

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

**بررسی مقایسه ای اثرات *Rosmarinus officinalis*
و *Streptococcinum* , *Hepar sulfur*
اریترومایسین در درمان ماهیان
قزل آالی پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*)
مبتلا به استرپتوکوکوزیسی**

مجری :

مریم صالحی

شماره ثبت

۴۷۴۶۹

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

عنوان پروژه : بررسی مقایسه ای اثرات *Streptococcinum*, *Rosmarinus officinalis*, Hepar sulfur و اریترومايسين در درمان ماهیان قزل آلاي پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) مبتلا به استرپتوکوکوزيس
شماره مصوب پروژه : ۸۸۰۵۵ - ۱۲ - ۱۲ - ۲
نام و نام خانوادگی نگارنده / نگارندگان : مریم صالحی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مریم صالحی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : حسین عصائیان - علی نکوئی فرد - جلیل معاضدی - صابر شیری - ژا له
علیزاده اوصالو - عیسی شریف پور - بیژن مصطفی زاده - ابوالفضل سپهداری - مسعود صیدگر - لطیف
اسماعیلی - امیر زینالی - هادی فخری - مسعود حقیقی .
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان آذربایجان غربی
تاریخ شروع : ۸۸/۸/۱
مدت اجرا : ۴ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ
بلامانع است .

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

**بررسی مقایسه ای اثرات *Rosmarinus officinalis* , Hepar sulfur و *Streptococcinum* و اریتروماکسین در درمان ماهیان قزل آلائی پرورشی
(*Oncorhynchus mykiss*) مبتلا به استرپتوکوکوزیس**

مجری :

مریم صالحی

شماره ثبت

۴۷۴۶۹

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

عنوان پروژه : بررسی مقایسه ای اثرات *Streptococcinum*, *Rosmarinus officinalis*, *Hepar sulfur* و اریترومايسين در درمان ماهیان قزل آلاي پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) مبتلا به استرپتوکوکوزيس
شماره مصوب پروژه : ۸۸۰۵۵ - ۱۲ - ۱۲ - ۲
نام و نام خانوادگی نگارنده / نگارندگان : مریم صالحی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مریم صالحی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : حسین عصائیان-علی نکوئی فرد- جلیل معاضدی - صابر شیری - ژاله
علیزاده اوصالو- عیسی شریف پور- بیژن مصطفی زاده - ابوالفضل سپهداری- مسعود صیدگر- لطیف
اسماعیلی - امیر زینالی- هادی فخری - مسعود حقیقی .
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان آذربایجان غربی
تاریخ شروع : ۸۸/۸/۱
مدت اجرا : ۴ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۴
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ
بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : بررسی مقایسه ای اثرات *Hepar sulfur* , *Rosmarinus officinalis*,

Streptococcinum و اریتروماکسین در درمان ماهیان قزل آلاى پرورشی

(*Oncorhynchus mykiss*) مبتلا به استرپتوکوکوزیس

کد مصوب : ۸۸۰۵۵ - ۱۲ - ۱۲ - ۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۷۴۶۹ تاریخ : ۹۴/۵/۱۴

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مریم صالحی دارای مدرک تحصیلی

کارشناسی ارشد در رشته بیولوژی دریا می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ

۹۴/۲/۲۸ مورد ارزیابی و رتبه متوسط تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول

بوده است.

صفحه	« فهرست مندرجات »	عنوان
۱	چکیده
۲	۱- مقدمه
۵	۲- مواد و روشها
۹	۳- نتایج
۱۹	۴- بحث و نتیجه گیری
۲۳	پیشنهادها
۲۵	منابع
۲۶	پیشنهادها
۳۰	چکیده انگلیسی

چکیده

هومیوپاتی یکی از طبهای کلی نگر است که با تجویز صحیح ، اثر مفیدی در بهبودی انواع بیماریهای جسمی و روحی همه موجودات زنده خواهدداشت . تاکنون پژوهش های زیادی درخصوص اثرات داروهای هومیوپاتی روی ماهی در ایران و جهان انجام نشده است. دراین مطالعه، تاثیر داروی هومیوپاتی Streptococcinum, Hepar sulfur and Rosmarinus officinalis در مقایسه با اریترومايسين بر میزان مرگ و میر و بازماندگی بچه ماهیان قزل-آلای رنگین کمان پرورشی که به طور تجربی به استرپتوکوکوزیس مبتلا گردیدند، بررسی شد. برای این منظور، ۶ تیمار هر یک با ۳ تکرار در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. هر تکرار دارای ۴۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی 5 ± 25 گرم در زوک های ۳۰۰ لیتری بود. تیمار ۱ حاوی اریترومايسين، تیمار ۲ حاوی استرپتوکوکوسینوم، تیمار ۳ رزمارینوس آفیسینالیس ، تیمار ۴ هپارسولفور ، تیمار ۵ شاهد (بدون تزریق باکتری و بدون تجویز دارو) و تیمار ۶ کنترل مثبت (با تزریق باکتری و بدون تجویز دارو) بود.

دمای آب، اکسیژن محلول، pH و شوری محیط آزمایشی تیمارها در شرایط کنترل شده برای قزل آلا روزانه ثبت گردید. دربررسی روزانه علائم کلینیکی ناشی از استرپتوکوکوزیس: خونریزی زیر پوستی، زیر چشم، زیر باله ها، آبشش ها و اگزوفتالمی، از عمده ترین علائم کلینیکی بود که در بچه ماهیان بیمار مشاهده گردید. دربررسی علایم آسیب شناسی: نکروز، هایپرپلازی در آبششها، نقاط ملانوزه در آبشش ها، کبد و کلیه ها، پرخونی در قلب و کلیه ها، خونریزی در احشاء، مشاهده شد. در این مطالعه، بازماندگی بچه ماهیان در تیمار ۱(حاوی اریترومايسين) نسبت به تیمار ۲(حاوی Streptococcinum) ، هم چنین نسبت به تیمار ۴ (هپارسولفور) و تیمار ۳ (رزمارینوس آفیسینالیس)، اختلاف معنی دار داشت ($P < 0/05$). اما بازماندگی بچه ماهیان در تیمار ۴ که حاوی هپارسولفور بود، درمقایسه با سایر تیمارهای حاوی داروهای هومیوپاتی ، بیشتر و به تیمار حاوی اریترومايسين نزدیکتر بود. هپارسولفور داروی هومیوپاتی است ، درحالیکه اریترومايسين داروی شیمیایی و حاوی عوارض جانبی زیادی است، پیشنهاد میگردد، دوز مناسب هپارسولفور با آنتی بیو گرام جهت درمان استرپتوکوکوزیس مورد مطالعه تکمیلی قرار گیرد.

کلمات کلیدی : استرپتوکوکوزیس، هومیوپاتی ، ماهی قزل آلای رنگین کمان ، رزمارینوس آفیسینالیس، استرپتوکوکوسینوم، هپارسولفور ، اریترومايسين.

۱- مقدمه

هومیوپاتی یا مشابه درمانی یکی از شاخه های طب کل نگر می باشد که کاربرد آن مربوط به سالهای بسیار قدیم حدود ۷۰۰۰ سال قبل است بطوریکه بقراط حکیم (۴۶۰-۳۵۰ قبل از میلاد مسیح) از این روش طبی جهت درمان بیماران استفاده می کرده و معتقد بوده که "مشابه را با مشابه می باید درمان کرد" (صالحی م، ۱۳۹۰).

جالینوس (۲۰۰-۱۳۰ پس از میلاد مسیح) که آناتومیست و فیزیولوژیست ماهری بود، در مورد درمان طبیعی به روش مشابه سخن گفته و بیش از ۱۰۰۰ سال، از نوشته های او در پزشکی استفاده شده است (Salehi M, 2010). در قرن ۱۵ و ۱۶ که طب در حال پیشرفت بود، پزشک سوئسی بنام Theopastus Von Bambast (۱۵۴۱-۱۴۹۳) با نام مستعار پاراسلسوس، بر این باور بود که "هرعضو از بدن بیمار در طبیعت، داروی مشابه خود را دارد" پاراسلسوس در قرن ۱۶ میلادی، تنها با قرصهایی از نان و مقادیر بسیار جزئی از ترشحات بیماران مبتلا به طاعون، موفق به درمان ۱۵۳۴ بیمار مبتلا به طاعون گردید. دکتر ساموئل هانمن، شیمیست، گیاه شناس، زبان شناس و پزشک آلمانی (۱۸۴۳-۱۷۵۵) این روش پزشکی را به شکل علمی ارائه نمود، به این معنی که تعدادی از داروهای هومیوپاتی راتک تک به روی خود اثر داد و علائم ایجاد شده ناشی از آن دارو را در کتابهای "Organon of Medicine"، "Materia Medica Pura" در دو جلد و "Chronic Diseases" نیز در دو جلد، ثبت نمود. هومیوپاتیهای بعدی از جمله دکتر هرینگ، دکتر کنت، دکتر بوئینگ هائزن، دکتر سانکران و محققین دیگر تا به امروز، تحقیقات را در مورد هومیوپاتی ادامه داده اند.

