بررسی ضایعات آسیب‌شناسی بافتی جراحات ایجاد شده در ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalichthys molitrix*) و ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) آلوده به انگل لرنئا سیپریناسهآ در برخی از مزارع پرورشی ماهیان گرمابی شهرستان شوشتر

علیرضا گلچین‌منشادی*[1]، میلاد عامری[2]، رضا صادقی‌لیمنجوب[1]

چکیده

لرنئا سیپریناسهآ معمولاً به نام کرم قلابدار شناخته می‌شود. نکروز عضلات، خونریزی، التهاب، و چرکی شدن جراحات ایجادشده معمول آن است. جراحات حاد معمولا در صورت وجود چندین لرنئا با هم در یک ماهی بوجود می‌آید. نکروز بافتی باعث بوجود آمدن صدمات جدی شده و می‌تواند به طور ثانویه بوسیله باکتری‌ها یا قارچ‌ها مورد تهاجم قرار گیرد. التهاب و التیام بعد از آن در اطراف محل ورود انگل، بدن انگل را کپسوله می‌کند. این تحقیق به منظور بررسی جراحات آسیب‌شناسی انگل لرنئا بر روی ماهی فیتوفاگ و آمور انجام گرفت. بدین منظور ۸۰ ماهی از چهار مزرعه و به روش تصادفی خوشه‌ای (از هر مزرعه ۲۰ نمونه) که وزن ماهی های آن بالای ۱۵۰ گرم باشد با استفاده از تور دست افشان (ماشک) صید گردید. ماهی‌ها در فصل تابستان و از شهرستان شوشتر صید گردیدند. نمونه گیری از پوست و عضله در محل اتصال انگل انجام و در فرمالین ۱۰ ٪ بافر نگهداری شد. مقاطع آسیب‌شناسی به روش استاندارد تهیه و سپس مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده واکنش التهابی به صورت نفوذ سلول‌های تک هسته ای، هیپرپلازی بافت پوششی پوست، تزاید فیبروبلاست، افزایش رنگدانه ملانین، نکروز عضلانی، پرخونی، رگ زایی و خونریزی بود که نشان دهنده پاسخ دفاعی ماهی از طریق سلول های دفاعی خون و تشکیل بافت التیامی بود. بیشترین جداسازی انگل از ناحیه پوست ماهی‌ها صورت گرفت ضمن اینکه درصد کل آلودگی به انگل لرنه آ ۳۰ درصد بود.

واژگان کلیدی: *لرنئا،آسیب‌شناسی بافتی،فیتوفاگ،آمور،شوشتر*

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۱۳

مقدمه

افزایش پرورش متراکم ماهی کپور در دنیا، با افزایش انگل‌های تهدید کننده سلامت، رشد و حیات ماهی همراه بوده است.گونه‌های مختلف جنس لرنئا هم اکنون جزء خطرناک‌ترین انگل‌های ماهیان پرورشی آب شیرین ایران و جهان است و گسترش پرورش ماهی بصورت متراکم اهمیت این انگل را محسوس تر کرده است. این انگل‌ها خاص مناطق حاره و معتدله هستند و بالغ بر ٤٠ گونه از آنها شناسایی شده است(٤). در خصوص شیوع این بیماری اطلاعات زیادی در دسترس است اما سابقه چندانی در مورد اثرات آسیب‌شناسی این انگل وجود ندارد. به‌نظر می‌رسد لازم است نحوه پاسخ سلولی و کم و کیف آن و همچنین تغییرات در سطح پوست و پاسخ سلولی نسبت به این انگل مورد ارزیابی قرار گیرد. نمونه‌های زیادی از تحقیقات انجام شده در مورد این انگل موجود است. اولین بار در ایران این انگل توسط Mokhayer (۱۹۸۳) از کپور معمولی گزارش گردید(۱۱) و بعد از آن در نقاط مختلف کشور آلودگی به این انگل گزارش شده است (۵و۳، ۲). Jalali و Barzegar (۲۰۰٦) این انگل را از ماهی کپور معمولی و مارماهی جداسازی نمودند(۷). Jazebizadeh (۱۹۸۳) مهمترین گزارش در این زمینه را ارائه داد که مربوط به عفونت سنگین *L.elegans* در دریاچه زریوار کردستان است که انواع زیادی از ماهیان آلوده شده به طوری که ماهیان صید شده غیر قابل تشخیص بودند(۸). در گزارش نادری توسط علیشاهی و پیغان (۱۳۸۷) نیز تعداد ۱٤٦۲ انگل از ماهی کپور سرگنده جداسازی شده است(٤). با این وجود اطلاعات آسیب‌شناسی در مورد انگل در ایران وجود ندارد و اطلاعات اندکی توسط Woo (۱۹۹۰) به ثبت رسیده است.

