

تعیین دوزاژ بهینه‌ی بالینی فلورفنیکل خوراکی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان دچار استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس تجربی و بررسی باقی‌مانده‌ی دارویی در کبد و ماهیچه‌ی آن‌ها

نیما شیری^۱، سیاوش سلطانیان^{۲*} و طهورا شمالی^۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۱

چکیده

بروز پدیده‌ی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در عوامل باکتریایی بیماری‌زا در پی مصرف بی‌رویه از یک سو و اهمیت به کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها در همه‌گیری‌های همراه با شکست‌های سنگین اقتصادی از سوی دیگر، سبب شده است تا یافتن دوز بهینه‌ی بالینی اهمیت خاصی داشته باشد. پژوهش حاضر با هدف تعیین دوزاژ بهینه‌ی بالینی آنتی‌بیوتیک به روش خوراکی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و همچنین ردیابی باقیمانده‌ی دارویی در کبد و ماهیچه‌ی آن‌ها انجام شد. بدین منظور، نخست میانه‌ی دوز کشنده (LD50) باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه برای ماهیان به کمک ثبت تلفات روزانه و محاسبه رگرسیون پروبیت به دست آمد. این دوزها برای آزمایش تعیین میانه‌ی دوز مؤثر (ED50) در گروه‌های کنترل و تحت درمان خوراکی با دوزاژهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ فلورفنیکل به مدت ۱۰ روز متوالی به کار گرفته شدند. ۵، ۱۰ و ۲۰ روز پس از دوره‌ی درمانی، از کبد و ماهیچه‌ی ماهیان نمونه‌برداری شده و پس از مراحل آماده‌سازی و تهیه‌ی استانداردها، سنجش غلظت باقیمانده‌ی دارویی از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. مقادیر ED50 فلورفنیکل خوراکی برای *S. iniae* و *L. garvieae* به ترتیب برابر با ۱۴/۵۲ و ۱۵/۴۹ به مدت ۱۰ روز متوالی به دست آمد. بیشینه‌ی حد باقیمانده (MRL) در روز دهم نمونه‌برداری در کبد و ماهیچه به ترتیب ۰/۴۶۱ (۰±/۰۶۴) و ۰/۶۲۲ (±۰/۱۰۳) و به طور معنی‌داری کمتر از مقدار مجاز استاندارد آژانس اروپایی ارزیابی محصولات دارویی بود. دوزاژ بهینه‌ی بالینی فلورفنیکل در ماهیان مبتلا به این بیماری معادل میانگین میانه‌ی دوز مؤثر دارو برابر با ۱۵ mg/kg BW برای ۱۰ روز متوالی شناخته شده است که پس از به کارگیری این دوزاژ حداقل ۱۰ روز زمان لازم است تا مصرف کننده بتواند از این ماهیان استفاده خوراکی کند.

کلمات کلیدی: میانه دوز کشنده، میانه دوز مؤثر، استرپتوکوکوزیس، لاکتوکوکوزیس، باقیمانده‌ی فلورفنیکل

مقدمه

(Akhlaghi 2010) که از این میان *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* بیش از سایرین جداسازی و گزارش شده‌اند (Fadaeifard et al. 2012, Zamri-saad et al. 2014). برخی مطالعات حاکی از این هستند که استرپتوکوک‌های بیماری‌زا در ماهی نظیر گونه‌ی استرپتوکوکوس اینیایی قابل سرایت از ماهیان آلوده به انسان هستند و می‌توانند موجب بروز عفونت سلولیت (در بافت

بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس ماهی یک عارضه‌ی عفونی سپتی سمیک بوده و می‌تواند به شکل‌های حاد یا تحت حاد بروز یابد. این عفونت سیستمیک به عنوان مجموعه‌ای از بیماری‌های مشابه ناشی از عوامل باکتریایی متفاوت از لحاظ جنس و گونه، به شمار می‌رود و تحقیقات ملکولی نشان داده که ۶ یا ۷ گونه از کوکسی-های گرم مثبت بیماری‌زا در وقوع این بیماری مؤثر هستند

^۱ دانش آموخته دکتری تخصصی بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

(نویسنده‌ی مسئول)

dr.soltanian48@gmail.com

^{۲*} دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۳ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

پیوندی) و تورم مفاصل شوند (Austin and Austin 2007). گرچه به نظر می‌رسد ضعف شدید سیستم ایمنی در انسان در مواردی نظیر سالخوردگی می‌تواند عامل بروز بیماری باشد (Yanong and Francis-Floyd 2006). همچنین لاکتوکوکوس گارویه که به عنوان یک عامل بیماری‌زای مشترک ماهیان و پستانداران به شمار می‌رود، می‌تواند سبب بروز اندوکاردیت در انسان شود (Wang et al. 2007). بنابراین، کنترل این بیماری علاوه بر جلوگیری از تحمیل هزینه‌های اقتصادی، با توجه مشترک بودن بین ماهی و انسان از منظر بهداشت عمومی نیز اهمیت اساسی دارد. در صورت ادامه یافتن همین روند در کشور شامل درصد شیوع بالای این بیماری (در برخی مناطق)، حدت بالای آن (با توجه به دمای بالای آب در برخی فصول سال) و مدیریت نامناسب بهداشتی و در پی آن مصرف غیرمسئولانه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها توسط پرورش‌دهندگان، احتمال وقوع فجایع انسانی نیز وجود دارد و حتی در حال حاضر، این مشکل از ابعاد قابل توجهی برخوردار است. برای نمونه، مشخص شده است که ۵۶/۲۳ درصد ماهیان قزل‌آلای عرضه شده در میادین (بازار) تهران و کرج به این عوامل بیماری‌زا آلوده هستند و از این میان ۳۲/۸ درصد مربوط به استرپتوکوکوس اینیایی و ۲۳/۴۳ درصد مربوط به لاکتوکوکوس گارویه می‌باشند (Taheri Mirghaed et al. 2016). به نظر می‌رسد این موضوع ناشی از مقاومت آنتی-بیوتیکی این باکتری‌ها باشد که عدم اثرگذاری مناسب (مهارکنندگی یا کشندگی) بر آن‌ها را در پی داشته است و در واقع ماهیان عرضه شده به بازار دارای فرم مزمن بیماری و حامل پاتوژن هستند، همان بخشی از جمعیت که تا پایان دوره‌ی پرواری زنده مانده‌اند (Bowker et al. 2010). به طوری که پژوهش Shahrani و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دهنده‌ی مقاومت چندگانه‌ی تمامی سویه‌های لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از قزل‌آلای پرورشی بیمار بوده است. مقاومت دارویی در مورد انروفلوکسازین معادل

۶۵/۴ درصد جمعیت عامل بیماری‌زای مورد نظر را شامل شده است. بنابراین با توجه به سطوح بالای مقاومت آنتی-بیوتیکی و تشخیص ژن‌های مقاومت، یافت شدن آنتی-بیوتیک در محصول نهایی ارائه شده در بازار مصرف، احتمال قوی ژئونوز بودن باکتری‌های اشاره شده و پتانسیل خطر در بهداشت عمومی، مقتضی است که ملاحظات بیش-تری رعایت گردد.

فلورفنیکل نسل سوم کلرومایستین، یکی از مشتقات کلرامفنیکل و در واقع آنالوگ ترکیب شده با فلور تیمافنیکل بوده که به عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی وسیع الطیف در کلینیک‌های دامپزشکی شناخته می‌شود (Pourmolaie et al. 2015). بر اساس گزارش سازمان غذا و دارو ایالات متحده (US.FDA) در سال ۲۰۱۴، در ارتباط با داروهای مورد تأیید این سازمان به منظور به کارگیری آن‌ها در آبی پروری، آکوافلور با دوزاژ خوراکی $10 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ BW}$ در یک دوره‌ی ۱۰ روزه‌ی متوالی، برای تمام ماهیان آب شیرین پرورشی بیمار مجاز دانسته شده و به ویژه بر استفاده از آن برای کنترل عفونت-هایی نظیر کولوموناریس، فرونکولوزیس، بیماری باکتریایی کلیه و آب‌های سرد تأکید شده است.

