مطالعه فاکتورهاي خوني و آسيب‌شناسي بافتي ناشي از آئروموناس هيدروفيلا (*Aeromonas hydrophila*)در قزل‌آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

کمال احمدي[۱]، عليرضا ميرواقفي*[۲]، مهدي بنايي[۳] و مريم موسوي[۴]
[۱]دانش‌آموخته کارشناسي ارشد شيلات، دانشگاه آزاد اسلامي، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان، تهران، ايران
[۲] دانشيار گروه شيلات و محيط زيست، دانشکده منابع طبيعی دانشگاه تهران، ايران
[۳]استاديار گروه شيلات دانشکده منابع طبيعی و محيط زيست دانشگاه صنعتی خاتم الانبيا بهبهان، ايران
[۴] کارشناس ارشد ميکروبيولوژي گروه شيلات و محيط زيست، دانشگاه تهران، ايران
(تاريخ دريافت: ۱۳۸۹/۴/۱۳ ، تاريخ تصويب: ۱۳۹۰/۵/۲۳)

چکيده
با توجه به اينکه شدت و حدت بيماريزايي باکتري آئروموناس در ماهي قزل‌آلاي رنگين کمان و ساير گونه‌هاي پرورشي در مناطق مختلف متفاوت مي‌باشد لذا جهت مبارزه و يا پيشگيري از شيوع بيماري ناشي از اين باکتري شناخت سويه بيماريزاي اين باکتري ضروري به نظر مي‌رسد. هدف از اين تحقيق بررسي اثرات باکتري آئروموناس بر بافت‌هاي بدن علاوه بر فاکتورهاي خوني مي‌باشد. بررسي ميزان تغييرات آسيب‌شناسي بافت‌هاي کبد، کليه، طحال و آبشش قزل‌آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با باکتري آئروموناس هيدروفيلاي بيماري‌زا، عامل بيماري سپتي‌سمي هموراژيک در ماهي‌ها، ماهي‌ها به روش تزريق درون صفاقي، تماس مستقيم مورد با 10^7 باکتري انجام گرديد. در طي دوره‌ي آزمايش، علائم باليني و ميزان مرگ و مير ثبت گرديد. پس از گذشت ۱۴ روز، ماهي‌هاي بازمانده صيد و پس از خون‌گيري، کالبد شکافي شدند. کاهش معني‌دار تعداد گلبول‌هاي قرمز و درصد هماتوکريت، لنفوسيت‌ها و مونوسيت‌ها ($p < ۰/۰۵$)، افزايش معني‌دار تعداد گلبول سفيد و نوتروفيل مهمترين تغييراتي است که در مطالعات خون‌شناسي ماهي‌هاي مبتلا به عفونت باکتريايي ديده شد.تاييد حضور باکتري در بافت‌ها توسط تست‌هاي بيوشيميايي صورت گرفت. بهم ريختگي ظاهري سلول‌هاي کبدي، از هم گسيختگي سينوس‌هاي خوني و در نتيجه بهم ريختگي آرايش سلولي و شکل گيري واکوئل‌هاي سلولي در کبد، افزايش تعداد مراکز ملانوماکروفاژ و تجمع رنگدانه‌هاي هموسيدريني، تغييرات ريختي در سلول‌هاي اليپسوئيدي در طحال، از بين رفتن مجاري کليوي، دژنره شدن اپيتليوم مجاري کليوي، افزايش فضاي ادراري، دژنره شدن و تحليل گلومرول‌ها و افزايش فضاي کپسول بومن در کليه، هيپرپلازي اپيتليوم لاملاهاي ثانويه و چسبندگي آنها، از مهمترين تغييرات آسيب‌شناسي بافتي، مشاهده شده در مقايسه با گروه شاهد است.

واژه هاي کليدي: آئروموناس هيدروفيلا، آسيب‌شناسي بافتي، فاکتورهاي خون‌شناسي، قزل‌آلاي رنگين کمان

* نويسنده مسئول: تلفن: ۰۲۶۱۲۲۲۳۰۴۴ فاکس: ۰۲۶۱۲۲۴۵۹۰۸ E-mail: vaghefi@nrf.ut.ac.ir

