

مطالعه آسیب‌شناسی پوسیدگی باله دمی مولدین ماهی آزاد دریای خزر در

مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت

دکتر علیرضا گلچین منشادی^{۱*}، دکتر عیسی شریف‌پور^۲، دکتر مهدی سلطانی^۳، مهندس محمد عابدی^۴

Pathological Study of caudal fin rot in brood stocks of *Salmo trutta caspius* from the salmonids propagation and breeding center of Shahid Bahonar, Kelardasht Iran

Golchin Manshadi, A.R.^{1*}, Sharifpour, I.², Soltani, M.³, Abedi, M.⁴

1-Graduated of Aquatic Animal health, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran.

2-Iranian fisheries Research Organization, Tehran, Iran.

3-Department of Aquatic Animal health, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

4-Veterinary laboratory expert, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran .

Thirty samples from caudal fin of damaged brood stocks were fixed in 10% formalin and 5µm microscopic sections were prepared using standard histological methods and then stained by H & E method to observe the pathological changes and by Maccallum-Goodpasture method to observe the bacterial colonies.

The results of light microscope study showed hyperplasia and spongiosis of the malpighian cells of epidermis, increasing of melanin pigments underlying epidermis, severe necrosis in both epidermis and dermis and also sloughing the epidermis in some cases, occurrence of clefts through the epithelium, neovascularization, hyperemia and mild inflammatory response in dermis along with separation of fin rays. No gram negative bacterial colonies were found in the sections.

Key words: *Salmo trutta caspius*, Pathology, Fin rot, Iran.

چکیده

تعداد ۳۰ نمونه باله دمی از مولدین آسیب دیده در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید و مطابق روشهای استاندارد بافت‌شناسی، مقاطع میکروسکوپی ۵ میکرونی از بافتها تهیه و به وسیله روش‌های هماتوکسیلین و اتوزین برای بررسی ضایعات آسیب‌شناسی و مکالوم - گود پاسچر برای جستجوی کلتی‌های باکتریایی رنگ‌آمیزی شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری هیپرپلازی و اسفنجی شدن سلولهای مالپیگی اپیدرم، افزایش رنگدانه ملانین زیر اپیدرم، نکروز شدید و وسیع اپیدرم و درم، جدا شدن و افتادن اپیدرم در برخی موارد و وجود شکافهایی در اپیتلیوم، افزایش مویرگها و پرخونی آنها در ناحیه درم، پاسخ آماسی خفیف در منطقه درم، پارگی و جدا شدن شعاعهای باله مشاهده شد. در مقاطع رنگ‌آمیزی شده بوسیله رنگ‌آمیزی اختصاصی باکتری، کلتی باکتری گرم منفی دیده نشد.

واژگان کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، آسیب‌شناسی، پوسیدگی باله، ایران.

مقدمه

پوسیدگی باله در ماهیان پرورشی از جمله معضلاتی است که صنعت آبی‌پروری با آن درگیر است. این مهم خصوصاً در بین مولدین آزاد ماهیان بخوبی مشهود است. از آنجائیکه عوامل مدیریتی و بهداشتی نقش مهم و موثری در بروز یا جلوگیری از وقوع آن دارند، لذا از پوسیدگی باله بعنوان یک عامل تعیین کننده در ارزیابی سطح بهداشتی مزارع پرورش ماهی یاد می‌شود. در آزاد ماهیان پرورشی نیز پوسیدگی باله به شکل وسیعی وجود دارد و این مسئله شاخص مناسبی برای تفکیک ماهیان وحشی و پرورشی از یکدیگر محسوب می‌شود (۱۲). عوامل مختلفی در بروز پوسیدگی باله ماهیان نقش دارند بطوریکه از آن بعنوان

یک سندرم نام می‌برند چرا که عمدتاً بعلاوه شرایط خاص پرورش، بیش از یک عامل در بروز آن نقش دارد. در بین عوامل متعدد عفونی و غیر عفونی در بروز پوسیدگی باله،

۱- دانش‌آموخته دکتری تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران

۳- گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- کارشناس دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