به کارگیری روش‌های کنترل و پیش‌گیری از بیماری‌ها نظیر امنیت زیستی، واکسیناسیون، فاژتراپی، استفاده از پروبیوتیک‌ها، مدیریت استرس و GAQPs^۱ راه‌کارهایی کلیدی در مدیریت بهداشتی یک مزرعه پرورش ماهی هستند. علی‌رغم توسعه‌ی این روش‌ها، زمانی که تلفات شدید ناشی از مواجهه با بیماری عفونی رخ می‌دهد، درمان آنتی‌بیوتیکی به منظور کنترل وضعیت اجتناب‌ناپذیر است و به عنوان آخرین راهبرد ضرورت می‌یابد (FAO, 2012)، که در آن تشخیص عامل بیماری نخستین و اساسی‌ترین گام است و پس از تأیید اثربخشی یک عامل ضد میکروبی در آزمایشگاه، می‌توان در مزرعه از آن بهره گرفت (Matthews et al. 2013). اگر چه، به دلیل خسارت‌های

¹GAQPs: Good aquaculture practices

۳-۱ در محل انجام تحقیق بوده است. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در آزمایش نظیر سختی کل، قلیائیت، TSS، TDS و EC آب در ابتدای آزمایش و بر اساس روش استاندارد APHA سنجیده شده و ثبت گردید (Eaton et al. 1999). به علاوه مقدار اکسیژن محلول و pH آب نیز در طول دوره‌ی آزمایش‌ها به ترتیب با متد وینکلر (بر پایه‌ی اکسیداسیون یون دوظرفیتی منگنز) و با استفاده از pH متر دیجیتال مورد پایش قرار گرفتند. دمای آب به طور روزانه از طریق دماسنج جیوه‌ای سنجیده شده و کنترل و تثبیت آن در محدوده‌ی $16/5 \pm 0/5^{\circ}\text{C}$ و در زمان مقتضی با استفاده از هیتر شعله‌ای صورت می‌گرفت. تعویض آب روزانه به میزان حداکثر ۲۰ درصد حجم هر تانک بوده و هواده‌ی از طریق یک هواده مرکزی انجام می‌شد.

دوزهای آلوده‌سازی جانوران آزمایشی و زمان دقیق شروع درمان خوراکی در گروه‌ها پیش از انجام آزمایش اصلی، با انجام چندین آزمایش مقدماتی تعیین گردید. در نخستین آزمایش که به منظور یافتن میانه‌ی دوز کشنده (LD50) انجام شد، ابتدا باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه از منبع سویه‌های موجود در بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شیراز - جداسازی شده از ماهیان بیمار و شناسایی شده به روش‌های بیوشیمیایی و ملکولار (Akhlaghi and Mahjor 2004, Sharifiyazdi et al. 2010) - برداشته شده و در محیط BHA به مدت ۴۸ ساعت در دمای 25°C کشت داده شدند و سپس باکتری‌های رقیق شده در محلول PBS استریل، از طریق لام نئوبار (هموسایتومتر) زیر میکروسکوپ نوری ($\times 40$) شمرده شدند و رقت‌های متوالی از 10^9 CFU/ml الی 10^2 تهیه گردید (Alishahi et al. 2009). تلقیح ماهیان از طریق تریق داخل صفاقی (IP) به حجم $200 \mu\text{l}$ PBS از رقت‌های مختلف باکتری‌ها و $200 \mu\text{l}$ PBS استریل (برای گروه شاهد) و بعد از بیپوشی به روش غوطه‌وری با استفاده از غلظت ۳۰ ppm تریکائین متان سولفونات (MS-222) انجام شد. در طی

سنگین و شکست‌های اقتصادی در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) ناشی از عفونت‌های باکتریایی به ویژه عفونت‌های استرپتوکوکوسی و لاکتوکوکوسی در کشور، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از سوی پرورش‌دهندگان به منظور حفظ سرمایه - در حجم وسیع و عموماً بدون نسخه دامپزشک - به کار گرفته می‌شوند (Safaeian et al. 2014, Shahrani et al. 2014). این مسئله خود باعث بروز پدیده - ای شده است که آن را به عنوان مقاومت آنتی میکروبیال می‌شناسیم و چرخه‌ی معیوبی را به وجود آورده که محصول آن ایجاد اختلال در پروسه‌ی درمانی بیماری - هاست (Raissy and Moumeni 2016). به علاوه، مصرف دارو در آبزیان به شیوه‌های خوراکی و غوطه‌وری، از منظر ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی فلور میکروبی محیط زیست (Safaeian et al. 2014) و در پی آن افزایش مخاطرات سلامت عمومی (Romero et al. 2012)، چالش‌برانگیز هستند. بدین منظور، پژوهش حاضر با هدف کلی تعیین دوزاژ بهینه‌ی بالینی آنتی‌بیوتیک به روش خوراکی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و همچنین ردیابی باقیمانده‌ی دارویی در کبد و ماهیچه‌ی آن‌ها انجام شد.

مواد و روش کار

تعداد ۵۰۰ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن $55 \pm 7/5$ از یکی از مراکز پرورش ماهی سردابی استان فارس تهیه شده و به کارگاه بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شیراز انتقال یافت. این ماهیان به منظور سازش‌پذیری در تانک‌های ونیرو با حجم ۵۰۰ L دارای جریان آب تازه و هواده‌ی مداوم، به مدت ۲-۱ هفته نگهداری شدند. در طول این دوره، این ماهیان با غذای کنستانتیره‌ی ایرانی (۲ بار در روز) و تا پیش از تقسیم شدن در تانک‌های مربوط به هر گروه آزمایشی تغذیه شدند (پیش از انتقال به تانک‌ها حداقل ۱۲ ساعت گرسنگی لازم است). منبع آب یک حلقه‌ی چاه با دبی l/s

دوره‌ی آزمایش مقدماتی میزان تلفات ماهیان در ۴ روز متوالی ثبت شدند (LD50-96h). دوزهای تزریقی مناسب پاتوژن‌ها برای مدت زمان آزمایش اصلی، بر اساس ۳۰ درصد مقدار LD50 حاصل شده برای هر یک به کار گرفته شدند. تعیین زمان دقیق شروع غذاهای درمانی در پی مشاهده‌ی علائم بالینی بیماری و همچنین نمونه‌برداری از کلیه، کشت دادن پاتوژن‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و تست ملکولی نیز مشخص شدند.

