

Isolation of *Aeromonas hydrophila* and Evaluation of Its Pathological Effects on Koi Fish (*Cyprinus carpio*)

Seyedeh Shiva Alavinezhad¹ , Reza Kazempoor^{2*} , Arman Ghorbanzadeh³, Ahmad Gharekhani⁴

1. Department of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
3. Department of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Sciences, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Department of Veterinary Medicine, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran

 [10.30699/ijmm.15.4.465](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.4.465)



ABSTRACT

In the summer of 2018, this study was performed on 50 Koi fish transferred to Razef Research Complex. In this study, after observing macroscopic symptoms in fish, including lethargy and immobility, imbalance, darkening of the skin, skin wounds, petechiae in the abdomen, opacity of the eye and anophthalmia, anorexia, and sitting on the bottom of the aquarium, sampling was performed to diagnose the pathogens and examine the pathological changes. According to microbial tests on skin samples and internal organs, *Aeromonas hydrophila* was reported, and septicemia in 48% of the studied fish. In necropsy specimens, the organs were pale, the liver was enlarged, and petechiae were observed on the surface of the liver. The microbial contamination also led to considerable tissue damages, including the destruction of gill filaments, nuclear pycnosis in the liver, and the infiltration of inflammatory cells into the heads of all fish. Considering the significant losses due to the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in different fish species and the importance of Koi fish, observing quarantine and hygienic principles to prevent sepsis was very important. Early diagnosis and use of appropriate treatment protocols for this disease are recommended.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Koi fish, Pathology

Received: 2021/02/18; Accepted: 2021/06/05; Published Online: 2021/08/16

Corresponding Information: Reza Kazempoor, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.
Email: r.kazempoor@riau.ac.ir



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Alavinezhad S S, Kazempoor R, Ghorbanzadeh A, Gharekhani A. Isolation of *Aeromonas hydrophila* and Evaluation of Its Pathological Effects on Koi Fish (*Cyprinus carpio*). Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (4) :465-476

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Aeromonas hydrophila is a Gram-negative bacillus found in aquatic environments, drinking water, sewage, and food (1). This bacterium can be isolated from estuaries, seawater, and freshwater (1-3). Freshwater environments, especially those rich in mineral materials, are the natural habitat of *A. hydrophila*; however, recent evidence suggests that

this organism can also be found as a part of intestinal flora in fish (4).

The bacterium is known to be a pathogenic microorganism in fish, causing a wide range of diseases, including motile *Aeromonas* septicemia in carp, tilapia, catfish, and salmon, the red spot disease in bass and carp, and wound-associated infections (e.g., Epizootic ulcerative syndrome) in catfish, cod, and carp (5).

Aeromonas septicemia usually occurs when fish are under stressful conditions such as high-temperature and poor-quality water, hypoxia, parasitic infections, high density, manipulation, and transport (6, 7); it may cause chronic inflammation for several weeks, gradually increasing the mortality rate. Factors like mortality associated with this bacterial infection, its management, and its treatment costs, highly inflict the fish farming industry (8, 9). Also, *A. hydrophila* can cause localized tissue damage in the host, including tissue degeneration and inflammation (10, 11).

Another important point about this bacterium is that in addition to fish, it can lead to zoonotic disease in amphibians and reptiles, which can also be pathogenic for mammals, including humans (2, 8, 11, 12). In fact, it is known as an emerging pathogen for humans (1). Consequently, the presence of drug-resistant *A. hydrophila* in aquariums becomes important regarding multiple public health aspects (13).

Koi (fancy carp *Cyprinus carpio* L. var. Koi) is an expensive ornamental freshwater fish that is often inflicted by infectious diseases, such as *A. hydrophila*, eventually leading to their death (14), raising environmental concerns (15) and zoonotic hazards (13). Based on the above and the importance of *A. hydrophila* infection in Koi fish, which leads to high mortality in fish, in the present study, we reported the isolation of *A. hydrophila* bacteria from the Koi fish transferred from farm ponds to the aquariums of a research center. The bacteria were identified using microbial culture methods, and pathological changes in the gills, liver, and kidneys were assessed to determine the pathological effects of this infection on this valuable ornamental fish.

Case Report

In the summer of 2017, 50 pieces of Koi fish (with an average weight of 25 ± 2 grams and a mean length of 24 ± 3 cm) were transferred from one of the concrete ponds of the Koi Fish Farming and Breeding Center in Shahriar city to the Razef Research Center, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Then, the fish were randomly divided into five tanks (170 L) (10 fish per tank). After a few days after the transfer, all the fish developed similar macroscopic symptoms, including darkening of the skin, abdominal petechiae, skin lesions, corneal opacity and anophthalmia, lethargy, immobility, imbalance, anorexia, and seating on the floor of the aquarium. After observing these clinical signs, we took the necessary measures (including autopsy for obtaining samples from the skin and internal organs for pathological and microbial examination). As this study was a

case report, seven fish presenting these clinical signs were randomly caught from each tank (a total of 35 fish). After anesthesia by clove powder, sampling was performed to obtain specimens from the skin and internal organs and identify the pathogenic agent. All the histological and microbial examinations were conducted under completely sterile conditions.

Liver, gill, and kidney samples were initially washed with the physiological serum and then completely homogenized using a tissue homogenizer. Afterward, the specimens were cultured on Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar) medium and incubated at 28°C for two days. After this step, the grown colonies were re-cultured on BHI Agar medium; the motile, oxidase-positive, and glucose fermenter bacteria suspected as *Aeromonas* spp., underwent further biochemical and physiological analyses. The confirmatory tests at this step included: H₂S production, urease test, citrate reduction, indole production, nitrate reduction, growth on MacConkey medium, and the fermentation of carbohydrates (glucose, inositol, sucrose, sorbitol, arabinose, and mannitol) (16).

For histological examinations, gill, liver and kidney samples were initially fixed in formalin buffer 10% for 48 hours. Then the fixed samples were placed in paraffin after dewatering and clearing with xylene. Tissue sections with a diameter of 5 µm were prepared using a microtome device and stained by hematoxylin-Eosin (H&E). The prepared histological slides were examined by optical microscope (Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan) to evaluate pathological features (17).

The results of the microbial tests showed that 48% of septicemia cases (24 samples) were caused by *A. hydrophila* (Figure 1). In autopsy specimens, in addition to petechiae and skin darkening and ulcerative lesions, the internal organs were pale, and the liver was enlarged with observable petechiae on its surface (Figure 2). In the microscopic examination of the gills, we observed collapsed and swollen secondary lamellae, the swelling, and shortening of lamellae and their complete destruction, as well as the edema of gill filaments. In addition, the epithelial detachment was observed along with the detachment of the lamellar epithelium outer layer. Congestion was evident in the primary and secondary lamellae (Figure 3 A and B). In the kidney, the infiltration of inflammatory cells (neutrophils) was evident in vessels and renal parenchyma (Figure 3C). The most prominent changes in the liver were irregular hepatic fibers, nuclear pyknosis, and cytoplasmic vacuolation. In addition, varying degrees of pancreatic cell degeneration were evident in some parts (Figure 3D).