در هر نمونه وجود داشت. نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و تا زمان عمل‌آوری بافتها نگهداری شدند. فرمالین نمونه‌ها حداقل یکبار تعویض گردید. بافتهای تثبیت شده مطابق روش‌های استاندارد بافت‌شناسی و با استفاده از دستگاه عمل‌آوری اتوماتیک آماده شدند. قبل از مقطع‌گیری، نمونه‌ها به دلیل ساختار غضروفی شعاع‌های باله کلسیم زدایی شدند. سپس مقاطع ۵ میکرونی بصورت طولی از نمونه‌ها با استفاده از میکروتوم دوار تهیه گردید. مقاطع میکروسکوپی تهیه شده به دو روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) جهت بررسی‌های آسیب‌شناسی ضایعات موجود و مکالوم و گودپاسچر (M&G) برای بررسی وجود باکتری رنگ‌آمیزی شدند (۷).

نتایج

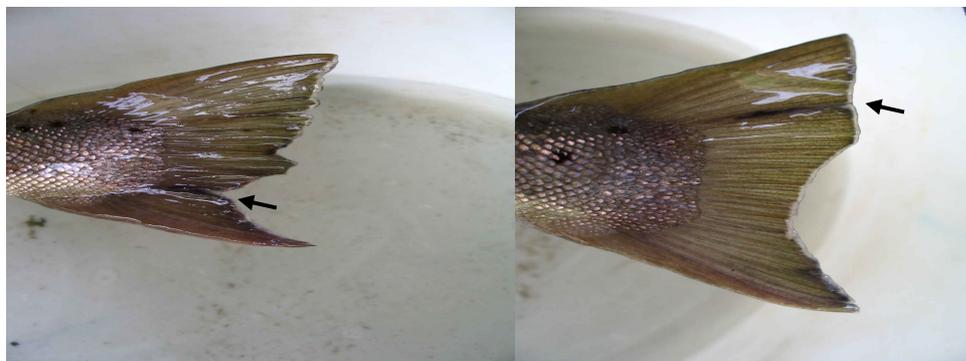
۱) ضایعات ماکروسکوپی

از دست رفتن بافت و حالت خوردگی و نیز ایجاد شکاف و پرخونی در باله از علائم ماکروسکوپی مشاهده شده در ماهی آزاد دریای خزر بود. این حالت در اکثر باله‌ها وجود داشت اما بطور مشخصی در باله دم دیده شد که قسمتهای مختلف پشتی، شکمی و خلفی را دربرمی‌گرفت. در برخی موارد بدلیل طولانی شدن عارضه ضخیم شدن باله نیز بخوبی مشهود بود (نگاره ۱).

عوامل باکتریایی به لحاظ فراگیر بودن در محیطهای آبی و حضور آنها بعنوان بخشی از فلور میکروبی سطوح خارجی ماهیان نقش مهمی دارند، بویژه زمانیکه شرایط محیطی برای رشد و تکثیر این نوع باکتریها فراهم باشد (۸). در برخی ماهیان صدمه به باله‌ها منجر به اختلال در شنای آنها و یا دستیابی به شکار می‌گردد با این حال این مسئله را هم باید در نظر داشت که پوسیدگی باله ممکن است امکان ابتلا به عفونت‌های سیستمیک مانند فورونکلوزیس (Furunculosis) را افزایش دهد (۱۲). گزارش‌های زیادی در ارتباط با ساختار باله طبیعی وجود دارد (۱۲)، لیکن مطالعه زیادی روی پوسیدگی باله‌های ماهی آزاد دریای خزر انجام نشده است. بدین منظور این مطالعه اثرات و ضایعات موجود در باله دم را در ماهی آزاد پرورشی دریای خزر مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش کار

به منظور انجام این مطالعه تعداد ۳۰ ماهی مولد قزل‌آلای قهوه‌ای که دارای تظاهرات بالینی پوسیدگی و خوردگی باله دم بودند انتخاب و پس از صید به آزمایشگاه منتقل شدند. مولدین با استفاده از داروی بیهوش کننده MS₂₂₂ به میزان ۱ ppm آرام شدند و با استفاده از پنس، قیچی و تیغ جراحی قطعاتی از باله دم پوسیده به ابعاد ۱-۰/۵ سانتیمتر نمونه‌برداری گردید بطوریکه از بافتهای پوسیده و سالم باله