آزمایش تعیین دوزاژ بهینه‌ی بالینی با استفاده از یک طرح کاملاً تصادفی در ۶ گروه آزمایشی (هر تانک واجد ۱۰ قطعه ماهی) برای هر عامل بیماری‌زا به طور جداگانه بدین شرح انجام شد: (الف) بدون چالش باکتریایی و بدون درمان آنتی‌بیوتیکی (C-/T-); (ب) چالش باکتریایی و بدون درمان آنتی‌بیوتیکی (C+/T-); (ج)، (د)، (ه) و (و) شامل چالش باکتریایی با درمان آنتی‌بیوتیکی به روش خوراکی، به ترتیب با دوزاژهای $5, 10, 20, 40 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ ، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روزانه در دوره‌ی درمانی به مدت ۱۰ روز متوالی (C+/T+ 5, 10, 20, 40 mg.kg^{-1}). دوزاژهای درمانی اشاره شده، مستخرج از دوز پیشنهادی US.FDA در سال ۲۰۱۴ بوده و دارای فواصل لگاریتمی مشخص هستند. در گروه‌های (ب) الی (و) ابتدا یک تزریق داخل صفاقی پاتوژن‌های مربوطه (به طور جداگانه) با غلظت‌های مشخص صورت گرفته و پس از انتشار در بدن میزبان، دوره درمانی با خوراک آغشته به دارو (به مقدار ۲/۵ درصد وزن بدن و یک بار در روز) فلورفینیکل با نام تجاری آکوافلور (Aquaflor® 50%) (Rooyan Darou, Iran) صورت گرفت. در طی انجام آزمایش تعیین دوزاژ بهینه بالینی از طریق محاسبه میانه‌ی دوز مؤثر (ED50) که ۱۰ روز دوره درمانی را شامل می‌شد، مرگ و میر روزانه و تجمع ماهیان به همراه وزن آن‌ها (توزین با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت حداقل ۰/۱ g) و علائم کلینیکی مشاهده شده، به تفکیک هر گروه آزمایشی ثبت شدند.

پس از دوره‌ی درمانی (۱۰ روزه)، ماهیان باقی‌مانده از هر تیمار همچنان نگهداری شدند و دوره‌ی بازایی را

گذراندند. با گذشت ۱، ۵ و ۱۰ روز پس از دوره درمانی، از این ماهیان که با استفاده از دوزهای ۱۰۰ ppm MS-222 و طبق آئین‌نامه‌ی اخلاق زیستی دانشگاه شیراز کشته شده بودند، نمونه‌برداری از کبد و ماهیچه‌ی پهلویی آن‌ها صورت گرفته و نمونه‌ها تا زمان انجام تست‌های باقی‌مانده دارویی در دمای 18°C - نگهداری شدند (Wang et al. 2011). پس از یخ‌زدایی، توزین آن‌ها به مقدار ۱ g صورت گرفته و به آن‌ها ۴ ml اتیل استات اضافه شده و به صورت دستی هم‌وزن شدند. پس از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) روئشین جدا شده و به عنوان منبع برای سنجش شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت (Jangaran Nejad et al. 2017).

مبنای آماده‌سازی نمونه‌ها روش پیشنهادی Pourmolaie و همکاران در سال ۲۰۱۵ بود که بر اساس شرایط آزمایش در تحقیق پیش‌رو اصلاحات زیادی را از طریق آزمون و خطا متحمل شده است. به طور خلاصه، مقدار $200 \mu\text{l}$ نمونه به حجم $30 \mu\text{l}$ کلرامفنیکل با درجه خلوص بالای ۹۸ درصد (سیگما-آلدریچ، سنت لوئیس، ایالات متحده آمریکا) به غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ ، به عنوان استاندارد داخلی افزوده شد. هر نمونه به مدت ۲ دقیقه به خوبی ورتکس شده و سپس $1/4 \text{ ml}$ اتیل استات به عنوان رسوب دهنده‌ی پروتئین‌ها به هر یک افزوده گردید و بلافاصله سانتریفیوژ (۵۰۰۰ g برای ۳ دقیقه) انجام شد. میزان $1300 \mu\text{l}$ از روئشین هر نمونه برداشت شده و فرایند تبخیر مایعات آن‌ها تحت بخار نیتروژن در دمای 40°C به مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت. به باقی‌مانده (جامدات) هر نمونه حجم $200 \mu\text{l}$ فاز متحرک (مایع) شامل آب و استونیتریل با نسبت حجمی ۷۵:۲۵ افزوده شده و سپس از فیلتر سرسرنگی $0.45 \mu\text{m}$ عبور داده شد. نمونه‌های حاصل شده به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و در پایان هر نمونه به حجم $60 \mu\text{l}$ یکی پس از دیگری به دستگاه تزریق شدند.

به جهت ترسیم منحنی استاندارد فلورفینیکل از عصاره‌ی بافتی ماهیان قزل‌آلای سالم (گروه بدون چالش عفونی و دارو درمانی) استفاده شد. بدین ترتیب $30 \mu\text{l}$ فلورفینیکل

ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 انجام شدند.

نتایج

آمار توصیفی مقادیر فراسنجه‌های کیفی آب تانک‌های آزمایشی در Table 1 ارائه شده است. نتایج تعیین LD50 نشان داد که با افزایش دوز پاتوژن‌ها میزان مرگ و میر به شکل نمایی (لگاریتمیک) افزایش می‌یابد. بر اساس میزان مرگ و میرهای ثبت شده در پایلوت، مقادیر LD50 عوامل باکتریایی لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی به ترتیب برابر با 2.72×10^6 و 1.15×10^8 CFU/ml بوده است (Table 2). بخشی از جمعیت ماهیان تلقیح شده با لاکتوکوکوس گارویه به ویژه در دوزهای بالاتر پاتوژن، در حدود ۴۸ ساعت پس از تزریق، دچار سیاه شدگی کلی بدن و یا در بخش‌هایی نظیر پایه‌ی باله‌های سینه‌ای و پستی و سرپوش آبششی شدند. گرچه روند بیماری بسیار سریع بوده و علائم کلینیکی به سیاه شدگی و آسیت خفیف محدود بوده و خون‌ریزی پتشی در اندام‌های داخلی نظیر سکوم‌های پیلوریک و پرده‌ی صفاق تنها در کالبدگشایی ماهیان زنده مانده (پس از پایلوت) دیده شد. در مورد ماهیان تلقیح شده با استرپتوکوکوس اینیایی، شروع علائم کلینیکی دیرتر از گروه دیگر و عموماً با شروع در روز پنجم بوده و علاوه بر سیاه شدگی جزئی، علائمی نظیر خون‌ریزی سرسوزنی در قسمت‌های قدامی ماهی و در اطراف باله‌ی سینه‌ای تا سرپوش آبششی دیده شد. آسیت شکمی و اگزوفتالمی در ماهیان تلقیح شده با دوزهای بالاتر کاملاً مشهود بود و بررسی بالینی لاشه نیز نشان داد که پرخونی در اندام‌هایی نظیر کبد و لوله‌ی گوارشی ماهیان تلف شده

استاندارد آنالیز شیمیایی سیگما-آلدریج تهیه شده در غلظت‌های 2.5 ، 5 ، 12.5 ، 25 ، 50 ، 100 و 200 $\mu\text{g/ml}$ همراه $30 \mu\text{l}$ استاندارد داخلی (کلرامفنیکل به غلظت ppm ۱۰) داخل $200 \mu\text{l}$ روشین مخلوط شدند (در سه تکرار). سایر مراحل آماده‌سازی و تزریق به دستگاه به نحوی بود که برای نمونه‌ها شرح داده شد.

غلظت فلورفینیکل از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و با به کارگیری دستگاه Knauer-HPLC (برلین، آلمان) مجهز شده به یک دتکتور UV (مدل K2500) و انژکتور Rheodyne (مدل 7125) تعیین شد. جداسازی مواد در دمای 40°C بر روی یک ستون $200 \times 4.6 \text{ mm}$ با پوشش 120-A C18 به عنوان فاز ثابت (جامد) انجام شد. فاز مایع (آب- استونیتریل) از فیلتر سرسرنگی $0.45 \mu\text{m}$ عبور داده شده و از طریق هموژنایزر اولتراسونیک گاززدایی گردید. نرخ جریان فاز مایع بر روی ستون معادل 1 ml/min بوده است.

