دانشگاه گیلان
۱۳۵۳_1974

چاپ اول

فنون کاربردی در آزمایشگاه آبزیان

تصنیف:
مسعود ستاری
استاد دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

اداره چاپ و انتشارات دانشگاه گیلان

فنون کاربردی در آزمایشگاه آبزیان

مسعود ستاری

Practical techniques in aquatics laboratory

By:
Masoud Sattari, Ph. D

University of Guilan Press

ISBN: 978-600-153-216-0

بسم الله الرحمن الرحیم

فنون کاربردی
در
آزمایشگاه آبزیان

تصنیف:
دکتر مسعود ستاری
استاد دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

انتشارات دانشگاه گیلان
۱۳۹۹

دانشگاه گیلان
۱۳۵۳-1974

شابک: ۰ ـ ۲۱۶ ـ ۱۵۳ ـ ۶۰۰ ـ ۹۷۸

سرشناسه	: ستاری، مسعود، ۱۳۴۵ -
عنوان و نام پدیدآور	: فنون کاربردی در آزمایشگاه آبزیان/ تصنیف مسعود ستاری؛ ویراستار علمی جاوید ایمانپورنمین.
مشخصات نشر	: رشت: دانشگاه گیلان، انتشارات، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری	: ۵۱۷ ص.: مصور(رنگی)، جدول، نمودار.
شابک	: 978-600-153-216-0
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
موضوع	: آبزیان -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	: Aquatic animals -- Laboratory manuals
موضوع	: ماهی‌ها -- بیماری‌ها -- تشخیص -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	: Fishes -- Diseases -- Diagnosis -- Laboratory manuals
شناسه افزوده	: ایمانپور، جاوید، ۱۳۴۱ -، ویراستار
شناسه افزوده	: دانشگاه گیلان. انتشارات
رده بندی کنگره	: QL۱۲۰
رده بندی دیویی	: ۵۹۱/۹۲
شماره کتابشناسی ملی	: ۵۹۲۳۹۷۴

اداره چاپ و انتشارات دانشگاه گیلان

نام کتـــاب	:	فنون کاربردی در آزمایشگاه آبزیان
تصنیف	:	دکترمسعود ستاری
ویراستار علمی	:	دکتر جاوید ایمانپور نمین
ویراستار ادبی	:	فرشته گلچین راد
نوبت چـــاپ	:	اول،۱۳۹۹
ناشـــر	:	انتشـارات دانشـگاه گیـلان
شـــمارگان	:	۱۰۰۰ جـلد
قیمت	:	ریال

* هر گونه چاپ و تکثیر فقط در اختیار انتشارات دانشگاه گیلان است.*

مقدمه مؤلف

آبزیان میلیون‌ها سال منبع غذایی مهمی برای انسان به‌حساب می‌آمده‌اند. آبزی‌پروری هزاران سال است که انجام می‌شود. باوجوداین، افزایش سریع جمعیت جهان، فشار زیادی را به محیط برای تأمین غذای کافی وارد می‌سازد.

اکنون‌که به یاری پروردگار متعال کتاب روش‌های تحقیق در بیماری‌های آبزیان به پایان رسیده است، خوشحالم که نتیجه تلاش اینجانب به ثمر می‌رسد و در اختیار علاقه‌مندان به علوم شیلاتی قرار می‌گیرد. در این مجموعه نیز همانند کتب قبلی تلاش شده است که جدیدترین اطلاعات در خصوص فنون آزمایشگاهی در آبزیان ارائه شود. اگرچه کتاب حاضر نیز همانند کتب قبلی خالی از اشکال نیست، اما نتیجه حداکثر تلاش اینجانب بوده و امید می‌رود که با ارائه نظرات، پیشنهادها و انتقادات خوانندگان کمی و کاستی آن در چاپ‌های بعدی به حداقل برسد.

در پایان از تمام دوستان و همکارانی که اینجانب را در تهیه این کتاب یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌کنم. ازجمله، آقای دکتر عبدالمجید حاجی مرادلو که در تهیه منابع مربوط به‌روش‌های تحقیق در بیماری‌های آبزیان به اینجانب یاری رسانده‌اند؛ انتشارات دانشگاه گیلان که مسئولیت انتشار این کتاب را بر عهده گرفتند و خانم ناهید شادپرور و زهرا یزدانی طالمی که اینجانب را در حروف‌چینی و صفحه‌آرایی یاری نمودند.

دکتر مسعود ستاری

۱۳۹۸

عنوان **صفحه**

مقدمه مؤلف ..... الف

فصل اول: فنون ریخت‌شناسی و طبقه‌بندی ماهیان

مقدمه ۲
محاسبات ریخت سنجی (اندازشی) ۲
خصوصیات مریستیک (شمارشی) ۳
ویژگی‌های تشریحی ۳
الگوهای رنگ ۴
کاریوتایپ ۴
ویژگی‌های بیوشیمیایی ۵
تعیین سن ۶
پارامترهای رشد ۸
فاکتور وضعیت (ضریب چاقی) ۸
رابطهٔ طول- وزن ۹
میزان مرگ‌ومیر ۹
میزان مرگ‌ومیرکل ۹
مرگ‌ومیر طبیعی ۱۰
مرگ‌ومیر صیادی ۱۰
ضریب بهره‌برداری ۱۰
مرگ‌ومیر سالیانه ۱۰
نرخ بقا ۱۰
سن \ اندازه بلوغ ۱۰
شاخص وزنی غدد جنسی ۱۱
شاخص وزنی کبد ۱۱
نسبت جنسی ۱۱
قطر تخمک ۱۲

هماوری ۱۲
اهمیت مطالعات ریخت‌شناسی ۱۲
روش شبکه‌ای تراس ۲۰
روش کار درشبکه تراس ۲۱
ریخت‌سنجی هندسی ۲۷
روش کار در ریخت سنجی هندسی ۲۹
صفات شمارشی ۳۳
فصل دوم: فنون نمونه‌برداری و کالبدگشایی در آبزیان
نحوۀ تحویل نمونۀ ماهی بیمار به آزمایشگاه ۳۶
آزمایش فیزیکی بر روی ماهیان ۳۸
تغییرات رنگ به‌عنوان شاخصی در بهداشت ماهی ۳۹
دیگر علائم درشت‌بینی متداول در بیماری‌ها ۳۹
آماده کردن ماهی برای نمونه‌برداری ۴۱
آرام کردن یا بیهوش کردن ماهی ۴۲
استفاده از میکروسکوپ ۴۳
بیوپسی پوست ۴۴
روش‌های بیوپسی پوست ۴۵
بیوپسی آبشش ۴۹
روش‌های بیوپسی آبشش ۴۹
بیوپسی اندام‌های داخلی ۵۲
روش‌های کالبدگشایی ۵۲
شرایط بافت ۵۶
نمونه‌برداری ۵۷
روش‌های تثبیت بافت ۶۴
فصل سوم: فنون بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی در ماهیان
مقدمه ۶۸

هدف و قواعد تثبیت ۶۹
شیمی تثبیت ۷۰
انواع مواد تثبیت‌کننده ۷۱
تثبیت‌کننده‌های انعقادی ساده ۷۲
تثبیت‌کننده‌های غیرانعقادی ساده ۷۳
مخلوط مواد تثبیت‌کننده ۷۴
تثبیت بافت برای میکروسکوپ الکترونی ۷۷
محلول کارنوفسکی ۷۹
تثبیت و روش‌های خاص ۸۰
روش‌های ایمنی شیمی بافت ۸۱
روش‌های مولکولی ۸۲
نکات ایمنی ۸۲
دستگاه‌های مورداستفاده در آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی ۸۳
دستگاه عمل‌آوری بافت ۸۳
رنگ‌آمیزی ۸۶
روش کار ۸۸
سلول‌شناسی ۸۹

فصل چهارم: فنون خون‌گیری و خون‌شناسی در ماهیان

مقدمه ۱۰۲
خون‌گیری ۱۰۳
مواد ضد انعقاد ۱۰۳
روش‌های خون‌گیری ۱۰۷
روش‌های خون‌شناختی متداول ۱۰۸
خون‌گیری از نمونه‌های منفرد ۱۰۸
قطع ساقه دمی ۱۱۰
پونکسیون قلب ۱۱۴

روش‌های نمونه‌برداری پی‌درپی ۱۱۵
طراحی کانول ۱۱۵
خون‌گیری از ماهیان مقید شده و ماهیان در حال شنا ۱۱۷
کانول‌گذاری در آئورت پشتی ۱۱۷
کانول‌گذاری در آئورت شکمی ۱۱۹
کانول‌گذاری در سیاهرگ عقبی ۱۱۹
کانول‌گذاری در رگ‌های مجزا ۱۲۰
خون‌شناسی ۱۲۰
ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز ۱۲۱
شمارش کل گلبول‌های قرمز ۱۲۱
تعیین هموگلوبین ۱۲۳
روش سیانومت هموگلوبین ۱۲۵
محلول درابکین ۱۲۵
تعیین هماتوکریت ۱۲۶
شمارنده‌های گلبول‌های قرمز ۱۲۶
الکتروفورز هموگلوبین ۱۲۹
باکس ۱: جداسازی ایزومورفهای هموگلوبین از طریق الکتروفورز ۱۳۲
تعیین مقدار حجم خون ۱۳۴
انتشار اندازه‌های مختلف گلبول‌های قرمز ۱۳۷
باکس ۲: روش **STA – put** برای تفکیک گلبول‌های قرمز خون ۱۳۹
منحنی‌های تعادل اکسیژن ۱۴۱
فعالیت آنزیمی گلبول‌های قرمز ۱۴۵
ارزیابی ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز ۱۴۸
گلبول‌های سفید ۱۵۰
شمارش گلبول‌های سفید ۱۵۰
شمارش تفریقی گلبول‌های سفید ۱۵۱

هتروفیل‌ها ۱۵۳
ائوزینوفیل‌ها ۱۵۵
بازوفیل‌ها ۱۵۵
مونوسیت‌ها ۱۵۶
لنفوسیت‌ها ۱۵۷
پلاسماسل‌ها ۱۵۸
ترومبوسیت‌ها ۱۵۹
شیمی سرم ۱۵۹
مواد زائد نیتروژنی ۱۶۱
کراتینین و کراتین ۱۶۲
اسید اوریک ۱۶۲
آمونیاک ۱۶۲
الکترولیت‌های سرم ۱۶۳
پروتئین‌های سرم ۱۶۴
آنزیم‌های سرم ۱۶۵
دیگر پارامترهای سرم ۱۶۵
ثبت مقادیر پایه ۱۶۶

فصل پنجم: فنون جمع‌آوری دیگر مایعات بدن ماهیان

مقدمه ۱۷۲
جمع‌آوری ادرار ۱۷۲
کاتترهای مثانه ۱۷۲
کاتترگذاری در مثانه ماهیان مقید شده و ماهیان در حال شنا ۱۷۴
جمع‌آوری ادراری که به‌طور طبیعی خارج می‌شود ۱۷۶
کاتتر بیرونی ۱۷۶
کاتتر پس مثانه‌ای ۱۷۷
حجره فیزیولوژیک تقسیم شده ۱۷۷

جمع‌آوری مواد مدفوعی ۱۷۹
جمع‌آوری مدفوعی که در اثر ثقل رسوب می‌کند ۱۷۹
جمع‌آوری دستی ۱۷۹
دستگاه گوئلف ۱۷۹
دستگاه ستونی **TUF** ۱۸۰
حجره‌های فیزیولوژیک تقسیم شده برای مدفوع ۱۸۰
جمع‌آوری رشته‌های مدفوعی به‌صورت دستی ۱۸۱
کاتترهای مدفوعی ۱۸۲
جمع‌آوری سلول‌های جنسی ۱۸۴
تخم‌گیری ۱۸۴
جمع‌آوری تخم‌های لقاح یافته ۱۸۴
جمع‌آوری اسپرم از طریق اسپرم‌گیری ۱۸۵
آسپیره کردن مایعات ۱۸۶

فصل ششم: فنون میکروب‌شناسی آبزیان

فنون باکتری‌شناسی در ماهیان ۱۹۰
طبقه‌بندی باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان ۱۹۱
کشت باکتری‌ها ۱۹۲
اسکن‌کردن سریع برای تعیین حساسیت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها ۱۹۹
فنون قارچ‌شناسی در ماهیان ۲۰۳
مقدمه ۲۰۳
نمونه‌گیری برای قارچ‌ها ۲۰۵
فنون ویروس‌شناسی ماهیان ۲۰۸
مقدمه ۲۰۸
نمونه‌گیری برای ویروس‌ها ۲۱۲
آشنایی با میکروسکوپ‌های الکترونی ۲۱۴
میکروسکوپ الکترونی گذاره **(TEM)** ۲۱۴

میکروسکوپ الکترونی نگاره**(SEM)** ۲۱۷
مفاهیم کشت سلول..... ۲۱۹
نگهداری سلول‌ها در محیط کشت..... ۲۲۰
امکانات و تجهیزات اصلی در کشت سلول..... ۲۲۱

فصل هفتم: فنون انگل‌شناسی آبزیان

مقدمه..... ۲۳۶
ایمنی در آزمایشگاه..... ۲۳۶
انواع نمونه‌ها و روش کار با آن‌ها..... ۲۳۶
روش‌های تشخیصی انگل‌های رودهای..... ۲۳۷
جمع‌آوری نمونه مدفوع..... ۲۳۷
آزمایش‌های درشت‌بینی نمونه‌ها..... ۲۳۷
آزمایش‌های ریزبینی..... ۲۳۷
تهیه لام با متیلن بلو..... ۲۳۸
روش‌های تغلیظ نمونه‌ها..... ۲۳۹
روش‌های رنگ‌آمیزی دائمی..... ۲۴۰
رنگ‌آمیزی تریکروم..... ۲۴۰
روش کار برای نمونه‌های تازه..... ۲۴۰
مراحل رنگ‌آمیزی تری کروم..... ۲۴۲
اجزای رنگ تریکروم..... ۲۴۲
رنگآمیزی هماتوکسیلین آهن ۲۴۲
رنگ‌آمیزی زیل نلسون اصلاح‌شده ۲۴۳
رنگ‌آمیزی زیل نلسون اصلاح‌شده – رنگ اسید فست – روش سرد – هنریکسن..... ۲۴۳
رنگ‌آمیزی کربول فوشین کاینیون..... ۲۴۴
رنگ‌آمیزی اسیدفست دی متیل سولفوکساید ۲۴۴
رنگ‌آمیزی کارمن آلوم ۲۴۴
مواد تثبیت‌کننده و نگهدارنده..... ۲۴۴

فرمالین ۲۴۴
پلی وینیل الکل ۲۴۵
استات سدیم اسید استیک فرمالین..... ۲۴۵
مرتیولات ید فرمالین ۲۴۵
آزمایش نمونه‌های خون..... ۲۴۶
گسترش‌های خونی..... ۲۴۶
رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی ۲۴۷
روش گیمسا..... ۲۴۷
روش فیلد..... ۲۴۷
روش رایت..... ۲۴۷
روش لیشمن اصلاح‌شده..... ۲۴۷
طبقه‌بندی انگل‌های ماهیان..... ۲۴۸
تک‌یاخته‌های انگلی..... ۲۴۸
ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیئیس..... ۲۴۸
تریکودینا ۲۵۰
چیلودنلا (چیلودون) ۲۵۰
هگزامیتا..... ۲۵۱
شاخه کرم‌های پهن ۲۵۱
ترماتودهای مونوژن..... ۲۵۲
ترماتودهای دیژن ماهیان ۲۵۵
سستودهای ماهیان..... ۲۵۸
رده سستویدیا ۲۵۸
نماتودهای ماهیان..... ۲۶۲
خارسران (آکانتوسفالا)..... ۲۶۷
زالوها و سخت‌پوستان در ماهیان..... ۲۶۸
انگل‌های سخت‌پوست..... ۲۶۹

پاروپایان ۲۶۹
آبشش پایان ۲۷۲
فصل هشتم: فنون سم‌شناسی در آبزیان
مقدمه ۲۷۶
تعاریف ۲۷۷
گروه‌های عمدهٔ مواد سمی یا مضر برای ماهیان ۲۷۸
روش **ICP Atomic Emission Spectroscopy (ICP- AES)** ۲۷۹
آشنایی با طیف‌سنجی جذب اتمی ۲۸۰
اصول پایه طیف‌سنجی جذب اتمی ۲۸۱
محدودیت‌ها ۲۸۳
زمان پیش‌بینی‌شده برای آنالیز ۲۸۳
نکات مهم در مورد **AAS** ۲۸۴
کروماتوگرافی گازی ۲۸۴
اساس کروماتوگرافی گازی ۲۸۵
کروماتوگرافی گازی چگونه عمل می‌کند؟ ۲۸۵
مبانی کروماتوگرافی گازی ۲۸۶
فصل نهم: فنون جراحی در ماهیان
مقدمه ۲۹۰
مراقبت از حیوان ۲۹۱
قواعد جراحی ۲۹۲
ایجاد بیهوشی برای جراحی ۲۹۲
التیام برش‌های جراحی ۲۹۴
نقش دمای محیط ۲۹۴
پیچیدگی‌ها ۲۹۵
تجهیزات عمل جراحی ۲۹۶
صحت و اطمینان از اجزای دستگاه جراحی ۲۹۶

میزهای جراحی ۲۹۷
تجهیزات ۲۹۸
بسته‌بندی‌های سترون (استریل) جراحی ۲۹۸
پوشاندن اطراف محل جراحی با پارچه (دریپ) ۲۹۸
نخ و سوزن‌های جراحی ۲۹۹
روش‌های جراحی ماهیان ۳۰۰
مفاهیم عمومی ۳۰۰
روش‌های جراحی ۳۰۰
لاپاراتومی ۳۰۲
جراحی‌های انتخابی و غیرمنتظره ۳۰۴
جراحی میدانی و برچسب‌گذاری ۳۰۴
عوارض جراحی ۳۰۵
نگهداری ماهیان در دوران نقاهت ۳۰۶
تأسیسات نگهداری ماهیان ۳۰۶
اهمیت کاهش استرس ۳۰۷
نور رسانی ۳۰۸
خلاصه ۳۰۸

فصل دهم: فنون رادیوگرافی در ماهیان

مقدمه ۳۱۴
ملاحظات عمومی ۳۱۴
ملاحظات رادیو ایزو توپیک ۳۱۵
شفافیت ۳۱۶
کارآیی ۳۱۷
پس‌زمینه ۳۱۸
روش‌های اتورادیوگرافیک ۳۱۹
اتورادیوگرافی درشت بینی (ماکروسکوپی) ۳۱۹

رهیافت‌های فتوگرافیک برای میکروسکوپ نوری ۳۲۱
عمل‌آوری متداول ۳۲۲
روش‌های مرتبط با مقاطع انجمادی ۳۲۴
رهیافت‌های اتورادیو گرافیک برای میکروسکوپ الکترونی ۳۲۷
مقدار سنجی ۳۲۹

فصل یازدهم: فنون مولکولی در آزمایشگاه آبزیان

مقدمه ۳۴۰
دی اکسی ریبوز نوکلئیک اسید ۳۴۰
ریبوز نوکلئیک اسید ۳۴۵
رمز ژنتیکی چیست؟ ۳۴۷
ساختار پروتئین ۳۴۸
نکات قابل‌ذکر در مورد کروموزوم‌ها ۳۵۰
تفاوت ژنتیکی در سطح کروموزوم‌ها ۳۵۱
چگونه تولیدمثل جنسی ایجاد تفاوت می‌کند؟ ۳۵۴
Mitochondrial and chloroplast DNA ۳۶۰
چگونه میتوان تفاوت‌های ژنتیکی را اندازه‌گیری کرد؟ ۳۶۲
تفاوت‌های موجود در توالی **DNA** ۳۶۳
باکس ۱۱-۱: کلونینگ ۳۶۴
PCR کمی یا **Quantitative PCR (qPCR)** ۳۷۳
باکس ۱۱-۲: جداسازی قطعات **DNA** و پروتئین‌ها بر اساس اندازه توسط الکتروفورز ۳۷۵
آشنایی با دستگاه الکتروفورز ۳۸۰
اجزای دستگاه ۳۸۱
روش انجام آزمایش ۳۸۱
مزایای الکتروفورز ۳۸۲
تعیین توالی **DNA** ۳۸۷
توالی یاب های نسل اول ۳۸۸

تعیین توالی به روش ماکسام-گیلبرت ۳۸۹
توالی یابهای نسل دوم ۳۹۰
تکنیک پایروسکوئنسینگ ۳۹۱
تکنیک **Semiconductor Sequencing (Ion Torrent)** ۳۹۳
تکنیک**Illumina (Solexa)** ۳۹۴
تکنیک **ABI (Applied Biosystems) Solid (Sequencing by Oligo Ligation and Detection) System** ۳۹۵
دستگاه‌های توالی یاب نسل سوم ۳۹۹
تکنیک **Heliscope (Helicos Single molecule sequencing device)** ۴۰۰
تکنیک **SMRT (Single Molecule Real Time)** یا**Pac Bio sequencing RS** ۴۰۱
تکنیک**Nanopore Sequencing** ۴۰۲
میتوکندری و نقش آن در مطالعات ژنتیکی ۴۰۳
ساختمان میتوکندری ۴۰۳
ژنوم میتوکندری ۴۰۴
ساختار و ژنوم میتوکندری ۴۰۴
وراثت میتوکندریایی ۴۰۴
مطالعات ژنوم میتوکندری در ماهیان ۴۰۵
توالی یابی ژنومی ۴۰۵
انواع مارکرهای مولکولی و اهمیت آن‌ها ۴۰۶
مارکرهای **DNA** میتوکندریایی ۴۰۷
کاربرد **mtDNA** در ژنتیک حفاظت **(Conservation genetics)** ۴۰۹
نقش حلقه **D (Displacement-loop)** در ژنتیک جمعیت ۴۱۰
استخراج **DNA** ۴۱۲
مراحل استخراج **DNA** به روش استات آمونیوم ۴۱۲
بررسی کمی و کیفی **DNA** استخراج‌شده ۴۱۳
روش محاسبه غلظت **DNA** ۴۱۴

ارزیابی کیفیت **DNA** با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۴۱۵
الکتروفورز محصول **PCR**، با استفاده از ژل پل اکریل آمید ۶٪ ۴۱۶
روش توالی یابی مستقیم **(Direct sequencing)** ۴۱۷
روش هضم آنزیمی **PCR-RFLP** ۴۱۹

فصل دوازدهم: فنون آزمایشگاهی سخت‌پوستان

توضیحات ۴۲۴
آناتومی میگو ۴۲۵
روش‌های بررسی بیماری‌های سخت‌پوستان ۴۳۰
نمونه‌برداری ۴۳۰
ارزیابی وضعیت سلامتی واحدها از دیدگاه همه‌گیری شناختی ۴۳۰
مواد نمونه که برای انجام آزمایش‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند ۴۳۱
اختصاصات بر اساس اندازه سخت‌پوست ۴۳۱
اختصاصات بر اساس جمعیت‌های سخت‌پوستان ۴۳۱
اختصاصات بر اساس وضعیت بالینی ۴۳۲
نام‌گذاری ویروس ۴۳۳
تولید ویروس ۴۳۳
نگهداری و ذخیره ویروس ۴۳۳
فنون (تکنیک‌ها) ۴۳۳
بررسی ریزبینی مستقیم ۴۳۶
روش‌های بافت‌شناسی ۴۳۶
روش‌های تثبیت با دیویدسون **AFA** ۴۳۷
انتقال و تحویل نمونه‌های نگهداری شده ۴۳۹
میکروسکوپ الکترونی گذاره ۴۳۹
استفاده از روش‌های مولکولی و پادتنی برای آزمایش‌های تأییدی و تشخیصی ۴۴۰
آماده کردن نمونه‌ها و انواع آن‌ها ۴۴۰
حفظ و نگهداری **RNA** و **DNA** در بافت‌ها ۴۴۱

اطلاعات اضافی که باید جمع‌آوری شود ۴۴۱
بیماری‌های ویروسی سخت‌پوستان ۴۴۱
بیماری لکه سفید ۴۴۲
بقا در خارج از بدن میزبان ۴۴۲
ثبات ویروس (روش‌های مؤثر غیرفعال کردن) ۴۴۲
چرخه زندگی ۴۴۲
عوامل میزبانی ۴۴۳
گونه‌های میزبان حساس ۴۴۳
مراحل حساس میزبان ۴۴۳
ترجیح ویروس به گونه یا تحت جمعیت (احتمال تعیین ویروس) ۴۴۳
اندام‌های هدف و بافت آلوده ۴۴۳
تداوم آلودگی توسط حاملانی که طول عمر طولانی دارند ۴۴۴
ناقلین ۴۴۴
حاملان آبزی وحشی شناخته‌شده یا مشکوک ۴۴۴
الگوی بیماری ۴۴۴
مکانیسم‌های انتقال ۴۴۴
میزان شیوع ۴۴۵
انتشار جغرافیایی ۴۴۵
میزان ابتلا و مرگ‌ومیر ۴۴۵
عوامل محیطی ۴۴۵
کنترل و پیشگیری ۴۴۵
واکسیناسیون ۴۴۶
شیمی‌درمانی ۴۴۶
تحریک ایمنی ۴۴۶
پرورش نژادهای مقاوم ۴۴۶
ذخیره‌سازی مجدد با گونه‌های مقاوم ۴۴۷

عوامل ممانعت کننده ۴۴۷
ضدعفونی تخم‌ها و نوزادان ۴۴۷
روش‌های پرورشی متداول ۴۴۷
نمونه‌برداری ۴۴۷
انتخاب نمونه‌های مقاوم ۴۴۷
تهیه مخزن نمونه‌ها ۴۴۷
بهترین اندام‌ها یا بافت‌ها ۴۴۸
نمونه‌ها \ بافت‌هایی که مناسب نیستند ۴۴۸
روش‌های تشخیصی ۴۴۸
روش‌های تشخیص میدانی ۴۴۸
علائم بالینی ۴۴۸
تغییرات رفتاری ۴۴۹
روش‌های بالینی ۴۴۹
شیمی بالینی ۴۴۹
آسیب‌شناسی ریزبینی ۴۴۹
تهیه لام مرطوب ۴۴۹
تهیه گسترش (اسمیر) ۴۴۹
مقاطع تثبیت‌شده ۴۵۰
آمیخته‌گری درجا **(ISH)** ۴۵۰
ایمنی شیمی بافتی ۴۵۰
میکروسکوپ الکترونی \ آسیب‌شناسی سلولی ۴۵۰
زی سنجش ۴۵۰
کشت سلول \ محیط کشت صناعی ۴۵۱
روش‌های تعیین پادگن بر پایه پادتن ۴۵۱
روش‌های مولکولی ۴۵۲
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز **(PCR)** ۴۵۲

استخراج **DNA** ۴۵۲
واکنش **PCR** مرحله اول ۴۵۴
دومین مرحله از واکنش **PCR(nested)** ۴۵۴
توالی **DNA** فرآورده‌های **PCR** ۴۵۵
روش آمیخته گری درجا **(ISH)** ۴۵۶
خالص‌سازی عامل بیماری‌زا ۴۵۸
روش‌های سرم‌شناسی ۴۵۹
رتبه‌بندی آزمایش‌ها با توجه به هدف استفاده ۴۵۹
معیارهای تشخیصی تقویت‌کننده ۴۶۰
تعیین موارد مشکوک ۴۶۰
تعیین مورد تأییدشده ۴۶۱
طاعون خرچنگ دراز آب شیرین ۴۶۱
روش‌های تشخیصی ۴۶۱
نکروز عفونی بافت‌های زیر جلدی و خونساز ۴۶۲
روش‌های تشخیصی ۴۶۲
نکروز عضلانی عفونی ۴۶۲
عارضه تورا ۴۶۳
بیماری دم‌سفید ۴۶۳
بیماری سرزرد ۴۶۴
پارو ویروس کبدی لوزالمعدی**(HPV)** ۴۶۴
باکولو ویروس- تیپ پنئوس مونودون**(MBV)** ۴۶۵
ویروس نکروز غده روده میانی باکولو ویروس**(BMNV)** ۴۶۶
باکولو ویروس تیپ **C (TCBV)** ۴۶۷
باکولو ویروس پنئی**(BP)** ۴۶۷
ویروس عارضه مرگ‌ومیر مولدین**(SMSV)** ۴۶۷
شبه- رئو ویروس ۴۶۸

شبه- پارو ویروس لنفوییدی(LPV) ۴۶۸
ویروس تهان‌دار کننده اندام لنفوییدد(LOVV) ۴۶۹
بیماری‌های باکتریایی میگو ۴۶۹
کشت و شناسایی باکتری‌های میگو ۴۷۰
شمارش پلت ۴۷۰
روش شمارش قطره‌ای ۴۷۱
آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک ۴۷۲
گونه‌های ویبریو ۴۷۳
شناسایی ویبریو ۴۷۴
شناسایی هر یک از گونه‌های ویبریو ۴۷۵
مایکو باکتری‌ها ۴۷۷
علائم درشتبینی بیماری ۴۷۸
کوتیکول ۴۷۸
عضله ۴۷۸
آسیب‌شناسی ۴۷۸
ریکتزیا و کلامیدیا ۴۷۹
تورم کبدی لوزالمعدی نکروز دهنده(NHP) ۴۷۹
مایکو پلاسماها ۴۷۹
کشت مایکو پلاسماها ۴۸۰
آسیب‌شناسی ۴۸۰
روش‌های زیست‌شناسی مولکولی ۴۸۰
باکتری‌های مزاحم ۴۸۱
آسیب‌شناسی ۴۸۱
انگل‌های سخت‌پوستان (پریاخته‌ها) ۴۸۲
آسیب‌شناسی ۴۸۲
تک‌یاخته‌ها ۴۸۳

تک‌یاخته‌های مزاحم ۴۸۳
آسیب‌شناسی ۴۸۳
آسینتا ۴۸۴
اپیستیلیس ۴۸۴
وورتیسلا ۴۸۴
زئوتامنیوم ۴۸۴
آنوفریس ۴۸۴
روش‌های آزمایش و شناسایی انگل‌ها ۴۸۵
تثبیت و رنگ‌آمیزی سریع آبشش ۴۸۵
لام مرطوب آبشش ۴۸۶
آبشش‌ها ۴۸۶
ضمایم ۴۸۶
مدفوع ۴۸۶
خراش کوتیکول ۴۸۶
بیماری‌های قارچی میگو ۴۸۷
بیماری‌های قارچی (مایکوز) نوزادان ۴۸۷
آسیب‌شناسی ۴۸۸
مایکوز بالغین ۴۸۸
گونه‌های حساس ۴۸۸
آسیب‌شناسی ۴۸۹
کشت و شناسایی قارچ‌ها ۴۸۹
لاجنیدیوم و سیرولپیدیوم ۴۸۹
کشت و شناسایی قارچ فوزاریوم ۴۹۰
بیماری‌های متفرقه میگو ۴۹۰
تورم روده هموسیتیک ۴۹۰
علائم درشت‌بینی بیماری ۴۹۱

آبی‌رنگ شدن کوتیکول ۴۹۱
کدورت سفیدرنگ بافت‌های عضلانی ۴۹۱
پر بودن روده و رنگ آن ۴۹۱
آسیب‌شناسی ۴۹۲
عارضه گرفتگی عضله ۴۹۲
علائم درشت‌بینی بیماری ۴۹۲
بافت عضلانی کدر سفید ۴۹۲
بدشکلی ۴۹۳
عارضه بدشکلی نوزادی ۴۹۳
عارضه نکروز عضله ایدیوپاتیک (با منشأ ناشناخته) ۴۹۳
عارضه مرتبط: عارضه عضله قهوه‌ای**(BMS)** ۴۹۴
بیماری اسپرماتوفور سیاه ۴۹۴
علائم درشت‌بینی بیماری ۴۹۵
بیماری آبشش سیاه ۴۹۵
آسیب‌شناسی ۴۹۵
کمبود اسید آسکوربیک ۴۹۵
علائم درشت‌بینی ۴۹۶
آسیب‌شناسی ۴۹۶
اسفروییدها (اجسام کروی شکل) ۴۹۶
آسیب‌شناسی ۴۹۷
عارضه دستگاه گوارش و عصبی ۴۹۷
آسیب‌شناسی ۴۹۷
منابع ۴۹۹

فصل اول

فنون ریخت‌شناسی و طبقه‌بندی ماهیان

مقدمه

اطلاعات مورداستفاده برای پی بردن به ارتباطات تکاملی در بین ماهیان، عمدتاً از مطالعات تاکسونومیک سخت و طاقت‌فرسا، به‌ویژه توصیف دقیق گونه‌ها حاصل شده است. این مطالعات، پایه علم ماهی‌شناسی را تشکیل می‌دهند و نیاز به آن‌ها نسبت به هر زمان دیگر بیشتر شده است، زیرا نه تنها پایه‌ای برای مطالعات تکاملی به‌حساب می‌آیند، بلکه برای مطالعات زیست‌محیطی، فیزیولوژیک و غیره نیز موردنیاز هستند. اگر مشخص نباشد که بر روی چه موجود زنده‌ای کار می‌کنید، اغلب این امر منجر به نتیجه‌گیری‌های نادرست می‌شود. روش‌های عمومی که برای مطالعات تاکسونومی مورداستفاده قرار می‌گیرند، در شش دسته قرار دارند که شامل موارد زیر است:

۱. محاسبات مورفومتریک (اندازشی).
۲. محاسبات مریستیک (شمارشی).
۳. ویژگی‌های تشریحی.
۴. الگوهای رنگ.
۵. کاریوتایپ.
۶. خصوصیات بیوشیمیایی (مویل و چک، ۲۰۰۴).

محاسبات ریخت سنجی[1] (اندازشی)

شامل هر اندازه‌گیری استانداردی است که روی ماهی انجام داد که ازجمله می‌توان به طول استاندارد، طول پوزه، طول درازترین شعاع بر روی بالهٔ پشتی یا ضخامت ساقه دمی اشاره کرد. ازآنجاکه این اندازه‌گیری‌ها با رشد ماهی تغییر می‌کند و معمولاً آن‌ها را به‌صورت نسبت‌هایی از طول استاندارد (یا دیگر اندازه‌گیری‌هایی که می‌توان به‌راحتی انجام داد) بیان می‌کنند. باوجوداین، این نسبت‌ها مذکور مفیدتر خواهند بود، اگر مقایسه‌ای بین نمونه‌های ماهیانی که دارای اندازه تقریباً یکسان و جنسیت مشابه هستند، صورت گیرد، زیرا همیشه رشد یک ماهی تحت تأثیر عوامل مختلف قرار می‌گیرد. برای مثال، دوشکلی جنسی در بین ماهیان امری متداول است (اما غالباً واضح و آشکار نیست). بنابراین، اگرچه انجام اندازه‌گیری‌های مورفومتریک برای توصیف یک گونهٔ ماهی امری ضروری است، اما خود این اندازه‌گیری‌ها دارای فواید محدودی هستند. به‌منظور استاندارد کردن اندازه‌گیری‌های مورفومتریک به‌نحوی‌که در بین گونه‌ها قابل‌مقایسه باشد. پروتکلی ایجادشده که در آن، مجموعه‌ای از اندازه‌گیری‌ها بین نقاط مشخص تشریحی ماهی انجام می‌شود که ازجمله

1. Morphometric measurements

می‌توان به‌اندازه‌گیری فاصله بین قاعده باله پشتی تا قاعده باله مخرجی اشاره کرد (مویل و چک، ۲۰۰۴).

خصوصیات مریستیک[1] (شمارشی)

این خصوصیات قابل‌اعتمادترین ویژگی‌های تاکسونومیک (طبقه‌بندی) محسوب می‌شوند، زیرا انجام بیشتر آن‌ها ساده است. خصوصیات مریستیک شامل هر چیزی است که می توان بر روی ماهی شمارش کرد. ازجمله تعداد مهره‌ها، شعاع‌ها و خارهای باله‌ها، ردیف‌های فلس‌ها، زوائد باب‌المعدی و منافذ خط جانبی. به لحاظ این‌که اغلب تفاوت‌هایی ازنظر این ویژگی ها در یک گونه ماهی وجود دارد، لازم است محاسبات را بر روی تعداد قابل‌ملاحظه‌ای از نمونه‌ها انجام داد و میانگین، محدوده های اندازه و خطای معیار[2] را تعیین کرد. یکی از بزرگ ترین دلایل وجود اختلاف در محاسبات مریستیک، خطای انسان، به‌ویژه هنگام کار بر روی ماهیان کوچک است، اما درصورتی‌که از روش‌های استاندارد استفاده شود، این‌گونه خطاها کاهش می‌یابند. منشأ دیگر بروز اختلاف، شرایط رشد ماهی نوزاد می‌شود. هر عاملی ازجمله دما، غلظت اکسیژن محلول، شوری یا قابلیت دستیابی به غذا که بر روی رشد مرحله نوزادی تأثیر می گذارد، احتمالاً بر روی ویژگی های مریستیک نیز تأثیر خواهد گذاشت (مویل و چک، ۲۰۰۴).

ویژگی‌های تشریحی[3]

این ویژگی‌ها را به‌سختی می‌توان تعیین کرد. باوجوداین، برای توصیف گونه‌ای ماهیان حائز اهمیت هستند. این ویژگی ها شامل شکل، کامل بودن یا نبودن خط جانبی آن، وضعیت و اندازه اندام های داخلی، تشریحی خاص (تنفس از هوا و اندام های الکتریکی)، خصوصیات ثانویه جنسی (برجستگی های تولیدمثلی[4] بر روی بدن ماهیان نر) و شکل، اندازه، ارتباطات داخلی استخوان ها و عضلات است. بیشتر این خصوصیات حالت مثبت - منفی دارند یک ماهی یا واجد این ویژگی هاست و یا این‌که فاقد آن‌هاست. لذا این‌ها ویژگی‌های قطعی محسوب می‌شوند و نه‌تنها برای تفکیک گونه‌ها، بلکه برای تفکیک طبقات بالاتر نیز مفید هستند. بااین‌حال، این ویژگی‌ها نیز همواره مطلق نیستند، زیرا گاهی یک ماهی منفرد از گونه‌ای پیدا می‌شود که واجد ویژگی هایی است که به‌عنوان ویژگی قطعی گونه دیگر محسوب می‌شود و این‌گونه با گونه اول ارتباط نزدیک دارد. برای مثال، معمولاً دندان‌های قاعده‌ای آب‌شی (بازی برانشیال) خصوصیتی قابل‌اطمینان برای تفکیک

1. Meristic Traits
2. Standard Errors
3. Anatomical Characteristics
4. breeding tubercles

قزل آلای حلق بریـده از قزل‌آلای رنگین کمان اســـت، اما این دندان ها به طور نادر در یک قزل‌آلای رنگین‌کمان یافت می شـــوند. برعکس، گاهی اوقات یک قزل‌آلای حلق بریده فاقد این دندان‌هاســـت (مویل و چک، ۲۰۰۴).

الگوهای رنگ[1]

شاید متغیرترین ویژگی گونه‌ای محسوب شود، زیرا بر اساس سن، ساعات مختلف روز یا محیطی که ماهی در آن به ســـر می‌برد، تغییر می کند. باوجوداین، الگوهای رنگ باید بخش مهمی از توصـــیف گونه‌ای را تشـکیل دهند، زیرا این الگوها جزء اختصاصات گونه‌ای به‌حساب می‌آیند و انعکاس‌دهنده وضعیت زیستگاه، شرایط تولیدمثل، جنسیت و روش‌های برقراری ارتباط با همنوعان هستند. مشکل عمده در خصوص استفاده از رنگ به‌عنوان یک ابزار طبقه‌بندی این است که ماهیان در اثر ماندن در مواد نگهدارنده رنگ می‌بازند. لذا توصیف ماهی زنده بسیار مناسب‌تر است (مویل و چک، ۲۰۰۴).

کاریوتایپ[2]

کاریوتایپ توصـــیف تعداد و ریخت‌شـــناســـی کروموزوم‌ها اســـت. به نظر می‌رســـد که تکیه‌بر تعداد کروموزوم‌ها به ازای هرســـلول، یک ویژگی نســـبتاً محتاطانه باشـــد. بنابراین، ممکن اســـت به‌عنوان شـاخصـی برای نزدیکی روابط درون خانواده‌ها مورداستفاده قرار گیرد. حتی شمارش تعداد و تعیین وضـــعیـت بـازوهای کروموزوم ها محافظه کارانه تر از تعداد کروموزوم‌ها اســـت و اغلب در مطالعات تاکســونومیک (طبقه بندی) از فواید یکســان برخوردار اســت. بنابراین ممکن است در دوره تغییرات تکاملی، دو کروموزوم تک بازویی (آکروســنتریک) به هم متصـل شده و تبدیل به یک کروموزوم زوج بازویی (متاســـنتریک) شـــوند. بدین ترتیب، تعداد کروموزوم‌ها کاهش می یابد، اما تعداد بازوها تغییر نمی کند. نوعی از الحاق کروموزومی که باعث افزایش تعداد آن‌ها می‌شـود، نیز بسیار به‌ندرت ممکن اســت روی دهد. شـیوهٔ دیگری که باعث افزایش تعداد کروموزوم‌ها می‌شـود، پلی‌پلوییدی اســت که ناشـی از ناتوانی دســته‌ای از کروموزوم‌های زوج یک ســلول دیپلویید در تفکیک (جدایی) از یکدیگر اســت. تولید ســلول‌های جنســی دیپلویید از این طریق متداول اســت، اما اندازه‌ای هســت که کافی منجر بـه تولید تریپلویید و تتراپلویید شـــود. تریپلوییدی به‌طور معنی دار، منشـــأ تولید گونه های تک‌جنســی معین در ماهیان پوســیلی‌اید مکزیک بوده اســت. تتراپلوییدی ممکن اســت در تکامل گونه‌ها بســیار حائز اهمیت باشـد و ازاین‌رو، یک شـاخص تاکســونومیک مهم به‌حساب می‌آید. برای مثـال، در کپور، مـاهی طلایی و ســـس مـاهی تعـداد بـازوهـای کروموزومی تقریبـاً دو برابر دیگر

1. Color patterns
2. karyotype

کپورماهیان است. این حالت در همه اعضای خانواده انشقاق یافته کاتوستومیده نیز دیده می‌شود و نشان می‌دهد که احتمالاً تتراپلوئیدی نقش مهمی در تکامل اولیه این‌گونه‌های موفق ایفا کرده است. به همین ترتیب مشابه در ماهی قزل‌آلا، ماهی آزاد سفید و گری لینگ (سالمونیده) نیز تعداد بازوهای کروموزومی، دو برابر ماهیان اسملت (اوسمریده) است. این ماهیان اعضای دودمانی راسته آزادماهی‌شکلان هستند (مویل و چک، ۲۰۰۴).

ویژگی‌های بیوشیمیایی[1]

ویژگی‌های بیوشیمیایی الگوهایی در خصوص پروتئین‌ها و ماده ژنتیکی هستند و به‌طور مشخص برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها ناشی از توسعه سریع زیست‌شناسی مولکولی در دهه‌های گذشته هستند. روش‌های بیوشیمیایی اصلی، شامل الکتروفورز و روش‌های مختلف تجزیه (آنالیز) ترکیب و ساختار DNA هستند. الکتروفورز تشابهات پروتئینی (آلوزیم) گونه‌ها را ارزیابی می‌کند. پروتئین‌ها در مکان‌هایی بر روی DNA کدگذاری شده‌اند. بنابراین، واریانت‌های مربوط به پروتئین‌ها که در مکان‌های مختلف کدگذاری شده‌اند (آلل‌ها)، نشان‌دهنده مجموعه‌های ژنی جایگزین برای ویژگی‌های اختصاصی هستند. تجزیه (آنالیز) تعداد و نوع واریانت‌های هر آلل، معیاری برای ساختار و تفکیک (تمایز) ژنتیکی به‌حساب می‌آید. در روش الکتروفورز، در یک نمونه بافت، ساختار غشای سلول را به‌طور مکانیکی پاره می‌کنند تا پروتئین‌های محلول در آب آزاد شوند. محلول حاصله را در یک ژل که از نشاسته یا آگار تهیه‌شده قرار می‌دهند. سپس، آن را در معرض یک جریان الکتریکی قرار می‌دهند. هر پروتئین در پاسخ به جریان تا اندازه‌ای به پیش می‌رود که این مقدار بستگی به‌اندازه مولکولی و شارژ الکتریکی دارد؛ بنابراین پروتئین‌ها (آلل‌ها) را می‌توان شناسایی کرد و تشابه ماهیان منفرد و گونه‌ها را با توجه به وجود یا عدم وجود آن پروتئین و تفاوت‌هایی که در وضعیت آن‌ها در ژل بروز می‌کند، مقایسه کرد. وجود تفاوت‌های اندک در ساختار مولکولی یک پروتئین، می‌تواند منجر به داشتن شارژ خالص متفاوت و متعاقب آن، وضعیت متفاوت در ژل شود. تعداد این تفاوت‌ها در بین دو نمونه، شاخصی برای تعیین تشابه ژنتیکی در نظر گرفته می‌شود و اگر نمونه‌ها مربوط به گونه‌های مختلف باشند، نزدیکی ارتباطات تکاملی آن‌ها را نشان می‌دهند. ثابت‌شده است که الکتروفورز به‌ویژه برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی درون جمعیت‌ها با ارزش است. معمولاً گونه‌های مختلف، دارای آلل‌های منحصر به خود بوده یا آمیزه‌ای از آن‌ها را دارند که می‌تواند برای شناسایی گونه‌ای مفید باشد، به‌ویژه هنگامی‌که درباره ماهیت گونه‌هایی که ازنظر ریخت‌شناسی شبیه هم هستند، شک و تردید وجود داشته باشد (مویل و چک، ۲۰۰۴).

1. Biochemical characteristics

اگرچه ثابت‌شده است که الکتروفورز ابزار مهمی برای سیستماتیک است، اما سنجش مستقیم ساختار ژنتیکی، روش‌هایی که امکان بعضی از اندازه‌گیری‌ها را برای تعیین توالیDNA فراهم می‌کنند، در بسیاری از مطالعات جایگزین الکتروفورز شده‌اند. مزیت این روش‌ها این است که می‌توان آن‌ها را با نمونه‌های کوچکی از بافت به انجام رساند (بنابراین، نیازی نیست که برای تعیین خصوصیات ماهی، آن را کشت). همچنین، می‌توان از بافت‌های نگهداری‌شده یا حتی مواد فسیل‌شده استفاده کرد. علاوه براین، این روش‌ها توان بالقوه اندازه‌گیری تفاوت‌های بیش از سه بیلیون توالی DNA را دارند (مویل و چک، ۲۰۰۴).

دو نوعDNA عمومی در سلول‌ها وجود دارد که شامل DNA میتوکندری و DNA هسته است. DNAمیتوکندری خصوصاً برای تجزیه‌وتحلیل (آنالیز) جمعیت‌ها در درون گونه‌ها مفید است، زیرا فاقد امکان رونوشت برداری است. همچنین الگوی توارث ساده (از طریق مادر) دارد و سریع‌تر ازDNA هسته تکامل می‌یابد. از طرف دیگر، DNA هسته فراوان‌تر است و در حدود سه بیلیون تحت واحد نوکلئوتید دارد، درحالی‌که تعداد تحت واحدهای نوکلئوتید DNAمیتوکندری ۲۰۰۰۰است (اما درواقع، همه آن‌ها پروتئین‌ها را کدگذاری می‌کنند). یک روش برای آنالیز DNA مقایسه بازهای زوج بر روی یک بخش استاندارد از DNA است که امروزه می‌توان (پس از آماده‌سازی بعضی از فرآورده‌ها) توسط دستگاه‌های اتوماتیک، توالی DNA آن را تعیین کرد. روش دیگر، شکستن رشته‌های DNA با استفاده از آنزیم‌های استانداردشده (آندونوکلئازهای محدودکننده) و سپس مقایسه تعداد و اندازه اجزاء با استفاده از الکتروفورز است. این روش را انگشت‌نگاری DNA می‌نامند. محققان به موارد استفاده متعددی که روش‌های مربوط به DNAدر طبقه‌بندی و مدیریت شیلاتی دارند، اشاره کرده‌اند که ازجمله می‌توان به شناسایی ذخایر مشخص ماهیان باس راه‌راه، ماهی آزاد و ماهیان دیگر اشاره کرد، حتی هنگامی‌که آن‌ها به‌صورت مختلط در اقیانوس به‌سر می‌برند (مویل و چک، ۲۰۰۴).

مطالعات متعددی بر روی ریخت‌شناسی ماهیان ایران انجام‌شده است (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۹؛ اکبر زاده و همکاران، ۱۳۹۰؛ عزیزی و همکاران، ۱۳۹۰، ۱۳۹۴؛ حقیقی و همکاران، ۱۳۹۱، ۱۳۹۳، ۱۳۹۴؛ خاتمی نژاد و همکاران، ۱۳۹۲، ۱۳۹۴،a, b, c ۲۰۱۳؛ مسلمی اقدم و همکاران، ۱۳۹۲، ۲۰۱۴، ۲۰۱۶؛ اسدی و همکاران، ۱۳۹۳، ۲۰۱۶، ۲۰۱۷؛ حاجی وند و همکاران، ۱۳۹۵؛ وثاقی و همکاران، ۱۳۹۵؛ منصوری چرهی و همکاران، ۲۰۱۶).

تعیین سن

برای تعیین سن ماهیان، تعداد ۳۰-۲۰ عدد فلس از قسمت فوقانی خط جانبی، درست در ناحیهٔ انتهای بالهٔ پشتی جدا می‌شود و پس از شستشو با آب مقطر تعداد ۸-۷ عدد از فلس‌های سالم را

بین دو لام قرار داده و پس از پیوست شماره نمونه، تعیین سن توسط لوپ دوربین‌دار مجهز به نور از پایین از طریق شمارش حلقه‌های سالیانه صورت می‌گیرد (بیسواس، ۱۹۹۹).

به‌منظور بررسی صحت در شمارش حلقه‌های سالیانه و تخمین سن ماهیان موردبررسی، فلس‌های مربوط به تعداد مناسبی از نمونه‌های ماهی توسط ۲ نفر به‌صورت مجزا بررسی و تخمین سن صورت می‌گیرد. سپس با استفاده از آنالیز میانگین درصد خطا[1] (APE)، طبق رابطهٔ زیر صحت تخمین سن محاسبه می‌شود:

$$APE = \frac{100}{N}\sum_{j=1}^{N}\left[\frac{1}{R}\sum_{i=1}^{R}\frac{|Xij - Xj|}{Xj}\right]$$

که در این رابطه، N تعداد ماهیان تعیین سن شده، R تعداد دفعات تعیین سن، Xij iمین سن تعیین‌شده برای jمین ماهی و Xj میانگین سن تعیین‌شده برای jمین ماهی است (بیسواس، ۱۹۹۹).

تصویر ۱-۱: دو نمونه از فلس‌های تعیین سن شده اردک‌ماهی. (A) نمونهٔ ۴ ساله و (B) نمونهٔ ۶ ساله (اقتباس از مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۴).

1. Average Percent Error

پارامترهای رشد

برای محاسبه پارامترهای رشد از معادله فون برتالانفی[1] با استفاده از رگرسیون غیرخطی و طبق رابطهٔ زیر برای هر جنس به‌صورت جداگانه استفاده می‌شود. این معادله از داده‌های طول و سن استفاده کرده و منحنی رشد را ترسیم می‌کند (بیسواس، ۱۹۹۹).

$$L_t = L_\infty \left[1 - exp^{-K\,(t-t_0)}\right]$$

که در این معادله، L_t طول ماهی در سن t است؛ L_∞ طول بی‌نهایت فرضی و بدین معناست که اگر ماهی بدون محدودیت رشد کند به آن می‌رسد؛ K ضریب رشد و نشان‌دهندهٔ این است که ماهی با چه سرعتی به سمت طول بی‌نهایت حرکت می‌کند و t_0 زمانی است که طول ماهی برابر با صفر است. این پارامتر نیز مقداری فرضی است. مقدار پارامتر ϕ(فای) از طریق رابطهٔ زیر در هر جنس محاسبه می‌شود:

$$\phi = \log(K) + 2\log(L_\infty)$$

فاکتور وضعیت[2] (ضریب چاقی)

فاکتور وضعیت (CF) با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه می‌شود:

$$K = \frac{W}{L^3} \times 100$$

در این رابطه W وزن بدن (g) و L طول چنگالی (FL) است. معمولاً فاکتور وضعیت برای جنس نر و ماده به‌صورت جداگانه محاسبه می‌شود. روند تغییرات فاکتور وضعیت در ماهیان را در جنس نر و ماده در سه مرحله قبل از تخم‌ریزی، تخم‌ریزی و پس از تخم‌ریزی بررسی می‌کنند. تفکیک ماهیان به این سه مرحله بر اساس شرایط تولیدمثلی و وضعیت غدد جنسی انجام می‌شود. بدین‌صورت که ماهیان مرحلهٔ ۲ و ۳ رسیدگی جنسی در مرحله قبل از تخم‌ریزی، ماهیان مرحلهٔ ۴ و ۵ رسیدگی جنسی در مرحله تخم‌ریزی و ماهیان تخم‌ریزی کرده (مرحلهٔ ۶) و اندکی پس از این زمان (بسته به وضعیت غده جنسی) در مرحله پس از تخم‌ریزی قرار می‌گیرند (مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۶).

1. Von Bertalanffy
2. Condition factor

رابطهٔ طول- وزن[1]

رابطه طول- وزن (LWR) در جنس نر و ماده با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه می‌شود.

$W = a L^b$

کـه در این رابطـه، W برابر بـا وزن بدن (g)، L برابر با طول چنگالی (cm)، a و b پارامترهای رابطهٔ طول-وزن است.

برای تعیین صحت مقدار b و الگوی رشد از رابطهٔ زیر استفاده می‌شود:

$$t = \frac{s.d._x}{s.d._y} \times \frac{|b-3|}{\sqrt{1-r^2}} \times \sqrt{n-2}$$

طبق معـادلـهٔ بـالا، $s.d._x$ انحراف معیار لگاریتم طول (cm)، s.d.y انحراف معیار لگاریتم وزن (g)، r^2 ضـریب رگرسـیون رابطه طول - وزن و n تعداد ماهیان اسـت. درنهایت، مقایسـه مقدار t محاسـبه‌شـده با مقادیر t جدول با درجهٔ آزادی n-۲، بیانگر الگوی رشـد خواهد بود. اگر مقدار t محاسباتی از t جدول کمتر باشد، الگوی رشد از نوع ایزومتریک و اگر مقدار t محاسباتی از t جدول بیشـتر باشد، الگوی رشد از نوع آلومتریک خواهد بود (اگر مقدار b بزرگتر از ۳ باشد، الگوی رشد از نوع آلومتریک مثبت و اگر مقدار b کوچکتر از ۳ باشـد، الگوی رشـد از نوع آلومتریک منفی خواهد بود) (اسدی و همکاران، ۲۰۱۷).

میزان مرگ‌ومیر

مقادیر مختلف مرگ‌ومیر در هر جنس به‌طور جداگانه محاسبه می‌شود.

میزان مرگ‌ومیر کل

برای محاسبهٔ مرگ‌ومیر کل (Z) از رابطهٔ زیر استفاده می‌شود.

$$Z = \frac{K(L_\infty - \bar{L})}{(\bar{L} - L')}$$

که در این رابطه Z مرگ‌ومیر کل، K نرخ رشـد، L_∞ طول بی‌نهایت، L' طولی که از این طول به بعد ماهیان در معرض بهره‌برداری کامل قرار می‌گیرند و $\bar{L}$ طول متوسـط نمونه‌هایی اسـت که بهره‌برداری می‌شوند (مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۴).

1. Length - weight relationship

مرگ‌ومیر طبیعی

برای محاسبه مرگ‌ومیر طبیعی (M) از رابطهٔ زیر استفاده می‌شود:

$$\ln[M] = -0.0152 - 0.279\ln[L_\infty] + 0.6543\ln[K] + 0.463\ln[T]$$

که در این رابطه، M مرگ‌ومیر طبیعی در سال، L_∞ طول بی‌نهایت، K نرخ رشد و T متوسط دمای سالیانه سطحی آب محل زندگی موجود است (بیسواس، ۱۹۹۹).

مرگ‌ومیر صیادی

مرگ‌ومیر صیادی (F) هم از طریق کسر مرگ‌ومیر طبیعی از مرگ‌ومیر کل و با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه می‌شود.

$$F = Z - M$$

ضریب بهره‌برداری

مقدار ضریب بهره‌برداری در جنس نر و ماده به‌طور جداگانه از طریق زیر محاسبه می‌شود که در این رابطه، E ضریب بهره‌برداری در سال، F مرگ‌ومیر صیادی و Z مرگ‌ومیر کل می‌باشد.

$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{F}}{\mathbf{Z}}$$

مرگ‌ومیر سالیانه

میزان مرگ‌ومیر سالیانه در جنس نر و ماده از طریق رابطهٔ محاسبه می‌شود که در این رابطه، A برابر با مرگ‌ومیر سالیانه و Z مرگ‌ومیر کل است (مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۳).

$$A = 1 - e^{-Z}$$

نرخ بقا

نرخ بقا در هر جنس از طریق رابطهٔ زیر به دست می‌آید. در این رابطه S برابر با نرخ بقاست.

$$S = 1-A$$

سن \ اندازه بلوغ

برای تعیین سن \ اندازه بلوغ ماهی، ماهیان در دورهٔ تخم‌ریزی موردبررسی قرار می‌گیرند. بدین ترتیب که تعداد افراد رسیده و آمادهٔ تخم‌ریزی در هر دسته سنی (یک سال) و هر دسته طولی (یک سانتی‌متر) به دست می‌آید. مقادیر مورد انتظار تعداد ماهیان بالغ در هر دسته سنی و طولی به ترتیب از روابط زیر محاسبه می‌شود. درنهایت با استفاده از روش least square و با استفاده از

رگرسیون لجستیک یا S شکل[1] در هر جنس به‌طور جداگانه، مقادیر سن\اندازه بلوغ یا سن\اندازه‌ای که در آن ۵۰٪ افراد بالغ هستند، محاسبه می‌شود (مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۴).

$$P = 1/[1 + e^{-r(t-t_m)}]$$

که در این رابطه، P مقدار مورد انتظار افراد بالغ، r شیب منحنی، t دسته سنی و t_m میانگین سنی است که در آن ۵۰٪ افراد جامعه، بالغ هستند.

$$P = 1/[1 + e^{-r(L-L_m)}]$$

که در این رابطه نیز، P برابر با مقدار مورد انتظار افراد بالغ، r شیب منحنی، L دسته طولی و L_m طولی است که در آن ۵۰٪ افراد جامعه، بالغ هستند (بیسواس، ۱۹۹۹).

شاخص وزنی غدد جنسی

برای تعیین فصل تخم‌ریزی از شاخص وزنی غدد جنسی[2] (GSI) در هر جنس به‌طور جداگانه استفاده می‌شود. شاخص وزنی غدد با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه می‌شود که در آن GW برابر با وزن غده جنسی (g) و TW برابر با وزن کل نمونه (g) است (مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۶).

$$GSI = \frac{GW}{TW} \times 100$$

شاخص وزنی کبد[3]

شاخص وزنی کبد (HSI) از رابطهٔ زیر و در هر جنس به‌طور جداگانه محاسبه می‌شود که در این رابطه LW برابر با وزن کبد (g) و TW برابر با وزن بدن (g) است (بیسواس، ۱۹۹۹).

$$HSI = \frac{LW}{TW} \times 100$$

نسبت جنسی

محاسبهٔ نسبت جنسی با استفاده از نسبت تعداد ماهیان نر به تعداد ماهیان ماده با رابطهٔ زیر انجام می‌شود (مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۳).

$$\text{نسبت جنسی} = \frac{\text{تعداد ماهیان نر}}{\text{تعداد ماهیان ماده}}$$

---

1. Sigmoid
1. Gonadosomatic index
2. Hepatosomatic index

قطر تخمک

برای تعیین میزان قطر تخمک، در مرحلهٔ رسیدگی ۲، ۳، ۴ و ۵ و درمجموع تعداد ۲۰۰ تا ۳۰۰ عدد تخمک در هر مرحلهٔ رسیدگی به‌صورت تصادفی انتخاب می‌شود و قطر تخمک توسط بینوکولار مجهز به عدسی مدرج اندازه‌گیری و ثبت می‌شود (بیسواس، ۱۹۹۹).

هماوری

برای تعیین هماوری، استفاده از ماهیانی که نزدیک به فصل تخم‌ریزی هستند، باعث می‌شود که مقدار محاسبه‌شدهٔ هماوری، به میزان هماوری واقعی نزدیک‌تر باشد؛ بنابراین، برای تعیین هماوری فقط از ماهیانی که در مرحله ۴ و ۵ رسیدگی جنسی هستند و علائمی مبنی بر تخم‌ریزی در آن‌ها دیده نمی‌شود، استفاده می‌کنیم (مسلمی اقدم و همکاران، ۲۰۱۴).

برای بررسی تأثیر ناحیه تخمدان بر هماوری، ابتدا تعدادی ماهی انتخاب می‌شود و مقدار ۰/۵ گرم تخمک از تخمدان سمت چپ و سمت راست به‌طور جداگانه برداشت می‌شود و تعداد تخمک آن‌ها مورد مقایسه قرار می‌گیرد. سپس این مقایسه بین ۳ قسمت ابتدایی، میانی و انتهایی تخمدان سمت چپ صورت می‌گیرد؛ بنابراین، برای تعیین هماوری، مقدار ۰/۵ گرم تخمک از قسمت مرکزی تخمدان سمت چپ بدن برداشت می‌شود و تعداد تخمک‌های موجود شمارش‌شده و به وزن کل تخمدان تعمیم داده می‌شود (بیسواس، ۱۹۹۹).

اهمیت مطالعات ریخت‌شناسی

ویژگی‌های ریخت‌شناسی ماهیان به‌طورمعمول در بررسی زیست‌شناختی آن‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد تا اختلافات و تشابهات جنبه‌های مختلف بین گروه‌های مختلف رده‌بندی را تعیین کند. این مطالعات باعث یافتن تفاوت‌ها بین جمعیت‌های ماهیان می‌شود و ابزاری مفید برای تعیین میزان جداشدگی جمعیت‌های ماهیان است. اختلافات ریخت‌شناسی میان جمعیت‌ها یا گونه‌ها معمولاً به‌صورت تباین شکل کلی بدن و یا شکل‌های تشریحی خاص توضیح داده می‌شود. مثلاً یک گونه ممکن است به‌طور نسبی دارای بدنی لاغرتر و یا مرتفع‌تر و یا دارای چشم‌های کوچک‌تر و یا باله پشتی کوچک‌تر نسبت به گونه دیگر باشد. اگرچه این توصیفات کیفی در پاره‌ای از مواقع ممکن است کافی باشد، بهتر آن است که برای بیان اختلاف بین افراد ازلحاظ کمی، اندازه‌گیری‌های مختلفی از آن‌ها انجام شود سپس این اندازه‌ها مورد تحلیل آماری قرار گیرد. باوجوداین، مهم‌ترین محدودیت خصوصیات ریخت‌شناسی در سطح درون‌گونه‌ای آن است که تغییرات ریختی مستقیماً تحت کنترل ژنتیک نبوده، بلکه متأثر از تغییرات محیطی نیز هست. انعطاف ریختی ماهیان این اجازه را به ماهی می‌دهد که نسبت به تغییرات محیطی پاسخی به‌صورت تغییرات فیزیولوژیک و

رفتاری دهند که خود می‌تواند منجر به تغییرات ریخت‌شناسی، تولیدمثلی و بقاء در آن‌ها شده و بدین ترتیب اثرات تغییرات محیطی تعدیل شود. این تغییرات ریختی الزاماً منجر به تغییرات ژنتیکی در جمعیت نمی‌شود و بنابراین، تعیین اختلافات ریختی میان جمعیت‌ها نمی‌تواند گواهی بر اختلافات ژنتیکی آن‌ها باشد. تغییرات ریختی ناشی از محیط در شناسایی جمعیت‌ها دارای مزیت‌هایی است خصوصاً هنگامی‌که زمان لازم برای به وجود آمدن اختلاف ژنتیکی میان جمعیت‌ها وجود نداشته باشد. مارکرهای ژنتیکی معمولاً نسبت به تبادل ژنی پایین میان جمعیت‌ها و درنتیجه، یکسان بودن آن‌ها ازلحاظ ژنتیکی بسیار حساس هستند؛ بنابراین مارکرهای مولکولی برای تعیین وجود اختلاف میان جمعیت‌ها ناکافی بوده و در عوض مارکرهای ریختی می‌توانند تغییرات ریخت‌شناسی ناشی از اختلاف زیستگاه‌های جداشده از هم را مشخص کنند. ازاین‌رو تحلیل‌های ریخت سنجی می‌تواند گام نخست در ارزیابی ساختار جمعیتی یک گونه باشد (توران، ۱۹۹۹).

ویژگی‌های ریخت سنجی برخلاف ویژگی‌های شمارشی در طول دوران زندگی ثابت نیستند، با اندازه بدن ماهی ارتباط داشتند و به‌طور پیوسته با افزایش اندازه بدن تغییر می‌کنند؛ بنابراین، باید اثر اندازه‌ها را کاهش داد. معمولاً در مطالعات ریخت سنجی ماهیان، به‌جز در مواردی که هدف، تعیین اختلاف در اندازه متوسط دو گروه از ماهیان باشد، اثر اختلاف اندازه نمونه‌ها از تغییرات شکل بدن حذف می‌شود، چراکه اختلاف بین گروه‌ها باید ناشی از اختلاف شکل بدن باشد و نه اختلاف در اندازه نسبی آن‌ها. به همین دلیل اصلاح داده‌های خام ریخت سنجی به متغیرهایی که مستقل از اندازه بدن بوده و تنها اختلاف شکل را نشان می‌دهند، نخستین گام در تحلیل آماری داده‌های ریخت سنجی است. به‌منظور حذف اثر اندازه، داده‌های مورفومتریک قبل از تجزیه‌وتحلیل به کمک فرمول الیوت استاندارد می‌شوند. استاندارد کردن داده‌های مورفومتریک تغییرات ناشی از رشد آلومتریک را کاهش خواهد داد (توران، ۱۹۹۹).

$$M_{(t)} = M_{(o)} (L/ L_{(o)})^b$$

اجزای فرمول بالا عبارت هستند از M_t: مقادیر استانداردشده صفات؛ M_o: طول صفات مشاهده‌شده؛ L: میانگین طول استاندارد برای کل نمونه و برای همه مناطق؛ L_o: طول استاندارد هر نمونه؛ b: ضریب رگرسیونی بین log Mo و log Lo برای هر منطقه).

تصویر ۱-۲: صفات ریخت سنجی موردبررسی: طول کل(TL) طول استاندارد(SL) طول سر(C) فاصله بین نوک پوزه و منفذ مخرجی(Pan) فاصله پیش باله مخرجی(aA) فاصله پیش باله شکمی(aV) فاصله پیش باله سینه‌ای(aP) فاصله پیش باله پشتی(aD) طول ساقه دمی(Lpc) طول باله پشتی(lD) طول باله مخرجی(lA) طول باله دمی(lC) طول باله سینه‌ای(lP) طول باله شکمی(lV) فاصله بین باله شکمی و منفذ مخرجی(Van) پهنای سر(hc) حداکثر ارتفاع بدن(H) حداقل ارتفاع بدن(h) عرض سر (Laco)حداکثر پهنای بدن(Lac) فاصله بین چشم‌ها(io) قطر چشم(o) فاصله پیش حدقه چشمی(prO) فاصله پس حدقه چشمی(poO) قاعده باله پشتی (D) قاعده باله مخرجی(A) قاعده باله شکمی(V) قاعده باله سینه‌ای(P) (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

در دهه‌ی ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ ریخت شناسان استفاده از ابزارهای آماری چند متغیره را برای شرح و توصیف الگوهای تنوع شکل در درون و بین گروه‌ها شروع کردند. این رویکرد در حال حاضر ریخت سنجی سنتی[1] یا ریخت سنجی چند متغیره نامیده می‌شود. مطالعات ریخت سنجی سنتی بر پایه یکسری از اندازه‌گیری‌هایی که اختلاف اندازه و شکل بدن را نشان می‌دهد، استوارشده و داده‌های حاصل پیوسته بوده و با افزایش اندازه و سن ماهی به‌طور مداوم تغییر می‌کند. در ۵۰ سال گذشته، مطالعات ریخت سنجی بر پایه مجموعه‌ای از ویژگی‌ها شکل گرفته است (توران، ۱۹۹۹).

سپس کارآیی داده‌های اصلاح‌شده از طریق آزمون معنی‌دار بودن همبستگی بین متغیر اصلاح‌شده و طول استاندارد موردسنجش قرار می‌گیرد. معنی‌دار نبودن این همبستگی، نشان‌دهنده

1. Traditional Morphometric

حذف کامل اثر اختلاف اندازه از داده‌هاست. برای تعیین اختلاف بین گونه‌های موردمطالعه در هر یک از صفات، از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) استفاده می‌شود. برای جداسازی گونه‌ها با استفاده از رابطه ماتریسی خصوصیات ریخت‌شناسی، آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)، تحلیل متغیرهای کانونی (CVA) و تحلیل تابع متمایزکننده (DFA) انجام می‌شود و در مورد هر یک از صفات استخراج‌شده، صفات اصلی مشخص می‌شود. همچنین دندروگرام صفات ریخت سنجی بر اساس فاصله اقلیدسی رسم می‌شود (حقیقی و همکاران، ۱۳۹۴).

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) که بر پایه کوواریانس ماتریس داده‌های اندازه‌گیری شده است، منتج به رسم نمودار به‌منظور تعیین اختلاف در میان‌گونه‌های موردمطالعه می‌شود. تحلیل مؤلفه‌های اصلی، واریانس‌های مرتبط با هر تعداد از متغیرهای اندازه‌گیری شده را به‌صورت تعداد کمتری از مؤلفه‌های اصلی ترکیب و خلاصه می‌کند. این مؤلفه‌ها ترکیب خطی متغیرهایی هستند که تغییرات شکل بدن را در کل نمونه‌ها نشان می‌دهند. تحلیل تابع متمایزکننده (DFA) برخلاف تحلیل مؤلفه‌های اصلی نیاز به گروه‌بندی افراد از قبل دارد. نتایج تحلیل تابع متمایزکننده به کمک جدول گروه‌بندی به‌منظور قرار دادن افراد در هر گروه استفاده می‌شود و میزان موفقیت این گروه‌بندی بر پایه درصد افرادی که به‌طور صحیح در گروه‌های اصلی خود قرار می‌گیرند، تخمین زده می‌شود. همچنین از نرم‌افزارهای SPSS Excel و NTsys برای تجزیه‌وتحلیل‌های آماری و ترسیمی استفاده می‌شود (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

ازلحاظ توصیف اختلاف در شکل کلی بدن، اندازه‌گیری‌های سنتی دارای ضعف‌ها، معایب و انحرافاتی است که به‌طور خلاصه در زیر بیان‌شده است.

۱- غالب این اندازه‌گیری‌ها تنها بر پایه چند محور نظیر محورهای طولی[1] بدن و به‌ندرت ارتفاع و عرض بدن تنظیم شده است. بنابراین اطلاعات مربوط به بسیاری از داده‌ها تکراری شده و این در حالی است که فاقد اطلاعات مربوط به‌اندازه‌گیری‌های اریب[2] است.

۲- در روش سنتی اندازه‌گیری‌های ریخت سنجی، نواحی مختلف بدن به‌طور یکسان بررسی نمی‌شود، به‌طوری‌که بعضی از قسمت‌های بدن دارای اطلاعات بیشتر بوده و دیگر قسمت‌ها کمتر بررسی می‌شوند (توران، ۱۹۹۹).

۳- بعضی از نقاط انتخاب‌شده نظیر نوک پوزه و انتهای ستون مهره در روش سنتی به‌طور تکراری مورداستفاده قرار می‌گیرد و هرگونه عدم اطمینان در تعیین موقعیت صحیح این نقاط در تمامی این اندازه‌گیری‌ها تأثیر منفی می‌گذارد.

۴- بسیاری از نقاط انتخاب‌شده در روش‌های سنتی ریخت سنجی، به‌جای این‌که تشریحی

1. Longitudinal axes
2. Oblique

باشـند، حد نهایی[1] هسـتند. نقاط تشریحی شامل یکسری از نقاط همتا[2] (دارای پراکنش یکسـان بر روی بدن) بوده که توسـط پاره‌ای از ویژگی‌های ثابت ریخت‌شـناسـی بدن شـناسـایی‌شـده‌اند، اما نقاط حد نهایی به‌صـورت واژه‌های حداکثر یا حداقل تعریف‌شده‌اند (مثل بیشترین ارتفاع بدن) و موقعیت آن‌ها از یک شکل به شکل دیگر متغیر است (توران، ۱۹۹۹).

۵- در روش‌های سـنتی اندازه‌گیری‌های ریخت سـنجی، بسیاری از اندازه‌گیری‌ها بزرگ بوده و بخش وسـیعی از بدن را می‌پوشـاند. ازآنجاکه فواصـل کوتاه نسـبت به فواصـل دور حاوی اطلاعات جامع‌تر و مکانی‌تری[3] است، بنابراین کوواریانس‌های[4] میان فواصل دور بیان‌کننده کوواریانس میانگین‌هاست و درنتیجه، اطلاعات کمتری از شکل بدن ارائه می‌کند.

نمودار ۱-۳: دندروگرام UPGMA صفات ریخت سنجی بر اساس فاصله اقلیدسی در مورد هفت گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران با تأکید بر مشابهت صفات ریخت سنجی گونه *A. atropatenae* در حوضه ارومیه و نمک (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

1. Extremal
2. Homologous
3. Localized
4. Covariance

نمودار ۱-۴: پراکنش افراد بر اساس روابط عامل‌های استخراجی اول و دوم در مورد صفات ریخت سنجی هفت گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

نمودار ۱-۵: Scree plot آنالیز PCA در مورد صفات ریخت سنجی هفت گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

نمودار ۱-۶: نمودار حاصل از آزمون CVA در مورد صفات ریخت سنجی هفت گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

جدول ۱-۱: نتایج حاصل از آزمونMANOVA/CVA در مورد صفات ریخت سنجی هفت گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

Wilks' lambda:	0.001516	**Pillai trace:**	3.431
df1:	156	**df1:**	156
df2:	712	**df2:**	750
F:	9.239	**F:**	6.422
p(same):	1.761E-98	**p(same):**	3.276E-69
Eigenvalue 1:	9.369	**Percent:**	53.94
Eigenvalue 2:	3.86	**Percent:**	22.22

Constraints: 0

Hotelling's pairwise comparisons, Bonferroni corrected \ uncorrected:

	1	31	61	67	90	93	123
1		3.85174E-17	0.000226054	1.43399E-09	0.00224166	4.35619E-09	1.61527E-14
31	8.08865E-16		0.000944128	1.80904E-13	0.000171411	5.49291E-16	0.000254986
61	0.00474713	0.0198267		0.0390956	Fail	0.00707133	0.000574827
67	3.01137E-08	3.79898E-12	0.821008		Fail	5.49335E-07	6.292E-10
90	0.0470749	0.00359964	Fail	Fail		9.8961E-06	0.00035902
93	9.148E-08	1.15351E-14	0.148498	1.1536E-05	0.000207818		7.41486E-15
123	3.39207E-13	0.0053547	0.0120714	1.32132E-08	0.00753941	1.55712E-13	

نمودار ۱-۷: توابع متمایزکننده ۱ و ۲ در مورد صفات ریخت سنجی هفت گونه از ماهیان. جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۱-۸: دندروگرام UPGMA صفات ریخت سنجی بر اساس فاصله اقلیدسی در مورد هفت گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

روش شبکه‌ای تراس[1]

درگذشــته بررسی‌های ریخت‌سنجی بر اساس یکسری اندازه‌گیری‌های سنتی حول محور بدن و سر بود. محدودیت عظیم ویژگی‌های ریخت ســـنجی این اســـت که تنوع فنوتیپی دقیقاً تحت کنترل ژنتیک نبوده و تحت تأثیر عوامل محیطی نیز قرار دارد که منجر به ســازگاری با تغییرات محیطی و تغییر در فیزیولوژی و رفتار و درنتیجه تغییر در ریخت‌شــناســی می‌شــود. با توجه به محدودیت و ضعف اندازه‌گیری‌های قدیمی، روش جدید اندازه‌گیری ریخت سنجی به نام سیستم شبکه تراس در تعیین تنوع با استفاده از صفات مورفومتریک وارد شد (توران، ۱۹۹۹).

روش جدیدی از اندازه‌گیری‌های ریخت سنجی به‌منظور تعیین تفاوت میآن‌گونه‌ها و به‌خصوص جمعیت‌ها به‌طور فزاینده‌ای مورداستفاده قرارگرفته است که به آن شبکه یا پروتکل تراس می‌گویند. این روش شامل مجموعه منظمی از فواصل بوده که این فواصل بین نقاط از پیش طراحی‌شده که به آن‌ها نقاط نشــانه[2] می‌گویند، دورتادور بدن اندازه‌گیری می‌شود و بدن را به واحدهای کاری تقسیم می‌کند. اندازه‌گیری‌های محاســبه‌شــده بین لبه، نشانه‌هایی است که از یک الگوی خاص چهارضلعی یا ســلولی در ســراسر شکل بدن پیروی می‌کند. روش تراس فاقد ضعف‌ها و معایب روش‌های سنتی ریخت ســنجی اســت. از طرفی استفاده از روش‌های آماری توسعه‌یافته‌ی مختلف آنالیز واریانس‌ها و محاسبه همبستگی ضرایب، میزان دقت را افزایش می‌دهد. اندازه‌گیری‌های ریخت سنجی ادغام‌شده با آنالیزهای تصــاویر، روشــی برای بهبود فهم ساختار ذخایر ماهی ارائه می‌دهد (حقیقی و همکاران، ۱۳۹۱).

روش شـــبکه تراس اطلاعات بیشـــتری درباره تفاوت‌های شـــکل بدن با توجه به مکان و منطقه موردبررسی نسبت به‌اندازه‌گیری‌های قدیمی می‌دهد. همچنین روش تراس در توضیح تفاوت ریخت شــناختی بین گونه‌های بســیار نزدیک و مشــابه نسبت به روش سنتی قدرتمندتر است. تصویر ۱-۹ الگوی روش تراس را به‌عنوان‌مثال در نوعی ماهی نشان می‌دهد.

---

1. Truss Network
2. Landmark

تصـویر ۱-۹: الگوی روش تراس و موقعیت لندمارک‌ها و شـبکه تراس حاصل از اتصال لندمارک‌ها در سمت چپ شاه‌کولی (*A. chalchoides*). ۱. نوک دهان ۲. ابتدای چشم ۳. انتهای چشم ۴. نقطه شروع فلس در سطح پشتی ۵. قاعده درپوش آبششی ۶. انتهای درپوش آبششی ۷. ابتدای باله سینه‌ای ۸. ابتدای باله شکمی ۹،۱۰. قسمت قدامی و خلفی باله پشتی ۱۱،۱۲. بخش قدامی و خلفی باله مخرجی ۱۳. قسمت بالایی شروع باله دمی ۱۴. قسـمت پایینی شـروع باله دمی ۱۵. قسمت میانی انتهای ساقه دمی (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

مزیت‌های روش تراس نسبت به روش سنتی به شرح زیر است:

۱. مجموعه اندازه‌گیری‌های روش تراس کل بدن را به‌صـورت منظم پوشـش می‌دهد و اختلافات شکل بدن را در جهات اریب، افقی و عمودی نمایان می‌کند.
۲. به کمک این روش می‌توان آرایش نقاط[1] را بدون از دست دادن اطلاعات مربوط به فواصل اندازه‌گیری شـده، بازسازی کرد. عمل بازسازی نقاط را می‌توان به‌صورت اشکال سه‌بعدی نمایش داد.
۳. امکان حذف خطاهای اندازه‌گیری به هنگام تحلیل آماری وجود دارد.
۴. به‌جای داده‌های اندازه‌گیری شـده تک‌تک افراد، می‌توان میانگین شکل کلی افراد را برای جمعیت‌ها و گونه‌ها به دست آورد.
۵. شـکل‌های بدن به‌منظور مقایسـه بین گروهی و خصـوصـاً تحلیل اختلاف شـکل بدن استاندارد می‌شود (توران، ۱۹۹۹).

روش کار در شبکه تراس

عکس‌برداری دیجیتال: ابتدا ۱۵ نقطه نشـانه یا لندمارک روی بدن هر ماهی در نظر گرفته می‌شود. نقاطی که ازلحاظ زیسـت‌شـناسـی تعریف مشـخصـی برای آن‌ها وجود دارد. سـپس تهیه عکس از

1. Configuration of landmarks

نمونه‌ها توسط دوربین مناسب و به کمک یک پایه‌ی عمود بر سطح جهت عکس‌برداری از ارتفاع انجام می‌شود. از همه نمونه‌ها تحت شرایط یکسان و با فاصله ثابت ۳۰ سانتی‌متری عکس‌برداری می‌شود. تصاویر مربوط به هر ایستگاه به‌صورت جداگانه به رایانه منتقل می‌شوند. برای تهیه داده‌ها و به‌منظور بررسی ویژگی‌های ریخت شناختی میان نمونه‌ها از گونه‌های موردمطالعه با استفاده از سیستم شبکه‌ای تراس، در ابتدا تصاویر تهیه‌شده با دوربین دیجیتال، توسط نرم‌افزار tpsUtil مرتب می‌شوند. سپس با استفاده از این نرم‌افزار و به کمک ابزار Digitize landmarks، ۱۱ لندمارک یا نقطه دورتادور حاشیه بیرونی بدن ماهی و ۴ لندمارک روی سر و بدن ماهی انتخاب می‌شود. سپس فواصل مابین این نقاط بر روی سمت چپ بدن ماهی بررسی می‌شود. نرم‌افزار tpsDig همانند جدول مختصات عمل کرده، هر لندمارک شامل یک X و یک Y است. سپس داده‌ها با فرمت tps ذخیره می‌شوند.

پس‌ازآن، روی‌هم‌گذاری نمونه‌ها بر اساس روش GLS = GPA[1] انجام می‌شود و پروکراست فواصل اندازه مرکز به دست می‌آید که اثر اندازه، موقعیت و جهت در آن‌ها به‌طور کامل حذف خواهد شد. سپس با استفاده از فاصله‌های اصلاح‌شده ریخت سنجی برای تعیین اختلاف بین گونه‌های موردبررسی، از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده می‌شود. برای جداسازی گونه‌ها با استفاده از رابطه ماتریسی خصوصیات ریخت‌شناسی، از تجزیه‌وتحلیل تابع متمایزکننده[2] (DFA)، تحلیل متغیرهای کانونی[3] (CVA) و آزمون تجزیه مؤلفه‌های اصلی[4] (PCA) استفاده می‌شود و در مورد هر یک از صفات استخراج‌شده، صفات اصلی مشخص می‌شود. در تجزیه به عامل‌ها از ضریب کایزر[5] (KMO) نیز استفاده می‌شود، به‌طوری‌که اگر مقدار این ضریب بزرگتر از ۰/۶ باشد، بیان‌کننده این نکته است که روش تجزیه به عامل‌ها مناسب است. همچنین دندروگرام صفات ریخت‌سنجی مطلق بر اساس فاصله اقلیدسی توسط نرم‌افزار NTSYSpc V. 2.02i رسم می‌شود (حقیقی و همکاران، ۱۳۹۱).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) که بر پایه کوواریانس ماتریس داده‌های اندازه‌گیری شده است، منتج به رسم نمودار به‌منظور تعیین اختلاف در میان‌گونه‌ها می‌شود. درواقع یک روش عینی برای یافتن شاخص‌هایی است که می‌تواند تغییرات داده‌ها را در صورت امکان به‌طور فشرده و خلاصه در چند مؤلفه اصلی بیان کند. تحلیل مؤلفه‌های اصلی، واریانس‌های مرتبط با هر تعداد از متغیرهای اندازه‌گیری شده را به‌صورت تعداد کمتری از مؤلفه‌های اصلی ترکیب و خلاصه کرده که

1. Generalized (procructes) Least Squares Orthogonal
2. Discriminant Factor Analysis
3. Canonical Discrimination Analysis
4. Principal Components Analysis
5. Kaiser Meyer Olkin

این مؤلفه‌ها ترکیب خطی متغیرهایی هستند که تغییرات شکل بدن را در کل نمونه‌ها نشان می‌دهند. در تحلیل مؤلفه‌های اصلی نیازی به گروه‌بندی افراد از قبل نیست (حقیقی و همکاران، ۱۳۹۴).

تحلیل متغیرهای کانونی(CVA): برای بررسی میزان حداکثر جدایی بین گروه‌ها از این آزمون استفاده می‌شود (توران، ۱۹۹۹).

تحلیل تابع متمایزکننده(DFA) برخلاف تحلیل مؤلفه‌های اصلی نیازمند گروه‌بندی افراد از قبل است. نتایج تحلیل تابع متمایزکننده به کمک جدول گروه‌بندی به‌منظور قرار دادن افراد در هر گروه استفاده می‌شود و میزان موفقیت این گروه‌بندی بر پایه درصد افرادی که به‌طور صحیح در گروه‌های اصلی خود قرار می‌گیرند، تخمین زده می‌شود. تعداد نمونه‌های موردبررسی حداقل باید ۳/۵ برابر تعداد صفاتی که برای آنالیز استفاده می‌شوند، انتخاب شود (توران، ۱۹۹۹؛ منصوری چرهی و همکاران، ۲۰۱۶).

آنالیز خوشه‌ای(Cluster): برای رسم دندروگرام و نمایش فاصله گروه‌ها بر اساس این روش، از نرم‌افزار NTSYS Version 2.02 استفاده می‌شود. رسم دندروگرام UPGMA[1] صفات ریختی اصلاح‌شده با سیستم شبکه‌ای تراس بر اساس فاصله اقلیدسی نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف ماهیان در چه موقعیتی از هم قرار دارند (توران، ۱۹۹۹).

نمودار ۱-۱۰: نمودار مؤلفه ۱به ۲ در آزمون تجزیه مؤلفه‌های اصلی(PCA) برای صفات ریختی اصلاح‌شده با سیستم شبکه‌ای تراس ۵ گونه از ماهیان جنس*Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳)

1. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

نمودار ۱-۱۱: Scree plot آنالیز PCA در مورد صفات ریختی اصلاح‌شده با سیستم شبکه‌ای تراس ۵ گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳)

نمودار ۱-۱۲: نمودار مؤلفه ۱به ۲ در تحلیل متغیرهای کانونی (CVA) برای صفات ریختی اصلاح‌شده با روش شبکه‌ای تراس در ۵ گونه از ماهیان جنس*Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

جدول ۱-۲: نتایج حاصل از آزمون MANOVA/CVA برای صفات ریختی اصلاح‌شده با سیستم شبکه‌ای تراس ۵ گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

Wilks' lambda:	0.0001546	Pillai trace:	3.474
df1:	420	df1:	420
df2:	530.6	df2:	540
F:	10.08	F:	8.495
p(same):	2.147E-124	p(same):	2.508E-110
Eigenvalue 1:	22.75	Percent:	56.68
Eigenvalue 2:	8.712	Percent:	21.71

Constraints: 0

Hotelling's pairwise comparisons, Bonferroni corrected \ uncorrected:

	A0	CH0	F0	H0	M0
A0		Fail	Fail	0.378322	0.0647721
CH0	Fail		Fail	Fail	0.964398
F0	Fail	Fail		Fail	Fail
H0	1	Fail	Fail		3.946E-06
M0	0.647721	1	Fail	3.946E-05	

تصویر ۱-۱۳: توابع متمایزکننده ۱ و ۲ برای صفات ریختی اصلاح‌شده با سیستم شبکه‌ای تراس ۵ گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۱-۱۴: دندروگرام حاصل از آزمون کلاستر برای صفات ریختی اصلاح‌شده با سیستم شبکه‌ای تراس ۵ گونه از ماهیان جنس*Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۱-۱۵: نمودار پراکنش نقاط نمونه‌ها روی PC1 و PC2 مربوط به ۵ گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

ریخت‌سنجی هندسی[1]

شـــکل یک موجود زنده ارتباط به‌مراتب بیشـــتری با ژنتیک دارد، ولی اندازه ممکن اســـت درنتیجه شـرایط محیطی تغییرپذیری داشته باشد. در دهه ۱۹۸۰ تغییری اساسی در ماهیت مجموعه داده‌ها و آنالیز آن‌ها و همچنین در روش ســاختارهای ریخت شــناختی و کمی کردن آن‌ها شــروع شد. این تغییر بر روی نقاط مختصـات لندمارک و اطلاعات ژئومتریک در موقعیت نسـبی‌شان متمرکز شد و همچنین، توسط چنین روشی نتایج آنالیزهای چند متغیره می‌تواند به‌صورت شکل فضایی لندمارک بررسی شود. این روش جدید، ریخت‌شناسی هندسی نامیده شد. در اوایل قرن بیستم زیست‌شناسی شروع به تحول از یک زمینه توصیفی به یک علم کمی کرد.

پیش‌قدم این علم تومسون در سال ۱۹۱۷ است که از تغییر شکل شبکه‌ها برای تغییر ارتباطات اشکال مختلف بهره برد، ولی روش او فاقد هرگونه ابزار عددی بوده و به‌طور خالص، روش نمایشی و گرافیکی اسـت که اجازه می‌دهد اشـکال به‌صـورت بصری دوبه‌دو مقایسه شوند. علم ریخت سنجی هندسی، روش ریخت سنجی است که با مطالعه شکل در فضای دوبعدی یا سه‌بعدی سروکار دارد و با آنالیز اشکال زیست‌شناختی به‌طوری‌که تمامیت فیزیکی شکل در دو یا سه بعد حفظ شود، تقویت می‌شود. از دیدگاه کلی، موضوع ریخت سنجی هندسی مجموعه‌ای از مختصات کارتزین X, Y,Z و یا X,Y به ترتیب برای اجســـام ســـه‌بعدی یا دوبعدی اســـت. برای مثال، اگر تفاوت میانگین بین جنس‌ها و گونه‌ها مدنظر اسـت، برای هر گروه یکجایگاه لند مارک‌ها[2] قابل‌محاسـبه اسـت و سپس این جایگاه در یک سری داده جدید قرار می‌گیرند و این آرایش فضایی مجموع خواهد بود که با هم مقایسه می‌شوند.

لندمارک‌هایی که بر روی یک فرد قرار داده می‌شـــوند، باید به‌وضـــوح با لندمارک‌های فرد دیگر منطبق باشـــد، به این معنا که لندمارک‌های متناظر باید در نقاطی روی ســـطح موضـــوع که دارای مفهوم خاص مشابهی در تمام نمونه‌ها است، ثابت شوند. لندمارک‌ها باید تا حد ممکن مقتضی شکل ســاختمان تحت مطالعه را نشان دهد و زمانی که لندمارک‌ها به تعداد کافی نباشند، می‌توان نقاطی را حول قسمتی یا تمام خطوط بیرونی[3] اختیار کرد. در این روش، تمام سطح یک ساختمان (دریک فضـــای دوبعدی یا ســـه‌بعدی) را انتخاب کرده و ســـپس خط ســـیر پیرامونی به رقم تبدیل‌شـــده (Digitize) در طول خطوط بیرونی و یا بالای ســـطح آن انجام می‌شـــود. ارتباطات هندســـی بین لندمارک‌ها در مختصـــات خامشـــان به‌صـــورت ذاتی نبوده و این ارتباط توســـط واردکردن یک تابع مناسـب در فضـای دوبعدی یا سـه‌بعدی به دسـت می‌آید. اگر لندمارک‌های مناسـبی انتخاب نشده

1. Geometric Morphometric
2. Shape configuration
3. Outline

باشـد، ساده‌ترین روش برای به دست آوردن یک شکل، ثبت مختصات لندمارک‌ها و سپس از طریق محاســبات ریاضــی، بیرون کشــیدن تأثیر تغییرات در جهت، موقعیت و اندازه اســت. در حقیقت لندمارک‌ها نقاطی هســتند که برای ردیابی و یافتن تغییرات شــکل ســاختمان‌های موردمطالعه، اســتفاده می‌شوند. لندمارک‌ها معمولاً به سه گروه تقسیم می‌شوند که شامل لندمارک‌های تیپ ۱، ۲ و ۳ اســت. لندمارک‌های تیپ ۱، لندمارک‌های کلاسیک و دارای همولوژی می‌باشند، مانند محل اتصـال استخوان به تاندون یا محل انشعاب رگبال‌های بال حشرات. لندمارک‌های تیپ ۲، هم ازنظر زیســت‌شــناسی و هم ازنظر هندسی اهمیت دارند، مانند نقاطی که معرف حداکثر خمیدگی هستند. لندمارک‌های تیپ ۳، منحصــراً هندســی بوده، مانند دو انتهای یک خمیدگی (مانند دو انتهای قطر یک شــی). معمولاً لندمارک‌های تیپ ۱ و ۲ به‌عنوان لندمارک‌های همولوگ در نظر گرفته می‌شوند (توران، ۱۹۹۹؛ وثاقی و همکاران، ۱۳۹۵).

تصویر ۱-۱۶: استفاده از کولیس برای اندازه‌گیری‌های ریخت سنجی (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

تصـــویر ۱-۱۷: تصـــویر شـــاه‌کولی (*A.chalchoides*) و ۱۵ لندمارک تعیین‌شـــده بر روی آن در روش ریخت‌سـنجی هندسی. ۱.نوک دهان ۲.ابتدای چشم ۳. انتهای چشم ۴. نقطه شروع فلس در سطح پشتی ۵. قاعده درپوش آبششی ۶. انتهای درپوش آبششی ۷. ابتدای باله سینه‌ای ۸. ابتدای باله شکمی ۱۰و ۹. قسمت قدامی و خلفی باله پشـتی ۱۲و ۱۱. بخش قدامی و خلفی باله مخرجی ۱۳. قسـمت بالایی شـروع باله دمی ۱۴. قسمت پایینی شروع باله دمی ۱۵. قسمت میانی انتهای ساقه دمی (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

روش کار در ریخت سنجی هندسی

ازنظر روش‌شـناسـی، ریخت سـنجی شـامل ترادفی از سـه مرحله اسـت. اول هر تعداد موضـوع موردمطالعه که با تعداد لندمارک‌های مشـخص در یک دسـتگاه مختصـات دو یا سه‌بعدی بیان‌شده، روی مبدأ مختصـات پیاده می‌شـوند و با اندازه مرکزی واحد (سـنتروئید سـایز)، مقیاس‌گذاری می‌شـوند. سپس به نحوی چرخش داده می‌شوند که مجموع مربع فواصل اقلیدسی بین لندمارک‌ها روی هر نمونه و لندمارک‌های همتایش روی یک آرایش فضـایی میانگین برسـد. تغییر شـکل‌های (شـامل چرخش، ترازبندی و جایگزینی در مبدأ) هر موضوع متعلق به یک نمونه را به‌عنوان نقطه‌ای در فضـای شـکل کندل تعریف می‌کنند. آرایش فضـایی حاصل از آن‌ها به‌عنوان نمایش کلی از بدن ماهی به کار می‌رود تا نمایانگر تفاوت بین شـکل‌ها باشـد. اندازه، در قالب اندازه مرکزی محاسـبه می‌شـود و به‌صـورت ریشـه دوم مجموع مربع فواصـل بین هر نشـانه‌گذاری تا مرکز ثقل محاسـبه می‌شود. آنالیز واریانس ANOVA و MANOVA برای بررسی درجه معنی‌داری تفاوت‌های بین گروه‌ها پس از بررسـی پیش‌فرض‌ها انجام می‌شـود (برای انجام این آنالیز باید تعداد نمونه‌ها الزاماً از تعداد متغیرها بیشتر باشد، در غیر این صورت نمی‌توان این آنالیز را در نرم‌افزار انجام داد). در روش لندمارک، بر اسـاس روش GLS = GPA روی‌هم گذاری نمونه‌ها انجام می‌شـود. مختصـات نشـانه‌گذاری‌های تراز شـده برای هر نمونه میانگین‌گیری می‌شـود تا یک آرایش فضـایی میانگین (consensus) تولید شـود. این آرایش فضـایی میانگین یک نقطه تانژانتی را بین فضـای شـکل و

تقریب خطی متأثر از تابع شبکه تغییر شکل (Thin-plate spline) در فضای اقلیدسی تعریف می‌کند. شبکه تغییر شکل برای نمایش گرافیکی جهت تغییرات شکل نسبت به شکل مرجع به کار می‌رود. این روش اجازه درون‌یابی تغییرات شکل را از طریق تغییر شکل یک شبکه فراهم می‌سازد. این تکنیک شامل انطباق یک تابع با مختصات نشانه‌گذاری‌های هر نمونه در مقابل شکل مرجع است، به‌طوری‌که کلیه نشانه‌گذاری‌های هومولوگ بر هم منطبق می‌شوند. برای هر آنالیز RW، شبکه تغییر شکل تعیین‌شده و بر روی نمودار تحلیل متغیرهای کانونی (CVA) منطبق می‌شود تا تفسیر جهت تغییر شکل بین جمعیت‌ها و گونه‌ها را به‌راحتی امکان‌پذیر سازد. برای نمایش پراکنش افراد در فضای حاصل از کلیه متغیرها، آنالیز مؤلفه‌های اصلی و به‌منظور مطالعه حداکثر جدایی بین گونه‌ها، آنالیز متغیرهای کانونی (CVA) با استفاده از نرم‌افزار PAST و آنالیز توابع متمایزکننده (DFA) با استفاده از نرم‌افزار Morpho J استفاده می‌شود. محاسبه شکل میانگین با استفاده از نرم‌افزار tpsRelw انجام می‌شود. از نرم‌افزار Morpho J هم برای به تصویر کشیدن تفاوت‌های شکلی استفاده می‌شود (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

آنالیز شکل[1]: ازآنجاکه ریخت سنجی هندسی بر مقایسات جفت‌جفت موضوعات است و پراکنش آن‌ها را در نظر نمی‌گیرد، لذا اندازه نمونه‌ها و تعداد نمونه‌ها و هم تعداد لندمارک‌ها در اغلب موارد موردمطالعه مطرح نیست و نیز لندمارک‌هایی که روی یک فرد قرار داده می‌شود، باید به‌وضوح با لندمارک‌های فرد دیگر مرتبط باشد. به این معنا که لندمارک‌های متناظر باید در نقاطی روی سطح موضوع که دارای مفهوم خاص مشابهی در تمام نمونه است، ثابت شوند. برای تهیه داده‌ها با استفاده از ریخت سنجی هندسی در ابتدا تصاویر تهیه‌شده با دوربین دیجیتال، توسط نرم‌افزار tpsUtil version 1.44 مرتب می‌شوند. سپس با استفاده از نرم‌افزار tpsDig version 2.16 و با استفاده از ابزار Digitize landmarks، ۱۱ لندمارک یا نقطه دورتادور حاشیه بیرونی بدن ماهی و ۴ لندمارک روی سر و بدن ماهی انتخاب می‌شود. خروجی حاصل، وارد برنامه tpsRelw Version 1.46 شده، نقاط Centroid Size نمونه‌های هر ایستگاه به دست می‌آید. به این صورت که از خروجی‌های حاصل از هر ایستگاه به‌طور جداگانه، از طریق دکمه Data در برنامه بارگذاری می‌شود و از طریق دکمه Consensus، Centroid Size هر گروه از داده‌ها به دست می‌آید.

تحلیل‌های آماری: داده‌های به‌دست‌آمده توسط tpsDig2 به برنامه آماری PAST (Paleontological Statistics) که نرم‌افزار قدرتمندی جهت آنالیزهای شکلی می‌باشد، جهت آنالیزهای دقیق گروه‌ها منتقل می‌شود. برای حصول اطمینان از وجود تفاوت بین گونه‌های

1. Shape Analysis: Landmarks

موردمطالعه آنالیز واریانس یک‌طرفه برای میانگین اندازه‌های سنترویید انجام می‌شود (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

آنـالیز مؤلفـه‌هـای اصـــلی (PCA): برای انجام تحلیل مؤلفه‌های اصـــلی از نرم‌افزار PAST version 1.94 اســتفاده می‌شــود. برای این منظور فایل حاوی اطلاعات Procrustes شــده در برنامه باز می‌شــود. ســپس با انتخاب گزینه Row color از منوی Edit، برای هر ایســتگاه رنگی انتخاب می‌شــود تا بتوان در هنگام رســم Scatter، آن‌ها را از یکدیگر تشــخیص داد. برای انجام تحلیل از منوی Multivar گزینه Principal components انتخاب می‌شود.

آنالیز واریانس چند متغیره(MANOVA/CVA): برای آنالیزهایی که بر اســاس شــکل انجام می‌شود، باید اندازه را در آن‌ها از بین برد. این کار با Procrustes کردن داده‌ها در نرم‌افزار PAST انجام می‌شــود. به‌این‌ترتیب جدا کردن گونه‌ها فقط بر اساس شکل صورت می‌گیرد. برای جدا کردن گونه‌ها از آنالیز واریانس چند متغیره[1] (MANOVA) اســتفاده شد. از این تست برای نشان دادن حداکثر جدایی بین گروه‌ها استفاده می‌شود (توران، ۱۹۹۹).

آنـالیزتـابع متمـایزکننـده(DFA): نتـایج تحلیـل تابع متمایزکننده به کمک جدول گروه‌بندی به‌منظور قرار دادن افراد در هر گروه اســتفاده می‌شود و میزان موفقیت این گروه‌بندی بر پایه درصد افرادی که به‌طور صـــحیح در گروه‌های اصـــلی خود قرار می‌گیرند، تخمین زده می‌شـــود (توران، ۱۹۹۹).

آنـالیز معنی‌داری تفـاوت‌هـای شـــکلی: برای تعیین معنی‌داری تفـاوت‌های شـــکل گونه‌های موردمطالعه از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون Tukey اســتفاده می‌شود که مقادیر P نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌های شـکلی در مقایســه دوبه‌دو گونه‌هاســت. به این منظور، از شــکل میانگین هرگونه اســتفاده می‌شــود که به‌صورت دوبه‌دو با یکدیگر مقایسه می‌شوند. برای تعیین و رسم شکل قالب هر گروه و برای مقایســه آن‌ها نســبت به یکدیگر از نرم‌افزار Morpho J اســتفاده می‌شــود (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

آنالیز کلاستر(Cluster): برای رسم دندروگرام و نمایش فاصله گروه‌ها بر اساس این تکنیک از نرم‌افزار NTSYS Version 2.02 اســتفاده می‌شــود. اگر تعداد نمونه‌ها زیاد باشــد، از داده‌های Consensus شـــده (میانگین داده‌ها) برای رســـم دندروگرام اســـتفاده می‌شـــود (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

---

1. Multivariate Analysis of Variance/CVA: Canonical Variates Analysis

نمودار ۱-۱۸: نمودار پراکنش نقاط نمونه‌ها روی CV1 و CV2 مربوط به ۵ گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۱-۱۹: توابع متمایزکننده ۱ و ۲ برای صفات ریختی اصلاح‌شده با روش هندسی بین ۵ گونه از ماهیان جنس*Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

نمودار ۱-۲۰ دندروگرام بر اساس فواصل اقلیدسی در مورد ۵ گونه از ماهیان جنس *Alburnus* در ایران (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

صفات شمارشی

۱۱ ویژگی شـمارشی (مریستیک) نیز به وسیلهٔ لوپ با بزرگنمایی ۱۰x بر روی نمونه‌های شمارش شـد که عبارت‌اند از تعداد شـعاع سخت باله پشتی، تعداد شعاع‌های نرم باله پشتی، تعداد شعاع‌های سخت باله دمی، تعداد شعاع‌های نرم باله دمی، تعداد شعاع‌های سخت باله مخرجی، تعداد شعاع‌های نرم باله مخرجی، تعداد شـعاع‌های سـخت باله شـکمی، تعداد شـعاع‌های نرم باله شـکمی، تعداد شـعاع‌های سـخت باله سـینه‌ای، تعداد شـعاع‌های نرم باله سـینه‌ای، تعداد فلس‌های خط جانبی. با توجه به این‌که ویژگی‌های شـمارشـی در طول دوران زندگی ماهی ثابت باقی می‌مانند و ارتباطی با اندازه ماهی ندارند، نیازی به حذف اثر اختلاف اندازه از این داده‌ها نیست (توران، ۱۹۹۹).

تصویر ۱-۲۱: تعیین صفات شمارشی به‌وسیله لوپ با بزرگنمایی x ۱۰ (خاتمی نژاد و همکاران، ۲۰۱۳).

برای جداسازی گونه‌ها با استفاده از رابطه ماتریسی خصوصیات شمارشی، آزمون تحلیل متغیرهای کانونی (CVA) و تحلیل تابع متمایزکننده (DFA) انجام می‌شود و در مورد هر یک از صفات استخراج‌شده، صفات اصلی مشخص می‌شود. همچنین دندروگرام صفات شمارشی بر اساس فاصله اقلیدسی رسم می‌شود (توران، ۱۹۹۹).

فصل دوم

فنون نمونه‌برداری و کالبدگشایی در آبزیان

فنون دقیق کالبدگشایی، نقش مهمی در تکرارپذیری و قابلیت اعتماد به نتایج تشریح، آسیب‌شناسی، سم‌شناسی، ایمنی‌شناسی، عصب‌شناسی و طبقه‌بندی ماهیان دارد. در آسیب‌شناسی، کالبدگشایی ماهی برای اهدافی مانند تشخیص عفونت‌های انزئوتیک و اپی‌زئوتیک، ایدیوپاتیک یا توکسیکوپاتیک و همچنین برای اطمینان از بررسی سلامت ماهیان پرورشی برای عرضه به بازار به کار می‌رود. در تحقیقات آبزی‌پروری کالبدگشایی کاربرد دیگری جهت ارزیابی‌اثرات غذاهای جایگزین بر روی ترکیب بدن و کارایی تبدیل غذا دارد که انعکاس آن در شاخص‌های سوماتیک (جسمی) مانند نسبت‌های اندازه کبد به بدن مشاهده می‌شود. ماهیان به‌عنوان شاخص‌هایی برای مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی مورداستفاده قرار می‌گردند. در این موارد، ممکن است لازم باشد که کالبدگشایی صحرایی برای تحقیق بر روی ماهی‌میری یا سطوح اثرات تحت کشنده مواد سمی از طریق ارزیابی شرایط اندام‌های درونی صورت گیرد در این مطالعات برش بافت‌ها برای آنالیز آلاینده‌های شیمیایی مختلف یا ارزیابی وسیع شاخص‌های سوماتیک صورت می‌گیرد که درمجموع می‌تواند استرس در یک جمعیت آلوده را در مقایسه با جمعیت‌های غیرآلوده نشان دهد (نوگا، ۲۰۱۰).

شاخص‌های سوماتیک و استرسی را همچنین می‌توان با کالبدگشایی صحرایی در هنگام تحقیقات سم‌شناسی آزمایشگاهی نیز به دست آورد. برای مثال، هنگامی‌که لازم است برای مشاهده جراحات سیستمیک (عمومی) حاصل از مواجهه حاد یا مزمن با آلاینده در محیط آزمایشگاه کالبدگشایی صورت گیرد. فواید حاصل از کالبدگشایی در آزمایشگاه این است که می‌توان از فنون پیشرفته‌تر با شرایط کنترل‌شده‌تری استفاده کرد. شیمی عصبی و سم‌شناسی رفتاری ماهیان نیز ممکن است نیازمند گشودن مغز باشد و این فرآیند در آزمایشگاه که کنترل مناسب‌تری برقرار است، بهتر صورت می‌گیرد (نوگا، ۲۰۱۰).

نحوهٔ تحویل نمونهٔ ماهی بیمار به آزمایشگاه

بسیاری از موارد به‌این‌ترتیب آغاز می‌شود که صاحب ماهی تماس گرفته و از وجود یک مشکل خبر می‌دهد. باید از صاحب ماهی درخواست شود که یک یا چند ماهی را برای آزمایش به درمانگاه منتقل کند (ماهیان نماینده). این نکته حائز اهمیت است که آیا صاحب مزرعه می‌پذیرد که ماهیانش را برای تشخیص بیماری قربانی کنیم یا خیر. افرادی که با ذوق و علاقه به پرورش ماهی روی می‌آورند، معمولاً مایل هستند که چند ماهی برای تعیین بیماری قربانی شوند، مگر این‌که ماهی موردنظر نادر بوده یا ماهی مولد گران‌قیمت باشد. با این‌که آزمایش‌های کامل بعد از مرگ

نسبت به بیوپسی اولویت دارد، اما در مورد بسیاری از ماهیان زینتی امکان‌پذیر نیست و تنها در خلال صحبت با صاحب ماهی می‌توان پی برد (نوگا، ۲۰۱۰).

اگر قرار است که مراجعه‌کننده، ماهی را به درمانگاه تحویل دهد، باید به او توصیه کنیم که هم نمونهٔ ماهی وهم نمونهٔ آب را در ظروف تمیز مجزا به درمانگاه انتقال دهد. بهترین ظروف، سطل‌های پلاستیکی تمیز (هرگز نباید در معرض صابون یا مواد شیمیایی دیگر قرار بگیرند)، خنک‌کننده‌های پلاستیکی، خنک‌کننده‌های استیروفوم، یا کیسه‌های آکواریومی پلاستیکی هستند. باوجوداین، ظروف شیشه‌ای غذا که به‌خوبی شسته شده باشند، نیز قابل‌قبول هستند. نیم لیتر آب برای آزمایش اصلی کیفیت آب کافی است (نوگا، ۲۰۱۰).

برای انتقال ماهی (با فرض اینکه رسیدن به درمانگاه کمتر از ۳۰ دقیقه به طول خواهد انجامید)، بنا بر قاعده، حدود یک لیتر آب به ازای هر سانتی‌متر ماهی مناسب است. اگر اکسیژن مازاد فراهم باشد، می‌توان از تراکم بیشتری استفاده کرد. بهتر است که ظرف ماهی را در داخل خنک‌کننده قرار دهیم تا از شوک حرارتی جلوگیری شود. ماهیان را می‌توان مستقیماً در داخل ظرف خنک‌کننده قرار داد. برای مسافت‌های طولانی‌تر بهتر است که منابع اکسیژن اضافی در خلال انتقال فراهم شود. می‌توان از کپسول‌های اکسیژن یا دستگاه‌های هواده قابل‌حمل برای تأمین اکسیژن می‌توان استفاده کرد. ماهیان کوچک را می‌توان با کیسه‌های آکواریومی پلاستیکی بسته انتقال داد.

امکان تشخیص یک بیماری، به کیفیت نمونه‌های تحویل داده‌شده بستگی مستقیم دارد. ماهیان زنده که علائم مشخص درمانگاهی یک بیماری را نشان می‌دهند، بهترین نمونه‌ها محسوب می‌شوند. نمونه‌های نگهداری شده در بیشتر موارد، حداقل استفاده را دارند، اما این امر در همهٔ موارد صادق نیست. روش‌های مختلف نگهداری بافت برای مشکلات معین، مفید هستند. نمونه‌های آب نیز زمان نگهداری معینی دارند (نوگا، ۲۰۱۰).

با این‌که در بسیاری از موارد ماهیان زینتی که به‌صورت منفرد (تک) نگهداری می‌شوند، به بهترین وجه به درمانگاه انتقال می‌یابند، اما اغلب مهم است که تأسیسات ماهیان در حال رشد، مانند پرورش ماهیان زینتی، خرده‌فروشی‌ها، عمده‌فروشی‌ها، یا کارگاه‌های تجاری ماهیان خوراکی بازدید شوند. این بازدید اجازه می‌دهد که ارزیابی کامل‌تری نسبت به تأسیسات و مدیریت به‌دست آید که اغلب عوامل ریشه‌ای ایجاد بیماری به‌حساب می‌آیند. روش‌های مورداستفاده برای تشخیص، مشابه ماهیان آکواریومی منفرد است.

ازآنجاکه معمولاً در کارگاه‌های پرورشی تجاری ماهیان بیشتری مبتلا می‌شوند، لذا ماهیان متعددی را می‌توان مورد آزمایش قرار داد که به تقویت تشخیص کمک می‌کند. معمولاً در مواقع همه‌گیری باید چهار تا شش ماهی را مورد آزمایش قرار داد و تا آنجا که ممکن است باید ماهیان

زنده مورداستفاده قرار گیرند. تنها استثناء زمانی است که همهٔ ماهیان زنده سالم به نظر برسند. در این موارد باید ماهیانی را که تازه مرده‌اند، آزمایش کرد.

اگر قرار است که ماهیان را برای ارائهٔ گواهی‌نامه به‌منظور تعیین وجود یا عدم وجود بیماری معین آزمایش کنیم، تعداد ماهیان مورد آزمایش بستگی به اندازهٔ جمعیت، شیوع بیماری موردبررسی و سطح اطمینان موردنظر دارد.

اخذ تاریخچه: هنگام ملاقات با صاحب ماهیان بیمار، باید تاریخچهٔ کاملی از بیماری گرفته شود. این تاریخچه از این نظر می‌تواند مفید باشد که سعی می‌کنیم تعیین نماییم آیا بیماری حاد است یا مزمن، زیرا این امر می‌تواند به ما کمک کند که تعدادی از وجوه افتراقی را حذف کنیم. بیماری‌های حاد مشخصاً مشکلاتی هستند که در عرض تنها چند روز توسعه‌یافته و منجر به شیوع چشمگیر بیماری و تلفات سنگین در این مدت می‌شوند. مشخصهٔ بیماری‌های مزمن، برخلاف بیمارهای حاد، این است که در طی چندین هفته یا بیشتر توسعه می‌یابند و تنها منجر به تلفات اتفاقی می‌شوند. همچنین اغلب این ماهیان در شرایط بد و نامناسبی قرار داشته و ممکن است بی‌اشتها باشند.

سؤالات مهمی که می‌توان پرسید، شامل موارد زیر است: چه مدت در واحد پرورشی (آکواریوم، استخر و غیره) ماهی نگهداری می‌شود؟ آیا همهٔ ماهیان تحت تأثیر قرارگرفته‌اند؟ اگرنه، کدام گروه تحت تأثیر قرارگرفته‌اند؟ آیا ماهیان هیچ‌گونه علائم رفتاری مانند فلاشینگ (مالش بدن بر روی اشیاء که نشان‌دهنده مشکلات پوستی است)، پایپینگ (قرار گرفتن نزدیک فاز بینابینی هوا و آب برای به دست آوردن اکسیژن که نشان‌دهندهٔ مشکلات مربوط به آبشش است) نشان می‌دهند؟ کمبود اکسیژن یکی از مشکلات متداول به‌حساب می‌آید. متأسفانه اکسیژن را تنها می‌توان در محل (استخر) به‌درستی اندازه‌گیری کرد. بنابراین، تاریخچه ممکن است برای ارزیابی، نقش قطعی داشته باشد. غالباً بهتر است از صاحب ماهیان درخواست شود که در مورد روش‌های متداول و تغذیه، تعویض آب و روش‌های مدیریتی دیگر توضیح دهد تا تاریخچهٔ درستی به دست آید. همچنین مهم است که تعیین کنیم چه درمان‌های مقدماتی، ازجمله استعمال دارو انجام‌شده است.

آزمایش فیزیکی بر روی ماهیان

هنگامی‌که یک پرورش‌دهنده ماهی خود را زنده به درمانگاه تحویل می‌دهد، باید فوراً دستگاه هواده در داخل ظرف نگهداری ماهی قرار داد. پس‌ازاینکه تاریخچهٔ کامل تهیه شد، باید ماهی را ازنظر اختلالات و ناهنجاری‌های رفتاری از نزدیک مورد آزمایش قرار داد. برای مثال، افزایش تنفس نشان می‌دهد که احتمالاً مشکلات آبششی یا مسمومیت با نیتریت وجود دارد و جراحات خارجی (برای مثال، توده‌ها، حالت ابری پوست در اثر افزایش تولید موکوس، خراشیدگی یا حالت نامنظم باله‌ها) نیز گویای وجود مشکل است. آزمایش آبشش‌ها نیز به‌راحتی با بیوپسی صورت می‌گیرد.

تغییرات رنگ به‌عنوان شاخصی در بهداشت ماهی

وجود رنگ‌دانهٔ ملانین در پوست ماهی تحت کنترل عصبی- غدد درون‌ریز (نوروآندوکرین) قرار دارد و بنابراین، تحت تأثیر هورمون‌هایی مانند اپی‌نفرین قرار می‌گیرد. هنگامی‌که ماهی مریض می‌شود، احتمالاً حفظ الگوی طبیعی رنگ‌دانه‌ها از اولویت کمتری نسبت به هموستاز وظایف حیاتی‌تر بدن برخوردار خواهد بود. بنابراین، اغلب ماهی مریض نسبت به ماهیان سالم‌تر همان مخزن، رنگ‌های غیرطبیعی از خود نشان می‌دهد. این علامت، یکی از پاسخ‌های متداول آزادماهیان در مقابل بیماری است و ماهی بیمار مشخصاً تیره‌تر از ماهی طبیعی می‌شود. تغییر رنگ در اثر کوری نیز ایجاد می‌شود که با حذف پیام‌های بینایی همراه است. این پیام‌ها برای حفظ الگوی رنگ طبیعی در نور روز موردنیاز است. غالباً ماهی در محیط‌های پرورشی دارای رنگ‌های درخشان‌تری نسبت به ماهیان وحشی است. ازآنجاکه پیام‌های شیمیایی که رنگ‌دانه‌ها را تحت کنترل دارند، از طریق اعصاب انتقال می‌یابند، آسیب عصب پریفرال (محیطی)، مانند آنچه که در اثر عدم ثبات مهره‌ها ایجاد می‌شود، می‌تواند سبب تغییرات موضعی در الگوی رنگ‌دانه‌ها شود. تغییر موضعی رنگ ممکن است در اثر تحریکات ناشی از آسیب‌های بافتی موضعی، مانند تغذیهٔ انگل‌ها، جراحات مزمن یا زخم‌های در حال التیام ایجاد شود که با تغییر وضعیت انتشار سلول‌های رنگدانه‌ای همراه است (نوگا، ۲۰۱۰).

معمولاً قرمزشدن بدن در اثر خونریزی‌ها ایجاد می‌شود که ممکن است به واسطهٔ عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی ایجادشده باشد و یا جراحات پوست در این امر دخیل باشند. از دست دادن بافت باله بسیار شایع است که از کیفیت پایین آب ناشی می‌شود. اتصال انگل‌ها نیز ضخیم شدن پوست را به همراه دارد و منجر به ایجاد کاست‌ها (بلورهای پروتئینی) یا نقاط سفیدرنگ می‌شود. مشاهدات مربوط به الگوی رنگ تا زمانی می‌تواند در بهترین حالت صورت گیرد که ماهی در عمل کارگاه پرورشی باشد، زیرا این الگوها ممکن است تحت تأثیر استرس حاد (برای مثال، قرار گرفتن در شرایط محصور) واقع شوند.

دیگر علائم درشت‌بینی متداول در بیماری‌ها

اغلب ماهیان بیمار به دورهم جمع می‌شوند و خود را از دستجات سالم‌تر جدا می‌کنند. ماهیان ضعیف در مجاری پرورش ماهی یا اکوسیستم‌های دیگری که با آب جاری فعالیت می‌کنند، اغلب نزدیک محل خروج آب یافت می‌شوند. ماهیان بیمار علائم رفتاری دیگری نیز نشان می‌دهند؛ ازجمله اینکه نزدیک سطح آب قرار می‌گیرند که علت آن کمبود اکسیژن (هیپوکسی) است. بد خود را به دلیل تحریک ناشی از انگل‌ها می‌خارانند و یا در اثر درگیری دستگاه عصبی، ناهنجاری‌های رفتاری مختلفی از خود بروز می‌دهند.

علامت درمانگاهی متداول دیگر، تورم ناحیه شکم است که متداول‌ترین دلیل آن، تورم صفاق (پریتونیت) عفونی (ویروسی، باکتریایی یا انگلی) است، اما در اثر اختلالات متابولیک (نارسایی کلیه)، سرطان‌ها یا چاقی نیز ایجاد می‌شود. این علامت در منابع مربوط به ماهیان آکواریومی، با عنوان دروپسی[1] (آب‌آوردگی) ارائه شده است. تورم شکم ممکن است به‌عنوان یک علامت طبیعی در هنگام بلوغ جنسی ماهیان ماده‌ای که آماده تخم‌ریزی هستند، نیز دیده شود. جراحات چشم مانند اگزوفتالمی[2] (بیرون‌زدگی کرهٔ چشم) در بیماری‌های عفونی مختلف ازجمله عفونت‌های ویروسی و باکتریایی متداول است. غالباً جراحات یک‌طرفه نشان‌دهندهٔ وجود یک عامل تروماتیک (ضربه یا ضغطه) احتمالی، خصوصاً در ماهیان بزرگ است. بسیاری از کمبودهای تغذیه‌ای نیز با آسیب‌های چشمی در ارتباط هستند. ناهنجاری‌های اسکلتی، خصوصاً مربوط به ستون فقرات نیز در انواع مختلفی از بیماری‌ها، ازجمله عفونت‌های انگلی معین، کمبودهای تغذیه‌ای و مسمومیت دیده می‌شوند.

تصویر ۲-۱: تیرگی رنگ در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۲: آب‌آوردگی (آسیت) در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

1. Dropsy
2. Exophthalmos

تصویر ۲-۳: انحراف ستون فقرات در ماهیان شامل انحراف افقی (اسکولیوزیس = تصویر بالا) و انحراف عمودی (لوردوزیس = تصویر پایین) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۴: بیرون‌زدگی کره چشم (اگزوفتالموس) در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

آماده کردن ماهی برای نمونه‌برداری

در هنگام دست‌کاری ماهی برای تشخیص بیماری، باید از دستکش‌های لاتکس استفاده کرد. پوست ماهی فاقد لایهٔ شاخی است. بنابراین، نسبت به آسیب ناشی از معاینات طبی حساس است. هرگز نباید از دستمال‌کاغذی خشک برای گرفتن ماهی به‌منظور بیوپسی استفاده کرد. هنگامی‌که دستکش‌های لاتکس را خیس می‌کنیم، حالت نرم و لغزنده پیدا می‌کنند و آسیب‌های پوستی احتمالی را کاهش می‌دهند. لذا هنگامی‌که ماهی را دست‌کاری می‌کنیم، مانع از بین رفتن انگل‌های مهاجم به پوست می‌شوند. بعضی از عوامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و ماهی ممکن است در اثر دست‌کاری ماهیان آلوده جمع و منقبض شوند. بسیاری از دستکش‌های یک‌بارمصرف توسط پودر تالک پوشیده شده‌اند. بنابراین، باید دست‌های پوشیده با دستکش را قبل از دست‌کاری ماهی با آب شستشو داد تا از آلوده شدن بیوپسی‌ها توسط بلورهای تالک جلوگیری شود. بعد از معاینات

ظاهری، باید از پوست و آبشش برای جستجوی عوامل بیماری‌زا بیوپسی تهیه کرد. معمولاً بیوپسی‌های پوست را می‌توان از ماهیان بزرگتر از ۲۵ میلی‌متر به دست آورد و بیوپسی آبشش نیز از ماهیان بزرگ‌تر از ۵۰ میلی‌متر قابل تهیه است. این فنون بسیار با ارزش هستند، زیرا بسیاری از بیماری‌هایی که ماهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به پوست یا آبشش محدود می‌شوند.

آرام کردن یا بیهوش کردن ماهی

در ماهی‌ها از داروهای یکسانی برای آرام کردن و بیهوشی استفاده می‌شود. تنها تفاوت بین آرام کردن و بیهوشی، دوز[1] (مقدار) دارو و یا طول دوره‌ای است که ماهی در معرض دارو قرار می‌گیرد. ازآنجاکه همه این داروها از طریق آب تجویز می‌شوند، دوز آن‌ها مستقیماً با مقدار دارو در داخل آب و مدت‌زمان باقی ماندن ماهی در داخل محلول متناسب است.

برای بیوپسی، یک بخش از آبی را که برای نقل‌وانتقال لازم است، داخل کیسهٔ آکواریومی یا ظرف مناسب دیگر ریخته و مقدار کمی از ماده بیهوشی (و بافر، در صورت لزوم) به آن افزوده می‌شود. سپس ماهی را در داخل حمام بیهوشی قرار داده‌شده و به‌دقت تحت‌نظر گرفته می‌شود. در مبحث داروشناسی (فارماکوپیا) محدوده‌ای از مقدار دارو که برای گونه‌های مختلف ماهی مورداستفاده قرارگرفته، ارائه شده است. پاسخ ماهی به یک دوز ارائه شده، به میزان قابل‌ملاحظه‌ای متفاوت است و به گونهٔ ماهی و شرایط محیطی بستگی دارد. هنگامی‌که این داروها بر روی یک گونه ماهی با میزان حساسیت ناشناخته استفاده می‌شوند، ابتدا با حداقل دوز توصیه‌شده شروع به‌تدریج و در صورت نیاز بر مقدار آن اضافه می‌شود تا این‌که اثر مطلوب مشاهده می‌شوند.

ماهیان حالاتی از بیهوشی را از خود بروز می‌دهند که به پستانداران شباهت دارد. اولین مرحله بروز هیجان است. بعضی از ماهیان مانند مارماهیان، در طی این مرحله شروع به تقلای شدید و غیرطبیعی می‌کنند و سعی می‌کنند که فرار کنند. لذا ظرفی که این ماهیان را در خود جای می‌دهد، باید به‌خوبی پوشانده شود. بعد از تحریک، ماهی سست و بی‌حال می‌شود (پاسخ حیوان نسبت به لمس کاهش می‌یابد)، تعادل خود را از دست می‌دهد (بر روی یک‌پهلو می‌خوابد) و تنفس کاهش می‌یابد (نفس زدن[2] یا باز کردن و بستن سرپوش‌های آبششی آرام‌تر و ضعیف‌تر می‌شود). اگر ماهی در حمام بیهوشی به مدت طولانی باقی بماند، تنفس آن متوقف خواهد شد. نباید ماهی را در مادهٔ بیهوشی به مدت طولانی قرار داد تا اینکه تنفس قطع شود. باوجوداین، بسیاری از ماهیان حتی پس از قطع تنفس به مدت چندین دقیقه، دوباره بهبود می‌یابند.

---

1. dosage
2. Gilling

اگر مقدار مادهٔ بیهوشی کافی باشد، ماهی باید در عرض کمتر از ۵ دقیقه بی‌حرکت شود. اگر ماهی پس از این مدت نیز هشیار بود، مقدار کمی دیگر از ماده بیهوشی را باید اضافه کرد.

هنگامی‌که حرکات ماهی متوقف شد و امکان دست‌کاری آن فراهم آمد، باید توسط پنس ظریف یک برش کوچک از باله برداشت و یک خراش از پوست نیز توسط اسکالپل تهیه کرد. این بیوپسی را باید فوراً بر روی یک لام قرار داد و یک قطره از آب آکواریوم به آن اضافه کرد. سپس می‌توان لام را با یک لامل پوشاند و نمونه را مورد آزمایش قرار داد. همچنین باید با استفاده از یک قیچی ظریف از آبشش بیوپسی تهیه کرد (نوگا، ۲۰۱۰).

اغلب بیهوشی سبب دفع مدفوع بی‌اختیار می‌شود و این امکان را فراهم می‌کند که نمونهٔ مدفوع نیز جمع‌آوری شود. همچنین، آرام‌بخش یا مادهٔ بیهوش کننده سبب می‌شود که اتصال انگل‌های سطح خارجی بدن مانند مونوژن‌ها یا زالوها سست‌تر شود و کندن آن‌ها از سطح بدن راحت‌تر شود. این امر ممکن است با تشخیص این مشکلات تعارض داشته باشد؛ به‌این‌ترتیب که تعداد موجودات زندهٔ مشاهده‌شده در گسترش لام مرطوب را تحت تأثیر قرار می‌دهد. باوجوداین، اهمیت تخدیر[1] انگلی بر روی تشخیص بالینی موردبررسی قرار نگرفته است. در عمل، از بسیاری از ماهیان می‌توان بدون استفاده از آرام‌بخش بیوپسی تهیه کرد. اگر اجازهٔ کشتن نمونهٔ ماهی را داشته باشیم، به جای استفاده از دوزهای بالای مواد شیمیایی، می‌توان از تخریب مغز[2] یا قطع نخاعی کردن[3] استفاده کرد (نوگا، ۲۰۱۰).

استفاده از میکروسکوپ

بعد از آزمایش آب، آزمایش بر روی بافت‌ها از طریق لام مرطوب، مناسب‌ترین روش در تشخیص بیماری‌های ماهی است. در حقیقت، بخش عمدهٔ موارد بیماری‌های ماهی را می‌توان تنها با استفاده از آزمایش‌های کیفیت آب اشاره‌شده فوق و با آزمایش لام مرطوب پوست و آبشش تشخیص داد. میکروسکوپی که برای تشخیص استفاده می‌شود، باید تعدادی از عدسی‌های شیئی را ازجمله، ×۱۰، ×۴۰ (با خشکی پایین و بالا) و ×۱۰۰ (با روغن ایمرسیون، قدرت بالا) را داشته باشد. یک عدسی شیئی با قدرت پایین (×۴) نیز برای دیدن سریع نمونه مفید است. دیافراگم قابل تنظیم میکروسکوپ را به پایین بکشید (تنگ کنید) تا نور اضافی از میدان حذف و بر کنتراست افزوده شود. هنگامی‌که لام مرطوب مورد آزمایش قرار می‌گیرد، نکتهٔ حائز اهمیت این است که اندازهٔ

1. Narcotization
2. Pithing
3. Cervical severance

اشـــیای مختلف را در میدان میکروســـکوپی تعیین کنیم، زیرا هنگامی‌که اندازهٔ یک انگل یا موجود زندهٔ دیگر معلوم باشد، شناسایی صحیح آن بسیار راحت‌تر خواهد بود.

دقیق‌ترین راه اندازه‌گیری اندازهٔ یک شـی، استفاده از میکرومتر چشمی است. این میکرومتر در داخل قسـمت عدسـی چشـمی میکروسـکوپ قرار داده می‌شـود و برای تعیین اندازهٔ موجود زنده، میکرومتر روی آن تنظیم می‌شود. راه دیگر تعیین اندازه یک شی، این است که اندازهٔ آن را با اندازهٔ یک گلبول قرمز در همان میدان مقایســه کنیم. معمولاً اندازهٔ گلبول‌های قرمز بر روی محور طویل آن‌ها، حدود ۶ تا ۹ میکرومتر اسـت.این سلول‌ها را می‌توان در داخل میدان میکروسکوپی، بر اساس ظاهر بشـقابی شـکل یا تخم‌مرغ نیمرویی آن‌ها شناسایی کرد. به‌دلیل این‌که گلبول‌های قرمز ازنظر اندازه ثابت و پایدار هسـتند، لذا می‌توان از آن‌ها برای تعیین ابعاد یک شی استفاده کرد. از دانه‌های لاتکس[1] نیز می‌توان برای تخمین اندازه استفاده کرد (نوگا، ۲۰۱۰).

آماده کردن لام‌ها: قبل از انجام هر نوع بیوپســی، فوراً یک قطره آب (آب دریا، اگر ماهی دریایی است) به لام افزوده‌شده عمل بیوپسی بر روی ماهی صورت می‌گیرد. می‌توان از آب ظرفی که ماهی در آن قرارگرفته اسـت، اسـتفاده کرد. یکی از سریع‌ترین روش‌ها برای انتقال آب، این است که نوک انگشـت خود را در داخل آب فرو کنید و سپس انگشت خود را با لام در تماس قرار دهید؛ که باعث می‌شود یک قطره آب بر روی لام قرار گیرد. از پی پت نیز می‌توان استفاده کرد. بیوپسی را باید فوراً در داخل قطرهٔ آب قرار داد تا جلوی خشک شدن موجودات زنده در داخل نمونه و مرگ آن‌ها گرفته شود.

بیوپسی پوست

بیوپســی پوسـت یکی از مفیدترین ابزارهای موجود برای تشخیص بیماری‌ها است، زیرا پوست اندام هدف اصـلی برای تعدادی از عوامل عفونی متداول اسـت. پوست ماهی لایه‌هایی دارد که با لایه‌های پوسـت پسـتانداران آنالوگ (مشـابه) اسـت؛ ازجمله، می‌توان هیپودرمیس، درمیس، لایهٔ غشاء پایه، اپیدرمیس و کوتیکول را نام برد. درمیس واجد ســلول‌های رنگدانه‌ای و فلس‌هاســت که در داخل بافت همبند فرورفته‌اند و هر یک از آن‌ها فلس بعدی را همانند ســفال‌های پشــت‌بام می‌پوشــاند. بعضــی از گونـه‌ها مانند اســبله فاقد فلس هســتند، درحالی‌که گونه‌های دیگر، مانند مارماهیان فلس‌های کوچک دارند. آنچه که فلس‌ها را می‌پوشــاند، اپیدرمیس اســت که درواقع، واجد بافت پوششی سنگفرشی مطبق به همراه سلول‌های جامی شکل[2] (تولید کنندهٔ موکوس) است. اپیدرمیس توسـط کوتیکول پوشـیده می‌شـود. این لایه یک لایهٔ نازک از موکوس، حاوی سـلول‌های پوشـشی

1. Latex beads
2. Goblet cells

پوسته‌پوسته‌شده و بسیاری از مواد محافظت‌کننده مانند پادتن‌ها، لیزوزیم و پروتئین C واکنش‌پذیر است. تقریباً در همهٔ ماهیان، بافت پوششی فاقد لایهٔ شاخی (کراتینی[1]) است و سلول‌های زنده در تمام لایه‌ها وجود دارند. این امر باعث می‌شود که پوست ماهی هم نسبت به جراحات حاد و هم مزمن حساس باشد.

پوست سه وظیفهٔ زیر را در تمام ماهیان به عهده دارد: ۱- مقاومت در مقابل حرکت را کاهش می‌دهد که این کار کمک سطح صاف و فاقد اصطکاک آن انجام می‌شود؛ ۲- به‌عنوان اولین خط دفاعی در مقابل تهاجم عوامل عفونی عمل می‌کند؛ و ۳- به‌عنوان یک سد غیرقابل نفوذ در مقابل حرکات مایعات و نمک‌ها به این روش عمل می‌کند. در بعضی از گونه‌ها (برای مثال مارماهیان و اسبله)، پوست به‌عنوان یک مکان اضافی برای تنفس محسوب می‌شود. اهمیت حیاتی پوست در حفظ هموستازی داخلی، دلیل عمدهٔ این نکته است که چرا آسیب پوست، صرف‌نظر از درگیری اندام‌های دیگر، می‌تواند منجر به مرگ ماهیان شود.

روش‌های بیوپسی پوست

خراش پوست[2]: دو روش عمده برای تهیه بیوپسی پوست مورداستفاده قرار می‌گیرد که شامل خراش پوست و چیدن باله است. خراش پوست با توسط یک اسپاتولا یا یک چاقوی جراحی و ایجاد خراش در امتداد پهلوهای بدن یا باله‌ها صورت می‌گیرد. در این هنگام است ماهی به‌طور کامل مهار می‌شود. برای این کار، ماهی را به کمک داروی آرام‌بخش به‌طور ملایم آرام می‌کنیم و به کمک دستی که به نرمی به ماهی چسبیده و قفل‌شده، از تقلای آن ممانعت به عمل می‌آوریم. برای اجتناب از هرگونه آسیب در هنگام انجام این روش‌ها، باید پوست ماهی را از خشک شدن در اثر تماس با سطوح زبر در امان نگه داشت. برای مثال، ماهی را نباید با حوله‌های کاغذی مهار کرد، حتی اگر حوله‌ها مرطوب باشند. این سطح زبر به‌راحتی می‌تواند کوتیکول را از بین ببرد. دستکش‌های لاستیکی لاتکس که با آب مرطوب شده باشند، خصوصاً برای دست‌کاری ماهی مناسب هستند.

برای برداشتن خراش تنها یک فشار ملایم لازم است، زیرا بسیاری از عوامل بیماری‌زا نزدیک سطح پوست یافت می‌شوند. مقدار فشاری که برای انجام خراش لازم است، بسیار کمتر از فشاری است که برای پستانداران لازم است. آسیب نمونه‌هایی که با فشار زیاد تهیه می‌شوند، بیش از فواید آن‌ها است. در ماهی‌های کوچک حتی خراش ملایم نیز باعث از بین رفتن اپیدرمیس و درمیس

1. Keratinized
2. Skin scraping

می‌شـــود. نباید نواحی زیادی از پوســـت را خراش داد، زیرا زخم بازی که به وجود می‌آید، باعث عفونت ثانویه یا عدم تعادل شدید مایعات بدن می‌شود (نوگا، ۲۰۱۰).

خراش پوست از جایی که جراحات آشکار دیده می‌شود، صورت می‌گیرد. باید زخم‌های کوچکتر مورد آزمـایش قرار گیرند، زیرا غالباً جراحات کهنه توســـط باکتری‌های فرصـــت‌طلب (برای مثال، آئروموناس هیدروفیلا) یا کپک‌های آب که زیاد رشـد کرده‌اند، پوشـیده می‌شـود. همیشـه باید لبهٔ جلویی زخم مورد آزمایش قرار گیرد، زیرا این ناحیه به‌احتمال‌زیاد واجد عوامل بیماری‌زای محرک اسـت. برای تعیین عامل مسـبب آغازگر لازم است نمونه‌هایی را از محل‌های دیگر به‌غیراز جراحات آشـکار تهیه کنیم، تا مشـخص شود که کدام عامل بیماری‌زا وجود دارد. همچنین باید نمونه‌هایی از ماهیان دیگر همان حوضـچه تهیه شـود. هنگامی‌که امکان تشـخیص عوامل بیماری‌زا توسـط لام مرطوب وجود ندارد، کشـت باکتریایی جراحات اولویت پیدا می‌کند. محتویات حاصـل از تخریش را باید فوراً به یک لام شـیشـه‌ای انتقال داد و یک قطره آب (اگر ماهی دریایی اسـت، آب دریا) به آن اضـافه کرد و یک لامل پلاسـتیکی (یا شـیشـه‌ای) بر روی آن قرار داد. لامل‌های پلاستیکی بر روی عامل‌های شـیشـه‌ای ارجح‌تر هسـتند، زیرا قیمت ارزان‌تری دارند و در هنگام خراشـیدن امعاواحشا برای تهیهٔ لام مرطوب، به‌راحتی شـکسـته نمی‌شـوند. لام‌های مرطوب را باید هر چه سـریع‌تر مورد آزمایش قرار داد، زیرا بسـیاری از انگل‌ها، خصـوصـاً تک‌یاخته‌ها خیلی زود پس از برداشـتن از روی میزبان می‌میرند. شـناسـایی بسـیاری از تک‌یاخته‌ها پس از مرگ مشکل است. استفاده از یک قطره محلول متیل سلولز می‌تواند مفید واقع شود. این ماده حرکات تک‌یاخته‌ها را کند می‌کند، اما تقریباً هرگز برای شناسایی انگل‌ها به این ماده نیازی نیست.

هایفه‌های (رشـته‌های) قارچی، گرانولوماها (جراحات دانه‌ای‌شـکل) و بسـیاری از تک‌یاخته‌ها با درشـت‌نمایی پایین (×۴۰ تا ×۱۰۰) زیر میکروسـکوپ قابل‌مشاهده هستند. معمولاً شناسایی قطعی تک‌یاخته‌ها و باکتری‌ها، به درشـت‌نمایی بالا (×۴۰۰) و گاهی اوقات روغن ایمرسیون (×۱۰۰۰) نیاز دارد.

چیدن باله[1]: برای چیدن باله به‌راحتی قطعهٔ کوچکی از یکی از باله‌ها قیچی می- شـــود(معمولاً بالهٔ دمی ساده‌تر است). آماده کردن نمونه به همان صورتی است که برای خراش پوست توصیف‌شده اسـت. این روش نسـبت به خراش پوسـت جراحت‌تروماتیک کمتری ایجاد می‌کند، زیرا زخمی که ایجاد می‌شـود، تمیزتر و همچنین کوچکتر اسـت، اما معمولاً این روش به اندازهٔ خراش پوست مفید واقع نمی‌شـود. در این روش، دیدن عوامل بیماری‌زای کوچک مانند ایکتیوبودو ممکن اسـت مشکل

1. Fin clipping

باشـد، زیرا شـعاع‌های ضـخیم و سـخت باله امکان تهیهٔ گسترش نازک را با مشکل مواجه می‌سازد. قسمت‌های نازک‌تر گسترش را باید مورد جستجو قرار داد (نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۵: نمونه‌برداری (خراش) پوست با چاقوی جراحی در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۶: قرار دادن خراش پوست بر روی لام (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۷: نمونه‌برداری (خراش) پوست با لامل در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۸: نمونه‌برداری (خراش) پوست با لامل در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۹: قرار دادن خراش پوست با لامل بر روی لام (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۱۰: چیدن باله با چاقوی جراحی در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۱۱: قطعه‌ای از باله دمی در زیر میکروسکوپ. به شعاع‌های باله و سلول‌های رنگدانه‌دار (کروماتوفور ها) توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

بیوپسی آبشش

بیوپسی آبشش، ابزار تشخیصی مهم در طب ماهی است. بسیاری از عوامل عفونی که پوست را تحت تأثیر قرار می‌دهند، آبشش‌ها را نیز آلوده می‌کنند. آبشش نیز همانند پوست، اندامی با چندوظیفه است. این اندام، مکان اصلی تنفس و همچنین ترشح مواد زائد نیتروژنی است و نقش مهمی در تعادل یونی ایفا می‌کند. پیچیدگی آبشش در ساختار تشریحی آن انعکاس یافته است. هر کمان آبششی واجد ردیف‌هایی از زوائد انگشتی‌شکل است که با چشم غیرمسلح قابل‌رؤیت هستند و به آن‌ها تیغه‌های اولیه می‌گویند. هر تیغهٔ اولیه واجد ردیف‌هایی از تیغه‌های ثانویهٔ میکروسکوپی است. یک شبکه عروقی مویرگ مانند در تیغه‌های ثانویه در جهت مقابل جریان آب جریان می‌یابد و تبادلات گازی را تسهیل می‌کند.