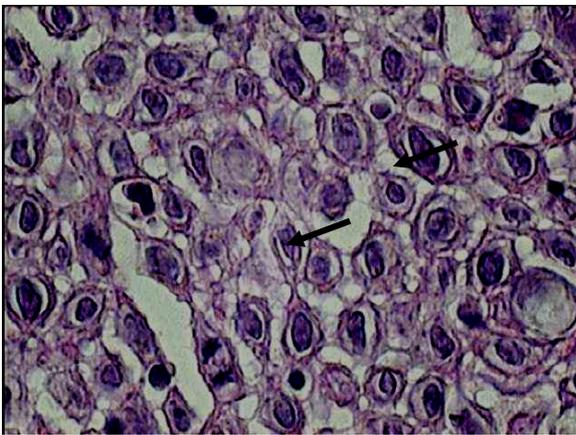


نگاره ۱: پوسیدگی دم به صورت یک خط سفید رنگ در باله دم (سمت راست)، پوسیدگی و شکاف همراه با پرخونی در باله دم (سمت چپ)

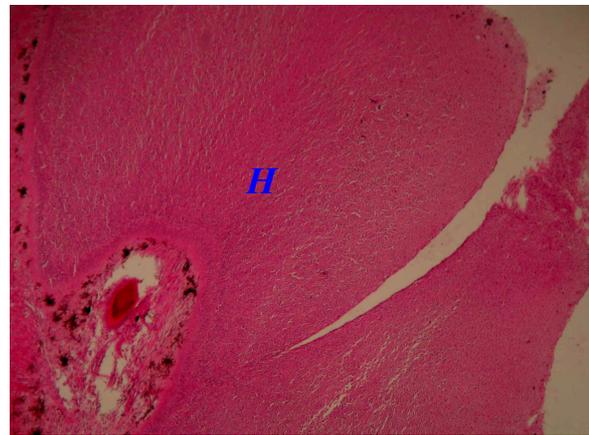
۲) ضایعات میکروسکوپی

پاسخ سلولی را می‌توان از اولین علائم عکس‌العمل نسبت به محرک‌های مختلف دانست. بررسی مقاطع آسیب‌شناسی حاکی از پاسخ آماسی خفیفی در منطقه درم بود. تغییرات در اپیتلیوم در تمامی مقاطع مشاهده گردید. هیپرپلازی اپیدرم در نتیجه پاسخ هیپرپلاستیک در اپیتلیوم وجود داشت که منجر به ضخیم شدن باله شده بود (نگاره ۲). اسفنجی شدن خفیف اپیدرم در برخی مناطق شامل ادم سلولی و آسیب سلولی بود (نگاره ۴). اپیدرم و درم دچار نکروز شدید و

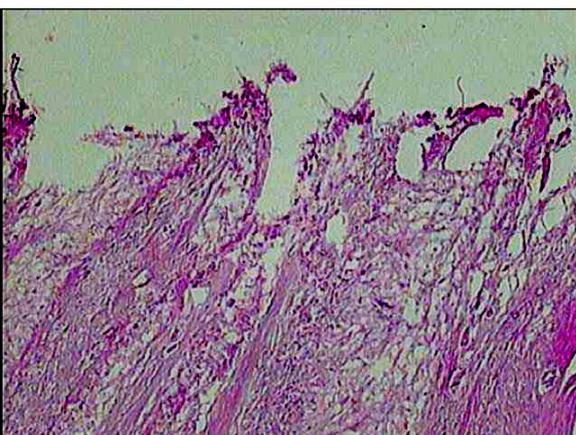
وسیع بودند. نکروز سلول‌های مالپیگی اپیدرم که معمولاً دستخوش تغییرات کاربولیتیک بودند. (نگاره های ۳ و ۵). درم نیز با نکروز شدید مشاهده گردید (نگاره ۶). از دیگر تغییرات مشاهده شده در مقاطع آسیب‌شناسی می‌توان به افزایش رنگدانه‌های ملانین (نگاره ۸)، افزایش مویرگ‌ها و پرخونی آنها (نگاره ۷) اشاره کرد که بوضوح در غالب مقاطع مورد بررسی جلب توجه می‌کرد. ایجاد شکاف و پارگی در شعاع‌های نرم باله نیز در مقاطع قابل مشاهده بود (نگاره ۹).