داروهای این طب بی ضرر و با صرفه هستند که در دامپزشکی نیز کاربردهای متعددی دارند و میتوانند در درمان بیماریهای ماهی و میگو نیز مورد استفاده قرار گرفته و نتایج خوبی بدنبال داشته باشند (S. Abutbul et al., 2004). حدود ۹۰ درصد از داروهای هومیوپاتی گیاهی و ۱۰ درصد منشاء حیوانی و مواد معدنی دارند. رقیق کردن و تکان دادن شدید و بطور عمودی، دو تکنیک اصلی برای تهیه داروهای هومیوپاتی هستند. داروهای گیاهی هومیوپاتی از ریشه، ساقه، پوست ساقه، گل، دانه، میوه و یا گرده روی پرچم گل، تهیه می شوند. داروهای حیوانی هومیوپاتی از ترشحات حیوانات نظیر سم مار کبری، از زنبور عسل، سوسک سیاه، ماهی مرکب، حلزون و... تهیه می گردند. داروهای معدنی از طلا، نقره، مس، نمک طعام و... تهیه می شوند.

داروهای هومیوپاتی به اشکال مختلف قرص، شربت و قطره تهیه می شوند. همه داروها از طریق مخاط و پوست جذب می شوند و جنبه خوراکی ندارند. بطوریکه انواع قرصها زیر زبان قرار میگیرند و از طریق مخاط دهان جذب می شوند. البته لازم است ۱ ساعت قبل و ۱ ساعت بعد از مصرف دارو، از خوردن و نوشیدن پرهیز شود.

قرصهای پهن (Tablet) از نشاسته و قرصهای ریز کروی، از لاکتوز (قند شیر بز) ساخته می شوند. داروهای هومیوپاتی در رفتهای مختلف تهیه شده، روی قرصها اسپری گشته، در نتیجه این قرصها به صورت دارو در می آیند.

داروها ابتدا به شکل محلول اولیه (Mother Tincher) تهیه میشوند . به این ترتیب که بعنوان مثال ریشه ، ساقه ، برگ ، گل و یا پرچم را خشک ، سپس کوبیده و در الکل ۷۰ درصد حل نموده و محلول اولیه تهیه می شود . که در شرایط مطلوب یعنی به دور از نور ، حرارت ، سرما ، الکتریسته و وسایل الکتریکی ، رطوبت ، انواع عطرها و بوها ، سالیان سال ماندگاری خواهند داشت و اثر بخشی خود را از دست نخواهند داد .

داروهای هومیوپاتی در انسان ، حیوان و گیاه ، با وجودی که در مقایسه با یکدیگر علائم کاملاً مشابه ای ندارند ، اثر بهبودی یکسانی خواهند داشت .

امروزه یکی از بیماریهای مهم و فراگیر در صنعت آبی پروری، بیماری ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی است که کشورمان ایران رانیز از آثار مخرب خود درامان نگاه نداشته است . لذا بررسی تاثیر مناسب و قطعی دارویی که هزینه و اثرات مخرب زیست محیطی را نداشته باشد، مورد اهتمام کارشناسان مربوطه می باشد .

استرپتوکوکوزیس در گونه های ماهی تیلپیا ، کفال های خاکستری (Mugil cephalus) and Liza ramada و silver carp مشاهده شده است (Hubbert,1989) . همچنین ماهی قزل آلائی رنگین کمان پرورشی نیز مبتلا به استرپتوکوکوزیس شده است (Eldar et al., 1999) .

اولین گزارش وقوع بیماری ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی در گونه های تیلپیا (Oreochromis spp.) و Sarotherodon spp در ژاپن گزارش گردید . عوامل استرس زای مختلفی همچون افزایش بیش از حد دمای آب ، دستکاریهای نادرست ماهی ، افزایش تراکم ماهی ، تغییرات ناگهانی فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب ، ترکیبات نامناسب غذا و... که ایمنی ماهی را پایین می آورند، باعث بالا رفتن حساسیت ماهی نسبت به ابتلاء به بیماری های مختلف همچون استرپتوکوکوزیس می شوند (Roy P.E. et al.,2009) .

تنظیم فاکتورهای غذای ماهیان از جمله : فاکتورهای بهداشتی و اسید آمینه ها و اسیدهای چرب ضروری برای ماهیان ، به حفظ سلامتی و بالا بردن سیستم ایمنی بچه ماهیان کمک زیادی می کند .

باتوجه به تسلط شرکتهای داروسازی و طب رایج در گستره جهانی ونیز عدم توجه دولتها به طب هومیوپاتی، امکانات و مقالات محدودی در دسترس می باشد. درعین حال داروهای هومیوپاتی به جهت اینکه طبیعی هستند، بسیار ارزان و در صورت تجویز صحیح، اثر درمانی موثر و دایم خواهند داشت. داروهای هومیوپاتی در رسیدگی جنسی، رشد لاروها، افزایش تولید آبیان موثرند. این داروها تولید کورتیزول که باعث ایجاد استرس در آبی می شود را کاهش می دهند. ضمناً مصرف این داروها مطبوع است زیرا اغلب بسیار رقیق، در اندازه های کوچک و بدون تماس بادست مورد استفاده قرار می گیرند و بدون ایجاد عوارض جانبی هستند (Maria do ...2011) . گروهی از پزشکان کانادایی استرپتوکوکوزیس را در گروهی از ماهی فروشان سالخورده که حدود ۴ نفر از آنها به بیماریهای دیگری همچون دیابت و روماتیسم قلبی نیز مبتلا بودند، گزارش کردند (Mitchell 1997) . (R.Weinstein et al.,

Rosmarinus officinalis که از گیاه سبزی با برگهای سوزنی و خوشبو بنام رزماری تهیه میشود ، همچون سایر داروهای هومیوپاتی، می تواند در دزهای مختلف 6x, 12x, 30x, 200x, 1M, LM,... تهیه و تجویز گردد . به عنوان مثال دوز 6x داروبه معنی ۶ بار به مقدار یکدهم رقیق شده است . دوز C30 به معنی ۳۰ بار به مقدار یک صدوم رقیق شده و دوز 1M به معنی ۱ بار به مقدار یک هزارم رقیق شده است .

در این پروژه بدلیل اینکه رزمارینوس آفیسینالیس درایران موجود نبود ، از کشورکانادا و از شرکت Heliolab که تنها دوز Q یا خالص این دارو موجود بود ، خریداری و برای پروژه ارسال گردید .

Streptococcinum از چرک ناشی از زخمهای ایجاد شده در اثر ابتلا به استرپتو کوکوزیس ، تهیه می گردد و می تواند در دوزهای مختلف و با رقتهای متفاوت تهیه و تجویز گردد . از دوز C30 که یک دوز یا توان دارویی متعادل است ، بعنوان تنها دوز موجود در این پروژه ، مورد استفاده قرار گرفت .

Hepar sulfure سولفید ناخالص کلسیم است که با گلهای زرد خوش رنگ سولفور در لایه داخلی سفید رنگ صدف ایستر سوزانده شده وبه شکل محلول در می آید و برای درمان بسیاری از علائم بیماریها همچون بوجود آمدن چرک در گلو و سینوسها در بیماریهای ویروسی و باکتریایی (Streptococcus) ، موثر واقع می شود .

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مراحل اجرای پروژه

این پروژه در آزمایشگاه مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، با ۶ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار در زوکهای ۳۰۰ لیتری، اجرا شد. هر یک از زوکها حاوی ۴۰ بچه ماهی قزل آلائی 25 ± 5 گرمی بودند به مدت ۱۰ روز انجام شد.

سوش خالص باکتری *S. iniae*، در محیط کشت Sheep Blood Agar توسط بخش بهداشت و بیماریهای دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز تهیه گردید و در شرایط استاندارد، به محل اجرای پروژه ارسال شد. تعداد باکتریها با روش colony counting به کمک رقتهای سریال و توسط اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. ۵۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان 25 ± 5 گرمی از مرکز پرورش ماهیان سردآبی (شرکت قزل ماهی بنار) در ارومیه خریداری شد و با وانت حمل بچه ماهی، حاوی تانکر یک متر مکعبی دوجداره پلی اتیلنی مجهز به سیستم تزریق اکسیژن خالص با آب چاه ۱۲ درجه سانتیگراد، به مرکز تحقیقات آرتمیای کشور (ارومیه) منتقل گردید.

بچه ماهیان بمدت ۳ روز جهت سازگاری با شرایط پرورش، نگهداری شدند، روز چهارم بچه ماهیان با اسانس گل میخک به مقدار ۱۰۰ گرم در لیتر بیهوش و با تزریق باکتری (تعداد 10^6 در هر میلی لیتر از سرم فیزیولوژی) به داخل صفاق بچه ماهیان بطور همزمان انجام گردید.

پس از ۲۴ ساعت علائم بیماری از جمله شنای نامتعادل، بی اشتها، بی اشتها، بی اشتها و ملتهب شدن محل اتصال باله ها و آبششها بروز کرد. با مشاهده نشانه بیماری، تجویز دارو آغاز شد و تا ۱۰ روز ادامه یافت.