روش‌های بیوپسی آبشش

درست قبل از بیوپسی، باید آبشش‌ها را با چشم غیرمسلح مورد آزمایش قرار داد. آبشش‌های سالم به رنگ قرمز روشن هستند. آبشش‌هایی که به رنگ صورتی کمرنگ دیده می‌شوند، نشان‌دهندهٔ کم‌خونی هستند درحالی‌که رنگ قهوه‌ای کمرنگ نشان‌دهندهٔ تشکیل مت هموگلوبین است. کم‌خونی را با تغییرات پس از مرگ اشتباه نگیرید (آبشش‌ها پس از مرگ به‌دلیل خروج غیرفعال خون از آن‌ها، به رنگ صورتی کمرنگ در می‌آیند). ازآنجاکه تیموس به‌خوبی در حفرهٔ آبششی قابل‌مشاهده است، می‌توان آن را نیز در همین زمان مورد ارزیابی قرار داد. رنگ تیموس باید سفید براق باشد. خونریزی درتیموس در اثر استرس در آزادماهیان گزارش شده است (نوگا، ۲۰۱۰).

بیوپسی آبشش با واردکردن نوک قیچی ظریف (قیچی ایریدکتومی[1]) به داخل حفرهٔ آبششی انجام می‌شود. سپس دهانه‌های قیچی به‌آرامی باز شود و پس از بلند کردن سرپوش آبشش کمانهای آبششی مشاهده می‌شود، سپس نوک چند تیغهٔ اولیه را بریده و به یک لام انتقال می‌دهیم و یک لامل را برای پوشاندن آن استفاده می‌کنیم. فقط نوک تیغه‌ها را باید برید. در این حالت، خونریزی در حداقل ممکن خواهد بود (نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۱۲: نمونه‌برداری از آبشش با چاقوی جراحی در ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۱۳: نحوه واردکردن چاقوی جراحی و برداشتن قطعه‌ای از آبشش (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

1. iridectomy

تصویر ۲-۱۴: انتقال نمونه بر روی لام به کمک لامل (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۱۵: یک صفحه آبشش که رشته‌ها، کمان و خار های آبششی را نشان می‌دهد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۱۶: نمای ریز بینی دو رشته آبششی که تیغه های ثانویه را نشان می‌دهد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۱۷: نمای ریزبینی یک تیغه ثانویه آبشش که گلبول‌های قرمز، سلول‌های ستونی و سلول‌های پوششی را نشان می‌دهد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

بیوپسی اندام‌های داخلی

کلیه محل ترجیحی برای جداسازی بسیاری از بیماریهای ویروسی و باکتریایی در ماهی است. باوجوداین، اگرماهیان با ارزش مبتلا باشند (برای مثال، ماهیان مولد)، ممکن است قربانی کردن آن‌ها برای تعیین وضعیت بهداشتی مطلوب نباشد. یک روش جای‌گزین که بدون کشتن ماهی انجام می‌شود، انجام بیوپسی است. در ماهیان استخوانی، کلیه اندامی طویل و نواری شکل است که در طول حفرهٔ صفاق قرار دارد. به‌دلیل این‌که همهٔ ماهیان هم ازبافت خونساز و هم ترشحی تشکیل شده است، لذا فاقد ساختار جامدی است که در پارانشیم طبیعی کلیهٔ پستانداران دیده می‌شود. درعوض، مغز استخوان آن‌ها حالت مقاوم دارد. کلیه درانتهای جمجمه‌ای (رأسی) خود به سمت شکمی انحناء می‌یابد و درست در زیر سطح میانی حفرهٔ آبششی قرار می‌گیرد. این امر باعث می‌شود که کلیه برای آسپیره کردن با سوزن در دسترس باشد. ماهیانی را که قرار است بیوپسی شوند، یا می‌کشند یا اینکه توسط شخص دیگری مقید می‌کنند. سرپوش آبششی را بلند می‌کنیم ویک سرنگ cc ۳ با سوزن گوج ۲۲ و طول cm ۱/۵ را به‌صورت پشتی و سپس پشتی خلفی، درست در عقب کمان آبششی آخری وارد کلیه می‌کنیم. سپس سرنگ را آسپیره می‌کنیم تا ۰/۱ میلی‌لیتر از بافت کلیه جمع‌آوری شود و ابتدای سرنگ را پرکند. در آزادماهیان، وجود بافت کلیه را می‌توان سریعاً با آزمایش بخش کوچکی از بافت آسپیره شده از طریق میکروسکوپ و مشاهدهٔ حضور اجزای بافتی و ملانوسیت‌ها ثابت کرد (نوگا، ۲۰۱۰).

روش‌های کالبدگشایی

کشتن ماهی: همواره نمونه‌های زنده برای تشخیص ارجح‌تر هستند، اما اگر برای شناسایی نمونه‌ها نیاز به کمک داریم و مواد زنده را نمی‌توان به آزمایشگاه مرجع ارسال کرد، لازم است که نمونه‌ها به‌شکل صحیح نگهداری شوند. بسیاری از تک‌یاخته‌ها را می‌توان در مقاطع بافت شناسی شناسایی

کرد، اما بسیاری از آن‌ها در اثر فرایند تثبیت[1] و عمل آوری از پوست یا آبشش جدا می‌شوند. بهتر است که صفحات آبشش‌ها با یکدیگر تثبیت شوند و آن‌ها را به‌صورت رشته‌های منفرد از یکدیگر جدا نکنیم، خصوصاً مواقعی که ممکن است انگلهایی که اتصال سطحی دارند (برای مثال، چیلودنلا و تریکودینا) حضور داشته باشند. از تک‌یاخته‌ها می‌توان گسترش تهیه کرد، به کمک هوا خشک نمود و سپس رنگ‌آمیزی کرد (همانند آنچه که در مورد گسترشهای خون انجام می‌شود)، اما این روش به‌ندرت برای شناسایی تک‌یاخته‌ها در موارد درمانگاهی استفاده می‌شود. روشهای نگهداری انگلهای پریاخته به‌طور متداولتر مورداستفاده قرار می‌گیرد.

تصویر ۲-۱۸: ضدعفونی سطح بدن برای انجام نمونه‌برداری (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

تصویر ۲-۱۹: نحوه قرار گرفتن اسکلت باله شکمی در ماهیان برای اجتناب از برخورد چاقوی جراحی (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

1. Fixation

تصویر ۲-۲۰: محل برش بر روی سطح شکمی و ایجاد منفذ با چاقوی جراحی (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

تصویر ۲-۲۱: نحوه برش با چاقو و پنس (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

تصویر ۲-۲۲: نحوه باز نگه‌داشتن حفره شکمی (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

تصویر ۲-۲۳: نحوه باز نگه‌داشتن حفره شکمی و انجام نمونه‌برداری (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

تصویر ۲-۲۴: دوختن محل عمل با نخ جراحی (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

تصویر ۲-۲۵: بستن محل برش توسط نخ جراحی (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

تصویر ۲-۲۶: استفاده از مواد ضد آب برای جلوگیری از به هم خوردن تعادل اسمزی (اقتباس از وایلدگوس، ۲۰۰۱).

شرایط بافت

مفید بودن آزمایش‌های پس از مرگ ازنظر تشخیصی، به میزان زیاد بستگی به کیفیت نمونه دارد. باید تا آنجا که امکان‌پذیر است، ماهی زنده را آزمایش کرد. صاحب ماهی‌ممکن است نمونه‌ای را که به تازگی تلف‌شده، برای تشخیص به درمانگاه ارسال کند. باوجوداین، نمونه‌های مذکور فاقد ارزش تشخیصی هستند. ماهیان در شرایط یکسان، بسیار سریع‌تر از پستانداران دچار تجزیه و فساد می‌شوند. این امر به‌ویژه در مورد ماهیان کوچک صادق است. بیشتر تک‌یاخته‌های انگل خارجی و مونوژن‌ها در عرض چند دقیقه تا چند ساعت پس از مرگ میزبان خود تلف می‌شوند. این مدت بستگی به دما و گونهٔ انگل دارد. ممکن است انگل‌های بزرگتر مانند پاروپایان یا آبشش پایان تا مدت طولانی‌تری قابل جستجو باشند. تهاجم باکتریایی، هم به پوست و هم به اندام‌های داخلی، فوراً پس از مرگ روی می‌دهد و تفسیر نتایج کشت را با مشکل مواجه می‌کند. درنهایت به دلیل اینکه بافتهای ماهی به‌سرعت دچار اتولیز (تجزیه) می‌شوند، امکان ارزیابی‌های بافت‌شناسی کاهش می‌یابد (نوگا، ۲۰۱۰).

اگر امکان تحویل نمونه به‌صورت زنده وجود ندارد، می‌توان نمونه را در داخل کیسهٔ پلاستیکی قرار داد و این مجموعه را در داخل ظرف حاوی یخ مرطوب گذاشت. در اینجا نیز ارزش تشخیص بافت‌ها طی مرور زمان کاهش می‌یابد. ماهیان را باید در عرض چند ساعت پس از مرگ مورد آزمایش قرار داد.

اگر امکان آزمایش ماهیان در عرض چند ساعت وجود ندارد، باید آن‌ها را قربانی و فوراً در ۲۰ - درجهٔ سانتی‌گراد منجمد کرد. بسیاری از تک‌یاخته‌های انگل خارجی و مونوژن‌ها بعد از انجماد قابل تشخیص نیستند، اما ممکن است پاسخ میزبان به بعضی از تک‌یاخته‌ها (برای مثال، کیست‌های سفید ایکتیوفتیریوس) با چشم غیرمسلح قابل‌مشاهده باشد. انگل‌های تک یاختهٔ خارجی و

مونوژن‌ها را معمولاً نمی‌توان از طریق لام مرطوب بافت‌های ذخیره شده در ترکیبات شیمیایی تثبیت‌کننده شناسایی کرد. بیشتر انگل‌ها در مقاطع بافت شناسی قابل تشخیص هستند، اما بسیاری از انگل‌های خارجی در هنگام عمل‌آوری بافت‌ها از پوست و آبشش‌ها کنده می‌شوند. بنابراین، ممکن است پیداکردن آن‌ها در مقاطع بافتی مشکل باشد. گرانولوماها (ضایعات دانه‌ای‌شکل) به‌راحتی در لام‌های مرطوب بافت‌های تثبیت شده دیده می‌شوند. سپس می‌توان بافتهای مبتلا را برای تشخیص، عمل‌آوری کرد.

نمونه‌برداری

آزمایش‌های مربوط به پوست و آبشش را باید به روش‌هایی که در مورد بیوپسی توصیف شد، انجام داد. اغلب توصیه می‌شود تا زمانی‌که آزمایش‌های پوست و آبشش تکمیل نشده، ماهی را قربانی نکنیم. علت این امر، مشکلات مربوط به فساد و متلاشی شدن بافت ماهی است. اگر قرار است کشت‌های باکتریایی انجام شود، همان‌طور که قبلاً توصیف شد، باید بعداً اقدام به این امر کرد. بعد از کشتن ماهی، آن را بر روی پهلو بخوابانید و یک برش طولی در امتداد خط میانی، از منفذ مخرج تا درست ناحیهٔ شکمی حفرهٔ آبششی ایجاد کنید. این برش از قسمت خلفی حفرهٔ صفاقی تا کیسهٔ پریکارد امتداد خواهد یافت. برش‌های طولی دیگری از هر دو انتهای این برش اولیه ایجاد کنید که در امتداد سطح پشتی حفرهٔ بدن باشد. دیوارهٔ بدن را به سمت پشتی برگردانید، به‌طوری‌که امعاواحشا نمایان شوند (نوگا، ۲۰۱۰).

اگر مایعی وجود داشت، یک گسترش همانند آنچه که در مورد نمونه‌های خون توصیف شد، تهیه‌کنید. روده‌ها، کبد، طحال، غدد جنسی و قلب را شناسایی کرده و مورد آزمایش قرار دهید. کیسهٔ شنا را به سمت شکمی برگردانید و کلیهٔ قدامی و خلفی را مورد آزمایش قرار دهید. مغز را با استفاده از یک جفت قیچی تیز نمایان کنید، به‌طوری‌که جمجمهٔ پشتی به سمت قدامی برگردانده شود. بعد از تحقیق و بررسی ظاهری، با استفاده از قیچی‌ها و پنس‌های ظریف، مغز را به‌طور کامل خارج کنید. می‌توان گسترش‌های مستقیمی از بافت‌های مختلف تهیه و برای یافتن باکتری‌ها رنگ‌آمیزی کرد، بهترین حالت این است که مقاطع بافت‌شناسی را به‌درستی رنگ‌آمیزی کنیم.

تصویر ۲-۲۷: استفاده از دستگاه بیهوشی Lewbart - Harms شامل یک آکواریوم شیشه‌ای ۲۰ لیتری که یک پوشش شیشه‌ای یا پلاستیکی شفاف دارد. اگر این پوشش در دسترس نبود، می‌توان آن را ساخت. به‌این‌ترتیب که یک قطعه از پلکسی گلاس را برید که بتواند با لبه داخلی آکواریوم چفت شود و همچنین آن‌قدر کوتاه باشد که از یک سمت فضای کافی داشته باشد تا اجازه دهد لوله یک پمپ آب از کنار آن خارج شود. یک قطعه فوم جراحی بر روی پوشش آکواریوم قرار داده شده است. یک بریدگی از قبل در داخل این قطعه کنده شده است به‌نحوی‌که ماهی به حالت استراحت به پشت بر روی این قسمت V مانند قطعه فوم قرار گیرد. آن‌قدر آب در داخل آکواریوم قرار دارد که می‌تواند پمپ کوچک غوطه ور را بپوشاند. پمپ دو لوله خروجی دارد. یک لوله آب را از آکواریوم به حفره دهانی ماهی هدایت می‌کند و لوله دیگر آزاد است و امکان آب‌رسانی مداوم به ماهی را فراهم می‌کند و پوست و آبشش ماهی را مرطوب نگه می دارد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۲۸: ماهی بیهوش شده بر روی دستگاه بیهوشی Lewbart – Harms
(اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۲۹: کاتتر گذاری در مجرای تخم بر یک ماهی باس راه راه برای نمونه‌برداری از اووسیت آن تا میزان بلوغ اووسیت ها مشخص شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۰: روش نمونه‌برداری از کلیه. واردکردن سوزن از طریق غشای میانی حفره آبششی و به داخل کلیه (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۱: روش‌های آندوسکوپی. واردکردن یک سوزن ورس (Veress) درست در ناحیه عقب کمربند شانه ای یک کوسه. زاویه کم ورود شانس ایجاد آسیب بخ حفره شکمی را کاهش می‌دهد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰) .

تصویر ۲-۳۲: واردکردن نوک آندوسکوپ به داخل حفره شکمی یک کوسه لئوپارد. دقت شود که سوزن ورس نیز همزمان گاز دی‌اکسید کربن را به داخل حفره شکمی وارد می‌کند (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۳: تصویر آندوسکوپیک که کبد یک صخره ماهی گوفر (gopher rockfish) را پس از نمونه‌برداری نشان می‌دهد. به خونریزی اندکی که ایجادشده است دقت نمایید که مشخصه چنین روش‌هایی در ماهی است (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۴: رهیافت جراحی برای نمونه‌برداری از کلیه در قزل‌آلا . برش عمیق و ضخیم از دیواره بدن برای رسیدن به محل کلیه (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۵: کشیدن دیواره بدن به‌طرفین برای دیدن اندام‌های احشایی حفره شکمی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۶: بیرون کشیدن غدد جنسی برای مشاهده کیسه شنا (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۷: فشار واردکردن بر روی کیسه شنا به کمک یک واشر استیل ضدزنگ برای رویت بیشتر کلیه (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۸: استفاده از یک عدسی خمیده لویس برای تهیه نمونه از کلیه (دیواره بدن و همه امعاواحشا را برداشته ایم تا محل نمونه‌برداری مشخص شود) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۳۹: تشریح اندام‌های داخلی کپور شامل بافت‌های تخمدان، کبد، روده، طحال، کیسه شنا و کلیه (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۴۰: تشریح اندام‌های داخلی کپور نمایانگر کیسه شنا (کیسه‌های جلویی و عقبی) و کلیه قرمز رنگ در بالای آن (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۴۱: تشریح مغز با برداشتن جمجمه و نمایان شدن مغز (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۴۲: مغز ماهی شامل لوب های بویایی، لوب های بینایی و مخچه (به ترتیب از راست به چپ) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۴۳: تیموس ماهی مغز ماهی (بافت سفیدرنگ) به همراه آبشش کاذب در زیر آن (بافت قرمز و رشته رشته) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۲-۴۴: قلب ماهی شامل دهلیز (a) و بطن (v) و پیاز شریانی (بافت سفیدرنگ، سمت چپ) (اقتباس از روبرتس، ۲۰۱۲)

روش‌های تثبیت بافت

یک قسمت به اندازهٔ یک سانتی‌متر مربع از هر جراحت و هر اندام را باید در داخل ماده تثبیت‌کننده قرار داد. حتی بـایـد دیوارهٔ بدن ماهیان کوچک را شـــکاف داد تا اندامهای داخلی برای تثبیت در معرض مادهٔ تثبیت‌کننده قرار گیرند، اما معمولاً ماهیان بســـیار کوچک (کوچکتر از ۵ میلی‌متر) را می‌توان به‌طور کامل، بدون عوارض ناشـــی از اتولیز (تجزیه) تثبیت کرد. مادهٔ تثبیت‌کنندهٔ انتخابی برای فعالیتهای تشخیصی متداول، فرمالین بافرهٔ خنثی ۱۰٪ است. بعضی از محققان محلول بوئن را به‌عنوان مادهٔ تثبیت‌کنندهٔ مناســب‌تر معرفی می‌کنند، اما این ماده معایب متعددی دارد (در هنگام خشـک شـدن، دارای توان بالقوهٔ انفجاری اسـت؛ خارج کردن کامل آن از بافت تثبیت شـده مشکل است و اگر به‌طورکامل از بافتهای تثبیت‌شده خارج نشود، به آن‌ها آسیب می‌رساند) که ارزش آن را به‌عنوان یک مادهٔ تثبیت‌کننده کاهش می‌دهد (نوگا، ۲۰۱۰).

بافت‌ها را می‌توان به‌طور متداول با اسـتفاده از فنون بافت‌شناسی استاندارد عمل‌آوری کرد و در پارافین غوطه‌ور سـاخت. توجه داشـته باشـید که باید آبشـش‌ها و پوست واجد فلس را قبل از تهیه مقطع، دکلســـیفیـه کرد (بـافـت اســـتخوانی و کلســـیمی آن را خارج کرد). می‌توان از رنگ‌های هماتوکســـیلین و ائوزین و رنگ‌های اســـتاندارد دیگر برای بافت‌های ماهی اســـتفاده کرد. بنابراین، می‌توانید نمونه‌ها را به آزمایشگاه‌های آسیب شناسی پستانداران نیز ارسال کنید (نوگا، ۲۰۱۰).

روش‌های تهیهٔ لام مرطوب: غالباً تهیهٔ گسـترش بافتی، خصـوصاً ازکلیه، طحال، کبد یا جراحات دیگر مفید واقع می‌شـود. می‌توان ماهیان کوچک را به‌طور کامل برای تهیهٔ گسـترش مورداسـتفاده قرار داد، یا اینکه کل امعاواحشاء را بیرون آورد و گسترش تهیه کرد. برای تهیهٔ گسترش بافتی، یک قطعهٔ کوچک (تقریباً ۸ میلی‌متر مکعب) از بافت را بردارید و به همراه یک قطره آب یا نرمال سالین

(سرم فیزیولوژی نمکی) بر روی یک لام قرار دهید. لبهٔ یک لامل پلاستیکی را نزدیک بافت بگذارید و سپس به ملایمت از آن گسترش تهیه کنید. ساختار بافت را با بزرگنمایی کم (×۱۰۰) موردبررسی قرار دهید و به جستجوی انگل‌ها و گرانولوماها (ضایعات دانه‌ای) بپردازید. سپس بافت را خرد کرده و به‌صورت گسترش نازک بافتی درآورید. بعد، آن را با درشت‌نمایی ×۱۰۰ و بالاتر (×۴۰۰) به‌صورت خشک آزمایش کنید تا تک‌یاخته‌ها و باکتری‌ها شناسایی شوند (نوگا، ۲۰۱۰).

فصل سوم

فنون بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی در ماهیان

مقدمه

بافت از تجمع سلول‌ها به وجود می‌آید و سلول‌ها از لایه‌های زایشی جنین نشأت می‌گیرند. لایه‌های زایشی از یک سلول تخم به وجود می‌آیند. لایه‌های زایشی شامل بیرونی (اکتودرم)، میانی (مزودرم) و درونی (آندودرم) هستند. اندام‌هایی مانند پوست و مشتقات آن و دستگاه عصبی از اکتودرم منشأ می‌گیرند. مزودرم، اندام‌هایی مانند دستگاه گردش خون و قلب، ادراری، تناسلی، عضلات، استخوان‌ها و غضروف را می‌سازد. آندودرم دستگاه گوارش و غدد ضمیمه را ایجاد می‌کند. به‌طورکلی چهار نوع بافت اصلی به نام بافت‌های پوششی، پیوندی، عضلانی و عصبی در بدن وجود دارند. درواقع، بافت‌های دیگر، اشکال تغییر شکل یافته همین بافت‌ها هستند. با ایجاد بافت‌ها، اندام‌ها شکل می‌گیرند و هر عضو، از مجموعه چندین بافت ساخته شده است. یادگیری جزئیات ساختمانی اندام‌ها و اعضای مختلف برای درک فعالیت فیزیولوژیک و تغییرات آسیب‌شناسی آن‌ها ضروری است؛ بنابراین، بافت‌شناسی نه‌تنها به‌عنوان علمی مستقل نمی‌تواند مطرح شود، بلکه بهتر است مرتبط با دیگر شاخه‌های علوم پزشکی و دامپزشکی به‌عنوان یکی از پایه‌های اصلی این علوم موردتوجه قرار گیرد. بافت‌شناسی دو قسمت دارد که شامل بافت‌شناسی عمومی مشتمل بر بافت‌های پوششی، پیوندی، عضلانی و عصبی است و بافت‌شناسی اختصاصی که بافت‌هایی مثل خون را شامل می‌شود (اوستراندر، ۲۰۰۰).

مطالعات متعددی در ارتباط با آسیب‌شناسی ماهیان در ایران انجام‌شده است (ستاری، ۱۹۹۶؛ باقرزاده و همکاران،۱۳۸۹، ۱۳۹۱، ۱۳۹۴، ۱۳۹۵، ۲۰۱۰، ۲۰۱۳؛ رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۴؛ نوعی و همکاران،a ۲۰۱۵).

این فصل شامل دو بخش است. در ابتدا به‌روش‌های تثبیت بافت‌های ماهیان و ماهی کامل پرداخته‌شده و سپس به‌روش‌های مورداستفاده برای بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی آن‌ها اشاره می‌شود. به‌طور سنتی، تثبیت بافت‌های حیوانات عمدتاً برای مطالعات بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی کاربرد داشته است. امروزه توسعه ابزارهای جدید مولکولی و ایمنی‌شناسی، امکان تعیین محل توالی نوکلئوتیدها و پادگن‌های (آنتی‌ژن‌های) بافت‌ها و سلول‌ها را حتی در نمونه‌های نگهداری شده فراهم کرده است. در سال‌های اخیر، نیاز به انجام آزمایش‌های آسیب‌شناسی تشریحی ماهیان افزایش‌یافته است، علاوه بر این، نیاز به پایش مداوم بهداشت انواع مختلف ماهیان در آبزی‌پروری و افزایش استفاده از مدل‌های ماهیان در سم‌شناسی آبزیان، آزمایش‌های سرطان‌شناسی و تحقیقات پزشکی نیز علل دیگر این نیاز محسوب می‌شوند. کاربرد آزمایش‌های مولکولی و ایمنی‌شناسی ماهیان، به خاطر آزمایش‌های مربوط به پستانداران به‌کندی پیش رفته است، اما در بیشتر موارد، مواد شیمیایی و روش‌های مورداستفاده برای پستانداران، برای ماهیان نیز مستقیماً قابل‌استفاده

اســت. نمونه‌ها را باید بدون توجه به موارد اســتعمال، به‌درســتی عمل‌آوری کرد؛ بنابراین، ســاختار حفظ می‌شود و ارزیابی‌های بافت‌شناسی قابل‌اطمینان خواهد بود. این فرآیند، با تثبیت بافت شروع می‌شود و این‌که مهم‌ترین مرحله در تهیه نمونه‌های بافتی خوب به‌حساب می‌آید.

هدف و قواعد تثبیت

هدف از تثبیت بافت این اســت که اجزا و ریخت‌شــناســی سلول‌های بافت‌ها، در شرایطی نزدیک به دوره زنـده‌بودن بافت حفظ شـــود. این امر از طریق ممانعت یا جلوگیری از اتولیز (تجزیه خودی) و فساد[1] انجام می‌شود. اوتولیز هنگامی رخ می‌دهد که آنزیم‌های تجزیه کنندهٔ پروتئین، باعث شکستن پروتئین‌ها و تبدیل آن‌ها به اسیدهای آمینه می‌شوند و دیگر انعقاد[2] صورت نمی‌گیرد. انعقاد درواقع، مکانیســم اصــلی تثبیت بافت توســط بعضــی از مواد تثبیت‌کننده است. فساد درواقع، تجزیه بافت‌ها توسط باکتری‌های غیربیماری‌زا پس از مرگ موجود زنده است. همچنین، تثبیت، باعث سفت شدن بافت‌هایی می‌شــود که به‌طور طبیعی نرم هســتند و این امکان را فراهم می‌کند که دست‌کاری آن‌ها در خلال مراحــل بعــدی عمــل‌آوری و تهیــه مقطع راحــت‌تر صـــورت گیرد و هنگامی‌که رنگ‌های شـــیمیایی و بیولوژیک مورداســـتفاده قرار می‌گیرند، به نمایان کردن ســـاختارها یاری می‌رســـاند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

نمونه‌های بافتی یا کل بدن حیوان را باید فوراً پس از خارج کردن از بدن، یا سریعاً پس از مرگ، در داخل حجم مناسبی از مادهٔ تثبیت‌کننده قرار داد. اندازه مناسب برای بافت‌هایی که برای مشاهده در زیر میکروســکوپ نوری تهیه می‌شوند، در حدود حداکثر ۲ سانتی‌متر مربع در بزرگترین بعد آن و در حدود ۳ تا ۴ میلی‌متر ضخامت است، اما این اعداد بسته به تراکم بافت متغیر است. برای مثال، در مقــایســـه با بافت‌های متراکمی مانند کبد، قطعات بزرگتری از بافت‌های اســـفنجی، مانند قلب ماهیان را می‌توان به‌اندازه کافی تثبیت کرد. خون را نیز باید شـــســـتشـــو داد و خارج کرد، زیرا خون رونـد نفوذ مـاده تثبیـت‌کننـده را کند می‌کند. حرارت و خشـــکی (از دســـت دادن رطوبت)، تنها فرآیندهای فیزیکی دخیل در امر تثبیت هســتند. حرارت، ســبب انعقاد ســریع می‌شــود و حرارت و خشــکی، توأماً باعث تغییر شــکل شــدید بافت‌ها می‌شــوند. به‌طورمعمول، تثبیت به مدت ۶ تا ۴۸ ســاعت در دمای اتاق کافی اســت. تثبیت خوب، شاخص انکسار[3] را به حدود ۱/۵۴ می‌رساند. سپس این شــاخص توســط رنگ‌آمیزی اصــلاح می‌شود. گاهی اوقات لازم است که بافت‌ها به مدت طولانی قبل از عمل‌آوری، نگهداری شـــوند. بیشـــتر منابع توصـــیه می‌کنند که بدون در نظر گرفتن ماده

1. Putrefaction
2. Coagulation
3. Refractive index

تثبیت‌کننده مورداســـتفاده، بافت‌ها یا در الکل اتانول ۷۰٪ یا در فرمالین بافره خنثی ۱۰٪ ذخیره شوند. ذخیره‌سازی در اتانول، باعث بازگرداندن[1] رنگ‌های ازدست‌رفته‌ای می‌شود که در اثر تثبیت با فرمالین حاصـل شده است و بر روی کیفیت رنگ‌آمیزی تأثیری بر جای نمی‌گذارد. ذخیره‌سازی در فرمالین بافره، منجر به از دسـت دادن تدریجی خاصـیت رنگ‌پذیری بازوفیلیک (قلیایی) می‌شـود و شـــواهدی وجود دارد که نشـــان می‌دهد فرمالین بعضـــی از خصـــوصـــیات پادگنی (آنتی ژنیک) را می‌پوشـاند. ذخیره‌سازی نادرست، منجر به آسیب شدید بافت می‌شود و علت آن نیز وجود آلدئیدها (هنگام ذخیره‌ســازی در فرمالین) اســت که از فعالیت آنزیم‌ها ممانعت به عمل می‌آورند. علت دیگر آن، اکسیداسیون است که ممکن است بر روی رنگ‌آمیزی اثر بگذارد. اگرچه ذخیره‌سازی نمونه‌های بافتی در الکل بهترین حالت اســـت، اما بیشـــتر آزمایشـــگاه‌ها به خاطر قیمت پایین‌تر، از فرمالین اســـتفاده می‌کنند. برخی توصـــیه می‌کنند که بافت‌هایی که در فرمالین بافره تثبیت می‌شـــوند، باید ذخیره‌سازی آن‌ها نیز توسط همین ماده صورت گیرد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

شیمی تثبیت

مواد تثبیت‌کننده، ترکیباتی شیمیایی (مایعات، جامدات یا آمیزه‌ای از آن‌ها) هستند که باعث انعقاد پروتئین‌ها در داخل سـلول‌ها و بافت‌ها می‌شـوند، یا اینکه فاقد نقش انعقادی هستند. پروتئین‌ها در pH ایزوالکتریک خود حالت خنثی دارند. آن‌ها در این نقطه (pH)، حداقل قابلیت حل و چسبندگی و پایین‌ترین فشار اسمزی و کمترین تورم را نشان می‌دهند. تفاوت‌های موجود در pH ایزوالکتریک حاصل از محلول‌های تثبیت‌کننده، بر روی کیفیت رنگ بافت‌ها تأثیر می‌گذارد. پروتئین‌های طبیعی در سـلول‌های زنده، به‌صورت محلول‌های کلوئید یا به‌صورت ژل دیده می‌شوند. فرآیند تثبیت، باعث می‌شـــود که بیشـــتر پروتئین‌های بافت‌ها به‌صـــورت نامحلول درآمده و شـــرایط طبیعی و زنده و ژله مانند را به توده اسفنجی و ریزدانه[2] تبدیل می‌کند. مواد تثبیت‌کننده انعقادی، مانند اسید پیکریک، کلرید جیوه و اتانول، باعث رسـوب پروتئین و شـکل‌گیری لخته‌ای از رشته‌های ظریف ریزریز شده[3] می‌شـــوند. این مواد، پروتئین‌ها را تثبیت کرده و اجازه نفوذ مواد شـــیمیایی شـــفاف‌کننده، آب‌زدا و نفوذکننـده را فراهم می‌ســـازنـد. هنگـامی‌که این مواد تثبیت‌کننده انعقادی به داخل بافت‌ها نفوذ می‌کنند، با تقویت اتصـالات پروتئینی در مقابل گسـیختگی ناشـی از فرآیندهای بعدی، تثبیت این بـافـت‌هـا را تکمیل می‌کنند. باوجوداین، مواد تثبیت‌کننده انعقادی، آرتی فکت‌هایی در داخل بافت تولید می‌کنند که ازجمله می‌توان به تغییر یا گسـیختگی غشـاهای هسته و سیتوپلاسم، جابه‌جایی

1. Restore
2. Fine ground
3. Shredded

کریستاهای میتوکندری‌ها و همچنین گسیختگی، انتشار غیریکنواخت یا آسیب مواد زمینه‌ای سلول‌ها اشاره کرد. مواد تثبیت‌کننده غیرانعقادی، مانند فرمالدئید و اسمیوم تتراکسید پروتو پلاسم را به این روش تبدیل نمی‌کنند. به همین خاطر، تغییر شکل سلول‌ها و بافت‌ها به حداقل می‌رسد و آرتی فکت‌ها کاهش می‌یابد. متداول‌ترین ترکیبات تثبیت‌کننده، از سه یا چهار ماده شیمیایی تشکیل می‌شوند و فرمول آن‌ها به نحوی است که تعادلی بین معایب یک ماده با فواید ماده دیگر وجود داشته باشد؛ بنابراین، بسیاری از تثبیت‌کننده‌ها دارای مواد انعقادی و غیر انعقادی هستند. مواد انعقادی، روند نفوذ را تسهیل می‌کنند، درحالی‌که غیرانعقادی‌ها، هم ساختار بافت و هم واکنش‌های رنگ‌آمیزی آن را کنترل می‌کنند.

با توجه به اینکه فرمالدئید متداول‌ترین تثبیت‌کننده ساده محسوب می‌شود و یکی از اجزای بیشتر ترکیبات تثبیت‌کننده در مبحث آسیب‌شناسی ماهی به‌حساب می‌آید، لذا اطلاعات اختصاصی بیشتری در مورد فرمالین در اینجا ارائه خواهد شد. فرمالین یک تثبیت‌کننده پلیمر ساز (مولد اتصالات زنجیره‌ای) مناسب محسوب می‌شود و علت آن نیز توانایی این ماده در ایجاد اتصال بین زنجیره‌های پروتئینی مجاور است. واکنشی که اخیراً در ارتباط با فرمالدئید موردتوجه قرارگرفته است، اضافه شدن آن به ترکیبی است که حاوی یک اتم هیدروژن واکنش‌پذیر می‌باشد و نتیجه آن، شکل‌گیری ترکیب هیدروکسی متیل[1] است. معمولاً این ترکیب، واکنش‌پذیر است و می‌تواند با یک اتم هیدروژن اضافی دیگر به هم فشرده شود و یک پل متیلنی[2] ایجاد کند. تبدیل و تغییر گروه‌های آمینوی آزاد به مشتقات متیلن، قابل‌ملاحظه‌ترین تغییر در این فرآیند است.

انواع مواد تثبیت‌کننده

معیارهای مختلفی را باید برای انتخاب ماده تثبیت‌کننده در نظر گرفت که ازجمله می‌توان به نوع بافت، هدف مطالعه و نوع جراحت اشاره کرد. علاوه براین، باید دید که آیا بافت‌های ماهی مورداستفاده قرار می‌گیرند، یا اینکه کل بدن ماهی را باید آماده کرد. درنهایت، نوع رنگ‌آمیزی یا روش‌های خاصی که مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرند، جزء معیارهای انتخاب محسوب می‌شوند. این ملاحظات و موارد دیگر، در تعیین نوع ماده تثبیت‌کننده (ماده تثبیت‌کننده ساده، یک تثبیت‌کننده انعقادی یا غیر انعقادی یا آمیزه‌ای از این دو) نقش دارند.

بیشترین مطالعات در خصوص مناسب بودن مواد تثبیت‌کننده، بر روی بافت‌های پستانداران صورت گرفته است. مطالعات مختلفی نیز بر روی مواد تثبیت‌کننده مختلف برای بافت‌های ماهیان انجام‌شده است. در بعضی از این مطالعات، مواد تثبیت‌کننده را برای استفاده در بافت‌های خاص و

1. Hydroxymethyl
2. Methylene bridge

روش‌هایی را برای ماهیان مختلف مورد آزمایش قرار داده‌اند؛ برخی نیز مواد تثبیت‌کننده مختلف را برای مطالعات بافت‌های کبد آزادماهیان توسط میکروسکوپ نوری ارزیابی کرده‌اند؛ همچنین روش‌هایی برای آماده‌سازی کل بدن ماهیان کوچک برای ارزیابی بافت‌شناسی گزارش شده است؛ برخی هم روش‌های تثبیت مرتبط با واکنش‌های ایمنی‌شناسی پادتن‌های پستانداران مورداستفاده در مطالعات ایمنی شیمی سلولی ماهیان را بررسی کرده‌اند. این روش‌ها و منابع دیگر در ادامه ارائه خواهد شد.

تثبیت‌کننده‌های انعقادی ساده

این گروه از تثبیت‌کننده‌ها، شامل اتانول، اسیدپیکریک، کلریدجیوه و کرومیوم تری‌اکسید است. جزئیات بیشتر در مورد دو تا از این تثبیت‌کننده‌ها که به‌تنهایی مورداستفاده قرار می‌گیرند، در مبحث زیر ارائه شده است، اما می‌توان این دو ترکیب را همراه با تثبیت‌کننده‌های دیگر مورداستفاده قرار داد. اگرچه این مواد شیمیایی را به‌ندرت به‌صورت انفرادی به‌عنوان تثبیت‌کننده مورداستفاده قرار می‌دهند، اما لازم است توجه داشته باشید که مواد شیمیایی مختلفی ممکن است به‌عنوان تثبیت‌کننده به کار روند و باید از خواص تثبیت‌کنندگی آن‌ها آگاه باشید (اوستراندر، ۲۰۰۰).

اتانول: اتانول یک تثبیت‌کننده انعقادی و غیرافزودنی[1] است که گاهی برای تثبیت آنزیم‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد. اتانول یک منعقدکننده سیتوپلاسمی قوی است که به‌سرعت نفوذ می‌کند؛ کروماتین را تثبیت نمی‌کند و به‌ندرت به‌تنهایی مورداستفاده قرار گیرد. اتانول مطلق، غلظت استاندارد برای انجام تثبیت است. اتانول نقاط ایزوالکتریک پروتئین‌ها را کمتر از تثبیت‌کننده‌های دیگر تغییر می‌دهد. اتانول باعث کوچک شدن (چروکیده شدن) و سفت شدن بافت‌ها می‌شود؛ گلبول‌های قرمز و سفید را تجزیه می‌کند و گلیکوژن را غیرمحلول می‌کند. این الکل، تثبیت‌کننده توصیه‌شده برای گلیکوژن است. اتانول با اسیدپیکریک، کلریدجیوه، فرمالدئید و اسید استیک سازگار است.

اسید پیکریک (تری نیتروفنل): اسیدپیکریک به‌آرامی نفوذ می‌کند، اما عمل تثبیت آن سریع صورت می‌گیرد. محلول آبی اشباع (محلول آبی ۰/۹ تا ۱/۲٪)، غلظت استاندارد برای تثبیت است. این ماده، تنها ترکیبی است که هم برای تثبیت به کار می‌رود و هم یک رنگ محسوب می‌شود. اسیدپیکریک یک منعقدکننده عالی پروتئین به‌حساب می‌آید و پیکرات پروتئین ایجاد می‌کند که میل ترکیبی شدیدی نسبت به رنگ‌های اسیدی دارد . اگرچه اسیدپیکریک باعث می‌شود که بافت تا ۵۰٪ آب خود را از دست بدهد، اما بافت‌ها نرم باقی می‌مانند. این ماده، چربی‌ها را حل نمی‌کند و

1. Non - additive

نمی‌توانـد کربوهیـدرات‌هـا را بـه‌خوبی تثبیـت کند، اما برای تثبیت گلیکوژن توصـیه می‌شـود. اسـیدپیکریک نسبت به آمیخته شدن با تثبیت‌کننده‌های دیگر قدرت تحمل زیادی دارد (در مبحث مربوط به محلول بوئن به این نکته پرداخته‌شده است).

تثبیت‌کننده‌های غیرانعقادی ساده

این گروه، شـامل فرمالدئید، اوسـمیوم تتراکسـید، دی‌کرومات پتاسـیم و اسـیداسـتیک اسـت. این تثبیت‌کننده‌ها با شـکسـتن اتصـالات متقاطع[1] بین مولکول‌های پروتئین و همچنین، با آزاد کردن رادیکال‌هایی که با مولکول‌های آب در ارتباط هسـتند، فعالیت خود را به انجام می‌رسانند. فرمالدئید در آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی بیشترین کاربرد را به‌عنوان ماده تثبیت‌کننده دارد.

فرمالدئید: فرمالدئید، گازی است که تقریباً به‌اندازه ۳۷٪ تا ۴۰٪ (ازنظر وزنی) در داخل آب حل می‌شـود و معمولاً آن را به‌عنوان فرمالین ۴۰٪ می‌شـناسـند. فرمالین می‌تواند ساختار سلول زنده را بهتر از هر تثبیت‌کننده دیگری حفظ کند و در این میان، فقط اوسـمیوم تتراکسید استثنا محسوب می‌شـود. میزان نفوذ این ماده، به خاطر وزن مولکولی پایین، نسـبتاً سـریع اسـت. فرمالین ماده نگهـدارنـده خوبی برای چربی‌هـا محسـوب می‌شـود و بـافـت‌ها را به‌خوبی سـفت می‌کند، اما کربوهیدرات‌های محلول را تثبیت نمی‌کند. فرمالین با انواع متنوعی از روش‌های رنگ‌آمیزی سازگار اسـت و می‌توان نمونه‌ها را سال‌ها بدون تخریب فزاینده در داخل آن نگهداری کرد. قیمت فرمالین، ارزان و آماده کردن آن راحت اسـت. این ماده، ریخت‌شـناسـی سـلول‌ها، آنتی‌ژنیسـیته (خاصـیت پادگنی) و مواد ژنتیکی را به‌خوبی حفظ می‌کند. فرمالین، بخشـی از متداول‌ترین تثبیت‌کننده‌های موجود را تشکیل می‌دهد.

فرمالین بافره خنثی (NBF) شـامل ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالدئید (۳۷٪ تا ۴۰٪)، ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۴ گرم فسفات‌سدیم مونوبازیک و ۶/۵ گرم فسفات‌سدیم دی‌بازیک (فاقد آب) است. بافت را می‌توان بـه مـدت نـامحـدود در داخـل این تثبیـت‌کننده نگهداری کرد. غالباً NBF را به‌عنوان تثبیت‌کننده فراگیر (جهانی) به‌حساب می‌آورند.

اسید استیک: اسید استیک یکی از قدیمی‌ترین تثبیت‌کننده‌های شناخته‌شده محسوب می‌شود. این مـاده باعث می‌شـود که اجزای سـلولی، خصـوصـاً ژل‌های پروتئینی، بسـیار بیشـتر از تثبیت‌کننده‌های دیگر متورم شـوند. لذا، به‌ندرت به‌تنهایی مورداسـتفاده قرار می‌گیرد، اما همراه با مواد شـیمیایی دیگری که خاصیت جاذب آب دارند، به کار گرفته می‌شود. اسید استیک سریع نفوذ می‌کند و هسـته سـلول را شـبیه حالت طبیعی و زنده حفظ می‌کند. باوجوداین، اسـید اسـتیک

1. Cross - linkages

نوکلئوپروتئین‌ها را رسوب می‌دهد و میتوکندری‌ها، اجسام گلژی و ذخایر کلسیم را تخریب می‌کند. بـایـد بافت‌ها را به‌جای واردکردن در داخل آب، به داخل الکل انتقال دهیم تا تورم بافت به حداقل برسد. اسید استیک بافت‌ها را نرم‌تر از هر تثبیت‌کننده دیگری نگه می‌دارد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

مخلوط مواد تثبیت‌کننده[1]

مخلوط تثبیت‌کننده‌ها، شـامل دو یا چند ماده است که هر یک از آن‌ها می‌توانند به‌تنهایی به‌عنوان تثبیت‌کننده عمل کنند. تا آنجا که ممکن اســت، باید اجزای این مخلوط همدیگر را تکمیل کرده و نواقص یکدیگر را جبران نمایند؛ بنابراین، معمولاً یک مخلوط سـه‌جزئی اسـتفاده می‌شود که شامل اسـید اسـتیک، یک تثبیت‌کننده انعقادی و همچنین، یک تثبیت‌کننده غیر انعقادی است. در داخل این مخلوط، اســـید اســـتیـک بـا اثر جاذب آب تثبیت‌کننده‌های دیگر در تعارض قرار می‌گیرد و تثبیت‌کننده غیر انعقادی نیز پروتئین‌ها را متعادل و تثبیت می‌کند. پارافین به‌راحتی به داخل بافت نفوذ نمی‌کند، مگر اینکه توسـط گنجیدگی‌های یک تثبیت‌کننده به حالت اسـفنجی شـکل درآمده باشـد. اگر یک تثبیت‌کننده انعقادی به‌تنهایی مورداسـتفاده قرار گیرد، سـیتوپلاسـم و نوکلئوپلاسم تغییر شـکل می‌دهند و به یک شبکه توری مانند[2] ضخیم تبدیل می‌شوند. اگر فرمالدئید یا اوسمیوم تتراکسید نیز در داخل آن وجود داشته باشد، به یک حالت حد وسط دست پیدا می‌کند. پروتوپلاسم به‌صـــورت صـــاف‌تر تثبیت می‌شـــود، اما همچنان امکان نفوذ پارافین باقی می‌ماند. در مبحث زیر، متداول‌ترین مخلوط‌های تثبیت‌کننده، دســـتورات لازم برای آماده کردن آن‌ها و فواید و معایب این مخلوط‌ها به‌اختصار موردبررسی قرار می‌گیرد.

تثبیت‌کننده‌های بوئن و لیلی[3]:محلول تثبیت‌کننده بوئن شـامل فرمالین، اسـید اسـتیک و اسید پیکریک اســت. در محلول تثبیت‌کننده لیلی که ارتباط نزدیکی با محلول بوئن دارد، اســـید فرمیک جایگزین اسـید اسـتیک شده است. هم محلول بوئن و هم محلول لیلی به‌سرعت و یکنواخت، بدون جذب و خارج کردن آب[4]، به داخل بافت نفوذ می‌کنند و برای بافت‌های عضـــلانی و همبند بســـیار مناســـب هســـتند. همچنین، برای بافت‌های نرم و پودر شـــونده و همین‌طور، نشـــان دادن گلیکوژن توصـــیه می‌شـــوند. محلول‌های بوئن و لیلی را نباید برای بافت‌هایی اســـتفاده کرد که قرار اســـت با واکنش فولگن[5] رنگ‌آمیزی شـــوند. علت این امر، توان بالقوه هیدرولیز بیش‌ازحد[6] اســـید نوکلئیک

1. Fixative mixtures
2. Meshwork
3. Bouin,s and Lillie,s fixatives
4. Shrinkage
5. Fuelgen
6. Over-hydrolysis

است. به این مفهوم که در اثر وجود اسید پیکریک، نوکلئوپروتئین دچار انعقاد می‌شود. ازآنجاکه محلول‌های بوئن و لیلی حاوی اسید پیکریک هستند، پیکرات پروتئین تولید می‌کنند که در داخل آب قابل‌حل است؛ بنابراین، باید بافت‌ها را مستقیماً به داخل الکل ۵۰ تا ۷۰٪ منتقل کرد تا اسید پیکریک اضافه خارج شود. توصیه می‌شود که عمل تثبیت به مدت ۲۴ ساعت تا چندین هفته ادامه یابد. تثبیت برای دوره‌های طولانی، چندین ماه یا بیشتر، باعث می‌شود که هسته ضعیف رنگ بگیرد. مزیت محلول لیلی نسبت به محلول بوئن این است که این ماده می‌تواند برای کل بدن یک ماهی کوچک، عمل تثبیت را بهتر انجام دهد. علت این امر این است که اسید فورمیک موجود در محلول لیلی بهتر از اسیداستیک موجود در محلول بوئن می‌تواند عمل دکلسیفیه کردن (خارج کردن کلسیم) داخل بافت را انجام دهد.

اجزای موجود در محلول بوئن به‌خوبی‌اثر یکدیگر را تکمیل می‌کنند. فرمالین سیتوپلاسم و نوکلئوپلاسم را تثبیت می‌کند و اسیدپیکریک نیز به انعقاد سیتوپلاسم کمک می‌کند تا پارافین به‌راحتی نفوذ کند. اسید استیک سبب تورم بافت‌ها شده و اتصالات نمک در بین زنجیره‌های پروتئینی را می‌شکند. این ماده، بافت را سفت‌وسخت نمی‌کند و درواقع، از سفت‌وسخت شدن ناشی از الکل ممانعت به عمل می‌آورد. همچنین، باعث حل شدن گنجیدگی‌های سلولی خاص، مانند میتوکندری، اجسام گلژی و بعضی از مواد معدنی مانند کلسیم می‌شود.

اسید استیک با نشت مایعات ناشی از اسید پیکریک واکنش متقابل نشان می‌دهد. همچنین، اسید استیک معایب ناشی از فرمالدئید و اسید پیکریک را جبران می‌کند. اسید پیکریک معایب فرمالین، مانند سختی بیش‌ازحد بافت‌ها و تأخیر در نفوذ پارافین را جبران می‌کند و باعث می‌شود که سیتوپلاسم حالت بازوفیلیک پیدا کند.

طرز تهیه محلول بوئن، شامل افزودن ۷۵۰ میلی‌لیتر اسیدپیکریک (محلول آبی اشباع)، ۲۵۰ میلی‌لیتر فرمالدئید (۳۷٪ تا ۴۰٪) و ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به یکدیگر است (اوستراندر، ۲۰۰۰).

با خاطر وجود اسید استیک، توصیه می‌شود که این ترکیب را برای گنجیدگی‌های سیتوپلاسمی استفاده نکنید. غالباً واکوئل‌های بزرگ در داخل بافت‌ها شکل می‌گیرند. توصیه می‌شود که بافت‌ها را با الکل ۷۰٪ به همراه چندین قطره هیدروکسید آمونیوم به مدت چندین روز شستشو دهید تا اینکه هیچ رنگ زردی باقی نماند و تمام آن خارج شود. قبل از رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی، بیشتر رنگ زرد را باید خارج کرد. در غیر این صورت، باید لام‌ها را در الکل ۷۰٪ به همراه چند قطره

کربنات لیتیم[1] قرار داد تا رنگ زرد از بین برود. بخشـــی از رنگ زرد نیز در هنگام عمل‌آوری بافت در محلول‌های الکل با درصدهای متفاوت از بین می‌رود.

محلول تثبیـت‌کننده لیلی نیز شـــامل ۸۵۰ میلی‌لیتر اســـید پیکریک ۱ تا ۲٪ آبی (۱-۲ گرم اســیدپیکریک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب)، ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ۳۷٪ تا ۴۰٪ و ۵۰ میلی‌لیتر اســید فرمیک ۹۰ تا ۹۵٪ است (اوستراندر، ۲۰۰۰).

این ترکیـب تثبیت‌کننده را به مدت یک تا دو روز می‌توان اســـتفاده کرد. برای اینکه رنگ زرد ناشی از اسید پیکریک خارج شود، بافت را در الکل ۷۰٪ تا ۸۰٪ به مدت ۲ تا ۳ روز قرار دهید.

محلول‌های تثبیت‌کننده دیتریش و دیویدسون[2]: محلول تثبیت‌کننده دیتریش شامل فرمالدئید، اتانول، اسـید اسـتیک گلاسـیال و آب مقطر اسـت. این محلول باعث می‌شـود که جزئیات سـلولی به‌خوبی آشکار شود و میزان نشت مایعات یا از ریخت افتادن بافت در حد اندک خواهد بود. نمونه‌ها را می‌توان در صـورت ضـرورت در محلول دیتریش به مدت ۲ تا ۳ ماه قرار داد، بدون اینکه با سفت شدن بیش از اندازهٔ بافت‌ها همراه باشد. همچنین، محلول دیتریش زمان موردنیاز برای از بین بردن کلسـیم توسـط مایعات مربوطه را کاهش می‌دهد، زیرا اسـید استیک گلاسیال به‌عنوان یک ماده از بین برندهٔ کلســیم عمل می‌کند. نوزاد ماهیان یا ماهیان بســیار کوچکی که به مدت ۳ تا ۴ روز در داخل محلول دیتریش نگهداری می‌شـــوند، نیاز به کلســیم زدایی اندک دارند، البته اگر کلســـیمی بـاقی‌مـانـده بـاشـــد. بـافـت‌هایی را که برای یک دوره زمانی طولانی در محلول دیتریش نگهداری می‌شوند، باید به مدت ۲۴ ساعت توسط آب جاری شستشو داد تا از تشکیل رسوب سیاه فرمالین بر روی مقـاطع بافتی جلوگیری شـــود. به‌طورکلی، این ترکیب، یک محلول تثبیت‌کننده مختلط عالی برای ماهی کامل و بافت‌های آن محسوب می‌شود و توسط آژانس حفاظت از محیط‌زیست و سازمان ملی تحقیقات اقیانوســی و جوی برای انجام برنامه‌های گســترده پایش و نمونه‌برداری مورداســتفاده قرار می‌گیرد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

محلول تثبیـت‌کننده دیتریش شـــامل ۷۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۳۷۵ میلی‌لیتر اتانول (۹۵٪)، ۱۲۵ میلی‌لیتر فرمالدئید (۳۷٪ -۴۰٪) و ۲۵ میلی‌لیتر اسـید اسـتیک گلاسـیال اسـت (اوسـتراندر، ۲۰۰۰).

محلول تثبیت‌کننده دیویدسـون شـبیه محلول دیتریش است و از فرمالدئید، اتانول، گلیسیرین، اسـید استیک گلاسیال و آب مقطر تشکیل می‌شود. محلول تثبیت کنندهٔ دیویدسیون توسط دبلیو. اچ. هارتمن معرفی‌شـده و به‌افتخار دبیلو. ام. دیویدسـون، یک خون‌شـناس بریتانیا نام‌گذاری شـده اسـت. آن‌ها در مطالعات خود بر روی کروماتین جنسـی از این محلول استفاده کردند. در آن مقاله،

1. Lithium carbonate
2. Deitrich/s and Daividson/s fixatives

آن‌ها نشان دادند که ۱۰ قسمت گلیسیرین از دستورالعمل اولیه تهیه محلول دیویدسون حذف شده است. محلول دیویدسون با آب دریا به‌جای آب مقطر توسط محققان مورداستفاده قرار گرفت. این محلول، بهترین تثبیت‌کننده برای نرم‌تنان دوکفه‌ای دریایی به‌حساب می‌آید. محلول دیویدسون مکرراً برای ماهیان دریایی مورداستفاده قرار می‌گیرد و اخیراً توسط اسپیلبرگ و همکاران بر روی کبد ماهی آزاد اقیانوس اطلس مورد ارزیابی قرارگرفته است. آن‌ها دریافتند که محلول دیویدسون یکی از دو ترکیب تثبیت‌کننده است که بر روی ریخت‌شناسی کبد در حد میکروسکوپ نوری بهترین شرایط نگهداری را به همراه دارد. همچنین، محلول دیویدسون برای غدد جنسی ماهیان محلول تثبیت‌کننده عالی به‌حساب می‌آید.

محلول تثبیت‌کننده دیویدسون شامل ۲۰۰ میلی‌لیتر فرمالدئید (۳۷٪ تا ۴۰٪)، ۱۰۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال، ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل مطلق و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است.

تثبیت بافت برای میکروسکوپ الکترونی

روش‌های تثبیت، برای میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و نگاره (SEM) مشابه هم است. باوجوداین، تثبیت بافت برای میکروسکوپ الکترونی بسیار بحرانی‌تر از میکروسکوپ نوری است. همان‌طور که در مورد مواد تثبیت‌کننده دیگر هم اشاره شد، در اینجا نیز هدف از تثبیت، حفاظت و نگهداری سریع بافت با حداقل تورم یا نشت مایعات (آب‌زدایی) است. میکروسکوپ الکترونی بافت را با عوامل فیزیکی دیگر مواجه می‌سازد که ازجمله می‌توان مواجهه بافت با یک خلأ و پرتوی الکترونی است. سرعت حفاظت، بستگی به میزان نفوذ و واکنش ماده تثبیت‌کننده دارد که به نوبهٔ خود، بستگی به pH، اسمولاریته، دما، دوره تثبیت، غلظت مادهٔ تثبیت‌کننده و اندازهٔ نمونه دارد.

محلول‌های تثبیت کنندهٔ انعقادی برای میکروسکوپ الکترونی مناسب نیستند، زیرا این محلول‌ها جزئیات سلولی را به‌شدت از شکل می‌اندازند. محلول‌های تثبیت کنندهٔ افزودنی غیرانعقادی که به‌طور متداول برای میکروسکوپ الکترونی استفاده می‌شوند، شامل گلوتارآ لدئید، اوسمیوم تتراکسید و فرمالدئید هستند. این محلول‌ها می‌توانند به اجزای سلولی به‌غیراز پروتئین‌ها افزوده شوند. برای مثال، ازآنجاکه اوسمیوم تتراکسید یکی از فلزات سنگین به‌حساب می‌آید، لذا می‌تواند بعضی از چربی‌ها را تثبیت کند، یا بافت را رنگ‌آمیزی کند، زیرا باعث افزایش چگالی بافت می‌شود. به‌طورمعمول، فرمالدئید سریع نفوذ می‌کند، اما تثبیت آن کند است. یک روش تثبیت مضاعف نیز وجود دارد که با یک تثبیت اولیه توسط محلول گلوتارآلدئید یا کارنوفسکی[1] شروع می‌شود (این محلول ترکیبی از گلوتارآلدئید و فرمالدئید است) و به دنبال آن، یک مرحله تثبیت

1. Karnovsky

بعدی با اوسـمیوم تتراکسـید وجود خواهد داشت. این روش، مؤثرترین روش حفظ و نگهداری بافت محسـوب می‌شـود. گلوتارآلدئید نسـبت به اوسمیوم تتراکسید و فرمالدئید باعث آب‌زدایی بیشتر از هسـته و آب‌زدایی کمتر از سیتوپلاسم می‌شود. فواید فرمالدئید بیشتر است، زیرا این ماده هم باعث اتصـال متقاطع نوکلئوپروتئین و هم DNA می‌شـود، درحالی‌که گلوتارآلدئید فقط باعث اتصـال متقاطع نوکلئوپروتئین‌ها می‌شود.

اگرچـه محلول‌هـای تثبیـت‌کننـده در دمای اتاق بسـیار سـریع‌تر نفوذ می‌کنند، اما در مورد میکروسـکوپ الکترونی، بافت‌ها را در دمای حدود ۴ درجه سـانتی‌گراد قرار می‌دهند، زیرا در این حالت اجزای سـلولی کمتر از سـلول خارج می‌شـوند و اتولیز (تجزیه خودی بافت) نیز کند می‌شود. بـاید بافت‌ها را در عرض چند دقیقه پس از مرگ جمع‌آوری و تثبیت کرد تا اجزای سـلولی حفظ شـوند. این امر خصـوصـاً در مورد ماهیان، خصـوصاً آن‌هایی که از آب‌های گرم جمع‌آوری می‌شوند، صادق است، زیرا ماهیان موجوداتی خونسرد هستند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

اندازه مطلوب بافت‌ها در حدود ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر مکعب اسـت. درصـورتی‌که نتوانیم بافت را به‌صـورت مکعبی جدا کنیم (به خاطر از بین رفتن نواحی موردعلاقه)، در این صورت می‌توان بافتی را که یک بعد آن به‌اندازه‌یک میلی‌متر یا کمتر ضخامت دارد، استفاده کرد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

pH بافر انتقال‌دهنده[1] برای محلول‌های گلوتارآلدئید و اوسـمیوم تتراکسـید، عاملی بحرانی در انجام عمل تثبیت خوب محسـوب می‌شـود. بافرها بر روی ظاهر و قابلیت رنگ‌پذیری اندامچه‌های درون‌سـلولی تأثیر می‌گذارند. تودهٔ مولکولی پروتئین‌ها با pH در ارتباط اسـت. کاکودیلات سـدیم[2] که به‌طور گسترده استفاده می‌شود، در pH بین ۶/۴ و ۷/۴ مؤثر واقع می‌شود. pH بیشتر بافت‌های حیوانات، بین ۶/۰ تا ۸/۰ اسـت. کاکودیلات سـدیم بر روی اسـتقرار (تمرکز) آنزیمی تأثیری بر جا نمی‌گذارد و الکترولیت‌هایی مانند کلسـیم را می‌توان به‌عنوان تثبیت‌کننده (متوازن‌کننده) اضـافه کرد، بدون اینکه منجر به ایجاد رسـوب شـوند. این وضعیت را می‌توان در هنگام استفاده از بافرهای فسـفات مشـاهده کرد. برای محلول‌های تثبیت‌کننده اولیه و پایانی، می‌توان از بافر یکسـان استفاده کرد.

اسـمولاریته کل یک محلول تثبیت‌کننده، بر روی شـکل و اندازه سـلول تأثیر می‌گذارد. هر نوع سـلول، دارای یک اسـمولاریته مناسـب خاص خود اسـت و ازآنجاکه بافت‌ها از چندین نوع سـلول تشـکیل‌شـده‌اند، لازم اسـت که اسمولاریته میانگین آن‌ها را پیدا کنیم تا بتوانیم رضایت‌بخش‌ترین شـکل حفظ و نگهداری را تأمین کنیم. اوسـمولاریته حداقل تأثیر را بر روی بافت‌های متراکم دارد، اما تأثیر آن بر روی بافت‌های کم‌تراکم‌تر و دارای آب بیشـتر، قوی‌تر است. محدوده اسمولاریته برای

1. Vehicle
2. Sodium cacodylate

محلول تثبیت‌کننده و انتقال‌دهنده آن برای بافت‌های پستانداران، ۵۰۰ تا ۷۰۰ میلی اوسمول است. در مورد ماهیان، محلول‌های تثبیت‌کننده واجد گلوتارآلدئید در داخل بافر کاکودیلات که در داخل همان محدوده مربوط به بافت‌های پستانداران قرار می‌گیرد، به‌طور متداول مورداستفاده قرار می‌گیرد. محلول تثبیت‌کننده کارنوفسکی (در حدود ۲۰۰۰ میلی اسمول) نیز غالباً برای نمونه‌های دریایی مورداستفاده قرار می‌گیرد. اضافه کردن ترکیبات غیرالکترولیت (سوکروز، گلوکز، دکسترین) و الکترولیت‌ها ($CaCl_2$ و NaCl)، اسمولاریته را تثبیت و متعادل می‌کند و تورم سلولی و همچنین، خارج شدن اجزای سلولی را کاهش می‌دهد. آن‌ها شکل سلول را حفظ می‌کنند و غشای سلولی و همچنین، عناصر اسکلتی سلول را پایدار و متعادل نگه می‌دارند.

تأمین یک غلظت مطلوب در هنگام تثبیت بسیار حائز اهمیت است. اگر غلظت بسیار پایین باشد، می‌توان زمان لازم برای انجام تثبیت را طولانی کرد که این امر منجر به خارج شدن اجزای سلولی می‌شود. اگر غلظت بسیار بالا باشد، ساختارهای ظریف سلولی ممکن است آسیب ببینند. اوسمیوم در غلظت مناسب (حدود ۱٪) یک مادهٔ مؤثر برای اتصال متقاطع مولکول‌های پروتئین محسوب می‌شود، اما در غلظت‌های بالا می‌تواند باعث شکافتن این مولکول‌ها شود (اوستراندر، ۲۰۰۰).

ازآنجاکه در هنگام انتخاب یک محلول تثبیت‌کننده برای میکروسکوپ الکترونی، عوامل متنوعی را باید در نظر گرفت، لذا باید نمونه‌های عمل‌آوری شده را برای جستجوی شواهد مربوط به حفظ و نگهداری رضایت‌بخش مورد ارزیابی قرار داد. غشاها باید حالت پیوسته داشته باشند و هیچ‌گونه نشانه‌های بدشکلی یا گسیختگی در آن‌ها مشاهده نشود. فضاهای بین غشاها باید دانه‌دار باشند و در بین سلول‌های سالم هیچ‌گونه فضاهای بین سلولی بزرگ‌شده مشاهده نشود. جزئیات اجزای سلولی و ظاهر رضایت‌بخش آن‌ها ارائه شده است (اوستراندر، ۲۰۰۰) .

طرز تهیه ۲/۵٪ گلوتارآلدئید در ۰/۱ مول بافر کاکودیلات سدیم به همراه ۰/۶ مول سوکروز: ۲۵۰/۰ میلی‌لیتر از بافر ۰/۲ مول سدیم کاکودیلات با pH=۷/۴ را با ۵۰/۰ میلی‌لیتر گلوتارآلدئید (۲۵٪)، ۱۰۰/۰ گرم سوکروز و ۵۰۰/۰ گرم آب مقطر مخلوط کنید.

طرز تهیه بافر کاکودیلات سدیم ۰/۲ مول با pH=۷/۴: ۴۲/۸ گرم اسید کاکودیلیک یا ۳۱/۹۹ گرم اسید کاکودیلیک (فاقد آب) را در ۹۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. PH را تا ۷/۴ تنظیم کنید و این کار را به کمک یک مول در لیتر اسید هیدروکلریک انجام دهید.

محلول کارنوفسکی

دو گرم پارافرمالدئید را در ۲۵ میلی‌لیتر آب حل کنید و این امر را با گرم کردن محلول و رساندن آن به دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه انجام دهید. یک تا ۳ قطره از محلول یک مول در لیتر NaOH را به

این مجموعه اضـافه کنید و به هم بزنید تا محلول شفاف شود. محلول را خنک کنید. ۵ میلی‌لیتر از محلول ۵۰٪ گلوتارآلدئید را اضـافه کنید و حجم محلول را با کمک بافر کاکودیلات ۰/۲ مول به ۵۰ میلی‌لیتر برسـانید تا pH در حد ۷/۴ تا ۷/۶ تنظیم شـود. اگر کاکودیلات اسـتفاده می‌شـود، ۲۵ میلی‌لیتر $CaCl_2$ فاقد آب به این مجموعه اضافه کنید (اوستراندر، ۲۰۰۰).

تثبیت و روش‌های خاص

بـافـت کبد: اثرات پنج نوع تثبیت‌کننده مختلف واجد آلدئید برای مطالعات میکروسـکوپ نوری بافت کبد ماهی آزاد اقیانوس اطلس (سـالمو سـالار) ارزیابی شـد. تثبیت‌کننده‌ها شامل محلول‌های بوئن، دیویدسـون، محلول فرمالین ۱۰٪ به همراه بافر فسفات میلونیگ[1] اصلاح‌شده، محلول فرمالین ۱۰٪ به‌علاوه ۱٪ گلوتارآلدئید در ۰/۱ مول بافر فسـفات و محلول اصـلاح‌شـده کارنوفسکی با قدرت نصف محلول اولیه بودند. این مطالعه نشان داد که محلول فرمالین بافر فسفات و محلول دیویدسون بهترین شـرایط را برای نگهـداری بـافـت کبـد فراهم می‌کنند. معیارهای اصـلی که برای ارزیابی مورداستفاده قرار گرفتند، شامل ظاهر ریخت‌شناسی هسته و سیتوپلاسم سلول‌های کبدی، وضعیت عروقی کبـد، مجـاری صـفراوی، بـافـت همبنـد و آرتی‌فکـت‌هـا در مقـاطع رنگ‌آمیزی شـده با هماتوکسیلین و ائوزین بودند. هسته و سیتوپلاسم سلول‌های کبدی یکنواخت و همگن بود و حدود آن به‌خوبی مشـخص‌شـده بود و فقط تا حدی آب از دسـت داده بودند. این مطالعه، حداقل تا حدی مطالعات قبلی را تأیید می‌کرد که نشـان داده بودند فرمالین بافر فسفات و محلول بوئن متداول‌ترین و کارآمدترین تثبیت‌کننده‌ها در آسیب‌شناسی ماهی به‌حساب می‌آیند. بسیاری از محققان، فرمالین بافر فسـفات را به‌عنوان تثبیت‌کننده انتخابی برای مصـارف عمومی در نظر می‌گیرند (اوسـتراندر، ۲۰۰۰).

تثبیت کامل ماهی کوچک: پروتکل‌های بافت‌شـناسـی مختلفی برای نمونه‌های ماهیان کوچک کامل ارزیابی شـده اسـت. تهیه مقاطع بافتی با کیفیت بالا ممکن اسـت دشـوار باشـد، زیرا ماهیان کوچک از بافت‌های متنوعی تشـکیل‌شده‌اند که قوام آن‌ها متفاوت بوده و از اندام‌های احشایی نرم تا بافت سـخت اسـتخوان و فلس‌ها متغیر هستند. در یک آزمایش که بر روی ۸۴۰ عدد ماهی مداکای یک‌سـاله صـورت گرفت تا پارامترهای مربوط به تثبیت و کلسیم‌زدایی را مقایسه کنند، یک گروه از ماهیان مداکا فلس کنی شـدند، گروه دوم فلس کنی نشـدند و گروه سـوم نیز فلس کنی نشدند، اما بعـد کلسـیم زدایی آن‌هـا به مدت ۴، ۸ یا ۱۲ سـاعت در محلول TBD-1 (یک محلول اسـید هیدروکلریک ۱۴٪) صورت گرفت. نمونه‌های حاصل از هر یک از این پنج گروه در داخل سه محلول

1. Millonig’s

تثبیت‌کننده مختلف (محلول لیلی، بوئن یا فرمالین بافره خنثی ۱۰٪) در دوره‌های زمانی متفاوت قرار داده شدند. پس از عمل تثبیت، نمونه‌ها را برای ذخیره‌سازی در محلول بافره خنثی ۱۰٪ (NFB) قرار دادند. در مقاطع رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین مربوط به ماهیان کامل، بافت کبد، به‌عنوان مهم‌ترین شاخص (اندیکاتور) کیفیت تثبیت در نظر گرفته شد. بهترین پروتکل کلی، تثبیت در محلول‌های بوئن یا لیلی به مدت ۲ تا ۴ روز و به دنبال آن، ذخیره‌سازی در NBF ۱۰٪ بود و پس‌ازآن نیز یک مرحله ۸ تا ۱۲ ساعته کلسیم‌زدایی در TBD-1 را در نظر گرفتند. ازآنجاکه هیچ آمیزه قطعی برای کسب نتایج واضح نسبت به بقیه وجود نداشت، لذا توصیه می‌شود که زمان تثبیت سه‌روزه در محلول بوئن، به همراه یک دوره کلسیم زدایی ۸ ساعته در TBD-1 لحاظ شود.

روش‌های ایمنی شیمی بافت[1]

به‌طورکلی، به نظر می‌رسد پروتکل‌هایی که برای مطالعات ایمنی شیمی بافت با استفاده از مدل‌های پستانداران توسعه‌یافته، برای ماهیان نیز مناسب است. به نظر می‌رسد که تثبیت با استفاده از فرمالین به‌خوبی عمل می‌کند و در مورد بافت‌های جوندگان، نشان داده شده است که نمونه‌هایی که در فرمالین تثبیت‌شده و به مدت بیش از ۲۴ ماه نگهداری می‌شوند، نتایج قابل‌قبولی برای رنگ‌آمیزی پادگن (آنتی‌ژن) هسته‌ای سلول‌های در حال تزاید[2] (PCNA) ایجاد می‌کنند. به دلیل اینکه فرمالین باعث اتصالات متقاطع پروتئین‌ها می‌شود، اپی‌توپ‌های بعضی از پادگن‌ها پوشانده می‌شوند و لازم است که از هضم آنزیمی با روش‌های بازیابی[3] پادگنی استفاده شود تا پوشش آن‌ها برداشته شود. مطالعات انجام‌شده برای تعیین PCNA در ماهی مداکا (*اوریزیاس لاتی پس*) که با محلول لیلی تثبیت‌شده بودند، نشان داد که این محلول نسبت به فرمالین برای تعیین PCNA از مطلوبیت کمتری برخوردار است. باوجوداین، استفاده از روش‌های بازیابی پادگن باعث شد که بر مشکلات تثبیت فایق آیند و امکان تعیین PCNA در ماهی مداکایی که در تثبیت‌کننده‌های دیگر مانند محلول دیویدسون تثبیت‌شده بودند، فراهم آید. البته نمونه‌هایی که در محلول استون تثبیت‌شده بودند، مستثنی هستند. اثرات محلول‌های بوئن، دیتریش و لیلی را بر روی الگوهای رنگ‌آمیزی ایمنی‌شناختی، شدت و ویژگی بافتی پادتن p-گلیکوپروتئین در ماهی قنات شیپس هد (*سیپرینودون واریگاتوس*) توصیف شد. دیده شده است که واکنش ایمنی‌شناختی در کبد، روده، لوزالمعده برون‌ریز و کلیه، وابسته به ماده تثبیت‌کننده است. در مورد محلول بوئن، کاهش شدت

1. Immunohistochemical techniques
2. Proliferating cell nuclear antigen
3. Antigen retrieval techniques

رنگ‌آمیزی ایمنی‌شناختی و فرونشاندن[1] در بعضی از آمیزه‌های بافت \ پادتن مشاهده شد. به‌طورکلی، اطلاعات آن‌ها نشان داد که تثبیت بافت، تأثیر مهمی بر روی واکنش ایمنی‌شناختی پادتن p- گلیکوپروتئین در بافت‌های ماهی دارد و باید در هنگام مقایسه و تفسیر نتایج مدنظر قرار گیرد.

روش‌های مولکولی

استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای نمونه‌های بافت‌شناسی که در پارافین غوطه‌ور شده‌اند، این امکان را فراهم می‌کند که محل توالی‌های اولیگونوکلئوتید بافتی و سلولی را تعیین کنیم. در مورد PCR، عمل تثبیت باید منجر به ریخت‌شناسی سلولی مطلوب و یکپارچگی اسید نوکلئیک نگهداری شده شود. بااینکه در مورد ایمنی شیمی بافت، روش‌های مورداستفاده برای بافت‌های تثبیت‌شده در فرمالین سازگاری یافته است، اما تثبیت‌کننده‌هایی که پایه اصلی آن‌ها آلدئید است، برای حفظ و نگهداری اسیدهای نوکلئیک ترجیح داده می‌شوند. باوجوداین، خصوصیات اتصال متقاطع تثبیت‌کننده‌های آلدئیدی، گاهی اوقات نیازمند شرایط خاص هضم پروتئولیتیک (تجزیه پروتئین) است تا بتوان آن‌ها را مورداستفاده قرار داد. بعضی از تثبیت‌کننده‌ها مانند آن‌هایی که حاوی اسید پیکریک هستند (محلول‌های بوئن و لیلی)، یا آن‌هایی که واجد جیوه هستند (محلول زنکر) [2]، اسیدهای نوکلئیک و بافت‌ها را دچار تجزیه می‌کنند و به همین خاطر، برای مطالعات مولکولی مناسب نیستند.

نکات ایمنی

فرآیند تثبیت مشخصاً با مرگ سلولی همراه است؛ بنابراین، موادی که در این فرآیند مورداستفاده قرار می‌گیرند، باید به‌دقت جابه‌جا شوند. برگه‌های اطلاعات ایمنی مواد شرکت‌های تولیدکننده (MSDS)[3]، حاوی اطلاعات لازم همراه با جزئیات در مورد مواد شیمیایی و ترکیبات هستند. برگه‌های MSDS که به همراه هر ماده شیمیایی ارائه می‌شوند، باید واجد اطلاعات قطعی در مورد نکات ایمنی و جابه‌جایی آن باشند. اطلاعات لازم در مورد جابه‌جایی و نکات ایمنی بعضی از مواد متداول برای تثبیت بافت‌شناسی به شرح زیر ارائه می‌شود.

آلدئیدها (گلوتارآلدئید، فرمالدئید): این مواد اگر در تماس با پوست قرار گیرند، باعث تورم پوست می‌شوند و بوی آن‌ها ممکن است سمی‌باشد؛ بنابراین، باید آن‌ها را در زیر هود بخار و با

1. Quenching
2. Zenker’s solution
3. Manafacturer’s Material Safety Data Sheet

استفاده از دستکش جابه‌جا کرد. تنفس بخارات حاصله خطرناک است و فرمالدئید را به‌عنوان یک ماده سرطان‌زا به‌حساب می‌آورند. به لحاظ خطرات ناشی از استفاده و دفع فرمالدئید، مصرف محلول‌های تثبیت‌کننده غیرفرمالدئیدی درحال‌توسعه است، اما در حال حاضر چندان متداول نشده است.

کاکودیلات سدیم: کاکودیلات سدیم واجد آرسنیک است. اگر این محلول استنشاق شود، یا اینکه از طریق پوست جذب شود، ممکن است موجب تورم پوست و همچنین آماس کبد و کلیه شود. باید از دستکش استفاده کرد و جابه‌جایی آن را در زیر هود انجام داد. اگر کاکودیلات سدیم در تماس با اسیدها قرار گیرد، یا اینکه شوینده‌ها به داخل تأسیسات آب‌فلز کاری راه یابند، ممکن است گاز آرسنیک تولید شود (اوستراندر، ۲۰۰۰).

تتراکسید سدیم: تتراکسید سدیم در دمای اتاق فرار است و بخارات آن برای چشم، بینی و حلق سوزآور هستند. تماس با این محلول باید محدود شود و آن را در زیر هود جابه‌جا کنیم، آن هم درحالی‌که عینک ایمنی استفاده می‌شود.

دستگاه‌های مورداستفاده در آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی

دستگاه عمل‌آوری بافت

این دستگاه چهار مرحله را به انجام می‌رساند که شامل تثبیت، آبگیری، شفاف‌سازی و آغشته سازی است. این دستگاه دو حرکت دارد: ۱-حرکت انتقالی یا حرکت ظرف به ظرف ۲ - حرکت نوسانی.

تثبیت: این دستگاه دارای دوازده لیوان مخصوص است که به ترتیب در لیوان‌های شماره ۱ و ۲ محلول فرمالین ۱۰٪ ریخته‌اند، لیوان‌های شماره ۳ حاوی الکل ۷۰ درجه، شماره ۴ الکل ۸۰ درجه، شماره ۵ الکل ۹۰، شماره ۶ و ۷ الکل ۹۵ درجه هستند. لیوان شماره ۸ حاوی الکل مطلق است. لیوان‌های ۹ و ۱۰ حاوی گزیلول و درنهایت داخل دو لیوان آخر پارافین وجود دارد. این غلظت‌ها به‌تناسب کار ممکن است در آزمایشگاه‌ها کمی متفاوت باشند. کاسِت حاوی بافت توسط تکنیسین داخل زنبیل مخصوص قرار داده می‌شود. سپس زنبیل را به حلقه دستگاه عمل‌آوری بافت می‌آویزد، به‌طوری‌که زنبیل در لیوان شماره ۱ فرود آید. بعد از گذشت یک ساعت سر[1] دستگاه به‌طور اتوماتیک بالا می‌آید و حدود ۳۰ درجه موافق عقربه ساعت چرخش می‌کند . به‌این‌ترتیب زنبیل در بالای لیوان شماره ۲ قرار می‌گیرد. سپس سر دستگاه به‌طور اتوماتیک پایین آمده به‌طوری‌که زنبیل در داخل لیوان شماره ۲ فرود می‌آید. بعد از گذشت یک ساعت مرحله تثبیت (فیکساسیون) با موفقیت به پایان می‌رسد (خواجه، ۱۳۸۵).

1. Head

آب‌گیری: سپس سر دستگاه به‌طور اتوماتیک بالا می‌آید و حدود ۳۰ درجه موافق عقربه ساعت چرخش می‌کند. بدین ترتیب زنبیل حاوی بافت داخل لیوان شماره ۳ فرود می‌آید. این کار ادامه می‌یابد تا اینکه مرحله آبگیری[1] با موفقیت به پایان می‌رسد (خواجه، ۱۳۸۵).

شفاف‌سازی: در مرحله آبگیری از الکل با درجه صعودی استفاده شد تا آبگیری از بافت به‌خوبی انجام شود. گردش کار دستگاه عمل‌آوری بافت به‌طور اتوماتیک پیش می‌رود تا اینکه در مرحله شفاف کردن[2] چشمه‌ها و منافذ بافت توسط گزیلل باز می‌شود.

آغشتگی[3]: در این مرحله به‌تدریج پارافین مذاب (۵۲ – ۵۶ درجه سانتی‌گراد) به داخل منافذ و چشمه‌های بافت نفوذ می‌کند و در پایان باعث استحکام و قوام بافت می‌شود.

تصویر ۳- ۱: بن ماری برای تثبیت دمای آب.

تصویر ۳-۲: دستگاه عمل‌آوری بافت (اقتباس از خواجه، ۱۳۸۵).

1. Dehydration
2. Clearing
3. Impregnation

تصویر ۳-۳: مراحل انجام کار دستگاه عمل‌آوری بافت (اقتباس از خواجه، ۱۳۸۵).

در این مرحله نمونه‌های دارای قالب پارافینی را با دستگاهی به نام میکروتوم به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرون برش می‌دهیم. متداول‌ترین نوع میکروتوم، نوع چرخان است که در اکثر آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی استفاده می‌شود. با این دستگاه می‌توان مقاطع پشت سرهم تهیه کرد. قبل از برش برداری، باید بلوک تراشیده و روی پایه نصب شود. سطوح جانبی بلوک تا حاشیه بافت و سطوح فوقانی و تحتانی آن تا ۵ میلی‌متری مانده به بافت را می‌تراشیم. باید توجه داشت که همه سطوح بلوک به حالت موازی باشد. در این حالت بلوک پارافین برای نصب روی پایه آماده است. علاوه براین، قبل از شروع به کار باید دمای حمام آب (بن ماری) را به ۵۰-۴۵ درجه (۶-۵ درجه پایین‌تر از دمای ذوب پارافین رساند. همچنین لازم است تعدادی لام به میزان موردنیاز تهیه کنیم و با استفاده از قلم الماس کد بلوک و نیز شماره برش را به‌صورت پی‌درپی روی آن‌ها درج کنیم (خواجه، ۱۳۸۵).

۱- بلوک را در گیره میکروتوم جای می‌دهیم، به‌طوری‌که سطح بالا و پایین آن به‌موازات لبه تیغ قرار گیرند.

۲- گیره و بلوک را در جای خود قفل و میکروتوم را برای تهیه مقاطع میکرونی تنظیم می‌کنیم.

۳- باید توجه داشته باشیم که تیغ به‌طور مطمئن بسته شده باشد.

۴- سطح بلوک را تراش می‌دهیم تا کاملاً صاف شود. هنگامی‌که تیغ میکروتوم به محل نمونه رسید، مقاطع را به کمک قلم‌مو یا پنس با ملایمت برمی‌داریم و در سطح حمام آب شناور

می‌کنیم. مقاطع ناقص را از دور خارج می‌کنیم و مقاطع کامل را بعد از پهن شدن، با فرو بردن لام در حمام آب با زاویه ۴۵ درجه و بالا آوردن آن به‌صورت عمودی از سطح آب جمع‌آوری می‌کنیم. باید دقت کنیم که در حد امکان مقاطع در وسط لام قرار گیرند. همچنین درصورتی‌که مقاطع بزرگ باشند، برای هر لام فقط یک مقطع کافی است.

۵- لام‌ها را به‌آرامی روی یک سطح صاف در دمای آزمایشگاه قرار می‌دهیم.

۶- لام‌های تهیه‌شده را در جعبه لام می‌چینیم و برای خشک شدن کامل در اتوو (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار می‌دهیم. بعد از ۲۴ ساعت لام ها جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها آماده‌اند (خواجه، ۱۳۸۵).

باید در نظر داشته باشیم که: الف) بریدگی مقاطع در حین کار، نشا ن دهنده دندانه‌دار بودن لبه تیغ یا وجود گردوغبار یا مو در لبه تیغ است. بنابراین، لازم است لبه تیغ را هر از چند گاهی، در ضمن کار با زایلن تمیز و خشک‌کنیم. ب) وجود نوارهای افقی ضخیم و نازک در مقطع ممکن است به علت شُل بودن تیغ یا بلوک، سختی زیاد بلوک، یا کُندی تیغ باشد. ج) نازک بودن مقاطع در یک انتها به علت وجود ناحیه‌ای کُند روی تیغ است. د) انحنادار بودن نوار مقاطع به علت وجود ناحیه‌ای کُند روی تیغ یا موازی نبودن حواشی بلوک است. ه) وجود حفره در مقطع به علت وجود حباب در مایع مخصوص قالب‌گیری، یا وجود ناحیه سخت در بافت است؛ و) درصورتی‌که هوا گرم باشد، برش‌ها به‌سختی برداشته می‌شوند و اغلب دچار پارگی می‌شوند. در این صورت می‌توان با گذاشتن یخ روی سطح بلوک (به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه) آن را سفت کرد. هرچند که بیشتر مقاطع قدرت چسبیدن به لام‌های خشک را دارند، ولی معمولاً برای چسبیدن بهتر مقاطع به لام توصیه می‌شود که از مواد چسباننده استفاده شود .تعداد زیادی ماده چسباننده (مانند گلیسیرین، آلبومین، پلاسما، خمیر نشاسته و ژلاتین) برای این منظور موجود است. می‌توان برای افزایش قدرت چسبندگی لام ها از ژلاتین استفاده کرد. بدین منظور ۰/۳ گرم پودر ژلاتین به کمک همزن مغناطیسی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌شود. سپس محلول ژلاتین در بوکالی ریخته می‌شود. با فرو بردن لام ها به مدت چند ثانیه در محلول، لام‌ها ژلاتینه می‌شوند. لام‌ها پس از خشک شدن قابل‌استفاده هستند (خواجه، ۱۳۸۵).

رنگ‌آمیزی

هدف از رنگ‌آمیزی متمایز کردن سلول‌ها، اجزای سلولی و عناصر تشکیل‌دهنده بافت‌ها ازنظر نوری، برای مطالعه ریزبینی است. واکنش‌های رنگ‌آمیزی بر سه اصل حلالیت، جذب و آغشتگی استوارند. روش رنگ‌آمیزی معمولی، یعنی استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین، روش متداول در اکثر آزمایشگاه‌هاست. هماتوکسیلین نوعی رنگ بازی است و ساختارهایی را که با آن رنگ می‌گیرند به

رنگ آبی تا بنفش درمی‌آورد. این ساختارها به ساختارهای بازوفیل موسوم‌اند. ائوزین نوعی ماده رنگی اسیدی است و ساختارهایی را که با آن رنگ می‌شوند به رنگ قرمز درمی‌آورد. این ساختارها به ساختارهای اسیدوفیل یا ائوزینوفیل موسوم‌اند. با این روش رنگ‌آمیزی هسته‌ها به رنگ آبی و سیتوپلاسم به رنگ قرمز در می‌آیند. اغلب تثبیت‌کننده‌ها به‌جز آن‌هایی که حاوی تتروکسید اسمیوم هستند، برای این روش رنگ‌آمیزی مناسب هستند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

روش کار: به‌طورکلی قبل از آنکه مقاطع پارافینی رنگ‌آمیزی شوند، باید پارافین از مقطع خارج شود و آبدهی انجام شود. برای حذف کردن پارافین از گزیلن (زایلین) و برای آبدهی از الکل اتیلیک با درجات نزولی استفاده می‌کنیم. بعد از رنگ‌آمیزی، مقاطع احتیاج به آب‌گیری و شفاف‌سازی دارند. عمل آبگیری با استفاده از الکل مطلق و شفاف‌سازی با زایلن انجام می‌شود. بنابراین، روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین به این شکل انجام می‌شود (خواجه، ۱۳۸۵).

۱- زایلین I و II هر یک به مدت سه دقیقه
۲- الکل‌هایی با درجات نزولی (مطلق، ۹۶، ۷۰ و ۵۰) هریک به مدت سه دقیقه
۳- آب مقطر سه دقیقه
۴- هماتوکسیلین هاریس ۵ دقیقه
۵- شستشو با آب جاری ۳ دقیقه
۶- ائوزین ۵ دقیقه
۷- آب مقطر ۳ دقیقه
۸- الکل مطلق ۳ دقیقه
۹- زایلین I و II هر یک به مدت ۳ دقیقه

باید دقت کرد که: الف) بعد از رنگ‌آمیزی، لام‌ها به مدت زیاد در الکل نمانند، چون رنگ آن‌ها از بین می‌رود. ب) لام ها را باید بعد از خارج کردن از محلول ابتدا به‌صورت نسبی خشک، سپس وارد محلول بعدی کرد. ج) هرچه لام‌ها مدت بیشتری در آخرین زایلین بماند، شفاف‌تر می‌شوند (خواجه، ۱۳۸۵).

چسبانیدن: چسباندن که اصطلاحاً مونته کردن مقاطع نیز نامیده می‌شود، به این مفهوم است که بعد از رنگ‌آمیزی و قبل از مطالعه مقطع، باید روی آن لامل قرار گیرد تا حمل‌ونقل آن آسان باشد و از آسیب دیدن مقطع جلوگیری به عمل آید. مواد مونته کننده به دو گروه تقسیم می‌شوند: مواد آبی مثل ژل گلیسیرین، محیط آپاتی و محیط فارانت. مواد آبی هنگامی برای مونته کردن به کار می‌روند که رنگ توسط الکل برداشته‌شده و یا از بین می‌رود، مثل رنگ‌آمیزی چربی (سودان) ۲ - مواد رزینی مثل کانادا بالسام، دپکس و انتلان که در زایلین یا تولوئن حل می‌شوند. ضریب انکسار مواد مونته کننده باید در حد امکان نزدیک به شیشه باشد (خواجه، ۱۳۸۵).

روش کار

۱- زیادی زایلن از اطراف مقطع پاک می‌شود.

۲- یک یا دو قطره انتلان را بر مقطع می‌ریزیم و اجازه می‌دهیم تا همه سطح مقطع را آغشته کند. مقدار واقعی ماده مونته کننده موردنیاز بستگی به‌اندازه مقطع دارد.

۳- لامل را به‌طور مایل به مقطع نزدیک می‌کنیم و آن را به‌آرامی روی ماده مونته کننده قرار می‌دهیم.

۴- هرگونه حباب هوا را با فشردن آرام لامل و یا به ضربات ملایم از بین می‌بریم.

۵- زیادی انتلان را می‌توان با زایلین پاک کرد.

لام‌های تهیه‌شده پس از ۷۲ ساعت کاملاً خشک می‌شوند. سپس می‌توان با ۳ میلی‌لیتر اسید الکل ۳٪ (۳ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک در ۹۷ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۶ درجه) لام‌ها را کاملاً تمیز و شفاف کرد. پس از حذف انتلان اضافی به کمک تیغ اسکالپل، لام‌ها آماده مطالعه می‌شوند (خواجه، ۱۳۸۵).

تصویر ۳-۴: دستگاه میکروتوم (اقتباس از خواجه، ۱۳۸۵).

تصویر ۳-۵ نحوه عمل دستگاه میکروتوم (اقتباس از خواجه، ۱۳۸۵).

سلول‌شناسی

سلول‌شناسی یکی از سودمندترین روش‌های کاربردی آسیب‌شناسی در ماهیان است. این کار مشخصاً برای تشخیص انگل‌های تک‌یاخته خونی ماهیان استفاده می‌شود. مزیت اصلی این روش، این است که برای اندازه‌های مختلف ماهی کاربرد دارد. برای گرفتن گسترش سطحی باید به جراحات سطحی، افزایش ترشح موکوس، علائم رفتاری تحریکی، حرکات شدید، انعکاس نور و سائیدن بدن توجه کرد. تهیه گسترش‌های سطحی پوست ماهیان به‌صورت لام مرطوب رنگ نشده، به‌منظور تسهیل مشاهده حرکات انگل‌ها صورت می‌گیرد. احتمالاً بر اثر تمرین، تشخیص انواع سلول‌های سطحی ماهی امکان‌پذیر خواهد بود. این کار با میکروسکوپ فازکنتراست بهتر صورت می‌گیرد. می‌توان بعد از گرفتن لام مرطوب همان لام را رنگ کرد. این امر به تشخیص عوامل بیماری‌زای مشکوک و ارزیابی پاسخ ماهی نسبت به این عوامل کمک می‌کند. اگر احتمال داده شود که برای انجام آزمایش کامل، به بیش از یک رنگ‌آمیزی نیاز هست، باید گسترش‌های متعددی تهیه شوند. ازآنجاکه ممکن است برخی از لام‌ها رنگ خود را از دست بدهند و رنگ‌آمیزی مجدد به‌روش‌های دیگر موردنیاز باشد، لذا ساده‌ترین و مطمئن‌ترین کار این است که لام‌های متعددی در اختیار داشته باشیم (استوسکوف، ۱۹۹۳).

رنگ‌آمیزی با رنگ متیلن بلو اغلب به‌عنوان یک روش رنگ‌آمیزی عمومی به کار می‌رود و اجازه می‌دهد که عناصر ایجادشده در داخل سلول را بهتر مشاهده شوند. این روش بسیار سریع صورت می‌گیرد و شبیه رنگ‌آمیزی رایت – گیمساست و تفسیر نتایج از این طریق آسان است. رنگ‌آمیزی گرم برای شناسایی باکتری‌ها و رنگ‌آمیزی اسید فست برای تعیین مایکو باکتری‌ها به کار می‌رود. رنگ‌آمیزی رایت فوری به‌طور وسیع در امور دامپزشکی استفاده می‌شود و برای رنگ‌آمیزی عناصر موجود در گسترش‌های سطحی به کار می‌رود. اغلب محققان برای تفسیر گسترش‌های خونی از این روش رنگ‌آمیزی استفاده می‌کنند. این روش تفسیر سلول‌شناسی را آسان‌تر می‌کند. رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو به‌طور انتخابی برای قارچ‌ها به کار می‌رود. تمام این رنگ‌ها را می‌توان به‌صورت کیت‌های تجاری خریداری کرد و یا با استفاده از فرمول‌ها تهیه کرد. این روش‌ها، سریع بوده و نیاز به دستگاه خاصی ندارند (استوسکوف، ۱۹۹۳).

معمولاً پوست ماهی دارای بافت پوششی سنگفرشی مطبق غیرشاخی و نمونه‌هایی که از خراش پوست به دست می‌آیند، واجد تعداد زیادی از سلول‌های سنگفرشی و فلس‌ها هستند. معمولاً سلول‌های پوششی بزرگ هستند و حالت چندضلعی و پهن و سیتوپلاسم فراوان دارند و به‌طور مشخص، واجد هسته گردی هستند که تراکم کروماتین آن یکنواخت است. این سلول‌ها ممکن است به‌صورت یک لایه سلولی دیده شوند، ولی در گسترش‌های تهیه‌شده از ماهی، منفرد هستند. فلس‌های ماهی به اشکال، اندازه‌ها و ساختارهای مختلف دیده می‌شوند. فلس‌های کوچک در

گسترش‌های سطحی بیشتر ماهیان شبیه اثرانگشت هستند. این فلس‌ها هسته ندارند و به‌راحتی از اجزای سلولی قابل‌تفکیک هستند (استوسکوف، ۱۹۹۳).

وضعیت غالباً دیگری که در بیشتر گسترش‌های پوست دیده می‌شود، تولید موکوس توسط سلول‌های جامی شکل است. ظاهر موکوس به‌صورت لایه‌های زمینه‌ای شکل و یا توده‌های بی‌شکل شفاف است که اغلب واجد سلول نیز هستند. هنگامی‌که آن را توسط رنگ‌های رومانوفسکی یا متیلن بلوی جدید رنگ‌آمیزی شوند، پروتئین موکوس به رنگ آبی کمرنگ تا ارغوانی دیده می‌شود (استوسکوف، ۱۹۹۳).

گاهی اوقات ممکن است سلول‌های جامی شکل در داخل گسترش به‌صورت سلول‌های پوششی استوانه‌ای بلند با هسته قاعده‌ای و سیتوپلاسم فراوان دیده شوند. سیتوپلاسم آن‌ها حاوی واکوئل‌های واضح متعددی است و پس از رنگ‌آمیزی، دانه‌های ائوزینوفیلی ریز در داخل سیتوپلاسم بازوفیلی آن‌ها دیده می‌شود. گاهی اوقات ملانوفورها و ایریدوفورها مشاهده می‌شوند که ممکن است همراه با بافت‌های پوششی کنده شوند. این سلول‌ها می‌توانند ظاهر ستاره‌ای شکل پیچیده‌ای به خود بگیرند. پاهای کاذب این سلول‌های آمیبی شکل واجد رنگدانه به اشکال پیچیده و مختلف دیده می‌شود. معمولاً این سلول‌ها حاوی رنگدانه‌های زرد، قرمز یا سیاه هستند و هنگامی‌که در گسترش مشاهده می‌شوند، تعداد آن‌ها کاملاً زیاد و غالب است. آن‌ها ممکن است در گسترش‌های تازه، به‌صورت رنگدانه‌های متحرک فعال مشاهده شوند و به نظر می‌رسد که در حال حرکت هستند. این سلول‌ها را نباید با موجودات زنده بیماری‌زای غیرمعمول اشتباه گرفت (استوسکوف، ۱۹۹۳).

سلول‌های پوششی غیرطبیعی نیز ممکن است در آزمایش‌های سلول‌شناسی شناسایی شوند. آن‌ها شامل سلول‌های بسیاری بزرگی هستند که توسط ویروس لنفوسیستیس آلوده شده‌اند. این سلول‌ها را می‌توان در گسترش‌های حاصل از جراحات مشخص لنفوسیستیس مشاهده کرد، اما به‌طور متداول در فرآورده‌های حاصل از بیوپسی پوست، جایی که قسمت کوچکی از یک تومور تحریک‌کننده[1] وجود دارد و یک گسترش بافتی از آن تهیه‌شده است، شناسایی می‌شوند.

سلول‌های دیگری که ممکن است در یک گسترش سطحی بدن ماهی دیده شوند، شامل فیبروپلاست‌های دوکی‌شکل و سلول‌های چربی (آدیپوسیت‌ها) است که حاوی یک واکوئل بزرگ منفرد هستند. این نوع سلول‌های بافت همبند فقط در گسترش از مناطقی دیده می‌شود که لایه‌های سلولی دست خورده‌اند. این سلول‌ها به‌سرعت سلول‌های پوششی کنده نمی‌شوند و به‌ندرت دیده می‌شوند.

1. Exuberant

پاسخ‌های آماسی بر روی پوست ماهی، مشابه دیگر حیوانات است. هموسیت‌های لوکوسیتیک (گلبول‌های سفید) در این امر دخالت دارند. گلبول‌های سفید غالبی که در گسترش‌های سطحی بدن ماهی دیده می‌شوند، شبیه ماکروفاژها یا مونوسیت‌ها هستند. هتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و حتی بازوفیل‌ها را می‌توان در گسترش‌های سطحی مشاهده کرد. لنفوسیت‌ها و گاهی اوقات ترومبوسیت‌ها نیز قابل‌مشاهده هستند. محققان خبره و هشیار می‌توانند در مورد وضعیت گلبول‌های سفید در داخل گسترش قضاوت کنند. در عفونت‌های شدید، گلبول‌های سفید توکسیک یا تجزیه‌کننده دیده می‌شوند. در سلول‌های توکسیک، افزایش واکوئول‌های سیتوپلاسمی، دانه‌دار شدن نامشخص (آتیپیک) و درجاتی از کاریورکسی در هسته دیده می‌شود. ممکن است انگل‌ها، ازجمله باکتری‌ها در گسترش موکوس دیده شوند. تشخیص انگل‌های تک‌یاخته در گسترش‌های تازه، در هنگامی‌که زنده هستند و حرکت دارند، راحت است. این انگل‌ها را می‌توان از روی وضعیت ریخت‌شناسی خاص و وضعیت حرکت آن‌ها تشخیص داد. یافتن انگل‌های کرمی در گسترش‌های سطحی، نسبتاً راحت است و از طریق ویژگی‌های ریخت‌شناسی می‌توان آن‌ها را شناسایی کرد. باکتری‌ها در گسترش‌های تازه به‌صورت کلنی‌های بزرگ قابل‌شناسایی هستند، اما از طریق لام‌های رنگ‌آمیزی شده راحت‌تر می‌توان آن‌ها را مطالعه کرد.

شکل ۳-۶: ساختار کلی سلول‌های کبدی در نمونه شاهد ماهی سفید (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

شکل ۳-۷: ساختار سلول‌های کبدی در تیمارماهی سفید (H & E) در اثر مواجهه ۲۴ ساعته با جلبک ندولاریا به تعداد $۱۰^{۸}$ در میلی‌متر مکعب (بزرگ‌نمایی× ۴۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

شکل ۳-۸: لیز شدن آشکار غشا هپاتوسیت (مشاهده سلول‌های نکروتیک) در اکثر حالت‌ها به همراه هسته پیکنوتیک ۴۸ ساعت پس از مواجهه با $۱۰^{۴}$ عدد جلبک ندولاریا (H & E) (بزرگ‌نمایی× ۴۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۹: آبشش ماهی کپور نمونه شاهد (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۱۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۱۰: آبشش ماهی کپور نمونه شاهد (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۲۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۱۱: آبشش هایپر پلازی شده ماهی کپور در اثر مواجهه با $۱۰^{۸}$ عدد جلبک ندولاریا (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۴۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۱۲: کلیه ماهی کپور نمونه شاهد (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۴۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۱۳: کلیه ماهی کپور پس از مواجهه با $۱۰^{۸}$ جلبک ندولاریا به مدت ۹۶ ساعت (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۲۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۱۴: کلیه ماهی کپور پس از مواجهه با $۱۰^{۸}$ جلبک ندولاریا به مدت ۹۶ ساعت (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۲۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۱۵: کلیه ماهی کپور پس از مواجهه با $۱۰^{۸}$ جلبک ندولاریا به مدت ۹۶ ساعت (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۴۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۱۶: روده متعارف ماهی نشان‌دهنده چین‌خوردگی‌های داخل روده (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۴۰) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۳-۱۷: لوزالمعده برون‌ریز متعارف ماهی به همراه روده مجاور در طرفین (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۴۰) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۳-۱۸: مقطع بافت‌شناسی بیضه متعارف ماهی پرشده از اسپرماتوزوئید (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۴۰) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۳-۱۹: مقطع بافت‌شناسی طحال نشان‌دهنده پولپ قرمز و تجمعات متراکمی از گلبول‌های سفید بازوفیلیک (پولپ سفید) که الیپسوئیدهای طحالی کم‌رنگ‌تر (حاوی سلول‌های بیگانه‌خوار) را احاطه کرده‌اند (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگنمایی ۴۰) (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۳-۲۰: ساختار عضله در ماهی سفید (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۳).

تصویر ۳-۲۱: مقطع آسیب‌شناسی یواسرونژیلیدس اکسیسوس در روده ماهی خاویاری (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (ستاری و مخیر، ۲۰۰۵).

تصویر ۳-۲۲: مقطع آسیب‌شناسی لپتورینکوئیدس پلاژی سفالوس در روده ماهی خاویاری (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰) (ستاری و مخیر، ۲۰۰۵).

تصویر ۳-۲۳: مقطع آسیب‌شناسی لپتورینکوئیدس پلاژی سفالوس در روده ماهی خاویاری (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (ستاری و مخیر، ۲۰۰۵).

تصویر ۳-۲۴: مقطع آسیب‌شناسی کوکولانوس اسفروسفالوس در روده ماهی خاویاری (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (ستاری و مخیر، ۲۰۰۵).

تصویر ۳-۲۵: مقطع آسیب‌شناسی یوبوتریوم آسیپنزرینوم در روده ماهی خاویاری (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (ستاری و مخیر، ۲۰۰۵).

تصویر ۳-۲۶: مقطع آسیب‌شناسی بوتریمونوس فالاکس در روده ماهی خاویاری (رنگ‌آمیزی H & E) (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (ستاری و مخیر، ۲۰۰۵).

فصل چهارم

فنون خون‌گیری و خون‌شناسی در ماهیان

مقدمه

محققان تمایل دارند که علوم آزمایشگاهی را با خون‌شناسی و شاید سرم‌شناسی یکسان فرض کنند. این روش‌ها، عناصر ضروری انضباط کاری آن‌ها است، اما نمی‌توان آن‌ها را برای کل جمعیت تعمیم داد. در هر کار عملی، به‌ویژه در طب ماهی، محققان باید صلاحیت و شایستگی لازم برای انجام آزمایش‌های متعدد را داشته باشند که می‌توان از خون‌شناسی، سرم‌شناسی و سلول‌شناسی نام برد. مطالب این فصل عمدتاً بر روی روش‌ها و تفسیر عمومی این سه مبحث متمرکز شده است. با توجه به این‌که ماهیان را به تعداد فزاینده در تحقیقات فیزیولوژیک، داروشناسی و سم‌شناسی مورداستفاده قرار می‌دهند، لذا نیاز مبرمی به جزئیات روش‌های نمونه‌برداری از ترشحات آن‌ها احساس می‌شود. در این فصل، جزئیاتی در خصوص رهیافت‌های چندگانه جمع‌آوری خون ازجمله ساختن کانول‌ها و کاتترها ارائه می‌شود. همچنین ملاحظات خاصی در مورد اصلاح و حفظ و نگهداری نمونه‌ها در هر بخش ارائه خواهد شد (استوسکوف، ۱۹۹۳) .

خون نوعی بافت همبندی است که ماده بنیادی آن پلاسما، رشته‌های آن، فیبرین و عناصر سلولی آن، گلبول‌های قرمز، سفید و ترومبوسیت‌ها هستند. بسیاری از ماهیان، دستگاه گردش خون مشابه دارند و این دستگاه به میزان زیاد و یا تماماً گسسته است و قلب، بسترهای مویرگی آبششی و عمومی و رگ‌های بزرگ دریک زنجیره (آرایش) خطی به هم اتصال دارند. مهم‌ترین وظایف خون شامل:

۱. انتقال موادغذایی از لولهٔ گوارشی به بافت‌ها، به‌طرف و یا از سوی اندام‌های ذخیره کننده (مثل کبد).
۲. انتقال متابولیت‌ها (مانند اسید لاکتیک از عضلات به کبد).
۳. انتقال محصولات دفعی از بافت‌ها به‌سوی اندام‌های تنفسی و از اندام‌های ترکیب‌کننده (مثل اوره در کبد) به‌سوی کلیه‌ها.
۴. انتقال گازها (اکسیژن و گازکربنیک) بین اندام‌های تنفسی و بافت‌ها و ذخیره کردن اکسیژن.
۵. انتقال هورمون‌ها مثل آدرنالین (واکنش سریع) و هورمون رشد (واکنش کند).
۶. انتقال سلول‌های واحد عمل غیرتنفسی (مثل گلبول‌های سفید).
۷. انتقال حرارت از اندام‌های درونی به‌سوی سطح بدن برای دفع آن.
۸. انتقال نیرو، مثل شکستن کیتین سخت‌پوستان.
۹. انعقاد که از خصوصیات ذاتی بسیاری از انواع خون و همولنف است

۱۰. تثبیت محیط داخلی مناسب برای سلول‌ها، به‌منظور ایجاد pH مناسب، یون‌ها، مواد غذایی و غیره.

خون‌گیری

هنگامی‌که ماهی را برای نمونه‌گیری و یا مقاصد دیگر دست‌کاری می‌کنند، حیوان دچار استرس می‌شود و اثر استرس بر روی شاخص‌های خونی بسیار وسیع و پایدار است. درنتیجه، امروزه بسیاری از محققان از نمونه‌گیری‌های پی‌درپی از خون ماهیان (گرفتن خون از یک ماهی در دفعات متعدد) اجتناب می‌کنند. حتی هنگامی‌که فقط یک‌بار نمونه‌گیری انجام می‌شود، عوامل متعددی بر روی اطلاعات به‌دست‌آمده تأثیر می‌گذارند. این عوامل، شامل: روش‌های مورداستفاده برای جلوگیری از تحرک و جست‌وخیز ماهی قبل از نمونه‌گیری، نوع ماده ضد انعقاد مصرفی و طول مدت ذخیره‌سازی نمونه قبل از مصرف و شرایط حاکم بر آن است.

معمولاً خون ماهی سریع منعقد می‌شود و این ویژگی توسط محققان اولیه، در هنگام تهیه نمونه مشخص‌شده است. آن‌ها اجازه می‌دادند که نمونه منعقد شود. سپس لخته را سانتریفوژ می‌کردند و سرم رویی را برای آزمایش مورداستفاده قرار می‌دادند. اگرچه این روش بی‌دردسر بود، اما امروزه به فراموشی سپرده شده است، زیرا نمی‌توان وضعیت سلولی خون را که بسیار حائز اهمیت است، مشخص کرد. به‌علاوه، سرمی که به‌این‌ترتیب تهیه می‌شود، پلاسما به‌حساب نمی‌آید، زیرا عناصر انعقادی آن از بین رفته‌اند. انعقاد با انتقال یون‌ها و آب در بین پلاسما و سلول‌ها همراه است. بعضی از سلول‌ها به‌طور اجتناب‌ناپذیر می‌شکنند و ترکیبات داخلی آن‌ها آزاد می‌شود و وضعیت خون را دگرگون می‌کند؛ بنابراین، مواد ضد انعقاد مورداستفاده قرار می‌گیرد تا سلول‌ها را از پلاسما جدا کنیم. البته استفاده از این مواد، مستلزم تحمل مشکلات متعددی است و باید این مسئله را مدنظر داشت (هوستون ۱۹۸۰).

مواد ضد انعقاد

معمولاً دودسته مواد ضد انعقاد مورداستفاده قرار می‌گیرند. یک دسته شامل اکسالات‌ها، سیترات‌ها و عوامل شلات‌کننده[1] (ملحق شونده) نظیر EDTA (اتیلن دی آمین – تترااستیک) هستند که انعقاد را از طریق ایجاد مجموعه[2] با یون‌های کلسیم، کند می‌کنند. وجود این یون‌ها برای تبدیل پروترومبین به ترومبین، توسط آنزیم ترومبوپلاستین ضروری است. آنزیم مذکور عمل انعقاد را

1. Chelating
2. Complex

تحریک می‌کند.دسـتهٔ دوم از عوامل ضـد انعقاد، شـامل هپارین اسـت که به‌طور طبیعی در داخل مست‌سل‌ها[1] و دیگر بافت‌ها یافت می‌شود و خاصیت ضد ترومبین دارد.

EDTA باعث کاهش pH خون شـده و آن را اسیدی می‌کند، درصورتی‌که اکسالات و سیترات تا حدودی pH را بالا می‌برند. EDTA غلظت یون دوظرفیتی کلسـیم و دیگر یون‌های دو ظرفیتی را کـاهش می‌دهـد، ولی در مورد یون‌هـای تـک‌ظرفیتی، بسـتگی به نوع نمک دارد. علاوه بر این، افزایش فشار نسبی دی‌اکسید کربن ($p\ CO_2$) و اثر القایی روت[2] یا تغییر در تعادل بین اکسیژن و خون نیز از عوارض اسـتفاده از EDTA اسـت. به همین دلیل، بهتر اسـت EDTA را تنها برای نمونه‌گیری‌هایی که به‌منظور به دست آوردن اطلاعات در زمینه فشار گازهای خون یا وضعیت اسید – باز آن انجام می‌شـود، مورداسـتفاده قرار داد. هنگامی‌که حجم نمونه انتهایی مشـخص اسـت، می‌توان میزان EDTA را افزایش داد تا غلظت آن در هر میلی‌لیتر نمونه به ۵ میلی‌گرم برسد (نوگا ۲۰۱۰).

هپارین، موکوپلی‌سـاکارید سولفاته D- گلوکوز اسید و D – گلوکوونیک اسید است و معمولاً در بازار به‌صـورت نمک آمونیوم، کلسـیم، سـدیم یا لیتیم وجود دارد. ازآنجاکه سـطوح زیست‌شناختی موردنیاز لیتیم کم است، بسیاری از محققان، نمک مذکور را به‌رغم قیمت نسبتاً گران‌تر آن، به دیگر نمـک‌هـا ترجیح می‌دهنـد. هپارین اثر کمی بر روی حجم سـلول‌های خونی، pH خون و فشـار دی‌اکسـید کربن و اکسـیژن بر جا می‌گذارد. البته مطالعات جدیدتر نشان داده است که این ماده بر روی نفوذپذیری هسـته نسـبت به کروماتین اثر می‌گذارد و باعث تورم هسـته می‌شـود و کروماتین هسـته به سـیتوپلاسـم تغییر مکان می‌دهد. همچنین، باعث تجمع و انباشـتگی گلبول‌های قرمز در یک نقطه می‌شـود و علاوه بر این، عنوان شـده اسـت که اثر این ماده از ویالی به ویال دیگر متغیر است (هوستون ۱۹۸۰).

هپارین حل‌شـده در سـرم نمکی (معمولاً ۰/۹ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم) متداول‌ترین شـکل این ماده در مطالعات مربوط به کانول گذاری در ماهیان اسـت. غلظت هپارین در سرم نمکی هپارین دار متفاوت اسـت و عمدتاً بسـتگی به گونه ماهی، وزن ماهی یا مورد اسـتعمال نمونه دارد، هرچند که فشـارخون، میزان ضـربان قلب، دما و مواد سـازنده کانول نیز به‌عنوان عوامل مهم اعلام شـده‌اند. اگر قرار اسـت که یون‌های کلسـیم در پلاسـمای هپارین‌دار اندازه‌گیری شوند، غلظت‌های هپـارین نبـایـد از ۱۰۰ واحـد بین‌المللی بـه ازای هر میلی‌لیتر تجـاوز کند. مثال‌های خاص هپارین مورداستفاده در آزمایش‌های کانول‌گذاری در جدول ۱ ارائه شده است.

1. Mast cells
2. Induced Root Effect

جدول ۴-۱: مثال‌هایی از مواد ضد انعقاد در تحقیقات مربوط به کانول گذاری در رگ‌ها

گونه	سن یا وزن	ضد انعقاد	غلظت	رگ کانول گذاری شده
انکورینکوس میکیس	۱۳۴۶-۵۵۳ گرم	هپارین	۴۵۰ واحد در میلی‌لیتر سرم نمکی (سالین)	آئورت پشتی، سرخرگ صفاقی
انکورینکوس میکیس	۴ سال	سدیم هپارینه	۱ میلی‌گرم در لیتر سالین ۱٪	آئورت پشتی
انکورینکوس میکیس	۴۵۰-۱۵۰ گرم	هپارین	۱۰ واحد در میلی‌لیتر سالین ۰/۹٪	آئورت پشتی
سالموگردنری (قزل‌آلای سرپولادی)	۸۰۰-۱۳۵ گرم	هپارین	۱۴۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر	آئورت پشتی
سیپرینوس کارپیو	-	هپارین	۱۰ واحد در میلی‌لیتر سالین	آئورت پشتی
سالموسالار	۱۱۶۰-۵۸۰ گرم	هپارین	۱۰۰۰ واحد محلول هپارین	آئورت پشتی

نمک‌های اکسالات یا سیترات نیز به‌عنوان مواد ضدانعقاد در آزمایش‌های ماهیان مورداستفاده قرارگرفته‌اند. فعالیت ضدانعقاد این نمک‌ها، از طریق کاهش یون کلسیم خون حاصل می‌شود و این امر باعث می‌شود که از تشکیل ترومبین ممانعت شود. معمولاً خون را در داخل لوله‌های حاوی نمک‌های اکسالات یا سیترات جمع‌آوری می‌کنند، یا اینکه از لوله‌هایی که از قبل مقادیر اندازه‌گیری‌شده‌ای از نمک‌های اکسالات یا سیترات در داخل آن‌ها وجود دارد و ازنظر تجاری در دسترس هستند، استفاده می‌شود (برای مثال، لوله‌های vacutainer، شرکت Becton Dickinson). هیچ گزارشی وجود ندارد که نشان دهد این نمک‌ها به‌عنوان مواد ضدانعقاد در روش‌های کانول‌گذاری مورداستفاده قرارگرفته باشند. احتمالاً علت این امر، ممانعت این ترکیبات از یون کلسیم است که ممکن است با اثرات عروقی یا عمومی ناخواسته همراه باشد.

در اینجا لازم است اثرات روند ایجاد بیهوشی نیز بر روی ویژگی‌های خون مدنظر قرار گیرد. معمولاً این اثرات بسیار متعددند، اما به نظر می‌رسد که بعضی از آن‌ها (برای مثال، افزایش میزان گلوکز، لاکتات، پیروات، خصوصاً استروئیدها، یا کاتکل آمین‌های خون یا پلاسما) پاسخ‌های عمومی است که به‌واسطه دست‌کاری ماهی، قرار گرفتن حیوان در معرض هوا و دیگر اختلالات بروز می‌کند. باوجوداین، در مواقعی که نیازی به استفاده مجدد از نمونه وجود ندارد، می‌توان عوارض ناشی از

مصـرف مواد بیهوش کننده را با اسـتفاده از بی‌حرکت کردن[1] حیوان توسط ضربه از بین برد. ضربه شدید با استفاده از لبه یک تیشه آهنی بر روی محل اتصال جمجمه به ستون مهره‌ها، سبب آسیب غیرقابل‌جبران دسـتگاه عصـبی مرکزی ماهی و بی‌حرکت شـدن آن می‌شـود. ضـربه را باید دقیق و بدون اعمال نیروی اضافی زد تا آئورت پشتی پاره نشود.

بعضـی از آزمایشـگاه‌ها قبل از آزمایش یا ذخیره نمونه‌ها، آن‌ها را در یکجا انباشـته می‌کنند، اما شـــواهدی وجود دارد که نشـــان می‌دهد زمان ذخیره کردن نمونه، ممکن اســـت یک متغیر مهم به‌حســـاب بیاید. به‌عنوان‌مثال، در یک بررســـی مشـــاهده شـــد که میزان هماتوکریت خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمانی که توسـط MS-222 بیهوش شده بود، در دقایق مختلف پس از نمونه‌گیری افزایش یافت.

بررسـی‌هایی که توسـط محققان مختلف، بر روی عوامل مؤثر بر شاخص‌های خونی انجام شد، یـک نتیجه کلی را به همراه داشـــت: نمونه‌ها را باید بدون تاخیر مورد آزمایش قرار داد و یا ذخیره کرد؛ نمونه‌گیری برای آزمایش‌هایی که برای انجام آن‌ها کل خون موردنیاز اســـت، باید به‌ســـرعت انجام شود؛ نمونه باقیمانده را باید ترجیحاً در دمای کم سانتریفوژ کرد؛ پلاسمای رویی را باید توسط یک میکروپی‌پت جمع‌آوری کرد و به داخل یک لوله پلاســتیکی ســرپوش‌دار انتقال داد؛ پلاســمای باقیمانده بر روی سـرستون سلول‌های متراکم شده را باید از طریق یک کاغذ صافی جذب کرد؛ اگر نمونه گلبول‌های قرمز موردنیاز اسـت، باید لایه رویی[2] گلبول‌های سـفید را خارج کرد؛ اگر به نمونه گلبول‌های سـفید احتیاج داشته باشیم، روش‌های پیشرفته جداسازی و تغلیظ این سلول‌ها موردنیاز است.

هنگامی‌که پلاسـما و اجزای سـلولی از هم جدا می‌شوند، می‌توان آن‌ها را حداقل به مدت ۶ ماه بدون هیچ‌گونه تغییری در ترکیبشـــان ذخیره کرد. برای مثال، پس‌ازاینکه اجزای خون در نیتروژن مایع با دمای ۷۵- درجه سـانتی‌گراد منجمد می‌شـوند، تغییرات اندکی در اسـمولاریته پلاسـما یا میزان آب سـلول‌های متراکم شـده و ترکیب یونی ایجاد می‌شـود. میزان هموگلوبین سلولی، غلظت پروتئین پلاســـما، تحرک الکتروفوزی و وفور نســـبی ایزومورف‌های هموگلوبین و فراکســـیون‌های پروتئین پلاسـما، تغییرات کمی را نشان می‌دهند، ولی از طرف دیگر، فعالیت آنزیمی در خلال دوره ذخیره‌سـازی نمونه کاهش می‌یابد؛ اما به‌طورکلی برای احتیاط، نباید نمونه‌های پلاسما و گلبول‌های قرمز را منجمد کرد. به همین دلیل، قبل از ذخیره‌ســازی نمونه، باید درزمینه تقســیم کردن اجزای نمونه از یکدیگر تصمیم‌گیری شود.

---

1. Stunning
2. Buffy

در مواقعی که تأخیر در روند آزمایش بر روی نمونه غیرقابل‌اجتناب است، ضروری است که از روش سرد کردن نمونه استفاده شود. اگرچه، خصوصیات خون، حتی در داخل یخچال نیز دچار تغییر می‌شود. برای مثال، حجم گلبول‌های قرمز و میزان آب آن‌ها افزایش می‌یابد؛ انتقال یون‌های سدیم و کلر از پلاسما به داخل سلول‌ها و انتقال معکوس یون پتاسیم از سلول‌ها به داخل پلاسما روی می‌دهد؛ غلظت ATP به‌شدت کاهش می‌یابد، اما در عوض، غلظت ADP افزایش زودگذری نشان می‌دهد. در تمام شرایط، در نمونه‌هایی که داخل یخچال نگهداری می‌شوند، در عرض یک تا سه ساعت، تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای روی می‌دهد، ولی در مورد نمونه‌هایی که در دمای اتاق نگهداری می‌شوند، این تغییرات در عرض یک ساعت و یا کمتر ظاهر می‌شود.

از استفاده توأم بعضی از ترکیبات بیهوش‌کننده و ضدانعقاد با یکدیگر باید اجتناب ورزید. اغلب استفاده توأم MS-222 به همراه EDTA باعث همولیز (تجزیه گلبول‌های قرمز خون) می‌شود و این امر در هنگام ذخیره‌سازی نمونه شدت می‌یابد. در دمای اتاق، وقوع این امر قطعی است. در نمونه‌هایی که با بی‌حس کردن مکانیکی ماهیان و استفاده از هپارین به دست می‌آیند، به‌ندرت دیده می‌شود که همولیز و افزایش حجم گلبول‌ها ایجاد شود و ترکیب آن‌ها تغییر کند. ترکیبی از روش‌های بی‌حسی در اثر ضربه، استفاده از ماده ضدانعقاد هپارین، ذخیره‌سازی در سرما و آزمایش سریع بر روی نمونه، بهترین نتایج را به همراه خواهد داشت (نوگا، ۲۰۱۰).

اگر یک رگ خونی یا قلب برای نمونه‌برداری‌های مکرر یا اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیک (برای مثال، فشارخون، بازده قلبی، حجم خون) کانول‌گذاری شود، کانول را با یک محلول ضد انعقاد شستشو می‌دهند و به دنبال آن، نمونه‌های خون را جمع‌آوری می‌کنند و اغلب مقادیر کوچکی از مواد ضد انعقاد را به داخل رگ‌های کانول‌گذاری‌شده یا قلب تزریق می‌کنند تا انعقاد بعدی کند شود. به‌علاوه، بسیاری از آزمایش‌های بیوشیمیایی بر روی خون کامل یا پلاسمای واجد ماده ضدانعقاد انجام می‌شود. به‌طور جایگزین، اگر قرار است که زمان‌های انعقاد خون اندازه‌گیری شود، یا اگر می‌خواهیم سرم را برای آزمایش بیوشیمیایی جمع‌آوری کنیم، می‌توان خون کامل را در داخل یک لوله فاقد مواد ضدانعقاد جمع‌آوری کرد. سپس، می‌توان بعد از انعقاد کامل، سرم را از سلول‌های منعقدشده توسط سانتریفیوژ جدا کرد (هوستون ۱۹۸۰).

روش‌های خون‌گیری

روش مورداستفاده برای خون‌گیری، مقادیر خون‌شناختی را در هنگام آنالیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. تا چندی پیش، خون‌شناسی ماهی روشی پس از مرگ محسوب می‌شد که پس از کشتن ماهی، آن را انجام می‌دادند. این کار تا مدت‌ها تنها در مورد نمونه‌های کوچک و یا بعضی از حیوانات پرورشی انجام می‌شد. در این ماهیان، اندازه نمونه، تنها بر اساس حجم خون ماهی و

کارایی روش‌های خون‌گیری، محدود می‌شـــد. باوجوداین، در مورد نمونه‌های کوچک ۲۰۰ گرمی یا بزرگتر، نیازی نیســت که برای به دست آوردن حجم مناسب برای آنالیز، ماهی را بکشند. می‌توان از ماهی، نســبت به پســتانداران همااندازه، خون بیشتری گرفت (۰/۰۸٪ تا ۰/۱٪ وزن بدن). روش‌های خون‌گیری در محیط طبیعی (in-vivo) در مباحث بعد ارائه شده است (هوستون ۱۹۸۰).

روش‌های خون‌شناختی متداول

تقریباً تمام روش‌های خون‌شـناختی و آزمایشـگاهی که در طب انسـانی مورداستفاده قرار می‌گیرد، برای آزمایش‌های خون ماهی نیز استفاده می‌شود و یا می‌توان استفاده کرد. این امر به‌ویژه در مورد روش‌هایی که قبلاً برای طب کودکان مورداســتفاده قرار می‌گرفت، صادق است. بسیاری از محققان، همانند محققان طب انســانی و دامی، کوشــش کرده‌اند تا وضــعیت خون‌شــناختی متعارف گونه‌های مختلف ماهی را تعیین کنند. هدف این نوع مطالعات واضح و آشکار است. انحراف از این وضعیت‌ها، برای ارزیابی نمونه و یا تعیین و تشـخیص اسـترس‌های حاصل از عوامل آلوده‌کننده و بیماری‌زا، در میان دیگر عوامل، مورداســتفاده قرار می‌گیرد. پاســخ این ســؤال که آیا شــرایط متعارف را می‌توان تعیین کرد، مشــخص نیســت. ماهی نیز همانند دیگر موجودات خونســرد آبزی، در مقابل تغییرات شـرایط محیطی به‌سـرعت عکس‌العمل نشـان می‌دهد و این تغییرات ممکن است به‌صورت ساعتی، روزانه و فصـلی اتفاق بیفتد. حیوانات آبزی احتمالاً در یک شـرایط مناسـب و قابل سـازگاری به سر می‌برند، زیرا غالباً آن‌ها را در شرایطی که قابل سازگار شدن است، می‌توان یافت. سؤالی که به وجود می‌آید، این اســـت که آیا می‌توان واژه «متعارف» را همانند پســـتانداران، در مورد موجودات آبزی اکتوترم به کار برد یا خیر؟ شـــرایط متعارف خون‌شـــناختی در ماهیان ممکن اســـت از چنان دامنه وسـیعی برخوردار باشـد که عملاً آن را به‌صـورت واژه‌ای بی‌معنی درآورد. تفسیر محتاطانه اطلاعات خون شـــناختی مـذکور، اطلاعـات مفیـدی در زمینه انواع مختلف وظایف فیزیولوژیک به ما ارائه می‌دهد. به همین دلیل، تأکید زیادی بر روی توسـعه و به‌کارگیری روش‌های مناسـب به عمل آمده اســت. این مطالب در بخش گلبول‌های قرمز (به‌علاوه انتقال گازهای تنفســی) و گلبول‌های ســفید (به‌علاوه انعقاد خون و پاسخ به عوامل بیماری‌زا) مدنظر قرارگرفته است.

خون‌گیری از نمونه‌های منفرد

اگر تنها گرفتن یک نمونه خون موردنظر اســت، پونکســیون (ســوزن زدن) دمی، متداول‌ترین روش مورداســتفاده توسـط محققان خواهد بود. پونکسیون دمی منجر به گرفتن خون کامل به میزان ۰/۲ تا بیش از ۱۰ میلی‌لیتر از ماهیان بزرگتر از ۲۵ گرم خواهد شـد. قبل از کشیدن خون، باید ماهی را در داخل محلول رقیق MS-222 (۳-آمینو بنزوئیک اسـید اتیل استر متان سولفونات) یا یک ماده

بیهوش‌کننده مشابه بیهوش کنید تا تعادل خود را از دست بدهد (برای توصیف بیشتر در خصوص مواد بیهوش کننده ماهیان و مقادیر آن، به ایواما و آکرمن، ۱۹۹۴ مراجعه کنید). ماهیان بیهوش شده را می‌توان بر روی یک سطح باثبات، به پشت (سطح شکمی به سمت بالا) قرار داد (توجه: یک قطعه از استیروفوم که یک شیار V شکل در داخل آن ایجادشده است، می‌تواند به‌خوبی ماهی را به‌صورت تثبیت‌شده نگه دارد). خون را می‌توان به داخل یک سرنگ شیشه‌ای یا پلاستیکی یک یا پنج میلی‌لیتری (بسته به‌اندازه ماهی یا میزان خون موردنیاز) کشید. این امر با استفاده از یک سوزن ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر (۲/۵ تا ۳/۷۵ سانتی‌متری) گوج (اندازه) ۲۲ صورت می‌گیرد. یک لوله واکیوم (واکیوتینر[1]) را می‌توان برای خون‌گیری از ماهیان بزرگ مورداستفاده قرار داد. ازآنجاکه میزان مکش را نمی‌توان کنترل کرد، این امر ممکن است در بعضی از ماهیان سبب کلاپس (روی هم خوابیدن جداره‌های) عروق شود. در صورت نیاز می‌توان سرنگ یا لوله واکیوم را آغشته به ماده ضد انعقاد کرد. معمولاً سوزن را حدود ۵ میلی‌متر عقب‌تر از باله مخرجی، در امتداد خط میانی بدن ماهی وارد می‌کنند. سوزن را به‌آرامی وارد کنید (به‌طوری‌که لبه عقبی سوزن با انتهای خلفی ماهی روبرو شود) و به‌طرف پایین به داخل ناحیه دمی ماهی ادامه دهید. سوزن را به‌آرامی به سمت پایین هدایت کنید تا اینکه سوزن درست با خارهای دمی تماس حاصل کند. سپس تقریباً یک میلی‌متر به عقب بکشید تا در موقعیت سیاهرگ دمی قرار گیرد. هنگامی‌که سوزن در داخل سیاهرگ قرار می‌گیرد، خون به داخل محفظه سوزن کشیده می‌شود. با نگه‌داشتن سرنگ در همان‌جا (بدون حرکت) به همراه سوزن، به‌آرامی مکش ملایمی توسط سرنگ ایجاد شود تا اینکه مقدار موردنظر خون به داخل سرنگ کشیده شود. دقت شود که میزان مکش زیاد نباشد، زیرا ممکن است رگ‌ها دچار کلاپس شوند (جدار رگ‌ها روی‌هم بخوابند). بعد از کشیدن خون، سوزن را خارج کرده و به‌آرامی سرنگ را چند بار بالا و پایین کنید تا خون (و ماده ضد انعقاد، اگر اضافه‌شده است) با هم مخلوط شوند. اکنون می‌توان خون را از داخل سرنگ به ظرف دیگری تخلیه کرد (توجه: هرگز خون را از طریق سوزن تخلیه نکنید، چون باعث همولیز نمونه خون می‌شود). ماهی را به داخل آب برگردانید و بر روی آبشش آن آب‌رسانی انجام دهید تا اینکه حرکات سرپوش آبششی مجدداً برقرار شود (هوستون ۱۹۸۰).

1. Vacutainer

تصـــویر ۴-۱: نمودار یـک مـاهی کـه رگ‌های عمده خونی و محل‌های خون‌گیری را نشـــان می‌دهد. ۱- پونکسـیون دمی؛ ۲ – پونکسـیون قلب، کانول گذاری؛ ۳ – پونکسـیون آئورت شـکمی، کانول گذاری (برای جزئیات بیشـتر به تصویر ۲ مراجعه شود)؛ ۴ – کانول گذاری در آئورت پشتی (به تصویر ۲ مراجعه شود)؛ ۵ – کانول گذاری در سـیاهرگ دمی؛ ۶ – کانول گذاری در سـرخرگ صفاقی؛ ۷ – کانول گذاری در سرخرگ روده‌بندی (اقتباس از اوستراندر،۲۰۰۰).

قطع ساقه دمی

روش دیگری که می‌توان توسط آن به‌سرعت از ماهی بیهوش شده خون‌گیری کرد، قطع ساقه دمی، درسـت در عقب باله مخرجی، به کمک یک چاقو یا اسکالپل تیز است. مقادیر کم‌خون را می‌توان از قسـمت بریده‌شـده به داخل لوله‌های موئین کوچک کشـید و مقادیر بیشـتر را در داخل لوله‌های آزمـایش جمع‌آوری کرد. این امر را می‌توان بـا افزودن مـاده ضـــد انعقـاد یـا بـدون آن انجـام داد. عمده‌ترین عیب این روش این است که ماهی برای نمونه‌گیری قربانی می‌شود (نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۴ -۲: خون‌گیری از ماهی از رگ‌های دمی با رهیافت جانبی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۴ -۳: خون‌گیری از ماهی از رگ‌های دمی با رهیافت شکمی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۴ -۴: خون‌گیری از ماهی از ناحیه قلب (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۴ -۵: خون‌گیری از ماهی با قطع ساقه دمی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

تصویر ۴ -۶: خون‌گیری از ماهی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

تصویر ۴ -۷: خون‌گیری از ماهی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

تصویر ۴ -۸: خون‌گیری از ماهی از ساقه دمی با رهیافت شکمی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

تصویر ۴ -۹: گسترش خون ماهی با رنگ‌آمیزی گیمسا (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

برای ماهیان بسیار کوچک (برای مثال، ماهی موسکوئیتو، گونه گامبوزیا یا مداکا، اوریزیاس لاتی پس) که حجم خونشان بسیار اندک است، گلبول‌های قرمز (RBCs) را می‌توان با تغییراتی در این روش جمع‌آوری کرد. ماهیان با MS-222 بیهوش می‌شوند تا تعادل خود را از دست دهند و سپس آن‌ها را در الکل ۷۰٪ فرو می‌برند. ساقه دمی توسط قیچی‌های ضدعفونی شده بریده می‌شود و بدن ماهی را فوراً به‌صورت آویزان (سر به سمت بالا) در داخل لوله‌های PE به ابعاد ۷۵ × ۱۰ میلی‌متر واجد یک میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژیک نمکی ضدعفونی شده قرار می‌دهند. با تکان دادن ملایم لوله، جریان باریکی از خون به‌آرامی از بدن ماهی خارج می‌شود و گلبول‌های قرمز خون (RBCs) در ته لوله رسوب می‌کنند. هنگامی‌که جریان خون قطع شد، ماهی را توسط پنس ضدعفونی شده خارج می‌سازند؛ گلبول‌های قرمز را در داخل محلول سرم فیزیولوژیک نمکی به حالت تعلیق درمی‌آورند؛ محلول نمکی را به داخل لوله‌های میکروسانتریفیوژ مخروطی انتقال داده و آن‌ها را به مدت یک دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ یا کمتر سانتریفوژ می‌نمایند. بعد از انجام سانتریفیوژ، سرم فیزیولوژیک نمکی را به آهستگی خالی کرده و گلبول‌های قرمز را در یک میلی‌لیتر سرم نمکی اضافی مجدداً به حالت تعلیق درمی‌آورند و مثل دفعه قبل به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ می‌نمایند. پس‌ازاینکه سانتریفیوژ انجام و سرم نمکی به آهستگی تخلیه شد، گلبول‌های قرمز شسته شده را می‌توان برای آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند اندازه‌گیری طول رشته DNA مورداستفاده قرار داد. نمک‌ها را توزین کرده و در داخل یک فلاسک یک لیتری مدرج می‌ریزند. سپس، این نمک‌ها را با آب فاقد یون تا حجم یک لیتر رقیق کرده و قبل از استفاده، محلول را اتوکلاو می‌کنند (هوستون، ۱۹۸۰).

پونکسیون قلب

از پونکسیون بطن قلب می‌توان برای جمع‌آوری یک نمونه خون با حجم زیاد استفاده کرد. همان‌طور که قبلاً توصیف شد، ماهی را می‌توان بیهوش کرد و در یک وضعیت باثبات به پشت (سطح شکمی به سمت بالا) خواباند. محل واردکردن سوزن، خط سفید شکمی (لینهآ آلبا)[1] است. این خط، یک تورفتگی در امتداد خط میانی شکمی ماهی است که از بین باله‌های

سینه‌ای عبور می‌کند. یک سوزن گوج ۲۳ متصل به یک سرنگ به‌آرامی وارد می‌شود و مستقیم در این محل به سمت پایین هدایت می‌شود تا اینکه خون در مخزن (هاب) سوزن مشاهده شود. این امر، نشان‌دهنده وارد شدن به بطن قلب است. در مورد گربه‌ماهیان و ماهیان دیگری که دارای کمربند استخوانی هستند، بهتر است سوزن را در خط میانی در زیر باله‌های سینه‌ای وارد کرده و سپس اندکی سوزن را به سمت انتهای قدامی ماهی متمایل (زاویه‌دار) کرد (مستقیم به سمت پایین هدایت نشود) (هوستون،۱۹۸۰) .

جدول ۴-۲: دستورالعمل آماده‌سازی سرم فیزیولوژیک نمکی ماهی به همراه اضافه نمودن EDTA به‌عنوان ماده ضد انعقاد (هوستون، ۱۹۸۰).

کلرید سدیم ($NaCl$)	۶/۴۴ گرم
کلرید پتاسیم (kCl)	۰/۰۱۱ گرم
کلرید کلسیم ($CaCl_2$)	۰/۰۲۲ گرم
سولفات منیزیوم ($MgSO_4$)	۰/۰۱۲ گرم
فسفات دی هیدروپتاسیم (KH_2PO_4)	۰/۰۰۷ گرم
بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$)	۰/۰۱۰ گرم
اتلین دی آمین تترااستیک (EDTA)	۰/۰۱۸۶ گرم

خون را همچنین می‌توان از آئورت شکمی جمع‌آوری کرد، هرچند که این روش فقط در مورد ماهیان بزرگ (بیش از ۱/۵ کیلوگرم) مورداستفاده قرار می‌گیرد و بسیار دشوارتر از خون‌گیری از طریق قلب است. در یک ماهی بیهوش شده، می‌توان از سوزن ۱/۵ سانتی‌متر گوج ۲۲ برای نمونه‌برداری استفاده کرد. ماهی را به پشت خوابانده و دهان آن را باز نگه می‌دارند. سوزن از طریق دهان به سمت قاعده لینگوآل فرنوم[2] هدایت می‌شود. بافت زیر زبان را با واردکردن سوزن در جهت پایین و کمی به سمت عقب سوراخ می‌کنند تا اینکه غضروف فقط سوراخ شود. اگر یک فشار منفی

1. Linea alba
2. Lingual frenum

مختصـر به سـرنگ وارد کنیم، خون به داخل مخزن (هاب) سـوزن کشـیده می‌شـود. این امر نشان می‌دهد که آئورت سوراخ شده است.

روش‌های نمونه‌برداری پی‌درپی

طراحی کانول

بیشتر کانول‌هایی که برای جمع‌آوری خون ماهیان مورداستفاده قرار می‌گیرند، از لوله‌های پلی‌اتیلن (PE) با درجه طبی[1] سـاخته می‌شـوند که انعطاف‌پذیر بوده، اما هنوز مواد دسـت‌کاری شده بالایی دارند که غیرسـمی بوده و با بافت‌های ماهیان واکنش نشـان نمی‌دهند. تنها اسـتثنای قابل‌توجه، لولـه‌هـای پلی‌وینیـل کلرایـد (PVC) برای جمع‌آوری و انـدازه‌گیری میزان گازهای خون اسـت. نفوذپذیری لوله‌های PVC نسبت به گازهایی مانند اکسیژن (O_2) و دی‌اکسید کربن (CO_2) بسیار کمتر از لوله‌های پلی‌اتیلن است. بدون در نظر گرفتن ماده سازنده لوله‌ها، قطر داخلی آن‌ها در محل حداقل قطر باید تا آنجا که ممکن است بزرگ باشد و به قطر داخلی همان رگ‌هایی نزدیک شود که قرار اسـت کانول گذاری شـود. این امر باعث کاهش میزان مکش موردنیاز برای جمع‌آوری خون به داخل سـرنگ و به حداقل رسـاندن اثرات جانبی، مانند آسـیب به سـلول‌های خونی و ایجاد همولیز (تجزیه گلبول‌ها) می‌شـود. جدول ۳ اختصـاصـات لوله‌های پلی‌اتیلن تجاری را ازنظر اندازه ارائه می‌کند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

جدول ۴-۳: اختصاصات اندازه برای لوله‌های PE با درجه طبی (ClayAdams intramedic, Becton Dickinson, Parsippany,NJ) مورداستفاده برای ساختن کانول و کاتتر (اوستراندر، ۲۰۰۰)

لوله‌ها	ID (mm)	OD (mm)	اندازه سوزن برای اتصال به لوله
PE 10	۰/۲۸	۰/۶۰	۳۰
PE 20	۰/۳۸	۱/۰۹	۲۷و ۲۶
PE 50	۰/۵۸	۰/۹۶	۲۳
PE 90	۰/۸۶	۱/۲۷	۲۰
PE 160	۱/۱۴	۱/۵۷	۱۸
PE 190	۱/۱۹	۱/۷۰	۱۸
PE 200	۱/۴۰	۱/۹۰	۱۷
PE 204	۱/۵۷	۲/۰۹	۱۶
PE 240	۱/۶۷	۲/۴۲	۱۵

1. Medical grade

انواع اولیه کانول‌ها از لوله‌های پلی‌اتیلن متصل به نوک سوزن ساخته می‌شدند. اخیراً کانول‌هایی برای جمع‌آوری خون ساخته شده که به‌طور کامل از لوله‌های صناعی، مانند PE، PVC، الاستومر سیلیکون[1] یا پلی یورتان[2] تهیه‌شده‌اند. واردکردن لوله‌های PE به داخل رگ، استرس بالقوه ناشی از جای‌گیر شدن سوزن را به حداقل خواهد رساند. کانول‌ها را می‌توان از دو اندازه‌یا نوع مختلف از لوله‌ها (برای مثال PE متصل شده به PVC، الاستومر سیلیکون یا پلی یورتان) درست کرد که توسط چسب سیانو اکریلات[3] چسبیده می‌شوند، یا این‌که پس از نرم کردن با حرارت یا حلالی مانند بنزن، به هم جوش می‌خورند. این امر امکان آن را برای کانول فراهم می‌کند که از یک لوله با طول کوتاه و قطر کوچکتر (برای مثال PE 15 یا PE50) برای ورود آسان به داخل رگ، مرتبط به لوله‌ای با طول بیشتر و قطر بزرگتر یا واجد خواص دیگر تشکیل شود.

حالت جایگزین دیگر این است که از لوله PE با قطر وسیع‌تر استفاده‌شده و با حرارت ملایم و کشیدن لوله به سمت خارج، ناحیه‌ای با قطر کوچکتر ایجاد کنیم که می‌توان آن را با یک چاقوی جراحی برید و از آن به‌عنوان انتهای داخل شونده کانول استفاده کرد. می‌توان با ایجاد یک یا چند حباب توسط حرارت بر روی کانول PE، آن را برای تثبیت در داخل حفره دهانی بهبود بخشید.

