

## مطالعه آسیب شناسی تجربی یرسینیا راگری در قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی طاهری میرقاند<sup>۱\*</sup> مهدی سلطانی<sup>۱</sup> شفیق شفیعی<sup>۲</sup> سید سعید میرزرگر<sup>۱</sup> سارا شکر پور<sup>۳</sup>

۱) گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲) گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، 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 راگری یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی صنعت آبی 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 راگری در قزل آلاهی رنگین کمان انجام شد. **روش کار:** گروه‌های ۱۰ تایی ماهیان در دو تکرار با وزن ۱۰۰-۱۲۰ گرمی 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 LD<sub>50</sub> تیمارهای روش تزریقی و حمام شامل رقت‌های متوالی  $10^{10}$  تا  $10^1$  از سویه‌های باکتریایی مذکور طراحی گردید. همزمان با ثبت تلفات نسبت به تهیه بافت اقدام و ضایعات میکروسکوپی مطالعه شد. **نتایج:** نتایج حاصله از علائم بالینی و رفتاری شامل بی اشتها، بیحالی، شنای چرخشی و نزدیک به سطح، تیرگی پوست، آگزوفتالمی، پرخونی و خونریزی‌های سرسوزنی در نقاط مختلف بدن، پرولاپس مخرج، بزرگ شدن کبد و طحال بود. در مطالعات آسیب شناسی پرخونی عروق و سینوزوئیدهای کبدی، نکروز و واکنش‌شدن هیپاتوسیت‌ها، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ کلیه، اتساع فضای بومن در گلوامرول‌ها، 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، هایپرپلازی سلول‌های جامی و افزایش ضخامت لایه اپیدرم زبان از جمله علائم قابل مشاهده بودند. میزان LD<sub>50</sub> 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 LD<sub>50</sub> پس از ۹۶ ساعت در غلظت  $10^8$  Cells/mL × ۵ محاسبه شد. **نتیجه گیری نهایی:** نتایج بدست آمده حاکی از تنوع حدت در سویه‌های بومی است.

**واژه‌های کلیدی:** یرسینیوزیس، آسیب شناسی تجربی، قزل آلاهی رنگین کمان

### مقدمه

گردیده است که بیانگر گسترش بیماری در دهه اخیر در مزارع قزل آلاهی رنگین کمان کشور می‌باشد (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 آنها 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 و روش کار

**ماهی:** ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان با میانگین وزنی ۱۰۰-۱۲۰ گرم 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 قزل آلاهی رنگین کمان به میزان ۲

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 قزل آلاهی رنگین کمان ایالت آیداهو آمریکا اتفاق افتاد (۱۸). عامل مولد بیماری باکتری یرسینیا راگری بوده که عبارت است از اجرام گرم منفی که متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و جنس یرسینیا می‌باشد. شیوع بیماری عمدتاً در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان 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 آلاهی کشور جداسازی و شناسایی گردید (۱۹). در طی سالیان اخیر موارد متعددی از درگیری مزارع با بیماری از مناطق مختلف کشور گزارش



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 آگیری، شفاف‌سازی 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

**علائم 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 علائم 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 پر خون بود. از نظر داخلی پرخونی، خونریزی و التهاب 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 علائم مشاهده شده در برخی از نمونه‌های مبتلا وجود پرخونی و خونریزی به صورت نقاط سر سوزنی در ناحیه فک و زبان ماهیان در گیر بود (تصویر ۱). کشت باکتریایی از بافت کلیه تمام نمونه‌های تلف شده منجر به جداسازی و شناسایی مجدد یرسینیا راکری گردید.

**آسیب شناسی میکروسکوپی:** بطور کلی شدت ضایعات میکروسکوپی 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:** در تلفات مربوط به تمامی سویه‌ها پرخونی عروق و سینوزوئیدهای کبدی دیده شد اما نکروز و تورم هیپاتوسیت‌ها تنها در تلفات ناشی از سویه‌های با شدت تلفات بالاتر قابل مشاهده بود. علاوه بر این واکنش‌ها شدن هیپاتوسیت‌ها و تغییرات چربی نیز در تمامی سویه‌ها مشاهده گردید. (تصویر ۲).