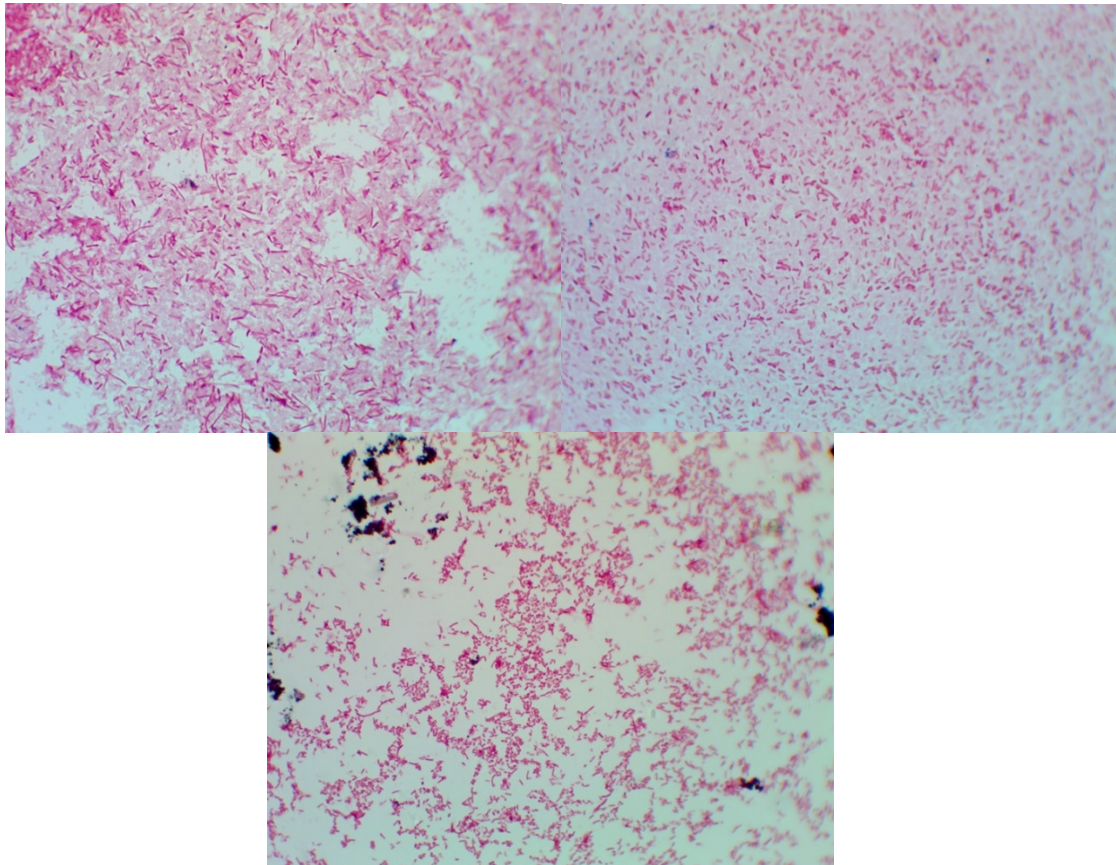


Figure 1. The identification of *Aeromonas hydrophila* bacterium in the studied samples

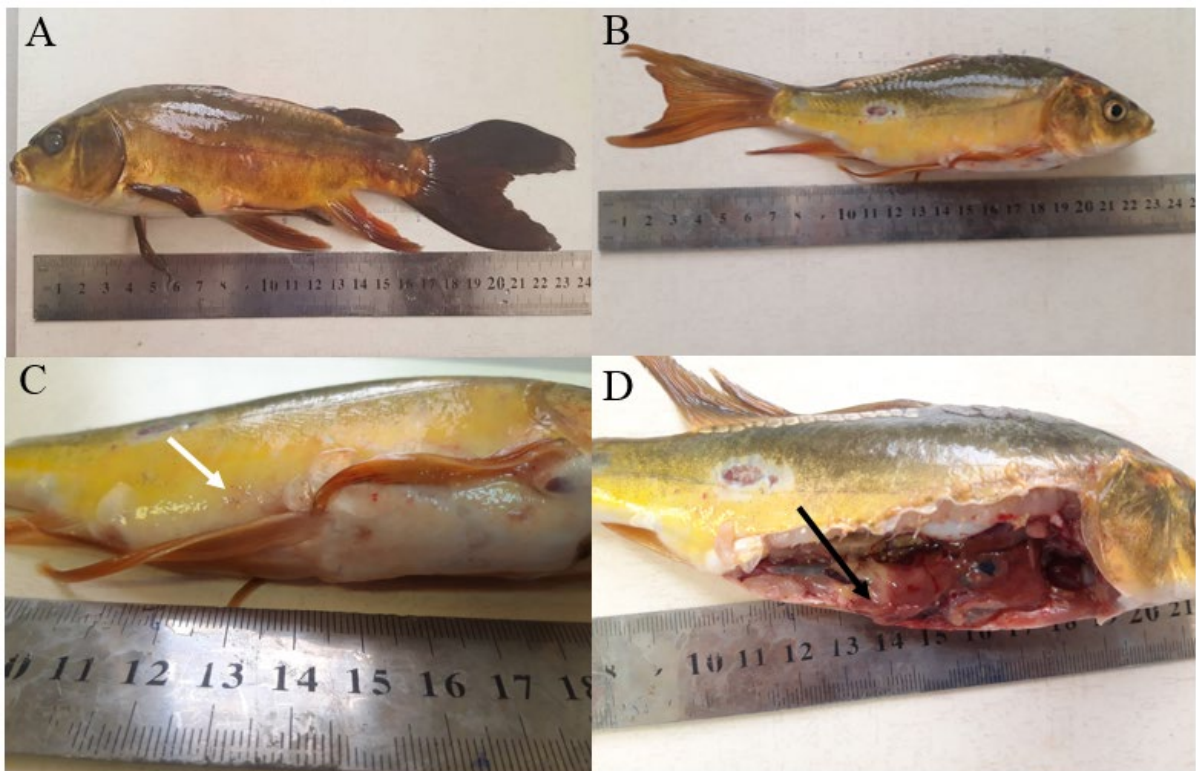


Figure 2. The darkening of the skin (A), ulcerative skin lesions (B), petechiae on the skin surface (the white arrow) (C), the enlargement of the liver, pale internal organs, and petechiae on the liver surface (the black arrow) (D).