در مورد بخش اعظم کانول‌گذاری‌ها در ماهیان (برای مثال، کانول‌گذاری در آئورت شکمی و پشتی، دمی و آبششی)، نمی‌توان رگ را جدا (ایزوله) کرد و باید بافت‌های اطرافی را سوراخ کرد تا به رگ برسیم. روش‌های مختلفی وجود دارد که امکان داخل شدن راحت بیشتر کانول‌ها را از طریق بافت به رگ فراهم می‌کند. در مورد کانول‌هایی که از یک لوله متصل به سوزن ساخته شده‌اند، انتهای سوزن را از طریق بافت وارد می‌کنند و مستقیماً به داخل رگ وارد می‌شوند. به‌این‌ترتیب سوزن تا پایان دوره عمل در آنجا باقی می‌ماند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

روش دیگر، استفاده از یک تروکار[4] یا سوزن‌های سوراخ کننده بزرگ‌تر است. در این حالت، ابتدا آن را وارد رگ می‌کنند، اما بعداً که یک کاتتر[5] PE واجد نخ با قطر کوچک‌تر را از درون آن به داخل رگ وارد کردند، تروکار را به بیرون می‌کشند. روش اصلاح‌شده استفاده از سوزن واجد نخ، به‌کارگیری یک سیم تیز و محکم (برای مثال، سیم پیانوی فولادی) واجد نخ است که آن را وارد کانول می‌کنند. این وسیله، یک سوراخ کوچک در رگ ایجاد می‌کند. علاوه بر این، یک سیم قابل تطابق راحت نیز وجود دارد که همانند یک پلانگر[6] سرنگ با فشار پایین عمل می‌کند. کانول واجد

1. Silicon elastomer
2. Polyurethane
3. Cyanoacrylate
4. Trocar
5. Catheter
6. Plunger

سیم را به داخل رگ وارد می‌کنند و سپس، سیم به‌آرامی پس کشیده می‌شود (تا ۱۰ میلی‌متر عقب‌تر از نقطه ورود) تا اینکه خون در داخل کانول مشاهده شود. اگر خونی مشاهده نشد، می‌توان موقعیت کانول را تغییر داد و دوباره سیم را پس کشید. باوجوداین، باید دقت لازم را معمول داشت، زیرا دست‌کاری رگ با سیم، سبب آسیب به رگ یا جمع شدن آن می‌شود. به‌محض این‌که خون وارد کانول شد، سیم را می‌توان کاملاً خارج کرد و کانول را با سرم نمکی واجد هپارین پر کرد و پوشاند.

خون‌گیری از ماهیان مقید شده و ماهیان در حال شنا

کانول‌گذاری در آئورت پشتی

آئورت پشتی متداول‌ترین رگی است که برای جمع‌آوری پیاپی خون از ماهیان محصور و ماهیان در حال شنا در مطالعات مورداستفاده قرار می‌گیرد. این روش کانول‌گذاری به‌راحتی بر روی بیشتر ماهیان بزرگ (بیش از ۲۰۰ گرم) ازجمله بسیاری از آزادماهیان (قزل‌آلای رنگین‌کمان، ماهی آزاد صورتی، ماهی آزاد ساک آی و ماهی آزاد اقیانوس اطلس)، گربه‌ماهی روگاهی، کپور معمولی و کوسه سگ‌ماهی انجام‌شده است. این روش برای انجام اندازه‌گیری‌های پی‌درپی پارامترهای خون‌شناسی و شیمی خون، وضعیت اسید- باز خون، غلظت گازهای خون، تعیین حجم خون، اندازه‌گیری فشارخون سیستمیک و پایش غلظت‌های مواد شیمیایی در خون مورداستفاده قرارگرفته است.

کانول‌گذاری در آئورت پشتی را می‌توان به‌سرعت (معمولاً در عرض کمتر از ۵ دقیقه) بدون نیاز به آب‌رسانی به آبشش، پس از بیهوشی عمیق با غلظت بالای MS-222 به انجام رساند. برای مثال، استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر MS-222 به مدت تقریباً پنج دقیقه برای بیهوش کردن یک قزل‌آلای رنگین‌کمان ۵۰۰ گرمی کافی است. هنگامی‌که ماهی کاملاً بیهوش شد، یک سوزن گوج ۱۶ را از طریق بخش گوشتی پوزه به داخل حفرهٔ دهانی وارد می‌کنند. یک قطعه ۲۰ میلی‌متری از لوله PE160 را که توسط حرارت پهن شده است، از طریق سوزن وارد می‌کنند. سوزن به سمت داخل کشیده می‌شود و امکان می‌دهد که انتهای پهن لوله در برابر مسیر حفره دهانی آرام بگیرد و لوله از سطح پوزه ماهی بیرون‌زدگی پیدا کند. این لوله یک گذرگاه نامحدود فراهم می‌کند که از طریق آن می‌توان کانول را از حفره دهانی خارج کرد.

تصویر ۴- ۱۰: نموداری که وضعیت کانول های واردشده در آئورت پشتی و شکمی را نشان می‌دهد (اقتباس از اوستراندر، ۲۰۰۰).

سپس ماهی را از پشت در داخل یک نگهدارنده V شکل قرار می‌دهند و آرواره پایین را توسط یک قلاب معلق یا یک سیم خمیده به سمت بیرون می‌کشند تا دهان باز بماند. کانول مورداستفاده برای قزل‌آلای رنگین‌کمان از لوله باریک شونده PE50 تشکیل‌شده که یک حباب در فاصله تقریباً ۳۰ تا ۵۰ میلی‌متری نوک ورودی آن تعبیه‌شده است. کانول را با سرم نمکی هپارین‌دار پر می‌کنند و به یک سیم استیل تیز شده متصل می‌کنند (قبلاً توصیف شد) و با یک زاویه کم[1] به داخل خط میانی سقف حفره دهان در محل دومین کمان حلقی وارد می‌کنند. مقاومت اندکی در نوک سیمی که وارد رگ می‌شود، احساس خواهید کرد و باید پر شدن کانول با خون را مشاهده کرد. سیم کشیده می‌شود و کانول در جای خود تنگ قرار می‌گیرد تا از جریان یافتن خون جلوگیری کند. این در حالی است که انتهای آزاد کانول از طریق لوله خروجی PE 160 به سطح خارجی بدن ماهی بسته می‌شود. حباب کانول باید در مقابل انتهای پهن لوله قرار گیرد تا به تثبیت کانول کمک کند و از خروج آن از داخل رگ ممانعت به عمل آورد. سپس، باید کانول را توسط سرم نمکی هپارین‌دار شستشو داد (باید دقت کرد که بیش از ۰/۳ میلی‌لیتر به داخل رگ تزریق نشود) و آن را با یک میله میان تهی یا یک پین مستقیم بست یا توسط حرارت مسدود کرد. کانول را باید در مجاورت اولین کمان آبششی حلقی توسط یک بخیه ابریشمی ۰-۴ محکم کرد و باید قبل از گره زدن، نخ را دو بار به دور کانول چرخاند. سپس، باید با ایجاد یک جریان آب اکسیژن‌دار بر روی آبشش‌های ماهی به مدت چند دقیقه، به ماهی تجدید حیات بخشید. به کمک این روش عمومی می‌توان از ماهیان ترانسکت شده[2]، محدودشده یا در حال شنا به‌صورت پی‌درپی خون‌گیری کرد. بدین ترتیب، امکان جمع‌آوری خون به‌صورت مکرر برای چندین هفته فراهم می‌شود.

1. Shallow angle
2. Transected

کانول‌گذاری در آئورت شکمی

کانول‌گذاری در آئورت شکمی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بالغ نیز بر روی نمونه‌های کاملاً بیهوش‌شده، بدون آب‌رسانی به آبشش انجام می‌شود. این کانول از لوله‌هایی با PE 50 تشکیل می‌شود که در فواصل ۲/۵ و ۵ سانتی‌متر از نوک آن حباب وجود دارد. قبل از کانول‌گذاری باید از یک سوزن گوج ۱۶ استفاده کرد و یک منفذ خروجی در دهان ماهی در محل اتصال آرواره‌های بالا و پایین ایجاد کرد.

یک قطعه پهن شده از لوله با PE 160 را از طریق یک سوزن نخ دار می‌بندند (همانند توضیحات قبل). سپس، این ماهی را درحالی‌که سطح پشتی آن به سمت بالاست، در داخل یک شکاف V شکل قرار می‌دهند و آرواره بالا باز نگه‌داشته می‌شود. ازآنجاکه آئورت شکمی درست در زیر غضروف موجود در امتداد خط میانی شکمی در کف حفره دهانی واقع شده است، لذا باید در ابتدا یک منفذ ورود به داخل غضروف به کمک سوزن گوج ۲۰ ایجاد شود. سوزن در دومین کمان آبششی قرار داده می‌شود و سپس آن را با یک زاویه ملایم به سمت پایین وارد می‌کنند تا اینکه غضروف اندکی سوراخ شود. هنگامی‌که غضروف سوراخ شد، سوزن را با کانول سیم‌دار (با یک سیم کند) جایگزین می‌کنند. سپس سیم را به بیرون می‌کشند و این امر باعث کشیده شدن خون به داخل کانول می‌گردد. کانول را در وضعیتی قرار می‌دهند که جریان خون مطلوب برقرار شود. همچنین، آن را با سرم نمکی هپارین‌دار پر می‌کنند، می‌بندند و توسط یک بخیه در محل اولین حباب محفوظ نگه می‌دارند. سپس انتهای بسته شده کانول از طریق یک لوله PE 160 به خارج از حفره دهانی عبور داده می‌شود؛ بنابراین، حباب دوم در مقابل انتهای پهن شده لوله خروجی قرار می‌گیرد. انعقاد یک مشکل بالقوه در این روش است. این مشکل را می‌توان با شستشوی مداوم کانول با سرم نمکی هپارین‌دار برطرف کرد. این کانول را می‌توان برای ماهیان محدودشده و همچنین ماهیان در حال شنا مورداستفاده قرار داد.

کانول‌گذاری در سیاهرگ عقبی

نمونه‌های خونی پی‌درپی را می‌توان از سیاهرگ دمی ماهیان بزرگ نیز جمع‌آوری کرد. ماهی را بیهوش کرده و از پهلو بر روی یک سطح صاف قرار می‌دهند. برای رسیدن به سیاهرگ دمی، می‌توان از پهلوی ماهی، درست از ناحیه شکمی خط جانبی، هم‌طراز با باله مخرجی اقدام کرد. یک سوزن گوج ۱۸ با دیواره نازک را در این نقطه وارد می‌کنند و اندکی به سمت سر هدایت می‌نمایند تا به داخل سیاهرگ نفوذ کند. کانولی که از لوله‌ای با PE 50 غیرقابل تغییر تشکیل‌شده و با سرم نمکی هپارین‌دار پرشده است، از طریق سوزن وارد کرده و به داخل رگ هدایت می‌کنند. کانول را

به کمک یک بخیه (ابریشم ۰-۴) به بدن ماهی محکم می‌کنند و قبل از گره زدن نخ بخیه، آن را دوبار به دور کانول می‌چرخانند.

کانول‌گذاری در رگ‌های مجزا[1]

اگر رگی را که قرار است کانول‌گذاری شود، بتوانیم تشریح کنیم و از بافت‌های مجاور مجزا نماییم (برای مثال، سرخرگ‌های صفاقی یا روده‌بندی)، در آن صورت می‌توان مستقیماً از طریق یک برش سوراخ‌مانند در رگ کانول‌گذاری کرد. در هنگام جداسازی، رگ را توسط یک گیره یا پنس جواهرفروشی، در بالای نقطه ورود کانول می‌گیرند و توسط یک بخیه (ابریشم ۰-۴) می‌بندند و گره را در زیر نقطه ورود کانول ایجاد می‌کنند. یک برش عرضی در داخل رگ ایجاد می‌شود و از طریق آن، یک کانول پرشده از هپارین را به داخل رگ وارد می‌کنند و فوراً در آن محل توسط یک بخیه در قسمت قدامی محکم می‌کنند. سپس گیره را جدا کرده و جریان خون به سمت رگ کانول‌دار برقرار می‌شود.

خون‌شناسی

به‌رغم تصور عموم، خون‌شناسی ابزاری با ارزش در تشخیص و پیش‌بینی بیماری‌ها است. اگرچه مطالعه خون ماهی دوره رشد سریعی را پشت سر گذاشته، اما به‌تازگی وضعیت ثابتی ازنظر نام‌گذاری در روش‌ها، همانند خون‌شناسی پستانداران به دست آورده که نشان‌دهنده جدید بودن این علم است. مبانی علم خون‌شناسی ماهی از اواخر سده ۱۸۰۰ پایه‌گذاری شد. دانشمندانی که بر روی ویژگی‌های عمومی خون آزمایش می‌کردند، مطالعه مدل‌های خون ماهی را آغاز کردند. با شروع قرن بیستم، مطالعات متعددی بر روی خون محیطی ماهی صورت گرفت که شامل مطالعات طاقت‌فرسا درباره ویژگی‌های رنگ‌آمیزی گلبول‌های سفید خون خزندگان ماهی و بی‌مهرگان بود. در طی این مطالعات، یک اطلس رنگی با ۱۷۷ عکس از گلبول‌های سفید و هر یک با اسامی مختلف تهیه شد.

نام‌گذاری سلول‌های خونی ماهی همچنان دچار سردرگمی بود، اما استفاده از واژه هتروفیل برای سلول‌های گرانولوسیتی (دانه‌دار سیتوپلاسمی) غیر از ائوزینوفیل و بازوفیل، بدون توجه به ویژگی‌های رنگ‌آمیزی آن‌ها، باعث آسان شدن ارتباطات بین آن‌ها شد. این واژه توسط جوردن در یک فصل از کتاب «جیبی خون‌شناسی داونی» مورداستفاده قرار گرفت. در این کتاب، نام‌گذاری خون‌شناسی ماهی در شکل پیشرفته آن انجام شد و هتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها به‌عنوان انواع

1. Isolated vessels

سلول‌های موردقبول در خون ماهی مورد تصویب قرار گرفتند. متأسفانه خون‌شناسی ماهی تاکنون هرگز ساماندهی نشده است. محققان مختلف نام‌های جدیدی برای سلول‌ها پیشنهاد کرده‌اند، بدون اینکه توجهی به تثبیت روش‌های مربوطه انجام دهند. بدون استاندارد کردن معیارهای نام‌گذاری سلول‌ها و به‌کارگیری روش‌های استاندارد، اندازه‌گیری اجزای خون ماهی ازنظر بالینی مفید واقع نخواهد شد. به همین خاطر، بیشتر مطالب این فصل صرف تلاش برای ارائه جزئیات روش‌های استاندارد و نام‌گذاری سلول‌ها شده است که باید به‌عنوان پایه‌ای برای خون‌شناسی بالینی ماهی مورداستفاده قرار گیرد.

ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز

گلبول‌های قرمز ماهی بالغ، بیضی‌شکل، هسته‌دار و واجد سیتوپلاسم فراوان، به رنگ ائوزینوفیلی کمرنگ هستند. معمولاً هسته آن‌ها بیضی‌شکل است و در امتداد محور سلول قرار دارد، اما در بعضی از گونه‌ها تقریباً گرد است. کروماتین هسته، متراکم بوده شدیداً رنگ می‌گیرد آنیزوسیتور (متفاوت بودن اندازه گلبول‌های) و پلی کرومازیا (تغییرات شدت رنگ) تا حدی طبیعی است. گاهی اوقات فعالیت‌های میتوزی در خون اطرافی ماهی دیده می‌شود. اریتروپوئز (تولید گلبول‌های قرمز) به‌طور طبیعی در جریان خون ماهی روی می‌دهد. از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی، سیتوپلاسم گلبول‌های قرمزدارای گرانول‌های ریز، بدون گنجیدگی و با میتوکندری‌های محدود است. ممکن است واکوئول‌های سیتوپلاسمی برجسته‌ای مشاهده شوند و اعتقاد بر این است که واکوئول‌ها، اتوفاژیک بوده و از میتوکندری‌های در حال استحاله نشأت گرفته‌اند.

شمارش کل گلبول‌های قرمز

روش‌های متعددی برای شمارش کل گلبول‌های قرمز مورداستفاده قرار می‌گیرد که هرکدام مزایا و معایبی دارند. روش‌های اتوماتیک، تخمین قابل‌قبولی ارائه می‌کنند، اما گلبول‌های قرمز ماهی، در مقایسه با گلبول‌های قرمز پستانداران، کاملاً بزرگ‌تر هستند و همچنین، اندازه آن‌ها از لنفوسیت‌های کوچک و ترومبوسیت‌های هسته‌دار ماهی بزرگ‌تر است. این گلبول‌های سفید، در شمارش کلی گلبول‌های قرمز محاسبه می‌شوند، مگر اینکه در مورد هر نمونه، تنظیم دقیقی صورت گیرد و محدوده تفکیک پایین‌تری مورداستفاده واقع شود.

روش‌های دستی شمارش گلبول‌های قرمز، هم‌زمان با شمارش کلی گلبول‌های سفید انجام می‌شود، زیرا روش‌های رنگ‌آمیزی تفریقی برای تفکیک گلبول‌های سفید از گلبول‌های قرمز هسته‌دار موردنیاز است. این روش‌ها، بعداً با جزئیات بیشتر، در مبحث مربوط به گلبول‌های سفید عنوان می‌شود. معمولاً رقت خاصی از خون را با استفاده از محلول رنگ‌آمیزی و لام شمارش سلولی

نئوبار مورداستفاده قرار می‌دهند. شمارش کلی گلبول‌های قرمز (تعداد سلول‌ها در هر میکرولیتر) با استفاده از شمارش گلبول‌های قرمز در چهار مربع کناری و مربع وسطی لام صوت می‌گیرد. تعداد به‌دست‌آمده را در فاکتوری که وابسته به میزان رقت است، ضرب می‌کنند. روش مشابهی نیز برای نمونه‌های پستانداران صورت می‌گیرد. کل ناحیه مربع ثانویه در انتها که شمارش می‌شود، ۰/۲ میلی‌متر مربع است. عمقی که در زیر لامل قرار می‌گیرد، ۰/۱ میلی‌متر است. به همین خاطر، حجم مایعی که در زیر ۵ مربع ثانویه قرار می‌گیرد، ۰/۰۲ میکرولیتر است. در مورد رقت‌های متداول $\frac{۱}{۱۰۰}$ (۲۰ میکرولیتر خون در ۱۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق‌کننده) عددی که طی شمارش به دست می‌آید، در ۵۰۰۰ ضرب می‌کنند تا کل گلبول‌های قرمز به دست آید (هوستون، ۱۹۸۰) .

معمولاً وضعیت گلبول‌های قرمز با بیان وضعیت یک یا چند شاخص از سه شاخص اصلی و سه شاخص فرعی مشخص می‌شود. شاخص‌های اصلی، شامل میزان هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Hct) و وفور گلبول‌های قرمز (RBC) است (هوستون، ۱۹۸۰).

از شاخص‌های فرعی نیز می‌توان حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MEV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MEH) و حجم متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MEHC) را نام برد. ازنقطه‌نظر وظایف فیزیولوژیک، شاخص‌های اصلی به‌عنوان معرف ظرفیت حمل اکسیژن خون و بنابراین، توانایی موجود زنده برای تأمین نیازهای اکسیژن سوخت‌وسازی به‌حساب می‌آید. هموگلوبین معمولاً به‌صورت گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر خون کامل یا میلی‌مول در لیتر ($mM.L^{-1}$) خون کامل بیان می‌شود که روش مستقیم تعیین ظرفیت است. شمارش گلبول‌های قرمز ازنظر ارزش کاربردی معادل روش قبل است، البته اگر همانند بسیاری از پستانداران و پرندگان، تمام گلبول‌های قرمز در حال گردش را به‌صورت تقریباً اشباع‌شده با هموگلوبین به‌حساب بیاوریم. باوجوداین، در مورد ماهیان وضعیت بدین‌گونه نیست. اندازه‌گیری هماتوکریت، یکی از سریع‌ترین و درنتیجه، متداول‌ترین شاخص اصلی است، اما ازنظر تعیین وضعیت تنفسی و وظایف مربوطه، حداقل استفاده را می‌توان از آن نام برد، زیرا بستگی به تعداد و حجم سلول‌ها دارد. میزان هموگلوبین سلولی در اثر بلوغ سلول‌ها افزایش می‌یابد. حجم سلولی تحت تأثیر عوامل تنظیم اسمزی قرار دارد که آن هم از تعداد مولکول‌های هموگلوبین فعال (ازنظر اسمزی) موجود تأثیر می‌پذیرد (هوستون، ۱۹۸۰).

باوجوداینکه ارتباط آماری معنی‌داری بین هماتوکریت و میزان هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز وجود دارد، اما به نظر نمی‌رسد که این شاخص‌ها، ارزش قابل‌قبولی ازنظر پیش‌بینی وضعیت حیوان داشته باشند. با توجه به این ملاحظات، مقادیر هماتوکریت را باید بااحتیاط مورد تعبیر و تفسیر قرار داد (هوستون، ۱۹۸۰) .

از شـاخص‌های فرعی، MEH، متوسـط میزان هموگلوبین در داخل هرگلبول قرمز، ازنقطه‌نظر وظایف تنفسی دارای ارزش آشکاری است. متوسط حجم سلولی، MEV، غالباً برای ارزیابی وضعیت تنظیم اسمزی مورداستفاده قرار می‌گیرد و کاربرد مهمی در ارتباط با دینامیک عضله قلب و جریان خون دارد. شـاخص بعدی که مورداستفاده کمتری دارد،MEHC است که میزان هموگلوبین را در ۱۰ میلی‌لیتر از گلبول‌های قرمز فشـرده‌شـده نشـان می‌دهد. این شاخص‌ها را به‌صورت زیر تخمین می‌زنند:

$$MEV = \frac{HCt(\%) \times ۱۰}{RBC\ ,\ ۱۰^{۶}\ mm^{۳}}$$ برحسب نانومتر گزارش می‌شود

$$MEH = \frac{Hb(g/L)}{RBC\ ,\ ۱۰^{۶}\ mm^{۲}}$$ برحسب میکروگرم به ازای هر سلول گزارش می‌شود

$$MEHC = \frac{Hb(g/۱۰۰mL)}{HCt(\%)}$$ برحسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بیان می‌شود

تعیین هموگلوبین

اگرچه روش‌های متفاوتی بر اسـاس مشـتقات مختلف هموگلوبین مورداسـتفاده قرارگرفته است، اما امروزه تعیین هموگلوبین به‌صـورت مشـتق سیانومت هموگلوبین $(HB^{+} - CN^{-})$، به‌عنوان روش انتخابی به‌حسـاب می‌آید. سـیانومت هموگلوبین یکی از مشـتقات پایدار اسـت و در حقیقت، همه مشـتقات متداول هموگلوبین به‌راحتی و تماماً، به سیانومت‌هموگلوبین تبدیل می‌شوند. طیف جذب این ماده وسـیع بوده و بیشـینه آن در حول‌وحوش ۵۴۰ نانومتر است و این امر، امکان آن را فراهم می‌سـازد که حتی با یک فیلترفتومتر سـاده نیز میزان آن را به‌درسـتی تعیین کنند. محلول‌های سـیانومت‌هموگلوبین در یک دامنه غلظت وسـیع، از قانون بیر- لامبرت[1] پیروی می‌کنند (برای مثال، میزان جذب نسـبت مسـتقیم با میزان غلظت دارد). در روش سـیانومت‌هموگلوبین، همه مشتقات هموگلوبین با استفاده از فری سیانین و یون‌های سیانید، به مت‌هموگلوبین تبدیل می‌شود. مت‌هموگلوبین، ترکیب قرمز پایداری اسـت که می‌توان آن را از طریق اسـپکتوفتومتری اندازه‌گیری کرد و چگـالی اپتیکی آن در ۵۴۰ نـانومتر قرائـت می‌شـود. کـل نمونه خون را با محلول درابکین مخلوط می‌کنند تا نسـبت $\frac{۱}{۲۵۱}$ بین خون و معرف ایجاد شـود. پس از مخلوط کردن به مدت ده دقیقه، آن را به حال خود می‌گذارند تا واکنش کامل شـود و سـپس، چگالی اپتیکی مخلوط قرائت می‌شود. یک منحنی استاندارد از رقت‌های پی‌درپی سیانومت‌هموگلوبین استاندارد تشکیل می‌دهند

1. Beer - lambert

و یا یک نمونه استاندارد را با نمونه موردنظر مقایسه می‌کنند تا غلظت هموگلوبین نمونه را محاسبه کنند.

معرف‌های موردنیاز برای یک دوره طولانی، بدون استفاده از یخچال پایدار باقی می‌مانند و می‌توان جواب را با دقت ۲٪ یا کمتر به دست آورد. در مقام مقایسه، میزان متوسط خطا، با استفاده از آزمایش آهن توسط اسپکتروفتومتری جذب اتمی، ۱۳٪ است و با استفاده از روش اسید هماتین، اختلافات تا بیش از ۴۰٪ نیز می‌رسد. آزمایش‌هایی که مستلزم استفاده از مشتقات اکسی یا دی‌اکسی هموگلوبین است، بین ۲ تا ۱۰٪ خطا نشان می‌دهند و در حقیقت، تنها روش مت‌هموگلوبینازید($Hb^{-}-N_3^{-}$) ازنظر دقت با این روش برابری می‌کند. باوجوداین، حداکثر جذب $Hb^{-}-N_3^{-}$ در ۵۴۲ نانومتر، دامنه بسیار کوتاهی دارد و گاهی اوقات، انحرافات غیرقابل‌پیش‌بینی به‌واسطه کدورت ایجاد می‌شود و همچنین، معرف NaN_3 را نمی‌توان در دمای اتاق ذخیره کرد.

معرفی که برای روش سیانومت‌هموگلوبین مورداستفاده قرار می‌گیرد، شامل ۲۰۰ میلی‌گرم $K_3Fe(CN)_6$، ۵۰ میلی‌گرم KCN، ۱۴۰ میلی‌گرم KH_2PO_4 (با تمام درجات آنالیتیکی و ۰/۱ میلی‌لیتر NONIDETP۴۰ یا ۰/۵ میلی‌لیتر دترجنت استورکس SE است که با آب مقطر متبلور به ۱ لیتر می‌رسانند. بدین ترتیب، یک محلول شفاف به رنگ زرد کمرنگ و با pH= ۷-۷/۴ ایجاد می‌شود که جذب آن در مقایسه با آب شاهد، در ۵۴۰ نانومتر، صفر است. این محلول را باید در بطری‌های شیشه‌ای قهوه‌ای بوروسیلیکات دربسته نگهداری کرد. بدین ترتیب، pH و ویژگی‌های جذبی آن، برای چندین ماه ثابت باقی می‌ماند. البته نباید منجمد شود و یا با اسیدها در تماس قرار گیرد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه خون کامل تازه و حجم مناسبی از هموگلوبین استاندارد را توسط معرف سیانید تا ۵ میلی‌لیتر رقیق می‌کنند و توسط مخلوط‌کن به‌هم می‌زنند. این واکنش در عرض ده دقیقه یا کمتر کامل خواهد شد. سپس به دنبال سانتریفیوژ برای خارج کردن ترشحات سلولی معلق، میزان جذب در ۵۴۰ نانومتر خوانده می‌شود. هموگلوبین استاندارد براکتینگ[1] مورداستفاده قرار می‌گیرد و معمولاً مقادیر به‌دست‌آمده را برحسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر یا میلی‌مول در لیتر خون کامل بیان می‌کنند. هموگلوبین استاندارد انسانی تثبیت‌شده، از طریق آزمایشگاه‌های کلینتون و موسسه تشخیص بورینگر- مانهیم به دست می‌آید. این استانداردها، بر اساس بالاترین میزان هموگلوبین انسان‌ها ساخته می‌شوند (هوستون، ۱۹۸۰).

1. Bracketing

روش سیانومت هموگلوبین

۱. ۵ میلی‌لیتر از محول درابکین را به کیووت[1] خشک و تمیز منتقل کنید.
۲. ۲۰ میکرو لیتر خون کامل را به آن بیفزایید (تا نسبت $\frac{۱}{۲۵۱}$ ایجاد شود).
۳. نمونه را خوب مخلوط کنید و سپس اجازه دهید که ده دقیقه به حال خود باقی بماند.
۴. با استفاده از محلول درابکین به‌عنوان شاهد، چگالی نوری (OD) نمونه را در ۵۴۰ نانومتر رؤیت کنید.
۵. غلظت هموگلوبین را از طریق منحنی استانداردی که از رؤیت هموگلوبین استاندارد با رقت‌های مختلف به‌دست‌آمده است، محاسبه کنید و یا به‌طور هم‌زمان، از طریق محلول استاندارد این کار را انجام دهید:

$$\text{میزان هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)} = \frac{\text{چگالی نوری خون}}{\text{چگالی نوری محلول استاندارد}} \times \text{غلظت هموگلوبین محلول استاندارد}$$

محلول درابکین

۱- ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر را در یک فلاسک حجمی یک لیتری بریزید.
۲- یک گرم بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) به آن بیفزایید.
۳- ۰/۰۵ گرم سیانید پتاسیم (KCN) به آن بیفزایید.
۴- ۰/۰۲ گرم فری سیانید پتاسیم $[K_3Fe(CN)_6]$ اضافه کنید.
۵- محتویات مذکور را خوب مخلوط کنید.
۶- آب مقطر به این مجموعه اضافه کنید تا حجم آن به یک لیتر برسد.

متأسفانه تداخلی که هسته گلبول‌های قرمز ایجاد می‌کند، بر روی چگالی نوری محاسبه‌شده در روش سیانومت‌هموگلوبین تأثیر می‌گذارد و سبب می‌شود که مقدار هموگلوبین زیاد به دست آید. این اثر را می‌توان با سانتریفیوژ خون لیزه شده (۱۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه) و رسوب دادن ترشحات هسته قبل از تعیین هموگلوبین برطرف کرد. این کار، نیازمند انجام مراحل اضافی است و به‌ندرت انجام می‌شود. اجزای فرعی متفاوت هموگلوبین در گلبول‌های قرمز ماهی نیز سبب می‌شود که تفاوت‌هایی در بین روش‌های تعیین هموگلوبین مشاهده شود. معمولاً مقادیری که در روش سیانومت هموگلوبین قرائت می‌شود، نسبت به‌روش‌های اسید هماتین یا هماتین قلیایی بیشتر است. روش‌های دیگری نیز برای تعیین میزان هموگلوبین ماهی مورداستفاده قرار می‌گیرد. مقادیری که در روش اکسی هموگلوبین به دست می‌آید، کمتر از روش سیانومت هموگلوبین است. روش‌های

1. Cuvette

اتوماتیک کولترهموگلوبینومتر، مقدار هموگلوبین را زیاد نشان می‌دهد که به خاطر تداخل ترشحات هسته‌ای گلبول‌های قرمز خون ماهی است.

تعیین هماتوکریت

معمولاً لوله‌های میکروهماتوکریت استاندارد به طول ۷۵ میلی‌متر و قطر ۱/۱ تا ۱/۲ میلی‌متر و قطر داخلی ۰/۵ میلی‌متر برای اندازه‌گیری هماتوکریت مورداستفاده قرار می‌گیرند. خون در اثر فعالیت مویرگ‌ها به داخل لوله کشیده می‌شود. انتهای لوله توسط یک مسدودکننده تجاری (برای مثال، کریتوسیل) بسته می‌شود و نمونه را ترجیحاً در دمای یک اتاق خنک سانتریفیوژ می‌کنند و این کار در یک سانتریفیوژ استاندارد میکروهماتوکریت، به مدت ۵ دقیقه و به میزان ۷۰۰۰ دور در دقیقه صورت می‌گیرد. اگر حجم نمونه کم باشد. می‌توان از لوله‌های کوچکتر استفاده کرد. لوله درومونده[1] ساده که ۳۲ میلی‌متر طول دارد و قطر خارجی آن ۰/۸ میلی‌متر است، وسیله مناسبی برای این منظور به‌حساب می‌آید، زیرا می‌توان آن را در لوله میکروهماتوکریت استاندارد، برای سانتریفیوژ جاسازی کرد. طول ستون حاوی گلبول‌های قرمز فشرده‌شده و همچنین طول گلبول‌های قرمز فشرده‌شده به همراه مایع رویی[2] را اندازه‌گیری می‌کنند. میزان هماتوکریت، از نسبت این دو مقدار به هم به دست می‌آید و آن را برحسب درصد بیان می‌کنند. یک میکرومتر و یک ذره‌بین (سه برابر کننده) برای این منظور مفید است و البته به‌جای آن، می‌توان از یک دستگاه رؤیت کننده میکروهماتوکریت استفاده کرد. معمولاً دقت این کار ۲± درصد است.

شمارنده‌های گلبول‌های قرمز

استفاده از دستگاه‌های شمارنده الکترونیکی، در صورت وجود، امکان شمارش سریع‌تر و قابل‌اطمینان‌تر گلبول‌های قرمز را نسبت به‌روش‌های چشمی فراهم می‌کند. با-وجود این، استفاده از این ابزارها، نسبت به اطلاعاتی که به دست می‌آید، گران تمام می‌شود. درنتیجه، اغلب روش وقت‌گیر کلاسیک، با میزان اشتباه حقیقی خود (به‌اندازه ۱۰± درصد) مورداستفاده قرار می‌گیرد. خونی را که تازه گرفته‌شده است، به نسبت ۱ به ۲۰۰ با پی‌پت رقیق‌کننده استاندارد گلبول‌های قرمز رقیق می‌کنند و این کار توسط محلول رقیق‌کننده هندریکز صورت می‌گیرد که در زیر نحوهٔ تهیه آن ذکر شده است:

---

1. Drummond
2. Buffy

Na_2SO_4	۱۰ گرم	اسید استیک گلاسیال	۵۰ میلی‌لیتر
NaCl	۲/۵ گرم	آب مقطر	تا ۵۰۰ میلی‌لیتر
سیترات سدیم	۱/۵ گرم		

خون را تا زیر علامت ۰/۵، به داخل پی‌پت می‌کشند. پی‌پت را میزان کرده و سپس پاک می‌کنند و خون داخل بافت تا نوک پی‌پت جذب می‌شود تا اینکه منیسک درست روی علامت قرار گیرد. سپس پی‌پت را تا علامت ۱۰۱ توسط محلول هندریکز پر می‌کنند و انتهای آن را می‌بندند و پی‌پت را در یک شیکر (دستگاه تکان‌دهنده) به مدت دو دقیقه قرار می‌دهند. اگر شیکر در دسترس نبود، می‌توان این کار را با دست انجام داد. این کار باید با دقت و به‌طور کامل صورت گیرد، زیرا اگر قسمتی از خون با محلول رقیق‌کننده مخلوط شود، میزان خطای این روش بسیار زیاد خواهد بود.

چند قطره کوچک را از نوک پی‌پت تخلیه می‌کنند تا قسمتی از نمونه که مخلوط شده است، خارج شود. سپس دوباره نوک پی‌پت را پاک می‌کنند و آن را در کناره هموسیتومتر نئوبار یا اسپنسر (بین لامل و سطح لام شمارش) قرار می‌دهند. در اثر حالت موئینه، نمونه به داخل لام راه می‌یابد. هموسیتومتر به نواحی یک میلی‌متر مربعی تقسیم شده است. مربع وسطی به ۲۵ مربع کوچکتر تقسیم می‌شود و هرکدام از این مربع‌ها نیز به ۱۶ مربع تقسیم می‌شوند. گلبول‌های قرمز موجود در ۵ مربع ثانویه را می‌شمارند و معمولاً آن‌ها را از بین مربع‌های وسطی انتخاب می‌کنند. بر طبق قرارداد، سلول‌هایی که در مرز خطوط فوقانی و سمت راست قرار دارند، شمارش می‌شوند، ولی در مورد سلول‌های خط تحتانی و سمت چپ، بدین‌گونه عمل نمی‌شود. با دانستن میزان دقت و ابعاد این مربع‌ها، تعداد کل سلول‌های شمارش‌شده را در $۱۰^۶$ ضرب می‌کنند و تعداد گلبول در هر میلی‌متر مکعب خون کامل به دست می‌آید. هوستون (۱۹۸۰) محلول دیسی[1] را به‌عنوان محلول رقیق‌کننده پیشنهاد کرد که حاوی محلول فرمالدئید ۴۰٪ (محلول قوی فرمالین) به میزان ۱۰ میلی‌لیتر، تری سدیم سیترات ۳۱/۳ گرم، بریلیانت کریستال بلو یک گرم و آب مقطر تا ۱ لیتر است. آن‌ها با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر خون کامل تازه به ۰/۹۸ میلی‌لیتر محلول دیسی، رقت $\frac{۱}{۵۰}$ ایجاد کردند و سپس، آن را به داخل لام هموسیتومتر منتقل کردند و شمارش گلبول‌ها به صورتی که قبلاً ذکر شد، صورت گرفت.

شمارش گلبول‌های قرمز گونه‌های شاخص ماهیان استخوانی توسط هوستون (۱۹۸۰) ارائه شده است. در این شمارش، اختلافات قابل‌ملاحظه‌ای مشاهده می‌شود و هنوز مشخص نیست که آیا این اختلافات ذاتی است یا اکتسابی. ظاهراً عوامل زیادی بر روی وضعیت خون‌شناسی ماهیان تأثیر

1. Dacie fluid

می‌گذارند. این عوامل، تغییرات فصلی را تحت‌الشعاع قرار می‌دهند و عوامل اولیه آن‌ها به‌خوبی مشخص نشده است. دمای محیط، میزان دسترسی به اکسیژن و دوره تابش نور بر روی ظرفیت حمل اکسیژن خون تأثیر می‌گذارند و این تأثیر، هم بر روی مقدار و هم نوع هموگلوبین است (هوستون ۱۹۸۰). تنوع قابل‌ملاحظه‌ای در پاسخ به این عوامل مشاهده می‌شود. برای مثال، ماهیانی که در معرض غلظت‌های مختلف اکسیژن محلول و دمای ثابت قرار گرفتند، تغییراتی در ظرفیت حمل اکسیژن و گلبول‌های قرمز آن‌ها و همچنین، تنظیم‌کننده‌های میل ترکیبی هموگلوبین اکسیژن آن‌ها مشاهده شد. در شرایط بوم‌شناختی حقیقی که توسط چرخه حرارتی با امواج سینوسی روزانه تأمین می‌شود، میزان هموگلوبین افزایش می‌یابد. این حالت، ویژگی نمونه‌هایی است که در معرض اوج چرخه حرارتی قرار دارند و تغییرات کمی در میزان میل ترکیبی هموگلوبین- اکسیژن ایجاد می‌شود. در مورد گونه‌های دیگر، قرار گرفتن در معرض افزایش دما، منجر به افزایش ظرفیت، تثبیت میل ترکیبی و تغییر در جریان تهویه و بازده قلب می‌شود. نمود این نوع پاسخ‌ها غالباً بستگی به دیگر عوامل دارد. برای مثال، مدت زیادی است که مشاهده‌شده است وضعیت غذایی معمول و عناصر غذایی خاص، اثر عمیقی بر روی وضعیت خون‌شناسی برجای گذارند. این مسئله در مورد آلاینده‌های محیطی نیز صادق است.

اندازهٔ نمونه‌ها نیز عاملی مهم به‌حساب می‌آید. میزان نیاز به اکسیژن برحسب وزن (شدت سوخت‌وساز) در ماهیان، همانند تمام موجودات زنده، اثر معکوس دارد. ارتباط مشابهی نیز بین ظرفیت حمل اکسیژن و وزن پیش‌بینی می‌شود. باوجوداین، این امر تنها در مورد تعداد محدودی از گونه‌ها گزارش شده است. هیچ گزارشی در ارتباط با تفاوت‌های مربوط به‌اندازه در بین ماهی زرد آفریقایی (*باربوس هولوبی*)، کپور معمولی، ماهیان لجنی *لابئو اومبراتوس* و *لابئو کاپنسیس* یا ماهیان کانر وحشی و پرورشی وجود ندارد.

به‌طورمعمول، ظرفیت حمل اکسیژن، مستقیماً با وزن ماهی تفاوت می‌کند. افزایش متوسط یا قابل‌توجه یک یا چند شاخص اصلی، از ماهی کراپی سیاه و بلوگیل و وایت فیش کوهستانی گزارش شده است. در ماکرل اسپانیایی، افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین در اثر افزایش طول بدن به بیش از ۲۵- ۵۰ سانتی‌متر مشاهده می‌شود. افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در میزان هموگلوبین و هماتوکریت در اثر رشد ماهیان قزل‌آلای حلق کوتاه مشاهده کردند. این امر در مورد قزل‌آلای رنگین‌کمان و جویباری نیز صادق است. ارتباط مشابهی نیز در مورد گربه‌ماهی سیلوروئید با تنفس هوازی، *هتروپنوستس فوسیلیس* دیده می‌شود. ماهی پهن آمریکایی نیز ارتباط مثبتی بین تمام شاخص‌های اصلی و وزن نشان می‌دهد و این امر با افزایش سن مشخص‌تر می‌شود. پاسخ به تغییرات شرایط محیطی ممکن است با اندازه ماهی در ارتباط باشد. تغییرات اندکی در شاخص‌های اصلی و ثانویه خون‌شناختی کپور معمولی بزرگ (۲۰۰ گرمی یا بزرگتر) که در معرض افزایش درجه

حرارت بودند، مشاهده‌شده است. باوجوداین، نمونه‌های کوچکتر (۱۰ تا ۵۰ گرمی) تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای نشان دادند. هیچ شاهدی دال بر وجود تفاوت‌های مربوط به‌اندازه در ماهی طلایی که در ۷/۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، مشاهده نکردند، اما ارتباط معنی‌داری بین هموگلوبین و وزن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ملاحظه شد. به‌طور خلاصه، باید تفسیر این‌گونه اطلاعات، برای تشخیص عوامل چندگانه مؤثر، با دقت انجام شود (هوستون، ۱۹۸۰) .

تشکیل گلبول‌های قرمز آمیتوتیک[1] اطرفی: نظریه موردقبولی که در مورد اریتروپوئز (تشکیل گلبول‌های قرمز) در ماهیان بالغ وجود دارد، این است که این سلول‌ها در اثر تکثیر و تزاید میتوزی که بخش اعظم یا تمام آن در طحال و رأس کلیه صورت می‌گیرد، ایجاد می‌شوند. بعدازاینکه آن‌ها به داخل جریان خون آزاد شدند، سلول‌های تخم‌مرغی‌شکل[2] جوان، پهن شده و به‌صورت بیضی در می‌آیند؛ در داخل آن‌ها انواع مختلفی از اندامچه‌ها به وجود می‌آید؛ هِم و گلوبین تشکیل می‌شود؛ این دو با هم ترکیب‌شده و هموگلوبین ایجاد می‌کنند. بسیاری از اجزای اندامی از بین می‌روند و نهایتاً قدیمی و پیر می‌شوند. ساخت DNA متوقف می‌شود و به‌استثنای مراحل قبل از خروج نوزاد آزادماهیان از تخم یا پس‌ازآن، شواهدی دال بر انجام میتوز در گلبول‌های قرمز در حال گردش وجود ندارد. باوجوداین، گزارش‌های مربوط به تشکیل گلبول‌های قرمز محیطی، از طریق روندهای غیرمیتوزی، به‌طور فزاینده‌ای انتشار می‌یابند. این امر شامل گونه‌های متعدد، ازجمله وایت ساکر، ماهی پهن پلورونکتس پلاتسا و ماهی آزاد اقیانوس اطلس است. مشاهدات انجام‌شده دیگر نیز به فرآیندهایی از این قبیل اشاره داشته است. اگرچه این سلول‌ها معمولاً به‌عنوان سلول‌های غیرطبیعی یا عجیب‌وغریب به‌حساب می‌آیند، اما تشکیل گلبول قرمز به این روش در مهره‌داران، امری متداول است. این سلول‌ها ۱۰٪ گلبول‌های قرمز محیطی ماهی وایت ساکر را به خود اختصاص می‌دهند. در آزمایشگاه هوستون (۱۹۸۰) آن‌ها با تعداد کمتری نمونه قزل‌آلای رنگین‌کمان، ماهی طلایی و بروک سیلورساید آزمایش کردند اما در این نمونه‌ها، تغییرات مورد انتظار در میزان DNA آن‌ها مشاهده نشد.

الکتروفورز هموگلوبین

بیش از ۹۰٪ ماهیان استخوانی آزمایش‌شده، دارای هموگلوبین‌های پلی‌مورفیک (چندشکلی) هستند. واریانت‌های هموگلوبین- ایزومورف‌ها- ممکن است در مطالعات جمعیت در تعیین کمی و کیفی مارکرهای ژنتیکی مفید واقع شوند. ایزومورف‌ها غالباً از خود هتروژنیسیتی عملکردی نشان می‌دهند. برای مثال، آن‌ها ازنظر میزان میل ترکیبی با اکسیژن با هم متفاوت هستند. همچنین،

1. Amitotic
2. Ovoidal

ازنظر دامنـه‌ای کـه در آن، این میـل ترکیبی می‌توانـد تحـت تـأثیر محلول‌های تنظیم‌کننده میل ترکیبی قرار گیرد، تفاوت دیده می‌شـود. ازآنجاکه این هموگلوبین که توسط گلبول‌های قرمز احاطه می‌شـود، در هنگام سـازش قابل تنظیم اسـت، بنابراین می‌توان سازگان هموگلوبین‌ها را ساماندهی کرد. درنتیجه، دانستن کامل یا نسبی وفور ایزومورف‌های هموگلوبین بسیار حائز اهمیت است.

بهترین فنون برای تعیین سـازگان هموگلوبین، الکتروفورز اسـت. تصـور می‌شود که تفاوت‌های موجود در میزان تحرک الکتروفورتیک ایزومورف‌های هموگلوبین، انعکاسـی از تفاوت‌های موجود در نوع و ردیف اسـیدهای آمینه (نه تعداد آن‌ها) اسـت. باوجوداین، این امر لزوماً بدین معنی نیست که هر تحرکی که مشاهده می‌شود، بیانگر وجود یک هموگلوبین جداگانه است. تشخیص و تمایز توسط الکتروفورز، بر اساس محاسبات توده‌های الکتریکی مولکول‌هاست و انواع مختلف مولکول‌ها می‌توانند ارتباطات شـارژ - جرم[1] کلی مشـابه داشـته باشـند. به‌علاوه، مخلوط‌های اکسـی و دِی اکسـی هموگلوبین و همچنین، هموگلوبین آزاد، با کمپلکس هموگلوبین- هپاتوگلوبین، تفاوت‌هایی را ازنظر میزان تحرک از خود نشـان می‌دهند. به دلیل وجود این موارد و ملاحظات مشـابه، باید در هنگام جمع‌آوری نمونه، الکتروفورز نهایی و تعبیر و تفسیر نتایج، دقت لازم را به خرج داد.

عناصر ضروری هر دستگاه الکتروفورز، شامل محیط حمایت‌کننده[2] بافر و میدان الکتریکی است. مواد زمینه زیادی مورداسـتفاده قرار می‌گیرد که در میان آن‌ها می‌توان از کاغذهایی با ترکیبات و منافذ مختلف، ژل نشـاسـته، ژل پلی‌اکریل‌آمید و اسـتات سـلولز نام برد. هم ژل‌های یکپارچه و هم ژل‌هایی با منافذ درجه‌بندی‌شـده در دسـترس است. بافرهای مختلفی را نیز می‌توان برای استخراج ویژگی‌های مشـخص مورداستفاده قرار داد. باوجوداین، برای جداسازی‌های متداول، سازگان استات سـلولز که توسـط آزمایشـگاه‌های هلنا (Helena) تهیه می‌شـوند، خصـوصـاً بسـیار مفید هستند. اسـتفاده از این سـازگان‌ها، نسـبت به ژل نشاسته یا اکریل آمید، راحت‌تر است. وضوح[3] نیز در این سـازگان‌ها بهتر از ژل نشـاسـته بوده و حداقل، به‌خوبی بسـیاری از سـازگان‌های ژل اکریل آمید می‌تواند عمل کند. به‌علاوه، شـفافیت اسـتات سلولز را می‌توان قبل از ارزیابی چگالی‌سنجی افزایش داد که در تصـمیم‌گیری بسـیار مفید واقع می‌شـود. این نوع سـازگان‌ها را می‌توان برای جدا کردن پروتئین‌های پلاسـما نیز مورداسـتفاده قرار داد. نهایتاً، بسـیاری از معرف‌های موردنیاز به‌صـورت بسته‌بندی‌شده در دسترس بوده و به‌راحتی می‌توان آن‌ها را ذخیره کرد و مورداستفاده قرار داد.

روش الکتروفورزی که در باکس ۱ توضـیح داده شده است، از قدرت حلالیت (resolution) و انکسـار (Fraction) بالایی برخوردار اسـت و تنها با بخش کوچکی از یک درصـد کل پروتئین‌های

1. Charge - mass
2. Support medium
3. Resolution

موجود، می‌توان عمل جداسازی را انجام داد؛ بنابراین، موضوع شناسایی وجود هموگلوبین‌ها حائز اهمیت و توجه است. سابقاً رنگ بسیار حساس بنزیدین[1] برای این منظور مورداستفاده قرار می‌گرفت. بااین‌وجود، این ماده سرطان‌زا است و برای مصارف آزمایشگاهی متداول، مناسب نیست. محققان ۲ و ۷- دی‌آمینو فلوئورون را به‌عنوان آشکارساز[2] هموگلوبین مورداستفاده قرار دادند. این روش، بر اساس فعالیت شبکه پراکسیدازی هموگلوبین استوار است و ۲ و ۷- دی‌آمینو فلوئورون به‌عنوان دهنده هیدروژن عمل می‌کند. گفته می‌شود که این روش، برای آنالیز هموگلوبین و هیستوشیمی بسیار حساس و مناسب است (هوستون، ۱۹۸۰) .

آزمایش‌های اولیه جالب‌توجه بود. آن‌ها پیشنهاد کردند که اگر این روش برای هیستوشیمی یا شناسایی هموگلوبین‌های جداشده توسط الکتروفورز مورداستفاده قرار می‌گیرد، بهتر است اصلاح شود. محققان روشی برای جایگزینی این روش توصیف کردند که گفته می‌شود قادر است مقادیر کمتر از ۵ نانوگرم آهن متصل به پروتئین را در الکتروفروگرام ژل پلی‌اکریل‌آمید تعیین کند. این روش، بر اساس کاتالیز آهن اکسیداسیون دی‌آمینو بنزوئیک‌اسید توسط پراکسید هیدروژن و تولید رنگدانه‌های غیرمحلول استوار است.

روش جداسازی پروتئین سرم، مشابه روشی است که برای هموگلوبین در باکس ۱ توصیف‌شده است. تیتان III نسبت به H -III برای اتصال با بافر تریس- باربیتال- سدیم- باربیتال (بافر هلنا الکترا HK، pH = ۸/۸ ارجح‌تر است. زمان و ولتاژ لازم برای هر قطعه استات سلولز اختصاصی است. پونسیو S، همه پروتئین‌های موجود را رنگ می‌کند. رنگ‌های انتخابی برای گلیکوپروتئین‌ها، لیپوپروتئین‌ها و دیگر مواد نیز در دسترس است. نهایتاً، زمانی که تغییرات سازشی بالقوه در میزان وفور ایزومورف‌ها موردبررسی قرار می‌گیرد، باید عوامل متعددی را مدنظر قرار داد. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شده است، بلوغ گلبول‌های قرمز، مستلزم از بین رفتن اندام‌هاست و از قرار معلوم، توانایی تولید (سنتز) نیز در گلبول از بین می‌رود. این مسئله و همچنین، عمر طولانی گلبول‌های قرمز بالغ نشان می‌دهد که هموگلوبین‌هایی که در هر زمان در داخل گلبول وجود دارد، انعکاسی است از پاسخ به شرایط اولیه (گذشته) و نه شرایط جاری و یا شرایطی که در آینده به‌طور تجربی ایجاد می‌شود. در ارتباط با تغییرات در میزان وفور ایزومورف‌ها، محدودیت‌های همودینامیک بالقوه مهمی وجود دارد. به‌ندرت پیش می‌آید که پاسخ‌های خون شناختی، با تغییرات عمده در میزان متوسط هموگلوبین سلولی همراه باشد (هوستون ۱۹۸۰)؛ بنابراین، افزایش ظرفیت حمل اکسیژن خون، تنها از طریق تکثیر و تزاید گلبول‌های قرمز صورت می‌گیرد. در غیاب وجود راه‌هایی برای حذف انتخابی گلبول‌های قرمز بالغ و پیر، موجود زنده باید تکثیر و تزاید گلبول‌های قرمز را محدود

1. Benzidine
2. Detector

کرده و یا افزایش شـدید چسـبندگی (ویسـکوزیته) خون و کار قلب را تحمل کند؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که تغییرات ایجادشده در میزان وفور ایزومورف‌ها، در پاسخ به شرایط، تنها، تغییرات اندکی است که دورنمای غامض و مبهم هموگلوبین‌های موجود را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد.

در مورد گونه‌هایی که سازگان هموگلوبین پیچیده دارند، شناسایی این موارد ممکن است دشوار باشد. در چنین شرایطی، "نسبت پیام به سروصدا" [1] را می‌توان با کاهش میزان هموگلوبین، قبل از ایجـاد شـــرایط جـدیـد بهبود بخشـــیـد. برای این منظور، غالباً عامل همولیتیک فنیل هیدرازین-اسـیدکلریدریک مورداسـتفاده قرار می‌گیرد. برای این کار، می‌توان از تزریق داخل صفاقی (۱۰-۱۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن بدن) یا غوطه‌ور سـاختن (۱ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۴ سـاعت) در دمای کم اسـتفاده کرد. بسـته به گونه موجود و شـرایط محیط، حداکثر اثر همولیتیک، معمولاً پس از ۱۰-۱۴ روز ایجاد می‌شـود. سپس می‌توان شرایط را بر اساس میل خود، به‌آرامی تعدیل کرد (هوستون ۱۹۸۰) .

باکس ۱: جداسازی ایزومورف‌های هموگلوبین از طریق الکتروفورز

جداســازی ایزومورف‌های هموگلوبین از طریق الکتروفورز آزمایشــگاهی هلنا به‌صــورت زیر انجام می‌شود:

۱- یک نمونه کوچک از خون کامل را سانتریفیوژ می‌کنند و این کار با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه صـورت می‌گیرد. لایه رویی (baffy) و پلاسما را توسط میکروپی‌پت خارج کرده و سـلول‌ها را توسـط محلول شـسـتشـوی نمکی، دوباره به حالت تعلیق در می‌آورند. سـیکل سانتریفیوژ و تعلیق مجدد حداقل سه بار تکرار می‌شود تا تعداد گلبول‌های سـفید و پروتئین پلاسـما در فرآورده حاصله به حداقل برسد، یا آن‌ها را به‌کلی خارج کنند.

۲- دو حجم آب مقطر را به یک حجم سلول فشرده‌شده اضافه می‌کنند و سوسپانسیون حاصله را در یک مخلوط‌کن به‌هم می‌زنند تا همولیز (تجزیه گلبول‌ها) صـورت گیرد. سپس نمونه را بـه مـدت ۱۰ دقیقـه در دمای ۴ درجه، با ۵۰۰۰ دور در دقیقه ســانتریفوژ می‌کنند تا قطعات ســلولی جدا شــوند. ســپس مایع رویی را که حاوی هموگلوبین محلول اســت، جمع‌آوری می‌کنند.

۳- حبـاب‌هـای مونو اکســید کربن را به داخل محلول همولیز شــده، به مدت ۵ دقیقه وارد می‌کنند تا هموگلوبین به مشـتقات پایدار مونو اکسـید کربن تبدیل شـود. اگر یک شـیشه

1. the signal – to noise ratio

کوچک حاوی مونو اکسید کربن تحت‌فشار را از طریق یک دریچه کاهنده به یک سوزن ریز جلدی نمره ۲۲ یا ۲۳ منتقل کنیم، راحت‌ترین سازگان انتقال گاز خواهد بود. برای اطمینان، این مرحله را باید در یک هود تهویه انجام داد. در مواقعی که لازم نیست نمونه فوراً مورداستفاده قرار گیرد، می‌توان در آن را بست و در داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور ساخت و در دمای بسیار پایین (برای مثال، ۷۵- درجه سانتی‌گراد) ذخیره کرد.

۴- جداسازی ایزومورف‌های هموگلوبین از طریق الکتروفورز، بر اساس دستور کارخانه سازنده سازگانی که از آن استفاده می‌کنیم، صورت می‌گیرد. هوستون (۱۹۸۰) در هنگام کار با واحد الکتروفورزی هلنا در آزمایشگاه خود دریافت که رقیق کردن یک بسته بافر سوپرا هِم با ۱۰۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر غیریونیزه، سرد کردن کل محلول تا ۲-۴ درجه سانتی‌گراد و هدایت جریان ۴۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲-۴ درجه سانتی‌گراد، بسیار مفید واقع می‌شود.

۵- صفحات استات سلولز (تبتان III-H) برای شناسایی در یک گوشه سمت براق میلار علامت‌گذاری می‌شوند. صفحات باید به‌صورت یکنواخت در داخل بافر خیسانده شوند. بافریزه کننده‌ای که برای این منظور ساخته شده است، وسیله بسیار مفیدی محسوب می‌شود.

۶- پنج میکرولیتر نمونه هیدرولیز شده و شاهد (هلنا AA_2 هموکنترل) را به یک سرنگ‌هامیلتون منتقل کرده و از آنجا به چاهک‌های انتقال‌دهنده نمونه منتقل می‌کنند. هر نمونه از یک سمت انتقال‌دهنده به سمت دیگر حرکت می‌کند و در عرض هر یک از چاهک‌ها، یک اسلاید شیشه‌ای رسم می‌کند و این در حالی است که چاهک‌ها را برای جلوگیری از تبخیر به‌طور مداوم پر می‌کنند. سپس شاهد AA_2 برای تعیین میزان حرکت نسبی مورداستفاده قرار می‌گیرد. این شاهد در مورد مطالعات مقایسه‌ای خون‌شناختی و انسانی نیز به‌طور متداول مورداستفاده قرار می‌گیرد.

۷- اپلیکاتور نمونه، وسیله‌ای است که دارای چند نوک است و برای انتقال نمونه‌ها از چاهک‌های انتقال‌دهنده به صفحات استات سلولز به کار می‌رود. نوک اپلیکاتور را به داخل حفرات نمونه وارد می‌کنند تا نمونه را به حرکت در بیاورند. بعدازاینکه آن‌ها کاملاً مرطوب شدند، نوک اپلیکاتور را توسط کاغذ خشک‌کن، خشک می‌کنند. سپس صفحات استات سلولزی را که در داخل بافر خیسانده شده‌اند، به‌سرعت از حمام بافر خارج می‌کنند و یک بار آن را نقطه‌گذاری می‌کنند و بر روی صفحه تراز قرار می‌دهند. طرفی که استات دارد، در بالا قرار می‌گیرد. سپس دوباره اپلیکاتور را به نمونه آغشته می‌کنند، تراز کرده و بر روی صفحه استات به مدت ۵ ثانیه فشار می‌دهند و بعد برمی‌دارند.

۸- صفحه انتقال‌دهنده به‌سرعت به اتاقک (chamber) الکتروفورز انتقال داده می‌شود. برای اینکه جلوی کج شدن باندها گرفته شود، لازم است خطوط استفاده‌شده به‌صورت عمودی قرار گیرند. در یک‌زمان، تنها باید یک صفحه را به کار انداخت (به حرکت درآورد). شروع حرکت را نباید به تاخیر انداخت. باید توجه داشت که حتی تفاوت اندک در بافر اتاقک، منجر به سیفون شدن و کج شدن نمونه‌های هموگلوبین می‌شود.

۹- فوراً باید اپلیکاتور نمونه را تمیز کرد.

۱۰- بعدازاینکه صفحه را از اتاقک الکتروفورز خارج کردند، آن را به مدت ۵ دقیقه در رنگ غوطه‌ور می‌سازند. این رنگ حاوی ۵٪ پوسیو S در محلول آبی تری‌کلرواستیک-سولفوسالیسیلیک اسید است. سه بار شستشوی دو دقیقه‌ای در محلول اسیداستیک ۵٪، برای از بین بردن رنگ زمینه کفایت می‌کند. سپس صفحه را دوبار به مدت ۵ دقیقه در محلول شفاف کننده (۳۰ حجم اسیداستیک متبلور، ۷۰ حجم متانول و ۴ حجم اسید شفاف کننده هلنا) قرار می‌دهند. به دنبال این امر، صفحه را به مدت یک دقیقه روی یک خشک‌کن، توسط هوا خشک می‌کنند (در این حالت، جهت میلار باید به‌طرف پایین باشد) و به همراه خشک‌کن، در داخل یک آون ۶۰ درجه به مدت ۳ تا ۵ دقیقه قرار می‌دهند. در این حالت، خطوط شفاف می‌شوند و سپس، می‌توان مقدار آن را توسط روش‌های چگالی سنجی متداول، به‌راحتی تعیین کرد.

تعیین مقدار حجم خون

دانستن حجم خون، اغلب در ارزیابی وضعیت خون شناختی مفید واقع می‌شود. تلاش‌های زیادی صورت گرفته است تا حجم خون را از طریق خون‌گیری[1] (گرفتن خون از بدن) مورد ارزیابی قرار دهند، اما هیچ‌کدام موفقیت‌آمیز نبوده است. مطالعات اخیر به‌غیراز چند استثناء، بر اساس روش‌های رقیق‌کردن حجم (حجم‌های رقیق‌شده) انجام‌شده است. این مطالعات مستلزم اضافه کردن مقادیر محلول خاص به یک قسمت محدود از بدن است. غلظت محلول در آن قسمت مشخص می‌شود و حجمی را که آن محلول در داخل آن رقیق‌شده است، از فرمول زیر محاسبه می‌کند:

$$\text{غلظت } C = \frac{\text{مقدار } Q}{\text{حجم } V} \quad \text{یا} \quad \frac{Q}{c} = V$$

1. Exsanguination

این قاعده در تمام مطالعات مربوط به تقسیم‌بندی مایعات بدن که مستلزم استفاده از رهیافت‌های گوناگون است، مستتر شده است. برای مثال، روشی برای علامت‌گذاری گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلا در محیط آزمایشگاه به کمک کروم (Cr) ابداع شد. بعدازاینکه فعالیت ویژه‌ایزوتوپ‌ها (میزان تجزیه به ازای واحد زمان) اندازه‌گیری شد، گلبول‌های قرمز را مجدداً به داخل خون ماهی تزریق کردند. سپس دوباره نمونه خون‌گرفته شد و فعالیت ایزوتوپ موردانـدازه‌گیری قرار گرفت و از روی کاهش میزان فعالیت ویژه آن‌ها، حجم خون را تخمین زدند. این روش از ارزش قابل‌قبولی برخوردار است، اما انجام آن به زمان زیادی نیاز دارد. از نشانگرهای دیگری که اخیراً مورداستفاده قرارگرفته است، می‌توان آلبومین سرم گاوی علامت‌گذاری شده توسط یُد (I) و رنگ حیاتی اوانس آبی (T -۱۸۲۴) را نام برد. این رنگ به‌سرعت به پروتئین‌های پلاسمای در حال گردش متصل می‌شود. این دو نشانگر، به‌جای اندازه‌گیری حجم خون، حجم پلاسما را برای ما مشخص می‌کنند. لذا باید حجم گلبول‌های قرمز را نیز مشخص کرد تا بتوانیم حجم کل خون را به دست بیاوریم. حجم گلبول‌های قرمز را می‌توان از روی مقادیر میکروهماتوکریت، پس از تصحیح (کم کردن) میزان پلاسمای محبوس شده در فاصله ستون گلبول‌های فشرده‌شده، محاسبه کرد. مقادیر پلاسمای محبوس شده در ستون گلبول‌های قرمز، پس از سانتریفیوژ خون کامل، مشابه یکدیگر به‌دست آمد (۳٪ و ۲/۸٪)؛ بنابراین:

$$\text{حجم خون} = \text{حجم پلاسما} \times \frac{۱۰۰}{۱۰-۰/۹۷\text{Hct}}$$

موانع و اشکالات آشکاری درباره تجویز پروتئین‌های خارجی وجود دارد. به همین دلیل، تعیین حجم خون در ماهیان، به‌طور فزاینده‌ای، بر اساس استفاده از رنگ T -۱۸۲۴ یا نشانگرهای مشابه استوار است.

ارزیابی حجم خون از طریق روش رقیق کردن نشانگرها، بر اساس فرضیه‌های مختلفی قرار دارد و نتایج به‌اندازه‌ای گستردگی دارد که می‌تواند به این فرضیه‌ها جواب مساعد دهد و یا موارد اختلاف مورد اغماض قرار گیرند. در این میان، فرضیه‌هایی حائز اهمیت هستند که در آن‌ها لایل (نشانگر) به اجزا و بخش‌های پلاسما محدود می‌شود و همچنین، مارکر به‌طور کامل در آن بخش توزیع می‌شود. بین حجم خون تخمینی، بر اساس ایجاد مجموعه T -۱۸۲۴ با پروتئین پلاسمای داخلی قبل از تزریق به وجود می‌آید و آن‌هایی که پس از تزریق مستقیم رنگ ایجاد می‌شوند، تفاوت عمده‌ای وجود دارد. تصور می‌شود که رنگی را که مستقیماً تزریق می‌کنند، قبل از اتصال به عناصر پلاسما، از خون خارج می‌شود. این امر عجیب نیست. ذرات آلبومینی که به آن‌ها رنگ اواس آبی به‌راحتی متصل می‌شود، جزء مجموعه‌های پروتئینی هستند که در بیشتر ماهیان استخوانی، از اندازه نسبتاً کوچکی برخوردارند (هوستون ۱۹۸۰). این ذرات را احتمالاً می‌توان با مقدار کمی رنگ

اشـــباع کرد؛ بنابراین، باید میزان رنگی که به ماهیان تزریق می‌شـــود، نســـبت به آن‌هایی که به پســتانداران تزریق می‌کنند، کاهش نشـان دهد. اگرچه شـواهد کمی وجود دارد که نشان دهد رنگ در اثر نفوذ به داخل گلبول‌های قرمز کاهش می‌یابد، اما پروتئین پلاســما می‌تواند به‌راحتی از دیواره مویرگ‌ها به داخل بافت همبند و بینابینی راه یابد. درنتیجه، غلظت رنگ در پلاسما به‌طور یکنواخت در طی زمـان کاهش می‌یابد. این عامل و همچنین، کم بودن نســـبی میزان اختلاط رنگ با گردش خون محیطی، سبب می‌شود که نمونه‌گیری در یک دوره زمانی طولانی صورت گیرد. برای مثال، در مطالعاتی که قبلاً عنوان شـد، نمونه‌گیری چهار یا پنج بار در طی یک دوره ۲ تا ۷ ســاعته صــورت گرفت.

تعیین حجم خون، نیازمند قرار دادن یک کانول در داخل آئورت یا رگ دیگر است. باید به ماهی حداقل ۴۸ ســاعت فرصــت داد تا پس‌ازانجام این روش‌ها بهبود یابد. ســپس رنگ اوانس آبی را در داخل ســرم نمکی اســتریل وارد کرده و از طریق کانول به بدن حیوان تزریق می‌کنند و مقدار آن، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلولی که حاوی ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اســت و یا تقریباً ۰/۲ میلی‌گرم رنگ به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن است. به دنبال تزریق رنگ، با استفاده از ۰/۵ میلی‌لیتر سرم نمکی استریل به‌آرامی شـــســـتشـــو می‌دهد. نمونه‌گیری از خون، بعد از ۳،۲،۱ و ۵ ســاعت انجام می‌شـود و میزان غلظـت رنگ هماتوکریت و پلاســـما را تخمین می‌زنند. تعیین بعدی، از طریق اســـپکتروفتومتری صــورت می‌گیرد که آن را با رنگ اســتاندارد، با طول‌موج ۶۲۰ نانومتر، پس از رقیق کردن با ســرم نمکی به نســبت ۱ به ۹ (حجم به حجم) مقایســه می‌کنند. حداقل مربع رگرســیون برای تخمین غلظت رنگ پلاســما در زمان صفر صورت می‌گیرد. این غلظت، همان غلظتی است که انتظار می‌رود وجود داشــته باشد، البته اگر همه رنگ موردنظر بدون اتلاف و به‌صورت آنی و یکنواخت، در سرتاسر قســمت‌های پلاســما مخلوط شده باشد. غلظت رنگ در زمان صفر و مقدار هماتوکریت، برای تعیین حجم کل خون مورداستفاده قرار می‌گیرد. مهم‌ترین عامل ایجاد اشتباه در تعیین حجم خون به این طریق، مخلوط شــدن ناکافی رنگ اســت. انجام بســیاری از مطالعات اولیه و حتی برخی از مطالعات اخیر، مستلزم حداقل ۳۰ دقیقه زمان برای مخلوط شدن رنگ بوده است. مخلوط شدن ناکامل رنگ به‌طور اجتناب‌ناپذیر، سبب می‌شود که محاسبه میزان غلظت رنگ در زمان صفر، افزایش نشان دهد و درنتیجه، مقدار حجم خون، کم محاسبه شود.

تلاش شـده است تا حجم خون را از طریق رقیق کردن مستقیم گلبول‌های قرمز تخمین بزنند. انجام این روش، مســتلزم کشــیدن ۲۰ تا ۵۰٪ حجم احتمالی خون در ابتدای کار بود و بر پایه این فرضــیه قرار داشــت که میزان هماتوکریت و حجم خون، قبل و بعد از خون‌گیری، ارتباط یکسانی با یکدیگر دارند و در طی این فاصـــله، اجازه داده می‌شـــود که تعادل مجدد برقرار شـــود. اگر این امر صحیح باشد و هیچ عامل دیگری دخالت نکند، باید ارتباط زیر برقرار باشد (هوستون ۱۹۸۰).

$$\frac{\text{هماتوکریت اولیه } (Hct_1)}{\text{حجم خون } (V)} = \frac{\text{هماتوکریت ثانویه}}{\text{حجم } (V) - \text{حجم خون کشیده شده} (V_m)}$$

$$V = \frac{Hcti \cdot V_W}{Hcti - Hctf}$$

این روش بسیار حساس و مستلزم استفاده از فرضیه‌های متعدد است که هیچ‌کدام آن‌ها گستردگی لازم را ندارند. باوجوداین، اعدادی که در ارتباط با حجم خون گزارش شده است، با آنچه از رنگ اوانس آبی و مارکر یُد به‌دست‌آمده است، مطابقت دارد.

انتشار اندازه‌های مختلف گلبول‌های قرمز

گلبول‌های قرمز ماهیان استخوانی، در مرحله اولیه رشد خود، به داخل گردش خون آزاد می‌شوند. بلوغ این سلول‌ها مستلزم تغییراتی در ترکیب و همچنین، ریخت‌شناسی آن‌هاست. برای مثال، هموگلوبین سلولی به‌شدت افزایش می‌یابد. تغییراتی در ظهور (فعال شدن) ژن گلوبین و درنتیجه، در تعداد ایزومورف‌های هموگلوبین روی می‌دهد. به همراه این امر، تغییراتی نیز در غلظت سلولی ATP، Cl^- و Mg^{2+} صورت می‌گیرد. این ترکیبات، اجزای مهم سازگانی هستند که میزان میل ترکیبی هموگلوبین و اکسیژن را تنظیم می‌کند. به‌طور مختصر، جمعیت گلبول‌های قرمز اطرفی، هم ازنظر ریخت‌شناسی و هم ازنظر وظایف فیزیولوژیک، هتروژن (نامتجانس) هستند. به نظر می‌رسد که اندکی کمتر از نصف این سلول‌ها، دارای خواص ترکیبی هستند که برای نقل‌وانتقال مؤثر اکسیژن موردنیاز است.

برخی ازنقطه‌نظرات درباره انتشار و توزیع سنی گلبول‌های قرمز را می‌توان با انجام آزمایش‌های ریزبینی بر روی فرآورده اسمیر آن‌ها به دست آورد. رنگ‌آمیزی لیشمان و گیمسا امکان تفریق و تمایز بین گلبول‌های قرمز بالغ و نابالغ را تا حد قابل‌قبولی فراهم می‌کند. اسمیری را که در مجاورت هوا خشک شده است، در داخل متانول مطلق به مدت ۵ دقیقه تثبیت می‌کنند و چندین بار با آب مقطر شستشو می‌دهند و به مدت ۲۰ دقیقه در داخل رنگ لیشمان که حاوی متانول و فاقد استون است، قرار می‌دهند و سپس با متانول مطلق شستشو می‌دهند. شدت رنگ را باید کنترل کرد، زیرا ممکن است رنگ‌آمیزی مجدد نیاز باشد. سپس لام را به داخل رنگ گیمسا به مدت ۱۵ دقیقه منتقل می‌کنند و سپس با آب مقطر شستشو می‌دهند. در اینجا نیز باید شدت رنگ کنترل شود، زیرا ممکن است لازم باشد که لام مدت بیشتری در رنگ بماند. درنهایت، لام‌ها را چندین بار توسط آب مقطر شستشو می‌دهند تا تمام ذرات رنگ باقیمانده پاک شوند و لام را در مجاورت هوا خشک

می‌کنند. تفاوت‌های موجود در شدت رنگ سیتوپلاسم گلبول‌های قرمز، نشان‌دهنده اختلافات موجود در ترکیب پروتئینی آن‌ها در مراحل مختلف رشد است. درنتیجه می‌توان نسبت سلول‌های نابالغ به بالغ را حداقل به‌طور نسبی محاسبه کرد.

به‌علاوه، بلوغ گلبول‌های قرمز، با تغییرات شکل، اندازه و چگالی آن‌ها در ارتباط است. برای مثال، نسبت قطر کوچک به قطر بزرگ گلبول قرمز، در قزل‌آلای رنگین‌کمان، از حدود ۰/۷۵ تا ۰/۵۳ تغییر می‌کند. محققان نسبت عرض به طول گلبول‌های قرمز جوان قزل‌آلای رنگین‌کمان را ۰/۷۴ و برای گلبول‌های قرمز بالغ، ۰/۶۷ گزارش کردند و متوسط حجم گلبول‌های قرمز نیز از ۲۸۰ تا ۴۷۵ میکرومتر مکعب متغیر بود. همچنین، در میزان متوسط هموگلوبین سلولی نیز افزایش مشاهده شد. گلبول‌های قرمز را می‌توان بر اساس اندازه و تراکم آن‌ها، از طریق سرعت رسوب در واحد ثقل[1] از هم جدا کرد. این تکنیک، نسبت به‌روش‌های جداسازی دیگر، دارای فواید متعددی است.

دستگاه STA-put جونز و میلر (مؤسسه علمی جونز، تورنتو) که برای این منظور ساخته شده است، دستگاهی ساده و نسبتاً ارزان است و نتایج قابل‌قبولی به همراه می‌آورد. به‌علاوه، می‌توان سلول‌ها را به‌سرعت و به تعداد زیاد، برای مطالعات بعدی (در مقایسه با دستگاه‌های سانتریفیوژی که بر اساس گرادیان غلظت کار می‌کنند) جمع‌آوری کرد (هوستون ۱۹۸۰).

دستگاه STA-put تفاوت‌های موجود در اندازه، شکل و غلظت سلول‌ها را برای جداسازی آن‌ها بر اساس رسوب در واحد ثقل مورداستفاده قرار می‌دهد. این نوع دستگاه‌ها، نسبت به جریان‌های کنوکسیون عمودی ناشی از درجه حرارت، حساس هستند و باید آن‌ها را با استفاده از گرادیان غلظت، به کمک سرم آلبومین گاوی، سرم جنین گاو، فیکول و یا مواد مشابه دیگر تثبیت کرد. سرعت رسوب‌گذاری در واحد ثقل، راه مناسبی برای جدا کردن سلول‌ها، بدون ایجاد آسیب به آن‌ها در شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف است و جمعیت‌های یکنواخت گلبول‌های قرمز بالغ را می‌توان توسط این روش به دست آورد، اما در مورد سلول‌های جوان یا پیر، به دست آوردن آن‌ها به‌طور مداوم کار دشواری است (هوستون ۱۹۸۰).

در آزمایشگاه هوستون (۱۹۸۰)، با سانتریفیوژ پرکول که بر اساس گرادیان غلظت غیرمداوم کار می‌کند و به‌طور گسترده‌ای در ارتباط با گلبول‌های سفید ماهی قابل‌استفاده است، نتایج نسبتاً بهتری به‌دست‌آمده است. هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان هموگلوبین گلبول قرمز یا میزان وفور ایزومورف‌های هموگلوبین، در بین سلول‌هایی که دارای ریخت‌شناسی مشابه هستند، با استفاده از

1. Gravity

این دو روش مشاهده نشده است. به‌علاوه به نظر نمی‌رسد که پرکول ویژگی‌های سیتوپلاسمی سلول‌ها را تغییر دهد (هوستون ۱۹۸۰).

باکس ۲: روش STA – put برای تفکیک گلبول‌های قرمز خون

روش زیر برای تفکیک گلبول‌های قرمز خون (روش STA-put) به‌طور متعارف مورداستفاده قرار می‌گیرد:

۱- همه ابزارها و محلول‌ها در طول شب، در دمای ۴ درجه، در یک اتاق سرد خنک می‌شوند و دستگاه به‌دقت مورد کنترل قرار می‌گیرد.

۲- تقریباً ۲ میلی‌لیتر از نمونه خون را در داخل لوله سانتریفیوژ ریخته و ۳ بار، به کمک حجم کمی از محلول نمکی ایزوتونیک شستشو می‌دهند (با برگرداندن و تکان‌دادن ملایم‌لوله‌ها)؛ بعد از هر شستشو، نمونه‌ها را با هزار دور در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ می‌کنند. سپس سلول‌های فشرده را در داخل ۲۵ میلی‌لیتر محلول نمکی به همراه سرم آلبومین گاوی (BSA) دوباره به حالت تعلیق در می‌آورند.

۳- ۱۰ میکرولیتر از این تعلیق را در داخل یک میلی‌لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۳٪ BSA رقیق می‌کنند تا رقت ۱ به ۱۰۰ به دست آید. سپس تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر تعلیق را محاسبه می‌کنند.

۴- حداکثر $۱/۵\times۱۰^{۹}$ سلول را می‌توان در این روش مورد ارزیابی قرار داد. حجمی از تعلیق برحسب میلی‌لیتر که این تعداد سلول را در خود جای دهد، تعیین می‌شود و این حجم را با ۴۰ میلی‌لیتر سرم نمکی حاوی ۰/۳٪ BSA تکمیل می‌کنند.

۵- سپس دستگاه STA-PUT را آماده می‌کنند: ۶۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۲٪ BSA در سرم نمکی را به اتاقک D، ۶۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۱٪ BSA در سرم نمکی را به اتاقک C و ۵۰ میلی‌لیتر از محلول نمکی بدون BSA را به اتاقک B اضافه کرده و همزن را روشن می‌کنند:

۶- دریچه سه راهه بین اتاقک‌های A و B را باز می‌کنند و به‌این‌ترتیب، ۵۰ میلی‌لیتر از محلول نمکی اتاقک B به داخل اتاقک A راه می‌یابد. این محلول نمکی، بر اساس گرادیان غلظت در رو قرار می‌گیرد و محلول اتاقک A را تشکیل می‌دهد. در هنگام انجام این عمل، جریان را می‌توان تنظیم کرد؛ بنابراین، این روش در عرض ۲ دقیقه کامل می‌شود. نباید هیچ حباب هوایی در زیر بافل (baffle) و یا در داخل لوله‌های رابط تشکیل شود.

۷- سپس ۴۰ میلی‌لیتر تعلیق سلولی را به اتاقک B اضافه می‌کنند و اجازه می‌دهند که به داخل اتاقک A که قابل‌تفکیک است، جریان یابد. زمانی که اولین سلول‌ها در اتاقک A به قیف می‌رسند (t 0) ثبت می‌شود.

۸- بعدازاینکه همه سلول‌ها از لوله‌ای که از اتاقک B می‌آید، وارد شدند، دریچه بین B و A را می‌بندند و زمان ثبت می‌شود. سپس اتاقک را با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۵٪ BSA، در دو مرحله شستشو می‌دهند. سپس این محلول شستشو را با پی‌پت خارج کرده و اتاقک B را با ۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۵٪ BSA پر می‌کنند.

۹- دریچه‌های بین اتاقک D و C و سپس، بین C و B و نهایتاً، بین B و A را باز می‌کنند. هنگامی‌که محلول در اتاقک A به نوک مخروط قیف رسید و همه سلول‌ها تا کف اتاقک بالا آمدند، میزان جریان را می‌توان افزایش داد. نتیجه این امر، ایجاد یک گرادیان غلظتی عمودی است که در داخل آن، محلول‌های غلیظ‌تر به ترتیب، در زیر نمونه سلولی قرار می‌گیرند.

۱۰- هنگامی‌که پر کردن اتاقک به اتمام رسید، اجازه داده می‌شود که ترتیب سلول‌ها تا ۱۸۰ دقیقه پس از t_0 ادامه یابد. در خلال این مدت، ۳۰ تا ۳۲ ویال سانتریفیوژ درجه‌بندی‌شده را تا سطح ۴۰ میلی‌لیتر علامت‌گذاری و سپس شماره‌گذاری و خنک می‌کنند.

۱۱- محتویات اتاقک A در اندازه‌های ۴۰ میلی‌لیتر جمع‌آوری می‌شود.

۱۲- ویال‌های ۱ تا ۳ را سانتریفیوژ کرده و سلول‌ها را به‌صورت کمی، به یک ویال مشخص انتقال می‌دهند و آن را با نام A علامت‌گذاری می‌کنند. به همین ترتیب، ۳۰ ویال دیگر را در ۱۰ ویال جدید، از A تا J دسته‌بندی می‌کنند. این کار باید به‌طور اجمالی، برای ۸۰٪ سلول‌ها محاسبه شود. ویال‌های باقیمانده را دور می‌اندازند. به‌طور مختصر، سلول‌های جوان در ویال‌های I و J، سلول‌های بالغ در ویال‌های D تا H و سلول‌های پیر در ویال‌های A تا C دیده می‌شوند. البته این نوع تفکیک باید کنترل شود و این کار به‌راحتی، با اندازه‌گیری ابعاد سلول‌ها از طریق میکروسکوپ صورت می‌گیرد.

محلول اصلی (Stock) پرکول را با رقیق کردن ۹ قسمت پرکول (کمپانی داروی کانادا) با یک قسمت از محلول ۱/۵ مول نمک طعام (با درجه‌بندی آنالیتیکی) تهیه می‌کنند و pH آن را به کمک اسیدکلریدریک یک نرمال، در حد ۷/۵ تنظیم می‌کنند. محلول اصلی بعداً با محلول نمک طعام ۰/۱۵ مول رقیق می‌شود تا محلول‌هایی با چگالی‌های متفاوت به وجود آید. P از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$P= (P_S V_S + P_d V_d) / (V_S + V_d)$$

P_S= چگالی محلول پرکول اصلی (۱/۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

V_S= حجم محلول پرکول اصلی (برحسب میلی‌لیتر)

P_d= چگالی محیط رقیق‌شده (۰/۱۵ مول کلرید سدیم،۱/۰۰۴۸ گرم در میلی‌لیتر در ۲۰ درجه سانتی‌گراد)

V_d= حجم محلول رقیق‌شده (میلی‌لیتر)

حجم‌های ده میلی‌لیتری از چگالی‌های مختلف را می‌توان با مخلوط کردن محلول اصلی و محلول‌های رقیق‌شده به‌صورت زیر تهیه کرد (این ردیف‌ها را می‌توان حتی بیش ازآنچه در جدول نشان داده شده است، افزایش داد).

محلول اصلی (میلی‌لیتر)	۱۰/۰ ۹/۵ ۹ ۸/۵ ۸ ۷/۵ ۷ ۶/۵
محلول رقیق‌شده (میلی‌لیتر)	۰/۰ ۰/۵ ۱ ۱/۵ ۲ ۲/۵ ۳ ۳/۵
چگالی (گرم در میلی‌لیتر)	۱/۱۲۲ ۱/۱۱۶ ۱/۱۱۰ ۱/۱۰۴ ۱/۰۹۹ ۱/۰۹۳ ۱/۰۸۷ ۱/۰۸۱

یک میلی‌لیتر از این محلول‌ها را به داخل لوله‌های سانتریفیوژ درجه‌بندی‌شده ۱۲ میلی‌لیتری می‌ریزند برای این منظور، از سرنگ و یا پی‌پت های رقیق‌کننده کالیبره شده استفاده می‌شود. مراحل حدواسط (اینترفاز) چگالی باید به‌راحتی قابل‌مشاهده باشد. چگالی‌ها را می‌توان توسط نشانگرها کنترل کرد.

نمونه خون را باید تازه مورداستفاده قرار داد. سلول‌ها را باید حداقل ۳ بار در محلول نمکی اصلاح‌شده کوتلند شستشو داد.

لایه رویی (buffy) را هر بار باید بیرون ریخت و سلول‌ها را درنهایت در داخل محلول نمکی با حجم برابر، مجدداً به حالت تعلیق درآورد. ۵۰ میکرولیتر از این تعلیق را به‌دقت بر روی لایه رویی هر یک از گرادیان‌های (شیب) غلظت قرار می‌دهند و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۵ درجه با ۴۰۰× چگالی سانتریفیوژ می‌کنند. لایه‌های سلولی را به‌روش‌های مختلف می‌توان جمع‌آوری کرد (هوستون ۱۹۸۰).

به‌طورکلی، چگالی گلبول‌های قرمز در بین گونه‌های مختلف متفاوت است، اما در داخل هرگونه نسبتاً ثابت است. بعد از فعالیت‌های اولیه در ارتباط با یک گونه، دامنه گرادیان (شیب) غلظت را می‌توان کاهش داد.

منحنی‌های تعادل اکسیژن

هموگلوبین و دیگر شاخص‌های خون شناختی اصلی، انعکاس‌دهنده ظرفیت حمل اکسیژن هستند و بررسی آن‌ها در ارتباط با توانایی‌های حیوان برای تأمین نیازهای سوخت‌وسازی خود، حائز توجه و اهمیت است. باوجوداین، غلظت‌های هموگلوبین، لزوماً انعکاس‌دهنده مقادیر اکسیژنی که حمل شده، نیست. به‌علاوه، متغیر اساسی و بحرانی، ظرفیت حمل اکسیژن نیست، بلکه میزان اکسیژنی است که تحویل بافت‌ها داده می‌شود و با ظرفیت حمل اکسیژن و بازده قلبی مشابهت و نزدیکی دارد. باوجوداین، شدت و وسعت این توان بالقوه، بستگی به میل ترکیبی هموگلوبین- اکسیژن‌دارد.

میل ترکیبی درواقع، قدرت اتصال بین آهن «هِم» و اکسیژن است. این خاصیت، عاملی است که میزان آمادگی هموگلوبین برای جذب اکسیژن از پلاسما و رهاسازی آن (در هنگام بروز تغییرات میزان اکسیژن پلاسما) را تعیین می‌کند.

میزان میل ترکیبی هموگلوبین و اکسیژن را می‌توان تنظیم کرد. ایزومورف‌هایی که معمولاً سازگان‌های مجموعه هموگلوبین را در بین ماهیان تشکیل می‌دهند، غالباً دارای میل ترکیبی ذاتی متفاوتی هستند و غالباً، نسبت به محلول‌های تنظیم‌کننده میل ترکیبی، حساسیت‌های متفاوتی نشان می‌دهند. محلول‌های اخیر شامل H^+، ATP، GTP، Cl^- و Mg^{2+} هستند. تمام واکنش‌های متقابل مستقیم یا غیرمستقیم هموگلوبین، بر روی تعادل بین اشکال تنشی[1] (دی‌اکسی) و رلاکس (اکسی) این مولکول تأثیر می‌گذارند. اثر بوهر (Bohr)، شناخته‌شده‌ترین اثر تنظیم‌کنندگی، اساساً یک واکنش متقابل پروتونی است که حالت تنشی دِی‌اکسی هموگلوبین و رهاشدن اکسیژن را تحریک می‌کند. کلرید و ارگانوفسفات‌ها، ATP و GTP نیز وضعیت مولکولی تنشی را تحریک می‌کنند. درنتیجه، افزایش غلظت این مواد در داخل گلبول قرمز، آزاد شدن اکسیژن را تسهیل می‌کند. برعکس Mg^{2+}، مجموعه‌های نوکلئوزیدتری فسفات (NTP) مانع از واکنش‌های متقابل تنظیم‌کنندگی آن‌ها می‌شوند. افزایش Mg^{2+} در گلبول‌های قرمز، باعث کاهش غلظت مؤثر NTP می‌شود و حمل اکسیژن را زیاد می‌کند. ماهیان می‌توانند میزان وفور نسبی و حقیقی ایزومورف‌های خاص هموگلوبین و تنظیم محیط داخل سلولی را که آن‌ها در داخل آن عمل می‌کنند، تغییر دهند (هوستون ۱۹۸۰). درنتیجه، دانش مربوط به میزان اکسیژن خون و میل ترکیبی آن، می‌تواند حائز اهمیت باشد. میل ترکیبی را اساساً به‌صورت P_{50} نشان می‌دهند و درواقع، فشار نسبی[2] اکسیژن است که در آن، نیمی از کل اکسیژن به‌صورت اکسی‌هموگلوبین دیده می‌شود. این مقدار را می‌توان توسط منحنی‌های تعادل اکسیژن تخمین زد. این منحنی‌ها درواقع، توصیف ارتباط درصد هموگلوبین، آن هم در شرایطی است که با اکسیژن ترکیب‌شده است و با عنوان فشار نسبی اکسیژن از آن نام می‌برند. روش‌های اولیه برای اندازه‌گیری میل ترکیبی هموگلوبین- اکسیژن (برای مثال، روش‌های وان اسلیکه و ناتلسون)، مستلزم آزادسازی اکسیژن از هموگلوبین، با استفاده از نیرو[3] و اندازه‌گیری تغییرات حاصله در فشار یا حجم بوده است. این روش‌ها وقت‌گیر بودند و ازنظر تکنیکی، انجام آن‌ها مشکل بود، ولی با ظهور الکترود اکسیژن کلارک، کنار گذاشته شدند. تغییر و تبدیلات کوچک به‌سرعت توسعه یافت. برای مثال، روشی توصیف شد که تنها، مستلزم استفاده از ۷ میکرولیتر نمونه خون کامل بود. مطالعات اخیر در زمینه

1. Tense
2. Tension
3. Forced release

میل ترکیبی اکسیژن- هموگلوبین در ماهیان، بر پایه چهار روش عمومی انجام‌شده است. روش‌هایی نیز برای مخلوط کردن بی‌هوازی نمونه‌های خون پر اکسیژن و فاقد اکسیژن به نسبت‌های معلوم و تعیین فشار اکسیژن(pO_2) توسط الکترود ابداع شد (هوستون ۱۹۸۰).

این روش بر روی ماهیانی که به‌طور اختیاری از هوا تنفس می‌کنند، به کار رفت و این امر با استفاده از رادیومتر سیستم BMS-2 mkII برای ایجاد تعادل نمونه‌های مخلوط شده به‌صورت غیرهوازی و همچنین، الکترود رادیومتر BMS-3، برای اندازه‌گیری فشار اکسیژن انجام شد. همچنین، یک روش الکترولیتی برای تعیین منحنی‌های تعادل اکسیژن از نمونه‌های ۵۰-۱۰۰ میکرولیتری توصیف شد. بر اساس یکی از این رهیافت‌ها، بی‌اکسیژن شدن در حضور اندام‌هایی که متابولیزه کردن آن را به میزان ثابت انجام می‌دهند، نشان داده می‌شود و نتایج حاصله، با آنچه توسط دیگر روش‌ها به دست می‌آید، قابل‌مقایسه است.

باوجوداین، امروزه بیشتر تأکید بر روی روش‌های اسپکتروفتومتری است. این روش‌ها به‌ویژه هنگامی برای تعیین منحنی‌های تعادل اکسیژن با ارزش هستند که فیلم‌های نازکی از خون کامل در سازگان مورداستفاده قرار گیرد و امکان تنظیم پیشرفته فشار نسبی اکسیژن را فراهم سازد. استفاده از آنالیزر تجزیه‌کننده آمینکو- هم- o – اسکان برای مطالعه خون ماهیان گزارش شده است. این روش‌ها در حال حاضر، بسیار گمراه‌کننده، اما راحت، نسبتاً ساده و ارزان‌قیمت هستند. فنون اسپکتروفتومتری را می‌توان به نحو شایسته‌ای مورداستفاده قرار داد و دارای مزایای زیادی هستند. این روش نیز همانند دیگر روش‌ها، بستگی به تفاوت‌های موجود بین اکسی و دِی اکسی هموگلوبین، ازنظر جذب طیف‌های مختلف دارد. فرضیه اصلی که این روش بر پایه آن قرار دارد، این است که در شرایطی که هموگلوبین کاملاً از اکسیژن اشباع است و شرایطی که هموگلوبین کاملاً فاقد اکسیژن است، میزان جذب در بین این دو طیف به‌صورت خطی تغییر می‌کند. مشکل عمده‌ای که باید برطرف شود، تمایل هموگلوبین به‌سوی ایجاد حالت بی‌ثبات است که درنتیجه دناتوره شدن سطحی و واکنش‌های اکسانش خودی روی می‌دهد. واکنش‌های اکسانش خودی، محدودیت‌هایی را با توجه به زمان، دما، مخلوط کردن و عوامل مربوطه به وجود می‌آورد.

دستگاه طراحی‌شده، شامل یک لوله تونبرگ (thunberg) است که قسمت پایینی آن به یک کیووت (cuvette) چشمی از جنس پیرکس بسته شده است. وجود انواع کیووت‌ها با اندازه‌های مختلف و فضای کیووت‌های چشمی، امکان مانور و انعطاف‌پذیری در رابطه با حجم‌های مختلف نمونه‌ها را فراهم می‌کند. این روش با گلبول‌های همولیز شده، بهتر از گلبول‌های کامل و سالم کار می‌کند. ابتدا گلبول‌های قرمز را خالص کرده و از یون‌های آلی و غیر آلی پاک می‌کنند. سپس سلول‌ها را سه بار با محلول ۱/۵٪ کلریدسدیم، به همراه $۱۰^{-۲}$ مول تریس بافر در pH =۷/۴ شستشو می‌دهند و به مشتقات کربوکسی تبدیل می‌کنند و بعد آن‌ها را در دو تا سه برابر حجم

خود آب مقطر لیزه (خرد) می‌کنند. پس از سانتریفیوژ (۲۸۰۰۰ دور × ثقل، ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد) برای فشرده کردن ترشحات سلولی، مایع رویی را به خارج می‌کشند و محتویات هموگلوبین آن تعیین می‌شود. در صورت ضرورت، می‌توان این محلول‌ها را قبل از استفاده در داخل نیتروژن مایع، منجمد و در دمای ۷۵- تا ۸۰ - درجه ذخیره کرد. قبل از آزمایش، باید نمک‌ها، نوکلئوزیدهای تری فسفات و محلول‌های مربوطه را خارج کرد. این کار به‌سادگی، با عبور دادن از ستون‌های ۲/۵×۵۰ سفادکس G-25 و به دنبال آن، استفاده از ستون‌های دیونیزه کننده صورت می‌گیرد. ستون‌های اخیر از بالا به پایین، شامل ۲ سانتی‌متر Dowex-50 (w)، شکل آمونیوم، ۲ سانتی‌متر Dowex شکل استات و ۲۰ سانتی‌متر AG 501-X8(D) مخلوط با بستر رزینی[1] است.

بعدازاینکه آن را به‌صورت استریپ[2] و دیونیزه درآوردند، نمونه خالص را دوباره ایجاد می‌کنند تا pH مطلوب را تأمین کنند و غلظت‌های نسبی مناسبی از ATP (یا GTP) و هموگلوبین، یون کلرید و هموگلوبین، یون منیزیوم و NTP و دیگر جفت‌های شیمیایی کلیدی به دست آید. غلظت هموگلوبین تنظیم می‌شود؛ بنابراین، چگالی بصری در حدود ۵۶۰ و ۵۸۰ نانومتر، از حدود ۱/۶ تجاوز نمی‌کند. حجم‌های مشخص خون همولیز شده را به لوله تونبرگ با حجم مشخص می‌افزایند و بازوی کناری لوله را به یک مسیر خلأ اتصال می‌دهند و دستگاه، فاقد اکسیژن (داِکسیژنه) می‌شود. این کار باید به‌آرامی، در عرض ۱۵ تا ۲۰ دقیقه صورت گیرد و سازگان را به‌آرامی در حمام یخ تکان دهند. میزان «داِکسیژنه شدن» با تعیین طیف جذب از طول‌موج ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر، با فواصل ۱۰ نانومتر، مورد کنترل قرار می‌گیرد. هنگامی‌که هموگلوبین کاملاً از اکسیژن تخلیه شد، بازوی کناری لوله بسته می‌شود و لوله به یک حمام که دمای آن توسط ترموستات کنترل می‌شود، انتقال می‌یابد و آن را به دمای مطلوب و موردنظر می‌رسانند. یک پی‌پت مدرج، حاوی یک قطره جیوه، به بازوی جانبی متصل می‌شود و وضعیت منیسک جیوه ثبت می‌شود. بازوی جانبی را بااحتیاط باز می‌کنند تا هوا وارد شود و حجم هوای واردشده را توسط حرکات قطره جیوه مشخص می‌کنند. بعد از هر بار اضافه کردن هوا، اجازه می‌دهند که دستگاه حداقل به مدت ۱۰ دقیقه به حالت تعادل برگردد و طیف آن را تعیین می‌کنند. اضافه کردن هوا چندین بار تکرار می‌شود تا چندین نقطه بر روی منحنی ثبت شود. آخرین طیف را باید پس از اضافه کردن اکسیژن خالص در فشار یک اتمسفر تعیین کرد. درجه اکسیژن‌دار شدن هموگلوبین (y، درصد اکسی هموگلوبین) را در هر فشاری می‌توان به‌راحتی، از روی طیف‌های حاصل از هموگلوبین کاملاً فاقد اکسیژن (Hb) و

1. Resin
2. Stripped

هموگلوبین کاملاً اکسیژن‌دار (HbO_2) تعیین کرد. (OD درواقع، چگالی بصری است و obs، آنچه مشاهده می‌شود)

$$y = \frac{OD(obs) - OD(Hb)}{OD(Hbo_2) - OD(Hb)}$$

بهترین روش این است که متوسط مقدار y را از روی چندین طول‌موج (برای مثال، ۵۴۰، ۵۶۰، ۵۸۰ نانومتر) محاسبه کنیم. فشار نسبی اکسیژن (P_1) در لوله‌های تونبرگ را می‌توان از طریق حجم هوای واردشده (V_1)، فشار نسبی اکسیژن در هوا (P_0) و حجم فاز گازی در رگ (حجم نمونه- حجم رگ= V_t) به دست آورد:

$$P_i = \frac{(P_o V_i)}{(V_t)}$$

y را می‌توان از روی طرح و نقشه P_i به دست آورد که نتیجه آن، پی بردن به ارتباط تعادل اکسیژن است و P_{50} را می‌توان از روی آن تفسیر کرد.

فنون مذکور، اطلاعات مفیدی در زمینه توانایی نقل‌وانتقال گازهای تنفسی در اختیار ما قرار می‌دهد، اما آن‌ها تنها این امکان را فراهم می‌کنند که از فشار واقعی اکسیژن بافت‌ها استنباط مناسبی داشته باشیم. بر همین اساس، یک دستگاه مینیاتوری را ابداع شد که دارای یک کاتد پلاتین قابل پیوند و یک الکترود سیلور- سلیورکلراید است. ظاهراً هنگامی‌که این دستگاه بر روی کپور معمولی مورد آزمایش قرار گرفت، نتایج قابل‌قبولی ازنظر تصمیم‌گیری و تخمین اکسیژن بافتی به همراه داشت.

فعالیت آنزیمی گلبول‌های قرمز

آزمایش‌های آنزیمی برای بررسی گلبول‌های قرمز طبیعی پستانداران و همچنین، تعیین اختلالات مربوطه مورداستفاده قرارگرفته و استعمال این روش‌ها، در مورد ماهیان نیز با نتایج مفیدی همراه بوده است. روش‌های آنزیمی گوناگونی در تحقیقات پزشکی مورداستفاده قرارگرفته است. همچنین، کمیته بین‌المللی برای استاندارد کردن فعالیت‌های خون شناختی، انجام مطالعاتی را در زمینه دقت، قابلیت اطمینان و سهولت اجرای این روش‌ها به عهده گرفت. گزارش‌های حاصله، رفرنس مفیدی برای آشنایی کسانی است که به‌تازگی وارد این عرصه شده‌اند، به‌طوری‌که این گزارش‌ها در ارتباط با روش‌های اندازه‌گیری حدود ۳۰ آنزیم، اطلاعات مناسبی ارائه می‌کند. این روش‌های اندازه‌گیری را می‌توان بر روی خون ماهیانی که حاوی هپارین یا EDTA هستند، مورداستفاده قرار داد. در هنگام انجام آزمایش‌ها بر روی نمونه‌های خون پستانداران، گلبول‌های سفید را باید خارج کرد، زیرا این سلول‌ها ازنظر سوخت‌وساز، بسیار فعال‌تر از گلبول‌های قرمز فاقد هسته هستند؛ اما

این مسئله در مورد ماهیان حائز اهمیت نیست؛ معمولاً گلبول‌های سفید ماهی از وفور چندانی برخوردار نیستند و گلبول‌های قرمز نیز تا زمان پیری، ازنظر سوخت‌وساز، فعال باقی می‌مانند. باوجوداین، حذف گلبول‌های سفید یک عمل احتیاطی است.

روش ساده‌ای توصیف‌شده است که در مورد نمونه‌های خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌خوبی قابل انجام است و می‌توان توسط آن، شمار زیادی از گلبول‌های سفید را بدون هدر دادن گلبول‌های قرمز، خارج کرد. در این روش، اوزان مساوی از آلفا- سلولز و سلولز میکروکریستالین را با سرم نمکی ایزوتونیک مخلوط می‌کنند تا محلول آبکی[1] ایجاد شود. یک استوانه سرنگ شیشه‌ای ۵ میلی‌لیتری تمیز، به‌طور عمودی قرار داده می‌شود و به همراه آن، یک قطعه پارچه توری کوچک ریزچشمه به داخل استوانه سرنگ وارد می‌کنند تا منفذ سوزن را بپوشاند. دو میلی‌لیتر از این محلول آبکی به سرنگ اضافه می‌شود و همچنین، اجازه می‌دهند که ۵ میلی‌لیتر از سرم نمکی به داخل و قاعده ستون کشیده شود. سپس، در حدود یک میلی‌لیتر از خون کامل را به نسبت یک‌به‌یک، با سرم نمکی که توسط یخ خنک شده است رقیق می‌کنند و به داخل استوانه سرنگ می‌ریزید. این امر به محلول آبکی اجازه می‌دهد که به داخل کشیده شود و سپس، گلبول‌های قرمز را توسط اضافه کردن ۲-۵ میلی‌لیتر محلول نمکی می‌شویند. گسترش (اسمیر) حاصله را باید برداشت و ازنظر وجود گلبول سفید آزمایش کرد. قبل از اندازه‌گیری آنزیم‌ها، باید علاوه بر گلبول‌های سفید، اجزای پلاسما را نیز خارج کرد. روش فوق‌الذکر، بسیاری از اجزا را خارج می‌کند، اما باید آن را تکمیل کرد. به‌این‌ترتیب که حداقل دوبار دیگر، با سرم نمکی که توسط یخ خنک شده است، شستشو داد. روش‌های شستشو را باید با دقت انجام داد تا از همولیز زودرس اجتناب شود (هوستون ۱۹۸۰).

پس‌ازاینکه عمل تغلیظ و شستشو انجام شد، نمونه را باید برای استفاده و یا ذخیره، همولیز کرد. فنون مختلفی برای این منظور مورداستفاده قرار می‌گیرد. گفته می‌شود که استفاده از روش متداول لیزه کردن توسط شوک هیپوتونیک، برای آنزیم‌هایی که تماماً یا به‌طور ناکامل به غشای گلبول متصل شده‌اند، رضایت‌بخش نیست. لیزه کردن توسط امواج مافوق‌صوت نیز ممکن است برخی از واریانت‌های آنزیم را که ازنظر ساختاری پایدار نیستند، غیرفعال می‌کند.

مخلوط کردن یک حجم از تعلیق سلولی با ۹ حجم از محلولی که از ۲/۷ میلی‌مول EDTA (۷ = pH) و ۰/۷ میلی‌مول ۲- مرکاپتواتانول تشکیل‌شده، پیشنهاد شده است. این محلول، گروه‌های سولفیدریل را برای چندین ساعت تثبیت می‌کند. برخی از آنزیم‌های گلبول‌های قرمز به حرارت حساس هستند و به‌سرعت در دمای اتاق فعالیت خود را از دست می‌دهند. به همین دلیل،

1. Slurry

اندازه‌گیری باید سریعاً انجام شود، اما اگر انجام این کار امکان‌پذیر نیست، نمونه را باید سریعاً در دمای ۷۵- تا ۸۰- درجه منجمد کرد تا بعدها مورداستفاده قرار گیرد. باوجوداین، زمان ذخیره‌سازی باید حداقل ممکن باشد و تنها باید یک بار نمونه را ذوب کرد و از انجماد مجدد نمونه خودداری کرد. بعد از ذوب کردن، باید نمونه را به‌خوبی مخلوط کرد اما اگر هدف ما اندازه‌گیری آنزیم‌های متصل به غشاست، نباید از روش سانتریفیوژ استفاده کرد.

معمولاً اندازه‌گیری در شرایطی انجام می‌شود که فعالیت آنزیم‌ها در حداکثر مقدار خود باشد یا تقلیدی از سلول‌های زنده باشد. رهیافت اخیر احتمالاً بهتر است؛ بنابراین، بسیاری از روش‌هایی که مستلزم استفاده از بافت‌های پستانداران است، در دمای حدود ۳۷ درجه و در pH نزدیک به pH سلول‌های این نوع بافت‌ها صورت می‌گیرد. باوجوداین، شرایط اندازه‌گیری باید مشابه شرایط مربوط به گونه‌هایی باشد که به‌طور متعارف موردبررسی قرارگرفته‌اند. اندازه‌گیری آنزیم‌های کپور معمولی با ماهی طلایی را می‌توان در دمایی که برای مطالعات پستانداران عنوان شده است، انجام داد، اما این کار در مورد سلول‌ها و بافت‌های آزادماهیان از حساسیت کمتری برخوردار است. به‌علاوه، این امر در مورد شرایط مناسب برای لیپوپروتئین نیز صادق است، همان‌طور که بسیاری از آنزیم‌های متصل به غشاء این‌گونه عمل می‌کنند.

گرمخانه گذاری باید در دمای قابل‌تحمل (سازگاری) انجام شود. در غیر این صورت و یا درصورتی‌که فعالیت‌ها هم در دمای سازگاری و هم در دمای استاندارد صورت گیرد، ممکن است در تعبیر و تفسیر اطلاعات اشتباهاتی روی دهد.

نهایتاً، واحدهای مختلفی برای بیان فعالیت‌های آنزیمی گلبول‌های قرمز مورداستفاده قرارگرفته است که متداول‌ترین آن‌ها: ۱- میزان فعالیت به ازای هر سلول و یا متداول‌تر از آن، میزان فعالیت به ازای $۱۰^{۶}$ یا $۱۰^{۹}$ سلول؛ ۲- میزان فعالیت به ازای واحد حجم گلبول‌های قرمز فشرده‌شده یا به ازای واحد حجم کل خون (که کمتر متداول است)؛ ۳- میزان فعالیت به ازای هر گرم هموگلوبین؛ ۴- میزان فعالیت به ازای هر میلی‌گرم ذرات جامد سلول خشک؛ و ۵- میزان فعالیت به ازای هر میلی‌گرم پروتئین غیر هموگلوبین است. از بین این‌ها، شاید روش دوم ازنظر مناسب بودن، کمترین امتیاز را داشته باشد. حجم هر یک از سلول‌ها، تقریباً به‌طورقطع، در اثر اسمز ناشی از روش‌های تفکیک و شستشو تغییر می‌کند و حجم سلول‌های فشرده‌شده، تحت تأثیر این امر و همچنین، شرایط سانتریفیوژ قرار دارد و انعکاسی از این موارد است. بیان فعالیت آنزیمی برحسب تعداد گلبول‌های قرمز (۱) زمانی قابل‌قبول است که یک شمارنده سلولی اتوماتیک و قابل‌اطمینان در دسترس باشد؛ رقیق کردن و شمارش دستی بسیار به طول می‌انجامد و با اشتباهات زیادی همراه است. هموگلوبین (۳) یک استاندارد غیرمنطقی است و استفاده گسترده آن در مطالعات مربوط به پستانداران، ممکن است برای سلول‌های متعارف قابل توجیه و تصدیق باشد، زیرا این سلول‌ها دارای

میزان هموگلوبین نسبتاً ثابتی هستند، اما از صحت این روش، در هنگامی‌که انواع مختلفی از آنمی (کم‌خونی) وجود دارد، نمی‌توان دفاع کرد. گلبول‌های قرمز ماهیان، در مرحله اولیه نمو خود، به داخل خون رها می‌شوند و تنها زمانی هموگلوبین در داخل آن‌ها تجمع می‌یابد که به مرحله بلوغ رسیده باشند. به‌علاوه، سلول‌های بالغ، برحسب دمای محیط و میزان دسترسی به اکسیژن، ازنظر میزان هموگلوبین سلولی با هم متفاوت هستند. میزان فعالیت آنزیمی نباید در ارتباط با واحد هموگلوبین بیان شود، زیرا هموگلوبین عمده‌ترین جزء گلبول‌های قرمز به‌حساب می‌آید. عین همین قضیه در مورداستفاده از میزان مواد جامد خشک (۴) نیز صادق است. پروتئین غیرهموگلوبینی (۵) احتمالاً معنی‌دارترین معرف و نکتهٔ قابل عطف و اشاره به‌حساب می‌آید، هرچند که این روش نیز نیاز به تحقیقات اضافه دارد.

ارزیابی ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز

گسترشی که برای آزمایش تفریقی گلبول‌های سفید تهیه می‌شود، برای ارزیابی ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز نیز مورداستفاده قرار می‌گیرد. در خون ماهیان، درجاتی ازپلی کروماتیا مشاهده می‌شود و غالباً، فعالیت‌های میتوژنیک را نیز در بین گلبول‌های قرمز خون اطرافی می‌توان دید. باوجوداین، مشاهده تعداد زیادی گلبول‌های قرمز نابالغ، نشان‌دهنده کم‌خونی جبران‌شونده است. حالت‌های غیرطبیعی هسته و وجود تعداد زیادی گلبول قرمز فاقد هسته در مسمومیت‌ها و سوءتغذیه (نظیر کمبود اسیدفولیک) دیده می‌شود که غالباً با تقسیم غیر میتوزی (آمیتوز) و همچنین، نامنظم بودن قطعات هسته در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده تفریقی همراه است.

در مارماهیانی که در خلیج‌های آلوده زندگی می‌کنند، قطعه‌قطعه شدن هسته گلبول‌های قرمز دیده می‌شود. عارضه (سندروم) کبدچرب در ماهی، به دلیل تغذیه با چربی‌های تندشده یا کمبود ویتامین E، منجر به افزایش قطعه‌قطعه شدن و شکستن گلبول‌های قرمز و همچنین، توقف بلوغ می‌شود. سپس وجود گلبول‌های قرمز در گسترش خون ماهی به همراه کم‌خونی، در اثر ازدیاد حساسیت، مشاهده می‌شود. ازدیاد حساسیت در خون ماهی دیده شده است، اما مکانیسم آن تا حدودی از مکانیسم واکنش‌های ازدیاد حساسیت پستانداران متفاوت است. ارزیابی دقیق ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز، در تشخیص بالینی بیماری‌ها می‌تواند مفید واقع شود.

شاخص‌های گلبولی وینتروب: شاخص‌های گلبولی وینتروب متوسط حجم گلبولی (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) نیز غالباً در خون‌شناسی مورداستفاده قرار می‌گیرند. این شاخص‌ها را توسط همان فرمول‌هایی که در مورد پستانداران استفاده می‌شود، تعیین می‌کنند. مفید بودن این شاخص‌ها، ارتباط مستقیمی با دقت اطلاعات مورداستفاده در محاسبات دارد.

ارزیابی کم‌خونی: با اســـتفاده از شـــاخص‌های وینتروب، می‌توان کم‌خونی در ماهی را به همان روشـی که در پستانداران استفاده می‌شود، طبقه‌بندی و ارزیابی کرد. این امر خصوصاً در مورد خون ماهی بسـیار مهم است، زیرا علائم بالینی کم‌خونی، غالباً تا مدت‌ها پس از بیماری‌زایی عامل بیماری پوشیده می‌ماند. برای مثال، قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند کاهش هماتوکریت را تا ۷۰٪ جبران کند و این در حالی است که میزان اکسیژن در تمام بافت‌ها را ثابت نگه می‌دارد. این کار با افزایش بازده قلب در اثر افزایش حجم ضـربه‌ای صـورت می‌گیرد؛ بنابراین، ماهی باکم‌خونی‌های مشـخص، علائم بالینی کمی نشان می‌دهد، مگر اینکه حیوان را وادار به فعالیت کنیم.

وجود تعـداد زیادی گلبول قرمز نابالغ یا پلی‌کزومازیای مشـــخص در گســـترش خون، نشـــانه کم‌خونی جبران شـونده اسـت. به‌رغم وجود تعداد زیادی اشـکال بلاسـتی (نابالغ)، MCV کمتر از اندازه طبیعی است. این امر درست برخلاف پستانداران است. در ماهیان، گلبول‌های قرمز جوان‌تر تا حدودی کوچکتر از گلبول‌های قرمز بالغ هسـتند (استوسکوف، ۱۹۹۳). کم‌خونی میکروسیتیک (با اندازه کوچک گلبول‌ها) در ماهی، شامل کم‌خونی‌های هموراژیک (همراه با خونریزی) و همولیتیک (همراه با شکستن و تجزیه گلبول‌ها) است. کم‌خونی هموراژیک، پس از تخم‌گیری از ماهیان مولدی که به‌زحمت جابه‌جا می‌شـوند و پس از دیگر اشـکال تروما (ضـربه و ضغطه) یا پس از جراحی روی می‌دهد. این حالت همچنین، در آلودگی‌های شدید بازالوها، لامپری‌ها یا پاروپایان مکنده خون دیده می‌شـــود. کم‌خونی میکروســـیتیک، همراه با افزایش پلی‌کرومازیا در ماهیان مبتلابه ســـپتی‌ســـمی (عفونـت خونی) هموراژیـک ویروســـی دیده می‌شـــود که در این حالت، یکپارچگی[1] عروق به هم می‌خورد و خون در اثر خونریزی تلف می‌شـــود. این حالت در اثر کمبود ویتامین K نیز در ماهی ایجاد می‌شـود(اسـتوسکوف، ۱۹۹۳). کم‌خونی همولیتیک در ماهی، در اثر تماس با همولیزین‌های (آنزیم‌های تجزیه‌کننده گلبول‌های قرمز) باکتریایی (گونه‌های ویبریو) مشـاهده می‌شـود. همچنین این حـالـت، در اثر عفونـت‌هـای شـــدیـد بـا تـک یـافتـه‌های خونی نظیر تریپانوزوما، کریپتوبیا یا هموگرگارینا دیده می‌شـود. عفونت‌های ویروسـی نظیر ویروس نکروز گلبول‌های قرمز، سبب تجزیه گلبول‌هـای قرمز و ایجاد کم‌خونی همولیتیک می‌شـــود. مســـمومیت‌ها نیز همولیز ایجاد می‌کنند. تمـاس بـاکلر، منجر بـه تخریـب دســـته‌جمعی گلبول‌های قرمز و ایجاد مت‌هموگلوبین می‌شـــود (اســـتوســـکوف، ۱۹۹۳). تشـکیل مت‌هموگلوبین همراه با تخریب گلبول‌های قرمز و یا بدون آن، در مسمومیت با نیتریت، آنیلین و نیترو بنزن دیده می‌شود. کم‌خونی میکروسیتیک و نورموکرومیک (با رنگ طبیعی)، در ارتباط با استرس ناشی از تراکم جمعیت نیز دیده می‌شود. کم‌خونی میکروسیتیک هیپوکرومیـک (با کاهش رنگ)، همراه با طویل شـــدن گلبول‌های قرمز، در ماهیان قزل‌آلایی که با

1. Integrity

جیره حاوی مخمر تغذیه کرده‌اند، دیده می‌شود و این حالت، ماحصل پراکسیدازی است که توسط مخمر تولید می‌شود. دیگر عوامل استرس‌زای اکسیداتیو نیز سبب کم‌خونی‌های مشخص در ماهی می‌شوند.

کم‌خونی‌های هیپوپلاستیک در ماهی، در اثر کمبود اسیدفولیک و ویتامین $B_{۱۲}$ ایجاد می‌شود. در کمبود اسیدفولیک، کم‌خونی به‌صورت نورموکرومیک و ماکروسیتیک است. کم‌خونی ناشی از کمبود $B_{۱۲}$ به‌صورت هیپوکرومیک دیده می‌شود. دیگر کم‌خونی‌های تغذیه‌ای به‌صورت تجربی، در اثر کمبود نیاسین، پیریدوکسین، اینوزیتول، ریبوفلاوین، ویتامین C و آهن ایجاد می‌شود.

دیگر آزمایش‌ها: آزمایش‌های متعدد دیگری در علوم آزمایشگاهی مربوط به پستانداران برای ارزیابی وضعیت گلبول‌های قرمز صورت می‌گیرد. میزان رسوب گلبول‌های قرمز (ESR)، آزمایش‌های مربوط به شکنندگی گلبول‌های قرمز در اثر فشار اسمزی و آزمایش‌های ایمنی‌شناسی متعددی مانند آزمایش کومبز در پستانداران، برای تشخیص بیماری مفید واقع می‌شوند. در خون‌شناسی ماهی، این روش‌ها به‌صورت گسترده مورداستفاده قرار نمی‌گیرند و اطلاعات اندکی در مورد ارزش تشخیصی آن‌ها وجود دارد.

گلبول‌های سفید

گلبول‌های سفید ازنظر شکل ظاهری و عملکرد، متنوع‌ترین عناصر خونی هستند و به سه گروه تقسیم می‌شوند، درحالی‌که گلبول‌های قرمز و ترومبوسیت‌ها اساساً منوتیپیک هستند. گلبول‌های سفید ماهی بر اساس شکل ظاهری و عملکرد، به ۵ زیرگروه مشخص تقسیم می‌شوند که هرکدام از آن‌ها را باید به‌طور جداگانه موردبررسی قرار داد.

شمارش گلبول‌های سفید

در مورد پستانداران، شمارش گلبول‌های سفید را می‌توان با محلول‌های رقیق‌کننده‌ای که سبب شکستن و تجزیه گلبول‌های قرمز می‌شوند، تسهیل کرد و این کار، امکان شمارش دقیق و صحیح آن‌ها را با استفاده از دستگاه‌های الکترونیکی فراهم می‌کند، اما این امر در مورد ماهیان امکان‌پذیر نیست، زیرا در خون آن‌ها، گلبول‌های قرمز نیز مانند گلبول‌های سفید، هسته‌دار هستند. باوجوداین، محلول‌های رقیق‌کننده متعددی برای کمک به شمارش گلبول‌های سفید تهیه‌شده‌اند که محلول شاو (shaw) از آن جمله است. این محلول خود شامل دو محلول است که در هنگام رقیق کردن نمونه باهم ترکیب می‌کنند محلول I (که باید قبل از مصرف، به‌صورت تازه تهیه شود) شامل: نوترال رد (قرمز خنثی) ۲۵ میلی‌گرم و نمک طعام ۰/۹ گرم در ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر است. محلول

شماره II نیز که باید هر هفته جایگزین شود، شامل کریستال ویوله (۱۲ میلی گرم) سیترات سدیم (۳/۸ گرم) و محلول فرمالدئید استاندارد (۰/۴ میلی‌لیتر) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است.

یک پی‌پت رقیق‌کننده ۱ به ۲۰ مورداستفاده قرار می‌گیرد. خون را تا علامت ۰/۵ بالا می‌کشند تا نیمی از حباب پی‌پت را پر کند. نمونه خون و محلول رقیق‌کننده را به‌ملایمت مخلوط می‌کنند. سپس پی‌پت توسط محلول شماره ۲ تا علامت ۱۰۱ پر می‌شود و آن را نیز کاملاً و به‌ملایمت مخلوط می‌کنند. بعد چند قطره را بیرون می‌ریزند تا مطمئن شوند که مایعات مخلوط‌نشده از ستون پی‌پت خارج‌شده است و سپس لام شمارش را به کمک خاصیت موئینه، با نمونه پر می‌کنند. گلبول‌های سفید را در چهار مربع بزرگی که در گوشه‌ها قرار دارند و هرکدام، شامل ۱۶ مربع کوچک هستند) شمارش می‌کنند. با ضرب کردن عدد حاصل در عدد ۵۰، میزان گلبول‌های سفید در هر میلی‌متر مکعب خون به دست می‌آید.

شمارش تفریقی گلبول‌های سفید

شمارش تفریقی گلبول‌های سفید، بیانگر درصد مشارکت هر نوع گلبول سفید به کل جمعیت آن‌هاست. شمارش تفریقی گلبول‌های سفید با مشکلاتی همراه است. شکنندگی ذاتی ترومبوسیت‌ها باعث به‌هم خوردن تناسب بین گلبول‌های سفید می‌شود. به‌علاوه، تشابه ترومبوسیت‌ها با لنفوسیت‌های کوچک نیز باعث بروز اشتباهاتی در محاسبه درصد هر یک از آن‌ها می‌شود. مشکل دیگری که وجود دارد، طبقه‌بندی انواع گلبول‌های سفید خون ماهی، به کمک فنون رنگ‌آمیزی است که اساساً برای گلبول‌های سفید خون پستانداران کاربرد دارند.

سه روش برای مطالعه گلبول‌های سفید ماهی به‌طور گسترده مورداستفاده قرارگرفته است که شامل موارد زیر است:

- روش رومانوفسکی: در این روش، لام‌های نازک خونی را توسط هوا خشک کرده و به مدت ۵ دقیقه در متانول تثبیت می‌کنند. سپس لام را به مدت دو دقیقه در رنگ لیشمان تجاری[1] قرار می‌دهند و به‌طور کامل توسط آب می‌شویند. بعد آن را به مدت ۱۰ دقیقه در محلول بافری گیمسای تجاری می‌گذارند. پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها را در محلول ۰/۱ مول فسفات بافر (با pH = ۶/۴) و سپس، آب مقطر شستشو می‌دهند و نهایتاً، توسط هوا خشک می‌کنند (استوسکوف، ۱۹۹۳).

۱- طرز تهیه رنگ لیشمان به این صوت است که ۱/۵ گرم رنگ لیشمان را در یک لیتر متانول خالص حل می‌کنند و به این ترتیب، محلول آماده تهیه می‌شود.

- روش سودان بلاک B: در این روش، لام‌های نازک خونی را توسط هوا خشک کرده، به مدت ۵ ثانیه در یک محلول تثبیت‌کننده که حاوی فرمالین (۱۰ میلی‌لیتر) و اتانول (۹۰ میلی‌لیتر) است، قرار می‌دهند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه توسط آب جاری می‌شویند و توسط هوا خشک می‌کنند. بعد لام‌ها را به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در دمای اتاق، در داخل رنگ سودان- بلاک B می‌گذارند؛ با اتانول ۷۰٪ شستشو می‌دهند و به‌آرامی با رنگ گیمسای بافری تجاری (همانند رنگ‌آمیزی رومانوفسکی) مجدداً رنگ‌آمیزی می‌کنند. طرز تهیه رنگ سودان پلاک B به‌این‌ترتیب است که ۷ گرم از این رنگ را در ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰٪ حل می‌کنند.
- فسفولیپیدها، چربی‌های خنثی، استرول‌ها و دیگر مواد چرب توسط رنگ سودان بلاک B رنگ‌آمیزی می‌شوند. سلول‌های گرانولوسیتی (دانه‌دار) نابالغ، غالباً خاصیت سودانوفیلی موضعی ضعیفی از خود نشان می‌دهند. در سلول‌های بالغ‌تر، رنگ‌آمیزی شدید موضعی یا سراسری دیده می‌شود و این امر ممکن است باعث تیره و مبهم شدن دیگر جزئیات سیتوپلاسمی شود. در سلول‌های لنفوئید، خصوصاً مونوسیت‌ها، گاهی اوقات گرانول‌های (دانه‌های) کوچک سیتوپلاسمی یا هسته‌ای که خاصیت سودانوفیلیک ضعیف دارند، دیده می‌شود. باوجوداین، آن‌ها معمولاً نسبت به این رنگ خاصیت انکساری[1] دارند (استوسکوف، ۱۹۹۳).
- روش اسید شیف پریودیک (PAS): این روش خصوصاً برای کشف اندامچه‌ها و اجزای حاوی گلسیرول حساس است . لام مربوطه را پس از تهیه به‌صورت تازه، توسط هوا خشک می‌کنند و لام نازک حاصله را در محلول فرمالین- اتانول (به مدت ۱۰ دقیقه) تثبیت می‌کنند و به مدت ۱۰ دقیقه نیز با آب جاری شستشو می‌دهند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اسید پریودیک تجاری نگه می‌دارند. بعد لام مذکور را توسط آب شیر می‌شویند و آن را به مدت ۲۰ دقیقه در معرف شیف تجاری قرار می‌دهند. پس از شستشو، لام را به آهستگی با هماتوکسیلین تجاری، دوباره رنگ می‌کنند و پس از شستشو و خشک‌کردن (در هوا) مونته می‌کنند.

رنگ‌آمیزی PAS مثبت، به‌صورت فوشین غنی‌شده دیده می‌شود. سلول‌های گرانولوسیتی (دارای دانه‌های سیتوپلاسمی) پاسخ‌های متغیری نشان می‌دهند. در هتروفیل‌های بالغ، معمولاً مقادیر زیادی رنگ، هم به‌صورت منتشر و هم موضعی دیده می‌شود. گاهی اوقات در لنفوسیت‌ها نیز، تکه‌ها[2] یا دانه‌های کوچک PAS مثبت دیده می‌شود. ترومبوسیت‌ها نیز ممکن است دارای

1. Refractory
2. Patches

سیتوپلاسم صورتی‌رنگی باشند که به‌طور ضعیف PAS مثبت است. برعکس، گلبول‌های قرمز و مراحل رشد سلول‌های دانه‌دار و بدون‌دانه هر دو منفی هستند.

هتروفیل‌ها

معمولاً هتروفیل‌های ماهی سلول‌های گردی هستند که دارای هسته چندقطعه‌ای بوده و در گسترش‌های حاصل از خون اطرافی که توسط رنگ گیمسا- رایت رنگ‌آمیزی می‌شود، دارای اجسام سیتوپلاسمی دوکی یا میله‌ای شکل هستند. این سلول‌ها در یک گونه ماهی معین، ظاهراً اندازه نسبتاً یکسانی دارند و معمولاً مدورند. یک سلول هتروفیل مشخص ۱۰-۱۵ میکرومتر قطر دارد و نسبت هسته به سیتوپلاسم آن نسبتاً کم است (تقریباً ۱ به ۳ تا ۱ به ۲). هسته در وضعیت دور از مرکز قرار دارد و در مقطع عرضی به شکل کروی تا بیضی یا مشخصاً دو قطعه‌ای دیده می‌شود. سلول‌هایی که هنوز بالغ نشده‌اند، هسته‌های کروی یا دوقطعه‌ای (کلیه‌ای شکل) دارند. هسته‌های هیپرسگمانته با ۵ قطعه یا بیشتر، به‌ندرت در ماهیان دیده می‌شود. هیچ هستکی در هسته مشاهده نشده است و یا تعداد هستک‌های گزارش شده کم است. سیتوپلاسم هتروفیل‌ها با رنگ‌آمیزی رومانوفسکی به رنگ صورتی یا آبی خاکستری به نظر می‌رسد و در داخل آن‌ها، دانه‌های کوچک متعددی وجود دارد. معمولاً این دانه‌ها میله‌ای شکل هستند و به رنگ خاکستری یا آبی کم‌رنگ تا قرمز کم‌رنگ دیده می‌شوند و غالباً به‌طور مشخص ائوزنیوفیلیک هستند و باعث تیرگی و محو شدن جزئیات داخلی هسته می‌شوند. همین خاطر به آن‌ها به‌جای نوتروفیل، هتروفیل گفته می‌شود. هرچند که با نوتروفیل‌های پستانداران آنالوگ (مشابه) هستند. در داخل این دانه‌ها، گرانول‌های (دانه‌های) گلیکوژن وجود دارد (استوسکوف، ۱۹۹۳) .

معمولاً دانه‌های هتروفیلیک پراکسیداز مثبت هستند و در ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای، ماکرل اسپانیایی و پلیس، نسبت به رنگ سودان بلاک B و اسید شیف پریودیک (PAS) پاسخ مثبت می‌دهند (کامپل ۱۹۸۸ ؛ الیس ۱۹۷۷). هتروفیل‌های ماهی پلیس به واکنش فسفاتاز اسیدی و قلیایی نیز پاسخ مثبت می‌دهند (استوسکوف، ۱۹۹۳).

بر اساس مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، دو نوع دانه هتروفیلیک در ماهی توصیف‌شده است که شامل دانه‌های همگن (هموژنوس) کوچک و دانه‌های بیضی بزرگ با کریستالوئیدهای محوری است.

هتروفیل‌های ماهی از بعضی جهات با نوتروفیل‌های پستانداران متفاوت هستند. اگرچه هسته هتروفیل‌های ماهی ممکن است دندانه‌دار یا دو قطعه‌ای باشد، اما در دسته‌بندی پلی‌مورفوموکلئار (هسته چندقطعه‌ای) که ویژگی نوتروفیل‌های پستانداران است، قرار نمی‌گیرند. بیش از ۵ نوع دانه

سیتوپلاسمی ممکن است در نوتروفیل پستانداران یافت شود، درحالی‌که مطالعات انجام‌شده با میکروسکوپ نوری و الکترونی، تنها یک یا دو نوع از این دانه‌ها را در ماهیان نشان داده است.

نوتروفیل‌های پستانداران دارای ماهیت میلوئید هستند و از مغز استخوان نشأت می‌گیرند، درحالی‌که در ماهیان استخوانی، کلیه مهم‌ترین منبع تولید هتروفیل‌هاست و طحال نقش کمتری در این زمینه دارد. به نظر می‌رسد که در کوسه‌ها، بخش عمده تولید هتروفیل‌ها در بافت‌های لنفوئید مری (احتمالاً اندام لیدیگ) صورت می‌گیرد.

فعالیت هتروفیل‌های ماهی وظایف آن‌ها، هنوز موضوع مطالعات محققان است. برای مثال، ماهیت بیگانه‌خواری آن‌ها هنوز جای سؤال است. در گزارش‌های مختلف، مهاجرت هتروفیل‌ها به محل جراحات ناشی از عفونت‌های باکتریایی، محل فعالیت انگل‌ها و جراحات مکانیکی توصیف‌شده است. مطالعات انجام‌شده بر روی فعالیت هتروفیل‌ها در عفونت‌های باکتریایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی طلایی نشان داده است که آن‌ها پاسخ بیگانه‌خواری شدیدی نشان می‌دهند. همچنین، هتروفیل‌های ماهی طلایی، خاصیت بیگانه‌خواری شدیدی نسبت به توریوم دی‌اکسید (توروتراست) که یک ماده حاجب رادیوگرافیک است، نشان می‌دهند. در آزمایش‌های انجام‌شده، کموتاکسی (تمایل به سمت مواد شیمیایی) نیز در هتروفیل‌های ماهی به‌خوبی مشاهده نشده است. باوجوداین، این سلول‌ها در ابتدای پاسخ آماسی، به داخل بافت آسیب‌دیده نفوذ می‌کنند و مشاهدات نشان داده است که محرک‌های کموتاکسیک در این امر دخیل هستند.

نوسان تعداد هتروفیل‌ها در خون ماهی کاملاً وسیع است، اما این سلول‌ها در گردش خون محیطی، گلبول‌های سفید غالب به‌حساب نمی‌آیند (برخلاف پستانداران که در آن‌ها تعداد نوتروفیل‌ها ۶۵٪ جمعیت گلبول‌های سفید را تشکیل می‌دهند (در ماهیان تعداد نوتروفیل‌ها را بین ۲ تا ۲۵٪ گزارش کرده‌اند).

بیماری‌های عفونی و شرایط استرس‌زا باعث افزایش تعداد هتروفیل‌ها در خون ماهی می‌شوند. افزایش هتروفیل‌ها در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و تک‌یاخته‌ای ماهیان سریع صورت می‌گیرد (طی ۲۴ ساعت) و به نظر می‌رسد که مستقل از درجه حرارت عمل می‌کنند. افزایش هتروفیل‌های جوان که به آن انحراف به چپ آرنت اسکال (انحراف شیلینگ) گفته می‌شود، در پاسخ به تورم‌های حاد روی می‌دهد. در بیماری‌های مزمن با دوره طولانی نیز تعداد سلول‌های هتروفیل با هسته‌های هایپرسگمانته (چند قطعه‌ای) افزایش می‌یابد که به آن، انحراف به راست می‌گویند.

در ماهیان، افزایش هتروفیل‌ها (هتروفیلی) غالباً با کاهش لنفوسیتها (لنفوپنی) همراه است. افزایش هتروفیل‌ها، خصوصاً در پاسخ به استرس‌ها، ازجمله شوک سرما، یا پاسخ به تزریق کورتیزون یا آدرنوکورتیکوتروپیک هورمون (ACTH) روی می‌دهد.

ائوزینوفیل‌ها

ائوزینوفیل‌های ماهی، همانداره هتروفیل‌ها بوده و یا اندکی کوچکتر از آن‌ها هستند. قطر این سلول‌ها ۱۰ تا ۱۵ میکرومتر بوده و مدور هستند. هسته ائوزینوفیل‌ها دوقطعه‌ای بوده و تعداد زیادی دانه‌های بزرگ (۰/۵ تا ۱ میکرومتر) به شکل دایره‌ای یا بیضی و با محدوده غشایی، در سیتوپلاسم آن‌ها دیده می‌شود. این دانه‌ها با رنگ‌آمیزی رومانوفسکی، دومینیکی‌تری اسید و ائوزین، به رنگ قرمز دیده می‌شوند. ساختار ظریف آن‌ها، شامل یک ناحیه قشری یکنواخت خارجی و یک ناحیه کریستالوئید محوری داخلی است.

ائوزینوفیل‌ها در ماهیان، اساساً بر پایه خواص رنگ‌آمیزی دانه‌های سیتوپلاسمی خود شناسایی می‌شوند و درنتیجه، آن‌ها را با هتروفیل‌ها و مست‌سل‌ها اشتباه می‌گیرند، اما مدور بودن دانه‌های مذکور از دانه‌های میله‌ای شکل هتروفیل‌ها قابل‌تفکیک است و می‌توان به‌عنوان یک ویژگی تشخیصی مناسب از آن‌ها استفاده کرد. همچنین، عنوان شده است که تعداد قطعات هسته ائوزینوفیل‌های ماهی کمتر ازهتروفیل‌هاست، هرچند که ممکن است هسته، همانند هتروفیل‌ها توسط دانه‌های سیتوپلاسمی بزرگ و فراوان فوق‌الذکر پوشیده شده باشند. ائوزینوفیل‌ها در ردیف‌های گرانولوسیتی، مشابه هتروفیل‌ها تولید می‌شوند. این سلول‌ها در مرحله پروگرانولوسیت قابل‌تفکیک هستند و در واکنش‌های ازدیاد حساسیت دخالت دارند و اگرچه تعداد آن‌ها از بازو فیل‌ها بیشتر است، اما بااین‌حال، نسبتاً نادر هستند. تعداد ائوزینوفیل‌ها در گونه‌هایی که مورد آزمایش قرارگرفته‌اند، تنها ۲ تا ۳٪ گلبول‌های سفید طبیعی را تشکیل می‌دهد. گاهی اوقات نیز تعداد آن‌ها را بیش از ۱۰٪ گزارش کرده‌اند.

ائوزینوفیل‌ها می‌توانند باکتری‌ها و دیگر مواد خارجی را مورد بیگانه‌خواری قرار دهند، اما احتمالاً کارایی هتروفیل‌ها را ندارند. به‌احتمال‌زیاد، ائوزینوفیل‌ها در کنترل عفونت‌های ناشی از انگل‌های پریاخته نقش دارند و در ایجاد پاسخ‌های ایمنی در مقابل آنتی‌ژن‌های گوناگون دخالت می‌کنند.

ازآنجاکه ائوزینوفیل‌ها واجد تعداد زیادی میتوکندری بزرگ هستند و عمل بیگانه‌خواری را انجام می‌دهند، لذا این فرضیه که برای آن‌ها، راه گلیکولیز بی‌هوازی - شانت هگزوزمنوفسفات — حائز اهمیت است، منطقی به نظر می‌رسد. دانه‌های سیتوپلاسمی این سلول‌ها به‌خوبی موردمطالعه قرار نگرفته‌اند.

بازوفیل‌ها

بازوفیل‌های ماهی به‌خوبی موردمطالعه قرار نگرفته‌اند. این سلول، یک گرانولوسیت (سلول دانه‌دار سیتوپلاسمی) است و مشخصاً از همان ردیف سلول‌های پیشتازی که هتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها را

ایجاد می‌کنند، به وجود می‌آید. سلول مذکور در گسترش خونی که با رنگ‌آمیزی رومانوفسکی رنگ‌شده است و زیر نور میکروسکوپ نوری به کمک وجود دانه‌های سیتوپلاسمی متعدد که شدیداً بازوفیلیک هستند و قطر آن‌ها تقریباً ۰/۸ میکرون است و همچنین، نامشخص‌بودن ساختارهای داخلی، مشخص می‌شود. شکل این دانه‌ها مدور به نظر می‌رسد و غالباً، تعداد آن‌ها از اجسام سیتوپلاسمی هتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها کمتر است. در ماهی ماکرل اسپانیایی، این دانه‌های بازوفیلیک، PAS مثبت هستند.

هسته سلول، بازوفیلیک، دور از مرکز و غالباً لوبوله (چندقطعه‌ای) است، اما غالباً به گستردگی هسته هتروفیل‌ها نمی‌رسد. کروماتین هسته، همگن (هموژنوس) است.

از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی، اجسام سیتوپلاسمی بازوفیل‌ها، به‌صورت تخم‌مرغی شکل و بزرگ، نواحی تراکم الکترونی دیده می‌شود که توسط غشایی، پوشیده شده و در ناحیه شبکه آندوپلاسمیک دانه‌دار قرارگرفته است. این سلول‌ها حاوی هیستامین هستند و در تورم‌های حاد و واکنش‌های ازدیاد حساسیت، به‌عنوان سلول‌های هدف (تارگت‌سل) به‌حساب می‌آیند. تعداد بازوفیل‌ها در گونه‌های مختلف ماهی متفاوت است و این سؤال مطرح است که آیا آن‌ها در تمام گونه‌ها وجود دارند یا خیر؟ اما باوجوداین، آن‌ها را از گونه‌های زیادی از ماهیان گزارش کرده‌اند. در بعضی از مطالعات، تعداد بازوفیل‌ها در ماهی کپور زیاد گزارش شده است، اما آن‌ها به‌ندرت بیش از ۱٪ کل جمعیت گلبول‌های سفید را تشکیل می‌دهند.

وظیفه بازوفیل‌ها مشخص نشده است. این سلول‌ها شبیه مست‌سل‌ها هستند، اما ارتباط آن‌ها با یکدیگر مشخص نیست. بازوفیل‌ها توسط هورمون‌های غده فوق کلیه تحت تأثیر قرار می‌گیرند و در وضعیت‌های آلرژیک و استرس دیده می‌شوند (استوسکوف، ۱۹۹۳).

مونوسیت‌ها

در خون بسیاری از ماهیان، تمایز ریخت‌شناسی مشخص بین ردیف‌های لنفوسیتی و مونوسیت‌ها وجود ندارد. این تفکیک معمولاً بر اساس اندازه و منظم بودن هسته قرار دارد. مونوسیت‌های ماهی نسبتاً بزرگ هستند (۵-۱۰ × ۱۴-۱۶ میکرومتر) اما وفور آن‌ها نسبت به مونوسیت‌های پستانداران بسیار کمتر است و در حدود ۰/۱٪ کل جمعیت گلبول‌های سفید را به خود اختصاص می‌دهند. سیتوپلاسم مونوسیت‌ها بیشتر از لنفوسیت‌های بزرگ است و غالباً، اما نه همیشه، شکل هسته آن‌ها نامنظم‌تر است. معمولاً این هسته خارج از مرکز بوده و شکل آن در مقطع عرضی، از بیضی تا دندانه‌دار و یا به شکل مغز متغیر است. مطالعات میکروسکوپ الکترونی، وجود کروماتین هسته متراکم را که به‌صورت قطعه‌قطعه در داخل کروماتین اطرافی محیطی قرارگرفته‌اند، نشان می‌دهد و یک هستک منفرد نیز در بعضی از این‌گونه‌ها گزارش شده است. هسته یک مونوسیت کمتر از نصف

حجم سلول را اشغال می‌کند و کروماتین دانه‌دار زمختی دارد کروماتین متراکم هسته لنفوسیت‌ها در اطراف هسته به‌صورت دستجاتی مشاهده می‌شود، ولی در مونوسیت‌ها این وضعیت وجود ندارد.

سیتوپلاسم مونوسیت‌ها سبز متمایل به آبی، آبی تا آبی خاکستری دیده می‌شود و ظاهر انباشته[1] دارد و ممکن است واکوئوله به نظر برسد. علاوه براین، میتوکندری‌ها و لیزوزوم‌های زیاد ومقدای توری آندو پلاسمیک نیز به‌طور مشخص مشاهده می‌شود. گاهی اوقات نیز ممکن است رازهایی در سیتوپلاسم وجود داشته باشد که PAS و اسید فسفاتاز مثبت هستند. در مواردی نیز پاهای کاذب دیده می‌شود.

مونوسیت‌های ماهی تنها در خون و کلبه قدامی به تعداد زیاد دیده می‌شوند و از سلول‌های بنیادی کلیه قدامی به وجود می‌آیند. این سلول‌ها خاصیت بیگانه‌خواری دارند و کربن کلوئیدی را جذب می‌کنند گاهی اوقات واژه مونوسیت / ماکروفاژ برای مونوسیت‌ها ماهی مورداستفاده قرار می‌گیرد زیرا غالباً سلول‌های که شبیه اشکال انتقالی هستند، در خون اطرافی ماهی دیده می‌شوند. استعمال این واژه باعث بروز اشتباهاتی می‌شود و به سردرگمی افرادی می‌افزاید لذا توصیه می‌شود که واژه مونوست برای سلول‌های موجود در گردش خون و ماکروفاژ برای سلول‌های تمایز یافته‌ای که در بافت‌های همبند وجود دارند، استفاده شد (ماکروفاژها را می‌توان از طریق سیتوپلاسم باروفیلی و رنگ واکوئول‌های هتروفاژیکشان نیز تشخیص داد).