مقدمه

در حال حاضر يکي از مهمترين مشکلات در مديريت بهداشتي برخي از مزارع پرورش ماهي‌ها، کنترل سندرم سپتي‌سمي باکتريايي ناشي از *A. hydrophila* است. بسياري از گونه‌هاي مختلف جانوران آب شيرين مبتلا به آئروموناس هيدروفيلا، علائم باليني مختلفي نظير خونريزي دستگاه گوارشي، زخم‌ها و تاول‌هاي چرکي بويژه در ناحيه گردن لاک‌پشت‌ها، قرمزي بدن ناشي از خونريزي يا پتشي در سخت پوستان، نکروز و خونريزي در آبشش و دستگاه گوارشي و همچنين زخم‌هاي جلدي در گونه‌هاي مختلف کپورماهيان چيني و کاراس بسيار شايع است (Li *et al*., 2006). اين باکتري يکي از مهمترين باکتري‌هاي شناخته شده فلور طبيعي محيط‌هاي آبي است و به طور وسيعي در آب‌هاي شيرين سطحي و آبهاي ساحلي بسياري از نقاط دنيا يافت مي‌شود. جنس آئروموناس شامل باکتري‌هاي کروي، گرم منفي، اکسيداز مثبت و تخمير کننده گلوکز مي‌باشند و به عنوان يکي از عوامل بيماريزا فرصت طلب در انواع جانوران خونسرد و خونگرم اعم از ماهي‌ها، خزندگان، دوزيستان، پرندگان و پستانداران از جمله انسان شناخته شده‌است. اکثر اين ميکروارگانيسم‌ها به جز *A. salmonicida* و *A. media* بوسيله تازک‌هاي قطبي منفرد حرکت مي‌کنند. اين ميکروارگانيسم‌ها در مدفوع حيوانات خونگرم نيز يافت مي‌شوند. لذا احتمال وجود آنها در سيستم‌هاي پرورش ماهي‌هاي گرمابي نيز وجود دارد. براساس گزارش‌ها و مطالعات صورت گرفته، اين باکتري‌ها ممکن است حتي در آبهاي آشاميدني کلرزده نيز يافت شوند (Mahon and Manuselis, 2000). در ايران نيز حضور اين باکتري‌ها در آب‌هاي سطحي و حتي آشاميدني مناطق مختلف به کرات گزارش شده است (Soltandalal *et al*., 2005; Doubaradran *et al*., 2006; Halakou *et al*., 2008). باکتري‌هاي *Aeromonas* spp. از توانايي توليد طيف وسيعي از فاکتورهاي سمي و بيماريزا که شامل اندوتوکسين‌هاي مختلف و ليپوپلي‌ساکاريدها (LPS) برخوردارند (Chopra and Houston, 1999). ترکيب LPS مهمترين ترکيب غشاي باکتري‌هاي گرم منفي است و برهمکنش آن با فاکتورهاي سيستم ايمني سلول و خوني جانوران، نقش بسزايي در عفونت‌زايي و التهاب بازي مي‌کند (Morrison and Bucklin, 1996).

از سويي ديگر اين باکتري با سنتز و ترشح انواع مختلفي از ترکيبات خارج سلولي اعم از آنزيمهاي پرتئوليتيک، همولیزين‌ها و انتروتوکسين‌ها از توانايي قابل توجهي در ايجاد جراحات جلدي و عفونت داخلي برخوردار است (Majumdar *et al*., 2006). اين باکتري باعث ايجاد بيماري در ماهيان آکواريمي ايجاد بيماري کرده که در دماهاي بالاتر شدت بيماري بيشتر مي‌باشد (Akhlaghi and Vafaee, 2002). اين باکتري در ماهي قزل‌آلاي رنگين کمان نيز باعث افزايش ايمنوگلبولين‌هاي سرم، کاهش هماتوکريت و گلبول‌هاي قرمز خون مي‌شود (Tvakoli and Akhlaghi, 2009).

با توجه به احتمال وقوع سپتي‌سمي هموراژيک ناشي از شيوع باکتري فرصت طلب آئروموناس هيدروفيلا در بين ماهي‌هاي پرورشي، شناخت دقيق از تغييرات آسيب شناسي بافتي و خوني ضرور بنظر مي‌رسد. هدف از انجام اين تحقيق بررسي تغييرات فاکتورهاي خون‌شناسي و تغييرات آسيب‌شناسي بافت‌هاي کبد، کليه، طحال و آبشش ماهي قزل‌آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به دنبال عفونت تجربي با باکتري آئروموناس هيدروفيلاي بيماري‌زا مي باشد.

مواد و روش‌ها

ماهي

اين تحقيق در آزمايشگاه شيلات دانشکده منابع طبيعي دانشگاه تهران تهران انجام شد. در اين آزمايش تعداد ۹۰ ماهي قزل‌آلاي رنگين کمان نابالغ *O.mykiss* به وزن ۲۵±۱۵۰گرم استفاده شده است. اين تحقيق در شرايط مناسب پرورشي (دماي ۲°C ±۱۴، اکسيژن محلول ۰/۵±۶/۵ mg/l، دوره نوري ۱۶ L/۸ D) انجام گرديد. پس از انتقال ماهيان، به مدت ۱۵ روز با شرايط آزمايشگاه سازگار گرديدند. ماهي‌ها در شرايط کنترل شده از نظر بهداشتي و مجزا در ۹ مخزن فايبرگلاس به

حجم ۲۰۰ ليتر مجهز به هواده و با طراحي مدار بسته مجزا با تعويض ۲۰% آب در روز توزيع گرديدند. در طي دوره پرورشي ماهيان روزانه به نسبت وزني ۲% از حجم زي‌توده با جيره تجاري تغذيه شدند.

سويه بيماريزاي باكتري

سويه بيماريزاي *A. hydrophila* (RTCC) به شماره ۱۰۳۲به صورت رشد يافته بر روي محيط مغذي تريپتون سويا آگار (TSA)، از موسسه‌ي تحقيقاتي و سرم‌سازي رازي تهيه و در شرايط استاندارد به آزمايشگاه شيلات دانشكده‌ي منابع طبيعي دانشگاه تهران انتقال داده شد (Joseph and Carnahan, 1994). سپس استوک باكتريايي در محيط‌كشت تريپتون سويا براث (TSB) در انكوباتور شيكردار در دماي ۳۷ درجه‌ي سانتي‌گراد به مدت ۲۴ ساعت كشت گرديد و براث حاصل نيز پس از سانتريفيوژ در ۴۰۰۰ دور در دقيقه به مدت ۱۰ دقيقه سانتريفيوژ و ذخيره‌ي باكتريايي لازم پس از دو بار شستشو با محلول بافر فسفات نمكي (PBS) با pH: ۷/۲، تهيه گرديد. به منظور تأييد بيماري زا بودن سويه مورد نظر ميزان LD_{50} آن در آزمايشي كه در ۵ غلظت سوسپانسيون سلولي $cfu\ ml^{-1}$ 10^8و10^7، 10^6، 10^5، 10^4 به ماهيان به صورت درون صفاقي تزريق گرديد و با ۳ تكرار مورد بررسي قرار گرفت. پس از مدت زمان معين (۱۰ روز) ميزان تلفات در گروه هاي آزمايشي بررسي گرديد و ميزان LD_{50} سويه آزمايشي، در غلظت سوسپانسيون سلولي $cfu\ ml^{-1}$ 10^6 تعيين گرديد.