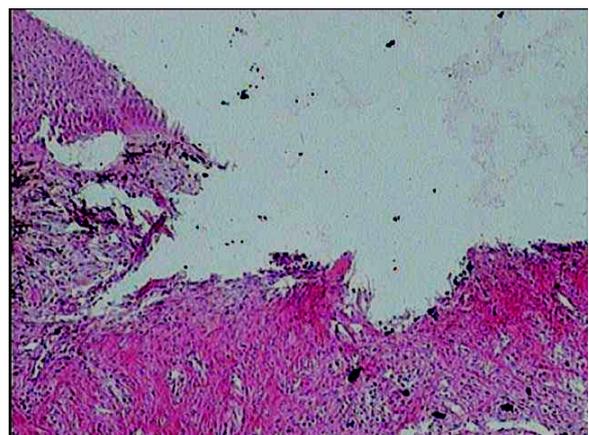
نگاره ۴: اسپونجیوزیس اپیدرمال در فضای خالی اطراف سلولی (H&E, X200)



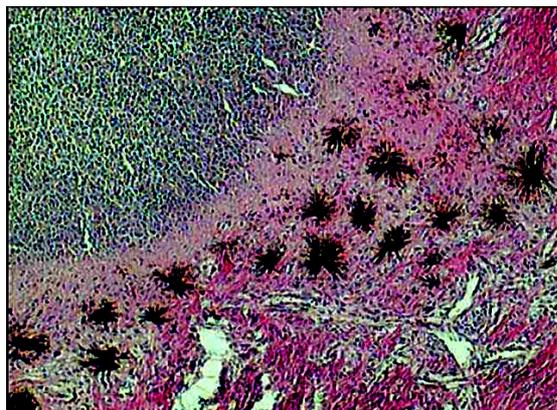
نگاره ۲: هیپرپلازی اپیدرم در باله دمی (H) (H&E, X 16)



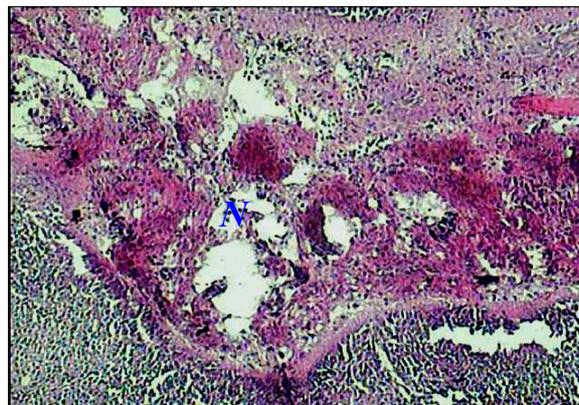
نگاره ۵: لجنی شدن اپیدرم و همچنین بقایای درم که متحمل دژنراسن شده است (H&E, X200)



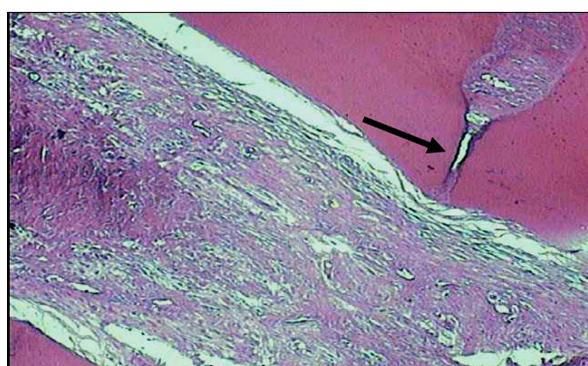
نگاره ۳: نکروز شدید در اپیدرم و درم (H&E, X200)



