



بیماری‌زایی تجربی عفونت *Yersinia ruckeri* در ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*)

فاطمه خدادادی آرپناهی^۱، محمد مازندرانی^{۱*}، ولی... جعفری^۱، کوروش امینی^۲

^۱ گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
^۲ مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی (گرگان)

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۰۲/۲۲

اصلاح: ۹۶/۰۹/۱۰

پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

کلمات کلیدی:

علائم بالینی

کلمه خزری

هیستوپاتولوژی

یرسینیوزیس

در بررسی حاضر حساسیت کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) در مواجهه تجربی با باکتری یرسینیا راگری (*Yersinia ruckeri*) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۴۴ بچه ماهی انگشت قد کلمه خزری با میانگین وزنی $2/1 \pm 9/3$ گرم در ۱۲ آکواریوم تقسیم شدند. ماهیان به مدت ۴ هفته مورد پرورش قرار گرفتند تا با شرایط محیطی سازگار شوند. آزمایش در ۵ گروه تیمار و یک گروه شاهد (هرکدام شامل ۲ تکرار) صورت گرفت. پس از آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی گروه تیمار با غلظت‌های مختلف $10^4 \times 5/4$ ، $10^5 \times 5/4$ ، $10^6 \times 5/4$ ، $10^7 \times 5/4$ ، $10^8 \times 5/4$ ، $10^9 \times 5/4$ ، $10^{10} \times 5/4$ و $10^{11} \times 5/4$ باکتری به طریق تزریق داخل صفاقی مواجه شدند. بر اساس نتایج پس از ۲۱ روز پایش، غلظت کشنده میانه (LC_{50}) $10^7 \times 4/4$ باکتری برای ماهی کلمه خزری محاسبه گردید. در بررسی‌های بافت‌شناسی ماهیان بیمار علائم عمده مشاهده شده در آبشش‌ها شامل ادم و جداشدگی اپیتلوم پوششی در لاملاهای ثانویه، هایپرپلازی قاعده لاملاها و نفوذ سلول‌های آماسی بوده است، در بافت کیله پرخونی در عروق و بافت بینابینی، نکروز کانونی و نفوذ سلول‌های آماسی از عمده‌ترین علائم قابل مشاهده بود. در بررسی بافت کبد واکتوله شدن هپاتوسیت‌های کبدی در اکثر نمونه‌ها و همچنین نکروز موضعی هپاتوسیت‌های کبدی در برخی از نمونه‌ها ثبت گردید.

مقدمه

بیماری دهان قرمز (یرسینیوزیس) یکی از بیماری‌های باکتریایی شایع در مزارع ماهیان و به خصوص ماهیان سردابی در کشورهای مختلف دنیا است، عامل بیماری مذکور باکتری گرم منفی *Yersinia ruckeri* است که معمولاً به صورت سیستماتیک ماهیان را آلوده و بیمار می‌کند (Tobback et al., 2009). در اغلب موارد ماهیان بیمار دچار یک سپتی‌سمی خون‌ریزی‌دهنده می‌شوند که در بسیاری از موارد بروز و شیوع این بیماری با عوامل محیطی همچون کیفیت پایین آب پرورش، دستکاری‌های بی‌مورد، افزایش تراکم و استرس‌های محیطی همراه است (Timothy et al., 2005). بیماری مذکور اولین بار در سال ۱۹۵۵ در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان در دره هگرمین واقع در اهایو آمریکا گزارش شد به‌همین دلیل به نام بیماری هگرمین نیز معروف است (Rucker, 1966). این بیماری تاکنون از نقاط مختلف جهان و از گونه‌های مختلف ماهیان گزارش شده است اما ظاهراً قزل‌آلای رنگین‌کمان بالاترین حساسیت را به این بیماری دارد (Furones et al., 1993). به‌دلیل عفونت سیستماتیک علائم مختلفی برای این بیماری گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به خون‌ریزی در قاعده باله‌ها و نقاط مختلف پوست و به خصوص در اطراف دهان و فک‌ها (به همین دلیل در برخی موارد بیماری را با نام بیماری دهان قرمز نیز می‌شناسند)،

