بررسی مقاومت آنتی-بیوتیکی *آئروموناس هیدروفیلا*های جداسازی شده از حیوانات مختلف انجام شده‌است (Igbinosa, 2013; Gray, 1984) اما با توجه به تفاوت نمایی آنتی‌بیوگرام در مناطق مختلف جغرافیای استفاده از الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی منطقه‌ای در درمان تجربی و اختصاصی لازم می-باشد (Var *et al*., 2015).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی ۲۰ جدایه‌ی *آئروموناس هیدروفیلا*، نسبت به ۱۲ آنتی¬بیوتیک نشان داد که جدایه‌ها مقاومت ۹۰ درصدی نسبت به کلیندامایسین (لینکوزآمیدها) و ونکومایسن (گلیکوپپتیدها) داشتند که با نتایج مطالعه Isoken هم خوانی داشت (Isoken, 2013) همچنین در ۷۰ درصد از جدایه‌های مورد بررسی، مقاومت نسبت به استرپتومایسین (آمینوگلیکوزید) مشاهده گردید. این یافته با نتایج حاصل از مطالعات دیگر محققین که در آن‌ها استفاده از سفالوسپورین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، نیتروفورانتوئین مانعی جهت رشد بیش‌تر سویه‌های آئروموناس هیدروفیلا اعلام‌شده، هم‌خوانی دارد (Soliman, 1999؛ Motyle *et al*., 1985؛ Yucel & Ctak, 2003؛ Chandrakanthi *et al*., 2000؛ Emekdas *et al*., 2006).

همچنین مقاومت ۵۰ درصدی نسبت به کلرامفنیکل مشاهده شد در حالی‌که مطالعات مهرابیان و همکاران (۱۳۹۱) و Kaskhedikar و Chhabra (۲۰۱۰) مقاومت ۱۰۰ درصدی به کلرامفنیکل رانشان دادند. در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به سایر آنتی بیوتیک های اکسی-تتراسایکلین ، سولتریم و آموکسی‌سیلین در ۲۵ درصد سویه‌ها، مشاهده‌شد. این در حالی است که در مطالعه صورت گرفته توسط محققین مختلف، عنوان شده است که اکثر گونه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* به تتراسایکلین حساس می‌باشند (Kashhedikar & Chhabra, 2010).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در جدایه‌ها هیچ مقاومتی نسبت به سفوتاکسیم مشاهده نگردید که این یافته با مطالعه مهرابیان و همکاران در سال ۱۳۹۱ که به بررسی میزان مقاومت آئروموناس هیدروفیلاهای جدا شده از کبوتر در شهرکرد و یافته‌های Kashhedikar و Chhabra در سال ۲۰۱۰ که میزان مقاومت دارویی آئروموناس هیدروفیلا را در ماهی در هندوستان مورد ارزیابی قراردادند، هم‌خوانی دارد (مهرابیان و همکاران، ۱۳۹۱؛ Kashhedikar & Chhabra, 2010). در نهایت با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مختلف، تفاوت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر اساس منطقه جغرافیایی یا محل جداسازی و میزبان در سویه‌های مختلف از این باکتری وجود دارد از این‌جهت به‌منظور حفظ بهداشت و سلامت عمومی و جلوگیری از زیان‌های اقتصادی، توصیه می‌شود که پیش از درمان و به صورت دوره‌ای الگوی مقاومت این باکتری در هر منطقه مورد بررسی قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت تأمین بودجه مورد نیاز جهت انجام این پروژه.

منابع

آهنگرزاده، م.، ۱۳۹۲. نقش آئروموناس هیدروفیلا در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی باکترین جدایه‌ی (های) حاد آن، پایان نامه دکتری تخصصی بیماری‌های آبزیان، صفحات ۱۰۵- ۱۰۶.

اخلاقی، م.، ۱۳۷۹. ایمنی زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۱، صفحات ۵۷-۶۲.

پیغان، ر. و اسماعیلی ف.، ۱۳۷۲. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسمهای شبیه آئروموناسهای، متحرک، مجله علمی شیلات ایران، سال ۶، شماره۲، صفحات ۱-۸ .

علیشاهی، م.، سلطانی، م. و زرگر، الف.، ۱۳۸۸. بررسی باکتریایی تلفات ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) در استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۵ ، شماره ۱ بهار، صفحات ۳۴-۲۵.