لنفوسیت‌ها

لنفوسیت‌ها به‌طور مشخص، در گردش لنفاتیک طحال با نواحی لمفوئید گسترده و ناحیه پرونفریک کلیه یافت می‌شوند. این سلول‌ها فراوان‌ترین گلبول‌های سفید در خون اطرافی ماهیان هستند. لنفوسیت‌ها، سلول‌هایی تک‌هسته‌ای گرد یا گاهی اوقات اندکی دانه‌دار بوده و به لنفوسیت‌های دیگر مهره‌داران شباهت دارند. در این سلول‌ها نسبت هسته به سیتوپلاسم زیاد است و معمولاً در یک نمونه خون، طرح کروماتین هسته آن‌ها از هسته ترومبوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و بلاست‌سل‌ها قابل‌تشخیص است. معمولاً لنفوسیت‌ها را برحسب اندازه آن‌ها، به دو یا سه گروه تقسیم می‌کنند (استوسکوف، ۱۹۹۳):

لنفوسیت‌های کوچک: در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده به‌صورت مدور دیده می‌شوند و سیتوپلاسم آن‌ها به رنگ آبی کم‌رنگ تا کمی تیره است. اندازه‌این سلول‌ها نصف یا یک سوم گلبول‌های قرمز است و آن‌ها را باید در بعضی از گونه‌های ماهیان از ترومبوسیت‌ها تفکیک کرد. معمولاً لنفوسیت‌ها کوچک، اندکی بزرگتر از ترومبوسیت‌ها هستند. لنفوسیت‌ها معمولاً مدور و

1. Flocculent

دارای دانه‌های آزوروفیلیک هستند که ممکن است با دانه‌های ترومبوسیت‌ها اشتباه شوند. در چنین مواقعی دانه‌های مشابه در سیتوپلاسم لنفوسیت‌های بزرگتر به حل این مشکل کمک می‌کند. همچنین، لنفوسیت‌های کوچک را می‌توان بر اساس رنگ آبی آسمانی یا آبی تیره سیتوپلاسم و پاهای کاذب از ترومبوسیت‌های گرد تفکیک کرد.

لنفوسیت‌های متوسط: اندازه آن‌ها، حد واسط لنفوسیت‌های کوچک و بزرگ است و مقدار سیتوپلاسم آن‌ها اندکی افزایش نشان می‌دهد و ممکن است حباب‌هایی به سمت خارج، به‌طرف غشای سلول مشاهده شود. از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی، این سلول‌ها حاوی میتوکندری بیشتری هستند و دانه‌های آزوروفیلیک کوچک نیز در آن‌ها دیده می‌شود. کروماتین هسته‌این سلول‌ها، نسبت به لنفوسیت‌های کوچک، بازتر است.

لنفوسیت‌های بزرگ: اندازه‌این سلول‌ها، به‌اندازه مونوسیت‌ها و بلاست‌سل‌ها نزدیک می‌شود، اما به‌ندرت به آن اندازه می‌رسد. هسته‌این سلول‌ها، منظم‌تر از مونوسیت‌هاست و طرح و مدل کروماتین آن‌ها در نمونه‌های موجود از مونوسیت‌ها قابل تمایز است. این سلول‌ها که لنفوسیت‌های جوان به‌حساب می‌آیند، سیتوپلاسم بیشتری نسبت به لنفوسیت‌های بالغ کوچک‌تر دارند و سیتوپلاسم آن‌ها واحد میتوکندری فراوان‌تری است.

تعداد لنفوسیت‌های جریان خون، تحت تأثیر بیماری‌ها و شرایط فیزیولوژیک قرار دارد. ماهیانی که دچار بیماری‌های عفونی یا استرس هستند، ممکن است تعداد لنفوسیت‌های آن‌ها کم باشد و در بیماری‌های سپتی سمیک (همراه با عفونت خونی) باکتریایی، لنفوپنی به همراه هتروفیلی به‌طور متداول دیده می‌شود. تزریق کورتیزول یا دگزامتازون به ماهی آزاد، باعث کاهش تعداد لنفوسیت‌های جریان خون می‌شود. لنفوپنی در واکنش به استرس در ماهی به‌خوبی مشخص‌شده است.

لنفوسیت‌های ماهی سلول‌هایی هستند که مکانیسم‌های ایمنی خاصی را انجام می‌دهند، اما خاصیت بیگانه‌خواری را در این سلول‌ها تأیید نکرد. وی توانست محل ایمونوگلوبولین‌های سطحی را با استفاده از روش‌های ایمونوفلورسنت در خون ماهی پهن (دیس) و لنفوسیت‌های بافتی این ماهی نشان دهد.

پلاسماسل‌ها

پلاسماسل‌هایی مشابه آنچه در پستانداران دیده می‌شود، در ماهی نیز وجود دارد و گاهی اوقات در خون اطرافی می‌توان آن‌ها را مشاهده کرد. ویژگی این سلول‌ها، داشتن هسته‌ای است که دور از مرکز قرار دارد و به‌شدت رنگ می‌گیرد. کروماتین هسته حالت چرخ درشکه‌ای داشته و غالباً

هســتک‌هایی در آن دیده می‌شود. منطقه دستگاه گلژی به‌صورت یک هاله اطراف هسته‌ای کمرنگ در سیتوپلاسم آبی پررنگ قابل تمایز است.

ترومبوسیت‌ها

ترومبوسیت‌های ماهی، سلول‌های کوچک، دوکی‌شکل یا بیضی طویل هستند که هسته‌ای متراکم، منفرد، گرد تا بیضــی‌شــکل و ســیتوپلاسم اندک دارند که با رنگ‌آمیزی رومانوفسکی به رنگ آبی تا آبی خاکســتری دیده می‌شــود. دانه‌های ســیتوپلاســمی غالباوجود دارند و به رنگ بازوفیلی شدید یا ائوزینوفیلی ملایم دیده می‌شوند. این دانه‌ها همیشه وجود ندارند (استوسکوف، ۱۹۹۳) .

ترومبوســـیت‌ها به رنگ‌آمیزی ســـودان بلک B و بنزیدین پراکســـیداز پاســـخ مثبت می‌دهند. ترومبوســیت‌های ماهی از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی، با داشتن کروماتین پره‌ای[1] و وزیکول‌های ســیوپلاسمی متعدد، مشابه سازگان اتصال سطحی پلاکت‌های پستانداران، از لنفوسیت‌های کوچک متمایز می‌شــوند. به‌علاوه، ترومبوســیتهای کلاســیک، شــکل طویل مشــخصــی دارند. ســیتوپلاســم ترومبوســیت‌ها در خلال تشــکیل لخته گســترده می‌شــود و رشــته‌های طویلی ایجاد می‌کند که به رشته‌های سلول‌های مجاور اتصال یافته و شبکه توری را به وجود می‌آورد. این چارچوب، سلول‌های دیگر و ترشــحات را به دام می‌اندازد و لخته را ایجاد می‌کند. ترومبوســیت‌ها ازنظر شــکل به دو نوع تقســیم می‌شــوند. اشــکالی که کوچکتر هســتند و شــکلشان گرد یا بیضی است، نشان‌دهنده مرحله نسبتاً جوان سلول هستند. این نوع سلول‌ها، معمولاً دارای یک هسته به رنگ ارغوانی شدید هستند و ســیتوپلاسم آن‌ها دارای محتویات نسبتاً کم و حاشیه صورتی‌رنگ است و این سلول‌ها هستند که با لنفوسیت‌های کوچک اشتباه می‌شوند. ترومبوسیت‌های نوع دوم، ترومبوسیت‌های بالغ یا مشخص هســتند که بســیار درازتر بوده (حد ۵×۱۵ میکرومتر) و غالباً آن‌ها را به‌عنوان سلول‌های دوکی یا قطره اشــکی شــکل توصــیف می‌کنند. ســیتوپلاســم آن‌ها آبی روشــن یا کم‌رنگ بوده و دانه‌های سیتوپلاسمی آن‌ها آزوروفیلیک است.

تجویز کورتیزول یا دگزا متازون باعث افزایش زمان انعقاد خون ماهی می‌شود و این امر از طریق کاهش تعداد ترومبوسیت‌ها صورت می‌گیرد.

شیمی سرم

مطالعات شیمی خون ماهیان سالم، نسبتاً کم است و مطالعه در مورد ماهیانی که بیماری‌های خاص دارند، تقریباً وجود ندارد. این امر تعبیر و تفســیر شــیمی ســرم خون بیماران بالینی را بسیار مشکل

1. Ribbed

می‌کند. کارهای بسیار زیادی در زمینه تعیین و تثبیت پارامترهای پایه و همچنین، مطالعات کوهورت (آینده‌نگر) در بیماری‌های مشخص لازم است. همانند دیگر فعالیت‌های دامپزشکی، روش‌های مورداستفاده برای به دست آوردن نمونه و نقل‌وانتقال آن‌ها، اهمیت زیادی در زمینه قابلیت اطمینان به اطلاعات به‌دست‌آمده از آزمایش نمونه‌ها دارد. نمونه سرم برای آزمایش شیمیایی خون ارجح‌تر است، اما غالباً پلاسما استفاده می‌شود، زیرا به دست آوردن دو نمونه از یک بیمار مشکل است. میزان پلاسمایی که از یک نمونه تهیه می‌شود، بیش از سرم است. اگر پلاسما استفاده می‌شود، لازم است که در هنگام تعبیر و تفسیر نتایج، ماده ضد انعقادی را که استفاده‌شده است، مدنظر قرار داد. نمک‌های سدیم یا پتاسیم EDTA یا هپارین، مشخصاً میزان سدیم یا پتاسیم سرم را تحت تأثیر قرار خواهد داد. در مواقعی که از EDTA استفاده می‌شود، اتصال EDTA با کلسیم، قرائت میزان کلسیم سرم را تغییر می‌دهد. هنگامی‌که نمونه‌های پلاسما برای انجام آزمایش‌های مربوط به فعالیت‌های آنزیمی و الکترولیت‌ها گرفته می‌شود، نمک‌های آمونیوم یا لیتیم هپارین، مواد ضد انعقاد انتخابی به‌حساب می‌آیند.

تعیین گلوکز خون، همانند نمونه‌های پستانداران، هنگامی‌که بر روی سرم جداشده از عناصر سلولی، مدت کوتاهی پس از نمونه‌گیری آزمایش شود، بسیار مفید است. اگر بیش از ۳۰ دقیقه تا یک ساعت زمان لازم است تا نمونه‌های خون کامل اخذ و برای بررسی به آزمایشگاه ارسال شود، لازم است که از ماده ضد انعقاد فلوراید استفاده شود تا گلیکولیز در نمونه خون کامل کاهش یابد. متأسفانه فلوراید نه‌تنها مانع از گلیکولیز می‌شود، بلکه مانع از انجام دیگر روندهای آنزیمی در سرم و همچنین، در معرف‌های مورداستفاده برای آزمایش اتوماتیک سرم می‌شود. این ماده تنها هنگامی باید استفاده شود که اختصاصاً محقق تمایل دارد که گلوکز را تعیین کند و امکان انجام آزمایش سریع عملی نیست.

نقل‌وانتقال نادرست نمونه، اولین عامل ارزیابی ناصحیح شیمی سرم است. باید در عرض یک ساعت پس از نمونه‌گیری، آزمایش انجام شود. تشکیل لخته در دمای اتاق، نیاز به ۱۵ تا ۳۰ دقیقه زمان دارد. در این زمان، لخته را می‌توان کنار زد و نمونه به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با نیروی نسبی ۱۰۰۰ (rpm ۳۰۰۰ در یک دستگاه به شعاع ۱۰cm) سانتریفیوژ می‌شود. بهترین حالت، زمانی است که سرم توسط ابزار جداکننده سرم به دست آید. این امر نیازمند آن است که نیروی سانتریفیوژ نسبی بیشتری استفاده شود تا مؤثر واقع شود. همولیز عامل مهمی در جهت ایجاد اشتباه در آزمایش شیمی سرم است. همولیز باعث افزایش میزان لاکتات دهیدروژناز سرم (LDH)، آسپاتات آمینوترانسفراز (AST) (قبلاً SGOT می‌نامیدند) و میزان پتاسیم در نمونه‌های خون بسیاری از گونه‌های ماهیان می‌شود. اگر میزان همولیز به حدی باشد که باعث ایجاد تداخل در امر اندازه‌گیری کولوریمتری شود، دیگر مقادیر به‌دست‌آمده از دستگاه‌های اتوماتیک نیز نادرست خواهد

شد. همولیز را در بسیاری از موارد می‌توان به حداقل رساند و برای این کار باید از تماس نمونه خون با رطوبت یا آب جلوگیری کرد؛ نمونه را به‌دقت انتقال داد و نباید خون را به‌سرعت از سوزن تخلیه کرد. لوله‌های حاوی خون را باید به‌دقت حمل‌ونقل کرد. از تکان دادن شدید آن‌ها اجتناب ورزید و همچنین، از برداشتن لخته به‌صورت شدید یا سانتریفیوژ زیاد خودداری کرد (استوسکوف، ۱۹۹۳) .

مواد زائد نیتروژنی

نیتروژن اوره خون: ارزیابی ترکیبات نیتروژنی در سرم ماهی، خصوصاً پیچیده است، زیرا لازم می‌شود که گونه‌های ماهیان آب شیرین و شور و همچنین، ماهیان بسیار اختصاصی را از یکدیگر تفکیک کنیم. به نظر می‌رسد که به‌استثنای ماهیان الاسموبرانش (کوسه‌ها وسپرماهیان)، سلاکانت و ماهیان شش‌دار، دو آنزیم اولیه سیکل اوره، کاربامویل‌فسفات‌سنتتاز و اورنیتین‌ترانس‌کاربامویلاز در ماهیان وجود نداشته باشد. باوجوداین، به نظر می‌رسد که در همه ماهیان، اوره از ترکیبات آندوژن و اگزوژن آرژینین، نوکلئوتیدهای پورین و اسیدهای آمینه پیش‌ساز پورین، گلوتامین، سرین وگلیسین ایجاد می‌شود و در اینجا، آمونیاکی که از طریق چرخه کربس - هنسلیت ایجاد می‌شود، به اوره تبدیل نمی‌شود. در ماهیان، بیشتر اوره در کبد تولید می‌شود، اما اوره به‌سرعت از طریق بسیاری از غشاهای داخلی عبور می‌کند و درنتیجه، می‌توان آن را در تمام بافت‌ها یافت. اوره به مقدار کم، در ارتباط با ترشح نیتروژن توتال (کل) ترشح می‌شود که عمدتاً از طریق آبشش صورت می‌گیرد. بر همین اساس در ماهیان استخوانی، وجود مقدار زیادی نیتروژن اوره در خون (BUN)، اساس شاخصی برای بیماری کلیه نیست، اما به‌احتمال‌زیاد با بیماری آبشش یا کلیه در ارتباط است. باوجوداین، تفاوت‌های گونه‌ای وجود دارد. به نظر می‌رسد که در بسیاری از ماهیان سالم آب شیرین، میزان BUN کم است و در حول‌وحوش ۱۰ میلی‌گرم در دسی لیتر قرار دارد، درصورتی‌که در ماهیان استخوانی دریایی به‌طور متعارف، حدود ۵ میلی‌گرم در دسی لیتر است. در ماهیان استخوانی، افت میزان BUN، می‌تواند انعکاسی از بیماری کبد یا گرسنگی[1] باشد.

برعکس، در ماهیان الاسموبرانش، غلظتBUN طبیعی بسیار زیادتر است و از این مقدار برای حفظ تعادل اسمزی خود با آب‌شور استفاده می‌کنند. در ماهیان الاسموبرانش، اوره درنهایت توسط لوله‌های کلیوی از ادرار جذب مجدد می‌شود و احتمالاً این امر، هم‌زمان با جذب مجدد سدیم صورت می‌گیرد. سلاکانت‌ها از این نظر، شبیه ماهیان الاسمو برانش هستند.

اگرچه، ماهیان الاسمو برانش غلظت اوره خود را در حد بالا حفظ می‌کنند، اما آن‌ها نسبت به مسمومیت با اوره قدرت تحمل چندانی ندارند. هیچ‌کدام از آنزیم‌های آن‌ها توسط اوره افزایش

1. Starvation

نمی‌یابد و این ماده از فعالیت آنزیم‌های روندهای اکسیداتیو و گلیکولیز به‌طور مشخص جلوگیری می‌کند. به نظر می‌رسد که کوسه‌ها نمی‌توانند از کنترل غلظت اوره در بدن خود، برای افزایش توان تحمل نوسان شوری سطح بدن خود استفاده کنند؛ بنابراین، در ماهیان الاسموبرانش و سلاکانت‌ها، BUN به‌عنوان اندیکاتور (شاخص) بیماری کلیه به‌حساب می‌آید، به‌ویژه اگر دچار کاهش شود.

کراتینین و کراتین

در ماهیان، کراتین برکراتینین غالب است. کراتین از طریق کلیه دفع می‌شود، اما از طریق آبشش‌ها دفع نمی‌شود و بیش از نصفی از نیتروژن ادراری بسیاری از ماهیان را تشکیل می‌دهد. کراتینین در ماهیان یافت می‌شود و در اثر سیکلیک (حلقه‌ای) شدن غیرآنزیمی کراتین به‌صورت هم‌زمان به وجود می‌آید. به نظر می‌رسد که مقادیر کراتینین موجود در عضلات با مقادیر کراتین ارتباطی نداشته باشد و از زمانی که کراتینین تولید می‌شود، متابولیزه نمی‌شود، اما میزان ترشح نیز تغییری نمی‌کند. معمولاً مقادیر کراتینین خون ماهیان تلئوست در محدوده ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در دسی لیتر است و در ماهیان دریایی میزان آن بیشتر است.

اسید اوریک

اسید اوریک در ماهیان، از نوکلئوتیدهای آندوژنیک واگزوژنیک پورین و همچنین از کاتابولیسم (شکستن) پروتئین از طریق پورین‌ها ایجاد می‌شود. این ماده در کبد و به مقدار کمتر در کلیه تبدیل به اوره می‌شود و از طریق آبشش دفع می‌شود.

آمونیاک

آمونیاک مهم‌ترین ماده ترشحی ماهی است. این ماده از دآمینه‌شدن اسیدهای آمینه و شکستن پورین و پیریمیدین ایجاد می‌شود و اساساً به‌صورت آمونیاک یا یون آمونیوم، از طریق آبشش‌ها به‌صورت انتشار غیرفعال و از طریق مکانیسم تبادل با سدیم ترشح می‌شود. میزان ترشح آمونیاک پس از تغذیه افزایش می‌یابد، درصورتی‌که ترشح اوره صورت نمی‌گیرد. این ماده همچنین، در خلال دوره‌های فعالیت فیزیکی افزایش می‌یابد، درصورتی‌که ترشح اوره صورت نمی‌گیرد. این ماده در خلال دوره‌های فعالیت فیزیکی افزایش می‌یابد. در خون ماهی، آمونیاک توسط اسید گلوتامیک و فعالیت‌های گلوتامیناز و گلوتامین سنتتاز بافره[1] می‌شود. محدوده نیتروژن آمونیاکی سرم ماهیان

1. Buffered

تلئوسـت بین ۰/۳ تا ۵/۵ میلی‌گرم در دسـی‌لیتر است. اوج[1] مشخص در آمونیاک سرم، در حدود ۴ ساعت پس ازتغذیه، در حد طبیعی است (استوسکوف، ۱۹۹۳).

الکترولیت‌های سرم

اگرچه کلیه‌های ماهیان در ترشـح مواد زائد نیتروژنی مشارکت اندکی دارند، اما عمدتاً با دفع آب در ماهیان آب شـیرین یا حذف کاتیون دو ظرفیتی (منیزیوم و سـولفات) در آب‌شـور مرتبط هسـتند. مـاهیان آب شـیرین گلومرول‌های فراوانی دارند و هر روز در حدود ۳۰٪ از وزن بدن خود را با آب تازه پاک می‌کنند؛ سـدیم و کلرید را در لوله‌های دیسـتال کلیه جذب مجدد می‌کنند و ادرار بسـیار رقیق تولیـد می‌کنند. برعکس، ماهیان دریایی، گلومرول‌های کمتر و کوچکتر دارند و باید آبی را که از طریق آبشـش‌ها در اثر انتشـار خارج می‌شود، از طریق نوشیدن آب جبران کنند. این امر، موجب بار نمکی عمده‌ای می‌شـود که باید آن را خارج کرد. یون‌های سدیم و کلر اساساً از طریق سلول‌های کلراید در آبشش دفع می‌شوند، اما بار منیزیم و سولفات توسط کلیه ماهیان دریایی جابه‌جا می‌شود. در مـاهیـان آب شـیرین، کـاهش میزان پـالایش گلومرولی به هر دلیلی که باشـد، منجر به بروز اولیگوری حاد می‌شـود و حالتی شـبیه ماهیان دریایی پیش می‌آید؛ جذب مجدد سـدیم کاهش می‌یابد تا دفع آب تسهیل شود و جذب مجدد منیزیوم، جای دفع این یون را می‌گیرد؛ میزان سدیم و منیزیوم کاهش می‌یابد و میزان سـولفات سـرم نیز انتظار می‌رود که کاهش پیدا کند. در ماهیان دریایی، اختلال در وظایف لوله‌های کلیوی، باعث ترشـح منیزیوم و سـولفات می‌شود و باید منجر به افزایش مقادیر سولفات و منیزیوم سرم شود.

معمولاً در مـاهیـان آب شـیرین، جدا از ابتلای کلیوی، میزان سـدیم و کلرید در عفونت‌های عمومی کاهش می‌یابد و نشـان‌دهنده اختلال در وظایف آبشـش‌هاسـت. مقادیر الکترولیت برحسب گونه و محیط متغیر اسـت. در بیشـتر ماهیان، مقادیر سدیم در حدود ۱۵۰ و کلرید در حدود ۱۳۰ میلی اکی والان در لیتر اسـت. مقادیر پتاسـیم و کلسیم نیز در عفونت‌های عمومی کاهش می‌یابد و بـه ترتیـب از مقـادیر ۳/۲ و ۵ میلی اکی والان در لیتر پـایین‌تر می‌آیـد. در مـاهیان دریایی، مقدار کلسـیم نزدیک ۶/۵ میلی اکی والان در لیتر است و در ماهیان ماده تخم‌گذار محیط‌های آب‌شور و شـیرین، مقادیر کلسـیم بیشـتر است. مشکلاتی که در زمینه تعبیر و تفسیر کاهش هم‌زمان مقادیر چند الکترولیت در ماهیان وجود داشت، سبب شد که تعدادی از محققان نسبت پتاسیم به سدیم را در حد ۰/۰۲، به‌عنوان بهترین شاخص سلامت ماهی، نسبت به مقادیر مطلق الکترولیت‌ها، به‌حساب آورنـد. این روش هنوز بـه‌عنوان یـک روش ثـابـت‌شـده در امور بالینی به‌حسـاب می‌آید. مقادیر

1. Spike

الکترولیت‌ها را می‌توان به‌عنوان شاخص تأثیرات خارجی ناشی از محیط به‌حساب آورد. برای مثال، آب شیرین بسیار اسیدی، منجر به کاهش سدیم و کلرید می‌شود که ممکن است با افزایش کورتیزول سرم در ارتباط باشد و یا اینکه ارتباطی وجود نداشته باشد. مقادیر کلسیم نیز در شرایط اسیدی کاهش می‌یابد که با کاهش اسمولالیته سرتاسری سرم در ارتباط است. به علت پیچیدگی در زمینه ارزیابی اجزای الکترولیتی مختلف در سرم خون ماهی، اغلب اسمولالیته کل مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بخش عمده اسمولالیته سرم، به سدیم، کلرید و پروتئین سرم مربوط می‌شود. این پارامتر در اثر بیماری آبشش، راحت‌تر از اختلال کلیوی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و به‌راحتی نمی‌توان تغییرات ایجادشده در الکترولیت‌های جزئی سرم مانند منیزیوم، کلسیم یا پتاسیم را انعکاس دهد. هنگام ارزیابی اسمولالیته سرم، باید بااحتیاط برخورد کرد، زیرا ممکن است حتی هنگامی‌که سدیم، پتاسیم، کلرید، کلسیم و حتی پروتئین سرم به‌صورت حاد کاهش می‌یابد، اسمولالیته سرم در حد طبیعی باقی بماند. هنوز به علت این مسئله به‌خوبی پی نبرده‌اند، اما ممکن است از طریق آزاد شدن اسیدهای آمینه در خلال تجزیه پروتئین‌ها به وجود بیاید. معمولاً اسمولالیته سرم در ماهیان آب شیرین در حدود ۲۹۵ میلی اسمول در لیتر در ماهیان آب‌شور ۳۰۰ تا ۳۰۵ میلی اسمول در لیتر است.

پروتئین‌های سرم

کاهش مقادیر پروتئین سرم که اغلب در ارتباط با اختلال کلیه است، لزوماً با افزایش مقادیر پروتئین ادرار همراه نیست و باید بااحتیاط تعبیر و تفسیر شود. عوامل دیگری که باعث کاهش پروتئین تام می‌شوند، شامل کاهش جذب در اثر گرسنگی، کاهش تولید در اثر اختلال کبد، افزایش نفوذپذیری مویرگ‌ها نسبت به پروتئین‌های پلاسما یا تجزیه پروتئین‌ها در اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک یا باکتری‌هاست. مقدار پروتئین سرم در اثر بیماری کبد کاهش می‌یابد. مقادیر کلسیم سرم نیز به همراه کاهش مقادیر آلبومین، در اثر بیماری کبد کاهش می‌یابد. این امر احتمالاً به این خاطر است که آلبومین به‌عنوان یک حامل لیگاند[1] برای کلسیم سرم عمل می‌کند. مقدار پروتئین تام در اثر عفونت‌های آئروموناسی که با عفونت خونی همراه است، نیز کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش ایمونوگلوبولین‌های جریانی است.

1. Ligand

آنزیم‌های سرم

آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) (که قبلاً SGPT می‌نامیدند) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) (کـه قبلاً SGOT نامیده می‌شـــد)، در ماهیان وجود دارد. این آنزیم‌ها در بافت‌های کبد تغلیظ می‌شـوند. مقادیر AST و ALT سـرم در بیماری نکروتیک حاد کبد ماهیان در اثر تماس با ســـموم کبـدی مانند تتراکلریدکربن افزایش می‌یابد. مقادیر این آنزیم‌ها در بیماری‌های مزمن کبد، به‌صورت قابل‌اطمینان افزایش چندانی نشان نمی‌دهد.

نشـــان داده شـــده اســـت که عفونت‌های خونی شـــدید، به‌ویژه در اثر گونه‌های آئروموناس باعث افزایش AST و کاهش ALT سـرم می‌شـوند. این نوع عفونت‌ها همچنین، منجر به افزایش مقادیر گلوکز ســـرم می‌شـــوند که متعاقباً مقدار آن کاهش می‌یابد. همچنین، در این عفونت‌ها، کم‌خونی به همراه کاهش هموگلوبین، شمارش کل گلبول‌های قرمز و هماتوکریت نیز مشاهده می‌شود.

روش نمونه‌گیری تأثیر زیادی بر روی تعیین آنزیم ســـرم دارد. آلانین آمینوترانســـفراز، لاکتات دهیدروژناز، کراتینین و فسـفر، همگی مشخصاً، در نمونه‌هایی که از ساقه دمی‌گرفته می‌شوند، بیش از نمونه‌هایی هســـتند که از بزل (پونکســـیون) قلب به دســـت می‌آید. پروتئین کل ســـرم، آلبومین، گلوکز، نیتروژن اوره، کلســـترول، منیزیوم، کراتینین ALT، آلکالین فسفاتاز، آمیلاز و استیل کولین استراز ظاهراً تحت تأثیر آلودگی بافتی ناشی از قطع دم قرار نمی‌گیرند.

دیگر پارامترهای سرم

احتمـالاً گلوکز تنها جزء غیرآنزیمی و غیرپروتئینی اســـت که در ســـرم خون ماهی مورد آزمایش قرارگرفته اسـت. گلوکز در عفونت‌های باکتریایی حاد تا ۲۴ سـاعت افزایش می‌یابد اما سپس سریع کاهش پیدا می‌کند. مقدار گلوکز با افزایش ســـن ماهی افزایش می‌یابد. ماهیان همچنین، نســـبت به آلوکسان حساس هستند و می‌توانند موقتاً، در اثر تزریقات داخل صفاقی مکرر دارو به میزان ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن، حالت دیابتیک پیدا کنند. این امر منجر به افزایش قابل‌ملاحظه گلوکز سرم می‌شود و پس از ۳ تا ۴ روز به حالت طبیعی برمی‌گردد.

پارامترهای دیگر ســـرم به‌غیرازگلوکز، با افزایش ســـن تغییر می‌کنند. آمیلاز، کلرید، کراتینین، پروتئین تام سـرم و هموگلوبین کل خون، همگی با افزایش سن ماهی افزایش می‌یابند. کلسیم سرم و الکالین فسـفاتاز با افزایش سن کاهش می‌یابند و کلسترول کل خون، اسید اوریک و نیتروژن اوره، با افزایش سن حالت هیپربولیک از خود نشان می‌دهند؛ ابتدا با افزایش سن کاهش می‌یابند و سپس رو به افزایش می‌گذارند.

ثبت مقادیر پایه

فقدان مقادیر پایه مناسب برای بسیاری از گونه‌های ماهیان، بدین معنی است که لازم است محققان در چند سال آینده درگیر این مسئله باشند. اگرچه آن‌ها تمایل دارند که از مقادیر پایه استفاده کنند، اما روش‌های لازم برای تعیین آن‌ها به‌راحتی در دسترس نیست. کتاب‌های دامپزشکی پر از اسنادی است که اطلاعاتی را در مورد مقادیر پایه ارائه می‌کنند، اما غالباً در همه آن‌ها تعداد نمونه‌هایی که مورد آزمایش قرارگرفته‌اند، بسیار کم است و همچنین، غالباً در آن‌ها نیاز شدید به وجود مقادیر مفید به‌عنوان منبع احساس می‌شود.

اولین مرحله در ثبت نوسانات مقادیر یک پارامتر در خون ماهی، این است که مقدار میانگین و انحراف معیار (SD) توزیع مقادیر آن پارامتر را با استفاده از طرح نمونه‌گیری تصادفی از یک جمعیت حیوانات نرمال تعیین کنیم. یک راه برای دستیابی به نمونه‌گیری تصادفی، تعیین همه حیوانات در یک جمعیت سالم با تعداد واحد و مشخص است. سپس شماره‌ها از طریق جدول اعداد تصادفی با یک دستگاه مولد اعداد تصادفی انتخاب می‌شوند و حیوانات مربوطه را به داخل گروه موردمطالعه وارد می‌کنند. شماره‌هایی که بیش از یک بار از منبع اعداد تصادفی بیرون می‌آیند، پس از یک بار استفاده، کنار گذاشته می‌شوند. تعداد حیواناتی که موردنیاز است تا آزمایش تعیین نوسان مقدار پایه به‌خوبی انجام شود، بستگی به میزان تفاوت‌هایی دارد که در مقادیر پارامتر موردمطالعه دیده می‌شود و همچنین، بستگی به آن دارد که شما چه مقدار اختلاف را در میزان میانگین به‌دست‌آمده از آزمایش‌های خود نسبت به میانگین جمعیت می‌پذیرید. با فرض اینکه اطلاعات برحسب توزیع گوس استوار است، عدد موردنیاز نمونه‌ها یا ضرایب آن‌ها برای دستیابی به میانگین، با سطح اعتماد ۹۵٪، از فرمول زیر محاسبه می‌شود (استوسکوف، ۱۹۹۳):

$$N = \frac{۳/۸۴۱۶ \times (SD)^{۲}}{(Distance)^{۲}}$$

به‌عنوان‌مثال، در نظر بگیرید که می‌خواهید مقادیر پایه را برای یک آنزیم سرمی تعیین کنید. شما چند آزمایش انجام داده‌اید و انحراف معیار را ۴ واحد محاسبه کرده‌اید. تمایل دارید که مقدار میانگین بین یک واحد از میانگین حقیقی جمعیت باشد. بر اساس این فرمول، شما نیاز دارید که ۶۵/۱ (پس از گردکردن ۶۶) نمونه در مطالعه خود داشته باشید. باوجوداین، اگر قبول کنید که مقدار میانگین آزمایش شما از میانگین حقیقی به میزان ۲ واحد اختلاف داشته باشد، فقط به ۱۵/۴ (پس از گرد کردن ۱۵) نمونه نیاز دارید.

معمولاً برحسب قرارداد، دو برابر انحراف معیار به‌عنوان محدوده‌های مقادیر متعارف در نظر گرفته می‌شود. این قرارداد بدین معنی است که انتظار می‌رود تنها در ۲/۵٪ کل حیوانات متعارف، مقادیر موردنظر بالاتر از مقدار این محدوده است و ۲/۵٪ در زیر این محدوده قرار دارند. این نتایج

در بعضـــی از حیوانات متعارف، به‌عنوان مورد غیرمتعارف در نظر گرفته می‌شـــود، اما این مســـئله بـه‌عنوان مورد قـابـل‌قبول برای حیوانات غیرمتعارفی که موردقبول قرار نمی‌گیرند، همانند جمعیت حیوانات متعارف است.

در این روش، انتشـــار حیوانـات غیرمتعـارف در نظر گرفته نمی‌شـــود. انواع مختلفی از حالات غیرمتعارف وجود دارد و ممکن اسـت انواع مختلفی از انتشـار این حالات غیرمتعارف وجود داشـته باشـد که بسـیاری از آن‌ها برحسـب انتشار گوس نیستند. فرضیه‌ای که در هنگام استفاده از قرارداد انحراف معیار دو برابر برای تثبیت نوســان مقادیر پایه وجود دارد، این اســت که مقدار پارامتر برای حیوان غیرمتعارف به‌اندازه کافی بالاتر یا پایین‌تر از مرکز انتشـار مربوط به محدوده نوسـان جمعیت حیوانات متعارف است.

همه مقادیر شـیمی سرم، انتشار گوس را نشان نمی‌دهند. آن‌ها می‌توانند کاملاً نامتقارن باشند. این اطلاعات را اطلاعات ناهموار[1] می‌نامند. در این موارد، میانگین (مقدار متوســـط) و نما (مقداری که بسـیار مکرر دیده می‌شـود)، مورد موافقت قرار نخواهد گرفت. اگر ناهمواری کافی باشـد، نتیجه آن، این خواهـد بود کـه مقـادیر مربوط بـه نمونـه‌های جمعیت متعارف از محدوده انحراف معیار ۲ خارج شـود. هنگامی‌که اطلاعات به دسـت می‌آید، گاهی اوقات می‌توان انتشـار گوس و همچنین، تغییر و تبدیلاتی نظیر به دسـت آوردن لگاریتم یا ریشه مربع هر نقطه از اطلاعات را نیز ارائه کرد. روش دیگری که می‌توان اسـتفاده کرد، به‌کارگیری روش درصـدی[2] اسـت. محدوده نرمال باید بین ۲/۵ و ۹۷/۵٪ همـه اطلاعـات متعـارف قرار گیرد. در این روش، ۵٪ حیوانـات متعـارف بـه‌صـورت غیرمتعـارف در نظر گرفته می‌شـوند که به آن خطای نوع ۱ می‌گویند. در نظر گرفتن حیوان بیمار به‌صـورت متعارف نیز خطای شماره ۲ گفته می‌شود. تغییرات مقادیر ریزش برای به حداقل رساندن هر یـک از خطـاهـای فوق‌الـذکر بـاعث افزایش احتمال نوع دیگری از خطا می‌شـود. اسـتفاده از درصـدهای مختلف به‌غیراز ۲/۵ و ۹۷/۵، زمانی قابل توصـیه است که یک جنبه از بیماری یا پارامتر که موردمطالعه قرار می‌گیرد، به نسبت‌های متفاوتی از خطاهای I و II نیاز داشته باشد.

1. Sqewed
2. Percentile

تصویر ۴-۱۱: گلبول‌های قرمز و انواع گلبول‌های سفید از گسترش خون ماهی آزاد کوهو شامل لنفوسیت‌ها، ترومبوسیت‌ها (رنگ‌آمیزی لیشمان؛ بزرگنمایی ۱۰۰۰) (اقتباس از روبرتس، ۲۰۱۲).

تصـویر ۴-۱۲ (صفحه قبل): سلول‌های خونی ماهی پهن (پلیس) ۱- لنفوسیت‌های خون با سیتوپلاسمی که اندکی به رنگ اسید شیف پریودیک (PAS) پاسخ مثبت داده است (رنگ‌آمیزی PAS، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۲- ترومبوسیت با دانه‌های متعددی که اسید فسفاتاز مثبت هستند؛ ۳- ترومبوسیت‌ها با دانه‌هایی در قاعده spike که PAS مثبت هســتند (بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۴- مونوســیت های خون حاوی ذرات کربن متعدد (رنگ‌آمیزی لیشـمان، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۵- مونوسـیت های خون در نواحی از گسـترش که امکان پخش شــدن منـاســب گلبول‌های ســفید را به‌خوبی فراهم نمی‌کند که به‌تبع آن کوچک‌تر به نظر می‌رســند (بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۶- مونوســیت های خون با دانه‌های اســیدفســفاتاز - مثبت (بزرگنمایی ۹۰۰)؛ ۷- مونوسیت های خون که سیتوپلاسم آن‌ها تیرگی PAS - مثبت دارد (بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۸- ماکروفاژها (از گسـترش تیموس) حاوی ترشـحات سلولی (رنگ‌آمیزی لیشمان، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۹- ماکروفاژهای بافتی حاوی دانه‌هایی بزرگ که فعالیت اسـید فسفاتاز دارند (بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۰- ماکروفاژهای حفره شکمی با دانه‌های PAS- مثبت (بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۱- ماکروفاژهای پرشده با ترکیبات آهن آزاد (رنگ‌آمیزی پرلز پتاسـیم فروسیانات، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۲- ملانوماکروفاژهای طحال حاوی مواد پرلز - مثبت (بزرگ‌نمایی ۹۰۰) ۱۳- ملانوماکروفاژهای طحال (رنگ‌آمیزی PAS، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۴- ملانوماکروفازهای کلیه با سـیتوپلاسـم اسـیدفسـفاتاز – مثبت (بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۵- نوتروفیل های خون (رنگ‌آمیزی لیشـمان، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۶- نوتروفیل های خون (رنگ‌آمیزی سودان بلک B و لیشمان؛ بزرگنمایی ۹۰۰)؛ ۱۷- نوتروفیل های خون. آزمایش بنزیدین پراکســیداز ســاتو و ســکیا و ســافرونین (بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۸- نوتروفیل های خون (PAS، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۱۹- نوتروفیل های خون (رنگ‌آمیزی الکالین فســفاتاز، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۲۰- نوتروفیل های خون (رنگ‌آمیزی اســید فســفاتاز، بزرگ‌نمایی ۹۰۰) (اقتباس از روبرتس، ۲۰۱۲).

تصویر ۴-۱۲ (ادامه): ۲۱- گسترش کلیه نشان‌دهنده مراحل رشد نوتروفیل: پروگرانولوبلاست، گرانولوبلاست، گرانولوسیت بالغ و لنفوسیت (رنگ‌آمیزی لیشمان، بزرگنمایی ۱۰۲۵)؛ ۲۲- گسترش کلیه، مراحل از گرانولوبلاست تا گرانولوسیت بالغ حاوی دانه‌های اسید – فسفاتاز . ردیف‌های گلبول قرمز شامل گرانولوبلاست منفی، گرانولوبلاست، گرانولوسیت و مراحل آخر اریتروبلاست است (آزمایش اسید فسفاتاز با رنگ زمینه هماتوکسیلین، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۲۳- گسترش کلیه. گرانولوبلاست ها منفی هستند؛ گرانول‌های رنگ مثبت تنها در گرانولوسیت های بالغ دیده می‌شوند (رنگ‌آمیزی سودان بلک B با رنگ زمینه لیشمان، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)؛ ۲۴- گسترش کلیه. ردیف‌های گرانولوسیتی از گرانولوبلاست اولیه رنگ مثبت می‌گیرند درحالی‌که ردیف‌های اریتروسیتی (اریتروبلاست) منفی است (رنگ‌آمیزی PAS و هماتوکسیلین، بزرگ‌نمایی ۹۰۰)، ۲۵- گسترش کلیه که مراحل مختلف رشد گلبول‌های قرمز را نشان می‌دهد شامل پرواریتروبلاست، اریتروبلاست نهایی و پرواریتروسیت (رنگ‌آمیزی لیشمان، بزرگ‌نمایی ۹۰۰) (اقتباس از الیس ۱۹۷۵ در روبرتس، ۲۰۱۲).

فصل پنجم

فنون جمع آوری دیگر مایعات بدن ماهیان

مقدمه

محققان تمایل دارند که علوم آزمایشگاهی را با خون‌شناسی و شاید سرم‌شناسی یکسان فرض کنند. این روش‌ها، عناصر ضروری انضباط کاری آن‌ها است، اما نمی‌توان آن‌ها را برای کل جمعیت تعمیم داد. در هر کار عملی، به‌ویژه در طب ماهی، محققان باید صلاحیت و شایستگی لازم برای انجام آزمایش‌های متعدد را داشته باشند که می‌توان از خون‌شناسی، سرم‌شناسی، سلولی شناسی و ..... نام برد. درعین‌حال، با توجه به اینکه ماهیان را به تعداد فزاینده در تحقیقات فیزیولوژیک، داروشناسی و سم‌شناسی مورداستفاده قرار می‌دهند، لذا نیاز مبرمی به جزئیات روش‌های نمونه‌برداری از ترشحات آن‌ها احساس می‌شود. در این فصل، جزئیاتی در خصوص خون‌شناسی، سرم‌شناسی، سلول‌شناسی و همچنین، رهیافت‌های چندگانه جمع‌آوری خون، ادرار، مدفوع و اسپرم ماهیان، ازجمله ساختن کانول ها و کاتترها ارائه می‌شود. همچنین ملاحظات خاصی در مورد اصلاح و حفظ و نگهداری نمونه‌ها در هر بخش ارائه خواهد شد.

جمع‌آوری ادرار

مطالعات بر روی عملکرد کلیه و ترشح ادراری نمک‌ها، هورمون‌ها، داروها، گزنوبیوتیک‌ها یا متابولیت‌های آن‌ها توسط ماهیان، نیازمند جمع‌آوری ادرار از ماهیان مقید شده یا ماهیان در حال شناست. ادرار ماهی را می‌توان از ماهیان زنده توسط کاتترهای حالب یا مثانه جمع‌آوری کرد، یا این-که به‌طور طبیعی ادرار را به داخل محفظه (حجره) مجزا جمع کرد. بقیه محققان روش ساده‌ای را برای جمع‌آوری ادرار از ماهی بیهوش شده یا تازه مرده، بدون استفاده از کانول توصیف کرده‌اند. این روش با مالش‌دادن[1] ناحیه شکمی ماهی صورت می‌گیرد.

کاتترهای مثانه

کاتترهای مثانه را (که گاهی اوقات به آن‌ها کانول گفته می‌شود)، از طریق پاپیلای ادراری به داخل مثانه وارد می‌کنند. به دلیل تفاوت‌های وسیع در تشریح دستگاه ادراری تناسلی گونه‌های ماهیان مختلف، باید کاتترها را با شرایط ماهی منطبق کرد. توصیه می‌شود که قبل از طراحی کاتتر، محقق اقدام به تشریح ناحیه ادراری تناسلی یکی از اعضای گونه مورد آزمایش نماید. اطلاعات به‌دست‌آمده از تشریح، محقق را قادر می‌سازد تا کاتتر را با وضعیت ماهی مطابقت دهد و از اشتباه در هنگام

1. Palpating

ورود کاتتر اجتناب نماید، زیرا ممکن است منجر به جمع‌آوری مواد نامطلوب مانند شیره اسپرم (مایع منی و اسپرم)، مدفوع یا مایعات دیگر شود.

در یک آزمایش اولیه که به ماهی کپور معمولی (سیپرینوس کارپیو) و ماهی طلایی (کاراسیوس اوراتوس) کاتتر وصل شد، از یک کاتتر شیشه‌ای L- شکل استفاده شد و آن را از پاپیلای ادراری عبور داده و به یک کیسه پلاستیکی متصل کردند تا ادرار را از مثانه جمع‌آوری کنند. بیشتر کاتترهایی که امروزه استفاده می‌شوند، از لوله‌های PE ساخته می‌شوند، هرچند که بعضی از محققان از مواد دیگر برای اتصال به لوله استفاده می‌کنند. ازجمله این مواد می‌توان به لوله‌های غذادهی به کودکان[1] نام برد. کاتترهای دیگر، از اندازه‌های مختلفی از لوله‌های PE به‌صورت فابریک ساخته می‌شوند که توسط چسب آن‌ها را به هم می‌چسبانند. در اینجا، طراحی‌های مختلفی از کاتترها برای استفاده در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور بالغ با جزئیات شرح داده می‌شوند.

بیشتر کاتترهایی که برای استفاده در قزل‌آلای رنگین‌کمان بالغ توصیف می‌شوند، بر اساس طراحی مشابه ساخته شده‌اند. به‌طورکلی، نوک قسمت وارد شونده که در مثانه باقی می‌ماند، باید صاف باشد و دو طرف لوله ممکن است منفذدار باشد و منافذ کوچک متعددی داشته باشد تا از مسدود شدن کامل توسط موکوس اجتناب شود. انتهای عقبی (تقریباً ۲۰۰ میلی‌لیتر) که از لوله غذای بچه بریده‌شده است (برای مثال، ۱۲×۳/۵ اینچ لوله غذای آرجیل، شروود مدیکال، سنت لوئیس، MO)، منفذدار شده و همانند نوک وارد شونده به‌خوبی عمل می‌کند. آن را می‌توان به‌راحتی به لوله PE اضافه وصل کرد تا طول کاتتر افزایش یابد و به‌اندازه مطلوب برسد. اگر لوله PE برای ایجاد نوک واردشونده مورداستفاده قرار می‌گیرد، انتهای آن را باید توسط حرارت صاف کرد و توسط سوزن داغ شده منافذی را به وجود آورد. اندازه لوله‌ها ممکن است از PE 60 تا PE 190 متغیر باشد. این امر بستگی به‌اندازه ماهی و تنگی مناسب کاتتر در پاپیلای ادراری دارد. سپس می‌توان نوک وارد شونده را در صورت نیاز به لوله‌های PE با اندازه‌های اضافی وصل کرد.

محققان کاتتری را توصیف کردند که برای استفاده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در حال شنا طراحی‌شده است. این کاتتر از یک لوله PE 60 به‌اندازه ۴۵ سانتی‌متر ساخته شده است که از طریق یک بند PE 190 به‌اندازه ۱۵ میلی‌متر (با انتهایی که تا حدی پهن است) با نخ بسته می‌شود و تا تقریباً ۱۵ میلی‌متر از نوک صاف و منفذدار لوله PE 60 با چسب محکم می‌شود. بند PE 190، جریان ادرار را در اطراف کاتتر مسدود می‌کند و کمک می‌کند تا در داخل پاپیلای ادراری تثبیت شود. محققان دیگر به‌جای استفاده از بند، نوک کاتتر را پهن کردند و مقدار آن از ضرب عدد ۱/۵ در اندازه قطر اولیه کاتتر به دست آمد. تغییر دیگر این طراحی، مطابقت این کاتتر

1. Infant Feeding Tube

برای اســـتفاده در ماهیان کپور معمولی بالغ بود. این کاتتر از لوله‌های PE (با قطر داخلی ۰/۳ تا ۱ میلی‌متر) ســـاخته شـــد. حباب‌هایی با اســـتفاده از حرارت در فواصـــل ۳ و ۲۰ میلی‌متری از نوک منفذدار ساخته شد و به‌عنوان گیره‌های داخلی و خارجی کاتتر استفاده شدند.

کاتترگذاری در مثانه ماهیان مقید شده و ماهیان در حال شنا

ماهیان را با MS - 222 یا مواد دیگر به‌طور سـبک بیهوش می‌کنند و در داخل یک بلوک Vشکل قرار می‌دهند، به‌نحوی‌که سـطح شـکمی آن‌ها به سـمت بالا باشد. ازآنجاکه کاتترگذاری در مثانه را غالباً به همراه روش‌های جراحی دیگر انجام می‌دهند، لذا باید آبشـــش‌ها را به‌طور مداوم در حمامی از آب جریان‌دار و هوادهی شده و واجد ماده بیهوشی (برای مثال، MS - 222) قرار داد. با استفاده از ســـرنگ، کاتتر ادراری را کاملاً با ســـرم فیزیولوژی نمکی یا آب فاقد یون پر می‌کنند. بعضـــی از محققان اســـتفاده از ســـرم نمکی را برای ماهیان دریایی و آب را برای ماهیان آب شـــیرین گزارش کرده‌انـد. بـایـد دقت کرد که حباب در داخل کاتتر شـــکل نگیرد، زیرا حباب‌ها جریان ادرار را کند (ممانعت) می‌کنند و هنگامی‌که کاتتر وصل باشد، خارج کردن این حباب‌ها دشوار خواهد بود. کاتتر پر از مایع را به داخل پاپیلای ادراری وارد می‌کنند و به‌آرامی به ســـمت مثانه هدایت می‌نمایند. اگر کاتتر دارای بندها یا حباب‌های اضـافی بود، باید مطمئن شد که در داخل پاپیلا قرارگرفته‌اند. سپس باید کاتتر را آزمایش کرد تا مطمئن شوید که جریان ادرار برقرار است. این امر با خارج کردن سرنگ و مشـاهده جریان ادرار از انتهای کاتتر صـورت می‌گیرد. همچنین، باید مطمئن شد که هیچ حباب هوایی در انتهای وارد شـــونده کاتتر یا در امتداد طول آن وجود ندارد. اگر جریان ادرار برقرار بود و هیچ حباب هوایی در کاتتر مشـــاهده نشـــد، باید ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر ســـرم نمکی یا آب به داخل آن تزریق کرد و بست تا اینکه تمام مراحل جراحی کامل شود. سپس کاتتر را باید به پاپیلای ادراری یا باله مخرجی، به کمک بخیه ابریشـــمی ۰-۴ محکم کرد و قبل از گره زدن بخیه، آن را دوبار به دور کاتتر چرخاند. در صـورت نیاز می‌توان بخیه‌های دیگری را نیز مورداستفاده قرار داد تا کاتتر بر روی بدن ماهی محکم شـــود، اما تنها درصـــورتی‌که قرار باشـــد ماهی در حال شـــنا باشـــد، انجام این امر ضرورت اجتناب‌ناپذیر پیدا می‌کند.

تصـــویر ۵-۱: کاتترهایی که برای جمع‌آوری ادرار از ماهی مورداســـتفاده قرار می‌گیرند. کاتتر داخلی ادراری (A): جمع‌آوری (زه کشی) ادرار از کیسه مثانه و کاتتر خارجی؛ (B): جمع‌آوری ادراری که به‌صورت طبیعی خارج می‌شود.

می‌توان از یک کیســه جمع‌آوری انعطاف‌پذیر[1] (برای مثال، بادکنک یا کاندوم) اســتفاده نمود و آن را به انتهای یک کاتتر محکم شــده و کوتاه متصــل کرد تا ادرار ماهی را در حال شــنا جمع‌آوری کند. به‌طور جایگزین، می‌توان کاتتر ماهی در حال شــنا را بســت و با کانول به‌صــورت دوره‌ای برای تخلیه مثانه اقدام نمود. جمع‌آوری دوره‌ای ادرار توســط کیســه انعطاف‌پذیر مذکور یا کاتتر بســته شده[2]، نیازمند دست‌کاری مجدد ماهی و ایجاد استرس است. به‌علاوه، محدود شدن جریان ادرار در هر دو روش، ممکن است عملکرد کلیه را دچار تغییر کند.

اگر مــاهیــان پس از کاتترگذاری در داخل یک حجره فیزیولوژیک یا دســـتگاه مقیدکننده قرار داده شـــونـد، ادرار را می‌توان به‌طور مداوم به داخل یک ظرف قیراندود جمع‌آوری کرد، یا اینکه با اســتفاده از یک جمع‌کننده تقســیم شــده[3] در فواصــل زمانی معین جمع‌آوری نمود. برای این موارد

1. Flexible Collecting Bag
2. Plugged Catheter
3. Fraction collector

استعمال، انتهای آزاد کاتتر را باید در موقعیت مجرای ادراری موردنظر قرار داد، یا اینکه جمع‌کننده تقسیم شده در تقریباً ۸-۲ سانتی‌متر زیر سطح آب در حجره قرار گیرد. این سطح، رأس هیدرولیک کافی (۱-۲ میلی‌متر جیوه) را برای جمع‌آوری (زه‌کشی) ادرار کیسه مثانه فراهم می‌کند، بدون اینکه نیازی به استفاده از هوا یا ایجاد مکش اضافی باشد، زیرا این اقدامات باعث جمع شدن (کلاپس) کیسه مثانه بر روی کاتتر خواهد شد.

دیورز (ادرار زایی) آزمایشگاهی، افزایش موقت تولید ادرار، ممکن است در اثر استرس ناشی از جابه‌جایی ماهیان، بیهوشی یا روش‌های جراحی روی دهد. این اثر ممکن است چندین ساعت یا حتی چندین روز تداوم یابد. درنتیجه دیورز آزمایشگاهی، غلظت یون‌ها و مواد شیمیایی در ادرار اندکی پس از کاتترگذاری ممکن است رقیق شود. به همین خاطر، توصیه می‌شود که جمع‌آوری ادرار برای اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی را به تأخیر انداخته و ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از کاتترگذاری صورت گیرد.

جمع‌آوری ادراری که به‌طور طبیعی خارج می‌شود

کاتتر بیرونی

در بیشتر ماهیان، برون ده و ترکیب ادرار ممکن در اثر استفاده از کاتتر جای‌گیر شده در مثانه دچار تغییر شود. علت این امر نیز عمدتاً به خاطر حذف ذخایر ادراری مثانه و تغییر ادرار در این روند است. برای اجتناب از این تعارض بالقوه[1] و امکان جمع‌آوری ادرار رقیق نشده، یک کاتتر بیرونی طراحی‌شده است که می‌تواند ادراری را که به‌طور طبیعی خارج می‌شود، از قزل‌آلای رنگین‌کمان جمع‌آوری کند. ازآنجاکه کاتتر بیرونی، کل منافذ ادراری تناسلی را در برمی‌گیرد و با این منافذ مطابقت دارد، لذا باید ماهی را یک هفته قبل از انجام آزمایش گرسنه نگه داشت و روده خلفی را بخیه زد تا از عبور مایعات روده‌ای یا کاست‌های دفعی به داخل کاتتر جلوگیری شود. به‌علاوه، نباید کاتترگذاری در خلال فصل تولیدمثل صورت گیرد، زیرا این امر منجر به آلودگی ادرار با مایع اسپرم یا مایعات تولیدمثلی دیگر می‌شود. کاتتر بیرونی را می‌توان با بریدن انتهای پهن شده یک کاتتر ادراری چندمنظوره بارد[2] ۴۰ سانتی‌متری (سایز ۱۲ فرانسوی، لاستیک انعطاف‌پذیر، شرکت داول، کرانستون، RI) ایجاد کرد و یک قاعده پهن به وجود آورد که توسط نخ ابریشمی ۰-۲ به گوشت اطراف منفذ ادراری تناسلی بخیه زده می‌شود. سپس می‌توان کاتتر را به کمک چسب (سیمان) سیانوآکریلات به بدن ماهی چسباند و برای بررسی امکان نشت، کاتتر را با آب پر کرد.

---

1. Interference
2. Bard

سپس، به ماهی آب‌رسانی کرده و در حجره نگهداری قرار می‌دهند و اجازه داده می‌شود که ادرار به داخل یک ظرف که ۳ سانتی‌متر یا بیشتر در زیر سطح آب قرار دارد، جمع‌آوری شود.

کاتتر پس مثانه‌ای[1]

کاتتر پس مثانه‌ای نیز طراحی شد تا ادراری را که به‌طور طبیعی در قورباغه ماهی (اوپسانوس بتا)[2] تولید می‌شود، جمع‌آوری کند. این کاتتر از یک لوله PE 10 با طول کوتاه (۱۰ میلی‌متر) که سر آن را توسط حرارت صاف کرده‌اند، تهیه می‌شود. این لوله به یک لوله PE 50 با طول بیشتر (۴۰ سانتی‌متر) متصل است و درنهایت، به یک سرنگ اتصال می‌یابد. کاتتر را با سرم نمکی پر می‌کنند و انتهای لوله PE 10 تا نیمه وارد پاپیلای ادراری می‌شود. برای محکم کردن کاتتر، از بخیه ابریشمی ۰-۴ استفاده کرده و آن را به دور کاتتر و پاپیلا می‌بندند. سپس انتهای آزاد کاتتر را به بدن ماهی محکم می‌کنند و این کار از طریق بستن با نخ[3] به روش اتصالات حاصل از نوارهای[4] لاتکس به سیمان سیانوآکریلات صورت می‌گیرد. در هنگام احیا و آب‌رسانی به ماهیان، ادراری که به‌طور طبیعی خارج می‌شود، از طریق کاتتر به داخل یک مجرای رگ مانند می‌ریزد که کمتر از ۳ سانتی‌متر در زیر سطح آب حجره نگهداری ماهیان قرار دارد.

حجره فیزیولوژیک تقسیم شده[5]

حجره فیزیولوژیک ماهی، برای جداسازی مسیرهای متعدد دفع مواد زائد در ماهیان جهت مطالعات فیزیولوژیک و سم‌شناسی مورداستفاده قرار می‌گیرند. طراحی‌های انجام‌شده، شامل جعبه‌های دوقسمتی ساده با مدخل‌های ورودی و خروجی برای جداسازی مواد دفعی آبشش و ادرار است. انواع پیچیده نیز برای استفاده در ماهیانی که کانول یا کاتترگذاری شده‌اند، مورداستفاده قرار می‌گیرند تا راه‌های دفع را از یکدیگر جدا کنند.

ساده‌ترین حجره فیزیولوژیک، جعبه یا استوانه‌ای است با یک غشای انعطاف‌پذیر که آن را به دو حجره تقسیم می‌کند. یک سوراخ بیضی‌شکل به‌اندازه بدن ماهی در داخل این غشا ایجاد می‌کنند و ماهی را در داخل حجره قرار می‌دهند، به‌طوری‌که غشا کاملاً اطراف بدن ماهی را درست در عقب آبشش‌ها به‌راحتی دربر گیرد. این غشا باعث می‌شود که مواد ترشحی آبشش‌ها از ترشحات کیسه مثانه و \ یا روده مجزا باقی بماند.

---

1. Post-bladder catheter
2. Opsanus beta
3. Threading
4. Strips
5. Divided physiological chamber

سازگاری‌های اخیری که نسبت به حجره چوبی اولیه‌ایجادشده است، از پلکسی گلاس‌های[1] شفاف یا تیره به‌دست‌آمده است و غشای تقسیم‌کننده را می‌توان با بخیه‌زدن یا چسب‌های سیانوآکریلات به بدن ماهی محکم کرد. سطح آب را می‌توان توسط لوله‌های قائم[2] (برای تعدیل فشار) متعادل کرد و آب را هوادهی نمود یا در مواردی به گردش درآورد. قبل از انجام آزمایش، باید سد غشا را با استفاده از یک رنگ موردبررسی قرار داد تا اطمینان حاصل شود که غشاء فاقد نشتی است. این سد را می‌توان بعدها تقویت کرد. به‌این‌ترتیب که می‌توان ماهی را قطع نخاعی کرد، یا اینکه ماده بیهوشی را به‌طور مداوم استفاده نمود، یا اینکه از وسایل محدودکننده برای نگهداری ماهی در جای خود بهره گرفت. برای جلوگیری از آلودگی ترشحات ادراری با مواد مدفوعی، می‌توان روده خلفی را در ماهیان گرسنه بست[3].

تصویر ۵-۲: نمودار حجره فیزیولوژیک. بخش خلفی با یک زه کش برای جمع‌آوری مواد مدفوعی از ماهی توسط یک کاتتر ادراری سازگار شده است. باوجوداین، ادرار طبیعی را نیز می‌توان جمع‌آوری کرد، به شرطی که ماهی گرسنه نگه‌داشته شود و روده آن مسدود شود (اقتباس از اوستراندر ۲۰۰۰).

حجره‌های فیزیولوژیک فوایدی برای جمع‌آوری ادرار از ماهی دارند، به‌ویژه در ماهیان کوچک که نمی‌توان کاتترگذاری کرد، می‌توان از آن به‌عنوان روشی نسبتاً ساده برای غربال کردن[4] ترشحات

1. Plexiglass
2. Standpipes
3. Ligate
4. Screen

ادراری اســـتفـاده کرد. معایب اســـتفاده از حجره فیزیولوژیک (در مقایســـه با کاتترگذاری) برای جمع‌آوری ادرار شـامل: رقیق شـدن ادرار توسـط آب حجره جمع‌کننده؛ آلودگی بالقوه ادرار با مواد مدفوعی، فرآورده‌های پوستی یا پرگنه های (کلنی‌های) باکتریایی؛ نشت سد غشایی؛ استرس ناشی از مقید بودن در حجره یا ترانسکت کردن[1] است. همچنین، اگر ماهی در داخل حجره بیهوش شود، تغییر در میزان جریان و ترکیب ادرار در اثر بیهوشی مداوم نیز از معایب این روش است.

جمع‌آوری مواد مدفوعی

بسیاری از مواد شیمیایی که وزن مولکولی زیاد (بیش از ۳۰۰ دالتون) دارند، عمدتاً از طریق دستگاه گوارش دفع می‌شـــوند و ممکن اســـت پس از دفع بتوان آن‌ها را در مدفوع اندازه‌گیری کرد. مدفوع ماهی را می‌توان پایش[2] مسـتمر کرد تا از روی آن، قابلیت دسـتیابی و هضم اجزای غذایی مختلف (ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای آمینه و غیره) در جیره ماهیان تعیین شود. نشانگرهای خنثی را که جذب دســـتگاه گوارش نمی‌شـــوند، مانند یتریوم[3] یا اکســـید کرومیوم (Y_2O_3 , Cr_2O_3) می‌توان بـه همراه این مواد مغذی جهت محاســـبه کارایی جذب اجزای جیره تجویز کرد. مدفوع را همچنین می‌توان برای مطـالعـه دفع مواد خطرنـاک و گزنوبیوتیـک از بـدن مـاهی جمع‌آوری کرد. مدفوع را بســـته به اهداف آزمایش می‌توان از تک‌تک ماهیان یا حوضـــچه مربوط به چندین ماهی جمع‌آوری کرد. متداول‌ترین روش‌ها با جزئیات بیشتر بررسی خواهد شد.

جمع‌آوری مدفوعی که در اثر ثقل رسوب می‌کند

جمع‌آوری دستی

ســـاده‌ترین روش جمع‌آوری مدفوع، ســـیفون کردن دســـتی، کشـــیدن با پی پت یا جمع‌آوری ذرات مدفوع از کف مخزن به‌وســـیله تور اســـت. این روش‌های دستی وقت‌گیر هستند و نیاز به کار فشرده کارگری دارند و باید به‌صـورت روزانه انجام شـوند تا امکان نشت مواد از مدفوع کاهش یابد و امکان بالقوه آلودگی باکتریایی و فساد اجزای مدفوع رو به کاهش گذارد.

دستگاه گوئلف

دســـتگاه گوئلف ترکیبی از یک لوله جمع‌آوری (زه‌کشـــی) ساکن و یک ستون رسوب‌گیر ثقلی است که امکان جمع‌آوری مدفوع را بدون ایجاد آشـفتگی در ماهیان فراهم می‌کند. این دستگاه اولین بار

---

1 . Transection
2. Monifor
3. Yttrium

در دانشـــگاه گوئلف (گوئلف، اونتاریو، کانادا) ابداع شـــد و غالباً در مطالعات مربوط به تعیین مقدار کارایی آسـیمیلاسیون جیره مورداستفاده قرار می‌گیرد. دستگاه مذکور از یک مخزن ماهی با انتهای (ته) شیب‌دار یا مخروطی تشکیل می‌شود که جمع‌آوری (زه‌کشی) آن به داخل یک لوله جمع‌کننده افقی صـورت می‌گیرد و این لوله به یک ستون رسوب‌گیر عمودی اتصال دارد. هنگامی‌که آب و مواد مدفوعی مخزن از لوله جمع‌کننده عبور می‌کنند و به داخل سـتون رسـوب‌گیر وارد می‌شـوند، مواد مدفوعی در ته مخروطی آن رسوب می‌کنند و می‌توان آن‌ها را از طریق یک مدخل جمع‌آوری در ته ستون خارج کرد. جریان آب از طریق یک خروجی در بالای ستون خارج می‌شود. میزان جریان آب از درون دسـتگاه (معمولاً ۲ تا ۸ لیتر در دقیقه) به نحوی تنظیم می‌شود که شرایط رسوب‌گذاری را در داخل سـتون (اما نه در داخل لوله جمع کننده) به حداکثر برسـاند. فایده عمده دسـتگاه گوئلف این اسـت که این دسـتگاه روشی سریع و ساده برای جمع‌آوری یک‌باره مدفوع از بسیاری از ماهیان اسـت. عیب اصـلی این اسـت که هنوز جمع‌آوری نمونه به‌صورت دستی کنترل می‌شود، هرچند که اتوماتیزه کردن این دســتگاه باید امکان‌پذیر باشــد و این امر از طریق نصــب دریچه‌های مارپیچی قابل‌کنترل توسط رایانه بر روی لوله‌های ورودی و خروجی صورت می‌گیرد.

دستگاه ستونی TUF

در دسـتگاه سـتونی TUF نیز همانند دستگاه گوئلف از یک ستون رسوب‌گیر استفاده می‌شود. این دسـتگاه از یک لوله مسدودکننده ۳۰×۵۰ سانتی‌متری با یک لوله سیفون ورودی ۲/۵ سانتی‌متری تشـکیل می‌شـود. لوله اخیر از نزدیک ته مخزن به سـتون کشـیده می‌شود و در اینجا از طریق لوله مسـدودکننده وارد می‌شـود. یک لوله خروجی کوچک، آب را از بالای سـتون رسوب‌گیر جمع‌آوری (زه‌کشـی) می‌کند و هنگامی‌که برای سـیفوناژ دائم اسـتقرار یافت، میزان جریان آب از درون ستون توســط میزان جریان ورودی به مخزن ماهی تعیین می‌شــود. محققان از ۰/۶ لیتر در دقیقه جریان آب ورودی استفاده کردند. آزمایش‌هایی که برای مقایسه قابلیت هضم پروتئین و چربی در قزل‌آلای رنگین‌کمان صــورت گرفت، نشــان داد که هر دو دســتگاه گوئلف و TUF برای جمع‌آوری مدفوع، قابل‌اطمینان و قابل‌مقایسه با یکدیگر هستند.

حجره‌های فیزیولوژیک تقسیم شده برای مدفوع

اگر کیســه مثـانه را کاتترگذاری کنیم، مدفوع نیز ممکن اســت به داخل حجره خلفی یک حجره فیزیولوژیک تقسیم شده جمع‌آوری شود. مواد مدفوعی واجد آب را به‌راحتی می‌توان از طریق حجره جمع‌آوری مدفوع نمونه‌برداری کرد و این کار از طریق مدخل جمع‌آوری (زه‌کشی) صورت می‌گیرد، بدون اینکه در آزمایش اختلال ایجاد شــود، یا ماهی دچار آشــفتگی گردد. معایب عمده این روش،

مشـابه معایب جمع‌آوری دسـتی مدفوع از یک مخزن اسـت: احتمال آلودگی باکتریایی و فسـاد به همراه مشکلات نمونه‌برداری از ذرات مدفوع از حجره C وجود دارد. فایده عمده این روش این است که مدفوع هر ماهی در داخل حجم نسـبتاً کمی از آب (تقریباً یک لیتر) صـورت می‌گیرد و امکان تعیین مقدار آسـان ترشـحات مدفوعی را فراهم می‌کند، خصـوصاً اگر مواد مذکور با مواد رادیواکتیو نشان‌دار شده باشند.

جمع‌آوری رشته‌های مدفوعی به‌صورت دستی

روش جمع‌آوری دسـتی برای جمع‌آوری مـدفوع از مـاهی آزاد اقیانوس اطلس (سـالمو سـالار) توصـیف‌شـده اسـت. در این روش، ماهیان را به کمک ۲- فنوکسـی اتانول به‌صـورت ملایم بیهوش می‌کنند. مدفوع توسـط فشـار ملایم به ناحیه شـکمی، درسـت در قسمت خلفی باله‌های شکمی به سمت منفذ مخرج جمع‌آوری (کشیده) می‌شود. سپس، آن را مستقیماً از مخرج ماهی به داخل یک لوله باز می‌ریزند. این روش، خصـوصاً هنگامی مفید است که ناچار هستیم از تعداد زیادی از ماهیان نمونه مدفوع جمع‌آوری کنیم و رقیق شدن مدفوع در آب مخزن مطلوب نیست (اوستراندر ۲۰۰۰).

تصویر ۵ -۳: دو تصویر اصلاح‌شده از دستگاه گوئلف برای جمع‌آوری مدفوع از چندین ماهی (اقتباس از اوستراندر، ۲۰۰۰).

تصویر ۵-۴: ستون TUF برای جمع‌آوری مدفوع از چندین ماهی (اقتباس از اوستراندر، ۲۰۰۰).

کاتترهای مدفوعی

دو نوع طراحی کاتتر مدفوعی در منابع توصیف‌شده است. یک کاتتر مدفوعی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان ۲۰۰ تا ۵۰۰ گرمی طراحی‌شده است. این کاتتر از لوله لاتکس قابل‌انعطاف به ابعاد: ۵ میلی‌متر ID، ۶ میلی‌متر OD و ۱۰۰ سانتی‌متر طول تشکیل می‌شود. کانول را در فواصل ۵ سانتی‌متری توسط یک مارکر سیاه دائمی علامت‌گذاری می‌کنند (در صورت نیاز، می‌توان فواصل کوچکتر را علامت‌گذاری کرد). نوک کاتتر با یک زاویه مشخص بریده می‌شود و سپس نوک آن را گرد می‌کنند تا در هنگام ورود به داخل روده، آسیبی به جدار آن وارد نکند. یک گردن قلاب‌دار با استفاده از یک قطعه ۵ میلی‌متری از لوله‌ای با قطر داخلی (ID) ۵/۵ تا ۶ میلی‌متر بر روی کاتتر در فاصله ۵ سانتی‌متر از انتهای ورودی قرار می‌دهند.

ماهی را توسط MS-222 بیهوش می‌کنند و سطح شکمی آن را به سمت بالا می‌گیرند و بر روی یک حفاظ V – شکل قرار می‌دهند. در هنگام ورود کاتتر، آبشش ماهی را باید به‌طور مداوم آب‌رسانی کرد. این امر توسط محلول رقیق MS-222 (۲۰ تا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر) صورت می‌گیرد. درصورتی‌که قرار است هم کاتتر ادراری و هم مدفوعی جاسازی شود، ابتدا باید کاتتر ادراری و سپس کاتتر مدفوعی را وارد کرد. در هنگام آماده‌سازی کاتتر مدفوعی، از یک نخ بخیه (۰-۴ ابریشمی) استفاده کرده و دور مخرج را بخیه می‌زنند، اما گره آن را نمی‌بندند. سپس کاتتر مدفوعی را وارد می‌کنند؛ بنابراین، گردن قلاب‌دار در خارج از مخرج باقی می‌ماند (به خاطر داشته باشید که هیچ مایعی در داخل کاتتر نباید وجود داشته باشد). سپس، نخ بخیه را به دور کاتتر تنگ کرده و گره می‌زنند و بعد، گردن قلاب‌دار را به کمک یک بخیه محکم می‌کنند. باید مواظب بود که فقط گردن سوراخ شود. سپس، ماهی را در داخل یک حجره فیزیولوژیک قرار می‌دهند، به‌طوری‌که کاتتر مدفوعی از حجره خارج شود و به داخل یک پیاله یا فلاسک تخلیه گردد. سپس، اجازه داده می‌شود که ماهی در طول شب از درستکاری‌های جراحی به دورمانده و بهبود یابد.

نمونه مدفوع را می‌توان در کل دوره تماس یا در فواصل زمانی معین جمع‌آوری کرد. زمان‌بندی جمع‌آوری نمونه‌ها با توجه به مدت عبور مدفوع از کاتتر، در زمان‌های معین انجام می‌شود. اندازه‌گیری‌ها با استفاده از خطوط ۵ سانتی‌متری «اضافی»[1] صورت می‌گیرد. هنگامی‌که تماس برقرار شد، کاتتر خارج می‌شود و دو انتهای آن را توسط هموستات گیره مانند می‌بندند. مسافت طی شده توسط مدفوع در کاتتر در خلال هر یک از فواصل زمان‌بندی‌شده نمونه‌برداری محاسبه می‌گردد. نمونه‌برداری از انتهای بیرونی کاتتر آغاز می‌شود. اولین مسافت نمونه‌برداری (زمان صفر تا زمان اولین نمونه‌برداری) را با بازکردن هموستات، جدا کرده و کاتتر را می‌برند. مدفوع موجود در بخش بریده‌شده را خارج کرده و به داخل یک ظرف انتقال می‌دهند. نمونه‌برداری آن‌قدر ادامه می‌یابد تا همه فواصل کاتتر بریده شوند. سپس، مدفوع نمونه‌برداری شده را می‌توان مورد هضم قرار داد، یا برای آزمایش‌های بعدی استخراج کرد.

این روش خصوصاً برای جمع‌آوری نمونه‌های زمان‌بندی‌شده، برای محاسبه مقادیر حذف مواد ترشحی مفید واقع می‌شود. بلاک و همکاران با این روش توانستند مقادیر ترشحی پنتاکلرفنل[2] (PCP) را طی دوره‌های ۲۴ و ۳۶ ساعته محاسبه کنند. معایب این روش، شامل مشاهدات فردی برای جمع‌آوری‌های زمان‌بندی‌شده و هدر رفتن نمونه در صورت آبکی بودن آن است. باوجوداین، اگر مواد مدفوعی جامد باشند، مقدار کمی از نمونه در بین محل‌های جمع‌آوری مجاور یکدیگر هدر می‌روند. این امر در مطالعات بلاک، در هنگام تجویز داخل شکمی PCP نشان‌دار رادیواکتیو نشان داده شده است. نمونه‌های مدفوعی اندازه‌گیری شده در خلال دوره سازگاری شبانه، با مواد نشان‌دار رادیواکتیو آلوده نشدند، حتی هنگامی‌که نمونه‌های مجاور آن حاوی مقادیر بالایی از رادیواکتیویته بودند.

محققان کاتتری را برای جمع‌آوری مایعات مخرجی از قورباغه ماهیان بالغ ایجاد کردند. آن‌ها این کاتتر را از کاتتر ادراری بارد[3] ۴۰ سانتی‌متری ساختند. قبل از واردکردن کاتتر، آن را به یک قطعه ورودی پلاستیکی سفت پهن شده (با قطر داخلی ۲/۵ میلی‌متر x قطر خارجی (OD) ۵ میلی‌متر (پهن شده) ۱۰x میلی‌متر طول) متصل کردند و با محلول نمکی ۰/۹٪ پر کردند. قطعه ورودی سفت را به‌آرامی در داخل مخرج تا تقریباً ۵ میلی‌متر وارد کردند و توسط نخ بخیه در جای خود محکم نمودند. کاتتر به همراه نوارهای لاتکس قلاب‌دار به بدن ماهی بخیه زده شد. ازآنجاکه کاتتر با مایع (محلول نمکی) پرشده بود، لوله‌های جمع‌آوری می‌بایست تقریباً ۳ سانتی‌متر در زیر سطح آب قرار گیرد تا جمع‌آوری نمونه تسهیل شود. مایعات مخرجی جمع شده توسط این کاتتر

1. Increment
2. Pentachlorphenol
3. Bard

به‌طور موفقیت‌آمیز برای آزمایش مواد زائد نیتروژنی (اوره و آمونیاک) مورداستفاده قرارگرفته است. مقادیر مواد زائد نیتروژنی مایع مخلوط ادراری و مخرجی، مشابه مقادیر اندازه‌گیری شده در ماهیانی بود که شنای آزاد انجام می‌دادند. فایده اصلی کاتترگذاری، قابلیت جداسازی مواد زائد نیتروژنی ادراری و مدفوعی است. به‌علاوه، ماهیت متناوب حذف ادراری و مدفوعی مواد را، تنها از طریق کاتترگذاری می‌توان مشاهده کرد.

جمع‌آوری سلول‌های جنسی

سلول‌های جنسی (تخم‌ها و اسپرم‌های) ماهیان به‌طور متداول برای انجام روش‌های لقاح در خارج از بدن در تأسیسات تخم‌پروری جمع‌آوری می‌شوند. سلول‌های جنسی را همچنین برای آبزی‌پروری و استفاده در تحقیقات عمومی به شرح زیر جمع‌آوری می‌کنند: مطلوب ساختن شرایط ذخیره سلول‌های جنسی، اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما و مایعات سمینال، آزمایش‌های دست‌کاری هورمونی و مطالعات مربوط به رفتارهای تولیدمثلی.

تخم‌گیری

ساده‌ترین روش برای جمع‌آوری تخم‌های بارور نشده از ماهیان ماده رسیده، تخم‌گیری دستی است. یک شکاف با چاقوی جراحی (اسکالپل) در شکم ماهی ماده ایجاد می‌کنند. سپس، شکم را به‌ملایمت فشار می‌دهند و تخم‌ها را از شکاف شکمی به داخل یک ظرف مناسب می‌ریزند. اگر تهیه تخم لقاح یافته مدنظر باشد، شیره اسپرم را از ماهی نر در حال اسپرم ریزی مستقیماً بر روی تخمک‌ها می‌ریزند. اسپرم و تخمک‌ها را به‌آرامی به همراه مقدار کمی آب چشمه مخلوط می‌کنند و با آب جاری شستشو می‌دهند و درنهایت برای سفت شدن در داخل یک ظرف مناسب قرار می‌دهند.

جمع‌آوری تخم‌های لقاح یافته

تخم‌های لقاح یافته را می‌توان از ماهیان استخری (برای مثال، کپور و گربه‌ماهی روگاهی) در داخل ظروف تخم‌ریزی، پناهگاه‌های تولیدمثلی استوانه‌ای در کف استخرهای مولدین در خلال فصل تخم‌ریزی جمع‌آوری کرد. ظروف کهنه شیر یا هر ظرف استوانه‌ای دیگری که منفذ کوچکی (با قطر داخلی ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر) دارند، برای استفاده به‌عنوان ظرف تخم‌ریزی مناسب هستند. این ظروف را می‌توان به نحوی در استخر قرار داد که انتهای باز آن‌ها به سمت مرکز استخر باشد. ماهیان ماده، تخمک‌های ژلاتینی خود را در داخل این ظروف قرار می‌دهند. سپس، این تخمک‌ها توسط یک ماهی نر، بارورشده و محافظت و اکسیژن‌دهی به آن‌ها توسط این ماهی صورت می‌گیرد.

این ظروف را هر روز کنترل می‌کننـد و هر زمـان کـه تخم در داخـل آن‌هـا وجود داشـــت، تخلیه می‌کنند. سـپس، این تخم‌ها را پس از جمع‌آوری، با محلول بتادین ۱۰٪ ضـدعفونی کرده، شستشو داده و در داخل تراف‌های خاص با آب اکسیژن‌دار و دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهند تا تخم‌گشایی صورت گیرد.

ماهیان را می‌توان در آکواریوم‌های آزمایشـگاه نیز وادار به تخم‌ریزی کرد. این امر سبب می‌شود که روند تخم‌ریزی راحت‌تر بتوان کنترل کرد و مورد پایش مداوم قرار داد. در خلال فصل تخم‌ریزی، به ماهیان ماده هورمون (برای مثال، عصـاره هیپوفیز، هورمون‌های نیمه خالص محرک غدد جنسی، هورمون محرک غدد جنسـی جفت انسـان یا هورمون لوتئینی) تزریق می‌شـود تا وادار به رسیدگی جنسـی شـوند. ماهیان ماده تزریق‌شـده را به‌صـورت جفت با ماهی نر در داخل یک آکواریوم تحت شـرایط جریان مداوم قرار می‌دهند. تخم‌ریزی باید در عرض ۲۴ سـاعت صـورت گیرد. اگر این امر انجام نشـود، باید تزریق مجدد صـورت گیرد. ماهیان مولد را باید فوراً پس از لقاح تخمک‌ها خارج کرد تا امکان خروج تخم‌ها فراهم شود.

جمع‌آوری اسپرم از طریق اسپرم‌گیری

میلت[1] (مایع منی و اسـپرم) را می‌توان از ماهی نر به روش اسـپرم‌گیری جمع‌آوری کرد. این امر از طریق فشـار ملایم بر روی شکم ماهی صورت می‌گیرد تا این‌که میلت خارج شود. اسپرم‌گیری یکی از روش‌های آسـان اسـت که بدون انجام بیهوشـی یا مواد خاص برای جمع‌آوری صـورت می‌گیرد. باوجوداین، خطر آلودگی میلت با ادرار تقریباً غیرقابل‌اجتناب اسـت و ممکن اسـت تا ۸۰٪ حجم جمع‌آوری‌شده را شامل شود.

جمع‌آوری مایع اسـپرمی توسـط سـرنگ و کاتتر: به‌طور جایگزین می‌توان مایع اسـپرمی را از ماهیان نر رسیده با استفاده از سرنگ‌های ۲/۵ میلی‌لیتری (بدون سوزن) جمع‌آوری کرد. این کار را با واردکردن این سـرنگ به داخل منفذ جنسـی انجام می‌دهند. در هنگام جمع‌آوری مایع اسـپرمی، می‌توان فشـار ملایمی به ناحیه شـکمی وارد کرد و باید دقت کرد که نوک سرنگ با ادرار، مدفوع یا موکوس آلوده نشـود. با اسـتفاده ازاین‌روش، می‌توان مقادیر کمی از مایع اسپرمی فاقد آلودگی(۰/۲ میلی‌لیتر) را بدون بیهوشـی جمع‌آوری کرد (ویلژوئن و فان وورن، ۱۹۹۲). همچنین، می‌توان برای جلوگیری از آلودگی، از یک کاتتر اسـتفاده کرد و آن را موقتاً وارد منفذ تناسـلی نمود و هم‌زمان، فشار ملایمی بر روی شکم ماهی اعمال کرد.

---

1. Milt

ذخیره‌سازی نمونه‌ها: مایع اسپرمی به‌دفعات، برای آزمایش‌های باروری جمع‌آوری می‌شود و باید آن را برای استفاده‌های آتی ذخیره‌سازی کرد. به نظر می‌رسد که ذخیره‌سازی در انجماد بیشتر از بقیه روش‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد، هرچند که افزودنی‌های شیمیایی مورداستفاده برای نمونه‌های اسپرم هنوز در دست تحقیق است. در جدول ۴، روش‌های مختلف ذخیره‌سازی در انجماد اسپرم خلاصه شده است. هنوز هیچ روش ذخیره‌سازی درازمدتی برای تخم‌ها یا جنین‌ها در دسترس نیست.

جدول ۵-۱: روش‌های انتخابی ذخیره‌سازی مایع اسپرمی.

گونه ماهی	رقیق‌کننده	محافظ انجماد
قزل‌آلای رنگین‌کمان	۰/۶ مول سوکروز	Me2SO
قزل‌آلای رنگین‌کمان	۰/۶ مول سوکروز	20% DMSO
گربه‌ماهی آبی	محلول Hanks	DMSO
گونه‌ایکتالوریده	محلول Hanks	5% MeOH
گونه کپورماهیان	محلول Hanks فاقد یون کلسیم	10% DMSO
گونه اسپاریده	محلول Hanks	10% DMSO

آسپیره کردن مایعات

استفاده عمده دیگری که سلول‌شناسی بالینی، در علوم مربوط به ماهی دارد. آزمایش مایعات آسپیره شده از اندام‌های مختلف حفره بدنی است. منابع متداول نمونه‌گیری، شامل آسپیره کردن کیسه شنا یا مایع آسیت در حفره بدن است. روش‌های رنگ‌آمیزی که در مورد این نمونه‌ها انجام می‌شود، مشابه روش‌هایی است که در مورد فرآورده‌های گسترش بافت‌های سطحی استفاده می‌شود.

معمولاً پاراسنتز کیسه شنا در ماهیان سالم، فقط گاز است. حتی وجود مقادیر کمی از مایع حاصل از پاراسنتز در کیسه شنا با ارزش است. وجود تعداد زیادی گلبول‌های سفید تک هسته یا هتروفیل‌های نابالغ در این نمونه‌ها نشان‌دهنده روندهای عفونی است و نمایانگر آن است که در کیسه شنا عفونت وجود دارد. وجود باکتری‌های داخلی سلولی در درون گلبول‌های سفید حاصل از پاراسنتزکیسه شنا، الزاماً، برای عفونت‌های باکتریایی ارزش تشخیصی دارد. پیش‌بینی این‌گونه موارد، در غیاب بیماری عمومی و به همراه درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب، خوب است.

هنگامی‌که در پاراسنتز کیسه شنا مقادیر زیادی منابع وجود دارد که الزاماً فاقد سلول است. این امر نشان‌دهنده آن است که در مجاری هوایی عفونت آماس مزمن وجود دارد. پیش‌بینی برای یک

ماهی چنین وضعیتی دارد، ضعیف است. تورم روده که با ایجاد کار همراه است، ممکن است علائمی مشابه به بیماری‌های کیسه شنا را داشته باشد. علاوه بر وضعیت شنای غیرطبیعی، برآمدگی‌های شکم در اثر تجمع گاز، ممکن است محقق را به‌اشتباه بیندازد و شکم را با کیسه شنا اشتباه بگیرد. وجود سلول‌های پوششی استوانه‌ای مژه را به همراه ترشحات قابل‌ملاحظه، نشان‌دهنده پاراسنتز از روده است. در هنگام پاراسنتز از مایع آسیتی حفره شکمی ممکن است به‌طور تصادفی از روده نمونه‌برداری شود. این امر را می‌توان به‌راحتی، باوجود ترشحات غذایی تشخیص داد گلبول‌های سفید را نمی‌توان به تعداد زیاد مشاهده کرد درحالی‌که در بعضی مواقع که معده یا روده سوراخ می‌شود و محتویات به داخل حفه بطنی می‌ریزد، تعداد آن‌ها زیاد است و پریتونیت ایجاد می‌شود.

تجمع آسیت در ماهی غالباً با سلول‌های تک‌هسته‌ای همراه است. غالباً محتویات سلولی مایعات آسیتی بسیار کم است. در این حالت، سانتریفیوژ نمونه برای رسوب سلول‌ها، روش مفیدی برای تسهیل آزمایش‌های سلول‌شناسی است. در این روش، به خاطر کاهش لامل موردنیاز برای پوشاندن سلول‌ها، زمان قرائت نتیجه کوتاه می‌شود. در این روش، تفسیر نتایج اندکی مشکل می‌شود، زیرا تعداد سلول‌ها را نمی‌توان بدون داشتن اندازه حجم نمونه، قبل و بعد از سانتریفیوژ تخمین زد. همچنین سانتریفیوژ باعث پاره شدن سلول‌ها می‌شود و شناسایی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند.

فصل ششم

فنون میکروب‌شناسی آبزیان

فنون باکتری‌شناسی در ماهیان

باکتری‌ها موجودات زندهٔ تک‌سلولی هستند که با تقسیم دوتایی تکثیر حاصل می‌کنند. این عوامل معمولاً به سه شکل دیده می‌شوند: میله‌ای (باسیلوس)[1]، کروی (کوکسی) [2] و مارپیچی (اسپیریلوم) [3]. عوامل بیماری‌زای باکتریایی در ماهیان، عموماً میله‌ای شکل هستند. فقط تعداد محدودی کروی هستند و اشکال مارپیچی تاکنون شناخته نشده‌اند. باکتری‌ها یک دیواره سلولی دارند که شکل سلول را حفظ می‌کند و همچنین یک غشاء داخلی که سبب می‌شود تا مواد غذایی و متابولیت‌ها در داخل باکتری انتشار یابند. باکتری‌های جنس مایکوپلاسما (باکتری‌هایی که دیوارهٔ سلولی ندارد) نیز به‌طور نادر گزارش کرده‌اند و گونه‌هایی که ماهیان را آلوده می‌کنند، عامل ایجاد اپیتلیوسیستیس هستند. برخی از عوامل بیماری‌زای باکتریایی در ماهیان، کپسول‌هایی به دور خود ایجاد می‌کنند و معمولاً ایجاد این کپسول‌ها، به حدت آن‌ها بستگی دارد. تعداد زیادی از باکتری‌های بیماری‌زا، تاژکدارند و از آن، برای حرکت استفاده می کنند، اما برخی از آن‌ها فاقد آن هستند. برخی نیز با خم و راست شدن و سرخوردن حرکت می‌کنند (پست، ۱۹۸۷).

بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا در ماهیان، سرما دوست[4] هستند و فقط گونه‌های محدودی در دمای بالای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد یا کمتر رشد می کنند. حداکثر دمای رشد بسیاری از باکتری‌ها، ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد یا کمتر است. دمای رشد مطلوب تعداد زیادی از باکتری‌های سرمادوست، ۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد است و در دمای ۴ درجه نیز به تکثیر خود ادامه می‌دهند.

بسیاری از باکتری‌ها می‌توانند تغییرات وسیع فشار اسمزی را تحمل کنند. برخی حتی نمک دوست[5] هستند و ۳/۵٪ کلرید سدیم را به‌راحتی تحمل می‌کنند، اما می‌توانند حتی در نمک بیش از ۷٪ نیز تکثیر حاصل کنند. باوجوداین، اگر غلظت نمک حداقل ۰/۵٪ باشد، بهتر تکثیر می‌یابند.

بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان، می‌توانند در محدودهٔ وسیعی از pH رشد کنند. عوامل فرصت‌طلب یا ثانویه، در pH بین ۵/۵ تا ۱۰ می‌توانند تکثیر حاصل کنند، اما معمولاً در بین عوامل بیماری‌زای اصلی، تحمل نوسان pH، محدودهٔ کمتری دارد و عموماً بین ۶ تا ۹ است.

تقریباً همهٔ باکتری‌هایی که ماهیان را آلوده می کنند، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری هستند. به‌ندرت دیده شده است که باکتری مولد بیماری در ماهی، هوازی مطلق باشد. بعضی از این

---

1. Bacillus
2. Cocci
3. Spirilum
4. Psychrophilic
5. Halophilic

باکتری‌ها تولید رنگ می‌کنند[1] و رنگ‌دانه‌های مختلفی توسط آن‌ها تولید می‌شود که می‌توان از رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای، زرد، پرتقالی یا قرمز نام برد. برخی از آن‌ها، خاصیت فلورسنت دارند. گاهی اوقات رنگدانه‌های تولیدشده توسط یک باکتری، در شناسایی آن نقش دارد.

بسیاری از باکتری‌هایی که در ماهی ایجاد بیماری می‌کنند، ساپروفیت[2] (گندیده خوار) هستند. این عوامل هنگامی می‌توانند در ماهی ایجاد بیماری کنند که تعادل فیزیولوژیک ماهی به هم بخورد، یا اینکه فقر غذایی وجود داشته باشد و یا حالات غیرطبیعی دیگر ایجاد شود. نتیجهٔ این امر، تهاجم عوامل فرصت‌طلب به ماهی خواهد بود.

بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا در محیط‌های رشد به‌سختی رشد می‌کنند و در آزمایشگاه به محیط کشت مخصوص نیاز دارند. باوجوداین، تعداد زیادی از باکتری‌های بیماری‌زای ماهی، بر روی محیط‌های کشت معمولی آزمایشگاه به‌خوبی قادر به رشد هستند.

مطالعات متعددی بر روی باکتری‌های آبزیان در ایران انجام‌شده است (زهرایی صالحی و ستاری، ۱۳۷۵، ۲۰۰۵؛ مصلحی و همکاران، ۱۳۹۳، ۲۰۱۶؛ هاشمی مفرد و همکاران، ۱۳۹۵؛ علیزاده رودپشتی و همکاران، ۲۰۱۰، ۲۰۱۷).

طبقه‌بندی باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان

باکتری‌هایی که در ماهی ایجاد بیماری می‌کنند، اعضای باکتری‌های حقیقی (یوباکتری‌ها)، ری باکتری‌ها[3] (اکتینومیست‌ها) [4] و باکتری‌های سرخورنده (سیتوفاگاها) [5] هستند. طبقه‌بندی و بیماری‌های ایجادشده توسط این موجودات، موضوع عمدهٔ مباحث این فصل است (پست، ۱۹۸۷).

شناسایی عامل بیماری‌زای باکتریایی، برای تشخیص بیماری ضروری است. برای تشخیص قطعی، می‌توان از روش‌های مختلف آزمایشگاهی استفاده کرد. ریخت‌شناسی، خصوصیات رنگ‌آمیزی و فعالیت‌های بیوشیمیایی، روش‌های متداول در زمینهٔ شناسایی باکتری‌ها به‌حساب می‌آیند. کلیدهای موجود در زمینهٔ شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان، به تشخیص آن‌ها کمک می کند. روش‌های آزمایشگاهی دیگری که برای شناسایی بیماری‌های باکتریایی مورداستفاده قرار می‌گیرد، شامل آگلوتیناسیون بر روی لام، ایمونودیفوزیون و پادتن‌های درخشان است. در مورد بعضی از باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان، لازم است که گونهٔ آن‌ها مورد شناسایی قرار گیرد تا

1. Chromogenic
2. Saprophytic
3. Ray bacteria
4. Actinomycetales
5. Cytophagales

تشـخیص قطعی داده شود و درمان صحیح صورت گیرد، ولی در مورد باکتری‌های دیگر، شناسایی جنس برای تشخیص و درمان کفایت می‌کند.

کشت باکتری‌ها

اگر احتمال وجود بیماری باکتریایی دیده شـود، بهتر اسـت ماهی به یک آزمایشـگاه مرجع ناحیه ارجاع داده شـود، زیرا روش‌های موردنیاز برای شـناسـایی عوامل بیماری‌زای باکتریایی تا حدودی اختصـاصـی هسـتند. نمونه‌ها را باید به آزمایشـگاه‌هایی ارسال کرد که با کشت باکتریایی گونه‌های آبزی آشـنا باشند، زیرا بسیاری از عوامل بیماری‌زای آبزی دارای نیازهای خاص هستند. برای مثال، بهتر است باکتری‌هایی را که از ماهی جدا می‌شوند، در دمای اتاق (۲۲-۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) کشت داد، اما دمای ۳۷ درجه (دمای متداول در گرمخانهٔ آزمایشـگاه‌های میکروب‌شـناسـی تجاری) برای کشت مناسب نیست، زیرا بعضی از عوامل بیماری‌زای ماهی در این دما به‌طور ضعیف رشد می‌کنند، یا اصـلاً رشـد نمی‌کنند. در مورد ویبریو سـالمونیسـیدا، نمونه‌ها باید در دمای ۱۷درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شـوند. نمونه‌های مربوط به ماهیان دریایی را باید بر روی محیطی که میزان نمک آن زیاد اسـت (برای مثال، تریپتیکاز سـوی آگار با ۲٪ نمک طعام)، یا بر روی آگار خون غنی‌شـده، مانند کلمبیا آگار با ۵٪ خون فاقد فیبرین گوسفند (CBA) کشت داد. CBA یک محیط کشت عمومی خوب، هم برای عوامل بیماری‌زای باکتریایی آب شیرین و هم دریایی است.

بعضـی از باکتری‌ها نیاز به محیط‌های کشـت اختصـاصـی دیگر دارند، اما این محیط‌ها به‌طور متداول در فعالیت‌های بالینی مورداسـتفاده قرار نمی‌گیرند. محیط‌های کشـت انتخابی را نیز برای افزایش امکـان جداسـازی عوامل بیماری‌زای معین می‌توان اسـتفاده کرد، اما به‌طور متداول در فعالیت‌های درمانگاهی اسـتفاده نمی‌شـوند، مگر اینکه با اطلاعات و دانش قبلی در ارتباط با عوامل بیماری‌زا، احتمال داده شـود که به آن عوامل برخورد خواهد شد و دلیل قانع‌کننده‌ای برای این امر وجود داشـته باشـد. همهٔ محیط‌های تفریقی که برای موجودات زندهٔ آب شـیرین استفاده می‌شوند، ممکن اسـت برای محیط‌های مصـب رودخانه‌ها قابل‌اتکا کاربرد نباشـد. برای مثال، محیط ریملر-شـاتس[1] یک محیط کشت انتخابی مفید برای شناسایی آئروموناس هیدروفیلا در آب شیرین است، اما نمی‌تواند بین آئروموناس هیدروفیلا و ویبریوها در محیط‌های مصـب رودخانه تفکیک و تمایزی قائل شود.

نمونه‌ها را می‌توان به چندین روش مختلف به آزمایشـگاه تحویل داد. باید تا آنجا که امکان‌پذیر اسـت، نمونه‌های زنده را برای کشت استفاده کرد. تنها استثناء زمانی است که تنها نمونهٔ ماهی که

1. Rimmler - shotts

علائم بالینی را نشـان می‌داد، تلف‌شـده باشـد (یعنی اینکه همهٔ ماهیان زنده ظاهری سـالم داشـته باشـند). شناسایی یک عامل بیماری‌زای اجباری (برای مثال، آئروموناس سالمونیسیدا) در یک ماهی تلف‌شـده، تشـخیص قوی‌تری نسـبت به جداسـازی یک عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب (برای مثال، آئروموناس هیدروفیلا) محسوب می‌شود، خصوصاً اگر باکتری به تعداد زیاد حضور داشته باشد.

ماهی کامل را می‌توان منجمد کرد و در داخل یخ خشک به آزمایشگاه انتقال داد. قابلیت بازیابی بسـیاری از عوامل بیماری‌زای باکتریایی متداول ماهی پس‌از انجماد در دمای ۲۰- درجهٔ سـانتی‌گراد (دمای فریزرهای خانگی)، از ۲۰ تا ۶۰ روز متغیر است. روش‌های تشخیص از طریق ایمنی‌شناسی، برای شـناسـایی سـریع و احتمالی (اولیهٔ) عوامل بیماری‌زا (برای مثال، بیماری باکتریایی کلیه یا BKD) به‌طور فزاینده مورداسـتفاده قرار می‌گیرند. با اینکه طحال، کبد و مایعات حفره شـکمی محل‌های متداول کشـت به‌حسـاب می‌آیند، اما اندام انتخابی برای جداسـازی عوامل بیماری‌زای باکتریایی عمومی (سـیسـتمیک) در ماهی، کلیه‌ها هستند که می‌توان از سمت شکمی یا پشتی به آن‌ها دست یافت.

رهیافت پشـتی به کلیه: ماهی را کشـته، بالهٔ پشـتی را با قیچی می‌بریم و سـطح پشـتی بدن را ضـدعفونی می‌کنیم. این کار با سـوآب کشـیدن آن ناحیه با یک مادهٔ ضـدعفونی‌کننده (برای مثال، ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی یا الکل ۷۰ درجه) یا با داغ کردن (سـوزاندن) پوسـت به کمک یک شـی فلزی پهن (برای مثال، چاقو یا اسـپاتولا) که بر روی شـعله گرم شده است، انجام می‌شود. اگر یک مادهٔ ضـدعفونی‌کننده اسـتفاده می‌شـود، پوسـت را باید با یک گاز اسـتریل خشک (پاک) کرد. سـپس، قیچی‌های اسـتریل برای بریدن نواحی ضدعفونی‌شده مورداستفاده قرار می‌گیرند. برش باید به اندازهٔ کافی عمیق باشـد که بتواند سـتون مهره‌ها را قطع کند. برش عمیق‌تر، وارد حفرهٔ شـکمی می‌شود و احتمال دارد منجر به پاره شدن روده‌ها و آلوده کردن نمونه شود.

محل‌های دقیق محل شـکاف تا حدودی متغیر اسـت و بسـتگی به گونهٔ ماهی دارد، اما معمولاً یک شـکاف درسـت در ناحیهٔ خلفی بالهٔ پشتی ایجاد می‌شود. محل مناسب دیگر، بریدن یک‌چهارم فاصلهٔ مخرج تا لبهٔ خلفی سرپوش آبششی است. زمانی که شکاف ایجاد شد، باید سر و دم ماهی را به سـمت پایین (سطح شکمی) خم کرد تا کلیه در معرض دید قرار گیرد. کلیه درست در زیرستون مهره‌ها واقع شـده و به رنگ قرمز تیره و خونی اسـت. اگر شکاف به اندازهٔ کافی عمیق نباشد، یعنی اینکه برش فقط به داخل عضـلات اپاکسـیال (قسمت فوقانی بدن) واردشده باشد، تقریباً هیچ خونی در این قسـمت وجود نخواهد داشـت، زیرا عضـلات از خون‌رسـانی بسـیار کمتری نسـبت به کلیه

برخوردار هســتند. هنگامی‌که کلیه در معرض دید قرار گرفت، می‌توان یک نمونه به کمک یک لوپ استریل یا کولتورت[1] برداشت کرد.

تصویر ۶-۱: کشت باکتریایی پس از کشتن ماهی با استفاده از رهیافت پشتی. پس از بیهوشی باله پشتی را می‌بریم که آلودگی احتمالی کاهش یابد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۲: سطح پشتی با یک ماده ضدعفونی‌کننده ضدعفونی می‌شود و سپس با یک گاز استریل خشک می‌کنیم (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

1. Culturette

تصویر ۶-۳: پشت ماهی را با یک قیچی استریل می‌بریم. باید دقت شود که آن‌قدر نبریم که وارد حفره شکمی‌شویم. در این مرحله بیشترین احتمال آلودگی وجود دارد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۴: . سر و دم ماهی را به سمت شکمی خم می‌کنیم تا کلیه برای کشت دادن نمایان شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۵: ورود به کلیه با ظاهر شدن مقدار زیادی خون همراه است زیرا کلیه عروق فراوان دارد.کیسه شنای خوابیده و سفیدرنگ در ناحیه شکمی کلیه قرار دارد. این اندام در همه ماهیان دیده نمی‌شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۶: واردکردن یک کولتورت استریل به داخل کلیه و دقت در انجام امر به‌نحوی‌که با دیگر نواحی در تماس قرار نگیرد، زیرا ممکن است باعث آلودگی نمونه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۷: تلقیح به داخل پلیت آگار خون کلمبیا با استفاده از یک کولتورت با نوک کوچک و گسترش تلقیح بر روی پلیت (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

رهیافت شکمی به کلیه: ماهی را با یک مادهٔ ضدعفونی‌کننده تمیز می‌کنیم (سوآب می‌کشیم). از ناحیهٔ مخرجی باید اجتناب شود. ماهی را باید بر روی سطح پهلویی قرار داد. حفرهٔ صفاقی را با استفاده از روش‌های آسپتیک باز می‌کنیم و دیواره بدن را برمی‌داریم. برای رسیدن به کلیه، امعا واحشای موجود در حفرهٔ صفاقی را به ملایمت کنار می‌زنیم و کیسهٔ شنا را از ستون مهره جدا می‌کنیم. این امر را با استفاده از پروب استریل و کند به بهترین وجه می‌توان انجام داد. کلیه در کل طول حفرهٔ صفاقی امتداد دارد و درست در ناحیهٔ شکمی ستون مهره‌ها واقع شده است. توجه داشته باشید که در مورد ماهی بزرگ، نیاز به استفاده از یک اسکالپل دارید تا غشایی را که کلیه را از کیسهٔ شنا جدا می‌کند، ببرید. ممکن است یک لوپ یا سوآب برای کشت استفاده شود. سپس این نمونه را می‌توان فوراً به یک محیط کشت انتقال داد، یا اگر به یک محیط کشت انتقالی انتقال داده

می‌شود، به همراه یخ به یک آزمایشگاه تشخیصی ارسال کرد. به جای این کار، می‌توان یک قطعه از کلیه را برداشت و در لولهٔ یک سرنگ استریل قرار داد، مگر اینکه لازم باشد فوراً نمونه را برای انتقال به آزمایشگاه منجمد کنیم.

کشت امعاواحشای دیگر: رهیافت شکمی را می‌توان برای نمونه‌گیری از اندام‌های دیگر، مانند طحال و کبد نیز مورداستفاده قرار داد. اگر باز کردن حفرهٔ صفاقی به‌صورت آسپتیک (غیر سترون) صورت نگرفته باشد، می‌توان سطح اندامی را که قرار است نمونه‌گیری شود، با تیغهٔ یک چاقوی جراحی داغ سوزاند و سپس یک لوپ را از قسمت سوزانده شده وارد کرد تا به بافت داغ نشده برسد. این کار فقط در مورد ماهیان بزرگ امکان‌پذیر است. در مورد ماهیان کوچکتر، می‌توان کل اندام‌ها را به‌صورت آسپتیک برداشت و یک لوپ برای انتقال بافت بر روی محیط کشت مورداستفاده قرار داد.

تصویر ۶-۸: کشت باکتری‌ها پس از کشتن (یوتانایز کردن) با استفاده از رهیافت شکمی. بعد از کشتن، پهلوی ماهی را ضدعفونی می‌کنیم و از منفذ مخرج و جراحات پوست اجتناب می‌کنیم. سپس ناحیه را با گاز استریل خشک می‌کنیم (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۹: دیواره بدن را با چاقوی استریل می‌بریم. باید دقت کرد که از مخرج اجتناب شود و برش نزدیک دیواره بدن صورت گیرد تا از قطع روده جلوگیری شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۰: امعاواحشا را با دقت کنار می‌زنیم تا کیسه شنا در معرض قرار گیرد. کیسه شنا را یا باید برید یا اینکه کنار زد تا به کلیه برسیم (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۱: کلیه غالباً با یک کپسول از بافت فیبری سفت پوشیده شده است که باید آن را برید تا به پارانشیم کلیه برسیم (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۲: محیط کشت آگار خون حاصل از کشت جراحت پوست که پرگنه های باکتریایی به‌خوبی جداسازی شده‌اند (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

کشت جراحات پوست: جراحات پوست در بسیاری از بیماری‌های باکتریایی متداول است. بعضی از بیماری‌های باکتریایی خود را به‌صورت عفونت‌های اصلی پوست نشان می‌دهند. ممکن است تعیین عامل آغازگر مشکل باشد، زیرا غالباً جراحات به عوامل مهاجم ثانویه آلوده می‌شوند. این نکته حائز اهمیت است که هر چه زودتر از جراحات نمونه‌گیری شود تا موجود زنده غالب را تعیین کنیم. غالباً این موجود زنده، عامل آغازگر نیز محسوب می‌شود.

برای اجتناب از آلودگی نمونه، بهتر است از جراحات پوست که هنوز هیچ‌گونه روش بالینی بر روی آن اعمال نشده است، کشت دهیم. جراحات پوست را می‌توان با یک لوپ کشت داد؛ اما راحت‌تر است که هنگامی‌که روش زیر مورداستفاده قرار می‌گیرد، پرگنه‌های منفرد را جدا می‌کنیم.

۱ - یک لوپ استریل به حجم یک میکرولیتر را به داخل لبهٔ جلویی جراحات پوستی قرار دهید. اگر تعدادی از فلسها را به‌صورت آسپتیک از لبهٔ جراحت بردارید، مفید خواهد بود زیرا مطمئن خواهید شد که نمونه‌برداری از لبه جراحت صورت گرفته است. باوجوداین، معمولاً این امر نیاز نخواهد شد.

۲ - فوراً مواد موجود بر روی لوپ را به یک ناحیهٔ ۴ میلی‌متر مربعی در حاشیهٔ محیط کشت تلقیح کنید.

۳ - با استفاده از یک کولتورت مینی‌تیپ فوراً ناحیهٔ تلقیح شده را بر روی نیمی از محیط کشت به‌صورت سوآب بکشید. سپس گسترش را بر روی ربع محیط کشت و درنهایت، بر روی ربع آخر بکشید. این روش همیشه منجر به جدا شدن پرگنه‌های منفرد می‌شود و همچنین به شما امکان می‌دهد که تعداد باکتری‌های موجود در جراحت را تخمین بزنید.

اسکن‌کردن سریع برای تعیین حساسیت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها

عفونت‌های باکتریایی ممکن است به‌سرعت در داخل یک جمعیت گسترش یابند. لذا ضروری است که هر چه سریع‌تر ماهی را با یک آنتی‌بیوتیک مناسب درمان کنیم، زیرا یک فاصلهٔ یک یا دو روزه ممکن است فاصله‌ای بحرانی باشد. بنابراین، مفید خواهد بود که سریعاً آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها را انجام دهیم. این آزمایش تنها یک آزمایش کیفی است و نمی‌تواند جایگزین ارزیابی حساسیت دقیق شود. یک روش ساده‌شده برای تعیین حساسیت باکتریایی به شرح زیر است (نوگا، ۲۰۱۰):

۱. نوک یک سوآب استریل را با محلول نمکی (سالین) استریل مرطوب کنید (آب غلیظ شده بر روی سرپوش محیط کشت باکتریایی استریل را می‌توان در صورت آلوده نبودن مورداستفاده قرار داد).

۲. یک پرگنهٔ باکتریایی منفرد را با نوک سوآب برداشته و آن را به‌صورت مساوی و یکنواخت بر روی سطح محیط کشت پخش‌کنید.
۳. از یک پنس استریل استفاده کرده و به‌طور یکنواخت، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را بر روی سطح آگار قرار دهید. مطمئن شوید که دیسک‌ها به‌طور ثابت بر روی آگار قرارگرفته‌اند.
۴. سرپوش محیط کشت را بر روی آگار قرار دهید و اجازه دهید که به مدت چند دقیقه بماند تا مطمئن شوید که دیسک‌ها چسبیده‌اند. سپس به‌دقت محیط کشت را برگردانید و در انکوباتور قرار دهید.
۵. وجود یک ناحیهٔ ممانعت کننده به‌اندازه ۱۵ تا ۱۶ میلی‌متر، نشان‌دهندهٔ وجود مقاومت است. عوامل بیماری‌زای حساس ماهی مشخصاً واجد ناحیهٔ شفاف (روشن) به اندازهٔ حداقل ۲۰ میلی‌متر هستند. این نتایج بسته به نوع دیسک و یا آنتی‌بیوتیک مورداستفاده، متفاوت است. توصیه می‌شود که ۳ تا ۴ نمونهٔ جداشده مورد آزمایش قرار گیرند.

تصویر ۶-۱۳: قزل‌آلای آلوده به عفونت آئروموناس های متحرک. به مخرج قرمز و متورم توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۴: ماهی طلایی (از منظر شکمی). خونریزی‌های پتشی و پرخونی یا خونریزی در قاعده باله‌ها (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۵: ماهی آزاد مبتلابه بیماری فورونکولوزیس. زخم‌های پوستی تیپیک (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

تصویر ۶-۱۶: ماهی طلایی با زخم‌های نسبتاً کم‌عمق و خاکستری بر روی سر در اثر آئروموناس سالمونیسیدا (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۷: طحال هایپرتروفی (بزرگ) شده یک ماهی باس دریایی اروپایی با گرانولوماهای (گره‌های) چندکانونی ناشی از مایکوباکتریوم مارینوم (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۸: بیماری باکتریایی پیسی ریکتزیوزیس. تصویر درشت بینی جراحات کبد در یک ماهی آزاد. به کانون‌های سفیدرنگ متعدد توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۱۹: ماهی آزادی که شکم آن باز و امعاواحشای آن خارج‌شده و ندول‌های (گره‌های) سفیدرنگ موضعی ناشی از بیماری باکتریایی کلیه (رنی باکتریوم سالمونینارروم) آشکار شده است (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

تصویر ۶-۲۰: گربه‌ماهی مبتلابه باکتری ادواردزیلا تاردا. به فیستول (سوراخ) بر روی پهلو (در زیر باله سینه‌ای) و خونریزی بر روی بدن توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۲۱: ماهی باس راه راه دورگه مبتلا با استرپتوکوکوزیس. به خونریزی گسترده بر روی بدن توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

فنون قارچ‌شناسی در ماهیان

مقدمه

کلمهٔ مایکوز[1] (یا مایکوتیک)[2]، از واژهٔ یونانی مایکس[3] به معنای قارچ گرفته‌شده است. کلمهٔ فونجی[4] نیز که گاهی اوقات در متون از آن استفاده می‌شود، کلمه ای لاتین به معنای قارچ است. به‌طورکلی، قارچ‌ها به دودسته تقسیم می‌شوند: گندیده خوارها[5] (قارچ‌هایی که از موجودات مرده یا مواد آلی تغذیه می‌کنند) و قارچ‌های انگلی (قارچ‌هایی که غذای خودشان را از موجود زندهٔ دیگر به دست می‌آورند). ازآنجاکه بیشتر قارچ‌های گندیده خوار، انگل اختیاری هستند و بیشتر قارچ‌های انگلی نیز گندیده خوار اختیاری به‌حساب می‌آیند، لذا مسائل مربوط به بیماری‌های قارچی بسیار پیچیده است. همهٔ قارچ‌ها در یک‌چیز مشترک هستند و آن، نوع تغذیه است، زیرا همگی هتروتروف[6] هستند (یعنی موجوداتی هستند که برای رشد و تولیدمثل به مواد آلی نیاز دارند). همین خصوصیت، قارچ‌ها را از گیاهان سبز مجزا می‌کند. به‌عبارت‌دیگر، قارچ‌ها برخلاف گیاهان، قادر به ساختن مواد غذایی خود نیستند.

قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها موجودات پیچیده‌تری هستند. هر سلول قارچ دارای یک یا چند هسته است، ولی اندازهٔ این هسته یا هسته‌ها کوچک است. دیوارهٔ سلولی قارچ حاوی سلولز، کیتین و کالوز[7] است و در سرتاسر این دیواره، قابلیت جذب مواد غذایی وجود دارد. سلول قارچ در اطراف

1. Mycosis
2. Mycotic
3. Mykes
4. Fungi
5. Saprobes
6. Heterotrophic
7. Callose

خود، آنزیم‌های گوارشی ترشح می‌کند. بدین ترتیب، در مواد آلی موجود در محیط تغییر به وجود می‌آورد و درنهایت، آن‌ها را به مواد غذایی قابل‌جذب تبدیل می‌کند.

ساختار بدن قارچ‌ها، تقریباً از گونه‌ای به گونه دیگر، از جنسی به جنس دیگر و به‌ویژه از خانواده‌ای به خانوادهٔ دیگر متغیر است. بعضی از موجودات قارچی کامل، از یک سلول منفرد تشکیل شده‌اند (مانند مخمرها). قارچ‌های دیگر، از تعدادی سلول که به‌صورت رشته یا هایفه[1] به هم اتصال دارند، تشکیل شده‌اند. این رشته‌ها یا هایفه‌های قارچی، در جهت‌های مختلف انشعاباتی به وجود می‌آورند. بدین ترتیب، تودهٔ درهم‌پیچیده‌ای از رشته‌ها ایجاد می‌شود که آن را میسلیوم یا تالوس[2] می‌نامند. سلول‌های تشکیل‌دهندهٔ یک هایفه از یکدیگر مجزا هستند. حال اگر این سلول‌ها مشخصاً از یکدیگر مجزا دیده شوند، هایفه را دیواره‌دار[3] و هنگامی‌که دیوارهٔ بین سلول‌ها دیده نشود، هایفه را بدون دیواره[4] می‌نامند. در حقیقت، در هایفه‌های بدون دیواره تیغه سلولی وجود دارد، ولی بسیار ظریف و سوراخ‌دار است و به همین علت، آن را نمی‌توان دید.

تولیدمثل قارچ‌ها به‌صورت جنسی یا غیرجنسی است. در هر دو حالت، قارچ‌ها در مرحله‌ای از چرخهٔ زندگی خود، هاگ[5] تولید می‌کنند که به علت داشتن تاژک، زئوسپور[6] نامیده می‌شود. این هاگ‌ها عامل اصلی انتقال قارچ در محیط هستند. در تولیدمثل غیرجنسی (که گاهی اوقات تکثیر سوماتیک[7] یا رویشی[8] نامیده می‌شود)، یک سلول بدون دخالت سلول‌های دیگر تکثیر می‌یابد، ولی در تولیدمثل جنسی، هسته‌های دو سلول دخالت دارند. هایفه تولیدمثلی[9] را هایفهٔ بارور نیز[10] می‌نامند که حاوی واحدهای تولیدمثلی (معمولاً شامل هاگ‌ها) هستند. در قارچ‌های انگلی و قارچ‌های انگل اختیاری، هاگ‌هایی که از ساختارهای تولیدمثلی آزاد می‌شوند، هرکدام یک واحد آلوده‌کنندهٔ محیط به‌حساب می‌آیند. این هاگ‌ها در برابر حرارت، خشکی، مواد ضدعفونی‌کننده و مکانیسم‌های دفاعی بدن میزبان مقاوم هستند.

در بیشتر قارچ‌ها، رشتهٔ میسلیومی که از تودهٔ اصلی قارچ جدا می‌شود، قادر به تولیدمثل غیرجنسی رویشی است. بدین ترتیب، این میسلیوم رشد خود را در شرایط مساعد در سطح و یا داخل بدن میزبان ادامه می‌دهد.

---

1. Hyphae
2. Thallus
3. Septate hyphae
4. Aseptate or non septate
5. Spore
6. Zoospore
7. Somatic
8. Vegetative
9. Reprpductive hyphae
10. Fertile hyphae

طبقه‌بندی قارچ‌ها، در تشـخیص بیماری‌های قارچی ماهی بسـیار حائز اهمیت اسـت و بر پایهٔ چرخهٔ زندگی، ریخت‌شـناسـی هایفه، ریخت‌شناسی واحدهای تولیدمثلی و نوع هاگ‌های تولیدشده در قارچ اسـتوار اسـت. نام‌گذاری علمی و طبقه‌بندی قارچ‌ها انجام‌شـده اسـت و هنوز در بعضـی از قسـمت‌ها ادامه دارد. البته در این تقسـیم‌بندی، ابهاماتی وجود دارد و علت آن نیز تفسـیر شـخصی محققان مختلف از ریخت‌شناسی، فیزیولوژی و اطلاعات ژنتیکی قارچ‌های معین و یا به خاطر ناقص بودن دانش مربوط به این موجودات است.

جنس‌ها و گونه‌های نسـبتاً محدودی از قارچ‌ها می‌توانند در ماهیان ایجاد بیماری کنند. مواردی از این بیماری‌ها، به‌صورت همه‌گیری و یا به شکل نادر گزارش شده است.

عـامـل بیماری‌های قارچی در ماهیان، از گروه قارچ‌های گندیده‌خوار اختیاری هسـتند. معمولاً شـرایط نامطلوب محیطی، سوءتغذیه یا بیماری‌های اولیهٔ دیگر، زمینه‌ساز بروز بیشتر همه‌گیری‌های قارچی به‌حسـاب می‌آیند. در اینجا، بیماری‌های قارچی متداول، انتخاب و موردبحث قرارگرفته‌اند. این قارچ‌ها، مثال‌های خوبی برای نشـان دادن پیچیدگی قارچ‌های بیماری‌زا، چگونگی تولید بیماری توسط این قارچ‌ها و نحوهٔ اثر آن‌ها بر روی میزبان هستند.

نمونه‌گیری برای قارچ‌ها

کشـت قـارچ در روش‌های متداول تشـخیص بیماری‌های ماهی کمتر اسـتفاده می‌شـود، زیرا متـداول‌ترین عوامل بیماری‌زای قارچی (اواومیسـت‌ها) را می‌توان بدون کشـت تشـخیص داد. باوجوداین، بعضی از بیماری‌های قارچی نادر برای تشخیص قطعی نیاز به کشت دارند. معمولاً کشت عوامـل قـارچی غیر از اواومیسـت‌ها انجام نمی‌شـود، مگر این‌که موجودات زندهٔ قارچی یا در لام مرطوب یا از طریق آسیب‌شناسی دیده شوند.

برای کشـت قارچ، باید تودهٔ کوچکی (تقریباً ۱۲ میلی‌متر مکعب) از بافت آلوده به قارچ را به محیط کشـت تلقیح کرد و سپس برای رشد در دمای اتاق قرار داد. ازآنجاکه رشد قارچ قابل‌ملاحظه اسـت (معمولاً در عرض چند روز صـورت می‌گیرد)، توصیه می‌شود که لبهٔ رشدیافتهٔ میسلیوم را به یک محیط کشـت تازه انتقال دهیم و این کار را با بریدن بخش کوچکی از آگار که حاوی حاشـیهٔ جلویی محل رشد است، انجام دهیم. این روش کمک می‌کند که هرگونه آلودگی باکتریایی را که به همراه نمونهٔ بافتی واردشده است، حذف کنیم.

در مورد قارچ‌های غیر اواومیسـت، سـابورو دکسـتروز آگار (SDA) محیط کشـت مناسب و در دسترس (ازنظر تجاری) و عمومی برای جداسازی تقریباً همهٔ این عوامل بیماری‌زاست. اگر مشکوک به وجود یک عامل بیماری‌زای قارچی غیر اواومیسـتی هسـتیم، نمونه‌های بافتی را باید به محیط

SDA شـــیب‌دار[1] تلقیح کرده و برای رشـــد در دمای اتاق قرار دهیم. باید هشـــیار بود که غالباً هاگ‌های قارچ‌ها با منشـأ هوا می‌توانند محیط‌های کشـت را آلوده کنند. بنابراین مطمئن شـوید که نوع قارچ جداشـده از کشت ازنظر ریخت‌شناسی شبیه نوع قارچی است که در جراحات وجود دارد. اگر قارچ بر روی SDA رشد نکرد، محیط‌های کشت اختصاصی دیگر را مورد آزمایش قرار دهید، یا نمونه‌ها را می‌توانید به یک آزمایشگاه اختصاصی ارسال کنید.

اواومیسـت‌ها را می‌توان در بهترین حالت، با اسـتفاده از آگار پودر ذرت، مخمر، یا محیط کشت فقیر از مواد مغزی دیگر جدا کرد تا از رشـــد باکتری‌های آلوده‌کننده ممانعت به عمل آید. معمولاً با این‌که اواومیسـت‌ها به‌راحتی جدا می‌شـوند، اما ممکن است کشت اواومیست‌ها از جراحات آلوده به باکتری دشـوار باشد، زیرا باکتری‌ها از رشد اواومیست‌ها، خصوصاً اشکال دیر رشد مانند آفانومیسس ممانعت می‌کنند. در جراحات بسـیار آلوده، اضافه کردن پنی‌سیلین (تقریباً ۵۰۰ واحد در میلی‌لیتر و یا اسـترپتومایسـین به میزان تقریباً ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) مفید واقع می‌شـود. باوجوداین، رشـد بعضـی از اواومیسـت‌ها (خصوصاً آفانومیسس) مشخصاً توسط آنتی‌بیوتیک‌ها ممانعت می‌شود، اما معمولاً رشـد سـاپرولگنیا و آکلیا، دوجنسـی که به‌طور متداول از ماهیان جدا می‌شـوند، به‌طور معنی‌دار ممانعت نمی‌شود.

تصویر ۶-۲۲: عفونت کپک آب (ساپرولگنیوزیس) در یک گربه‌ماهی روگاهی. به توده رشته‌های (هایفه های) بزرگ، سفید و کرک پنبه‌ای (این توده‌ها هنگامی‌که ماهی در آب است دیده می‌شوند) و همچنین به از بین رفتن رنگدانه‌های سیاه متعارف توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

1. Slants

تصـویر ۶-۲۳: لام مرطوب از عفونت کپک آب (سـاپرولگنیوزیس). هایفه ها (رشـته‌ها) وسـیع و فاقد دیواره هسـتنـد. زئوسـپورانژیوم هـا (هـاگـدان‌هـا) همیشـه در لام مرطوب جراحـات دیـده نمی‌شـونـد (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصـویر ۶-۲۴: قلب‌های ماهی منهادن با درجات مختلفی از ایکتیوفونوزیس. قلب متعارف در سمت چپ بالا دیده می‌شـود. به ندول های (دانه‌های) سـفیدرنگ متعدد و برآمده در تورم‌های مزمن توجه شـود. در موارد پیشرفته‌تر ملانیزه شدن (سیاه شدن) قابل‌ملاحظه مشاهده می‌شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۲۵: لام مرطوب از هاگ در حال زایش ایکتیوفونوس هوفری. معمولاً رشته‌های فاقد دیواره پس از مرگ ماهی شروع به رشد می‌کنند(اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰)

تصویر ۶-۲۶: یک تخم مرده و آلوده به کپک آب ماهی رنگین‌کمانی ماداگاسکار. رشته‌های (هایفه های) زیادی به درون و اطراف تخم رشد می‌کنند (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۲۷: تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در سینی انکوباتور. تخم‌های زنده به رنگ قهوه‌ای هستند، درحالی‌که تخم‌های مرده به خاطر رسوب پروتئین تخم به رنگ سفید دیده می‌شوند (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

فنون ویروس‌شناسی ماهیان

مقدمه

کلمهٔ ویروس اولین بار برای توصیف یک زهر[1]، سم یا عامل مضر محلول مورداستفاده قرارگرفته است. علت به کار بردن اصطلاح «پالایش‌پذیر[2]» برای این عوامل، این بود که مایع رویی حاصل از پالایش باکتری‌ها، ماده‌ای مضر بود و از صافی عبور می‌کرد. بعدها اصطلاح ویروس پالایش‌پذیر به

1. Poison
2. Filterable

کلمهٔ ویروس تغییر یافت و مورد استفادهٔ عموم قرار گرفت و عاقبت، مشخص شد که ویروس‌ها موجوداتی خاص هستند و با سم محلول یا زهر تفاوت دارند.

بیماری‌های ویروسی ماهیان حدوداً از سال ۱۹۶۰ موردمطالعه جدی قرارگرفته‌اند. البته باید در نظر داشت که ویروس‌هایی که در گیاهان و مهره‌داران عالی‌تر ایجاد بیماری می‌کنند، مدت‌ها قبل از این تاریخ، یعنی از سال ۱۸۹۲ موردبررسی واقع‌شده‌اند و در این فاصله، ویروس‌شناسان ماهی از موفقیت‌ها و شکست‌های ویروس‌شناسان قبل از خود استفاده کرده‌اند. بنابراین، پیشرفت در زمینهٔ بیماری‌های ویروسی ماهیان، بسیار سریع‌تر از بیماری‌های گیاهان و حیوانات خونگرم صورت گرفته است.

برای مطالعهٔ ویروس‌ها، لازم است از رهیافت‌هایی متفاوت ازآنچه که در مورد باکتری‌ها و یا قارچ‌ها وجود دارد، استفاده کرد. این امر تا حدودی با ماهیت ویروس‌ها و تا حدی نیز، با ساختار و فیزیولوژی آن‌ها در ارتباط است. کوچک بودن اندازهٔ این موجودات، سبب می‌شود که نتوان به‌راحتی آن‌ها را مشاهده کرد. باوجوداین، میکروسکوپ الکترونی این اجازه را به ما می‌دهد که ویروس‌ها را در بافت‌های آلوده مشاهده کنیم و این مشاهدات را برای تشخیص بیماری‌ها مورداستفاده قرار دهیم.

ویروس‌ها فاقد هسته یا اندامچه‌هایی هستند که در مطالعهٔ باکتری‌ها، قارچ‌ها و یا موجودات ریزبینی دیگر مشاهده می‌شود. ذرهٔ واحد ویروسی[1] یا ویریون، دستگاه‌های متابولیک برای بقا و تکثیر خود ندارد. ویروس‌ها برای تکثیر خود، به ساختارهای سازندهٔ سلول میزبان وابسته‌اند. به‌عبارت‌دیگر، ویروس‌ها انگل اجباری میزبان خود هستند.

همهٔ ویریون‌ها از اسید نوکلئیک تشکیل شده‌اند که به شکل ریبونوکلئیک اسید (RNA) یا دزکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) است و یک پوشش پروتئینی به نام کپسید، آن‌ها را در خود محصور کرده است. این کپسیدها، از مولکول‌های تکراری پروتئین (واحدهای ساختمانی) که اسید نوکلئیک ویریون را احاطه می‌کنند و یا از مجموعه‌ای از واحدهای ساختمانی که آن‌ها را کپسومر می‌نامند، به وجود می‌آیند. اسید نوکلئیکی که توسط کپسید احاطه شده است، نوکلئوکپسید خوانده می‌شود.

برخی از ویریون‌ها، پوشش پاکتی‌شکل[2] دارند که دور نوکلئوکپسید را پوشانده است. ویرون‌های دیگر، این پوشش را ندارند و به آن‌ها ویروس‌های برهنه[3] گفته می‌شود. پوشش ویروسی مذکور، از سلول‌های میزبان به دست می‌آید و حاوی چربی (لیپید) است. این پوشش‌ها، ویروس را در برابر

1. Single viral particle
2. Envelope
3. Naked viruses

درمان با حلال‌های شیمیایی، حساس می‌کنند. روش نام‌گذاری ویروس‌ها در طول این سالها، در جهت‌های متفاوتی پیش رفته است و در این راستا، شکل ویریون‌ها را نیز مورداستفاده قرار داده‌اند. تقریباً همهٔ ویروس‌های حیوانی، کروی یا میله‌ای شکل هستند. در این میان، نوکلئوکپسید تمام ویروس‌های کروی شکل، بیست‌وجهی است، درحالی‌که در ویریون‌های میله‌ای شکل، حالت مارپیچی و متقارن دارد.

گاهی اوقات تنظیم و قاعدهٔ نام‌گذاری ویروس‌ها بر اساس شکل آن‌ها، دچار اشکال می‌شود، زیرا بعضی از ویروس‌ها فاقد تقارن ۲۰ وجهی یا مارپیچی هستند. به این ویروس‌ها، کمپلکس یا دوتایی[1] می‌گویند. پاکس ویروس‌ها[2] از این دسته هستند. بسیاری از این ویروس‌ها به شکل آجر[3] هستند و در داخل آن‌ها، اندامک‌هایی به شکل غشاء با لایه‌های متعدد، از خارج، هسته‌ای را که از دو طرف محدب است، می‌پوشانند.

نام‌هایی که در ابتدا برای ویروس‌ها انتخاب می‌کردند، بر اساس منطقه‌ای بود که برای اولین بار بیماری را از آنجا گزارش و یا ویروس را از آن جدا می‌کردند. برای مثال، می‌توان ویروس اگتود[4] را نام برد که برای اولین بار نزدیک اگتود در ناحیه‌ای به نام جاتلند[5]، از ماهیان قزل‌آلا جدا شد و مثال دوم، در مورد طبقه‌بندی گروهی از ویروس‌هاست، که اولین عضو آن را از منطقه‌ای در نزدیکی کوکساکی نیویورک جدا کردند.

تاکنون هیچ روش رسمی برای طبقه‌بندی ویروس‌ها اتخاذ نشده است، اما رایج‌ترین روش، بر اساس نوع اسید نوکلئیک موجود در ویریون استوار است. برای مثال، می‌توان دو دستهٔ ریبوویروس‌ها یا دزاکسی ریبوویروس‌ها را نام برد. این دودسته، خود بر اساس نوع تقارن نوکلئوکپسیدها، برهنه یا پوشش‌دار بودن ویروس، تعداد رشته‌های اسید نوکلئیک، اندازه و شکل، تعداد کپسومرهای ویریون‌های ۲۰ وجهی و یا قطر مارپیچ ویروس‌های مارپیچی، به طبقه‌بندی‌های کوچکتری تقسیم می‌شوند. این تقسیم‌بندی، برای متخصصان بیماری‌های ماهی مناسب‌تر است، زیرا بسیاری از ویروس‌هایی که در ماهی ایجاد بیماری می‌کنند، با این روش بهتر طبقه‌بندی می‌شوند.

روش‌های نگهداری ویروس‌ها در خارج از بدن میزبان، در اوایل قرن اخیر کشف شد و توسعه یافت و برای نگهداری ویروس‌های انسان و مهره‌داران عالی‌تر دیگر مورداستفاده قرار گرفت. در همین راستا، روش کشت سلول که بر اساس آن، سلول‌های انسان یا حیوانات خونگرم آزمایشگاهی

---

1. Binal
2. Pox viruses
3. Brick-shape
4. Icosahedral
5. Egtved

را در محیط آزمایشگاه[1] (داخل شیشه) نگهداری می‌کنند، از سال ۱۹۵۰ متداول شد. استفاده از تیرهٔ سلولی[2] بافت‌های ماهیان برای بررسی بیماری‌های ماهی، در دههٔ ۱۹۵۰ روش آزمایشگاهی کم‌وبیش تازه‌ای بود. تا آن زمان، هیچ تیرهٔ سلولی[3] استانداردی وجود نداشت، اما پس‌ازآن، متخصصان بیماری‌های ماهی تلاش کردند تا اندام‌های مشخصی از بدن ماهی را برای تهیهٔ لایه‌های سلولی[4] استفاده کنند. روش کار بسیار دشوار و تا حدی متغیر و بی‌ثبات بود. معمولاً سلول‌ها را بر روی شیشه‌های پوشش‌دار به‌صورت طولی رشد می‌دادند و سپس با زحمت زیاد در داخل لوله‌های کشت می‌خواباندند و این لوله‌ها را به طرق گوناگون، بر روی قفسه‌ها به حالت تعادل قرار می‌دادند. در سال ۱۹۶۰، هنگامی‌که تحقیقات بر روی ویروس‌های ماهی در حال گسترش بود، یک تیرهٔ سلولی استاندارد از سلول‌های غدد جنسی قزل‌آلای رنگین‌کمان تهیه شد و مورداستفاده قرار گرفت، اما تا سال ۱۹۸۰، تعداد تیره‌های سلولی حاصل از ماهیان استخوانی که در دسترس ویروس‌شناسان ماهی قرار گرفت، متجاوز از ۶۰ تیره بود و هرساله، تیره سلولی جدیدی تهیه و مورداستفاده قرار می‌گرفت. بعضی از تیره‌های سلولی پس از صدها پاساژ[5] تهیه می‌شد و فقط از طریق کلکسیون کشت سلولی آمریکا واقع در بتسدای ماریلند امکان دستیابی به آن‌ها وجود داشت. بعدها ظروف شیشه‌ای و پلاستیکی بهتری اختراع شد و برای رشد لایه‌های سلولی و مطالعهٔ ویروس‌ها مورداستفاده قرار گرفت.

روش‌های جدا کردن و شناسایی ویروس‌ها هنوز هم درحال‌توسعه و تکامل است. در بسیاری از روش‌ها، از لایه‌های کشت سلول که به آسیب سلولی ناشی از ویروس‌ها حساس هستند، استفاده می‌شود. برای این منظور، ویروس را رقیق و به لایه‌های سلولی تزریق می‌کنند و از طریق انهدام موضعی سلول‌ها و تشکیل پلاک، جمعیت ویروس را مورد ارزیابی قرار می‌دهند و سپس، حدت آن را می‌سنجند. همچنین، از بعضی از ویروس‌های ماهی سرم‌های ضد[6] تهیه‌شده است و برای شناسایی ویروس‌های معین از روش خنثی‌کنندگی سرم[7] استفاده می‌کنند.

روش پادتن‌های درخشان (فلورسنت آنتی‌بادی)[8] نیز در حال بررسی است، اما مشکل اساسی در این زمینه، خالص کردن پروتئین پادتن حاصل از ویروس برای اتصال با مواد فلورسنت است.

---

1. In vitro
2. Cel line
3. Cell sheet
4. Un certain
5. Passage
6. Antiserum
7. Serum neutralization technique
8. Fluorescent antibody

پیشگیری و کنترل بیماری‌های ویروسی، خصوصاً در بین ماهیان پرورشی، کاری بسیار دشوار است، زیرا هیچ آنتی‌بیوتیک یا ترکیب شیمیایی دیگری برای متوقف کردن رشد ویروس و یا کشتن آن وجود ندارد. لذا استفاده از روش‌های آزمایش و کشتار، قرنطینه و محدود کردن نقل‌وانتقال، رعایت بهداشت و ضدعفونی، تنها راه کنترل بیماری‌های ویروسی در ماهیان است. یکی از بزرگترین مشکلات در زمینهٔ کنترل این نوع بیماری‌ها، تعیین حامل‌های ویروس در بین جمعیت ماهیان کارگاه پرورشی است. در بین مهره‌داران عالی‌تر، کنترل بعضی از بیماری‌های ویروسی، با استفاده از واکسن امکان‌پذیر است، اما این روش، برای کنترل بیماری‌های ویروسی در ماهیان، به‌طور محدود مورداستفاده قرارگرفته است. باوجوداین، امروزه تحقیقات وسیعی در زمینهٔ استفاده گسترده‌تر از واکسن‌ها صورت می‌گیرد.

فهرست اسامی بیماری‌های ویروسی ماهیان در حال افزایش است. بعضی از این بیماری‌ها، ارزش اقتصادی و بعضی نیز ارزش زیست‌شناختی دارند. در اینجا بیماری‌هایی که مطالعات زیادی بر روی آن‌ها انجام گرفته است و یا بیشترین اهمیت را در بین ماهیان دارند، موردبحث و بررسی قرار می‌گیرند.

نمونه‌گیری برای ویروس‌ها

شناسایی قطعی عفونت‌های ویروسی، متکی به کشت سلول یا شناسایی عوامل بیماری‌زا از طریق آزمایش‌های ایمنی‌شناسی است. این روش‌ها بستگی به توانایی‌ها و قابلیت‌های پرسنلی دارد که در این فنون تخصص یافته‌اند. باوجوداین، استفادهٔ قابل‌اطمینان از این فنون، بستگی به تحویل نمونه‌ها با کیفیت خوب دارد. ویروس‌های مختلف ازنظر توانایی‌های لازم برای حفظ بقای خود در مقابل روش‌های ذخیره و نگهداری، با یکدیگر متفاوت هستند. توصیه‌های ویژه برای بیماری‌های ویروسی خاص، در مبحث مربوط به هر یک از این بیماری‌ها ارائه شده است. باوجوداین، معمولاً هنگامی‌که به وجود ویروسی مشکوک هستیم و عامل اختصاصی آن نامعین است، ماهی زنده بهترین نمونه برای تحویل به آزمایشگاه محسوب می‌شود. در غیر این صورت، ماهی را باید با یخ مرطوب یا یخ خشک فوراً با پست پیشتاز ارسال کرد. ماهیانی را که نمی‌توان فوراً به آزمایشگاه انتقال داد، باید در پایین‌ترین دمای ممکن منجمد کرد، اما در مورد بعضی از ویروس‌ها، بهترین حالت این است که نمونه‌ها را در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد ذخیره کنیم. خصوصاً اگر ممکن است روندهای آزمایشگاهی چند روز به طول انجامد.

بعضی از ویروس‌ها مانند ویروس IPN را می توان از طریق بسیاری از تیره‌های سلولی ماهیان استخوانی جدا کرد: RTG-2 (غدهٔ جنسی قزل‌آلای رنگین‌کمان)، FHM (قنات سرچربی)، BF-

2 (نوزاد ماهی آبشش آبی)، PG (غدهٔ جنسی اردک‌ماهی شمالی)، WF-2 (نوزاد ماهی وال آی)[1]، GE-4 (نوزاد ماهی گوپی)، SWT (جنین ماهی دم‌شمشیری)، GF-1 (بالهٔ ماهی بلواستریپ گرونت)[2]، CHSE-114 (جنین ماهی آزاد چینوک)، RBS (طحال قزل‌آلای رنگین کمان)، RTH-149 (هپاتوم قزل‌آلای رنگین کمان)، STE-137 (جنین قزل‌آلای سرپولادی)، ASH (قلب ماهی آزاد اقیانوس اطلس)، ASO (تخمدان ماهی آزاد اقیانوس اطلس) و احتمالاً تیره‌های سلولی دیگر را نیز می‌توان برای این منظور استفاده کرد. باوجوداین، RTG-2 و FHM تیره‌های سلولی انتخابی[3] هستند. برای اینکه تکثیر ویروس به بهترین وجهی صورت بگیرد، آن‌ها را در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری می‌کنند. روش متداول، به این صورت است که بافت مشکوک را در یک‌هاون له می‌کنند، به‌طوری‌که سلول‌ها پاره و ذرات ویروسی خارج شوند. برای راحتی کار، قبل از له کردن بافت به آن، سرم فیزیولوژی نمکی یا محیط کشت سلولی اضافه می‌کنند. سپس محلول به‌دست‌آمده را از صافی‌های ریز عبور می‌دهند، یا این‌که سانتریفوژ می‌کنند. بدین ترتیب، محلول فاقد باکتری یا محلول رویی را جدا می‌کنند. پس‌ازآن، برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها یا قارچ‌ها، یک ترکیب آنتی‌بیوتیک و قارچ‌کش به محلول اضافه می‌شود و سپس، محلول حاصله را به ورقهٔ سلولی تک‌لایه تزریق می کنند. ویروس در عرض ۴۸ ساعت بر روی ورقهٔ سلولی حساس، آثار آسیب سلولی[4] را ظاهر خواهد کرد.

وجود ویروس در بافت مشکوک و حتی مقدار آن را نیز می توان با استفاده از روش ایجاد پلاک[5] تعیین کرد. برای این منظور، عصارهٔ بافتی به‌دست‌آمده را مرتباً رقیق می‌کنند و یک بخش[6] از هر رقت به داخل بشقاب‌های حاوی لایهٔ سلولی حساس تزریق می‌شود. بدین ترتیب، تعداد پلاک‌های ایجادشده (PFU) [7] به ازای واحد حجم عصاره یا واحد وزن بافت را محاسبه می‌کنند. به دلیل وجود ویژگی‌های اختصاصی پلاک‌ها، شناسایی مقدماتی ویروس امکان‌پذیر خواهد بود.

برای تشخیص قطعی ویروس‌هایی مانند IPN، باید از آزمایش خنثی‌کنندگی سرم استفاده کرد. برای این امر، سرم ضد IPN را بر روی ورقهٔ سلولی می‌ریزند و اجازه می‌دهند تا پادتن‌ها جذب سلول‌ها شوند. سپس عصارهٔ سلولی ماهیان مشکوک به IPN یا ترشحات حاصل از ورقهٔ سلولی را که در آن، آسیب سلولی ظاهرشده است، به داخل ورقهٔ سلولی جدیدی که حاوی کمپلکس پادتن – سلول است، تزریق می‌کنند. در این حالت، اگر در داخل عصاره یا ترشحات مذکور ویروس IPN

1. Walleye fry
2. Blue striped grunt fin
3. Choice
4. Cytopathic effect
5. Plaquing - technique
6. Aliquot
7. Plaque- forming- unit

وجود داشــته باشــد، پادتن‌های ضــد IPNV، لایهٔ ســلولی مذکور را از آســیب ویروس در امان نگه می‌دارند، ولی ورقهٔ سلولی ای که حاوی سرم ضد IPN نباشد، دچار آسیب می‌شود.