٪ 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 در طول اجرای آزمایشات کنترل و اندازه گیری می‌شدند. شرایط کیفی آب شامل دمای  $1/6 \pm C^{\circ}$ ، PH ۷/۸، اکسیژن محلول بالای ۷ mg/l، نیترات کمتر از ۱ mg/l و آمونیاک کمتر از ۰/۱ 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 قبلاً از ماهیان قزل‌آلای مزارع مختلف جداسازی و شناسایی گردیده بودند (۲۰). ایزوله‌های لیوفیلیزه ابتدا در آبگوشته TSB (Tryptic soya broth) در دمای  $22^{\circ}C$  به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شده و پرگنه‌های باکتریایی از پاساژ ثانویه در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردیده (۱۰۸ سلول باکتری در هر میلی لیتر سرم 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 LD<sub>50</sub>:** پس از مطالعات صورت گرفته با توجه به نتایج تلفات سویه‌های مختلف یرسینیا راکری، باکتری با بیشترین درصد تلفات انتخاب و سوسپانسیون یکنواخت آن در سرم فیزیولوژی استریل تهیه و نسبت به تهیه ۸ رقت سریالی آن شامل  $10^2$  تا  $10^1$  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  $10^2$  تا  $10^1$  آب به مدت یک ساعت حمام باکتریایی همراه با هواده بود. برای هر یک از تیمارهای داخل صفاقی و حمام تعداد ۱۰ ماهی در ۲ تکرار استفاده شد. بعد از مواجهه با باکتری ماهیان به مدت ۱۴ روز مانیتورینگ شده و علائم رفتاری و کلینیکی آن‌ها ثبت گردید. ماهیان تلف شده بلافاصله از تانک خارج شده و تأیید تلفات نیز با کشت و جدا سازی باکتری از بافت‌های کلیه ماهیان تلف شده صورت گرفت. همچنین جهت تعیین میزان LD<sub>50</sub> از روش آنالیز نرم افزار PROBİT (EPA, Probit Analysis Program) Version ۱/۵ با ضریب اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

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



جدول ۲. نتایج LD<sub>50</sub> 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 <sup>۳</sup>	۹	۱	۳۷	۱	۲/۶
۱۰ <sup>۴</sup>	۷	۳	۲۸	۴	۱۲/۵
۱۰ <sup>۵</sup>	۶	۴	۲۱	۸	۲۷/۵
۱۰ <sup>۶</sup>	۶	۴	۱۵	۱۲	۴۴/۴۴
۱۰ <sup>۷</sup>	۴	۶	۹	۱۸	۶۶/۶
۱۰ <sup>۸</sup>	۳	۷	۵	۲۵	۸۳/۳
۱۰ <sup>۹</sup>	۲	۸	۲	۳۳	۹۴/۲
۱۰ <sup>۱۰</sup>	-	۱۰	-	۴۳	۱۰۰

جدول ۳. نتایج LD<sub>50</sub> 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 <sup>۳</sup>	۱۰	-	۶۱	-	۰
۱۰ <sup>۴</sup>	۱۰	-	۵۱	-	۰
۱۰ <sup>۵</sup>	۹	۱	۴۱	۱	۲/۳۸
۱۰ <sup>۶</sup>	۸	۲	۳۲	۳	۸/۵۷
۱۰ <sup>۷</sup>	۸	۲	۲۴	۵	۱۷/۲۴
۱۰ <sup>۸</sup>	۷	۳	۱۶	۸	۳۳/۳۳
۱۰ <sup>۹</sup>	۵	۵	۹	۱۳	۵۹/۰۹
۱۰ <sup>۱۰</sup>	۴	۶	۴	۱۹	۸۲/۶۰

