

دراسة التغيرات المرضية النسجية في اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* المصابة تجريبيا بجراثيم *Aeromonas hydrophila*

ايمان سبع خميس¹، عبد المطلب جاسم الرديني² وانعام بدر فالح²

1 مركز الثروة الحيوانية والسمكية، وزارة العلوم والتكنولوجيا، بغداد، العراق

2 كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الخلاصة. اجريت الدراسة لمعرفة التغيرات المرضية النسجية ودراسة التغيرات المرضية العيانية والعلامات السريرية التي تحدثها بكتريا *Aeromonas hydrophila* المسببة لمرض الانتان النزفي البكتيري Bacterial hemorrhagic septiceamia في اسماك الكارب العادي *Cyprinus carpio*. تضمنت الدراسة احداث الإصابة بالمرض عن طريق حقن البكتريا داخل العضلة في المنطقة الظهرية في الجهة اليسرى خلف الحافة الامامية للزعنفة الظهرية بحوالي 1-2 سم وكانت الجرعة المحقونة 10^8 وحدة مكونة للمستعمرة 100/cfu غم من وزن الجسم. ظهرت الاعراض المرضية المميزة للمرض بعد مرور ثلاثة ايام من استحداث الإصابة اذ تمثلت بخمول الاسماك وصعوبة التنفس والسباحة قرب السطح مع تاكل حافات الزعانف وبروز العين وتمدد البطن وغزارة المادة المخاطية التي تحيط بالجسم، ووضحت التغيرات العيانية تضخم واحتقان الكلية والكبد والطحال مع تنخر العضلات muscle necrosis، اما التغيرات المرضية النسجية في الكلية تمثلت بتنخر نبيبي مصحوب بارتشاح خلوي بين النبيبات المتتكسة degenerative tubule ووجود نضحة ليفينية fibrinous exudat في مناطق نسيج مكون الدم في الطحال مع وجود التنخر البؤري focal necrosis في متن الكبد و ارتشاح الخلايا الالتهابية فضلا عن وجود الخبز الشديد بين الحزم العضلية المتتكسة.

الكلمات المفتاحية: الايرومونات هايدروفيليا، الكارب العادي، مرض الانتان النزفي البكتيري.

المقدمة

ان الظروف التي تعيش فيها الاسماك بطريقة الاستزراع المكثف يؤدي الى ظهور عددا من عوامل الاجهاد في الاسماك مثل الازدحام وقلة الاوكسجين وشحة الماء يؤثر سلبا في الحالة الصحية للاسماك (8)، وهذه العوامل تؤدي الى تثبيط الجهاز المناعي ومن ثم زيادة قابلية الاسماك للإصابة بالامراض المعدية لاسيما الامراض البكتيرية ومنها الإصابة بجراثيم *Aeromonas hydrophila*، و تسبب هذه الجرثومة العديد من الحالات المرضية الخطيرة للاسماك ومن ضمنها مرض الانتان الدموي النزفي البكتيري Bacterial hemorrhagic septiceamia الذي يعد واحد من أخطر الامراض البكتيرية التي تصيب الاسماك مسببا خسائر في الثروة السمكية، وهي واسعة الانتشار في بيئة المياه

العذبة والبيئة البحرية (15). تكون هذه الجراثيم سالبة لصبغة كرام عسوية straight اما مستقيمة الشكل او منحنية يتراوح طولها بين 1-4.5 مايكرون متحركة بواسطة سوط احادي يكون غالبا قطبي وهي هوائية (اختيارية) موجبة لفحص oxidase و catalase (12). تنتج الجرثومة العديد من الذيفانات toxins (9) فقد لوحظ بان 92% منها ينتج بصورة منتظمة الذيفان الحال للدم نوع بيتا (β - haemolysis) والذيفان الخلوي cytotoxin وتنتج نوعين من الذيفان المعوي Entertoxin فضلا عن ذلك تنتج هذه الجرثومة العديد من الخمائر منها الخميره الحالة للبروتين protease والخميرة الحالة لل Lecithinase والخمير الحالة لليفين elastase تؤدي هذه الذيفانات، والخمائر دورا واضحا في امراضية الجرثومة (8). ويكمن دورها في تجمع السوائل في التجويف الجسمي والنزف، و تنخر الانسجة وتتكس الخلايا لذا يسمى المرض الذي تسببه الجرثومة بعفونة الدم النزفية Hemorrhagic septicemia (10). تكون الجرثومة محاطة بشعيرات pilli وتمثل هذه الشعيرات احدى الاليات لتلازن الدم heamagglutination واحدى اسباب فوعة الجرثومة في الاسماك. تعد الاعداد جميعها معرضة للاصابة ولكن الاسماك الصغيرة التي لا تتجاوز اعمارها السنة تكون اكثر حساسية للاصابة بالمرض (5). تحدث الاصابة عادة في نهاية فصل الشتاء وبداية فصل الربيع نظرا لانخفاض درجة حرارة الشتاء وانخفاض مناعة الاسماك ونقص التغذية في هذا الفصل ويؤدي ارتفاع درجة الحرارة المفاجئة دورا مهما في ظهور المرض ويعد الاجهاد عاملا مساعدا للمرض ايضا.