تیمار اول: اریترومايسين ۲۰ درصد خریداری شده از شرکت تولیدی داروهای دامی، به مقدار ۰/۱ گرم به ازاء هر کیلو وزن ماهی زنده، همراه با غذا به مدت ۱۰ روز، هر صبح تجویز گردید.

تیمار دوم: قراردادن یک گرانول Streptococcinum C30 خریداری شده از نمایندگی شرکت Heliose انگلیس در تهران، هر روز صبح به صورت حمام دادن، در آب قرار گرفت. [هر روز به جهت حمام درمانی و ایجاد تماس ماهی با دارو، ساعت ۸ صبح به مدت نیم ساعت چرخش آب قطع شده و یک گرانول از دارو در آب قرار گرفت و در ساعت ۸/۳۰ مجدداً گردش آب برقرار شد.

تیمار سوم: قراردادن یک قطره از پوتنس (توان دارویی) Q (عصاره خالص) *Rosmarinus officinalis* خریداری شده از شرکت Heliolab در کانادا هر روز صبح در آب، به صورت حمام دادن و به روش بالا انجام شد.

تیمار چهارم: قراردادن یک گرانول از داروی Hepar sulphur C30 خریداری شده از نمایندگی شرکت Heliose انگلیس در تهران در آب، هر روز صبح به صورت حمام دادن به روش یاد شده انجام گردید.

تیمار شاهد: بدون تزریق باکتری و بدون تجویز دارو مورد بررسی قرار گرفت.

تیمار کنترل مثبت: با تزریق استرپتوکوکوس اینیایی ولی بدون تجویز دارو اجرا شد.

علائم درمانگاهی ایجاد شده در بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان ، مورد بررسی و ثبت قرار گرفت . فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محیط پرورش (دما، اکسیژن و شوری) نیتريت، نیترات، قلیائیت، بی کربنات و گاز کربنیک توسط دستگاه پرتابل استاندارد WTW اندازه گیری و ثبت گردید (جدول یک) . بیومتری بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان در ابتدا و انتهای کار انجام شد و تلفات بچه ماهیان ثبت گردید (جدول ۲) .

دارو درمانی راس ساعت ۸/۰۵ هر روز صبح انجام شده است. خونگیری از ورید دمی بین مهره ها، بین باله مخرجی و مخرج با سرنگ انسولین هپارینه انجام شد و قبل از خونگیری ، محل تزریق با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده بود. در این مطالعه از روش آزمایش مستقیم کشت خون استفاده شده است. نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و تست آماری آزمون دانکن در سطح ۵ درصد و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.



تصویر شماره ۱ : آزمایشگاه محل اجرای پروژه ، زوکهای مورد آزمایش ، اتصالات آب ، هوا دهی به زوکها در محوطه قرنطینه



تصویر شماره ۲ : زوکهای حاوی تیمارها با شماره و اسامی داروهای تجویزی روی هر یک از آنها

۲-۲- روش آماده سازی دارو جهت تزریق به بچه ماهیان

شرایط کار آزمایشگاه در موقعیت استریل و استاندارد و با رعایت کلیه اصول بهداشتی بوده است .
به هر ماهی به تعداد 10^6 باکتری در یک میلی لیتر از سرم فیزیولوژی به داخل صفاق تزریق شده است .



تصویر شماره ۳: تزریق همزمان باکتری به بچه ماهیان

بهمن ماه در ارومیه دمای هوا زیر صفر است در حالیکه آلودگی تجربی قزل آلا به این باکتری لازم بود در دمای حدود ۲۰ درجه سانتیگراد صورت گیرد که بوسیله هیترهای برقی دمای آب به این درجه رسید .

۲-۳- بیومتری بچه ماهیان

اندازه گیری طول و وزن بچه ماهیها در ابتدا و انتهای کار صورت گرفت .

تغذیه بچه ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان :

غذای اکستروژ شده بچه ماهیهای قزل آلا (FFT₁) با استاندارد ۲۰۰۰-۹۰۰۱ ISO با کیفیت بهداشتی از شرکت فرادانه خریداری گردید و از این غذا به مقدار ۲ درصد وزن بدن ، ۳ نوبت در روز، در ساعات ۸/۳۰ ، ۱۲ ، ۱۷ ، به بچه ماهیان داده شد . هر روز در مجموع ۴۵ گرم غذا ، بمقدار ۱۵ گرم در هر نوبت مورد تغذیه بچه ماهیهای قزل آلا قرار داده شد و جهت افزایش رشد بچه ماهیها، هر روز ۲ گرم غذا به سهمیه غذای روزانه اضافه گردید .
خروجی آب زوکهای حاوی بچه ماهیان با در نظر گرفتن شرایط بهداشتی و عدم نشست آب از لوله خروجی به محیط آزمایشگاه انجام شد . ضمناً آب خروجی ، با کلاً ۲۰۰ میلیگرم در لیتر ضد عفونی می گردید سپس وارد کانال خروجی سالن می شد .

۴-۲- بررسی میکروسکوپی بافتهای بچه ماهی بیمار

از قلب ، کلیه ، کبد و آبشش بچه ماهیان قزل آلالی بیمار زنده، نمونه برداری صورت گرفت و بافتها در محلول استاندارد دیویدسون فیکس شدند. بافتها پس از تهیه بلوکهای پارافینه و برش آنها، با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند .

۳- نتایج

۳-۱- فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی محیط آزمایشی پرورش ماهی قزل آلا

دمای آب :

دمای آب زوک های حاوی بچه ماهیان قزل آلا در این پروژه 17 ± 1 درجه سانتیگراد در طول اجرای پروژه بود.

اکسیژن محلول (Do) :

اکسیژن محلول در روز اول ۶/۸ و در روزهای بعد ۷ میلی گرم در لیتر تنظیم شده است ..

نیتريت (No²) :

مقدار نیتريت در دو روز اول متغیر و سپس به مقدار ثابت ۰/۰۴ppm رسیده است .

نترات (No₃) :

نترات به مقدار ثابت ۰/۱ میلی گرم در لیتر در طی اجرای پروژه بوده است .

آمونیاک (NH₃) :

آمونیاک به مقدار ثابت <۰/۰۵ میلی گرم در لیتر ثبت شده است .

قلیائیت (Alkalinity) :

قلیائیت به مقدار ۲۸۲-۳۰۰ میلی گرم در لیتر در طی اجرای پروژه متغیر بوده است .

بی کربنات (Hco₃) :

بی کربنات به مقدار متغیر ۲۵۸-۲۸۶ میلی گرم در لیتر در طول اجرای پروژه ثبت شده است .

گاز کربنیک (Co₂) :

گاز کربنیک به مقدار ۰-۳ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شده است .

جدول شماره ۱ : ثبت روزانه عوامل فیزیکی و شیمیایی آب

روزهای آزمایش عوامل	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
water temp ° c	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	17	17	17	16	16
Do	6.8	7	7	7	7	7	7	7	7	7
N-No2 ppm	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
No2 pm	0.05	0.07	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
No3 mg/l	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
NH3 mg/l	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
NH4 mg/l	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
-NH4 mg/l	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
Alkalinity mg/l	282	290	302	302	302	302	300	300	300	300
Hco3 mg/l	262	258	286	286	285	286	284	280	286	285
Co3 mg/l	20	32	16	16	16	16	16	16	16	16
PH	6.8	6.8	6.8	7	7	6.9	7	7	7	7
Co2 mg/l	1	0	1	2	1	1	1	2	2	3

در تصویر ذیل نمونه بچه ماهی قزل آلالی رنگین کمان بیومتری شده به طول ۱۵٫۵ سانتیمتر و وزن ۲۶ گرم، در انتهای پروژ، نشان داده شده است .



تصویر شماره ۷: بیومتری بچه ماهی قزل آلالی رنگین کمان بیمار

۲-۳- بررسیهای آماری

۱-۲-۳- تلفات تیمار و تکرارها طی ده روز اجرای پروژه

تیمار شاهد ۱۶ عدد ، تیمار ۱ (اریترومایسین) ۵۲ عدد، تیمار ۲ (استرپتوکوکسینوم) ۶۹ عدد، تیمار ۳ (رزمارینوس آفیسینالیس) ۸۱ عدد، تیمار ۴ (هپارسولفور) ۶۱ عدد و تیمار کنترل مثبت ۹۵ عدد.

از نظر تلفات ، تیمار ۳ (حاوی Ros-off) نسبت به تیمار کنترل مثبت ، اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($P < 0.05$). بین تیمار ۱ (حاوی اریترومایسین) نسبت به تیمار ۳ (حاوی Ros-off Q) و همچنین سایر تیمارها نیز اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.05$).