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mazandarani57@gmail.com

خونریزی در اندام داخلی و به خصوص قسمت انتهایی روده‌ها، خونریزی و بیرون‌زدگی مخرج، تجمع مایعات خونی در محوطه شکمی و ... اشاره نمود. در عین حال در مرحله حاد بروز بیماری ماهیان ممکن است بدون علائم دچار تلفات شوند (Tobback et al., 2007). یرسینیوزیس اولین بار در سال ۱۹۹۹ از مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران گزارش گردید (Soltani et al., 1999) پس از آن از مزارع مختلف ماهیان سردابی کشور گزارش گردید به گونه‌ای که امروزه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های شایع باکتریایی در صنعت آبی‌پروری کشور است که سالیانه خسارات فراوانی به این مزارع وارد می‌سازد (Fadaeifard and Sharifi and Akhlaghi, 2008; Simin, 2014; Soltani et al., 2014). گزارش‌های داخلی این بیماری در صنعت آبی‌پروری تاکنون محدود به مزارع قزل‌آلای کشور بوده و از بروز بیماری در ماهیان گرمابی به صورت طبیعی تاکنون گزارشی در دست نیست. ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) یکی از ماهیان با ارزش و پرطرفدار در بین مصرف‌کنندگان شمال کشور است از طرف دیگر این گونه ماهی، به عنوان یکی از منابع غذایی ماهیان خاویاری (به خصوص فیلماهی) از اهمیت بالایی برخوردار است. متأسفانه در سال‌های اخیر مکان‌های طبیعی بازسازی ذخایر این ماهیان تخریب شده است، به همین دلیل همه ساله سازمان شیلات ایران در راستای بازسازی ذخایر، اقدام به تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان این گونه به دریای خزر می‌نماید (Statistical Yearbook of Iran Fisheries Organization, 2014). به این منظور بچه ماهیان تا مرحله انگشت قد و گاه بیشتر در استخرهای خاکی پرورش داده می‌شوند. ماهیت استخرهای پرورش این ماهیان به دلیل گرمایی بودن به گونه‌ای است که در پایین دست استخرهای سردابی قرار می‌گیرد به عبارت دیگر در صورت آلودگی و بروز بیماری در مزارع سردابی بالادست، این آلودگی قادر خواهد بود به مزارع پایین دست از جمله مزارع ماهیان کلمه خزری نیز برسد که با توجه به شیوع بالای آلودگی یرسینیا در مزارع سردابی کشور این امر بسیار محتمل است. از طرف دیگر در راستای توسعه پایدار آبی‌پروری و مدیریت بهداشتی این مزارع شناسایی عوامل آسیب‌رسان بسیار حائز اهمیت است. با توجه به عدم وجود گزارشی در راستای میزان حساسیت این ماهیان به بیماری مذکور، در بررسی حاضر وضعیت بیماری‌زایی باکتری یرسینیا را کوی در این ماهیان به صورت تجربی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه ماهی و شرایط پرورش

در راستای انجام این بررسی تعداد ۱۴۴ بچه ماهی انگشت قد کلمه خزری با میانگین وزنی $2/1 \pm 9/3$ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال _ استان گلستان تهیه شده و با تانکر حمل بچه ماهی به مرکز تحقیقاتی شهید نظری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهیان مذکور به مدت ۲۰ دقیقه در آب نمک ۲۰ گرم در لیتر ضدعفونی شده و سپس به تانکر فایبرگلاس با ابعاد 2×2 و ارتفاع آبیگری ۳۰ سانتی‌متر منتقل شدند. این ماهیان به مدت ۲ ماه با غذای تجاری بیومار (Biomare co, France)، به میزان ۳٪ وزن بدن دو بار در روز مورد تغذیه قرار گرفتند. در طی این دوره دمای آب $1/35 \pm 25/4$ درجه سانتی‌گراد، سختی آب برابر با 3 ± 186 میلی‌گرم/لیتر، pH برابر $7/6 \pm 0/2$ اندازه‌گیری گردید. در طی این دوره تعویض آب به صورت روزانه و به میزان حدود ۸۰٪ حجم آب و نیرو صورت گرفت.

نحوه آماده‌سازی باکتری

باکتری یرسینیا را کوی (*Yersinia ruckeri*) که در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان از ماهیان بیمار جداسازی شده به صورت فریز شده تهیه گردید. در این راستا گونه دقیق باکتری قبلاً با کمک تست PCR مورد تأیید قرار گرفته بود و در نهایت با کد PTCC 1888 در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران ثبت گردید. باکتری مذکور در محیط کشت تریپتیک سوی برای (Tryptic Soya Broth) به مدت ۴۸ ساعت غنی‌سازی گردیده و سپس به صورت سطحی بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) تلقیح گردید. ۴۸ ساعت پس از کشت، باکتری‌ها از سطح محیط کشت جمع‌آوری شده و با کمک سرم فیزیولوژی سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید. بار باکتریایی سوسپانسیون به روش کدورت سنجی و بر اساس جدول استاندارد مک فارلند و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۴۰ نانومتر و OD برابر با یک تنظیم گردید. در عین حال پس از تهیه رقت‌های سریالی جهت تعیین بار باکتری‌های زنده در هر سی‌سی از سوسپانسیون ۰/۱ سی‌سی از هر رقت بر روی محیط کشت نوتریت

