مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۱، ۸-۱
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.118638.2252
Archive of SID

مطالعه آسیب شناسی تجربی یرسینیا راکری در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی طاهری میرقائد[1*] مهدی سلطانی[1] شفیق شفیعی[2] سید سعید میرزرگر[1] سارا شکر پور[3]

۱) گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، ایران
۳) گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۰ آبان ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۷ دی ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری یرسینیوزیس با عامل یرسینیا راکری یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی صنعت آبزی پروری بویژه آزاد ماهیان بوده و در بین آزاد ماهیان گونه قزل آلا از حساس ترین گونه‌ها محسوب می‌شود. **هدف:** این مطالعه بمنظور ارزیابی تجربی بیماریزایی یرسینیا راکری در قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. **روش کار:** گروه‌های ۱۰ تایی ماهیان در دو تکرار با وزن ۱۰۰-۱۲۰گرمی مورد تزریق میزان ۰/۱ ml از غلظت 10^8 Cells/ml از سویه‌های باکتریایی به روش داخل صفاقی قرار گرفته و به مدت ۲۰ روز نگهداری شدند. پس از ثبت تلفات روزانه و علائم بالینی، حاد ترین سویه انتخاب و به منظور تعیین LD۵۰ تیمارهای روش تزریقی و حمام شامل رقت‌های متوالی 10^{-3}تا 10^{-10} از سوسپانسیون باکتریایی مذکور طراحی گردید. همزمان با ثبت تلفات نسبت به تهیه بافت اقدام و ضایعات میکروسکوپیک مطالعه شد. **نتایج:** نتایج حاصله ازعلائم بالینی و رفتاری شامل بی اشتهایی و بیحالی، شنای چرخشی و نزدیک به سطح، تیرگی پوست، اگزوفتالمی، پرخونی و خونریزی‌های سرسوزنی در نقاط مختلف بدن، پروالاپس مخرج، بزرگ شدن کبد و طحال بود. در مطالعات آسیب شناسی پرخونی عروق و سینوزوئیدهای کبدی، نکروز و واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ کلیه، اتساع فضای بومن در گلومرول‌ها، دژنراسیون و نکروز انعقادی لوله‌های ادراری، نکروز شدید و کنده شدن پرزهای روده،هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم لاملاهای ثانویه و چماقی شدن آن‌ها ، نکروز سلولی طحال، هیپرپلازی سلول‌های جامی و افزایش ضخامت لایه اپیدرم زبان از جمله علایم قابل مشاهده بودند. میزان LD۵۰ در روش تزریق داخل صفاقی پس از ۴۸ ساعت در غلظت $10^6 \times 1/2$ سلول به ازای هر ماهی بدست آمد. در روش حمام نیز میزان LD۵۰ پس از ۹۶ ساعت در غلظت 10^8 Cells/mL × ۵ محاسبه شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج بدست آمده حاکی از تنوع حدت در سویه‌های بومی است.

واژه‌های کلیدی: یرسینیوزیس، آسیب شناسی تجربی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

بیماری یرسینیوزیس یا بیماری دهان قرمز انتروباکتریایی (دهان قرمز هگرمن) از جمله بیماری‌های باکتریایی است که خسارات اقتصادی قابل توجهی را در آزاد ماهیان پرورشی سبب می‌گردد (۲۱). بیماری اولین بار در سال ۱۹۵۰ میلادی به صورت یک عفونت سیستماتیک در تعدادی از کارگاه‌های پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایالت آیداهو آمریکا اتفاق افتاد (۱۸). عامل مولد بیماری باکتری یرسینیا راکری بوده که عبارت است ازاجرام گرم منفی که متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و جنس یرسینیا می‌باشد. شیوع بیماری عمدتاً در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در آب شیرین است (۱۲) اما در آب شور و گونه‌های دیگر از ماهیان نیز یک مشکل جدی محسوب می‌شود (۱۰). بیماری در تمام رده‌های سنی از ماهیان دیده می‌شود اما در ماهیان بزرگتر عمدتاً به صورت فرم مزمن وجود دارد و فرم حاد آن در نوزادان و انگشت قدها می‌باشد. در ایران اولین گزارش بیماری در سال ۱۹۹۹ می‌باشد که طی آن ۶ ایزوله باکتری از برخی مزارع قزل الای کشور جداسازی و شناسایی گردید (۱۹) . درطی سالیان اخیر موارد متعددی از درگیری مزارع با بیماری از مناطق مختلف کشور گزارش گردیده است که بیانگر گسترش بیماری در دهه اخیر در مزارع قزل الای رنگین‌کمان کشورمی باشد (۲۰). با توجه به تنوع حدت ایزوله‌های درگیر در بروز بیماری، ضایعات آسیب شناسی حاصله نیز متفاوت می‌باشد. لذا به همین دلیل ضایعات آسیب شناسی متنوعی نیز از بروز بیماری گزارش شده است (۳). در ایران نیز همانگونه که اشاره شد سویه‌های مختلفی از باکتری گزارش گردیده است که نقش بیماریزایی انها ممکن است که متفاوت باشد. لذا در این مطالعه ضایعات آسیب شناسی تجربی برخی از ایزوله‌های بدست آمده از مزارع قزل آلا ایران مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفته است.