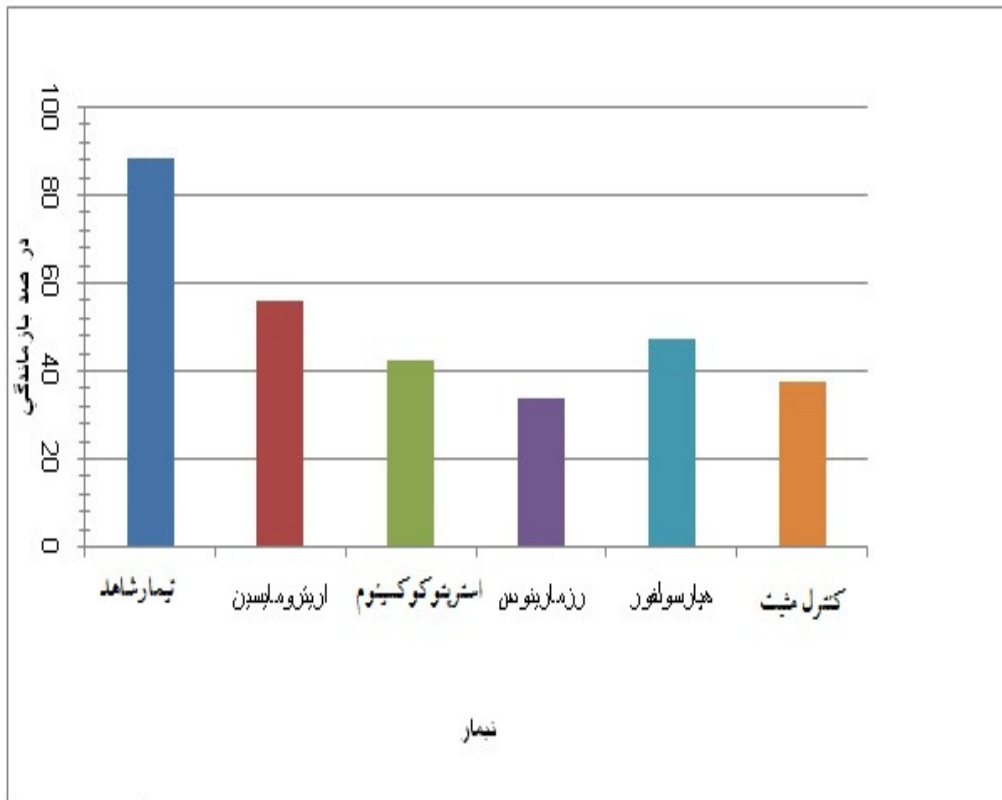
همچنین بین تیمار کنترل مثبت و سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده می گردد ($P < 0.05$). بین کنترل مثبت و کنترل منفی نیز اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$). بین تیمار ۲ (حاوی استرپتوکوکسینوم) و تیمار ۴ (هپارسولفور) اختلاف معنی داری مشاهده نشده است ($P > 0.05$). بین تیمار ۳ (حاوی رزمارینوس آفیسینالیس) و کنترل مثبت نیز اختلاف معنی داری وجود ندارد ($P > 0.05$).

جدول شماره ۲: ثبت تلفات روزانه بچه ماهیان قزل آلابی رنگین کمان در تیمارهای مختلف

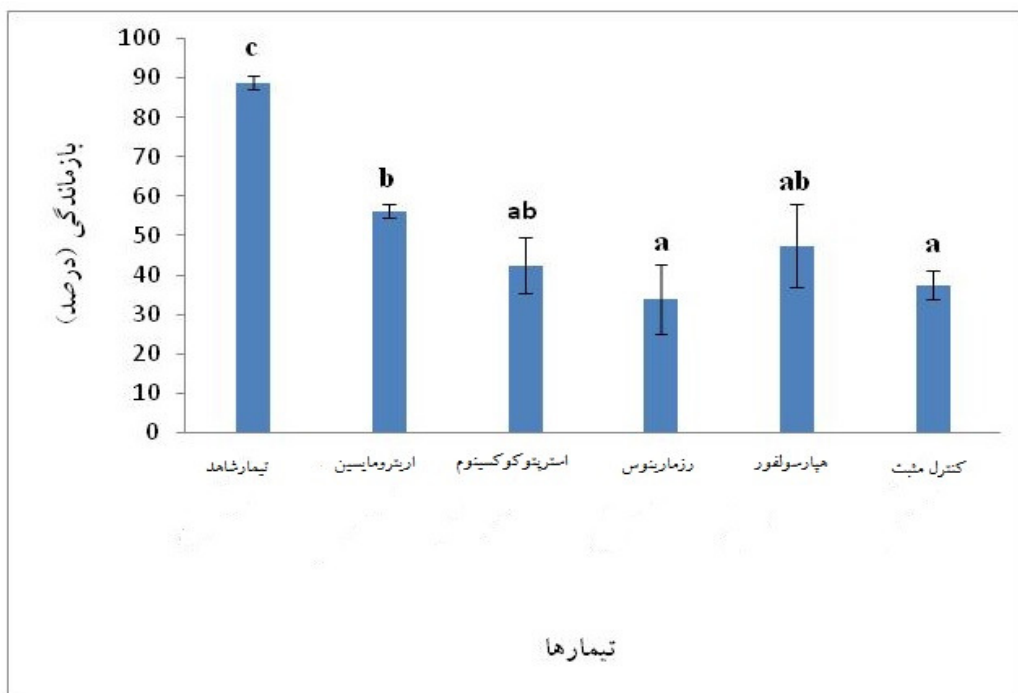
تاریخ	تیمار شاهد	تیمار ۱ (اریترومایسین)	تیمار ۲ (استرپتوکوکسینوم)	تیمار ۳ (رزمارینوس)	تیمار ۴ (هپارسولفور)	تیمار کنترل مثبت
۹۱/۱۰/۱۰	۴	۱۴	۱۵	۱۷	۱۶	۱۵
۹۱/۱۰/۱۱	۳	۵	۵	۸	۱۰	۷
۹۱/۱۰/۱۲	۲	۶	۷	۶	۶	۸
۹۱/۱۰/۱۳	۰	۵	۷	۶	۴	۷
۹۱/۱۰/۱۴	۰	۵	۵	۵	۴	۴
۹۱/۱۰/۱۵	۰	۴	۳	۶	۳	۵
۹۱/۱۰/۱۶	۱	۳	۵	۵	۴	۶
۹۱/۱۰/۱۷	۲	۳	۴	۵	۴	۵
۹۱/۱۰/۱۸	۱	۱	۴	۴	۲	۳
۹۱/۱۰/۱۹	۰	۲	۳	۳	۲	۵
۹۱/۱۰/۲۰	۰	۱	۲	۳	۲	۴
۹۱/۱۰/۲۱	۲	۱	۳	۴	۱	۵
۹۱/۱۰/۲۲	۰	۰	۱	۳	۱	۵
۹۱/۱۰/۲۳	۰	۲	۱	۳	۱	۴
۹۱/۱۰/۲۴	۱	۰	۲	۲	۱	۶
۹۱/۱۰/۲۵	۰	۰	۲	۱	۰	۵
مجموع	۱۶	۵۲	۶۹	۸۱	۶۱	۹۵

جدول شماره ۳: درصد بازماندگی در هر تکرار، از هر تیمار

تیمار کنترل تیمار کنترل مثبت	تیمار ۴ هپارسولفور	تیمار ۳ رزمارینوس	تیمار ۲ استرپتوکوکسینوم	تیمار ۱ اریترومایسین	تیمار شاهد شاهد	تیمار تکرار
۳۵	۴۰	۲۷,۵	۴۷,۵	۵۷,۵	۹۰	۱
۴۰	۵۵	۴۰	۳۷,۵	۵۵	۸۷,۵	۲
۳۷,۵	۴۷,۵	۳۳,۷۵	۴۲,۵	۵۶,۲۵	۸۸,۷۵	میانگین در صد بازماندگی



نمودار شماره ۱: درصد بازماندگی ماهیان قزل آلا در تیمارهای مورد آزمایش



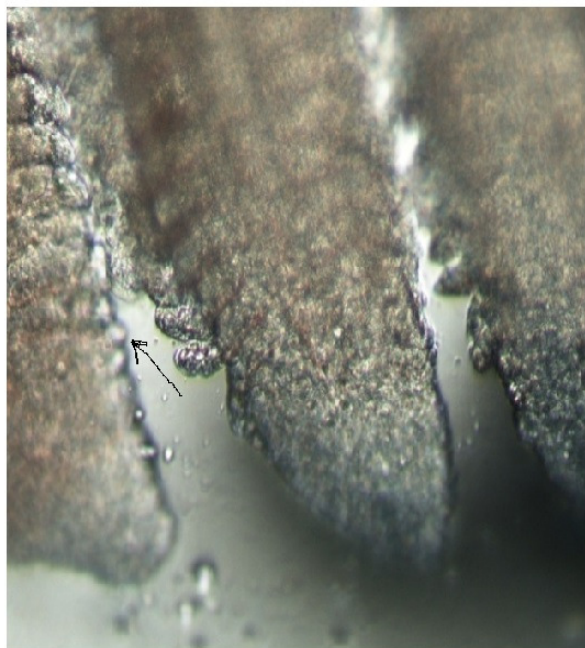
نمودار شماره ۲: مقایسه درصد بازماندگی بچه ماهیان در تیمارهای مورد آزمایش

حروف یکسان نشان دهنده اختلاف غیر معنی دار ($P > 0/05$) و حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) هستند.