در مرحله‌ي بعد باكتري *A. hydrophila* به غلظت نهايي $1\times10^7 cfu\ ml^{-1}$ به مخازن ماهي‌ها افزوده شد. مازاد محلول باكتريايي كشت نيز در محلول استاندارد حاوي ۰/۸۵% نمک و گليسرول ۲۰% در دماي ۷۰- درجه‌ي سانتي‌گراد نگهداري و در طي دوره‌ي آزمايش جهت تهيه محلول باكتريايي بصورت تازه مورد استفاده قرار گرفت (Joseph and Carnahan, 1994). ماهي‌ها به دو روش تزريق درون صفاقي و تماس مستقيم با باكتري‌ها با عامل عفونت‌زا آلوده گرديدند.

نحوه محاسبه تعداد باكتري

ابتدا باكتري در محيط تريپتون سوي آگار در دماي ۳۷ درجه به مدت ۱۸ ساعت كشت گرديد. سپس كلني در CC ۱فسفات بافر نمكي (PBS: 7.2) استريل رقيق گرديد تا جذب نور آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر به ميزان ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ برسد كه تعداد باكتري به روش توتال كانت برابر با $10^8 \times 1/5$ محاسبه گرديد. سپس براي تهيه ميزان باكتري مورد نظر در مخازن كوچكتر ،كشت در ۴ ليتر محيط تريتون سوي براث تهيه شد و پس از سانتريفيوژ كردن رسوب جسم باكتري توسط بافر فسفات نمكي (pH 7.) جدا گرديد ودو بار شستشو داده شد. و غلظت نهايي در PBS به ميزان ($cfu\ ml^{-1}$) 1×10^7 باكتري در هر ميلي ليتر محاسبه گرديدكه ابتدا ماهيان در مخازن كوچكتر با باكتري به مدت ۶۰ دقيقه تماس داشتند سپس ماهيان به مخازن اصلي نگهداري ماهيان باز گردانده شدند.

نحوه جداسازي باكتري ***A. hydrophila*** */از بافت كبد، طحال و كليه*

پس از ضدعفوني كردن ماهيان با الكل ۷۰%، ماهيان تشريح شدند و بافتهاي مورد نظر جدا گرديد. سوسپانسيون بافت (رقيق سازي بافت با سرم فيزيولوژي استريل) پس از تهيه، در محيط كشت تريپتون سوي آگار (TSA) به صورت ايزوله كشت داده شد. ابتدا رنگ آميزي گرم از كلني ها صورت گرفت. باسيل گرم منفي انتخاب گرديد و تستهاي بيوشيميايي استاندارد جهت تائيد باكتري *A. hydrophila* انجام شد.

شمارش سلول‌هاي خوني

در طي ۱۴ روز از زمان آلودگي ماهي‌ها به سويه‌ي بيماريزا، ميزان مرگ و مير، شدت جراحات جلدي و تغييرات باليني ماهي‌هاي مرده مورد بررسي قرار گرفت. در پايان دوره‌ي آزمايشي، نيز از هر تيمار ماهي‌هاي بازمانده صيد و از آنها خون‌گيري صورت گرفت. شمارش سلول‌هاي قرمز (RBC) و سفيد (WBC) خون به روش

هموسيتومتري انجام گرفت. مقدار هماتوکريت (Hct) نيز به ترتيب به روش ميکروهماتوکريت سنجش گرديد، در شمارش افتراقي گلبول‌هاي سفيد نيز، گسترش خوني تهيه و با گيمسا رنگ آميزي گرديد. به منظور کاهش احتمال خطاي آزمايش در حين شمارش گلبول‌هاي سفيد و قرمز شمارش گلبول‌ها ۳ مرتبه انجام شد.

بافت‌شناسي

پس از خون‌گيري، ماهي‌ها کالبد شکافي شدند و از بخش مياني کليه، کبد، طحال و آبشش ۳ نمونه بافت جدا گرديد و در محلول بوئن به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. تهيه بافت براساس روش متداول در بافت‌شناسي انجام و لام‌هاي تهيه شده با رنگ‌هاي هماتوکسيلين و ائوزين رنگ آميزي و سپس بوسيله‌ي ميکروسکوپ نوري با بزرگنمايي ۴۰ و ۱۰۰ عدسي شيئي مشاهده گرديد.

تجزيه و تحليل آماري

تجزيه و تحليل داده‌ها با استفاده از تجزيه واريانس يک طرفه (ANOVA) و نرم افزار (13) Mintab انجام شد. آزمون نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirrov Normality Test انجام گرديد و جهت نرمال کردن داده‌هاي درصدي به صورت Arcsin عمل شد. مقايسه ميانگين‌ها نيز با استفاده از آزمون آماري دانکن در سطح اطمينان ۹۵% صورت گرفت.