*۱ـ گروه دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران. (Golchinalireza@yahoo.com)
۲ـ دانش آموخته گروه دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

اصولا پاسخ دفاعی ماهی نسبت به عوامل عفونی در مقایسه با پستانداران متفاوت است. برای مثال در پستانداران معمولا در مواجه با انگل‌ها، میزان لکوسیت‌ها خصوصاً ائوزونوفیل‌ها افزایش پیدا می‌کند، اما این رخداد معمولا در ماهی مشاهده نمی‌شود(۹). در این تحقیق با صید ماهی‌های کپور فیتوفاگ و آمور از استخرهای پرورشی حومه شوشتر، جراحات بافتی انگل بر روی پوست ماهی و پاسخ های دفاعی میزبان، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری از مزارع پرورش ماهی در شهرستان شوشتر انجام گرفت. این مزارع در جوار شاخه گرگه از روخانه‌ی کارون قرار دارند. نمونه‌گیری از چهار مزرعه، در چهار جهت جغرافیایی قرارگیری استخرها نسبت به هم یعنی از شمالی‌ترین، جنوبی‌ترین، شرقی‌ترین و غربی‌ترین و در عین حال از مزارع مهم انجام پذیرفت.

۸۰ ماهی از مزارع مذکور و به روش تصادفی خوشه‌ای صید گردید. این روش وقتی به کار می‌رود که فهرست کامل افراد جامعه در دسترس نباشد. به این منظور واحدهای جامعه را در دسته‌هایی خوشه‌بندی می‌کنند، سپس از میان خوشه‌ها نمونه‌گیری به عمل می‌آورند. بدین‌ترتیب از هر مزرعه ۲۰ نمونه که وزن ماهی‌های آن بالای ۱۵۰ گرم باشد با استفاده از تور دست افشان (ماشک) صید گردید. سعی شد تعداد پرتاب تور در هر یک از استخرهای مزرعه مورد نظر برابر باشد و همچنین از کارگر ماهیگیر خواسته شد که پرتاب تور دستی را از چهار طرف یک استخر انجام دهد تا از نقاط مختلف یک استخر نمونه‌گیری صورت گیرد. شناسایی انگل در مراحل بعدی با استفاده از کلید شناسایی انجام گرفت(۱). جهت نمونه‌گیری از ماهیان با توجه به آلودگی تمام ماهیان، از هر ماهی یک نمونه (جمعاً تعداد۸۰ نمونه بافتی) از محل زخم‌ها و آسیب‌های ایجاد شده توسط انگل لرنئا در ماهی فیتوفاگ و آمور اخذ و در فرمالین ۱۰٪ جهت تثبیت قرار داده شد. پس از آماده شدن نمونه‌ها به روش رایج قالب‌های پارافینی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین، مقاطع بافتی تهیه شده مورد مطالعه قرار گرفت(۱۰).

نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد بیشترین انگل لرنئا از قسمت پوست ماهی های مورد مطالعه جداسازی گردید ضمن اینکه درصد کل آلودگی ماهی‌ها ۳۰٪ بود (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- تعداد و درصد آلودگی انگل لرنئا جداشده از ارگان‌های مختلف ماهی‌های فیتوفاگ و آمور

نام ارگان	تعداد انگل جمع آوری شده	درصد آلودگی
چشم	۱	۰/۵
دهان	٤	۲/۲
آبشش	۱۱	۵/۸
باله	۵۲	۲۸
پوست	۱۱۵	٦۸/۱
سایر	۳	۱/۷
کل	۱۸٦	۱۰۰