روش پادتن‌های درخشــان (فلورســنت آنتی‌بادی) نیز برای شناسایی ویروس IPN مورداستفاده قرارگرفته اســت، اما نمی‌توان ازاین‌روش به‌طور مداوم اســتفاده کرد. خالص کردن پادتن IPNV از ســرم ضــد، قبل از الحاق به رنگ فلورسنت، مشکل بزرگی است که تاکنون مرتفع نشده است. روش غیرمســتقیم پادتن‌های درخشــان را نیز محققان مورد آزمایش قرار داده‌اند، اما این روش نیز توفیق اندکی به همراه داشته است.

روش تثبیت کمپلمان[1] نیز به‌طور گسترده قابل‌استفاده نیست. این روش برای تعیین و شناسایی ســویه‌های ســرم‌شــناسی IPNV، پس از مشاهدهٔ اثرات آسیب سلولی در کشت سلول کاربرد دارد. باوجوداین، روش مذکور در عرض ۲۴ ســاعت کامل می‌شــود. لذا می توان به کمک آن، بیماری را سریعاً تشخیص داد.

آشنایی با میکروسکوپ‌های الکترونی[2]

میکروســکوپ الکترونی عبوری (TEM)، یکی از ابزارهای مورداستفاده در فناوری‌ها و علوم مختلف ازجملــه نــانو فناوری اســت. یکی دیگر از ابزارهای بزرگ‌نمایی که در آن‌ها به‌جای پرتوهای نور، از الکترون اســتفاده می‌شــود،SEM است SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی) از ابزارهای مطالعه در نانوفناوری اســت که می‌تواند به شــیوه بمباران الکترونی، تصــاویری از اجســامی به کوچکی ۱۰ نانومتر تهیه کند. اســتفاده از این ابزار، آماده‌ســازی نمونه برای مطالعه و ...، نیازمند اطلاعاتی درباره امکانات، سازوکار، اجزا و چگونگی عملکرد آن است.

میکروسکوپ الکترونی گذاره[3] (TEM)

اســاس عملکرد میکروســکوپ الکترونی عبوری کــه بــه‌اختصــار به آن TEM گویند، مشــابه میکروســکوپ‌های نوری اســت، با این تفاوت که به‌جای پرتوی نور در آن از پرتوی الکترون استفاده می‌شــود. آنچه می‌توان با کمک میکروســکوپ نوری مشاهده کرد، بسیار محدود است؛ درحالی‌که با اســتفاده از الکترون‌ها به‌جای نور، این محدودیت از بین می‌رود. وضــوح تصویر در TEM هزار برابر بیشتر از یک میکروسکوپ نوری است.

---

1. Complement fixation test

۲ . اقتباس از سیستم جامع آموزش فناوری نانو (نسخه ۳).

3. Transmission Electron Microscope

با استفاده از TEM می‌توان جسمی به‌اندازه چند آنگستروم ($۱۰^{-۱۰}$ متر) را مشاهده کرد. برای مثال می‌توانید اجزای موجود در یک سلول یا مواد مختلف در ابعادی نزدیک به اتم را مشاهده کنید. برای بزرگ‌نمایی، TEM ابزار مناسبی است که هم در تحقیقات پزشکی، زیست‌شناسی و هم در تحقیقات مرتبط با مواد قابل‌استفاده است. درواقع TEM نوعی پروژکتور نمایش اسلاید در مقیاس نانو است که در آن پرتویی از الکترون‌ها از تصویر عبور داده می‌شود. الکترون‌هایی که از جسم عبور می‌کنند، به پرده فسفرسانس برخورد کرده، سبب ایجاد تصویر از جسم بر روی پرده می‌شوند. قسمت‌های تاریک‌تر بیان‌گر این امر هستند که الکترون‌های کمتری از این قسمت جسم عبور کرده‌اند (این بخش از نمونه، چگالی بیشتری دارد) و نواحی روشن‌تر، مکان‌هایی هستند که الکترون از آن‌ها عبور کرده است (بخش‌های کم چگال‌تر). وضوح این میکروسکوپ ۰/۲ نانومتر است که در حد اتم است (بیشتر اتم‌ها ابعادی تقریباً برابر ۲/۰ نانومتر دارند). با این نوع میکروسکوپ حتی می‌توان نحوه قرار گرفتن اتم‌ها در یک ماده را بررسی کرد. استفاده از این میکروسکوپ گران و وقت‌گیر است، چراکه نمونه باید در ابتدا به شیوه‌ای خاص آماده شود. لذا تنها در مواردی خاص از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده می‌کنند. از این میکروسکوپ برای تحلیل و آنالیز ریخت‌شناسی، ساختار بلوری (نحوه قرارگیری اتم‌ها در شبکه بلوری) و ترکیب نمونه‌ها استفاده می‌شود.

عملکرد میکروسکوپ: با کمک یک منبع نور در بالای میکروسکوپ، الکترون‌ها گسیل و منتشر می‌شوند. الکترون‌ها از تیوب خلأ میکروسکوپ عبور می‌کنند. در میکروسکوپ‌های نوری از عدسی‌های شیشه‌ای برای متمرکز کردن نور استفاده می‌شود، درحالی‌که در TEM از عدسی‌های الکترومغناطیسی استفاده می‌شود تا الکترون‌ها را جمع و متمرکز ساخته به‌صورت یک پرتوی باریک گسیل کند. این پرتوی الکترونی از نمونه عبور داده می‌شود. بسته به چگالی مواد، الکترون‌ها ممکن است از بخش‌هایی از جسم بگذرند و به صفحه فلورسانس برخورد کنند و تصویر سایه مانندی از نمونه‌ایجاد کنند که میزان تیرگی بخش‌های مختلف جسم به چگالی مواد در آن بخش‌ها وابسته است. هر چه جسم کم چگال‌تر باشد، تصویر تیره‌تر خواهد بود. این تصویر می‌تواند مستقیماً توسط اپراتور مطالعه شود و یا با کمک یک دوربین، تصویربرداری شود.

آماده‌سازی نمونه: همان‌طور که در بالا اشاره شد، آماده کردن نمونه نیز به‌دقت خاصی نیاز دارد که در ادامه به نحوهٔ آماده‌سازی نمونه برای مطالعه آن با TEM اشاره می‌شود. نمونه‌ای که می‌خواهید با TEM بررسی کنید، باید چگالی آن به حدی باشد که اجازه دهد تا الکترون‌ها تا حدی از آن عبور کنند. راه‌های مختلفی برای تهیه این نوع نمونه وجود دارد. می‌توانید برش‌های بسیار نازک از نمونه مدنظر تهیه کنید و آن را در یک پلاستیک، ثابت نمایند یا اینکه آن را منجمد

کنیـد. روش دیگر تهیـه نمونـه‌ایزولـه کردن نمونـه و مطـالعـه محلولی از مولکول‌ها یا ویروس‌های موردنظر با کمک TEM است.

تصویر ۶-۲۸: میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM

همچنین می‌توان نمونه را با روش‌های مختلف رنگ کرد و با اســـتفاده از نشـــانه‌گذاری، آن را مطالعه کرد. برای مثال، فلزات سنگین رنگ‌شده مانند اورانیوم و سرب، الکترون‌ها را به‌خوبی متفرق می‌کنند و کنتراسـت نمونه را در زیر میکروسـکوپ بهبود می‌بخشـند. در ادامه روش تهیه دو نمونه برای مطالعه آن‌ها با TEM آورده شده است:

تصویر ۶-۲۹: آماده‌سازی نمونهTEM

۱- تهیه برش با کمک مواد دربرگیرنده: مواد زیستی شامل مقادیری آب هستند. با توجه به این‌که برای استفاده در TEM باید کار در خلأ انجام شود، لازم است تا آب به‌گونه‌ای تبخیر و یا جداسازی شود (با کمک الکل یا استون) و درنهایت نمونه فیکس و ثابت می‌شود. حال نمونه در پلاستیکی محصور می‌شود (به شکل یک بلوک پلاستیکی سخت) و سپس برش‌های نازکی از آن به کمک چاقوی الماس مربوط به دستگاه اولترامیکروتوم (برای ایجاد برش‌های بسیار ظریف) تهیه می‌شود که تنها ۱۰۰-۵۰ نانومتر ضخامت دارند. برش‌های تهیه‌شده روی یک توری مسی قرار داده می‌شوند و با کمک فلزات سنگین رنگ می‌شوند. حال نمونه بافت آماده مطالعه با کمک پرتوی الکترونی TEM است.

۲- تهیه نمونه به روش رنگ کردن :در این روش از مواد ایزوله (که می‌توانند برای مطالعه باکتری‌ها و یا مولکول‌های ایزوله استفاده شوند) استفاده می‌شود، به این طریق که ابتدا محلول محتوای باکتری روی توری ریخته و با پلاستیک پوشانده می‌شود. محلول نمکی یک فلز سنگین (مانند اورانیوم یا سرب) به آن‌ها اضافه می‌شود. محلول نمکی فلز با مواد ترکیب نمی‌شود، اما هاله‌ای را در اطراف آن، روی توری تشکیل می‌دهد. نمونه به‌صورت یک تصویر منفی، هنگامی‌که با کمک TEM موردمطالعه قرار می‌گیرد، نمایان می‌شود.

تصویر ۶-۳۰: آماده‌سازی TEM برای مطالعات زیست‌شناختی

میکروسکوپ الکترونی نگاره[1] (SEM)

میکروسکوپ الکترونی نگاره که به آن یا به‌اختصار SEM می‌گویند، یکی از ابزارهای مورداستفاده در فناوری نانو است که با کمک بمباران الکترونی، تصاویر اجسامی به کوچکی ۱۰ نانومتر را برای مطالعه تهیه می‌کند. ساخت SEM سبب شد تا محققان بتوانند نمونه‌های بزرگ‌تر را به‌سادگی و با وضوح بیشتر مطالعه کنند. بمباران نمونه سبب می‌شود تا از نمونه، الکترون‌هایی به سمت صفحه

1. Scanning Elecron Microscope

دارای بار مثبت رها شود که این الکترون‌ها در آنجا تبدیل به سیگنال می‌شوند. حرکت پرتو بر روی نمونه، مجموعه‌ای از سیگنال‌ها را فراهم می‌کند که بر این اساس میکروسکوپ می‌تواند تصویری از سطح نمونه را بر صفحه کامپیوتر نمایش دهد. SEM اطلاعات زیر را در خصوص نمونه در اختیار می‌گذارد:

- توپوگرافی نمونه: خصوصیات سطوح
- مورفولوژی: شکل، اندازه و نحوه قرارگیری ذرات در سطح جسم
- ترکیب: اجزایی که نمونه را می‌سازند

نحوه عمل SEM : SEM وسیله‌ای است که به کمک آن می‌توان تصویر بزرگ‌تر از نمونه را با کمک الکترون‌ها (به‌جای نور) خلق کرد. پرتویی از الکترون‌ها با کمک تفنگ الکترونی میکروسکوپ تولید می‌شود.

تصویر ۶-۳۱: میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM

پرتوی الکترونی در خلأ به‌صورت عمودی از میکروسکوپ عبور می‌کند. سپس با عبور از میدان‌های الکترومغناطیسی و لنزهای ویژه به‌صورت متمرکز به نمونه تابانده می‌شوند. به‌محض برخورد پرتو با نمونه، الکترون‌ها و اشعه‌های ایکس از نمونه خارج می‌شوند.

تصویر ۶-۳۲: واکنش جسم در هنگام برخورد پرتو الکترونی با آن سپس آشکارسازها پرتوهای ایکس، الکترون‌های اولیه و الکترون‌های ناشی از برخورد الکترون‌های اولیه با جسم را جمع‌آوری می‌کنند و آن‌ها را به سیگنال مبدل کرده به صفحه‌نمایش (مانند صفحه تلویزیون) منتقل می‌کنند و به این طریق تصویر نهایی تهیه می‌شود.

آماده‌سازی نمونه: قبل از هر کار باید آب از نمونه جدا شود، زیرا آب در خلأ تبخیر می‌شود. تمامی فلزات رسانا هستند، لذا نیازی به آماده‌سازی آن‌ها برای تهیه تصویر با SEM نیست. موادی که جزء دسته فلزات نیستند، باید به‌وسیله یک لایه‌نازک رسانا پوشانده شوند. این کار به کمک ابزاری به نام پوشش‌دهنده انجام می‌شود که برای این کار از میدان الکتریکی و گاز آرگون استفاده می‌شود. برای این کار نمونه در یک محفظه خلأ قرار داده می‌شود و گاز آرگون و میدان مغناطیسی سبب می‌شوند که الکترون از آرگون جداشده و سبب شوند تا اتم‌ها بار مثبت داشته باشند. یون‌های آرگون توسط فویل طلای دارای بار منفی جذب می‌شوند. یون‌های آرگون به اتم‌های طلای سطح فویل طلا برخورد می‌کنند. این اتم‌های طلا روی سطح نمونه قرار می‌گیرند و سبب ایجاد یک پوشش رسانا از طلا بر سطح نمونه می‌شوند.

مفاهیم کشت سلول[1]

کشت سلول فرایندی است که در آن سلول‌ها در شرایط کنترل‌شده رشد می‌کنند که به‌طورکلی خارج از محیط طبیعی خودشان است. در عمل، واژه کشت سلول امروزه به کشت سلول‌های مشتق شده از یوکاریوت پرسلولی، به‌ویژه سلول‌های حیوانی اشاره دارد، درحالی‌که دیگر انواع کشت‌ها، سلول‌های بافت گیاهی، قارچ و میکروب‌ها را رشد می‌دهند. توسعه تاریخی و روش‌های کشت سلول با کشت بافت و کشت اندام ارتباط تنگاتنگی دارد. کشت ویروس نیز با سلول‌های میزبان ویروس، مرتبط است. این روش آزمایشگاهی حفظ خطوط سلول زنده (جمعیتی از سلول‌های فرود

---

۱. اقتباس از سامانه مرکز مطالعات و توسعه پژوهش های زیست فناوری

آمده از یک تک‌سلولی و حاوی ساختار ژنتیکی مشابه) که جداشده از منبع بافت اصلی خودشان هستند، در میانه قرن بیست قوی‌تر شد.

نگهداری سلول‌ها در محیط کشت

برای اکثریت سلول‌های اولیه جداشده از بافت، این سلول‌ها تحت تأثیر روند پیری قرار می‌گیرند و تقسیمات سلولی آن‌ها بعد از تعداد معینی متوقف می‌شود، مگر اینکه حیات آن‌ها حفظ شود. سلول‌های رشد کرده در دمای مناسب و مخلوط گازی نگهداری می‌شوند. در انکوباتور سلولی، شرایط کشت برای انواع مختلف سلول‌ها بسیار متفاوت است و اختلاف شرایط برای انواع خاصی از سلول‌ها ممکن است منجر به ایجاد فنوتیپ‌های خاصی شود.

گذشته از دما و مخلوط گازی، معمول‌ترین عامل متنوع در کشت، محیط رشد سلول است. دستورالعمل محیط‌های رشد می‌تواند در pH، غلظت گلوکز، فاکتورهای رشد و حضور دیگر مواد مغذی متفاوت باشد. معمولاً رشد به‌عنوان مکمل محیط، از سرم خون حیوانات مانند سرم جنین گاوی به‌دست‌آمده‌اند (سرم گوساله، سرم اسب، سرم خوک). یکی از پیچیدگی‌های عناصر خون مشتق شده پتانسیل و توانایی آن‌ها برای آلوده کردن کشت توسط ویروس‌ها یا پریون‌ها، خصوصاً در کاربردهای زیست‌فناوری پزشکی است. چگالی (تعداد سلول‌ها در هر واحد حجم محیط کشت) نقش اساسی برای بعضی از انواع سلول‌ها ایفا می‌کند. برای مثال چگالی پایین باعث می‌شود سلول‌های گرانولوزا محصولات استروژنی ایجاد کنند، درحالی‌که چگالی بالاتر باعث ظهور محصولات پروژسترونی درپوشش سلول‌های تکا می‌شود. سلول‌ها همچنین قادر به رشد در سوسپانسیون یا کشت‌های پایبند[1] نیز هستند. بعضی سلول‌ها به‌طور طبیعی در سوسپانسیون زنده می‌مانند بدون اینکه به هیچ ماده خارجی (خارج سطح سلول) اتصال یابند، مانند سلول‌های موجود در جریان خون. همچنین تعدادی رده سلولی موجود است که مورد دست‌کاری قرارگرفته تا توانایی زنده ماندن در کشت‌های سوسپانسیونی را پیدا کنند؛ بنابراین این رده‌های سلولی می‌توانند در چگالی‌های بالاتر از شرایط کشت مداوم نیز رشد کنند. رده‌های سلولی مداوم نیازمند سطحی مانند کشت بافت پلاستیک یا ریزناقلین[2] هستند که ممکن است با یک غشای خارج سلولی پوشیده شده باشد (مانند کلاژن و لامینین)، اجزایی که باعث افزایش ویژگی‌های چسبندگی می‌شوند و دیگر سیگنال‌های موردنیاز برای رشد را مهیا می‌کنند.

---

1. Adherent
2. Microcarrier

تصویر ۶-۳۳: کشت سلول در یک ظرف کشت بافت ویژه

امکانات و تجهیزات اصلی در کشت سلول

برخی تجهیزات و تکنیک‌های خاص جهت نگهداری کشت‌های سلولی موردنیاز است. درواقع داشتن این امکانات بیشتر به معنای انجام هر چه بهتر فرآیند کشت سلول است.

محیط کار استریل: برای انجام کارهای مربوط به کشت سلول باید تا جایی که امکان دارد یک اتاق جداگانه در نظر گرفته شود. این اتاق باید عاری از هرگونه شلوغی بوده و در صورت امکان از یک تهویه هوای فیلتر شده در محیط کار برخوردار باشد. یک فیلتر هوای[1] HEPA می‌تواند چنین محیطی را فراهم آورد. بافت اولیه حیوانی و میکروارگانیسم ها نباید در نزدیکی آزمایشگاه کشت سلول کشت شوند و باید یک آزمایشگاه جداگانه و اختصاصی برای کار کشت سلول به‌صورت استریل طراحی شود. پوشش‌های مخصوص آزمایشگاه کشت سلول باید در ورودی آزمایشگاه پوشیده شده و لباسی که از این محیط خارج می‌گردد نباید مجدداً وارد آزمایشگاه شود. در صورت نیاز به استریلیتی شدید یک هود لامینار جهت حفظ بهتر از شرایط استریل پیشنهاد می‌گردد. در صورت استفاده از یک ماده شیمیایی خطرناک باید از هودهای ورتیکال یا عمودی استفاده شود. به‌هرحال برای کشت‌های اولیه و درحالی‌که هیچ‌گونه هود لامینار یا اتاق استریل در دسترس نیست باید یک فضای استریل جهت انجام کار در نظر گرفت. اگر شیوه‌های سترونی یا استریلیزاسیون به‌درستی رعایت گردد و نظافت و نظم محیط حفظ شود، می‌توان تا حدی از محیط کار استریل آسوده‌خاطر بود.

تمام سطوح کار، میزها و قفسه‌ها و هود لامینار باید به‌طور مرتب با اتانول ۷۰٪ یا یک پاک‌کننده جایگزین به‌درستی پاکیزه و استریل گردند. درصورتی‌که هود لامینار یا فیلترهای هوا در

1. High Efficiency Particle Air Filter

محیط کار وجود نداشت، کار کشت می‌تواند بر روی یک میز تمیز با کمک شعله آتش جهت استیل نمودن سطح کار و هوای اطراف آن انجام گردد.

وسایل انکوباسیون: علاوه بر فیلترهای هوا و هود لامینار و میزهای کاری که تمیز کردنشان به‌راحتی صورت می‌گیرد، آزمایشگاه کشت سلول به یک انکوباتور برای نگهداری سلول‌ها در دمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد هم نیاز خواهد داشت. دمای انکوباسیون به نوع سلول‌های کشت‌شده بستگی دارد. سلول‌های حشرات در دمای حدود ۳۰ درجه بهترین رشد خود را دارند، درحالی‌که سلول‌های پستانداران به دمای حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد نیاز دارند. استفاده از انکوباتورهایی که برای فراهم کردن CO_2 از یک منبع اصلی یا سیلندر گاز استفاده می‌کنند ضروری به نظر می‌رسد، چراکه هوای درون انکوباتور باید همیشه بین ۲ الی ۵٪ CO_2 داشته باشد.به‌طورکلی، لاین‌های سلولی بسیاری قادرند در اتمسفری حاوی ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO_2 و با رطوبت نسبی ۹۹٪ قابلیت زنده ماندن خود را حفظ نمایند. غلظت CO2باید در تعادل با کربنات سدیم محیط کشت باشد. محیط کشت‌های مختلف ظرفیت بافری متفاوتی دارند. درصورتی‌که یک انکوباتور مجهز به CO_2 در دسترس نباشد به‌طور موقت می‌توان کشت‌ها را در یک فلاسک غیرقابل نفوذ حفظ نمود به این شکل که می‌بایست پس از گازدهی با CO_2 فلاسک‌ها را به کمک نوار پارافیلم به‌خوبی مهروموم نمایید.

همچنین ممکن است محیط کشت‌های مختلفی مورداستفاده قرار گیرند که نیازی به اتمسفر حاوی CO_2 نداشته باشند که در این حالت به انکوباتور مجهز به CO_2 نیازی نیست، برای مثال هپاتوسیت‌ها در کشت‌های اولیه خود در محیط کشت Leboviztz L-15 نگهداری می‌شوند که نیازی به CO_2 ندارد اما در این صورت نباید فلاسک‌های کشت مهروموم و نفوذناپذیر شوند، چون‌که هپاتوسیت‌ها به مقادیر بالای O_2 نیاز دارند و باگذشت زمان مقدار اکسیژن در محیط بدون گاز غیرقابل نفوذ کاهش می‌یابد. بیشتر لاین‌های سلولی در دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند اگرچه برخی کشت‌ها، ازجمله کشت‌های پوستی ممکن است به دمای پایین‌تری نیاز داشته باشند. سلول‌های کشت‌شده عموماً در دماهای پایین‌تر زنده می‌مانند، اما به‌ندرت دمای زنده ماندن آن‌ها بیش از ۲ درجه بالاتر از دمای نرمال است و بنابراین انکوباتور باید طوری تنظیم گردد که در دمای تقریباً ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد افزایش درجه حرارت را جهت جلوگیری از مرگ سلول‌ها قطع کند.انکوباتور ها طوری طراحی‌شده‌اند که یک درجه حرارت یکنواخت را تنظیم کنند، به‌عبارت‌دیگر درجه حرارت باید نهایتاً ۰/۵ ± درجه سانتی‌گراد در هر دمایی که تنظیم شده است تغییر کند؛ بنابراین انکوباتورهای مجهز به سیستم گردش هوا می‌تواند به یکنواختی هوا در انکوباتور کمک کرده و آن را حفظ کند.

تصویر ۶-۳۴: انکوباتور برای کشت ویروس.

یخچال و فریزر ۲۰-: هر دو این وسایل برای ذخیره محیط کشت مایع در ۴ درجه سانتی‌گراد و برای آنزیم‌ها (به‌طور مثال تریپسین) و برخی دیگر از محتویات محیط کشت (مانند گلوتامین و سرم) در ۲۰- درجه بسیار مهم و ضروری هستند. یخچال برای نگهداری محیط‌های کشت و بافر و فریزر برای ذخیره سرم قبل از تقسیم‌بندی، مواد مغذی و آنتی‌بادی‌ها موردنیاز خواهد بود. این مواد طبیعی برای ذخیره شدن به دمای ۲۰- نیاز دارند اما سلول‌ها برای ذخیره و نگهداری به نیتروژن مایع یا فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نیاز دارند.

میکروسکوپ: ازآنجاکه کشت در فلاسک‌ها یا پلیت‌ها انجام می‌گیرد، یک میکروسکوپ نوری معکوس موردنیاز خواهد بود. تشخیص تغییرات مورفولوژیکی در هر کشت بسیار حیاتی است چراکه این می‌تواند اولین نشانه ایجاد فساد در یک کشت باشد. یک میکروسکوپ نوری بسیار ساده با بزرگنمایی ۱۰۰× برای کار روزمره شمارش سلولی کافی خواهد بود، هرچند میکروسکوپی با کیفیت بهتر برای آنالیزهای کروموزومی یا کارهای رادیوگرافی خودکار موردنیاز است.

میکروسکوپ معکوس همچنین برای بررسی فلاسک‌ها و پلیت‌های چند خانه از قسمت زیری هر ظرف به کار می‌رود. هر دو نوع میکروسکوپ باید مجهز به لنزهای ۱۰× و ۲۰× بوده و برای میکروسکوپ‌های معمولی لنزهای ۴۰× ۱۰۰× نیز کاربرد دارند. تجهیزات اضافی ازجمله دوربین، دوربین ویدئویی CCD ، آداپتور و ملزومات دیگر و امکانات UV نیز برای اهداف دیگر موردنیاز هستند.

تصویر ۶-۳۵: بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها

ظروف کشت بافت: ظروف یک‌بارمصرف پلاستیکی برای انجام کشت انواع مختلفی دارند، اما معمول‌ترین آن‌ها ظروفی از جنس پلی استایرن می‌باشد. اگرچه تمام ظروف پلاستیکی یک‌بارمصرف برای کشت سلول باید به‌اندازه کافی رشد سلولی را فراهم آورند، اما حصول اطمینان از اینکه کشت در یک ظرف جدید هم قادر به رشد است یا خیر ضروری به نظر می‌رسد. آزمایشاتی که در این راستا صورت می‌گیرند، شامل منحنی‌های رشد و زمان رسیدن به یک لایه یکنواخت سلولی می‌باشد.

سلول‌ها می‌توانند در پتری دیش‌ها یا فلاسک‌هایی نگهداری شوند که مجهز به یک سری امکانات‌اند، ازجمله این‌که می‌توان فلاسک‌ها را با CO_2 گازدهی کرده و سپس آن‌ها را محکم بسته (غیرقابل نفوذ)، به‌طوری‌که نیاز به استفاده از انکوباتور CO_2 مرتفع گردد. این حالت خصوصاً زمانی که انکوباتور به‌خوبی کار نمی‌کند مفید خواهد بود. ظروف کشت سلول همیشه متناسب با روش کار انتخاب می‌شوند.گاهی ممکن است تعویض یک محیط کشت مصرف‌شده با یک محیط کشت دیگر ضروری باشد. انتخاب ظرف به چندین عامل بستگی دارد: آیا کشت در یک سوسپانسون است یا کشت به‌صورت تک لایه می‌باشد؟ عملکرد سلول، آیا کشت به CO_2 نیاز دارد یا نیاز ندارد؟ هزینه هم می‌تواند یک عامل محدودکننده باشد. عملکرد سلول متناسب با فضای سطح موجود است. تضمین رشد یک تک لایه سلولی یکنواخت در بسیاری موارد از اهمیت زیادی برخوردار است به‌خصوص در ظروف کشت چند خانه‌ای (۹۶،۴۸ یا ۲۴) خانه‌ای.

تصویر ۶-۳۶: پلیت‌های کشت سلول

شستشو و استریلیزه کردن وسایل: قابلیت دسترسی به طیف وسیعی از ظروف پلاستیکی کشت سلول لزوم شستشو را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داده است. به‌هرحال ظروف شیشه‌ای مثل پیپت‌ها باید در محلول شستشو دهنده خیسانده شوند و سپس فرآیند شستشو با خیساندن در آب مقطر به‌خوبی صورت گیرد. سپس فرآیند خشک‌کردن و استریلیزاسیون آن‌ها انجام‌شده به این شکل که مقداری پنبه در ورودی پیپت ها قرار داده و با کاغذ اتوکلاو آن‌ها را کاملاً محصور کرده و با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو کنید. همچنین ظروف شیشه‌ای مثل پیپت‌ها، فلاسک‌ها مخروطی و ارلن و بشرها (با یک پوشش آلومینیومی) در آون با دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت استریل می‌شوند. شاخص‌های استریلیزاسیون مانند چسب‌های استریلیتی (چسب اتوکلاو) برای هر دسته از وسایلی که استریل می‌شوند به‌منظور اطمینان از عملکرد مؤثر دستگاه‌های فوق ضروری می‌باشند. برای وسایلی که به‌صورت باز و بدون بسته‌بندی هستند از کیسه‌های اتوکلاو استفاده نمایید. فویل‌های آلومینیومی نیز مورد خوبی برای بسته‌بندی نمودن این وسایل جهت اتوکلاو هستند.

نیتروژن مایع/ فریزر (۷۰-): همواره چه برای لاین‌های سلولی که مکرراً تکثیر می‌شوند و چه لاین‌هایی که درنهایت از بین می‌روند، نمونه‌های از کشت جهت ذخیره‌سازی باید فریز شوند. این عمل به‌منظور ممانعت از جهش سلولی و محافظت از لاین سلولی در مقابل آلودگی و دیگر اتفاقات ناگوار صورت می‌پذیرد. فرآیند فریز کردن سلول‌ها عموماً برای تمامی انواع سلولی صورت می‌گیرد.

سلول‌ها باید در فاز تصاعدی رشد با یک نگهدارنده مناسب که معمولاً دی متیل سولفوکسید (DMSO) است فریز شوند. سلول‌ها معمولاً ابتدا چند ساعت در ۲۰- درجه قرار داده می‌شوند و سپس در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه فرو برده می‌شوند (در ویال‌های کوچک در بسته) یا اینکه در فاز گازی که در قسمت بالای مایع قرار دارد، نگهداری می‌شوند. مواردی از تخریب و مرگ سلولی در ۷۰- درجه مشاهده‌شده است، بنابراین اولویت استفاده از نیتروژن مایع است. ویال‌ها را می‌توان در یک جعبه پلی استایرنی با دیواره‌های ۱ اینچی فریز نمود.

روش اسمزی معکوس: تهیه یک آب دوبار تقطیرشده یا اسمز معکوس برای آماده‌سازی محیط کشت و شستشوی ظروف شیشه‌ای ضروری است. pH آب دوبار تقطیرشده باید مرتباً چک شود، چراکه در مواردی امکان تغییر درpH وجود دارد. تنوع در کیفیت آب مورداستفاده ممکن است سبب تغییراتی درنتیجه شود، بنابراین آبی که از یک منبع می‌آید باید مورداستفاده قرار گیرد. آب با اتوکلاو شدن در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل می‌شود. آب مقطر درصورتی‌که برای تهیه محیط کشت است باید در ظروف شیشه‌ای، استریل و نگهداری شود. نگهداری در ظروف پلاستیکی می‌تواند منجر به ورود مواد سمی از پلاستیک به درون آب گردد.

استریلیزاسیون فیلتری: محیط‌هایی که قابلیت اتوکلاو ندارند باید به‌واسطه عبور از یک فیلتر غشایی با قطر منافذ ۰/۲۲ استریل شوند. این فیلترها در اندازه‌ها مختلف به‌منظور فیلتراسیون طیف وسیعی از مواد با حجم‌های مختلف طراحی‌شده‌اند. این فیلترها می‌تواند به‌صورت یک‌بارمصرف و یا به‌صورت فیلترهایی باقابلیت اتوکلاو همراه با یک نگهدارنده مناسب خریداری شوند. محیط‌های کشت، آنزیم‌ها، هورمون‌ها، کوفاکتورها و بافرهای بیکربنات نمونه‌ای از این مواد غیرقابل اتوکلاو هستند.

تصویر ۶-۳۷: مراحل کشت سلول

امکانات شمارش سلولی: امکان ردیابی رشد سلول‌ها به‌صورت چشمی وجود ندارد، اما دقت هرچه بیشتر در شمارش سلولی برای اغلب اهداف آزمایشگاهی موردنیاز است. معمول‌ترین وسیله مورداستفاده جهت انجام شمارش سلولی، لام نئوبار هموسایتومتر است که اساساً برای شمارش سلول‌های خونی طراحی‌شده است. این لام ضخیم از یک سری خطوط عمودی و افقی به‌صورت مشبک تشکیل‌شده که میانگین تعداد سلول‌ها در ۴ خانه که خود از ۱۶ خانه کوچکتر تشکیل یافته‌اند، شمارش می‌شود. سوسپانسیون سلولی پس از پیپتینگ مناسب برای جدا شدن کامل سلول‌های چسبیده به هم در زیر لامل بر روی این لام لود می‌شود. پیپتینگ مناسب سوسپانسیون سلولی قبل از لود کردن بسیار اهمیت دارد، این کار به‌منظور دقت بیشتر و شکستن توده‌های سلولی به هم چسبیده که کار شمارش را با سختی مواجه می‌کند صورت می‌گیرد. تعداد سلول‌های شمارش‌شده در این خانه‌ها در ۱۰۴ نشان‌دهنده میزان سلول‌ها در هر میلی‌متر مکعب از سوسپانسیون است.

دیگر تجهیزات موردنیاز: علاوه بر وسایل و امکانات فوق تعداد دیگری از تجهیزات نیز برای انجام عمل کشت سلول مفید هستند. یک حمام آب گرم یا بن ماری و سانتریفیوژ برای انجام کار ضروری به نظر می‌رسد. یک پمپ مکشی جهت تسریع در مکش محیط کشت و مواد و جلوگیری از آلودگی مفید خواهد بود. پمپ باید به‌طور مناسبی مانع از بازگشت مایع به محیط شود. تجهیزات اضافی شامل پیپت های مدرج در سایزهای مختلف، لوله‌ها و فلکون‌های سانتریفیوژ، نگهدارنده های عمومی، پیپت های یک‌بارمصرف و بالن‌های پلاستیکی جهت استفاده با پیپت ها هستند. میکرو پیپت های دقیق یا سمپلر (حجم‌های ۱ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر) برای تیمار کشت‌ها با مواد شیمیایی مورداستفاده هستند. این میکروپیپت‌ها به‌صورت یک‌بارمصرف، قابل اتوکلاو و پلاستیکی موجود هستند. برای انجام آزمایشات اختصاصی نیز ممکن است به تجهیزات خاص دیگری نیاز باشد.

تصویر ۶-۳۸: تلقیح سلول‌ها در محیط کشت سلول.

تصویر ۶-۳۹: اشکال مختلف ویروس‌ها.

تصـــویر ۶-۴۰: انواع ژئومتری ویرون؛ A، B، C: ویریون بیســـت‌وجهی منظم که از محورهای دوتایی (A)، ســه‌تایی (B) و پنج‌تایی (C) دیده می‌شوند. D: تحت واحدهای فاقد پوشش با تقارن بیست‌وجهی؛ و E و F: تحت ساختارهای یک ویریون (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۴۱: انواع ویروس‌های آبزیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۴۲: ویروس نکروز لوزالمعده عفونی (IPN) از قزل‌آلای رنگین‌کمان واردشده از ژاپن. قطر ذرات ویروسی ۵۵ نانومتر است.

تصویر ۶-۴۳: نوزادان آلوده به ویروس نکروز عفونی بافت‌های خونساز (IHN) که خونریزی در کیسه زرده را نشان می‌دهد.

تصویر ۶-۴۴: خونریزی در اندام‌های داخلی اردک‌ماهی در اثر سپتی سمی هموراژیک ویروسی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۴۵: گربه‌ماهی روگاهی مبتلابه ویروس CCVD . به اتساع حفره شکمی (آب‌آوردگی یا آسیت) توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۴۶: گربه‌ماهی روگاهی مبتلابه ویروس CCVD . به ضایعات و زخم‌های ناحیه شکم توجه شود (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۶-۴۷: ماهی کفشک مبتلابه بیماری ویروسی لنفوسیستیس.

تصویر ۶-۴۸: جراحات لنفوسیستیس که گنجیدگی‌های دانه‌ای شکل حاصل از ذرات ویروسی را نشان می‌دهد.

تصویر ۶-۴۹: ذرات ویروسی بزرگ‌شده که ریخت‌شناسی تیپیک ایریدوویروس‌ها را نشان می‌دهد.

تصویر ۶-۵۰: علائم غیراختصاصی ماهی آلوده به ویرمی بهاره کپورماهیان شامل تورم شکم، خونریزی بر روی پوست، بافت چربی شکمی کیسه شنا و جاهای دیگر بدن.

تصویر ۶-۵۱: بیرون‌زدگی کره چشم زمانی بهتر قابل‌مشاهده است که از روبرو نگاه کرده و یک چشم را با چشم دیگر مقایسه کنیم. ماهی کوی مبتلابه بیرون‌زدگی یک‌طرفه ملایم در چشم‌چپ خود است.

تصویر ۶-۵۲: لای ماهی که علائم تخریش و خونریزی شدید پوست را نشان می‌دهد. بعد تشخیص داده شد که به یک رابدوویروس شـــبیه ویروس ویرمی بهاره کپورماهیان و ویروس آب‌آوردگی ســـر نوزاد اردک‌ماهی آلوده است و امروزه آن را به‌عنوان رابدوویروس لای ماهی می‌شناسند.

تصویر ۶-۵۳: ماهی کپوری که علائم ابله کپور را نشان می‌دهد. این بیماری ویروسی باعث ایجاد تکه‌هایی از هیپرپلازی اپیدرمی می‌شود.

تصویر ۶-۵۴: هرپس ویروس در بیماری آبله کپور که در مقایسه با ویروس لنفوسیستیس، ویریون‌های کوچکتر و پوشش‌دار مشاهده می‌شود.

تصویر ۶-۵۵: هرپس ویروس سالمونیس، بیست‌وجهی؛ فقط دو نوکلئوکپسید قابل‌مشاهده‌اند.

تصویر ۶-۵۶: تصویر الکترونی از ایریدوویروس سوف (پایک-پرچ)؛ تصاویر الف تا سی (ویریون‌ها با مقاطع بسیار ظریف؛ تصاویر دی تا ای، ویریون‌ها با رنگ‌آمیزی منفی؛ (مقیاس = ۱۰۰ نانومتر)؛ مقیاس تصویر بی در تصویر سی و مقیاس تصویر دی در تصویر ای نشان داده شده است. ذرات ویروسی یک پوشش به دست می‌آورند و این امر از طریق جوانه زدن از غشای پلاسمایی انجام می‌دهند (تصاویر بی و سی). ردیف منظمی از تحت واحدها پوشش ویروس را تشکیل می‌دهند.

فصل هفتم

فنون انگل‌شناسی آبزیان

مقدمه

بیماری‌های انگلی میزان قابل‌توجهی از حالات مریضـــی و مرگ‌ومیر در ســـراســـر دنیا را به خود اختصـاص می‌دهند و اغلب با نشانه‌ها و علائم غیراختصاصی آشکار می‌شوند. بیماری‌های انگلی را با معاینات فیزیکی به‌تنهایی نمی‌توان تشـخیص داد. ازاین‌رو، تحقیقات آزمایشگاهی برای مشخص کردن اینکه آیا بیمار به انگل آلوده شـده اسـت یا خیر و در صـورت آلودگی چه نوع انگلی دارد، ضـروری است. بدین ترتیب آزمایشگاه نقش مهمی در تشخیص بیماری‌های انگلی دارد و بنابراین، کلیدی برای انتخاب داروی مناسب جهت درمان است. سنجش‌های آزمایشگاهی باید کامل، دقیق و معتبر باشند، چون نتایج آن‌ها به ما در جهت تشخیص کمک می‌کند.

مطالعات متعددی بر روی انگل‌های ماهیان در ایران انجام‌شده است (ستاری و فرامرزی، ۱۳۷۵، ستاری و شفیعی، ۱۳۷۵؛ ستاری و همکاران، ۱۳۷۵، ۱۳۷۸، ۱۳۷۹، ۱۳۸۰، ۱۳۸۱، ۲۰۰۵، ۲۰۰۶، ۲۰۰۷، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹؛ بازاری مقدم و همکاران، ۱۳۸۱؛ جلیل پور و همکاران، ۱۳۸۱؛ شناور ماسوله و همکـاران، ۱۳۸۱، ۱۳۸۵؛ خارا و همکاران، ۱۳۸۳، ۱۳۸۴، ۱۳۸۵، ۱۳۸۶، ۱۳۹۰، ۲۰۰۵، ۲۰۰۷، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹، ۲۰۱۱، ۲۰۱۲، ۲۰۱۴؛ عبـدالله پور و همکـاران، ۱۳۸۳، معصـــوم زاده و همکـاران، ۱۳۸۵؛ انوری فر و همکـاران، ۲۰۱۴؛ دقیق روحی و همکـاران، ۲۰۱۴، ۲۰۱۵؛ موســـوی ثـابـت و همکاران، ۲۰۱۳؛ نظامی و همکاران، ۲۰۰۵؛ نوعی و همکاران، ۲۰۱۵).

ایمنی در آزمایشگاه[1]

قبل از پرداختن به‌روش‌های تشـخیصی و آزمایشگاهی، نکات ایمنی مربوط به محل کار که رعایت آن برای هر فرد و هر آزمایشـگاه الزامی اسـت بیان می‌شـود. وجود دستورالعمل مکتوب روش‌های آزمایشـگاهی که برای اسـتفاده کارکنان در دسـترس باشد؛ وجود دستورالعمل مربوط به‌روش‌های ایمنی که در آزمایشـگاه برای پی گیری در تمام زمان‌ها مورداستفاده قرار گیرند؛ پوشیدن روپوش سـفید و بلند، ترجیحاً مچ دار در هنگام کار و تعویض آن پس از خروج از آزمایشـگاه الزامی است. در پایان کار، پرسنل موظف به شستشوی دست خود پیش از ترک آزمایشگاه هستند.

انواع نمونه‌ها و روش کار با آن‌ها

هنگام کار با نمونه‌های آزمایشـگاهی باید کاملاً مراقب بود حتی‌الامکان از دسـتکش اسـتفاده شود. بسـیاری از بیماری‌ها از طریق خون منتقل می‌شـوند. بنابراین هنگام کار با نمونه‌های خون باید

1. Laboratory safety

تمامی آن‌ها را به‌عنوان منبع آلودگی در نظر گرفت. نمونه‌گیری، جمع‌آوری و کار با نمونه‌ها باید با دقت کافی همراه باشد. خطرات موجود شامل: صدمه و آسیب در اثر خراش یا بریدگی و آلوده شدن زخم یا خراش‌های پوستی و مخاطی است. اگر هنگام کار خون روی پوست ریخت باید ناحیه آلوده را فوراً با آب و صابون شست. در صورت پاشیدن خون به چشم باید هر چه سریع‌تر چشم را با آب شستشو داد. بررسی‌های آزمایشگاه انگل‌شناسی شامل مشاهده انگل، تخم کرم‌ها، نوزادان انگل، کیست یا تروفوزوآیت انگل، انجام آزمایش‌های سرم‌شناسی و مولکولی به کمک دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است. نمونه‌های مورداستفاده در آزمایشگاه انگل‌شناسی نیز شامل مدفوع، خون و مایعات فیزیولوژیک و زخم است.

روش‌های تشخیصی انگل‌های روده‌ای

آزمایش مدفوع برای جستجوی تک‌یاخته‌ها (تروفوزوآیت، کیست) و کرم‌ها (نوزاد، تخم و بعضی از اشکال بالغ) انجام می‌شود. کرم‌های بالغ و قطعات کرم‌های نواری را با چشم غیرمسلح می‌توان مشاهده کرد، ولی تخم‌ها، نوزادان، تروفوزوآیت‌ها و کیست‌ها را تنها با میکروسکوپ می‌توان دید. برای مشاهده این اجسام در مدفوع، لام مدفوع را باید به‌خوبی تهیه کرد و با دقت موردمطالعه ریزبینی قرار داد.

جمع‌آوری نمونه مدفوع

چون تعدادی از تخم کرم‌ها و تک‌یاخته‌ها جداره نازک و شکننده دارند، بنابراین نمونه مدفوع باید با روشی صحیح جمع‌آوری شود تا بتوان به کمک میکروسکوپ آن‌ها را شناسایی کرد.

آزمایش‌های درشت‌بینی نمونه‌ها

قوام نمونه مدفوع نشان‌دهنده نوع عوامل احتمالی است که می‌توانند درون آن باشند. معمولاً تروفوزآیت‌های تک‌یاخته‌ای روده‌ای در نمونه‌های آبکی یا نرم و کیست‌ها اغلب در نمونه‌های با قوام وجود دارند.

آزمایش‌های ریزبینی

ساده‌ترین روش بررسی مدفوع، تهیه لام مرطوب است که برای جستجوی کیست و تروفوزوآیت تک‌یاخته‌ها تخم و نوزادکرم‌ها استفاده می‌شود .برای تهیه لام‌های مرطوب از سرم فیزیولوژی، لوگل و متیلن بلوی بافره استفاده می‌شود. بدین‌صورت که با یک قلم الماس نام بیمار یا شماره بیمار را در یک‌طرف لام بنویسید. یک قطره سرم فیزیولوژی (لوگل) را روی لام بریزید. توسط

یک اپلیکاتور چوبی قسمت کوچکی از نمونه را برداشته و به‌آرامی با سرم فیزیولوژی مخلوط کنید. به‌آرامی لامل را روی مخلوط نمونه و قطره رها کنید، به‌طوری‌که لبه لامل با قطره تماس پیدا کرده و از تشکیل حباب جلوگیری شود. برای مشاهده ریزبینی، تمام سطح لام باید با بزرگنمایی مناسب به‌طور منظم از یک‌گوشه به سمت بالا و پایین یا عقب و جلو آزمایش شود. وقتی مورد مشکوک یا موجود زنده مشاهده شد، با بزرگنمایی مناسب و نور مناسب بررسی شود.

در مدفوع حاوی مخاط نمونه را از اطراف مخاط برداشت کنید؛ در نمونه شل و آبکی، نمونه را از هر قسمت از مدفوع می‌توان برداشت کرد. در نمونه‌های قوام‌دار نمونه را به‌خوبی هم زده سپس برداشت کنید تا شامل قسمت‌های داخلی و خارجی نمونه شود. روش بسیار مفید برای مشاهده و بررسی حرکت تروفوزوآیت‌های آمیب‌ها و تاژک‌داران تهیه لام مرطوب با استفاده از سرم فیزیولوژی نمکی است. این روش برای تشخیص تروفوزوآیت و در مدفوع اسهالی و همچنین تروفوزوآیت و کیست تک‌یاخته‌ها و تخم و نوزاد کرم‌ها در اشکال دیگر به کار می‌رود. در نمونه تازه، شکل و تحرک تروفوزوآیت‌ها در تشخیص مفید است. نوزادها و اغلب تخم کرم‌ها با بزرگنمایی ۴۰ قابل‌مشاهده هستند. علاوه بر شکل، کیست آمیب‌ها و تاژک‌داران (خصوصاً هسته آن‌ها) در لام مرطوب با استفاده از لوگل[1] آسان‌تر تشخیص داده می‌شوند. محلول لوگل کیست تک‌یاخته‌ها را رنگ نموده و با آن می‌توان پاره‌ای از جزئیات غیرقابل‌مشاهده در گسترش رنگ نشده را مشاهده کرد. می‌توان با افزودن یک قطره ید به کنار لام تهیه‌شده با سرم فیزیولوژی امکان رنگ‌پذیری تدریجی و بررسی بهترین قسمت‌های رنگ‌شده را فراهم کرد. معمولاً سیتوپلاسم کیست‌ها به رنگ زرد یا قهوه‌ای روشن و هسته به رنگ قهوه‌ای تیره دیده می‌شود. در کیست‌های انتامیبا کروماتین محیطی و کاریوزوم قابل‌مشاهده است. واکوئل گلیکوژنی قهوه‌ای تیره و اجسام کروماتوئیدی قهوه‌ای روشن دیده می‌شوند.

تهیه لام با متیلن بلو[2]

زمانی کاربرد دارد که در لام مرطوب با سرم فیزیولوژی، تروفوزوئیت آمیب و اجسام مشابه مشاهده شود. این ماده تروفوزوآیت‌های آمیب‌ها را در نمونه‌های تازه رنگ‌آمیزی می‌کند. سیتوپلاسم به رنگ آبی روشن و هسته و گنجیدگی‌ها آبی تیره دیده می‌شوند. اگر آمیب از جنس انتامیبا باشد، کروماتین‌های محیطی هسته قابل‌مشاهده است.

---

1. Iodine Wet Mount
2. Buffered Methylene Blue,BMB Wet mount

روش‌های تغلیظ[1] نمونه‌ها

روش تغلیظ برای مشاهده انگل‌ها، زمانی که تعداد موجودات زنده در نمونه کم است، کاربرد دارد و اساس آن جداسازی کیست تک‌یاخته‌ها و تخم کرم‌ها از دیگر بقایای مدفوع بر پایه اختلاف وزن مولکولی آن‌هاست که نتیجه آن، زیادشدن انگل در واحد حجم است. روش‌های تغلیظ شامل شناورسازی[2] و رسوبی[3] است که هرکدام به شیوه‌های مختلفی انجام می‌شوند. در روش‌های رسوبی تخم‌ها و کیست‌های سنگین‌تر از محلول تعلیق (سوسپانسیون) در عمق لوله تغلیظ می‌شوند و در روش‌های شناورسازی، انگل‌های سبک‌تر در سطح یک مایع سنگین شناور می‌مانند. نمونه تغلیظ شده را می‌توان با تهیه یک گسترش مرطوب برای جستجوی انگل‌ها موردبررسی قرار داد .در این حالت شانس دیدن کیست تک‌یاخته‌ها و تخم کرم‌ها خصوصاً در حالتی که تعداد آن‌ها در نمونه کم است، بیشتر می‌شود.

روش رسوبی فرمالین اتر[4]: این روش دارای قدرت تغلیظی بالا، معتبر و با ارزش است و برای شناسایی کیست اکثر تک‌یاخته‌ها و تخم و نوزاد کرم‌ها به کار می‌رود. از معایب آن گران بودن و خطرکار با اتر است.

روش کار: ۱۰ میلی‌لیتر فرمالین ۱۰٪ را به حدود ۱ گرم مدفوع اضافه کرده و با اپلیکاتور خوب مخلوط کنید. تنزیب چهار لایه را درون یک قیف قرار داده و قیف را درون لوله سانتریفیوژ بگذارید. تعلیق (سوسپانسیون) را از تنزیب عبور دهید، به‌طوری‌که هفت میلی‌لیتر از این تعلیق (سوسپانسیون) صاف شود. سه میلی‌لیتر اتر را به لوله سانتریفیوژ اضافه کرده و با درب پلاستیکی بپوشانید و لوله را به‌شدت تکان داده تا فرمالین و اتر به‌خوبی در هم حل شوند. در لوله را به آهستگی بردارید تا گاز حاصله خارج شود و لوله را یک دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ کنید. پس از سانتریفیوژ، چهار لایه در لوله تشکیل می‌شود. لایه اول اتر و چربی، لایه دوم مواد زائد مدفوع، لایه سوم فرمالین و لایه چهارم مواد رسوبی است. پس از جدا کردن لایه چربی از دیواره، لوله را به‌سرعت وارو کرده تا سه لایه اضافی دور ریخته شوند. یک قطره از لایه رسوبی را برداشته و روی لام بریزید و لامل را به‌آرامی روی آن قرار دهید و با عدسی ۱۰ و ۴۰ بررسی کنید.

شناورسازی با آب‌نمک اشباع[5] : این روش تا حدودی قابل‌اعتماد بوده و با آن می‌توان تخم انگل‌های سبک و کیست تک‌یاخته‌ها را مشاهده کرد.

---

1. Concentration procedures
2. Floatation
3. Sedimentation
4. Formalin - Ether method
5. Willis Method

روش کار: تا نصف لوله‌آزمایش از محلول اشباع نمک بریزید. ۰/۵ گرم از مدفوع را به‌وسیله اپلیکاتور به لوله منتقل کرده و مخلوط کنید. لوله را از محلول پر کنید و ذرات درشت مدفوعی را که بالا می‌آیند از لوله خارج کنید. یک لامل روی دهانه لوله طوری قرار دهید که حباب زیر لامل تشکیل نشود. بدون اینکه لوله حرکتی داشته باشد ۱۵ دقیقه صبر کنید و سپس لامل را برداشته روی لام بگذارید و زیر میکروسکوپ مشاهده کنید. روش‌های دیگر برای شناورسازی شامل شناورسازی با سولفات روی[1] (۳۳۱ گرم سولفات روی در ۷۱۰ میلی‌لیتر آب) و شناورسازی با ساکاروز است.

روش‌های رنگ‌آمیزی دائمی[2]

از فنون رنگ‌آمیزی دائمی برای تشخیص تروفوزوآیت و کیست تک‌یاخته‌ها در موارد مشکوک، ارسال نمونه به یک آزمایشگاه مرجع و اهداف آموزشی استفاده می‌شود. این فنون متنوع بوده و امکان بررسی جزئیات دقیق و شناسایی موجود زنده را امکان‌پذیر می‌کنند.

رنگ‌آمیزی تری‌کروم[3]

روشی ارزشمند برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های تازه مدفوع و همچنین نمونه‌های تثبیت‌شده توسط پلی وینیل الکل است.

روش کار برای نمونه‌های تازه

- گسترش که به‌صورت مناسب تهیه‌شده است را به مدت یک‌ساعت در ظرف ماده تثبیت‌کننده شائودین قرار دهید به‌گونه‌ای که قسمت نام یا شماره بالای ظرف مشخص باشد.
- لام را با پنس از ظرف خارج کرده و با کاغذ خشک‌کن مایع اضافی را از لبه لام بزدائید.
- لام را به مدت یک دقیقه در محلول ید الکل قرار دهید و مانند مرحله قبل با کاغذ خشک‌کن خشک‌کنید.
- لام را به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار دهید و بعد از خشک شدن در ظرف دوم اتانول وارد کرده و به مدت یک دقیقه قرار دهید و خشک‌کنید.

---

1. Ash Method
2. Permanent Staining Procedures
3. Trichrome Staining

- لام را به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه در ظرف رنگ تری کروم قرار دهید. سپس آن را بیرون آورده و مایع اضافی آن را بگیرید.
- لام را با پنس نگه‌داشته، دوبار آن را داخل محلول رنگ فرو ببرید (حداکثر زمان ۵ ثانیه باشد) و سپس خشک‌کنید.
- لام را یک‌بار در ظرف شماره یک حاوی اتانول ۹۵٪ به مدت ۱ تا ۲ ثانیه فرو برده و پس از گرفتن مایع اضافی مجدداً در ظرف شماره ۲ اتانول ۹۵٪ به مدت ۲ تا ۳ ثانیه قرار داده سپس مایع آن را بگیرید.
- لام را به مدت یک دقیقه در کربول گزیلن یا اتانول خالص فرو ببرید و سپس مایع اضافی را بگیرید.
- به مدت ۲ تا ۳ دقیقه گسترش را در گزیلن قرار دهید.
- بلافاصله لام را روی کاغذ قرار داده و ۳ تا ۴ قطره محیط مونته کننده روی لام قرار داده و یک لامل را روی آن قرار دهید و کمی روی لامل فشار دهید تا محیط در زیر آن کاملاً پخش‌شده و حباب هوا بین لام و لا مل قرار نگیرد.
- نمونه مونته شده را روی میز به‌طور افقی قرار دهید تا خشک شود و این عمل ممکن است بیشتر از یک روز طول بکشد. امکان بررسی نمونه بعد از ۳۰ دقیقه وجود دارد، ولی باید دقت کرد لامل از سطح لام کنده نشود.

رنگ‌آمیزی تری‌کروم برای جستجوی تروفوزوآیت و کیست انتامیبا هیستولیتیکا، ژیاردیا لامبلیا و دیگر تک‌یاخته‌های بیماری‌زا و یا غیربیماری‌زا مناسب است. گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده را می‌توان با استفاده از عدسی شیئی ایمرسیون روغنی با بزرگنمایی ۱۰۰ برای بررسی تک‌یاخته‌ها مورد آزمایش دقیق قرار داد. مخمرها، سلول‌های انسان (گلبول‌های قرمز، سلول‌های پلی مورفونوکلئر و ماکروفاژها) و کریستال‌های شاکوت لیدن شناسایی می‌شوند. درصورتی‌که تعداد زیادی از این موجودات در نمونه وجود داشته باشد، در طی چند دقیقه قادر به دیدن آن‌ها خواهید شد. اشکال بیماری‌زا و غیربیماری‌زا هر دو باید حتماً با نام کامل گزارش شوند.

در این رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم به رنگ سبز آبی، هسته و گنجیدگی‌هایی مثل گلبول‌های قرمز، اجسام کروماتوئیدی در کیست‌ها و تاژک تاژکداران معمولاً به رنگ قرمز ارغوانی دیده می‌شوند. واکوئل‌های گلیکوژنی در مراحل رنگ‌آمیزی حل‌شده و ناحیه سفیدرنگ و یا بی‌رنگی مشاهده می‌شود که جای خالی گلیکوژن است.

مراحل رنگ‌آمیزی تری کروم

۱- تثبیت‌کننده شـــائودین؛ ۲- محلول ید-الکل؛ ۳- اتانول ۷۰٪؛ ۴- رنگ تری کروم؛۵- محلول رنگ بر الکل - اسیدکلریدریک؛ ۷- گزیلول؛ ۸- مونته کردن

اجزای رنگ تری‌کروم

۱-کروموتروپ[1] ۶ گرم

۲- لایت گرین[2] ۱/۵ گرم

۳- فست گرین[3] ۱/۵ گرم

۴ – اسید فسفوتنگستیک[4] ۷ گرم

۵- اسید استیک ۱۰ میلی‌لیتر

۶- آب مقطر تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین آهن[5]

این رنگ‌آمیزی برای تک‌یاخته‌های دوره‌ای خصوصاً مژه‌داران بسیار مناسب است.

روش کار:ابتدا از نمونه مدفوع یک سـوسـپانسـیون (تعلیق) با اسـتفاده از رینگر و سـرم تهیه کرده، سـپس از آن یک گسـترش مناسـب تهیه کنید. بلافاصله این گسترش تهیه‌شده را به مدت ۱۵ دقیقه در تثبیت‌کننده گرم و یا ۳۰ دقیقه در تثبیت‌کننده سـرد قرار دهید. لام را به مدت ۱ دقیقه در الکل یدوره ۲۰٪ قرار داده و سپس چند لحظه آن را در آب مقطر قرار دهید.

گسـترش را به مدت یک دقیقه به‌منظور تثبیت آن در الکل ۷۰٪ قرار داده و سپس به مدت ۲ دقیقه در زاج آهن ۵۶ درجه قرار دهید و بعد از آن، چند لحظه در آب مقطر بگذارید. لام را در هماتوکسـیلین ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه قرار داده و سـپس زیر شـیر آب بشـویید تا رنگ آن آبی روشن شود. بعد از پایان این مرحله لام را در الکل ۹۶٪ و سپس ۱۰۰ درجه به مدت ۱ دقیقه قرار داده تا آب لام گرفته شـود. لام را به مدت ۱ یا چند دقیقه در گزیلول قرار داده سپس یک لامل روی آن قرار داده و در اتوو قرار دهید تا خشک شود.

---

1. Chromotrope
2. Light Green
3. Fast Green
4. Acid Phospho Tangestite
5. Iron Haematoxylin Staining

رنگ‌آمیزی زیل نلسون اصلاح‌شده[1]

این روش برای جستجوی اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم انجام می‌شود. اووسیست‌ها به‌صورت اجسام گرد به رنگ صورتی قرمز در یک زمینه سبز کم‌رنگ دیده می‌شوند .با استفاده از رنگ متیلن بلو - سافرانین برای رنگ‌آمیزی اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم، این اووسیست‌ها بیضی و به رنگ صورتی تا نارنجی دیده می‌شوند. اسپورزوآیت‌های داخل اووسیست‌ها کمی تیره‌تر رنگ می‌گیرند.

رنگ‌آمیزی زیل نلسون اصلاح‌شده – رنگ اسید فست –روش سرد -هنریکسن[2]

محلول‌های لازم:

- رنگ کربول فوشین
- تهیه رنگ ذخیره:۱۵۰ گرم پودر فوشین به اضافه یک لیتر اتانول
- فوشین: ۱۰ میلی‌لیتر رنگ ذخیره به اضافه ۵۰ میلی‌لیتر فنل آبدار ۵٪
- محلول رنگ بر: ۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به اضافه ۹۸ میلی‌لیتر آب مقطر
- رنگ زمینه: ۵ گرم مالاشیت گرین به اضافه ۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر

روش کار

۱- تهیه گسترش از رسوب فرمالین - اتر

۲-تثبیت فروتی با متانول خالص به مدت ۵ دقیقه

۳- قرار دادن لام‌ها در رنگ کربول فوشین به مدت ۱۰ دقیقه

۴- شستشوی لام‌ها با آب معمولی

۵- قرار دادن لام‌ها در محلول رنگ بر (اسید سولفوریک ۲٪) به مدت ۳۰ ثانیه همراه با حرکت دادن لام‌ها

۶- شستشوی لام‌ها با آب معمولی

۷- قراردادن لام‌ها در رنگ زمینه (مالاشیت گرین یا متیلن بلو) به مدت ۵ دقیقه

۸- شستشوی لام‌ها با آب معمولی

۹- خشک‌کردن لام‌ها در مجاورت هوا و مشاهده میکروسکوپی آن

---

1. Modified Ziehl-Neelsen
2. Modified Ziehl-Neelsen Acid- Fast Stain - Cold Method – Henricksen

رنگ‌آمیزی کربول فوشین کاینیون[1]

این روش رنگ‌آمیزی برای بررسی کوکسیدیاها مناسب است.

رنگ‌آمیزی اسیدفست دی متیل سولفوکساید[2]

این روش برای تشخیص کوکسیدیاها مناسب است.

رنگ‌آمیزی کارمن آلوم[3]

این رنگ‌آمیزی به‌منظور رنگ‌آمیزی کرم‌ها به کار می‌رود.

مواد تثبیت‌کننده و نگهدارنده[4]

فرمالین

این ماده نگهدارنده برای نگهداری تخم و نوزاد کرم‌ها و کیسـت تک‌یاخته‌ها به کار می‌رود. محلول ۵٪ برای کیسـت تک‌یاخته‌ها و ۱۰٪ برای نگهداری تخم و نوزاد کرم‌ها به کار می‌رود. فرمالین بیشـترین ماده تثبیت‌کننده‌ای است که برای تخم کرم‌ها، نوزادان، کیست تک‌یاخته‌ها و اووسیست اسـتفاده می‌شـود. معمولاً فرمالین تجاری ۳۷٪ اسـت که یک محلول آبی ۳۷٪ از گاز فرمالدئید محسوب می‌شود و در موقع ساخت محلول‌های تثبیت‌کننده انگل‌شناسی باید به‌عنوان یک محلول ۱۰۰٪ در نظر گرفته شود. دو غلظت مورداستفاده از فرمالین ۵٪ و ۱۰٪ است. اگرچه تهیه محلول ۵٪ آن برای تمام اهداف توصـیه می‌شـود، اما تمام کارخانه‌های سـازنده کیت‌های حاوی ماده نگهدارنده فرمالین، از محلول ۱۰٪ آن اسـتفاده می‌کنند، چون توانایی بیشـتری برای کشـتن تخم کرم‌ها دارد. می‌توان در مورد نمونه‌های نگهداری شـده در فرمالین، عمل تغلیظ را انجام داد، اما نمی‌توان بر روی این نمونه روش‌های رنگ‌آمیزی را به کار برد. فرمالین در سـرم فیزیولوژی یا آب مقطر به نسـبت ۱ به ۱۰ یا ۱ به ۲۰ رقیق می‌شود. استفاده از فرمالین گرم (۶۰ درجه سانتی‌گراد) برای جلوگیری از آلوده‌کنندگی تخم کرم‌ها توصیه می‌شود.

---

1. Carbol – Kaynion Fuchsin
2. D.M.S.O
3. Carmin Alum staining
4. Fixative

پلی وینیل الکل[1]

برای نگهداری تروفوزوآیت و کیسـت تک‌یاخته‌ها و به‌منظور آزمایش مدفوع (به نسـبت ۱ به ۳) توصیه می‌شود. مزیت مهم آن، این است که از مدفوع نگهداری شده در این محلول می‌توان نمونه دائمی تهیه کرد.

اگرچه هر دو روش تغلیظ و رنگ‌آمیزی را می‌توان در مورد نمونه‌های نگهداری شـده در این ماده بکار برد، اما طبق توصـیه کمیته ملی برای اسـتانداردسـازی آزمایش‌های بالینی[2] بهتر است عمل تغلیظ را روی نمونه‌های نگهداری شده در فرمالین و عمل رنگ‌آمیزی را روی نمونه نگهداری شده در PVA انجام داد. باید توجه کرد که نسـبت بین مدفوع و ماده نگهدارنده باید به نسـبت یک قسـمت از مدفوع و سـه قسـمت ماده نگهدارنده بوده و کاملاً با هم مخلوط شـوند. به‌طورکلی مدت‌زمان مجاورت مدفوع و ماده نگهدارنده نباید کمتر از ۳۰ دقیقه باشـد. نمونه‌های مدفوع موجود در ماده نگهدارنده می‌تواند در درجه حرارت اتاق نگهداری شوند.

پلی وینیـل الکـل: ۵ گرم پودر پلی وینیل الکل + ۱/۵ میلی‌لیتر گلیسـرول + ۶۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر.

استات سدیم اسید استیک فرمالین[3]

هم برای تغلیظ و هم گسترش رنگ‌آمیزی دائمی مناسب است. به‌وسیله SAF هماتوکسیلین آهن شکل ارگانیسم را بهتر حفظ می‌کند.

مرتیولات ید فرمالین[4]

نگهدارنده و رنگ کننده خوبی برای بیشـتر مراحل انگلی یافت شـده در مدفوع اسـت. از نمونه نگهداری شـده در این ماده می‌توان برای تهیه گسـترش مستقیم و انجام روش‌های تغلیظ استفاده کرد، اما تهیه گسـترش رنگ‌آمیزی با کیفیت مطلوب از آن آسـان نیسـت، خصـوصـاً در مورد نمونه‌های حاوی تروفوزوآیت تک‌یاخته که در رنگ‌آمیزی خصوصیات آن مشخص نمی‌شود. ترکیب مرتیولات ید فرمالدئید شامل: ۲۰۰ میلی‌لیتر مرتیولات با رقت یک‌هزارم + ۲۵ میلی‌لیتر فرمالدئید ۳۷٪ + ۵ میلی‌لیترگلیسرول + ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر است.

---

1. Polyvinyl Alcohol = PVA
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards = NCCLS
3. Sodium Acetate Acetic-Formalin = SAF
4. Merthiolate-Iodine-formalin = MIF

آزمایش نمونه‌های خون[1]

عوامل مختلف انگلی مثل عامل مالاریا، تریپانوزومیازیس وفیلاریازیس در خون جستجو می‌شود. رنگ‌آمیزی گسترش‌های خون معمول‌ترین روش است که برای مطالعه انگل‌های خون به کار می‌رود که در این خصوص روش‌های متنوعی ارائه شده است.

گسترش‌های خونی[2]

جمع‌آوری نمونه خون و کار با آن باید با دقت و احتیاط کافی همراه باشد. چون بسیاری از بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و انگلی توسط خون منتقل می‌شوند. برای بررسی نمونه‌های خون معمولاً از دو نوع گسترش نازک و ضخیم استفاده می‌شود. در گسترش‌های ضخیم به دلیل تراکم انگل، شانس دیده شدن آن افزایش می‌یابد. گسترش‌های نازک برای شناسایی مراحل و اشکال مختلف انگل و گونه‌ها مناسب است. گسترش‌های تهیه‌شده قبل از رنگ‌آمیزی باید کاملاً خشک شود. برای رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی بیشتر از رنگ‌های گروه رومانوفسکی (Romanowsky)به‌خصوص گیمسا استفاده می‌شود. هنگامی‌که به تشخیص سریع نیاز باشد، می‌توان از رنگ فیلد استفاده کرد. توصیه می‌شود چنانچه گسترش‌ها به‌طور جداگانه تهیه شود. گسترش نازک را با روش گیمسا و گسترش ضخیم را با روش فیلد رنگ‌آمیزی کنید.

تهیه گسترش نازک[3] : گسترش نازک باید از یک لایه سلول‌های خونی تشکیل شود، لذا باید یکنواخت و غیرمتراکم بوده و انتهای گسترش به شکل شعله شمعی باشد. مزیت این روش این است که ساختمان انگل را به‌طور کامل حفظ می‌کند.

تهیه گسترش ضخیم[4]: گسترش ضخیم معمولاً از ۱۵-۲۰ لایه سلول‌های خونی تشکیل می‌شود. درنتیجه، به دلیل دارا بودن تعداد بیشتری از عناصر انگلی تشخیص را آسان‌تر می‌کند. برای تهیه گسترش ضخیم سه قطره خون را در گوشه یک لام تمیز قرار داده و با گوشه لام دیگری به مدت ۳۰ ثانیه آن را مخلوط کرده و هم بزنید تا فیبرین‌ها جدا شوند و دایره‌ای به قطر ۱/۵ سانتی‌متر ایجاد شود. پس از تهیه گسترش، باید آن را در معرض هوا قرار داده تا خشک شود. این گسترش نیازی به تثبیت کردن و حرارت دادن ندارد .چنانچه این گسترش تثبیت شود هموگلوبین زدایی صورت نمی‌گیرد.

---

1. Blood specimens Analysis
2. Blood films
3. Preparation of thin blood film
4. Preparation of thick blood film

رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی

روش گیمسا[1]

بهترین روش رنگ‌آمیزی جهت انگل‌های خونی خصوصاً عوامل تریپانوزوماست. یک یا دو قطره محلول غلیظ گیمسا را در یک میلی‌لیتر آب مقطر خنثی حل کرده، محلول را به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه بر روی لام حاوی گسترش ضخیم و نازک ریخته پس از این مدت با آب مقطر شستشو داده و پس از خشک‌کردن، با عدسی ۱۰۰ به جستجوی انگلی بپردازید.

روش فیلد[2]

در این روش از دو معرف رنگیA و B استفاده می‌کنند. ابتدا گسترش‌های خونی نازک را به مدت ۳ ثانیه و گسترش‌های ضخیم را به مدت ۶ ثانیه در معرف اول قرار دهید و سپس آن را با آب بشویید. بعد به همان ترتیب لام‌ها را در معرف B قرار دهید و پس از شستشو در مجاورت هوا خشک کنید و با عدسی ۱۰۰ بررسی کنید.

روش رایت[3]

روی گسترش‌های خون مقداری از محلول رنگ بریزید تا سطح لام‌ها هرکدام از رنگ پوشیده شود، سپس مقداری تامپون با pH ۶/۸ تا ۷/۲ به مدت ۲ دقیقه روی لام قرار دهید. پس از گذشت مدت‌زمان رنگ‌آمیزی روی لام‌ها را با محلول تامپون شستشو داده و بگذارید تا خشک شود. رنگ-آمیزی به روش رایت برای گسترش‌های ضخیم مناسب نیست و به‌طورکلی در تشخیص انگل‌های تریپانوزوما از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده می‌شود.

روش لیشمن اصلاح‌شده[4]

رنگ لیشمن را به مدت ۳ دقیقه روی گسترش بریزید . سپس بافر فسفات با pH هفت به آن اضافه کنید. نهایتاً لام‌ها را با آب شسته سپس خشک و مونته کنید. در این رنگ‌آمیزی، هسته بنفش کم‌رنگ و سیتوپلاسم آبی کم‌رنگ دیده می‌شوند. در مشاهده عوامل تریپانوزوما هسته بنفش، سیتوپلاسم آبی و رنگدانه‌ها زرد می‌شوند.

---

1 Gimsa Staining
2. Filed’s staining
3 Writz staining
4. Modified Leishman staining

طبقه‌بندی انگل‌های ماهیان

تک‌یاخته‌های انگلی

تک‌یاخته‌ها حیواناتی هستند که از یک سلول تشکیل شده‌اند و توانایی انجام سوخت‌وساز، تولیدمثل و حفظ بقای خود را دارند. کالبدشناسی تک‌یاخته‌ها اندکی شبیه سلول گیاهی یا حیوانی است و مانند آن‌ها، اندامچه‌های بزرگی مانند هسته، سیتوپلاسم و دیواره سلولی دارند. یک تک‌یاخته اندامچه‌هایی دارد که در طی مراحلی از نمو خود، اختصاصاً برای حرکت سازش یافته‌اند. بنابراین، قدرت سازش‌پذیری سلول‌های تک‌یاخته با سلول‌های تشکیل‌دهندهٔ گیاهان و جانوران متفاوت است (ستاری، ۱۳۸۷).

زیرسلسلهٔ تک‌یاخته‌ها به هفت شاخه تقسیم می‌شود که شامل سارکوماستیگوفورا[1]، لابیرنتومورفا[2]، آپی‌کومپلکسا[3]، میکروسپورا[4]، استوسپورا[5]، میکسوزوآ[6] و سیلیوفورا[7] هستند. هرکدام از این شاخه‌ها خود به رده‌ها، راسته‌ها، خانواده‌ها، جنس‌ها و گونه‌های متعارف طبقه‌بندی می‌شوند (ستاری، ۱۳۸۷).

ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیئیس[8]

ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیئیس، عامل ایکتیوفتیریازیس و بزرگترین تک یاختهٔ انگلی ماهیان است (هوفمن، ۱۹۷۸؛ لوین، ۱۹۷۳). تروفوزوآیت[9] این انگل که گاهی اوقات تروفونت[10] نامیده می‌شود، تخم‌مرغی یا مدور است و طویل‌ترین محور آن، طولی برابر ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر دارد. این تروفوزوآیت ها در اطراف خود، دارای مژه‌های یک شکل هستند و آن‌هایی که پیرترند، هستهٔ بزرگ هلالی شکل دارند. تروفوزوآیت در داخل کیست‌هایی در بین لایه‌های پوست قرار می‌گیرد. سپس تروفوزوآیت های بالغ از ماهی میزبان جدا می‌شوند و از طریق تقسیم چندتایی شروع به تکثیر می‌کنند.

---

1. Sarcomastigophora
2. Labirinthomorpha
3. Apicomplexa
4. Microspora
5. Acetospora
6. Myxozoa
7. Ciliophora
8. *Ichthyophthirius multifiliis*
9. Trophozoite
10. Tropont

بدین ترتیب، تعداد زیادی تومیت[1] ایجاد می‌شـود (گاهی اوقات به آن‌ها ترونت[2] یا اجسام سرگردان [3] هم اطلاق می‌شـــود) کـه دارای مژه‌های یک شـــکل و طولی برابر ۳۰ تا ۴۵ میکرومتر هســـتند (هوفمن، ۱۹۷۸). دمای مناسب برای تکثیر این انگل، ۲۴ تا ۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد است. در این دما، تروفوزوآیت های بالغ (کیســت) در عرض ۷ تا ۸ ســاعت تکثیر می‌یابند. تومیت‌هایی که از کیســت بالغ آزاد می‌شـوند، باید در عرض ۴۸ ســاعت میزبان خود را پیدا کنند. بنابراین، چرخهٔ تکاملی انگل در دمای ۲۴ تا ۲۶ درجهٔ ســانتی‌گراد، طی چهار روز کامل می‌شـود. در دمای ۷ درجهٔ ســانتی‌گراد، تکثیر در داخل کیســـت در حدود ۷۷ ســـاعت و چرخهٔ کامل زندگی انگل، ۳۵ تا ۴۰ روز به طول می‌انجامد.

تصویر ۷-۱: لام مرطوب از پوست و فلس ماهی که تروفوزوآیت ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیئیس را نشان می‌دهد.

تصویر ۷-۲: لام رنگ‌آمیزی شده آبشش با هماتوکسیلین و ائوزین در ماهی که تروفوزوآیت ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیئیس را نشان می‌دهد.

1. Tomit
2 .Theront
3. Vagrant bodies

تریکودینا

گونه‌های تریکودینا جزء پیچیده‌ترین تک‌یاخته‌هایی هستند که بر روی پوست و آبشش ماهیان زندگی می‌کنند. شکل بدن این موجودات، شبیه نعلبکی یا کاسه است. سطح محدب به‌عنوان سطح جلویی یا دهانی و سطح مقعر به‌عنوان سطح عقبی یا مقابل دهانی به‌حساب می‌آید. در سطح عقبی، اندام پیچیده‌ای به نام صفحهٔ مکنده یا چسبنده وجود دارد که سبب اتصال انگل به میزبان می‌شود. اسکلت ساختمانی پیچیده این صفحه، از سه حلقهٔ متحدالمرکز تشکیل شده است. داخلی‌ترین حلقه را حلقهٔ دندانه‌دار[1] یا تاج می‌گویند که از ساختارهای مزرس یا دندان مانندی به وجود آمده است. این دندانه‌ها ازنظر تعداد، شکل و اندازه، تنوع زیادی دارند. یک ساختار نواری مدور به نام نوار مخطط[2] نیز در این انگل وجود دارد که قلاب‌های حلقهٔ دندانه‌دار را می‌پوشاند. به نظر می‌رسد که این نوار به‌صورت یک ردیف خطوط شعاعی، از حلقهٔ دندانه‌دار تا نزدیک حاشیهٔ صفحهٔ مکنده گسترش یافته است. خارجی‌ترین حلقه، در ناحیهٔ حاشیه‌ای قرار دارد و از یک غشای قابل‌انعطاف نازک تشکیل شده است که توسط یک بند به نوار مخطلط متصل می‌شود و بر روی آن حرکت می‌کند.

تصویر ۷-۳: لام مرطوب از پوست و فلس ماهی که تروفوزوآیت تریکودینا را نشان می‌دهد.

چیلودنلا (چیلودون) [3]

این جنس شامل گونه‌های زیادی است و در آمریکای شمالی، دوگونه از آن‌ها بر روی پوست و آبشش ماهیان مشاهده‌شده است. گونه‌های چیلودنلا، جزء مژه‌داران متحرک هستند. اطلاعات ما

1. Denticulate
2. Striated band
3. Chilodon

عمدتاً در مورد چیلودنلا سیپرینی[1] است (دیویس، ۱۹۵۳). شکل این انگل، مشخصاً مانند قلب است؛ یعنی انتهای خلفی پهن‌تر و دارای یک بریدگی جزئی است. سطح شکمی انگل، مسطح و دارای ردیف‌هایی از مژه‌های موازی است. سطح پشتی نیز کمی تحدب دارد و به‌جز شیار دهانی که در انتهای قدامی قرارگرفته است، بقیه قسمت‌ها فاقد مژه‌اند. سوراخ دهانی در سطح شکمی، نزدیک انتهای قدامی انگل قرار دارد و توسط میله‌های شاخی احاطه شده است. این میله‌ها از قسمت‌های مختلف بدن انگل نشأت گرفته‌اند و معمولاً نامشخص هستند. موجود مذکور واجد یک هستهٔ بزرگ تخم مرغی شکل در $\frac{۱}{۳}$ انتهای بدن و یک هستهٔ کوچک در نزدیک یا داخل هستهٔ بزرگ است. طول انگل ۳۰ تا ۷۰ میکرومتر و عرض آن، ۲۱ تا ۴۰ میکرومتر است. تکثیر آن، عمدتاً از طریق تقسیم دوتایی[2] صورت می‌گیرد. گونه‌هایی از چیلودنلا وجود دارند که توانایی حیات خود را در دماهای بسیار متفاوت حفظ می‌کنند، ولی ظاهراً دمای مناسب برای چیلودنلا سیپرینی، ۵ تا ۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد است.

هگزامیتا

بسیاری از اعضای جنس هگزامیتا، به‌طور طبیعی در دستگاه گوارش ماهیان دیگر نیز زندگی می‌کنند و هنگامی‌که وضعیت میزبان برای انگل مناسب می‌شود، بیماری‌زایی خود را نشان می‌دهند. تمام گونه‌های این انگل، بیضی یا گلابی‌شکل هستند و از جلو به عقب باریک‌تر می‌شوند، اما انواع مدور نیز زیاد دیده شده‌اند. عرض انگل، ۶ تا ۸ میکرومتر و طول آن، ۱۰ تا ۱۲ میکرومتر است. همهٔ گونه‌ها سه جفت تاژک قدامی دارند که ازنظر طول با یکدیگر متفاوت هستند، اما اندازهٔ آن‌ها یک تا یک و نیم برابر طول بدن است. این تاژک‌ها از بلفاروپلاستی که در قسمت انتهای قدامی اگزوستیل‌ها قرار دارد، نشأت می‌گیرند. چهارمین جفت تاژک‌ها، در انتهای خلفی بدن، از اگزوستیل ها خارج می‌شود. یک جفت هستهٔ بیضی‌شکل در انتهای قدامی بدن وجود دارد و یک غشای ظریف دورتادور هسته‌ها را احاطه می‌کند.

شاخه کرم‌های پهن

شاخهٔ کرم‌های پهن، از سه ردهٔ توربلاریا[3]، ترماتودا[4] و سستودا[5] تشکیل شده است. رده توربلاریا تنها در گروه محدودی از ماهیان ایجاد بیماری می‌کنند. تمام موجودات دو رده دیگر، ارتباط نزدیکی با

1. *C. cyprini*
2. Binary Fission
3. Turbellaria
4. Trematoda
5. Cestoda

میزبان‌های حیوانی خود دارند. نام دیگر ترماتودها، کرم‌های برگی‌شکل[1] و سستودها، کرم‌های نواری شکل[2] است.

ترماتودهای مونوژن[3]

این انگل‌ها، پهن، طویل و از سطح پشتی- شکمی فشرده‌شده‌اند؛ درازای این انگل‌ها ۰/۱۵ تا ۲۰ میلی‌متر (و در بعضی از نمونه‌ها تا بیش از ۳۰ میلی‌متر) است؛ معمولاً شکل بدن، سیگاری شکل یا دوکی‌شکل و کم‌وبیش پهن است؛ انتهای جلویی، ۲ تا ۴ لوب دارد که منافذ غدد رأسی به آنجا باز می‌شوند و گاهی اوقات یک لوب وجود دارد، یا یک بادکش قوی مشاهده می‌شود. گاهی اوقات

تصویر ۷-۴: نمودار ساختار کرم‌های برگی شکل

A: زیر رده پایین‌تر (پلی اونکوینیا)؛ B: زیر رده‌بالاتر (اولیگونکوینیا). ۱- منفذ دهانی؛ ۲ مجاری غدد انتهای راسی؛ ۳- گره‌های (گانگلیون‌های) راسی؛ ۴- دستگاه دفعی؛ ۵- تنه‌های عصبی به همراه سطوح اتصال آن‌ها؛ ۶- روده؛ ۷- دهلیز جنسی؛ ۸- اندام جفت‌گیری؛ ۹- غدد زرده ساز (ویتلاری)؛ ۱۰- مخزن غدد پروستات؛ ۱۱- رحم (اووتیپ به همراه تخم‌ها)؛ ۱۲- مجرای واژنی؛ ۱۳- کانال جنسی روده‌ای؛ ۱۴- تخمدان؛ ۱۵- بیضه‌ها؛ ۱۶- قلاب‌های میانی دیسک اتصال؛ ۱۷- چشم‌ها؛ ۱۸- منفذ دستگاه دفعی؛ ۱۹- حلق؛ ۲۰- مجرای سمینال (واز دفران)؛ ۲۱- غدد پوسته ساز؛ ۲۲- مجاری غدد زرده ساز (ویتلاری)؛ ۲۳- مجرای تخم بر (اوویدوکت)؛ ۲۴- غدد انتهای خلفی بدن و دیسک اتصال (هاپتور)؛ ۲۵- چنگک‌های حاشیه‌ای دیسک اتصال؛ ۲۶- بادکش‌های قیف roal ؛ ۲۷- دریچه‌های اتصال (اقتباس از بایکوفسکایا- پاولوفسکایا و همکاران، ۱۹۶۴).

---

1. Fluke
2. Tape worms
3. Monogenetic flukes, Class Monogenoidea (Beneden), Bykhovskii, 1937

لوب‌ها دارای حفره‌ها یا مکنده‌هایی (بادکش‌هایی) هستند، یا به زوائد لاله گوشی شکل غده‌ای[1] تغییر شکل داده‌اند. انتهای عقبی کرم کم‌وبیش مشخص و شامل یک دیسک اتصال (هاپتور) است که مسلح به ساختارهای کیتینی متفاوت است. چنگک‌های حاشیه‌ای و قلاب‌های میانی، میله‌ها و صفحه‌های ارتباطی، دریچه‌ها، دیواره‌های عضلانی، حفره‌ها و انواع متفاوتی از زوائد، به همراه خود دیسک که گاهی اوقات به یک بادکش (مکندهٔ) قوی تغییر شکل می‌دهد، دیده می‌شود. تعداد و شکل قلاب‌ها و ریخت‌شناسی ساختارهای اتصالی کیتینی و عضلانی، در طبقه‌بندی این انگل‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

کرم‌های برگی شکل، مهره‌داران خونسرد را آلوده می‌کنند و البته، سخت‌پوستان، سفالوپودها (سرپایان) و پستانداران آبزی (هیپوپوتاموس) استثناء هستند و آن‌ها نیز آلوده می‌شوند (بایکوفسکایا- پاولوفسکایا و همکاران، ۱۹۶۴).

تصویر ۷-۵: داکتیلوژیروس اکستنسوس (قلاب‌های ناحیه اوپیستوهاپتور)از ماهی کپور در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

1. Glandular lappet

تصویر ۷-۶: تترااونکوس مونتنترون (قلاب‌های ناحیه اوپیستوهاپتور) از اردک‌ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۷: ژیروداکتیلوس .sp (قلاب‌های ناحیه اوپیستوهاپتور) از ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۸: دیکلی بوتریوم آرماتوم (ناحیه سر) (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۹: دیکلی بوتریوم آرماتوم (ناحیه دم) (بزرگنمایی ۱۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

ترماتودهای دیژن ماهیان

ترماتودهای دیژن همگی دارای چرخهٔ زندگی پیچیده هستند که طی آن، چندین مرحلهٔ نوزادی پی‌درپی و تولیدمثل جنس و غیرجنسی متناوب را پشت سر می‌گذارند و در طول چرخهٔ تکاملی خود، میزبان‌های خود را تغییر می‌دهند تا در میزبان اصلی به مرحلهٔ بلوغ برسند. ماهیان نیز در طول چرخهٔ تکاملی ترماتودها، دچار آلودگی می شوند و می‌توانند یا نقش میزبان اصلی یا واسط را ایفا کنند. ممکن است ترماتودهای بالغ در روده، کیسهٔ صفرا، مثانه و به‌ندرت در اندام‌های دیگر ماهی دیده شوند. تقریباً تمام ترماتودهای دیژن ماهیان، هرمافرودیت و دارای دستگاه تناسلی نر و ماده هستند. تخم‌ها در میزبان اصلی تولید و بعد از طریق مدفوع، ادرار یا راه‌های دیگر، آزاد

می‌شـوند. برای مثال، تخم‌های گونه‌های سـالمینیکولا[1]، در خون ماهی رها می‌شـوند، از آبشش ها عبور می‌کنند و در همین‌جا، میراسـیدیوم ها از تخم خارج می‌شـوند و مسـتقیماً به داخل آب می‌ریزنـد. تخم‌هـایی کـه از بدن میزبان خارج می‌شـوند، یا در داخل آب به میراسـیدیوم تبدیل می‌شـوند، یا اینکه اولین میزبان واسـط که یک نوع نرمتن اسـت، آن‌ها را می‌بلعد. میراسیدیوم‌هایی که در داخل آب از تخم خارج می‌شـوند، باید به‌طور فعال به جستجوی اولین میزبان واسط بپردازند تا با سـوراخ کردن پوسـت، وارد بدن آن شـوند. حلزون‌ها، صـدف‌ها یا به‌ندرت کرم‌های حلقوی (آنلید)[2]، به‌عنوان اولین میزبان واسط ترماتود به‌حساب می‌آیند.

معمولاً تعداد میزبان‌های واسـط بسـته به گونه‌های ترماتودها، محدود اسـت. میراسـیدیوم در اولین میزبان واسـط، در اثر دگردیسـی به اسپورسیست مادر یا ردی مادر تبدیل می‌شود. این‌ها نیز به‌نوبه خود، تکثیر غیرجنسـی انجام می‌دهند و یک یا چند اسپوروسیست دختر یا ردی دختر ایجاد می‌کنند. اسـپوروسـیسـت ها یا ردی‌های مادر و دختر، بین چند تا صـدها سـرکر ایجاد می‌کنند. سـرکرهای بیشتر گونه‌های ترماتودها، از اولین میزبان واسط خارج می شوند و با شنای آزاد، فعالانه به جسـتجوی دومین میزبان واسط می‌پردازند تا با سوراخ کردن پوست، به بافت‌های زیرپوست نفوذ کنند. سـرکر بعضـی از گونه‌ها، وارد پوسـت، بعضـی وارد قرنیهٔ چشـم و بعضـی نیز وارد رشـته‌های آبشـشـی یا قسـمت‌های دیگر می شـوند. در داخل اسـپوروسیست مادر یا دختر بعضی از گونه‌های ترماتودها، یک سـرکر پیش رس[3] تولید می‌شـود. این سرکر بعدازاینکه نرمتن یا کرم حلقوی توسط ماهی خورده شـد، در محیط معده آزاد می‌شود و شروع به مهاجرت به سمت اندام موردنظر می‌کند. سـرکر در بدن میزبان واسـط دوم، به متاسـرکر تبدیل می‌شود و وقتی‌که این میزبان توسط میزبان اصلی بلعیده شد، چرخهٔ تکاملی انگل کامل می‌شود.

---

1. *Salminicola*
2. Annelid worms
1. Precoious

تصویر ۷-۱۰: نمودار کرم‌های برگی شکل. e:مری؛ ep: منفذ ترشحی؛ ev: وزیکول ترشحی؛ fp: منفذ جنسی ماده؛ gb: بورس جنسی؛ i: روده؛ ie: انتهای روده؛ lc: کانال لورر؛ mp: منفذ جنسی نر؛ o: تخمدان؛ oo: اووتیپ؛ os: بادکش دهانی؛ p: حلق؛ se: مجرای بیرون رینده (اجاکولات) اسپرم؛ sh: غدد پوسته ساز؛ sr: مخزن دریافت‌کننده اسپرم؛ sv: سمینال وزیکول؛ t: بیضه‌ها؛ u: رحم؛ vd: مجرای ویتلاری (غدد زرده ساز)؛ vde: وازدفران؛ vit: ویتلاریا (غدد زرده ساز)؛ vs: بادکش شکمی (اقتباس از بایکوفسکایا- پاولوفسکایا و همکاران، ۱۹۶۴).

تصویر ۷-۱۱: ریپیدوکوتیل ایلنس (بزرگنمایی ۴۰) از اردک‌ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۱۲: آسیمفیلودورا تینکه (بزرگنمایی ۴۰) از لای ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۱۳: تصویر الکترونی نگاره از اسکریابینوپسولوس سمی آرماتوس (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

سستودهای ماهیان

رده سستویدیا

سستودها، کرم‌هایی با بدن پهن و نواری شکل هستند. بدن آن‌ها شامل سر (اسکولکس) و تعداد متعددی بندهای پی‌درپی (پروگلوتید) است که تنه یا استروبیلا را تشکیل می‌دهند. البته اعضای زیر ردهٔ سستودایا و راستهٔ کاریوفیلیده‌آ از زیرردهٔ سستودا دارای بدنی کامل و بدون بند هستند. معمولاً سر این کرم‌ها، دارای اندام اتصال (تثبیت) است که به‌صورت بادکش یا قلاب‌های کیتینی دیده می‌شود.

بادکش‌ها انواع متنوعی دارند. بعضی به‌صورت لوب‌های مکندهٔ برگی شکل یا حفره (بوتریدی) دیده می‌شوند که گاهی اوقات توسط دیواره‌هایی، به بخش‌های ثانویه و شیارهای گودال مانند و حفره‌های شکاف مانند (بوتری) تقسیم می‌شوند. معمولاً تعداد مکنده‌ها ۲، ۴ یا بیشتر است که گاهی اوقات دارای حفرهٔ مکندهٔ نهایی واحدی هستند. نوع دوم اندام تثبیت، قلاب‌های کیتینی به اشکال و اندازه‌های مختلف هستند که بر روی اسکولکس قرار می‌گیرند و معمولاً محل قرار گرفتن آن‌ها، بر روی روستلوم برآمدهٔ انتهایی یا خرطوم است (سیکلوفیلیده)، یا اینکه بر روی چهار روستلوم یا پروبوسید دیده می‌شوند (تترارینکیده). گاهی اوقات قلاب‌ها بر روی حاشیه‌های بوتریدی ها یا بر روی اندامی در پشت سر قرار می‌گیرند (تترافیلیده، پروتئوسفالیده). همچنین ممکن است بر روی صفحه‌ای در پشت سر یا مستقیماً بر روی اسکولکس قرار گیرند (پسودوفیلیده).

معمولاً به دنبال سر، یک گردن کوتاه و فاقد بند وجود دارد که درواقع، مرکز رشد انگل است و از آنجا، بندهای جدید به‌صورت پی‌درپی به وجود می‌آیند و استروبیلا را تشکیل می‌دهند. در کرم‌های فاقد بند و لیگولیدها که فاقد اسکولکس مشخص هستند (و قسمت قدامی بدن، وظایف اسکولکس را انجام می‌دهد)، مرکز رشد متمرکزی وجود ندارد و این وضعیت مطابق معمول، در همهٔ کرم‌های پهن فاقد بند دیده می‌شود.

ردهٔ سستویدیا به دو زیررده تقسیم می‌شود: ۱- کرم‌های نواری شکل فاقدبند (مونوزوئیک) یا سستودریا، با نوزادهایی به نام لیکوفور یا دکاکانت که دارای ۱۰ قلاب هستند؛ ۲ - کرم‌های نواری‌شکل واقعی (سستودا) با مرحلهٔ لاروی به نام انکوسفر (کوراسیدیوم) که دارای ۶ قلاب جنینی است. اعضای یک جنس از راستهٔ آمفیلینیده‌آ و زیرردهٔ سستودریا انگل ماهیان واقع می‌شوند، درحالی‌که هفت راسته از سستودها که سه راستهٔ آن (تترارینکیده‌آ، تترافیلیده‌آ و سیکلوفیلیده آ) تنها توسط اشکال نوزادی خود مشخص می‌شوند، در ماهیان وجود دارند.

تصـویر ۷-۱۴: نمودار سـاختار دسـتگاه تولیدمثل در کرم‌های نواری مختلف. A: کاریوفیله ایدیا (اقتباس از فورمن، ۱۹۳۱)؛ B: پروتوسـفـالیـدیا (اقتباس از یاماگوتی، ۱۹۳۴)؛ C: پسـودوفیلیدیا (اقتباس از فورمن، ۱۹۳۰). c: سـیر؛ cb: بورس سـیر؛ o: تخمدان؛ sh: غدد پوسـته سـاز؛ sr: مخزن دریافت‌کننده اسپرم؛ sv: سـمینال وزیکول؛ t: بیضـه‌ها؛ u: رحم؛ up: منفذ رحم؛ uvp: منفذ رحمی واژنی؛ v: واژن؛ vas: مجرای سـمینال (واز دفران)؛ vd: مجاری ویتلاری (غدد زرده ساز)؛ vit: ویتلاریا (غدد زرده ساز)؛ vp: منفذ واژنی (اقتباس از بایکوفسکایا- پاولوفسکایا و همکاران، ۱۹۶۴).

تصویر ۷-۱۵: کاریوفیله اوس فیمبریسپس (اسکولکس و ناحیه جلویی) (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۱۶: کاریوفیله اوس فیمبریسپس (ناحیه دم) (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۱۷: تریه نوفوروس کراسوس (ناحیه اسکولکس) (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) از اردک‌ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر(ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۱۸: بوتریوسفالوس گوکنگنسیس (اسکولکس و ناحیه جلویی) (بزرگ‌نمایی ۲۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوب غربی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۱۹: یوبوتریوم آسیپنزرینوم (اسکولکس و ناحیه جلویی) (بزرگنمایی ۱۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۰: بوتریمونوس فالاکس (ناحیه سر) (بزرگ‌نمایی ۲۰۰) از ماهیان خاویاری در حوضه جنوب غربی دریای خزر (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

نماتودهای ماهیان

بدن نماتودها استوانه‌ای است و گاهی اوقات به اشکال مختلف (کیسه‌ای یا گلابی شکل) دیده می‌شود. سطح خارجی بدن توسط پوشش کوتیکولی توسعه‌یافته پوشیده شده است. در بعضی از موارد، واجد ضمایم متفاوت نظیر خار، قلاب، توبرکول، برآمدگی و گره هستند. بعضی از آن‌ها بر روی جلد خود خطوط طولی یا عرضی دارند. جنس نر گونه‌های مختلف، خصوصاً در بین آسکاریس‌ها، واجد یک جفت بالهٔ دایره‌ای شکل هستند که یا بر روی کل بدن، یا در انتهای آن قرار دارد. نماتودها واجد حفرهٔ عمومی اولیه و حفرهٔ پوستی - عضلانی هستند که تنها از عضلات طولی پوشیده شده است.

انتهای قدامی بدن نماتودها، دارای حفره دهانی است که در قسمت انتهایی قرار دارد و معمولاً (نه همیشه) توسط لب‌ها احاطه شده است. این لب‌ها، واجد اندام‌های حسی هستند. ساختار، تعداد

و وضـعیت لب‌ها، بسـیار متفاوت اسـت. در اطراف انتهای قدامی (لب‌ها یا ناحیهٔ پشـت لب‌ها)، اندام گیرندهٔ شـیمیایی یا آمفیدها وجود دارند که شامل حفره‌هایی در پوست هستند و با اعصاب آمفیدی ارتباط دارند. شکل آمفیدها پاکتی شکل، مارپیچی، وزیکولار، نعل اسبی یا حفره‌ای شکل است.

دسـتگاه گوارش، شـامل دهان، مری و روده اسـت. اغلب دهان شـامل کپسـول دهانی است که توسـط کوتیکول پوشـیده شـده است. پس‌ازآن، مری قرار دارد که از سه بخش قابل‌تفکیک تشکیل شده است. این سه بخش، شامل قسمت جلویی، قسمت میانی باریک و قسمت عقبی متسع یا بولب اسـت. بسـیاری از گونه‌ها، واجد قسمت جلویی عضلانی و قسمت عقبی غده‌ای یا ونتریکول (کاردیا) هستند. اعضای راسته آسکاریدیدا، در محل اتصال مری به مجرای روده‌ای، دارای زوائد کور (سکوم) هستند.

زوائد کور دو نوع هستند که شامل زائدهٔ کور روده‌ای و زائدهٔ کور مری است. در کونتراسکوم، هر دو نوع دیده می‌شود، اما در پوروسکوم، زائدهٔ کور روده‌ای و در رافیدآسکاریس، زائدهٔ کور مری وجود دارد. وجود این زوائد کور و جهت قرار گرفتن آن‌ها (جلویی یا عقبی)، برای طبقه‌بندی آن‌ها استفاده می‌شود. روده شامل یک لولهٔ مستقیم است که به منفذ مخرجی (آنال) ختم می‌شود. در نماتودهای نر، غـالبـاً کلوآک وجود دارد کـه مجاری تولیدمثلی و رودهٔ عقبی به داخل آن باز می‌شـــوند. منفذ مخرج، در سـطح شـکمی باز می‌شـود، گاهی اوقات در قسـمت انتهایی قرار دارد و گاهی اوقات نیز اصـلاً وجود ندارد. قسمتی از بدن که پس از منفذ مخرج قرار دارد، دم نامیده می‌شود و ازنظر شکل و اندازه در گونه‌های مختلف، متفاوت است. بسیاری از انگل‌های نماتود (زیردهٔ فاسمیدیا) در ناحیهٔ دم، دارای غدد مخصوص دمی یا فاسمید هستند. اعضای زیردهٔ آفاسمیدیا چنین غددی را ندارند.

ردهٔ نمـاتودها دارای دو زیرده اســـت: ۱ - فاســـمیدیا، که ویژگی آن‌ها، داشـــتن غدد دمی مخصوص به نام فاسمید است. ۲-آفاسمیدیا، که فاقد فاسمید هستند.

ویژگی‌های زیر، در تشـخیص اعضـای گروه کرم‌های گرد اهمیت بسیار زیادی دارند: ۱ – اندازهٔ بدن؛ ۲- سـاختار انتهای جلویی بدن (شـکل، تعداد و وضـعیت لب‌ها، دندان‌ها و سـاختار کپسـول دهانی و حلق و مری)؛ ۳- وضـعیت حلقهٔ عصـبی؛ ۴ - سـاختار روده (وجود زوائد کور، جهت قرار گرفتن و تعداد آن‌ها)؛ ۵ - وضعیت منافذ دفعی؛ ۶ - ساختار و محل قرار گرفتن منفذ تناسلی ماده؛ ۷- شـکل و اندازهٔ زوائد فرعی و جدار تخم‌ها؛ ۸ – سـاختار قسـمت عقبی انگل نر (محل قرارگرفتن کلوآک، وضـعیت، تعداد و نوع پاپیلای جنسـی، شـکل، سـاختار و تعداد اسپیکول‌ها و وجود یا نبود گوبرناکولوم، وجود باله، خار یا ساختارهای دیگر)؛ ۹ - گونهٔ میزبان و محل قرار گرفتن انگل در بدن آن (بایکوفسکایا- پاولوفسکایا و همکاران، ۱۹۶۴).

تصویر ۷-۲۱: کامالانوس لاکوستریس جداشده از ماهیان سوف در سواحل جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۲: یواسترونژیلیدس اکسیسوس جداشده از ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۳: نوزاد آنیزاکیس جداشده از ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۴: رافیدآسکاریس آکوس (ناحیه سر) جداشده از اردک‌ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۵: رافیدآسکاریس آکوس (ناحیه دم) جداشده از اردک‌ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۴۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۶: سیستیدیکولا افمریداروم[1] (ناحیه سر) جداشده از ماهی قزل‌آلای خال قرمز در حوضه جنوب غربی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۲۰۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

1. *C. ephemeridarum*

تصویر ۷-۲۷: *Dichline minutus* (ناحیه سر) جداشده از گاوماهیان در حوضه جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۴۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۸: نوزاد رافیدآسکاروئیدس .sp (ناحیه سر) جداشده از ماهی اسبله (*Silurus glanis*) در حوضه جنوب غربی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۴۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۲۹: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از کوکولانوس اسفروسفالوس (ناحیه سر) جداشده از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۳۰۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

خارسران (آکانتوسفالا)

کرم‌های کم‌وبیش استوانه‌ای هستند که دو قسمت متمایز در آن‌ها دیده می‌شود. این دو قسمت، شامل بدن و خرطوم است. اهمیت طبقه‌بندی آن‌ها به شکل خرطوم مربوط می‌شود که ممکن است گرد یا کروی (بیشتر نئواکینورینکینه آ)، بیضی یا تخم مرغی (پارآکانتو سفالوس کورتوس) یا اینکه استوانه‌ای (بیشتر اکینورینکیدا) با تغییرات مختلف باشد. ابعاد خرطوم نیز مهم است. برای مثال، می‌توان از طول یا فاصله نوک خرطوم تا نقطه شروع خارهای عقبی، پهنا یا فاصله بین دونقطه مجزا با بیشترین پهنا از وسیع‌ترین بخش، به‌استثنای خارها نام برد.

خرطوم توسط خارهای کوتیکولی خمیده (برگشته) پوشیده شده است که برای اتصال انگل به دیواره میزبان استفاده می‌شود. خارهای موجود بر روی خرطوم اعضای زیررده نئواکینورینکینه آ، به‌صورت ردیف‌های مارپیچی قرار می‌گیرند و تعداد خارهای موجود بر روی هر ردیف مارپیچی، برای اهداف طبقه‌بندی حائز اهمیت است. خارهای اعضای زیررده اکینورینکینه‌آ، به‌صورت آرایش پنج‌تایی قرار می‌گیرند (برای مثال، به‌صورت مدل شطرنجی) و ردیف‌های مارپیچی و طولی، هر دو به‌طور مشخص دیده می‌شوند.

دسته آکانتو سفال ها، شامل کرمهای انگلی است که در روده مهره‌داران در مرحله بلوغ جنسی زندگی می‌کنند. اعضای دو زیررده نئواکینو رینکینه آ و اکینورینکینه آ، ماهیان را آلوده می‌کنند.

تصویر ۷-۳۰: کورینوزوما استروموزوم (ناحیه خرطوم) جداشده از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۴۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

تصویر ۷-۳۱: لپتورینکوئیدس پلاژی سفالوس (ناحیه خرطوم) جداشده از ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (بزرگ‌نمایی ۴۰) (ستاری و همکاران، ۲۰۰۷).

زالوها و سخت‌پوستان در ماهیان

زالوهای رده هیرودینهآ (شاخه کرم‌های حلقوی) در آب‌های شیرین همه قاره‌ها، به‌جز قطب جنوب و اقیانوس‌های دنیا زندگی می‌کنند. اکثر این موجودات از کرم‌ها، نوزاد حشرات، نرمتنان و بی‌مهرگان دیگر تغذیه می‌کنند و غذای دیگر آن‌ها، خون بی‌مهرگان و مهره‌داران است. معمولاً به زالوهای دسته اخیر، انگل‌های مهاجم نیز اطلاق می‌شود. ماهیان آب‌های شور و شیرین، میزبان‌های معمول این دسته هستند.

زالوها دارای بدنی دراز، باریک و مارپیچی هستند و فعالانه برای حمله به شکار خود، در آب شنا می‌کنند. جراحت ایجادشده در پوست و بافت‌های زیرین، موجب ورود خون و مایعات به داخل دستگاه گوارش زالو می‌شود. زالو پس از پر کردن دستگاه گوارش خود از خون، شکار را رها می‌کند. زخم ایجادشده، به‌تدریج بهبود می‌یابد، اما عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب در طی روند بهبود، در هر زمان، می‌توانند وارد زخم شوند.

تصویر ۷-۳۲: شمایی از یک زالو که خصوصیات تشخیصی، ازجمله بادکش‌ها و حالت بندبندی آن را نشان می‌دهد.

انگل‌های سخت‌پوست

تعداد بسیار زیادی از سخت‌پوستان برای ادامه زندگی خود، به حیوانات دیگر وابسته هستند. این موجودات می‌توانند برای ماهیان نیز مشکلاتی ایجاد کنند. شاخه بندپایان گروهی بسیار بزرگ و متنوع هستند و رده سخت‌پوستان از این شاخه، شامل راسته‌های بسیاری است که بعضی از گونه‌های آن، مستقیماً به ماهیان اختصاص یافته‌اند. در یکی از منابع عنوان شده است که ماهیان به بیش از هزار گونه از پاروپایان، آبشش پایان، جورپایان، ناجورپایان و بارناکل‌ها آلوده می‌شوند. بعضی از این‌گونه‌ها، همان‌طور که بعداً توضیح داده خواهد شد، کشنده هستند. بعضی دیگر، موجب ناتوانی و ضعف ماهیان می‌شوند و عده‌ای نیز اهمیت ویژه‌ای در پرورش ماهی و صنایع مربوط به آن دارند.

سخت‌پوستان دارای یک اسکلت خارجی و ضمایم متصل به آن هستند. بدن آن‌ها بندبند، دستگاه گوارش کامل و دستگاه گردش خون به‌صورت هموسل است. مغز در قسمت عقبی و رشته‌های عصبی در قسمت شکمی قرار دارند و هر بند از بدن، دارای یک گانگلیون (گره) عصبی است. لوله‌های مالپیگی به‌عنوان اندام‌های دفعی، در اکثر گونه‌ها وجود دارند. تنفس توسط نای، آبشش یا از طریق سطح بدن انجام می‌شود. جنس‌ها مجزا و همگی تخم‌گذار هستند.

پاروپایان

وقتی‌که لرنه آ سیپریناسه‌آی ماده بر روی میزبان خود به مرحله بلوغ رسید، توسط جنس نر بارور می‌شود. دگردیسی در جنس ماده زمانی تکمیل خواهد شد که ظاهر بدن این پاروپا به شکل جانور عجیب‌وغریبی در آید که هیچ‌گونه شباهتی به پاروپایان ندارد. ناحیه سر انگل در بافت پوششی پوست یا آبشش میزبان فرو می‌رود و اغلب از دیواره بدن یا کاسه سر عبور می‌کند و وارد اندام‌های دیگر می‌شود. دگردیسی سر از طریق زوائد رأسی صورت می‌گیرد. روند مذکور، تثبیت انگل را به همراه دارد و این امر موجب نگهداری موجود در محل خود برای باقیمانده دوره زندگی می‌شود.

در نزدیکی انتهای عقبی بدن ماده‌های باروری که به میزبان متصل هستند، یک جفت کیسه تخم رشد می‌کند و تخم‌ها پس از تولید به این کیسه اضافه می‌شوند. این تخم‌ها در داخل کیسه فشرده نشده‌اند. لذا فضای کافی برای رشد و تکامل و ایجاد جنین وجود دارد. کیسه مذکور، تخم‌های بالغ و رسیده را نیز پوشش می‌دهد. سپس، تخم‌ها بالغ می‌شوند و ناپلیوس ها کیسه تخم را پاره می‌کنند و خارج می‌شوند.

ناپلیوس های تازه متولدشده، بیضی‌شکل هستند و حدود ۱۴۰ میکرومتر درازا و ۸۰ میکرومتر پهنا دارند. این موجودات پس از ۵۰ ساعت، بسته به دمای محیط، پوست‌اندازی می‌کنند و به متاناپلیوس تبدیل می‌شوند. متاناپلیوس ها نیز به آهستگی بزرگ می‌شوند و به درازایی حدود ۱۸۰ میکرومتر و پهنای ۸۵ میکرومتر می‌رسند و سیخک‌هایی در قاعده آواره‌های آن‌ها ظاهر می‌شود.

اولین نشـــانه مرحله متاناپلیوس، ظهور بدن بندبند اســـت. ۲۰ الی ۴۰ ســـاعت بعد از تشـــکیل متـاناپلیوس، یک اســـکلت خارجی پیکر موجود را دربرمی‌گیرد و پاروپای اولیه با بدنی حدود ۲۳۰ میکرومتر درازا و ۱۱۰ میکرومتر پهنـا ایجـاد می‌شـــود. پـاروپای اولیه دو جفت پای شـــنا دارد و شـاخک‌های آن واجد بندهای بسـیار است و درصورتی‌که نتواند در طی سه روز میزبان خود را پیدا کند، از بین می‌رود.

پاروپای اولیه بر روی پوســت و آبشــش میزبان خود دگردیســی را ادامه می‌دهد و به دنبال آن، دومین، ســومین، چهارمین و پنجمین مرحله پاروپایی را ســپری می‌کند. در طی این مراحل، هر بار بدن پاروپا به میزان بیشــتری بندبند می‌شــود و تعداد پاهای شــنا افزایش می‌یابد. یک قطعه یا بند شکمی اضافی نیز در مرحله پنجم پاروپایی اضافه می‌شود که درواقع، همان بند تناسلی است. جنس نر در این زمـان، حدود ۷۸۰ میکرومتر درازا و ۱۷۰ میکرومتر پهنا دارد و دارای یک جفت بیضـــه تکامل‌یافته در ناحیه سینه است که مجاری اسپرم بر آن به بند تناسلی منتهی می‌شوند. جنس ماده حدود ۱۰۴۰ میکرومتر درازا و ۲۰۰ میکرومتر پهنا دارد و واجد بند تناسـلی بسیار طویل و سنگین اســت. عمل جفت‌گیری در ششمین مرحله تکاملی پاروپایی انجام می‌شود. جنس نر دو اسپرماتوفور کیســه‌ای شکل خود را بر روی بند جنس ماده قرار می‌دهد و سپس ماده را ترک می‌کند و می‌میرد. جنس ماده بارورشــده، دگردیســی را ادامه می‌دهد و به‌ســرعت طولش افزایش می‌یابد و پوســت یا آبشـــش میزبان را نیز ســـوراخ می‌کند. ســـپس، روند تکاملی تثبیت بر روی ســـر انجام می‌شـــود و تخمدان‌ها در جهت عقبی، از قسـمت قدامی سینه در نقطه‌ای نزدیک به محل اتصال سینه با شکم، شـروع به رشـد می‌کنند. بدن نیز به رشـد خود ادامه می‌دهد و شاخک‌های رأسی از ناحیه سر انگل منشعب می‌شوند. جنس ماده در این وضعیت، قادر به تولید تخم است.

تصویر ۷-۳۳: شمایی از انواع عمدهٔ پاروپایان انگلی که ماهیان پرورشی را مبتلا می‌کنند، ازجمله ویژگی‌های تشخیصی آن‌ها. کیسه‌های تخم (E) فقط در ماده‌های بالغ دیده می‌شوند. اگر انگل بالغ تازه به ماهی چسبیده باشد، ممکن است با چشم غیرمسلح قابل‌مشاهده نباشند. شمای ۱: پاروپای تیپیک دارای زندگی آزاد (*Cyclops* sp.)،C=cephalothorax شمای ۲: نوع ارگازیلی فورم: بدن به سه بخش سر، سینه و شکم تقسیم می‌شود و شکل آن شبیه مرحله زندگی آزاد پاروپایان است. آنتن چنگ مانند (grasping) و کیسه تخم فقط در ماده‌های بالغ دیده می‌شود. شمای ۳: نوع لرنئوپودید (از نمای جانبی و پشتی): بدن آن‌ها نسبت به ارگازیلیدها به چنگک شباهت بیشتری دارد. شمای ۴: نوع کالیگی فورم (نر در سمت چپ و ماده در سمت راست): شپش دریایی بالغ (۵ تا ۱۰ میلی‌متر)، پهن با سر وسیع . کیسه تخم فقط در ماده بالغ دیده می‌شود. شمای ۵: شکل لرنه اید: ماده بالغ (حدود ۵ تا ۲۵ میلی‌متر) با بدن دراز و باریک و زوائد وستیگال(vestigal)، سر و قلاب‌ها.

تصویر ۷-۳۴: لرنه آ سیپریناسه آی ماده. به زوائد زائده راسی (سمت راست تصویر) و یک زوج کیسه تخم (سمت چپ) توجه شود.

تصویر ۷-۳۵: ناپلیوس لرنه آ سیپریناسه.

تصویر ۷-۳۵: مرحله پاروپایی لرنه آ سیپریناسه آ.

آبشش پایان

گونه‌های جنس آرگولوس را شپش ماهیان نیز می‌نامند. این انگل‌ها بدنی پهن دارند که برای اتصال به بدن میزبان و تغذیه سازگاری یافته است و نیش‌های روی بدن، بادکش‌های فنجانی شکل و استیلت‌ها که جزء آلات تغذیه‌ای انگل هستند، به میزبان آسیب می‌رسانند، خصوصاً وقتی‌که تعداد زیادی از این موجودات بر روی بدن یک میزبان استقرار یابند.

شکل بدن گونه‌های آرگولوس در هر دو جنس نر و ماده، پهن، مسطح و تخم مرغی شکل است و هر دو جنس، دارای یک اندازه هستند. اتصال سر به سینه، آن‌قدر به هم نزدیک است که به آن، سرسینه (سفالوتوراکس) می‌گویند. دو چشم مرکب نیز در ناحیه سر وجود دارد. دو آرواره بالایی به‌صورت اندام‌های بادکش مانند برای اتصال به میزبان، تغییر شکل یافته‌اند. آرواره‌های پایینی نیز در یک حفره بر روی سطح شکمی قرار دارند. قسمت‌های دیگر دهانی، تغییر شکل داده و به‌صورت استیلت درآمده‌اند. استیلت ها توسط غلافی احاطه شده‌اند و انگل می‌تواند به کمک آن‌ها، در بافت میزبان نفوذ کند. استیلت ها در قسمت جلویی چشم‌ها، در بین آرواره‌های پایینی قرار دارند.

تصویر ۷-۳۶: شمایی از یک آبشش پای تیپیک (آرگولوس) از سطح شکمی. خصوصیات تشخیصی کلیدی شامل اندازه (۵ تا ۲۰ میلی‌متر)، شکل بیضی که شبیه یک فلس است و بادکش‌ها که شبیه چشمان بزرگ هستند.

قسمت پشتی ناحیه سرسینه، محدب است. چهار جفت پای شنا در این انگل وجود دارد. پاهای مذکور، به موجود زنده این توانایی را می‌دهند تا در آب و روی بدن میزبان حرکت کند. شـــکم که گاهی باله دمی نامیده می‌شود، کوتاه است و از دو لبه گرد تشکیل می‌شود که به‌صورت تنگاتنگ به ناحیه سینه متصل است. کیسه‌های تخم بر روی جنس ماده مشاهده می‌شوند.

تصویر ۷-۳۷ :شمای میکروسکوپ الکترونی آرگولوس فولیاسه اوس.

تصویر ۷-۳۸: شمای لپئوفتیروس (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

فصل هشتم

فنون سم‌شناسی در آبزیان

مقدمه

مواد معلق، ترکیبات و یون‌های محلول و همچنین، فرآورده‌های حاصل از تجزیهٔ زیستی برای مدت‌زمان نسبتاً کوتاه و بعضی از آن‌ها را برای مدت طولانی در منابع آبی باقی می‌مانند. آب که مهم‌ترین حلال موجود در طبیعت است، مواد طبیعی و همچنین، مواد صناعی و نیمه صناعی را در خود حل می‌کند.

تمدن پیشرفتهٔ امروز قادر است تغییرات پیچیده‌ای در محیط ایجاد کند. البته، این مطلب بدین معنی نیست که تمام تغییرات ایجادشده در محیط در اثر تمدن جدید ایجادشده است، بلکه می‌توان این‌طور استنباط کرد که از زمان ایجاد صنایع پیشرفته، میزان مواد زائدی که وارد طبیعت می‌شود، افزایش یافته است. مواد زائدی که روزانه در جمعیت‌های پیشرفتهٔ انسانی تولید می‌شوند، پس از رها شدن در آب باعث تغییر در قدرت بقای موجودات زندهٔ آبزی و همچنین، آلودگی محیط‌زیست می‌شوند. بنابراین، ماهیان نیز در اثر تغییرات مداوم اکوسیستم، شرایط مطلوب برای ادامهٔ زندگی خود را از دست می‌دهند؛ بدین ترتیب که در بعضی از مواقع، تغییرات محیط سبب تغییرات فیزیولوژیک یا بیوشیمیایی یا اعمال دیگر بدن ماهی می‌شود و نتیجهٔ این امر، حساس شدن ماهی نسبت به عوامل بیماری‌زای موجود در محیط خواهد بود.

ماهیان وحشی و همچنین، ماهیانی که در محیط‌های محصور زندگی می‌کنند، به‌طور اتفاقی یا عمدی در معرض آلاینده‌های متعدد قرار می‌گیرند. در طی چند دههٔ گذشته، تلاش‌های زیادی صورت گرفته است تا ارتباط بین آلاینده‌های آب و سموم طبیعی را با ماهیان مشخص و دسته‌بندی کنند. سم شناسان نتیجهٔ این مطالعات را برحسب تشابه بین آن‌ها، طبقه‌بندی کرده‌اند و همچنین، از واژه‌هایی استفاده کرده‌اند که بتواند به نحو مناسب، سمیت نسبی سموم را در رابطه با محیط آب نشان دهد. طبقه‌بندی مذکور نه‌تنها در زمینهٔ علم سم‌شناسی حائز ارزش و اهمیت است، بلکه به‌عنوان روشی برای ارزیابی اثرات کشنده و تحت کشندهٔ سموم بر روی ماهیان مورداستفاده قرار می‌گیرد. استفاده از اصطلاحات سم‌شناسی برای توصیف اثر نسبی یک مادهٔ سمی باید در حد امکان با اطلاعات لازم در زمینهٔ عوامل مؤثر بر سمیت، همراه شود. عواملی مانند دما،pH و غلظت اکسیژن محلول در محیط که بر روی افزایش یا کاهش سمیت مواد سمی تأثیر می‌گذارند، باید شناخته شوند. برای مثال، ماده‌ای ممکن است برای یک گونهٔ خاص از ماهیان که در آب‌های سبک (آبی که در آن میزان کلسیم، منیزیوم و یون‌های دیگر مؤثر در ایجاد سختی کم است) زندگی می‌کند، کشنده باشد، ولی همین ماده در آب‌هایی که دارای کلسیم و منیزیوم نسبتاً زیاد هستند، در مدت کوتاه هیچ اثر قابل مشاهدهٔ فیزیولوژیک برجا نگذارد. pH محیط نیز نسبت کلسیم-منیزیوم را به سمت منیزیوم تغییر می‌دهد که نتیجهٔ آن، ایجاد تغییراتی در سمیت نسبی خواهد

بود. وجود یا عدم وجود مواد آلی در آب، باعث تغییرات بسیار زیاد در میزان سمیت بعضی از مواد سمی می‌شود. بیشتر مطالعات در زمینهٔ سمیت مواد معلق، محلول، یون‌ها و مواد سمی دیگر موجود در آب، با نتایج متناقصی همراه بوده است. علت اصلی این تناقصات، وجود پارامترهای مختلف محیطی است؛ بدین معنی که در این مطالعات، پارامترهای فوق‌الذکر یا اندازه‌گیری نشده‌اند، یا این‌که با یکدیگر متفاوت بوده‌اند.

بیشتر مواد سمی موجود در آب را می‌توان به نحوی، در یکی از هفت گروه بزرگ قرار داد. این مواد سبب تغییرات زیان‌آور زیست‌شناختی، فیزیولوژیک و آسیب‌شناسی می‌شوند و بر روی بقای ماهی یا جمعیت ماهیان تأثیر می‌گذارند. اطلاعات ما در مورد اثر مواد سمی بر روی ماهیان، عمدتاً به مقدار یا غلظتی از مادهٔ سمی مربوط می‌شود که مرگ آن‌ها را به همراه دارد. باوجوداین، یک ماده سمی که یک ماهی را با غلظت معین و در زمان مشخص نابود نمی‌کند، اثرات جانبی مداومی بر روی حیوان به وجود می‌آورد که نتیجه‌اش، تأثیر منفی بر روی قدرت بقا، تولیدمثل و سلامت آن است. تماس ماهیان با یک مادهٔ سمی، ممکن است بر روی فعالیت و ظاهر آن‌ها تأثیر نگذارد، ولی بعد از مدتی، اشکالاتی در توانایی تولیدمثل ماهی ایجاد می‌کند و در درازمدت، بر روی کل جمعیت تأثیر می‌گذارد؛ بدین ترتیب که اضافه شدن افراد جدید به جمعیت کاهش می‌یابد، یا صورت نمی‌گیرد. درنهایت، غلظت مادهٔ سمی به حدی می‌رسد که تعداد زیادی از ماهیان یا همهٔ آن‌ها را به‌سرعت نابود می‌کند و جمعیت ماهی لطمه می‌بیند.

تشخیص مسمومیت در ماهی، از طریق مشاهده ظاهر و فعالیت ماهی قبل از مرگ، مشاهدهٔ نشانه‌های بیماری قبل و بعد از مرگ، مشاهدات آسیب‌شناسی و آزمایش آب، غذا یا بافت‌های بدن ماهی صورت می‌گیرد. در ادامهٔ این فصل به‌طور انتخابی در مورد مواد سمی بحث می‌شود و روش‌های مفیدی برای تشخیص آثار این سموم در بدن ماهی ارائه می‌شود.

تعاریف

TLm: غلظت معینی از یک مادهٔ سمی که در آن غلظت، ۵۰٪ از موجودات در مدت معین، قادر به ادامهٔ حیات هستند.

LD_{50}: غلظتی از مادهٔ سمی که در داخل آب، یا به‌صورت تزریقی یا خوراکی، سبب مرگ ۵۰٪ موجودات در مدت‌زمان معین می‌شود.

ED_{50}: مقداری از یک مادهٔ سمی که سبب بروز اثر سمی در ۵۰٪ موجودات در مدت‌زمان معین می‌شود.

MATC: حداکثر غلظت قابل‌قبول یک مادهٔ سمی که سبب بروز آثار زیان‌آور فیزیولوژیک می‌شود.

AF (عامل استعمال، یا نسبت بین غلظت TLm و غلظت MATC): عامل استعمال هر مادهٔ سمی، از طریق تقسیم غلظت MATC برای یک موجود زنده بر غلظت TLm برای همان موجود محاسبه می‌شود.

گروه‌های عمدهٔ مواد سمی یا مضر برای ماهیان

۱. فلزات سمی: آلومینیوم، آرسنیک، آنتی‌موآن، کادمیوم، کروم، مس، آهن، منگنز، جیوه، سرب، اورانیوم، روی و غیره
۲. مواد کاهندهٔ اکسیژن: فضولات دام‌های اهلی، فاضلاب‌های حاوی ضایعات کشتارگاهی، فاضلاب‌های کارخانجات شیر و فرآورده‌های آن، مواد دفعی حاصل از تغذیهٔ حیوانات، فاضلاب کارخانهٔ کاغذسازی که شامل مواد آلی و غیرآلی کاهندهٔ اکسیژن آب است، فاضلاب حاصل از تصفیه شکر، فاضلاب حاصل از کارخانجات آبجوسازی، کارخانجات تقطیر و موارد دیگر.
۳. یون‌های اصلی که به‌طور طبیعی در آب وجود دارند: این یون‌ها شامل کلسیم، منیزیوم، سدیم، پتاسیم، سولفات، کربنات (بی‌کربنات) و کلرید هستند. آن‌ها ۹۵٪ تا ۹۹٪ یون‌های محلول اکثر آب‌های طبیعی را تشکیل می‌دهند. مجموعه‌ای از این ترکیبات به‌طور طبیعی در داخل آب یافت می‌شوند که در آب شیرین به آن‌ها مواد باقیماندهٔ تام و در آب‌شور، شوری اطلاق می‌شود
۴. گازهای سمی: این گازها شامل آمونیاک، کلر، بروم، سولفید هیدروژن، اکسید کربن، ازون و غیره هستند.
۵. ترکیبات آلی سمی: این ترکیبات شامل آمین‌ها، آمیدها، الکل‌ها، کرزول‌ها، سیانیدها، کتون‌ها، چربی‌ها و اسیدهای‌چرب، فنل‌ها، مواد پتروشیمی، حلال‌ها، قیرها، اسیدهای آلی یا نمک‌های آن‌ها و همچنین، سیترات‌ها، مالات‌ها، تارتارات‌ها، اکسالات‌ها، سالیسیلات‌ها و غیره هستند.
۶. آفت‌کش‌ها: این مواد شامل حشره‌کش‌ها، هیدروکربن‌های‌کلردار، ارگانوفسفات‌ها، کاربامات‌ها، عناصر فلزی، ترکیبات فلزی و ترکیبات آلی طبیعی، جلبک‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و ماهی‌کشها هستند.
۷. ترکیبات درمانی: ترامایسین، سولفامرازین، سبز مالاشیت، مازوتن، فرمالدئید، ترکیبات آمونیوم چهارظرفیتی و همه باکتری‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها، تک‌یاخته‌کش‌ها و غیره، حتی اگر در مقادیر توصیه‌شده مصرف شوند، برای ماهیان سمی هستند و اگر به‌طور صحیح مصرف نشوند، بی‌نهایت سمی خواهند بود.

مطالعات متعددی در خصوص سم‌شناسی آبزیان انجام‌شده است (رمضانپور و همکاران، ۲۰۱۴؛ اسلامی و همکاران، ۲۰۱۴؛ جعفری و همکاران، ۲۰۱۵؛ رسولی و همکاران، ۲۰۱۵؛ باقرزاده و همکاران، ۱۳۸۹، ۱۳۹۱، ۱۳۹۴؛ دل افکار و همکاران، ۱۳۹۲).

در ادامه این فصل سه روش عمده برای بررسی میزان سموم بررسی می‌شود:

روش ICP Atomic Emission Spectroscopy (ICP- AES)

این روش تکنیکی است که می‌توان برای تعیین غلظت‌های عناصر کمیاب به‌ویژه تعیین بیشتر عناصر جدول تناوبی استفاده کرد. نتایج قابل‌قبول را می‌توان برای حدود ۷۰ عنصر با محدوده تعیین به ازای هر قسمت در میلیارد به دست آورد. روش ICP Mass Spectrometry (ICP – MS) نیز بسیار حساس است و می‌تواند آنالیز چندین عنصر کمیاب و فوق کمیاب (در حد هر قسمت در تریلیارد) را انجام دهد. آزمایش بر روی این عناصر را می‌توان بر روی انواعی از مواد فوق آلیاژ (super alloys) تا مواد فوق خالص (high purity materials) انجام داد.

آنالیز ICP توسط اسپکترومترهایی (طیف‌سنج‌هایی) صورت می‌گیرد که تحت کنترل کامپیوتر هستند. نرم‌افزار کامپیوتری، وظایف دستگاه را هم کنترل کرده و هم مونیتور می‌کند. علاوه بر این، پردازش، ذخیره‌سازی و برون داد (output) نتایج آزمایش را به عهده دارد. اسپکترومترها از تکنولوژی Charged Coupled Device (CCD) استفاده می‌کنند که امکان می‌دهد این دستگاه طیف وسیعی از عناصر را اندازه‌گیری نماید.

آزمایش ICP بر روی نمونه‌های جامد و مایع صورت می‌گیرد، اما نمونه جامد باید قبل از انجام آزمایش توسط انحلال نمونه در یک حلال (مشخصاً اسید) به یک محلول تبدیل شود. محلول نمونه به ICP به شکل قطرات ریز آئروسول انتقال داده می‌شود. آئروسول توسط یک دستگاه مهپاش (Nebulizer) تولید می‌شود که می‌تواند نمونه را به همراه آرگون با سرعت‌بالا (high velocity) آسپیره کند و مه ریز (fine mist) ایجاد نماید.

سپس آئروسول از داخل یک حجره (Chamber) اسپری عبور می‌کند و در اینجا قطرات بزرگتر حذف می‌شوند. قطراتی که آن‌قدر کوچک هستند که در مشعل پلاسما بخار می‌شوند، به داخل بدنه مشعل ورود می‌کنند و در آنجا با گاز آرگون دیگری مخلوط می‌شوند. آزمایش ICP بر اساس Inductively Coupled Plasma استوار است. در این روش، یک منبع تحریک‌کننده وجود دارد که توسط جهت دادن انرژی یک ژنراتور، فرکانس رادیویی را به سمت یک گاز مناسب سوق می‌دهد. یک فنر جفت‌ساز برای انتقال فرکانس رادیویی به گاز آرگون حرارت دیده مورداستفاده قرار می‌گیرد و یک پلاسمای آرگون را در مشعل تولید می‌کند. پلاسمای داغ باقیمانده، حلال را خشک می‌کند و باعث بمباران اتمی نمونه می‌گردد.

تصـویر ۸-۱: نمایی از دسـتگاه اسپکترومتر ICP – AES به همراه رایانه متصل به آن دستگاه اسپکترومتر ICP – AES پرتوهـای اتمی تبدیل‌شـــده به نور را تعیین می‌کند. با طیف‌ســـنجی جرمی ICP (ICP Mass Spectrometry) فرآینـد موردنظر از یونیزه شـــدن اســـتفـاده می‌کند. جرم حاصـــل از یون‌ها نشان‌دهنده عناصر موجود در نمونه است.

فهرست اسامی عناصری که توسط تست ICP قابل‌اندازه‌گیری است در جدول زیر آمده است:

ELEMENTS ANALYZED DURING AN ICP TEST SCAN

Aluminum	Antimony	Arsenic	Barium	Beryllium	Boron	Cadmium
Calcium	Cerium	Cesium	Chromium	Cobalt	Copper	Dysprosium
Erbium	Europium	Gadolinium	Gallium	Germanium	Gold	Hafnium
Holmium	Indium	Iridium	Iron	Lanthanum	Lead	Lithium
Lutetium	Magnesium	Manganese	Mercury	Molybdenum	Neodymium	Nickel
Niobium	Osmium	Palladium	Phosphorus	Platinum	Polonium	Potassium
Praseodymium	Rhenium	Rhodium	Rubidium	Ruthenium	Samarium	Scandium
Selenium	Silicon	Silver	Sodium	Strontium	Sulfur	Tantalum
Technetium	Tellurium	Thallium	Thorium	Thulium	Tin	Titanium
Tungsten	Uranium	Vanadium	Ytterbium	Yttrium	Zinc	Zirconium

آشنایی با طیف‌سنجی جذب اتمی

طیف‌ســنجی (یا طیف‌نمایی یا اســپکتروســکوپی) مطالعه ماده و خواص آن، با بررســی نور، صـوت و ذرات گســیل‌شـده، جذب‌شـده یا پراکنده‌شـده از ماده موردنظر اسـت. طیف‌سنجی به‌عنوان مطالعه برهمکنش بین نور و ماده نیز تعریف می‌شـــود. ازلحاظ تاریخی طیف‌ســـنجی به شـــاخه‌ای از علم

برمی‌گردد که برای مطالعات نظری در ساختار ماده و آنالیزهای کیفی و کمی از نور مرئی استفاده می‌شد. در حال حاضر طیف‌سنجی به‌عنوان یک تکنیک جدید نه‌فقط برای نور مرئی بلکه برای بسیاری از تابش‌ها با طول‌موج‌های متفاوت به‌کاربرده می‌شود. طیف‌سنجی جذب اتمی یکی از روش‌های طیف‌سنجی است که به‌وسیله آن می‌توان با دقت بالایی غلظت عناصر فلزی موجود در یک نمونه را تعیین نمود. طیف‌سنجی جذب اتمی (AAS) یک روش اسپکتروسکوپی برای اندازه‌گیری کمی عناصر شیمیایی با استفاده از جذب اشعه نوری (نور) توسط اتم در حالت گازی است. در شیمی تجزیه این تکنیک برای تعیین غلظت یک عنصر خاص در یک نمونه مورداستفاده قرار می‌گیرد. AAS می‌تواند برای تعیین مقدار کمی بیش از ۷۰ نوع از عناصر مختلف مورداستفاده قرار گیرد. البته حد تشخیص برای همه آن ۷۰ عنصر مناسب نیست مثلاً اگرچه اندازه‌گیری اورانیم در نرم‌افزار دستگاه جذب اتمی واردشده است اما کمترین غلظتی که می‌توان اندازه‌گیری کرد در حدود ۵ppm oo است که مقدار بزرگی است؛ لذا این روش دستگاهی را می‌توان برای اندازه‌گیری حدود ۳۰عنصر با حد تشخیص مناسب (زیر ۱ ppm) بکار برد.

تصویر ۸-۲: نمایی از دستگاه طیف‌سنجی جذب اتمی

اصول پایه طیف‌سنجی جذب اتمی

۱- همه اتم‌ها می‌توانند نور جذب کنند. ۲- طول‌موج نوری که جذب می‌شود برای هر عنصر متفاوت بوده و مختص همان عنصر است. ۳- میزان نور جذب‌شده مستقیماً به غلظت اتم‌های جذب‌کننده نور یا به عبارتی به غلظت عنصر موردنظر در نمونه محلول، بستگی دارد. در تجزیه جذب اتمی، ماده موردانداز‌ه‌گیری باید به حالت عنصری کاهش یابد، تبخیر شود و سر راه شعاع تابش منبع، قرار گیرد. در این فرایند نمونه‌ها باید به‌صورت محلول باشند. در اولین قدم آزمایش، محلولِ حاوی عنصر موردنظر، به‌وسیله یک شعله که به‌عنوان‌مثال با هوا و استلین می‌سوزد در

دمای ۲۰۰۰ درجه سلسیوس (درجه حرارتی پایین‌تر از طیف تابشی) بخار می‌شود. در اثر بخار شدن، قسمت اعظم عناصر موجود در محلول به حالت خنثی در می‌آید و پرتوی تابش شده از لامپ‌های کاتدی (لامپ مخصوص برای هر عنصر) توسط اتم‌های خنثی‌شده، جذب می‌شود. در این حالت شدت اشعه تابش اولیه کمتر می‌شود. تفاوت شدت دو پرتوی تابشی و خروجی معیار غلظت عناصر موجود در محلول است. عیب اصلی این تکنیک، وجود نیاز به یک لامپ منبع جداگانه برای هر عنصر مورد تجزیه است. برای رفع این نقیصه کوشش‌هایی به عمل آمده است تا یک منبع پیوسته به همراه یک تکفام ساز (تکفام ساز، جلوی منبع نور قرار می‌گیرد و طول‌موج موردنظر را عبور می-دهد) با قدرت جداکنندگی بسیار بالا به کارگرفته شود؛ اما این تکنیک به‌اندازه به‌کارگیری یک لامپ مخصوص برای هر عنصر رضایت‌بخش نیست.

اساس روش: اساس این تکنیک، استفاده از دستگاه جذب برای ارزیابی غلظت آنالیت در نمونه است؛ لذا نیازمند رابطه‌ای بین میزان نور جذب‌شده توسط نمونه و غلظت نمونه هستیم که همان قانون بیر لامبرت است. به‌طور خلاصه الکترون‌های اتم‌ها با جذب طول‌موج مشخصی (انرژی) می‌توانند به سطوح بالاتر انرژی بروند و برای مدت کوتاهی به حالت برانگیخته در بیایند. می‌دانیم که این مقدار انرژی جذب‌شده برای هر اتم با اتم دیگر متفاوت است. به زبان دیگر هر عنصری فقط به یک طول‌موج مشخص پاسخ می‌دهد. باریک بودن پرتو نور در این روش موجب می‌شود تا انرژی خاصی تولید شود و این روش بسیار دقیق و انتخاب پذیر باشد. هنگامی‌که اتم برانگیخته به حالت پایه برمی‌گردد طول‌موج مشخصی از خود ساطع می‌کند با اندازه‌گیری میزان جذب نمونه و رسم منحنی کالیبراسیون و قانون بیر لامبرت پی به میزان مجهول در نمونه می‌بریم. آشنایی با دستگاه این دستگاه دارای ۵ قسمت اساسی است: ۱. منبع تابش ۲. اتم ساز ۳. مونوکروماتور ۴. دتکتور ۵. ثبات منبع تابش از مهم‌ترین خصوصیاتش توانایی تولید باریکه‌ای از تابش با توان کافی و پایدار است. منابع در این روش باید خطی باشند مثل لامپ‌های هالو کاتد[1].

موارد کاربرد: آنالیز ناخالصی‌های ناچیز در آلیاژها و معرف‌های مورداستفاده در پروسه تولید؛ آنالیزهای مربوط به آب؛ آنالیز نمونه‌های تهیه‌شده در تماس مستقیم با هوا؛ آنالیز مستقیم جامداتی چون سنگ معدن‌ها و فلزات.

نمونه‌ها: دستگاه جذب اتمی برای اندازه‌گیری فلزات استفاده می‌شود و نمونه‌های که به دستگاه خورانده می‌شود باید به حالت محلول وجود داشته باشد (مگر برای کارهای تحقیقاتی خاصی که نمونه را می‌توان به‌صورت جامد نیز آنالیز کرد که البته تجهیزات موردنیاز تجاری نشده است). لذا قبل از اندازه‌گیری فلزات در هر نمونه‌ای، باید آن نمونه را به‌صورت محلول درآورد؛ لذا با انجام

1. Hollow cathode lamps

مرحله انحلال و هضم نمونه‌ها، محدودیتی در نوع نمونه وجود ندارد: آب، خاک، مواد غذایی، آلیاژها، سنگ معدن، پلاستیک و...

محدودیت‌ها

۱-حوزه تشخیص از حدود قسمت در بیلیون تا قسمت در میلیون می‌باشد.
۲-توانائی آنالیز مستقیم (بدون واسطه) گازهای نجیب، هالوژن‌ها، گوگرد، کربن یا نیتروژن را ندارد.
۳-حساسیت آن در حد مورد اکسیدهای دیرگداز یا عناصر موجود در کربیدها نسبت به روش طیف‌سنجی از طریق نشر پلاسمائی اتمی ضعیف می‌باشد.
۴-اساساً یک روش تک جزئی (تک منظوره) می‌باشد.

زمان پیش‌بینی‌شده برای آنالیز

۱-این زمان بسیار متغیر بوده و به نوع تکنیک و اتمایزر مورداستفاده بستگی دارد.
۲-برای تجزیه (جدایش) نمونه ممکن است حدود ۴–۸ ساعت یا زمان کمتری در حدود ۵ دقیقه صرف شود.
۳-زمان اصلی آنالیز از حدود ۱ دقیقه (در نوع شعله‌ای) تا حدود چندین دقیقه (در نوع کوره‌ای) متغیراست.

روش کار

برای کار با دستگاه اتمیک ابتدا کمپرسور را روشن می‌کنیم و به‌وسیله لگلاتور فشار سوخت و اکسیدان را تنظیم می‌کنیم سپس کلید سمت راست را روشن کرده و بعد از آن بروی نرم‌افزار دستگاه دابل کلیک کرده و در صفحه باز شده گزینه Online را انتخاب کرده و بروی next کلیک می‌کنیم، در کادر باز شده لامپ‌ها را تنظیم می‌کنیم.

لامپ از نوع کاتد فلزی که می‌خواهیم غلظت آن را تعیین کنیم..... Work Lamp
برای گرم کردن لامپ ..... Worm Up Lamp
برای تغییر موقعیت دو لامپ در صورت نیاز ..... Exchange

حال که لامپ‌ها را تنظیم کردیم بروی گزینه Next کلیک می‌کنیم. در صفحه باز شده که مربوط به تنظیمات فلز مشخص‌شده در مرحله قبل می‌باشد، هیچ تغییری نمی‌دهیم و بروی گزینه Next کلیک می‌کنیم. تا صفحه دیگری باز شود که دستگاه در یک بازه مشخص (مثلاً ۳۲۳/۷ تا ۳۲۵/۷ برای مس که دارای طول‌موج ۳۲۴/۷ می‌باشد) سرچ می‌کند و لامپ‌ها را طوری تنظیم

می‌کند که دارای بیشـترین انرژی باشـند. (البته این مرحله کمی وقت‌گیر اسـت و حدود ۵ الی ۱۰ دقیقه زمان می‌برد) و در آخر نمودار را رسـم کرده و نقطه‌ای که بیشترین انرژی در آن ثبت‌شده را انتخـاب می‌کنـد. در اینجـا Close می‌کنیم و گزینـه Next و در آخر Finish می‌کنیم؛ و وارد محیط نرم‌افزار می‌شـــویم. حـال بروی گزینـه Sample کلیـک کرده و واحـد غلظـت‌ها را تعیین می‌کنیم (معمولاً PPM یا PPb) سـپس محلول‌های استاندارد را تعیین کرده Next می‌زنیم و در صفحه بعد تعداد نمونه‌ها را تعیین می‌کنیم و بروی Finish کلیک می‌کنیم.

حال بروی Fire کلیک کرده تا شعله دستگاه روشن شود و جذب نمایش داده شده را به وسیلهٔ کلیک بروی Zero صـفر می‌کنیم سـپس جذب حلال را صفر کرده و بروی گزینه measer کلیک کرده و محلول‌هـای اســـتاندارد را از رقیق به غلیظ وارد کرده و پس‌ازآنکه جذب به یک مقدار ثابت رســـید، Start می‌زنیم که دســـتگاه اتوماتیک۳ بار جذب را می‌خواند و میانگین آن را ثبت می‌کند. این کـار را برای تمامی اســـتانداردها انجام می‌دهیم و پس‌ازآن نوبت به نمونه‌های با غلظت مجهول می‌رســـد که باید جذب آن‌ها را ثبت کنیم، ســـپس نمودار کالیبراســـیون را از منوی view، گزینه Calibration Curve رسم می‌کنیم.