نتايج

دامنه‌ي تغييرات تعداد گلبول قرمز، هماتوکريت، گلبول-هاي سفيد و شمارش افتراقي گلبول‌هاي سفيد در جدول ۱ ارائه شده است. کاهش معني‌دار تعداد گلبول قرمز و درصد هماتوکريت ($p < ۰/۰۵$) ، افزايش معني دار ($p < ۰/۰۵$) تعداد گلبول‌هاي سفيد، کاهش لنفوسيت ($p < ۰/۰۵$) و مونوسيت‌ها و افزايش معني دار ($p < ۰/۰۵$) نوتروفيل از مهمترين تغييراتي است که در مطالعات خوني ماهي‌هاي مبتلا به عفونت باکتريايي ديده مي‌شود. پس از تاييد حضور باکتري *A. hydrophila* در بافتهاي کبد، طحال و کليه توسط تستهاي بيوشيميايي(جدول ۲) بافت‌ها از لحاظ پاتولوژي بررسي گرديد

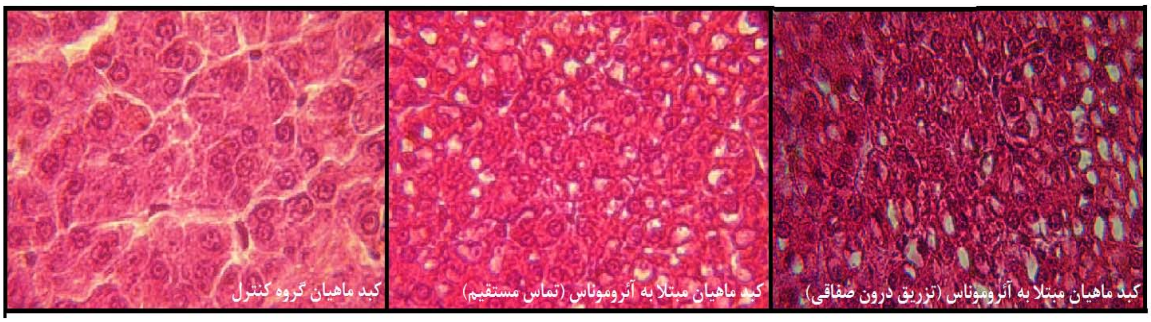
جدول ۱- تغيير تعداد گلبول‌هاي قرمز، هماتوکريت، گلبول‌هاي سفيد و شمارش افتراقي گلبول‌هاي سفيد

فاکتور	گروه کنترل	تماس با باکتري	تزريق درون صفاقي
گلبول قرمز	۱/۲۹ ± ۰/۱۲^{b}	۱/۱۰± ۰/۰۸^{a}	۱/۰۹± ۰/۰۹^{a}
هماتوکريت	۳۹± ۲/۸۳ ^{b}	۳۶/۱۷ ± ۰/۹^{a}	۳۵/۸۳ ± ۱/۴۷^{a}
گلبول سفيد	۲۰/۸۳ ± ۲/۰۴^{a}	۲۳/۸۳± ۰/۹۸^{b}	۲۵/۳۳± ۱/۵۰^{b}
لنفوسيت	۸۰/۱۷ ± ۱/۴۷^{b}	۷۷±۱/۱۵^{a}	۷۸/۱۷±۰/۹۸^{ab}
مونوسيت	۱۲/۸۳ ± ۰/۹۸^{b}	۱۱/۳۳± ۰/۵۳^{ab}	۱۰/۱۷± ۰/۹۸^{a}
نوتروفيل	۷ ± ۱/۲۶ ^{a}	۱۱/۶۷± ۱/۱۱^{b}	۱۲± ۱/۴۱^{b}

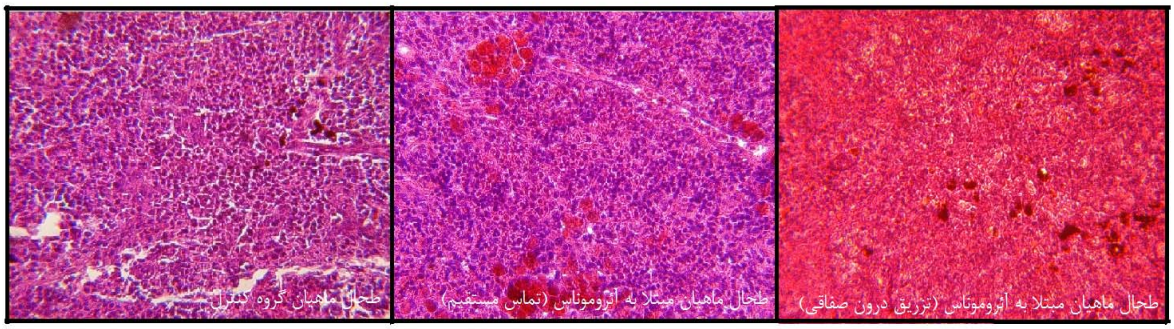
معني‌دار بودن تغييرات در سطح اطمينان ۹۵% با حروف الفباي لاتين مشخص گرديده است.

جدول۲- تستهاي بيوشيميايي باكتري آئروموناس هيدروفيلا

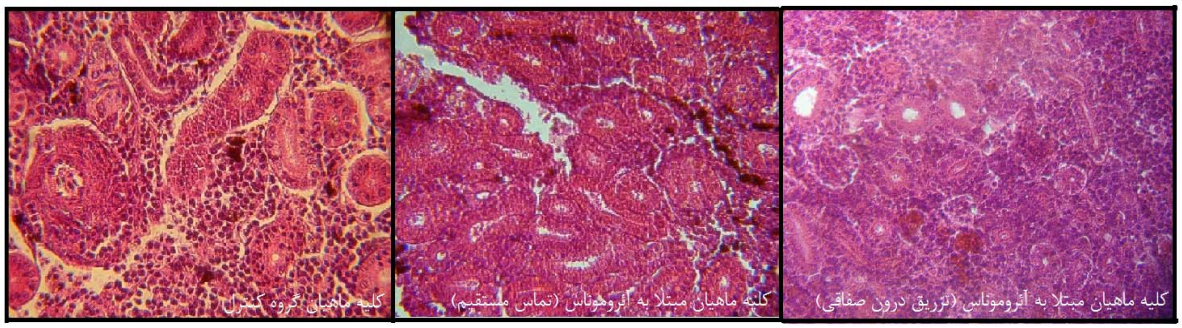
آزمايش	نتيجه واكنش
كاتالاز	+
اكسداز	+
SIM	+، +، _
سيمون سيترات	_
ايجاد گاز از گلوكز	+
VP	_
ليزين دكربوكسيلاز	_
اورنيتين دكربوكسيلاز	_
سوكروز	_
آرابينوز	_
اينوزيتول	_