آگار کشت داده شد که در این راستا بر مبنای تشکیل CFU، بار باکتریایی هر سی‌سی از سوسپانسیون‌های مذکور برابر با 10^9 \times $5/4$ سلول باکتری زنده تعیین گردید. در این بررسی پس از تهیه رقت‌های سریالی بر مبنای 10^{-1} پنج رقت باکتریایی تهیه گردید.

نحوه مواجهه ماهیان با باکتری

دو ماه پس از پرورش در ونیرو ماهیان مذکور به‌منظور مواجهه باکتریایی به آزمایشگاه محیط‌زیست دانشکده شیلات و محیط‌زیست (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) منتقل شدند. در این راستا ماهیان در ۱۲ آکواریوم شیشه‌ای با ابعاد 40×30 سانتی‌متری با ارتفاع آب‌گیری ۳۰ سانتی‌متر تقسیم شدند (۱۲ عدد ماهی در هر آکواریوم) و به‌منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به مدت ۴ هفته دیگر دو بار در روز به میزان ۳٪ وزن بدن تغذیه شدند. سپس به‌منظور انجام آزمایش ۵ گروه تیمار و یک گروه شاهد (هر کدام شامل ۲ تکرار) در نظر گرفته شد. پس از آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی گروه‌های تیمار با غلظت‌های مختلف $10^8 \times 4/5$ ، $10^7 \times 4/5$ ، $10^6 \times 4/5$ ، $10^5 \times 4/5$ و $10^4 \times 4/5$ (باکتری/ ماهی) مواجه شدند. در این راستا به ماهیان گروه تیمار ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون‌های باکتریایی یرسینیا راگری در غلظت‌های یاد شده به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. به ماهیان گروه شاهد نیز ۰/۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. ماهیان به مدت ۲۱ روز به‌صورت روزانه پایش شدند و علائم بالینی و تلفات ثبت گردید. به‌منظور تأیید علت مرگ ماهیان کلمه مورد بررسی کشت باکتریایی، از کلیه و کبد ماهیان تازه تلف شده و در حال مرگ در محیط نوترینت آگار صورت گرفته و باکتری یرسینیا راگری در ماهیان گروه تیمار با کمک تست‌های بیوشیمیایی جداسازی گردیده و مورد تأیید قرار گرفت.

بررسی‌های آسیب‌شناسی بافتی

بررسی آسیب‌های بافتی در ماهیانی که دچار علائم بیماری بودند صورت گرفت و در عین حال ماهیان شاهد نیز نمونه‌برداری شده و مورد بررسی قرار گرفتند. در این راستا از بافت‌های کلیه، کبد و آبشش ماهیان دارای علائم بیماری، نمونه‌برداری صورت پذیرفت به این منظور یکسان بودن شرایط نمونه‌برداری بافتی نمونه‌برداری آبشش از کمان دوم آبشش سمت راست ماهیان صورت گرفت. نمونه‌برداری کلیه‌ها نیز از کلیه میانی انجام شد. نمونه بافتی کبدی از کبد اصلی و غیر منتشره انجام گرفت. نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و فیکساتیو نمونه‌ها پس از ۱۲ ساعت تعویض گردید. نمونه‌های بافتی در پروسور بافتی آماده‌سازی شده پس از آبگیری در الکل اتانول پارافینه شده و مقاطع ۵ میکرونی از بافت‌ها تهیه گردید. سپس مقاطع بافتی به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد (Roberts, 2012) و نمونه‌ها با چسب انتالن لامل گذاری شدند و سپس با میکروسکوپ نوری $1000 \times$ مورد مطالعه قرار گرفتند.

بررسی‌های آماری

جهت بررسی آماری تحقیق حاضر نرم‌افزارهای SPSS18 و Excell 2010 مورد استفاده قرار گرفت. نمودار روند تلفات بچه ماهیان در پایان بررسی توسط نرم‌افزارهای SPSS18 ثبت گردید و جهت تعیین دوز میانه کشنده (LC_{50}) از برنامه Probit در محیط SPSS18 استفاده شد.