مهرابیان، س.، طهماسبی، ح.، ممتاز، ح.، غلام-حسینی، الف. و ریاحی‌چولیچه، ح.، ۱۳۹۱.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی درآئروموناس هیدروفیلاهای جداسازی شده ازکبوترهای خانگی درشهرکرد. ششمین کنگره میکروب‌شناسی بالینی ایران واولین کنگره بین‌المللی میکروب‌شناسی بالینی.

Agnishwar, S., Mousumi, S. and Pranab, R., 2013. Detection of 232bp virulent gene of *Aeromonas hydrophila* through PCR technique: (A rapid molecular diagnostic approach). Advances in Microbiology, 3: 83-87. http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.31013

Austin, B. and Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens, 4th ed. Chichester, UK: Springer- Praxis. 81P. DOI: 10.1007/978-1-4020-6069-4.

Bjorksten, B., 2006. The gut microbiota: a complex ecosystem. Clinical Experimental Allergy. 36: 1215-1217. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2006.02579.x

Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI publishing. 361 P. DOI: 10.1079/9780851997384.0000

Carnahan, A.M. and Joseph, S.W., 2005. "Aeromonadaceae," in The Proteobacteria, Part B, Berger's Manual of Systematic Bacteriology, D. J. Brenner, Krieg, and G. M. Garrity, Eds., Springer, New York, NY, USA.

Cascon, A., Anguita, J., Hernanz, C., Sanchez, M., Fernandez, M. and Naharro, G., 1996. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. Applied and Enviromental Microbiology, 62: 1167-1170. PMCID: PMC167882

Cesar, I., Geert, H., Mauro, T., Albert, M.J., Swings, J., Raffaele, P. and Jemmi, T., 1999. PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in Aeromonas spp. Applied and Environmental Microbiology. pp: 5293-5302. PMCID: PMC91719

Chandrakanthi, W.H.S., Pathiratne, A. and Widanapathirana, G.S., 2000. Characteristics and virulence of *Aeromonas hydrophila* isolates from Freshwater fish with Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Diagnostics Microbiology of Infectious Diseases. 28: 29-42.

Clinical Institute and Laboratory Standards, 2011. Performance standards for 170 antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement. CLSI M100-S21.

Dorsch, M., Ashbolt, N.J., Cox, P.T. and Goodman, A.E., 1994. Rapid identification of Aeromonas species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. Journal of Applied Bacteriology, 77: 722-726. DOI:10.1111/j.1365-2672.1994.tb02825.x

Emekdas, G., Aslan, G., Tezcan, S., Serin, M.S., Yildiz, C., Ozturhan, and Durmaz, R., 2006. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility and genotypic discrimination of Aeromonas strain isolated from municipally treated tap water sample by cultivation and Ap-PCR in

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

Nam, I.Y. and Joh, K., 2007. Rapid Detection of Virulence Factors of Aeromonas Isolated from a Trout Farm by Hexaplex-PCR. The Journal of Microbiology, 45(4): 297-304. PMID: 17846582

Nielsen, M.E., Høi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y. and Larsen, J.L., 2001. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile aeromonas species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of china?. Disease of Aquatic Organisms, 46(22): 23-29. DOI: 10.3354/dao046023

Peyghan, R., Khadjeh, G.H., Mozarmnia, N. and Dadar, M., 2010. Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, *Cyprinus carpio*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 1: 26-29. DOI: 10.4236/abb.2010.11004

Porteen, K., Agrawal, R.K. and Bhilegaonkar, K.N., 2006. PCR Based Detection of Aeromonas from Milk Samples. Journal of Food Technology, 4(2): 111-115. URL:http://medwelljournals.com/abstract/?doi=jftech.2006.111.115

Sen, K. and Rodgers, M., 2004. Distribution of six virulence factors in Aeromonas species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. U.S. Environmental Protection Agency Paper 153 P. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x

turkey. International Journal of Food Microbiology. 107: 310-314. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.012

Gray, S.J., 1984. *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. J. Hyg., Camb. 92: 365-375.

Igbinosa, I.H., 2013. Antibiogram Profiling and pathogenic status of Aeromonas species recovered from Chicken. Saudi Journal of Biological Sciences 21: 481-485. http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.06.003

Kashhedikar, M. and Chhabra, D., 2010. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. Veterinary World. 3(2): 76-77.