محاسبه‌ی LD50^۱ هر یک از پاتوژن‌ها و ED50^۲ فلورفینیکل برای ماهیان بیمار از طریق رگرسیون پروبیت انجام شد. به منظور مقایسه‌ی باقی‌مانده‌ی دارویی (در هر دو بافت) گروه‌های آزمایشی و همچنین طی زمان‌های نمونه‌برداری، تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی دانکن (Duncan) به کار گرفته شدند. مقایسه‌ی میانگین مقادیر باقی‌مانده در نمونه‌های بیمار شده با دو پاتوژن از طریق آزمون تی استیودنت مستقل (Independent T student test) صورت گرفت. به علاوه، شاخص MRL نمونه‌های ماهیچه با استفاده از تی تست تک نمونه‌ای (One sample t-tset) با استاندارد ارزیابی محصولات دارویی (معادل $1 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ BW}$) مقایسه گردید. کلیه‌ی آزمون‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS 20.0 و

1- Median Lethal Dose
2- Median Effective Dose

و بازماندگان وجود داشته است. عارضه‌های رفتاری مشترک برای ماهیان تلقیح شده با لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی، کند شدن حرکت و شنای ماهیان، بی‌حالی و شنای نامتعادل بودند.

Table 1: Water quality parameters in the experimental tanks

Parameter	Symbol (unit)	Mean	Sd	CV
Total hardness	TH (mg CaCO ₃ /l)	344.55	22.4	6.5
Alkanity	Alk (mg CaCO ₃ /l)	93.27	18.67	20.02
Total suspended solids	TSS (mg/l)	35.27	4.3	12.2
Total dissolved solids	TDS (mg/l)	2210	390	17.64
Electric conduction	EC (μSimens/cm)	2.32	0.3	12.93
Dissolved oxygen	DO (mg/l)	5.57	0.47	8.43
pH	pH	7.8	0.12	1.53
Temperature	T (°C)	16.5	0.5	3.03

Table 2: The median lethal dose of pathogenic agents in rainbow trout

	<i>L. garvieae</i>			<i>S. iniae</i>		
Lethal dose	LD10	LD50	LD90	LD10	LD50	LD90
(CFU/ml)	3.11×10^5	2.72×10^6	2.37×10^7	5.68×10^6	1.15×10^8	2.33×10^9
Equation	$Y=1.36X-3.75$			$Y=0.98X-2.9$		
Intercept	-3.75			-2.9		
X-variable	1.36			0.98		

نتایج آزمایش اصلی نشان داد که نرخ مرگ و میر ماهیان تلقیح شده، با افزایش دوز درمانی فلورفنیکل در خوراک کاهش یافته است (Fig 1). گرچه شیب روند تلفات ماهیان تحت چالش با استرپتوکوکوس اینیایی طی ۱۰ روز دوره درمانی با دوزهای مختلف آنتی‌بیوتیک تندتر از تلفات ماهیان بیمار شده (تجربی) با لاکتوکوکوس گارویه بود (X-Table 3).

همچنین یافته‌های این بخش حاکی از این بود که مقادیر ED50 طی دوره درمانی با فلورفنیکل خوراکی برای لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی به ترتیب برابر با mg.kg^{-1} BW ۱۴/۵۲ و ۱۵/۴۹ به طور روزانه و به مدت ۱۰ روز بوده است (Table 3).

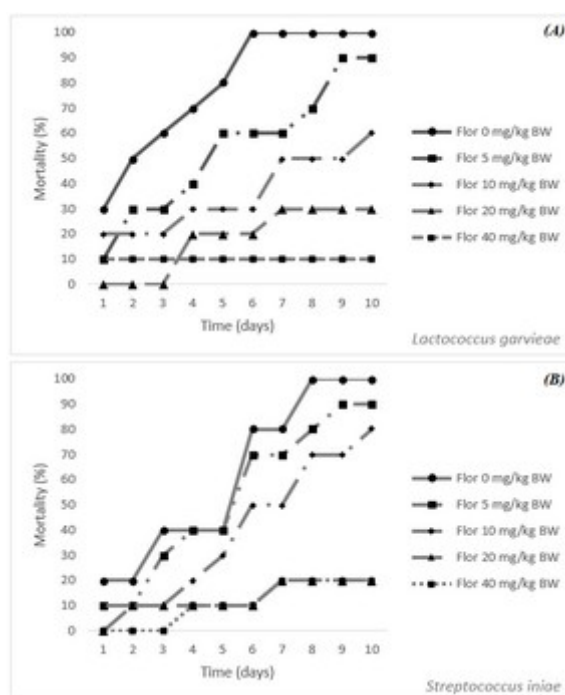


Figure 1. Mortality trend of challenged fish with the pathogen agents (A. *Lactococcus garvieae*; B. *Streptococcus iniae*) during therapeutics period

Table 3: The median effective dose of florfenicol to pathogenic agents in rainbow trout

	<i>L. garvieae</i>			<i>S. iniae</i>		
Effective dose (mg/kg BW)	ED10	ED50	ED90	ED10	ED50	ED90
	6.84	14.52	30.69	7.11	15.49	33.65
Equation	$Y=-3.92X+9.56$			$Y=-3.79X+9.51$		
Intercept	9.56			9.51		
X-variable	-3.92			-3.79		

بر اساس تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی از نظر باقی‌مانده‌ی دارویی در کبد و نیز ماهیچه‌ی ماهیان تحت چالش وجود داشته است ($P<0/05$). بنابراین فرض برابری میانگین باقی‌مانده‌ی دارویی در بدن ماهیان تیمارهای مختلف با یکدیگر رد می‌شود. نتایج آزمون تعقیبی دانکن برای باقی‌مانده‌ی فلورفنیکل در بافت‌های کبد و ماهیچه ماهیان آزمایشی (Fig 2) نمایان‌گر این حقیقت بود که میانگین باقی‌مانده‌ی دارویی در کبد و ماهیچه‌ی ماهیانی که تحت دارودرمانی با دوزاژ $40 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ فلورفنیکل به مدت ۱۰ روز متوالی بودند، به طور معنی‌داری بیش از باقی‌مانده‌ی دارویی در دیگر گروه‌های آزمایشی بوده است ($P<0/05$). هیچ اختلاف معنی‌داری بین باقی‌مانده‌ی دارویی گروه‌های آزمایشی چالش داده شده و تحت آنتی‌بیوتیک درمانی با دوزاژ 0 ، 5 و $10 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ بدون چالش/بدون دارودرمانی دیده نشد ($P>0/05$). افزون بر این، آزمون‌های آماری نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین باقی‌مانده‌ی دارویی در بدن ماهیان آزمایشی، در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری (۱، ۵ و ۱۰ روز پس از دوره درمانی)، میانگین باقی‌مانده‌ها در بافت‌های مختلف (کبد و ماهیچه) و همین طور تحت چالش عفونی با پاتوژن‌های مختلف (استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه) وجود نداشته است ($P>0/05$).