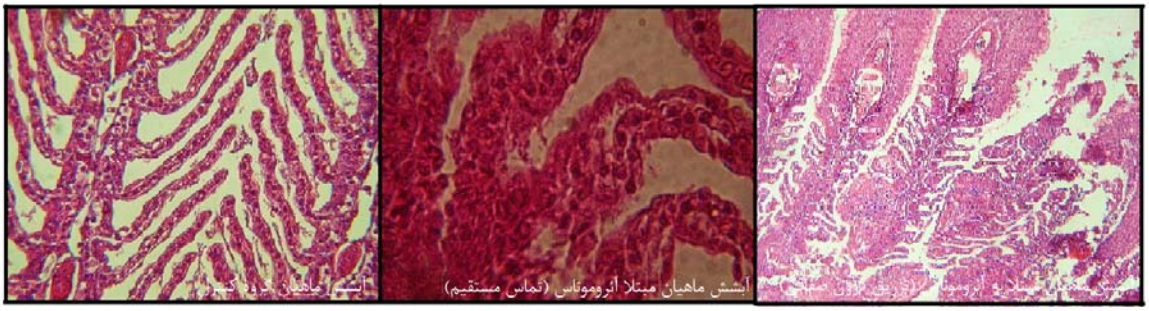
شكل ۱- بهم ريختگي شكل ظاهري سلول‌هاي كبدي، رسوب مواد سيتوپلاسمي و هسته‌اي، از هم گسيختگي سينوس‌هاي خوني و در نتيجه بهم ريختگي آرايش سلولي و شكل گيري واكوئل‌هاي سلولي در كبد ماهي‌هاي مبتلا به آئروموناس هيدروفيلا به طور كامل محسوس است.



شكل ۲- افزايش معني دار تعداد مراكز ملانوماكروفاژ و تجمع رنگدانه‌هاي هموسيدريني و همچنين تغييرات ريختي در سلول‌هاي اليپسوئيدي به خوبي در طحال ماهياني كه در مبتلا به عفونت باكتريايي آئروموناس هيدروفلا مشهود است.



شکل ۳- از بين رفتن مجاري کليوي، دژنره شدن اپيتليوم مجاري کليوي، افزايش فضاي ادراري، دژنره شدن و تحليل گلومرول‌ها و افزايش فضاي بومن نيز از مهمترين تغييرات در کليه ماهياني مبتلا به آئروموناس هيدروفيلا است.



شکل ۴- هيپرپلازي اپيتليوم بين لاملاهاي ثانويه و بهم‌چسبيدگي آنها، از مهمترين تغييرات آسيب‌شناسي بافتي، مشاهده شده در بافت آبشش ماهي‌هاي مبتلا به آئروموناس هيدروفيلا در مقايسه با بافت آبشش ماهي‌هاي گروه کنترل است. تورم سلول‌هاي موکوسي، افزايش بيش از حد موکوس، هيپرپلازي سلول‌هاي کلراید در آبشش اين ماهي‌ها مي‌تواند در تنفس و تبادلات گازي و همچنين تبادلات يوني و تنظيم اسمزي آنها اختلال ايجاد نمايد.

بحث

باکتري *A. hydrphila* يکي از مهمترين عوامل بيماري زايي باکتريايي شناخته شده در بين گونه‌هاي مختلف ماهي‌هاي آکواريومي است (Akhlaghi and Vafaei, 2002). اين باکتري همچنين به عنوان عامل سپتي سمي هموراژيك در ماهي‌هاي پرورشي شناخته شده است (Akhlaghi, 2000).

مکانيسم بيماري‌زايي آئروموناس هيدروفيلا به فاکتورهاي همچون آنزيم‌هاي پروتئازها[1]، الاستازها[2]، ليستئيناز[3]، آميلاز[4]، ليپاز، ژلاتيناز[5]، کيتيناز[6] (Merino *et al*., 1995; Pemberton *et al*., 1997) انترتوکسين‌هاي سمي درون سلولي[7] (Chopra *et al*., 1993)، آئروليزين[8] اعم از بتا هموليزين[9] و آلفا هموليزين[10] مترشحه از باکتري مربوط مي‌شود (Howard and Buckley, 1985). اين فاکتورها نقش بسزايي در بيماري‌زايي باکتري ايفا مي‌کنند و اين امکان را براي باکتري بوجود مي‌آورند که در مراحل پيشرفته بيماري به سهولت به سلول‌هاي ميزبان حمله نمايد و آسيب‌هاي هيستوپاتولوژيکي قابل توجهي در بافت‌هاي مختلف ميزبان ايجاد کند. اين تغييرات در

[1] Proteases
[2] Elastase
[3] Lecithinase
[4] Amylase
[5] Gelatinase
[6] Chitinase
[7] Cytotoxic enterotoxins
[8] Aerolysin
[9] β-hemolysin
[10] α-hemolysin

نهایت مي‌تواند منجر به بروز اختلالات فیزیولوژیک و برهم زدن هموستازي جانور گردد که در بسیاري از موارد به مرگ ماهي‌ها ختم مي‌شود. مرگ و میر شدید ماهیهاي تیلاپیا *O. niliticus* مبتلا به عفونت باکتریایي آئرومونـاس هیدروفیلا مشاهده شده است (Ahmed and Shoreit, 2001; Gamal *et al.*, 2002).