LeChevallier, M.W., Seidler, R.J. and Evans, T.M., 1980. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. Applied Environmental Microbiology; 40: 922-930. PMCID: PMC291691

Lee, S., Kim, S., Oh, Y. and Lee, Y., 2000. Characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout in Korea. The Journal of Microbiology, 38(1): 1-7.

Motyl, M.R., Mckinley, G. and Janda, J.M., 1985. In Vitro susceptibilities *of Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 28: 151-153. doi: 10.1128/AAC.28.1.151

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]
Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

Shome, B.R., Shome, R., Mazumder, Y., Das, A., Kumar, A., Rahman, H. and Bujarbaruah, K.M., 2005. Abdominal dropsy disease in major carps of Meghalaya: Isolation and characterization of *Aeromonas hydrophila*. Current Science, 88(12): 1897-1900.

Soliman, Z.I., 1999. Antibiogram of some bacteria contaminating tilapia fish at El-Manzala lake in port said governorate. Vet. Med. J. Giza, 47: 19-27.

Swaminathan, T.R., Rathore, G., Abidi, R. and Kapoor, D., 2004. Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. Indian Journal of Fisheries, 51(2): 251-254.

Uddin, N. and Al-Harbi, A.H., 2012. Bacterial Flora of polycultured common carp (Cyprinus carpio) and African catfish (Clarias gariepinus). International Aquatic Research, 4: 10.

Var, S.K., Hadi, R. and Khardori, N.M., 2015. Evaluation of regional antibiograms to monitor antimicrobial resistance in hampton roads, Virginia. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 14: 22. DOI 10.1186/s12941-015-0080-6

Yousr, A.H., Napis, S., Rusul, G.R.A. and Son, R., 2007. Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in Aeromonas spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. ASEAN Food Journal, 14(2): 115-122.

Yucel, N. and Ctak, S., 2003. The occurrence, hemolytic activity and antibiotic susceptibility of motile Aeromonas spp. Isolated from meat and milk samples in Turkey. Journal of Food Safety, 23: 189-200.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110313]

Downloaded from isfj.ir at 13:18 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

Determination of isolated *Aeromonas hydrophila* antibiotic resistance profile from farmed common carp (*Cyprinus carpio*) in khuzestan province

Moori Bakhtiari N.[*1]; Peyghan R.[2]; Monzavi S.F.[3]

[*] n.moori@scu.ac.ir

1- Pathobiology Department of Veterinary School of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2-Clinical Sciences Department of Veterinary School of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Abstract

Aeromonas are an example of emerging bacterial pathogens. Even though they have been recognized as primary fish and human pathogens. *Aeromonas hydrophila* are opportunistic pathogens that are at the same time infectious and enterotoxigenic and multiple antibiotic resistances (MAR) among *Aeromonas hydrophila* strains has been reported from many parts of the world. Under these circumstances, it will be worthwhile to find out the prevalence of antibiotic resistance of the *Aeromonas hydrophila* strains. The one hundred pieces of fish samples were collected from 4 common carp training pool in Khuzestan province. The part of intestine was collected in sterile plate and was homogenized. The samples were cultured in blood agar and incubated in 37centigrade degree temperature. Three to five *Aeomonas hydrophila* suspected colony, were selected from any plate and purified in blood agar. After initial evaluation of each colony by catalase, oxidase and gram staining, suspected strains DNA was extracted by boiling. *Aeromonas hydrophila* strains were confirmed by PCR assay and using of genus and species specific primers. Finally, multiple antibiotic resistance (MAR) of confirmed *Aeromonas hydrophila* isolates was evaluated by Kirby-Bauer disc diffusion method. Twenty *Aeromonas hydrophila* strains of Aeromonas suspected colonies were confirmed by PCR assay and the most of isolates had a multiple resistance. The least and the most resistance was observed regarding to cefotaxim and ciprofloxacin (<25%), vancomycin and clindamycin (90%), respectively. Compared with results of other studies, antibiotic resistance pattern of these bacterial strains is variable in different geographical areas; therefore resistant pattern of each group of bacteria must be determined in each area.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Common carp (*Cyprinus carpio*), Antibiotic resistance, Khouzestan province

*Corresponding author