جدول ۲- تعداد و درصد آلودگی ماهی های فیتوفاگ و آمور آلوده به انگل لرنئا

نام ماهی	تعداد ماهی مورد مطالعه	تعداد ماهی آلوده	درصد آلودگی
فیتوفاگ	٤۰	۱۱	۲۷/۵
آمور	٤۰	۱۳	۳۲/۵
کل	۸۰	۲٤	۳۰

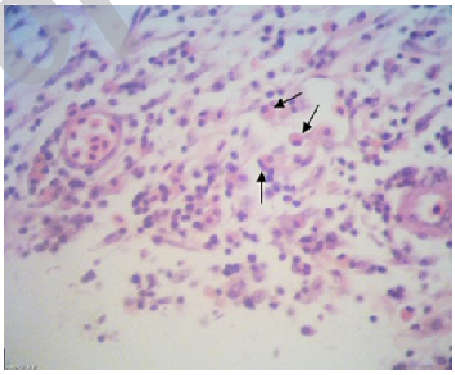
پس از تهیه مقاطع آسیب‌شناسی از محل اتصال انگل لرنئا در نمونه‌های ماهی، مقاطع مزبور مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج زیر بدست آمد:

۱ـ واکنش التهابی و ترمیمی: از اولین پاسخ‌های دفاعی میزبان در مواجه با انگل حضور سلول‌های خونی است. در مقاطع مورد بررسی نفوذ سلول‌های تک هسته‌ای در درم مشاهده

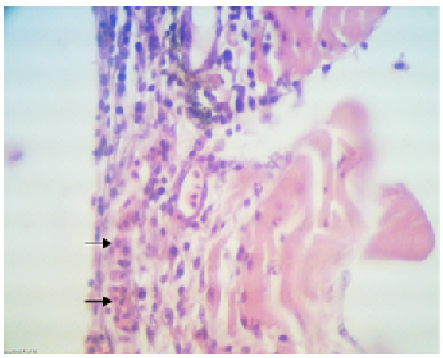
Archive of SID

www.SID.ir

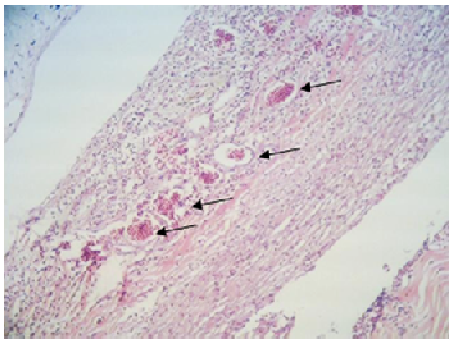
گردید(نگاره۱). پرخونی مویرگ‌ها در ناحیه درم در منطقه آسیب دیده همزمان با بهبود ضایعه از دیگر یافته‌های این مطالعه بود. این امر می‌تواند باعث مهاجرت سریع و فعال سلول‌های دفاعی به منطقه زخم شده تا از هجوم باکتری‌ها به بافت‌های زیرین اپیدرم و نیز جذب سموم جلوگیری کند (نگاره۲). بدین منظور رگ‌زایی (Vascularization) در بافت در حال التیام صورت می‌پذیرد که به نظر می‌رسد ظهور نسبتاً سریع مویرگ‌های خونی در ناحیه زخم نقش مهمی در سرعت بخشیدن به انجام مراحل بهبود زخم ایفا می‌نماید. این حالت در غالب مقاطع آسیب‌شناسی مشاهده شد(نگاره۳). در مراحل بعدی بدلیل اثر تحریکی انگل و واکنش دفاعی پوست هیپر پلازی بافت پوششی در محل نفوذ انگل مشاهده می‌گردد(نگاره٤).



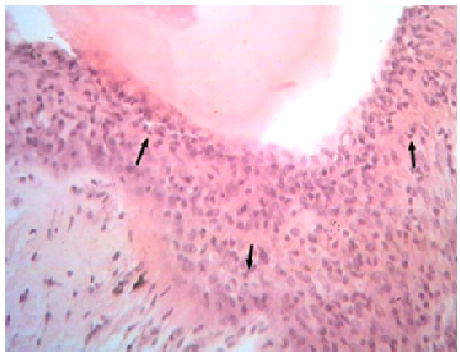
نگاره۱ - نفوذ سلول‌های آماسی تک هسته‌ای. ماکروفاژها (پیکان)را می‌توان در لابلای دیگر سلول‌های آماسی خصوصا لنفوسیت‌ها با اندازه‌های مختلف مشاهده کرد (H&E* 800)