کاهش معنـي دار ($p < ۰/۰۵$) تعـداد سـلول‌هـاي قرمـز خوني (RBC) و مقدار هماتوکریت (Hct) در مـاهي‌هـاي مبتلا به عفونت باکتریایي در مقایسه با مـاهي‌هـاي گـروه شاهد از مهمتـرین پاسـخ خـوني مـشاهده شـده در ایـن آزمایش است. به عبارت دیگر، کاهش تعـداد سـلول‌هـاي قرمز خوني و مقدار هماتوکریت یکي از شاخص‌هـاي بـارز کم خوني در این جانوران مي‌باشد.

آئرولیزین یک پروتئین سمي همولیتیک است که توسـط آئرومونـاس هیدروفیلا ترشـح مـي‌شـود. ایـن پـروتئین بـا متصل شدن به گلیکـو فـسفاتیدیل اینوزیتـول در سـطح سلول‌هاي قرمز خوني به آنها مي‌چسبند و پس از نفوذ به درون غشاي سلول، آن را متلاشي مي‌نماینـد و ایـن امـر سبب همولیز گلبول‌هاي قرمز خون و کاهش تعـداد آنهـا مي‌گـردد (Howard *et al.*, 1987; Parker *et al.*, 1994). از این رو حذف گلبول‌هـاي قرمـز آسـیب دیـده ناشـي از ترشح آئرولیزین توسط باکتري *A. hydrophila* سبب آزاد شدن آهن هموگلوبین و تجمع ترکیبات پروتئیني حـاوي آهن نظیر هموسیدرین و فریتین در طحال این مـاهي‌هـا مـي‌گـردد. لـذا افـزایش تعـداد و انـدازه‌ي مراکـز ملانوماکروفاژي طحال، به عنوان مهمترین محل انهـدام و تخریب گلبول‌هاي قرمز آسیب دیده و فرسوده مي‌توان به عنوان یک شاخص آسیب‌شناسي بافتي، دلیلـي دیگـر بـر این ادعا باشد. در واقع این مراکز نقش بسزایي در تجمـع متابولیت‌هاي گلبول‌هاي قرمز در طحال ایفا مي‌نماینـد و باعـث کـاهش هماتوکریـت و گلبـول‌هـاي قرمـز خـون مي‌شود(Tvakoli and Akhlaghi, 2009).

افزایش معني‌دار ($p < ۰/۰۵$) تعداد گلبول‌هاي سفید (WBC)، کاهش لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها و نیز افزایش معني دار ($p < ۰/۰۵$) نوتروفیل‌ها در ماهي‌هاي مبتلا به عفونت باکتریایي آئرومونـاس هیدروفیلا در مقایسه با گروه کنترل کاملا مشهود است. افزایش تعداد گلبول‌هاي سفید در خون به خوبي مؤید بروز عفونت در بدن جانوران است(Tvakoli and Akhlaghi, 2009).

از سویي دیگر افزایش تعداد نوتروفیل‌ها نیز وجود عفونت خوني در ماهي‌هاي مبتلا به عفونت باکتریایي را تایید مي‌کند. در واقع، نوتروفیل‌ها نیز در تماس با باکتري‌ها، تحریک شده و از خود یک انفجار تنفسي نشان مي‌دهد و در طي واکنش سلولي که بوسیله NADPH اکسیداز کاتالیزور مي‌شود، آنیون سوپراکسید تولید مي‌کنند. از سوي دیگر، نوتروفیل‌ها داراي یک آنزیم منحصر به فرد به نام میلوپراکسیداز مي‌باشند که نقش مهمي در فعالیت باکتري‌کشي ایفا مي‌نماید. این آنزیم با استفاده از رادیکال اکسیداتیو و هالیدها، اسیدهاي هیپوهالیک تولید مي‌کند، و از این طریق موجب مرگ پاتوژن‌ها مي‌گردد (Dalmo *et al.*, 1997). از اینرو، این فرایند به عنوان یکي از مهمترین فرایندهاي دفاعي هومورال در از بین بردن باکتري‌ها شناخته مي‌شود (Johnston, 1978).

در مطالعه بافت کبد ماهي‌هاي مبتلا به *A. hydrophila* ، آسیب‌هاي سلولي نظیر تورم ابري در هپاتوسیت‌ها، تـورم هسته و سیتوپلاسم، ایجاد واکوئل و کاهش قـدرت رنـگ پذیري و افزایش تعداد و مراکـز ملانوماکروفاژهـا در ایـن بافت به وضوح مـشاهده شـد. در واقـع، نکـروز پارانـشیم کبدي، افزایش اندازه‌ي سلول‌هاي کبدي و تورم سلولهاي کـویفري نیـز ممکـن اسـت ناشـي از خـصوصیات سـمي اندوتوکسین‌هاي باکتري *A. hydrophila* باشد.

تـورم ابـري سـلول‌هـاي پوشـشي لولـه‌هـاي کلیـوي و هیپرتروفي سلول‌ها سبب شده حـد و مـرز سـلول‌هـا بـه وضوح قابل تشخیص نباشد و فضاي داخلي لوله‌ي کلیوي کاهش یابد. نکـروز بافـت بینـابیني و خـون‌سـاز کلیـه‌ي ماهي‌هاي مبـتلا بـه آئرومونـاس و افـزایش گرانـول‌هـا و

رنگدانه‌هاي ملانين و هموسيدرين از مهمترين آسيب‌هاي هيستوپاتولوژيکي مشاهده شده در بافت خون‌ساز کليه‌ي ماهي‌هاي بيمار است. جداسازي باکتري‌هاي آئروموناس هيدروفيلا از اندام‌هاي داخلي کليه، طحال و کبد ماهي-هاي آمور مرده در استخرهاي پرورشي استان خوزستان نيز مؤيد اين امر مي‌باشد (Alishahi *et al*., 2009).