كما لوحظ ان هناك ارتفاع اخر في مستوى الاصابة بالمرض في حزيران وتموز نتيجة لقلّة منسوب الاوكسجين، ان وصول نسبة الاوكسجين الى مستوى ثلاثة اجزاء بالمليون في الماء يحدث اجهدا شديدا على الاسماك مما يعرضها للاصابة (18). يعد مرض الانتان النزفي الجرثومي احد الامراض الجرثومية الوبائية التي تصيب الاسماك لاسيما اسماك العائلة الشبوطية Cyprinidae وتعد اسماك الكارب العادي common carp المرعى في المزارع السمكية اكثر حساسية عندما تكون في المياه الطبيعية (10).

وصف هذا المرض خليفة (2) بانه يمتلك عدة اشكال فالشكل الاول هو الشكل الحاد ويظهر انتان دموي مميت بسرعة، وقد لاتظهر فيه اعراض مرضية تذكر ، وهذا الشكل يعد مميتا للاسماك المصابة ، والشكل الثاني هو الشكل الحاد المصحوب بظهور استسقاء وتقرحات وبروز الحراشف، اما الشكل الثالث هو الشكل المزمن المصحوب بتكوين تقرحات جلدية والشكل الرابع هو الشكل الكامن الذي يتميز بعدم ظهور اي اعراض للمرض ويكون صعب التشخيص في الاسماك المصابة.

المواد وطرائق العمل

تم عزل بكتريا *Aeromonas hydrophila* من اسماك مصابة بمرض الانتان الدموي البكتيري Bacterial hemorrhagic septicemia في مختبر الاحياء المجهرية في كلية الطب البيطري، جامعة بغداد. عزلت من الكلية والكبد بعد تشريح الاسماك بطريقة معقمة وذلك حسب طريقة (14) Lucky. تم تأكيدها في مختبرات الصحة المركزي في بغداد بعد اجراء كافة الفحوصات البايوكيميائية عليها . تم تنشيط البكتريا بتمريرها خلال اسماك الكارب الاعتيادي ثلاث مرات لزيادة ضراوتها (19)، وحقنت الاسماك خلبيا I/P بعالق البكتريا *Aeromonas hydrophila* بمقدار 0.5 مل/سمكة، وتحضن بدرجة 25 °م لمدة 24 ساعة (6).

تقدير الجرعة النصف مميتة LD50 Determination of

حددت الجرعة النصف مميتة حسب طريقة Collins (7) لأجل تحضير جرعة الحقن نقلت الجراثيم من اكار نقيع القلب والدماغ الى وسط اكار ريميلر شوتس Rimmers shotts agar وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 25م، بعد ذلك نقلت الجراثيم الى مرق التريبتكيز سويا Tryptic soya broth وحضنت لمدة 48 ساعة بدرجة 25م، اخذ (1) مل من العالق الجرثومي وخفف في سلسلة مؤلفة من عشرة تخفيف عشرية بوساطة المحلول الملحي الفسلجي المعقم بعدها اخذ 1 مل من كل تخفيف وزرع على وسط اكار Tryptic soya agar ، وحضن لمدة 24 ساعة بدرجة 25 م وفي اليوم التالي حسب عدد المستعمرات الجرثومية من كل تخفيف وضرب في نسبة التخفيف ، وحقن كل تخفيف في مجموعة كاملة مكونة من خمسة اسماك وجرعة 0.3 مل لكل 100 غم من وزن الاسماك كان مقدار الجرعة المميتة الوسيطة 0.3×10^9 جرثومة/مل، وحسب طريقة (16).

استعمل 92 نموذجاً من اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* بمديات اوزان بين 142-156 غم ، ومديات اطوال كلية تراوحت بين 22-27 سم عوملت بمحلول ملحي بتركيز 2% ولمدة 5 دقائق لغرض تعقيمها وأقلمة الاسماك لمدة اسبوعين واستبعدت الاسماك الضعيفة ووضعت الاسماك في احواض زجاجية مجهزة بالاكسجين وكانت درجة حرارة الماء اثناء مدة التجربة بين 26-28 °م. وزعت عشوائياً بعدد 7 اسماك لكل حوض زجاجي سعة الواحد 70 لتر بواقع ثلاثة مكررات . مع احداث خمج تجريبي بوساطة الخمج البكتيري حقنا داخل العضلة في المنطقة الظهرية في الجهة اليسرى من الجسم (14)، وكانت الجرعة المعطاة 10^8 وحدة مكونة للمستعمرة 100/CFU غرام من وزن الجسم (20). اجريت الصفة التشريحية للأسماك المقتولة بعد اسبوع من الاصابة التجريبية وسجلت العلامات السريرية و التغيرات المرضية العيانية لأعضاء الكبد والكلية والطحال والعضلات.