نگاره۲ـ پرخونی در ناحیه درم (انتهای پیکان) (H&E* 800)

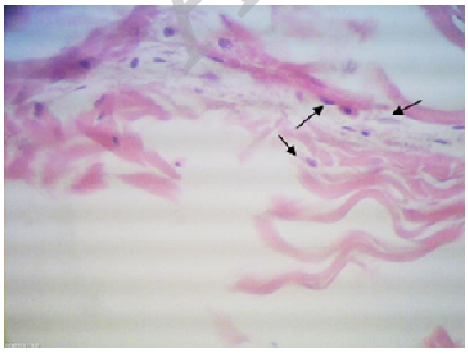


نگاره۳-رگ‌زایی یا ایجاد مویرگ‌های جدید در ناحیه آسیب دیده (محل پیکان‌ها) (H&E* 200)



نگاره ٤-تکثیر سلول‌های بافت پوششی پوست در ناحیه آسیب دیده (محل پیکان ها این محدوده را نشان می دهد) (H&E* 800)

۲- تزاید فیبروبلاست‌ها: فیبروبلاست‌های جدید به شکل سلول‌های متورم با هسته‌های کم رنگ در منطقه درم مشاهده شد که معمولا حدود چند ساعت پس از ایجاد جراحت در منطقه قابل رویت است(نگاره۵).

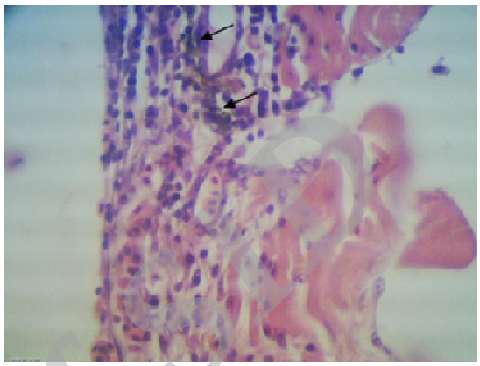


نگاره۵ - تشکیل فیبروبلاست های جدید به شکل سلول‌های متورم با هسته‌های کم رنگ در منطقه درم(پیکان) (H&E* 800)

Archive of SID

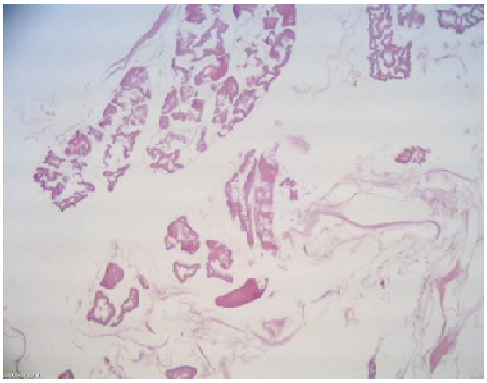
www.SID.ir

۳- افزایش رنگدانه ملانین: رنگدانه‌ها در اکثر آسیب‌های پوست نقش دارند و در مدت کوتاهی بعد از ایجاد زخم در زیر اپیدرم مشاهده می‌شوند. در مطالعه حاضر رنگ‌دانه‌های ملانین در اطراف عروق خونی یافت گردید(نگاره٦).



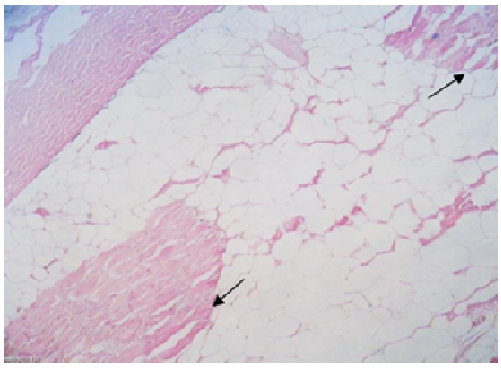
نگاره ٦ـ افزایش رنگدانه ملانین در اطراف عروق خونی(پیکان) (H&E* 800)

٤ –نکروز عضلانی: به دلیل اثرات تخریب‌کنندگی انگل لرنئا از هم پاشیدگی عضلات و آثار نکروز در سلول‌های عضلانی مشاهده گردید(نگاره ۷).