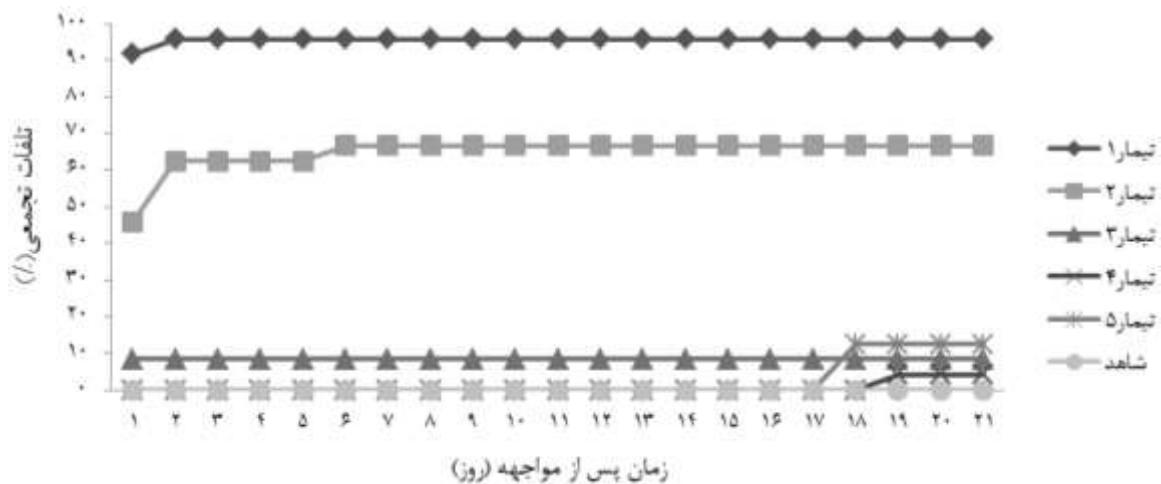
نتایج

وضعیت تلفات ماهیان کلمه خزری در مواجهه با یرسینیا راگری به‌صورت تزریق داخل صفاقی در طی ۲۱ روز پایش در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این بررسی اولین تلفات، ۱۲ ساعت پس از مواجهه در تیمارهای مواجهه شده با دوز $10^8 \times 5/4$ (سلول باکتری به ازای هر ماهی) مشاهده شد که این روند ۲۴ ساعت بعد از مواجهه، ۹۱/۶۶ درصد ثبت شد. ۴۸ ساعت بعد از مواجهه به ۹۵/۸۳ درصد افزایش یافت و تا روز ۲۱ تلفات دیگری مشاهده نشد. از طرفی در تیمار مواجهه شده با دوز $10^7 \times 5/4$ ، اولین تلفات ۲۴ ساعت پس از مواجهه ۴۵/۶۳ درصد ثبت شد. روند تلفات این گروه تا ۶ روز پس از مواجهه به ۶۶/۶۷ درصد رسید و تا پایان دوره پایش تلفات دیگری مشاهده نشد. در تیمار مواجهه شده با دوز $10^6 \times 5/4$ ، فقط ۲۴ ساعت پس از

مواجهه تلفات ۸/۳۳ درصد ثبت شد. در تیمارهای مواجهه شده با دوز $10^5 \times 5/4$ ، اولین تلفات ۱۹ روز پس از مواجهه باکتری ۴/۱۶ درصد ثبت شد. همچنین تیمارهای مواجهه شده با دوز $10^4 \times 5/4$ اولین تلفات ۱۸ روز پس از مواجهه باکتری برابر با ۱۲/۵ درصد نشان دادند (شکل ۱). در این بررسی در ماهیان گروه شاهد در طول ۲۱ روز هیچ علائم غیرطبیعی و تلفاتی مشاهده نشد. در پایان روز ۲۱ بر اساس بررسی‌های آماری غلظت میانه کشنده (LC_{50}) این باکتری $4/4 \times 10^7$ برای ماهی کلمه خزری محاسبه گردید (جدول ۱).

علائم بالینی در ماهیانی که علائم بیماری در آن‌ها بروز یافت در جدول ۲ قابل مشاهده است. در این بررسی عمده‌ترین علائم بالینی یاد شده در ماهیان بیمار شامل خونریزی در قاعده باله‌ها، خونریزی‌های پتیشیا (petechia) در نقاط مختلف پوست، خونریزی در اطراف مخرج و اندام‌های داخلی محوطه شکمی بود (شکل ۲ تصاویر A تا F). همچنین در یک مورد نیز بیماری به‌صورت خونریزی در فکین و اطراف دهان بروز پیدا کرد. در بسیاری از نمونه‌ها نیز علائم یاد شده با شدت کمتر بروز پیدا کرد.