هيپرتروفي سلول‌هاي بافت آبشش، هيپرپلازي سلول‌هاي موکوسي در تيغه‌هاي اوليه آبششي، بهم چسبيدن تيغه‌ها و هيپرپلازي سلول‌هاي بافت پوششي از مهمترين تغييرات آسيب‌شناسي بافت آبشش ماهي‌هاي آلوده به عفونت آئروموناسي است. تيرگي پوست، از بين رفتن فلس‌ها و باله‌ي دمي، هيپرتروفي آبشش‌ها، خونريزي در سطح آبشش‌ها، التهاب کبدي از مهمترين تغييرات آسيب‌شناسي است که در بين ماهي‌هاي پرورشي ديده شده است (Ahned and Shoreit, 2001; Gamal *el al*., 2002).

در واقع، ترشح آنزيم‌هايي همچون پروتئازها، الاستازها، ليپاز، ژلاتيناز (Merino *et al*., 1995; Pemberton *et al*., 1997) انترتوکسين‌هاي سمي درون‌سلولي (Chopra *et al*., 1993)، آئرولي‌زين و ليپوپلي‌ساکاريدها توسط آئروموناس هيدروفيلا (Howard and Buckley, 1985) مي‌تواند به ديواره‌ي سلول‌ها، بافت‌هاي پوششي، پيوندي، بافت عضلاني ميزبان آسيب وارد نمايد.

از سويي ديگر، امروزه ارتباط بين نقش توليد راديکال‌هاي آزاد در سلول‌هاي ميزبان و بيماري‌زايي ناشي از شوک سپتي‌سمي اندوتوکسين‌هاي باکتريايي به خوبي مشخص شده است (Abu-El-Saad, 2007). به عبارتي ديگر، تغييرات آسيب‌شناسي بافتي مشاهده شده در ماهي‌هاي مبتلا به آئروموناس پس از پايان دوره‌ي آزمايش ممکن است ناشي از ترکيبات ليپوپلي‌ساکاريدها، افزايش سطح توليد راديکال‌هاي آزاد ناشي از مسموميت اندوتوکسيني و ترشح آنزيم‌هاي پروتوليتيک باشد. ورجاني و همکاران (۱۹۹۹)[1] دريافتند که ليپوپلي‌ساکاريدهاي باکتري سبب افزايش شکنندگي غشاي سلولي، افزايش اندازه‌ي هستک، هسته و نيز بيرون‌زدگي سيتوپلاسمي و نيز افزايش تعداد هسته‌هاي بزرگ و قطرات چربي مي‌شوند.

در مجموع، عامل باکتريايي آئروموناس هيدروفيلا مي‌تواند با ترشح آنزيم‌ها و سموم مختلف و همچنين افزايش سطح توليد راديکال‌هاي آزاد در سيستم‌هاي بيولوژيک ميزبان، زمينه‌ي لازم جهت از بين بردن سلول‌ها را در بافت‌هاي مختلف فراهم سازد که اين امر در نهايت به بروز سپتي‌سمي عفوني باکتريايي، تغييرات شديد آسيب شناسي بافتي و خوني مي‌انجامد. لذا شناخت دقيق مکانيسم بيماري‌زايي اين باکتري مي‌تواند گامي موثري در ارائه يک راه‌حل درماني يا پيشگيرانه از شيوع اين عفونت باکتريايي باشد.

[1] Vergani *et al*. (1999)