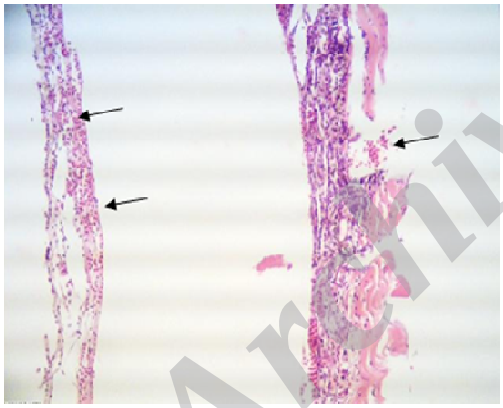
نگاره ۷- نکروز عضلات به دلیل اثرات تخریب‌کنندگی انگل لرنه آ (H&E* 200)

۵ـ نفوذ چربی و فیبروز در ناحیه درم: در اثر فعالیت تخریب‌کنندگی انگل لرنهآ در قسمت درم، نفوذ بافت چربی و تشکیل بافت فیبروزه از دیگر علائم بجا مانده از انگل لرنئا است (نگاره۸).



نگاره ۸- نفوذ چربی و فیبروز در ناحیه درم. انتهای پیکان‌ها دو طرف نفوذ چربی و تشکیل بافت فیبروز را نشان می‌دهد(H&E* 200)

٦ـ خونریزی: باتوجه به فعالیت مکانیکی و اثرات تخریبی که قلاب های انگل لرنئا بر جای می‌گذارد، خونریزی در ناحیه درمیس و زیر آن از علائم معمول می‌باشد که به خوبی در مقاطع آسیب‌شناسی قابل مشاهده بود (نگاره ۹).



نگاره ۹- خونریزی در محل نفوذ انگل لرنئا (انتهای پیکان) (H&E* 200)

بحث

بسته شدن شکاف زخم به وسیله ترمیم اپیدرم عامل مهمی در کمک به کاهش از دست دادن مایعات، پروتئین‌ها و یون‌ها از طریق زخم و همچنین محدود کردن ورود عوامل بالقوه بیماریزا می‌باشد مهاجرت سلول‌های پوششی به طرف محل شکاف زخم با استفاده از اکسودای فیبرینی موجود در

Archive of SID

www.SID.ir

محل زخم به عنوان یک بستر صورت می‌گیرد .همچنین در زمان مهاجرت سلول‌ها به طرف زخم، اپیدرمیس موجود در فاصله‌ای دورتر از محل اصلی زخم نازک شده و سلول‌های مالپیگی موجود در آن به صورت کشیده در آمده که احتمالاً در تسهیل مهاجرت آنها می‌تواند موثر باشد (۲).

اتصال لبه‌های جدا شده درم در ماهی کپور به طور خفیفی در شش روز پس از ایجاد زخم آغاز می‌شود و این اتصال پس از ۱٦ روز توسط بافت فیبروزه کامل می‌گردد (۲). Halver در سال۱۹۷۲ نشان داد که ویتامین C یک عامل تسهیل کننده لازم برای تشکیل کلاژن در ترمیم زخم‌هاست(٦).همچنین Alexis و همکاران(۱۹۹۷) نشان دادند که پاسخ بهبود زخم ارتباط مستقیمی با سطح آسکوربیت در جیره غذایی ماهی دارد(۵) اگرچه در تحقیق انجام شده توسط شریف پور (۱۳۸۳) چنین فرضه ای ثابت نشد(۲). در این تحقیق نیز مراحلی از آسیب بافتی و ترمیم آن ها توسط بافت فیبروزه در برخی مقاطع آسیب‌شناسی ملاحظه گردید.

در مطالعه دیگری بر روی روند بهبود زخم در ماهی کپور معمولی، نفوذ سلولهای آماسی و حضور اولین ماکروفاژها دو ساعت پس از ایجاد زخم به ثبت رسید(۲). در مطالعه انجام شده بوسیله Turnbull بول و همکاران (۱۹۹٦) نیز رد پای پاسخ التهابی در بسیاری از مقاطع آسیب‌شناسی پوسیدگی باله پشتی مرحله پار ماهی آزاد اقیانوس اطلس مشاهده شده است. در مراحل اولیه، پاسخ سلولی بطور متناوب مربوط به حضور بافت نکروتیک گزارش شده است (۱٤). وجود پاسخ آماسی در منطقه درم در این مطالعه حاکی از انطباق آن با سایر مطالعات انجام شده می باشد گرچه میزان این پاسخ متفاوت است.