در بررسی‌های بافت‌شناسی ماهیان بیمار، علائم عمده مشاهده شده در آبشش‌ها شامل ادم و جداشدگی اپیتلوم پوششی در لاملاهای ثانویه، هایپرپلازی قاعده لاملاها و نفوذ سلول‌های آماسی بوده است. در بافت کیله پرخونی در عروق و بافت بینابینی، نکروز کانونی و نفوذ سلول‌های آماسی از عمده‌ترین علائم قابل مشاهده بود، بعلاوه پرخونی، واکتوله شدن هیپاتوسیت‌ها و در برخی نمونه‌ها نکروز هیپاتوسیت‌های کبدی عمده‌ترین علائمی بود که ثبت گردید (شکل ۳ تصاویر A تا F).



شکل ۱. نمودار روند تلفات ماهی کلمه خزری در مواجهه با یرسینیا راکری به روش تزریق داخل صفاقی. تیمار ۱: ماهیان مواجهه شده با 10^8 $4/5$ (باکتری / ماهی)، تیمار ۲: ماهیان مواجهه شده با $10^7 \times 4/5$ (باکتری / ماهی)، تیمار ۳: ماهیان مواجهه شده با $10^6 \times 4/5$ (باکتری / ماهی)، تیمار ۴: ماهیان مواجهه شده با $10^5 \times 4/5$ (باکتری / ماهی) و تیمار ۵: ماهیان مواجهه شده با $10^4 \times 4/5$ (باکتری / ماهی)

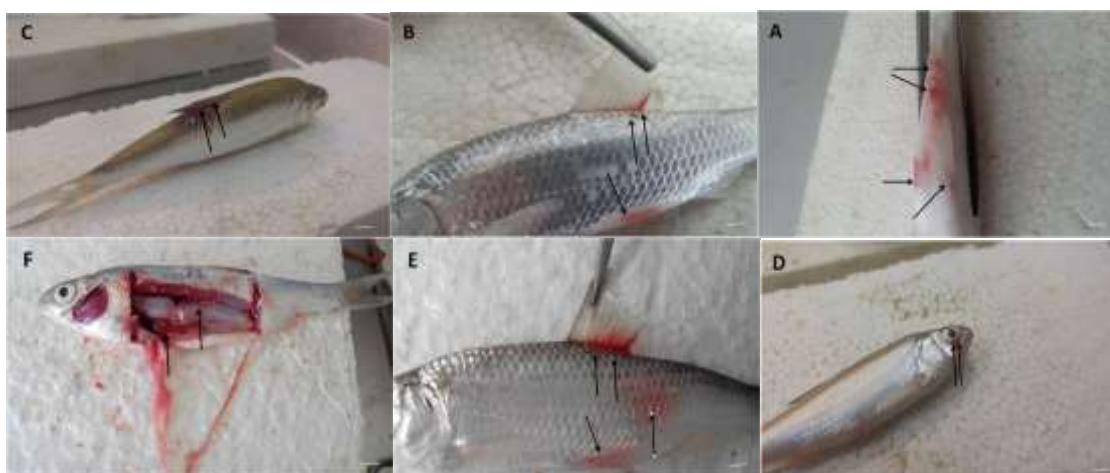
جدول ۱. میزان دوز میان کشنده (LC_{50}) باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) در طی ۲۱ روز پس از مواجهه در کلمه خزری

LC_{99}	LC_{90}	LC_{50}	LC_{10}
$1/0.1 \times 10^8$	$7/52 \times 10^7$	$4/40 \times 10^7$	$1/27 \times 10^7$