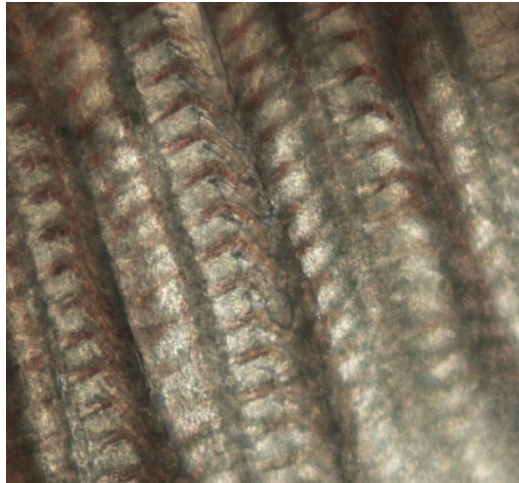
۳-۳- نتایج بالینی و آسیب شناسی

در بررسی بالینی بچه ماهیان بیمارزنده: خونریزی در اطراف وزیرچشم، زیر باله ها، زیر شکم، زیر مقعد، آبششها و پرخونی در اندامهای مختلف و نیز آگزوفتالمی یک طرفه و دو طرفه چشمها عمومیت داشت. همچنین در بچه ماهیان در حال تلفات، خونریزی زیر چشم، زیر باله ها، آبششها و مخرج، خونریزی در امعاء و احشاء مشاهده گردید.

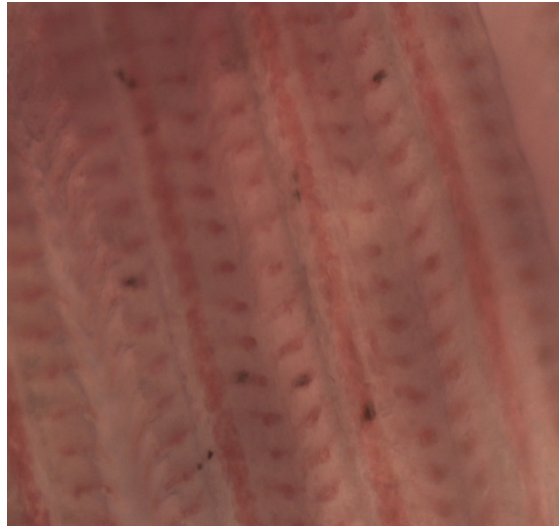
در بررسی میکروسکوپی، خونریزی در آبششها، قلب، کبد و کلیه بچه ماهی بیمار، نکروز، لکه های خونریزی داخلی، پرخونی و هایپرپلازی در آبششها مشاهده گردید که در عکسهای زیر (۸-۱۸) نمایان است (با لنز ۱۰۰ ایکس). سپتی سمی و نقاط ملانوزه روی قلب و کبد قابل مشاهده بودند و نیز ملا نوما کروفاژها در بافت کلیه، آبشش، کبد و روده مشاهده شدند. در بررسی ماکروسکوپی، کلیه سیاه لجنی رنگ و حالت پرخونی بافت کلیه مشخص بود و در بررسی میکروسکوپی آن، ملانوما کروفاژها و نقاط ملانوزه در کلیه ملاحظه گردید. در خون بچه ماهی، تعداد متعددی باکتری *S.iniae* (تصویر شماره ۱۵) مشاهده شد. پر خونی در همه قسمتهای بدن مشاهده گردید. بی اشتهایی، میزان و نحوه تنفس نامطلوب، رنگ بدن ملانوزه و تیره رنگ بود، سرپوش آبششی باز و آبششها و محوطه بطنی پر خون بود، پر خونی در قاعده باله ها مشاهده می شد، معده و روده ها خالی بود و کبد، کیسه صفرا و طحال متورم بودند، کیسه شنا و قلب دارای خونریزی بودند.



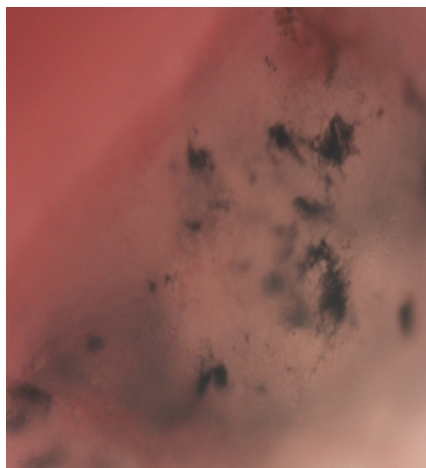
تصویر شماره ۸: نکروز و هایپر تروفی و هایپر پلازی لاملاها در آبششها



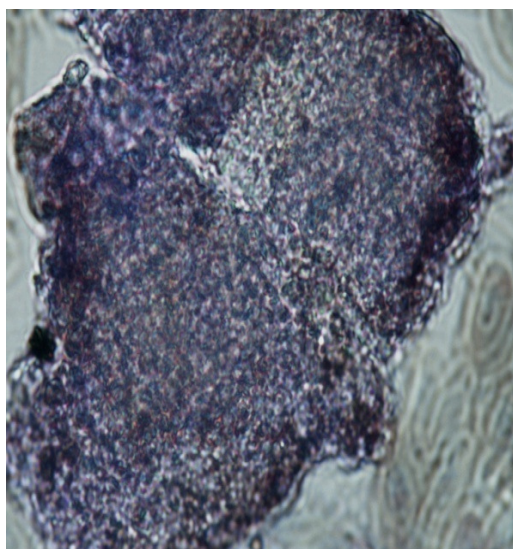
تصویر شماره ۹: پرخونی و هایپرپلازی لاملاهای ثانوی در آبشها



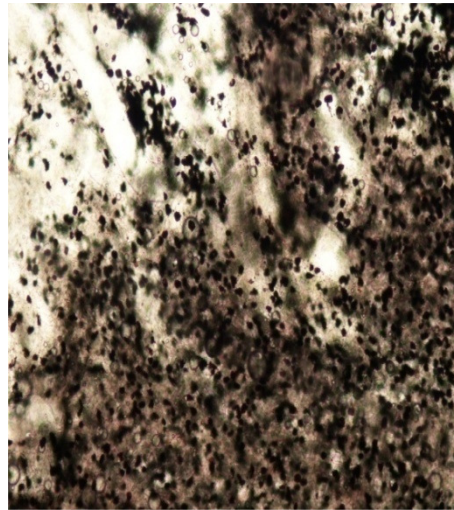
تصویر شماره ۱۰: هایپرپلازی و پرخونی در آبشها



تصویر شماره ۱۱ : نقاط ملانوزه روی قلب (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین)



تصویر شماره ۱۲ : ملانوما کروفازها در کبد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین)

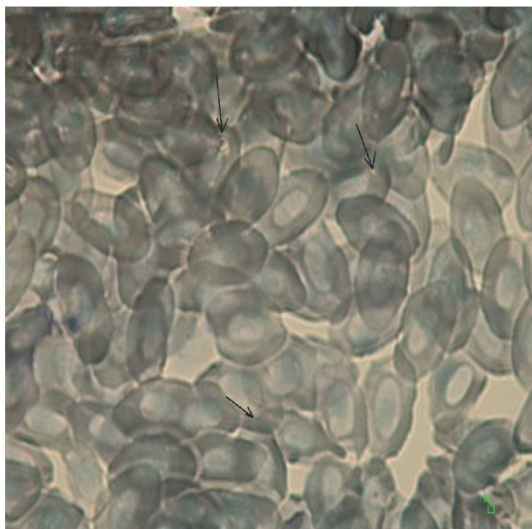


تصویر شماره ۱۳: نقاط ملانوزه در کلیه (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین)



تصویر شماره ۱۴: پرخونی ناحیه ای در کلیه

پرخونی در آبششها، کبد و طحال بچه ماهیان قزل آلالی رنگین کمان بیمار نیز وجود داشت. حالت پرخونی تقریباً در همه اندامهای ماهیهای بیمار قابل مشاهده بود.

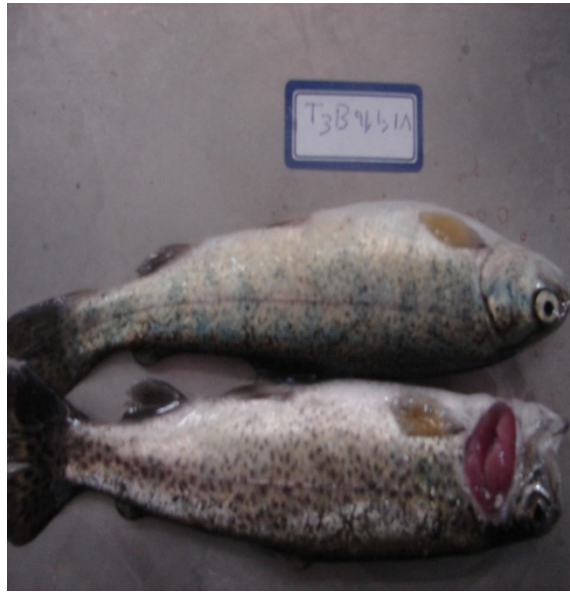


تصویر شماره ۱۵ : *S.iniae* در خون بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان

تعداد زیادی از این باکتری در خون بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان بیمار، موجود بود .
بچه ماهیان بدلیل گریزازنور، به عمق زوکها میرفتند و تنها در صورت استرس و بروز علائم بیماری ، به سمت خروجی و یا به سطح آب می آمدند .