مواد وروش کار

ماهی: ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱۰۰-۱۲۰ g از مزرعه پرورشی واقع در محل بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در محمد شهر کرج تهیه و به حوضچه‌های فایبرگلاس سیستم مدار بسته ماهیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید. ماهیان پس از انتقال به مدت ۲ هفته در شرایط جدید سازگاری داده شده و با استفاده از غذای تجاری پلت ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به میزان ۲

www.SID.ir
*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۹۴، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: mirghaed@ut.ac.ir

Archive of SID

٪ وزن بدن روزانه تغذیه می‌شدند.

شرایط کیفی آب: منبع آب مورد استفاده شامل آب چاه بود که روزانه ۲۰٪ از میزان آن تعویض گردیده و هوادهی آن به صورت مداوم توسط یک هواده مرکزی به منظور حذف گازهای آن و تأمین اکسیژن لازم انجام می‌شد. با توجه به این که شرایط کیفیت آب در زمان انجام این گونه آزمایشات مهم می‌باشد لذا فاکتورهای کیفی آب درطول اجرای آزمایشات کنترل و اندازه گیری می‌شدند. شرایط کیفی آب شامل دمای ۱/۶ °C ± ۱۳/۶، PH برابر۷/۸، اکسیژن محلول بالای ۷ mg/l، نیترات کمتر از ۰/۱ mg/l و آمونیاک کمتر از ۰/۱۰ mg/l بوده است.

بیماریزایی تجربی: برای ایجاد بیماریزایی تجربی از ایزوله‌های با کد ۰۲۲۳، ۰۲۲۶، ۰۲۲۹، ۰۲۳۰، ۰۲۳۳، ۰۲۳۴، ۰۳۰۰ و ۰۳۰۱ استفاده شد. این ایزوله‌ها قبلا از ماهیان قزل‌آلای مزارع مختلف جداسازی و شناسایی گردیده بودند (۲۰). ایزوله‌های لیوفیلیزه ابتدا در آبگوشت TSB (Tryptic soya broth) در دمای ۲۲°C به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شده و پرگنه‌های باکتریایی از پاساژ ثانویه در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردیده (۱۰۸سلول باکتری در هر میلی لیترسرم فیزیولوژی استریل) و پس از بیهوشی ماهیان با اسانس میخک، به هر ماهی میزان ۰/۱ ml از سوسپانسیون هر سویه باکتریایی تزریق داخل صفاقی شد. برای هر یک از تیمارها تعداد ۱۰ ماهی در ۲ تکرار استفاده شد. در گروه شاهد نیز میزان ۰/۱ ml سرم فیزیولوژی استریل به ازای هر ماهی تزریق داخل صفاقی گردید. سپس میزان تلفات طی یک دوره ۲۰ روزه ثبت و از بافت‌های مختلف برای مطالعات آسیب شناسی نمونه برداری گردید.

تعیین میزان LD۵۰: پس از مطالعات صورت گرفته با توجه به نتایج تلفات سویه‌های مختلف یرسینیا راکری، باکتری با بیشترین درصد تلفات انتخاب و سوسپانسیون یکنواخت آن درسرم فیزیولوژی استریل تهیه و نسبت به تهیه ۸ رقت سریالی آن شامل 10^{3} cells/ml تا 10^{10} اقدام گردید. از رقت‌های مذکور میزان ۰/۱ ml به ازای هر ماهی و در گروه کنترل نیز میزان ۰/۱ ml سرم فیزیولوژی استریل تزریق داخل صفاقی شد (پس از ایجاد بیهوشی با اسانس میخک). غلظت باکتریایی در روش حمام نیز cells/ml 10^{3} تا 10^{10} آب به مدت یک ساعت حمام باکتریایی همراه با هواده بود. برای هر یک از تیمارهای داخل صفاقی و حمام تعداد ۱۰ ماهی در۲ تکرار استفاده شد. بعد از مواجه با باکتری ماهیان به مدت ۱۴ روز مانیتورینگ شده و علایم رفتاری و کلینیکی آن‌ها ثبت گردید. ماهیان تلف شده بلافاصله از تانک خارج شده و تائید تلفات نیز با کشت و جدا سازی باکتری از بافتهای کلیه ماهیان تلف شده صورت گرفت. همچنین جهت تعیین میزان LD۵۰ از روش آنالیز نرم افزار PROBIT (EPA,Probit Analysis Program) Version ۱/۵ با ضریب اطمینان۹۵ ٪ استفاده شد.

مطالعات آسیب شناسی: برای مطالعات آسیب شناسی از بافت‌های آبشش، روده، کلیه، کبد، طحال و زبان ماهیان تلف شده نمونه‌گیری و

جدول ۱. تلفات ماهیان در مواجهه با سویه‌های متفاوت یرسینیا راکری.