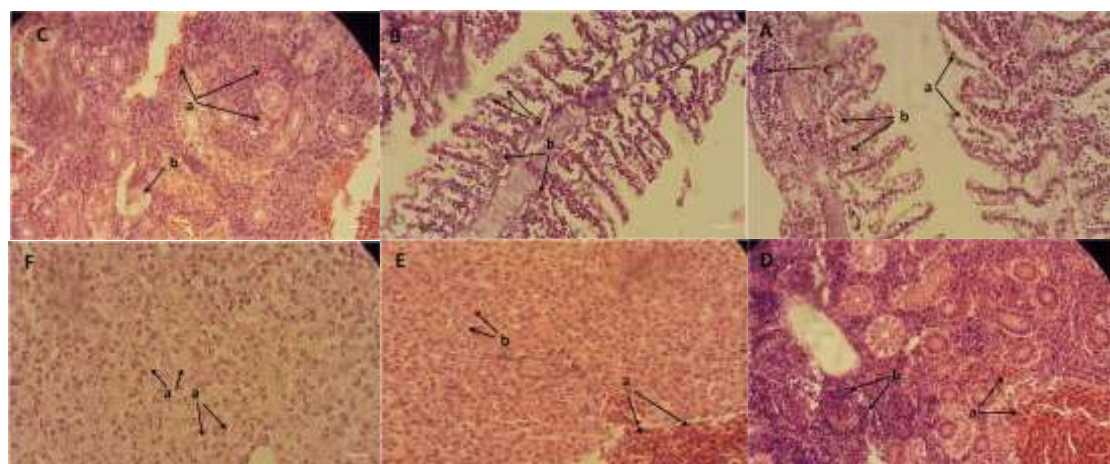
بررسی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) به کمک نرم‌افزار Probit

جدول ۲. علائم بالینی ثبت شده در ماهیان کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) مواجهه شده با غلظت‌های مختلف باکتری یرسینیا راکری
 در مواجهه به روش تزریق داخل صفاقی (*Yersinia ruckeri*)

علائم بالینی ثبت شده در ماهیان کلمه خزری مواجهه شده با غلظت‌های مختلف باکتری یرسینیا راکری	۴/۵ × ۱۰ ^۴ باکتری/ ماهی	۴/۵ × ۱۰ ^۵ باکتری/ ماهی	۴/۵ × ۱۰ ^۶ باکتری/ ماهی	۴/۵ × ۱۰ ^۷ باکتری/ ماهی	۴/۵ × ۱۰ ^۸ باکتری/ ماهی
خونریزی در اطراف مخرج	-	-	-	√	√
خونریزی قاعده باله شکمی و مخرجی	-	-	√	√	√
خونریزی در قاعده باله‌های پشتی	-	-	√	√	√
خونریزی در قسمت پایینی چشم	√	√	√	√	√
خونریزی گسترده در سطح پوست	-	-	-	√	√
خونریزی در اندام داخلی محوطه شکمی	-	-	-	√	√
خونریزی پتیشیا (سرسوزنی) در سطح پوست	-	-	√	√	√



شکل ۲. خونریزی در اطراف مخرج و قاعده باله شکمی و مخرجی (A)، خونریزی در قاعده باله‌های پشتی و شکمی (B)، خونریزی شدید در قاعده باله پشتی (C)، خونریزی در قسمت پایینی چشم (D)، خونریزی در قاعده باله‌ها و خونریزی پتیشیا در زیر پوست (E)، خونریزی در اندام داخلی محوطه شکمی (F)



شکل ۳. بافت آبدش (A): جداشدگی اپیتلیوم لاملاهای ثانویه (a)، هایپرپلازی قاعده لاملاها (b) و نفوذ سلول‌های آماسی (c) - بافت آبدش (B): جداشدگی گسترده اپیتلیوم پوششی لاملاهای ثانویه (a) و نفوذ سلول‌های آماسی (b) - بافت کلیه (C): پرخونی در بافت بینابینی کلیه (a) و کانول‌های نکروزه پنیبری (b) - بافت کلیه (D): پر خونی در بافت کلیه (a) و نفوذ گسترده سلول‌های آماسی (b) - بافت کبد (E): پرخونی در بافت کبدی (a) و واکنولاسیون هیپاتوسیت‌های کبدی (b) - بافت کبد (F): نکروز هیپاتوسیت‌های کبدی (a). (رنگ‌آمیزی H & E - بزرگنمایی × ۴۰۰)