References

- Abu-El-Saad, A.S. 2007. Immunomodulating effect of inositol hexaphosphate against *Aeromonas hydrophila*-endotoxin. Immunobiology 212: 179-192.
- Ahmed, S.M. and A.A.M. Shoreit, 2001. "Bacterial hemorrhagic septicemia in *Oreochromis niloticus* at Aswan fish hatcheries". Assiut Vet. Med. J. Vol. 45, No. 89, April 200.
- Akhlaghi, M. 2000. Immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio.* L). Journal of Veterinary Research. 55(1): 57-62.
- Akhlaghi, M. and A. Vafaei, 2002. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in Aquarium Fish. Iranian Journal of Veterinary Research. 3(1): 82-87.
- Akhlaghi, M. and H. Tavakoli, 2009. Study of Lysozyme, Immunoglobulin, Blood Cell and Hematocrit Changes Following Experimental Infection with a Pathogenic *Aeromonas hydrophila* in Rainbow Trout. Journal of Veterinary Research. 64(2): 157-162.
- Alishahi, M. M. Soltani, and A. Zargar, 2009. Bacteriological Study of Grass Carp (*Ctenopharyngoon idella*) Mortality in Khuzestan Province. Scientific Research Iranian Veterinary Journal. 4(5(22)): 25-34.
- Chopra, A.K. C.W. Peterson, and G.F. Jin, 1993. Cloning, expression and sequence analysis of cytolytic enterotoxin gene in *Aeromonas hydrophila.* Canadian Journal of Microbiology, 39: 513–523
- Chopra, A.K. and C.W. Houston, 1999. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis.. Microbes and Infection, 1: 1129–1137.
- Dalmo, R.A. K. Ingebrightsen, and J. Bogwald, 1997. Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Diseases, 20: 241–273,
- Dobaradaran, S. B. Bina, and B. Nasrisfahani, 2006. The Effect of Some Physical and chemical Parameters on Regrowth of *Aeromonas* Bacterium and Heterotrophic Bacteria in Isfahan Drinking water System. Water and Wastewater; 17 (57): 8-13.
- Fang, J.S. J.B. Chen, and W.J. Chen, 1999. Hemolytic uremia syndrome in an adult male with Aeromonas hydrophila enterocolitis. Journal of Nephrology Dialysis Transplantation, 14: 439-440.
- Halakou, A. N.A. Mozafar, and H. Forohesh, 2008. The Distribution of *Aeromonas* SPP. From the Surface waters of Golestan Province in Iran. Journal of Sciences (Islamic Azad University), 17(66): 25-29.
- Howard, S.P. and J.T. Buckley, 1985. Activation of the hole forming toxin aerolysin by extracellular processing. Journal of Bacteriology, 163:336–340
- Howard, S.P. W.J. Garlnd, J.M. Green, and J.T. Buckley, 1987. Nucleotide sequences of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. Journal of Bacteriology 169: 2869–2871
- Johnston, R.B. 1980. Jr Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophages. Fed Proc 37: 2759–2764, 1978
- Joseph, S.W. and A. Carnahan, 1994. The Isolation, identification, and systematic of the motile *Aeromonas* species. Annual Review of Fish Diseases, 4: 315-43.
- Koneman, E. S. Allen, W. janda, W. Winn, G. Procop, P. Schreekenberger, and G. Wood, 2006. Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.6th ed. Lippincott, Philadelphia, 417
- Mahon, C.R. and G. Manuselis, 2000. Textbook of Diagnostic Microbiology. W.B. Sanders Co, Philadelphia, 524
- Majumdar, T. S. Ghosh, J. Pal, and S. Mazumder, 2006. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 256 (1-4): 95-104.
- Merino, S. X. Rubires, S. Knochel, and J.M. Tomas, 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. International Journal of Food Microbiology 28:157–168
- Mohamed, G.A. M.M.S. Fouda, and H.S. Hussein, 2002. *Aeromonas hydrophila* infection in male monosex O. *niloticus* fish reared in floating cages. 6th Vet. Med. Zag. Conference (7-9 Sept. 2002), Hurgada, Egypt.
- Morrison, D.C. and S.E. Bucklin, 1996. Evidence for antibiotic mediated endotoxin release as a contributing factor to lethality in experimental gram-negative sepsis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 101: 3–8.
- Parker, M.W. J.T. Buckley, J.P.M. Postma, A.D. Tucker, K. Leonard, F. Pattus, and D. Tsernoglou, 1994. Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane- channel states. Nature 367:292–295

- Pemberton, J.M. S.P. Kidd, and R. Schmidt, 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. FEMS Microbology Letters 152: 1–10
- Soltandalal, M.M. Z. Ghalavand, and B. Nikmanesh, 2005. Investigation of Infection Rate to Intestinal Pathogens and Aeromonas Species in Children Suffering from Gastroenteritis at Tehran Children's Medical Center, 2004-2005. Journal of Zanjan University of Sciences and Health services; 13(52): 37-42.
- Vergani, G. M.T. Portoles, and R. Pagani, 1999. Escherichia coli lipopolysaccharide effects on proliferating rat liver cells in culture: a morphological and functional study. Tissue Cell 31, 1–7.
- Xiao-liang, L. S. Jiang-bing, and F. Wei-huan, 2006. Protection of *Carassius auratus Gibelio* against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. J Zhejiang University Science B, 7(11): 922-928.

Histophatology and Hematology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*

K. Ahmadi[1]. A.R. Mirvaghefi[*2]. M. Banaee[3] and M. Mousavi[4]

[1]Master Science of Fisheries, young researchers club, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran

[2] Associate professor in University of Tehran, I.R. Iran

[3] Assistant professor, Behbahan University of Technology, Environment and Natural Resource College, I.R. Iran

[4] M. Mousavi- University of Tehran, I.R. Iran

(Received: 04/07/2010 , Accepted:14/08/2011)

Abstract

To investigate the hispathological characteristics in liver, kidney, spleen and gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*, septicemia agents in fishwere infected through injected intraperitoneally and direct contact with 10^7 bacteria per liter solution. Mortality and clinical diagnostic were recorded in experimental periods. After 14 days, blood and tissues were sampled of survival fish. A significant decreased in RBC, Hb, lymphocytes and monocyte (p <0.05) and significant increase in WBC and neutrophile (p <0.05) is the most important changes in hematological index of infected fish by *A.hydrophila*. Presence of bacteria in the tissues were confirmed the by biochemical tests. Tissues were normal in the control group. The apparent disorganization of live cells, cytoplasmic and nuclear material deposition, the rupture of blood sinuses, hypertrophy of hepatocytes, degeneration, hemorrhage, vacuolization of cell cytoplasm in liver tissue; a significant deposition of hemosiderin granules in a melano-macrophage center and morphological alterations in ellipsoid cells in spleen tissue; degeneration and necrosis of renal tubules, glomerular lesions, shrinking of the glomerulus and enlargement of space inside Bowman's capsule, dwindling of the tubular lumen in kidney tissue; hyperplasia, necrosis of epithelial filament, shortening of secondary lamellae and lamellar fusion in gills are important histopathological damage observed in tissues of infected fish with *A.hydrophila*.

Keywords: *Aeromonas hydrophila, Histopathology, Hematological index, Rainbow trout*

*Corresponding author: Tel: +982612223044 ,Fax: +982612245908 , E-mail: vaghefi@nrf.ut.ac.ir