افزایش مویرگ‌ها و پرخونی آن‌ها در ناحیه درم و نیز افزایش رنگدانه‌های ملانین در منطقه آسیب دیده همزمان با بهبود ضایعه از دیگر یافته‌های این مطالعه بود که بوسیله سایر مطالعات حمایت می‌شد. بنظر می‌رسد ظهور نسبتاً سریع مویرگهای خونی در ناحیه زخم نقش مهمی در سرعت بخشیدن به انجام مراحل بهبود زخم دارد. این امر می‌تواند باعث مهاجرت سریع و فعال سلول های دفاعی به منطقه زخم شده تا از هجوم باکتری‌ها به بافت‌های زیرین اپیدرم و نیز جذب سموم جلوگیری کند ضمن اینکه موجب تغذیه سلول‌های ترمیمی فعال در منطقه زخم نیز می‌شوند(۲).

وجود رنگدانه ملانین بعنوان سد دفاعی مهمی در ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر نقش ملانین در اختفاء ماهی، ملانین و رنگدانه‌های مربوطه به دلیل استعداد تولید آب اکسیژنه (H_2O_2) نقش دفاعی در برابر بیشتر ارگانیسم‌ها بازی می‌کنند. علاوه بر این ملانین‌ها در مکانیسم کشتن باکتریها و جلوگیری از نفوذ اشعه ماوراء بنفش (UV) از اپیدرم تازه ترمیم یافته به داخل منطقه تازه بهبود یافته درم نقش مهمی دارند(۱۲). حضور رنگدانه‌های ملانین در منطقه صدمه دیده هشت ساعت و توسعه ملانین در زیر لایه پایه اپیدرم جدید و بافت فیبروزه ظرف هشت روز بعد از ایجاد زخم مشاهده شده است. پس از آن با پیشرفت روند بهبود زخم، رنگدانه‌های ملانین در منطقه بهبود زخم گسترش و افزایش می یابند (۲). این مهم با یافته‌های آسیب‌شناسی حاصل از این بررسی مطابقت دارد که افزایش رنگدانه‌های ملانین در برخی موارد خصوصاً در اطراف مویرگ‌های خونی مشاهده شد.

همانطور که Woo و همکاران (۱۹۹۰)، Kularatne و همکاران (۲۰۰۲) و Silva و همکاران (۲۰۰۰) نیز تاکید نموده‌اند سیستم ایمنی ماهی نقش مهمی در مقابله با این عفونت انگلی داشته بطوریکه علاوه بر ایجاد واکنش التهابی در محل چسبیدن انگل و تغییراتی در تابلوی خونی (افزایش لکوسیتوز، افزایش لنفوسیت‌ها، و ائوزینوفیل‌ها و افزایش سلول‌های قرمز خون)، باعث کاهش احتمال ماهی در مواجه‌های بعدی می‌گردد(۱۵و۹،۱۳) که در اسلایدهای تهیه شده در این تحقیق هم به وضوح واکنش التهابی و پرخونی دیده شد. در یک تحقیق که با عنوان گزارش آلودگی شدید و نادر به انگل لرنئا

Archive of SID

www.SID.ir

سپیریناسهآ در یک ماهی کپور سر گنده توسط علیشاهی و پیغان در خوزستان انجام گرفت(۵) با توجه به فقدان واکنش های التهابی معمول اطراف محل اتصال انگل به پوست ماهی (که خونریزی و زخم‌های میکروسکوپی در محل اتصال ایجاد می‌کند) و نیز عادی بودن وضعیت ماهی و رشد مناسب (عدم تفاوت معنی‌دار وزن و طول ماهی کپور سرگنده در استخر) می‌توان این فرضیه را که می‌تواند نوعی تحمل ایمنی در ماهی نسبت به انگل ایجاد شده است مد نظر قرار داد. در صورت پذیرش چنین فرضیه ای در واقع سیستم ایمنی ماهی انگل را خودی قلمداد کرده و در برابر آن واکنشی نشان نداده است. این موضوع در برخی انگل‌ها مشاهده شده است. مطالعات نشان می‌دهد گاهی ماهیان آلوده شده به انگل تریپانوزوما واجد آنتی‌بادی تا ۳۵۰ روز هستند اما ایمنی حاصله تا حدی کند است و نمی‌تواند همه انگل‌ها را از سیستم گردش خون پاک نماید همچنین دیگر مطالعات نشان می‌دهد موکوس ماهیان آلوده به انگل ایک(Ich) اجازه ورود شکل مهاجم انگل به پوست ماهی را نمی‌دهد که بدلیل وجود نوعی آنتی بادی در موکوس می‌باشد. این آنتی‌بادی حداقل هفت ماه در موکوس باقی می‌ماند(۱).