بحث

یرسینیوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی مزارع سردابی کشور محسوب می‌شود که سالیانه خسارات فراوانی به این صنعت وارد می‌سازد (Fadaeifard and Simin, 2014). در بررسی‌های متعدد عنوان گردیده که حساسیت آزادماهیان و به خصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان به این بیماری بیشتر از سایر گونه‌ها است، اما در عین حال بیماری‌زایی باکتری یرسینیا راگری در سایر گونه‌های آبزیان نیز از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است (Furones *et al.*, 1993). این بیماری معمولاً به صورت سیستمیک رخ می‌دهد و علائم متعددی در ماهیان حساس به خصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان قابل مشاهده است که از آن جمله می‌توان به خونریزی در فکین و اطراف دهان، خونریزی قسمت انتهایی دستگاه گوارش که معمولاً با بیرون‌زدگی مقعد همراه است، اگزوفتالمی به همراه خونریزی در چشم‌ها در بسیاری موارد اشاره نمود (Rucker, 1966). در بررسی حاضر علائم بالینی قابل مشاهده در کلمه خزری بسیار ملایم‌تر بوده است به عنوان مثال خونریزی در دستگاه گوارش و به خصوص قسمت انتهایی روده‌ها به بندرت ثبت گردید و یا خونریزی در چشم بسیار ملایم بوده و در هیچ موردی اگزوفتالمی مشاهده نشد و در مجموع می‌توان ادعا نمود چهره این بیماری در ماهی کلمه خزری کمی متفاوت‌تر و ملایم‌تر به نظر می‌رسد؛ اما این موضوع به معنی حساسیت پایین این گونه با یرسینیوزیس نمی‌باشد زیرا بر اساس نتایج بررسی حاضر LC_{50} و کشندگی این باکتری برای ماهی کلمه خزری $10^7 \times 4/4$ باکتری تعیین گردید. در بررسی Haig و همکاران (2011) تزریق داخل صفاقی $10^7 \times 2/4$ باکتری *Yersinia ruckeri* منجر به تلفات 60 تا 75 درصدی در ماهیان آزادماهی آتلانتیک (*Salmo salar L*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید. در بررسی دیگری تزریق $10^5 \times 5$ باکتری منجر به تلفات 86 درصدی ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گردید (Brec *et al.*, 1999). در تحقیق Shaowu و همکاران (2013) غلظت دوز میانه کشنده (LC_{50}) این باکتری را برای تاسماهی‌های *Acipenser schrencki* در روش مواجهه داخل صفاقی $10^6 \times 7/2$ محاسبه نمودند. در مطالعه دیگری تزریق $10^6 \times 2/8$ به صورت داخل صفاقی منجر به تلفات حدود 70 درصدی در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) گردید (Mazandarani and Taheri Mirghaed, 2015). آسیب‌های بافتی کلیه، کبد و آبشش ناشی از این باکتری در ماهیان کلمه خزری نیز نشان‌دهنده حساسیت این ماهی به این باکتری یرسینیا راگری است به گونه‌ای که آسیب‌های ثبت شده شبیه آنچه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در بررسی Tobback و همکاران (2009) گزارش شده است، می‌باشد. در بررسی حاضر نیز بنا بر نتایج بررسی می‌توان ادعا نمود باکتری یرسینیا راگری قادر به آلودگی و بیماری‌زایی در ماهی کلمه خزری است و این امر می‌تواند به عنوان یک زنگ خطر در مدیریت بهداشتی مزارع تکثیر و پرورش این ماهیان باشد. همان‌گونه که عنوان گردید وضعیت مزارع تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی از جمله کلمه خزری در کشور به گونه‌ای است که در قسمت پایین دست مزارع سردابی قرار دارند لذا در صورت آلودگی مزارع قزل‌آلای بالادست، انتقال آلودگی بعید به نظر نمی‌رسد. در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در صورت بروز بیماری باکتری در دستگاه گوارش و به خصوص قسمت انتهایی روده ماهیان کلونیزه شده و همراه با مدفوع باکتری را در محیط دفع نمایند در عین حال پس از بهبود یافتن نیز حدود 25٪ از ماهیان بهبودیافته تا مدت‌ها باکتری را در محیط دفع می‌کنند (Rodgers, 1992; Busch and Lingg, 1975). از طرفی در بسیار از ماهیان ممکن است در صورت آلودگی، باکتری در اندام داخلی ماهی کلونیزه شود اما بیماری بروز نیابد در این حالت ممکن است باکتری تا مدت‌ها در بدن ماهی زنده بماند و در شرایط نامساعد محیطی و یا بروز استرس و ضعیف شدن سیستم ایمنی به‌طور ناگهانی بیماری بروز یابد (Hunter *et al.*, 1980). در عین حال این باکتری توانایی زنده‌مانی بالایی نیز دارد ظاهراً در برخی مواقع باکتری قادر است با تشکیل پلاک و بیوفیلم در محیط استخر برای مدت طولانی حیات خود را حفظ کند (Coquet *et al.*, 2002)، که این امر در شرایط استخرهای خاکی کشور که تعویض آب آن کم است احتمال وقوع دارد. لذا با توجه به مباحث عنوان‌شده، هنگام بروز بیماری در یک منطقه عملاً پاک‌سازی باکتری از محیط بسیار مشکل خواهد بود. مراکز بازسازی تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی در کشور در راستای بازسازی ذخایر آبزیان دریا خزر سالیانه میلیون‌ها قطعه بچه ماهی از جمله کلمه خزری را تکثیر و پس از رساندن به سبزی انگشت قد در استخرهای خاکی، در دریا رهاسازی می‌کنند (Statistical Yearbook of Iran Fisheries Organization, 2014). منابع آبی استخرهای این ماهیان معمولاً از رودخانه‌هایی تأمین می‌شوند که در بالادست آن‌ها مزارع ماهیان سردابی وجود دارد که با توجه به آلودگی منطقه و حساسیت ماهی کلمه