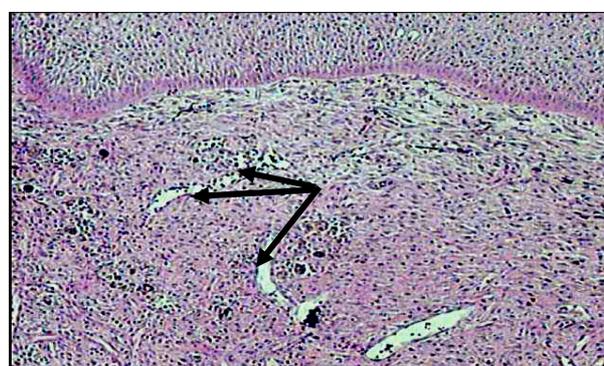
نگاره ۸: افزایش رنگدانه ملانین در زیر اپیدرم (H&E, X200)



نگاره ۶: نکروز شدید در درم (H&E, X200)



نگاره ۹: جداسدگی قسمت نرم باله دم (H&E, X 200)



نگاره ۷: بافت همبند جوانه ای در درمیس (H&E, X 200)

اینکه ماهی آزاد دریای خزر در دمای پایین زیست می کند. Pickerring (1977) در یک بررسی ضخیم شدن اپیدرم در قزل آلابی قهوه ای را که خصوصاً در جنس نر بطور معنی داری بیشتر است را نتیجه نوسانات موزون در طی سیکل های سالانه اعلام کرد که آنرا باید بعنوان یک تغییر فیزیولوژیک از حالت بیماری تفکیک نمود (۸). هیپرپلازی اغلب با اسفنجی شدن همراه است. سریعترین علامت ضایعات در اپیدرم، ادم بین سلولی یا اسفنجی شدن همراه با جدا شدن سلول های مالپیگی از یکدیگر بوسیله مایعی از درم است. در مقاطع میکروسکوپی، این سلولها سیاه و چروکیده همراه با فضاهای مشخص وسیعی که آنها را از هم جدا می کند دیده می شود. اسفنجی شدن بیشتر در اپیدرم ماهی دیده می شود. یعنی جائیکه اتصالات دسموزومی تا

بحث

صدمه متناوب به اپیتلیوم پوست منجر به پاسخ هیپرپلاستیک خصوصاً در دمای پائین می گردد (۱۰). محرک های ایجاد هیپرپلازی در اپیدرم عبارتند از محرک های شیمیایی، هورمونها، عوامل ویروسی (۹). همچنین تولیدات خارج سلولی باکتریایی می توانند هیپرپلازی اپیتلیوم را القاء کنند (Kudo & Kimura 1983) (۶)، خصوصاً در دماهای پائین، ندول های کوچک هیپرپلازی بعنوان پدیده ای که در دماهای پایین بسیار بیشتر رخ می دهد در همه گونه ها مطالعه شده است (۱۰). در این مطالعه به نظر می رسد با توجه به جداسازی قبلی باکتری های موثر در پوسیدگی باله از باله های آسیب دیده، القاء هیپرپلازی اپیدرم بوسیله تولیدات و سموم خارج سلولی باکتریایی بسیار محتمل بنظر می رسد، ضمن