تصویر شماره ۱۶ : ماهیهای مرده و در حال مرگ به سطح آب زوک آمده اند



تصویر شماره ۱۷: پر خونی درقاعده آبشها، سطح پوست و اگزوفتالمی چشمها



تصویر شماره ۱۸: امعاء و احشاء متورم و پر خون بچه ماهی بیمار

۴- بحث و نتیجه گیری

با توجه به امکانات موجود، از انجام آنتی بیوگرام که لازمه تعیین دوز دارویی است، صرف نظر شد، درحالیکه اگر امکان انجام اینکار فراهم می شد، می باید هر یک از سه داروی هومیوپاتی با دوزهای Q, C6, C12, C30, C200 & 1M روی دیسک آنتی بیوگرام آزمایش می شد و سپس داروی موثر مورد استفاده قرار می گرفت. به دلیل محدودیت وجود داروی هومیوپاتی در ایران، تنها از Hep-s 30، R.officinalis Q و Strep. 30 استفاده شد. در این پروژه، تیمار ۳ (حاوی Q Ros-off) اختلاف معنی داری با تیمار ۲ (حاوی Strep. 30) و تیمار ۴ (حاوی Hep-s 30) داشت ($P < 0/05$) که این اختلاف معنی دار می تواند بدلیل بالا بودن دوز این دارو باشد. چراکه این دارو خالص بوده است درحالیکه دو داروی دیگر هومیوپاتی، به نسبت ۳۰ مرتبه و ۱۰۰ بار رقیق شده اند (C30).

R.officinalis اگر با دوزهای کمتر از Q (عصاره خالص)، همچون 1M، C200، C30 و C12 مورد استفاده قرار می گرفت، امکان داشت نتیجه بهتری حاصل گردد.

در تجویز داروهای هومیوپاتی، دوز C30 دوز متعادلی است و در این پروژه نیز از داروهای Hep- Streptococcinum C30، استفاده شد.

این پروژه اولین بار است که در جهان اجرا شده است. تنها مقاله ای که مورد استفاده این پروژه قرار گرفته است، در مورد استفاده از رزمارینوس آفیسینالیس در درمان استرپتوکوکوزیس در ماهی تیلاپیا در سال ۲۰۰۴ بوده است (S.Abutbul et al., 2004). در این مقاله، ۶ رقت متفاوت از محلول Ros-off تهیه و با آزمایش آنتی بیوگرام روی S.iniae تاثیر داده شد که همه رقتهای تهیه شده از این دارو در جلوگیری از رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی موثر بودند.

در مورد دو داروی دیگر (Hep-s and streptococcinum) که در این پروژه مورد آزمایش قرار گرفته است، قبلا در هیچ پروژه یا مقاله ای مورد استفاده قرار نگرفته است. در این پروژه، از بین ۳ داروی هومیوپاتی Hep- Ros-off، streptococcinum، s، داروی Hep-s از نظر درصد بازماندگی بچه ماهیان قزل آلا نسبت به سایر تیمارها، به درصد بازماندگی اریترومايسين، نزدیکتر است. بین درصد بازماندگی Hep-s C30 و streptococcinum C30 نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشده است ($P > 0/05$). در صورتیکه در مورد دوزهای مختلف این دوداروی هومیوپاتی آنتی بیوگرام انجام شود، احتمالا می توان هر دو این داروها را با تعیین دوز مناسب، بعنوان داروی موثر در درمان استرپتوکوکوزیس معرفی کرد. Streptococcinum در هومیوپاتی بعنوان یک nosod است. به این معنی که منشاء آن ترشحات عفونی ناشی از استرپتوکوکوزیس است. داروهای nosod هومیوپاتی یا مشابه درمانی، نسبت به داروهای مناسب دیگر هومیوپاتی، اثر بهتری در درمان بیماریهای مرتبط خواهند داشت (صالحی م، ۱۳۹۰). Hep-s نیز در هومیوپاتی بنام چرک خشک کن محسوب می شود به این معنی که چرک

ایجاد شده در اثر آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی را خشک و یا از بدن موجود زنده دفع میکند (صالحی م، ۱۳۹۰).

مهدی سلطانی و همکاران، ۱۳۸۷، نیز در تحقیقی روی مطالعه آسیب شناسی تجربی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در قزل آلای رنگین کمان با غلظتهای مختلف باکتری شامل $10^3 \times 1/5$ تا $10^8 \times 1/5$ ، که پس از جداسازی و تخلیص باکتری، آنرا *S.iniae* معرفی کردند، علائم بیماری حاصل از تزریق داخل صفاقی این باکتری را بر حسب غلظت باکتری تزریق شده، علائمی بالینی از جمله: بیرون زدگی چشم، بیرون زدگی مخرج، تورم شکم، تیرگی پوست و کاهش اشتها، گزارش نمودند و در تیمارهای با غلظتهای بالاتر باکتری، علائم شدیدتری همچون: پرخونی و نکروز بافت کبد، پرخونی و خونریزی و تورم منتر، خونریزی در شبکه چشم، اتساع کپسول بومن و دژنراسانس توبولهای ادراری کلیه، هایپرپلازی رشته های ثانویه آبششها، پرخونی و خونریزی طحال همراه با افزایش مراکز ملانوما کروفاژی و نیز پرخونی در پریکارد قلب را ذکر نمودند (سلطانی مهدی، ۱۳۷۶).

برای درمان علائمی همچون: انواع درها، ضعف همراه با درد، سرفه، برونشیت، چرک در زخمهای کوچک، سرفه همراه با خارش، احتقان گلو، چرک در کلیه و غشاهای مخاطی، بکاربرده و نتایج خوبی گرفته است (Nash, 2013).

S.Abutbul *et al.*, 2004 نشان داد که ماده استخراج شده از برگ Ros-off اثر ضد باکتریایی روی *S.iniae* داشته است. در عملیات آزمایشگاهی، تغییرات شیمیایی در مواد مختلف مستخرج از این گیاه دیده شد. در آنتی بیوگرام، محلول شماره یک که با استات اتیل تهیه شده بود، بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را در وزن خشک 37.5mm/mg طی ۳۶ ساعت در آنکوباسیون، در پیشگیری از رشد باکتری نشان داد.

آنالیز شیمیایی روغن محلولهای مختلف تهیه شده نشان داد که محلول شماره های مورد آزمایش 1, 8, 12 مقدار زیادی از مواد محتوی 1,8-cineol, Camphor and o-pinene terpenes همچون فنل یا carnosic و اسید رزمارینیک دارند.

S.Abutbul *et al.*, 2004 روی اثرات ضد باکتری *R.officinalis pinene, limonene, 1,8-cineol, camphor, terpineol-4-ol* (a and a-terpineol) تحقیق کردند و به این نتیجه رسیدند که مواد *camphor, terpineol-4-ol and a-terpineol* در مقابل باکتریهای گرم منفی بیماریزای گیاهی *Eriwinia herbicola* و *Pseudomonas syringae* موثر بوده است.

S.Abutbul *et al.*, 2004 همچنین نشان دادند که مواد *terpineol-4-ol* اثر ضد باکتریایی خوبی در برابر *Haemophilus influenza, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumonia, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli* داشته است.

اسید رزمارینیک (پلی فنل مهم از Ros-off بدست آمده نیز یک عامل ضد باکتری است (S.Abutbul *et al.*, 2004). در آزمایشهای انجام شده با جانشین کردن غذای ماهی با اتیل استات استخراج شده از برگ گیاه

رزمارینوس به میزان ۴/۲ درصد یا پودر خشک تمام برگ، به میزان ۷/۶ درصد از *R. officinalis*، این غذاها بطور وضوح مرگ و میر ماهیان مبتلا به *S. iniae* ($p < 0/003$ and $p < 0/012$) برای مواد استخراج شده و پودر برگ را کاهش می دهند و هیچ اثر سمی نیز برای ماهی تیلاپیا ندارند.

آزمایشی نیز برای مقایسه مرگ و میر ماهی تیلاپیای بیمار بامواد ناشی از *R. officinalis* یا پودر برگ آن واکسی تتراسایکلین انجام شد، درحالیکه اثرات ضدباکتریایی روغن خالص *R. officinalis* به اثبات رسیده است، اظهار کردند که اطلاعات از خصوصیات ضدباکتریایی مواد استخراج شده وکل این گیاه بسیار کم است. اما بهرحال نتایج مطالعات انجام شده، خاصیت ضد باکتریایی گیاه را نشان داده اند.