سویه باکتریایی	Origin	سال جداسازی	درصد تلفات
یرسینیا راکری (۰۲۲۳)	مازندران	۱۳۸۹	۷۰
یرسینیا راکری (۰۲۳۴)	تهران	۱۳۹۰	۶۰
یرسینیا راکری (۰۲۳۰)	مازندران	۱۳۹۰	۶۰
یرسینیا راکری (۰۲۲۹)	تهران	۱۳۸۹	۳۰
یرسینیا راکری (۰۳۰۰)	مازندران	۱۳۹۰	۲۰
یرسینیا راکری (۰۳۰۱)	مازندران	۱۳۹۰	۲۰
یرسینیا راکری (۰۲۲۶)	تهران	۱۳۸۹	۱۰
یرسینیا راکری (۰۲۳۳)	زنجان	۱۳۹۰	۱۰

بلافاصله در محلول فرمالین ۱۰ ٪ تثبیت گردید. بافت‌های تثبیت شده ابتدا آبگیری، شفاف سازی و پارافینه شده و سپس از آن‌ها مقاطع میکروسکوپی ۵ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین وائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند .در ادامه مقاطع بافتی با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج

علایم آسیب شناسی بالینی: در برخی از ماهیان تلف شده ناشی از سویه‌های با تلفات بالا به استثنای تورم و قرمزی در محل تزریق تغییرات بالینی دیگری مشاهده نگردید اما در ادامه بسته به درجه حدت سویه باکتریایی علایم بالینی شامل سستی و بیحالی، شنای چرخشی و نزدیک به سطح، کاهش اشتها، تیره شدن پوست و اگزوفتالمی یک تا دو طرفه و در برخی موارد همراه با خونریزی قابل مشاهده بود. همچنین خونریزی‌های سرسوزنی در نقاط مختلف بدن بخصوص در قاعده باله‌ها و مخرج ماهیان مبتلا مشاهده و در برخی موارد آبشش‌ها رنگ پریده و یا پرخون بود. از نظر داخلی پرخونی، خونریزی والتهاب در قسمتهای انتهایی روده، خونریزی‌های پتشی منتشره در سطح کبد و زواید باب المعده و بزرگ شدن طحال و کبد در اکثر نمونه‌های تلف شده مشاهده گردید. از دیگر علایم مشاهده شده در برخی از نمونه‌های مبتلا وجود پرخونی و خونریزی به صورت نقاط سر سوزنی در ناحیه فک و زبان ماهیان درگیر بود (تصویر۱). کشت باکتریایی از بافت کلیه تمام نمونه‌های تلف شده منجر به جداسازی و شناسایی مجدد یرسینیا راکری گردید.

آسیب شناسی میکروسکوپیک: بطور کلی شدت ضایعات میکروسکوپیک ناشی از ایزوله‌های مختلف متفاوت بوده است بطوریکه در ایزوله‌های با درصد تلفات بالاتر شدت ضایعات آسیب شناسی نیز بیشتر بوده است.

الف-بافت کبد: درتلفات مربوط به تمامی سویه‌ها پرخونی عروق و سینوزوئیدهای کبدی دیده شد اما نکروز و تورم هپاتوسیت‌ها تنها در تلفات ناشی از سویه‌های با شدت تلفات بالاتر قابل مشاهده بود. علاوه بر این واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها و تغییرات چربی نیز در تمامی سویه‌ها مشاهده گردید.(تصویر۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. نتایج LD۵۰ در ۱۴ روز مواجهه با یرسینیا راکری به روش تزریق داخل صفاقی.

رقت باکتری	ماهیان زنده	ماهیان تلف شده	فراوانی تجمعی ماهیان زنده	فراوانی تجمعی ماهیان تلف شده	درصد تلفات تجمعی
کنترل	۱۰	-	۴۷	-	۰
$۱۰^{۳}$	۹	۱	۳۷	۱	۲/۶
$۱۰^{۴}$	۷	۳	۲۸	۴	۱۲/۵
$۱۰^{۵}$	۶	۴	۲۱	۸	۲۷/۵
$۱۰^{۶}$	۶	۴	۱۵	۱۲	۴۴/۴۴
$۱۰^{۷}$	۴	۶	۹	۱۸	۶۶/۶
$۱۰^{۸}$	۳	۷	۵	۲۵	۸۳/۳
$۱۰^{۹}$	۲	۸	۲	۳۳	۹۴/۲
$۱۰^{۱۰}$	-	۱۰	-	۴۳	۱۰۰

جدول۳. نتایج LD۵۰ در ۱۴ روز مواجهه با یرسینیا راکری به روش حمام.

رقت باکتری	ماهیان زنده	ماهیان تلف شده	فراوانی تجمعی ماهیان زنده	فراوانی تجمعی ماهیان تلف شده	درصد تلفات تجمعی
کنترل	۱۰	-	۷۱	-	۰
$۱۰^{۳}$	۱۰	-	۶۱	-	۰
$۱۰^{۴}$	۱۰	-	۵۱	-	۰
$۱۰^{۵}$	۹	۱	۴۱	۱	۲/۳۸
$۱۰^{۶}$	۸	۲	۳۲	۳	۸/۵۷
$۱۰^{۷}$	۸	۲	۲۴	۵	۱۷/۲۴
$۱۰^{۸}$	۷	۳	۱۶	۸	۳۳/۳۳
$۱۰^{۹}$	۵	۵	۹	۱۳	۵۹/۰۹
$۱۰^{۱۰}$	۴	۶	۴	۱۹	۸۲/۶۰

ب- بافت کلیه: در تلفات ناشی از تمامی سویه‌ها آتروفی، چروکیدگی گلومرول‌ها و اتساع فضای بومن مشاهده شد. افزایش حضور مراکز ملانوماکروفاژ، دژنراسیون، نکروز انعقادی لوله‌های ادراری و کستهای متعدد سلولی تنها در تلفات ناشی از سویه‌های با حدت بالاتر مشاهده گردید (تصویر ۳).