النتائج والمناقشة

العلامات السريرية والعيانية

تميزت العلامات السريرية للأسماك المريضة عن طريق الحقن العضلي الى ظهورها بعد ثلاثة ايام من الاصابة في اسماك الكارب اذ تمثلت بخمول الاسماك وزيادة في حركة غطاء الغلاصم وغزارة المادة المخاطية التي تحيط بالجسم مع ظهور افات نزفية شديدة severe heamorrhagic lesions على سطح الجسم والزعانف مع بروز العين exophthalmia، كذلك لوحظ تمدد في منطقة البطن وتوسعها مع وجود حالة حبن Ascitis الذي ادى بالنتيجة الى سباحة الاسماك بوضعية غير طبيعية ، مع تجمع السوائل في جيوب القشور وتطورت هذه الافات الى افات تقرحية وانسلاخ وتساقط الحراشف وهذا يتفق مع ما اشار اليه Miyazaki (17) من ظهور العلامات السريرية للمرض بعد الحقن العضلي قد يعزى السبب الى الديقان السام الذي تمتلكه الجرثومة الذي يعرف بالعامل الودمي Odematic Factor اذ يعد العامل الاول في ضراوة الجرثومة (20)، حيث ذكر هذا الباحث ان حقن عترة شديدة الضراوة بنفس الطريقة يتميز بظهور تلك العلامات، اما التغيرات المرضية العيانية فقد لوحظ في الكبد والكلية احتقان شديد وتضخم مع وجود بقع نزفية وتغير لون الكبد الى اللون البني المصفر اما الطحال فقد بدا عليه احتقان شديد

وتضخم مع وجود بقع نزفية وفي العضلات لوحظ نخر تقرحي ulcerative necrosis في منطقة الحقن وهذا مماثل لما لاحظته (20) Rey عند احداث الخمج التجريبي في اسماك Crussian carp (*Carassius auratus*) واسماك الكارب الاعتيادي.

التغيرات المرضية النسجية

الكبد

امتازت التغيرات المرضية المجهرية في نسيج الكبد بوجود تنخر بؤري focal necrosis مع ارتشاح الخلايا الالتهابية لاسيما العدلات مصحوب بحدوث تغيرات دهنية لبعض الخلايا الكبدية وملاحظة نخر منفرد في بعض خلايا نسيج الكبد individual necrosis شكل (1) مقارنة مع نسيج كبد سمكة سليمة شكل (2).

الكلية

اظهر الفحص النسجي وجود افات تنكسية مع نخر نبيبي مصحوب بارتشاح خلوي بين النبيبات المتكسة فضلا عن مشاهدة نفس النضحة الالتهابية في محفظة الكلى مع ترسب شبكة الليفين و حدوث اختزال لمفي lymphoid reduction للنسيج المكون للدم. كما اوضحت النتائج احتقان لمتن الكلى مع ارتشاح لمفي مصحوب بخزب (وذمة) edema ووجود البلاعم الميلانية شكل (3) مقارنة مع نسيج كبد سمكة سليمة شكل (4).

الطحال

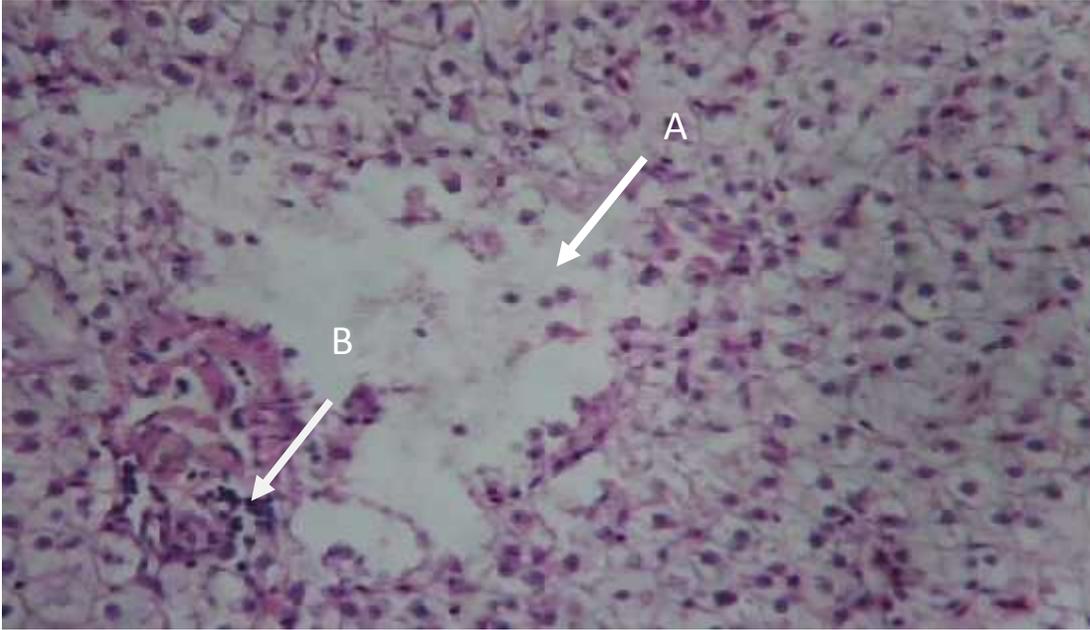
امتازت التغيرات المرضية المجهرية في نسيج الطحال بوجود اختزال و نفاذ لمفي في نسيج مكون الدم واللب الابيض مع وجود البلاعم الميلانية مصحوبة بنضحة ليفينية fibrinodematosus exodate لاسيما في مناطق نسيج مكون الدم hemopiotic tissue فضلا عن وجود احتقان في بعض مناطق اللب الابيض شكل (5) مقارنة مع نسيج كبد سمكة سليمة شكل (6).