یافته‌های باقی‌مانده‌ی دارویی در بافت‌های بدن ماهیان آزمایشی نشان داد که از دیدگاه زمان بازیابی پس از دوره درمانی با فلورفنیکل خوراکی، بیش‌ترین میانگین باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک در روز نخست، در کبد و ماهیچه‌ی ماهیان تحت چالش عفونی، به ترتیب برابر $\mu\text{g.g}^{-1} \text{ BW}$ $2/54(0\pm/42)$ و $1/22(0\pm/18)$ بوده است. میزان این باقی‌مانده در روزهای بعدی در هر دو بافت کاهش یافته و در روز دهم نمونه‌برداری نیز با کمینه‌ی حالت خود در کبد و ماهیچه به ترتیب $\mu\text{g.g}^{-1} \text{ BW}$ $0/461(0\pm/064)$ و $0/622(0\pm/103)$ به دست آمد. بنابراین نرخ پاک‌شدگی فلورفنیکل از کبد و ماهیچه‌ی ماهیان تحت درمان در طی ۱۰ روز بازیابی، به ترتیب معادل $8/81$ و 49 درصد بوده است. بررسی گروه‌های آزمایشی حاکی از این بود که باقی‌مانده‌ی فلورفنیکل در تیمارهای الف (C-/T-) و ب (C+/T-) قابل تشخیص نبوده است. اما در گروه‌های دریافت‌کننده دارو، کمینه‌ی میانگین باقی‌مانده در کبد و ماهیچه ماهیان تحت درمان با $5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ (C+/T+ 5) معادل $\mu\text{g.g}^{-1}$ $0/311(0\pm/056)$ و $0/298(0\pm/039)$ و همچنین بیشینه‌ی میانگین فلورفنیکل در کبد و ماهیچه‌ی ماهیان تحت درمان با $40 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ (C+/T+ 40 mg.kg^{-1}) برابر $\mu\text{g.g}^{-1}$ $4/067(3\pm/03)$ و $3/226(1\pm/11)$ ثبت گردید.

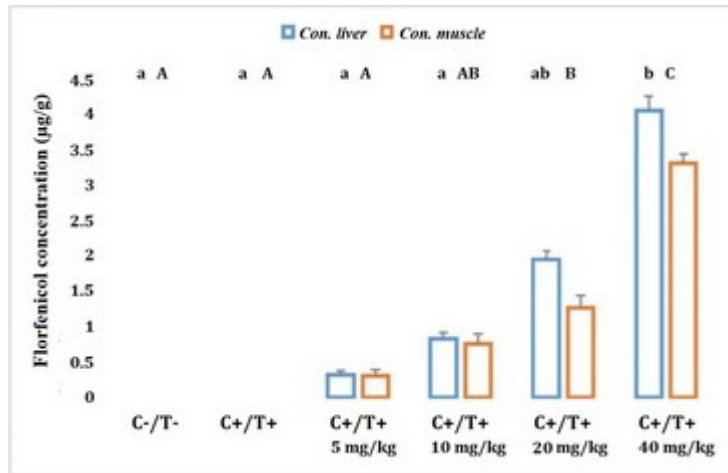


Figure 2: Mean of tissue florfenicol residual in different experimental groups; different letters (a, b, etc.) demonstrate statistical differences ($p < 0.05$) between treatments.

بحث

مستقل از هم شناخته شوند. به طوری که بیماری ناشی از لاکتوکوکوس گارویه در قزل‌آلای رنگین‌کمان یک بیماری فوق حاد با مرگ و میر سریع و معمولاً فاقد علائم کلینیکی را به وجود می‌آورد؛ در حالی که بیماری ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی یک بیماری با روند حاد بوده با دوره‌ی طولانی‌تر و معمولاً همراه با جراحات و علائم سپتی سمی همورژیک است. بر مبنای نتایج، شروع غذادهی درمانی برای آزمایش اصلی (تعیین دوزهای بهینه‌ی بالینی) در روز سوم پس از تزریق پاتوژن‌ها صورت گرفت. انتخاب این زمان با توجه به این مسئله صورت گرفت که شرایط آزمایش برای هر دو پاتوژن یکسان باشد و از بروز چنین خطایی پیش‌گیری گردد. پس دوزهای تزریقی مناسب لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی برای آزمایش اصلی، بر اساس مقادیر LD50 حاصل شده در پایلوت در نظر گرفته شدند.

بر خلاف شدت بیماری‌زایی و ایجاد مرگ و میر، وقتی لاکتوکوکوس گارویه در برابر غلظت‌های درون تنی فلورفینیکل به منظور مهارشدگی قرار می‌گیرد، مقدار آنتی-بیوتیک کم‌تری ($14/52 \text{ mg.kg}^{-1}$) در مقایسه با استرپتوکوکوس اینیایی مورد نیاز خواهد بود (mg.kg^{-1}) ۱۵/۴۹ و به عبارت دیگر، دوزهای برابر فلورفینیکل اثر

یافته‌های مربوط به میانه دوز کشنده بیان‌گر این مطلب بودند که لاکتوکوکوس گارویه ($2/72 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$) جدایی‌ی فارس، با توجه به این که در مدت زمان مشابه دوز کم‌تری از آن مورد نیاز بوده تا ۵۰ درصد از جامعه‌ی آماری (ماهیان آزمایشی) تلف شوند، دارای خاصیت پاتوژنیک قوی‌تر و به عبارت دیگر کشنده‌تر از استرپتوکوکوس اینیایی ($1/15 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$) جدا شده از ماهیان این استان بوده است. با توجه به این که شیب روند تلفات در ماهیان تحت چالش با لاکتوکوکوس گارویه بیش‌تر از استرپتوکوکوس اینیایی بوده است ($X\text{-variable } L. garvieae > S. iniae$)، Table 2) علائم کلینیکی نیز در روز دوم پس از تزریق پاتوژن نخست، و روز پنجم پس از تزریق (دیرتر) پاتوژن دیگر بروز پیدا می‌کنند. گرچه ماهیان بیمار شده با استرپتوکوکوس اینیایی علائم گسترده‌تری را چه بر روی لاشه و چه در اندام‌های داخلی نشان دادند. این موارد با نتایج Nematollahi و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطابقت بالایی دارد. به نظر می‌رسد که استرپتوکوکوس‌ها، لاکتوکوکوس گارویه و *Vagococcus salmoninarum*، در بیماری استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس، علاوه بر این که از نظر ژنتیکی منشاء جداگانه‌ای دارند، می‌توانند از نظر روند تلفات نیز از هم تفکیک شده و به عنوان دو بیماری

خوراک درمانی برابر با $15 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ شناخته شده است.

نتایج باقی‌مانده دارویی در بافت‌های بدن ماهیان آزمایشی نشان داد که با توجه به این که نرخ پاک شدگی فلورفینیکل از بافت ماهیچه (۴۹ درصد) ماهیان تحت درمان تقریباً نیمی از مقدار آن برای بافت کبد (۸۱/۸ درصد) بوده است، به نظر می‌رسد که خروج و دفع باقی‌مانده‌ی دارویی از ماهیچه روند کندتری داشته و نسبت به کبد نیاز به زمان بیش‌تری (بیش از ۱۰ روز) دارد. این آنتی‌بیوتیک از نظر جذب دارو در بدن میزبان (بیش از ۹۷ درصد) رفتار مناسبی از خود نشان می‌دهد و نیز نیمه‌ی عمر حذف کوتاه‌تری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد (Bowser et al. 2009, Wang et al. 2009, Gaikowski et al. 2013). Fadaeifard و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان نمودند که مکانیسم حذف سریع فلورفینیکل از بدن ماهیان، سبب می‌شود باقی‌مانده‌ی دارویی در محصول نهایی (ماهیان بازاری) از حدود قابل قبولی برخوردار باشد (بر مبنای رهنمود اتحادیه اروپا). مطالعه‌ای به منظور بررسی وضعیت تخلیه‌ی فلورفینیکل آمین از فیله‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با آکوافلور (با دوزاژ $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$)، به عنوان متابولیت آنتی‌بیوتیک در سیستم‌های مختلف پرورشی نشان داد که غلظت فلورفینیکل آمین اندازه‌گیری شده در ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار دارویی به ترتیب برابر $11/09 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ و $11/58$ میکروگرم بر گرم، در سیستم‌های مدار بسته و جریان‌دار بوده است. نیمه‌ی عمر این آنتی‌بیوتیک در پلاسما نیز در ماهیان این دو سیستم به ترتیب معادل ۲۰/۳ و ۱۹/۷ ساعت ثبت گردید (Meinertz et al. 2014). این دوره پاک شدگی کوتاه فلورفینیکل به پرورش دهندگان اجازه می‌دهد که بیماری‌های باکتریایی را حتی در وزن‌های نزدیک به بازاری به کمک دارودرمانی مدیریت نمایند.