ج- بافت روده: در مقاطع بدست آمده از بافت روده پرخونی عروق، خونریزی و نفوذ سلول‌های آماسی در مخاط و زیرمخاط، از بین رفتن ساختمان طبیعی پرزهای روده، نکروز و کنده شدن پرزهای روده همراه با تجمع سلول‌های نکروزه داخل مجرای روده در تمامی نمونه‌ها قابل قابل مشاهده بود بطوریکه در سویه‌های با شدت تلفات بالاتر شدت بیشتر بوده است (تصویر۴).

د-بافت آبشش: ضایعات وارده بر بافت آبشش شامل پرخونی عروق وادم، چماقی شدن لاملاهای ثانویه، نفوذ سلول‌های التهابی،هایپر پلازی سلول‌های لاملای ثانویه و اتصال آن‌ها به هم بود که در تلفات مربوط به تمامی سویه‌ها مشاهده شد (تصویر۵).

و- بافت طحال: در بافت طحال پرخونی در آرتریول‌ها و سینوزوئیدهای طحالی در تلفات ناشی از همه سویه‌ها دیده شد. همچنین نکروز سلولی تنها در نمونه‌های ماهی مبتلا به سویه‌های با حدت بالاتر مشاهده گردید.

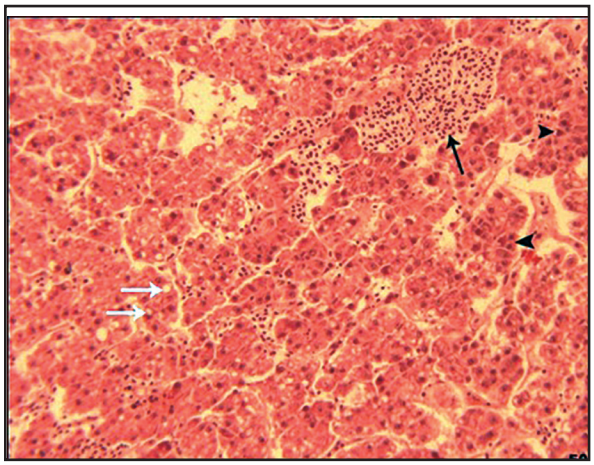
ی- بافت زبان: در مقاطع بدست آمده از زبان‌هایپرپلازی سلول‌های جامی، پرخونی در زیر مخاط، افزایش ضخامت و نکروز در لایه اپیدرم در برخی از نمونه‌های مبتلا به سویه‌های حاد مشاهده گردید (تصویر ۶).

نتایج تعیین حدت و میزان LD۵۰: نتایج مطالعات بیماریزایی تجربی بر روی ۸ ایزوله مورد استفاده در قزل‌آلای رنگین‌کمان طی یک دوره ۲۰ روزه در جدول ۱ نشان داده شده است. در سویه‌های با حدت بالا شامل ایزوله‌های ۰۲۳۰،۰۲۳۴ و۰۲۲۳ تلفات ۳ روز پس از تزریق شروع شده وبه حداکثر میزان خود در طی ۶ روز پس از ابتلا رسیده است. در نمونه‌های با حدت پایین شامل ایزوله‌های۰۲۲۹، ۰۳۰۰، ۰۳۰۱، ۰۲۲۶ و۰۲۳۳ شروع تلفات ۶ روز پس از تزریق بوده و حداکثر میزان تلفات در روزهای ۹-۸ ثبت گردید. بیشترین حدت مربوط به سویه‌های جداسازی شده از مازندران (آمل)، تهران (فیروزکوه) و مازندران (میانرود) با میزان تلفات به ترتیب ۷۰٪، ۶۰٪، ۶۰٪ و کمترین میزان تلفات مربوط به سویه‌های جداسازی شده از استان تهران و زنجان با میزان تلفات ۱۰ ٪ بوده است. پس از مطالعات صورت گرفته باکتری یرسینیا راکری با کد ۰۲۲۳ انتخاب و نتایج LD۵۰ در ۱۴ روز مواجهه با آن به روش تزریق داخل صفاقی و حمام در جدول ۲ و ۳ مشخص گردیده است. در روش تزریقی پس از ۲۴ ساعت تلفات شروع گردیده و میزان LD۵۰ پس از ۴۸ ساعت در غلظت $۱/۲ \times ۱۰^{۶}$ سلول به ازای هر ماهی بدست آمد. در روش حمام تلفات از روز ۳ آغاز و میزان LD۵۰ پس از ۹۶ ساعت در غلظت ۵×۱۰^{۸} سلول به ازای هر میلی لیتر