در آخر نیز برای خاموش کردن شعله کلید قرمز را فشار می‌دهیم، سپس از نرم‌افزار خارج‌شده و کلید دستگاه و کمپرسور را خاموش می‌کنیم و سپس شیر کپسول را می‌بندیم.

نکات مهم در مورد AAS:

۱-در هنگام زدن fire از خاموش بودن دکمه قرمز مطمئن شـــویم چون در غیر این صـــورت دستگاه روشن نخواهد شد.

۲-مخزن آب پشت دستگاه نباید خالی باشد، باید آن را از آب پر کرد.

۳-کمپرسور را باید چک کرد و از وجود سوخت و اکسیدان مطمئن شد.

۴-مورد فهرست گلوله‌ای.

۵-در هنگام روشن کردن شعله (زدن Fire) باید تا حد امکان از مشعل فاصله داشت.

کروماتوگرافی گازی

کروماتوگرافی گازی اولین بار در سـال ۱۹۵۲ به‌منظور جداسـازی اسیدهای چرب مورداستفاده قرار گرفت؛ اما امروزه به‌عنوان یک متد تجزیه‌ای مناسـب به‌منظور شـناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات (در بسـیاری از تحقیقات و آزمایشـگاه‌های صنعتی) مورداستفاده قرار می‌گیرد. همچنین این تکنیک به دلیل قابلیت اندازه‌گیری مقادیر بســـیار کم نمونه کاربرد گســـترده‌ای در مطالعات زیســـت‌محیطی،

دارویی و زیست‌شناسی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی دارد.ترکیباتی که با این تکنیک قابل‌اندازه‌گیری هستند باید فرار بوده و پایداری دمایی بالایی داشته باشند.

اساس کروماتوگرافی گازی

همانند سایر متدهای کروماتوگرافی، اساس جداسازی در این تکنیک برمبنای فاز ساکن و فاز متحرک استوار است که در اینجا فاز متحرک یک گاز بی‌اثر (عموماً هلیوم، آرگون و یا نیتروژن) می‌باشد که تحت‌عنوان گاز حامل (carrier gas) از آن یاد می‌شود. در کروماتوگرافی گازی عموماً از ستون‌های مویرگی (که عمدتاً ۳۰-۶۰ متر طول و قطر بسیار کمی دارند) به‌عنوان فاز ساکن استفاده می‌شود و جداسازی ترکیبات برمبنای قدرت برهمکنش متفاوت ترکیبات نمونه با فاز ساکن صورت می‌گیرد، به‌گونه‌ای که ترکیباتی از نمونه که برهمکنش قوی‌تری با فاز ساکن دارند، به مدت طولانی‌تری در ستون مویرگی باقی می‌مانند و درنتیجه این ترکیبات با زمان بازداری طولانی‌تری از سایر ترکیبات نمونه جدا می‌شوند.

کروماتوگرافی گازی چگونه عمل می‌کند؟

مطابق با شکل زیر یک سیلندر گاز حامل به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل می‌باشد و وظیفه‌ی حمل نمونه‌ی تزریق‌شده به دستگاه را بر عهده دارد. وقتی نمونهٔ مجهول (که به‌صورت محلول می‌باشد) به محل تزریق(injector) دستگاه تزریق می‌شود، تحت تأثیر دمای محل تزریق سریعاً تبخیر شده و به فرم گازی در می‌آید و همراه با گاز حامل در طول ستون کپیلاری به جلو رانده می‌شود. در اطراف ستون کپیلاری محفظه‌ی دمایی (آون) قرار دارد و درجه حرارت لازم برای برهمکنش بیشتر بین فاز ساکن و ترکیبات نمونه را فراهم می‌آورد تا جداسازی بهتری صورت گیرد. یک آشکارساز در قسمت انتهایی ستون تعبیه‌شده تا غلظت ترکیبات خروجی از ستون را اندازه‌گیری نماید؛ مبنای این اندازه‌گیری بر اساس یک نمونه‌ی استاندارد با غلظت مشخص است به این‌گونه که میزان ارتفاع یا سطح زیر پیک نمونه مجهول با ارتفاع یا سطح زیر پیک نمونه‌ی استانداردی که زمان بازداری یکسانی با نمونه‌ی مجهول دارد سنجیده می‌شود و ازاین‌رو غلظت نمونه مجهول بر اساس غلظت نمونه‌ی استاندارد محاسبه می‌شود و این اطلاعات به‌صورت گراف کروماتوگرام ثبت می‌شود.

۱- سیلندر گاز حامل؛ ۲- تنظیم‌کننده ی سرعت جریان گاز حامل؛ ۳-محل تزریق نمونه؛ ۴- سرنگ تزریق نمونه؛ ۵- ستون GC ؛ ۶- دتکتور ؛ ۷- کروماتوگرام.

تصویر ۸-۳: نمایی شماتیک از ساختار و اجزای دستگاه کروماتوگرافی گازی

مبانی کروماتوگرافی گازی

بیشتر آنالیزهای شیمیایی، شامل جداسازی اجزاء موجود در یک مخلوط می‌باشد و مهم‌ترین روش برای چنین جداسازی برخی از اشکال کروماتوگرافی می‌باشد. کروماتوگرافی بر اساس پخش انتخابی اجزاء مختلف در بین ۲ فاز پایه‌گذاری شده است. یکی از این فازها، فاز ساکن یا Stationary phase نامیده می‌شود که دارای سطح زیادی است و دیگری فاز متحرک یا mobile phase است. حرکت غیریکنواخت اجسام جداشونده به دلیل نابرابری برآیند دو نیروی متقابل محرکه و بازدارنده از طرف عامل جداکننده اساس کروماتوگرافی است که مجموعه نیروی محرکه و بازدارنده بنام عامل تفکیک‌کننده یا جداکننده نامیده می‌شود.

تصویر ۸-۴: دستگاه کروماتوگرافی گازی.

کروماتوگرافی یکی از روش‌های فیزیکی برای جداکردن و خالص‌سازی مواد است. روش مذکور اولین بار توسط دانشمند روسی Tswett Mikhail برای جداسازی کلروفیل به‌وسیله ستون پرشده با یک جاذب به کار برده شد . (نکته جالب اینکه Tswett در زبان روسی به معنای

رنگ می‌باشد). این روش بر اساس جذب سطحی Adsorption و یا تقسیم Partitionبین دو فاز ساکن و متحرک می‌باشد. در کروماتوگرافی گازی فاز متحرک یک گاز می‌باشد که معمولاً گاز حامل (Gas Carrier) نامیده می‌شود ولی در کروماتوگرافی مایع (Chromatography Liquid)فاز متحرک یک مایع می‌باشد .کروماتوگرافی گازی که امروزه کاربرد گسترده‌ای دارد روشی است که برای جداسازی و اندازه‌گیری اجزای فرار در یک مخلوط به کار می‌رود (مثلاً جداسازی سیکلوهگزان از بنزن به روش تقطیر مقدور نیست ولی به وسیلهٔ GC امکان‌پذیر است). نخستین دستگاه کروماتوگرافی liquid-gas در سال ۱۹۵۵ وارد بازار شد و در حال حاضر بیش از ۵۰ شرکت سازنده دستگاه‌های تجزیه‌ای، در حدود ۱۵۰ مدل از دستگاه‌های GC را با قیمت‌های از حدود چند ده تا چند صد هزار دلار به فروش می‌رسانند به‌طوری‌که هم‌اکنون چند صد هزار GCدر سراسر جهان مشغول به کار است. قسمت‌های گوناگون دستگاه GC عبارت است از:

۱) سیلندر حامل گاز

۲)ادوات تنظیم فشار و جریان

۳) محل تزریق نمونه

۴)ستون

۵)آشکارساز

۶) محفظه‌های گرمکن

۷) ثبات، داده‌پرداز و نمایشگر

تصویر۸-۵: نمایی شماتیک از ساختار و اجزای دستگاه کروماتوگرافی گازی

تصویر ۸-۶: نمای شماتیک دیگری از ساختار و اجزای دستگاه کروماتوگرافی گازی

کروماتوگرافی گازی با در نظر گرفتن اینکه امکان جداسازی ترکیبات بسیار پیچیده را در حداقل زمان فراهم می‌کند یک تکنیک بسیار قوی به شمار می‌رود. گازی که به‌عنوان گاز حامل در کروماتوگرافی گازی (GC) به کار می‌رود در سیلندرهای گاز ذخیره می‌شود . گازی که به یک دستگاه GC وارد می‌شود باید فشار و سرعت جریان (Flow) ثابتی که توسط کنترل‌کننده‌های فشار دائماً تنظیم می‌شوند، داشته باشد. نمونه‌های مورد آنالیز توسط سیستم تزریق (Injector) به درون ستون وارد می‌گردند. عمل جداسازی اجزاء توسط ستون انجام می‌گیرد و سپس این اجزاء شسته شده (elute) و توسط دتکتور تشخیص داده می‌شوند. خروجی دتکتور توسط یک آمپلی‌فایر تقویت‌شده و سپس به یک سیستم ثبات فرستاده می‌شود. علائم خروجی از دتکتور که به‌صورت mV برحسب زمان ترسیم می‌شود یک کروماتوگرام (Chromatogram)نامیده می‌شود. امروزه سیستم‌های ثبات به‌صورت کامپیوتری و با نرم‌افزارهای مجهز نظیرStar،Azur، Maitre و Galaxy امکان تجزیه‌وتحلیل کروماتوگرام را در حالت‌های مختلف فراهم کرده است . یک کروماتوگرام شامل یک سری از پیک‌هاست که با اجزای موجود در نمونه مطابقت دارند و در یک‌جهت روی یک خط پایه (یا Line Base) قرار می‌گیرند. شناسایی پیک‌ها یا آنالیز کیفی(Analysis Qualitative)، بر اساس زمان بازداری (Time Retention) یعنی زمانی که طول می‌کشد تا ترکیب از محل تزریق شسته شود و درنهایت از ستون خارج شود، استوار است و آنالیز کمی بر اساس‌اند ازه یا سطح زیر پیک (Area)به دست می‌آید.

فصل نهم

فنون جراحی در ماهیان

مقدمه

هنگامی‌که قواعد جراحی را بر روی ماهیان مطابقت می‌دهیم، این قواعد مشابه موجودات خشکی هستند. حیوانات آبزی اکتوترمیک، نیازمند تغییراتی در آماده‌سازی اتاق عمل، روش‌های جراحی و انتخاب مواد هستند که ممکن است برای کسانی که اولین بار اقدام به جراحی ماهی می‌کنند، به‌راحتی آشکار نباشد. تأمین شرایط خاص لانه‌سازی و نگهداری ماهیان قبل از جراحی، در جریان عمل و پس‌ازآن، نیازمند مهارت جراحی است تا از بقای ماهی و بازگشت آن به انجام وظایف فیزیولوژیک مطمئن شویم (اوستراندر، ۲۰۰۰). در مورد ماهیان، آب، کل شرایط حمایتی لازم را برای حیات آن‌ها فراهم می‌کند که ازجمله، می‌توان به تأمین اکسیژن، کنترل دمای بدن، تأمین شناوری و پناهگاه و دفع مواد زائد حاصل از سوخت‌وساز اشاره کرد. تأمین یک محیط آبی مناسب در خلال تمام مراحل روش‌های مختلف جراحی، به همراه شرایط تمیز و عملی برای جراح، نیازمند برنامه‌ریزی کافی است. روش‌های متنوع جراحی برای ماهیان توسعه‌یافته است که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱- تسهیل تحقیق بر روی وظایف اندام‌های ماهیان؛ ۲ - انجام روش‌های بیوپسی (تکه‌برداری)، بدون اینکه به مرگ ماهی منجر شود؛ ۳- خارج ساختن تومورها؛ و ۴ - تسهیل کاشتن فرستنده‌ها و تجهیزات دیگر برای انجام مطالعات کنترل از راه دور در ارتباط با رفتار ماهیان (اوستراندر، ۲۰۰۰). افزایش تعداد ماهیانی که در آکواریوم‌های خصوصی یا عمومی نگهداری می‌شوند (و نتیجه این امر، افزایش طول عمر آن‌هاست)، ملموس و ارزشمند است. بیماری‌های مربوط به سنین کهولت در ماهیان، بیش از هر چیز، نیازمند انجام جراحی است که ازجمله می‌توان به خارج ساختن تومور، جراحات کریه (بدمنظر) و اصلاح بینایی اشاره کرد. ماهیان با ارزش مانند کپور و کوی گرانقیمت دارای پیوندهای مستحکم با انسان هستند و بعضی از بیماری‌های آن‌ها، هنگامی‌که کشنده هستند، نیازمند مداخله جراحی‌اند (اوستراندر، ۲۰۰۰). در آبزی‌پروری تجاری، گونه‌های جدید به‌طور مداوم موردبررسی قرار می‌گیرند تا مناسب بودن آن‌ها برای پرورش متراکم مشخص شود. ماهیان مولد ممکن است توسط قلاب و آلات دیگر صید شوند و این امر منجر به جراحات و پارگی‌های پوستی شود که نیازمند انجام ترمیم جراحی است تا آن‌ها بتوانند در محیط اسارت زنده بمانند. تجارب تحقیقاتی در علوم کاربردی و پایه که نیازمند اطلاعات دقیق از ماهیان خاص در مراحل شنای آزاد است، از طریق مداخله جراحی به دست می‌آید (کلونتز و اسمیت، ۱۹۶۸). شاخص‌های متعددی برای جراحی ماهیان در علوم دامپزشکی، در آزمایشگاه و همچنین در مطالعات میدانی وجود دارد. اگر قواعد و احتیاطات لازم انجام شود، این روش‌ها را می‌توان به‌صورت انسانی و مؤثر انجام داد، بدون اینکه منجر به تلفات شود، یا اینکه تلفات حداقل خواهد بود.

کتاب‌هایی درباره جزئیات روش‌های جراحی دامپزشکی به رشته تحریر در آمده‌اند. تقریباً هرگونه متداول از پستانداران دارای کتاب جامعی است که خصوصیات تشریحی و فیزیولوژیک آن‌گونه را به همراه پاسخ‌های گمراه‌کننده نسبت به مواد بیهوشی مختلف و مواد جراحی یا تزریق توصیف می‌کند. کتاب‌هایی که جراحی در ماهیان را توصیف می‌کنند، در مواقعی در دسترس بوده‌اند و توصیف روش‌ها و مواد مناسب همچنان ادامه دارد. جراحی در ماهیان پیچیده است. هرکسی که تلاش می‌کند جراحی برای تحقیقات انجام دهد، باید به‌دقت با روش‌های سترون (آسپتیک) جراحی آموزش ببیند، یا اینکه خدماتی را از بخش جراحی دامپزشکی دریافت کند.

مراقبت از حیوان

در سرتاسر جهان، استفاده از حیوانات برای انجام آزمایش‌ها، به‌منظور افزایش تحقیق و امکان‌سنجی روش‌های تجربی و طراحی تحقیقات امری متداول است. گرایش جهانی برای کاهش استفاده از حیوانات در آزمایش‌ها و تغییر جهت آزمایش از پستانداران به سمت گونه‌های پست‌تر، باعث شده است که تمایل به ماهیان به‌عنوان حیوانات تحقیقاتی افزایش یابد. تعداد گونه‌های ماهیانی که مورداستفاده تحقیقات تجربی قرار می‌گیرند، در دهه گذشته افزایش شدیدی داشته است. در بسیاری از کشورها، ماهیان را به همراه مهره‌داران دیگر طبقه‌بندی می‌کنند و تحت همان قوانینی قرار می‌دهند که در مورد پستانداران اعمال می‌شود، درحالی‌که در کشورهای دیگر، آن‌ها همچنان بدون طبقه‌بندی باقی‌مانده‌اند. توجه به‌سلامت و رفاه ماهیان رو به افزایش است. مداخله جراحی برای تحقیقات تجربی مختلف، نیازمند ملاحظات دقیق در ارتباط با بهبود ماهیان بیمار است و باید با قواعد مراقبت از حیوان سازگار باشد و هنگامی‌که به سطح برخورد جراحی می‌رسد، از دستورالعمل‌های مربوطه استفاده شود. تمام پروتکل‌ها برای جراحی ماهیان باید توسط کمیته‌های مستقل مراقبت از حیوانات یا معادل آن بازنگری شوند. ارزیابی باید شامل نگهداری کافی، شرایط مناسب آب، تجزیه‌وتحلیل آماری ثابت‌شده برای اطمینان از اینکه حداقل تعداد حیوانات مورداستفاده قرار خواهند گرفت، ارزیابی مهارت جراحی، ارزیابی عمل و مراقبت پس‌ازآن، ازجمله، دستورالعمل‌های روشن برای تعیین مرحله انتهایی آزمایش باشد. باید ارزیابی مداوم و سرتاسری در خصوص نتیجه جراحی به‌صورت متداول صورت گیرد تا اطمینان حاصل شود که اصلاحات و تغییرات انجام‌شده در روش‌های جراحی، سلامت ماهیان را به مخاطره نخواهند انداخت. توجه مناسب به طراحی پیش از عمل، آموزش پرسنل، روش‌های جراحی سترون (آسپتیک) و سلامتی حیوان، باعث می‌شود که بهترین بازده ممکن از انجام جراحی حاصل شود و قابل‌اطمینان‌ترین اطلاعات تحقیقاتی به دست آید. جراحی بر روی ماهیان خانگی کوچک (آکواریومی) باید توسط دامپزشکان واجد مجوز صورت گیرد.

قواعد جراحی

ضدعفونی: جلوگیری از تماس با موجودات زنده کوچک، برای انجام هر روشی که مستلزم نفوذ به داخل پوست، ورود به داخل حفره شکمی یا بازکردن بافت‌های داخلی است، ضروری به‌حساب می‌آید. ضدعفونی تلفیقی که مستلزم استفاده از وسایل، گان، دستکش استریل و همچنین اتاق و منابع اکسیژن عاری از باکتری است، برای جراحی پستانداران ضروری محسوب می‌شود، اما در مورد جراحی ماهیان تقریباً غیرممکن است. باوجوداین، باید تلاش شود که شرایط جراحی در حد امکان به استانداردهای جراحی پستانداران نزدیک شود. روش‌های عمومی، ابزار و روش‌های استریل جراحی ماهیان بازنگری شده است. ذهنیت رساندن ماده بیهوشی از طریق آب جاری به آبشش‌های ماهیان موجود بر روی میز جراحی، خصوصاً به درون یک سانتی‌متر شکاف جراحی ممکن است برای یک جراح دشوار باشد و یکی از چالش‌هایی است که در برابر روش‌های ضدعفونی قرار دارد. برای حفظ تمامیت و سلامت موکوس خارجی و پوست، باید پوست ماهی را در کل زمان جراحی مرطوب نگه داشت و حیوان را در همان دمایی عمل کرد که آب واجد ماهی دارای آن دما بود (به بخش زیر در خصوص تجهیزات عمل جراحی مراجعه کنید). فقط باید محل جراحی فوری را خشک نگه داشت. جدا نگه‌داشتن (ایزوله کردن) و فراهم آوردن شکاف استریل، اگرچه ضروری است، اما به دلایل مختلف، با حالت متعارف مربوط به پستانداران متفاوت است.

با توجه به نیاز به رطوبت و جریان آب در خلال انجام جراحی، انتظار می‌رود که عفونت‌های آلوده‌کننده افزایش یابد. باوجوداین، بیشتر ماهیان نسبت به پستانداران، دمای نوسانی پایین‌تری دارند. فلور باکتریایی که ماهی به آن‌ها حساس است، با آنچه به‌طور متداول از طریق هوا و انسان منتقل می‌شود، تفاوت دارند؛ بنابراین، احتمالاً امکان بقای عوامل عفونی در دمای پایین‌تر یا در محیط خارج کمتر است. اکتوترمی برای اجتناب از آلودگی زخم ماهی در دمای پایین‌تر، فواید قابل‌توجهی به همراه دارد (واگنر و همکاران، ۱۹۹۹). این در حالی است که در ماهیانی که در دمایی نزدیک‌تر به دمای پستانداران زندگی می‌کنند، خطر آلودگی زخم از طریق آلاینده‌های محیطی مشترک بیشتر خواهد بود. بدون در نظر گرفتن میزان مخاطرات، مراقبت لازم باید اعمال شود، زیرا جراحی تحت شرایط سترون موفقیت بیشتری به همراه خواهد داشت و شرایط مناسب بهتری برای ماهی فراهم می‌کند.

ایجاد بیهوشی برای جراحی

استفاده از مواد بیهوش کننده باید به‌دقت موردبررسی قرار گیرد تا یک ترکیب تأییدشده مؤثر برای روش‌های جراحی خاص مدنظر قرار گیرد. واکنش به ماده بیهوش کننده در گروه‌های تاکسونومیک مختلف، متفاوت است. هر ماهی که برای جراحی در نظر گرفته می‌شود، باید به‌خوبی با آن آشنا بود

و توصیه می‌شود که آزمایش‌های لازم با ماهیان سالم صورت گیرد تا مطمئن شوید که دوز صحیح انتخاب خواهد شد و محاسبه دقیق زمان برای رسیدن به مرحله لازم بیهوشی صورت خواهد گرفت. بسیاری از مراحل کانول گذاری و داخل کردن فرستنده‌ها کمتر از ۴ دقیقه طول می‌کشد؛ بنابراین، ماهی به مرحله مناسب بیهوشی وارد می‌شود. سپس، عمل جراحی صورت می‌گیرد و ماهی بدون نیاز به ماده بیهوشی اضافی به تانک احیا برمی‌گردد. اعمال جراحی که بیش از چند دقیقه طول می‌کشد، خطر ایجاد کمبود شدید اکسیژن (هیپوکسی شدید) را به همراه دارد؛ بنابراین، لازم است که آب‌رسانی مداوم به آبشش‌ها صورت گیرد. این امر با استفاده از آب اشباع از اکسیژن یا آبی که واجد اکسیژن کافی و مقادیر کمی ماده بیهوشی برای تداوم زمان بیهوشی است، انجام می‌شود. اگر از روش چرخش آب استفاده می‌شود، باید مطمئن شد که مقادیر اکسیژن تخلیه نشده باشد و pH همچنان در محدوده خنثی قرار دارد، زیرا آب‌رسانی به آبشش‌ها باعث مصرف اکسیژن آب و بالا رفتن میزان دی‌اکسید کربن در اثر تبادلات تنفسی متعارف ماهی خواهد شد. در صورت امکان، بهتر است آب مورداستفاده برای بیهوشی و احیای ماهی، همان آبی باشد که ماهی از داخل آن انتخاب‌شده و قرار است به داخل آن برگردد. معمولاً گونه‌های اجتماعی را که دارای کنش‌های متقابل دسته‌جمعی نزدیک به هم هستند، باید به همان مخزن و جمعیتی برگرداند که قبل از جراحی با آن سازگار شده بودند. برآورده ساختن[1] نیازهای رفتاری ماهیان، موفقیت در بهبود پس از جراحی را تعیین می‌کند. برای مثال، رفتار سلسله‌مراتب اجتماعی در ماهی آزاد، برای بازگشت به شنای طبیعی و تغذیه متعارف حائز اهمیت است. ماهیانی که به‌تنهایی[2] زندگی می‌کنند، مانند اردک‌ماهی، پس از عمل جراحی و در خلال مراحل بهبود، نیاز به فضای کافی برای پنهان شدن دارند. ممکن است نیاز به مشاهدات مستقیم باشد تا از حمله به یک بیمار توسط ماهیان دیگری که پس از بهبود، رفتار تهاجمی و غیرمتعارف از خود نشان می‌دهند، اجتناب شود. ماهیانی که در محل جراحی می‌شوند و پس از عمل به محیط خود برمی‌گردند، مشکل کمتری ازنظر رفتار اجتماعی نسبت به ماهیان مخزن دارند، زیرا محیط برای آن‌ها آشناست و فضا و امکان پنهان شدن در هنگام بهبود برای آن‌ها فراهم‌تر است.

ماده بیهوشی به‌طور متعارف به داخل آب ریخته می‌شود. متداول‌ترین ترکیب، تریکائین متان سولفونات (با نام تجاری TMS از شرکت بین‌المللی سیندل و MS-222 از شرکت آزمایشگاه‌های آرجنت[3]) است. بااینکه ترکیبات دیگر نیز در دسترس هستند، اما تعداد کمی از آن‌ها تأیید رسمی قانونی به دست آورده‌اند. برای جراحی، فقط باید فرآورده‌هایی که مورد تأیید هستند، استفاده شوند.

---

1. Fulfilling
2. Solitary
3. Argent Laboratories

هنگامی‌که زمان بیهوشی طولانی است، یا اینکه میزان ماده بیهوشی را از طریق آب‌رسانی از روی آبشش‌ها تنظیم می‌کنید، باید مراقبت ویژه‌ای برای جلوگیری از آلودگی محل جراحی صورت گیرد.

التیام برش‌های جراحی

عناصر التیام در ماهیان، شبیه پستانداران است، هرچند که تفاوت‌های قطعی[1] چندی وجود دارد و ضرورت سازگاری با محیط آب و ماهیت اکتوترمیک آن، ازجمله این موارد محسوب می‌شوند (فرگوسن، ۱۹۸۹). بافت پوششی و لایه‌های کوتیکول و موکوس مرتبط با آن، برای ماهی حفاظت مکانیکی ایجاد می‌کنند و همچنین، مکانیسم دفاعی مناسبی در مقابل عدم تعادل اسمزی محسوب می‌شوند و این اطمینان را برای حیوان به همراه دارند که آب در محیط آب شیرین بیش‌ازاندازه وارد بدن نشود و برعکس، در محیط آب‌شور از بدن ماهی خارج نگردد (فرگوسن، ۱۹۸۹). پوست ماهی از بافت پوششی سنگفرشی غیرکراتینی تشکیل می‌شود و هر لایه‌ای از اپیدرمیس قادر است به تزاید بپردازد[2]. به‌علاوه، محققان مختلف نشان داده‌اند که سلول‌های پوششی می‌توانند سریع مهاجرت کنند و به پوشاندن یک برش یا جراحات دیگر، در غیاب فعالیت‌های میتوزی بپردازند. این مهاجرت سلول‌های پوششی که منحصربه‌فرد است، ماهی را از اثرات محیط آب در امان نگه می‌دارد.

نقش دمای محیط

همه جوانب التیام تا حدی از دمای محیط تحت تأثیر قرار می‌گیرند، اما به نظر می‌رسد که مهاجرت سلول‌های پوششی، کمتر تحت تأثیر دمای محیط قرار می‌گیرند. در دماهای مختلف و در گونه‌های مختلف ماهیان، پوشاندن محل جراحت توسط بافت پوششی در عرض چند ساعت صورت می‌گیرد. فعالیت میتوزی اپیدرم و بافت فیبروزی زیر آن در حدود سه روز بعد شروع می‌شود، اما اگر دما پایین‌تر باشد، ممکن است به تأخیر بیفتد و ضخامت بافت پوششی کاهش یابد (روبرتس و همکاران، ۱۹۷۳؛ بولوک و همکاران، ۱۹۷۸). کوئیل هاک و سیر (۱۹۹۹) تعیین کردند که التیام زخم (تشکیل مجدد بافت پوششی) در ماهیان سیچلید با سرعت ۵۰۰ میکرومتر در ساعت صورت می‌گیرد، درحالی‌که سانتوز روئیز و همکاران (۱۹۹۶) عنوان کردند که التیام جراحات در باله ماهی طلایی در مورد بافت پوششی طی ۱۲ ساعت و تزاید سلولی تا ۶۰ ساعت به طول می‌انجامد (سانتوز روئیز و همکاران ۱۹۹۶)؛ کوئیل هاک و سیر، ۱۹۹۹).

سلول‌های آماسی که برای التیام جراحات ضروری هستند، توسط دما بیشتر تحت تأثیر قرار می‌گیرند. در قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس، در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد در

---

1. Crucial
2. Pleuripotential

حدود ۱۲ ساعت طول می‌کشد تا سلول‌های آماسی به سمت ناحیه موردنظر حرکت کرده، ترشحات خارجی را تمیز کنند و مانع از بروز عفونت شوند. باوجوداین، اگر دما در حدود ۵ درجه سانتی‌گراد حفظ شود، ممکن است تا چهار روز هیچ‌گونه سلول آماسی مشاهده نشود، یا میزان پاسخ اندک باشد. هنگامی‌که دما در حد مطلوب باشد، هجوم بافت فیبروس (همبندی) به محل جراحت در حدود ۳ روز پس از عمل جراحی شروع می‌شود. فیبروپلازی (تزاید سلول‌ها یا بافت همبند) در ماهی قزل‌آلا در دمای ۱۵ درجه طی ۸ روز حالت پیشرفته پیدا می‌کند، اما در دمای بسیار پایین پس از ۱۶ روز تازه شروع به تظاهر می‌کند. سرعتی که طی آن تزاید بافت فیبروس، جراحات داخلی را می‌بندد و کشش کافی ایجاد می‌کند تا دیگر نیازی به بخیه نباشد، بر اساس میزان دما متغیر است و عامل مهمی برای انتخاب مواد موردنیاز بخیه به‌حساب می‌آید.

هنگامی‌که فلس‌ها را برای تسهیل جراحی جدا می‌کنیم، جراحات عمیق بر جا می‌ماند و از طریق لایه درمیس توسعه می‌یابد. معمولاً جراحات ناشی از جدا کردن فلس‌ها، به‌سرعت توسط بافت پوششی متحرک پوشیده می‌شوند و به‌دقت و تمیز از بین می‌روند. جایگزینی فلس‌ها نیاز به زمان قابل‌ملاحظه دارد، اما بر روی تمامیت و بهبود برش تأثیری بر جا نمی‌گذارد.

دمای مطلق که ماهی در آن دما نگهداری می‌شود، تنها عاملی نیست که بر روی التیام اثر می‌گذارد. هر ماهی یک محدوده دمایی مطلوب دارد و در این محدوده، بهترین عملکرد را از خود نشان می‌دهد. دمای اتاق برای آزادماهیان، بالاتر از محدوده دمایی مطلوب قرار دارد، درحالی‌که در مورد تیلاپیا، دمای اتاق کمتر از این محدوده است. تمام ماهیان را باید قبل از جراحی انتخابی[1] یا تجربی، به مدت ۱۴ روز در محدوده دمایی آن‌ها قرار داد و مجدداً پس از جراحی به همان محیط (ترجیحاً به مخزن اصلی، به دلایل اجتماعی و آشنا بودن با محیط) برگشت داد تا از میزان التیام مطلوب مطمئن شویم. به‌عنوان یک قاعده کلی، مکانیسم‌های التیام در هنگامی‌که دمای مطلوب وجود دارد، پایدار خواهند بود و در محدوده دمایی مطلوب، در بین گونه‌ها، تفاوت‌های اندکی مشاهده می‌شود.

پیچیدگی‌ها

در مواقع آلودگی‌های باکتریایی، یا گسیختگی فیزیکی، سلول‌های پوست به مهاجرت خود ادامه می‌دهند، اما از محل شکاف بیرون خواهند زد و به‌صورت بیرون‌زدگی‌های سفید و پنبه مانند دیده می‌شوند که گاهی اوقات با آلودگی قارچی اشتباه می‌شوند. آزمایش این بیرون‌زدگی‌ها توسط تهیه گسترش و مشاهده با میکروسکوپ نوری، غالباً تنها وجود سلول‌های پوششی را نشان می‌دهد که در

1. Elective

معرض آلودگی قـارچ قرارگرفتـه‌انـد. کنترل هرگونـه آلودگی میکروبی برای التیـام بـه‌موقع برش‌ها ضـروری اسـت. بهترین روش کنترل، انجام روش‌های جراحی سـترون (آسـپتیک) دقیق اسـت. آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان به‌صـورت موضـعی و عمومی مورداسـتفاده قرار داد، بدون اینکه با فرآیند التیام تعارضـی داشـته باشند، اما اگر شرایط عمل به‌صورت سترون (آسپتیک) باشد معمولاً نیازی به آن‌ها نیست.

تجهیزات عمل جراحی

صحت و اطمینان از اجزای دستگاه جراحی

طراحی دقیق و با جزئیات، به‌ویژه در موارد زیر ضـروری است: آیا محققان یک اتاق عمل خاص را از طریق یک واحد (یونیت) آزمایشـی توسعه خواهند داد، یا این‌که به اصلاح و تغییر اجزای اتاق عمل پستانداران می‌پردازند. در اینجا فقط به تفاوت‌های عمومی اشاره می‌کنیم.

آب، بخشـی از ملاحظات خواهد بود. امکان نگهداری ماهیان ممکن اسـت همان اتاقی باشـد که ماهی بیمار را نگه می‌دارند. اگر بیهوشی طولانی شود (عمداً یا به خاطر پیچیدگی عمل)، آب را باید از روی آبشـش به جریان انداخت تا تنفس صـورت گیرد. آبی که بر روی کف اتاق تجمع می‌یابد، ممکن اسـت سـطح لغزنده‌ای را ایجاد کند و از بعد مشـکلات شـغلی و بهداشتی حائز اهمیت باشد. هنگام عمل جراحی بر روی ماهیان، کف صـاف و قابل ضـدعفونی کردن، می‌تواند به یک وضـعیت قابل‌اتکا[1] تبدیل شود. کف باید به‌اندازه کافی ناهموار باشد تا کشش لازم را ایجاد کند، یا باید به‌طور موقت آن را با یک سـطح زبر پوشـاند که لغزنده نباشد. اگر ماهیان بیمار بزرگ باشند، باید برای زه کشی (خروج آب)، شیب مناسبی وجود داشته باشد.

احتمالاً باید برق برای تأمین نور خاص و همچنین، برای پمپاژ آب و رساندن ماده بیهوش کننده و بازبینی تجهیزات وجود داشته باشد. برای اطمینان از امنیت افراد، باید همه منابع الکتریکی، یا بر روی خطوط اصـلی یـا در پریز برق، حاوی فیوزهای قابل قطع خودکار[2] (GFI) باشـند. این ابزار الکتریکی، هر نوع کشـیدگی سریع برق را تعیین می‌کنند و فوراً برق را قطع می‌کنند تا امنیت افراد حفظ شود. حالت جایگزین دیگر، این است که همه منابع الکتریکی را به ۱۲ ولت کاهش دهیم. در هر دو حـالـت، هزینـه افزایش می‌یـابد، اما نباید جراحی در شـرایط مرطوب، بدون در نظر گرفتن پیچیدگی‌های حوادث برق، انجام شـود. در بیشـتر نظام نامه‌های الکتریکی، لازم اسـت که GFI در کنار سینک‌های آب یا منابع دیگر آب قرار داشته باشد.

---

1. Liability
2. Ground fault interrupters

میزهای جراحی

میزهای جراحی باید واجد بعضی از معیارهای عمومی باشند. حیوانات آبزی بیمار باید بتوانند همه وظایف ضروری بدن، ازجمله تنفس کافی، کارآیی قلبی، دمای متعارف فیزیولوژیک و رطوبت سطح خارجی بدن را حفظ کنند. میز باید برای جراحان، ناحیه عمل با ثبات و راحتی ازنظر ارتفاع، شیب و میزان نور را فراهم کند. به‌رغم تفاوت‌هایی که در رابطه با وضعیت و پیچیدگی‌های جریان آب وجود دارد، برش باید سترون (آسپتیک) باقی بماند و عاری از آب آلوده باشد و برای انجام جراحی، امکان دسترسی به بیمار به‌راحتی فراهم باشد.

ثبات وضعیت بیمار، برای انجام مناسب جراحی، بیشترین اهمیت را دارد، اما تنوع خصوصیات گونه‌های ماهیان، نیازمند نوآوری‌هایی برای مطابقت با شکل و وضعیت هرگونه است. ماهیانی که دارای شکل بیضی یا گرد هستند، به‌خوبی با تراف‌های «V» شکل مطابقت پیدا می‌کنند. مواد بسیاری ساخته شده‌اند که می‌توان به استیروفوم، پلکسی گلاس[1] و چوب و غیره اشاره کرد (کلونتز و اسمیت، ۱۹۶۸؛ استوسکوپ، ۱۹۹۳؛ لئوبارت و همکاران، ۱۹۹۵). یکی از محکم‌ترین و قابل تنظیم‌ترین طراحی‌ها، استفاده از یک لوله پلاستیکی PVC ۱۰ سانتی‌متری است که از وسط به‌صورت طولی برش داده شده باشد. طول آن بسته به دامنه اندازه مورد انتظار ماهیان می‌تواند متغیر باشد. یک پیچ[2] مرکزی که به‌صورت دائمی از طریق لوله متصل شده باشد، این امکان را فراهم می‌کند که یک سه‌پایه (سه‌پایه دوربین، ویدیو یا سه‌پایه تحقیقاتی سنگین‌تر) به آن وصل شود تا امکان تنظیم شیب برای خروج (زه کشی) آب و تنظیم ارتفاع برای جراح فراهم باشد و همچنین، امکان خم شدن به هر سو برای استفاده از نوررسانی غیرمتعارف عملی باشد. میز لوله‌ای برای اندازه‌های مختلف ماهیان قابل تنظیم است. این امر با تنظیم ضخامت ابر اسفنجی به‌عنوان بستر و تعدیل موقعیت ماهی صورت می‌گیرد. ابر به‌عنوان بالش عمل می‌کند، اما همچنین می‌تواند به حفظ دما کمک کند. این امر با اضافه کردن آب کافی، یا با خیساندن آن قبل از عمل جراحی، یا با افزودن آب در خلال دوره عمل صورت می‌گیرد. ابر اسفنجی به اشکال مختلف عرضه می‌شود و باید بررسی کرد که مطمئن شویم اسفنج سلولی باز استفاده خواهد شد، به‌ویژه اگر قرار است اسفنج آب را جذب کند و در خود نگه دارد. معمولاً نیازی به استفاده از تسمه نیست، اما در صورت نیاز، می‌توان به‌راحتی آن را متصل کرد. باید دقت کرد که فشار وارده به ماهی در حداقل مقدار ممکن باشد، زیرا اسکلت حمایتی بدن آن‌ها به‌اندازه پستانداران سنگین و محکم نیست.

گونه‌های مختلف ماهیان اشکال متفاوتی دارند که ممکن است با هر میزی سازگار و مطابق نباشند. ماهیان پهن نیاز به یک سطح نرم و پهن دارند که رطوبت و دمای آن مناسب باشد. ممکن

---

1. Plexiglass
2. Bolt

است برای پایداری و ثبات و مهار نیاز به استفاده از تسمه پهن، نرم و مرطوب باشد. ماهیانی که از دوپهلو پهن هستند، خصوصاً آن‌هایی که اندازه کوچک دارند، به میزهایی نیاز دارند که برای آن جراحی خاص تهیه‌شده است. خوشبختانه، استفاده از مواد نرم و جاذب آب متداول شده است. هر زمان که از اسفنج ابری یا مواد لاتکس یا استیروفوم دیگر استفاده می‌شود، آن‌ها را باید به‌خوبی شستشو داد تا از احتمال آلودگی‌های شیمیایی اجتناب شود.

طراحی روش‌های کنترل دما، تعیین می‌کند که میزان شیب میز چقدر باشد. برای جراحی‌های طولانی‌تر، استفاده از آب جریان دار که به‌آرامی از درون اسفنج ابری عبور می‌کند، می‌تواند رطوبت و دمای مناسب را حفظ نماید. در مورد ایجاد بیهوشی، باید از یک خروجی آب (زه کشی) مجزا استفاده کرد که آب آن از روی آبشش‌ها عبور می‌کند. بدین ترتیب، از احتمال آلودگی متقاطع دو منبع آب اجتناب خواهد شد.

تجهیزات

بسته‌بندی‌های سترون (استریل) جراحی

همه تجهیزات جراحی را باید به‌خوبی استریل و بسته‌بندی کرد. روش‌های مختلفی برای این امر وجود دارد، اما ترجیحاً بهتر است از اتوکلاو استفاده شود و تیغه‌های چاقو، نخ و سوزن‌های جراحی پس از باز شدن نیز به این مجموعه اضافه گردد. اگر از روش استریل کردن مرطوب (با استفاده از مایعات ضدعفونی‌کننده) استفاده می‌کنید، بقایای ماده ضدعفونی‌کننده ممکن است عمل را پیچیده کرده و روند جراحی را کند. باید فهرست تجهیزات به‌خوبی قبل از شروع عمل مشخص شوند. فهرست تجهیزات عمومی متعددی در دسترس است.

پوشاندن اطراف محل جراحی با پارچه (دریپ[1])

پوشاندن اطراف محل جراحی، محل شکاف را ایزوله (جدا) می‌کند و امکان آلودگی محل جراحت را از خارج از بین می‌برد. سطح مرطوب بدن ماهی، بحث استفاده از وسایل پوشاننده معمولی را (که معمولاً جاذب آب هستند) پیچیده می‌کند. مواد مورداستفاده برای بسته‌بندی تجهیزات جراحی [لفاف[2] سترون شده (استریلیزه)، از شرکت Source Medical] جایگزین دیگری است که به‌راحتی در دسترس است، به‌خوبی اتوکلاو می‌شود و نسبتاً ضد آب است. هنگامی‌که این وسایل را بر روی سطح بالایی بدن ماهی قرار می‌دهیم، همچنان خشک باقی می‌مانند. انواعی از وسایل دیگر به همراه چسب‌های حمایت‌کننده پلاستیکی (Kaydry Table Soacker, VWR

1. Drapes
2. Wrap

Scientific products) نیز وجود دارند که برای موکوس ماهی مناسب بوده و به‌صورت یکنواخت بر روی بدن ماهی باقی می‌مانند و دیگر نیازی به اتصال پارچه‌ها و مواد به کمک ژل یا گیره نیست. در صورت ضرورت می‌توان مواد جاذب را در زیر این پارچه‌های پوشاننده قرار داد تا رطوبت پوست حفظ شود. به‌استثنای عمل بر روی ماهیان بسیار بزرگ، در موارد دیگر، معمولاً از به‌کارگیری گیره‌ها اجتناب می‌شود، زیرا این گیره‌ها با فلس‌های ماهیان در تعارض هستند و ممکن است باعث ایجاد تروما (ضربه) به پوست آسیب‌پذیر شوند و پارگی رشته‌های عضلانی را به همراه داشته باشند.

نخ و سوزن‌های جراحی

انتخاب نخ و سوزن جراحی باید با توجه به روش جراحی تعیین شود. جراحی لاپاراتومی، نسبت به ترمیم زخم قرنیه، نیاز به ابزار بسیار متفاوتی دارد. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، حیوانات اکتوترمیک ازنظر میزان التیام زخم وضعیت متغیری دارند. تخم‌های قابل‌جذب در بدن به‌تدریج جذب می‌شوند (استوسکوپ، ۱۹۹۳). باوجوداین، زمان لازم برای این امر به میزان قابل‌ملاحظه‌ای متغیر است و بستگی به تغییرات مربوط به نفوذ سلول‌های آماسی و ماکروفاژها دارد. این تغییرات از دما تأثیر می‌پذیرند. در بسیاری از روش‌های تجربی، از نخ‌های بخیه غیرقابل‌جذب و دائمی استفاده می‌شود، خصوصاً اگر بتوان ماهی را به‌راحتی صید کرد و با بیهوشی خفیف بخیه‌ها را خارج نمود. به‌طورکلی، ماهیانی که دمای مطلوب آن‌ها پایین است و آن‌هایی که در دمای نیمه مطلوب به‌سر می‌برند، نیاز به بخیه‌هایی دارند که مدت طولانی‌تری (تا سه الی چهار هفته) باقی بماند. ازآنجاکه معمولاً در هیچ‌یک از لایه‌های داخلی بدن ماهیان بخیه زده نمی‌شود (و علت این امر، احتمال پاره شدن پرده صفاق و فاسیای دیگر است)، لذا باید بخیه‌ها تا زمانی باقی بمانند که تهاجم بافت فیبروس کامل شود. اگرچه با بخیه‌های دائمی، خطر باز شدن محل شکاف قبل از کامل شدن التیام به حداقل می‌رسد، اما لازم است که ماهی را مجدداً صید کرده و بیهوش کنیم تا نخ بخیه از بدن ماهی خارج شود.

در بعضی از روش‌ها، چسب‌های قوی[1] برای بستن سریع شکاف‌ها به‌طور موفقیت‌آمیز مورداستفاده قرارگرفته است. چسب‌های جراحی نیز برای شکاف‌های کوچک به‌خوبی عمل می‌کنند و نیاز به خارج کردن نخ بخیه نیز وجود ندارد. پروتکل‌های تجربی نیز ممکن است موردنیاز باشد تا دریابیم که آیا یک نوع خاص از نخ بخیه با نوع جراحی موردنظر ما مطابقت دارد یا خیر.

1. Steel stapes

روش‌های جراحی ماهیان

مفاهیم عمومی

جراحی ماهیان در وضعیت‌های متعددی قابل انجام است. جراحی ماهیان کوچک خانگی که نیازمند ترمیم اضطراری هستند، یا ماهیان زینتی با ارزش که نیازمند جراحی پلاستیک (برای زیبایی بیشتر) هستند، در فعالیت‌های دامپزشکی رو به افزایش نهاده است. در تجارب و آزمایش‌های علمی، ریزسازی حس‌گرها[1]، امکان تعیین زمان واقعی را در مورد ماهیان هم زیستگاه[2]، نسبت به مطالعات در محیط‌های بسته، فراهم می‌کند. در مطالعات میدانی، می‌توان فرستنده‌ها و گیرنده‌ها را در زیرپوست یا داخل حفره شکمی وارد کرد تا بتوان آن‌ها را چندین ماه ردیابی کرد و اطلاعات مربوط به مهاجرت، رفتار یا ثبت اطلاعات تولیدمثلی و ارتباط آن با اطلاعات سال‌های قبل را جمع‌آوری نمود. در تمام این موارد، باید ماهیان را بر اساس اصول انسانی دست‌کاری کرد و مداخله جراحی باید مصلحت‌آمیز باشد. همچنین، باید تلاش کرد که سریعاً به وضعیت فیزیولوژیک متعارف خود برگردند. میزان دستیابی به این اهداف، دقت و قابلیت اطمینان به نتایج تحقیقاتی را نشان می‌دهد. روش‌های بسیاری توصیف‌شده و موردمطالعه قرارگرفته‌اند، اما در اینجا فقط روش‌هایی که با بهبود متعارف همراه بوده‌اند، ارائه می‌شوند. روش‌هایی که صرفاً برای کسب تجارب توسعه‌یافته‌اند، در اینجا موردنظر نیستند.

روش‌های جراحی

قبل از عمل جراحی، باید ماهی بیمار را به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشت تا احتمال استفراغ و نتیجتاً، آسیب به آبشش کاهش یابد. کاهش محتویات دستگاه گوارش، امکان دست‌کاری امعاواحشا راحت‌تر می‌کند و خطر آلودگی را کاهش می‌دهد (کلونتز و اسمیت، ۱۹۶۸).

عمل جراحی زمانی شروع می‌شود که بیمار در وضعیت با ثبات قرار داشته باشد، به‌خوبی بیهوش شود و به‌طور متعارف تنفس کند. ضدعفونی محل جراحی باید سریع و ملایم صورت گیرد تا از تحریک پوست که التیام را به تأخیر می‌اندازد، اجتناب شود. سائیدن[3] محل جراحی با الکل توصیه نمی‌شود (استوسکوپ، ۱۹۹۳). ضدعفونی‌کننده‌های واجد پوویدون آیوداین، خصوصاً آن‌هایی که واجد ترکیبات اسیدی و شوینده‌ها (دترجنت‌ها) نیستند (برای مثال، اویدین[4] از شرکت بین‌المللی آزمایشگاه‌های Syndel) را می‌توان به‌آرامی بر روی محل عمل استفاده کرد. سائیدن

1. Miniaturization of sensors
2. Cohabited
3. Scrubes
4. Ovidine

محل جراحی فی‌نفسه[1] نیاز نیست، زیرا مواد ضدعفونی‌کننده بر روی باقیمانده موکوس و کوتیکول جریان پیدا می‌کنند. خشک‌کردن ساده توسط گاز یا حوله استریل و به دنبال آن، استفاده از ماده ضدعفونی‌کننده کفایت می‌کند. عقاید در خصوص ضرورت انجام ضدعفونی و تأثیر آن بر روی التیام متفاوت است (واگنر و همکاران، ۱۹۹۹)، اما آماده کردن یک سطح ضدعفونی شده برای ایجاد شکاف، محافظی در مقابل ورود باکتری‌ها یا آلاینده‌های زیست‌شناختی دیگر محسوب می‌شود. در مورد بعضی از ماهیان، ممکن است لازم باشد که پس از آماده‌سازی اولیه، تعدادی از فلس‌ها را خارج کنید. خارج کردن فلس‌ها، زخمی را بین لایه اپیدرمیس پوست برجای می‌گذارد. برای خارج کردن فلس‌ها، باید هر یک از آن‌ها را جداگانه درآورد و به سمت عقب بدن ماهی کشید تا به‌صورت تمیز از جیب فلس خارج شوند. استفاده از خون‌بندهای مناسب، روش مفیدی برای بستن محل خروج فلس خواهد بود و ترومای (ضربه) حاصله را به حداقل می‌رساند. هنگامی‌که فلس‌ها کوچک هستند، به‌طوری‌که نمی‌توان آن‌ها را تک‌تک خارج کرد، می‌توان از یک چاقوی جراحی استفاده نمود و فلس‌ها را به سمت عقب بدن ماهی خراش داد. خارج کردن فلس‌ها در جهت مخالف، باعث ایجاد زخم ناصافی خواهد شد که التیام ضعیفی را به همراه خواهد داشت. تنها فلس‌هایی را خارج کنید که برای ایجاد شکاف ضرورت دارد، زیرا باقیمانده فلس‌ها باعث حمایت و ثبات محل شکاف خواهند شد. خشک‌کردن و ضدعفونی مجدد محل جراحی، پس از خارج کردن فلس‌ها ضرورت دارد تا مطمئن شوید که هیچ موجود زنده بیماری‌زایی جیب فلس‌ها را آلوده نمی‌کند، یا از این طریق وارد نخواهد شد.

باید از پارچه‌های پوشاننده (دریپ) مناسب استفاده کرد تا فقط محل شکاف در معرض دید باشد. همه تجهیزات جراحی باید استریل باشند و به‌درستی بسته‌بندی شوند. تجهیزات را معمولاً بر روی یک میز مرتفع با میانگاه[2] متحرک قرار می‌دهند تا جراح به‌راحتی به آن دسترسی داشته باشد. برای ایجاد شکاف‌های خارجی و داخلی، تجهیزات مجزایی موردنیاز است. جراح باید قبل از باز کردن یک دسته از تجهیزات برای شکاف دادن پوست، به‌درستی از ماسک صورت و دستکش استفاده کند و سپس برای استفاده داخلی، از دسته دوم تجهیزات بهره‌مند شود و روش‌های موردنیاز جراحی را به اجرا در آورد.

اگرچه اپیدرمیس و پرده صفاق، شکننده هستند و به‌راحتی پاره می‌شوند، اما ساختار کلی پوست به خاطر وجود یک لایه پوستی فشرده از بافت کلاژن متراکم در بیشتر گونه‌های ماهیان، سفت و انعطاف‌پذیر است. جراح باید تجربه کافی داشته باشد تا هنگامی‌که تیغه جراحی از این لایه فشرده عبور می‌کند، فشار مطلوب را بر روی تیغه وارد سازد و کنترل خود را برای این امر حفظ

1. Scrubing per se
2. Waist

کند. اندازه و شکل تیغه چاقوی جراحی باید به‌درستی انتخاب شود تا فشار کافی اعمال شود و به‌سلامت ماهی آسیب نرسد و اندام‌های زیرین آسیب نبینند. یک برش تمیز، جراحات کمتری را نسبت به چندین دفعه برش به همراه خواهد داشت و التیام سریع‌تری را به دنبال خواهد آورد. جراحان مجرب تفاوت‌های قابل‌ملاحظه‌ای در انجام عمل نسبت به دیگران از خود نشان می‌دهند و امکان التیام سریع را بدون عواقب[1] فراهم می‌سازند.

بافت پوست و عضلات ماهیان دارای خون‌رسانی ضعیف‌تری است و فشارخون در ماهی به‌طور معنی‌داری کمتر از پستانداران است. برای مثال، می‌توان برش‌ها را در ناحیه وسطی شکمی یا اطراف ناحیه میانی شکم ایجاد کرد و دیگر نیازی نیست که تلاش برای بستن رگ‌های خونی در حال خونریزی انجام شود، یا این‌که تلاش اندکی برای این امر لازم خواهد بود. خون یک ماهی سالم بسیار سریع منعقد می‌شود. درنتیجه، بسیاری از روش‌ها را می‌توان در عرض چند دقیقه کامل کرد و اغلب نیازی به بیهوشی مداوم نیست تا زمان کافی برای تکمیل عمل جراحی فراهم شود. بستن تک‌تک لایه‌های بافتی، فقط در مورد ماهیان خیلی بزرگ توصیه می‌شود. در بیشتر وضعیت‌ها، بخیه‌های منفرد منقطع[2] برای پوشاندن لایه‌ها به‌صورت یک‌باره کفایت می‌کند. دلیل این امر نیز تحرک سلول‌های اپیدرمی است که در مباحث قبل در خصوص التیام برش‌های جراحی به آن اشاره شد.

لاپاراتومی

متداول‌ترین مداخله جراحی در ماهیان، کانول گذاری است که در فصول قبل به آن اشاره شد. لاپاراتومی عمدتاً برای جراحی اندام‌های داخلی صورت می‌گیرد. هم لاپاراتومی از طریق خط میانی بدن و هم از طریق اطراف ناحیه میانی شکم به‌طور موفقیت‌آمیز به اجرا درآمده است (کلونتز و اسمیت، ۱۹۶۸؛ واگنر و همکاران، ۱۹۹۹). روش خط میانی، بسته به گونه موردنظر، ارجح‌تر از روش دیگر است (استوسکوپ، ۱۹۹۳)، به‌ویژه در ماهیان گرد (ازنظر سطح مقطع) مانند آزادماهیان با فلس‌های سبک‌تر که دارای یک خط سفید مشخص در امتداد خط میانی شکم هستند و عروق خونی نسبتاً کمتری در آنجا وجود دارد. برش را می‌توان به‌سرعت در این ناحیه‌ایجاد کرد و به‌راحتی با پنس یا رتراکتور حفره شکمی را باز کرد تا به‌اندازه کافی در معرض دید قرار گیرد. لاپاراتومی روشی متداول برای انجام بیوپسی (تکه‌برداری)، خارج کردن تومور، جراحی اکتشافی برای تشخیص بیماری (لیوبارت و همکاران، ۱۹۹۸)، خارج کردن غدد جنسی[3] و کاشتن ابزارهای مختلف است.

---

1. Complication
2. Single interrupted sutures
3. Gonadectomy

انتخاب مکان‌های برش، بستگی به گونه ماهی دارد و معمولاً برحسب ناحیه‌ای از شکم انتخاب می‌شود که لازم است به آنجا دسترسی پیدا کنید. قبل از شروع هر پروژه عمده، لازم است که پروتکل‌های مربوط به هر یک از گونه‌ها موردبازنگری قرار گیرد یا توسعه یابد. کمربند شانه‌ای ماهیان، با توجه به تکامل گونه‌ها، به سمت ناحیه سرکشیده می‌شود؛ بنابراین، موقعیت آن در بین گونه‌های مختلف متفاوت است و ممکن است یک مانع پردردسر باشد. ترجیحاً بهتر است که برش‌ها به سمت قدامی یا خلفی کمربند لگنی کشیده شوند، هرچند که در صورت ضرورت، می‌توان استخوان‌های لگنی را شکاف داد و دوباره به هم متصل کرد. ممکن است لازم باشد که مطالعات پس از مرگ بر روی ماهی صورت گیرد تا مکان‌های مطلوب برش را تعیین کنید. ماهیان گوشتخوار دارای دستگاه گوارش ساده هستند و معمولاً فضای کافی وجود دارد تا عمل را به‌سرعت و با اطمینان انجام دهید. ماهیان علفخوار دارای توده روده‌ای بسیار بیشتری هستند که به‌صورت فشرده با روده بند اتصال دارند و این امر ممکن است کار لاپاراتومی را پیچیده کند.

بعدازاینکه پوست برش داده شد و پرده صفاق در معرض دید قرار گرفت و سوراخ شد[1]، برش را می‌توان با استفاده از یک چاقوی جراحی یا قیچی امتداد داد، به‌نحوی‌که بخش کند قیچی به سمت داخل باشد و دیواره شکم به سمت بالا کشیده شود تا قیچی از اندام‌های داخلی دور بماند. هرگونه خون‌ریزی داخلی بر روی امعاواحشا را باید قبل از ادامه کار فوراً مواظبت کرد[2]. خون ماهی سریع منعقد می‌شود و خونریزی‌های کوچک تبعات چندانی ندارد، اما خونریزی‌های داخلی حتی در هنگامی‌که فشارخون پایین است، نشان‌دهنده وجود یک جراحت مهم به‌حساب می‌آید.

همان‌طور که قبلاً توصیف شد، بستن شکاف در بیشتر ماهیان، شامل استفاده از بخیه‌های منقطع[3] ساده در کل دیواره بدن است. بستن دو طرف شکاف بدون تنگ کردن زیاد، ضرورت دارد تا چارچوبی برای مهاجرت سلول‌های پوششی و متعاقباً تزاید بافت فیبروس فراهم آید و جلوی نشت آب گرفته شود. هم پوست و هم روده بند می‌توانند شکاف را سریع بپوشانند، البته اگر چیزی نتواند مانع مهاجرت آن‌ها شود؛ بنابراین، باید تلاش زیاد صورت گیرد تا لایه‌های بافتی دو طرف شکاف به‌طور صحیح در کنار هم چیده شوند. جراحان باید دقت داشته باشند که در خلال بستن شکاف، چربی روده بند یا بافت‌های داخلی دیگر سهواً بریده نشوند. این نوع گسیختگی، مانع از ترمیم می‌شود. باید جلوی عفونت‌ها گرفته شود و بعضی از محققان توصیه می‌کنند که پودر آنتی‌بیوتیک بر روی محل شکاف ریخته شود، اما هیچ شاهدی وجود ندارد که نشان دهد این امر با فوایدی همراه است.

---

1. Puncturcd
2. Attended
3. Interrupted

جراحی‌های انتخابی[1] و غیرمنتظره[2]

ایجاد زخم، ازجمله تبعات زندگی در اسارت، دست‌کاری‌های متداول، حوادث داخل مخزن یا کنش‌های متقابل متضاد اجتماعی و مخازن پرجمعیت است. جنگ‌های مربوط به حفظ قلمرو در خلال فصل تخم‌ریزی، ممکن است منجر به ایجاد زخم‌های خطرناک در ماهیان با ارزش شود. هرچه سن ماهی در شرایط اسارت افزایش می‌یابد، بیماری‌هایی که به‌ندرت در شرایط محیط طبیعی دیده می‌شوند، ازجمله زخم‌های مربوط به چشم (نادل اشتین و همکاران، ۱۹۹۷)، اختلال کیسه شنا (لیوبارت و همکاران، ۱۹۹۵)، سرطان‌ها (استوسکوپ، ۱۹۹۳) و شکستگی‌ها شروع به تظاهر می‌کنند.

در آبزی‌پروری، ماهی شار مناطق قطبی دارای عارضه‌ای است که با اتساع بیش‌ازحد کیسه شنا همراه است. این مشکل به‌صورت دوره‌ای در بسیاری از گونه‌ها روی می‌دهد. کیسه شنا در این ماهیان اتساع پیدا می‌کند و سبب می‌شود که ماهی در هنگام استراحت بر روی سطح آب شناور بماند. عاقبت، انجام شنای پایدار در مقابل افزایش شناوری، سبب بروز خستگی مفرط و مرگ ماهی می‌شود. تلاش‌های زیادی برای درمان این مشکل انجام‌شده است. واردکردن سوزن به‌صورت زیرپوستی از پهلو از طریق مکان آماده‌شده‌ای بر روی دیواره شکم یا به‌صورت پشتی جمجمه‌ای از طریق کلوآک، باعث تسکین کوتاه‌مدت یا متوسط مؤثری می‌شود. ارزیابی وضعیت تولیدمثلی ماهیان مولد با ارزش را می‌توان با مداخله جراحی ساده‌ای به‌صورت ویدیولاپاروسکوپی از منفذ جنسی بهبود بخشید. این آزمایش‌ها باعث تعیین جنسیت ماهی، وضعیت تولیدمثلی و تخمین زمان تخم‌ریزی می‌شود.

جراحی میدانی و برچسب‌گذاری

زیست شناسان شیلاتی از انواعی از برچسب‌های داخلی و خارجی استفاده می‌کنند تا جزئی از یک مجموعه بزرگ ماهیان را شناسایی کرده و به مطالعه دینامیک جمعیت آن‌ها بپردازند. این برچسب‌ها، از گیره باله‌ها[3] تا گیرنده‌های راداری زیرجلدی و شکمی[4] متغیر هستند. درواقع، بعضی از این دستگاه‌های برچسب‌گذاری، مانند برچسب‌های کاشتنی قابل دید[5]، هیچ نوع واکنش زیان‌آوری تولید نمی‌کنند، درحالی‌که بقیه برچسب‌ها آسیب جلدی قابل‌ملاحظه‌ای را به همراه

1. Elective
2. Emergency
3. Fin Clips
4. Subcutaneous and Abdominal Transponders
5. Visual implant Tags

دارند. روبرتس و همکاران (۱۹۷۳) اثرات روش‌های برچسب‌گذاری را مطالعه کردند و واکنش‌های آسیب‌شناسی کوتاه‌مدت و درازمدت آن را توصیف نمودند.

کاشتن فرستنده‌های رادیویی [1] از طریق جراحی به همراه کوچک کردن ابزار مسافت سنجی[2] از اوایل دهه ۱۹۷۰ تکامل یافته است. فرستنده‌های هیدروسونیک یا آکوستیک[3] و منابع انرژی آن‌ها به‌اندازه کافی کوچک شدند که در شکم ماهیان مربوط به صید ورزشی جای بگیرند تا از این طریق، مسیرهای مهاجرت آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد و رفتارهای اجتماعی مطالعه شوند و همچنین، مکان‌های تولیدمثل آن‌ها در داخل یک توده آبی تعیین شود.

بر روی ماهیانی که از محیط‌های طبیعی صید می‌شوند، می‌توان جراحی میدانی انجام داد. همه قواعدی را قبلاً در خصوص جراحی در محیط آزمایشگاه عنوان شد، می‌توان برای لاپاراتومی ماهی در شرایط میدانی برای واردکردن یک فرستنده دائمی به اجرا در آورد. این روش‌ها نیاز به آن دارند که از بیهوشی کافی، کنترل دما، تسریع روش‌های طراحی‌شده ضدعفونی و اثرات پس از جراحی مطمئن شویم. ممکن است ماهیان مورد آزمایش را ناچار شویم قبل از بازگشت به محیط‌های طبیعی نگهداری کنیم تا بهبود آن‌ها کامل شود. باوجوداین، در مورد بسیاری از گونه‌ها، شرایط اسارت استرس‌زاست و بهتر است که آن‌ها را رها کنیم. اطلاعات تحقیقاتی خوب، بستگی به بهبود مناسب ماهی پس از عمل جراحی دارد؛ بنابراین، اگر ماهی قادر به ادامه حرکت نیست، بهتر است فرستنده را هرچه سریع‌تر از بدن آن خارج کنیم تا نقصان عمل جراحی را مورد ارزیابی قرار دهیم.

عوارض جراحی

متداول‌ترین عامل عدم موفقیت در جراحی، کشش نامناسب بخیه‌ها است. بخیه‌هایی که بسیار تنگ هستند، ممکن است منجر به پاره شدن بافت شوند، درحالی‌که بخیه‌های شل، امکان آلودگی از طریق آب و موجودات زنده ریزبینی داخل آن را فراهم می‌کنند و باعث دهان باز کردن شکاف یا ممانعت از مهاجرت سلول‌های پوششی به محل شکاف می‌شوند. جالب‌توجه است که باز شدن محل شکاف ممکن است فوراً باعث مرگ ماهی نشود. در قزل‌آلای رنگین‌کمان، ممکن است بافت چربی وابسته به چین صفاقی به‌اندازه کافی به محل شکاف بچسبد یا آن را مسدود کند، به‌طوری‌که از نشت آب جلوگیری به عمل آید. در این حالت، توانایی تنظیم اسمزی ماهی دست‌نخورده باقی می‌ماند تا اینکه بتوانید ماهی را دوباره صید کرده، بیهوش نمایید و محل شکاف را پس از برداشتن نسوج فاسد و مرده برای بار دوم به هم نزدیک کنید.

---

1. Radio Transmitter
2. Telemetry
3. Hydrosonic or Acoustic Transmitters

کاشتن فرستنده‌های رادیویی، عوارض مهمی به همراه داشته است. در عرض چند ساعت پس از عمل، فرستنده‌های نسبتاً بزرگ از منافذ جنسی خارج‌شده‌اند. به نظر می‌رسد که این ماهیان آن‌قدر کوچک بوده‌اند که نتوانسته‌اند فرستنده‌ها را ازنظر فیزیکی در خود جای دهند، یا این‌که این فرستنده‌ها در اثر تخریش ناحیه خلفی روده خارج‌شده‌اند. بعضی از این فرستنده‌ها بر روی محل شکاف قرارگرفته و در اثر فشار مداوم ناشی از قوه ثقل منجر به سربازکردن شکاف شده‌اند. آماس و تورم ناشی از پاسخ به جسم خارجی در مقابل فرستنده‌ها نیز منجر به آن شده که آن‌ها به‌طور متعارف توسط کپسولی دربرگرفته شوند و این کپسول آن‌ها را به‌صورت ثابت در آن محل حفظ کند. یک فرستنده با چگالی خنثی، هنگامی‌که در داخل حفره شکمی قرار می‌گیرد، درواقع هیچ‌گونه اثر سوئی بر روی بیشتر ماهیان ندارد. باوجوداین، بعضی از محققان دریافته‌اند که فرستنده‌ها چندین هفته پس از کاشتن، در اثر ورود به داخل روده خارج‌شده‌اند. کپسول دار شدن فرستنده‌هایی که در مجاورت دیواره روده قرار می‌گیرند، باعث احاطه فرستنده‌ها توسط این دیواره می‌شود و عاقبت، فرستنده به داخل روده کشیده می‌شود و حالت پوشش‌دار پیدا می‌کند. به‌رغم عدم وجود عوارض الیتامی در محل برش، فرستنده چندین هفته پس از عمل جراحی از طریق مدفوع دفع می‌شود. با استفاده از مواد خنثی‌تر، ایجاد کپسول توسط بافت همبند به دور فرستنده‌های کاشته شده در بدن کاهش یافته است.

نگهداری ماهیان در دوران نقاهت

تأسیسات نگهداری ماهیان

ماهیان را پس از عمل باید در بهترین تأسیسات ممکن نگهداری کرد. هر یک از گونه‌های ماهیان، نیازمندی‌های خاص خود را دارد. در سه روز اول بهبود، علاوه بر فراهم آوردن شرایط مطلوب پرورشی، باید احتیاط‌های بیشتری انجام شود. ازجمله این‌که باید شرایط برای مشاهده بیماران از نزدیک فراهم باشد؛ امکان چالش میکروبیولوژیک با موجودات زنده داخل آب به حداقل برسد؛ انگل‌های جلدی وجود نداشته باشند؛ حفاظت کافی برای غلبه بر تهاجمات مربوط به حفظ قلمرو صورت گیرد؛ اجازه داده شود که کنش‌های متقابل اجتماعی مناسب برقرار شود تا این‌که ماهی به فعالیت متعارف و عادات غذایی خود بازگردد. در داخل مخازن واجد ماهی، مواد جامد معلقی که از غذای اضافی، مواد مدفوعی یا موکوس پوسته‌پوسته‌شده اضافی حاصل می‌شوند، تجمع می‌یابند. همه این مواد به‌عنوان کانون تزاید باکتریایی عمل می‌کنند و می‌توانند باعث آلودگی محل برش شوند. آن‌ها اکسیژن آب مخازن پرستاری از ماهیان را مصرف می‌کنند و همچنین، تولید آمونیاک را افزایش می‌دهند. برقراری مجدد عادات غذایی متعارف، ما را از تأمین منابع انرژی کافی برای التیام مطلوب مطمئن خواهد ساخت. میزان اشتهای پس از جراحی در بین گونه‌های مختلف، متفاوت

اســت. هر نوع غذای مصــرف نشــده، حتی غذاهای زنده‌ای مانند آرتمیا نیز مخازن بهبود ماهیان را آلوده می‌کنند. بســیاری از جیره‌ها دارای مقادیر کافی روغن هســتند که خارج کردن آن‌ها از داخل آب دشــوار اســت. جیره‌های خشــک را باید مورد بازرســی قرار داد تا مطمئن شویم هیچ‌گونه غذای پودر مانند یا تکه‌تکه در داخل پلت‌ها وجود ندارد. اثرات این نوع احتیاط‌ها به‌راحتی آشــکار نیســت، امـا هنگـامی‌کـه این احتیـاط‌ها اعمال می‌شـــوند، بر روی کیفیت آب ازنظر وجود رســـوبات تأثیر می‌گذارند. مخازن نگهداری ماهیان پس از جراحی، باید توانایی تصـفیه اضـافی برای خارج سـاختن هرگونه عوارض ناشــی از آب، شــامل غذای مصرف نشده، روغن ازدست‌رفته توسط غذا یا ضایعات و مواد جامد معلق دیگر را داشــته باشند. استفاده از اشعه ماوراءبنفش در مخازن واجد روش چرخشی آب (ورود مجدد آب به داخل مخازن بهبود ماهیان)، کمک می‌کند تا از شکل‌گیری عوامل میکروبی در خلال مراقبت‌های پس از عمل ممانعت به عمل آید.

تأســیســات نگهداری ماهیان را باید به‌دفعات برای تعیین کافی بودن منابع اکســیژن و وضــعیت شـــیمیـایی آب، به‌ویژه بالا رفتن مقادیر آمونیاک، نیتریت، نیترات و دی‌اکســـید کربن پایش کرد. جریـان آب داخل مخازن را باید به نحوی تنظیم کرد که امکان فعالیت اجباری ملایم را فراهم کند و بـایـد دقت کرد که ماهی در اثر افزایش تحرک و فعالیت، دچار کوفتگی نشـــود. باید دقت کرد تا مطمئن شــویم که ماهیان پس از عمل در معرض سموم خارجی مانند کلر حاصل از منابع آب، مواد شـــوینده، آفت‌کش‌هایی مانند حشـــره‌کش‌ها و غیره یا علف‌کش‌ها، به‌ویژه آن‌هایی که برای کنترل زنگ گیاهان به کار می‌روند، قرار نگیرند. سیلیکونی که برای تعمیر مخازن، تعمیر لوله‌های آب‌پاش، یا جلوگیری از نشــت آب به کار می‌رود، نباید حاوی مواد ضــدزنگ گیاهان باشــد، زیرا آن‌ها برای ماهی بسیار سمی هستند.

اهمیت کاهش استرس

در بیشتر گونه‌ها، بازگرداندن ماهی به همان گروه و در همان مخزن اولیه با شرایط محیطی مطلوب، به کاهش اســـترس کمک می‌کند. در تمام موارد، باید پناهگاه‌های امن کافی در اختیار باشـــد، زیرا واکنش‌های اجتماعی متضاد به سمت ماهیانی معطوف می‌شود که تا چندین ساعت پس از بهبودی از مواد بیهوشی، شنای غیرمتعارف از خود به نمایش می‌گذارند (استوسکوپ، ۱۹۹۳). این پناهگاه‌ها ممکن اســت بسیار ساده باشند و از یک لوله پلاستیکی با اندازه مناسب تشکیل شوند که یک ماهی بتواند در داخل آن شــنا کند، یا اینکه از تشــکیلات پیچیده‌تری مانند شبکه توری پلاستیکی سفت ســاخته شــده باشــند که امکان ارتباط از طریق بینایی برای ماهی فراهم باشد، اما کنش‌های متقابل فیزیکی امکان‌پذیر نباشد.

اهمیت این تلاش‌های اضـافی را می‌توان در تداوم نتایج تحقیقاتی متعاقب آن مشاهده کرد (در صـورت چشـم‌پوشـی از انجام این تلاش‌ها، ممکن است از دستیابی به نتایج مطلوب باز بمانیم). هر چیزی، از رفتار ماهی گرفته تا سوخت‌وساز داروها، تحت تأثیر استرس‌های مزمن قرار خواهد گرفت. معمولاً بیماری‌ها در پی شرایط استرس‌زا ایجاد خواهند شد، درحالی‌که اگر ماهیان زودتر به شرایط سـلامت بازگردند، بهتر می‌توانند با بیماری‌ها مقابله کنند و به سـوخت‌وسـاز متعارف سـالم برگشت نمایند. برای مثال، بسـیاری از انگل‌ها که در شـرایط آزمایشـی بدون هیچ‌گونه تبعاتی بر روی بدن ماهی قرار دارند و معمولاً موردتوجه هم قرار نمی‌گیرند، مشخصاً پس از عمل جراحی در «آب تمیز» به‌سـرعت شـروع به تزاید می‌کنند. ماهیانی را که پس از عمل جراحی حالت تحریک‌شده از خود به نمایش می‌گذارند، باید به‌دقت مورد آزمایش قرار داد تا از وجود تک‌یاخته‌ها و مونوژن‌های سـطحی پوست و آبشش مطمئن شویم.

نور رسانی

اغلب در هنگام معاینه، عدم ثبات نور برای بعضـی از گونه‌های ماهیان اسـترس‌زا خواهد بود. پس از عمل، غالباً باید از معاینه کردن ماهیان در اتاق پر نور اجتناب شـود. بعضـی از گونه‌ها، مانند ماهیان گرمسیری آب شیرین، با نور شدید ارتباط مناسبی ندارند و تغییرات نور از روشنایی به تاریکی برای آن‌ها مطلوب نیسـت. باوجوداین، آزادماهیان نسـبت به تغییرات سـریع نور از روشنایی به تاریکی و برعکس، اسـترس قابل‌اندازه‌گیری بروز می‌دهند. افزایش تدریجی نور به تقلید از سپیده‌دم یا غروب برای کنترل نور روزانه ترجیح داده می‌شـود و حفظ شـرایط نوری پایین و مناسـب در طول روز، اسـترس پس از عمل جراحی را به حداقل می‌رسـاند. آزمایش با اسـتفاده از نور فلاش قلمی، امکان بررسـی دقیق محل شـکاف را بدون آشـفته کردن ماهی فراهم می‌کند. ماهیان نسـبت به فتوپریود حساس هستند و باید آن‌ها را در فتوپریود کنترل‌شده صحیح در تمام طول عمل جراحی و پس‌ازآن قرار داد تا عواقب هورمونی بر روی التیام آن‌ها تأثیر نگذارد.

خلاصه

انجام جراحی خوب، مستلزم تلاش گروهی است. همه اشخاصی که در یک طرح (پروتکل) تحقیقاتی دخیل هسـتند، باید در روش‌های ضدعفونی و قواعد جراحی به‌خوبی آموزش‌دیده باشند. چالش‌های اضافی دیگر، مستلزم حفظ و نگهداری ماهی در یک مرحله بینابینی تمیز و مناسب بین محیط آبی و مکان جراحی اسـت. به خاطر اینکه جراحی اسـترس قابل‌توجهی به ماهی تحمیل می‌کنند، خطر اوج گرفتن بیماری، لزوم انجام بیشـترین موازین بهداشـتی را در خلال انجام روش‌های جراحی و

حفظ بهترین شـرایط برای دوران نقاهت ضـروری می‌سـازد. پی بردن به نیازهای خاص هر یک از گونه‌های ماهیان، ازجمله مراقبت‌های پیش و پس از عمل، برای بقای بیشتر ضروری است.

تصویر ۹-۱: پلات فرم لازم برای جراحی ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۲: لوازم موردنیاز برای جراحی ماهیان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۳: خواباندن ماهی به پشت برای انجام جراحی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۴: خواباندن ماهی به پهلو برای جراحی ناحیه سر (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۵: نحوه آب‌رسانی به آبشش برای انجام جراحی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۶: عمل جراحی بر روی ماهی طلایی و خروج تومور از بدن ماهی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۷: نحوه بخیه زدن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۸: تگ گذاری در ماهی تون (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۹: نصب تگ صوتی (آکوستیک) در ماهی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۱۰: نصب ترانسمیتر در ماهی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۱۱: نصب تگ در ماهی تون (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

تصویر ۹-۱۲: نحوه بخیه زدن پس از عمل جراحی در ماهی (اقتباس از نوگا، ۲۰۱۰).

فصل دهم

فنون رادیوگرافی در ماهیان

مقدمه

اتورادیوگرافی به‌عنوان یک روش، از تشعشع حاصل از مواد رادیواکتیو موجود در داخل یک نمونه استفاده می‌کند تا یک امولسیون هسته‌ای یا فتوگرافیک را در معرض دید قرار دهد. برای انجام این امر، اتورادیوگرافی، تصویری تولید می‌کند که انعکاس‌دهنده انتشار منبع رادیواکتیویته در داخل یک نمونه است. جوهر و ماهیت[1] اتورادیوگرافی این است که اجازه می‌دهد رادیواکتیویته برای روشن ساختن جزئیات ساختاری نمونه، در داخل آن انتشار یابد، بدون این‌که چارچوب موضعی آن نمونه دچار اختلال یا آشفتگی شود. ازآنجاکه هر بلور امولسیون یک آشکارکننده[2] مستقل محسوب می‌شود، بنابراین، تعریف هر یک از موارد ثبت شدهٔ حاصل ازاین‌روش می‌تواند متغیر باشد و از یک سلول گرفته تا یک اندمچه را شامل شود و البته این امر بستگی به روش مورداستفاده دارد. بیشترین مورداستفاده آن، برای نمونه‌هایی است که یک نوع ناهمگونی ازنظر پیام و منبع انتشار در یک مقیاس کوچک نشان می‌دهند. در این حالت، این روش نسبت به‌روش‌های دیگر ازجمله روش‌های رادیوایزوتوپیک معمول و آزمایش‌های شیمیایی برتری دارد، زیرا در روش‌های اخیر، دستیابی به نمونه‌های بسیار کوچک، تعیین حساسیت و ملاحظات مربوط به پس‌زمینه[3] ممکن است مشکل باشد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

اتورادیوگرافی، روشی است که می‌توان آن را برای بسیاری از جوانب زیست‌شناسی تجربی ماهیان مورداستفاده قرار داد. رادیوایزوتوپ‌های ترکیبات مهم بیولوژیک را می‌توان برای ماهیان به اجرا درآورد، به‌نحوی‌که مکان مواد شیمیایی و میزان پایداری آن‌ها را می‌توان مشاهده کرد و در بعضی از موارد، میزان آن‌ها را تعیین کرد. بسیاری از ترکیبات موردعلاقه زیست‌شناسان، عناصر ایزوتوپ (^{3}H ، ^{14}C ، ^{35}S ، ^{125}I) هستند که برای اتورادیوگرافی بسیار مناسب می‌باشند. به‌علاوه، رادیو ایزوتوپ‌هایی که کاربرد علمی کمتری دارند و شایستگی آن‌ها ازنظر فنی تقلیل یافته است، با استفاده از رهیافت‌های اتورادیوگرافیک خاص در مطالعات مربوط به ماهیان کاربرد پیدا کرده‌اند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

ملاحظات عمومی

کتاب‌ها و مقالات مختلفی در خصوص کاربرد رادیوگرافی وجود دارد. این منابع، زمینه‌ای را در خصوص قواعد عمومی و استعداد اتورادیوگرافی تأمین می‌کنند. رهیافت مورداستفاده هر چه باشد،

1. Essence
2. Detector
3. Background

درهرصورت، اتورادیوگرافی به سه جزء عمومی نیازمند است که شامل وجود نمونه، رادیوایزوتوپ در داخل نمونه و یک وسیله ثبت مانند امولسیون رادیوگرافیک یا هسته‌ای است. فورمت‌های متنوعی برای فراهم آوردن کنش‌های متقابل بین این سه جزء ایجادشده است و در این فصل به آن‌ها پرداخته خواهد شد. مکمل‌های رادیوگرافی، به‌صورت یک روش، ردیفی از مراحل عمل‌آوری پی‌درپی هستند که می‌توان آن‌ها را برای یک مورد استعمال خاص اصلاح کرد. در بین تلفیق این کنش متقابل و این مراحل عمل‌آوری، پدیده شفافیت[1]، کارآیی و پس‌زمینه قرار دارد که بر روی بازده و قابلیت تفسیر تصاویر رادیوگرافیک تأثیر می‌گذارد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

تصویر ۱۰-۱: چینش‌های متداول مواجهه اتورادیوگرافیک در بین ساختار حمایت‌کننده، نمونه و امولسیون فتوگرافیک یا هسته‌ای: ۱ – رهیافت معمولی؛ ۲ – روش فیلم پیوسته (stripping) ؛ ۳ – مقطع انجمادی انجمادزدایی شده بر روی لام؛ ۴ – رهیافت سوبسترای پهن برای میکروسکوپ الکترونی؛ ۶ – روش لوپ (loop) برای میکروسکوپ الکترونی. کلمات کلیدی: e: امولسیون یا فیلم؛ sp: نمونه؛ S: اسلاید ؛ g: گرید (میله)؛ ge: ژلاتین؛ c: کربن؛ co: کولودیون (اقتباس از اوستراندر، ۲۰۰۰).

ملاحظات رادیو ایزو توپیک

تشعشع یونیزه کننده (آلفا- α، بتا- β یا گاما- γ) به بلورهای (کریستال‌های) هالوژن نقره در امولسیون‌های هسته‌ای یا فتوگرافیک، انرژی می‌بخشند. هنگامی‌که این امر روی می‌دهد، الکترونی که در یک نقطه واجد حساسیت به‌دام می‌افتد، نقره یونی را به عنصر نقره تبدیل می‌کند و بنابراین، یک تصویر ناپیدا تولید می‌شود. هر یک از انواع تشعشعات، به شکل متفاوتی با امولسیون واکنش متقابل نشان می‌دهند. ذرات آلفا، با یک توده بزرگ و انرژی اولیه بالای ایزوتوپی (همه آن‌ها بیش

1. Resolution

از MeV ۴ هستند) و شارژ 2^+ (که الکترون‌های اوربیتالی را جذب می‌کنند و انرژی را بسیار سریع به سمت امولسیون پراکنده می‌سازند)، می‌توانند تصویری فشرده و ناپیدا به وجود آورند. ذرات بتا با یک شارژ منفی منفرد و طیف ایزوتوپی خاص و غالباً انرژی‌های پایین‌تر، انرژی را از طریق دفع الکترون‌های اموسیون از دست می‌دهند. ذرات بتا به خاطر اندازه و انرژی خود، انرژی را نسبت به ذرات آلفا، با سرعت کمتری از دست می‌دهند؛ بنابراین، منجر به ایجاد تصاویری پنهان با تراکم کمتر می‌شوند. اشعه گامای تشعشع الکترومغناطیس، مستقیماً به همراه الکترون‌ها یا هسته به هم برخورد می‌کنند تا انرژی از دست بدهند و نتیجه این امر، کنش‌های متقابل وسیع با امولسیون است. از بین تشعشعات یونیزه که با یک امولسیون کنش متقابل نشان می‌دهند، ذرات آلفا و بتا بیشترین کاربرد را در اتورادیوگرافی دارند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

جدول ۱: مراحل تجربی متداول برای روش‌های اتورادیوگرافیک (اوستراندر، ۲۰۰۰).

تجویز رادیوایزوتوپ A
جمع‌آوری نمونه
آماده کردن نمونه
تهیه مقطع
رنگ‌آمیزی پیش از مواجهه B
استعمال فیلم یا امولسیون
مواجهه
توسعه امولسیون
رنگ‌آمیزی پس از مواجهه B
ارزیابی

A: رادیوایزوتوپ ها را می‌توان در محیط خارج (in vivo) یا پس از تهیه مقطع به‌صورت آزمایشگاهی (in vitro) تجویز کرد.

B: یا پیش یا پس از رنگ‌آمیزی

شفافیت[1]

ذرات آلفا و بتا ممکن است از ایزوتوپ به هر جهتی انتشار پیدا کنند. در مورد ذرات گاما، اثر کاملاً مجزا خواهد بود، زیرا همه ذرات دارای انرژی یکسان هستند. برعکس، هرچه انرژی حداکثر طیف ذره بتا بیشتر باشد، مسافت فی‌مابین منبعی که در آن دانه‌های نقره ممکن است در امولسیون شکل بگیرند، بیشتر خواهد شد. تراکم دانه در امولسیون، مستقیماً در بالای منبع، در هنگام افتادن و

1. Resolution

برخورد به سطوح پس‌زمینه، در بیشترین مقدار خود قرار دارد، به‌طوری‌که فاصله از منبع افزایش می‌یابد. ایزوتوپ‌های ساطع‌کننده بتا با انرژی کمتر، شفافیت بیشتری از خود نشان می‌دهند، زیرا فاصله طی شده از منبع توسط ذره بتا کمتر خواهد بود. برای مثال، ذرات بتای حاصل از تریتیوم[1] حداکثر انرژی KeV ۱۸/۵ دارند و به‌ندرت بیش از یک میکرومتر در امولسیون هسته‌ای حرکت می‌کنند، درحالی‌که کربن ۱۴ (C^{14}) با حداکثر انرژی MeV ۰/۱۵۶ می‌توانند تا چهار برابر مسافت بیشتری را طی کنند. ایزوتوپ‌های انتشاردهنده بتا با انرژی بالاتر مانند ^{32}P (MeV ۱/۷۰۹)، ^{35}S (MeV ۰/۱۶۷) و ^{131}I (Mev ۰/۸۶) دارای شفافیت ضعیف‌تری هستند. شفافیت تحت تأثیر زمان مواجهه، فاصله بین امولسیون و منبع، ضخامت امولسیون، اندازه بلورهای امولسیون و ضخامت منبع نیز قرار می‌گیرد. معمولاً زمان مواجهه طولانی‌تر، منجر به شفافیت کمتر می‌شود، زیرا یک بلور امولسیون، فقط یک‌بار به‌عنوان دانه نقره رشد یافته عمل می‌کند. هر چه زمان مواجهه بیشتر باشد، شانس این‌که بلوری که مستقیماً در مجاورت منبع قرارگرفته، بدون هیچ‌گونه رشد بعدی به امولسیون برخورد کند، بیشتر خواهد بود و این در حالی است که موارد برخورد[2] دور ثبت می‌شوند. هر چه فاصله بین منبع و امولسیون کاهش می‌یابد، شفافیت بهتر می‌شود. دانه‌های امولسیون که در بالای منبع واقع‌شده‌اند، در مسافت نزدیک‌تر، احتمال بیشتری برای مواجهه دارند. معمولاً امولسیون‌های ضخیم‌تر، میزان شفافیت را کاهش می‌دهند، درحالی‌که بلورهای کوچکتر امولسیون، باعث افزایش شفافیت می‌شوند. در حالت اول، تراکم بیشتر دانه‌ها، باعث مواجهه بیشتر امولسیون‌های ضخیم‌تر می‌شوند و در حالت دوم، دانه‌های رشد یافته، در هنگامی‌که بلورهای کوچکتری در امولسیون‌ها استفاده می‌شوند، انطباق نزدیکتری با مسیر ذرات پیدا می‌کنند. اگر منبع ضخیم‌تر باشد، شفافیت نیز ضعیف‌تر خواهد بود، زیرا یک ردیف از نقاط منبع در دسترس خواهند بود که هرکدام از آن‌ها اثر دیگری را در امولسیون تحت‌الشعاع قرار می‌دهد و می‌پوشاند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

کارآیی

هر چه انرژی اولیه ذره بتا پایین‌تر باشد، اتلاف انرژی به سمت امولسیون بیشتر خواهد شد و بنابراین، رسوبات نقره تصویر پنهان افزایش می‌یابد. برعکس، نفوذ بیشتر از درون نمونه و امولسیون، با انرژی بیشتر امکان‌پذیر خواهد بود. در مورد بسیاری از ایزوتوپ‌ها، تشعشع در داخل نمونه مرتبط با اتورادیوگراف توسط فاصله حرکت ذره محدود می‌شود و این به نوبهٔ خود، با انرژی ذره در ارتباط

1. Tritium
2. Hits

اسـت. بعضـی از ذرات که منشأ آن‌ها در داخل نمونه است، انرژی کافی برای عبور از نمونه ندارند و گفتـه می‌شـــود که متحمل «جذب خودی»[1] خواهند شـــد؛ بنابراین، اتورادیوگراف‌های مربوط به ایزوتوپ‌هـایی را که انرژی پایین‌تر دارند، می‌توان تنها به آن نواحی از نمونه مربوط دانســـت که در نزدیک‌ترین فاصـله نسـبت به امولسیون قرار می‌گیرند. ذراتی که در این رادیوگراف مشارکت دارند، در مورد سـاطع‌کنندگان بتا با انرژی بالاتر، بزرگ‌تر هسـتند، اما اتلاف انرژی و تصویر پنهان به ازای هر ذره کمتر اسـت. عوامل دیگری که بر روی کارآیی تأثیر می‌گذارند، شـامل ضـخامت و حساسیت امولسـیون، دما و دوره مواجهه، انتخاب ظاهر کننده عکس و شرایط ظهور هستند. اگرچه هر یک از این خصوصیات ممکن است مسئله‌ساز باشند، اما مهم‌ترین عوامل برای ایزوتوپ‌های با انرژی پایین، شامل جذب خودی و فاصله بین منبع و امولسیون هستند. در مورد ذرات با انرژی بالاتر، ضخامت و حساسیت امولسیون اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

پس‌زمینه [2]

عوامل دیگری غیر از تشعشع از منبع آزمایش، منجر به بروز دانه‌های نقره در امولسیون ظهور یافته می‌شـوند. پس‌زمینه منجر به‌مواجهه امولسـیون نسـبت به نور، آلودگی امولسیون با یون‌های فلزی، مواجهه امولسـیون با منابع خارجی تشـعشع، آرتی‌فکت‌های ناشی از فشار در هنگام خشک‌کردن یا جابه‌جایی امولسـیون، کنش متقابل بین امولسـیون با گروه‌های واکنش‌پذیر در نمونه‌های بیولوژیک (کموگرافی مثبت و منفی) و بیش‌ازحد نور دیدن امولسـیون است. باید مقایسه بین تراکم دانه‌ها در اتورادیوگراف‌های نمونه‌های فاقد برچسـب، با آن‌هایی که حاوی منبع آزمایشـی (تجربی) هسـتند، انجام شـود تا پیام (سیگنال) صحیح را تشخیص دهید. پس‌زمینه ممکن است اساساً از نواحی بالا یا پایین نمونه به نواحی دور و همچنین، بین نواحی یک نمونه متفاوت باشـد. کموگرافی، بی‌سـر و صـداترین شکل پس‌زمینه است، زیرا گروه‌های شیمیایی ممکن است خاص یک بافت یا اندام باشند و منجر به تشکیل یک رادیوگراف واقعی مشخص شوند. کنترل کموگرافی مثبت (افزایش پیام‌ها) یا منفی (کم شـدن پیام‌ها) برای اعتبار یک اتورادیوگراف (خصـوصـاً مقاطع بافت‌های منجمد) یک ضـرورت مطلق به‌حسـاب می‌آید و علت این امر قابل‌قبول بودن انواع فاقد پیام اسـت (اوسـتراندر، ۲۰۰۰).

1. Auto- absorption
2. Background

روش‌های اتورادیوگرافیک

یکی از مهم‌ترین ملاحظاتی که در مورد روش‌های اتورادیوگرافیک مورداستفاده مطرح است، سطح سازمانی است که این تحقیقات برای آن صورت می‌گیرد. روش‌های مختلفی برای نمونه‌های درشت‌بینی، در مقایسه با نمونه‌های مربوط به میکروسکوپ نوری (LM) یا میکروسکوپ الکترونی (EM) استفاده می‌شود. ازیک‌طرف، حضور رادیواکتیویته، به‌عنوان یک تصویر قابل‌مشاهده بزرگ، توسط سیاه کردن (لکه‌دار کردن) عمومی یک فیلم تشخیص داده می‌شود، درحالی‌که در مورد روش‌های LM یا EM، پیام (سیگنال) به‌صورت تراکم بیشتری از دانه‌های منفرد نقره شناسایی می‌شود که ممکن است در مقیاس سلولی یا الکترونی مشاهده شود. به لحاظ تفاوت‌هایی که در میزان شفافیت تصاویر وجود دارد، سهولت استفاده از روش‌های ماکروسکوپی نسبت به‌روش‌های LM و EM (که بیشتر مورد درخواست هستند) شدیداً متفاوت است (اوستراندر، ۲۰۰۰).

اتورادیوگرافی درشت بینی (ماکروسکوپی)

اتورادیوگرافی درشت بینی یا تمام بدن، منجر به ثبت انتشار رادیواکتیویته برای مشاهده توسط چشم غیرمسلح می‌شود. این روش به‌عنوان یک فن، به بررسی تمام بافت‌ها، اندام‌ها یا مکان‌ها به‌صورت منصفانه و بدون گرایش می‌پردازد و تصویری کامل از انتشار ترکیبات ارائه می‌دهد. این روش در مورد انواع متنوعی از ماهیان، ازجمله اردک‌ماهی مناطق شمالی، کاد، کفشک، ماهی آبشش آبی، کپور، قنات سرچربی و قزل‌آلای رنگین‌کمان به انجام رسیده است. این روش برای آزمایش انتشار آلاینده‌های محیطی، ایزوتوپ های موجود در طبیعت، داروهای مورداستفاده در آبزی‌پروری، سموم قارچی در فرآورده‌های غذایی و مواد مغذی در ماهیان مورداستفاده قرارگرفته است (اوستراندر، ۲۰۰۰).

اگرچه انواعی از روش‌های مختلف که بیشتر آن‌ها تجربی و آزمایشی بوده‌اند، در مورد ماهیان به‌عنوان گونه‌های موردعلاقه توصیف‌شده‌اند، اما اولین گزارش با سازگاری نزدیک به روش اصلی، توسط اسمیت و همکاران (۱۹۹۶) توصیف شده است. در یک فاصله زمانی صحیح به دنبال تعیین دوز[1]، ماهیان را یا با دوز بالای MS-222 یا بنزوکائین بیهوش کردند. معمولاً این آماده‌سازی‌ها در مورد ماهیان کوچک با محدوده وزنی بین ۷ تا ۱۴۰ گرم به اجرا درآمده است، هرچند که نمونه‌هایی با اندازه ۲۳۵ گرم نیز مورداستفاده قرارگرفته است. کار بر روی ماهیان کوچکتر راحت‌تر است و جابه‌جایی آن‌ها نیز راحت‌تر صورت می‌گیرد، به‌طوری‌که مقاطع حاصل از میکروتوم کاملاً شکننده

1. Dosing

هستند. به‌محض این‌که ماهی کشته شد، باید آن را منجمد کرد. متداول‌ترین رهیافت برای انجماد این است که ماهی را در کربوکسی‌متیل سلولز (۱٪) فرو برده و سپس به‌سرعت ماهی مذکور را در هگزان سرد شده (تا ۸۰- درجه سانتی‌گراد) با استفاده از دی‌اکسید کربن جامد غوطه‌ور کنید. رهیافت دیگر این است که ماهی را جداگانه منجمد کرده و سپس بعداً آن را در ژل کربوکسی‌متیل سلولز فرو برده و منجمد نمایید. انجماد را می‌توان با ایزوپنتان سرد شده با نیتروژن مایع نیز انجام داد (نیتروژن مایع به‌تنهایی باعث ترک خوردن نمونه می‌شود). بعدازاینکه ماهی را فرو برده و منجمد کردید، آن را به استیج[1] استفاده از میکروتوم متصل کنید. ژل کربوکسی متیل سلولز به‌عنوان یک ماده چسبنده مورداستفاده قرار می‌گیرد. این امر با قرار دادن یک لایه بین استیج و ماهی و انجماد صورت می‌گیرد. در این هنگام، لازم است که دما را برای بقیه مدت آزمایش در حدود ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار دهید. دمای دقیق ممکن است در یک محدوده باریکی متغیر باشد تا تهیه مقاطع با کیفیت تسهیل شود. هنگامی‌که نمونه به این مرحله متصل می‌شود، از قطعه بافتی می‌توان توسط انواعی از میکروتوم‌های انجمادی، یا میکروتوم سنگینی که در دمای ۲۰- درجه اتاق نگهداری می‌شود، مقطع تهیه کرد. متداول‌ترین میکروتوم انجمادی که خاص این هدف است میکروتوم انجمادی PMV (PMV 450 Mp, palmisterna Mekaniska Verkstad, Stokholm, Sweden) است. زمانی که قطعه ماهی به میکروتوم وصل شد، از آن با سرعت یکنواخت پایین مقطع تهیه کرده و مقاطع اولیه را کنار بگذارید تا به سطح مقطع موردنظر در داخل نمونه برسید. به‌منظور به دست آوردن مقاطع کامل از نمونه‌های نسبتاً بزرگ، ورقه‌ای از نوار مخصوص قابل‌انعطاف و سرد (No. 821, 3M Co. St. Paul, Mn, USA) مورداستفاده قرار می‌گیرد تا قطعات مربع شکل منجمد به دست آید و سطح آن سریع آماده بریدن شود. هم‌زمان بااینکه از قطعات مقطع تهیه می‌شود (ضخامت مطلوب ۲۰ تا ۴۰ میکرومتر)، نوار در جلوی چاقو به قطعه فشرده می‌شود و این در حالی است که نوار و مقطع متصل به آن به‌آرامی به سمت قسمت شفاف چاقو بلند می‌شود و قطعه در عقب تیغه واقع می‌شود. قبل از مواجهه فیلم با نمونه، مقاطع به‌صورت منجمد بر روی نوار خشک می‌شوند تا از جابه‌جا شدن برچسب ممانعت به عمل آید و کموگرافیک‌های بین نمونه و فیلم به حداقل برسد. انجماد خشک را می‌توان در یک اتاق سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) انجام داد، یا این‌که از روش‌های دیگر مانند کرایواستات[2] استفاده کرد. زمان برای انجماد خشک بین ۲۴ تا ۱۶۸ ساعت متغیر است و بستگی به ضخامت مقاطع و شرایط محلی دارد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

---

1. Stage
2. Cryostat

انواعی از فیلم‌های اشعه ایکس برای اتورادیوگرافی درشت‌بینی مورداستفاده قرارگرفته است. تعیین‌کننده عمده در انتخاب فیلم، نوع ایزوتوپی است که در مطالعه مورداستفاده قرار می‌گیرد. تریتیوم نسبت به فیلم‌های اشعه ایکس معمولی کارآیی بسیار پایینی دارد. دلیل این امر این است که تریتیم به‌ویژه نسبت به جذب خودی[1] در درون طیف حساس است و فیلم‌های معمولی اغلب دارای یک پوشش ضد خراش هستند که تریتیوم را بلوکه می‌کند. فیلم‌های حساس به تریتیم فاقد پوشش ضد خراش و متشکل از بلورهای بزرگ امولسیون در دسترس هستند و در مطالعات مربوط به ماهیان مورداستفاده قرارگرفته‌اند (اوستراندر، ۲۰۰۰). دوتا از این فیلم‌هایی که ازنظر تجاری در دسترس هستند، شامل اولترا فیلم Sweden 3- H (LKb, Bromma) و هایپر فیلم 3-H (Amersham, England) هستند. فیلم‌های اشعه ایکس دیگری که به‌طور متداول با استفاده از کربن ۱۴ (^{14}C) یا گوگرد ۳۵ (^{35}S) در مطالعات مربوط به ماهیان مورداستفاده قرار می‌گیرند، شامل فیلم‌های اشعه ایکس کودیرکس[2] (Kodak)، کوداک تیپ AA و استروکتوریس[3] D7R (Agfa- Geraret, Antwerp, Belgium) هستند. مواجهه فیلم با نمونه به‌صورت مقابله مستقیم، یا با فرمت ساندویچی با کاغذ خشک‌کن[4] یا در یک کاست اشعه ایکس صورت می‌گیرد. در هر یک از این حالت‌ها، مواجهه در یک محفظه با نور کم و معمولاً در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد. بر اساس منابع، دوره مواجهه، با توجه به مقدار مولکول نشان‌دار رادیواکتیو موجود، از ۴ هفته تا یک سال متغیر است. انتخاب زمان بر اساس مدت کافی برای ظهور سیگنال، بدون نوردادن زیاد استوار است. اغلب دوره‌های زمانی مختلف مواجهه، برای فراهم آوردن نتایج صحیح طی یک زمان‌بندی مشخص توسعه‌یافته‌اند. بعد از مواجهه، آن را به‌طور معمولی با ظاهرکننده کداک D -۱۹ بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده ظاهر می‌کنند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

رهیافت‌های فتوگرافیک برای میکروسکوپ نوری

در مطالعات تحقیقاتی متعدد، از روش‌های فتوگرافیک میکروسکوپ نوری، بر اساس امولسیون هسته‌ای و فتوگرافیک در مورد ماهیان استفاده‌شده است. در بین نواحی مختلف و محققان متفاوت، بیشترین موارد استعمال این روش‌ها، در مطالعات دستگاه بینایی ماهیان (اسمیت و همکاران، ۱۹۹۶)، دستگاه غدد درون‌ریز (دیویس و همکاران، ۱۹۹۷) و موارد استعمالی مانند مطالعات تبادل انرژی[5] سلولی (گارسیا و جانسون، ۱۹۷۲) مطالعات مربوط به تقسیم میوز و اسپرماتوژنز و تعیین

1. Self- absorption
2. Kodirex
3. Structurix
4. Blotting paper
5.Turn over

محل سـموم در یک مقیاس سلولی (کلینو و همکاران، ۱۹۹۶) بوده است. از زمانی که این تحقیقات از انواعی از مولکول‌های نشـان‌دار رادیواکتیو، انواع بافت‌ها و امولسـیون‌ها \ فیلم‌ها با خصـوصـیات متفاوت اسـتفاده می‌کنند، انواعی از روش‌ها در منابع ارائه شـده اسـت. هر یک از این تحقیقات، درواقع، هماهنگ‌سـازی روش‌ها برای موارد اسـتعمال خاص اسـت. روش‌های مورداسـتفاده برای عمل‌آوری بافت‌ها جهت تهیه مقطع تا حدی بر اسـاس قابلیت انتشـار مولکول نشـان‌دار شـده با رادیواکتیو موردعلاقه است. مباحث زیر، رهیافت‌های فتوگرافیک عمومی هستند که در مورد ماهیان مورداستفاده قرارگرفته‌اند

عمل‌آوری متداول[1]

پیش‌سـازهای نشـان‌دار رادیواکتیو، مانند اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها را می‌توان برای نشان دادن سـنتز، دسـتگاه حمل‌ونقل و تعیین محل مولکول‌های درشـت زیستی، مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک مورداسـتفاده قرار داد. بسیاری از مولکول‌های درشت سنتز شده از پیش سازهای نشان‌دار رادیواکتیو، توسـط روش‌های تثبیت مربوط به عمل‌آوری بافت‌شـناسـی معمولی باقی می‌مانند، درحالی‌که اغلب پیش سـازهای اتصـال نیافته از دسـت می‌روند؛ بنابراین، پروتئین‌ها و اسـیدهای نوکلئیک نشان‌دار رادیواکتیو، برای فرایندهای اتورادیوگرافیک در دسترس هستند. در بین روش‌های تثبیت موجود، استفاده از محلول تثبیت بوئن، تثبیت بر اساس فرمالدئید (مدینا و همکاران، ۱۹۹۳) یا ترکیب اصـلاح‌شـده‌ای از گلوتارآلدئید (زامیر و ریپس، ۱۹۸۳) به‌طور گسـترده‌ای برای این امر مورداسـتفاده قرارگرفته‌اند. تثبیت‌کننده‌های زنکرز[2] و کارنویز[3] نیز به‌طور موفقیت‌آمیز مورداستفاده قرارگرفته‌اند (وان آیس و همکاران، ۱۹۸۳). بافت‌ها پس از تثبیت، مشـخصاً توسط درجات مختلفی از الکل آب‌گیری می‌شـوند و آن‌ها را در داخل پارافین معمولی فرو می‌برند. اسـتفاده از مواد غوطه ورکننـده دیگر مـانند اپون ۸۱۲[4] و آرالدیت ۵۰۶ [5] و جی‌بی – ۴ (وان آلیس و همکاران، ۱۹۸۳) نیز در ارتباط با گلوتارآلدئید یا کارنویز و روش‌هایی که با شـفافیت بالاتر همراه هستند، مطرح بوده است. پس از غوطه‌ورکردن، از بافت‌ها مقاطعی به ضخامت بین ۱ تا ۱۵ میکرومتر تهیه می‌شود و در بیشـتر مطالعات، از ضخامت بین ۴ تا ۱۲ میکرومتر استفاده می‌شود. مقاطع تهیه‌شده را پس از قرار دادن بر روی لام‌ها و در مورد پارافین، پس از مومزدایی، می‌توان قبل یا پس از اسـتعمال امولسیون

1. Conventional
2. Zenkers
3. Carnoys
4. Epon 812
5. Araldite 506

هسته‌ای یا فتوگرافیک، در معرض رنگ‌آمیزی مضاعف[1] قرار داد. رنگ‌های مضاعف تیپیک که برای قابل‌مشاهده شدن بافت در زمینه با امولسیون استفاده می‌شوند، شامل رنگ‌های زیر هستند: کرسیل ویوله[2] (مدینا و همکاران، ۱۹۹۳)، تولوئیدین بلو (راو و شارما، ۱۹۸۲)، آزوره II متیلن بلو ۱٪ (زامیر و ریپس، ۱۹۸۳)، هماتوکسیلین و ائوزین، گیمسا (گارسیا و جانسون، ۱۹۷۲) و رنگ‌هایی که بر پایه هماسوم ائوزین هستند. لام‌هایی که در داخل امولسیون هسته‌ای فرو برده می‌شوند و این امولسیون نمونه را در زیر نور مطمئن می‌پوشاند، برای امولسیون خاص متناسب هستند. امولسیون‌هایی که به‌طور متداول استفاده می‌شوند، شامل کداک NTB-2 یا NTB-3 و ایلفورد K-5[3] هستند. انواعی از فیلم‌های نواری شکل[4] نیز برای این امر مورداستفاده قرارگرفته‌اند. این فرآورده‌ها از امولسیون متصل به ماتریکس ژلاتین تشکیل می‌شوند. فیلم نواری که به‌صورت وارونه (سر و ته) قرارگرفته و آب‌دهی می‌شود، به همراه نمونه متصل به آن بر روی لام شناور می‌ماند. سپس، امولسیون را قبل از مواجهه، خشک می‌کنند. زمان مواجهه برای همه روش‌ها، اختصاصاً بر اساس موارد استعمال تعیین می‌شود (مشخصاً ۱۴ تا ۳۵ روز) و این امر در جعبه‌های واجد نور کم به همراه مواد جاذب رطوبت در دمای ۴ تا ۵ درجه صورت می‌گیرد. پس از مواجهه، اسلایدها را توسط کداک D-۱۹ یا دکتول[5] ظاهر می‌کنند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

وضعیت دیگر برای عمل‌آوری معمولی، جایی است که ترکیبات نشان‌دار با رادیواکتیو، مواد پیش ساز نیستند، بلکه به‌صورت متصل دیده می‌شوند. در مورد سموم، داروها، هورمون‌ها و مواد ناقل عصبی مختلف ممکن است به این روش عمل شود. بااینکه اتصال کووالان ممکن است به بقای عمل‌آوری معمولی کمک کند، اما اتصالات غیرکووالان به این شکل عمل نمی‌کنند. مواد نشان‌دار ممکن است در اثر تغییرات استریوکمیکال[6] ناشی از تثبیت در محل اتصالات دفع شوند. همچنین، حجم زیاد محلول‌های آبی ممکن است ترکیبات را در مراحل اولیه تثبیت دفع کنند و محل اتصال ممکن است در اثر تثبیت دچار رسوب نشود. همه این موارد کاربرد نیازمند انجام بررسی‌های آزمایشی هستند تا خصوصیات حفظ سیستم موردنظر آزمایش شود. اگر عمل‌آوری‌های معمولی منجر به اتلاف ترکیبات شود، روش‌های مربوط به تهیه مقاطع انجمادی[7] به‌عنوان روش جایگزین را می‌توان استفاده کرد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

---

1. Counterstaining
2. Cresyl Violet
3. Ilford k-5
4. Stripping
5. Dektol developer
6. Stereochemical changes
7. Cryosection

روش‌های مرتبط با مقاطع انجمادی

فرآورده‌های بافت‌شناسی معمولی که برای تهیه آن‌ها از تثبیت‌کننده‌های مایع[1]، مایعات آب‌زدا[2]، محیط‌های غوطه‌ور[3] و مایعات دیگر استفاده می‌شود، ممکن است منبعی برای جابه‌جایی و نشت مواد نشان‌دار رادیواکتیو قابل‌انتشار باشند. به همین خاطر، روش‌های جایگزین مانند تهیه مقاطع انجمادی و انجماد خشک برای حفظ ترکیبات در جای خود مورداستفاده قرارگرفته‌اند. انتخاب هر یک از روش‌ها، ممکن است بر اساس بافت موردمطالعه متفاوت باشد. بافت‌هایی که دارای اجزایی با چگالی متفاوت هستند و میزان آب آن‌ها زیاد است، ممکن است در هنگام انجماد خشک یکپارچگی خود را از دست بدهند و تهیه مقاطع انجمادی و یخ‌زدایی بافت مونته شده برای آن‌ها فوایدی داشته باشد. ممکن است در مورد نمونه‌هایی که دارای اثرات کموگرافیک قابل‌توجه هستند، استفاده از انجماد خشک قبل از استعمال یک امولسیون مفید واقع شود.کارکردهای متنوعی در ارتباط با هورمون‌های قابل‌انتشار[4] و گزنوبیوتیک‌ها[5] توسط مقاطع انجمادی بافت‌های ماهیان صورت گرفته است. بسیاری ازاین‌روش‌ها، سازگاری‌هایی از روش‌های اصلی است (اوستراندر، ۲۰۰۰).

ماهیانی را که در معرض لیگاند نشان‌دار رادیواکتیو در محیط خارج از آزمایشگاه[6] بوده‌اند، کشته و از بافت‌های موردنظر فوراً برش‌های اولیه تهیه کرده و آن‌ها را در داخل یخ سرد به قطعات کوچک تقسیم می‌کنند. کوچک بودن اندازه بافت‌ها، ما را تقریباً از انجماد فوری[7] مطمئن می‌سازد و امکان بالقوه ایجاد آرتی‌فکت‌های بافتی و تحرک ترکیبات را کاهش می‌دهد. بافت‌ها را با غوطه‌ور کردن در انواعی از محیط‌ها که توسط نیتروژن مایع به‌شدت سرد شده‌اند، منجمد می‌کنند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

این محیط‌ها شامل فرئون مایع[8]، ایزو پنتان و پروپان مایع هستند. پس‌از انجماد، بافت‌ها را تا زمان تهیه مقطع و حتی در طول انجام این امر به‌صورت منجمد نگه می‌دارند. بافت‌ها را به یک استیج[9] از یک کرایواستات[10]، با استفاده از محیط‌هایی مانند OTC (El khart, IN miles, Inc.) متصل می‌سازند و معمولاً آن‌ها را بریده و مقاطعی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه می‌کنند.

---

1. Liquid fixative
2. Dehydration fluids
3. Embedding media
4. Diffusible hormones
5. Xenobiotics
6. In vivo
7. Instantaneous freezing
8. Liquid freon
9. Stage
10. Cryostat

مقاطع منجمد درحالی‌که بر روی لام‌های پوشیده شده با امولسیون (کداک NTB-2 یا NTB-3, New Haven) در زیر نور قرارگرفته‌اند، یخ‌زدایی می‌شوند، یا اینکه اول بر روی لام‌ها مونته می‌گردند و سپس آن‌ها را توسط امولسیون می‌پوشانند. این مقاطع دارای حداقل مقدار مایعات قابل‌انتشاری هستند که ممکن است به‌سرعت در خلال خشک‌کردن و تثبیت مقاطع بر روی لام از دست بروند.

ازآنجاکه کنش متقابل بالقوه بافت‌ها با امولسیون در مورد مقاط انجمادی بیش از رهیافت‌های دیگر است، لذا تهیه لام‌های شاهد برای کموگرافی مثبت و منفی و همچنین، پس‌زمینه[1]، نیازی ضروری محسوب می‌شود. لام ها را باید برای فواصل زمانی صحیح مواجهه، در دمای ۴ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد در جعبه‌های ضد نور واجد مواد جاذب رطوبت ذخیره کرد. فواصل زمانی مواجهه در مطالعات به چاپ رسیده، از ۱۴ تا ۶۰۰ روز متغیر است. بعد از این مواجهه، لام ها را در دمای اتاق قرار می‌دهند تا گرم شود و سپس، با استفاده از روش‌های معمولی، به کمک فرآورده‌هایی مانند ظاهر کننده کداکD-19 و تثبیت‌کننده کداک ظاهر می‌کنند. ازآنجاکه مقاطع درواقع، مونته‌های[2] یخ‌زدایی شده هستند، باید دقت کرد تا از کنده شدن مقاطع از روی لام در خلال مراحل ظاهرسازی جلوگیری شود. پس از ظاهر کردن، لام‌ها را در زیر جریان آب به‌آرامی شسته و توسط جریان هوا خشک می‌کنند. بافت‌ها را می‌توان با متیل گرین پیرونین[3]، کرزیل ویولت (دیویس و همکاران، ۱۹۷۷) یا متیلن بلو- بازیک فاچسین[4] رنگ‌آمیزی کرد تا جزئیات سلول‌ها و اجزای سلولی، بدون تحت‌الشعاع قرار گرفتن پیام‌های اتورادیوگرافیک قابل‌مشاهده شوند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

1. Background
2. Thaw mounted
3. Methyl green pyronin
4. Methylene blue-basic fuschin

تصـــویر ۱۰-۲: مقطع انجمادی ذوب‌شـــده و مونته شـــده چین مخاطی روده‌ای گربه‌ماهی که در مواجهه با [3H] بنزوپیرن قرارگرفته است. سیگنال سیاه، تصویر نقره‌ای حاصل از مواجهه و توسعه امولسیون NTB-2 است. رنگ‌آمیزی مضاعف با متیل گرین پیرونین (40x) (اقتباس از اوستراندر، ۲۰۰۰).

کاربردهای دیگر رادیوگرافی با مقاطع انجمادی، شـامل رهیافت آزمایشـگاهی[1] برای اسـتفاده از ترکیبات نشـان‌دار رادیواکتیو بوده اسـت. اسـتفاده ازاین‌روش‌ها در ماهیان تا حد زیاد، به آزمایش تعیین محل گیرنده‌ها یا ناقلین عصـبی در مغز محدودشـده اسـت (اسمیت و همکاران، ۱۹۹۶). در این روش‌هـا، مغز را خارج کرده و فوراً منجمد می‌کنند. پس‌از انجماد، از بافت آن مقاطعی انجمادی تهیه می‌کنند که ضخامت آن‌ها بین ۱۰ تا ۳۲ میکرومتر است. در این مرحله، مقاطع را یا در حالتی که بر روی لام‌های پوشیده شده توسط ژلاتین مونته کرده‌اند، یخ‌زدایی می‌کنند و برای استفاده آتی در دمای ۲۰- درجه ذخیره می‌نمایند، یا اینکه توسـط جریان هوا خشـک می‌کنند. معمولاً در مورد مقـاطع منجمـد، پس‌از انجمـاد زدایی، انکوبـاســـیون بافت‌ها را با بافر واجد تریس[2]، مقدمتاً انجام می‌دهند و توسـط جریان هوا خشـک می نمایند، یا اینکه اول مقاطع را خشـک می‌کنند و سـپس گرمخـانـه گـذاری مقـدمـاتی صـــورت می‌گیرد. معمولاً پس‌ازآنکوباســـیون مقدماتی، مقاطع را با

1. In vitro
2. Tris –based buffer

رادیولیگاند موردنظر، در داخل بافر تریس یا فسفات قرار می‌دهند. پس‌ازآنکوباسیون با رادیو لیگاند برای فاصله زمانی خاص، لام‌ها را به وفور در بافر یخ سرد می‌شویند و با آب مقطر شستشو می‌دهند و درنهایت با جریان هوا خشک می‌کنند. در این مرحله، می‌توان از رهیافت‌های مختلفی برای روش اتورادیوگرافیک استفاده کرد. مقاطع را می‌توان در معرض اولترا فیلم (LKB Inc. Gaithersburg, md) یا معادل آن یا فیلم کداک x-Omat AR (اسمیت و همکاران، ۱۹۹۶) قرار داد، یا اینکه در امولسیون مایع کداک NTB-2 فرو برد (فان و مالر، ۱۹۸۳). پس از ظاهر کردن، می‌توان مقاطع را با کرزیل ویولت، لوکسول بلو[1]، تولوئیدین بلو یا رنگ‌های مشابه دیگر رنگ‌آمیزی مضاعف[2] کرد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

رهیافت‌های اتورادیو گرافیک برای میکروسکوپ الکترونی

انواعی از رهیافت‌های رادیوگرافیک با شفافیت بالا، در مطالعات تجربی مربوط به زیست‌شناسی ماهیان استفاده‌شده است (زامیر و رپیس، ۱۹۸۳). روش‌های رادیوگرافیک برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی، نیاز به‌روش‌های خاص در خصوص جابه‌جا کردن بافت‌ها، امولسیون‌ها و رنگ‌آمیزی دارد. بیشتر مطالعات اخیر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، با اصلاحات یا سازگاری‌هایی که در روش‌های قدیمی‌تر انجام‌شده، به اجرا درآمده است. منصفانه است اگر بگوییم که نمی‌توان به توان بالقوه کامل ظرفیت‌های شفافیت EM با استفاده از رادیوگرافی پی برد. شواهد این امر در محدودیتهای که در خصوص حساسیت امولسیون و اندازه دانه‌های نقره وجود دارد، قابل‌مشاهده است (اوستراندر، ۲۰۰۰).

آماده کردن بافت، بر اساس روش‌های مربوط به میکروسکوپ الکترونی صورت می‌گیرد. در یکی از روش‌های تثبیت که برای ماهیان مورداستفاده قرار می‌گیرد، محلول رینگر ماهیان تلئوست با ۲٪ گلوتارآلدئید و ۱٪ پارافرمالدئید غنی‌سازی شده و برای نفوذ اولیه به مدت ۵ دقیقه استفاده می‌شود. سپس بافت‌ها به محلول تثبیت‌کننده اسید تانیک سرد یخی (۲۷۵ میلی مول کلرید سدیم، ۷/۶ میلی مول کلرید پتاسیم، ۴۱۵ میلی مول اوره، دو میلی مول فسفات سدیم، ۲٪ گلوتارآلدئید، ۰/۳٪ اسید تانیک با pH = ۷/۱) به مدت ۴ تا ۶ ساعت منتقل می‌شوند. پس از یک شب شستشوی بافت‌ها توسط محلول رینگر، مجدداً آن‌ها را به مدت ۶-۹ ساعت با محلول ۰/۲٪ اوسمیوم تتراکسید تثبیت می‌کنند. سپس بافت‌ها را با ۱۰۰ میلی مول کاکودیلات سدیم با ۷/۰ =pH شستشو می‌دهند و با ۱٪ اسید تانیک در بافر کاکودیلات عمل‌آوری می‌نمایند و دو بار با بافر

1. Luxol blue
2. Counterstained

کاکودیلات شستشه و درنهایت با آب می شویند. سپس بافت‌ها را در درجات مختلف الکل برای آب‌گیری قرار دهند و در محیط Epon 812 فرو می‌برند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

فرآورده‌های اتورادیوگراف برای میکروسکوپ الکترونی، نیازمند ملاحظات خاص ازنظر انتخاب امولسیون و استفاده از آن است. امولسیون‌هایی که بیشترین حساسیت و شفافیت را دارند، باید انتخاب شوند تا استفاده از میکروسکوپ الکترونی را به شایسته‌ترین وجه تکمیل کنند. عمومی‌ترین امولسیون برای استفاده در مورد ماهیان، Ilford L-4 است (زامیر و ریپس، ۱۹۸۳). نمونه‌ها را باید برای مشاهده بر روی یک میله (گرید[1]) مونته کرد. دو رهیافت عمومی برای مطابقت با استفاده از یک گرید در اتورادیوگرافی توسعه‌یافته است. یا نمونه توسط امولسیون در یک مکان پوشانیده می‌شود و سپس به گرید منتقل می‌گردد، یا اینکه گرید را به طرق مختلف با امولسیون می‌پوشانند. هر دو روش، دارای فواید و معایبی هستند. بااینکه روش سوبسترای پهن که نمونه را بر روی یک لام میکروسکوپی از طریق تکنیک فروبردن[2] می‌پوشانند، امکان ضخامت یک شکل امولسیون و تکنیک بهتر اتورادیوگراف را فراهم می‌کند، اما خارج کردن یک اتورادیوگراف کامل به یک گرید میکروسکوپ الکترونی برای مشاهده ممکن است با دشواری همراه باشد. از طرف دیگر، در روش لوپ[3]، امولسیون را بر روی نمونه‌ای که بر روی گرید از طریق یک لوپ مونته شده است، قرار می‌دهند. در این روش، هیچ انتقالی برای مشاهده ضرورت ندارد، اما ضخامت لایه ممکن است متغیر باشد. هر دو روش برای استفاده در ماهیان گزارش شده‌اند(اوستراندر، ۲۰۰۰).

در مورد روش لوپ، مقاطع بسیار نازک (کمتر از یک میکرومتر) را که بر روی یک چاقوی الماس یا شیشه بریده‌شده‌اند، بر روی یک گرید که توسط یک فیلم کولودیون[4] پوشیده شده و بر روی آن یک لایه تبخیری از کربن خوابانیده شده است، مونته می‌کنند. بعد از خشک‌کردن، گرید را به یک لام میکروسکوپی می‌چسبانند. یک سیم پلاتینی را به داخل امولسیون با قوام مناسب وارد می‌کند تا لوپ را پر کند. با تماس گریدها، امولسیون لوپ را سبکتر و کوچکتر می‌کند و گرید را می‌پوشاند. نمونه‌هایی را که توسط امولسیون پوشیده می‌شوند، در طول شب رطوبت گیری می‌کنند. سپس، لام‌ها را در جعبه‌های ضد نور به همراه مواد جاذب رطوبت قرار می‌دهند و قبل از پوشاندن با نیتروژن، آرگون یا دی‌اکسید کربن پاکسازی و تصفیه می‌کنند. جعبه‌ها را برای دوره مواجهه در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهند. ظهور امولسیون در تمام موارد، اغلب با

1. Grid
2. Dipping
3. Loop
4. Collodion

استفاده از فنیدون [۱] (زامیر و ریپس، ۱۹۸۳) یا میکرودول X [۲] صورت می‌گیرد. اتورادیوگراف‌ها را پس از ظهور، یا یورانیل استات[۳] ۲٪ یا سیترات سرب رنگ می‌کنند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

مقدار سنجی

رهیافت‌های مقداری نسبت به اتورادیوگرافی، از اندازه‌گیری‌های نسبی تا مطلق متغیر است. دقت در هر مرحله از روش‌های اتورادیوگرافیک، برای تولید نتایج معنی‌دار ضروری است. این امر به‌ویژه در مورد مقایسه اطلاعات جمع‌آوری شده یا پردازش شده در زمان‌های مختلف یا شرایط متفاوت صادق است. عواملی مانند ضخامت و قوام مقاطع، ضخامت امولسیون، خشکی امولسیون، کموگرافی، زمان‌های مواجهه و استفاده از ظاهر کننده می‌توانند در این قابلیت تغییر مشارکت داشته باشند. به لحاظ ماهیت محیط تثبیت، ارتباط بین دوز تشعشع و ظهور دانه‌های نقره، در سرتاسر یک دوره مواجهه طولانی، خطی نیست. هنگامی‌که ۱۰٪ امولسیون یا کمتر ظاهر می‌شود، ارتباط، حالت پیشرونده خطی پیدا می‌کند. هرچه میزان بلورهایی که ظاهر می‌شوند، افزایش می‌یابد، برخوردهای متعدد بعدی با مدل خطی ثبت نمی‌شوند. به‌طور مشابه، هرچه میزان ثبت (رکورد) تداوم می‌یابد، دانه‌های مجاور بر روی‌هم می‌افتند[۴] و حتی به هم جوش می‌خورند و ارزیابی و مقدار سنجی هر یک از موارد را دشوار می‌کنند. در داخل یک نمونه با دوره مواجهه خاص، نواحی معین ممکن است تابع تجزیه‌وتحلیل‌های کمی (مقداری) باشند، درصورتی‌که نواحی دیگر ممکن است شرایط کمی مطلوب کمتری داشته باشند و علت آن، نور دیدن بیش‌ازحد باشد. انجام کنترل برای پس‌زمینه، کموگرافی منفی و مثبت، کم‌رنگ شدن ناملموس و استانداردهای مرجع داخلی، برای ارزیابی کمی (مقداری) دقیق لازم هستند (اوستراندر، ۲۰۰۰).

---

1. Phenidon
2. Microdol X
3. Uranyl acetate 2%
4. Overlap

تصویر ۱۰-۳: مقاطع انجمادی مونته شده و انجماد زدایی شده چین مخاطی روده‌ای گربه‌ماهی که در معرض [3H] تایمیدین در تجارب چرخش انرژی سلول قرارگرفته‌اند. تراکم نقاط سیاه در سلول‌های منفرد بیانگر سیگنال اتورادیوگرافیک است. رنگ مضاعف با متیل گرین پیرونین (40x) (اقتباس از اوستراندر، ۲۰۰۰).

باوجوداین، آزمایش‌های کمی (مقداری) ممکن است به همان سادگی باشند که حضور یا عدم حضور سیگنال‌های رادیواکتیو یا مراحل پله ای تعیین کمی (مقداری) منابع رادیو اکتیو می‌باشد. مطالعات انجام‌شده بر روی کینتیک تغییرات سلولی با ۳H (تایمیدین)، استفاده از حضور یا عدم حضور دانه‌های نقره ظاهرشده را در داخل سلول‌ها امکان‌پذیر می‌سازد تا سلول‌هایی را که در حال تزاید هستند، تعیین مقدار کنیم. در داخل این زمینه، تعیین مقدار را می‌توان با کنترل و در نظر نگرفتن زمینه اثبات کرد که ممکن است بد تفسیر شود و به‌عنوان وفور تغییرات سلولی در نظر گرفته شود. از طرف دیگر، اتورادیوگرافی از کل بدن ماهیان باعث شده است که استفاده از تشعشع در مقیاس‌های خاکستری استاندارد قرار گیرد. این مقیاس ها یک شاخص تصویری نسبی را برای رادیواکتیویته در اندام‌های منفرد فراهم کرده است. مقایسه‌های نسبی دیگر با فیلم‌های اتورادیوگرافیک کل بدن ماهی، از ارزیابی‌های چگالی سنجی استفاده کرده‌اند تا تفاوت در پیام

(سیگنال) اندام‌ها را مقایسه کنند و این امر با استفاده از خون به‌عنوان بافت رفرنس صورت می‌گیرد (اوستراندر، ۲۰۰۰).

علاوه بر این روش‌ها، مقدار سنجی از طریق شمارش دانه‌های نقره یا ناحیه‌ای که داخل آن را دانه‌های نقره اشغال کرده‌اند، انجام می‌شود. شمارش ممکن است به‌صورت دستی با استفاده از گریدها و تفریق از طریق چشم صورت گیرد، یا اینکه از طریق روش‌های تجزیه‌وتحلیل تصویری انجام می‌شود. یکی از رهیافتها برای تجزیه‌وتحلیل تصویری به کمک رایانه و تعیین مقدار نسبی با استفاده از نرم‌افزار image- 1/At, Noran version 4.0 A انجام‌شده است. سیگنال‌های موردنظر با استفاده از محدوده آستانه در خصوصیات کنتراست در داخل برنامه تجزیه‌وتحلیل برجسته می‌شود. سپس ذرات دانه نقره از ساختار بافت و سیگنال‌های تلاقی کننده با استفاده از تفکیک‌کننده‌های اندازه و شکل سیگنال تفکیک می‌شوند. کالیبراسیون ناحیه داخلی نیز نصب می‌شود تا مقدار سیگنال‌های نقره به ازای واحد سطح (ناحیه) شمارش شوند. هنگامی‌که تصاویر میکروسکوپی تقویت شده بر روی مونیتور مشاهده شوند، نواحی لازم برای شمارش به‌صورت الکترونیکی خلاصه می‌شوند. کل ناحیه (میکرومتر مربع) که توسط دانه‌های نقره در هر ناحیه از بافت موردنظر اشغال می‌شوند، با استفاده از شمارش ذرات دانه نقره در داخل ناحیه مشخص‌شده محاسبه می‌شوند. چگالی سیگنال‌ها با استفاده از تقسیم میزان ناحیه هدف سیگنال به ناحیه منطقه‌ای به دست می‌آید (اوستراندر، ۲۰۰۰).

تصـویر ۱۰-۴: اتورادیوگراف تصـاویر بهبود یافته رایانه‌ای مقاطع انجمادی مونته شـده و انجماد زدایی شده چین‌های مخاطی روده گربه‌ماهی که در معرض [3H] بنزوپیرن قرارگرفته اسـت. رنگ زرد، سیگنال تعیین مقدار شـده در منطقه انتخابی اسـت (که توسط رنگ قرمز دور آن مشخص‌شده است)که توسط پارامترهای اندازه، شکل، کنتراست و آستانه برنامه ریزی شده تعیین می‌شود (اقتباس از اوستراندر، ۲۰۰۰).

ارزیابی کمی در سرتاسر طول یک تحقیق، چالش های متعددی را ایجاد می‌کند که حداقل آن، پرسـش در خصـوص ظهور سـیگنال قابل‌اندازه‌گیری اسـت. ظهور سـیگنال قابل‌اندازه‌گیری و قابل‌مقایسـه در همه نمونه‌ها در سـرتاسـر طول دوره ضـروری است. زمان‌های نمونه‌برداری اولیه با میزان تشـعشـع بالاتر، ممکن اسـت باعث نوردیدن بیش‌ازحد سـیگنال شـود، درحالی‌که زمان‌های بعدی با میزان تشـعشـع کمتر ممکن اسـت نوردیدن ناکافی[1] را نشـان دهد. یک رهیافت تجربی، انتخاب زمان مواجهه ای اسـت که ظهور دانه‌ها را با الگوی خطی برای ناحیه موردنظر در سـرتاسـر طول دوره تأمین کند. در سـرتاسـر دوره اسـتفاده از زمان‌های مواجهه متعدد و برای همه نمونه‌ها، محقق می‌توانـد زمـان مواجهـه اتورادیوگرافیک مناسـب را انتخاب کند که امکان مقدار سـنجی

1. Under - exposure

مقـایســـه‌ای را برای همه نمونه‌ها فراهم می‌کند. کنترل‌ها و اســـتانداردهای شـــدید برای این نوع تجزیه‌وتحلیل لازم استذ (اوستراندر، ۲۰۰۰).

تصویر ۱۰-۵: تصویر رادیوگرافیک ساده در ماهی گورامی لب کلفت نشان‌دهنده وجود یک توده شکمی (نوک پیکان) اســـت. نواحی رادیولوســـنت (کدر) اندام لابیرنت مجاری نیمدایره (L) و یک اندام تنفس اضـــافی و کیسه شنا (S) است (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۶: تصویر جانبی از تجویز یک ماده رنگی خوراکی (سولفات باریم) به ماهی گورامی لب کلفت. توجه داشته باشید که رنگ نشان می‌دهد توده با دستگاه گوارش ازتباطی ندارد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصـــویر ۱۰-۷: تصـــاویر فتوگرافیک و رادیوگرافیک از ماهی کرومیس نوتاتا. A: ماهی خام. نوک پیکان باله مخرجی را نشـــان می‌دهد. B: یافته رادیوگرافیک از ماهی. پتریگیوفور عمیقاً در بدن فرورفته اســـت. توجه داشـــته باشـــید که کمپلکس خار باله – پتریگیوفور یکی از کدرترین بخش‌ها در اسکلت ماهی است. خارهای باله شـــکمی (پیکان) نیز رادیو اوپک (کدر) هستند زیرا بر روی یکدیگر می خوابند. C: فتوگرافی بزرگ‌شده از این کمپلکس، ســـاختاری که از اتحاد یک پتریگیوفور و دو خار باله مخرجی که با یک مفصـــل شـــده‌اند، حاصل شده است. خار دوم باله مخرجی بزرگتر از خار اول است. (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۸: تصویر شکمی از یک سپر ماهی که ستون فقرات و ساختار اسکلتی دم را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۹: تصویر پشتی ازدو گربه‌ماهی که ستون فقرات و ساختار اسکلتی دم را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۰: تصویر پشتی ازیک پروانه ماهی (کتودونتیده) که ستون فقرات و ساختار پوزه را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۱: تصویر پشتی ازیک مارماهی که ستون فقرات و ساختار اسکلتی دم را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۲: تصویر شکمی از یک سپر ماهی که ساختار آبشش و ساختار اسکلتی دم را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۳: تصویر جانبی ازیک ماهی شش دارکه ستون فقرات و ساختار اسکلتی دم را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۴: تصویر جانبی ازیک ماهی اسبک دریا که ستون فقرات و ساختار اسکلتی دم را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۵: تصویر شکمی از یک اره ماهی که ساختار اره و دندانه‌های آن را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۶: تصویر جانبی از یک تک خارماهی که ساختار خار باله پشتی و تضاریس آن را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۷: تصویر جانبی از یک صیاد ماهی که ساختار آرواره و اسکلت و باله‌ها را نشان می‌دهد (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

تصویر ۱۰-۱۸: تصاویر ناهنجار (بالایی) و سالم (پایینی) ماهی آزاد اقیانوس اطلس (چپ) و تصاویر رادیوگرافی مربوطه (راست) (اقتباس از روبرتس ۲۰۱۲).

فصل یازدهم

فنون مولکولی در آزمایشگاه آبزیان

مقدمه

آیا تاکنون کسی را دیده‌اید که دقیقاً شبیه شما باشد و تون صدایش شبیه شما باشد؟ آیا تاکنون تصویر عین خود را دیده اید؟ شما نمی‌توانید چنین چیزی را ببینید مگر این‌که یکی از دوقلوهای همسان (مونوزیگوتیک) باشید (که از تقسیم یک تخم تولیدشده است). این امر به‌طور متداول پذیرفته شده است که همه انسان‌ها با هم متفاوت هستند- در حقیقت همه انسان‌هایی که تاکنون وجود داشته‌اند، منحصربه‌فرد بوده و از همه انسان‌های زنده دیگر که تاکنون زندگی کرده‌اند، تفاوت دارند. اگر این امر در مورد انسان (هوموساپینس) صدق کند، آیا ممکن است در مورد موجودات دیگری که تولیدمثل جنسی دارند، هم صادق باشد؟ پاسخ مثبت است. هر ماهی آزاد (سالمو سالار) از دیگر ماهیان آزادی که تاکنون زیسته‌اند، متفاوت است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

هر نرمتن دوکفه ای (*Mytilus edulis*) از دیگر نرمتنانی که تاکنون زیسته اند، متفاوت است. منحصربه‌فرد بودن هر یک از اعضای یک گونه، ماحصل دو عامل است که یکی از آن‌ها دی اکسی ریبوزنوکلئیک اسید (DNA) و دیگری تولیدمثل جنسی است. این دو عامل، تنوع درون گونه‌ای را تولید و حفظ می‌کنند و درک این امر، برای توانایی انسان جهت بهره برداری پایدار گونه‌های گیاهی و جانوری اساسی است. بدون جنسیت، روند تولیدمثل می‌تواند افرادی را تولید کند که ازنظر ژنتیکی یکسان هستند؛ زیرا در گیاهان که تولیدمثل غیر جنسی (نباتی) امری متداول است، روش‌های زیست فناورانه ای وجود دارد که می‌تواند کلون (clone) تولید کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

دی اکسی ریبوز نوکلئیک اسید

کشف واتسون و کریک درباره ساختار DNA در ۱۹۵۳ راهنمایی است برای پی بردن به این نکته که چگونه اطلاعات ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر انتقال می‌یابد و اینکه چگونه این اطلاعات، رمزی برای تولید اسیدهای آمینه پروتئین‌ها می‌شود. نیم قرن بعد از آن، عرصه های زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک به‌طور اجتناب‌ناپذیری به یکدیگر پیوند خورده اند و پیشرفت‌هایی کهبه‌ویژه طی ۲۵ سال گذشته روی داده، امکانات بالقوه ای را در خصوص زیست‌فناوری و ژنومیک باز کرده است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ساختار DNA، آن را قادر می‌سازد تا اطلاعات را برای همان سلولی که می‌خواهد تولیدمثل کند، انتقال دهد. DNA مولکولی پلیمریک است. بدین معنی که از زنجیره‌ای از تحت واحدها تشکیل‌شده که دربرگیرنده زنجیره هایی از مونومرهای نوکلئوتیدی هستند. هر نوکلئوتید حاوی یک باز به همراه یک قند (دی اکسی ریبوز) و یک گروه فسفات است (تصویر ۱۱-۱). چهار نوع باز

وجود دارد: آدنین، گوانین، تایمین و سایتوزین و آن‌ها را معمولاً به‌طور خلاصه با اولین حرفشان A، G، T و C می‌نامند. دو تا از این بازها، A و G ساختار زوج - حلقه‌ای دارند و به‌عنوان پورین شناخته می‌شوند. دو باز دیگر، T و C، پیریمیدین هستند و یک حلقه کربن – نیتروژن دارند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۱: ساختار DNA . هر نوکلئوتید حاوی یک قند، یک فسفات و یک باز است. نوکلئوتیدها توسط یک باند فسفودی استر بین کربن ۵ یک قند ریبوز و کربن ۳ قند دیگر به هم متصل می‌شوند؛ بنابراین، زنجیره نوکلئوتید ها دارای یک پایانه ۳ و یک پایانه ۵ است (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۲: ساختار DNA . دو رشته پلی نوکلئوتیدی به شکل یک مارپیچ مضاعف به دور یکدیگر می پیچند. جفت شدن مکمل باز ها بین دو رشته به این شکل روی می‌دهد که گوانین (G) همیشه با سایتوزین (C) و آدنین (A) با تایمین (T) متصل می‌شود (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

هر نوکلئوتید، واحدی اســـت منفرد که با نوکلئوتیدهای مجاور خود به‌صـــورت خطی متصـــل می‌شـــود و یک زنجیره پلی نوکلئوتیدی تشـــکیل می‌دهد. اتم های کربن خاص در ســـاختار پنج - کربنه دی اکســـی ریبوز را با شـــماره هایی از ۱ (اولین کربن مشـــخص) تا ۵ اطلاق می‌کنند. اتصال بین نوکلئوتیدها زمانی شکل می‌گیرد که کربن ۵ هر نوکلئوتید به کربن ۳ نوکلئوتید بعدی از طریق باند فسـفو دی اسـتر اتصال می‌یابد (تصویر ۱۱-۱). توالی چهار باز در یک زنجیره پلی نوکلئوتیدی، به‌عنوان یک رمز برای اطلاعات ژنتیکی عمل می‌کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

یک مولکول DNA کامل، درواقع شـامل دو زنجیره یا دو رشـته پلی نوکلئوتیدی اسـت که به دور یکدیگر پیچ خورده اند و یک مارپیچ مضاعف را تشکیل داده‌اند. اسکلت قند – فسفات در سمت بیرونی مولکول قرارگرفته‌اند، درحالی‌که جهت باز ها به سمت داخل ساختار است؛ دو رشته مولکول در خلاف جهت یکدیگر پیش می‌روند (تصویر ۱۱-۲).

زیبـایی عملکرد مولکول DNA، نتیجه جفت بودن بازهای مکمل اســـت؛ به‌نحوی‌که در ناحیه داخلی مولکول، G تنها می‌تواند به C متصـــل شـــود و A نیز تنها به T اتصـــال می‌یابد. این بدین معنی اسـت که این دو رشته مکمل یکدیگر هستند، به‌طوری‌که توالی باز یک رشته، توالی باز رشته دیگر را قابل پیش‌بینی و تعیین می‌کند. ازآنجاکه یک رشـته، رشته دیگر را قابل پیش‌بینی می‌کند، از این امر می‌توان استفاده کرد تا توالی دیگر رونویسی شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

روند رونویســـی، مولکول‌های دختری ایجاد می‌کند که هرکدام یک رشـــته مادری و یک رشـــته کپی دارند. به این امر رونویسی نیمه - محفوظ می‌گویند. رونویسی از DNA در هر زمانی که یک سـلول تقسـیم می‌شـود، روی می‌دهد. کل DNA سـلول به‌طور فزاینده باز می‌شـود و یک ناحیه کوتاه تک - رشـته‌ای را نمایان می‌کند که می‌تواند توسـط آنزیم‌های DNA پلیمراز کپی شـود. باز شدن، از پایانه‌های مولکول آغاز نمی‌شود، بلکه این آغاز از نقاطی صورت می‌گیرد که به آن نواحی رونویســـی می‌گویند. ســـپس باز شـــدن، از این نقاط در امتداد DNA ادامه می‌یابد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

رشـــته‌های جدید DNA که در خلال رونویســـی ساخته می‌شوند، همیشه در جهت کربن ۵ به ۳ تولید می‌گردند. این بدین معنی اسـت که هرگاه رشـته‌های اصلی از هم جدا می‌شوند، یک رشته جدید می‌تواند به‌طور مداوم در مقابل رشـته کپی خود (رشته مقدم) تولید شود. این در حالی است که رشـــته دیگر به ناچار متناوباً در اندازه‌های کوتاه تولید می‌شـــود، به‌نحوی‌که رشـــته کپی (رشـــته موخر) به‌اندازه کافی در دسترس قرار می‌گیرد (تصویر ۱۱- ۳).