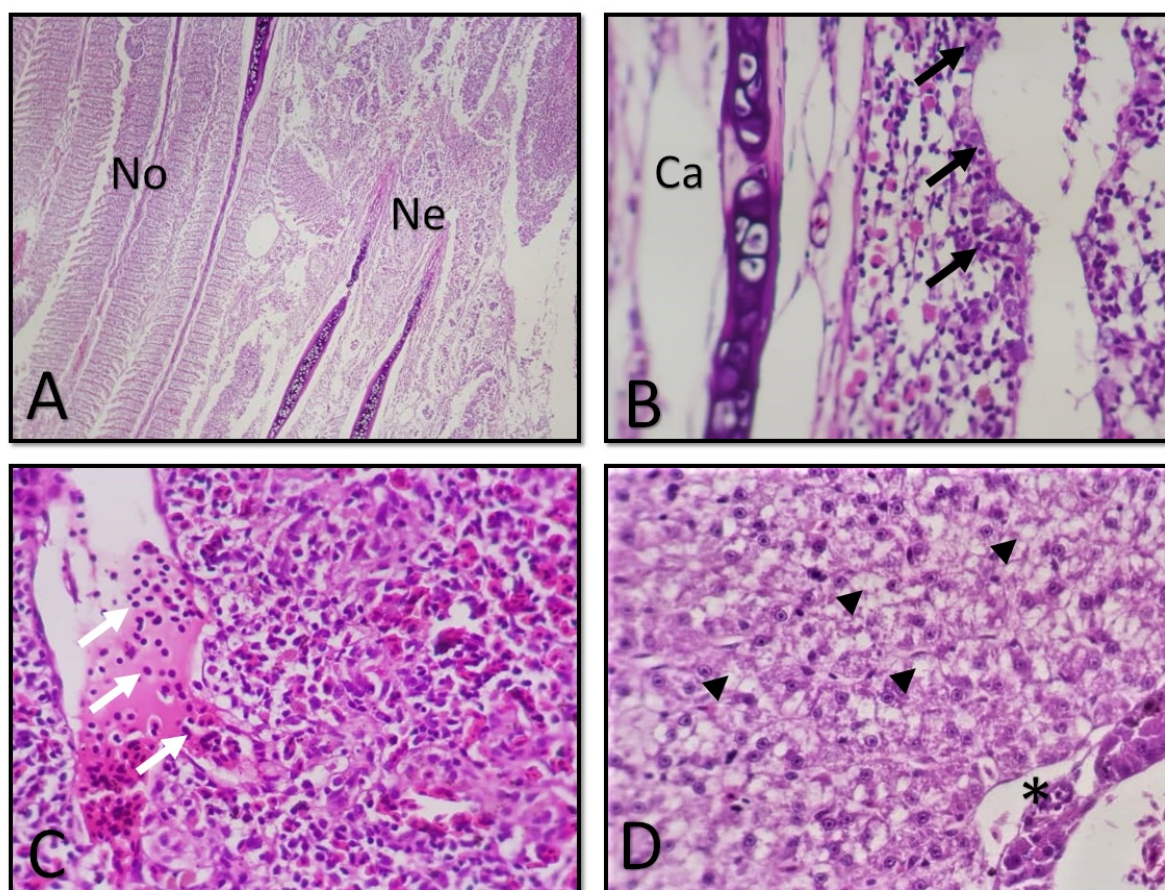


Figure 3. Gill, kidney, and liver histopathological examination. NO: normal gill blades, Ne: acute necrosis, Ca: gill cartilage, black arrow: the necrosis of epithelial and mucosal cells, white arrow: infiltration of inflammatory cells, arrow tip: the necrosis of hepatocytes, star: pancreatic cell degeneration. A: Gills (40X), B: Gills (400X), C: Kidney, D: Liver, H&E staining.

Discussion

The present study identified *A. hydrophila* bacteria in Koi fish, which is known as one of the most critical lethal pathogens in various carp fish (9). *Aeromonas* bacteria are a part of the water's natural flora, as well as fish. Still, they can become opportunistic pathogens causing super-acute epidemics (e.g., *Aeromonas hydrophila* pathotype) under certain conditions, including environmental stresses. This event can cause considerable casualties in the aquaculture industry (18, 19), often occurring within a few hours of the disease onset (20). In the present study, it can be said that transport stress and reduced immune function of fish could have been contributors to the outbreak. This is in line with the notion that *Aeromonas* bacteria are opportunistic pathogens that can only cause disease in immunocompromised fish (21). In Iran, several studies have investigated *A. hydrophila* infection in various fish, including goldfish (22), angelfish (23), and common carp (24).

In the autopsy examination of the obtained samples, wounds and bleeding spots were evident on the body's surface, as well as the abdomen and internal organs. These findings were similar to the symp-

toms observed in the study of Stratev *et al.* in 2015 (11). Many studies have shown that chronic infection with *A. hydrophila* is associated with ulcerative skin lesions and local bleeding and inflammation (10).

In our study, histological examinations showed multiple tissue damages in the gills, liver, and kidneys. These included necrosis, inflammation, and hemorrhage in the gills, inflammation in the kidney, necrosis, and nuclear pyknosis in hepatocytes. In several studies examining the histological features of *A. hydrophila* infection, similar findings have been reported (11, 25-29). In this regard, degenerative histological changes due to *A. hydrophila* infection have been reported in organs such as the gills, kidneys, and liver (10). Also, in line with the present study in which tissue damages in the gills were prominent, Al Yahya *et al.* (2018) (10) and Cookiyaei *et al.* (2012) (30) also reported necrosis in gill blades and hemorrhage in gills due to *A. hydrophila* infection. One of the significant issues in the histopathological features of *A. hydrophila* infection is that most tissue damage due to this bacterium has been observed in the liver and kidneys (11). In fact, the liver can be considered the target organ of *A. hydrophila* (10). In the histological evaluation of the

kidney, similar to the study of Sellegounder *et al.* (2018), infiltration of inflammatory cells was observed (31). In a study considering Nile tilapia, bleeding foci were observed in the kidney due to a bacterial infection (32). In the examination of the liver and pancreas tissues, we noticed vacuolation and nuclear pyknosis, as well as the necrosis of hepatocytes and pancreatic cells, which were similar to the results of other studies (10, 31, 33). In a study, Afifi *et al.* (2000) attributed these changes to the toxins and extra-cellular compounds released by *A. hydrophila*, including hemolysin, proteases, and elastase, in the liver, leading to severe tissue damage and necrosis (34).

Conclusion

The results of the present study showed that freshwater fish are always prone to *Aeromonas* spp. infections. According to our research, pathological

changes in the gills, liver, and kidneys can be suitable biomarkers for assessing the pathogenicity of *A. hydrophila* in Koi fish. In addition, *Aeromonas* species can be a threat to public health, especially for those who are in contact with sick fish. Therefore, the proper management of water quality and food health and the quarantine of new fish can play a significant role in preventing and controlling *A. hydrophila* infection in fish and avoiding its transmission to humans.

Acknowledgment

We sincerely thank all the colleagues at Razaf Research Center who assisted us in conducting this research.

Conflict of Interest The authors declared no conflicts of interest.