العضلات

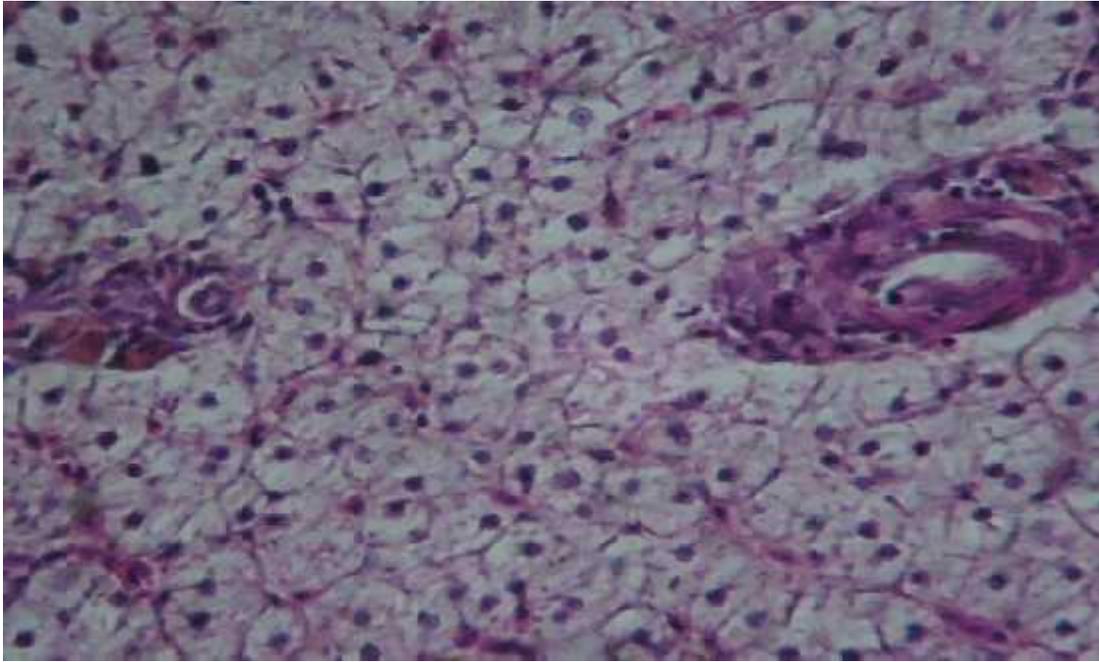
تميزت نتائج الفحص النسجي بحدوث تغيرات تنكسية degeneration change شديدة في النسيج مصحوبة بحدوث خزب (وذمة) شديد بين الحزم العضلية المتكسة مع ارتشاح خلايا وحيدة النواة لاسيما الخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة شكل (7) مقارنة مع نسيج كبد سمكة سليمة شكل (8).

بينت نتائج الدراسة المرضية النسجية لاسماك التجربة والمقتولة بعد اسبوع من الاصابة التجريبية عن طريق الحقن العضلي وجود تغيرات تنكسية وافات نخرية بؤرية لاسيما في الكبد والكلية اللذين يعدان من اهم الاعضاء المستهدفة target organs وهذا يعود الى تاثير الذيفانات البكتيرية التي تنتجها جرثومة *A. hydrophylia* لاسيما Lipopolysccharid وهذا يتفق مع (3) Ahmet & Nursal الذي اشار الى العترة الضارية للجرثومة التي تمتلك العديد من الذيفانات التي تؤدي دورا فعالا في امراضية الجرثومة واحداث افات مرضية شديدة ومن اهم هذه