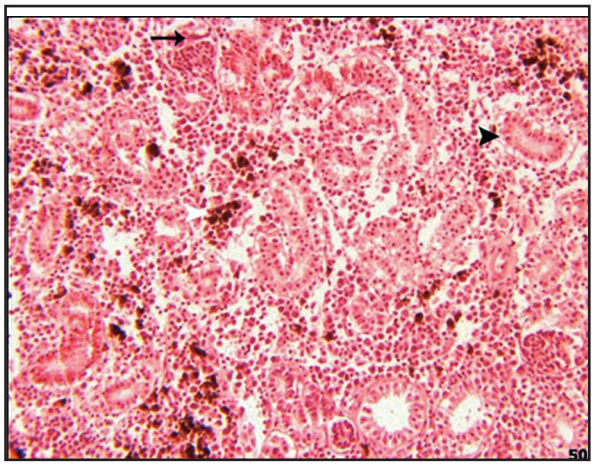
www.SID.ir

Archive of SID

تصویـر۱. برخـی از علایـم بالینی متعاقب آلودگی تجربی با باکتری یرسـینیا راکری. a) تیره شـدن پوسـت در مقایسـه با گـروه کنترل، b) پرولاپس مخرج همـراه با خونریزی، c) اگزوفتالمی همراه با قرمزی ناحیه دهان، d) بزگ شدن طحال و کبد و خونریزی در ناحیه انتهایی روده.



تصویر ۲. تصویرمیکروسـکوپیک کبد. پرخونی و اتسـاع سینوزوئیدها (فلش سیاه)، تغییرات چربی (حضور واکوئل در هپاتوسیت‌ها) (فلش سفید) و نکروز هپاتوسیت‌ها (سر فلش).



تصویـر۳. تصویرمیکروسـکوپیک کلیـه. افزایـش حضـور ملانوماکروفاژهـا، پرگنه باکتری به رنگ بازوفیلی داخل یک رگ خونی (فلش سـیاه)، نکروز انعقادی لوله‌های ادراری (سر فلش سیاه).

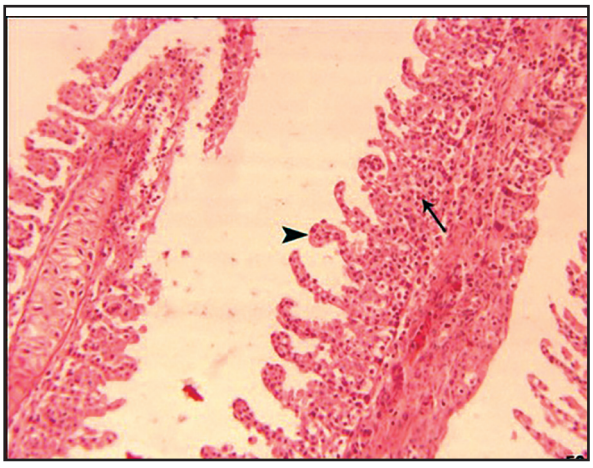
آب محاسبه گردید.

بحث

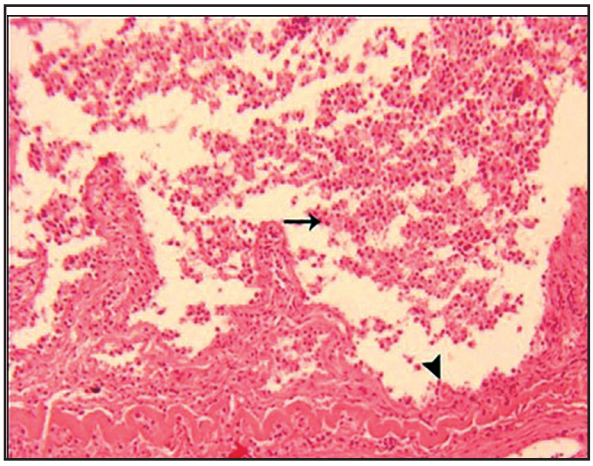
بیماری یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های مهم در صنعت آبزی پروری اسـت که عمدتاً گونه‌های مربوط به آزاد ماهیان را درگیر نموده و سـبب خسارات فراوان در این صنعت گردیده است(۲۱). با این وجود گونه‌های غیر آزاد ماهیان شامل کپور معمولی، ماهی طلایی، ماهیان خاویاری، ماراماهی مهاجر، کاد و تیلاپیا نیز به بیماری حساس می‌باشند(۷،۱۰،۱۱،۱۳). مطالعات

www.SID.ir

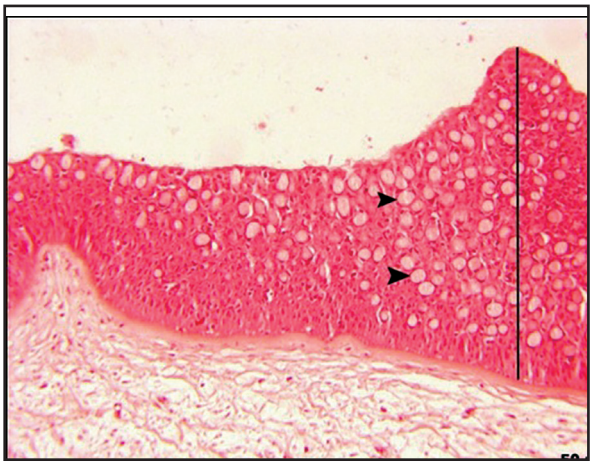
Archive of SID



تصویر ۴. تصویرمیکروسکوپیک آبشش. چماقی شدن(سر فلش). هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم لاملای ثانویه و اتصال آن‌ها به هم (فلش).