جداسازی آئروموناس هیدروفیلا و بررسی اثرات آسیب‌شناسی ناشی از این پاتوژن در ماهی کوی (*Cyprinus carpio*)

سیده شیوا علوی نژاد^۱، رضا کاظم‌پور^{۲*}، آرمان قربان‌زاده^۲، احمد قره‌خانی^۴

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

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.

۳. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.

۴. گروه دامپزشکی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۳۰

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۵

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۵/۲۵

موضوع: بیماری‌های مشترک انسان - دام

دام

نویسنده مسئول:

رضا کاظم‌پور، گروه زیست‌شناسی و علوم

پایه، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی،

رودهن، ایران

ایمیل:

or.kazempoor@riau.ac.ir

مقدمه

این مطالعه در تابستان سال ۱۳۹۷ بر روی ۵۰ قطعه ماهی کوی منتقل شده به مجموعه تحقیقاتی رازف، صورت پذیرفت. در این بررسی پس از مشاهده علائم ماکروسکوپی از جمله بی‌حالی و عدم تحرک، عدم تعادل، تیره شدن پوست، زخم‌های پوستی، پتشی در ناحیه شکمی، کدورت چشم و آنوفتالمی، بی‌اشتهایی و نشتن در کف آکواریوم؛ نمونه برداری جهت تشخیص عامل بیماری‌زا و بررسی تغییرات آسیب‌شناسی، صورت گرفت. نتایج تست‌های میکروبی نمونه‌های پوست و اندام‌های داخلی تأییدکننده حضور *آئروموناس هیدروفیلا* و نشان‌دهنده سپتی‌سمی ۴۸٪ ماهیان مورد مطالعه بود. در نمونه‌های کالبدگشایی اندام‌ها رنگ‌پریده بوده، کبد بزرگ شده و پتشی روی سطح کبد مشاهده گردید. همچنین آلودگی میکروبی ایجاد شده منجر به ایجاد آسیب‌های بافتی متعدد از جمله تخریب تیغه‌های آبششی، ایجاد پیکنوز هسته‌ای در کبد و نفوذ سلول‌های التهابی در سر کلیه ماهیان گردید. با توجه به ایجاد تلفات قابل توجه ناشی از بیماری‌زایی *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی و اهمیت ماهی کوی، رعایت اصول قرنطینه‌ای و بهداشتی جهت جلوگیری از وقوع سپتی‌سمی بسیار حائز اهمیت بوده و تشخیص به موقع و بهره‌مندی از پروتکل‌های درمانی مناسب برای این بیماری توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: *آئروموناس هیدروفیلا*، آسیب‌شناسی، ماهی کوی

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران؛ دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

کپور، تیلاپیا، گربه ماهی و سالمون، بیماری لکه قرمز در باس و کپور و عفونت‌های همراه با زخم، مانند سندرم اپیزوتیک اولسراتیو در گربه ماهی، کاد و کپور مشارکت دارد (۵). سپتی‌سمی *آئروموناس* عموماً هنگامی ایجاد می‌شود که ماهیان تحت شرایط استرس‌زا از جمله دمای بالای آب، کیفیت بد آب، هیپوکسی، عفونت‌های انگلی، تراکم بالا، دستکاری و حمل و نقل باشند (۶، ۷) و باعث ایجاد علائم التهاب مزمن برای چند هفته می‌شود که طی آن میزان مرگ و میر به‌طور تدریجی افزایش می‌یابد، مرگ و میر همراه با این عفونت باکتریایی و نیز هزینه‌های کنترل و درمان، منجر به تحمیل هزینه‌های اقتصادی زیادی به صنعت پرورش ماهی می‌شود (۸، ۹). همچنین *آئروموناس هیدروفیلا* می‌تواند منجر به ایجاد آسیب‌های

آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری میله‌ای گرم منفی است که به‌طور مشخص در محیط‌های آبی و همچنین در آب آشامیدنی، فاضلاب، و غذا یافت می‌شود (۱). این باکتری را می‌توان از آب مصب‌ها، آب شور دریا و آب شیرین جداسازی کرد (۱-۳). محیط‌های آب شیرین، به ویژه انواع حاوی مقادیر بالای مواد معدنی، به‌طور طبیعی به عنوان زیستگاه طبیعی *آئروموناس هیدروفیلا* در نظر گرفته می‌شوند، اما شواهد اخیر نشان می‌دهد که این ارگانیسم همچنین می‌تواند جزیی از فلور روده‌ای ماهی‌ها نیز باشد (۴).

این باکتری یک پاتوژن شناخته شده در ماهیان است که طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سپتی‌سمی *آئروموناس* متحرک در

بافتی موضعی از جمله تخریب بافتی و التهاب در میزبان شود (۱۰).
(۱۱)

نکته قابل توجه دیگر در رابطه با این باکتری این است که این پاتوژن می‌تواند یک بیماری زئونوتیک بوده و علاوه بر ماهی‌ها، دوزیستان و خزندگان، می‌تواند برای پستانداران، از جمله انسان نیز بیماری‌زا باشد (۲، ۸، ۱۱، ۱۲)، به گونه‌ای که به عنوان یک پاتوژن نوظهور در انسان شناخته می‌شود (۱). در نتیجه حضور *آئروموناس هیدروفیلیا* مقاوم به دارو در آکواریوم‌ها از جنبه‌های متعدد مرتبط با سلامت عمومی دارای اهمیت است (۱۳).

ماهی کوی (fancy carp *Cyprinus carpio* L. var. koi) از جمله ماهیان زینتی آب شیرین گران قیمت است که اغلب دچار بیماری‌های عفونی از جمله *آئروموناس هیدروفیلیا* می‌شود که در نهایت منجر به مرگ و میر ماهیان گردیده (۱۴) و نگرانی‌هایی در مورد تأثیرات محیطی (۱۵) و مخاطرات زئونوتیک (۱۳) ایجاد کرده است. با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت ماهی کوی و پاتوژن *آئروموناس هیدروفیلیا* در ایجاد بیماری و تلفات در جمعیت ماهیان، در مطالعه حاضر پس شناسایی باکتری *آئروموناس هیدروفیلیا* از ماهیان کوی منتقل شده از استخرهای پرورشی به آکواریوم‌های مجموعه تحقیقاتی با استفاده از روش‌های کشت میکروبی، برای شناسایی علایم پاتولوژیک ناشی از این بیماری در این ماهی زینتی ارزشمند، به بررسی تغییرات آسیب‌شناسی در بافت‌های آبشش، کبد و کلیه پرداختیم.