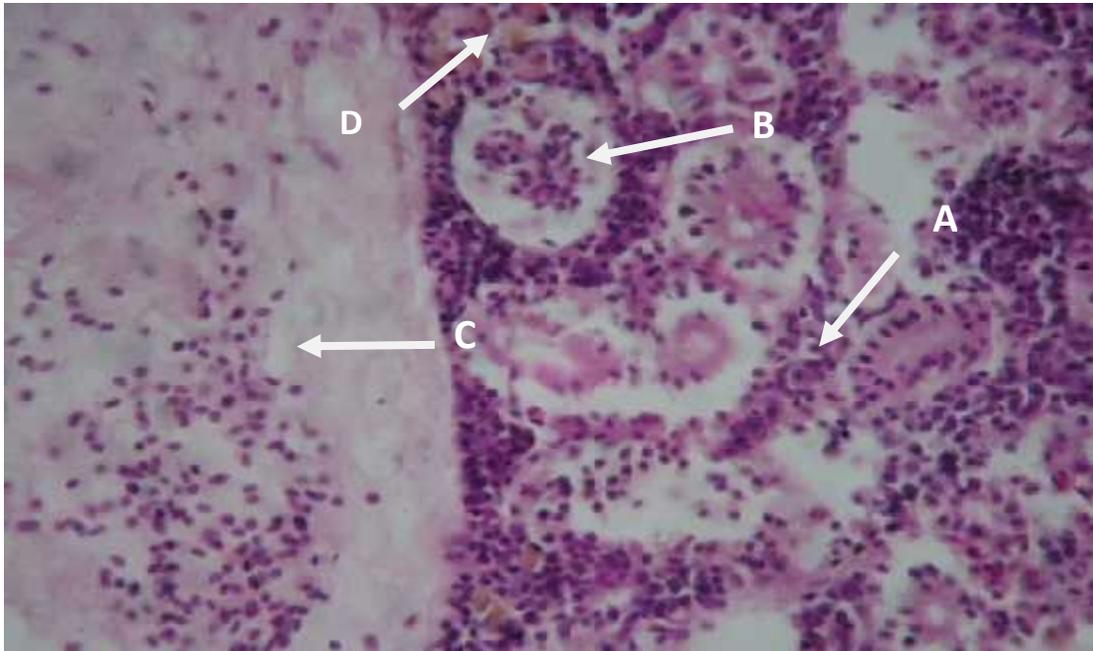
الذيفانات هو الذيفان الحال للدم hemolysin والذي يعد احد الذيفانات الداخلية Endotoxain التي تنتجها الجرثومة مع الذيفانات المعوية Enterotoxins والذيفانات الخلوية Cytotoxin. كما اوضح الفحص المجهرى حدوث تغيرات تنكسية وعائية مصحوبة بخزب ويعزى ذلك الى تاثير الى الذيفان الحال للدم الذي يزيد من نفاذية الاوعية الدموية ويؤدي الى تحطيم خلايا الدم الحمر وترسب الهيموسدرين في النسيج الخلالي للكلية والتي ظهرت بهيئة حبيبات قهوائية بنية اللون منتشرة او ملتصقة من قبل الخلايا البلعمية في الجهاز الشبكي البطاني في الطحال والكبد وهذا يتفق مع النتائج التي توصلت اليها الحمداني (1) بعد اجراء الخمج التجريبي بجراثيم *A. hydrophila*، و اشارت الدراسة الى حدوث تغيرات فجوية شديدة sever vacuolar changes في انسجة الكبد والكلى في الاسماك المخمجة عن طريق الحقن العضلي لعل ذلك يعزى الى الخميرة الحالة للبروتين البروتيز protase التي تنتجها الجرثومة وهذا يتفق مع النتائج التي توصلت اليها (4) Baun اذ اوضحت نتائج الفحص عن تنكس ظاهرة النبيبات الكلوية مع ارتشاح الخلايا للمفاوية في الكلية والكبد للاسماك المخمجة. تميزت اصابات جراثيم *Aeromonas* بتنخر شديد في نسيج العضلات والاعضاء الداخلية الاخرى وهذه المشاهدات تتفق مع ما ذكره (11) Huizinga من وجود الخزب الشديد بين الحزم العضلية المتكسفة في الاسماك المخمجة عن طريق الحقن العضلي.



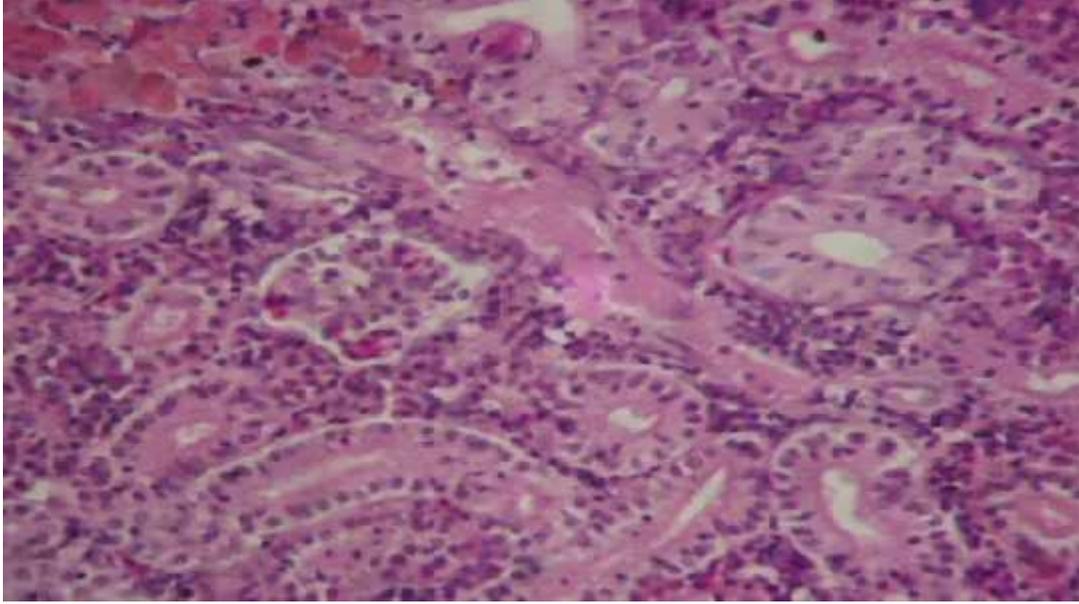
شكل (1). مقطع نسيجي لكبد الاسماك المخمجة بجرثومة *A. hydrophila* عن طريق الحقن العضلي بعد اسبوع من الإصابة التجريبية. A تنخر بؤري في متن الكبد، B - ارتشاح الخلايا الالتهابية E&H 40x .