تصویر ۵. تصویرمیکروسکوپیک روده. تخریب و نکروز حاد مخاط (سر فلش) همراه با خونریزی و تجمع سلول‌های نکروزه در داخل لومن روده (فلش).



تصویر ۶. تصویر میکروسکوپیک زبان. هیپرپلازی سلول‌های مخاطی (سر فلش) و افزایش ضخامت اپیتلیوم پوششی (خط سیاه) در نیمه راست تصویر.

مختلفی در ارتباط با بیماریزایی و آسیب شناسی بیماری در گونه‌های مختلف ماهیان صورت گرفته است که بسته به گونه میزبان، درجه حرارت آب، راه انتقال، نژاد باکتری درگیر و میزان حدت آن نتایج متفاوتی در بر داشته است که از جمله می‌توان به ادم، پرخونی و ضایعات خفیف تا دژنراسیون سلول‌ها، نکروز و تخریب وسیع بافتهای حیاتی کلیه، قلب، کبد، طحال، روده، زبان و چشم اشاره نمود (۲۲، ۱۴ ، ۱۱، ۳). در این مطالعه متعاقب تزریق داخل صفاقی سویه‌های مختلف باکتری ضایعات بالینی و میکروسکوپیک در اندام‌های مختلف شامل چشم، زبان، طحال، کبد، کلیه، روده و آبشش مشاهده گردید که نشان دهنده سپتسمی و حضور باکتری در اندام‌های مختلف ماهی قزل الای رنگین‌کمان می‌باشد (۲۱). در ارتباط با ضایعات پاتولوژیک نتایج بدست آمده تا حدودی مشابه نتایج سایر محققین بوده است. برای مثال ضایعات عروقی مربوط به آبشش شامل پرخونی و ادم در مطالعات پیشین بیماریزایی تجربی و طبیعی یرسینیوزیس گزارش گردیده است (۵،۱۶) اماهایپرپلازی سلول‌های تیغه‌های آبششی تنها در درمطالعه Avci و Birincioglu در سال ۲۰۰۵ گزارش گردیده است. همچنین تغییرات نکروتیک در کلیه، کبد و طحال ناشی از یرسینیوزیس در مطالعات بیماریزایی تجربی و طبیعی قزل الای رنگین‌کمان مشاهده شده است (۲۲ ، ۱۴، ۳ (که مشابه علایم بدست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد. در این تحقیق در تمامی نمونه‌ها بیشترین ضایعات در روده ماهیان تلف شده مشاهده گردید که می‌تواند حاکی از اهمیت بافت روده در بیماریزایی عامل بیماری بوده و نقش آن را بعنوان مدخل ورودی باکتری تائید می‌نماید) ۴،۲۳).

در مطالعهRickaert و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده شده است که سویه حاد باکتری یرسینیا راکری قادر است در درون ماکروفاژهای ماهی زنده مانده که حاکی از این موضوع است که باکتری یک میکروارگانیسم داخل سلولی اختیاری می‌باشد. مراکز ملانو ماکروفاژ نقش مهمی در پاسخ به میکروارگانیسم‌ها بویژه انواع داخل سلولی و گلبول‌های قرمز آلوده دارند که می‌تواند به دلیل عملکرد داخل سلولی اختیاری عامل بیماری یرسینیوزیس و همچنین بروز کم خونی همولیتیک ناشی از آن حائز اهمیت باشد (۱). در این تحقیق افزایش مراکز ملانو ماکروفاژ در کلیه برخی از ماهیان مبتلا مشاهده گردید که در مطالعه Tobbac و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز شرح داده شده است. لذا با توجه به نقش مراکز ملانو ماکروفاژ در پاسخ التهابی مزمن (۱،۸) مطالعه حاضر می‌تواند نقش احتمالی یرسینیا راکری در ایجاد نفریت مزمن در کلیه را نشان دهد.

معمولاً تلفات ناشی از یرسینیوزیس بسته به اندازه ماهی، شرایط بهداشتی کارگاه و عوامل استرس زا طی ۵ تا ۱۰ روز پس از ایجاد عفونت طبیعی رخ می‌دهد(۱۸). در مطالعه Busch و Lingg در سال ۱۹۷۵ متعاقب بیماریزایی تجربی به روش داخل صفاقی قزل‌آلای رنگین‌کمان، اولین تلفات ۶ روز پس از عفونت اولیه شروع شده و در روز ۹ به حداکثر میزان خود رسید. همچنین در مطالعه مشابه Avci و Birincioglu در سال ۲۰۰۵ شروع تلفات ۴ روز پس از ابتلا بوده و در روزهای ۶-۸ پس از ابتلا به حداکثر میزان رسید. در مقایسه با مطالعات اشاره شده، نتایج حاصله

www.SID.ir

Archive of SID

از این تحقیق تفاوت در الگوی تلفات را نشان می‌دهد که ناشی از حدت‌های متفاوت سویه‌های درگیر می‌باشد که در دیگر مطالعات تجربی در قزل آلای رنگین کمان نیز نشان داده شده است (۲،۶،۹،۱۷).