اپیدرم و نیز جذب سموم جلوگیری کند ضمن اینکه موجب تغذیه سلولهای ترمیمی فعال در منطقه زخم نیز می‌شوند (۱). وجود رنگدانه ملانین بعنوان سد دفاعی مهمی در ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر نقش ملانین در اختفاء ماهی، (Edelstein 1971) گزارش کرده است که ملانین و رنگدانه‌های مربوطه به دلیل استعداد تولید آب اکسیژنه (H_2O_2) نقش دفاعی در برابر بیشتر ارگانیسم‌ها بازی می‌کنند (۳). علاوه بر این ملانین‌ها در مکانیسم کشتن باکتریها (Ellis 1981) و جلوگیری از نفوذ اشعه ماوراء بنفش (uv) از اپیدرم تازه ترمیم یافته به داخل منطقه تازه بهبود یافته درم نقش مهمی دارند (۴). ظاهر شدن رنگدانه‌های ملانین در محل ضایعه بعد از ۸ ساعت و گسترش ملانین در زیر لایه پایه اپیدرم جدید و بافت فیروزه ظرف هشت روز بعد از ایجاد زخم مشاهده می‌شود و پس از آن با پیشرفت روند بهبود زخم، رنگدانه‌های ملانین در منطقه بهبود زخم گسترش و افزایش می‌یابند (۱). این مشاهدات با یافته‌های آسیب‌شناسی حاصل از این بررسی یعنی افزایش رنگدانه‌های ملانین در تمام مقاطع مورد مطالعه مطابقت دارد. تکه شدن، جدا شدن و پارگی شعاع‌های نرم باله دم‌ی نیز در مقاطع آسیب‌شناسی در این مطالعه مشاهده شد. گزارش‌ها حاکی از آن است که پوسیدگی باله یک ضایعه نکروتیک اولسراتیو است که ممکن است در نتیجه از دست رفتن بخش قابل توجهی از بافت، منجر به در معرض قرار گرفتن یا از دست رفتن شعاع‌های باله گردد. این وضعیت ممکن است بصورت نکروتیک باقیمانده یا بصورت هیپرپلازی اپیدرم ادامه یابد. Khan و همکاران (۱۹۸۱) و Turnbull و همکاران (۱۹۶۶) نیز در برخی مناطق وجود قسمتهایی از شعاع باله را نشان دادند که از ایتیلیوم بیرون زده بودند (۵ و ۱۲). تظاهرات بالینی پوسیدگی باله نشان از خوردگی و از دست رفتن قسمتهایی از باله دم‌ی، ایجاد شکاف و پرخونی در منطقه داشت بطوریکه لبه آسیب دیده باله به صورت خط

سطح ادامه یافته است (۱۰). تصاویر آسیب‌شناسی صدمه دیده باله‌های آفتاب سوختگی که بوسیله Bullock & Roberts (1981) مورد مطالعه قرار گرفته است، نشان از ضایعه وسیع در لایه اپیدرم داشت و هسته سلولهای مالپیگی باقیمانده حالت کشیده و رنگ‌پریده بخود گرفته بود. گاهی پرخونی عروق دم‌ی و ادم و نکروز بافت همبند درم نیز وجود داشت (۲). هیپرپلازی، اسفنجی شدن اپیدرم و نکروز در اپیدرم و درم در بسیاری از نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه نیز مشاهده شد. در یک بررسی پس از تزریق باکتری زنده آئروموناس هایدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) نفوذ و ارتشاح سلولهای التهابی در درم هشت ساعت پس از تزریق وجود داشته که بتدریج افزایش یافته است و ۲۴ ساعت پس از تزریق باکتری در سیتوپلاسم ماکروفاژ مشاهده شده است (۱۱). همچنین 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 (۱). در مطالعه انجام شده بوسیله Turn bull و همکاران رد پای پاسخ التهابی در بسیاری از مقاطع آسیب‌شناسی پوسیدگی باله پستی مرحله پار ماهی آزاد اقیانوس اطلس مشاهده شده است. در مراحل اولیه، پاسخ سلولی بطور متناوب مربوط به حضور بافت نکروتیک گزارش شده است (۱۲). وجود مختصر پاسخ آماسی در منطقه درم در این مطالعه با سایر مطالعات انجام شده انطباق دارد 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 سلولهای دفاعی به منطقه زخم شده تا از هجوم باکتریها به بافتهای زیرین