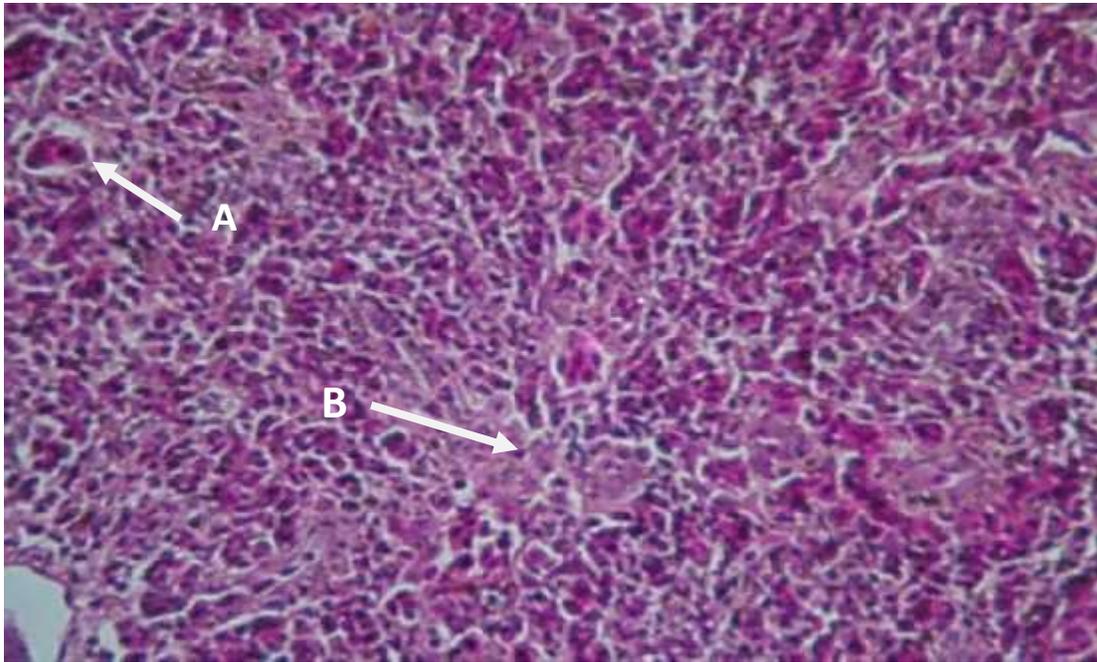
شكل (2). مقطع نسيجي لكبد الاسماك سليمة تمثل مجموعة السيطرة E&H 40x .



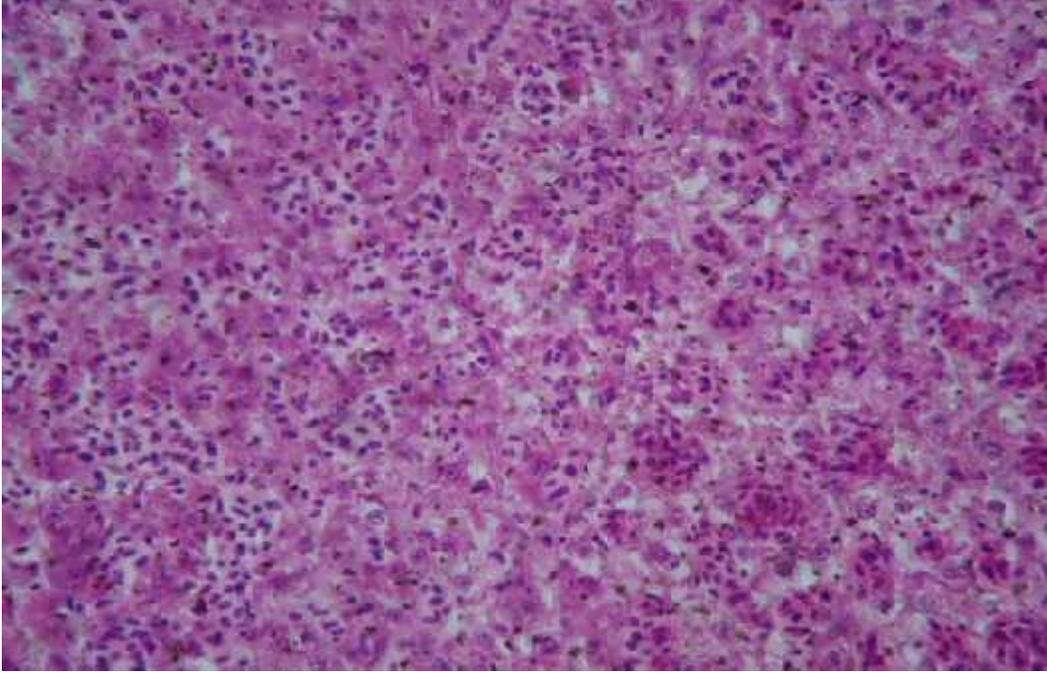
شكل (3). مقطع نسيجي لكلية الاسماك المخمجة بجرثومة *A. hydrophila* عن طريق الحقن العضلي بعد اسبوع من الاصابة التجريبية. A ارتشاح خلوي بين النبيبات المتكسدة، B - نخر نبيبي مع C- نضحة التهابية في محفظة الكلى مع ترسب شبكة الليفين D البلاعم الميلانية E&H 40x .