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 LD<sub>50</sub>:** نتایج مطالعات بیماری‌زایی تجربی بر روی ۸ ایزوله مورد استفاده در قزل آلا رنگین کمان طی یک دوره ۲۰ روزه در جدول ۱ نشان داده شده است. در سویه‌های با حدت بالا شامل ایزوله‌های ۰۲۳۰، ۰۲۳۴ و ۰۲۲۳ تلفات ۳ روز پس از تزریق شروع شده و به حداکثر میزان خود در طی ۶ روز پس از ابتلا رسیده است. در نمونه‌های با حدت پایین شامل ایزوله‌های ۰۲۲۹، ۰۳۰۰، ۰۳۰۱، ۰۲۲۶ و ۰۲۳۳ شروع تلفات ۶ روز پس از تزریق بوده و حداکثر میزان تلفات در روزهای ۸-۹ 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 LD<sub>50</sub> 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 LD<sub>50</sub> پس از ۴۸ ساعت در غلظت ۱۰<sup>۶</sup> × ۱/۲ سلول به ازای هر ماهی بدست آمد. در روش حمام تلفات از روز ۳ آغاز و میزان LD<sub>50</sub> پس از ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰<sup>۸</sup> × ۵ سلول به ازای هر میلی لیتر

**ب- بافت کلیه:** در تلفات ناشی از تمامی سویه‌ها آتروفی، چروکیدگی گلوبول‌ها 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 مشاهده بود بطوریکه در سویه‌های با شدت تلفات بالاتر شدت بیشتر بوده است (تصویر ۴).

**د- بافت آبشش:** ضایعات وارده بر بافت آبشش شامل پرخونی عروق وادم، چماقی شدن لاملاهای ثانویه، نفوذ سلول‌های التهابی، هایپر پلازی سلول‌های لاملائی ثانویه و اتصال آن‌ها به هم بود که در تلفات مربوط به تمامی سویه‌ها مشاهده شد (تصویر ۵).

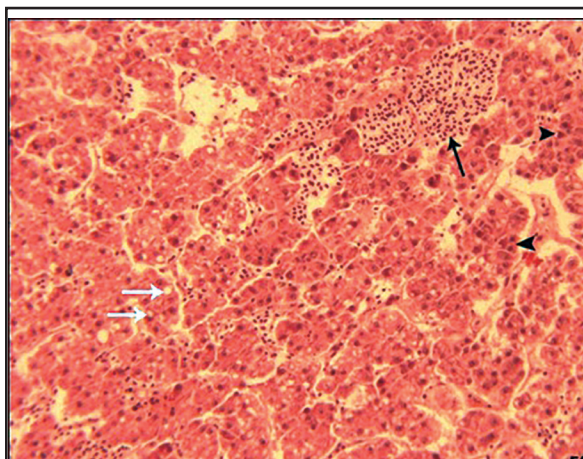
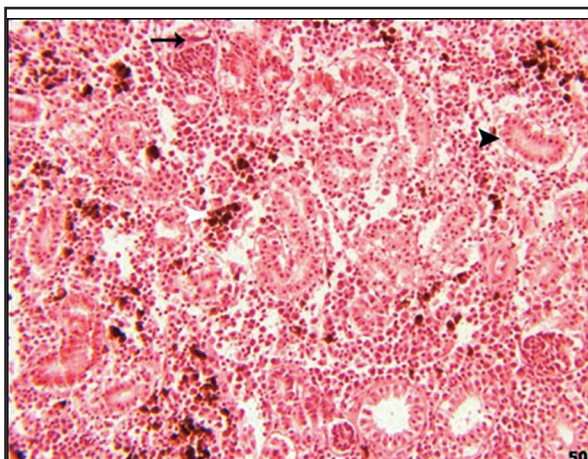
**و- بافت طحال:** در بافت طحال پرخونی در آرتریول‌ها و سینوزوئیدهای طحالی در تلفات ناشی از همه سویه‌ها دیده شد. همچنین نکروز سلولی تنها در نمونه‌های ماهی مبتلا به سویه‌های با حدت بالاتر مشاهده گردید.

**ی- بافت زبان:** در مقاطع بدست آمده از زبان هایپرپلازی سلول‌های





تصویر ۱. برخی از علائم بالینی متعاقب آلودگی تجربی با باکتری یرسینیا را کر. (a) تیره شدن پوست در مقایسه با گروه کنترل، (b) پرولاپس مخرج همراه با خونریزی، (c) اگزوفتالمی همراه با قرمزی ناحیه دهان، (d) بزرگ شدن طحال و کبد و خونریزی در ناحیه انتهایی روده.



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

تصویر ۳. تصویر میکروسکوپی کلیه. افزایش حضور ملانوما کروماتوفاژها، پرگنه با کتری به رنگ بازوفیلی داخل یک رگ خونی (فلش سیاه)، نکروز انعقادی لوله‌های ادراری (سر فلش سیاه).

آب محاسبه گردید.

است که عمدتاً گونه‌های مربوط به آزاد ماهیان را درگیر نموده و سبب خسارات فراوان در این صنعت گردیده است (۲۱). با این وجود گونه‌های غیر آزاد ماهیان شامل کپور معمولی، ماهی طلایی، ماهیان خاویاری، مارماهی مهاجر، کادو تیلاپیانیز به بیماری حساس می‌باشند (۷، ۱۰، ۱۱، ۱۳). مطالعات

### بحث

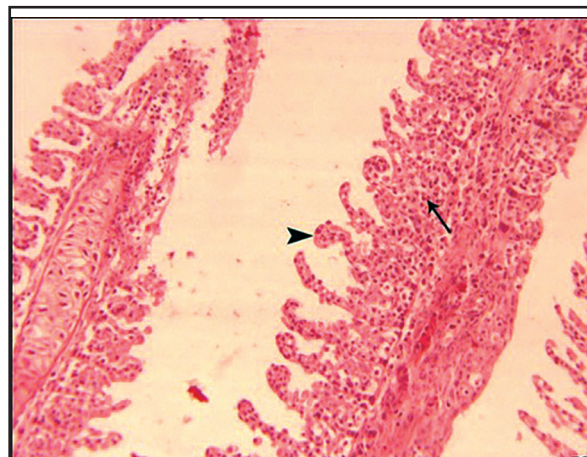
بیماری یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های مهم در صنعت آبی پروری



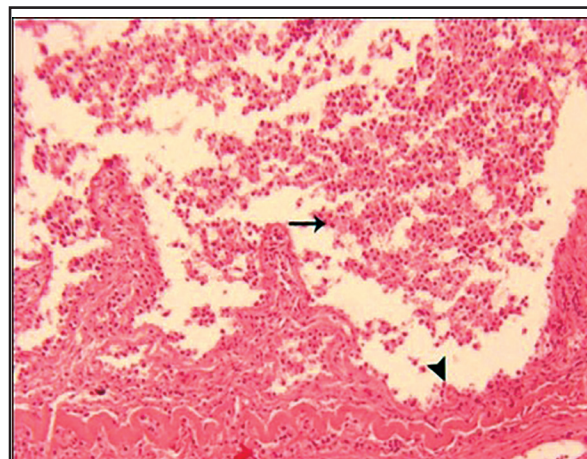
بر داشته است که از جمله می‌توان به ادم، پرخونی و ضایعات خفیف تا دژنراسیون سلول‌ها، نکروز و تخریب وسیع بافت‌های حیاتی کلیه، قلب، کبد، طحال، روده، زبان و چشم اشاره نمود (۲۲، ۱۴، ۱۱، ۳). در این مطالعه متعاقب تزریق داخل صفاقی سویه‌های مختلف باکتری ضایعات بالینی و میکروسکوپی در اندام‌های مختلف شامل چشم، زبان، طحال، کبد، کلیه، روده و آبشش مشاهده گردید که نشان دهنده سپتیمی و حضور باکتری در اندام‌های مختلف ماهی قزل آلا رنگین کمان 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). اما هیپرپلازی سلول‌های تیغه‌های آبششی تنها در در مطالعه Avcı 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 آلا رنگین کمان 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 تأیید می‌نماید (۲۳، ۴).

در مطالعه Rickaert 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 (۸، ۱) مطالعه حاضر می‌تواند نقش احتمالی یرسینیا راکری در ایجاد نفرت مزمن در کلیه را نشان دهد.

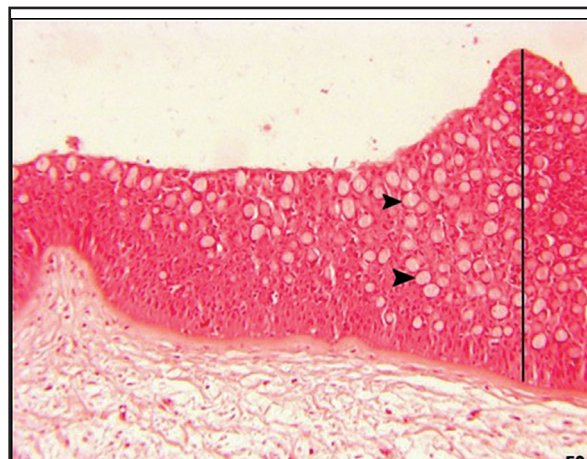
معمولاً تلفات ناشی از یرسینیوزیس بسته به اندازه ماهی، شرایط بهداشتی کارگاه و عوامل استرس زا طی ۵ تا ۱۰ روز پس از ایجاد عفونت طبیعی رخ می‌دهد (۱۸). در مطالعه Busch و Lingg در سال ۱۹۷۵ متعاقب بیماری‌زایی تجربی به روش داخل صفاقی قزل آلا رنگین کمان، اولین تلفات ۶ روز پس از عفونت اولیه شروع شده و در روز ۹ به حداکثر میزان خود رسید. همچنین در مطالعه مشابه Avcı 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



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



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



تصویر ۶. تصویر میکروسکوپی 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



## 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., Abdelaziz, 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

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

متعاقب تزریق داخل صفاقی و حمام غلظت‌های مختلف حادترین سویه، تلفات به ترتیب در ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق باکتری شروع و در ادامه افزایش یافته بطوریکه میزان LD<sub>50</sub> متفاوت و پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت به ترتیب در روش تزریق و حمام بدست آمد. تفاوت در میزان LD<sub>50</sub> در دو روش داخل صفاقی و حمام می‌تواند ناشی از این موضوع باشد که آبشش‌ها بعنوان مکان اصلی جهت ورود باکتری محسوب نمی‌گردند.

نتایج بدست آمده و مقایسه آن با دیگر مطالعات حاکی از تنوع حدت در سویه‌های بومی و وجود سویه‌های با حدت بالاست که می‌تواند به عنوان عامل بیماریزای خطرناک در تلفات مزارع پرورشی کشور قلمداد شود. همچنین در ارتباط با سویه‌های با حدت کمتر احتمال تبدیل ماهیان به حاملین بیماری وجود دارد که در صورت عدم تشخیص سبب انتقال بیماری می‌گردد. با توجه به افزایش قابل توجه بیماری در مزارع قزل‌آلای 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 استانهای کشور ضروری بوده که به اتخاذ سیاستهای عملی پیشگیری و کنترلی از بیماری مذکور کمک خواهد نمود.

## تشکر و قدرانی

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



- 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., Fadaei 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.



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

Taheri-Mirghaed, A.<sup>1\*</sup>, Soltani, M.<sup>1</sup>, Shafiei, Sh.<sup>2</sup>, Mirzargar, S.<sup>1</sup>, Shokrpur, S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup>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  $1.2 \times 10^6$  cells per fish 48 h post challenge. In bath route, LD50 was obtained  $5 \times 10^8$  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