با در نظر گرفتن تعداد زیاد بازها و اطلاعات رمزگذاری شـده در DNA یک سـلول، لازم اسـت که رونویســـی بســـیار دقیق صـــورت گیرد. حتی وقوع چند اشـــتباه کوچک در کپی‌برداری، منجر به اتلاف اطلاعات ژنتیکی مهم در خلال تعدادی از تقســـیمات ســـلولی می‌شـــود. باوجوداین، در خلال

رونـد رونویســـی، فعالیت‌های تصـــحیح کننده مختلفی روی می‌دهد و تقریباً همه خطاها با حذف بازهای اشتباه و ورود بازهای صحیح اصلاح می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـویر ۱۱- ۳: رونویسـی از DNA . هنگامی‌که مارپیچ مضـاعف DNA باز می‌شـود، DNA جدید به‌طور مداوم در جهت ۵ به ۳ بر روی رشـــته مقدم تولید می‌شـــود و همچنین در جهت ۵ به ۳ در راســـتای بندها (قطعات اوکازاکی) بر روی رشته‌های موخر تولید می‌شود (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

به‌رغم روندهای تصـحیح کننده، وقوع چند اشـتباه کوچک در هنگام کپی شدن تعداد زیادی از بازها، امری اجتناب‌ناپذیر اسـت و تخمین زده شده که میزان آن در حد ورود یک باز اشتباه به ازای هر ســه میلیارد اســت. به این خطاها، جهش‌های نقطه‌ای گفته می‌شـــود و همچنین، این جهش‌ها توســط مواد شـــیمیایی و رادیواکتیو به میزان زیاد تحریک می‌شـــود. اگرچه تعداد این موارد در هر رخداد رونویسـی ژنوم بسـیار محدود اسـت، باوجوداین، آن‌ها منشـأ اساسی تفاوت‌هایی هستند که ســـوخت فرآیند تکامل را تأمین می‌کنند. بدون این خطاها، هیچ تغییر ژنتیکی در ســـطح DNA اتفاق نمی‌افتد و این رخداد، مانع هرگونه ســـازگاری موجود زنده با محیط در حال تغییر می‌شـــود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

اما اگر این خطاها بسـیار زیاد شـود، سـلول‌های دختری اغلب نمی‌توانند قابلیت زیسـت داشته باشـند و موجود زنده‌ای که این DNA را حمل می‌کند، خیلی زود منقرض می‌شـود. توالی‌های در حال فعالیت، یعنی DNA رمزدار تنها نماینده بخش کوچکی از کل ژنوم هستند. برای مثال، میزان آن در انسان حدود ۳٪ است. بقیه بخشی را تشکیل می‌دهند که اصطلاحاً به آن‌ها « DNA بنجل» می‌گویند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

آیا اینکه همه این‌ها واقعاً بنجل هستند یا نه، مشخص نیست و فرضیه های متعددی پیشنهاد شده است که توضیح می‌دهند چطور ممکن است DNA بنجل، خصوصاً ازنظر تنظیم بیان ژن، به فعالیت وادار شود. بعضی از این DNA های بنجل شامل ژن‌های کاذب هستند؛ ژن‌هایی که به هر دلیلی غیرفعال هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

هنوز بخش‌های دیگری از DNA فاقد رمز، شامل توالی‌های تکراری خوشه ای پراکنده با طول‌های متفاوت هستند که از یک زوج باز (bp) تا هزاران باز (کیلوباز، kb) متغیر بوده و به‌عنوان عناصر تکراری شناخته می‌شوند. DNA بنجل همچنین شامل ترانسپوزون هایی (ترانهشگرهایی) است که پروتئین‌ها را رمزگذاری می‌کنند و ارزش آن‌ها برای ژنوم میزبان نامشخص است. توالی‌های تکراری پراکنده به‌صورت کپی‌هایی هستند که در سرتاسر ژنوم گسترش‌یافته‌اند و آن‌ها را می‌توان به‌عنوان عناصر هسته‌ای پراکنده بلند و کوتاه، تکرارهایی با پایانه طویل و ترانسپوزون های DNA طبقه‌بندی کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰) .

هنگامی‌که توالی‌های تکراری خوشه‌ای در کپی‌های پشت سر هم دیده می‌شوند، این توالی ها بسته به طول واحد تکرار شده به ماهواره ها، کوچک ماهواره ها و ریزماهواره ها دسته‌بندی می‌شوند. آن‌ها به نشانگرهای ژنتیکی مفیدی تبدیل می‌شوند که در فصول بعد توضیح داده خواهند شد. در بین این نشانگرها، این عناصر تکراری تا ۴۰٪ ژنوم را می‌توانند تشکیل دهند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۴:ساختار عمومی ژن. یک تنه (قطعه) باز شده، از یک ژن با یک رمز آغازگر در خلاف جهت شروع می‌شود و با یک رمز اختتامی در جهت جریان خاتمه می‌یابد. بسیاری از ژن‌ها یک منطقه یا مناطقی فاقد رمزدارند که در بین آن‌ها واقع‌شده‌اند. این اینترون ها در خلال رونوشت برداری در خارج از محلاتصال mRNA اتصال دارند؛ بنابراین آن‌ها فقط رمزهایی را در درون اکسون ها به اسیدهای آمینه ترجمه می‌کنند (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

هنگامی‌که توالی‌های تکراری خوشه ای در کپی‌های پشت سر هم دیده می‌شوند، این توالی ها بسته به طول واحد تکرار شده به ماهواره ها، کوچک ماهواره ها و ریزماهواره ها دسته‌بندی می‌شوند. آن‌ها به نشانگرهای ژنتیکی مفیدی تبدیل می‌شوند که در فصول بعد توضیح داده خواهند شد. در بین این نشانگرها، این عناصر تکراری تا ۴۰٪ ژنوم را می‌توانند تشکیل دهند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

یک ژن، یک واحد اطلاعاتی است که به‌صورت رمز در قطعات متمایز DNA نگهداری می‌شود. این رمز، توالی اسیدآمینه یک پروتئین یا توالی یک مولکول RNA را تعیین می‌کند. دانشمندان خیلی زود به‌طور اعجاب انگیزی کشف کردند که اطلاعات موجود در توالی مربوط به یک ژن منفرد اغلب در طول DNA تداوم نمی-یابد، بلکه با قطعات توالی‌های فاقد رمز به‌صورت پراکنده قرار می‌گیرد. بخش‌های رمزدار توالی ژن را اگزون ها و بخش‌های فاقد رمز را اینترون ها می‌نامند (تصویر ۱۱- ۴). قبل از این‌که یک ژن بیان شود، DNA ای که آن را رمزدار می‌کند، باید به ریبوز نوکلئیک اسید (RNA) رونوشت برداری شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ریبوز نوکلئیک اسید

ساختار RNA شبیه DNA است، با این تفاوت که ۱) قند آن به‌جای دی اکسی ریبوز، ریبوز است. ۲) به‌جای تایمین یک باز مشابه به نام یوراسیل (U) وجود دارد و ۳) این مولکول شامل فقط یک رشته پلی نوکلئوتید منفرد است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مولکول‌های RNA در اثر فرآیند رونوشت برداری از توالی خطی بازها در DNA تولیدشده و سپس در ترجمه آن توالی به یک زنجیره اسیدآمینه ای، مورداستفاده قرار می‌گیرند تا پروتئینی را تولید کنند.این نوع از RNA که از توالی رونوشت برداری می‌کند، RNA پیغامبر (mRNA) نامیده می‌شود. ترجمه این توالی به یک رشته اسیدآمینه ای را RNA ریبوزومی (rRNA) و RNA انتقال‌دهنده (tRNA) به عهده می‌گیرند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در خلال رونوشت برداری از DNA، یک کپی RNA از یکی از رشته‌های DNA ساخته می‌شود (تصویر ۱۱- ۵). یکی از این دو رشته DNA را رشته الگو و رشته دیگر را فاقد - الگو می‌نامند. نام های دیگری که برای رشته فاقد - الگو به کار می‌رود، شامل رشته سنس (+) یا رشته رمزدار است. RNA توسط آنزیم‌های RNA پلیمراز با استفاده از رشته الگو و بنابراین یک کپی از رشته DNA فاقد - الگو (سنس یا رمزدار) ساخته می‌شود. به لحاظ اینکه این RNA یک کپی مستقیم از DNA است، لذا هم حاوی توالی‌های رمزدار (اگزون ها) و هم فاقد رمز (اینترون ها) است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

اینترون ها از این RNA پیش-پیغامبر حذف می‌شـــوند و مولکول حاصـــله، mRNA نهایی خواهد بود. مولکول‌های mRNA از هســـته به ســـیتوپلاســـم منتقل شـــده و در آنجا پیغام توســـط rRNA در اجسامی به نام ریبوزوم به توالی اسیدهای آمینه ترجمه می‌شود. اسیدهای آمینه توسط مولکول‌های tRNA به ریبوزوم ها آورده می‌شـوند و هر یک از این مولکول‌ها، اسـیدآمینه خاصی را تعیین کرده (تصـویر ۱۱-۵) و در حضـور rRNA یک توالی خطی را تولید می‌کنند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـــویر ۱۱-۵: رونوشـــت برداری و ترجمه DNA. قبل از اینکه ترجمه اتفاق بیفتد، اینترون‌ها از RNA پیش-پیغامبر حذف می‌شوند. زنجیر پلی پپتیدی از اسیدهای آمینه ای شکل می‌گیرند که توسط mRNA رمزدار شـده و توسـط tRNA در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند (اصلاح‌شده توسط یوتر، اف.، آبرسولد، پی؛ و وینانز، ۱۹۸۷ جی.). عنوان مقاله: تفســـیر تفاوت ژنتیکی که توســـط الکتروفورز تعیین می‌شـــود. در کتاب ژنتیک جمعیت و مدیریت شـــیلات (مولفین ان. ریمن و اف. یوتر)، صـــفحات ۴۵-۲۱، دانشـــگاه واشـــنگتن، واشنگتن دی.سی.، ایالات متحده آمریکا، با مجوز برنامه گرانت دریایی واشنگتن، دانشگاه واشنگتن (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

جزئیات مکانیکی و بیوشیمیایی فرایندهای رونوشت برداری و ترجمه، خارج از اهداف این کتاب اســـت، اما می‌توان آن‌ها را در بیشـــتر کتاب‌های اســـتاندارد ژنتیک جســـتجو کرد. واژه بیان ژن، دربرگیرنده هر دوی این فرآیندها و مراحل مختلف کنترل آن‌هاســـت. علم رونوشـــت برداری، مطالعه رونوشت ها، مجموعه‌ای از رونوشت هایی از RNA است که توسط ژنوم یک سلول، یک اندام یا کل یک موجود زنده در یک‌زمان تولید می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

برای اهداف این بحث لازم اســت که فقط ذهنیت کلیدی زیر موردتوجه قرار گیرد که شــامل توالی رمزگذاری شـده بازها در DNA های مقدم، به‌واسـطه روند مستقیم کپی کردن با RNA تا تولید توالی اسیدهای آمینه و ساختن بلوک‌هایی از پروتئین‌هاست (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰) .

به این امر «ایده مرکزی» می‌گویند: اطلاعات از DNA به RNA و ســپس به پروتئین منتقل می‌شـود. اسـتثناهایی نسـبت به «ایده مرکزی» وجود دارد که می‌توان به رتروویروس‌ها و پرایون‌ها اشاره کرد، اما این امر خارج از اهداف این بحث است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

رمز ژنتیکی چیست؟

چگونه چهار باز (A, C, G, T) در DNA سـاماندهی می‌شوند که یک رمز فاقد ابهام را برای ۲۰ اسـیدآمینه در پروتئین‌ها فراهم کنند؟ حروف رمز شـامل سـه باز هسـتند. آمیزه های ممکن این چهار باز برای یک رمز سه حرفی شامل چهار به توان ۳ یعنی ۶۴ رمز است و این ۶۴ رمز سه حرفی هستند که ۲۰ اسیدآمینه را تعریف می‌کنند. به لحاظ اینکه بیش از ۲۰ رمز وجود دارد، رمز ژنتیکی دارای فزونی اسـت – به‌طوری‌که بیشـتر اسـیدهای آمینه توسـط بیش از یک رمز، رمزدار می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

رمزهایی نیز هسـتند که با اسـتفاده از نماد U برای یوراسـیل (در mRNA) به‌جای T برای تایمین (در DNA) نوشـته می‌شـوند. سه رمز (UAA, UAG, UGA) به‌عنوان رمز برای هیچ اسـیدآمینه ای اسـتفاده نمی‌شوند، اما به‌عنوان پیام برای تولید پروتئین استفاده می‌شوند تا تولید را متوقف کنند. به این رمزها، رمزهای پایانی یا متوقف کننده گفته می‌شـود. رمز سـه حرفی AUG برای تولید متیونین (فورمیل متیونین در باکتری‌ها و میتوکندری ها) اسـتفاده می‌شـود و به‌عنوان پیامی برای آغاز تولید پروتئین عمل می‌کند؛ بنابراین، رمز آغازگری است که چهارچوب خوانش رمز را تنظیم می‌کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

بنابراین، توالی اسـیدهای آمینه تمام پروتئین‌ها با متیونین شـروع می‌شود، اما گاهی اوقات بعداً حذف می‌شـود. جزئیات اسـیدهای آمینه ای که توسـط رمزهای مختلف رمزدار می‌شوند، در جدول ۱۱-۱ ارائه شـده اسـت. خصـوصاً دو باز اولیه رمزها برای هر اسیدآمینه به‌طورمعمول یکسان است. معمولاً تنها باز سوم است که تفاوت دارد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

موجودات زنده مختلف، تمایلات خاصـی برای یکی از چند رمزی نشـان می‌دهند که اسیدآمینه یکسـانی را رمزدار می‌کنند. به این امر سوگیری رمز اطلاق می‌شود. چگونگی این تمایل و رجحان در درون ژنوم، سؤال جدال برانگیزی است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ساختار پروتئین

پروتئین‌ها وظایف زیادی به‌عهده دارند. بعضی ساختار بافت‌ها را شکل می‌دهند. بقیه، به‌ویژه آنزیم‌ها، به‌عنوان کاتالیزور (تسریع کننده) واکنش‌های شیمیایی عمل می‌کنند و هنوز پروتئین‌های دیگری باقی‌مانده‌اند، مانند هورمون‌ها که وظایف تنظیمی انجام می‌دهند. پروتئین‌ها به خاطر ماهیت طبیعی خود به هم اتصال یافته‌اند تا مولکول‌های بسیار پیچیده‌ای باشند، اما این امکان وجود دارد که ساختار آن‌ها را به چهار سطح عمومی تقسیم کنیم.

ساختار اصلی پروتئین، توالی خطی زنجیره‌ای از اسیدهای آمینه (زنجیر پلی پپتید) است و این امر، همان‌طور که قبلاً دیده‌ایم، مستقیماً به توالی بازها در DNA مربوط می‌شود که رمز آن پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهد. اگرچه بیشتر اسیدهای آمینه ازنظر pH خنثی هستند، ولی دو اسیدآمینه شارژ منفی و دو اسیدآمینه شارژ مثبت دارند. علاوه بر این، بعضی ها آب دوست (جذب‌کننده آب) و بعضی آب گریز (دفع کننده آب) هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

بنابراین، ساختار ثانویه یک پروتئین، بر اساس الگوهای خاص حاصل از ویژگی‌ها و برهم‌کنش‌های انواع معینی از اسیدهای آمینه در درون زنجیر استوار است. یکی از این نوع ساختارهای ثانویه، مارپیچ آلفا و دیگری، صفحه تاه شونده است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ساختار ثالثیه، بستگی به این دارد که چگونه این ساختارهای ثانویه به‌صورت سه‌بعدی حالت تاخورده پیدا می‌کنند؛ بنابراین، رمز DNA از طریق ارتباط خطی اسیدهای آمینه مختلف، هم ساختارهای ثانویه و هم ثالثیه را القا می‌کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

این نکته بسیار حائز اهمیت است، زیرا آشکار می‌کند که جهش‌های نقطه‌ای در رمزگذاری DNA برای یک پروتئین خاص می‌تواند تبعات درازمدتی بر روی اندازه، شکل و شارژ کلی آن پروتئین داشته باشد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

جدول ۱۱-۱: رمز ژنتیکی، رمزدار شدن اسیدهای آمینه توسط ۶۴ آمیزه سه‌تایی از چهار باز را نشان می‌دهد. بازهای سمت چپ بیانگر اولین وضعیت در چهارچوب خوانش هستند، درحالی‌که بازهایی که در امتداد بالا هستند در دومین وضعیت و بازهای سمت راست نشانده سومین وضعیت هستند (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

	Second base				
First base	U	C	A	G	Third base
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Ala, Alanine; Arg, Arginine; Asn, Asparagine; Asp, Aspartic acid; Cys, Cysteine; Glu, Glutamic acid; Gln, Glutamine; Gly, Glycine; His, Histidine; Ile, Isoleucine; Leu, Leucine; Lys, Lysine; Met, Methionine; Phe, Phenylalanine; Pro, Proline; Ser, Serine; Thr, Threonine; Trp, Tryptophan; Tyr, Tyrosine; Val, Valine.

بسیاری از پروتئین‌ها از دو یا چند زنجیره (تحت واحد) پلی پپتیدی تشکیل می‌شوند و این تحت واحدهایی که یک پروتئین را می‌سازند، ممکن است یکسان یا متفاوت باشند. نام عمومی برای پروتئین‌هایی که بیش از یک تحت واحد دارند، اولیگومر است. این مسئله به سطح ساختار چهارم پروتئین‌ها برمی‌گردد و این امر پروتئین‌های بزرگ را قادر می‌سازد که بدون نیاز به توالی ژنی بسیار طولانی از DNA تولید شوند. این امر همچنین به پروتئین‌هایی با کارایی بیشتر اجازه می‌دهد که با داشتن تنها یک مولکول منفرد بتوانند فعالیت‌های مختلفی را انجام دهند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

پروتئین‌هایی که یک تحت واحد دارند، مونومر خوانده می‌شوند؛ به آن‌هایی که دو تحت واحد دارند، دی مر و چهار تحت واحد، تترامر اطلاق می‌شود. برای مثال، آنزیم گلوکز فسفات ایزومراز، آنزیم دخیل در تولید انرژی از طریق شکستن مواد کربوهیدرات، یک پروتئین دی مر است و دو تحت واحد دارد که توسط ژن یکسان رمزگذاری می‌شوند، درحالی‌که هموگلوبین که اکسیژن را در داخل خون حمل می‌کند، یک مولکول تترامر است که دو زنجیر گلوبین آلفا و دو گلوبین بتا دارد و هرکدام توسط ژن‌های مختلف رمزگذاری می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

نکات قابل‌ذکر در مورد کروموزوم‌ها

در ماهیان و آبزیان دیگر، همانند دیگر موجودات زنده یوکاریوت، مولکول‌های DNA در هسته با پروتئین‌ها، عمدتاً هیستون‌ها آمیخته می‌شوند تا کروموزوم را بسازند. هر کروموزوم نشانگر یک مولکول DNA منفرد است. معمولاً کروموزوم‌ها تنها زمانی به‌وضوح قابل‌مشاهده و شناسایی هستند که سلول در حال تقسیم باشد. در این هنگام، کروموزوم‌ها قبلاً به دو کروماتید دختری تقسیم شده‌اند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

باوجوداین، کروماتیدهای دختری در موقعیتی که به آن سنترومر یا «انقباض اصلی» گفته می‌شود، به یکدیگر متصل می‌مانند و این سنترومر، آخرین بخشی از کروموزوم است که تقسیم می‌گردد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

سنترومتر بر روی کروموزوم می‌تواند در موقعیت مرکزی (متاسنتریک)، بین مرکز و یک انتها (ساب متاسنتریک)، خیلی نزدیک به یک انتها (آکروسنتریک) یا انتهایی (تلوسنتریک) باشد. تعداد کروموزوم‌ها، درازا و موقعیت سنترومرهای آن‌ها برای هرگونه منحصربه‌فرد است و از این خصوصیات برای توصیف کاریوتایپ آن‌ها استفاده می‌شود (تصویر ۱۱-۶) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

کروموزوم‌ها خود دچار جهش (موتاسیون) و تکامل می‌شوند (باکس ۱۱-۱) و قبل از ظهور نشانگرهای آلوزایم، برخی متخصصان ژنتیک بیشتر وقت خود را صرف بررسی نحوه به ارث رسیدن بازچینی کروموزومی در زیر میکروسکوپ می‌کردند. امروزه تفاوت‌های کروموزومی برای اهداف آبزی‌پروری و شیلات، عمدتاً در ارتباط با پیوند زنی درون گونه‌ای مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـــویر ۱۱- ۶: گســـترش کروموزومی کاریوتایپ میتیلوس ادولیس در مرحله متافاز. شـــش زوج کروموزوم متاســـنتریک و هشت زوج ساب متاسنتریک دیده می‌شود. تعداد هاپلوئید N=14، دیپلوئید N=28۲، میله اندازه‌گیری = ۵ میکرومتر (تولیدشـده با اجازه از دیکسـون، دی. ار؛ و فلاول، ان. (۱۹۸۶). مطالعه مقایسه‌ای کروموزوم‌های میتیلوس ادولیس و میتیلوس گالوپروویونســـیالیس. مجله انجمن زیســـت‌شـــناســـی دریایی، انگلســـتان، شـــماره ۶۶ صـــفحات ۲۲۸-۲۱۹ (انتشـــارات دانشـــگاه کامبریج) (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تفاوت ژنتیکی در سطح کروموزوم‌ها

بیشـــتر بازچینش کروموزومی به‌صـــورت جهش‌های نقطه‌ای، نتیجه اشـــتباهات در خلال رونویســـی مولکول DNA روی می‌دهد. باوجوداین، این بازچینی مســـتلزم قطعات طویلی از DNA، به‌جای بازهای منفرد اســـت. حذف‌های DNA زمانی روی می‌دهد که رشـــته‌های DNA می‌شکنند، ولی نمی‌توانند مرمت شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

قطعات کروموزومی که به‌این‌ترتیب تولید می‌شـــوند و حاوی ســـنترومر (قطعات آســـنتریک) نیستند، در خلال تقسیات سلولی بعدی از دست می‌روند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

دو برابر شـــدن‌های کروموزومی، کپی اضـــافی از یک بلوک از DNA تولید می‌کند که حاوی توالی‌هایی از ژن کامل اســـت. همان‌گونه که می‌توان انتظار داشـــت، دو برابر شـــدن‌ها کم‌زیان‌تر از حذف شـــدن‌ها هســـتند و زمانی که دو برابر شـــدن‌ها حاوی توالی‌های کامل از ژن‌هاســـت، تکامل می‌تواند به‌صـــورت مســـتقل بر روی توالی‌های جدید و قدیمی روی دهد تآن‌هایتاً نقش‌های تباعدی

(انشعابی) برای این دو ژن تولید کنند. این امر روند عمده تکامل ژن‌های جدید است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

بعضی‌اوقات یک قطعه از یک کروموزوم می‌تواند با قطعه‌ای از کروموزوم غیرمشابه (non-homologous) دیگر تبادل شود و به چنین تبادلی جابه‌جاشدگی (translocation) کروموزومی می‌گویند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

وارونه‌سازی کروموزومی در جایی روی می‌دهد که یک قطعه از کروموزوم می‌شکند و دوباره به موقعیت اصلی خود برمی‌گردد و متصل می‌شود. قطعه وارونه ممکن است حاوی سنترومر (وارونگی دور مرکزی = pericentric inversion) باشد یا نباشد (وارونگی اطراف مرکزی = paracentric inversion) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

نوع دیگری از بازچینی کروموزومی وجود دارد که باید موردتوجه قرار گیرد. این امر مستلزم الحاق (جوش خوردن) با شکافت سنترومر است. دو کروموزوم تلوسنتریک یا آکروسنتریک می‌توانند در محل سنترومرها به هم جوش بخورند و یک کروموزوم ذوبازویی را تشکیل دهند که به آن جابه‌جاشدگی روبرتسونی می‌گویند. برعکس، یک کروموزوم دوبازویی می‌تواند در محل سنترومر بشکند و دو کروموزوم تلوسنتریک تولید کند. این نوع از بازچینی‌های کروموزومی، بسیاری از تفاوت‌های موجود در تعداد کروموزوم‌ها را در بین گونه‌های مختلف توضیح می‌دهد. تفاوت‌های کروموزومی دیگر به‌عنوان مارکر (نشانگر) در مطالعات ژنتیک جمعیت مورداستفاده قرار نمی‌گیرد، اما آن‌ها نقش مهمی در تکامل گونه‌ها ایفا می‌کنند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

قبل از اینکه الکتروفورز آلوزایم ها دسترسی به تک‌تک ژن‌ها را برای متخصصان ژنتیک فراهم کند، بسیاری از آن‌ها وقت خود را صرف نگاه کردن به ساختار کروموزوم‌ها در خلال تقسیم میوز می‌کردند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ساختار کروموزوم‌های زوج (دوظرفیتی‌ها، تصویر ۱۱-۷) که در خلال تقسیم میوز مشاهده می‌شود، انعکاسی از بازچینی کروموزومی است – کروموزوم‌ها با جابه‌جاشدگی فقط می‌توانند زوج شوند و این کار را با شکل‌گیری زنجیره‌ها یا حلقه‌ها، وارونگی‌هایی که تولید خمیدگی (loop) در اشکال دوظرفیتی می‌کنند و غیره انجام می‌دهند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

الگوهای اتصال بر روی کروموزوم‌ها که توسط رنگ‌های خاص (برای مثال، اتصال – جی G-banding با رنگ‌آمیزی گیمسا) یا با پیوند زنی کاوشگرهای فلورسنت (برای مثال، پیوندزنی درجا in situ hybridization) به نمایش گذاشته می‌شود، بازچینی‌های کروموزومی اگرچه در مطالعات اولیه تفاوت‌های موروثی مورداستفاده قرار می‌گرفته است، اما معمولاً زیان‌آور بوده و غالباً منجر به شکل‌گیری گامت یا تخم غیرقابل‌دوام می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

بازچینی‌های کروموزومی توضیح‌دهنده بسیاری از تفاوت‌های موجود در بین تعداد کروموزوم‌ها در بین گونه‌هاست و آزمایش کاریوتایپ در بین گونه‌های نزدیک به هم، در هنگام در نظر گرفتن پیوندزنی مصنوعی بین آن‌ها حائز اهمیت است.کروموزوم‌های اضافی یا B را می‌توان در بسیاری از گونه‌های گیاهی و جانوری مشاهده کرد. آن‌ها عمدتاً با تماماً هتروکروماتیک (عدم تجانس رنگی) و به میزان زیاد فاقد رمز هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

کروموزوم‌های B باعث افزایش انتشار ضربدری نامتقارن، همگذری و فرکانس‌های نوترکیب و همچنین کروموزوم‌های جفت نشده در تقسیم میوز می‌شوند.کروموزوم‌های B تمایل به تجمع در فرآورده‌های سلولی میوتیک دارند که نتیجه آن، افزایش B در طی نسل‌هاست و توسط «به‌گزینی» در مقابل ناباروری حاصل از افزایش تعداد کروموزوم‌های جفت نشده متعادل می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

پلی پلوئیدی حالتی است که هر موجود دارای بیش از دو کپی از هر کروموزوم است. برای مثال، تریپلوئیدها دارای سه دسته و تتراپلوئیدها دارای چهار دسته از کروموزوم‌ها هستند.

پلی پلوئیدی به‌طور طبیعی در بعضی از گیاهان (برای مثال، گندم که هگزاپلوئید است) روی می‌دهد و رخداد تتراپلوئید شدن در تاریخچه تکاملی آزادماهیان روی داده است. تریپلوئیدی را می‌توان به‌طور مصنوعی در گونه‌های دیپلوئید متعارف برای اهداف آبزی‌پروری ایجاد کرد. تقریباً همه ماهیان و آبزیان دیگر دیپلوئید هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

دیپلوئیدها دودسته کامل از ساختار DNA دارند، بنابراین، هر کروموزوم فقط یکی از زوج‌های مشابه را تشکیل می‌دهد. تقسیم سلولی متعارف – میتوز – تقسیم را با رونویسی همراه می‌کند، زیرا قبل از تقسیم سلولی هر کروموزوم رونویسی (به دو کروماتید) می‌شود و هر کپی به داخل یک سلول دختری ورود می‌کند؛ بنابراین، حالت دیپلوئید حفظ می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در خلال فرایند تولیدمثل جنسی، یک تقسیم سلولی ویژه بنام میوز روی می‌دهد که سلول‌های دختری، گامت‌ها را تولید می‌کند و فقط یک دسته منفرد از کروموزوم‌ها را در خود دارد؛ بنابراین، گامت‌های موجودات دیپلوئید، هاپلوئید هستند. به‌طور مشابه، گامت‌های موجودات تتراپلوئید، دیپلوئید هستند. در ادامه این فصل، جزئیات بیشتری از روند تقسیم میوز ارائه خواهد شد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

اگر یک موجود زنده نسخه یکسانی از یک ژن را از هر دو والده خود به ارث ببرد، به آن هوموزیگوت می‌گویند. اگر دو نسخه با هم متفاوت باشند، موجود زنده هتروزیگوت خواهد بود. هر نسخه از یک ژن خاص، آلل نامیده می‌شود؛ دو آللی که هر موجود زنده در هر لوکوس (موقعیت بر روی هر کروموزوم، جمع آن می‌شود لوسی) دارا می‌باشد، ژنوتیپ آن موجود را برای آن لوکوس تشکیل می‌دهد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در بسیاری از موجودات زنده، یک جفت خاص از کروموزوم‌ها وجود دارد که جنسیت موجود حامل آن کروموزوم‌ها را تعیین می‌کند. برای مثال، در سیستم XX-XY موجود در انسان و بعضی از ماهیان، ماده‌ها دارای یک جفت یکسان از کروموزوم‌های جنسی (کروموزوم‌های X) هستند، درحالی‌که نرها دارای یک کروموزوم X و یک کروموزوم کوچک Y هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در پرندگان و همچنین بعضی از ماهیان، سیستم تعیین جنسیت ZW مشاهده می‌شود: نرها جنسیت هوموگامتیک (ZZ) دارند، درحالی‌که ماده‌ها هتروگامتیک (ZW) هستند. در آن سیستم، کروموزوم Z بزرگتر است و ژن‌های بیشتری دارد و از این نظر شبیه کروموزوم X در سیستم XY است. جفت‌های دیگر کروموزوم‌ها، اوتوزوم نامیده می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در بسیاری از آبزیان دیگر، کروموزوم‌های جنسی قابل‌شناسایی وجود ندارد و در مورد نرم‌تنان معین مانند اویسترها، هر اویستر جنسیت خود را در خلال زندگی تغییر می‌دهد. در بعضی از ماهیان، جنسیت تحت تأثیر عوامل محیطی مانند دما یا برهم‌کنش‌های اجتماعی قرار می‌گیرد و کروموزوم‌های جنسی غالباً به‌اندازه کافی از هم متفاوت نیستند که در کاریوتایپ قابل‌شناسایی باشند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

چگونه تولیدمثل جنسی ایجاد تفاوت می‌کند؟

ویژگی کلیدی تولیدمثل جنسی، تولید گامت‌های هاپلوئید از طریق فرآیند تقسیم میوز و به هم پیوستن این گامت ها برای تولید یک نسل دیپلوئید جدید است. فرآیند تقسیم میوز به نحوی مواد ژنتیکی را به هم‌آمیخته می‌کند که هیچ‌کدام از دستجات کروموزومی هاپلوئید در گامت ها، با دستجات هاپلوئید موجود در والدینی که از آن مشتق شده‌اند، یکسان نیستند.

برای مشاهده این رخداد باید به مراحل خاص روند تقسیم میوز توجه کنیم (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در اینجا اشاره مختصری به رفتار کروموزوم‌ها در خلال تقسیم میوز با تأکید بر تبعات ژنتیکی آن می‌شود، به‌جای اینکه به توصیف جزئیات هر مرحله بپردازیم (تصویر ۱۱-۷) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

فرآیند تقسیم میوز درواقع شامل دو تقسیم سلولی است: میوز I و میوز II. جزئیات کامل تقسیم میوز در تمام کتاب‌های ژنتیک استاندارد ارائه شده است. میوز I مدت زیادی قبل از اینکه کروموزوم‌ها به‌وضوح قابل‌مشاهده شوند، شروع می‌شود. کروموزوم‌ها در ابتدا بسیار نازک و غیرمنقبض هستند، اما به‌طور فزاینده در خلال مرحله پروفاز منقبض‌تر و قابل‌مشاهده‌تر می‌شوند. در خلال این مرحله، جفت‌های هومولوگ کروموزوم‌ها به یکدیگر نزدیک می‌شوند و در ضمن، هر

کروموزوم در هر جفت به کروماتیدهایی تقسیم می‌شود که در محل سنترومر به یکدیگر متصل باقی می‌مانند؛ بنابراین، هر جفت از کروموزوم‌ها شامل چهار کروماتید است. این جفت از کروموزوم‌ها در این مرحله کروموزوم‌های دوظرفیتی خوانده می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰) .

در خلال این مرحله است که جفت کروموزوم‌ها تنگ به یکدیگر می‌چسبند و اینکه فرآیند نوترکیبی یا همگذری روی می‌دهد. نوترکیبی مستلزم برهم‌کنش بین دو مولکول DNA معمولی (دو رشته‌ای) است. اثری که ایجاد می‌شود این است که هر دو مولکول می‌شکنند، اما پایانه‌ها دوباره به مولکول اشتباه می‌پیوندند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ازنقطه‌نظر ژنتیک، هر کروماتید در یک کروموزوم دوظرفیتی را می‌توان یک مولکول DNA منفرد در نظر گرفت و برهم‌کنش نوترکیبی بین کروماتیدهایی که از کروموزوم‌های مختلف جفت – کروماتیدهای نادختری نشأت گرفته‌اند، روی می‌دهد (در مقایسه با کروماتیدهای دختری که از یک کروموزوم منفرد نشأت گرفته‌اند). مکانی که رخداد نوترکیبی روی می‌دهد، بر روی کروموزوم دو ظرفیتی به‌صورت کیاسما (ضربدر) قابل‌مشاهده است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

این امر در هر جفت از اوتوزوم ها می‌تواند اتفاق افتد، اما شکل‌گیری یک کیاسما، باعث احتمال کاهش کیاسمای دیگر در ناحیه مجاور کروموزوم می‌شود و احتمالاً علت این امر محدودیت‌های فیزیکی کروماتیدها برای خمیدگی مجدد بر روی خودشان است. تمایل یک کیاسما برای تداخل با دیگری را مداخله می‌نامند. مداخله زمانی کامل می‌شود که تنها فقط یک کیاسما به ازای هر بازوی کروموزوم وجود داشته باشد. مداخله منفی زمانی روی می‌دهد که وجود یک کیاسما باعث افزایش احتمال کیاسمای مجاور می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در مرحله متافاز تقسیم میوز I، کروموزوم‌های دوظرفیتی در امتداد خط مرکزی دوک قرار می‌گیرند و در این حالت سنترومر ها به بازوهای دوک متصل می‌شوند. میوز I تقسیمی کاهشی محسوب می‌شود. در خلال آنافاز، هر جفت کروموزومی از هم جدا می‌شوند؛ بنابراین، یکی از این جفت‌ها وارد یک سلول دختری و دیگری وارد سلول دختری دیگر می‌شود؛ بنابراین، در مرحله شروع میوز I، سلول حاوی چهار کپی از اطلاعات ژنتیکی است، اما پس از تقسیم، هر سلول دختری حاوی تنها دو کپی از مواد ژنتیکی است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

میوز II به‌طور مؤثر یک تقسیم میتوزی است که دو کروماتید از هر کروموزوم جداشده و وارد سلول‌های دختری می‌شوند؛ بنابراین، هر سلول دیپلوئید که وارد تقسیم میوز می‌شود، چهار گامت هاپلوئید تولید می‌کند. در بعضی از کتب ژنتیک پیشنهاد می‌شود که یک سلول را می‌توان در هنگامی‌که وارد تقسیم میوز I می‌شود، تتراپلوئید در نظر گرفته می‌شود، زیرا دارای چهار کپی از DNA است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

اثر واقعی نوترکیبی در سرتاسر ژنوم چیست؟ برای مثال، گونه‌ای مانند اویستر پهن اروپایی، اوستریا ادولیس را در نظر بگیرید که ده جفت کروموزوم دارد. در تمامی سلول‌های بدن، ازجمله سلول‌های زاینده که متحمل تقسیم میوز خواهند شد، یکی از جفت کروموزوم‌ها از مادر (والده ماده) و دیگری از پدر (والده نر) نشأت می‌گیرد. در نظر بگیرید یکی از کروموزوم‌ها را که به‌صورت چینش خطی ژن‌ها در امتداد یک مولکول منفرد DNA شکل می‌گیرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۷: فرآیند تقسیم میوز. نوترکیبی در خلال مرحله پروفاز میوز I روی می‌دهد (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

کروموزوم دیگر از جفت مشابه (هومولوگ) نیز شامل چینش خطی مشابهی از ژن‌ها در امتداد طول خود است، اما از والده متفاوتی نشأت گرفته است. این کروموزوم نیز ژن‌های مشابه با ترتیب مشابه دارد، اما از نیای متفاوتی نشأت گرفته است. آن نیا این کروموزوم را با تفاوت‌های مختلفی در بسیاری از ژن‌های خود، در مقایسه با کروموزوم دیگر این جفت تأمین می‌کند. در مراحل اولیه تقسیم میوز، هر کروموزوم از خود رونویسی می‌کند؛ بنابراین، دو کپی (کروماتید) از DNA وجود خواهد داشت (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

نوترکیبی بین کروماتیدهای غیرخواهری به نحوی روی می‌دهد که یک قطعه از DNA از یک کروماتید با یک قطعه معادل از کروماتید دیگر مبادله می‌شود؛ بنابراین، مولکول‌های DNA

کروماتید حاصله که متحمل نوترکیبی شده‌اند، از هر یک از مولکول‌های والدین متفاوت خواهند بود. البته هر یک از کروماتیدها که در رخداد نوترکیبی دخیل نبوده‌اند، بدون تغییر باقی می‌مانند. فرکانس (تکرار) رخدادهای نوترکیبی بین دو ژن، تعیین‌کننده فاصله ژنتیکی بین آن ژن‌ها خواهند بود و ما در فصل شش نشان خواهیم داد که چگونه این تکرارها نقشه‌برداری از ژنوم را امکان‌پذیر خواهد کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

اکنون توجه داشته باشید که این فرآیند می‌تواند در تمام جفت‌های اوتوزوم در آن سلول‌های زاینده در خلال آن تقسیم روی دهد. سپس در نظر داشته باشید که این فقط یک سلول زاینده در بین میلیون‌ها سلول زاینده غده جنسی اویستر است. همه سلول‌های زاینده دیگر نیز متحمل تقسیم میوزی می‌شوند که در خلال آن نوترکیبی در حال روی دادن در همه جفت‌های کروموزومی است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

موقعیت دقیق در امتداد مولکول‌های DNA (کروماتیدها) که وقایع نوترکیبی در آن موقعیت‌ها اتفاق می‌افتد، (تا حدی) تصادفی است و معمولاً در هر سلول زاینده به‌صورت متفاوت روی می‌دهد؛ بنابراین درک این نکته آسان است که چرا ده مولکول DNA (کروموزوم‌ها) در سلول جنسی (گامت) یک اویستربه سمتی می‌روند که از هر یک از مولکول‌های DNA (کروموزوم‌های) والدین متفاوت باشند، آن هم کروموزوم‌هایی که در سلول زاینده قبل از تقسیم میوز وجود دارند. همچنین می‌توان پی برد که چرا احتمالاً آرایش ژنتیکی (ده مولکول DNA) هر سلول جنسی ممکن است از هر سلول جنسی دیگر متفاوت باشد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

می‌توان مشاهده کرد که به هم آمیختن بسیار گسترده ژنوم از طریق نوترکیبی به دست می‌آید. باوجوداین، تنها به هم آمیختن مجدد در خلال تقسیم میوز روی نمی‌دهد. ده جفت کروموزوم را در سلول زاینده در نظر بگیرید که یکی از هر جفت از والد نر اویستر و دیگری از والده ماده نشأت گرفته‌اند. این امر را می‌توان به‌صورت M1، M2، M3 تا M10 (برای کروموزوم‌های نشأت گرفته از والد نر) و F1، F2، F3 تا F10 (برای کروموزوم‌های والده ماده) نشان داد. هر یک از سلول‌های دختری پس از میوز I واجد ده کروموزوم هستند، اما آن‌ها آمیزه‌ای تصادفی از کروموزوم‌های F و M محسوب می‌شوند که در شکل ۱۱-۸ نشان داده شده است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

بنابراین، به هم زدن ژنوم در تقسیم میوز از طریق دو فرآیند روی می‌دهد: نوترکیبی و دسته‌بندی مستقل. این دو فرآیند احتمالاً این اطمینان را ایجاد می‌کند که هیچ‌کدام از دو سلول جنسی هرگز با دستجات کروموزومی والدین و همچنین با یکدیگر یکسان نباشند. بخش پایانی فرآیند تولیدمثل جنسی، سینگامی – الحاق سلول‌های جنسی نر و ماده در هنگام باروری برای شکل‌گیری سلول تخم – بعداً تفاوت‌های ژنتیکی فرزندان از والدین خود را افزایش می‌دهد. با در نظر گرفتن همه این عوامل، ابداً تعجب‌برانگیز نیست که در گونه‌هایی که تولیدمثل جنسی انجام

می‌دهند، هیچ دو فردی با یکدیگر یکسان نیستند. تنها استثنا زمانی است که اگر یک تخم (زیگوت) که قبلاً بارورشده است، دو سلول مجزا تولید کند و هر دوی آن‌ها به‌طور مستقل به دو جنین متعارف تبدیل شوند. این نوزادان، دوقلوهای متشابه (مونوزیگوتیک) هستند و به‌طور مؤثری کلون‌های ژنتیکی یکدیگر به‌حساب می‌آیند. تخم اصلی که این دوقلوها از آن‌ها نشأت گرفته‌اند، هنوز از هر تخم دیگر یا فرد دیگر در آن‌گونه متفاوت هستند. اگرچه رفتار کروموزومی در خلال تقسیم میوز هم در نر و هم ماده یکسان است، اما تفاوت مهمی در تولید اسپرماتوزوئیدها و تخم‌ها (اووم‌ها) وجود دارد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۸: چگونه دسته‌بندی مستقل کروموزوم در آخر تقسیم میوز I باعث ایجاد تفاوت می‌شوند. سه جفت کروموزوم به‌صورت M1، M2 و M3 به‌عنوان کروموزوم‌های والد نر و F1، F2 و F3 کروموزوم‌های والده ماده نشان داده شده‌اند. دسته‌بندی مستقل، هشت آمیزه احتمالی از کروموزوم‌ها را در سلول‌های دختری به وجود می‌آورد (اقتباس ازبیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در نرها چهار اسپرماتوزوئید از هر سلول زاینده تولید می‌شود. در ماده‌ها تنها یک تخم (اووم) از هر سلول زاینده یا اووسیت اولیه به وجود می‌آید (تصویر ۱۱-۹). یکی از این دو سلول که در خلال میوز I تولید می‌شود، بزرگ و دیگری بسیار کوچک است. آن‌قدر کوچک که در حقیقت فقط شامل مواد کروموزومی با سیتوپلاسم اندک یا اینکه بدون سیتوپلاسم است. این سلول کوچک – اولین جسم قطبی – معمولاً متحمل تقسیم میوز II نمی‌شود. سلول بزرگ - اووسیت ثانویه – در خلال تقسیم میوز II دوباره به‌طور نامساوی تقسیم می‌شود تا اووم بزرگ و دومین جسم قطبی کوچک را تولید کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

حیوانات پرورشی عمدتاً پستانداران یا پرندگانی هستند که تقسیمات میوتیک در داخل بدن یا در داخل یک پوسته صورت می‌گیرد و بنابراین به‌راحتی در دسترس نیست. باوجوداین، در بیشتر ماهیان تنها تقسیم میوز I قبل از تخم‌ریزی صورت می‌گیرد و اووسیت ثانویه به داخل آب رها می‌شود. تقسیم میوز II تنها هنگامی صورت می‌گیرد که اسپرماتوزوئیدها به آن متصل شده باشند. در نرم‌تنان دوکفه‌ای، اووسیت‌ها در مرحله متافاز تقسیم میوز I رها می‌شوند و نمو بعدی بستگی به اتصال اسپرماتوزوئیدها دارد. این وضعیت ماهیان و آبزیان معین دیگر امکان دست‌کاری مجموعه کروموزومی را برای مهندسی این‌گونه‌ها برای تولید پلی پلوئیدی فراهم می‌کند (باکس ۱۱-۱).

تصویر ۱۱-۹: تفاوت در فرآورده‌های میوتیک نرها و ماده‌ها. در نرها هر اسپرماتوسیت اولیه چهار اسپرماتوزوئید تولید می‌کند، درحالی‌که هر اووسیت اولیه یک تخمک (اووم) به وجود می‌آورد (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

علاوه بر تفاوت در سطح DNA و به هم آمیختن (برخوردن) ژن‌ها در خلال تقسیم میوز، تفاوت ژنتیکی در سطح کروموزوم‌ها روی می‌دهد. این تفاوت‌ها به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی در گونه‌های پرورشی خیلی مفید نیستند، اما بازچینش کروموزومی نقش مهمی در تکامل ایفا کرده است (جدول ۱۱-۱) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

Mitochondrial and chloroplast DNA

تاکنون ما DNA موجود در هسته را که در داخل کروموزوم‌ها متشکل شده‌اند، موردتوجه قرار داده‌ایم. درواقع،DNA بیشتری در ژن‌های خارج کروموزومی سلول وجود دارد که در اندامچه‌های تولیدکننده انرژی، میتوکندری‌ها جای گرفته‌اند و از این اندامچه‌ها چند صد عدد در هر سلول وجود دارد. در گیاهان، اندامچه‌های فتوسنتز کننده – کلروپلاست‌ها – نیز واجد DNA هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

DNA میتوکندریایی (mtDNA) حیوانی به‌طور متعارف به‌صورت یک مولکول حلقوی با درازایی حدود ۱۶ کیلو باز است و در حدود ده کپی از DNA در هر میتو کندری وجود دارد. برخلاف DNA کروموزومی، هیچ تقسیم میوزی در میتوکندری روی نمی‌دهد و به نظر می‌رسد که رونویسی یک روند کپی‌برداری ساده باشد، هرچند که مطالعات اخیر به وجود اشکالی از نوترکیبی در خلال رونویسی DNA میتوکندریایی اشاره دارد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

به لحاظ این‌که تعداد زیادی میتوکندری در یک تخم وجود دارد، اما در اسپرماتوزوئید تعداد بسیار کمی دیده می‌شود، تعجب‌انگیز خواهد بود اگر بدانیم که DNA میتوکندریایی حاضر در اولادی که از تولیدمثل جنسی حاصل می‌شود، معمولاً به‌طور کامل از مادر به ارث می‌رسد (توارث مادری محض). این وضعیت توارث تمام - مادری DNA میتوکندریایی تقریباً در تمام حیوانات دیده می‌شود. باوجوداین، یک استثنا نسبت به این قاعده در یک گونه پرورشی مهم، موسل، گونه میتیلوس، روی می‌دهد که نشان‌دهنده توارث دو والدی DNA میتوکندریایی در این‌گونه است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ماده‌ها یک DNA میتوکندریایی نوع F در هر سلول بدن خود دارند، درحالی‌که نرها هم نوع F و هم نوع M در بیشتر سلول‌های خود دارند. نوع M در غده جنسی نرها بسیار متراکم است و تصور می‌شود که تنها DNA میتوکندریایی حاضر در اسپرماتوزوئیدها باشد. این مولکول‌های DNA میتوکندریایی نوع M وارد تخم می‌شوند و به طریقی که هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است، نوع M در تخم‌ها پس از باروری باقی می‌مانند و در افرادی که قرار است تبدیل به ماده شوند، از بین می‌روند، اما در افرادی که قرار است به نر تبدیل شوند، باقی‌مانده و ترجیحاً رونویسی می‌شوند. این چینش غیرمتعارف را «توارث تک والدی مضاعف» می‌نامند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

توارث تک والدی مضاعف اخیراً در دیگر دوکفه‌ای‌ها علاوه بر موسل ها مانند صدف مانیلا (تاپس فیلیپیناروم) تشخیص داده شده است و ممکن است گسترش وسیع‌تری ازآنچه تصور می‌شد، داشته باشد. توالی کامل ژنوم میتوکندریایی امروزه برای تعداد زیادی از مهره‌داران و بی‌مهرگان شناخته‌شده است و ترتیب قرار گرفتن ژن‌ها در درون ژنوم حلقوی در هر شاخه از موجوداتی که

تاکنون شناسایی‌شده، متفاوت است. به لحاظ اینکه DNA میتوکندریایی به‌طور گسترده‌ای در مطالعات آرایه‌شناسی مورداستفاده قرارگرفته است، ما این مولکول را به‌عنوان یک مثال استفاده خواهیم کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ژنوم میتوکندریایی ماهیان حاوی ۱۳ ژن برای رمزگذاری پروتئین‌ها، دو ژن برای رمزگذاری rRNA (rRNA 12S کوچک و rRNA۱۶ S بزرگ)، ۲۲ ژن برای رمزگذاری مولکول‌های tRNA و بخش فاقد رمز DNA که به‌عنوان واحه آغازگر برای رونویسی DNA میتوکندریایی و رونوشت برداری RNA عمل می‌کند. به این قسمت، منطقه کنترل اطلاق می‌شود (تصویر ۱۱-۱۰) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ژن‌های میتوکندریایی حیوانات، برعکس ژنوم هسته‌ای بسیار کارآمد هستند و اینترون ندارند. علاوه بر این، درواقع هیچ نوع DNA آشغال یا توالی‌های تکراری در ژنوم میتوکندریایی وجود ندارد، هرچند که منطقه کنترل به خاطر تکرارهای پشت سرهم ازنظر درازا متفاوت هستند. استثنا نسبت به این قاعده در اسکالوپ‌ها دیده می‌شود که بسیاری از گونه‌های آن توالی‌های تکراری متعدد بزرگ (تا ۴/۱ کیلو باز) در درون ژنوم DNA میتوکندریایی دارند که می‌تواند متعاقباً گسترش‌یافته و به طول بیش از ۳۰ کیلو باز برسد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

به دلایلی که هنوزبه‌طور کامل به آن‌ها پی برده نشده است، میزان موتاسیون (جهش) در DNA میتوکندریایی حیوانات بیش از DNA هسته (در حدود ۱۰-۵ برابر بیشتر) است. این بدین معنی است که میزان تکامل در DNA میتوکندریایی بیش از DNA هسته است و این امر برای ما اهمیت دارد، خصوصاً زمانی که در جستجوی نشانگرهای ژنتیکی هستیم و این نشانگرها انعکاس‌دهنده تغییرات درگذشته‌های نه‌چندان دور هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـــویر ۱۱-۱۰: نمای عمومی ژنوم میتوکندریایی ماهی. وضـــعیت ۱۳ ژن رمزدار کننده پروتئین بر روی مولکول نشان داده شده است. آن‌ها ۷ زیرواحد آنزیم NADH دهیدروژناز (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6)، سـیتوکروم b (Cytb)، سـه زیرواحد از سـیتوکروم c (COI, II, III) و دو زیرواحد از آنزیم آدنوزین تری فسـفات سنتتاز (ATP6 و ATP8) هستند .12SrRNA, 12S rRNA; 16SrRNA, 16S rRNA. قطعات سایه‌دار نشان‌دهنده وضعیت ژن‌های tRNA هستند (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

کلروپلاســـت‌هـای انـدام‌های فتوســـنتز کننده نیز واجد مولکول‌های DNA هســـتند که از ســـیانوباکتری‌های همزیســـت درونی نشـــأت گرفته‌اند. هر کلروپلاســـت واجد تا ۱۰۰ کپی از این ژنوم‌های کوچک هســـتند که از مولکول‌های حلقوی تشـــکیل‌شـــده‌اند. آن‌ها به‌طور متداول از طریق مادر به ارث می‌رســـند. ژنوم کلروپلاســـت اولین ژنوم گیاهی بود که خصـوصـیات آن مشخص شد و علت این امر نیز اندازه کوچک و سهولت جداسازی آن بود. توالی‌های کامل ژنوم کلروپلاست تعدادی از گیاهان و جلبک‌ها تعیین‌شـــده اســـت که نمایانگر انتقال انبوه ژن‌ها از اندامچه‌های اجدادی به هســـته اســـت. این امر ممکن اســـت توضـیح دهد که چرا همه وظایف کلروپلاســـت‌ها، نیازمند ورود پروتئین‌های رمزگذاری شده توسط ژنوم هسته است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

چگونه می‌توان تفاوت‌های ژنتیکی را اندازه‌گیری کرد؟

تفاوت‌های ژنتیکی را می‌توان در ســـطوح مختلف اندازه‌گیری و تعیین مقدار کرد. در اولین ســـطح، توالی دقیق قطعات DNA و نحوه تفاوت‌های آن‌ها در بین افراد را می‌توان تعیین کرد. در دومین

سطح تفاوت‌های بین اندازه‌های قطعات DNA را می‌توان شناسایی کرد. در سطح آخر، می‌توان تفاوت‌های پروتئینی را در نظر گرفت که حاصل تفاوت‌های توالی رمزگذاری DNA است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

درنهایت گاهی اوقات این امکان وجود دارد که تفاوت‌های فنوتیپی (رخ مانه) را شناسایی کنیم که حاصل تفاوت ژنتیکی در فقط یک یا دو لوکوس (مکان) است یا برای خصوصیاتی که توسط تعداد زیادی از ژن‌ها تعیین می‌شوند. جالب‌توجه است که ترتیب زمانی واقعی شرح استفاده از این سطوح مختلف اطلاعات، دقیقاً برعکس مسیری است که آن‌ها در این بخش ارائه می‌شوند. اولین نشانگرهای تفاوت‌های ژنتیکی قابل تصیف منحصراً فنوتیپی (رخ مانه‌ای) بود و اگرچه ساختار DNA در ۱۹۵۳ توصیف شد، آن‌ها همچنان تنها نشانگرهای مورداستفاده تا نیمه دهه ۱۹۶۰ بودند که مورداستفاده قرار می‌گرفتند. از این زمان به بعد بود که تفاوت‌ها در بین پروتئین‌ها (آلوزایم‌ها) توسط دستگاه الکتروفورز شناسایی شدند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

نشانگرهای DNA میتوکندریایی بر پایه طول قطعات در دهه ۱۹۸۰ توسعه یافتند، اما خیز عظیم به جلو در دهه ۱۹۹۰ با معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR – در ادامه فصل در باکس ۱۱-۱ توصیف خواهد شد) روی داد. این روش، امکان تکثیر ارزان و سریع قطعاتی از DNA را که می‌توان توالی یابی کرد، فراهم نمود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

از زمان تغییر قرن، تغییر و بهبود بسیار سریعی در فناوری‌های مربوط به DNA روی داده و این امر امکان جمع‌آوری پایگاه داده‌های عظیمی را در ارتباط با توالی‌های DNA فراهم نموده است، به‌طوری‌که کل ژنوم بعضی از موجودات زنده (ازجمله انسان) و همچنین صدها هزار توالی DNA وظیفه‌مند برای بسیاری از گونه‌ها و توالی‌های پروتئینی بی‌شماری تعیین‌شده است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تفاوت‌های موجود در توالی DNA

استخراج خام DNA از بافت حیوانی یا گیاهی فرایندی نسبتاً ساده است که مستلزم شکستن مکانیکی و شیمیایی ساختارهای نامحلول و جداسازی آن‌ها از طریق سانتریفیوژ است. سپس پروتئین‌های سلولی محلول و پروتئین‌هایی را که به DNA در کروموزوم‌ها متصل می‌شوند، می‌توان با استفاده از یک آنزیم پروتئاز قوی شکسته و خارج نمود. این امر معمولاً با استفاده از حلال‌هایی مانند فنول – کلروفورم صورت می‌گیرد. DNA در بخش محلول در آب وجود دارد و سپس می‌توان آن را با استفاده از الکل رسوب داد. تعدادی کیت تجاری در بازار وجود دارد که امکان خالص‌سازی بعدی DNA را فراهم می‌کنند. مشکل بعدی، تولید کپی‌های متعدد از قطعات

خاص DNA است که این کار را می‌توان یا با کلونینگ یا با استفاده از PCR (باکس ۱۱-۱) انجام داد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در فرآیند کلونینگ (باکس ۱۱-۱)، DNA هدف را به داخل یک مولکول ناقل وارد می‌کنند که به داخل سلول‌های میزبان جذب یا وارد می‌شود. رونویسی سریع بعدی این سلول‌های میزبان و مولکول‌های ناقل در داخل آن‌ها، منجر به تولید میلیون‌ها کپی از DNA هدف می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تا آنجا که به بیشتر نشانگرهای DNA مربوط می‌شود، کلونینگ فقط در خلال فاز نمو موردنیاز است – هنگامی‌که توالی‌های DNA در پهلوی مارکرهای حاصل از قطعات کلون شده یافت می‌شوند، می‌توان PCR را برای تولید میلیون‌ها کپی از توالی هدف در عرض چند ساعت استفاده کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

روش PCR بر این حقیقت استوار است که DNA دو رشته‌ای هنگامی‌که تا بالای ۹۰ درجه حرارت داده می‌شوند، دناتوره شده و به‌صورت رشته‌های منفرد از یکدیگر جدا می‌شوند. هنگامی‌که دناتوره شدن انجام شد، دما به حرارت از پیش تعیین‌شده (annealing) پایین آورده می‌شود و این امر اجازه می‌دهد که امتدادهای صناعی کوتاه از DNA تک‌رشته‌ای (پرایمرها) که طراحی‌شده‌اند تا متمم مناطق طرفین DNA هدف باشند، به این مناطق طرفیتی متصل (anneal) شوند. بالا بردن دما به ۷۲ درجه سانتی‌گراد در حضور آنزیم DNA پلیمراز و ساختن قطعاتی (بلوک‌هایی) از DNA، منجر به ایجاد دو کپی از DNA هدف دو رشته‌ای می‌شود. هر زمان که این چرخه تکرار می‌شود، تعداد کپی‌ها دو برابر می‌شود و ازآنجاکه هر چرخه فقط یک یا دو دقیقه طول می‌کشد، می‌توان در عرض چند ساعت میلیون‌ها کپی توسط این روش تولید کرد. به باکس ۱۱-۱ رجوع شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

باکس ۱۱-۱: کلونینگ

تعجب‌آور نخواهد بود اگر بدانیم که DNA مولکول بسیار سفتی است و می‌تواند فشارهای قابل‌ملاحظه‌ای را در خلال استخراج خود تحمل کند. باوجوداین، برای آنالیز صحیح DNA، لازم است که مولکول‌های طویل و نشکسته داشته باشیم و همچنین باید دقت کرد که در خلال آماده‌سازی، میزان برش کاهش یابد. پس‌ازاینکه مولکول‌های DNA طویل با وزن مولکولی بالا استخراج و خالص‌سازی شدند، آن‌ها را می‌توان با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده اندونوکلئاز خالص‌سازی شده از باکتری‌ها به قطعاتی تقسیم کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

یک رده (تیپ II) از این آنزیم‌ها دارای خاصیت مفیدی است و می‌تواند مولکول DNA را در نقاط خاص ببرد و هر آنزیم دارای توالی شناسایی خاص خود برای چهار باز یا بیشتر است. برای

مثال، یک آنزیم محدودکننده که از باکتری اشـریشیا کولی جداشده و EcoRI نام دارد، DNA را تنهـا در جـایی کـه هگزانوکلئوتـاید 5-GAATTC-3 وجود دارد، می‌برد. برش حالت ناصـــاف و ناهموار دارد و در هر انتها یک همپوشـانی به وجود می‌آورد و آن‌ها را «چسـبناک» یا «چسـبنده» می‌کند. اندونوکلئازهای محدودکننده دیگر مانند *Alu*I پایانه‌های کند (دارای لبه ضخیم) را می‌برد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

جدول ۱۱-۲: توالی‌های شناسایی و نوع توالی پایانی سه آنزیم اندونوکلئاز محدودکننده متداول (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

Restriction endonuclease	Recognition sequence	End sequences		Type of end
*Eco*RI	5′–GAATTC–3′ 3′–CTTAAG–5′	5′–G 3′–CTTAA	AATTC–3′ G–5′	Sticky
*Alu*I	5′–AGCT–3′ 3′–TCGA–5′	5′–AG 3′–TC	CT–3′ GA–5′	Blunt
*Hin*fI	5′–GANTC–3′ 3′–CTNAG–5′	5′–G 3′–CTNA	ANTC–3′ G–5′	Sticky

G, guanine; A, adenine; C, cytosine; T, thymine; N, any nucleotide.

هنگامی‌که DNA به قطعاتی بریده شد، این قطعات را می‌توان با استفاده از آنزیم DNA لیگاز به یک ناقل چسـباند. تعداد ناقلین بسـتگی به عوامل زیر دارد: اندازه قطعاتی که باید کلون شـوند، میزبان (باکتری‌ها، مخمر، گیاهان، پسـتانداران) و اینکه فرد تمایل دارد که ژن‌ها را بر روی قطعات کلون شـده بیان (یعنی رونوشـت برداری یا ترجمه) کند. باوجوداین، به‌مراتب متداول‌ترین سیستم شبیه‌سازی برای اهداف مرتبط با آبزی‌پروری، هنگامی‌که قصد داریم برای ژن‌ها یا توالی‌های نشانگر کاوش کنیم، استفاده از اشکال اصلاح‌شده باکتری اشریشیا کولای به‌عنوان میزبان است.

دو نـاقل عمده برای رسـاندن DNA به داخل باکتری وجود دارد: یکی ویروس (باکتریوفاژ یا فقط فاژ) اسـت که باکتری را آلوده می‌کند و دیگری، یک پلاسـمید اسـت که یک مولکول DNA حلقوی به‌حسـاب می‌آید و به‌صـورت گنجیدگی طبیعی در بسـیاری از باکتری‌ها دیده می‌شـود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

بعضـی از آزمـایشـگاه‌ها هنوز فاژها را ترجیح می‌دهند زیرا ذرات عفونی به‌طور طبیعی حاوی DNA تک‌رشـته‌ای قابل‌اسـتخراج هسـتند و آن‌ها دریافته‌اند که این فاژها نتایج توالی یابی خوبی

ارائه می‌دهد. باوجوداین، بیشتر آزمایشگاه‌ها ترجیح می‌دهند که بتوانند توالی یابی DNA را از هر دو مسیر انجام دهند (که نمی‌توان با فقط یک رشته به آن دست‌یافت) و دریافته‌اند که ناقلین پلاسمید احتمال کمتری دارد که DNA واردشده را «بجوند» (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

واریانت‌های بسیاری از پلاسمید وجود دارد و یکی از متداول‌ترین و مناسب‌ترین آن، پلاسمید pUC19 است (p مخفف پلاسمید، UC مخفف دانشگاه کالیفرنیا، جایی که این پلاسمید ساخته شد، 19 هم برای اینکه نشان دهد این پلاسمید نوزدهمین پلاسمید تولیدشده در این دانشگاه است). DNA از یک موجود زنده استخراج می‌شود و سپس با گرمخانه گذاری این DNA با یک آنزیم محدودکننده بریده می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

سپس قطعات بریده‌شده در محلولی که حاوی آنزیم DNA لیگاز و ناقل (در این مورد، یک پلاسمید که قبلاً توسط همان آنزیم محدودکننده یا آنزیم سازگار بریده می‌شود) است، آمیخته می‌شود. پلاسمیدها و ناقلین دیگر به نحوی مهندسی شده‌اند که حاوی یک واحه پلی کلونینگ (چند شبیه‌ساز) باشند و این واحه خود حاوی توالی‌های شناسایی برای بسیاری از آنزیم‌های مختلف محدودکننده باشد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

بسیاری از این قطعات DNA به درون مولکول‌های پلاسمید بسته (متصل) می‌شوند و سپس ناقل به همراه DNA واردشده به داخل آن، به درون شکل خاصی از اشریشیا کولای ورود می‌کنند. این اشریشیا کولای ذی‌صلاح در هنگامی‌که در معرض یک نوع شوک، معمولاً شوک حرارتی قرار می‌گیرد، ناقل را مصرف می‌کند (تصویر ۱۱-۱۱) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ناقل پلاسمیدی حاوی یک توالی ژنی برای مقاومت در برابر یک آنتی‌بیوتیک (برای مثال، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل) است. اشریشیا کولای مورداستفاده به‌خودی‌خود هیچ مقاومتی ندارد. آنتی‌بیوتیک به محیط کشت آگار افزوده می‌شود؛ بنابراین، تنها کلون‌های باکتریایی که واجد پلاسمید هستند، بر روی محیط‌های کشت رشد می‌کنند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

سلول‌های اشریشیا کولی به‌صورت لایه‌ای نازک بر روی محیط کشت آگار گسترش می‌یابند؛ بنابراین، هر سلول تغییریافته پس‌ازاینکه امکان تکثیر در طول شب در دمای ۳۷ درجه پیدا کرد، می‌تواند یک پرگنه (کلنی) مجزایی را تشکیل دهد (تصویر ۱۱-۱۲) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

همراه با تکثیر باکتریایی، پلاسمید در داخل هر سلول باکتریایی رونویسی می‌شود؛ بنابراین، میلیون‌ها کپی از DNA واردشده در کلون‌های باکتریایی تولید می‌شود. یک ژن پلاسمیدی ثانویه به کار گرفته می‌شود تا پرگنه‌هایی (کلنی‌هایی) را که حاوی پلاسمیدهای غیر- نوترکیب هستند، شناسایی کند. این پرگنه‌ها، باکتری‌هایی هستند که پلاسمیدهایی را مصرف می‌کنند که خود – انسداد بوده و فاقد DNA نوترکیب افزوده هستند. پلاسمید مورداستفاده، ژنی برای آنزیم B-گالاکتوزیداز دارد، اما واحه برش پلاسمیدی در وسط این ژن قرار دارد؛ بنابراین، پلاسمیدهایی که

خود – انسداد هستند، هنوز یک ژن فعال B- گالاکتوزیداز دارند، درحالی‌که پلاسمیدهایی که حاوی DNA نوترکیب هستند، فاقد آن هستند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

استفاده از یک سوبسترای X-ژل که در واکنش با B- گالاکتوزیداز، فرآورده‌ای آبی‌رنگ تولید می‌کند، این امکان را فراهم می‌سازد که پرگنه های آبی‌رنگ (DNA غیر – نوترکیب) و پرگنه های سفید (DNA نوترکیب) از یکدیگر شناسایی شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

اگر خواسته باشیم، می‌توان پرگنه های سفید واجد DNA نوترکیب را به‌صورت تک‌تک از محیط کشت با استفاده از یک خلال‌دندان استریل برداشت و در یک «کتابخانه DNA» از کلون‌ها نگهداری کرد (این نوع کتابخانه‌های DNA برای بعضی از گونه‌ها به‌صورت تجاری در دسترس است). باوجوداین، بعضی از محققان برای توالی DNA ژنومیک موردنیاز خود بر روی پرگنه های تغییریافته اصلی کاوش می‌کنند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

این امر را می‌توان با قرار دادن دقیق یک غشای نایلونی بر روی محیط کشت انجام داد؛ بنابراین، بعضی از قسمت‌های هر پرگنه به غشا انتقال‌یافته و سپس می‌توان آن را با دقت از روی غشا خارج کرد. بااینکه این غشا بر روی محیط کشت قرار دارد، اما موقعیت نسبی آن‌ها را می‌توان علامت‌دار کرد. برای مثال این امر با سوراخ کردن هر دو توسط یک سوزن داغ قرمز صورت می‌گیرد؛ بنابراین، آن‌ها را می‌توان بعداً به‌دقت دوباره علامت‌گذاری کرد. این غشاها را می‌توان مورداستفاده قرار داد تا دیواره سلول باکتری‌ها شکسته شده و رشته‌های DNA جدا شوند (دناتوره کردن). سپس DNA با استفاده از حرارت و اشعه UV بر روی غشا تثبیت می‌شود. سپس غشاها را برای توالی‌های موردنظر مورد کاوش قرار می‌دهند. این امر با پیوند زنی DNA پلاسمید با یک کاوشگر برچسب دار صورت می‌گیرد که توالی کوتاهی از DNA تک‌رشته‌ای مکمل توالی موردنظر است. کاوشگرها را می‌توان مواد شیمیایی، فلورسنت یا رادیواکتیو برچسب دار کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

پیوند زنی مستلزم در معرض قرارگیری غشاهای نایلونی با کاوشگرهای برچسب دار در دمای بالا است که می‌تواند همه‌چیز را ذوب کند، اما با یک DNA بسیار خوب تطابق دارد؛ بنابراین، کاوشگر DNA تنها به DNA هدف annealed می‌شود و برچسب آن را با خود حمل می‌کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مثالی از تجسم اتورادیوگرافیک کاوشگرهای واجد برچسب رادیواکتیو در تصویر ۱۱-۱۳ نشان داده شده است. منافذ سوزنی بر روی غشاها را می‌توان علامت‌گذاری کرد که بر روی فیلم مشاهده شود؛ بنابراین، محیط‌های کشت اصلی با پرگنه های باکتریایی واجد رشد مجدد را می‌توان علامت‌دار کرد و کلون‌هایی را که علائم برچسب رادیواکتیو مثبت نشان می‌دهند، می‌توان شناسایی و سپس برای توالی یابی یا آنالیزهای بعدی جداسازی کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

امروزه برچسب‌های شیمیایی به‌جای برچسب‌های رادیواکتیو کورد استفاده قرار می‌گیرند اما قواعد تغییری نکرده‌اند. همچنین، روبوت‌ها توسعه‌یافته‌اند و امکان شناسایی با توان عملیاتی بالا و برداشتن پرگنه های نوترکیب را فراهم کرده‌اند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تکنیک PCR میلیون‌ها کپی از یک توالی DNA هدف خاص می‌سازد. کل فرآیند تقویت (کپی‌سازی) در ریزلوله‌ها یا ریزچاهک‌ها در داخل بشقاب‌های پلاستیکی (بشقاب‌های مایکروتیتر با ۹۶ چاهک) در یک دستگاه ماشین چرخه حرارتی کوچک بر روی میز آزمایشگاه صورت می‌گیرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

هر ریزلوله واجد شماری از اجزایی است که به همراه DNA الگویی که باید کپی شود، وجود دارند. میلیون‌ها کپی از یک جفت از پرایمرها – توالی‌های تک‌رشته‌ای کوتاه از DNA که هرکدام مکمل یک پایانه از توالی DNA هدف هستند، در این ریزلوله‌ها وجود دارند. یک آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت (برای مثال، پلیمراز Taq که از باکتری ترموس آکواتیکوس مقیم در چشمه‌های داغ نشأت گرفته است) به همراه چهار دی اکسی نوکلئوتاید تری فسفات (dATP، dCTP، dGTP و dTTP، درمجموع dNTPها) در یک بافر وجود دارند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۱۱: تکنیک کلونینگ قطعات DNA (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۱۲: پرگنه های اشریشیا کولای بر روی پلیت آگار (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

با اســتفاده از پلیمراز *Taq* بیشــینه درازای DNA هدف به‌طور مؤثری در حدود ۴-۳ کیلوباز اســت، زیرا قطعات درازتر را نمی‌توان به‌طور موفقیت‌آمیزی تقویت کرد و عدم دقت شروع به تجمع ســطوح غیرقابل‌قبول می‌کند. DNA پلیمرازهایی خاص برای آن‌ها که نیاز به رونویســی PCR دقیق دارند، وجود دارد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۱۳: اتورادیوگراف غشای نایلونی که از روی پلیت آگار برداشته‌شده و با یک کاوشگر برچسب دار رادیواکتیو نشــان‌دار شده است. پیام‌های مثبت قوی از کلون‌های مختلف دیده می‌شود. پیکان‌ها نشان‌دهنده نقاط نشانگر سوزن هستند (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـویر ۱۱-۱۴: یک چرخه حرارتی که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در آن انجام می‌شود. در خلال این واکنش سـرپوش حرارتی بر روی پلیـت میکرو تیتر را که در بلوک‌های حرارتی قرار دارند، می‌پوشـاند (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

سه مرحله در PCR وجود دارد که شامل واسرشته سازی، اتصال آغازگر و پلیمریزه شدن است. هر مرحله حدود یک دقیقه طول می‌کشـد و هرکدام در یک دمای متفاوت روی می‌دهد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مرحله واسـرشته سازی: محتویات ریزلوله‌ها را تا بالای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت می‌دهند تا دو رشته DNA الگو از هم جدا شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مرحله اتصـال آغازگر: دما سـریع کاهش داده می‌شـود تا به دمای تعیین‌شـده قبل از اتصـال، معمولاً حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد برسد. این دما به آغازگرها امکان می‌دهد که «بنشینند»، به این مفهوم که با توالی‌های مکمل خود بر روی DNA الگو اتصـال یابند. مرحله پلیمریزه شـدن: دما افزایش‌یافته و به ۷۲ درجه سـانتی‌گراد می‌رسـد. در این دما آنزیم پلیمراز *taq* بیشترین فعالیت را دارد و این امر تولید DNA جدید را در سـه جهت به دور از آغازگرها امکان‌پذیر می‌سـازد. سـپس این مراحل تکرار می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مرحله واسـرشـته سـازی (۲): این مخلوط دوباره تا حدود ۹۴ درجه سـانتی‌گراد حرارت داده می‌شـود تا همه مولکول‌هایی را که تازه تولیدشـده‌اند و همچنین بخش‌های دیگر DNA الگو را که به‌طور شانسی و اتفاقی اتصال یافته‌اند، واسرشته کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مرحله اتصـال آغازگر (۲): آغازگرها همانند اولین چرخه اتصـال می‌یابند، اما در این زمان برخی از این آغازگرها به رشته‌هایی از DNA که تازه تولیدشده‌اند، متصل می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مرحلـه پلیمریزه شـــدن (۲): تولیـد جدید مولکول‌ها روی می‌دهد و منجر به ایجاد بعضـــی از مولکول‌ها می‌شـود که یک رشـته با طول دقیق دارند و این دقت بر اسـاس توالی‌های آغازگر در هر انتها تعریف می‌شود (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مرحله واسـرشـته سـازی (۳): رشته‌های DNA دوباره از هم جدا می‌شوند و آماده می‌گردند تا مرحله اتصال را شروع کنند. از این نقطه به بعد، تعداد مولکول‌های جدید با طول دقیق که بر اساس دو آغازگر تعیین می‌شـود، در هر چرخه به‌صـورت تصـاعدی افزایش پیدا می‌کند. معمولاً ۴۰-۲۰ چرخه مورداسـتفاده قرار می‌گیرد و محصـول PCR شـامل کپی‌های بسیار زیادی از توالی هدف به همراه مقدار کمی DNA اصـلی و قطعه‌قطعه شـده اسـت (تصـویر ۱۱-۱۵) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـویر ۱۱-۱۵: چگونه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عمل می‌کند. برای راحتی کار فقط کپی یکی از رشته‌های DNA نشـان داده شـده اسـت. این فرایند برای رشته‌های دیگر نیز یکسان است. ازآنجاکه DNA تمپلیت به‌طور متعارف دورشـــته‌ای اســـت، هر قطعه از این تمپلیت به دو قطعه کامل تبدیل می‌شـــود (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـویر ۱۱-۱۶: تئوری این روش را توصـیف می‌کند. در عمل، روش PCR به متغیرهای کوچک بسیار حسـاس اسـت. برای هر جفت آغازگر، یک دمای مطلوب اتصـال و غلظت مناسـب یون منیزیوم وجود دارد. آلودگی اندک DNA الگو با پروتئین‌ها یا مواد دیگر غالباً می‌تواند مانع تقویت PCR شـود. پلیمراز *Taq* و بافرها از کارخانجات مختلف ازنظر خصوصیات اندکی با هم تفاوت دارند و ممکن است نیاز به دوباره مطلوب سـازی دارنـد و البتـه بـااینکـه دمـا در بین مراحل مختلف تغییر می‌کند، همه اجزا می‌توانند به‌روش‌های غیرقابل‌پیش‌بینی برهم‌کنش داشـته باشند. روش PCR به‌رغم این ملاحظات، در آزمایشگاه‌ها متداول شده اسـت و روش سـاده و مؤثری برای تولید کپی‌های بسـیار زیاد از توالی‌های DNA خاص به‌حساب می‌آید. می‌توان با اسـتفاده از روش PCR چندشـبکه‌ای، کارایی PCR را افزایش داد. در این روش، می‌توان از چندین دسـته از آغازگرها در هر واکنش اسـتفاده کرد. این امر امکان تقویت چندین قطعه با اندازه معین را هم‌زمان فراهم می‌کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

PCR کمی یا Quantitative PCR (qPCR)

PCR کمی – یا real time روشـی اسـت که ما را قادر می‌سازد که نه‌تنها کپی‌هایی از یک قطعه از DNA بسازیم، بلکه همچنین مقدار تجمع کپی‌های آن قطعه را در خلال پیشرفت نهایی PCR تعیین مقدار می‌کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

دو روش متداول برای شـناسـایی شـکل‌گیری کپی‌ها وجود دارد: در یک روش، از یک رنگ فلورسـنت مانند SYBER Green اسـتفاده می‌شـود که فقط با DNA دورشته‌ای (ds) اتصال می‌یابد. روش دیگر، مسـتلزم اسـتفاده از یک کاوشـگر اولیگونوکلئوتید اصلاح‌شده (معمولاً RNA) است که از فلوئورسنس برای نشان دادن پیوندزنی بعدی با توالی مکمل آن استفاده می‌کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

رهیافت اول از ویژگی کمتری نسبت به رهیافت دوم برخوردار است زیرا علاوه بر ثبت تعداد واقعی و نهایی کپی‌های مولکول‌های DNA دورشته‌ای استفاده می‌کند، بلکه همچنین تقویت DNA غیراختصاصی را نیز ثبت می‌کند. رهیافت دوم با استفاده از RNA ویژه – توالی یا کاوشگر DNA تنها کپی‌های مورد سؤال توالی DNA را شناسایی می‌کند. این رهیافت همچنین امکان استفاده از PCR چند شبکه‌ای را با برچسب‌های رنگی بر روی کاوشگرهای مختلف فراهم می‌کند تا توالی‌های مختلف متعدد را در همان PCR شناسایی کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تعیین مقدار PCR با رسم پلات فلوئورسنس ساتع شده در مقابل یک مقیاس لگاریتمی از تعداد چرخه‌ها صورت می‌گیرد. به لحاظ این‌که تعداد کپی‌ها در هر چرخه PCR دو برابر می‌شود، رسم پلات بر روی یک مقیاس لگاریتمی باید یک خط مستقیم باشد. یک حد آستانه برای تعیین در بالای سطح زمینه تنظیم می‌شود و این آستانه چرخه را C می‌نامند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تهیه یک پلات استاندارد با استفاده از رقت‌های پی‌درپی DNA الگو از یک ژن «خانه‌داری» تأمین‌کننده استانداردی خواهد بود که در مقایسه با برونداد qPCR می‌توان قرائت کرد. به لحاظ اینکه تعداد کپی‌ها باید در هر چرخه دو برابر شود، مقادیر نسبی DNA بین دو نمونه را می‌توان محاسبه کرد. برای مثال، یک نمونه با یک C چهارچرخه زودتر از نمونه دیگر است، باید ۲ (=۱۶) برابر بیشتر از DNA الگو باشد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

استفاده اصلی qPCR تخمین بیان ژن نسبی است. همان‌طور که در ابتدای فصل توصیف شد، ژن‌ها به RNA پیغامبر (mRNA) رونوشت برداری می‌شوند، اینترون ها محروم می‌شوند و توالی mRNA اکسون نهایی به سیتوپلاسم صادر می‌شود و در اینجا توالی‌های اسیدآمینه و نهایتاً پروتئین‌ها ساخته می‌شوند. مقدار یک پروتئین خاص ساخته شده در یک سلول بستگی به مقدار mRNA تولیدشده در اثر رونوشت برداری DNA از ژن رمزگذاری شده دارد؛ بنابراین، اگر این mRNA را بتوان اندازه‌گیری کرد، می‌تواند به‌عنوان یک پروکسی برای بیان آن ژن عمل کند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

یک نمونه RNA که از کل یک موجود زنده، یک اندام یا یک بافت گرفته می‌شود، ابتدا رونوشت برداری معکوس به عقب به DNA مکمل (cDNA) می‌شود و این امر توسط آنزیم ترانس کریپتاز معکوس صورت می‌گیرد. این cDNA با استفاده از qPCR به همراه آغازگرهای خاص برای یک بخش از ژن مشکوک تقویت می‌شود. هر زمان که یک چرخه کامل می‌شود، تعداد موارد تعیین‌شده فلورسنس افزایش می‌یابد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

این معیار پیشرفت PCR نیاز به تعیین مقدار توسط واحدهای مطلق ندارد، اما به یک شیوه مقایسه‌ای با نمونه‌های دیگر، می‌توان بیان نسبی ژن را در بافت‌ها، اندام‌ها، افراد یا شرایط محیطی

شـناسـایی کرد. اندازه قطعه‌های DNA حاصـل از کلونینگ یا PCR را می‌توان با در معرض قرار دادن آن با الکتروفورز (باکس ۲-۳) در مقایسـه با اسـتانداردهای اندازه شـناخته‌شـده تعیین کرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ازآنجـاکـه الکتروفورز قطعـات را بر اسـاس اندازه آن‌ها تفکیک می‌کند، لذا می‌توان آن را برای خالص‌سـازی قطعات DNA استفاده کرد. برای مثال، ماحصل واکنش PCR را می‌توان بر روی ژل آگـارز یـا اکریلامیـد الکتروفورز کرد. DNA را در خلال الکتروفورز یا پس‌ازآن می‌توان با اتیدیوم بروماید رنگ کرد که در زیر نور ماوراءبنفش تلألوی فلورسـانس نشـان می‌دهد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

امید می‌رود که یک نوار روشـن زیبا با اندازه درسـت داشـته باشـیم که فرآورده PCR مطلوب ماسـت و می‌توانیم سـپس آن قطعه از ژل را بریده و DNA را استخراج کنیم؛ بنابراین، ما فرآورده مطلوبی از PCR بدون اجزای پس‌مانده از این واکنش، مانند آغازگرها داشته باشیم که ممکن است بعداً با توالی یابی DNA در تعارض باشند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

باکس ۱۱-۲: جداسازی قطعات DNA و پروتئین‌ها بر اساس اندازه توسط الکتروفورز

الکتروفورز برای جداسـازی مولکول‌های DNA بر اسـاس اندازه‌یا مولکول‌های پروتئین بر اسـاس اندازه و شارژ مورداستفاده قرار می‌گیرد. این دستگاه بر اساس این قاعده عمل می‌کند که هنگامی‌که یک جریان الکتریکی از میان مولکول‌های شارژ شده مانند پروتئین‌ها یا DNA عبور می‌کند، آن‌ها در مسیر باریکه‌ای از ژل کشیده می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۱۶: دستگاه برای جداسازی آلوزایم ها با الکتروفورز ژل نشاسته افقی (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰)

انواعی از ژل‌ها را می‌توان استفاده کرد. به‌طورمعمول، برای پروتئین‌ها از ژل نشاسته هیدرولیز شده افقی یا ژل استات سلولز استفاده می‌شود. در سیستم‌های ژل افقی، نمونه‌ها را به داخل سوراخ‌هایی (شکاف‌هایی) در ژل، نزدیک یک انتها یا درست در آن انتها قرار می‌دهند. نمونه‌ای از یک دستگاه ژل نشاسته افقی در تصویر B ۲-a۳ ارائه شده است (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در مورد DNA، مینی ژل‌های آگارز افقی برای شناسایی ابتدایی‌تر طول قطعات (رزولوشن مطمئن کمتر از حدود bp ۱۰-۵ در ژل آگارز ۲٪، تصویر B ۲-۳ b) یا پلی اکریلامید برای شناسایی دقیق‌تر (کمتر از 1bp، تصویر B ۲-c۳) به کار می‌روند. ژل‌های پلی اکریلامید به‌طور متعارف عمودی قرار می‌گیرند. در باریکه ژل‌های پلی اکریلامید عمودی، نمونه‌ها در نوک ژل قرار داده می‌شوند و از یکدیگر توسط یک ساختار شانه مانند یا توسط جداکننده‌ها مجزا می‌شوند.تا پایان قرن گذشته، ژل‌های پلی اکریلامیدی جداسازی DNA و توالی یابی DNA به‌طورمعمول از نوع باریکه‌ای بود. در امروزی‌ترین توالی یاب های DNA، ژل پلی اکریلامید به داخل مجاری مویرگ مانند مجزا، به‌جای روش باریکه‌ای سازمان‌دهی شده است و نمونه‌های منفرد معرفی‌شده به داخل ماشین در صفحات مایکروتیتر ۹۶-چاهکی به‌طور اتوماتیک در این مجاری مویرگی منفرد وارد می‌شوند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۱۷: اگاروز مینی ژل که نشان‌دهنده پیپتینگ نمونه DNA در امتداد ژل است. ژل را به داخل mould می‌ریزند و اجازه می‌دهند که جا بگیرد. چاهک‌ها در خلال این روند برای ژل قالب تشکیل می‌دهند. نمونه‌ها رنگ می‌شوند تا روند الکتروفورز بازبینی (مونیتور) شود (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

به لحاظ اینکه عبور یک جریان الکتریکی از درون آب باعث تغییر pH می‌شود، محلول مورداستفاده برای برقراری اتصال الکتریکی با ژل همیشه بافره (خنثی) است. هنگامی‌که جریان

برای مدت کافی برقرار ماند تا مولکول‌های سریع المهاجرت را از کند مهاجرت مجزا نماید، الکتروفورز متوقف می‌شود و ژل‌ها را آماده می‌کنند تا نوارهای پروتئینی یا DNA را قابل‌مشاهده سازند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

در مورد پروتئین‌ها، یک رنگ پروتئینی غیراختصاصی عمومی را می‌توان مورداستفاده قرار داد. هرچند که در مورد آنزیم‌ها، موقعیت‌های باندهای مختلف (آلوزایم ها) بر روی ژل را با استفاده از رنگ‌های اختصاصی – زمینه شناسایی می‌کنند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

غلظت‌های بالای DNA نظیر آنچه در مینی - ژل‌های آگاروز به کار می‌روند، با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ می‌شوند که در زیر نور ماوراءبنفش حالت فلورسانس پیدا می‌کند. در مورد مقادیر کم DNA، روش‌های رنگ‌آمیزی بسیار حساس‌تر موردنیاز است. روش‌های بسیار حساس متداول قدیمی مانند برچسب‌گذاری ایزوتوپ رادیواکتیو (با استفاده از سولفور – ۳۵ (35S)، یا پتاسیم – ۳۲ (32P) و اوتورادیوگرافی متعاقب آن امروزه با روش‌های تعیین لیزری که ساده‌تر، ارزان‌تر و کم‌خطرتر بوده و از حساسیت برابری برخوردار است، جایگزین شده‌اند (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

ماشین‌های آنالیز DNA امروزی باریکه‌ای یا مویرگی که برای شناسایی مارکرهای ژنتیکی مورداستفاده قرار می‌گیرند، از برچسب‌گذاری شیمیایی – نوری بهره می‌گیرند که می‌توان آن را مستقیماً با استفاده از لیزر تثبیت‌شده قرائت کرد و این امر زمانی روی می‌دهد که قطعات DNA برچسب دار از درون ژل باریکه‌ای یا مویرگی عبور می‌کنند. این امر خطرات و پیچیدگی‌های کار با رادیوایزوتوپ‌ها را از بین می‌برد و به‌وسیله برچسب‌هایی با رنگ‌های مختلف، ما را قادر می‌سازد که طول‌های قطعات بیشتری را از یک ژل منفرد یا مویرگ منفرد به دست آورد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

استانداردهای مختلفی را می‌توان بر روی ژل‌ها در امتداد نمونه‌ها برای مقایسه مورداستفاده قرار داد. رنگ‌ها و نمونه‌هایی از افراد با ژنوتایپ شناخته‌شده بر روی ژل‌های پروتئین و آنزیم ران می‌شوند، درحالی‌که نوارهای DNA با اندازه‌های شناخته‌شده (در جفت باز، bp، یا کیلو باز، kb) به‌عنوان استانداردهای اندازه مولکولی در مینی – ژل یا الکتروفورز برای توالی یابی مورداستفاده قرار می‌گیرد (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصـویر ۱۱-۱۸: دسـتگاه توالی یاب DNA با ژل اسلب (slab gel) که سینی‌های بالایی و پایینی را نشان می‌دهد. یک ژل بسـیار نازک بین دو پلیت شیشه‌ای قرار می‌گیرد (ساندویچ می‌شود) و بین سینی‌های بافره بالا و پایین ارتباط برقرار می‌کند. داخل دستگاه نشان‌دهنده جزئیات یک شانه دندان - کوسه‌ای (shark-tooth comb) بر روی قسـمت بالای ژل اسـت. تا ۹۸ نمونه را می‌توان در داخل هر یک از حجره‌های بین دندان‌ها به‌طور انفرادی قرار داد (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

هنگامی-که DNA جداشـده بر اسـاس اندازه بر روی ژل‌های پلی اکریلامید شـکننده نیاز به اعمال دیگری مانند پیوندزنی به کاوشـگرهای برچسـب دار داشـته باشد، ابتدا به یک غشای نایلونی سفت‌تر انتقال داده می‌شوند و این امر توسط تکنیکی که به آن نقطه‌گذاری جنوبی می‌نامند، صورت می‌گیرد (تصویر ۱۱-۱۹) (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۱-۱۹: روش ساوترن بلاتینگ (نقطه‌گذاری ساوترن) برای انتقال DNA از ژل به غشا (اقتباس از بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

هنگامی‌که کپی‌های با کیفیت بالای زیادی از DNA هدف در یک محلول خالص داشته باشیم، می‌توان از روش توالی یابی سانگر استاندارد (باکس ۲-۴) برای شناسایی توالی دقیق بازها (A، C، G و T) در امتداد DNA استفاده کرد. پیشرفت‌های تکنولوژیک اخیر ما را قادر ساخته است تعداد زیادی از قطعات DNA را برای توالی یابی با مهارت سریع انجام دهیم (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

مقایسه توالی بین افراد، بین جمعیت‌ها، بین گونه‌ها یا بین تقسیمات سیستماتیک رده‌های بالا، اطلاعاتی را درباره روابط بین دستجات فراهم می‌کند. البته رهیافت‌های مختلفی موردنیاز است تا به سطوح مختلف ارتباطات نشانی دهیم. اگرچه ما می‌توانیم فرض کنیم که شانس رخداد یک جهش (موتاسیون) نقطه‌ای در هر جایی از مولکول‌های DNA که ژنوم یک گونه خاص را تشکیل می‌دهند، یکسان است، سؤال مهم این است که تبعات این جهش نقطه‌ای برای آن‌گونه چیست؟ (بیمونت و همکاران، ۲۰۱۰).

آشنایی با دستگاه الکتروفورز

الکتروفورز (Electrophoresis) از دو کلمه Electro (الکتریکی) و Phoresis به معنی حرکت و انتقال ذره تشکیل شده است و در کل به معنی حرکت ذرات در یک مایع تحت میدان الکتریکی است.

در آزمایش‌های بالینی معمول تشخیص آنزیم‌های مهم موجود در سرم خون ازجمله فاکتورهایی است که اغلب موردتوجه قرار می‌گیرد. الکتروفورز تحت شرایط خاصی قادر است این آنزیم‌ها را به‌صورت کسرهایی نشان دهد که مقادیر این کسرها بیانگر احتمال وجود صدمات مغزی، انفارکتوس میوکارد، انفارکتوس ریوی، دیستروفی ماهیچه‌ای یا بیماری‌های کبدی هستند.

روش‌کار

الکتروفورز روشی است که در آن نمونه‌هایی که بار الکتریکی دارند، تحت تأثیر یک میدان الکتریکی از میان شبکه‌ای متخلخل حرکت می‌کنند. سرعت حرکت مولکول‌ها در این شرایط نه‌تنها تحت تأثیر بار الکتریکی است بلکه عواملی دیگری نظیر اندازه و شکل مولکول نیز در این امر دخیل هستند. به همین دلیل الکتروفورز روشی مناسب و کارآمد در جداسازی مولکول مورداستفاده قرار می‌گیرد. به‌طورمعمول برای الکتروفورز یک مخلوط مولکولی، لایه‌نازکی از آن، بر روی شبکه‌ای متخلخل که محلولی را درون خود محبوس کرده است، قرار داده می‌شود. پس از برقراری میدان الکتریکی با اعمال اختلاف پتانسیل در دو سوی این شبکه، مولکول‌های موجود در نمونه با سرعت‌های متفاوتی درون شبکه متخلخل شروع به حرکت می‌کنند. این اختلاف سرعت مبنای جداسازی در الکتروفورز است. در پایان، مولکول‌های پروتئینی مختلف به‌صورت باندهایی مجزا در قسمت‌های مختلف شبکه آشکار می‌شوند.شبکه متخلخل در ممانعت از انتشار مولکول‌ها در اثر گرمای ایجادشده به خاطر جریان الکتریکی نقش مهمی دارد. در اغلب دستگاه‌های الکتروفورز، ژل مابین دو محفظه بافری قرار می‌گیرد به‌طوری‌که ژل تنها واسطه در عبور جریان الکتریسیته بین این دو محفظه باشد.

تصویر ۱۱-۲۰: شمایی از دستگاه الکتروفورز

اجزای دستگاه

دســتگاه الکتروفورز از بخش‌های زیر تشــکیل یافته اســت: محفظه، منبع تغذیه الکتریکی، محیط پشــتیبان، معرف شیمیایی، گرمکن (انکوباتور) و غلظت سنج. محفظه الکتروفورز از دو سلول مجزا تشــکیــل یافته که در یکی آند (الکترود مثبت) و در دیگری کاتد (الکترود منفی) قرار می‌گیرد. جنس الکترودهای به‌کاررفته معمولاً گرافیت (کربن) یا پلاتین است. الکترو فورز پروتئین‌های ادرار، الکتروفورز پروتئین‌های ادرار در موارد بیماری‌های اتوایمیون، بیماری‌های کبدی و کلیوی، التهابات حاد و مزمن در خواست می‌شود.

روش انجام آزمایش

برای انجام این تســت ابتدا نمونه موردنظر را به دمای اتاق رســانده و ســپس مراحل انجام کار را به‌دقت دنبال می‌کنیم. مراحل به ترتیب زیر هستند:

۱. کاغذ اســتات ســلولز که به‌صورت ژل‌هایی هستند که برای ۸ نمونه اغلب کاربرد دارند در بافر مخصوص به مدت ۱۰ دقیقه خیسانده می‌شود.
۲. بعد از ۱۰ دقیقه این کاغذ را از محلول در آورده و بین ۲ کاغذ خشــک‌کن آرام قرار داده می‌شود تا نم‌گیری مختصری انجام شود ولی کاغذ نباید خشک شود.
۳. در این مرحله نمونه توسط اپلیکاتور خاصی که به‌منظور نمونه گذاری استفاده می‌شود بر روی کاغذ منتقل می‌شــود. لازم اســت که نمونه‌ها ۱/۵ســانتیمتر از لبه کاغذ و حداقل ۱ سانتیمتر از کناره‌ها فاصله داشته باشند.
۴. ســپس ژل را برگردانده و از پشــت داخل تانک الکتروفورز که حاوی بافر مخصــوص است قرار داده می‌شود به‌طوری‌که نمونه در سمت کاتد باشد.

۵. به‌وسیله ۲ لام تمیز و کاغذ صافی پلی برای ارتباط بهتر بافر با ژل تهیه می‌شود.
۶. تانک را به منبع تغذیه متصل کرده و با تنظیم دستگاه روی ولتاژ مناسب (۱۶۰ ولت) که شدت‌جریانی حدود ۶-۴ آمپر را فراهم کند جریان الکتریکی برقرار می‌شود.بعد از چند بار مصرف بافر جریان افزایش می‌یابد که در این زمان بافر تانک باید تعویض شده و از بافر تازه استفاده نمود.
۷. بعد از طی زمانی حدود ۲۰ دقیقه، دستگاه را خاموش کرده و مراحل رنگ‌آمیزی، رنگ بری، آب‌گیری و شفاف‌سازی انجام می‌شود.
۸. درنهایت باندها به‌وسیله اسکنر و برنامه مخصوص خوانده می‌شوند.

مزایای الکتروفورز

- امکان جداسازی و تعیین پروتئین‌ها
- قابلیت تفکیک زمانی و مکانی مراحل آنالیز
- سهولت و ارزانی نسبی
- غنای اطلاعات نهفته در داده‌های به‌دست‌آمده از الکتروفورز دوبعدی

الکتروفورز از شناخته‌شده‌ترین روش‌های آزمایشگاهی برای جداسازی بیومولکول‌ها است. این روش در سال ۱۸۰۷ توسط ریوس[1] کشف شد. او مشاهده کرد که ذرات خاک رس تحت تأثیر میدان الکتریکی در آب پراکنده می‌شوند. به‌طورکلی الکتروفورز حرکت ذرات پراکنده در داخل مایعی تحت تأثیر یک میدان الکتریکی یکنواخت است. همین حرکت در فضایی با میدان الکتریکی غیریکنواخت دی الکتروفورز نامیده می‌شود.

1- Reuss

تصویر ۱۱-۲۱: شمایی دیگر از دستگاه الکتروفورز

الکتروفورز به این دلیل اتفاق می‌افتد که ذرات معلق در مایع معمولاً دارای بار الکتریکی سطحی هستند و میدان الکتریکی نیروی کولونی الکترواستاتیک به این ذرات باردار اعمال می‌کند. اخیراً شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، نظریه‌ای بیان داشته‌اند مبنی بر اینکه برای انجام الکتروفورز حتماً نباید ذرات بار سطحی داشته باشند و حتی ذرات خنثی نیز به علت ساختار مولکولی خاصی که آب به‌عنوان مایع واسط دارد، می‌توانند الکتروفورز شوند.

نیروی کولونی الکترواستاتیک اعمال‌شده به بار سطحی، با نیروهای مخالف الکترواستاتیک کاهش پیدا می‌کند. بر طبق تئوری لایه مضاعف، تمام سطوح باردار در مایعات با لایه‌ای از بار مخالف پوشانده می‌شوند که ازنظر مقداری کاملاً برابر با بار سطحی است، اما با علامت مخالف آن. میدان الکتریکی همانند بار سطحی به این لایه نیرو وارد می‌کند. مجموع این نیروها برابر است با اولین نیروی نامبرده، اما در جهت مخالف آن. در حقیقت این نیرو به یون‌های موجود در لایه ثانویه اعمال می‌شود. این یون‌ها در فاصله‌ای از سطح ذره قرار می‌گیرند و بخشی از این نیروی الکترواستاتیک را از طریق تنش برش سیال به سطح ذره منتقل می‌کنند این بخش از نیرو که به بدنه ذره وارد می‌شود، نیروی منفی الکتروفورتیک نامیده می‌شود.

یک نیروی الکتریکی دیگر نیز وجود دارد که مرتبط با انحراف لایه ثانویه است و مربوط به تقارن کروی و رسانایی سطح است و به سبب زیادی یون‌ها در لایه ثانویه به وجود می‌آید. این نیرو، نیروی تخفیف الکتروفورتیک نامیده می‌شود. تمام این نیروها با اصطکاک هیدرودینامیک، به تعادل می‌رسند و باعث حرکت ذرات در سیال می‌شود. سرعت این حرکت v ، متناسب با شدت میدان

الکتریکی E است (البته درصورتی‌که این میدان خیلی قوی نباشد.) ضریب این تناسب تحرک پذیری الکتروفورتیک است که رابطه بین شدت میدان الکتریکی و سرعت ذره را مشخص می‌نماید: ماکرومولکول‌هایی مانند اسید نوکلئیک، DNA و پروتئین‌ها نیز باردار هستند و می‌توان با قرار دادن آن‌ها در یک میدان الکتریکی، بر مبنای خاصیت الکتروفورز آن‌ها را تفکیک کرد. سرعت حرکت مولکول‌ها در این شرایط نه‌تنها تحت تأثیر بار الکتریکی و شدت میدان الکتریکی است، بلکه عواملی نظیر اندازه، وزن مولکولی و شکل فضایی مولکول نیز در این امر دخیل هستند. همچنین اثرات محیطی نظیر نوع و نحوه استفاده از بافرها و حرارت ایجادشده در حین کار نیز از عوامل مؤثر بر جداسازی مولکول‌های نمونه هستند. معمولاً الکتروفورز برای تفکیک مولکول‌های بزرگی چون پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به‌کاربرده می‌شود، اما در مواردی نیز برای جداسازی مولکول‌های باردار کوچک‌تر نظیر قندها، اسیدهای آمینه، پپتیدها و حتی یون‌های ساده مورداستفاده قرار می‌گیرد.

در طی قرن ۲۰ میلادی چندین تئوری برای محاسبه این پارامتر به وجود آمده‌اند؛ که مهم‌ترین آن‌ها نظریه اسمولوکوفسکی در سال ۱۹۰۳ میلادی بود. آرن تیسلیوس در سال ۱۹۴۸ به خاطر زحماتی که برای الکتروفورز و آنالیز جذبی کشید برنده جایزه نوبل شد و ازاین‌رو او را پدر الکتروفورز نامیدند. اولین الکتروفورز نیز الکتروفورز بدون مرز تیسلیوس نام داشت که به‌وسیله آن محلول‌های پروتئینی غلیظ را در یک تیوب U شکل بزرگ که به‌وسیله بافر پوشانده شده بود، مورد آزمایش قرار می‌دادند. این روش الکتروفورز بسیار مشکل بود، به همین دلیل در سال ۱۹۵۰ تغییراتی در عملکرد آن اعمال شد. ابتدا از فیلترهای کاغذی و استات سلولز استفاده می‌شد، اما به دلیل ظرفیت محدود و رزولوشن پایین این مواد، جای خود را به ژل دادند. ژل‌های استفاده‌شده در آن زمان به علت بزرگ بودن خلل و فرجها قادر نبودند پروتئین‌ها را به تفکیک سایز جداسازی کنند، ازاین‌رو به‌تدریج به ژل‌هایی چون آگاروز دست‌یافتند.

امروزه الکتروفورز ژلی از بخش‌های جداناپذیر هر تحقیق و فعالیت‌های آزمایشگاهی به‌منظور جداسازی ماکرومولکول‌ها است. محدوده وسیعی از فعالیت‌های آزمایشگاهی تحقیقاتی و کلینیکی مانند تسلسل ژن‌ها، جداسازی کروموزوم‌ها، جداسازی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها توسط این روش انجام می‌گیرد. علاوه بر این، استفاده از الکتروفورز از مرز آزمایشگاه‌ها فراتر رفته و به‌عنوان شاهدی برای وکلا، قضات و هیات منصفه در امور قضایی محسوب می‌شود. تشخیص هویت DNA به‌خصوص در موارد تعویض نوزاد در بیمارستان‌ها و تعیین والدین فرد کاربرد بسیاری در علوم ژنتیک پیدا کرده است.

در حال حاضر آگاروز و پلی کریل آمید متداول‌ترین و پرکاربردترین ماده به‌عنوان واسط در الکتروفورز ژلی محسوب می‌شوند. در اغلب دستگاه‌های الکتروفورز، ژل مابین دو محفظه بافری قرار

می‌گیرد به‌طوری‌که ژل تنها واسطه در عبور جریان الکتریسیته بین این دو محفظه باشد. هر دو شبکه خلل و فرج داری تولید می‌کنند که میکرومولکول‌هایی بارداری را که در پاسخ به میدان الکتریکی جابه‌جا می‌شوند در خود جای می‌دهند. به‌عنوان‌مثال زمانی که جریان اعمال می‌شود، DNAهای با بار منفی به سمت الکترودهای باردار مثبت حرکت می‌کنند. خلل و فرج‌های موجود در شبکه ژلی انتقال مولکول‌های بزرگ را محدود می‌کنند و این در حالی است که مولکول‌های کوچک‌تر با آزادی بیشتری منتقل می‌شوند و در فاصله دورتری از الکترودها قرار می‌گیرند. این غربال مولکولی مولکول‌ها را بر مبنای سایزشان جدا می‌کند. همچنین می‌توان مولکول‌ها را بر مبنای بار اولیه‌ای که داشتند جداسازی کرد. مولکول‌هایی که بار بیشتری دارند تحرک الکتروفورزی بیشتری از خود نشان می‌دهند و سریع‌تر منتقل می‌شوند بدین ترتیب درون ژل با اولویت باری که داشتند قرار می‌گیرند. جداسازی بر مبنای بار به ژلی نیاز دارد که مانند آگاروز دارای خلل و فرج‌های بزرگ‌تری باشند. آگاروز برای جداسازی اسید نوکلئیک ها و پروتئین‌های خیلی بزرگ یا ترکیب‌ها استفاده می‌شود. آگاروز یک پلی ساکارید طبیعی است که از نوع خاصی جلبک دریایی قرمز به دست می‌آید. زمانی که گرما داده شده و سپس سرد می‌شود به‌صورت جامد متخلخلی با خلل و فرج‌های نسبتاً بزرگ تبدیل می‌شود. الکتروفورز ژل آگاروز (AGE) را می‌توان برای جداسازی مولکول‌ها بر مبنای بار یا وزن مولکولی‌شان استفاده کرد. یکی از مهم‌ترین کاربردهای AGEجداسازی بخش‌های حاصل از برش DNA با آنزیم‌های محدودکننده است.

در طی انجام الکتروفورز ثابت نگاه‌داشتن حرارت اهمیت بسیاری دارد چراکه به حفظ تکرارپذیری آزمایش کمک می‌کند. به‌عنوان‌مثال پلیمریزه شدن آکریل آمید یک واکنش گرمازا است و گرمای حاصله به‌خصوص در مورد ژل‌های غلیظ‌تر، ممکن است باعث بروز بی‌نظمی در اندازه‌ی منافذ ژل شود. انتقال گرما معمولاً مشکلی در ژل‌هایی با غلظت کمتر از ٪۱۵ T ایجاد نمی‌کند. البته ممکن است بالا رفتن دما مشکلات دیگری چون شکستن شیشه‌های الکتروفورز و آسیب به دستگاه را منجر شود. پروتئین‌ها به علت خصوصیت آمفوتری خود تحت تأثیر pH محیط بارالکتریکی خاص خود را نشان می‌دهند. بدین علت در جداسازی توسط الکتروفورز باید pH محلول‌های مورداستفاده ثابت باقی بماند. ازآنجاکه الکترولیز آب در آند یون‌ای "H+" و در کاتود یون‌های "OH-" ایجاد می‌کند، برای ثابت نگاه‌داشتن pH محلول‌های مورداستفاده، باید آن‌ها را بافر کرد.

نوع دیگری از الکتروفورز، الکتروفورز مویین (CE) است. این تکنیک که عمده‌ترین کاربرد آن در شیمی دارویی و درمانی است، برای جداسازی مولکول‌های درشت و ریز در مجاری بسیار نازک (با قطر داخلی ۲۰۰-۲۰میکرومتر) استفاده می‌شود. در این روش، جداسازی با ولتاژ بالا (۳۰-۱۰

کیلوولت) امکان‌پذیر می‌شود. از محاسن CE می‌توان به‌سرعت دستیابی به نتیجه در آنالیز یون‌ها اشاره کرد. به‌طورکلی CE بیشتر زمانی مطرح می‌شود که با آنالیت‌های باردار با پلاریته و قطبیت زیاد سروکار داریم. این تکنولوژی در علوم بایوتکنولوژی جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده و در آنالیز ماکرومولکول‌هایی چون پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها جایگزین خوبی برای الکتروفورز سنتی به شمار می‌رود. همچنین تکنولوژیCE برای سرعت بخشی به رشد علم ژنتیک به خدمت گرفته‌شده است. استفاده از الکتروفورز موئین در علوم تحلیلی به‌خصوص در زمینه دارویی و زهر شناسی رشد بسیاری داشته است.

الکتروفورز موئین دربرگیرنده چندین تکنیک است که عملکرد و مشخصه‌های متفاوتی با هم دارند. این تکنیک‌ها که به مودهای الکتروفورز موئین معروف هستند عبارت‌اند از: الکتروفورز ناحیه‌ای موئین(CZE)، تمرکز ایزوالکتریک (IEF)، الکتروفورز موئین ژلی، ایزوتاکوفورز (ITP) و کروماتوگرافی الکتروسینتیک موئین.

نوع دیگری از الکتروفورز که قدیمی‌ترین نوع این تکنیک محسوب می‌شود، الکتروفورز سطحی نام دارد. در این روش از یک لایه کاغذی متخلخلی با طول ۱۰-۲۰ سانتیمتر، ترموپلاستیکی متشکل از سلولز و اسید استیک و ژل پلیمر استفاده می‌شود.

تشخیص هویت DNA به‌وسیله الکتروفورز، اندازه‌گیری هر رشته و شمارش تعداد بخش‌ها و برش‌های تکرار شده در آن است. دانشمندان برای این کار از روش الکتروفورز ژلی استفاده می‌کنند. بدین ترتیب که با جریان الکتریکی رشته‌های DNA را از میان ژل عبور می‌دهند. چون هر بیت از DNA دارای بار منفی است و در معرض نیروی الکتریکی با بار برابر قرار می‌گیرد و آن را به سمت وجهی از ژل که بار مثبت دارد، پیش می‌برد. ذرات کوچک‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند. وقتی جریان برداشته می‌شود، از ژل تصویری گرفته می‌شود تا مشخص شود هر بیت چه قدر جابه‌جا شده است. با مقایسه باندهای ایجادشده با نمونه‌های استاندارد که سایزهای شناخته‌شده‌ای دارند، طول هر بخش از DNA به‌دقت اندازه‌گیری می‌شود.

تصویر ۱۱-۲۲: شمایی از دستگاه الکتروفورز افقی

تصویر ۱۱-۲۳: شمایی دیگر از دستگاه الکتروفورز عمودی

تعیین توالی DNA

امروزه تعیین توالی DNA جزء لاینفک علم مدرن به‌حساب می‌آید. به‌طور ی که از ا ین تکنیک در زمینه‌های مختلف میکروبیولوژی ازجمله ردیابی بیماری‌های عفونی و مطالعه تنوع جوامع میکروبی استفاده می‌شود. روش‌های متفاوتی برای تعیین توالی DNA وجود دارد. این امر دانشمندان را قادر ساخته که به‌راحتی به مطالعه مستقیم ژنوم بپردازند، اما هرکدام از این تکنیک‌ها معایب و مزایای خاص خود را دارند. ۱- لذا در این قسمت سعی بر این است که مقایسه‌ای اجمالی بین تکنیک‌های حاضر صورت گیرد. چندین روش مختلف برای تعیین توالی

DNAوجود دارد که شامل توالی یاب های نسل اول، توالی یاب های نسل دوم و توالی یاب های نسل سوم است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

توالی یاب های نسل اول

تعیین توالی بر پایه ختم زنجیر: این تکنیک به‌واسطه سنگر و همکارانش در اواسط ۱۹۷۰ ابداع شد. مبنای این تکنیک، استفاده از نوکلئوتیدهای ویژه‌ای موسوم به (ddNTPs) dideoxynucleotids بوده که فاقد گروه OH بر روی کربن′ ۳ خود هستند و اگر در ساختار یک اسید نوکلئیک قرار گیرند، این زنجیره دیگر بلندتر نخواهد شد. ازاین‌رو، به آن‌ها نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت‌ناپذیر نیز گفته می‌شود که به‌واسطه مواد رادیواکتیو(به‌طور عمده باs35) لیبل (برچسب‌گذاری) می‌شوند. ۲- این تکنیک نیازمند DNA تک رشته به‌عنوان الگو بوده که برای به دست آوردن آن، ابتداDNA ژنومی را استخراج کرده و به‌واسطه تیمار با آنزیم‌های محدودالاثر آن را قطعه‌قطعه می‌کنیم. سپس از حاملینی (فاژمیدها) برای انتقال این قطعات به داخل میزبان‌های باکتریایی استفاده کرده تا تعداد این قطعات هم‌زمان با تکثیر میزبان افزایش یابد. فاژمیدها قادر به تکثیر DNA به‌صورت تک‌رشته‌ای هستند. درنهایت، نمونه حاوی DNAتک رشته را به ۴ قسمت مساوی تقسیم کرده و به داخل چهار لوله‌آزمایش مختلف انتقال داده سپس کلیه مواد موردنیاز برای همانندسازی نیز به داخل هر لوله اضافه می‌شود. از طرفی در هر لوله علاوه بر نوکلئوتیدهای طبیعی(dNTP) ، یک نوع ddNTP خاص نیز قرار داده می‌شود. ازآنجاکه نوکلئوتیدهای طبیعی در مقادیر بیشتری نسبت به ddNTP ها در این پروسه حضور دارند و آنزیم پلیمراز، ddNTP ها را به‌طور اتفاقی به زنجیره در حال ساخت اضافه می‌کند، درنتیجه در هر لوله‌آزمایش قطعاتی با اندازه‌های مختلف ایجاد می‌شود که هر یک به ddNTP خاص آن لوله ختم شده است. درنهایت این قطعات به‌واسطه حرارت به‌صورت تک‌رشته‌ای تبدیل می‌شوند. سپس این قطعات بر روی ژل پلی آکریل آمید حرکت داده می‌شوند و از طریق اتورادیوگراف بر روی ژل ظاهر می‌شوند. برای به دست آوردن توالی DNA، نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت‌ناپذیر موجود در انتهای این قطعات از پایین به بالا خوانده می‌شود. سپس مکمل آن‌ها نوشته شده که مشابه با توالی قطعه موردنظر است. در شکل ۱ و ۲ مراحل کار نشان داده شده است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۲۴: تعیین توالی به روش سنگر (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۲۵: نحوه خواندن نوکلئوتیدها از روی ژل الکتروفورز
(اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تعیین توالی به روش ماکسام-گیلبرت

این تکنیک در سال ۱۹۷۷ توسط ماکسام و گیلبرت ابداع شد. اساس کار این روش بر پایه هضم شیمیایی بوده و نیازی به پلیمریزه کردن قطعه موردنظر نیست. در این روش ابتدا به انتهای ′۵ DNAدو رشته، یک گروه فسفات رادیواکتیو (P32) اضافه می‌شود. سپس با یک تیمار آنزیمی توسط یک آنزیم محدود الاثر یک انتهای این قطعه را بریده و DNA را حرارت می‌دهند تا

تک‌رشـته‌ای شـود. سـپس دو رشـته را به‌واسطه الکتروفورز از یکدیگر جدا می‌کنند. درنهایت تنها رشته‌ای که یک انتهای آن با فسفات رادیواکتیو لیبل شده است، توسط اتورادیوگراف ظاهرشده و از روی ژل تخلیص شـده و به داخل ۴ لوله‌آزمایش مختلف منتقل می‌شـود. سـپس هر یک از نمونه‌ها توسـط یک ماده شیمیایی خاص تیمار می‌شود. واکنش به‌گونه‌ای طراحی‌شده که قطعاتی با اندازه‌های مختلف ایجاد می‌شـود. این قطعات در ژل الکتروفورز از یکدیگر جداشـده و سپس به ترتیب از پایین به سـمت بالای ژل خوانده می‌شـوند. تیمارهای شـیمیایی شـامل: ۱- اسیدفرمیک ۶۰٪ سـبب شـکسـته شـدن پیوندها از محل پورین‌ها می‌شود (A+G). ۲- دی متیل سولفات سـبب شکسته شدن پیوند از محل G می‌شود، ۳- هیدرازین سبب شکستن پیوند از محل بازهای پیریمیدین می‌شود (C+T) و ۴- NaCl یک و نیم مولار سبب شکستن پیوند از بازC می‌شود. نمایی از این تکنیک در تصویر ۱۱-۲۶ نشان داده شده است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۲۶: تعیین توالی به روش ماکسام – گیلبرت (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

توالی یاب‌های نسل دوم

با پیشـرفت‌های ایجادشـده در زمینه‌های نانوتکنولوژی و بیوانفورماتیک، روش‌های جایگزینی برای افزایش سـرعت و افزایش بازدهی تعیین توالی DNA ابداع شـده اسـت. اصـطلاح Next Generation Sequencing برای توصیف مجموعه‌ای از فناوری‌ها با قدرت بالاتر نسبت به توالی یابی به شـیوه سـنگر مورداسـتفاده قرار می‌گیرد که شـامل نسل دوم از دستگاه‌های تعیین توالی

بوده که قطعات را به‌صورت هم‌زمان و با سرعت‌بالا تعیین توالی می‌کنند. برتری این روش‌ها نسبت به روش تعیین توالی بر پایه ختم زنجیر این است که این تکنیک‌ها بدون نیاز به ژل و در حین سنتزDNA ، توالی DNA را ثبت می‌کنند. از طرفی این سیستم نیازی به کلونینگ نداشته و از پروسه PCR برای ازدیاد قطعه موردنظر استفاده می‌کند. این امر منجر به افزایش سرعت و بازدهی تعیین توالی DNA می‌شود. این تکنیک‌ها شامل:

تکنیک پایروسکوئنسینگ

تکنیک پایروسکوئنسینگ توسط دکتر مصطفی رونقی و همکارانش ابداع شد. این روش نیز نیازمند DNA تک رشته به‌عنوان الگوست که از طریق دناتوره کردن محصولاتPCR به دست می‌آید . در این تکنیک پس از اتصال پرایمر به توالی مکمل، سنتز رشته جدید به‌واسطه آنزیم پلیمراز آغاز می‌شود. در واکنش‌های پلیمریزاسیون به ازای هر پیوند فسفودی استر، یک گروه پیروفسفات (ppi)و یک یون هیدروژن آزاد می‌شود. آنزیمATP سولفوریلاز از این گروه پیروفسفات به همراه آدنوزین فسفوسولفات (APS) موجود در مخلوط واکنش به‌منظور تولید ATP استفاده می‌کند. ATP تولیدی نیز انرژی موردنیاز برای آنزیمی موسوم به لوسیفراز را مهیا می‌کند .این آنزیم، لوسیفرین را اکسید کرده و منجر به تولید اکسی لوسیفرین می‌شود که درنتیجه این واکنش نور تولید می‌شود. این سیگنال نوری توسط دوربین‌های حساس به سیگنال‌های ساطع‌شده موسوم به CCD به‌صورت یک پیک ثبت می‌شود و ازآنجاکه نوکلئوتیدهایی که در هر مرحله اضافه می‌شوند، مشخص و یکسان هستند، می‌توان بر اساس تولید این پیک، توالی DNA را در حین سنتز به دست آورد. از طرفی در هر مرحله برای اضافه کردن نوکلئوتیدهای جدید باید نوکلئوتیدهای قبلی از محیط حذف شوند که این کار توسط آنزیمی موسوم به آپیراز انجام می‌شود. آپیراز یک آنزیم نوکلئوتیداز است. درتصویر ۱۱-۲۷ نمایی از این پروسه نشان داده شده است. فرم تجاری روش پایروسکوئنسینگ در سال ۲۰۰۵ توسط شرکت Science Life ۴۵۴ ارائه شد که از آن به‌عنوان تعیین توالی به روشPyrosequencing 454 نیز یاد می‌شود. در این تکنیک، ابتدا DNA ژنومی به قطعات ۳۰۰ الی ۵۰۰ جفت بازی شکسته شده و سپس به‌صورت تک رشته به مهره‌های فلزی متصل می‌شود. بدین‌صورت که در ابتدا قبل از دناتوره شدن، به دو سمت این قطعات آداپتور متصل می‌شود. سپس این قطعات تک‌رشته‌ای می‌شوند. آداپتور دو نقش مهم را ایفا می‌کند. اولاً در اتصال قطعات تک رشته به مهره‌های فلزی کوچک نقش داشته چراکه یکی از این آداپتورها در انتهای ′۵ خود حاوی یک گروه بیوتین است و ازآنجاکه این دانه‌های فلزی با استرپتوآویدین پوشیده شده‌اند، اتصال این قطعات تک رشته به دانه‌ها به‌واسطه تمایل بالای اتصال استرپتوآویدین به بیوتین انجام می‌شود. این پروسه به‌گونه‌ای

طراحی‌شـده اسـت که به هر مهره فلزی یک قطعه DNA تک رشـته متصـل می‌شـود. درنهایت هرکدام از این مهره‌ها، در درون یک قطره آب در امولسـیون روغن قرار می‌گیرند که در اصـطلاح، این فضـا میکرورآکتور نامیده می‌شـود و واکنش PCR به‌منظور تکثیر قطعه DNA درون این میکرورآکتور صورت می‌گیرد (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

میکرورآکتورها تمامی عوامل موردنیاز برای تکثیر قطعه DNA تک رشـته را دارند و به‌صورت فیزیکی به‌واسـطه سد ایجادشده توسط جزء روغن امولسیون از یکدیگر جدا می‌شوند. به این نوع تکثیر، PCR - امولسـیون نیز گفته می‌شـود. در این مرحله آداپتورها دومین نقش خود را ایفا می‌کنند، به‌طوری‌که آداپتورها به‌عنوان جایگاهی برای اتصـال پرایمرها و درنتیجه، تکثیر قطعه موردنظر، عمل می‌کنند. ازآنجاکه این تکنیک نیازمند DNA الگو تک رشـته اسـت، پس از اتمام مرحلهٔ تکثیر، محصـولات PCR باید دناتوره شـوند. بدین ترتیب پس از تکثیر بر روی هر دانه در حدود ۱ میلیون قطعه DNA تک رشـته برای تعیین توالی ایجاد می‌شود. هدف از تکثیر، افزایش قطعه موردنظر برای تقویت شدت سیگنال و به‌تبع آن، شناسایی بهتر توسط detector در مرحله تعیین توالی اسـت. در مرحله بعد امولسـیون را شـکسـته و محتویات درون آن را به داخل چاهک‌های پیکولیتری موجود در سـطح یک پلیت منتقل می‌کنند. شرایط طوری انتخاب می‌شود که در داخل هر چاهک تنها یک دانه می‌تواند قرار گیرد. سپس آنزیم‌های سولفوریلاز، لوسیفراز و آپیراز به همراه دیگر عوامل موردنیاز برای تکثیر به مخلوط واکنش افزوده می‌شـود و بدین ترتیب پایروسـکوئنسـینگ در هر چاهک به‌طور مسـتقل به شـیوه‌ای که در بالا توضـیح داده شـد، انجام می‌شود. این تکنیک قادر به توالی یابی بیش از ۱ میلیون نمونه به‌طور هم‌زمان است.

تصویر ۱۱-۲۷: نمایی از تکنیک پایروسیکوئنسینگ (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تکنیک Semiconductor Sequencing (Ion Torrent)

این تکنیک در سال ۲۰۱۰ توسط شرکت Life Technologies ارائه شد. این پروسه به تکنیک پایروسکوئنسینگ بسیار شبیه است. با این تفاوت که در این تکنیک از تغییراتpH که به‌واسطه رها شـــدن یون H^+ به هنگام ســـنتز رشـــته جدید در محیط ایجاد می‌شـــود، برای تشـــخیص نوکلئوتیدها استفاده می‌شود. مراحل آماده‌سازی این تکنیک، مشابه روش پایروسکوئنسینگ است (قطعات در این روش به طول ۲۰۰ جفت باز هســـتند)، با این تفاوت که درنهایت مهره‌های فلزی که حاوی بیش از یک‌میلیون DNA تک رشـــته هســـتند را به داخل ریزچاهک‌هایی انتقال می‌دهند که در زیر این چاهک‌ها یک حســـگر فوق حساس یونی تعبیه‌شده است که سریعاً تغییرات pH را ثبت می‌کند و درنهایت، این تغییرات به‌صـــورت یک پیک در نمایشـــگر ظاهر می‌شـــود. ازآنجاکه در این روش نیز در هر مرحله نوکلئوتیدهای مشـابه و مشخص به مخلوط واکنش افزوده می‌شود، می‌توان بر اساس تولید این پیک، توالی DNA را در حین سنتز به دست آورد. درتصویر ۱۱-۲۸ مراحل این پروسه نشان داده شده است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۲۸: تعیین توالی به روش Lon torrent (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تکنیک Illumina (Solexa)

این روش توسط شرکت Illumina در سال ۲۰۰۷ ارائه شد. در ابتدا ژنوم موردنظر به قطعاتی از DNAتا طول ۱۰۰ تا ۱۵۰ جفت باز شکسته می‌شود و قبل از تک‌رشته‌ای شدن به دو سمت این قطعات آداپتور متصل می‌شود. سپس این قطعات تک‌رشته‌ای شده و به‌صورت تصادفی بر روی یک سطح جامد توزیع می‌شوند. این سطح جامد به‌طور متراکم با توالی‌های مکمل آداپتور پوشیده شده است. درنتیجه هر قطعه از DNA تک رشته از یک انتهای خود به‌واسطه اتصال به توالی‌های مکمل آداپتور بر روی این سطح جامد ثابت می‌شود. در مرحله بعد انتهای آزاد این قطعات نیز به توالی‌های مکمل آداپتور متصل شده و درنتیجه منجر به تشکیل یک پل می‌شوند. سپس تکثیر این پل به واسطهٔ افزودن عوامل موردنیاز برای PCR آغاز می‌شود که در اصطلاح به این پروسه،bridge amplification or Bridge PCR گفته می‌شود. در این پروسه، توالی‌های مکمل آداپتور به‌عنوان پرایمر عمل می‌کنند. پس از اتمام هر سیکل، DNA دو رشته‌ای حاصل دناتوره شده تا دوباره پروسه PCR انجام شود. این پروسه تا زمانی که مجموعه‌هایی متراکم از قطعه موردنظر ایجاد شود، تکرار می‌شود، چراکه هدف در این مرحله افزایش تعداد قطعه موردنظر به لحاظ دستیابی به‌شدت سیگنال بیشتر است. ازآنجاکه این تکنیک نیز نیازمند DNA تک‌رشته‌ای به‌عنوان الگوست، پس از اتمام مرحله تکثیر، محصولات PCR باید دناتوره شوند. در این حالت مجموعه‌هایی در حدود ۱۰۰۰ کپی از DNA تک‌رشته‌ای به‌صورت تصادفی (رندوم) بر

روی سطح جامد ایجاد می‌شود که در اصطلاح به هرکدام از این مجموعه‌ها، DNA Polony گفته می‌شود که هر یک از این مجموعه‌ها نیز متعلق به یک قطعه DNA هستند. در این روش می‌توان به‌طور هم‌زمان حداقل ۴۰ میلیون پولونی که هر مجموعه متعلق به یک قطعه DNA است را تعیین توالی کرد. درنهایت، برای تعیین توالی، عوامل موردنیاز برای پروسه PCR که شامل پرایمر، نوکلئوتیدهای ختم دهنده و DNA پلیمراز است را به سطح این صفحات جامد می‌افزایند. پرایمرهایی که در این مرحله مورداستفاده قرار می‌گیرد، مکمل توالی‌های آداپتور بوده که به انتهای آزاد قطعات تک رشته در هر کلاستر متصل شده و به‌واسطه عملکرد آنزیم پلیمراز منجر به سنتز رشته جدید می‌شوند. در این تکنیک از نوع خاصی از نوکلئوتیدهای ختم دهنده موسوم به 3′- blocked reversible terminator nucleotides استفاده می‌شود که هرکدام از این نوکلئوتیدها، با یکی از ۴ رنگ فلورسانس (سبز، قرمز، آبی و نارنجی) لیبل می‌شوند. برخلاف ddNTP های مورداستفاده در تکنیک سنگر، این نوکلئوتیدها به‌صورت برگشت‌پذیر عمل کرده و پس از شناسایی شدن لیبل رنگی آن‌ها به‌واسطهdetector ، پلیمریزه شدن رشته در حال سنتز متوقف نمی‌شود و ادامه می‌یابد، چراکه پس از آزاد شدن لیبل رنگی و شناسایی آن به‌واسطه دستگاه، گروه terminator که انتهای′ ۳ این نوکلئوتیدها را بلوکه کرده نیز جدا می‌شود و درنتیجه، اثر مهاری آن برداشته‌شده و گروه3′-OH نمایان می‌شود. این امر منجر به ادامه تکثیر رشته در حال سنتز می‌شود. در حقیقت نقش این نوکلئوتیدهای ختم دهنده، ایجاد یک وقفه کوتاه در تکثیر رشته در حال سنتز برای شناسایی لیبل رنگی آن نوکلئوتید و درنتیجه، مشخص شدن نوع آن نوکلئوتید برای تعیین توالی است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

در این تکنیک نوکلئوتیدها برخلاف روش پایروسکوئنسینگ و یا Ion Torrent که به‌صورت مجزا از یکدیگر در هر مرحله افزوده می‌شوند، به‌صورت هم‌زمان به مخلوط واکنش در هر مرحله اضافه می‌شوند که بر اساس لیبل های فلورسانس متفاوتشان از یکدیگر متمایز می‌شوند. تفاوت دیگر این است که در روشSolexa ، پس از اتمام هر مرحله یک شستشو انجام می‌گیرد تا نوکلئوتیدهایی که در زنجیره در حال ساخت وارد نشده‌اند، از محیط حذف شوند و سپس مرحله بعدی آغاز می‌شود، درصورتی‌که در تکنیک پایروسکوئنسینگ و یا Ion Torrent از آنزیم آپیراز به این منظور استفاده می‌شود (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تکنیک ABI (Applied Biosystems) Solid (Sequencing by Oligo Ligation and Detection) System

این تکنیک در سال ۲۰۰۷ توسط شرکتApplied Biosystems ارائه شد. اساس این روش بر پایه اتصال پروب‌های الیگونو کلئوتیدی لیبل شده با ۴ رنگ مختلف فلورسانس(قرمز، آبی، نارنجی

و سبز) است که به‌موجب آن، هر پروب موقعیت دو باز را در زنجیره مشخص می‌کند. در این تکنیک قطعاتی از DNA در حدود ۳۵ الی ۷۵ جفت باز ایجادشده و به دو انتهای این قطعات آداپتورها متصل می‌شود. سپس این قطعات تک رشته شده و به‌واسطه تمایل اتصال بیوتین به استرپتوآویدین به سطح دانه‌های فلزی متصل می‌شوند. در مرحله بعد هرکدام از این دانه‌ها که حاوی یک قطعه DNA تک‌رشته‌ای هستند، در درون یک قطره آب در امولسیون روغن قرار می‌گیرند و واکنش PCR -امولسیون برای تکثیر قطعه DNA درون این میکرورآکتور انجام می‌شود. درنهایت پس از مرحله تکثیر و دناتوره شدن، هرکدام از دانه‌های فلزی که در حدود ۱ میلیون قطعه DNA تک‌رشته‌ای به آن‌ها متصل است، برای تعیین توالی به یک اسلاید شیشه‌ای انتقال داده می‌شوند. سپس پرایمرها که مکمل توالی آداپتور بوده و مخلوطی از پروب‌های الیگونوکلئوتیدی به این سطح افزوده می‌شود. در مرحله اول، پرایمر به آداپتور متصل می‌شود. سپس مخلوطی از الیگونوکلئوتیدهای اکتامر که انتهای آن‌ها با رنگ‌های فلورسانس مختلف لیبل شده است، به قسمت‌های مکمل خود بر روی رشته الگو متصل می‌شوند. اتصال این قطعات به یکدیگر به‌واسطه آنزیم لیگاز صورت می‌گیرد. به‌تبع، این الیگونوکلئوتیدها باید توالی متنوعی داشته باشند تا امکان حضور توالی مکمل بر روی رشته DNA افزایش یابد. برای این امر از di-base probeها استفاده می‌شود. همان‌طور که از اسم این پرو ب ها مشخص است، آن‌ها در ابتدای خود حاوی دو باز مشخص هستند و مابقی بازها از توالی‌های دجنره و یونیورسال هستند که با حرف n و z نشان داده می‌شوند. مثالی از این پروب ها درتصویر ۱۱-۲۹ نشان داده شده است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۲۹: روش di-base probe (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

ویژگی این پروب‌ها مربوط به ۲ باز اول اســت و حتی لیبل رنگی که به انتهای این پروب ها متصل می‌شود، بسته به این دو باز تعیین می‌شود، به‌طوری‌که یک الفبای دو حرفی و ۱۶ حالته بر اســاس این دو باز در روش Solid موجود اســت که از هر دو حرف نوکلئوتیدی یک کد یا رنگ خاصی حاصل می‌شود. الفبای فوق ۴ قانون دارد که شامل موارد زیر است:

۱. قانون معکوس: دو نوکلئوتید مختلف در هر دو حالت ترکیبی خود، یک رنگ یا کد مشــترک دارند. مثلاً دو نوکلئوتید T وC در هر دو حالت CT و معکوس آنTC ، به رنگ نارنجی و کد ۲ شناخته می‌شوند (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).
۲. قانون مکمل: نوکلئوتیدهای ۲ بازی مکمل نیز رنگ و کد یکســان دارند. مثلاً دو بازCA و مکمل آن GT هر دو دارای رنگ سبز یا کد ۱ هستند (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

جدول ۱- الفبای دو حرفی و ۱۶ حالته روش Solid

Code	0	1	2	3
Dye	FAM	Cy3	TXR	Cy5
	AA	AC	AG	AT
	CC	CA	GA	TA
	GG	GT	CT	CG
	TT	TG	TC	GC

۳. قانون مکمل معکوس: با توجه به دو قانون قبل، نوکلئوتیدهای ۲ بازی در دو حالت مکمل و معکوس نیز رنگ و کد یکســان دارند. مثلاً توالی AT و حالت مکمل معکوس آن یعنی CG هر دو دارای رنگ قرمز یا کد ۳ هستند (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).
۴. قانون ۴: دو نوکلئوتید یکســان مثلاًAA ، دارای کد 0 و رنگ آبی هســتند. در جدول ۱ این تقســیم‌بندی ارائه شــده اســت. تعیین توالی بر پایه Ligation در ۵ سیکل که هر ســیکل نیز شامل چندین مرحله است، به‌واسطه پرایمرهای مختلف انجام می‌شود. بدین ترتیب که در هر سیکل یک نوکلئوتید از پرایمر مربوطه کم می‌شود؛ یعنی در دور اول از پرایمرn ، در دور دوم از پرایمرn-1 در دور سوم از پرایمرn-2 ، در دور چهارم از پرایمر n-3و در دور پنجم از پرایمر n-4 اســتفاده می‌شــود. در ســیکل اول پس از اتصــال پرایمر n به توالی آداپتور، یک مجموعه چهارتایی از این پروب‌ها به مخلوط واکنش اضــافه می‌شود که برای اتصال به قطعه پرایمر با یکدیگر رقابت می‌کنند. درنهایت پس از اتصــال یکی از این پروب ها، لیبل فلورســانس مربوط به این پروب به همراه ۳ باز آخر

به‌صـورت آنزیماتیک جدا می‌شود (همان‌طور که در تصویر ۱۱-۳۱ نشان داده شده است این پروب‌ها حاوی یکcleavage site هستند که پس از اتصال به توالی مکمل، پروب از این ناحیه به‌صورت آنزیماتیک شکسته می‌شود). به‌واسطه جدا شدن لیبل رنگی، نوری سـاطع می‌شود که توسط دستگاه ثبت می‌شود. این مرحله آن‌قدر تکرار می‌شود تا رشته جدید به‌طور کامل سـنتز شـود. نکته قابل‌توجه این اسـت که قبل از ورود به هر مرحله، پروب های متصـل نشده به‌واسطه شستشو از محیط حذف می‌شوند تا اختلالی در مراحل بعدی ایجاد نکنند. پس از اتمام سـیکل اول وارد سـیکل دوم می‌شـویم. قبل از شـروع سـیکل دوم، رشـته حاوی پرایمر n به‌واسـطه حرارت از رشـته الگو جداشده و از طریق شستشو از محیط حذف می‌شود و به‌این‌ترتیب واکنش با پرایمر n-1 در سیکل دوم آغاز می‌شود. این واکنش نیز همانند سیکل اول تا تکمیل شدن رشته در حال سنتز به‌واسطه پروب های مختلفی که به‌صـــورت مرحله‌ای (در هر مرحله یک مجموعه ۴ تایی) به واکنش افزوده می‌شـود، ادامه می‌یابد. نمایی از این تکنیک درتصـویر ۱۱-۳۰ نشان داده شـده است. درنهایت، با تلفیق تمام داده‌ها در ۵ سیکل می‌توان به توالی رشته موردنظر دست‌یافت. این تکنیک قادر به توالی یابی بیش از ۵۰ میلیون نمونه به‌طور هم‌زمان است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۳۰: Sequencing by Ligation (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۳۱: نمایی از آداپتورهای سنجاق سری (SMRTbell) (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تصویر ۱۱-۳۲: تعیین توالی به شیوه Nanopore Sequencing (اقتباس از صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

دستگاه‌های توالی یاب نسل سوم

در تکنیک‌های نسل دوم، قبل از تعیین توالی، برای به دست آوردن شدت سیگنال بیشتر، مرحله تکثیر به‌واسطه PCR انجام می‌شود، اما در نسل سوم از دستگاه‌های توالی یاب، این مرحله صورت نمی‌گیرد و به‌طور مستقیم یک قطعه DNA تک‌رشته‌ای در حین سنتز تعیین توالی می‌شود. این امر می‌تواند منجر به حذف خطاها به هنگام همانندسازی شود. درنتیجه، این تکنیک‌ها بسیار ساده‌تر و ارزان‌تر از روش‌های قبلی هستند و شامل:

تکنیک Heliscope (Helicos Single molecule sequencing device)

تکنیک Heliscope در سال ۲۰۰۸ توسط شرکتHelicos Bioscince ارائه شد. در این روش، ابتدا ژنوم موردنظر به قطعاتی از DNA به طول ۳۰ تا ۳۵ جفت باز شکسته شده سپس در اثر دناتوره شدن، این قطعات به حالت تک‌رشته‌ای تبدیل می‌شوند. در مرحله بعد با استفاده از آنزیم ترمینال ترنسفراز به انتهای′۳ این قطعات تک رشته، دزوکسی آدنوزین تری فسفات را اضافه کرده تا یک دم پلی dA به طول بیش از ۵۰ نوکلئوتید ایجاد شود. سپس این قطعات از انتهای ′۳ خود به‌صورت تصادفی به توالی‌های مکمل دم پلیdA (توالی‌های الیگو dT به طول ۵۰ نوکلئوتید) که بر روی اسلایدهای شیشه‌ای تعبیه‌شده‌اند، متصل شده و در سطح این صفحات از انتهای′ ۳ خود ثابت می‌شوند. برای تعیین توالی، نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت‌پذیر که همگی توسط یک رنگ فلورسانس یکسان لیبل شده‌اند، به همراه آنزیم پلیمراز به این صفحات افزوده می‌شود تا پروسه تعیین توالی بر پایه تکثیر آغاز شود. در این پروسه از توالی‌های الیگو dT تعبیه‌شده بر روی اسلایدهای شیشه‌ای به‌عنوان پرایمر استفاده می‌شود. در این تکنیک از نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت‌پذیری که انتهای′ ۳ آن‌ها به‌واسطه یک گروه ترمیناتور بلوکه نشده است، استفاده می‌شود. در این نوکلئوتیدها، گروه ترمیناتور به‌تنهایی و یا به‌صورت متصل به واحد رنگی، به باز آلی متصل می‌شود. پس از قرارگیری این دسته از نوکلئوتیدها در زنجیره در حال ساخت، به دلیل تداخلی که به‌واسطه گروه رنگی و ترمیناتور ایجاد می‌شود، از عملکرد آنزیم پلیمراز ممانعت می‌شود. درنتیجه، سنتز رشته جدید به‌طور موقت، متوقف می‌شود. در هر مرحله، نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت‌پذیر مشابهی وارد واکنش می‌شوند. سپس یک شستشو انجام می‌شود تا نوکلئوتیدهایی که به زنجیره‌های در حال ساخت وارد نشده‌اند، از محیط حذف شوند. درنهایت جدا شدن رنگ فلورسانس به همراه گروه ترمیناتور آن دسته از نوکلئوتیدهایی که به زنجیره در حال سنتز واردشده‌اند، نه‌تنها منجر به ساطع شدن نور و ثبت سیگنال مربوطه توسط دستگاه می‌شود، بلکه منجر به از بین رفتن اثر مهاری آن‌ها و درنتیجه ادامه پروسه سنتز نیز می‌شود. بدین ترتیب دور بعدی با استفاده از یک ردیف از نوکلئوتیدهای مشابه دیگر آغاز می‌شود. این روند تا کامل شدن زنجیره در حال ساخت ادامه می‌یابد و ازآنجاکه در هر مرحله نوع نوکلئوتیدهای واردشده به پروسه مشخص است، می‌توان به توالی DNA رشته موردنظر به‌طور مستقیم و بدون نیاز به تکثیر قطعه دست‌یافت. این تکنیک قادر به آنالیز میلیون‌ها قطعه DNA تک رشته به‌طور هم‌زمان است. در این روش برخلاف روش Solexa، تمامی نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت‌پذیر، تنها با یک رنگ فلورسانس لیبل می‌شوند. استفاده از یک رنگ اجازه می‌دهد که اندازه‌گیری در وضوح بالاتری صورت گیرد، زیرا در این روش برخلاف روش Solexa پروسه تکثیر برای تقویت سیگنال مربوطه صورت نمی‌گیرد (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تکنیک SMRT (Single Molecule Real Time) یا Pac Bio sequencing RS

این تکنیک توسط شرکت Pacific Biosciences در سال ۲۰۱۰ ارائه شد. در این تکنیک از چیپ‌هایی استفاده می‌شود که دارای یک فیلم فلزی بسیار باریک هستند. این فیلم فلزی حاوی هزاران حفره بوده که Zero-Mode Waveguid (ZMW) نامیده می‌شوند. حجم هر ZMW در حدود ۲۰ زپتولیتر است که یک آنزیم DNA پلیمراز به کف هر یک از این چاهک‌ها متصل شده است. این چاهک‌ها توسط دوربین‌های CCD رصد می‌شوند. این امر امکان تعیین توالی هم‌زمان با سنتز در زمان واقعی را فراهم آورده است. در این روش، در ابتدا ژنوم به قطعاتی به طول ۱۵۰۰ جفت باز شکسته شده و قبل از تک‌رشته‌ای شدن، به ۲ سمت این قطعات، آداپتور متصل می‌شود. برخلاف سایر تکنیک‌ها، در این روش از آداپتورهای خاصی موسوم به آداپتورهای سنجاق سری استفاده می‌شود که ازلحاظ ساختاری به‌صورت یک قطعه تک رشته حلقوی هستند. لذا ساختار ویژه این آداپتورها باعث می‌شود که قطعه موردنظر پس از دناتوره شدن به حالت حلقوی تبدیل شود. نکته جالب‌توجه در این تکنیک این است که قبل از انتقال این قطعات به چاهک‌های موردنظر، یک پرایمر برای تکثیر، به هرکدام از آداپتورها متصل می‌شود. درنهایت، پس از اتصال آنزیم پلیمراز به توالی پرایمر، مخلوطی از نوکلئوتیدها که هرکدام با رنگ خاصی لیبل شده‌اند، به همراه دیگر عوامل موردنیاز برای پلیمریزه شدن به‌منظور تعیین توالی به داخل هر یک از این چاهک‌ها افزوده می‌شود. در طی پلیمریزه شدن، به‌واسطه اتصال هر نوکلئوتید، گروه رنگی مخصوص آن نیز آزاد شده و رنگ خاصی را ساطع می‌کند که توسط دوربین‌هایCCD ثبت می‌شود. در این حالت هر ۲ رشته DNA تعیین توالی می‌شود که این امر می‌تواند منجر به افزایش صحت در تعیین توالی شود. در ا ین تکنیک، هرکدام از نوکلئوتیدها با یکی از چهار رنگ فلورسانس (قرمز، آبی، نارنجی و سبز) لیبل می‌شوند، اما به‌جای اینکه فلوروفرم به باز آلی متصل شود، به گروه فسفات گاما نوکلئوتید متصل می‌شود. این امر منجر به کاهش ممانعت فضایی ناشی از رنگ فلورسانس و درنتیجه، افزایش راندمان پلیمریزه شدن می‌شود. نکتهٔ قابل‌توجه در این تکنیک این است که برخلاف دیگر روش‌های تعیین توالی، نیازی نیست که پس از هر مرحله که نوکلئوتیدها به مخلوط واکنش افزوده می‌شوند، یک مرحله شستشو صورت گیرد. این مسئله، در کاهش زمان انجام این پروسه نقش دارد. این روش قادر به توالی یابی بیش از ۳۰۰۰ نمونه به‌طور هم‌زمان است. امروزه تکنیکی موسوم به Pac Bio sequencing RSII بر پایهSMRT ابداع شده است که قادر به تعیین توالی قطعاتی به طول بیش از ۱۰ کیلو باز است. با این شیوه می‌توان یک ژنوم کامل انسان را در کمتر از ۴ ساعت توالی یابی کرد. یکی از محدودیت‌های بزرگ این تکنیک این است که به دلیل طول خوانش بالا، میزان خطا نیز افزایش می‌یابد، اما امکان توالی

یابی قطعات بزرگتر نیز مزیتی بزرگ به‌حساب می‌آید که خصوصاً در مطالعات متاژنومیکس می‌تواند بسیار سودمند باشد (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

تکنیک Nanopore Sequencing

این روش در سال ۲۰۱۱ توسط شرکت Oxford Nanopore Technologies ارائه شد. در این تکنیک از یک غشای بسیار نازک که حاوی کانال‌هایی به قطر ۱ الی ۲/۵ نانومتر است، استفاده می‌شود. این کانال‌ها به‌طور عمده از جنس آلفا- همولایزین هستند. در حقیقت در این سیستم از آلفا -همولایزین که از استافیلوکوکوس اورئوس ترشح می‌شود، برای ایجاد کانال استفاده می‌شود. آلفا -همولایزین یک پروتئین هپتامر بوده که به‌طور متعارفیک منفذ را در غشاءهای بیولوژیک ایجاد می‌کند. قطر داخلی این کانال به‌گونه‌ای است که تنها DNA به حالت تک‌رشته‌ای می‌تواند از داخل آن عبور کند. در دو سمت این کانال‌ها، ۲ الکترود تعبیه‌شده است. این امر منجر به ایجاد یک جریان یونی در داخل این کانال‌ها می‌شود. زمانی که DNA به‌صورت تک‌رشته‌ای (به طول ۵ کیلو باز) از درون این سوراخ‌های بسیار ریز عبور می‌کند، بر اساس میزان مقاومت هر یک از نوکلئوتیدها، جریان یونی تغییر می‌یابد. این تغییرات توسط دستگاهی ثبت می‌شود. ازآنجاکه این تغییرات برای هر نوکلئوتید متفاوت بوده و مختص به همان نوکلئوتید است، می‌توان ضمن عبور قطعه تک‌رشته‌ای، به ترتیب توالی نوکلئوتیدی آن نیز پی برد. ورودDNA تک‌رشته‌ای به داخل منفذ نیز به‌واسطه ولتاژ مثبتی است که در آن‌سوی منفذ ایجاد می‌شود زیرا DNAدارای بار منفی بوده و به‌واسطه این ولتاژ مثبت به داخل منفذ هدایت می‌شود. نکته قابل‌توجه در این تکنیک این است که برخلاف دیگر روش‌های تعیین توالی، از پلیمریزه شدن برای تعیین توالی استفاده نمی‌شود. این امر دانشمندان را قادر ساخته تا در عرض چند ساعت و با هزینه کم‌تر از ۱۰۰۰ دلار آمریکا به کل ژنوم انسان دست یابند. در تصویر ۱۱-۳۲ مراحل این تکنیک نشان داده شده است (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

البته این روش مشکلاتی را نیز به همراه دارد. یکی از بزرگترین مشکلات این تکنیک این است که در این روش ممکن است DNA سریع‌تر از حد انتظار از این کانال‌ها عبور کند. لذا این امر می‌تواند منجر به بروز خطا در تعیین توالی شود. امروزه تکنیک‌های جدیدتری بر پایه Nanopore Sequencingروانه بازار شده است. در این تکنیک‌ها سعی شده است که این محدودیت‌ها برطرف شود. به‌عنوان‌مثال، یک جزء اگزونوکلئازی بر روی این منفذ قرار داده شده است که نوکلئوتیدهای موجود در رشته الگو را یکی‌یکی می‌شکند. به‌این‌ترتیب، نوکلئوتیدها به‌صورت مجزا به داخل منفذ انتقال می‌یابند. از طرفی در داخل کانال‌ها نیز یک مولکول سیکلودکسترین برای اتصال به نوکلئوتیدهای آزاد تعبیه‌شده است. این امر باعث می‌شود که این

نوکلئوتیدها در اثر واکنش با این مولکول، مدت‌زمان طولانی‌تری در منفذ باقی بمانند. به‌این‌ترتیب تمایز بین نوکلئوتیدها بهتر صورت می‌گیرد و میزان خطا در تعیین توالی کاهش می‌یابد، یا اینکه می‌توان از یک تنظیم‌کننده سرعت ورودDNA به داخل منفذ استفاده کرد تا قطعه موردنظر با سرعت مناسب به داخل منفذ هدایت شود. برای این منظور از DNA پلیمراز باکتریوفاژ فی ۲۹ استفاده می‌شود. در این روش، DNA تک‌رشته‌ای الگو که یک پرایمر به آن متصل شده است، به کار گرفته می‌شود. آنزیم پلیمراز به پرایمر متصل شده و شروع به سنتز رشته مکمل می‌کند. در این حین، این آنزیم همانند یک موتور عمل کرده و منجر به ورود رشته الگو به داخل منفذ می‌شود. بدین ترتیب که یک توالی الیگونوکلئوتیدی ویژه موسوم به الیگومر بلاک کننده به انتهای پرایمر متصل می‌شود. سپس بار مثبت در طرف مخالف منفذ ایجاد می‌شود تا DNA به داخل منفذ هدایت شود. نیروی حاصل از این ولتاژ باعث می‌شود که ۲ رشته DNA از محل این توالی ویژه به‌صورت مکانیکی از یکدیگر جدا شوند و درنهایت، رشته الگو از انتهای′۳ به داخل منفذ وارد می‌شود. مزیتDNA پلیمراز باکتریوفاژ فی ۲۹ این است که به هنگام ایجاد این ولتاژ از DNA جدا نمی‌شود و همچنان به فعالیت خود ادامه می‌دهد. این پروسه می‌تواند منجر به کاهش سرعت ورود DNA تک‌رشته‌ای به داخل منفذ و درنتیجه شناسایی بهتر نوکلئوتیدها برای تعیین توالی شود (صباغی و سلیمانی، ۱۳۹۵).