مهاری بیش‌تری برای این عامل پاتوژن نسبت به دیگری دارند. دوزاژ فلورفینیکل پیشنهادی (US.FDA mg.kg^{-1}) 10 BW طی دوره درمانی ۱۰ روزه) توانسته است اثرات مطلوبی روی کاهش مرگ و میر ناشی از استرپتوکوکوزیس در باس سان شاین (Sunshine bass)^۱ در ۱۰ روز دوره درمانی (حداقل ۲۰ درصد) و کولومناریس در باس دهان گشاد (Largemouth bass)^۲ در طی مدت ۱۴ روز (حداقل ۵۰ درصد) داشته باشد (Bowker et al. 2010, Matthews et al. 2013). ولی همان‌طور که نتایج پیش رو نشان داد برای قزل‌آلای رنگین‌کمان دچار استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس این دوزاژ جهت کنترل بیماری کافی نبوده است. نتایج برخی تحقیقات در مورد کارایی درون تنی این آنتی‌بیوتیک در خصوص بیماری‌های باکتریایی مختلف در ماهیان در راستای یافته‌های مطالعه‌ی حاضر بوده است. به طوری که فلورفینیکل اثرگذاری مناسبی در حالت‌های درون تنی نسبت به انروفلوکسازین برای کنترل عامل بیماری آب-های سرد (*Flavobacterium psychrophilum*) در ماهی قزل‌آلای پرورشی داشته و نرخ مرگ و میر جانوران مورد آزمایش را در مقایسه با آنتی‌بیوتیک دیگر به طور معنی‌داری کاهش داده است (Boyacioglu et al. 2015). در مورد مرگ و میر ناشی از عفونت کولومناریس نیز گربه ماهیان روگاهی تغذیه شده با جیره‌ی حاوی دارو به طور معنی-داری (۸ درصد) تلفات کم‌تری نسبت به جیره‌ی بدون دارو (۵۴/۲ درصد) داشته‌اند و تنها از ۱۵ درصد ماهیان تیمار شده با دارو، کشت باکتری عامل بیماری (*F. columnare*) در مقایسه با ماهیان تیمار نشده (۶۸/۹ درصد) و مرده (۹۹/۵ درصد) به دست آمد (Gaunt et al. 2011). بنابر نتایج حاصل از تحقیق پیش رو، دوزاژ بهینه‌ی بالینی فلورفینیکل در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به بیماری ناشی از عوامل استرپتوکوکوسی و لاکتوکوکوسی معادل میانگین میانه‌ی دوز مؤثر دارو بر روی آن‌ها طی ۱۰ روز

1- White bass (*Morone chrysops*) × Striped bass (*Morone saxatilis*)

2- *Micropterus salmoides*

مقایسه‌ی بیشینه‌ی حد باقی‌مانده (MRL) فلورفینیکل در ماهیچه (به عنوان بافت مورد مصرف) ماهیان گروه‌های آزمایشی با مقدار استاندارد آژانس اروپایی ارزیابی محصولات دارویی معادل $1 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ BW}$ (Fadaeifard et al. 2015) روشن نمود که بین MRL ماهیچه گروه تحت دوزاژ درمانی $5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ BW}$ فلورفینیکل تفاوت معنی‌دار آماری وجود دارد ($t = -7.233, p = 0.019$). به عبارت دیگر، به کارگیری این دوزاژ برای درمان ماهیان بیمار و سپس مصرف آن‌ها بلافاصله پس از پایان دوره درمانی نیز مشکلی در جهت بهداشت عمومی مصرف کنندگان به دنبال نخواهد داشت. در گروه تحت دوزاژ درمانی $1 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ تفاوت آماری بین MRL با مقدار استاندارد وجود نداشته است ($t = -1.635, p = 0.244$) ولی با توجه به این که میانگین باقی‌مانده‌ی دارویی در این گروه کمتر از میزان مجاز بوده است، مصرف کنندگان ماهی می‌توانند پس از دوره درمانی از آن‌ها استفاده خوراکی کنند. در گروه‌های تحت دوزاژ درمانی 20 و $40 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ تفاوت آماری بین MRL با مقدار استاندارد وجود نداشته ($P > 0.05$) اما به دلیل این که میانگین باقی‌مانده‌ی دارویی در این گروه‌ها به طور مشهودی بیش‌تر از میزان استاندارد پیشنهادی بوده است، به عنوان یک هشدار در جهت سلامت جامعه انسانی بهتر است از مصرف ماهیان آنتی‌بیوتیک درمانی شده (با این دوزاژ) پرهیز شود. همچنین از منظری دیگر، به استناد مقایسه‌ی آماری MRL ماهیچه‌ی ماهیان در زمان‌های مختلف بازیابی پس از دارودرمانی با مقدار استاندارد، در زمان‌های ۱ و ۵ روز پس از پایان دارو درمانی، فارغ از دوزاژ درمانی، اختلاف آماری با مقدار استاندارد وجود نداشته ($P > 0.05$) گرچه میانگین آن‌ها بیش‌تر از استاندارد بوده است و توصیه به مصرف این ماهیان نمی‌شود. باقی‌مانده‌ی دارویی ۱۰ روز پس از دوره درمانی نیز تفاوت معنی‌داری با استاندارد از خود نشان نداد ($t = -0.264, p = 0.809$) که با توجه به کم‌تر بودن میزان آن از رقم پیشنهادی، مصرف خوراکی ماهیان ۱۰ روز پس از دوره درمان منعی ندارد.

یافته‌های پیش رو می‌تواند کاربرد آکوافلور در دوزهای بالاتر از مقادیر پیشنهادی توسط FDA در سال ۲۰۱۴ برابر با $10 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ را تأیید نماید که در کنترل مرگ و میر آزاد ماهیان بیمار در اثر عفونت ناشی از *F. psychrophilum* اثربخشی بهتری دارد و می‌تواند علاوه بر سبب افزایش نرخ تولید، سلامت مصرف کنندگان را تأمین کند (Meinertz et al. 2014, Meinertz 2011). این آنتی‌بیوتیک که مصرف آن به صورت خوراکی انجام می‌شود، از خوش خوراکی (Palatability) قابل توجهی برای ماهیان برخوردار است به طوری که حتی در دوزاژ $100 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ قابل مصرف بوده و ماهیان از خوردن غذای حاوی آنتی‌بیوتیک پرهیز نمی‌کنند. گرچه دوزهای بالای درمانی می‌تواند سبب بروز آسیب‌های هیستوپاتولوژیک شامل افزایش هیپرپلازی لاملاها، چسبندگی تیغه‌های آبششی، افزایش گنجیدگی‌های گلیکوژن و چربی در هیپاتوسیت‌های در کبد، کاهش لنفوسیت، افزایش بلاست سل‌ها، افزایش نکروز سلول‌های کلیه‌ی قدامی، دژنراسیون و مینرالیزاسیون لوله‌های کلیه‌ی خلفی گردد (Gaunt et al. 2003). علاوه بر مسئله باقی‌مانده‌ی دارویی، مقاومت عوامل بیماری‌زا به فلورفینیکل نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در وضعیت بهتری قرار دارد. به طوری که در بررسی مقاومت *Aeromonas salmonicida* آئروموناس‌ها متحرک، *Yersinia ruckeri* باکتری‌های اسید لاکتیک و *F. psychrophilum* مشخص شد که مقاومت آن‌ها به کلرافینیکل فراوانی بیش‌تری نسبت به سطوح فلورفینیکل داشته است (Michel et al. 2003). بنابراین به کارگیری دوزاژ درمانی بهینه ($15 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$) در ۱۰ روز متوالی نه تنها از مصرف بی‌رویه که عامل اصلی رخداد مقاومت آنتی‌میکروبیال است، پیش‌گیری می‌کند، سبب می‌شود تا دوزاژ ناکارآمد (کم‌تر از بهینه) نیز توسط پرورش دهندگان قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور که منجر به استفاده‌ی طولانی مدت (بیش از ۱۰ روز) آنتی‌بیوتیک در مزارع که خود از عوامل بروز مقاومت در میکروارگانیسم‌ها است، کنار گذاشته شود.