افزایش مقاومت باکتریها در برابر آنتی بیوتیکها و تجمع وماندگاری مواد شیمیایی در محیط زیست و بدن ماهی (S. Abutbul et al., 2004)، باعث محدودیت استفاده از آنتی بیوتیکها و مواد شیمیایی دیگر در آبرزی پروری شده است. نتایج مطالعات حاکی از توانایی *R. officinalis* به عنوان یک محلول سبز برای کنترل بیماری ناشی از *S. iniae* بود که میتوان برای درمان استرپتوکوکوزیس در پرورش ماهی ارگانیک از آن استفاده کرد (S. Abutbul et al., 2004).

Pier Giorgio Peiretti et al., 2012 نیز در مقاله ایی روی اثر روغن رزماری بر حفظ فیله های ماهی قزل آلالی رنگین کمان منجمد شده، از باکتریها کار کردند. اثر سه غلظت ۱، ۲، و ۳ درصد از روغن رزماری را برای افزایش حفاظت گوشت فیله منجمد شده ماهی قزل آلالی رنگین کمان، مورد آزمایش قرار داد و نتایج خوبی بدست آوردند به این معنی که فیله ها بدون آلوده شدن به باکتری در شرایط انجماد، به بازار عرضه شدند. در تشخیص سریع باکتری *S. iniae* از طریق تکنیک آنتی بادی فلورسنت گونه های مختلف ماهیان مبتلا به استرپتوکوکوزیس همچون ماهیان خاویاری، ممکن است دارای علائمی همچون شنای نامتعادل، بیحالی، تیره گی پوست، اگزوفتالمی یک طرفه یا دو طرفه، سفید شدگی سیاهی چشم، خونریزی در اطراف یک یا هر دو چشم، تورم شکم و زخم شدن نواحی مختلف بدن، باشند (Klesius et al., 2006).

در تاسماهیان مبتلا به بیماری استرپتوکوکوزیس، ممکن است قبل از مرگ، یک یا چند علامت بیماری دیگر از قبیل خونریزی در صفحات آبششی یا در پایه باله ها و تورم مخرج دیده شود. اما ماهی بیمار امکان دارد هیچ علامت بیماری قبل از مرگ نشان ندهد. در بررسی اندامهای داخلی تاسماهی بیمار: خونریزی در حفره شکم، طحال بزرگ پر خون، کبد بی رنگ، تورم اطراف قلب و کلیه ها، مغز عفونی و سیستم عصبی بیمار، مشاهده گردید که بیانگر شنای نامتعادل مکرر در ماهی می باشد (Klesius et al., 2006).

پس از جدا سازی باکتری از ماهی بیمار، لازم است یک آزمایش حساس همچون آنتی بیوگرام برای تشخیص داروی موثر از بین برنده باکتری انجام شود. بعنوان مثال، باکتریهای گرم مثبت همچون *Streptococcus iniae*، در اثر تجویز اریترومايسين از بین می روند. مقدار ۱/۵ گرم از اریترومايسين در یک پانده (۴۵۳/۵۹ گرم) غذا بمدت ۱۰ تا ۱۴ روز، باعث درمان بیماری استرپتوکوکوزیس می شود. آموکسی سیلین نیز در درمان بیماری

استرپتوکوکوزیس ماهی تیلاپیا و ماهی باس خورشیدی موثر بوده است. بطوریکه از طریق غذا، به مقدار ۸۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن ماهی (۳/۶ گرم در ۴۵۳/۵۶ گرم از غذا) به مدت ۸ تا ۱۲ روز، موجب درمان بیماری گردید (Roy P.E. et al, 2009).

پیشگیری بهتر از درمان است. بطوریکه کم کردن استرسهای متفاوت همچون بهبود شرایط فیزیکی شیمیایی آب، مدیریت درست شرایط پرورش ماهی و رعایت بهداشت همه جانبه در طول پرورش ماهی، از ابتلا ماهیان به بیماریها به مقدار زیادی می کاهد. اما البته استرس ناشی از افزایش دمای محیطی و آب، یک عامل ناگهانی است که ممکن است موجب ابتلا ماهیان به بیماریهای گوناگون شود. عفونت به باکتری استرپتوکوکوس بطور مکرر بخصوص طی استرسهای بالا، مشکل ساز است. این باکتری به سرعت منتشر می شود. بطوریکه از طریق دهان ماهی در ماهیان هم جنس خوار، از طریق خوردن ماهیان آلوده به باکتری، مبتلا می شوند. بنابراین می باید غذا و موارد مشکوک به بیمارهای دیگر را در آزمایشگاه میکروبیولوژی، آزمایش کرد.

مواد محرک ایمنی همچون بتا گلوکن و نوکلئوتیدها را به غذای ماهی اضافه می نمایند تا بازماندگی جمعیت کوسه ماهی و ماهیان زینتی را افزایش دهند (Roy P.E. et al, 2009).

Roy P.E. et al در سال ۲۰۰۹ در ژاپن پس از بررسی روی باکتری های جنس streptococcus، بیان کردند که این باکتریها در آب و در لجن نیز در طی تابستان فعالند. در سیستمهای پرورش ماهی بطور دوره ای ایجاد بیماری می کنند و بخصوص در شرایط استرس بالا، همواره این بیماری ایجاد و تشدید می گردد.

جهت پیشگیری از ابتلا ماهی به بیماری: کاهش استرس، بهبود شرایط فیزیکی - شیمیایی و بهداشتی آب و جلوگیری از در معرض قرار گرفتن ماهی در برابر عوامل بیماریزا، از عمده ترین اقدامات پیشگیری از ابتلا ماهی به بیماری محسوب می شود. اگرچه این باکتریها در آبهای گرم بطور مکرر ایجاد بیماری می کنند، اما در هر موقع از سال نیز می توانند باعث بروز بیماری شوند. با توجه به نتایج این پروژه، داروی های هومیوپاتی هپارسولفور و استرپتوکوکسینوم با تعیین دوز دارویی مناسب توسط آنتی بیوگرام، برای درمان استرپتوکوکوزیس پیشنهاد می شوند.

پیشنهادها

به دلیل اینکه کاربرد داروهای هومیوپاتی در مورد آبریان در ایران تا کنون سابقه نداشته است، پیشنهاد می شود با توجه به ارزان بودن این داروها، موثر و بدون عارضه جانبی بودن آنها، از داروهای مختلف هومیوپاتی که برای همه انواع بیماریهای آبریان مفید و موثر هستند، برای درمان بیماریهای آبریان، با همکاری یک نفر هومیوپات مجرب که به کار تکثیر و پرورش ماهی نیز آشنایی داشته باشد، استفاده گردد. لازم است قبل از استفاده از داروی هومیوپاتی، از طریق آنتی بیوگرام، پوتنس یا توان دارویی داروی مورد نظر مشخص گردد تا اثر دارو بطور دقیق بررسی شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از کلیه همکاران پروژه که در مقاطع زمانی متفاوت از آبان ماه ۱۳۸۸ تا انتهای اجرای پروژه در قسمتهای متفاوت پروژه قبول زحمت فرمودند . تشکر مخصوص از جناب آقایان دکتر مطلبی (ریاست محترم وقت موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور) ، دکتر جلیل ذریه زهرا (مدیریت محترم بخش بهداشت و بیماریهای موسسه) ، دکتر حسن نظام آبادی (مدیریت محترم حوزه ریاست موسسه) ، دکتر محمدرضا مهربابی (عضو محترم هیات علمی بخش بهداشت و بیماریهای موسسه) ، دکتر صیاد بورانی (ریاست محترم وقت مرکز تحقیقات ماهیان سردابی) ، خانم دکتر سلطنت نجار لشگری (کارشناس محترم وقت بخش بهداشت و بیماریهای مرکز تحقیقات ماهیان سردابی) ، دکتر حسین عصائیان (معاونت محترم تحقیقاتی وقت مرکز تحقیقات ماهیان سردابی) و سایر بزرگوارانی که در این مطالعه یاری فرمودند، بی نهایت سپاسگزاری می گردد.