تشکر و سپاسگزاری

با تشکر و سپاس فراوان از استاد فرزانه جنای آقای دکتر شریف‌پور عضو محترم هیأت علمی مرکز تحقیقات شیلات ایران که در تفسیر ضایعات آسیب‌شناسی این تحقیق را همراهی نمودند.

فهرست منابع

۱. جلالی‌جعفری، ب. (۱۳۷۷): انگل‌ها و بیماری‌های انگلی ماهیان آب شیرین ایران، چاپ اول، انتشارات معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، شرکت سهامی شیلات ایران، تهران، ایران، ۱۴۳-۱۱۲.

۲ . شریف‌پور، ع. (۱۳۸۳): مطالعه تجربی بافت‌شناسی کیفیت روند بهبود زخم در ماهی کپور معمولی، مجله علمی شیلات ایران، ۱۳ (۲): ۱۱۶-۹۱.

۳. عسگری ر. (۱۳۸٤): مروری بر ماهی‌شناسی سیستماتیک، انتشارات نقش مهر، چاپ دوم، ۹۷-٦۷

٤. علیشاهی،م. و پیغان ر. (۱۳۷۸):گزارش آلودگی شدید و نادر به انگل لرنه آ سیپریناسه آ در یک ماهی کپور سرگنده، مجله دامپزشکی ایران. ٤ (۲): ۱۲۸-۱۲۲.

5. Alexis, M.N., Karanikolas, K.K., Richards, R.H. (1997): Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (*Sparus aurata*). Acuacul. 151(4): 209-218.

6. Halver, J.E. (1972): The role of the acid ascorbic in fish disease and tissue repair. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38(1):79-92.

7. Jalali, B., Barzegar, M. (2006): Fish Parasites in Zarivar Lake. J. Agric. Sci. & Tech. (19) 8: 47-58.

8. Jazebizadeh, K. (1983): Study on Parasitic Diseases of Fishes of Zarivar Lake, Environmental Protection Organization of Iran Publication.P:19-43.

9. Kularatne M.R., Subasinghe P.,Shariff, M. (1994): Investigations on the lack of acquired immunity by the Javanese carp, *Puntius gonionotus* (Bleeker), against the crustacean parasite, *Lernaea minuta* (Kuang). Fish & Shellf. Immunol. 4(2):107-114

10. Luna, L.G. (1968): Manual of Histology Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition, McGraw Hill Book Co., New York.P:23-68

11. Mokhayer, B. (1983): Parasites and parasitic diseases of fish. The first international symposium of Ichthyoparasitology of the Ceske Budejovice. 99: 16-22.

12. Roberts, R.J.(2012): Fish pathology, 4th edition.Wiley - Blackwell: Chichester. P:145-187.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Silva S.A.T., Almeida S.C., Machado P.M. (2000): Effect of the Rate of infestation by Lernea on the leucocytes of *Schizodon intermedius*. Rev. Brasil. Biol. 60(2): 217-220.
14. Turnbull, J.F., Richards, R.H., Robertson, D.A. (1996): Gross, histological and scanning electron microscopic appearance of dorsal fin rot in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L.Parr. J. Fish Dis.19(7): 415-427.
15. Woo, P. Shariff, M. (1990): *Lernea cyprinacea* (Copepoda, Caligidea) in *Helostoma temmincki* cuvier and Valenciennes: The Dynamics of resistance in erecivered and naïve. J. Fish Dis. 13 (6):485-493.

Archive of SID

www.SID.ir