بیش از $15 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ (برای دوره درمانی ۱۰ روزه)، در یک راستا قرار دارد. دوزاژ مصرفی بیش از این مقدار در ماهیان پرورشی نیز سبب کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هموگلوبین، PCV و همچنین لوکوسیتوز (نوتروفیل‌ها) نسبت به گروه کنترل شده است (Badr et al. 2012).

به عنوان نتیجه‌گیری، پاسخ به این سوال که آیا دوزاژ بهینه‌ی بالینی به دست آمده که به طور روزانه ۵۰ درصد بیش‌تر از دوزاژ پیشنهادی سازمان غذا و داروی آمریکا ($10 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$) برای ماهیان بیمار تجویز می‌نماید، می‌تواند برای مصرف کنندگان ماهیان پرورشی (بهبود یافته) ایمن باشد، مثبت است و پرورش‌دهندگان می‌بایست به طور مسئولانه دقت لازم را در به کار گیری دوزاژ بهینه در سطح مزرعه و همچنین مدت زمان لازم برای پاک شدگی پیش از روانه کردن محصول به بازار مصرف، داشته باشند. به علاوه لازم است تا عوارض جانبی سم شناختی و موارد مربوط به سرکوب دستگاه ایمنی در ماهیان تحت درمان با دوزاژ پیشنهادی این تحقیق بررسی شوند. همچنین ضروری است تا برنامه‌های پایش دوره‌ای نسبت به توسعه-ی مقاومت عوامل بیماری‌زا در برابر مصرف آن صورت گیرد.

نتایج حاضر نشان داد افزایش غلظت داروی مصرفی رابطه‌ی مستقیمی با تجمع آن در بافت‌های کبد و ماهیچه‌ی ماهیان تحت دارودرمانی دارد. به همین دلیل است که در نواحی که دارای اپیدمی برخی بیماری‌های باکتریایی نظیر استرپتوکوکوزیس هستند به دلیل مصرف بی‌رویه از آنتی-بیوتیک‌ها ممکن است باقی‌مانده‌ی دارویی بیش از حد مجاز (1 mg.kg^{-1}) باشد. برای نمونه Ansari و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که غلظت آنتی‌بیوتیک در فیله‌ی قزل‌آلای پرورشی در استان چهار محال بختیاری _ به عنوان قطب پرورش ماهیان سردابی ایران _ در دامنه‌ی $0.3-4.6 \mu\text{g.g}^{-1}$ و با میانگین 0.8 بوده است و میانگین آن تفاوت معنی‌داری با تراز قابل قبول در رهنمود اشاره شده ندارد. نتایج حاصل از بررسی مقایسه‌ی بیشینه‌ی حد باقی‌مانده‌ی فلورفینیکل در ماهیچه‌ی ماهیان گروه‌های آزمایشی با مقدار پیشنهادی استاندارد نشان داد که مصرف ماهیان تحت درمان با حداقل دوزاژ $20 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ BW}$ برای یک دوره درمانی حتی پس از گذشت ۱۰ روز نمی‌تواند از منظر بهداشتی قابل پذیرش باشد. همچنین برای ماهیان تحت درمان با دوزاژهای کم‌تر از این مقدار هم لازم است تا حداقل ۱۰ روز از دوره درمان با آنتی‌بیوتیک گذشته باشد، تا مصرف کننده بتواند از آن‌ها استفاده خوراکی کند. این یافته‌ها با نظر Gaikowski و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مورد منع به کار گیری دوزاژ

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که مراتب قدردانی را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (معاونت علمی و فناوری نهاد ریاست جمهوری) به جهت تخصیص بخش عمده‌ای از هزینه‌های انجام این مطالعه اعلام نمایند. به علاوه، از جناب آقای مهندس حسین شمسایی (کارشناس ارزنده آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز) به پاس زحمات ایشان در بخش مربوط به کروماتوگرافی سپاس‌گزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

منابع مالی

پژوهش پیش رو بخشی از یک رساله‌ی دکتری است که منابع مالی آن از طریق دانشگاه شیراز و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به طور مشترک تأمین شد.

منابع

- Akhlaghi, M. and Mahjor, A.A. (2004). Some histopathological aspects of streptococcus cultured rainbow trout. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, 24(3): 132-136.
- Akhlaghi, M. (2010). Common bacterial diseases in aquaculture, health management and prevention. 1st ed. Shiraz University Press, Shiraz, Pp. 57-63. (In Persian)
- Alishahi, M.; Soltani, M. and Zargar, A. (2009). Bacteriological study of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) mortality in Khuzestan province. *Iranian Veterinary Journal*, 5(1): 25-34. (In Persian)
- Ansari, M., Raissy, M. and Rahimi, E. (2014). Determination of florfenicol residue in rainbow trout muscles by HPLC in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 23(1): 61-62. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1570-y>.
- Austin, B. and Austin, D.A. (2007). Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish. 4th ed. Springer Praxis Publishing, Chichester, Pp: 234-256.
- Badr, M.O.T.; Hashem, M.A. and Elmandrawi, S.A. (2012). Clinicopathological studies on some antibiotics used in Nile tilapia with *Streptococcus iniae*. *Journal of American Science*, 8(12): 1057-1070.
- Bowker, J.D.; Ostland, V.E.; Carty, D. and Bowman, M.P. (2010). Effectiveness of Aquaflor (50% florfenicol) to control mortality associated with *Streptococcus iniae* in freshwater-reared subadult sunshine bass. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22: 254-265. <https://doi.org/10.1577/H09-010.1>, PMID: 21413510.
- Bowser, P.R.; Kosoff, R.E.; Chen, C.Y.; Wooster, G.A.; Getchell, R.G.; Craig, J.L. et al. (2009). Florfenicol residues in Nile tilapia after 10-d oral dosing in feed: effect of fish size. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 14-17. <https://doi.org/10.1577/H08-014.1>, PMID: 19485121.
- Boyacioglu, M.; Kum, C.; Kirkan, S.; Sekkin, S.; Parin, U.; Karademir, U. and Akar, F. (2015). Comparison of *in vitro* and *in vivo* antibacterial efficacy for the control of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry: the first genotypical evidence in West Aegean region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39: 314-321. <https://doi.org/10.1577/H07-040.1>, PMID: 19306614.
- Eaton, A.; Clesceri, L. and Greenberg, A. (1999). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. APHA, AWWA and WEF, Washington DC, Pp: 212, 315-318.
- Fadaeifard, F.; Momtaz, H.; Rahimi, E. and 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. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2651>.
- Fadaeifard, F.; Rahimi, E.; Raissy, M. and Faghani, M. (2015). Determination of florfenicol residues in the muscle and liver of cultured rainbow trout in Iran by ELISA. *Journal of Chemical Health Risks*, 5(4): 267-272.
- FAO. (2012). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. 2nd ed. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 547. Edited by: Bondad-Reantaso MG, Arthur RA, Subasinghe RP. Rome, Pp: 25-90.
- FDA. (2014). FDA-Approved drugs for aquaculture in the USA. 5th ed. Kenilworth N.J., Pp: 4-11.
- Gaikowski, M.P.; Wolf, J.C.; Schleis, S.M.; Tuomari, D. and Endris, R.G. (2013). Safety of florfenicol administered in feed to tilapia (*Oreochromis* sp.). *Toxicologic Pathology*. 41: 639-652. <https://doi.org/10.1177/0192623312463986>, PMID: 23104766.
- Gaunt, P.S.; Endris, R.; Khoo, L.; Leard, A.T.; Jack, S.; Santucci, T. et al. (2003). Preliminary Assessment of the Tolerance and Efficacy of Florfenicol against *Edwardsiella ictaluri* Administered in Feed to Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(3): 239-247. <https://doi.org/10.1577/H03-022>.