گزارش مورد

در تابستان سال ۱۳۹۷، تعداد ۵۰ قطعه ماهی کوی (با میانگین وزنی 25 ± 2 گرم و میانگین طولی 24 ± 3) از یکی از استخرهای بتنی مرکز تکثیر و پرورش ماهی کوی در شهرستان شهریار به مرکز علمی-پژوهشی رازف، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، ایران، انتقال یافت. ماهی‌ها پس از انتقال به صورت کاملاً تصادفی در ۵ تانک (به حجم ۱۷۰ لیتر) تقسیم شدند (۱۰ ماهی در هر تانک). پس از گذشت چند روز از انتقال، تمامی ماهی‌ها دارای علایم ماکروسکوپی مشابه از جمله تیره شدن پوست، پتشی (هماتوم) در ناحیه شکمی، زخم‌های پوستی، کدورت چشم و آنوفتالمی، بی‌حالی و عدم تحرک، عدم تعادل، بی‌اشتهایی و نشستن در کف آکواریوم بودند. با مشاهده علایم بالینی اقدامات لازم برای نمونه‌برداری کشت میکروبی از پوست و اندام‌های داخلی بدن ماهیان و هم‌زمان کالبدگشایی و نمونه‌برداری برای بررسی‌های آسیب‌شناسی انجام پذیرفت. با توجه به آنکه این مطالعه به صورت گزارش موردی بوده است، برای انجام بررسی‌ها ۷ ماهی دارای

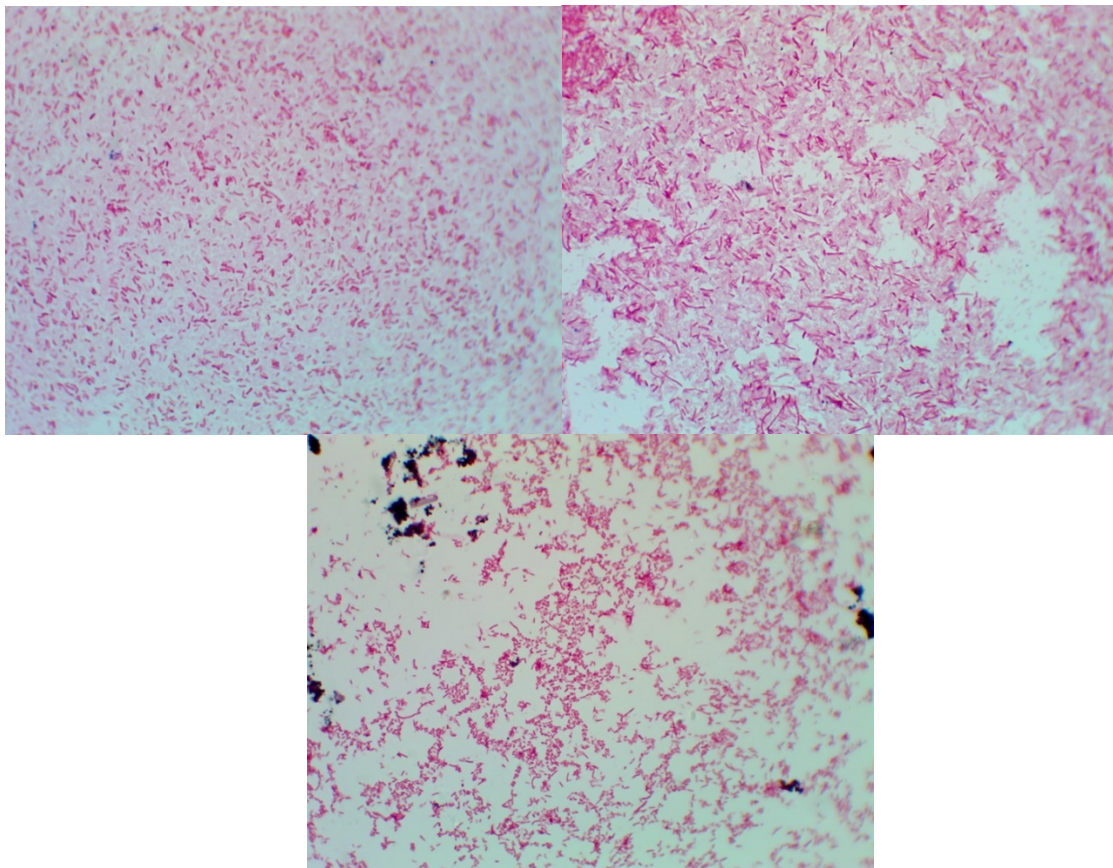
علایم بالینی از هر تانک (در مجموع ۳۵ ماهی) به صورت کاملاً تصادفی صید شده و پس از بیهوشی توسط پودر گل میخک نمونه برداری از پوست اندام‌های داخلی برای شناسایی عامل بیماری‌زا و انجام عملیات بافت‌شناسی در شرایط کاملاً استریل، صورت گرفت.

نمونه‌های اخذ شده از کبد، آبشش و کلیه ماهیان ابتدا توسط سرم فیزیولوژی شست‌شو داده شده و سپس با استفاده از هموژنیزاتور بافتی کاملاً همگن شدند و بر روی محیط BHIA کشت داده شده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت دو روز گرمخانه‌گذاری شدند. پس از مرحله گرمخانه‌گذاری پرگنه‌های رشد یافته را مجدداً بر روی محیط کشت BHIA پاشاژ داده و باکتری‌های متحرک، اکسیداز مثبت و تخمیرکننده گلوکز به‌عنوان موارد مشکوک به *آئروموناس* مورد بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی قرار گرفتند. تست‌های تاییدی انجام شده در این مرحله شامل تولید H_2S ، اوره آز، احیای سیتрат، تولید اندول، احیای نیترات، رشد در محیط مک کانکی و تخمیر کربوهیدرات‌ها (گلوکز، اینوزیتول، سوکرز، سوربیتول، آرتینوز، مانیتول) بود (۱۶).