فهرست منابع

- ۱) شریف‌پور، ع. (۱۳۸۳) مطالعه تجربی بافت‌شناسی کیفیت روند بهبود زخم در ماهی کپور (cyprinus carpio)، مجله علمی شیلات ایران، سال سیزدهم، شماره ۲، صفحات ۹۱-۱۱۶.
- 2) Bullock, A.M. & Roberts, R.J. (1981): Sunburn lesion in salmonid fry, a clinical and histological report, *Journal of Fish Disease* (4): 271-275.
- 3) Edelstein, L.M. (1971): Melanin: a unique biopolymer. In: *Pathobiology Annual*, (ed.) H.L. Ioachim, New York: Appleton-Century-Crofts. Pp: 309-324.
- 4) Ellis, A.E. (1981): Non-specific defence mechanism in fish and their role in disease process. In: *developments in Biological Standardization, International Symposium on Fish Biology*. (ed.) D.P. Anderson and Hennssen. Basel, Switzerland. 49, Pp: 337-352.
- 5) Khan R.A., Campbell J. & Lear H. (1981): Mortality in captive Atlantic cod, *Gadus morhua* associated with fin rot disease. *Journal of Wild life Diseases* 17, Pp: 521-528.
- 6) Kudo S. & Kimura N. (1983): Transmission electron microscopic studies on bacterial gill disease in rainbow trout fingerlings. *Japanes Journal of Ichthyology* 30, Pp: 247-260
- 7) Luna, L.G. (1968): *Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, McGraw-Hill, Pp: 38-39, 225, 226.
- 8) Pickerring. A.D. (1977): Seasonal changes in the epidermis of the brown trout *salmo trutta* (L.) *J. Fish Biol.* 10, Pp: 561-566.
- 9) Roberts, R.J. (2001): *Fish pathology*, third edition, Harcourt Publisher Limited, London.
- 10) Roberts, R.J. & Bullock, A.M. (1976): *The dermatology of marine teleost fish. II. Dermat pathology of the Integument.* *Oceanogr. Mar. Biol.* 14, Pp: 227-246.
- 11) sharifpour, I. (1997): *Histology of the inflammatory response of carp (cyprinus carpio) to Various stimuli*, Ph.D. thesis University of Stirling, Stirling, Scotland, U.K. Pp: 214-234.

سفید رنگی نمایان بود.

Turnbull و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعه‌ای بر روی پوسیدگی باله پشتی مرحله پار ماهی آزاد اقیانوس اطلس ضایعات در این محل را که به صورت یک خط سفید یا خاکستری در زمان بازرسی مشخص بود، گزارش کردند. آنها همچنین وجود شکاف‌هایی را در سرتاسر اپیتلیوم در مقاطع آسیب‌شناسی مشاهده کردند. مطالعه میکروسکوپ الکترونی (SEM) بشدت از این فرضیه که ایجاد پوسیدگی در باله پشت مربوط به زخم ناشی از گازگرفتگی است، حمایت می‌کند چرا که ضایعات روی باله با صدمه ناشی از دندان ماهیهای مرحله پار مطابقت می‌کرد (۱۲). این در حالیست که این مطالعه نشان داد که عواملی از جمله عدم رعایت تراکم مناسب، شرایط نامناسب فیزیوشیمیایی آب خصوصاً گل آلودگی شدید آب در فصل بهار زمینه‌ساز تکثیر باکتریهای فرصت طلب می‌باشد. با توجه به جداسازی قبلی گونه‌های جنس آئروموناس و سودوموناس که در پوسیدگی باله دخیلند، فرضیه باکتریایی بودن عامل پوسیدگی باله تقویت می‌گردد، اگرچه این مطالعه از نظریه مبنی بر اولیه بودن عامل باکتریایی حمایت نمی‌کند. عدم حضور باکتری‌های مولد بیماری در مقاطع هیستوپاتولوژی احتمالاً دلیل موضعی بودن عفونت و از دست رفتن آنها در هنگام نمونه‌برداری و روند تهیه بافتها می‌باشد. در مقایسه، Turnbull و همکاران (۱۹۹۶) کلنی‌های باکتری آئروموناس سالمونیسیدا (*Aeromonas salmonicida*) را در اطراف پایه برخی باله‌های ماهیان مبتلا به فورونکلوزیس (*furunculosis*) که یک بیماری سپتی سمیک است مشاهده کردند درحالیکه در ماهیانی که ضایعات باله پشتی ناشی از گازگرفتگی را داشتند، باکتریها به تعداد قابل توجه در هیچ منطقه‌ای از باله بجز شعاعهای باله که در معرض قرار گرفته بودند مشاهده نگردید (۱۲).

12) 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. *Journal of Fish Diseases* 19, Pp: 415-427.