متعاقب تزریــق داخل صفاقی و حمام غلظت‌های مختلف حادترین ســویه، تلفات به ترتیب در ۲۴ و ۷۲ ســاعت پس از تزریق باکتری شروع و در ادامــه افزایش یافته بطوریکه میزان LD۵۰ متفــاوت و پس از ۴۸ و ۹۶ ســاعت به ترتیب در روش تزریق و حمام بدست آمد. تفاوت در میزان LD۵۰ در دو روش داخل صفاقی و حمام می‌تواند ناشــی از این موضوع باشــد که آبشش‌ها بعنوان مکان اصلی جهت ورود باکتری محسوب نمی گردند.

نتایج بدســت آمده و مقایسه آن با دیگر مطالعات حاکی از تنوع حدت در ســویه‌های بومی و وجود ســویه‌های با حدت بالاســت که می‌تواند به عنوان عامل بیماریزای خطرناک در تلفات مزارع پرورشــی کشــور قلمداد شود. همچنین در ارتباط با سویه‌های با حدت کمتر احتمال تبدیل ماهیان به حاملین بیماری وجود دارد که در صورت عدم تشــخیص ســبب انتقال بیماری می‌گردد. با توجه به افزایش قابل توجه بیماری در مزارع قزل آلای کشور و خسارت قابل توجه ناشی از آن در مراحل مختلف پرورش، مطالعات بعدی به منظور شناسایی و مقایسه ایزوله‌های عامل بیماری در مزارع سایر اســتانهای کشور ضروری بوده که به اتخاذ سیاستهای عملی پیشگیری و کنترلی از بیماری مذکور کمک خواهد نمود.

تشکر و قدرانی

ایــن مطالعه در قالب زیر پروژه طرح کلان ملی واکســن‌های طیور و آبزیان مصوب شورای عالی عتف و نیز قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران انجام گرفته است.

References

1. Agius, C., Roberts, R. J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. J Fish Dis. 26: 499-509.
2. Austin, D.A., Robertson, P.A.W., Austin, B. (2003) Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Syst Appl Microbiol. 26: 127-131.
3. Avci, H., Birincioglu, S.S. (2005) Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. Turk J Vet Anim Sci. 29: 1321-1328.
4. Busch, R.A., Lingg, A.J. (1975) Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (Salmo gairdneri). J Fish Res Board Can. 32: 2429-2432.
5. Daniely, M.L., Goodwin, A.E., Killian, H.S. (1999) Epizootics in farm raised channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis. 22: 451-456.
6. Davies, R.L. (1991) Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. Vet Microbiol. 29: 289-297.
7. Eissa, A.E., Moustafa, M., Abdelaziz1, M., Ezzeldeen, N.A. (2008) *Yersinia ruckeri* infection in cultured Nile tilapia, Oreochromis niloticus, at a semi-intensive fish farm in lower Egypt. Afr J Aquat Sci. 33: 283-286.
8. Ferguson, H.W. (2006) Systemic pathology of fish. In: Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and Their Responses in Disease. Ferguson, H.W. (ed.). Scotian Press, London. p. 17-18.
9. Fouz, B., Zarza, C., Amaro, C. (2006) First description of nonmotile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. J Fish Dis. 29: 339-346.
10. Furones, M.D., Rodgers, C.J., Munn, C.B. (1993) *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. Annu Rev Fish Dis. 3: 105-125.
11. Gudmundsdottir, B.K., Gudmundsdottir, S., Gudmundsdottir S., Magnadottir B.) 2014) Yersiniosis in Atlantic cod, Gadus morhua (L.), characterization of the infective strain and host reactions. J Fish Dis. 37: 511-9.
12. Hastein, T., Gudding, R., Evensen, O. (2005) Bacterial vaccines for fish: an update of the current situation worldwide. Dev Biol. 121: 55-74.
13. Joh, S. J., Kweon, C. H., Kim, M. J., Kang, M. S., Jang, H., Kwon, J. H. (2010) Characterization of *Yersinia ruckeri* isolated from the farm-cultured eel Anguilla japonica in Korea. Korean J Vet Res. 50: 29-35.
14. Mahjoor, A.A., Akhlaghi, M. (2012) Study of

www.SID.ir

Archive of SID

Rainbow Trout organs naturally infected with Enteric Redmouth Disease. Asian J Anim Sci. 6: 147-153.