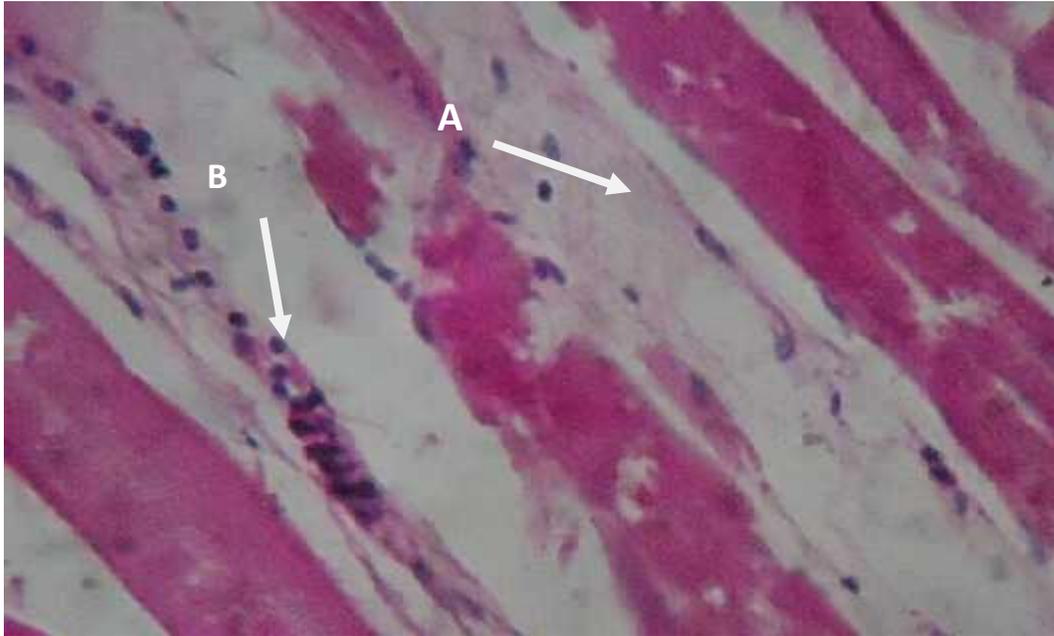
شكل (4). مقطع نسيجي لكلية الاسماك سليمة تمثل مجموعة السيطرة E&H 40x .



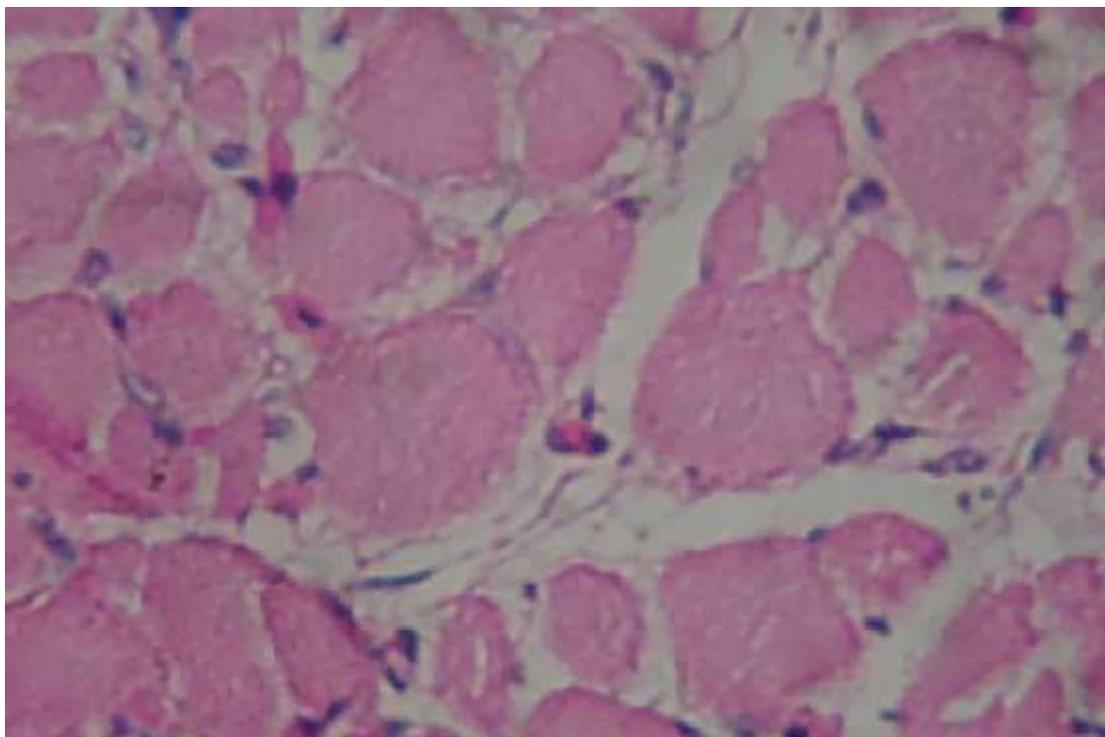
شكل (5). مقطع نسيجي لطحال اسماك المخمجة بجرثومة *A. hydrophila* عن طريق الحقن العضلي بعد اسبوع من الاصابة التجريبية. A احتقان مع وجود B نضحة ليفينية E&H 40x fibrinous exudate .



شكل (6). مقطع نسيجي لطحال الاسماك سليمة تمثل مجموعة السيطرة E&H 40x .



شكل (7). مقطع نسيجي لعضلات اسماك المخمجة بجرثومة *A. hydrophila* عن طريق الحقن العضلي بعد اسبوع من الاصابة التجريبية. A خرب شديد بين الحزم العضلية المتكسة، B ارتشاح خلايا وحيدة النواة . E&H 40x



شكل (8): مقطع نسيجي عرضي لعضلات اسماك سليمة تمثل مجموعة السيطرة E&H 40x .