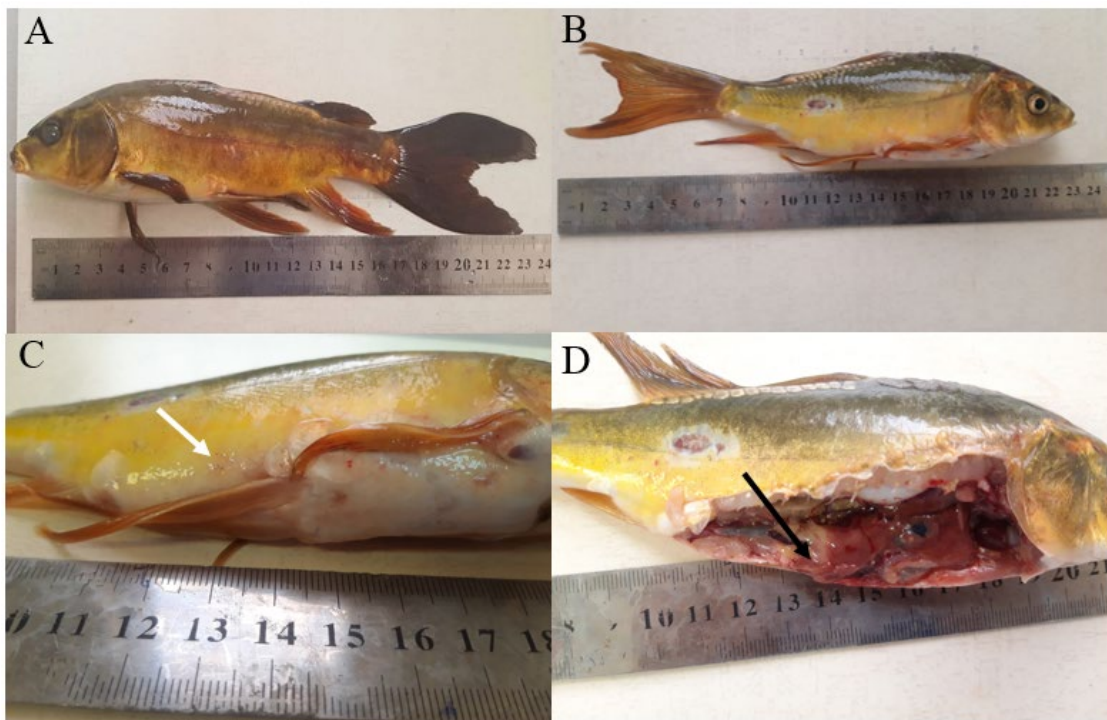
برای بررسی‌های بافت‌شناسی نمونه‌های آبشش، کبد و کلیه ماهی ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین بافری ۱۰٪ فیکس شدند. سپس نمونه‌های فیکس‌شده پس از طی مرحله آبگیری و شفاف‌سازی با زایلن در داخل پارافین قرار گرفتند، برش‌هایی به قطر ۵ میکرون با استفاده از دستگاه میکروتوم تهیه شده و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) انجام شد. لام‌های بافت‌شناسی تهیه‌شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (Japan, Tokyo, Olympus: Olympus BX51) از نظر آسیب‌شناسی بررسی شد (۱۷).

نتایج تست‌های میکروبی نشان‌دهنده سپتی‌سمی ۴۸ درصدی (۲۴ نمونه) *آئروموناس هیدروفیلیا* در ماهیان مورد مطالعه بود (شکل ۱). در نمونه‌های کالبدگشایی علاوه بر تیرگی، پتشی و ضایعات اولسراتیو پوست، اندام‌ها رنگ‌پریده بوده، کبد بزرگ شده و پتشی روی سطح کبد مشاهده گردید (شکل ۲). و در بررسی‌های میکروسکوپی آسیب‌های مشاهده شده در آبشش شامل به هم چسبیدن تیغه‌های آبششی ثانویه، تورم تیغه‌های آبششی، کوتاه شدن تیغه‌های آبششی، تخریب کامل تیغه‌های آبششی و ادم تیغه‌های آبششی ثانویه و فیلامنت‌های آبششی بود. علاوه بر این جدا شدن اپیتلیال با جدا شدن لایه خارجی اپیتلیوم لاملار مشاهده شد و احتقان در تیغه‌های آبششی اولیه و ثانویه کاملاً مشخص بود (شکل ۳. A, B). در سر کلیه، نفوذ سلول‌های التهابی (نوتروفیل) مشهود است که این سلول‌ها در عروق و پارانشیم دیده می‌شوند (شکل ۳. C). بیشترین تغییرات مشاهده شده در کبد، بی‌نظمی تارهای کبدی، پیکنوز هسته‌ای و واکوئولاسیون سیتوپلاسمی بود. علاوه

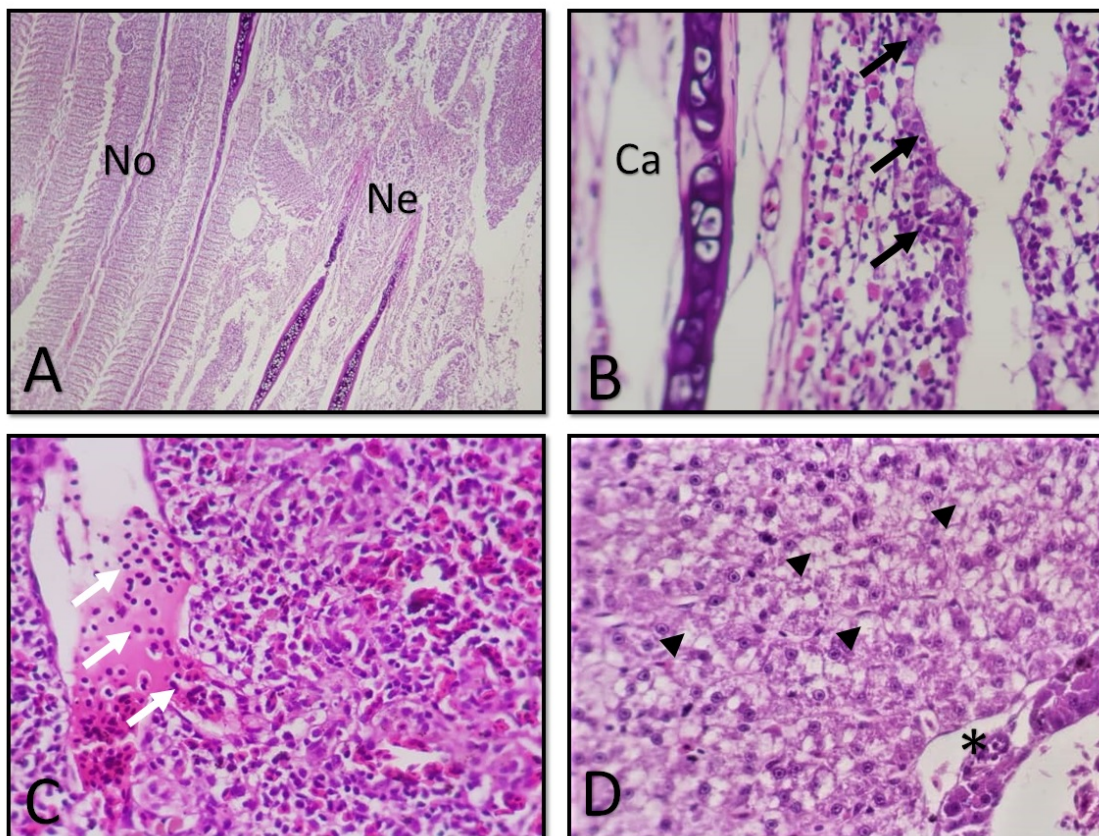
بر این، درجات مختلف دژنراسیون سلول‌های پانکراس نیز در چندین بخش مشهود بود (شکل ۳. D).