خزری به این بیماری احتمال درگیری این مزارع با عامل بیماری بسیار محتمل است. از طرف دیگر حمل و نقل، شمارش و رهاسازی این بچه ماهیان نیز با استرس فراوانی همراه است لذا در راستای افزایش راندمان بازسازی، مدیریت بهداشتی آلودگی با این باکتری نیز باید در نظر گرفته شود. در عین حال این بچه ماهیان معمولاً به صورت نیمه متراکم در استخرهای خاکی پرورش داده می‌شوند و چنانچه در روند توسعه پایدار افزایش تراکم پرورش در نظر گرفته شود احتمال شیوع و بروز بیماری و خسارت ناشی از این باکتری نیز در کنار سایر عوامل بسیار محتمل‌تر خواهد بود.

تا کنون گزارش رسمی در رابطه با حساسیت ماهیان کلمه خزری نسبت به بیماری یرسینیوزیس به دست ما نرسیده است و تصور ما بر این است که این گزارش اولین گزارش رسمی در رابطه با حساسیت این ماهی نسبت به باکتری یرسینیا راکری است.

منابع

- Brec, A., Petrinc, Z., Matasin, Z., Kozaric, Z. 1999. *Yersinia ruckeri* septicaemia in experimentally infected carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Acta Veterinaria Hungarica. 47(2): 161-172.
- Busch, R.A., Lingg, A.J. 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 32(12): 2429-2432.
- Coquet, L., Cosette, P., Junter, G.A., Beucher, E., Saiter, J.M., Jouenne, T. 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces. 26(4): 373-378.
- 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. Biological Journal of Microorganism. 9(1): 65-73. (in Persian)
- Furones, M.D., Rodgers, C.J., Munn, C.B. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric red mouth disease (ERM) in fish. Annual Review of Fish Diseases. 3: 105-125.
- 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. Veterinary Microbiology. 147(1-2): 155-161.
- 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* Richardson. Journal of Fish Diseases. 3(6): 467-472.
- Mazandarani, M., Taheri Mirghaed, A. 2015. Pathogenicity of *Yersinia ruckeri* bacterium in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fingerlings. Journal of Aquatic Ecology. 5(4): 79-87 (in Persian)
- Roberts, R.J. 2012. Fish pathology. 4th edition, Wiley-Blackwell, UK. 590 p.
- Rodgers, C.J. 1992. Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. Journal of Fish Diseases. 15(3): 243-254
- Rucker, R. 1966. Red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin - Office International des Epizooties. 65(5): 825-830.
- Shaowu, L., Di, W., Hongbai, L., Tongyan, L. 2013. Isolation of *Yersinia ruckeri* strain H01 from farm-raised Amur Sturgeon *Acipenser schrencki* in China. Journal of Aquatic Animal Health. 25(1): 9-14.
- 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. Iranian Journal of Veterinary Research. 9(4): 347-352. (in Persian)
- Soltani, M., Fadaei, F., Mehrabi, M.R. 1999. First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. Bulletin- European Association of Fish Pathologists. 9(4): 173-177.
- Statistical Yearbook of Iran Fisheries Organization, 2003-2013. 2014. Iranian Fisheries Organization, Iran. No (1). 63 p. (in Persian)
- 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. Iranian Veterinary Journal. 10(1): 59-68. (in Persian)

- Timothy, J.W., Gregory, D.W. 2005. Construction of a virulent, green fluorescent protein tagged *Yersinia ruckeri* and detection in trout tissues after intraperitoneal and immersion challenge. *Diseases of Aquatic Organisms*. 67(3): 267-272.
- 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*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 84(3): 219-228.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. 30(5): 257-268.