منابع

۱. سلطانی مهدی ، ۱۳۷۶ ، بیماریهای باکتریایی ماهی، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد.(ترجمه)
۲. سلطانی مهدی و همکاران ، ۱۳۸۷ ، مطالعات آسیب شناسی تجربی باکتری استرپتوکوکوس در قزل آلاهی رنگین کمان ، مجله علمی شیلات ایران ، شماره ۴ ، زمستان ۱۳۸۷ .
۳. صالحی مریم، ۱۳۹۰، هومیوپاتی در ماهیان و سایر موجودات زنده، قم، انتشارات معبود، ۲۲۵ صفحه.
۴. صالحی مریم، ۱۳۹۱، برخی از داروهای هومیوپاتی تهیه شده از آبزینان، مجله علمی دنیای آبزینان، شماره ۲۶، صفحات ۱۲۲-۱۹.
5. Eldar A, Ghittino C. , Lactococcus garvieae and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* : similar, but different diseases , Dis Aquat Organ. 1999 May 31 ; 36(3) : 227 – 31.
6. Hubbert, 1989, Bacterial Infections, Streptococcus, Fisheries and Aquaculture Department, FAO Corporate Document Repository, 2009.
7. Kelsius, Phillip et al., 2006, Rapid Detection and Identification of *Streptococcus iniae* Using a Monoclonal Antibody-Based Indirect Fluorescent Antibody Technique, Aquaculture , Aug 31, 2006.
8. Maria do C et al., 2001-2013, Viability of homeopathy in aquaculture production, World Aquacultuer 2011-meeting abstract.
9. Mitchell R. Weinstein et al., Invasive Infections Due to Fish Pathogen, *Streptococcus iniae*, The New England Journal of Medicine (28 Aug, 1997) ; 337: 589-594 .
10. Nash, 2013, Homeopathic Materia Medica by Nash.
11. Pier Giorgio Peiretti et al., 2012, Effects of Rosemary Oil (*Rosmarinus officinalis*) on the Shelf-Life of Minced Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Refrigerated Storage, Foods 2012, 1, 28-39.
12. Roy P.E. et al., 2009, Streptococcal Infections of fish, University of Florida IFAS Extension.
13. S. Abutbul et al., Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*), Aquaculture. Volume 238, Issues 1-4 September 2004, Pages 97-105.
14. Salehi Maryam, (2010). Use of homeopathic remedies as a treatment against fish diseases at The Second International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran-Oct 26-27, 2010

پیوست

ملاحظات مربوط به آزمایشگاه و تجهیزات :

باتوجه به زئونوز بودن استرپتو کوزیس طی انجام آزمایش، ملاحظات زیر مورد توجه قرار گرفت:
-سالن آزمایشگاه بهداشت و بیماریهای مرکز تحقیقات آرتیمیا در مدت حضور بچه ماهیان وانجام آزمایشها ، تحت تدابیر قرنطینه ایی قرار گرفت .

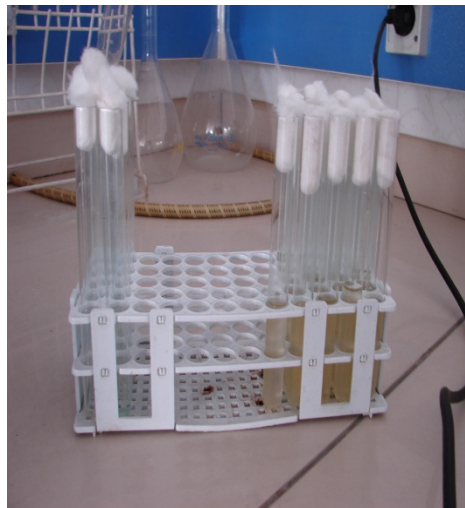
- فقط کارشناسان مرتبط ، به سالن رفت و آمد داشتند .
- برای استریل شدن ته کفش ها، قرار دادن یک حوضچه پراز آب کلرداردر ورودی آزمایشگاه ، و استفاده از لباس، کفش مجزا، دستکش و ماسک الزامی بود .
- آب خروجی زوکها، باکلر ۲۰۰ میلیگرم درلیترضد عفونی شده سپس وارد کانال خروجی سالن می شد .
- قبل وبعد از ورود به سالن، ضد عفونی چکمه ها الزامی بود .
- کلیه کارشناسان مرتبط، به مدت ۱ ماه پس از شروع پروژه ، اجازه رفتن به مزارع تکثیر و پرورش ماهی را نداشتند .
- تمامی تجهیزات مربوط به هر زوک مخصوص همان زوک بوده واز بکار بردن در سایر زوکها و خروج از سالن خوداری شد.
- هر روز تمامی تجهیزات و کف سالن با کلر ضد عفونی می گردید .
- درب سالن در هر رفت و آمد قفل می شد .
- پرسنل ذی ربط موظف برای کنترل جریان آب، هوادهی و حفظ ایمنی ماهیان بودند .



تصویر شماره ۲۱: آب حاوی بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در زوکها با توری روی آنها



تصویر شماره ۲۲: آزمایشگاه بهداشت و بیماریها



تصویر شماره ۲۳: لوله های آزمایش و محلولها

جدول شماره ۴: جدول آنالیز واریانس نرخ بازماندگی بچه ماهیان قزل آلا

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: **SURVIVE RATE**

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4 033.854 ^a	5	806.771	18.663	.001
Intercept	31263.021	1	31263.021	723.193	.000
TREAT	4033.854	5	806.771	18.663	.001
Error	259.375	6	43.229		
Total	35556.250	12			
Corrected Total	4 293.229	11			

a. R Squared = .940 (Adjusted R Squared = .889)

جدول شماره ۵ : مقایسه میانگین بازماندگی بین تیمارها با استفاده از آزمون توکی و دانکن .

SURVIVE RATE

TREAT	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a, E}				
3.00	2	33.7500		
11.00	2	37.5000		
2.00	2	42.5000		
4.00	2	47.5000		
1.00	2	56.2500		
.00	2		88.7500	
Sig.		.092	1.000	
Duncan ^{a, b}				
3.00	2	33.7500		
11.00	2	37.5000		
2.00	2	42.5000	42.5000	
4.00	2	47.5000	47.5000	
1.00	2		56.2500	
.00	2			88.7500
Sig.		.094	.090	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 43.229.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

Abstract:

The comparative study of the streptococinum, Hepar sulfur, Rosmarinus officinalis and erythromycin effects on cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with experimental streptococcosis

Homeopathy is one of alternative medicines that is very useful for soul and body diseases with accurate prescription. The goal of this study was "survey of the effects of homeopathic remedies. There is not any more research about homeopathy on aquatics in the world especially in Iran, thus Some research about the effects of homeopathy on aquatics is needed. In this study, the effects of streptococinum, Hepar sulfure, Rosmarinus officinalis (homeopathic remedies) and erythromycin in cultured rainbow trout, with experimental streptococcosis, also the mortality, were compared.

There was 6 treatment and 2 reviews in 300 liter tanks that each of treatment contained 40 juvenile rainbow trout with 25 ± 5 gr arrange weight.

Treatment 1: contained of erythromycin. Treatment 2: Streptococinum C30. Treatment 3: Rosmarinus officinalis Q. Treatment 4: Hepar sulfur C30. Treatment 5: (control treatment) without any injection and any therapy. Treatment 6: (positive control treatment) with injection but without any therapy. Daily estimation of the water temperature, oxygen, PH and salinity and some other chemical factors.

Treatment 1 had significance with the other treatments. Survival percent in treatments and their analysis showed that treatment 4 (Hep-s) had significance ($p < 0.05$) with treatment 3 (Ros-off) and its survival percent is more than the other homeopathic remedies. Erythromycin is chemical drug and has many side effects but Hep-s has not any side effect and is a natural remedy for Streptococcosis in homeopathy. Thus we offer the Hep-s to cure the streptococcosis but some research with disk diffusion test about the different doses of Hep-s is needed.

Daily survey of clinical symptoms such as hemorrhages in the external organs, Under eyes, under skin, under fins and gills, hemorrhages and exophthalmos, were the most symptoms. Important pathological symptoms were: necrosis, hyperplasia and melanosis in branches, liver and kidneys, hemorrhages in heart, kidneys and in visceral tissues.

According to the survival results, there was significant difference between the treatment 1 and the other treatments ($p < 0.05$). Also there was significant difference between treatment 3, treatment 4 and treatment 2 ($p < 0.05$), this difference is due to the high dose (Q) of R.officinalis, while the two other homeopathic remedies were in a moderated dose (C30), 30×100 diluted dose. Survival percent of treatment 4 (Hep-s) was more than the other homeopathic remedies and was related to erythromycin. Erythromycin is chemical medicine and has many side effects, while Hepar sulfur has not any side effects if the prescription would be accurate. Hep-s is suggested with disk diffusion tests for relief the symptoms of streptococcosis.

Key words: Homeopathy, *Oncorhynchus mykiss*, Hep-s, Ros-off, Streptococinum, erythromycin, streptococcosis.

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – National Artemia Research Center**

Project Title : The comparative study of the streptococcinum, *Hepar sulfur*, *Rosmarinus officinalis* and erythromycin effects on cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with experimental streptococcus.

Approved Number: 2-12-12-88055

Author: Maryam Salehi

Project Researcher : Maryam Salehi

Collaborator(s) : Asaeian Hosein, Nequifard Ali, Shiri Saber, Alizadeh Zhaleh, Moazedi Jalil, Sharifpour Issa, Zeynali Amir, Mostafazadeh Bizhan, Sepahdari Abolfazl, Seydgar Masood, Esmaeli Latif, Fakhri Hadi, Haghghi Masood

Advisor(s): -

Supervisor: -

Location of execution : West Azarbaijan Province

Date of Beginning : 2010

Period of execution : 4 Years

Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute

Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute**

Project Title :

The comparative study of the streptococcinum, *Hepar sulfur*, *Rosmarinus officinalis* and erythromycin effects on cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with experimental streptococcus.

Project Researcher :

Maryam Salehi

Register NO.

47469