15. Rickaert, J., Bossier, P., D'Herde, K., Diez-Fraile, A., Sorgeloos, P., Haesebrouck, F., Pasmans, F. (2010) Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. Fish Shellfish Immunol. 29: 648-655.
16. Rigos, G., Stevenson, R. (2001) The effect of antibiotic treatment on the establishment of persistent infection with *Yersinia ruckeri* Serovar II in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquacult Int. 9: 247-253.
17. Romalde, J.L., Toranzo, A.E. (1993) Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiol Lett. 112: 291-300.
18. Rucker, R.R. (1966) Redmouth disease of rainbow trout (Salmo gairdneri). Bull Off Int Epizoot. 65: 825-830.
19. Soltani, M., Fadaii F., Mehrabi, M.R. (1999). First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. B Eur Assoc Fish Pathol. 9: 173-177
20. Soltani, M., Mousavi, S.H., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Mirzargar, S., Shafiei, S.H., Shohreh, P., et al. Molecular (2014) study of *Yersinia ruckeri* distribution, the cause of yersiniosis in farmed rainbow trout in Iran. Ir J Vet Med. 40: 59-68.
21. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K. (2007) *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis. 30: 257-68.
22. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Ryckaert, J., Duchateau, L., Haesebrouck, F., Chiers, K. (2009) Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org. 84: 219-228.
23. Valtonen, E.T., Rintamäki, P., Koskivaara, M. (1992) Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland: do wild fish serve as a source of infection? J Fish Dis. 14: 163-171.

www.SID.ir

Archive of SID

Pathogenicity of *Yersinia Ruckeri* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)

Taheri-Mirghaed, A.[1*], Soltani, M.[1], Shafiei, Sh.[2], Mirzargar, S.[1], Shokrpur, S.[3]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*
[3]*Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
(Received 11 November 2017, Accepted 17 January 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Yersiniosis or enteric redmouth disease (ERM), caused by *Yersinia ruckeri*, is a serious bacterial disease in the farmed salmonids that causes economic problems in this industry. **OBJECTIVES:** This study was aimed to assess the experimental pathogenicity of *Yersinia ruckeri* in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **METHODS:** Two hundred Rainbow trout weighting 100-120 g, challenged with different strain of *Yersinia ruckeri* were obtained from affected trout farms using intra peritoneal injection route at a concentration of 10^8 cells/ml (0.1 mL per fish) to evaluate the virulence of these isolates. Each treatment group included 10 fish in two replicates and control fish received 0.1 mL sterile normal saline (0.9% NaCl). Following the intra peritoneal challenge, macroscopic and microscopic findings were determined. The most virulent strain was then used to determine the lethal concentration (LD50) using both intra peritoneal and bath method at dilutions of 10^3-10^{10} cells/mL. **RESULTS:** Macroscopically, anorexia, lethargy, circular swimming near the surface, blackening of skin, exophthalmia, hyperemia and hemorrhage in different parts of body, anal prolapse, enlarged liver and spleen were observed. Microscopically, hyperemia of hepatic sinusoids and vessels, necrosis and vacuolization of hepatocytes, increase in the abundance of macrophage centers in kidney, dilatation of Bowman's space, degeneration and necrosis of kidney tubules, severe necrosis and detachment of intestinal villi, hyperplasia and clubbing of epithelial cells of secondary lamellae, spleen cell necrosis, goblet cell hyperplasia and thickening of epidermis layer in the tongue mucosa were observed. The LD50 of intra peritoneal injection was calculated 1.2×10^6cells per fish 48 h post challenge. In bath route, LD50 was obtained 5×10^8 Cells/ml after 96 h. **CONCLUSIONS:** The results obtained from this study show virulence diversity of native strains.

Keyword: *Oncorhynchus mykiss*, *Yersinia ruckeri*, pathogenicity

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mortality rates of fish experimentally infected with 8 different strain of *Yersinia ruckeri* recovered from farmed rainbow trout.

Table 2. Mortality recorded for LD50 calculations of virulent strain *Yersinia ruckeri* in rainbow trout challenged using intra peritoneal injection during 2 weeks.

Table 3. Mortality recorded for LD50 calculations of virulent strain *Yersinia ruckeri* in rainbow trout challenged using bath method during 2 weeks.

Figure 1. Some of the signs observed in the experimentally infected fish to determine the virulence of *Yersinia ruckeri* strains. a) dark color of the skin, b) anal prolapse, c) exophthalmia and reddening of the mouth, d) Enlarged spleen and liver with hyperemia and hemorrhage in intestine.

Figure 2. Hyperemia of hepatic sinusoids and vessels (black arrow), vacuolization of hepatocytes (white arrow) and necrosis (head arrow).

Figure 3. Increase in the abundance of macrophage centers in kidney, Bacterial colonies in blood vessel (black arrow), degeneration and necrosis of kidney tubules (head arrow).

Figure 4. Epithelial cells Hyperplasia (arrow) and clubbing of secondary lamellae (head arrow).

Figure 5. Severe necrosis and detachment of intestinal villi (head arrow), aggregate of necrotic cells in the lumen of intestine (arrow).

Figure 6. Goblet cell hyperplasia (head arrow) and thickening of the epidermis layer in the tongue mucosa.

***Corresponding author's email: mirghaed@ut.ac.ir, Tel: 021-61117094, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir