مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۱، ۱۴۰۰، ۵۱-۴۴
مقاله پژوهشی

آسیب شناسی بافت روده و شاخص‌های خونی ماهی کلمه خزری (*Rutilus Caspicus*) در مواجهه با *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*)

محمد مازندرانی[۱]، علی طاهری‌میرقائد[۲]، اشکان زرگر[۲]، فاطمه خدادادی‌آرپناهی[۳]، اسماعیل پیرعلی خیرآبادی[۴]، سید سعید میرزرگر[۲]

[۱] *گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*
[۲] *گروه بهداشت و بیماری‌های دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۳] *گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*
[۴] *گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۷ مرداد ماه ۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۳ آبان ماه ۱۳۹۹
10.22059/jvr.2019.262756.2828 https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.1.6.4

چکیده

زمینهٔ مطالعه: یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های باکتریایی شایع در ماهیان است که همه ساله تلفات و خسارات اقتصادی فراوانی به مزارع پرورشی وارد می‌سازد.

هدف: در بررسی حاضر وضعیت تغییرات شاخص‌های خون‌شناسی و آسیب‌های بافتی روده در ماهیان کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) در مواجهه با باکتری *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌کار: تعداد ۶۰ عدد ماهی کلمه خزری مولد با میانگین وزنی ۲/۱±۶۳/۴ (گرم) به سه گروه (هر گروه با دو تکرار) شامل یک گروه تیمار، یک گروه شاهد مثبت و یک گروه شاهد منفی تقسیم شدند. ماهیان گروه تیمار به صورت تزریق داخل صفاقی با $۳/۸\times۱۰^{۷}$ باکتری *یرسینیا راکری* مورد مواجهه قرار گرفتند. به ماهیان گروه شاهد مثبت سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. هیچ تزریقی در ماهیان گروه شاهد منفی صورت نگرفت.

نتایج: علایم بیماری در روز چهارم پس از مواجهه آغاز شد و ۵ روز پس از مواجهه ۲۰ درصد ماهیان گروه تیمار تلف شدند. تلفات در روز ۹ پس از مواجهه به ۵۳ درصد رسید. در بررسی‌های خون‌شناسی ماهیانی که با *یرسینیا راکری* مواجه شدند تعداد گلبول‌های سفید (WBC) به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد بالاتر محاسبه گردید. همچنین ماهیان گروه تیمار ۱۰ روز پس از مواجهه دچار کم خونی ماکروسیتیک هایپو کرومیک شدند. در بررسی‌های بافت شناسی روده، نکروز و جداشدگی اپیتلوم پوششی روده و نفوذ سلول‌های آماسی از علایم شایع در ماهیان گروه تیمار بود.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج بررسی حاضر، *یرسینیا راکری* قادر به ایجاد بیماری حاد در ماهیان کلمه خزری است. لذا پیشگیری و کنترل این بیماری در مناطق آلوده بسیار ضروری است.

کلمات کلیدی: کلمه خزری، یرسینیوزیس، کم خونی، بافت شناسی، خون شناسی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: علی طاهری‌میرقائد، گروه بهداشت و بیماری‌های دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: mirghaed@ut.ac.ir

مقدمه

یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های شایع باکتریایی در مزارع پرورش ماهیان محسوب می‌شود که همه ساله خسارات فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد، عامل این بیماری باکتری *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*) است و اولین بار از مزارع قزل آلای رنگین کمان در آمریکا گزارش گردید (۱۸). در حال حاضر این بیماری از نقاط مختلف دنیا در گونه‌های مختلف ماهیان گزارش شده و همه ساله خسارات فراوانی به صنعت پرورش آبزیان وارد می‌سازد (۲۸). در برخی گزارشات میزان تلفات ناشی از این بیماری بیش از ۷۰

درصد نیز ثبت گردیده است (۸). معمولاً در شرایط استرس‌زا و شرایط نامناسب فیزیکوشیمیایی آب پرورش، شیوع بیماری افزایش می‌یابد (۲۴). در عین حال حساسیت ماهیان مختلف نسبت به باکتری *یرسینیا راکری* متفاوت است، براساس گزارشات اگر چه بیماری در گونه‌های مختلف اتفاق می‌افتد، آزاد ماهیان از بیشترین حساسیت در میان ماهیان پرورشی برخوردارند (۹).

یرسینیوزیس در ایران تنها از مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است و تا کنون گزارش رسمی در رابطه با شیوع بیماری در مزارع ماهیان گرمابی کشور و بخصوص کپور ماهیان به‌طور رسمی در دست نیست، اما گزارشات فراوانی در رابطه با شیوع این بیماری در مزارع ماهیان سردابی کشور وجود دارد، به گونه‌ای که همه ساله خسارات فراوانی به این صنعت در کشور وارد می‌سازد (۷،۱۹،۲۰). علایم کلینیکی متعددی برای این بیماری در ماهیان گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به سپتی‌سمی و خونریزی در فک و اطراف دهان (به همین دلیل نام دیگر بیماری، بیماری دهان قرمز است)، خونریزی در چشم‌ها و اگزوفتالمی، پرخونی و خونریزی در محوطه شکمی و دستگاه گوارش بخصوص در قسمت انتهایی روده‌ها اشاره نمود که ممکن است تمامی علایم یاد شده در ماهیان یک مزرعه مشاهده نشود (۱۱،۱۸).

ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) از جمله ماهیان با ارزش دریای خزر و حوزه آبریز آن محسوب می‌شود. این ماهی در بین مصرف‌کنندگان شمال کشور از استقبال بالایی برخوردار است، در عین حال به عنوان یکی از مهمترین منابع غذایی ماهیان خاویاری و بخصوص فیل‌ماهی نیز محسوب می‌شود. متأسفانه در سال‌های اخیر شاهد کاهش چشمگیر جمعیت این ماهی در دریای خزر بوده‌ایم و در راستای بازسازی ذخایر این ماهیان با ارزش، سازمان شیلات ایران همه ساله اقدام به تکثیر مصنوعی و رها سازی بچه ماهیان در سایز انگشت قد به دریا می‌نماید اما آمار صید این گونه از دریا بیانگر این موضوع است که این اقدامات اگرچه بسیار مفید بوده است اما نتوانسته جمعیت آسیب دیده این گونه را در دریا بازسازی کند (۲۱). برای عملیات بازسازی نیاز به تأمین ماهی مولد است و این مولدین می‌تواند به‌صورت مولدین صید شده از دریا و یا به صورت پرورش بچه ماهیان و رسیدن به مرحله مولدی، تأمین گردد که در هر دو صورت نیاز به نگهداری آن‌ها در استخرهای پرورشی می‌باشد. با توجه به گسترش یرسینیوزیس در مزارع سردابی کشور احتمال آلودگی مزارع پایین دست نیز وجود دارد. لذا در صورت آلودگی به *یرسینیا راکری* در منطقه آلودگی این ماهیان در مزارع پایین دست نیز دور از ذهن نیست و با توجه به عدم وجود گزارشی در رابطه با حساسیت ماهیان مولد کلمه خزری نسبت به *یرسینیا راکری*، در مطالعه حاضر بافت روده و شاخص‌های خونی ماهیان مذکور در مواجهه با این بیماری مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

تهیه و آماده سازی ماهیان: به منظور انجام آزمایش تعداد ۶۰ عدد ماهی کلمه خزری با میانگین وزنی ۲/۱ ± ۶۳/۴ (گرم) که به منظور مولد سازی پرورش داده شده بودند، با پلاستیک حمل بچه ماهیان به محل انجام آزمایش منتقل گردید. ماهیان مذکور در دو تانکر ۴۰۰ لیتری تقسیم شده و به مدت یک هفته به منظور سازگاری با شرایط مورد پرورش قرار گرفتند. در طی این دوره ماهیان روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن و دوبار در روز با غذای تجاری (انرژی – ایران) تغذیه شدند. در طی این دوره دمای آب ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد، سختی آب برابر با ۲ ± ۱۹۶ (میلی گرم/لیتر) ثبت گردید.

نحوه آماده سازی باکتریایی: باکتری *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*) مورد استفاده در این مطالعه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با کد PTCC 1888 بصورت فریز شده تهیه گردید. در این راستا گونه دقیق باکتری قبلاً با کمک تست PCR مورد تأیید قرار گرفته بود (۱۳). این باکتری ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت تریپتیک سوی براث (Tryptic Soya Broth) غنی‌سازی گردیده و سپس به صورت کشت سطحی در محیط نوترینت آگار (Nutrient agar) تلقیح گردید. ۴۸ ساعت پس از گرم‌خانه گذاری، باکتری‌ها از سطح محیط کشت برداشت شده و در سرم فیزیولوژی (NaCl ۰/۹ درصد) به صورت سوسپانسیون باکتریایی آماده گردید. کدورت سوسپانسیون مذکور با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر و OD بر اساس نیم استاندارد مک فارلند تنظیم گردید. بار باکترهای زنده این سوسپانسیون روش کشت سطحی و بر مبنای تشکیل کلونی (CFU) به روش استاندارد محاسبه گردید به این منظور پس از تهیه رقت‌های سریالی و کشت آن‌ها در محیط نوترینت آگار، بار باکتری‌های زنده سوسپانسیون $۳/۸ \times ۱۰^{۸}$ سلول زنده به ازای هر سی‌سی محاسبه گردید.

مواجهه باکتریایی ماهیان: در راستای انجام آزمایش یک گروه شاهد منفی، یک گروه شاهد مثبت و یک گروه تیمار (با ۲ تکرار

برای هر گروه) در نظر گرفته شد. به این منظور مولدین کلمه خزری در ۶ آکواریوم شیشه‌ای با ابعاد ۳۰ × ۵۰ × ۴۰ سانتی‌متر تقسیم شدند (۱۵ ماهی در هر آکواریوم). یک هفته پس از سازگاری ماهیان مواجهه باکتریایی انجام شد. در این مطالعه ماهیان گروه تیمار با ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون باکتریایی (معادل $۳/۸ \times ۱۰^{۷}$ باکتری زنده) به روش تزریق داخل صفاقی مورد مواجهه قرار گرفتند(۱۴). ماهیان گروه شاهد مثبت نیز با ۰/۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل به روش داخل صفاقی تزریق شدند. هیچ تزریقی در ماهیان گروه شاهد منفی صورت نگرفت. پس از تزریق ماهیان به مدت ۲ هفته همه روزه پایش شده و تلفات روزانه در صورت وقوع ثبت گردید.

بررسی آسیب شناسی بافت روده: نمونه برداری بافتی در گروه تیمار از ماهیان در حال مرگ و یا تازه تلف شده صورت گرفت. همزمان از ماهیان گروه شاهد نیز نمونه برداری انجام شد. به این منظور پس از باز شدن شکم ماهی نمونه‌برداری از قسمت‌های میانی و انتهایی روده هر کدام از نمونه‌ها انجام گرفت. نمونه‌های بافتی بلافاصله به فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت فیکساتیو نمونه‌ها تعویض گردید. نمونه‌های بافتی در دستگاه پروسسور بافتی آماده‌سازی شد، و پس از آبگیری در الکل اتانول پارافینه شده، مقاطع ۵ میکرونی از بافت‌ها تهیه گردید. رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی به روش هماتوکسیلین و ائوزین صورت پذیرفت (۱۵) و نمونه ها با چسب انتالن لامل گذاری شده و به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ تا ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند.

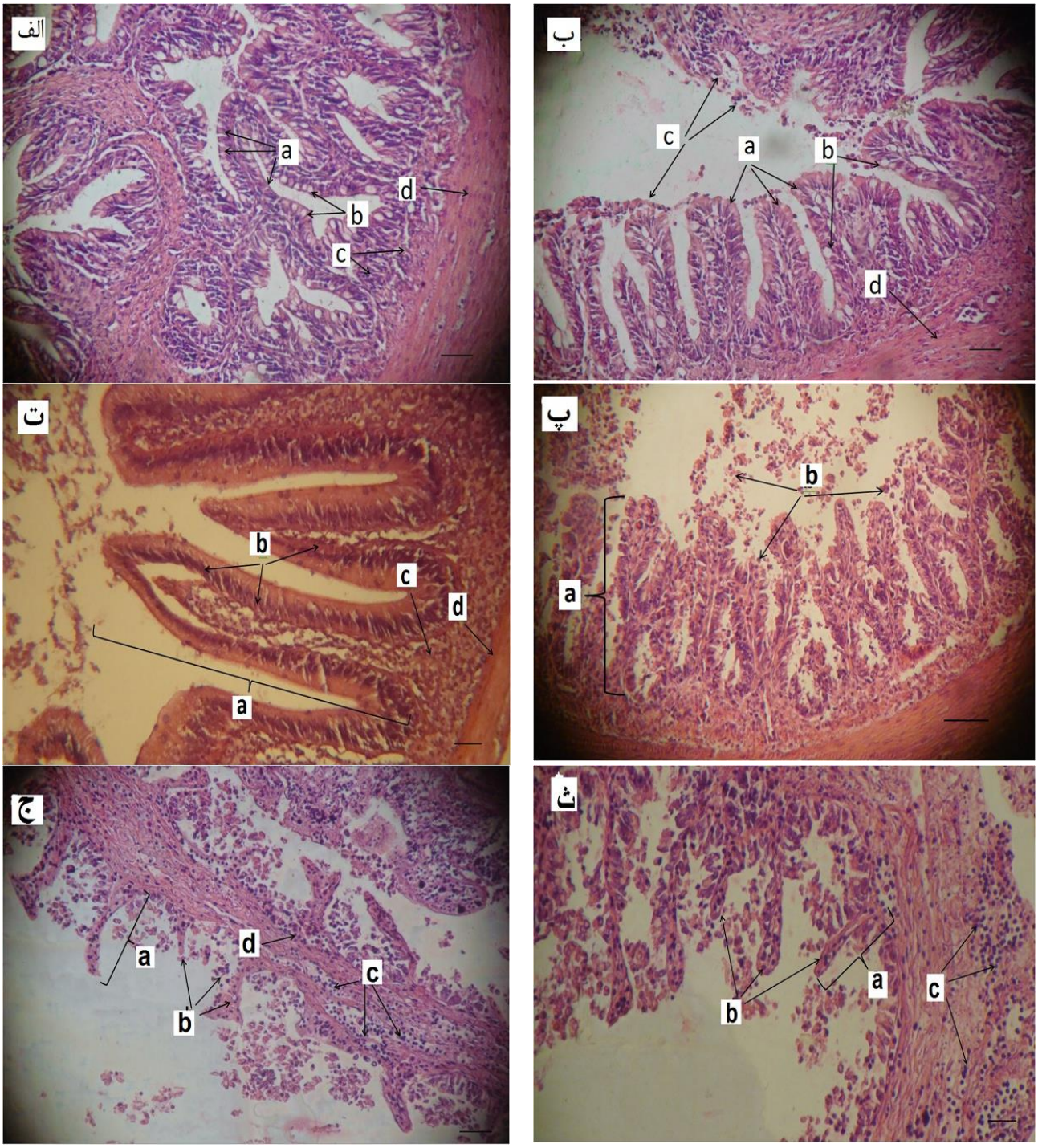
بررسی شاخص‌های خونی: جهت بررسی شاخص‌های خونی در روز ۱۲ پس از مواجهه از ماهیان سالم و بدون علایم بیماری خون‌گیری انجام شده و از هر گروه مورد آزمایش ۷ نمونه خون تهیه گردید. ابتدا ماهیان توسط ۱۰۰ (میلی گرم در لیتر) یوجینول (Sigma_ Aldrich co, Germany) بیهوش شدند و سپس خون‌گیری از ساقه دمی ماهیان توسط سرنگ آغشته شده به هپارین با سرسوزن گیج ۲۵ صورت گرفت. شمارش تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و گلبول‌های سفید (WBC) توسط لام نئوبار بر اساس روش استاندارد روتین شمارش سلولی انجام شد (۵). هماتوکریت به روش استاندارد میکروهماتوکریت انجام شده و به صورت درصد بیان گردید. مقادیر هموگلوبین در این آزمایش توسط روش سیانومت هموگلوبین و با کیت تجاری پارس آزمون اندازه‌گیری شد (۱). اندیس‌های خونی حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) بر اساس روش Dacie و Lewis (2001) محاسبه گردید (۵). پس از تهیه گسترش خونی نمونه‌ها و رنگ آمیزی با گیمسا تعیین درصد انواع گلبول‌های سفید نیز بر اساس ساختار و شکل سلولی صورت پذیرفت (۱۷).

بررسی‌های آماری: بررسی آماری نتایج تحقیق حاضر توسط نرم‌افزارهای SPSS18 و Excell 2010 انجام شد. نمودار روند تلفات مولدین کلمه خزری نیز توسط نرم افزارهای SPSS18 رسم گردید. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان گردید. برای مقایسه نتایج بین گروه‌های مختلف از one way ANOVA و آزمون آماری دانکن (Duncan) استفاده شد.

جدول ۱. شاخص‌های خون‌شناسی در ماهیان مولد کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) مواجهه شده با *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*).

	گروه شاهد منفی	گروه شاهد مثبت	گروه تیمار
تعداد گلبول قرمز (10^6 cell/m^3)	^{a}۱/۵۱ ± ۰/۱۳	^{a}۱/۴۵ ۰±/۱۶	^{b}۱/۲۲ ± ۰/۲۱
تعداد گلبول سفید (10^3 cell/m^3)	^{a}۱۱/۳ ± ۲/۸	^{a}۹/۵۴ ± ۶/۲	^{b}۲۱/۳ ± ۷/۱
هموگلوبین (میلی گرم در لیتر)	^{a}۸/۱ ± ۰/۳	^{a}۸/۲ ± ۰/۴	^{b}۶/۸ ± ۰/۶
هماتوکریت (درصد)	^{a}۲۷/۶ ± ۳/۱	^{a}۲۷/۲ ± ۳/۳	^{a}۲۸/۴ ۲±/۴
MCV (fl)	^{a}۱۸۲/۸ ۲۹±/۵	^{a}۱۸۷/۶ ± ۳۱/۲	^{b}۲۳۲/۶ ± ۲۴/۴
MCH (pg)	^{a}۵۳/۶ ± ۶/۱	^{a}۵۶/۵ ± ۶/۳	^{a}۵۵/۷ ± ۵/۱
MCHC (درصد)	^{a}۲۹/۳ ± ۳/۲	^{a}۳۰/۱ ± ۲/۷	^{b}۲۳/۹ ± ۳/۶
لنفوسیت (درصد)	^{a}۸۳/۴ ± ۳/۸	^{a}۸۷/۱ ± ۴/۱	^{a}۸۱/۷ ± ۴/۲
نوتروفیل (درصد)	^{a}۱۰/۶ ± ۳/۳	^{a}۷/۸ ± ۲/۸	^{a}۸/۹ ± ۳/۱
منوسیت (درصد)	^{a}۳/۶ ± ۱/۲	^{a}۳/۹ ± ۱/۳	^{a}۴/۱ ± ۰/۹
ائوزینوفیل (درصد)	^{a}۲/۴ ± ۰/۸	^{a}۲/۱ ± ۰/۹	^{b}۵/۳ ± ۱/۱

نمودار۱. روند تلفات ماهیان مولد کلمه خزری در مواجهه تجربی با *یرسینیا راکری* به روش تزریق داخل صفاقی.



تصویر ۱. بافت روده در ماهیان مولد کلمه خزری مواجهه شده با *یرسینیا راکری* به روش تزریق داخل صفاقی؛ تصویر (الف): بافت نرمال روده میانی در ماهیان گروه شاهد مثبت. سلول‌های استوانه‌ای اپیتلوم پوششی نرمال (a)، سلول‌های جامی (b)، بافت زیر مخاط نرمال (c)، لایه عضلات صاف (d). تصویر (ب): بافت روده میانی در ماهیان گروه تیمار، سلول‌های استوانه‌ای اپیتلوم پوششی(a)، سلول‌های جامی (b)، نکروز و جدا شدگی خفیف سلول‌های اپیتلوم پوششی (c)، لایه عضلات صاف روده (d). تصویر (پ): بافت روده میانی با آسیب‌های بافتی متوسط در ماهیان گروه تیمار، تصویر پرزهای روده (a)، نکروز و جداشدگی متوسط بافت پوششی اپیتلوم روده (b) . تصویر (ت): بافت نرمال انتهایی روده در ماهیان گروه شاهد مثبت، تصویر پرز روده نرمال (a)، سلول‌های ستوانه‌ای اپیتلیوم پوششی (b)، بافت نرمال زیر مخاط (c)، لایه عضلانی روده (d). تصویر (ث): نکروز و آسیب‌های شدید بافتی در روده انتهایی در ماهیان گروه تیمار، تصویر میکروویلی روده (a)، نکروز و جدا شدگی گسترده بافت پوششی پرزهای روده (b)، نفوذ سلول‌های اماسی (c). تصویر (ج): نکروز و آسیب‌های شدید بافتی در روده انتهایی در ماهیان گروه تیمار، تصویر میکروویلی روده (a)، نکروز و جدا شدگی گسترده بافت پوششی پرزهای روده (b)، نفوذ سلول‌های آماسی (c)، پرخونی عروق در بافت زیرمخاط (d).

نتایج

وضعیت تلفات حاصل از مواجهه تجربی ماهیان مولد کلمه خزری با باکتری *یرسینیا راکری* در نمودار ۱ قابل مشاهده است. بر اساس این نتایج تا ۴ روز اول پس از مواجهه علایم بیماری و تلفات مشاهده نشد. در روز پنجم پس از مواجهه ۲۰ درصد ماهیان مواجهه شده با $۳/۸ \times ۱۰^{۷}$ باکتری تلف شدند، روند تلفات تا روز ۹ پس از مواجهه به ۵۳ درصد رسید و پس از آن تا روز چهاردهم پس از مواجهه تلفاتی مشاهده نگردید (نمودار ۱). عمده علایم ماهیان بیمار شامل پرخونی و خونریزی در قاعده باله‌ها و همچنین پرخونی و خونریزی دستگاه گوارش و بخصوص در قسمت انتهایی روده‌ها ثبت گردید. در این مطالعه هیچ تلفاتی در ماهیان گروه‌های شاهد مشاهده نگردید.

در بررسی بافت شناسی روده‌ها، آسیب‌های وارده به بافت روده انتهایی در مقایسه با روده میانی در ماهیان گروه تیمار بسیار گسترده‌تر و شدیدتر بوده است، عمده‌ترین شاخص آسیبی در این بافت شامل نکروز و جداشدگی سلول‌های استوانه‌ای اپیتلوم پوششی روده‌ها و نفوذ سلول‌های آماسی در بافت زیر مخاط روده بود (تصویر ۱). علایم یاد شده در قسمت‌های میانی روده‌ها به صورت خفیف تا ملایم ثبت گردید (تصویر ۱، ب و پ). اما در قسمت انتهایی روده گستردگی نکروز اپیتلوم پوششی پرزهای روده به حدی شدید بود که می توان گفت پرزهای روده در این قسمت تمامی اپیتلیوم پوششی خود را از دست داده‌اند (تصویر ۱، ث و ج). هیچ آسیب بافتی در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد (تصویر ۱، الف و ت).

نتایج حاصل از بررسی‌های خون‌شناسی گروه‌های شاهد و ماهیان گروه تیمار ۱۲ روز پس از مواجهه با *یرسینیا راکری* در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس این نتایج مواجهه با یرسینیا باعث کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و مقادیر هموگلوبین در ماهیان گروه تیمار گردید. در عین حال تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در ماهیان گروه تیمار افزایش معنی‌دار داشت. در بررسی شاخص‌های خونی نیز مقادیر MCV در ماهیان گروه تیمار بالاتر و MCHC پایین‌تر محاسبه گردید (جدول ۱).

بحث

همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شد، مواجهه با $۳/۸ \times ۱۰^{۷}$ باکتری منجر به تلف شدن ۵۳ درصد از ماهیان مولد کلمه خزری گردید، که این موضوع نشان دهنده حساسیت متوسط این ماهی نسبت به باکتری *یرسینیا راکری* است. این حساسیت در ماهیان مختلف متفاوت گزارش شده است. به عنوان مثال در یک بررسی تزریق داخل صفاقی $۲/۸ \times ۱۰^{۶}$ باکتری منجر به تلفات حدود ۷۰ درصدی در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) گردید (۱۴). همچنین با تزریق ۵×۱۰^{۵} باکتری در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۸۶ درصد ماهیان تلف شدند (۲)، در مطالعه Haig و همکاران در سال ۲۰۱۱ با تزریق داخل صفاقی $۲/۴ \times ۱۰^{۷}$ باکتری به آزاد ماهی آتلانتیک (*Salmo salar* L) و قزل‌آلای رنگین کمان تلفات ۶۰ تا ۷۵ درصد ثبت گردید (۱۰).

بررسی‌های خون‌شناسی قادر است یک تابلو پاراکلینیکی قابل استناد از سلامت ماهیان ارائه کند. در مطالعه حاضر همانگونه که در جدول ۱ آورده شده است در ماهیانی که با باکتری مواجه شدند تعداد گلبول‌های قرمز کاهش یافته است که با توجه به افزایش اندیس‌های خونی MCV و کاهش MCHC می‌توان گفت این مواجهه منجر به کم خونی نوع ماکروسیتیک هیپوکرومیک در ماهیان مولد کلمه خزری شده است (۴). در حقیقت با عدم تغییر MCH در بین تمامی گروه‌های مورد مطالعه در کنار تغییرات اندیس‌های یاد شده بیانگر این موضوع است که اگرچه هموگلوبین سلولی کاهش نیافته اما با توجه با کاهش MCHC درصد هموگلوبین خون کاهش معنی‌دار داشته است. در بررسی مشابهی در تاسماهی ایرانی مواجهه با *یرسینیا راکری* منجر به کم‌خونی شدید ماهیان گردید (۱۴). افزایش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) را نیز می‌توان به درگیری سیستم ایمنی با باکتری پاتوژن ربط داد. در بررسی‌های متعدد افزایش تعداد گلبول‌های سفید در درگیری با پاتوژن‌های باکتریایی در ماهیان به اثبات رسیده است (۲۲).

وجود آسیب‌های بافتی روده‌ها نیز در بررسی حاضر بیانگر حساسیت ماهیان مولد کلمه خزری به یرسینیوزیس می‌باشد، علایم یاد شده شبیه برخی گزارشات در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (۲۵،۲۶،۲۷)، تاسماهی ایرانی (۱۴) می‌باشد. در این بررسی همان‌گونه که در تصویر ۱ قابل مشاهده است عوارض بافتی در قسمت انتهایی روده در مقایسه با قسمت‌های میانی از شدت بالاتری برخودار بوده است که این موضوع شاید به دلیل تجمع و کلونیزه شدن باکتری در قسمت انتهایی روده‌ها باشد. شاید بتوان

نفوذ و حضور بالای سلول‌های آماسی در قسمت‌های انتهایی روده ماهیان تیمار را با این موضوع مرتبط دانست. در بررسی‌های متعدد خونریزی در فک‌ها و دهان و همچنین خونریزی در قسمت انتهایی روده و بیرون زدگی مخرج ماهی از علایم تیپیک این بیماری در آزد ماهیان می‌باشد (۱۱،۱۸). در مطالعه حاضرعلایم یاد شده در آزاد ماهیان در ماهیان کلمه خزری به این کیفیت مشاهده نگردید، به عنوان مثال در هیچ موردی خونریزی و بیرون زدگی مخرج و یا خونریزی در دهان و فکین ثبت نشد.

همان‌گونه که در مقدمه اشاره گردید متأسفانه جمعیت ماهیان کلمه خزری در طی سال‌های اخیر به شدت روند کاهشی داشته است به گونه‌ای که در برخی مقاطع حتی تهیه مولدین از دریا نیز مشکل بوده است (۲۱)، به همین دلیل در کنار تکثیر مصنوعی و پرورش بچه‌ماهیانی که همه ساله به منظور رهاسازی و ترمیم جمعیت این ماهیان توسط سازمان شیلات ایران صورت می-گیرد، ناگزیر به مولد سازی و نگهداری مولدین نیز خواهیم بود. که در این راستا آگاهی از خطرات احتمالی که این روند را تهدید می‌کند ضروری و کاربردی است. ماهی کلمه خزری یک ماهی گرمابی است و با توجه به شرایط اقیمی کشور محل قرار گرفتن استخرهای این ماهی در پایین دست رودخانه‌ها است به عبارت دیگر آلودگی در قسمت‌های بالا دست (که معمولاً مزارع سردابی در آن واقع است) قادر به آلودگی این مزارع نیز می‌باشد. با توجه به شیوع همه ساله یرسینیا در مزارع سردابی کشور(۷،۱۹،۲۰)، مواجهه کلمه خزری با باکتری *یرسینیا راکری* در پایین دست این مزارع نیز دور از ذهن نیست. از طرفی هنگام شیوع یرسینیوزیس در یک منطقه، آلودگی برای مدت طولانی باقی خواهد ماند. بر اساس برخی گزارشات این باکتری قادر است به مدت ۴ ماه در استخرهای پرورش زنده بماند (۲۳). در عین حال در صورت بروز بیماری، باکتری در دستگاه گوارش ماهی کلونیزه شده و تا چند ماه پس از بهبودی این ماهیان باکتری را از طریق مدفوع در محیط دفع می‌کنند (۳،۱۶). این باکتری حتی از ماهیان سالم و بدون سابقه بیماری نیز در مناطق با سابقه آلودگی جداسازی شده است (۶). برخی محققین بر این باورند که این باکتری قادر است در اندام داخلی ماهیان حساس کلونیزه شده و تا مدت‌ها باقی بماند و در شرایط ناساعد محیطی و یا بروز استرس و ضعف سیستم عمومی بدن بیماری به طور ناگهانی بروز پیدا کند (۱۲).

لذا بر اساس مطالعه حاضر، با توجه به حساسیت ماهیان مولد کلمه خزری و همچنین آلودگی منطقه به *یرسینیا راکری* در پرورش و نگهداری مولدین کلمه خزری ملاحظات بهداشتی و قرنطینه‌ای برای این باکتری باید در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

در پایان از مدیریت و پرسنل صمیمی و زحمت‌کش "مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال _ گلستان" که در انجام مطالعه حاضر ما را همراهی نمودند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. J Fish Biol, 5, 771-781. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x
2. Brec, A., Petrinec, Z., Matasin, Z., Kozaric, Z. (1999). *Yersinia ruckeri* septicaemia in experimentally infected carp (*cyprinus carpio*) fingerlings. Acta Vet Hung, 47, 161-172. https://doi.org/10.1556/004.47.1999.2.2
3. Busch, R.A., Lingg, A.J. (1975). Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can J Fish Aquat Sci, 32, 2429–2432. https://doi.org/10.1139/f75-279
4. Clauss, T.M., Dove, A.D.M., Arnold, J.E. (2008). Hematologic disorders of fish. Vet Clin North Am Exot Anim Pract, 11, 445-462. https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007
5. Dacie, J.V., Lewis, S.M. (2001). Practical Haematology. (9th ed.) Churchill Livingstone, London. England, 633 p.
6. Enriquez, R., Zamora, J. (1987). Isolation of *Yersinia ruckeri* from carp (*Cyprinus carpio*) in Valdivia (in Spanish). Arch Med Vet, 19, 33-36.
7. Fadaeifard, F., Simin, S. (2014). Detection of virulence genes (yrp1 and yrpE) in the *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction test in Chaharmahal-Va Bakhtiary province, Iran. Biol J Microorg. 9, 65-73. (in Persian)
8. Furones, M.D., Rodgers, C.J., Munn, C.B. (1993). *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric red mouth disease (ERM) in fish. Ann Rev Fish Dis, 3, 105-125. https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90031-6
9. Gregory, D., Wiens, R., Vallejo, L. (2010). Temporal and pathogen load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. Fish Shell Immunol, 29, 639-647. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.010
10. Haig, S.J., Davies, R.L., Welch, T.J., Reese, R.A., Verner-Jeffreys, D.V. (2011) Comparative susceptibility of Atlantic salmon and rainbow trout to *Yersinia ruckeri*: Relationship to O antigen serotype and resistance to serum killing. Vet Microbiol, 147, 155–161. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.022