المصادر

1. الحمداني، الاء حسين (1990). دراسة امراضية الايرومونات هايدروفيليا في الخمج التجريبي لاسماك الكارب العادي وتقييم كفاءة بعض المضادات الجرثومية في علاجها، رسالة ماجستير ،كلية الطب البيطري، جامعة بغداد. صفحة 38-39.
1. خليفة، خليفة احمد (1986). امراض الاسماك. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،مطبعة جامعة الموصل.
2. Ahmet, A. & Nursal, M. (2010). Investigation of pathological findings infected with *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*). Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 16 (Suppl-B): S325-S328.
3. Bauna, Y. & Yilmaz, A.(2011). Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia . Ankara Univ. Vet. F.K (58):47-54.
4. Camus, A.; Durborow, R.; Hemstreet, W.; Thune, R. and Hawke J. (1998). *Aeromonas* Bacterial Infections Motile, *Aeromonas* Septicemia. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC publication, No 478.340-345.

5. Ciprino, R.C. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile *Aeromonas* septicemias of fish. Fish dis. Leaflet 68, united states department of the interior fish and wildlife service, division of fishery research. Washington, DC, pp1-25.
6. Collins, M.T.; Dawe, D.L. & Gratzek, J.B. (1985). Immune response of channel catfish under different environmental conditions. J. American Vet. Med. Association, 169, pp.991-994.
7. Erova, T.E.; Kosykh, V.G. & Fadl, A.A. (2008). Cold shock exoribonuclease R (Vac B) is involved in *Aeromonas hydrophila* pathogenesis. J. Bacterial, 190: 34-67.
8. Galindo, C.L.; Sha, D. and Fadl, L. (2006). Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. Cure immune Rev, 2: 13.
9. Guzl. A. and Kozinska E. (2004). Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. Sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio*). Bull Vet. Ist .plumage, 48. 391 -395.
10. Huizinga, H.; Esch, G.; Hazen ,T. (1979). Histopathology of red sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmondess*. J. Fish Dis. (2): 263-277.
11. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Stalay, J.T. and Williams, S.T. (1994) Bergery's manual of determinative bacteriology .William and Winkins, Baltimore, USA.
12. Jeney.G. (2011). Resistance of genetically different common carp, *Cyprinus carpio*, families against experimental bacteria challenge with *Aeromonas hydrophila*. J. fish Dis., 34:65-70.
13. Lucky, Z. (1977). The diagnosis of bacterial disease by infection experiments .In G.L. Hoffman (Ed.). Methods for Diagnosis of Fish Disease pp 68-71. Amerind New Delhi.
14. Martin, M. (2005). *Aeromonas* In: Bergeys Manual of systematic Bacteriology, 2nd ed, Brenner, Krieg, Saley, Garrity (Ed). Williams and Wilkins. Vol. 2, Springer-Verlag, New York
15. Mile, V. and Mesra, S. (1938).The estimation of bactericidal power of the blood. J. Hyg, 38: 732-739.
16. Miyazaki, T.; Okamoto, H.; Kageyama, T. and Kabayashi, T. (2000). Viremia-associated and -aki-byo. A new viral disease in color carp *Cyprinus carpio* in Japan. Dis. Aquatic Org., 39:183-192.
17. Monette, S.; Dallaire, A.D.; Mingelbier, M.; Groman D.; Uhland ,D.; Richard.; Pillard, T.G; Johannson, L.M. ; Chivers, D.P.; Ferguso, H.W.; Leighton,F. A. and Simko, E

- (2006). Massive mortality of common carp (*Cyprinus carpio*) in the St Lawrence River in 2001:diagnostic investigation and experimental induction of lymphocytic encephalitis. *Vet. Pathol.* 43: 302-310.
18. Navarre, O. and Halver, J. (1989). Disease resistance & humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin c. *Aquaculture*, 79.207-221.
19. Rey, A. (2009). Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Laboratory of pathology of Veterinary Medicine, Veterinary Record* (164): 493-499.

**Study of Histopathological Changes in the Common Carp
(*Cyprinus carpio*) Experimentally Infected by Bacteria
*Aeromonas hydrophila***

Eman S. Khamees¹, Abdulmotalib J. Al-Rudainy² and Enaam B. Faleh²

1 Agricultural Research Directorate, Baghdad, Ministry of Science and Technology;
Baghdad, Iraq

2 College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad Iraq

Abstract. The present study was conducted to investigate the histopathological changes and study the histopathological changes and clinical signs of bacterial hemorrhagic septicemia caused by *Aeromonas hydrophila* in common carp *Cyprinus carpio*. The study represented by induce the infection of the disease by intramuscular injection of the bacteria in the site of left behind the front edge of the dorsal fin 1-2 cm with dose of 10⁸ cfu/100 gm of fish body weight . distinctive clinical signs of disease were emerged after three days of induction of infection which represented by depression of fish, difficult inspiration ,swimming near the surface ,corrosion of edges and fins, exophthalmia , Ascetic and excessive mucus around the body ,Macroscopic pathological changes shows hypertrophy and congestion of kidney and spleen and necrosis of muscles . As for the histopathological changes of kidney represented by tubular necrosis with cellular infiltration among degenerated tubule and presence of fibrinous exudates in hemopoietic tissues in spleen and presence of focal necrosis in the liver and infiltration of inflammatory cells in addition to presence of severe edema between degenerated muscular bands.

Key words: *Aeromonas hydrophila* ; *Cyprinus carpio*; bacterial hemorrhagic septicemia.