شکل ۱. شناسایی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در نمونه‌های مورد مطالعه



شکل ۲. تیره شدن سطح بدن (A)، ضایعات اولسراتیو پوست (B)، فلش سفید: پتشی روی سطح پوست (C)، بزرگ شدن کبد، رنگ پریدگی اندام‌ها، فلش سیاه: پتشی سطح کبد (D)



شکل ۳. آسیب شناسی نمونه‌های آبشش، کلیه و کبد. NO: تیغه‌های آبششی نرمال، Ne: نکرور حاد، Ca: نواحی غضروفی آبشش‌ها، پیکان سیاه: نکرور سلول‌های اپیتلیال و مخاط، پیکان سفید: نفوذ سلول‌های التهابی، نوک پیکان: نکرور هیپانوسیت‌ها، ستاره: دژنراسیون سلول‌های پانکراس. A: آبشش (40X)، B: آبشش (400X)، C: کلیه، D: کبد، رنگ‌آمیزی H&E.

بحث و نتیجه گیری

نتیجه تحقیق حاضر به شناسایی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان کوی انجامید که این باکتری به عنوان یکی از عوامل بیماری زای کشنده بسیار مهم در انواع کپور ماهیان شناخته شده است (۹). *آئروموناس* ها جزو فلور طبیعی آب ها و بدن ماهیان هستند اما در شرایط خاصی از جمله استرس های محیطی می توانند به پاتوژن های فرصت طلبی تبدیل شوند که با ایجاد اپیدمی فوق حاد (مانند پاتوتایپ *آئروموناس هیدروفیلا*) باعث ایجاد تلفات بسیاری در صنعت آبزی پروری گردند (۱۸، ۱۹) که اغلب طی چند ساعت پس از بروز بیماری منجر به مرگ و میر می شود (۲۰)، به این ترتیب در مطالعه حاضر می توان استرس حمل و نقل و کاهش عملکرد ایمنی ماهیان را از عوامل دخیل در بروز علائم این بیماری دانست، همانطور که Roberts در سال ۲۰۱۲ بیان کرده است *آئروموناس* ها به عنوان پاتوژن های فرصت طلب در نظر گرفته می شوند که تنها قادر به ایجاد بیماری در جمعیت های ضعیف شده ماهی ها هستند (۲۱). در این رابطه در ایران مطالعات متعددی به بررسی آلودگی *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان مختلفی از جمله ماهی قرمز (۲۲)، فرشته ماهی (۲۳) و کپور معمولی (۲۴) پرداخته اند.

در بررسی کالبدگشایی نمونه های اخذ شده شاهد زخم و نقاط خونریزی روی سطح بدن، بخش شکمی ماهی و اندام های داخلی بودیم که مشابه با علائم مشاهده شده در بررسی Stratev و همکاران در سال ۲۰۱۵ بوده (۱۱) و مطالعات بسیاری نشان داده اند که عفونت مزمن با *آئروموناس هیدروفیلا* منجر به ضایعات اولسراتیو پوستی همراه با خونریزی های کانونی و التهاب شده است (۱۰).

نتایج بافت شناسی این مطالعه نشان دهنده آسیب بافتی متعدد در ارگان های آبشش، کبد و کلیه بود که از آن جمله می توان به نکروز، التهاب و خونریزی در بافت آبشش، التهاب در بافت کلیه و نکروز هیپاتوسیت ها و پیکنوز هسته ای در بافت کبد اشاره نمود. این در حالی است که مطالعات متعددی به بررسی آلودگی ماهیان به *آئروموناس هیدروفیلا* پرداخته و نتایج علائم بافت شناسی مشابه با مطالعه حاضر را گزارش داده اند (۱۱، ۲۵-۲۹). در این راستا و بر اساس گزارشات تغییرات دژنراتیو بافتی ناشی از عفونت *آئروموناس هیدروفیلا* به طور شایع در ارگان هایی مانند آبشش، کلیه و کبد دیده می شوند (۱۰) و همانطور که در مطالعه حاضر شاهد آسیب های ذکر شده در بافت آبشش بودیم، AIYahya و همکاران (۲۰۱۸) (۱۰) و SamCookiyaei و همکاران (۲۰۱۲) (۳۰) نیز

نکروز تیغه های آبششی و خونریزی در بافت آبشش را در نتیجه پاتوژن *آئروموناس هیدروفیلا* در آبشش گزارش کردند. یکی از نکات قابل توجه در بحث آسیب شناسی بافت ها در آلودگی با *آئروموناس هیدروفیلا* این است که بیشترین آسیب بافتی در نتیجه آلودگی با این باکتری در کبد و کلیه گزارش شده است (۱۱). در واقع کبد را می توان به عنوان ارگان هدف برای *آئروموناس هیدروفیلا* در نظر گرفت (۱۰). در بررسی بافت کلیه نفوذ سلول های التهابی مشابه با مطالعه Sellegounder و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده شد (۳۱) و در تیلاپیای نیل، کانون های خونریزی در کلیه ها بر اثر عفونت باکتریایی مشاهده شد (۳۲). بافت کبد و پانکراس در مطالعه حاضر نشان دهنده واکوئولاسیون، پیکنوز هسته ها و نکروز سلول های کبدی و آسیب نکروتیک سلول های پانکراس بود که این علائم در مطالعات متعددی مشاهده شد (۱۰، ۳۱، ۳۳) و Afifi و همکاران (۲۰۰۰) دلیل این امر را توکسین ها و ترکیبات خارج سلولی تولید شده به وسیله *آئروموناس هیدروفیلا* (از جمله همولیزین، پروتئاز و الاستاز) در کبد بیان کردند که منجر به ایجاد آسیب و نکروز شدید در این اندام می گردد (۳۴).

نتایج این مطالعه نشان می دهد ماهیان آب شیرین همیشه در معرض ابتلا به عفونت با *آئروموناس* هستند و تغییرات آسیب شناسی مشاهده در آبشش، کبد و کلیه می توانند بیومارکرهای خوبی برای ارزیابی بیماری زایی *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کوی باشند. علاوه بر این گونه های *آئروموناس* می توانند تهدیدی برای سلامت عمومی و به ویژه افرادی که در تماس با ماهیان بیمار هستند، به حساب بیاید. فلذا مدیریت مناسب کیفیت آب، بهداشت غذا و قرنطینه ماهیان جدید می تواند نقش قابل توجهی در پیشگیری و کنترل عفونت ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهیان داشته و در نتیجه از سرایت آن به انسان جلوگیری کند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از تمامی همکاران در مرکز تحقیقاتی رازف که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می کنیم.

تعارض در منافع

هیچ گونه تعارضی در منافع از سوی نویسندگان اعلام نشده است.

منابع مالی

وجود ندارد.