11. Horne, M.T., Barnes, A.C. (1999). Enteric red mouth disease (*Y. ruckeri*). In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (eds.). CABI Publishing, Oxfordshire. p. 455–477.
12. Hunter, V.A., Knittel, M.D., Fryer, J.L. (1980). Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout, *Salmo gairdneri*. J Fish Dis, 3, 467-472. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1980.tb00433.x
13. LeJeune, J.T., Rurangirwa, F.R. (2000). Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. J Vet Diagn Invest, 12, 558- 561. https://doi.org/10.1177/104063870001200611
14. Mazandarani, M., Taheri Mirghaed, A. (2015). Pathogenicity of *Yersinia ruckeri* bacterium in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fingerlings. J Aquat Ecol, 5, 79-87. (in Persian)
15. Roberts, R.J. (2012). Fish Pathology. (4th ed.), Wiley-Blackwell, UK, 590 p.
16. Rodgers, C.J. (1992). Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. J Fish Dis, 15, 243-254. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00660.x
17. Rowley, A.F. (1990). Collection, separation and identification of fish leukocytes. In: Techniques in Fish Immunology. van Muiswinkel, W.B. (ed.). SOS Publications, Fair Haven, NJ, p. 113-136.
18. Rucker R. (1966). Red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin Office Int Epiz, 65, 825–830.
19. Sharifi, Y., Akhlaghi, M.H. (2008). Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured Fars province, Iran. Iran J Vet Res, 9, 347-352. (in Persian) https://doi.10.22099/ijvr.2008.2617
20. Soltani, M., Mousavi, Sh., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Mirzargar, S.S., Taheri Mirghaed, A., Shafiei, Sh., Shohreh, P., Mohammadian, S. (2014). Molecular study of *Yersinia ruckeri* distribution, the causative agent of yersiniosis in some farmed rainbow trout of Iran. Iran J Vet Med, 10, 59-68. (in Persian)
21. Statistical Year book of Iran Fisheries Organization, 2004-2014. (2015). (1st ed.) 63 p. (in Persian).
22. Stoskopf, M.K. (1993). Fish Medicine. W.B. Saunders Co, Philadelphia, USA, 882 p.
23. Thorsen, B. K., Enger, O.E., Norland, S., Hoff, K.A. (1992). Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. J Appl Environ Microbiol, 58, 1624-1628. PMID: 1622232
24. Welch, T.J., Wiens, G.D. (2005). Construction of a virulent, green fluorescent protein tagged *Yersinia ruckeri* and detection in trout tissues after intraperitoneal and immersion challenge. Dis Aquat Organ, 67, 267–272. https://doi.org/10.3354/dao067267 PMID: 16408843
25. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis, 30, 257–268. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00816.x PMID: 17501736
26. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Ryckaert, J., Duchateau, L., Haesebrouck, F. (2009). Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ, 84, 219-228. https://doi.org/10.3354/dao02057 PMID: 19565699
27. Yimer Ahmed, E., Woldeyes, A., Korra, T., Laval, G. (2014). Yersiniosis outbreak in rainbow trout at fish farm in Oromia Regional State, Ethiopia. Ethiopia Vet J, 18, 35-49.
28. Zorriehzahra, M.J., Adel, M., Torabi Delshad, S. (2017). Enteric red mouth disease: Past, present and future: A review. Iran J Fish Sci, 16, 1135-1156.

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 1, 2021
Original Article

Intestinal Histology and Haematology of Caspian Roach (*Rutilus caspicus*) Exposed to *Yersinia ruckeri*

Mohammad Mazandarani[1], Ali Taheri Mirghaed[2], Ashkan Zargar[2], Fatemeh Khodadadi Arpanahi[3], Esmail Pirali Kheirabadi[4], Seyed Saeed Mirzargar[2]

[1] *Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*
[2] *Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine of Tehran University, Tehran, Iran*
[3] *Department of Fisheries and Environmental Dciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*
[4] *Department of Fisheraies, Faculty of Natural Resourse, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*

10.22059/jvr.2020.291705.2985
Received: *17 August 2020,* ***Accepted:*** *24 October 2020*

Abstract

BACKGROUND: Yersiniosis is known as one of the most prevalent bacterial diseases in fish, which causes high mortality and economic losses in cultured fish farms every year.
OBJECTIVES: The present study was conducted to investigate the changes in hematological indices and gut histopathology in Caspian roach (*Rutilus caspicus*) exposed to *Yersinia ruckeri*.
METHODS: 60 Caspian roach broodstock with an average weight of 63.4 ± 2.1 g were divided into three groups (with two replicates for each group), including one treatment, one positive control, and one negative control groups. The treatment group was intraperitoneally injected with *Yersinia ruckeri* bacterium at a dosage of 3.8×10^7 cell/fish. The positive group just received normal saline (0.9 % NaCl) via intraperitoneal injection. No injection was performed in the negative control group.
RESULTS: Symptoms appeared on the fourth day after exposure and 20 % of the fish in the treatment group died 5 days after the challenge. Cumulative mortality reached 53 % on day 9 after the challenge. According to hematological analysis, the challenge with *Yersinia ruckeri* led to a significant increase in white blood cell counts (WBC) compared to the control groups. Moreover, 10 days following exposure, the treatment group experienced hypochromic macrocytic anemia. Gut histopathology was characterized with necrosis and detachment of intestinal epithelial cell and inflammatory cells infiltration in the treatment group.
CONCLUSIONS: Based on the obtained results herein, *Yersinia rackeri* can cause acute disease in Caspian roach; therefore, preventing and controlling this disease is essential for these fish in infected regions.

Keywords: Caspian roach, Yersiniosis, Anemia, Histology, Hematology

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mirghaed@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-6111700

How to cite this article:

Mazandarani, M., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A., Khodadadi Arpanahi, F., Pirali Kheirabadi, E., Mirzargar, S. (2021). Intestinal Histology and Haematology of Caspian Roach (Rutilus caspicus) Exposed to Yersinia ruckeri. J Vet Res, 76(1), 44-51. https://doi.org/10.22059/jvr.2019.262756.2828

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Hematological indices of Caspian roach (*Rutilus caspicus*) exposed to *Yersinia ruckeri* by intraperitoneal injection
Graph 1. Cumulative mortality of Caspian roach in experimentally exposed to *Yersinia ruckeri* by intraperitoneal injection.
Figure 1. Intestinal histopathology analysis in the Caspian roach exposed to *Yersinia ruckeri* by intraperitoneal injection.