- Gaunt, P.S.; Gao, D.; Sun, F. and Endris, R. (2011). Efficacy of Florfenicol for Control of Mortality Caused by *Flavobacterium columnare* Infection in Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22: 115-122. <https://doi.org/10.1577/H09-057.1>, PMID: 20848886.
- Jangaran Nejad, A.; Peyghan, R.; Najafzadeh Varzi, H. and Shahriyari, A. (2017). Florfenicol pharmacokinetics following intravenous and oral administrations and its elimination after oral and bath administrations in common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Research Forum*. 8(4): 327-331. PMID: 29326792.
- Matthews, M.D.; James, D.; Bowker, J.D.; Carty, D.J.; Wandelaar, N.; Bowman, M.P. et al. (2013). Efficacy of Aquaflor (50% Florfenicol)-Medicated Feed to Control Mortality Associated with *Flavobacterium columnare* Infection in Florida Largemouth Bass and Bluegill. *Nourth American Journal of Aquaculture*, 75: 385-392. <https://doi.org/10.1080/15222055.2013.786006>.
- Meinertz, J.R.; Hess, K.R.; Bernardy, J.A.; Gaikowski, M.P.; Whitsel, M. and Endris, R.G. (2014). Florfenicol residues in rainbow trout after oral dosing in recirculating and flow-through culture systems. *Journal of Aquatic Animal Health*, 26: 243-250. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.945046>, PMID: 25321636.
- Meinertz, J.R. (2011). Depletion of florfenicol amine from the fillet tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) maintained in a recirculating aquaculture system and treated with Aquaflor® medicated feed. *Online Journal of Upper Midwest Environmental Sciences Centre*, 2: 13-18.
- Michel, C.; Kerouault, B. and Martin, C. (2003). Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fishpathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 1008-1015. PMID: 14633029.
- Nematollahi, A.; Karimi, I. and Mokhtari, A. (2014). Influence of nitrogen compounds and water temperature on association of *Lactococcus garvieae* to gill tissue of rainbow trout in Lactococcosis. *Iran Journal of Veterinay Clinical Sciences*, 7(2): 13-22. (In Persian)
- Pourmolaie, B.; Eshraghi, H.R.; Haghighi, M.; Mortazavi, S.A. and Sharif Rohani, M. (2015). Pharmacokinetics of florfenicol administrated to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by oral gavages and medicated feed routes. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science*, 4(4): 14-17.
- Raissy, M. and Moumeni, M. (2016). Detection of antibiotic resistance genes in some *Lactococcus garvieae* strains isolated from infected rainbow trout. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 15(1): 221-229. <https://doi.org/10.1111/1477-8947.00048>.
- Romero, J.; Feijoo, C.G. and Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives (Chapter 6). In: *Health and Environment in Aquaculture*. 2nd ed. Intech publishing, Santiago, Pp: 162-170.
- Safaeian, S.; Moghaddam, Z.; Hosseiny, H. and Esmaili, A. (2014). Antibiotic resistance in isolated negative gram bacteria from intestinal organ of Anzali wetland wild common carp. *Journal of Environmental Science and Technology*, 15(4): 65-74. (In Persian)
- Shahrani, M.; Raissy, M. and 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*, 3(11): 71-78. (In Persian)
- Sharifiyazdi, H.; Akhlaghi, M.; Tabatabaei, M. and Mostafavi Zadeh, S.M. (2010). Isolation and Characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Iran. *Iranian Journal of Veterinay Research*, 11, 342-350. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2010.105>.
- Taheri Mirghaed, A.; Soltani, M.; Mahmoodi, Z. and Hosseini Shekarabi, S.P. (2016). Study of cultured rainbow trout contamination with *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in some fish markets of Tehran and Karaj. *Journal of Food Hygiene*, 6(1): 65-73. (In Persian)
- Wang, C.Y.; Shie, H.S.; Chen, S.C.; Huang, J.P.; Hsieh, I.C. and Wen, M.S. (2007). *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice*, 61(1): 68-73. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.00855.x>, PMID: 16704679.
- Wang, J.; MacNeil, J.D. and Kay, J.F. (2011). Chemical analysis of antibiotic residues in food. 1st ed. John Wiley & Sons Inc. Publication, New York, Pp: 61-111.
- Wang, W.; Dai, X.; Li, Z. and Meng, Q. (2009). Tissue Distribution and Elimination of Florfenicol in Topmouth Culter (*Culter alburnus*) after Oral Administration. *Czech Journal of Food Science*, 27(3): 216-221.

Yanong, R.P.E. and Francis-Floyd, R. (2006). Streptococcal infections of fish. 2nd ed. University of Florida/ IFAS Extension, Circular 57/FA057, Florida, Pp: 1-5.

Zamri-saad, M.; Amal, M.N.A.; Siti-Zahrah, A. and Zulkafli, A.R. (2014). Control and Prevention of streptococcosis in cultured tilapia in Malaysia: A

review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 37(4): 389-410. <https://doi.org/10.1111/jfd.12125>.

Recieved:11.12.2018

Accepted:22.06.2019



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Determination of optimal clinical dosage of orally administered florfenicol in rainbow trout with the experimental Streptococcosis/ Lactococcosis, and assessment of drug residues in their liver and muscles

Shiry, N.¹; Soltanian, S.² and Shomali, T.³

Received: 11.12.2018

Accepted: 22.06.2019

Abstract

The occurrence of resistance to antibiotics in bacterial pathogens due to their unnecessary consumption, as well as, the importance of use antibiotics in the outbreaks with heavy economic failures cause that finding optimal clinical dosage would be striking. The present study was intended to the determination of optimal clinical dosage of orally administered florfenicol in rainbow trout with the experimental Streptococcosis/ Lactococcosis, and assessment of drug residues in their muscles. First, the median lethal dose (LD50) of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* for fish was determined via daily casualty record and calculating the probit regression. These doses were applied to determine ED50 in control and orally treated groups with dosages including 5, 10, 20, and 40 mg/kg-1 BW in 10 consecutive days. The liver and muscles of the survived fish were sampled three times after the therapeutic session, since sample and standards preparing, the chemical analysis was performed by high-performance liquid chromatography. Amounts of orally administered florfenicol for *L. garvieae* and *S. iniae* were 14.52 and 15.49 mg/kg BW during 10 consecutive days, respectively. Maximum limit residual (MRL) of sampling tenth day in the liver and muscle were 0.461 ± 0.064 and 0.622 ± 0.103 $\mu\text{g/g}$ that were significantly lower than authorized amount of the European agency for the evaluation of medicinal products. The optimal clinical dosage of florfenicol in rainbow trout with the experimental disease was equal to mean of the median effective dose of the drug was known 15 mg/kg BW that it takes at least 10-day recovery time after administration of this dosage for safe consuming of these fishes.

Key words: Median lethal dose, Median effective dose, Streptococcosis, Lactococcosis, Florfenicol residues

1- PhD Graduated in Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

2- Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

3- Associated Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Corresponding Author: Soltanian, S., E-mail: dr.soltanian48@gmail.com