Referance

- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):35-73. [DOI:10.1128/CMR.00039-09] [PMID] [PMCID]
- Trott D. *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*-By J. Glenn Songer, KW Post. Brisbane, Australia: The University of Queensland; 2006. [DOI:10.1111/j.1751-0813.2006.00082.x]
- Dias MK, Sampaio LS, Proietti-Junior AA, Yoshioka ET, Rodrigues DP, Rodriguez AF, et al. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. *Vet Microbiol*. 2016;188:12-5. [DOI:10.1016/j.vetmic.2016.04.001] [PMID]
- Sreedharan K, Philip R, Singh ISB. Virulence potential and antibiotic susceptibility pattern of motile aeromonads associated with freshwater ornamental fish culture systems: a possible threat to public health. *Brazil J Microbiol*. 2012;43(2):754-65. [DOI:10.1590/S1517-83822012000200040] [PMID] [PMCID]
- Holmes P, Niccolls LM, Sartory D. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. *The Genus Aeromonas*. 1996:127-50.
- Stratev D, Odeyemi OA. An overview of motile *Aeromonas* septicemia management. *Aquacult Int*. 2017;25(3):1095-105. [DOI:10.1007/s10499-016-0100-3]
- Saavedra MJ, Guedes-Novais S, Alves A, Rema P, Tacão M, Correia A, et al. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int Microbiol*. 2004;7(3):207-11.
- Plumb JA, Hanson LA. *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. [DOI:10.1002/9780470958353] [PMID]
- Zhang D, Moreira GS, Shoemaker C, Newton JC, Xu D-H. Detection and quantification of virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish tissues following waterborne challenge. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363(9). [DOI:10.1093/femsle/fnw080] [PMID]
- AlYahya SA, Ameen F, Al-Niaem KS, Al-Sa'adi BA, Hadi S, Mostafa AA. Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(1):182-5. [DOI:10.1016/j.sjbs.2017.10.019] [PMID] [PMCID]
- Stratev D, Stoev S, Vashin I, Daskalov H. Some varieties of pathological changes in experimental infection of carps (*Cyprinus carpio*) with *Aeromonas hydrophila*. *J Aquacult Eng and Fish Res*. 2015;1(4):191-202. [DOI:10.3153/JAEFR15019]
- Guz L, Kozinska A. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bullet Vet Ins Pulawy*. 2004;48:391-5.
- Weir M, Rajić A, Dutil L, Cernicchiaro N, Uhland F, Mercier B, et al. Zoonotic bacteria, antimicrobial use and antimicrobial resistance in ornamental fish: a systematic review of the existing research and survey of aquaculture-allied professionals. *Epidemiol Infect*. 2012;140(2):192-206. [DOI:10.1017/S0950268811001798] [PMID]
- Lin S, Mao S, Guan Y, Luo L, Luo L, Pan Y. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of Koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*. 2012;342:36-41. [DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.02.009]
- Matsui K, Honjo M, Kohmatsu Y, Uchii K, Yonekura R, Kawabata Zi. Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshwater Biol*. 2008;53(6):1262-72. [DOI:10.1111/j.1365-2427.2007.01874.x]
- Mzula A, Wambura PN, Mdegela RH, Shirima GM. Phenotypic and molecular detection of *Aeromonads* infection in farmed Nile tilapia in Southern highland and Northern Tanzania. *Heliyon*. 2019;5(8):e02220. [DOI:10.1016/j.heliyon.2019.e02220] [PMID] [PMCID]
- Pirarat N, Pinpimai K, Endo M, Katagiri T, Ponpornpisit A, Chansue N, et al. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res Vet Sci*. 2011;91(3):e92-e7. [DOI:10.1016/j.rvsc.2011.02.014] [PMID]
- Hemstreet B. An update on *Aeromonas hydrophila* from a fish health specialist for summer 2010. *Catfish Journal*. 2010;24(4).
- Nielsen ME, Høi L, Schmidt A, Qian D, Shimada T, Shen J, et al. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Dis Aquat Org*. 2001;46(1):23-9. [DOI:10.3354/dao046023] [PMID]
- Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol*. 2013;36(3):171-6. [DOI:10.1016/j.syapm.2012.12.007] [PMID]
- Roberts RJ. *Fish pathology*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2012. [DOI:10.1002/9781118222942]
- Fadaeifard F. Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* in the aquarium gold fish and cultured rainbow trout in Chaharmahal va Bakhtiari province. *Vet Clin Pathol*. 2014;8(1):401-9.
- Peyghan R, Tulaby Dezfuly Z, Moori Bakhtiari N, Ahangarzadeh M, Haghparast M. A case study of *aeromonas* septicemia coincides with infection to hexamita sp. and capillaria sp. In a stock of angle fish, *pteroptyllum scalare*. *Vet Res Biol Prod*. 2016;29(2):117-21.
- Hosseinzadeh M, Tukmechi A. Isolation and identification of enterotoxin producing *Aeromonas hydrophila* from common carp (*Cyprinus carpio*). *J Anim Environ*. 2016;7(4):173-8.

25. Abdelhamed H, Ibrahim I, Baumgartner W, Lawrence ML, Karsi A. Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Front Microbiol.* 2017;8:1519. [DOI:10.3389/fmicb.2017.01519] [PMID] [PMCID]
26. Alsaphar SA. Detection and study of the experimental infection of *Aeromonas* strain in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Iraqi J Vet Med.* 2012;36(2):222-30. [DOI:10.30539/iraqijvm.v36i2.500]
27. Khamees ES, Al-Rudainy AJ, Faleh EB. Study of Histopathological Changes in the Common Carp (*Cyprinus carpio*) Experimentally Infected by Bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Basrah J Agri Sci.* 2013;26. [DOI:10.33762/bagrs.2013.112076]
28. Kumar R, Pande V, Singh L, Sharma L, Saxena N, Thakuria D, et al. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in golden mahseer (*Tor putitora*). *Fish Aquacult J.* 2016;7(160):2.
29. Hamid NH, Hassan M, Sabri MM, Hasliza A, Hamdan RH, Afifah MN, et al., editors. Studies on Pathogenicity Effect of *Aeromonas hydrophila* Infection in Juvenile Red Hybrid Tilapia *Oreochromis* sp. Proceedings of international seminar on livestock production and veterinary technology; 2016. [DOI:10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.532-539]
30. SamCookiyaei A, Afsharnasab M, Razavilar V, Motalebi A, Kakoolaki S, Asadpor Y, et al. Experimentally pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* in freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*) in iran. *Iran J Fish Sci.* 2012;11(3):644-56.
31. Sellegounder D, Gupta YR, Muruganankumar R, Senthilkumaran B. Enterotoxic effects of *Aeromonas hydrophila* infection in the catfish, *Clarias gariepinus*: Biochemical, histological and proteome analyses. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018;204:1-10. [DOI:10.1016/j.vetimm.2018.08.008] [PMID]
32. Yardimci B, AYDIN Y. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Üni Vet Fakülte Dergisi.* 2011;58:47-54. [DOI:10.1501/Vetfak_0000002448]
33. Gupta S, Pal A, Sahu N, Dalvi R, Kumar V, Mukherjee S. Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *J Fish Dis.* 2008;31(9):649-57. [DOI:10.1111/j.1365-2761.2008.00939.x] [PMID]
34. Afifi S, Al-Thobiati S, Hazaa M. Bacteriological and histopathological studies on *Aeromonas hydrophila* infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from fish farms in Saudi Arabia. *Assiut Vet Med J.* 2000;42(84):195-205.