میتوکندری و نقش آن در مطالعات ژنتیکی

ساختمان میتوکندری

شکل میتوکندری‌ها متغیر اما اغلب رشته‌ای یا دانه‌ای می‌باشند. غشای خارجی حدود ۷۵ - ۶۰ آنگستروم ضخامت دارد و از نوع غشاهای زیستی با ساختمان سه لایه‌ای می‌باشد. این غشا صاف و فاقد چین‌خوردگی است و هیچ ریبوزومی به آن نچسبیده است. اتاق خارجی زیر غشای خارجی، فضایی در حدود ۲۰۰- ۱۰۰ آنگستروم وجود دارد که شامل دو بخش است: فضای بین دو غشا و فضای درون تاج‌ها یا کریستاها. در این اتاق، ترکیباتی مثل آب، نمک‌های کانی و یون‌ها، پروتئین‌ها، قندها و چربی‌ها SO_2، O_2، ATP و ADP وجود دارند. ضخامت غشای داخلی مثل غشای خارجی است اما ترکیب شیمیایی آن فرق می‌کند و دارای چین‌خوردگی‌های فراوانی است که چین‌ها یا کریستا نامیده می‌شوند. فضای درونی میتوکندری که به‌وسیله غشای داخلی دربرگرفته‌شده، ترکیب و ویژگی‌های کلی آن، شبیه سیتوزول می‌باشد و دارای آنزیم‌های خاص و ریبوزوم خاص خود (۷۰S) است. تعداد DNA، برحسب نوع و سن سلول فرق می‌کند و دارای سیتوزین و گوانین زیادی است که درنتیجه در مقابل گرما مقاوم است.

ژنوم میتوکندری

بررسی‌ها نشان می‌دهد که DNA سازی در میتوکندری نیز صورت می‌پذیرد و بر این اساس به وجود DNA در میتوکندری پی برده شده است. علاوه بر همانندسازی RNA و ساخت DNA، پروتئین‌سازی هم در میتوکندری صورت می‌گیرد. این فرایندها توسط آنزیم‌ها و مولکول‌های خاص خود اندامک صورت می‌گیرد. جایگاه DNA در ماده زمینه میتوکندری و بعضی مواقع چسبیده به غشای داخلی میتوکندری است. ژنوم میتوکندری سلول‌های اغلب جانوران حلقوی و از ۲۰-۱۵ هزار جفت نوکلئوتید تشکیل یافته است که غنی از بازهای سیتوزین و گوانین بوده و می‌تواند بخش مهمی از روند سنتز پروتئین‌های موجود در میتوکندری را هدایت کند.

ساختار و ژنوم میتوکندری

درون هر میتوکندری چندین نسخه از ژنوم میتوکندری وجود دارد که DNA در اتصال با پروتئین به‌صورت خوشه‌های مجزا تحت عنوان نوکلئوتید یافت می‌شوند. توالی‌های ژنوم میتوکندری که تاکنون برای گونه‌های مهره‌دار بررسی‌شده‌اند (شکل ۲-۱) شامل یک منطقه فاقد رمز (حلقه D یا D-loop) که مسئول آغاز همانندسازی رشته سنگین می‌باشد، مناطق رمز کننده تعداد ۱۳ پلی پپتید، ۲۲ عدد tRNA، دو RNA ریبوزومی و یک توالی کوتاه که نقطه شروع همانندسازی رشته سبک است که DNA به‌صورت ساختار حلقه‌ای است. ۱۳ پلی پپتید رمز شده موجود در ژنوم میتوکندری منحصراً از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو برای تولید ATP به کار می‌رود. این پلی پپتیدها شامل ۷ ترکیب NADH برای مجموعه I، سیتوکروم b، سه زیر واحد سیتوکروم اکسیداز و دو زیر واحد ATPase هستند.

وراثت میتوکندریایی

وراثت ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) به‌طورکلی به‌صورت مادری می‌باشد. وراثت دقیق مادری تصور می‌شد که درنتیجه تعداد کم میتوکندری در اسپرم باشد درحالی‌که تعداد میتوکندری در تخم ۱۰۰۰۰ بار بیش از اسپرم است. اگرچه الگوی وراثت مادری در تمام گونه‌های مهره‌داری بررسی‌شده، دیده شده است ولی مشاهده کمی از سهم والد نر در فرزندان در سرتاسر رده‌های مهره‌داران گزارش شده است. مشاهده نوترکیبی میتوکندری در چندین موجود نظیر: تاسماهیان و صدف‌های آب شیرین مشاهده‌شده است (Brown, 2008) . اهمیت وراثت mtDNA به این دلیل است که سویه‌های فردی می‌تواند نسبتاً به‌آسانی در محدودهٔ زمانی و مکانی دنبال شود و

همین امر باعث می‌شود که mtDNA معمولاً در مطالعات شجره شناسی جغرافیایی[1] به کار گرفته می‌شود. مشاهده نوترکیبی نیازمند وجود چندین ژنوم میتوکندری یا هتروپلاسمی[2] درون هر فرد می‌باشد که با تشخیص نوترکیبی از طریق چندین نسخه از توالی‌های متوالی متغیر[3] در منطقه کنترل صورت می‌پذیرد. اگرچه این مطالعات مدارکی را برای فراوانی نوترکیبی در میتوکندری ارائه می‌دهد ولی نوترکیبی ممکن است در مناطق دیگری از منطقه موردمطالعه رخ دهد. فرضیه موردقبول عدم نوترکیبی را تشریح می‌کند و همراه با نسبت بالای جهش درون میتوکندری، کمک می‌کند که mtDNA یکی از مناطق ژنتیکی مهم در مطالعات ژنتیک تکامل[4]، زیست‌شناسی جمعیت[5]، شجره شناسی جغرافیایی[6] و فیلوژنتیکی[7] یوکاریوت‌هاست.

مطالعات ژنوم میتوکندری در ماهیان

توالی یابی ژنومی

توالی یابی کل ژنوم میتوکندری در ماهیان مانند خیلی از مهره‌داران دیگر انجام‌شده است. اخیراً تحقیقات ژنومی بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) نشان می‌دهد که حدود ۳۲۶ گونه از ماهیان شعاع باله[8] ژنوم کامل میتوکندریایی آن‌ها توالی یابی شده است و بدون شک با بهبود روش‌های توالی یابی این تعداد رشد خواهد یافت (Brown, 2008). اگرچه تعداد گونه‌هایی که توالی کامل ژنوم میتوکندریایی آن‌ها گزارش شده در حال پیشرفت است، اما تنها تعداد چندگونه اندک دارای چندین گزارش از توالی یابی کل ژنوم میتوکندری می‌باشند، نظیر بیچیر *Polypterus ornutipinnis*، قزل‌آلای رنگین‌کمان، آزادماهی اقیانوس اطلس *Salmo salar L.*، مداکا *Oryzias latipes* که این امکان را ایجاد می‌کند که مقایسات درون گونه‌ای با استفاده از ژنوم میتوکندریایی صورت پذیرد. مقایسات درون گونه‌ای برای تحقیقات آینده در زمینه تعیین ژن‌ها و یا توالی‌های میتوکندری برای برخی خصوصیات مهم فیزیولوژیکی نظیر، مقاومت به دما، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد بسیار حائز اهمیت هستند (Brown, 2008). هرچند بررسی‌های درون گونه‌ای کمی با استفاده از ژنوم میتوکندری انجام‌شده است اما شمار زیادی از گونه‌های شعاع بالگان که توالی آن‌ها موجود است، این امکان را ایجاد کرده است که مطالعات بین‌گونه‌ای انجام

1- Phlogeography
2- Heteroplasmy
3- Variable number tandem repeat sequence
4- Evolutionary genetics
5- Population biology
6- Phylogeography
7- Phylogenetic
8- Actinopterygian species

شـود که هم می‌تواند به تشـخیص روابط متقابل درون خانواده و راسته‌ها کمک کند و هم به روابط بین خانواده کمک نماید (Miya *et al.*, 2005).

مطـالعه توالی یابی کل ژنوم میتوکندریایی در تاس ماهیان توســط Rastorguev و همکاران (۲۰۰۸) انجام شـد که در بررسی فوق ژنوم میتوکندریایی ۴ گونه از تاس‌ماهیان ازجمله تاس ماهی روسـی *Acipenser gueldenstaedtii*، تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، تاس ماهی آدریـاتیـک *Acipenser naccarii* و تاس ماهی سـیبری Siberian *sturgeon* توالی یابی گردید و روی‌هم رفته ۱۱ گونه از تاس ماهیان در این بررسی به لحاظ فیلوژنتیک مورد مقایسه قرار گرفتند. بر اسـاس توالی کل ژنوم میتوکندری نشـان داده شد که جنس *Scaphyrinchus* قرابت نزدیکی با جنس Acipenser و *Huso* دارد. همچنین مشـخص شـد که بر اسـاس فیلوژنتیک گونه‌های اقیانوس آرام و اطلس جدا هسـتند و شبه تاس ماهی روسی gueldenstaedtii-like و شبه تاس ماهی سیبری baerii-like نیز ارتباط نزدیکی دارند.

انواع مارکرهای مولکولی و اهمیت آن‌ها

پیشرفت مارکرهای ژنتیکی مبتنی بر DNA تأثیر مهمی را بر روی ژنتیک موجودات گذاشته است. با کمک مارکرهای DNA ازنظر تئوری می‌توان تنوع ژنتیکی را در سـراسـر ژنوم مشـاهده نمود. مارکرهای ژنتیک معروف در جوامع آبزی‌پروری شـامل آلوزایم‌ها، DNA میتوکندریایی، RFLP، AFLP،RAPD، میکروسـتلایت، SNP و EST می‌باشـند. کاربرد مارکرهای DNA پیشـرفت سریعی را در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، درون آمیزی، شناسایی نژاد و گونه و تهیه نقشه‌های ژنتیکی با دقت بالا در آبزی‌پروری ممکن می‌سـازد. مطالعات با طراحی مناسـب به‌وسـیله این مارکرهای ژنتیکی بدون شـک شـناسـایی ژن‌های شـرکت‌کننده در لوکوسـهای صفات کمی (QTL) را برای به‌گزینی تسریع خواهد کرد.

همه موجودات درنتیجه اعمال طبیعی سـلولی و یا ارتباط متقابل با محیط دسـتخوش جهش می‌شـوند و این پدیده منجر به تنوع ژنتیکی و یا پلی مورفیسم می‌شود. پیوستگی انحراف ژنتیکی با به‌گزینی، تنوع ژنتیکی را درون افراد، گونه و رده‌های بالاتر افزایش می‌دهد. به‌منظور اینکه این تنوع برای ژنتیـک دانان مفید باشـد بایسـتی این تنوع وراثت پذیر و برای محققین به‌عنوان یک تنوع فنوتیپی مشـخص از طریق روش‌های مولکولی قابل‌شـناسـایی باشـد. در سـطوح DNA انواع تنوع ژنتیکی شـامل: جایگزینی باز که به‌طورمعمول از طریق SNPs مشـخص می‌شود، شامل الحاق و یا حذف توالی‌های نوکلئوتیدی درون یک لوکوس و باز آرایی قطعات DNA اطراف یک لوکوس است. حذف و الحاق نوکلئوتیدی منجر به تغییر اندازه قطعات DNA می‌شود وقتی‌که به‌وسیله آنزیم‌های محدودکننده برش داده شـوند. درگذشـته آلوزایم و مارکرهای DNA میتوکندریایی در تحقیقات

ژنتیک آبزی‌پروری معروف بوده‌اند. مارکرهایی که اخیراً در این زمینه به کار گرفته‌شده‌اند شامل RFLP، RAPD، AFLP، میکروستلایت، SNP و EST می‌باشند. جدول ۱۱-۳ خصوصیات هرکدام را نشان داده است.

مارکرهای DNA میتوکندریایی

مارکرهای میتوکندریایی به خاطر استفاده آن‌ها در شناسایی جمعیت‌ها در بین ژنتیک دانان آبزی‌پروری کاملاً معروف هستند. در ابتدای بررسی‌های مولکولی، سطوح بالای چندشکلی mtDNA نسبت به آلوزایم ها برای شناسایی جمعیت‌ها به کار گرفته شدند. ازنظر تکنیکی مارکر mtDNA مارکرهای RFLPs هستند به‌استثنای اینکه مولکول هدف DNA میتوکندریایی است نه DNA ژنومی هسته. اگرچه لوکوس‌های mtDNA الل های زیادی را در هر لوکوس می‌تواند نشان دهد، شمار محدود مارکرهای موجود بر روی جایگاه‌های مولکول mtDNA ارزش PIC[1] بالای آن‌ها نسبت به آلوزایم‌هاست.

جدول ۱۱-۳: انواع مارکرها، خصوصیات و کاربردهای آن‌ها (اقتباس از Brown, 2008).

نوع مارکر	نیاز به اطلاعات مولکولی	نوع وراثت‌پذیری	تعداد لوکوس موردبررسی	تعداد الل های احتمالی	چندشکلی یا قدرت	کاربرد مهم
آلوزایم	بلی	مندلی، همبارز	منفرد	۲-۶	پایین	نقشه ژنتیکی، مطالعات جمعیتی
DNA میتوکندریایی	خیر	وراثت مادری	منفرد	هاپلوتایپهای چندگانه	پایین	انشقاق مادری
RFLP	بلی	مندلی، همبارز	چندگانه	۲	متوسط	نقشه ژنتیکی
RAPD	خیر	مندلی، غالب	چندگانه	۲	متوسط	انگشت‌نگاری برای مطالعات جمعیتی، تشخیص هیبرید
AFLP	خیر	مندلی، غالب	منفرد	۲	بالا	نقشه ژنتیکی، مطالعات جمعیت
میکروستلایت	بلی	مندلی، همبارز	منفرد	چندگانه	بالا	نقشه ژنتیکی، مطالعات جمعیت

1- Polymorphic Information Content

EST	بلی	مندلی، همبارز	منفرد	۲	بالا	نقشه ژنتیکی،
SNP	بلی	مندلی، همبارز	منفرد	۲ حداکثر تا ۴	بالا	نقشه مقایسه‌ای، مطالعات جمعیت
Insersion/ deletions	بلی	مندلی، همبارز		۲	پایین	نقشه ژنتیکی

در امور حفظ ذخایر آبزیان ازجمله تاسماهیان که بر برنامه‌های رهاسازی استوارند، تنوع mtDNA تنها دانش موردنیاز برای ارزیابی بقاء و اختلاف رشد ماهیان رهاسازی شده می‌باشد و در مواردی که برنامه‌های تولید و رهاسازی ماهیان به‌منظور احیای ماهیان ساکن آب‌های طبیعی صورت می‌گیرد، تفکیک این ماهیان و ماهیان رهاسازی شده بایستی با استفاده از ارزیابی تنوع mtDNA انجام شود و با توجه به این امر می‌توان ماهیان رهاسازی شده را تفکیک نمود (Billington and Hebert, 1991).

به‌طورکلی مطالعات گونه‌های مهره‌دار نشان داده است که انشعاب نوکلئوتیدی در mtDNA بسیار سریع‌تر از DNA هسته می‌باشد. این امر به دلیل سرعت‌بالای نرخ جهش در mtDNA می‌باشد که ممکن است ناشی از کمبود عوامل ویرایش در هنگام همانندسازی و یا اندازه کوچکتر جمعیت مؤثر باشد که درنتیجه وراثت مادری ژنوم هاپلوئید میتوکندریایی صورت می‌پذیرد. تقریباً کل مولکول mtDNA به‌جز تقریباً یک کیلو جفت باز (kbp) منطقه کنترل[1] که منطقه آغاز همانندسازی و نسخه‌برداری مولکول است، نسخه‌برداری می‌شود. به‌طورکلی بخش‌های فاقد کد ازجمله ژن منطقه کنترل سطوح بالایی از تنوع را نسبت به ژن‌های دارای کد مثل ژن سیتوکروم *b* نشان می‌دهد، احتمالاً به دلیل محدودیت‌های عملکردی و فشارهای به‌گزینی می‌باشد (حقیقی و همکاران، ۱۳۹۱).

بررسی مارکرهای mtDNA تاکنون منحصراً برای بررسی ساختار جمعیت‌های بسیاری از انواع ماهیان و آبزیان ازجمله: مارماهی، ماهی آبی، شوریده، سنگسر، کوسه‌ها و ماهیان خاویاری به کار گرفته‌شده‌اند. دلایل متعددی وجود دارد که مارکرهای mtDNA به‌طور گسترده‌ای در مطالعات ژنتیکی جمعیت جانوران به‌کاربرده می‌شود. اول اینکه، کار کردن با این مولکول آسان است. اندازه کوچکی دارد و دارای ژن‌های دست‌نخورده می‌باشد. دوم اینکه، اگرچه ژن‌ها در این مولکول دست‌نخورده باقی‌مانده‌اند ولی روی‌هم رفته میزان جهش بالاست. منطقه‌ای که ژنی را کد نمی‌کند (حلقه D) در خیلی از رده‌ها به‌سرعت تکامل می‌یابد. نرخ بالای جهش در DNA میتوکندریایی

1- D-loop

ممکن است تا حدودی درنتیجه محصولات فرعی تنفس سلولی و همچنین عدم مکانیسم‌های تعمیرکننده در مقایسه با DNA هسته‌ای است. سومین خصوصیت بارز mtDNA عدم نوترکیبی آن است به این منظور که فرزندان تقریباً همان ژنوم میتوکندریایی مادر را دریافت می‌کنند. درنهایت به دلیل این‌که mtDNA هاپلوئید بوده و از یک والد به ارث می‌رسد اندازه جمعیت آن یک‌چهارم اندازه جمعیت DNA هسته‌ای دیپلوئید می‌باشد (Brown, 2008).

کاربرد mtDNA در ژنتیک حفاظت (Conservation genetics)

یکی از مهم‌ترین کاربردها در زیست‌شناسی، شناسایی واحدهای حفاظت (یا واحدهای مهم تکاملی) با استفاده از روش‌های مولکولی است. این واحدها شامل جمعیت‌هایی هستند که تاریخچه زیستی مشخصی دارند و با توجه به تنوع زیستی‌شان به‌طور جداگانه مدیریت شوند. درگذشته معمولاً برنامه‌های مدیریتی بر اساس شناخت واحدهای مورفولوژیکی بود که می‌توانست خود موجب اشتباهاتی در شناسایی واحدهای حفاظتی ایجاد نماید. درنتیجه اطلاعات مورفولوژیکی مطمئن نیستند و بایستی از روش‌های مولکولی استفاده شود. در سطوح فراگونه‌ای که ممکن است ازنظر جغرافیایی جدا شوند، واحدهای حفاظتی می‌تواند با استفاده از روش‌های شجره شناسی جغرافیای شناسایی شود که با داده‌های فیلوژنتیکی و جغرافیایی زیستی ترکیب می‌شود (حقیقی و همکاران، ۱۳۹۱).

از کاربردهای بسیار مفید بررسی‌های mtDNA در ژنتیک حفاظت، شناسایی یا تأیید شرایط ژنتیکی منحصربه‌فرد بخش‌های مشخص جمعیت، زیرگونه‌ها و گونه‌های نادر، در معرض خطر یا در حال تهدید بوده است. برای مثال Grunwald و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از بررسی‌های mtDNA و قطعه منطقه D تأیید کردند که جمعیت‌های مختلف زیر گونه تاس ماهی اقیانوس اطلس *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* در معرض خطر می‌باشد. اطلاعات مربوط به mtDNA در راستای تشخیص ژنتیک تاس ماهی در معرض خطر ساکن آلاباما، *Scaphirhynchus suttkusi*، از تاس ماهی پاروپوزه و تاس ماهی در معرض خطر *S. albus*، از اهمیت بسیاری برخوردار بود. تشخیص تاس ماهی *S. albus* از تاس ماهی پاروپوزه در برخی مناطق که آن‌ها به‌صورت هم بوم زیست می‌کنند، با توجه به عواملی مثل دورگه گیری و نفوذ ژن‌ها مشکل است. Wirgin و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از توالی یابی منطقه D مولکول mtDNA نشان دادند که حداقل ۹ جمعیت از تاس ماهی بینی کوتاه *Acipenser brevirostrum* در بخش‌های شرقی و جنوب شرقی امریکا وجود دارد که نیازمند به مدیریت و حفاظت از این جمعیت‌ها بایستی در دستور کار قرار گیرد.

مطالعات mtDNA در زمینه ژنتیک حفاظت بسیار بااهمیت می‌باشد. به علت استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر DNA حاصل از قطعات بافتی کوچک، به دست آوردن اطلاعات mtDNA گونه‌ها، زیرگونه‌ها و جوامع در معرض خطر یا تهدید، بسیار آسان‌تر خواهد بود. روش‌های قبلی mtDNA اغلب نیازمند کشتن ماهی بود که این عمل در مورد گونه‌های در معرض خطر یا تهدید بسیار نامناسب است. در حال حاضر امکان استفاده از روش‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی، نمونه‌برداری از خون، بافت قاعدهٔ باله‌ها، سبیلک، تکه‌برداری از ماهیچه و یا برداشت فلس‌ها برای به دست آوردن مقادیر اندکی بافت برای استخراج DNA، فراهم است. پس از نمونه‌برداری مناطق خاصی از مولکول mtDNA که برای پاسخگویی به سؤالات حفاظتی مطرح شده مناسب باشد، می‌توان آن را با استفاده از PCR تکثیر کرده و توالی DNA آن را تعیین نمود و یا با استفاده از تکنیک هضم آنزیمی (RFLP) بررسی نمود (Billington, 1993).

نقش حلقه D (Displacement-loop) در ژنتیک جمعیت

حلقه D[1] به‌عنوان قسمتی از ناحیه کنترل معرفی می‌شود که از منطقه آغاز همانندسازی رشته سنگین (OH) شروع و تا توالی پیوسته انتهایی (TAS[2]) ادامه دارد. علاوه بر وظیفه این قسمت‌ها نواحی چپ و راست به‌وسیله جهش‌های طولی و جانشینی‌های بازی به‌سرعت تکامل می‌یابند؛ اما به دلیل حذف و الحاق بالا توزیع جهش‌ها در منطقه کنترل می‌تواند در بین گونه‌ها تغییر یابد. برای مثال، در مقایسه با ناحیه چپ نواحی اطراف CSB1 تنوع بیشتری را در برخی موجودات دارد. برخی موجودات توالی‌های تکراری را در مناطق TAS و CSB نشان می‌دهند (Hoelzel, 1993).

در مهره‌داران، منطقه کنترل می‌تواند به ۳ ناحیه تقسیم شود (تصویر ۱۱-۳۳). (۱) ناحیه چپ (انتهای '5) حاوی یک یا چند توالی پیوسته انتهایی (TAS) جاییکه سنتز رشته سنگین پیدایش یافته متوقف می‌شود؛ (۲) ناحیه مرکزی محافظت‌شده، غنی از C-G که در تنظیم همانندسازی رشته سنگین دلالت دارد؛ (۳) ناحیه راست (انتهای '3) که جایگاه آغاز همانندسازی رشته سنگین (OH) است و دو یا سه قسمت توالی محافظت‌شده کوتاه[3] (CSBs) را در بردارد. امروزه مطالعات گسترده‌ای از توالی یابی منطقه کنترل در ماهیان منتشر شده است. هیچ شکی وجود ندارد مطالعاتی که بر اساس توالی یابی منطقه کنترل صورت می‌پذیرد ساختارهای شجره شناسی

1- Displacement-loop
2- Termination association sequence
3- Conserved Sequence Blocks

جغرافیایی یا فیلوژنتیکی گونه‌های نزدیک به هم و همچنین ســـاختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف ماهیان را معلوم می‌سازد (Avise, 1994).

مواد و وسایل موردنیاز

ساخت بافرها (منبع LAB FUQS)

۲۰SDS درصد (سدیم دودسیل سولفات): مواد مورداستفاده: SDS، HCL و آب مقطر

طرز تهیـه: مقـدار ۱۰۰ گرم کریســـتـال SDS در ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمـای ۶۸ ° سـانتی‌گراد حل‌شده و سپس با اضافه کردن pH HCl را به ۷/۲ رسانده و سپس حجم این محلول را به ۵۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. این محصول در دمای آزمایشگاه نگهداری می‌شود.

بافر TAE: موارد مورداستفاده:Tris, NaEDAT و اسید استیک گلاسیال. طرز تهیه: مقدار ۴۸/۴ گرم تریس در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌شود، سپس ۲۰ میلی‌لیتر Na2 EDTA نیم مولار و ۱۱/۴۲ میلی‌لیتر اسـید اسـتیک گلاسیال به بافر اضافه می‌شود. حجم محلول را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر رسانده و در دمای اتاق نگهداری می‌کنیم.

بافر سـنگین کننده (Loading buffer): مواد مورداسـتفاده: برموفنل ۱٪، زایلن سیالین ۱٪، گلیســـرول ۵۰٪. طرز تهیـه: مقـدار ۲۵۰ گرم برموفنـل بلو بـا ۲۵۰ گرم زایلن ســـیالین را در ۳۳ میلی‌لیتر تریس ۱۵۰ میلی مولار بـا pH =۷,۶ حـل نموده و پس‌ازآن مقـدار ۶۰ میلی‌لیتر از ماده گلیسـرول و مقدار ۷ میلی‌لیتر آب مقطر اضـافه کرده و محلول فوق را در دمای آزمایشگاه نگهداری می‌کنیم.

آمونیوم پر سولفات(A.P.S): مواد مورداستفاده: پودر آمونیوم پر سولفات، آب مقطر

طرز تهیه: ۱۰ گرم پودر آمونیوم پر ســولفات را در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و درنهایت حجم محلول را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم و در دمای ۴ ° نگهداری می‌شود.

TEMED: این ماده به‌صــورت محلول بوده و فوق‌العاده ســمی اســت و این ماده دارای خاصــیت کاتالیزوری جهت تسریع پلیمریزه شدن ژل اکریل آمید است.

اکریل آمید ۳۰ درصـد: مواد مورداستفاده: اکریل آمید، متیلن بیس اکریل آمید، آب مقطر. طرز تهیـه: ۲۴ گرم اکریـل آمیـد بـه همراه یـک گرم متیلن اکریـل آمیـد (N,N methylen bis acrylomid) در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ۱۰۰ سـی‌سـی رسـانده می‌شـود و در دمای ۴ درجه نگهداری می‌شود.

۱۰(x)TBE: مواد مورداستفاده: تریس، اسید بوریک، EDTA نیم مولار و آب مقطر

طرز تهیه: برای تهیه یک لیتر (x)TBE ۱۰، ۱۰۸ گرم تریس باز را به همراه ۵۵ گرم اسید بوریک (۴۰ میلی‌لیتر EDTA ۰/۵ مولار) (pH = ۸) مخلوط کرده و حجم نهایی را به‌وسیله آب مقطر دوبار تقطیر به یک لیتر می‌رسانیم.

STE (Sodium Tris-EDTA): مواد مورداستفاده: تریس ۰/۰۵ مولار، EDTA ۰/۰۱ مولار، NaCl ۰/۱ مولار. طرز تهیه: برای تهیه یک لیتر STE گرم تریس ۰/۰۵ مولار و گرم EDTA ۰/۰۱ مولار و گرم NaCl ۰/۱ مولار را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل نموده و pH را به ۸ رسانده و حجم نهایی را به یک لیتر افزایش می‌دهیم.

استخراج DNA

روش‌های متعددی برای استخراج DNA وجود دارد که در این بررسی روش استات آمونیوم برای استخراج کل DNA ژنومی استفاده شد. مقدار ۳-۲ گرم از بافت نرم باله از انتهای باله دمی و باله پشتی تاس ماهیان ایرانی جدا که توسط گروه تحقیقاتی گشت ارزیابی ذخایر بین سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۷۹جمع‌آوری‌شده بودند و در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان موجود بودند، طبق روش تعدیل‌شده Pourkazemi (1996) در الکل ۹۶٪ فیکس شده و به‌منظور استخراج کل DNA ژنومی طبق روش استاندارد استفاده شد.

مواد موردنیاز: ایزوآمیل الکل، بافر STE (۱۰۰ mM NaCl , mM,Tris-HCl 20 mM ۱۰ EDTA)، اتانول مطلق ۷۰ درصد، پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) ساخت Fermentase، محلول SDS ۲۰درصد (سدیم دود سیل سولفات)، آب مقطر تزریقی و بافت موردنظر.

تجهیزات مورداستفاده: قیچی، میکروسانتریفیوژ (ساخت شرکت Eppendorf مدل ۵۴۱۵) ترمومیکسر (ساخت شرکت Eppendorf مدل ۵۴۳۶) تیوپ و رک، نمونه‌بردارها و نوک‌های مربوط به آن‌ها با توانایی ۱۰۰۰،۱۰۰،۲۰ میکرولیتر، دستکش یک‌بارمصرف، یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد.

مراحل استخراج DNA به روش استات آمونیوم

۱. مقدار ۱۰۰–۵۰ میلی‌گرم بافت نرم باله دمی را برداشته و پس از تمیز نمودن روی کاغذ صافی داخل میکروتیوپ های ۱/۵ ml قرار داده می‌شود.
۲. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از محلول STE و ۳۰ –۲۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪ اضافه می‌شود.
۳. پس از خرد کردن بافت توسط قیچی مقدار ۷– ۳ میکرولیتر از پروتئیناز K mg/ml ۱۰ جهت هضم پروتئین‌های بافت اضافه می‌شود.

۴. سپس میکروتیوپ ها داخل دستگاه ترمومیکسر در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸– ۶ ساعت قرار داده می‌شود تا محلول به‌صورت امولسیون غلیظ درآید.
۵. مقدار ۶۰۰– ۴۰۰ میکرولیتر از محلول استات آمونیوم ۷/۵ مولار اضافه می‌شود.
۶. سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm انجام می‌شود.
۷. محلول رویی به‌آرامی جداشده و داخل میکروتیوپ ها ۱/۵ ml جداگانه‌ای ریخته می‌شوند.
۸. ۶۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد شده در یخچال یا اتانول مطلق سرد اضافه‌شده و چندین بار میکروتیوپ ها تکان داده می‌شوند.
۹. مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ کنید.
۱۰. محلول رویی مجدداً دور ریخته شده و مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه می‌شود (اتانول ۷۰٪ جهت شستشوی پلت DNA و جذب نمک‌های موجود در آن است).
۱۱. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام می‌شود.
۱۲. محلول رویی را دور ریخته و برای خشک شدن پلت DNA میکروتیوپ ها به‌صورت وارونه بر روی کاغذ صافی تمیز قرار داده می‌شوند.
۱۳. در پایان مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل می‌شود یا محلول TE را برای حل شدن DNA اضافه کرده و مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم.

بررسی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده

پس از استخراج DNA کیفیت و کمیت آن را می‌توان تعیین کرد که برای این کار از دو روش زیر استفاده می‌شود:

بررسی کیفی DNA استخراج‌شده: در این بررسی جهت بررسی کیفیت DNA استخراج‌شده از روش الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز (۰/۹) و میزان فلورسانس ترکیب اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) جذب‌شده به‌وسیله DNA صورت گرفت. ترکیب اتیدیوم بروماید بین بازهای DNA فرورفته (Intercalate) و در اثر جذب DNA، فلورسانس نارنجی‌رنگی پس از تابش نور فرابنفش از خود منتشر می‌کند. با استفاده ازاین‌روش می‌توان مقدار DNA را به‌صورت تخمینی حدس زد (۵–۱ نانوگرم). ازاین‌روش زمانی استفاده می‌شود که در نمونه‌ها ناخالص بوده و یا به‌کارگیری روش اسپکتروفتومتری برای خواندن طول‌موج فرابنفش میسر نباشد.

بررسی کمی DNA استخراج‌شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری: برای تعیین کمیت DNA نمونه‌ها پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل ND1000) با آب مقطر استریل، ۲۰ میکرولیتر DNA ژنومی به‌وسیله آب مقطر به حجم ۳۰۰µL رسانده می‌شود، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر و نسبت A260/280 به‌وسیله دستگاه اندازه‌گیری و ثبت می‌شود. DNA و RNA نور UV را جذب کرده و غلظت آن را می‌توان با اندازه‌گیری میزان جذب در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر تعیین کرد. وجود تریپتوفان در پروتئین باعث جذب در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر می‌شود در نتیجه نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ (A_{260}/A_{280}) خلوص DNA را نشان می‌دهد. این نسبت برای DNA خالص بین ۱/۸– ۱/۶ است. درصورتی‌که نسبت A_{260}/A_{280} کمتر از ۱/۶ باشد نشانه آلودگی پروتئینی در نمونه‌ها می‌باشد و درصورتی‌که نسبت A_{260}/A_{280} بیشتر از ۲ باشد نشانه وجود RNA در نمونه‌ها است.

شکل ۱۱-۳۴: دستگاه PCR محصول شرکت Eppendrof برای انجام آزمایش‌های ژنتیک مولکولی

روش محاسبه غلظت DNA

غلظت DNA در نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

مقدار DNA (µg/ml) = A_{260} × ۵۰ × d

d = ضریب رقت؛ ۵۰ = میزان غلظت DNA (µg/ml) درصورتی‌که میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر ۱ باشد؛ A_{260} = میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر.

ارزیابی کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز

مواد مورداستفاده: بافر TAE با غلظت ۱۰X (تریس- استات)، آگارز، بافر لود کننده (Loading buffer) اتیدیوم بروماید ۱٪، آب مقطر استریل. تجهیزات مورداستفاده: نمونه‌بردارها و نوک‌های مربوط به آن‌ها در اندازه‌های مختلف با توانایی برداشتن نمونه با حجم ۲۰ میکرولیتر، سینی ژل، دستکش یک‌بارمصرف، دستگاه UV ترانس ایلیومیناتور، الکتروفورز افقی و منبع تأمین‌کننده جریان الکتریسته (ساخت شرکت (Amersham Pharmacia) دستگاه مستندسازی ژل (vilber loumat) همراه با برنامه نرم‌افزاری Bio capt

مراحل کار: در این روش DNA استخراج‌شده روی ژل آگارز ۰/۸٪ (برحسب اندازه DNA) الکتروفورز می‌شود:

۱. تانک الکتروفورز تمیز و خشک‌شده و در سطح افقی صاف به‌منظور تعادل مناسب تنظیم و قرار داده می‌شود.
۲. سینی مخصوص ژل را در محلی مسطح قرار داده و شانه روی ژل قرار داده خواهد شد تا یک میلی‌متر با کفی سینی ژل فاصله داشته باشد.
۳. برای تهیه ژل آگارز ۰/۸درصد ۳ میلی‌لیتر بافر TAE(10 x) را در ارلن ریخته و ۰/۳ گرم آگارز به آن اضافه گردید و حجم آن با آب مقطر به ۳۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود.
۴. سوسپانسیون حاصله را روی شعله حرارت داده تا آگارز در آن حل و شفاف شود و سپس ارلن در دمای محیط آزمایشگاه قرار می‌گیرد تا کمی سرد شود به‌اندازه‌ای که دمای سوسپانسیون به حدود ۵۰ الی ۵۵ درجه سانتی‌گراد برسد.
۵. زمانی که دمای محلول به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید، مقدار ۲-۱ میکرولیتر اتیدویوم بروماید ۱٪ به‌دقت به آن اضافه و محلول کاملاً به هم زده می‌شود.
۶. آگارز حل‌شده را در سینی ژل ریخته و اجازه می‌دهیم تا منعقد شود و از تشکیل حباب نیز در ژل جلوگیری شود.
۷. پس از سفت شدن ژل حامل‌های دو طرف سینی باز و ژل به‌آرامی داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد و پس از مدتی شانه ژل به‌آرامی از ژل خارج گردید و سپس به تانک و به میزان نیاز استاندارد دستگاه، بافر TAE(10 x) ریخته می‌شود.
۸. مقدار ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده همراه با ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملاً مخلوط و توسط سمپلر با دقت به هر یک از چاهک‌های ژل ریخته می‌شود.
۹. تانک الکتروفورز به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق بر روی ۱۰۰ ولت تنظیم می‌شود.

۱۰. پس از رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل، ژل موردنظر بر روی دستگاه UV ترانس ایلیومینیاتور منتقل می‌شود و کیفیت DNA ازلحاظ خلوص، آلودگی فنلی، پروتئین و شکستگی DNA ارزیابی می‌شود و نمونه‌های با باند قوی به‌منظور آزمایش‌های PCR انتخاب می‌شوند.

الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پل اکریل آمید ۶٪

در این بررسی ژل پلی اکریل آمید به دلیل حساسیت بیشتر برای بررسی نتایج PCR در روش PCR-RFLP استفاده گردید و برای آماده‌سازی ژل از مواد و تجهیزات ذیل استفاده می‌شود: آب مقطر دوبار تقطیر، اکریل آمید، TBE(10X)و آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد،TEMED، بافر سنگین کننده، مارکر 100 bp ساخت شرکت Fermentase، الکتروفورز عمودی ساخت شرکت Hoeffer مدل ۶۱۱۵۲ مولد جریان برق Amersham pharmacia

روش کار

۲۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۷/۵ میلی‌لیتر آکریل آمید ۳۰ درصد، ۵-۳ میکرولیتر TEMED به محلول اضافه‌شده و خوب هم زده می‌شود. سپس محلول حاصل به فضای بسته شده بین صفحات شیشه‌ای که قبلاً آماده شده‌اند، منتقل می‌شود و سپس شانه مربوطه با تعداد دندانه‌های ۲۰- ۱۵ عدد و با جلوگیری از تشکیل حباب در محل خود قرار می‌گیرد. پس از بسته شدن ژل (حدود ۱۰ تا ۱۵ دقیقه) شانه را به‌آرامی‌برداشته و چاهک‌ها را با بافر TBE (1X) شستشو داده و نمونه‌ها به ترتیب در محل چاهک‌ها ریخته شده و ژل در ستون عمودی بافر حاوی TBE(1X) قرار می‌گیرد. بین نمونه‌ها از مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده می‌شود. با روشن نمودن دستگاه و تنظیم مولد برق آن بروی ولتاژ ۱۲۰ ولت، الکتروفوز نمونه‌ها در مدت ۳-۲ ساعت انجام می‌شود.

رنگ‌آمیزی ژل پلی اکریل آمید با نیترات نقره: مواد و تجهیزات مورداستفاده: اسیداستیک، اتانول، نیترات نقره،NaOH، فرمالدهید، آب مقطر دو بار تقطیر شده، شیکر Akhtarian مدل ۲۰۴۰-۰۵، ظروف رنگ‌آمیزی. تهیه بافرهای ۱، ۲ و ۳: برای ساخت بافر ۱(بافر استیک ۵٪ و اتانول ۱۰٪)، ۴۰ میلی‌لیتر اتانول و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک و ۳۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. برای ساخت بافر ۲ (بافر نیترات نقره ۱٪) ۰/۲ گرم نیترات نقره در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌شود. برای ساخت بافر ۳ (بافر فرمالدئید ۱۵٪ وNAOH ۴/۵ درصد) ابتدا ۴/۵ گرم NAOH را در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و درنهایت ۲-۱ میلی‌لیتر فرمالدهید به محلول اضافه شد. برای رنگ‌آمیزی ژل دوبار و هر دفعه به مدت ۱۰ دقیقه در بافر ۱ قرار داده شده تا ژل فیکس شود سپس محلول را تخلیه کرده و ۱۰ دقیقه در بافر ۲ شستشو داده و سپس ژل را دوبار

در آب مقطر دوبار تقطیر شستشو داده، به‌گونه‌ای که هیچ آبی در ظرف پس از شستشو وجود نداشته باشد و سرانجام ژل در بافر ۳ قرار داده شده تا باندها ظاهر شوند سپس محلول دور ریخته شده و ژل در ورق پلاستیکی مخصوص بسته‌بندی می‌شود و برای مشاهده عکس‌برداری و ارزیابی می‌شود.

روش توالی یابی مستقیم (Direct sequencing)

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR): مواد و تجهیزات مورداستفاده: آنزیم تک DNA پلیمراز ساخت شرکت Fermentase، ۵۰mM $MgCl_2$ ساخت شرکت Fermentase، PCR Buffer در غلظت ۱۰X ساخت شرکت Fermentase، آب مقطر استریل، DNA ژنومی استخراج‌شده، نمونه‌بردارها و نوک‌های مربوط به آن‌ها با توانایی برداشتن ۱۰،۲۰،۱۰۰میکرولیتر و میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری استریل، دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf

۱. برای هر نمونه یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت می‌شود. سپس روی یخ، ترکیبات جدول ۲-۲ با مقادیر مشخص‌شده به‌دقت افزوده می‌شود.
۲. محتویات میکروتیوب ها توسط سمپلر به‌دقت هم زده شد و سپس میکروتیوب‌ها را به مدت ۱۰ثانیه سانتریفیوژ کرده تا محتویات آن‌ها ته‌نشین می‌شود.

بهینه کردن PCR: برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد که شامل مراحل زیر است را انجام داده و سپس با توجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط می‌کنیم (جدول ۱۱-۳). در مرحله اول با مشخص نمودن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال[1] هرکدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف شکستگی (اسمیر) و باندهای اضافی غلظت مناسب $MgCl_2$، DNA ژنومی، آغازگر و dNTPs به کار گرفته شد (جداول ۱۱-۳ و ۱۱-۴). پس از اتمام کار نمونه‌ها به یخچال منتقل می‌شود. پرایمرهای اختصاصی از ناحیه کنترل DNA میتوکندریایی از توالی قطعه حلقه D گزارش شده در بانک ژن NCBI به‌دست‌آمده و سپس به کمک نرم‌افزار Gunrunner طراحی می‌شود.

محصول PCR در ژل آگارز ۰/۸ درصد با نقطه‌جوش پایین خالص‌سازی می‌شود. به‌این‌ترتیب DNA به‌طور مستقیم در تکه‌های ذوب‌شده طبق روش استاندارد با ^{35}S و با استفاده از کیت توالی یابی cyclist Taq DNA و پرایمر ۱ به‌عنوان پرایمر توالی یابی در دمای الحاق ۵۵ درجه سانتی‌گراد به کار گرفته می‌شود. توالی‌های DNA در ژل واسرشت شده پلی اکریل آمید ۶ درصد

1- Annealing

و ۷ مولار اوره حل می‌شـود . پس از فیکس شـدن ژل‌ها و خشک شدن بر روی سینی شیشه‌ای در معرض فیلم اشعه X به مدت چند روز قرار می‌گیرند.

جدول ۱۱-۴: غلظت و نوع مواد مصرفی در مرحله PCR در روش توالی یابی

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA	۱۰۰ نانوگرم	≤1 µg
آنزیم تک DNA پلیمراز	۵U/µ	۰/۲میکرولیتر
dNTPs	۱۰ میلی مولار	۰/۷۵ میکرولیتر
$MgCl_2$	۵۰ میلی مولار	۱/۵ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۲/۵ میکرولیتر
پرایمر ۱	۲۰پیکومول	۱/۲ میکرولیتر
پرایمر ۲	۲۰پیکومول	۱/۲ میکرولیتر
آب مقطر	-	تا ۲۵ میکرولیتر

جدول: ۱۱-۵: چرخه‌های حرارتی مرحله PCR در روش توالی یابی

مراحل	درجه حرارت(سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته سازی[1] اولیه	۹۴	۵	۱
واسرشته سازی الحاق بسط[2]	۹۴ ۵۲ ۷۲	۰/۵ ۰/۵ ۱	۳۰
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

آنـالیز آمـاری: هـاپلوتـایپ‌های مربوط به قطعه حلقه D (D-loop) DNA میتوکندریایی با اسـتفاده از نرم‌افزارهای آماری مشخص می‌شوند. تنوع هاپلوتایپی مخصوص جمعیت‌ها با استفاده از شـاخص Nei و Tajima (۱۹۸۱) اندازه‌گیری می‌شـود. فواصـل ژنتیکی بین هاپلوتایپها بر اسـاس

1- Denaturation
2- Extension

روش دوپارمتری (PHYLIP 3.56C;)محاسبه می‌شود. برنامه آماری MEGA version 4.1، برای ایجاد ماتریس فاصله انشعاب توالی بین هاپلوتایپ‌ها به کار گرفته شد و همچنین برای ایجاد درخت neighbor joining مدل جانشینی نوکلئوتیدی Jukes-Cantor استفاده می‌شود. Nei (۱۹۷۸) پیشنهاد داد که استفاده از مدل Jukes-Cantor برای برآورد تعداد جانشینی نوکلئوتیدی (d) در هر محل (site)، وقتی‌که مقدار d برابر ۰/۰۵ یا کمتر می‌باشد و اینکه آیا انتقال/تغییر در بازها transition/transversion وجود دارد یا خیر مناسب است (Transversion: جانشینی یک باز پورین[1] به‌جای یک باز پیریمیدین[2] و برعکس. Transition: تغییر یک باز پورین به‌جای یک باز پورین دیگر و یا یک باز پیریمیدین به‌جای یک باز پیریمیدین دیگر). نرخ کل transition/transversion (R) با استفاده از فرمول زیر و با استفاده از نرم‌افزار Mega 4.1 به دست می‌آید:

$$R = [A*G*k_1 + T*C*k_2]/[(A+G)*(T+C)]$$

در فرمول نشان داده شده k_1: میزان احتمال جانشینی باز پورین و k_2: میزان احتمال جانشینی باز پورین است. الگوی ساختار جغرافیایی با استفاده از واریانس مولکولی (AMOVA) برآورد می‌شود. AMOVA اختلاف بین مناطق، بین جمعیت‌های درون یک منطقه و بین جمعیت‌ها را سنجش می‌کند و مشخص می‌سازد آیا اختلافی وجود دارد یا خیر. فرضیه اصلی ساختار جمعیت که به‌وسیله درخت UPGMA، مربع کای Chi-square analyses سنجش می‌شود، با ۱۰۰۰ بار تکرار انجام می‌شود.

روش هضم آنزیمی PCR-RFLP

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR): در روش هضم آنزیمی تنوع ساختار DNA میتوکندریایی با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده بر روی ژن نوکلئوتید دهیدروژناز ۵ (*ND*5) بررسی می‌شود.

به‌منظور انجام مرحله PCR از ویال‌های ۰/۲ استریل شده، به همراه دیگر مواد مصرفی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در شرایط کاملاً استریل در زیر هود لامینار و روی یخ به شرح زیر آماده‌سازی می‌شود:

۱. ابتدا ویال های ۰/۲ را شماره‌گذاری کرده و ترکیبی از مواد مصرفی را آماده کرده، داخل هرکدام از ویال ها می‌ریزیم.
۲. ویال‌ها را به مدت چند ثانیه سانتریفیوژ می‌کنیم تا کاملاً محتویات آن همگن شود.

1- Purine
2- Pyrimidine

۳. ویال‌ها را در دستگاه مولد چرخه حرارتی[1] به مدت ۱۲۵ دقیقه طبق برنامه داده شده به دستگاه گرمخانه گذاری می‌کنیم.
۴. پس از پایان این مرحله نمونه‌های موردنظر را به یخچال در دمای ۴°C انتقال می‌دهیم.

جدول ۱۱-۵: غلظت مواد مصرفی در مرحله PCR در روش هضم آنزیمی

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA	۱۰۰ نانوگرم	≤1 µg
آنزیم تک DNA پلیمراز	۵U/µ	۰/۲میکرولیتر
dNTPs	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرولیتر
$MgCl_2$	۵۰ میلی مولار	۱ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۲/۵ میکرولیتر
پرایمر ۱	۲۰پیکومول	۱ میکرولیتر
پرایمر ۲	۲۰پیکومول	۱ میکرولیتر
آب مقطر	-	تا ۲۵ میکرولیتر

جدول ۱۱-۶: چرخه‌های حرارتی مرحله PCR در روش هضم آنزیمی

مراحل	درجه حرارت(سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵	۱
واسرشته سازی الحاق بسط	۹۴ ۵۸ ۷۲	۰/۵ ۰/۵ ۱	۳۵
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

برای انجام هضم آنزیمی، از ۲۵ آنزیم برشگر استفاده می‌شود. برای این کار مقدار ۵-۳ میکرولیتر از محصول PCR را برداشته و به همراه آنزیم برشگر و بافر آنزیم در داخل میکروتیوب های اپندورف ۰/۵ میلی‌لیتر استریل ریخته و با آب مقطر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر می‌رسانیم

1-Thermo cycler

و به دنبال آن با توجه به دمای بهینه برای هر آنزیمی میکروتیوب‌ها را داخل انکوباتور قرار می‌دهیم و پس از پایان مدت‌زمان هضم (۱۶-۱ساعت) برای محصول PCR حدود ۲/۵ میکرولیتر بافر لودینگ به همراه ۱- ۰/۵ میکرولیتر پروتئیناز K به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم به میکروتیوب‌ها اضافه‌شده و به مدت دو ساعت در دمای ۵۵°C قرار می‌دهیم. درنهایت نمونه‌ها بر روی ژل اکریل آمید ۶٪ برای مشاهده باندهای الکتروفورز می‌شوند.

وزن مولکولی قطعات حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از مارکر ۱۰۰ جفت بازی و DNA فاژ λ که با آنزیم‌های محدودکننده (*Hind*III و EcoRI) تهیه می‌شوند، استفاده می‌شود. قطعات DNA بر روی ژل پلی اکریل آمید و نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه مستندسازی ژل عکس‌برداری می‌شوند.

آنالیز آماری: تعداد نوکلئوتیدهای جانشین شده در هر جایگاه نوکلئوتیدی و انحراف استاندارد آن‌ها بین هاپلوتایپ‌ها را با استفاده از بسته نرم‌افزاری REAP (Raff and Bentzen,1989) برآورد می‌کنیم. انشعاب نوکلئوتیدی بین تمام هاپلوتایپ ها با استفاده از روش D و انشعاب بین همه جفت جمعیت‌ها با استفاده از روش DA ارزیابی می‌شود. تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی طبق روش Nei و به کمک نرم‌افزار REAP انجام می‌شود. انشعاب بین نمونه‌ها و خطای استاندارد آن‌ها طبق روش Nei و Li انجام می‌شود. ماتریس مقدار انشعاب بین جمعیت‌ها که از طریق REAP به دست می‌آید، بود برای آنالیز خوشه‌بندی (cluster analysis) (UPGMA در نرم‌افزار NTSYS) و ساخت دندروگرام (dendrogram) استفاده می‌شود.

برای ارزیابی مقدار سطح معنی‌داری اختلاف بین جمعیت‌ها در فراوانی هاپلوتایپ ها، روش‌های آماره F (F-statistics) از نرم‌افزار آماری Arliquin 2000 استفاده می‌شود. هتروژنی heterogeneity بین جمعیت‌ها با استفاده از تست pseudoprobability برآورد می‌شود. محاسبه تنوع نوکلئوتیدی درون جمعیت و تنوع هاپلوتایپی تعداد کل نوکلئوتیدها با استفاده از REAP انجام می‌شود.

ساختار ژنتیک جمعیت: برای هر آنزیم جداگانه سنجش هموژنی فراوانی RFLP بین نمونه‌های مناطق با استفاده از شبیه‌سازی Mont-Carlo در برنامه REAP با ۱۰۰۰ بار تکرار سنجش می‌شود. این آنالیز برای همه نمونه‌ها انجام می‌شود.

رابطه بین تنوع ژنتیکی و جدایی جغرافیایی: شاخص (d) محاسبه‌شده بین همه جفت مناطق برای ساخت درخت (NJ) در phylip انجام می‌شود. سنجش هموژنی فراوانی هاپلوتایپ با استفاده از آنالیز Mont-Carlo در برنامه REAP با ۱۰۰۰ بار تکرار انجام می‌شود. AMOVA برای برآورد زیرجمعیت‌ها به‌وسیله جداسازی partitioning کل واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها

و با محاســـبه F_{st} آنالوگ Φ_{st} و ســـطح معنی‌داری آماری با آنالیز permutation analysis با ۱۰۰۰ بار تکرار انجام می‌شود.

تعداد هاپلوتایپ‌ها ← $[ne = 1(\Sigma x^2_i)^{-1}]$

تنوع هاپلوتایپی ← $h= 2n\ (1- \Sigma x^2_i)(2n-1)^{-1}$

n = اندازه نمونه

xi = فراوانی هاپلوتایپ در یک جمعیت

فصل دوازدهم

فنون آزمایشگاهی سخت‌پوستان

تعریف میگو: میگوها گروهی از حیوانات با بدن سخت هستند که به شاخه بندپایان، زیرشاخه سخت‌پوستان و رده مالاکوستراکا تعلق دارند. بدن آن‌ها حالت بندبند دارد. ضمایم حرکتی نیز به‌صورت بندبند و مفصلی است. آن‌ها از آبشش‌ها برای تنفس استفاده می‌کنند. ویژگی آن‌ها داشتن اسکلت خارجی exoskeleton(متشکل از یک پلیمر کربوهیدرات به نام کیتین، مواد معدنی، عمدتاً کربنات کلسیم و پروتئین) است. کیتین ازلحاظ شیمیایی از جنس پلی ساکارید ازت دار است که در آن گلوکز، آمونیاک و اسید استیک به‌صورت مولکول‌های گلوکزامین وجود دارد. بدن میگو بندبند بوده و از ۱۹ قطعه تشکیل‌شده است که شامل سر، سینه و شکم است (بندهای ۱ تا ۵ سر را تشکیل می‌دهند؛ بندهای ۶ تا ۱۳ سینه و بندهای ۱۴ تا ۱۹ شکم را شامل می‌شوند). سر و سینه باهم یکی شده و سرسینه (سفالوتوراکس) را تشکیل داده است. قسمت سر را کاراپاس (سخت جامه) در بر گرفته است (کاسترو و هوبر، ۲۰۱۰).

توضیحات

میگو، لابستر و خرچنگ با حدود ۱۰۰۰۰ گونه تحت عنوان دکاپودا (این کلمه به معنی ده پایان است) بزرگترین گروه سخت‌پوستان هستند. اندازه ده پایان هم در بین سخت‌پوستان از همه بزرگتر است. بسیاری از آن‌ها به‌عنوان غذا دارای اهمیت تجاری هستند.

ویژگی ده پایان، داشتن پنج زوج پا یا پره ئوپود است که اولین زوج آن سنگین‌تر است و معمولاً چنگال‌هایی برای تغذیه و دفاع دارد. ده پایان همچنین سه زوج ماکسیلیپد دارند که نزدیک دهان قرارگرفته و به سمت بالا می‌چرخد و برای سوا کردن غذا و راندن آن به سمت دهان کاربرد دارد. ماکسیلیپد ها برای به‌عنوان اندام فیلتر کننده برای ذرات غذایی کوچک در ده پایان مورداستفاده قرار می‌گیرد. کاراپاس به‌خوبی توسعه‌یافته و بخشی از بدن را احاطه می‌کند که با آن سفالوتوراکس (سرسینه) گفته می‌شود. بقیه بدن را شکم می‌نامند.

سلسله اعصاب مرکزی به‌صورت یک جفت گره عصبی است که در بالای دهان واقع شده است. این گره‌ها به یک جفت طناب عصبی پشتی مربوط می‌شوند. اندام‌های حسی از شاخک‌ها (آنتن‌ها) تشکیل می‌شوند.

میگوها و لابسترها از دوپهلو فشرده‌شده‌اند و شکم آن‌ها متمایز و طویل شده که به آن دم هم می‌گویند و مردم این قسمت را برای خوردن خیلی دوست دارند. میگوها مشخصاً لاشه خوار و جاروب کننده هستند و از ذرات دتریتوس (مواد آلی در حال فساد) در کف بستر تغذیه می‌کنند.

آناتومی میگو

بدن میگو بندبند بوده و از ۱۹ قطعه تشکیل‌شده است که شامل سر، سینه و شکم است (بندهای ۱ تا ۵ سر را تشکیل می‌دهند؛ بندهای ۶ تا ۱۳ سینه و بندهای ۱۴ تا ۱۹ شکم را شامل می‌شوند). سر و سینه باهم یکی شده و سرسینه (سفالوتوراکس) را تشکیل داده است. قسمت سر را کاراپاس در بر گرفته است. در قسمت جلوی سر پوزه یا روستروم قرار دارد که از چند ردیف دندانه تشکیل‌شده است. میگوها دارای چشم مرکب هستند. در قسمت سرسینه پاهای قدم زن (پره ئوپود) و در قسمت شکمی پاهای شناگر (پلئوپود) وجود دارند. شکم از تلسون (باله دمی بادبزنی شکل) تشکیل‌شده است. پاهای یک و دو سه انبرک دارند. میگوها آنتن شلاقی شکل دارند که در تشخیص حائز اهمیت هستند. قسمت برانش میگو در جلوی کاراپاس قرارگرفته است.

اسکلت خارجی چالشی برای رشد ماهی ایجاد می‌کند (همانند زرهی که یک شوالیه را در بر می‌گیرد). حیوان برای رشد باید پوست‌اندازی کرده و کاراپاس کهنه را به دور بیندازد و یک کاراپاس جدید و بزرگتر ترشح کند که آن هم دوباره کوچک‌شده و نیاز به تعویض دارد. به این روند دور انداختن پوسته، اکدیسیس یا پوست‌اندازی گفته می‌شود. چرخهٔ پوست‌اندازی به‌طور متعارف مستلزم محرک‌های خارجی مانند نور و درجه حرارت و همچنین پیام‌های داخلی است که ترشح هورمون اکدیسون را فعال می‌کنند و این هورمون وقایع پوست‌اندازی متعاقب آن را تسهیل می‌کند.

Scientific classification	
Kingdom:	Animalia
Phylum:	Arthropoda
Subphylum:	Crustacea
Class:	Malacostraca
Order:	Decapoda
Suborder:	Pleocyemata
Infraorder:	Caridea

این امر مستلزم ردیفی از مراحل فیزیولوژیک است – شکستن پوسته قدیمی، ذخیره‌سازی کربنات کلسیم و دوباره زایش اندام‌های حرکتی ازدست‌رفته، ساختن ذخایر کربوهیدرات برای تولید کیتین و نهایتاً فعالیت فیزیکی خارج شدن از کاراپاس سخت قدیمی و اتساع (با آب) کاراپاس نرم

جدید و رسیدن آن به‌اندازه بزرگتر. برای چند روز بعد پوسته نرم است (و به همین خاطر به آن خرچنگ نرم پوسته می‌نامند) و حیوان فاقد حرکت است و نسبت به شکار آسیب‌پذیر می‌باشد. هنگامی‌که پوسته سخت شد، حیوان فعالیت‌های متعارف خود را باز می‌یابد. معمولاً چند روز قبل از پوست‌اندازی، سخت‌پوست جای امنی برای مخفی شدن می‌یابد و فعالیت‌های تغذیه‌ای خود را به حالت تعلیق درمی‌آورد.

اکثر میگوها جداجنسی هستند. اندام تناسلی ماده را تلیکوم و اندام تناسلی نر را پتاسما می‌گویند. غدد جنسی سخت‌پوستان زوج و طویل هستند و در سینه و یا شکم قرار دارند. مجاری تخم بر لوله‌ای شکل هستند و معمولاً بر روی زوج آخر پاهای شنا برای نرها و زوج سوم در ماده‌ها ختم می‌شوند.

جدول ۱۲-۱: تفاوت ماهی و میگو

ویژگی	ماهی	میگو
ستون مهره	دارد	ندارد
جمجمه	دارد	ندارد
توپوگرافی بدن	سر، تنه و دم	سر، سینه و شکم (شامل ۱۹ بند)
نوع اسکلت	داخلی	خارجی
ترکیب اسکلت	غضروف یا استخوان	کیتین، کربنات کلسیم و پروتئین
پوشش خارجی	فلس استخوانی	سخت جامه (کاراپاس) کیتینی
اندام حرکتی	باله	ضمایم بندبند
دستگاه عصبی مرکزی	مغز و نخاع	یک جفت گره عصبی
دستگاه دفع	کلیه	پروتونفریدی
دستگاه گردش خون	بسته	باز
رنگدانه انتقال‌دهنده اکسیژن	هموگلوبین	هموسیانین

تصویر ۱۲- ۱: تشریح خارجی (نمای بالا) و داخلی (نمای پایین) اندام‌های میگو (اقتباس از سومیچ و موریسی، ۲۰۰۴).

تصویر ۱۲- ۱: تشریح خارجی (نمای بالا) و داخلی (نمای پایین) اندام‌های میگو (اقتباس از سومیچ و موریسی، ۲۰۰۴).

انواع میگوهای مهم ایران و جهان:

میگوی هندی Penaeus *indicus*

میگوی ژاپنی *Penaeus japonicus*

میگوی خنجری *Metapenaeus affinis*

میگوی ببری سبز Penaeus *semisulcatus*

میگوی ببری سیاه Penaeus *monodon*

میگوی وانامی Penaeus *vannamei*

تصویر ۱۲- ۲: تشریح ساختار لابستر از سطح پشتی (نمای بالا) و شکمی (نمای پایین) (اقتباس از سومیچ و موریسی، ۲۰۰۴).

تصویر ۱۲- ۳: لابستر امریکایی (هوماروس امریکانوس) که شمای کلی یک دکاپود (ده پا) را نشان می‌دهد. چیزی که در این تصـــویر قابل‌مشـــاهده نیســـت، آبشـــش‌های پرمانند اســـت که در حفره‌ای در دو طرف سـفالوتوراکس (سـرسینه) واقع‌شده‌اند. مجاری غدد جنسی (گونوداکت‌ها) در قاعده زوج آخر پاهای قدم زن در نرها و قاعده دومین زوج این پاها در ماده‌ها باز می‌شود (اقتباس از کاسترو و هوبر، ۲۰۱۰).

تصویر ۱۲- ۴:*Panaeus indicus*

تصویر ۱۲-۵:*Panaeus japonicus*

تصویر۱۲-۶: *Metapenaeusaffinis*

تصویر ۱۲-۷:*Penaeus semisulcatus*

تصویر ۱۲-۸:*Penaeus vannamei*

روش‌های بررسی بیماری‌های سخت‌پوستان

قواعد و روش‌هایی که در این فصل بحث می‌شوند، لزوماً با تأکید بر میگوهای پنئید ارائه می‌شوند، زیرا بیشتر بیماری‌هایی که به‌تازگی فهرست آن‌ها توسط OIE ارائه شده (و بیماری‌هایی که موردمطالعه هستند و احتمال دارد در فهرست قرار گیرند)، بیماری‌های میگوهای پنئید هستند (OIE، ۲۰۰۹). طبقه‌بندی میگوهای پنئید در ۱۹۹۷ موردبازنگری قرار گرفت(پزر فارفانته و کنسلی، ۱۹۹۷). زیرجنس‌های پنئید تبدیل به جنس شدند. باوجوداین، ازآنجاکه طبقه‌بندی پنئیدها هنوز به‌طور سرتاسری پذیرفته نشده است، طبقه‌بندی که توسط هولتوئیس (۱۹۸۰) ارائه شده است، در اینجا مورداستفاده قرار می‌گیرد.

نمونه‌برداری

ارزیابی وضعیت سلامتی واحدها از دیدگاه همه‌گیری شناختی

در وضعیتی که تعداد زیادی از تولیدکنندگان کوچک سخت‌پوستان در کشورهایی با منابع بهداشتی نسبتاً پایین فعالیت می‌کنند، رهیافت‌های متفاوتی برای جمع‌آوری داده‌ها موردنیاز است و تکیه بیشتری بر روی تحقیقات هدفمند و روش‌های نظارتی غیرفعال می‌شود. در این حالت، برنامه‌های مشوقی برای تشویق تولیدکنندگان به گزارش وقایع بیماری مورداستفاده قرار می‌گیرد. دست‌اندرکاران محلی یا پرسنل ادارات توسعه نیز می‌توانند اطلاعات مفیدی درباره وقوع بیماری در نواحی تحت مسئولیت خود از طریق تماس‌های خود تأمین کنند و تحقیقات بعدی را درباره وقایع گزارش شده هدایت نمایند.

هنگام طراحی تحقیقات بیماری، نمونه‌برداری از جمعیت‌های سخت‌پوستان وحشی، چالش سختی به همراه دارد. در مکان‌هایی که صید سخت‌پوستان وحشی صورت می‌گیرد، فرصت بالقوه‌ای

برای به دست آوردن نمونه وجود دارد. باوجوداین، این امر بیانگر وجود جمعیتی از حیوانات نسبتاً سالم است که باقی‌مانده و به‌اندازه و سن قابل بهره‌برداری رسیده‌اند؛ بنابراین، تحت خطر ابتلا به بیماری‌های موردنظر قرار دارند.

مواد نمونه که برای انجام آزمایش‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند

مواد نمونه بستگی به بیماری یا عامل بیماری‌زایی که قرار است مورد آزمایش قرار گیرند و همچنین، بستگی به‌اندازه حیوان و اهداف آزمایش دارد. این اهداف شامل تشخیص کامل بیماری، تعیین حاملین تحت بالینی عامل بیماری‌زا یا نمونه‌برداری برای نظارت هدفمند جهت تعیین عاری بودن جمعیت از بیماری خاص در مواد نمونه است. در ارتباط با جزئیات خاص نیازهای نمونه‌برداری، به راهنمای OIE برای نظارت بر بهداشت حیوانات آبزی رجوع کنید.

اختصاصات بر اساس اندازه سخت‌پوست

به کتاب راهنمای OIE درباره نظارت بر بهداشت حیوانات آبزی (۲۰۰۹) و فصول مربوط به هر یک از بیماری‌ها برای جزئیات نیازمندی‌های نمونه‌برداری مراجعه شود.

اختصاصات بر اساس جمعیت‌های سخت‌پوستان

در هنگام توسعه یک برنامه نظارتی، علاوه بر ملاحظات موجود در کتاب راهنمای OIE درباره نظارت بر بهداشت حیوانات آبزی (۲۰۰۹)، موارد زیر نیز درباره جمعیت‌های سخت‌پوستان باید در نظر گرفته شود.

۱- معمولاً جمعیت‌های سخت‌پوستان پرورشی در واحدهای نگهداری متعدد توزیع می‌شوند و معمولاً در استفاده از یک منبع آبی با هم سهیم هستند. به همین خاطر، ممکن است در معرض مواجهه با شرایط مختلف قرار داشته یا نداشته باشند.

۲- سخت‌پوستان تمایل دارند که در واحدهای نگهداری، بر اساس سلامت و کنش‌های متقابل رفتاری دیگر، در ستون‌های آب قرارگرفته و لایه‌بندی ایجاد کنند (برای مثال، حیوانات بیمار غالباً به حاشیه‌ها یا سطح استخرها می‌آیند).

۳- بیماری‌های مختلف سخت‌پوستان، تعداد زیادی گونه‌های حساس دارند که غالباً در مورد حساسیت نسبی آن‌ها اطلاعات اندکی وجود دارد.

۴- تقسیم کردن یا قاطی کردن جمعیت‌های سخت‌پوستان، خصوصیات این جمعیت‌ها را تغییر می‌دهد.

۵- بعضی از جمعیت‌های وحشی سخت‌پوستان گاهی اوقات دارای رفتار اجتماعی هستند که باعث می‌شود تا حد معین در بین هر اجتماع یک نوع همگنی[1] برقرار باشد.

اختصاصات بر اساس وضعیت بالینی

در دوره‌های (اپیزودهای) بالینی بیماری، نمونه‌هایی که ازنظر کیفی به‌دقت انتخاب می‌شوند و جراحات نمایانی دارند، باید از سخت‌پوستان زنده یا در حال مرگ تأمین شوند. باید تمام تلاش‌ها صورت گیرد تا نمونه‌هایی به دست آید که نمایانگر آن بیماری‌ای هستند که ذخایر سخت‌پوستان موردنظر را تحت تأثیر قرار داده است. این نمونه‌ها باید نزار و در حال مرگ باشند، یا اینکه ازنظر بالینی بیمار محسوب شوند. باید از جمع‌آوری نمونه‌های تلف‌شده اجتناب ورزید. هنگامی‌که ذخایر سخت‌پوستان وحشی یا پرورشی، علائم بالینی یک بیماری فعال را نشان می‌دهند که با فهرست بیماری‌های OIE مطابقت دارد، یا توسط آن‌ها پیشنهاد شده است، باید دقت کرد که مطمئن شویم نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به‌درستی برای انجام آزمایش‌های مورد انتظار ذخیره‌شده‌اند (رجوع شود به بخش ذخیره نمونه‌ها برای روش‌های توصیه‌شده). در مورد بیماری‌های فهرست شده در OIE، شدیداً توصیه می‌شود که جدول زمان‌بندی برای نمونه‌برداری طراحی شود (برای مثال، جدول مزرعه، فصل و .....)؛ بنابراین، مراحل خاص زندگی در زمانی نمونه‌برداری خواهد شد که بیشترین احتمال برای جداسازی و تعیین عامل بیماری‌زای مربوطه وجود دارد. این امر خصوصاً هنگامی حائز اهمیت است که روش‌های تشخیصی قابل‌دسترس وابسته به میکروسکوپ ساده یا روش‌های بافت‌شناسی هستند و روش‌های مولکولی را دربر نمی‌گیرند. در مورد بیماری‌هایی مانند عارضه تورا، نکروز عفونی بافت‌های زیر جلدی و خونساز، بیماری لکه سفید، نکروز عضلانی عفونی، تورم نکروز دهنده اندام کبدی لوزالمعدی و بیماری سر زرد، نوجوان‌ها و نیمه بالغین بهترین نمونه‌ها محسوب می‌شوند و در مورد طاعون خرچنگ دراز آب شیرین، نوجوان‌ها و بالغین نمونه‌های مناسب را تشکیل می‌دهند.

نمونه‌های به‌دست‌آمده برای آزمایش‌های مولکولی و پادتنی بیماری‌های فهرست شده در OIE، ممکن است با نمونه‌های مخزن در حد کمتر از پنج عدد به ازای هر نمونه آمیخته شوند. در موردسنجش های تشخیصی معین مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، رونوشت برداری معکوس – واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR (RT)، جداسازی و \ یا کشت عامل بیماری، زی سنجش[2] و غیره خرچنگ‌ها یا سخت‌پوستان دیگری که تازه تلف‌شده‌اند، ممکن است (بسته به شرایط) مناسب باشند.

1- homogenity
2- bioassay

نام‌گذاری ویروس

به‌طورکلی، نام‌گذاری ویروس‌ها که در فصـــول خاص هر بیماری مورداســـتفاده قرارگرفته اســـت، از روش‌های اخیر طبقه‌بندی برای ویروس‌ها که در گزارش کمیته طبقه‌بندی ویروس‌ها (۲۰۰۵) ارائه شـــده اســـت، پیروی می‌کنـد. همچنین، در فصـــول مربوط به هر یک از بیماری‌ها، نام‌هایی برای ویروس‌ها و بیماری‌ها ارائه شـده اسـت که به‌طور متداول در صـنایع پرورش میگو مورداستفاده قرار می‌گیرد. در این فصـول، اسـامی مشـابه متداول‌تری که مورداسـتفاده قرارگرفته‌اند، یا هنوز استفاده می‌شوند، نیز ارائه شده است.

تولید ویروس

ازآنجاکه هیچ تیره سلولی (سخت‌پوست، بندپا یا مهره‌دار) شناخته‌شده‌ای وجود ندارد که بتوان برای تولید ویروس‌های سخت‌پوستان استفاده کرد، لذا آلوده کردن گونه‌های میزبان حساس شناخته‌شده (که عاری از آلودگی به ویروس مورد سؤال هستند)، روش ترجیحی برای تولید ویروس جهت اهداف تجربی است.

نگهداری و ذخیره ویروس

عفونت‌زایی همه ویروس‌های شـناخته‌شده سخت‌پوستان را می‌توان با انجماد کل بدن سخت‌پوست یـا بـافـت‌هـای هـدف آلوده در دمـای ۲۰- درجـه ســـانتی‌گراد برای مدت کوتاه، یا در ۸۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر برای مدت طولانی حفظ کرد.

فنون (تکنیک‌ها)

فنون در دسترس برای تشخیص بیماری‌های سخت‌پوستان، شامل روش‌های سنتی آسیب‌شناسی بر اسـاس ریخت‌شـناسی (میکروسکوپ نوری مستقیم، آسیب‌شناسی بافتی و میکروسکوپ الکترونی)، روش‌های زی سنجش[1] با میزبان‌های شاخص (اندیکاتور) حساس و روش‌های مولکولی (کاوشگرهای ژنی و PCR) اسـت. بااینکه کشـت بافت به‌عنوان یک ابزار اسـتاندارد در آزمایشـگاه‌های تشـخیص پزشکی، دامپزشکی و ماهی در نظر گرفته می‌شود، اما هنوز به‌عنوان یک ابزار تشخیصی قابل‌استفاده و متداول برای عوامل بیماری‌زای سـخت‌پوسـتان محسـوب نمی‌شـود. شـیمی بالینی به یک ابزار تشخیصی متداول برای آسیب شناسان سخت‌پوستان تبدیل نشده است.

1- bioassay

در هنگام نوشتن این بخش از کتاب راهنمای آبزیان، روش‌های تشخیصی در دسترس که ممکن است برای تشخیص بیماری‌های سخت‌پوستان فهرست شده در OIE، یا برای تعیین عوامل مسبب آن‌ها انتخاب شوند، بر اساس موارد زیر استوار است:

۱- علائم درشت‌بینی و بالینی

۲- میکروسکوپ برایت فیلد (زمینه روشن) مستقیم، فاز کنتراست یا دارک فیلد (زمینه تاریک) با لام‌های مرطوب بافتی تماماً رنگ‌آمیزی شده یا رنگ‌آمیزی نشده، گسترش اسکواش بافتی و گسترش‌های اسمیر لکه‌گذاری شده[1]) و لام‌های مرطوب رشته‌های مدفوعی

۳- بافت‌شناسی نمونه‌های تثبیت‌شده

۴- سنجش زیستی حاملین مشکوک یا تحت بالینی با استفاده از میزبان‌های بسیار حساس (مرحله زندگی یا گونه) به‌عنوان شاخصی برای وجود عامل بیماری‌زا

۵- میکروسکوپ الکترونی گذاره[2] یا نگاره [3]

۶- آزمایش‌های پادتنی برای تعیین عامل بیماری‌زا با استفاده از پادتن‌های چند بنیانی سرم‌های ایمن (PAbs) یا پادتن‌های تک بنیانی (mAbs)

۷- روش‌های مولکولی (ازجمله تعیین توالی ژنی که برای تعیین سویه‌ها مناسب است)

۷-۱: کاوشگرهای DNA در سنجش آمیخته گری لکه‌گذاری نقطه‌ای که مستقیماً با نمونه‌های بافتی تازه یا با DNA استخراج‌شده صورت می‌گیرد.

۷-۲: کاوشگرهای DNA یا RNA برای سنجش‌های آمیخته گری درجا (ISH) با مقاطع بافت‌شناسی بافت‌های تثبیت‌شده.

۷-۳: PCR استاندارد و real time و RT-PCR برای سنجش مستقیم با نمونه‌های بافتی تازه یا با DNA استخراج‌شده یا RNA استخراج‌شده.

آزمایش‌های پادتنی تشخیصی برای عوامل بیماری‌زای سخت‌پوستان وجود ندارد. ازآنجاکه سخت‌پوستان پادتن تولید نمی‌کنند، لذا آزمایش‌های تشخیصی فقط به استفاده از آن‌ها برای تعیین عامل بیماری‌زا محدود می‌شود. بااینکه تعدادی از روش‌های تشخیصی پادتنی توسعه‌یافته و در منابع توصیف‌شده‌اند، اما این روش‌ها با پادتن‌های موش و خرگوش انجام‌شده‌اند که نسبت به عوامل بیماری‌زای خاص حاصل از تخلیص از میزبان‌های آلوده تولیدشده بودند. ازآنجاکه ویروس‌های سخت‌پوستان را نمی‌توان به‌طور متداول در محیط آزمایشگاه (یعنی در کشت بافت) کشت داد،

1- impression smears
2- transmission
3- scanned

ویروس تخلیص شـده حاصل از میزبان‌های آلوده به‌طور سنتی برای تولید پادتن استفاده‌شده است. اخیراً سـاختارهای پروتئینی ویروسـی نوترکیب را از روی اطلاعات مربوط به توالی ویروسـی تولید کرده و برای تولید پادتن مورداسـتفاده قرار داده‌اند. فقدان روش‌های کشـت سـلول سـخت‌پوستان، توسـعه و دسترسی به این نوع ابزار تشخیصی را تاکنون شدیداً محدود کرده است. اخیراً استفاده از روش پادتن‌های تک بنیانی (MAb) برای حل این مشـکل آغاز شده است تا چند آزمایش پادتنی را تأمین کنند. Mabها برای عوامل بیماری‌زای چندین بیماری سـخت‌پوسـتان در فهرسـت OIE (ازجمله IHHNV, YHV, TSV, WSSV) در دسـترس هسـتند. کیت‌های \ معرف‌های تشـخیصـی پادتنی برای آلودگی‌های YHV, WSSV, TSV از منابع تجاری در حال حاضـر در دسترس هستند.

روش‌های مولکولی توسعه‌یافته‌اند و بعضی از روش‌ها استفاده گسترده‌ای برای تعیین بسیاری از عوامل بیماری‌زای ویروسـی، باکتریایی و تک‌یاخته‌ای میگوهای پنئیده (یا سـخت‌پوسـتان ده‌پای معین دیگر) دارند. روش‌های تعیین اسید نوکلئیک به‌راحتی در منابع مختلف در دسترس هستند و بعضـی از آن‌ها را به شـکل کیت از منابع تجاری برای عوامل بیماری‌زای فهرست شده توسط OIE می‌توان به دست آورد. این عوامل شامل BP,MRV,IHHNV,YHV/GAV,WSSV,TSV و IMNV هسـتند. روش‌های PCR و RT-PCR برای همه این ویروس‌ها در دسـترس هستند و به شـکل متداول توسـط بخش‌های معینی از صـنعت پرورش سـخت‌پوسـتان مورداسـتفاده قرار می‌گیرند. در مورد عوامل بیماری‌های دیگر فهرست شده در OIE، کاوشگرهای خاص DNA که با برچسـب‌های غیر رادیواکتیو نشـان‌دار شـده‌اند، یا در منابع گزارش شـده‌اند، یا اینکه به‌طور تجاری برای اسـتفاده در فرمت‌های لکه‌گذاری نقطه‌ای (dot. blot) با همولنف یا عصـاره بافتی، یا برای استفاده با مقاطع بافت‌شناسی متداول به کمک ISH در دسترس هستند.

نمونه‌های برداشـته‌شـده برای آزمایش‌های مولکولی یا پادتنی برای بیماری‌های سـخت‌پوسـتان فهرسـت شـده در OIE را می‌توان به‌صـورت نمونه‌های مخزن به تعدادی که بیش از ۵ عدد نمونه نبـاشـند، به ازای هر نمونه مخزن نوجوان، نیمه بالغ و بالغ آمیخته نمود. باوجوداین، در مورد تهیه مخزن تخم‌ها، نوزادان و پس نوزادان به تعداد بیشـتر (برای مثال، حدود ۱۵۰ تخم یا نوزاد یا بیشتر یا ۵۰ تا ۱۵۰ پس نوزاد، بسـته به‌اندازه \ سـن آن‌ها)، ممکن است لازم شود که مواد نمونه‌ای کافی (پادگن برای آزمایش‌های پادتنی یا استخراج اسید نوکلئیک برای آزمایش‌های مولکولی جهت انجام سنجش تشخیصی) تأمین کنیم.

بررسی ریزبینی مستقیم

نمونه‌ها را برای بررسی ریزبینی مستقیم باید هر چه سریع‌تر پس از جمع‌آوری مورد ارزیابی قرار داد. حتی‌الامکان از نمونه‌های زنده استفاده کنید، یا اگر تهیه نمونه زنده عملی نیست، از نمونه‌های تازه، سرد شده یا تثبیت‌شده در فرمالین بافره ۱۰٪ استفاده نمایید. اگر آزمایشگاه میدانی کافی در دسترس است، باید از آن برای فرآوری و آزمایش نمونه‌ها در نزدیک مکان جمع‌آوری نمونه استفاده نمود.

روش‌های بافت‌شناسی

نمونه میگو یا هر سخت‌پوست ده پای دیگر را به هر وسیله‌ای که ممکن است، با حداقل استرس جمع‌آوری نمایید. یا میگو (یا سخت‌پوستان ده‌پای دیگر) را در مجاورت مخزن یا استخر تثبیت نموده، یا اینکه از طریق یک ظرف پرشده از آب و اکسیژن دهی شده به آزمایشگاه انتقال دهید. اگر قرار است که میگوها (یا سخت‌پوستان ده‌پای دیگر) برای مدت کوتاهی قبل از تثبیت نهایی به حال خود رها شوند، هوادهی کافی به داخل ظرف را برای آن‌ها فراهم کنید. برای مطالعه میگوهایی که فرض بر این است که بیمار هستند (یا سخت‌پوستان ده پای دیگر)، نمونه‌هایی را انتخاب کنید که در حال مرگ هستند، رنگشان تغییر کرده است، یا رفتار غیرمتعارف نشان می‌دهند، یا غیرمتعارف هستند، البته به‌استثنای زمانی که هدف، ارزیابی وقوع بیماری (برای مثال، تخمین شیوع بیماری) است. در این موارد، روش انتخابی ترجیحی، نمونه‌برداری تصادفی (بر اساس احتمالات) است.

I- منبع کافی از ماده تثبیت‌کننده آماده کنید. به‌طورکلی، حداقل ده حجم از ماده تثبیت‌کننده را برای یک حجم نمونه بافتی مورداستفاده قرار دهید [به این مفهوم که ۱۰ گرم نمونه میگو (یا سخت‌پوستان ده‌پای دیگر) نیاز به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول تثبیت‌کننده دارد].

II- استفاده از ماده تثبیت‌کننده دیویدسون AFA برای بیشتر موارد بافت‌شناسی توصیه می‌شود. این ماده سریع عمل می‌کند و تغییرات اتولیتیک (تجزیه بافت توسط آنزیم‌های خودی) را در سخت‌پوستان ده پا (خصوصاً در میگوهای پنئید، ماکروبراکیوم روزنبرگی، لابسترهای خاردار جنس پانیلوروس و سایر سخت‌پوستان ده‌پای پرورشی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری) کاهش می‌دهد و محتویات اسیدی آن باعث کلسیم زدایی از کوتیکول می‌شود. فرمول محلول دیویدسون AFA (به ازای یک لیتر) به شرح زیر است:

۱- ۳۳۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪

۲- ۲۲۰ میلی‌لیتر فرمالین[1] ۱۰۰٪ (محلول آبی اشباع ۳۷- ۳۹٪ از گاز فرمالدئید)
۳- ۱۱۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال[2]
۴- ۳۳۵ میلی‌لیتر آب شهر (در مورد سخت‌پوستان دریایی ممکن است آب دریا جایگزین آن شود)

محلول تثبیت‌کننده حاصله را در بطری‌های پلاستیکی یا شیشه‌ای با درپوش‌های مطمئن در دمای اتاق ذخیره کنید.

روش‌های تثبیت با دیویدسون AFA

۱- در مورد نوزادان و پس نوزادانی که بسیار کوچک هستند و نمی‌توان ماده تثبیت‌کننده را به‌راحتی با استفاده از یک سرنگ توبرکولین به آن‌ها تزریق کرد: با استفاده از یک پرده توری با چشمه ظریف یا یک پی‌پت پاستور نمونه‌ها را انتخاب کرده و جمع‌آوری نمایید. میگو (یا سخت‌پوستان ده‌پای دیگر) را که برای نمونه‌برداری انتخاب کرده‌اید، مستقیماً داخل محلول تثبیت‌کننده فرو ببرید. آن‌ها را به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در محلول تثبیت‌کننده نگهداری کرده و سپس به الکل اتیلیک ۷۰٪ برای ذخیره‌سازی انتقال دهید.

۲- در مورد پس نوزادان بزرگتر و نوجوان‌های بسیار کوچک که آن‌قدر کوچک هستند که نمی‌توان به آن‌ها تزریق کرد: نمونه‌ها را انتخاب کرده و جمع‌آوری نمایید. از یک سوزن یا پنس نوک‌تیز و ظریف استفاده کنید تا کوتیکول را شکاف دهید. میگوهای (یا سخت‌پوستان ده پای دیگر) انتخاب‌شده را مستقیماً در داخل ماده تثبیت‌کننده فرو ببرید. آن‌ها را به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در ماده تثبیت‌کننده نگهداری کرده و به الکل ۵۰ تا ۷۰٪ برای ذخیره‌سازی انتقال دهید.

۳- در مورد پس نوزادان بزرگتر، نوجوان‌ها و بالغین: ماده تثبیت‌کننده را (با استفاده از ۵-۱۰٪ حجم: وزن) از طریق سوزن و سرنگ (گوج سوزن بستگی به‌اندازه میگوها یا سخت‌پوستان ده پای دیگر دارد. به این مفهوم که سوزن گوج ۲۷ برای پس نوزادان و نوجوان‌های کوچک استفاده می‌شود) به میگوهای زنده (یا سخت‌پوستان ده‌پای دیگر) تزریق کنید.

۱- از فرمالین ۱۰٪ که قبلا تهیه شده است، برای آماده کردن محلول دیویدسون AFA استفاده نکنید، زیرا محتوای فرمالین این محلول به اندازه کافی برای تثبیت رضایت‌بخش نخواهد بود

۲- اسیدهای دیگر، مانند اسید کلریدریک را جایگزین اسید استیک نکنید. مقاطع بافت‌شناسی که از محلول اسیدکلریدیک- دیوید سون به دست می‌آیند، برای رنگ‌آمیزی متداول هماتوکسیلین و ائوزین مناسب نیستند.

ابتدا باید به اندام کبدی لوزالمعدی (HP) و سپس دو یا چند جای دیگر تزریق شود و حجم تزریق ماده تثبیت‌کننده به حدی باشد که رنگ این بافت را به سفید تا پرتقالی (هنگامی‌که دیویدسون AFA استفاده شود) تبدیل کند. سپس ماده تثبیت‌کننده را به نواحی مجاور سرسینه (سفالوتوراکس)، ناحیه شکمی قدامی و ناحیه شکمی خلفی تزریق کنید.

ماده تثبیت‌کننده را باید بین نواحی مختلف تقسیم کرد، به‌طوری‌که ناحیه سرسینه خصوصاً اندام کبدی لوزالمعدی سهم بیشتری نسبت به ناحیه شکمی دریافت کند.

یک راهنمای خوب برای اطمینان از اینکه ماده تثبیت‌کننده به‌اندازه کافی تزریق‌شده است، این است که مقدار این ماده در حد ۵ تا ۱۰٪ وزن بدن میگوها (یا سخت‌پوستان ده‌پای دیگر) باشد. همه علائم زنده‌بودن باید به‌سرعت متوقف شود و تغییر رنگ قابل‌مشاهده را باید بتوان در نواحی تزریق مشاهده کرد.

فوراً پس از تزریق، کوتیکول را با چاقوهای تشریح از محل ششمین بند شکمی به سمت قاعده پوزه (روستروم) شکاف دهید و خصوصاً دقت کنید که برش آن‌قدر عمیق نباشد که وارد بافت‌های زیرین شود. شکاف در ناحیه سرسینه باید درست در جانب خط میانی پشتی[1] باشد، درحالی‌که شکاف در ناحیه شکمی باید تقریباً میانی- جانبی[2] باشد.

۴- در مورد میگوهای (یا بیشتر سخت‌پوستان دیگر) بزرگتر از ۱۲ گرم: پس از تزریق ماده تثبیت‌کننده، باید بدن حیوان را به‌طور عرضی برید و به دو قسمت تقسیم کرد. این عمل حداقل یک‌بار درست در عقب محل اتصال شکم \ سرسینه و (به‌طور انتخابی) دوباره در وسط ناحیه شکمی انجام می‌شود.

۵- در مورد سخت‌پوستان بسیار بزرگ (برای مثال، لابسترها، خرچنگ‌ها، پنئیدهای بالغ، ماکروبراکیوم روزنبرگی بالغ، بعضی از گونه‌ها و مراحل زندگی خرچنگ‌ها و غیره): اندام‌های موردنظر را می‌توان پس از تزریق ماده تثبیت‌کننده برش داد. سپس برای تکمیل تثبیت این نمونه‌های بافتی می‌توان از روش‌هایی که قبلاً اشاره شد، استفاده کرد.

پس از تزریق، برش‌ها و مقاطع دوطرفه \ سه‌طرفه یا جدا کردن اندام‌های کلیدی، نمونه را در داخل محلول تثبیت‌کننده غوطه‌ور سازید (از نسبت ۱۰: ۱ از ماده تثبیت‌کننده: بافت استفاده کنید). اجازه دهید که روند تثبیت در دمای اتاق به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت تداوم یابد. این مدت بستگی به‌اندازه سخت‌پوست موردنظر دارد. می‌توان از محلول دیویدسون AFA برای مدت

1- dorsal midline
2- mid- lateral

طولانی‌تری استفاده کرد تا جدار خرچنگ‌ها، لابسترها، خرچنگ‌های دراز آب شیرین و غیره کلسیم زدایی شود.

پس از تثبیت، نمونه‌ها را باید به الکل اتیلیک ۷۰٪ انتقال داد تا در این ماده برای یک دوره نامعین ذخیره شوند.

ثبت یک تاریخچه کامل از نمونه‌ها در هنگام جمع‌آوری: مشاهدات با چشم غیرمسلح بر روی شرایط سخت‌پوستان، گونه، سن، وزن، منبع (وحشی یا اگر پرورشی است، شماره استخر یا مخزن، شماره ذخیره و غیره) و هر اطلاعات مرتبط دیگر که ممکن است در زمان دیگر موردنیاز باشد.

در هنگام تثبیت، ذخیره‌سازی و انتقال به آزمایشگاه، باید برچسب به همراه نمونه در داخل یک ظرف قرار داشته باشد. همیشه از مداد نرم[1] شماره ۲ بر روی کاغذ مقاوم در برابر آب استفاده کنید (کاغذ پلاستیکی توصیه می‌شود؛ هرگز از جوهر یا قلم‌های علامت‌گذاری استفاده نکنید، زیرا جوهر توسط الکل حل می‌شود).

انتقال و تحویل نمونه‌های نگهداری شده

ازآنجاکه نمی‌توان و نباید حجم‌های زیادی از الکل را از طریق پست یا حمل‌ونقل انتقال داد، روش زیر برای این منظور توصیه می‌شود: نمونه‌ها را از داخل الکل اتیلیک ۷۰٪ خارج کنید. در مورد نوزادان، پس نوزادان یا نوجوان‌های کوچک در صورت دسترسی، از ویال‌های پلاستیکی ضد نشت با درپوش پیچ‌دار استفاده کنید. اگر ناچار هستید که از ویال‌های شیشه‌ای استفاده کنید، آن را طوری بسته‌بندی کنید که دچار شکستگی نشود. در مورد نمونه‌های بزرگتر، ظروف نمونه را در داخل دستمال‌کاغذی سفید بپیچانید تا کاملاً پوشیده شود (از پارچه‌های نخی ریش‌ریش شده استفاده نکنید). نمونه‌های پیچیده در دستمال‌کاغذی را داخل کیسه‌های پلاستیکی قابل بستن قرار دهید و با الکل اتیلیک ۷۰٪ به حالت اشباع درآورید. برچسب را وارد کرده و کیسه پلاستیکی را ببندید. سپس این کیسه را در داخل کیسه قابل بستن دوم قرار دهید. چندین کیسه پلاستیکی کوچک را می‌توان دوباره در داخل یک ظرف محکم ضدضربه و قابل برچسب‌گذاری برای حمل‌ونقل قرار داد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره

میکروسکوپ الکترونی (EM- گذاره یا نگاره) ابزار تحقیقاتی بسیار با ارزش برای مطالعه بیماری‌ها در سخت‌پوستان است. باوجوداین، روش‌های EM به‌طور متداول برای تشخیص بیماری‌های

1- soft lead

فهرست شده توسط OIE استفاده نمی‌شوند و استعمال EM به اهداف خاصی محدود می‌شود (رجوع شود به فصول خاص هر یک از بیماری‌ها در فصول بعد).

استفاده از روش‌های مولکولی و پادتنی برای آزمایش‌های تأییدی و تشخیصی

آماده کردن نمونه‌ها و انواع آن‌ها

نمونه‌های انتخاب‌شده برای آزمایش‌های تشخیصی پادتنی و اسید نوکلئیک را باید با دقت بسیار جابه‌جا و بسته‌بندی (در کیسه‌ها یا بطری‌های پلاستیکی جدید) کرد تا امکان آلودگی متقاطع در بین نمونه‌های به‌دست‌آمده از ذخایر (وحشی یا پرورشی)، مخازن، استخرها و مزارع مختلف و غیره به حداقل برسد. باید از کیسه‌ها یا بطری‌های پلاستیکی جدید استفاده کرد.

برای هر مجموعه از نمونه‌ها، استفاده از یک برچسب ضد آب، به همراه داده‌های مناسبی که توسط مداد نمره ۲ پرشده است و قرار دادن آن‌ها در داخل هر بسته یا ظرف توصیه می‌شود.

بعضی از روش‌های مناسب برای ذخیره‌سازی و انتقال نمونه‌های مولکولی یا پادتنی به شرح زیر هستند:

*نمونه‌های زنده: این نمونه‌ها را می‌توان در محل فرآوری کرد، یا اینکه به آزمایشگاه‌های تشخیصی برای انجام آزمایش انتقال داد.

*همولنف: این بافت، نمونه ترجیحی برای آزمایش‌های تشخیصی مولکولی و پادتنی معین است. نمونه را می‌توان به کمک سوزن و سرنگ از طریق پونکسیون ناحیه کاردیاک از حفره شکمی (هموسل) سخت‌پوست (سینوس شکمی در میگوهای پنئید) انجام داد، یا اینکه از طریق مجزا کردن ضمایم بدن به این ناحیه دست‌یافت.

*نمونه‌های یخ‌زده یا سرد شده: این امر در مورد نمونه‌هایی صادق است که می‌توان آن‌ها را در عرض ۲۴ ساعت به آزمایشگاه انتقال داد. نمونه‌ها را در کیسه‌های نمونه‌ای قرار دهید که توسط مقادیر کافی از یخ مرطوب احاطه شده‌اند و سپس نمونه‌های قرارگرفته در کیسه را در داخل جعبه‌های عایق استیروفوم گذاشته و به آزمایشگاه انتقال دهید.

*نمونه‌های کامل منجمد: نمونه‌های زنده را بر اساس معیارهای فهرست شده در خصوص هر یک از بیماری‌ها در فصول بعد انتخاب کرده و سپس با استفاده از یخ خشک خردشده در محل منجمد نمایید، یا اینکه به انجماد آن‌ها در آزمایشگاه‌های محل نمونه‌برداری، با استفاده از فریزرهای مکانیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا کمتر اقدام نمایید. برچسب را آماده کرده و به داخل ظرف بیندازید. سپس نمونه‌ها را با مقادیر کافی از یخ خشک در داخل جعبه‌های عایق استیروفوم بسته‌بندی کرده و به آزمایشگاه انتقال دهید.

*نمونه‌های ذخیره‌شـــده در الکل: در مناطقی که ذخیره‌ســـازی و انتقال نمونه‌های منجمد با مشـکلاتی همراه است، الکل ۹۰- ۹۵٪ ممکن است برای حفظ، ذخیره‌سازی و انتقال انواع معینی از نمونه‌ها برای آزمایش‌های مولکولی مورداســـتفاده قرار گیرد. نمونه‌های نگهداری شـده در الکل به‌طورمعمول برای آزمایش‌های پادتنی مناسب نیستند. سخت‌پوستان کامل (هر یـک از مراحـل زنـدگی کـه نمونـه را تأمین می‌کنند، بزرگتر از ۲-۳ گرم نیســـتند)، بافت‌های جدا کرده (برای مثال، پاهای شـنا) از سخت‌پوستان بزرگ یا همولنف را می‌توان در اتانول ۹۰ تا ۹۵٪ نگهداری کرد و سپس برای انتقال بسته‌بندی کرد.

حفظ و نگهداری RNA و DNA در بافت‌ها

در مورد آزمایش‌های تشـــخیصـــی متداول توســـط PCR، RT- PCR و آزمایش‌های لکه‌گذاری نقطـه‌ای بـا کـاوشـــگرهـای DNA، نمونه‌ها را باید به نحوی آماده کرد که اســـید نوکلئیک عامل بیمـاری‌زا حفظ شـــود. در مورد بیشـــتر اهـداف، نگهـداری نمونه‌ها در الکل (۷۰- ۱۰۰٪)، روش ترجیحی برای آزمـایش‌های مولکولی بعدی اســـت. فرآورده‌های دیگر (برای مثال RNA Later، انواع بـافرهـای تجزیه‌کننده و غیره) به‌طور تجاری در دســـترس هســـتند و اطلاعاتی در مورد این فرآورده‌ها در فصـول خاص هر یک از بیماری‌ها در ادامه کتاب حاضـر هر جا که قابل‌اسـتفاده باشد، ارائه شده است.

اطلاعات اضافی که باید جمع‌آوری شود

به فصـــول خاص هر یک از بیماری‌ها در کتاب حاضـــر رجوع کنید تا توصـــیه‌هایی را در ارتباط با اطلاعات اضـــافی که ممکن اســـت موردنیاز باشـــد، ارائه کند، یا توصـــیه‌هایی که ممکن اســـت به آزمایشـگاه‌های تشخیصی کمک کند تا مناسب‌ترین آزمایش‌ها را برای نمونه‌های تحویل گرفته‌شده فعال نمایند، ارائه کند.

بیماری‌های ویروسی سخت‌پوستان

ویروس‌های متعددی در سخت‌پوستان ایجاد بیماری می‌کنند که به تعددی از آن‌ها اشاره می‌شود و یکی از آن‌ها (بیماری لکه سفید) با توضیحات کامل ارائه می‌شود.

بیماری لکه سفید[1]

سـویه‌های مختلفی از WSSV با چندگانگی‌های ژنتیکی کوچک (واریانت‌ها) شـناسـایی‌شـده‌اند. باوجوداین، باید متوجه بود که ازآنجاکه نیما ویریده خانواده‌ای است که به‌تازگی شناسایی‌شده است، مفهوم گونه پس از به وجود آمدن، در معرض تغییر خواهد بود و سـویه‌های جدید با جزئیات بیشتر موردمطـالعـه قرارگرفتـه‌اند. WSSV توسـط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (ICTV) به‌عنوان تنها عضو جنس ویسپو ویروس (Whispovirus) در خانواده نیماویریده تعیین‌شده است. ویریون‌های WSSV ازنظر شکل، تخم‌مرغی یا بیضوی تا میله‌ای هستند و تقارن منظم دارند. قطر این ویریون‌ها ۱۲۰ تا ۱۵۰ نانومتر و طول آن‌ها ۲۷۰ تا ۲۹۰ نانومتر اسـت. قابل‌توجه‌ترین ویژگی این ویریون‌ها، وجود اتسـاع (ضـمیمه) نخی شـکل یا تاژک مانند در یک سـمت آن‌هاسـت. امروزه اگرچه سـویه‌های جغرافیایی مختلفی باقابلیت تغییر ژنوتیپی شـناسـایی‌شـده‌اند، اما همه آن‌ها را بـه‌عنوان یک گونه منفرد (ویروس-۱ عارضـه لکه سـفید) در جنس ویسـپو ویروس طبقه‌بندی می‌کنند.

بقا در خارج از بدن میزبان

عامل بیماری در شـرایط آزمایشـگاهی حداقل به مدت ۳۰ روز در دمای ۳۰ درجه در آب دریا زنده می‌مـانـد؛ و در اسـتخرهـا حداقل به مدت ۳-۴ روز به بقای خود ادامه می‌دهد (ناکانو و همکاران، ۱۹۹۸).

ثبات ویروس (روش‌های مؤثر غیرفعال کردن)

ویروس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در کمتر از ۱۲۰ دقیقه و در دمای ۶۰ درجه در کمتر از یک دقیقه غیرفعال می‌شود.

چرخه زندگی

مطالعات آزمایشـگاهی با اسـتفاده از محیط‌های کشـت سلول اولیه و مطالعات خارج از آزمایشگاه با مرحلـه پس نوزادی (PL) میگوهـا نشـان می‌دهـد کـه چرخـه تکثیر ویروس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ساعت است.

1- White spot disease virus

عوامل میزبانی

WSSV دارای محدوده میزبانی بسیار وسیع است. این ویروس می‌تواند انواع وسیعی از سخت‌پوستان آبزی ازجمله میگوهای پنئید دریایی، لب‌شور و آب شیرین و همچنین، خرچنگ‌ها و خرچنگ دراز آب شیرین[1] را آلوده کند.

گونه‌های میزبان حساس

همه سخت‌پوستان ده‌پا (راسته ده‌پایان) از منابع دریایی و لب‌شور یا آب شیرین، حساس هستند (لایتنر، ۱۹۹۶).

مراحل حساس میزبان

تمام مراحل زندگی میزبان از مرحله تخم تا مولدین به‌طور بالقوه حساس هستند.

ترجیح ویروس به گونه یا تحت جمعیت (احتمال تعیین ویروس)

احتمال تعیین ویروس در خرچنگ‌ها نسبت به میگوها، بیشتر است. بهترین مراحل زندگی سخت‌پوستان برای تعیین ویروس، مراحل آخر پس نوزادی، نوجوانی و بلوغ است. احتمال تعیین ویروس را می‌توان با ایجاد شرایط استرس‌زا (برای مثال، قطع ساقه دمی، تخم‌ریزی و پوست‌اندازی، تغییرات در شوری، دما یا pH و در خلال شکوفایی پلانکتونی) افزایش داد.

اندام‌های هدف و بافت آلوده

اهداف عمده آلودگی WSSV، بافت‌های اکتودرمی و مزودرمی با منشأ جنینی، خصوصاً بافت پوششی کوتیکولی و بافت‌های همبند تحت کوتیکولی هستند. اگرچه WSSV بافت همبند زیرین در اندام کبدی لوزالمعدی و روده میانی[2] را آلوده می‌کند، اما سلول‌های پوششی لوله‌های کبدی لوزالمعدی این دو اندام، منشأ آندودرمی دارند و آلوده نمی‌شوند.

1- Cray Fish
2- midgut

تداوم آلودگی توسط حاملانی که طول عمر طولانی دارند

تداوم آلودگی به‌طور متداول روی می‌دهد و آلودگی طولانی‌مدت نشـان داده شده است. بار ویروسی در خلال تداوم آلودگی بسـیار پایین اسـت و به‌طور بالقوه توسط هیچ‌یک از آزمایش‌های تشخیصی موجود قابل‌تعیین نیست.

ناقلین

ناقلین ویروس شـامل روتیفرها، نرم‌تنان دریایی، کرم‌های پرتار و سـخت‌پوسـتان غیر ده پا ازجمله آرتمیا سـالینا و پاروپایان و همچنین بندپایان آبزی غیرسـخت‌پوسـت مانند اسـلاتر دریایی[1] (جورپـایان) و نوزاد حشـرات یوفیدراده[2] هسـتند. همه این گونه‌ها می‌توانند غلظت‌های بالایی از WSSV زنده را در خود جای دهند، هرچند که هیچ شـاهدی در ارتباط با تکثیر ویروس در آن‌ها وجود ندارد.

حاملان آبزی وحشی شناخته‌شده یا مشکوک

هیچ‌گونه حامل آبزی مشکوک تاکنون گزارش نشده است.

الگوی بیماری

آلودگی گاهی اوقات منجر به بیماری می‌شـود و گاهی اوقات نیز این اتفاق نمی‌افتد. این امر بستگی به عواملی دارد که تاکنون اطلاعات در این خصـوص ضـعیف است، اما به تحمل گونه‌ای و فشارهای محیطی مربوط می‌شـود. با یک دوز عفونی مناسب، درحالی‌که فرصت کافی قبل از مرگ‌ومیر فراهم باشـد، در همولنف حیوانات حسـاس تعداد زیادی ویریون در حال گردش مشـاهده می‌شود، اما این امر ممکن اسـت در مورد گونه‌های مقاوم نیز روی دهد که هیچ تلفاتی نشان نمی‌دهند؛ بنابراین، بار ویروسی بالا فی‌نفسه سبب بیماری یا مرگ‌ومیر برای همه گونه‌های حساس نمی‌شود.

مکانیسم‌های انتقال

آلودگی می‌تواند به‌صـورت عمودی (درون تخمدانی)، افقی با مصرف بافت آلوده (برای مثال، همنوع خواری، شـکار و غیره) و از طریق آب انتقال یابد. انتقال آلودگی می‌تواند مشخصاً از طریق حیوانات سـالم، در غیاب بیماری روی دهد. حیوانات تلف‌شده یا در حال مرگ می‌توانند منبع انتقال بیماری باشند.

1- sea slater
2- Euphydradae

میزان شیوع

میزان شیوع بسیار متغیر است و از کمتر از ۱٪ در جمعیت‌های وحشی تا حد ۱۰۰٪ در جمعیت‌های محصور تغییر می‌کند.

انتشار جغرافیایی

بیماری لکه سفید (WSD) از سخت‌پوستان چین (جمهوری خلق)، ژاپن، کره (جمهوری)، آسیای جنوب شرقی، جنوب آسیا، قاره هند، مدیترانه، خاورمیانه و آمریکا شناسایی‌شده است. مناطق و تقسیمات جغرافیایی عاری از WSD در درون این نواحی شناخته‌شده‌اند.

میزان ابتلا و مرگ‌ومیر

همه میگوهای پنئید به آلودگی بسیار حساس هستند و اغلب این آلودگی منجر به مرگ‌ومیر زیاد می‌شود. خرچنگ‌ها[1]، خرچنگ‌های دراز آب شیرین[2]، میگوهای آب شیرین، لابسترهای خاردار و لابسترهای چنگال دار[3] به آلودگی حساس هستند، اما میزان ابتلا و مرگ‌ومیر، به‌عنوان یکی از تبعات آلودگی، بسیار متغیر است. آلودگی در حد بالا، در غیاب علائم بالینی، در بعضی از ده‌پایان دیده شده است.

عوامل محیطی

همه‌گیری بیماری ممکن است در اثر عوامل استرس‌زا، مانند تغییرات سریع شوری ایجاد شود. دمای آب اثر شدیدی بر روی تظاهر بیماری دارد، به‌طوری‌که متوسط دمای زیر تقریباً ۳۰ درجه سانتی‌گراد باعث همه‌گیری WSD می‌شود.

کنترل و پیشگیری

اگرچه مکانیسم‌های زمینه‌ای ناشناخته باقی‌مانده‌اند، اما تجارب آزمایشگاهی نشان داده است که میگوها و خرچنگ‌های دراز آب شیرین واکسینه شده پس از تماس با WSSV، میزان بقای بهتری داشته‌اند. ابتدا نشان داده شد که میگوی پنئوس ژاپنیکوس که از آلودگی طبیعی و تجربی با WSSV جان سالم به در برده بودند، نسبت به تماس بعدی با WSSV مقاومت نشان می‌دادند. مطالعات بعدی نشان داد که تزریق داخل عضلانی ویریون‌های WSSV غیرفعال شده یا پروتئین

1- crabs
2- crayfish
3- clawed

ســـاختـاری نوترکیـب (VP 28) بـاعث می‌شـــود که تا حدی حفاظت در برابر آلودگی تجربی با WSSV ایجـاد گردد. به‌علاوه، میگوهای تغذیه‌شـــده با پلت‌های غذایی که با باکتری‌های غیرفعال ازنظر بیان VP 28 پوشـــیده شـــده بودند، پس از تماس با WSSV میزان بقای بهتری داشـــتند. باوجوداین، اگرچه این نتایج به نظر نویدبخش اسـت، اما حفاظت تنها هنگامی مؤثر واقع می‌شود که میگوهـا بـا مقدار (دوز) پایین WSSV آلوده شـــوند. همچنین، این اثر معمولاً فقط چند روز دوام می‌یابد، یا در مورد خرچنگ دراز آب شـــیرین در حدود ۲۰ روز ادامه پیدا می‌کند. روش‌های بالقوه دیگر حفاظت از میگوها در مقابل آلودگی با WSSV، استفاده از RNA تداخلی[1](RNAi) است. RNAهای دو رشـته‌ای (ds) خاص ژن WSSV می‌توانند فعالیت ضد WSSV قوی ایجاد کنند و میگوها را در مقابل آلودگی با WSSV حفاظت نمایند، اما همان مطالعه نشان داد که dsRNA باعث ایجاد پاسـخ‌های ضـدویروسی وابسته به توالی و همچنین مستقل از توالی در میگوها می‌شود. مطالعه جدیدتر حتی نشـان داد که dsRNA مربوط به VP 28 بیان‌شـده توسط باکتری می‌تواند میگوهـا را در برابر آلودگی بـا WSSV حفاظت کند. باوجوداین، تاکنون هنوز هیچ داده میدانی در ارتباط با واکسیناسیون یا رهیافت RNAi وجود ندارد.

واکسیناسیون

هیچ روش واکسیناسیون مؤثر و با دوامی توسعه نیافته است.

شیمی‌درمانی

هیچ گزارش تأییدشده علمی وجود ندارد.

تحریک ایمنی

گزارش‌های مختلف نشـان داده است که بتاگلوکان، ویتامین C، عصاره جلبک دریایی (فوکوئیدان)[2] و محرک‌های ایمنی دیگر ممکن است مقاومت به WSD را بهبود ببخشند.

پرورش نژادهای مقاوم[3]

هیچ پیشرفت معنی‌داری گزارش نشده است.

1- interference
2- fucoidan
3- resistance breeding

ذخیره‌سازی مجدد با گونه‌های مقاوم

برای WSD قابل‌استفاده نیست.

عوامل ممانعت کننده

هیچ عامل ممانعت کننده‌ای تا این زمان توصیه نشده است. rVP 28 تأثیر دارد، اما نمی‌توان هنوز آن را به‌عنوان یک عامل ممانعت کننده کاربردی مورداستفاده قرار داد.

ضدعفونی تخم‌ها و نوزادان

برای انتقال از طریق تخم، ضـــدعفونی تخم‌ها احتمالاً مؤثر اســـت، اما هنوز در آزمایش‌های علمی رسمی به اثبات نرسیده است.

روش‌های پرورشی متداول

چند روش پرورشی به‌طور موفقیت‌آمیز برای مدیریت مقابله با WSD مورداستفاده قرارگرفته است که ازجمله می‌توان به اجتناب از ذخیره‌ســازی اســتخرها در فصل سرد، استفاده از تخم‌های عاری از عامل بیماری‌زای خاص (SPF) یا تخم‌های PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)- منفی و همچنین، استفاده از آب و روش‌های پرورشی زی ایمن[1] اشاره کرد.

نمونه‌برداری

انتخاب نمونه‌های مقاوم

نمونه‌هایی از میگوهای در حال مرگ یا میگوهایی که علائم بیماری را نشـــان می‌دهند، یا تغییرات رفتاری دارند را باید برای تعیین WSSV انتخاب کرد.

تهیه مخزن نمونه‌ها

نمونه‌هایی که برای روش‌های مولکولی یا پادتنی تشـخیص WSD برداشـته می‌شوند، ممکن است توأمـاً بـه تعداد کمتر از ۵ نمونه به ازای نمونه‌های مخزن نوجوان یا نیمه بالغ باشـــند. باوجوداین، برای تخم‌ها، نوزادان و پس نوزادان، ممکن است تهیه مخزن تعداد زیادتر (برای مثال، حدود ۱۵۰ یا بیشـتر از ۱۵۰ تخم یا نوزاد، یا ۵۰ تا ۱۵۰ پس نوزاد، بسته به‌اندازه \ سن آن‌ها) ممکن است جهت تأمین نمونه کافی ضروری باشد.

1- biosecure

بهترین اندام‌ها یا بافت‌ها

آزمایش تمایل بافتی بر روی میگوهایی که به‌طور تجربی آلوده شده‌اند و همچنین، مولدین صیدشده از محیط طبیعی، نشان می‌دهد که بافت‌هایی که از اکتودرم و مزودرم جنینی نشأت می‌گیرند، خصوصاً بافت پوششی کوتیکولی و بافت همبند تحت کوتیکولی و همچنین، بافت‌های هدف دیگر (برای مثال، غده آنتنی، اندام خونساز و غیره)، بافت‌های هدف اصلی برای WSSV محسوب می‌شوند. نمونه‌های حاصل از پاهای شنا، آبشش‌ها، همولنف، معده یا عضلات شکمی برای تحویل به آزمایشگاه توصیه می‌شوند.

برای غربال‌گری غیرتخریبی توسط PCR، توصیه می‌شود که (یک قطعه کوچک از) آبشش، (یک مقدار کوچک از) همولنف یا (یک قطعه کوچک از) پای شنا برداشته شود. همچنین، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد یک ساقه چشمی قطع‌شده می‌تواند جایگزین خوبی باشد و مؤید این نکته است که چشم مرکب را باید قبل از تحویل به آزمایشگاه از بدن خارج کرد.

توجه: این نکته حائز اهمیت است که هنگام جدا کردن پاهای شنا برای غربال‌گری غیر تخریبی، از روش نمونه‌برداری توصیف‌شده توسط لو و همکاران (۱۹۹۷) پیروی کنیم.

نمونه‌ها \ بافت‌هایی که مناسب نیستند

اگرچه WSSV بافت همبند زیرین را در اندام کبدی لوزالمعدی و روده میانی آلوده می‌کند، اما سلول‌های پوششی استوانه‌ای این دو اندام منشأ آندودرمی جنینی دارند و بافت‌های مناسبی برای تعیین ویروس نیستند (لو و همکاران، ۱۹۹۷). چشم مرکب حاوی یک ماده ممانعت کننده از PCR است و بنابراین، برای تشخیص ویروس به روش PCR مناسب نیست (لو و همکاران، ۱۹۹۷).

روش‌های تشخیصی

روش‌های تشخیص میدانی

علائم بالینی

وجود لکه‌های سفید که در اسکلت خارجی فرورفته‌اند، متداول‌ترین علامت بالینی به‌حساب می‌آید. در بیشتر میگوها، این نقاط از اندازه کوچک (به‌سختی قابل‌مشاهده) تا قطر ۳ میلی‌متر متغیر هستند و گاهی اوقات به صفحات بزرگتر به‌هم‌پیوسته تبدیل می‌شوند. باوجوداین، باید توجه داشت که عوامل استرس‌زای محیطی مانند قلیائیت بالا یا بیماری‌های باکتریایی هم می‌توانند سبب لکه‌های سفید بر روی کاراپاس میگو شوند و اینکه در حقیقت، میگوهای در حال مرگ مبتلابه

WSD اگر لکه سفید داشته باشند، تعداد این لکه‌ها اندک است؛ بنابراین، تظاهر لکه‌های سفید مطلقاً یک علامت تشخیصی خوب برای آلودگی با WSSV به‌حساب نمی‌آید. به‌علاوه، گزارش شده است که سخت‌پوستان دیگر، مانند بیشتر خرچنگ‌های دراز آب شیرین، هنگامی‌که به WSSV آلوده می‌شوند، هیچ علائمی از لکه‌های سفید را نشان نمی‌دهند.تغییر رنگ به میزان زیاد در بین جمعیت‌های بیمار مشاهده می‌شود و رنگ غالب، رنگ متمایل به قرمز یا صورتی است.

تغییرات رفتاری

حضور لکه‌های سفید همیشه به این مفهوم نیست که شرایط خاتمه یافته است. برای مثال، تحت شرایط غیر استرس‌زا، میگوهای آلوده‌ای که لکه‌های سفید دارند، ممکن است به‌صورت نامحدود زنده بمانند. باوجوداین، اگر میگوها ظاهر سست و بی‌حال هم داشته باشند؛ رنگ آن‌ها صورتی یا قهوه‌ای متمایل به قرمز می‌شود؛ در حاشیه استخر\ مخزن در سطح آب جمع می‌شوند؛ یا میزان مصرف غذا سریع کاهش می‌یابد، بنابراین، می‌توان انتظار داشت که میزان بالایی از مرگ‌ومیر طی چند ساعت تا چند روز پس از آغاز این علائم روی دهد.

روش‌های بالینی

شیمی بالینی

در هنگام کشیدن همولنف از میگوهای آلوده به WSSV همیشه واکنش انعقادی تأخیری مشاهده می‌شود (یا گاهی اوقات به‌طور کامل انعقاد صورت نمی‌گیرد).

آسیب‌شناسی ریزبینی

تهیه لام مرطوب

برای نشان دادن هسته‌های هیپرتروفی شده در گسترش‌های آبشش و\ یا بافت پوششی کوتیکولی که ممکن است با رنگ‌آمیزی یا بدون رنگ‌آمیزی باشد، صورت می‌گیرد.

تهیه گسترش (اسمیر)

برای نشان دادن تجمع WSSV در فرآورده‌های گسترش (اسمیر) رنگ‌آمیزی نشده همولنف توسط میکروسکوپ دارک فیلد (با زمینه تاریک) انجام می‌شود.

توجه: این روش، ساده‌ترین شیوه ریزبینی است و برای کسانی که تجارب محدودی در WSSV دارند، توصیه می‌شود. محل‌های تجمع ویروس به‌صورت نقاط انعکاسی کوچک به قطر ۰/۵ میکرومتر دیده می‌شوند.

مقاطع تثبیت‌شده

برای نشان دادن بافت‌شناسی گنجیدگی‌های پاتوگنومونیک (دارای ارزش تشخیصی) در بافت‌های هدف تهیه می‌شوند.

آمیخته گری درجا (ISH)

استفاده از کاوشگرهای DNA خاص WSSV با مقاطع آسیب‌شناسی برای نشان دادن حضور اسید نوکلئیک‌های WSSV در سلول‌های آلوده را شامل می‌شود.

ایمنی شیمی بافتی

استفاده از پادتن‌های خاص WSSV به کمک مقاطع بافتی یا لام‌های مرطوب، برای نشان دادن حضور پادگن WSSV در سلول‌های آلوده است.

میکروسکوپ الکترونی \ آسیب‌شناسی سلولی

برای نشان دادن ویروس در مقاطع بافتی یا فرآورده‌های آلوده به ویروس نیمه خالص و منفی ازنظر رنگ‌آمیزی (برای مثال، همولنف) انجام می‌شود.

زی سنجش[1]

اگر میگوهای SPF در دسترس باشد، روش زی سنجش زیر برای تشخیص WSSV مناسب است.

۱- برای زی سنجش، پاهای شنا را از میگوهای مشکوک به آلودگی با WSSV جدا کرده و در بافر TN (۰/۰۲ مول Tris/HCI، ۰/۴ مول کلرید سدیم، pH = ۷/۴) همگن نمایید.

۲- پس از سانتریفیوژ کردن در هزار دور به مدت ده دقیقه، مایع رویی را به نسبت ۱/۱۰ با کلریدسدیم ۲٪ رقیق کنید و از صافی (صافی ۰/۲ میکرومتر) عبور دهید.

1- bioassay

۳- ۰/۲ میلی‌لیتر از این محلول را به داخل سطح پشتی جانبی بند شکمی چهارم میگوی شاخص (برای مثال، پنئوس وانامی SPF در مرحله جوانی) تزریق کنید. این تزریق بین صفحات پشتی به داخل عضله بند شکمی سوم صورت می‌گیرد.

۴- میگوهای در حال مرگ را با چشم غیرمسلح یا با استفاده از روش‌هایی که در بالا توصیف شد، آزمایش کنید. اگر پس از ۳ تا ۵ روز بعد از تزریق هنوز هیچ میگوی در حال مرگی مشاهده نشد و همه نتایج آزمایش منفی بود، در آن صورت، با اطمینان می‌توان نتیجه گرفت که نتایج زی سنجش منفی است.

کشت سلول \ محیط کشت صناعی

WSSV را می‌توان توسط کشت‌های اولیه از سلول‌های لنفوئید یا تخمدان جداسازی کرد. باوجوداین، استفاده از محیط کشت سلول، به‌عنوان یک روش جداسازی متداول، توصیه نمی‌شود. علت این امر: ۱- خطر بالای آلودگی؛ و ۲- ترکیب محیط کشت بسته به نوع بافت، گونه میزبان و اهداف تجربی متغیر است. به همین خاطر است که تاکنون هیچ محیط کشت استاندارد یا شناخته‌شده‌ای وجود ندارد که بتوان آن را توصیه کرد. ازآنجاکه تهیه و نگهداری محیط‌های کشت سلول اولیه برای جداسازی ویروس امری دشوار است، لذا باید زی سنجش شیوه اصلی تکثیر و تزاید ویروسی باشد.

روش‌های تعیین پادگن بر پایه پادتن

در روش‌های مختلف سنجش ایمنی‌شناختی، هم پادتن‌های چند بنیانی و هم تک بنیانی در مقابل ویروس یا پروتئین ساختاری ویروسی نوترکیب مورداستفاده قرارگرفته است. ازجمله می‌توان به آزمایش وسترن بلات، سنجش ایمنی نقطه‌ای، آزمایش غیرمستقیم پادتن‌های درخشان (IFAT)، ایمنی شیمی بافتی (IHC) یا آزمایش ایمونو سوربنت متصل به آنزیم (ELISA) برای تعیین WSSV اشاره کرد. روش‌های پادتنی را می‌توان سریع انجام داد و برای استفاده‌های میدانی راحت و قابل‌استعمال هستند، اما ازآنجاکه این روش‌ها فقط حساسیتی مشابه PCR تک‌مرحله‌ای[1] دارند، لذا فقط توصیه می‌شود که برای تأیید WSD حاد مورداستفاده قرار گیرند.

1- one step PCR

روش‌های مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

پروتکلی که در اینجا توصیف می‌شود، از لو و همکاران (۱۹۹۷) اقتباس‌شده و توصیه می‌شود برای همه وضعیت‌هایی که برای تشخیص WSSV موردنیاز است، استفاده شود. پاسخ مثبت در اولین مرحله از این پروتکل استاندارد، دلالت بر آلودگی شدید با WSSV دارد، درصورتی‌که هنگامی‌که پاسخ مثبت تنها در دومین مرحله تزاید مشاهده شود، نشان‌دهنده عفونت در وضعیت نهفته یا حامل است. سنجش‌های جایگزین نیز توصیف‌شده‌اند، اما توصیه نمی‌شوند، مگر اینکه ابتدا با پروتکلی که در اینجا توصیف‌شده است، مقایسه شود.

کیت‌های تجاری PCR برای تشخیص WSSV در دسترس بوده و قابل‌قبول هستند و برای همین هدف مطابقت داده شده‌اند تا اعتبار داشته باشند. با OIE Register مشورت کنید تا ببینید که این کیت‌ها مورد تائید OIE هستند یا خیر.

(Http:// www.oie.int/vcda/eng/en-vcda-register.htm)

استخراج DNA

۱- ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بافت میگو (پای شنای میگوهای نوجوان تا نیمه بالغ زنده، پس نوزاد مرحله ۱۱ به بالا (PL 11 UP) به‌صورت سرزده یا تمام بدن پس نوزاد مرحله ۱۰ یا استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر همولنف) را در ۱/۵ میلی‌لیتر لوله میکرو فیوژ با ۶۰۰ میکرولیتر محلول تجزیه‌کننده (۱۰۰ میلی‌مول کلرید سدیم، ۱۰ میلی مول Tris/HCl، pH=۸، ۲۵ میلی مول EDTA [اتیلن دی آمین تترا استیک اسید]، ۰/۵٪ SLS [سدیم N- لوریل سارکوزینات] یا ۲٪ SDS [سدیم دو دسیل سولفات] و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئیناز K که قبل از استفاده اضافه می‌شود) بریزید.

۲- با استفاده از یک میله یک‌بارمصرف بافت را در داخل لوله کاملاً همگن سازید.

۳- پس از همگن‌سازی، به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار دهید.

۴- کلرید سدیم ۵ مولار اضافه کنید تا به غلظت نهایی ۰/۷ مولار برسید. سپس به نسبت $\frac{۱}{۱۰}$ از محلول N-acetyl N,N, Ntrimethylammonium bromide (CTAB) به ۱۰ قسمت محلول کلرید سدیم (۱۰٪ CTAB در ۰/۷ مول کلرید سدیم) اضافه کنید و کاملاً مخلوط نمایید.

توجه:علاوه بر روش استخراج CTAB که در اینجا توصیف شد، کیت‌های استخراج تجاری نیز غالباً به‌عنوان بخشی از فعالیت‌های نظارتی متعارف مورداستفاده قرار می‌گیرند.

۵- به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۶۵ درجه قرار دهید و سپس در دمای اتاق به همان حجم کلروفورم \ ایزو آمیل الکل (۲۴/۱) اضافه کرده و به‌آرامی مخلوط کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس محلول آبی (لایه بالایی) را به داخل یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری تازه انتقال دهید و به حجم مساوی فنول اضافه کنید.

۶- به‌آرامی مخلوط کنید و به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نمایید. لایه محلول بالایی را جمع‌آوری کرده و روند استخراج فنول را یک یا دو بار تکرار کنید.

۷- لایه رویی نهایی را به یک لوله جدید منتقل کنید و با دو حجم از کلروفورم \ ایزو آمیل الکل (۲۴/۱) به‌آرامی مخلوط کنید و به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۸- لایه رویی را به یک لوله جدید منتقل کرده و با اضافه کردن دو حجم از اتانول ۹۵٪ یا مطلق و به دنبال آن، قرار دادن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه یا ۸۰- درجه به مدت ۱۵ دقیقه،DNA آن را رسوب دهید.

۹- به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و اتانول را دور بریزید. پلت DNA را با اتانول ۷۰٪ شستشو دهید. سپس خشک کرده و با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل در دمای ۶۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه دوباره به حالت تعلیق در آورید.

۱۰- یک میکرولیتر از این محلول DNAرا برای انجام یک واکنش PCR استفاده کنید.

توجه:روش‌های PCRnested زیر به‌خوبی متداول شده و نتایج تشخیصی قابل‌اتکایی را در شرایط خاص تأمین می‌کند. باوجوداین، باید دقت شود تا اطمینان یابیم که نمونه‌های DNA از اندام‌های توصیه‌شده تأمین شده‌اند و اینکه دمای PCR به‌درستی اعمال‌شده است (خصوصاً برای گرم کردن، دمای توصیه‌شده ۶۲ درجه سانتی‌گراد است). برای جلوگیری از احتمال به دست آوردن نتایج مثبت کاذب، این نکته حائز اهمیت است که از روش‌های خاص پیروی کنیم، خصوصاً هنگامی‌که این روش‌ها برای میزبان‌های جدید مانند چراکس کوآدری کاریناتوس[1] و همچنین پروکامباروس کلارکی‌ای[2] (خرچنگ دراز قرمز باطلاقی[3]) در پروکامباروس زونانگولوس[4] (خرچنگ دراز رود سفید جنوبی) مورداستفاده قرار می‌گیرند. برای تشخیص موارد بروز WSSVدر یک

1- *Cherax quadricarinatus*
2- *Procambarus clarkii*
3- swamp
4- *Procambarus zonangulus*

میزبان جدید یا در یک ناحیه‌ای که قبلاً عاری از ویروس بوده است، باید از توالی DNA برای تأیید نتایج مثبت استفاده کرد.

واکنش PCR مرحله اول

۱- یـک میکرولیتر محلول templateDNA (حاوی حدوداً ۰/۳- ۰/۱ میکروگرم DNA) را به یک لوله PCR اضـافه کنید که واجد ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط واکنشـی (۱۰ میلی مول Tris/ HCl، pH = ۸/۸، ۵۰ میلی مول KCl، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$، ۰/۱٪ ۱۰۰- XTriton، ۲۰۰ میکرومول از هر یک از dNTP، ۱۰۰ پیکومول از هر آغازگر (پرایمر)، ۲ واحد از DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت) است.

۲- توالی‌های آغازگر بیرونی به‌صورت زیر هستند:

F1۱۴۶ و 5' -ACT -ACT–AAC–TTC–AGC–CTA–TCT-AG -3'

146R1, 5'-TAA–TGC–GGG–TGT–ATT–GTT–CTT–ACG–A– 3'

۳- پروفایل PCR، یک چرخه از ۹٤° درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه است و به دنبال آن، ۳۹ چرخه از دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه به مدت دو دقیقه و یک مدت اضـافی ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه اسـت. آمپلی‌کون خاص WSSV از این واکنش bp ۱۴۴۷ اسـت. میزان حسـاسیت، تقریباً ۲۰۰۰۰ کپی از plasmid template است.

دومین مرحله از واکنش PCR(nested)

این مرحله برای تعیین WSSV در میگو در مرحله حامل ضروری است.

۱- ۱۰ میکرولیتر از فرآورده واکنش PCR مرحلـه اول را بـه ۹۰ میکرولیتر کوکتل PCR با همان ترکیبی که در بالا به آن اشـاره شـد، اضـافه می‌کنند، به‌اسـتثنای اینکه این کوکتل حاوی جفت آغازگر دوم (داخلی) به شرح زیر است:

F2(5'- GTA- ACT- GCC- CCT- TCC- ACT- TCC- A- 3') ۱۴۶

و R2(5'- TAC- GGC- AGC- TGC- TGC- ACC- TTG- T- 3') ۱۴۶

۲- از همان پرتکل تزاید دهنده PCR که در فوق اشاره شد، استفاده کنید. آمپلی‌کون خاص- WSSV از این واکنش، bp ۹۴۱ اسـت. حسـاسـیت کل هر دو مرحله تقریباً ۲۰ کپی از template پلاسمید WSSV می‌باشد.

۳- برای قابل‌مشاهده شدن، ۱۰ میکرولیتر فرآورده واکنش PCR را بر روی ۱٪ آگارز حاوی اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر الکتروفورز کنید.

۴- آغازگر خاص ده پایان

(۱۴۳5'- TGC- CCT- ATC- AGC TNT- CGA- TTG- TAG- 3'F

و TTC- AGN-TTT- GCA- ACC- ATA- CTT-CCC- 3'

که منجر به یک آمپلیکون با bp ۸۴۴ می‌شود؛ N نماینده G، A، T یا C است) باید در واکنش‌های کنترل مورداستفاده قرار تا کیفیت DNA استخراجی و تمامیت واکنش PCR را تغییر دهد. در میگوی پنئید پنئوس آزتکوس[1]، فرآورده PCR به‌دست‌آمده از جفت آغازگر خاص ده پایان، به توالی نوکلئوتید ۳۵۲-۱۲۰۰ rRNAS ۱۸ مربوط می‌شود. توالی RNAS ۱۸ ده‌پایان بسیار محفوظ مانده است و فرآورده‌ای از PCR با اندازه مشابه در همه ده پایان تولید می‌کند. یک شاهد مثبت (WSSV DNA template) و چند شاهد منفی (no template and shrimp DNA template) باید در هر اندازه‌گیری مورداستفاده قرار گیرد.

توالی DNA فرآورده‌های PCR

برای تأیید میزبان‌های جدید مشکوک WSSV، باید توالی قطعه DNA تکثیر یافته از PCR تشخیصی nested دومرحله‌ای به دست آید. پروتکل‌های کلون کردن[2] و تعیین توالی که در اینجا توصیف می‌شود، از کلایدون و همکاران (۲۰۰۴) اقتباس‌شده است.

توجه:برای جلوگیری از اتلاف وقت و هزینه، تعیین مستقیم توالی آمپلیکون PCR قابل‌قبول است. اگر نتیجه مثبت بود، آنگاه به مرحله چهار که در زیر اشاره شده است، بروید. در هنگامی‌که تنها باندی (باندهایی) به‌اندازه غیرقابل‌انتظار به دست می‌آیند، آنگاه باید آزمایش را دوباره با استفاده از روش‌های کلون کردن و تعیین توالی که در زیر توصیف می‌شود، انجام داد.

- مرحله ۱: قطعات DNA انتخاب‌شده برای آزمایش‌های بعدی را از ژل‌های آگاروز جدا کنید و سپس به خالص‌سازی آن‌ها با استفاده از کیت‌های تمیزکننده PCR تجاری بپردازید.
- مرحله ۲: آمپلی‌کون‌ها را به داخل پلاسمید ناقل متصل[3] کنید و به کلون کردن این سازه بپردازید.

1- *P.aztecus*
2- cloning
3- ligate

- مرحله ۳: از آغازگرهای مناسب استفاده کرده و به ازدیاد آمپلی‌کون‌های واردشده اقدام نمایید و سپس فرآورده تزاید یافته‌ها را در معرض روش تعیین توالی DNA قرار دهید.
- مرحله ۴: توالی‌های به‌دست‌آمده را با بانک‌های اطلاعاتی موجود با استفاده از Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) مقایسه کنید تا وابستگی فیلوژنتیک (آرایه‌شناسی) تقریبی را تعیین نمایید.

روش آمیخته گری درجا (ISH)

پروتکلی که در اینجا توصیف می‌شود، بر اساس آن چیزی است که توسط نونان و لایتنر (۱۹۹۷) ارائه شده است.

- مرحله ۱:میگوی در حال مرگ را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول تثبیت‌کننده دیویدسون AFA قرار دهید.
- مرحله ۲:بافت‌ها را در پارافین غوطه‌ور ساخته و سپس آن‌ها را در مقاطع ۵ میکرومتری برش دهید. سپس مقاطع را بر روی لام‌های ریزبینی با شارژ مثبت بگذارید.
- مرحله ۳:لام‌ها را بر روی هات پلیت[1] در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت دهید.
- مرحله ۴:سپس لام را پارافین زدایی کرده و آبدهی مجدد نمایید و بعد، به مدت ۲-۳۰ دقیقه (بسته به نوع بافت) با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئیناز پتاسیم دربافر EDTA(TNE)/ NaCl/ Tris در دمای ۳۷ درجه مواجه نمایید.
- مرحله ۵:لام‌ها را مجدداً با سرد کردن در محلول فرمالدئید ۴٪ که از قبل خشک شده است، به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت کرده و لام‌ها را با محلول سیترات سالین استاندارد دو برابر

(SSC; IXSSC =۱۵۰ m M NaCl ،۱۵ mM tri–CitrateSodium،PH 7.0)

در دمای اتاق شستشو دهید.

- مرحله ۶:لام‌ها را با محلول پیش آمیخته گری[2] (فورمامید ۵۰٪، ۰/۲٪ فیکول ۴۰۰، ۰/۲٪ پلی وینیل پیرولیدون، ۰/۲٪ آلبومین سرم گاوی، ۵SSCX، یک میلی‌مول

1- hot plate
2- pre-hybridisation

EDTA، ۵۰ میلی‌مول Tris /HCl ۸۰ = PH) بـه مـدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد پیش آمیخته[1] کنید.

- مرحله ۷:آمیخته گری را با آمپلی‌کون PCR خاص WSSV واجد bp ۱۴۴۷ (رجوع شـود به بخش واکنش PCR مرحله اول) که با دیگوکسـیژنین برچسـب‌گذاری شده است، ادامه دهید. توصیه می‌شود که کاوشگر با الحاق به DIG- dNTP توسط روش PCR برچسب‌گذاری شود. غلظت مطلوب را باید از طریق آزمایش و تنظیم و تعدیل مشخص کرد تا اینکه یک سیگنال خاص بالا در برابر پس‌زمینه پایین حاصل شود.
- مرحله ۸:برای آمیخته گری، کاوشگر را به مدت ده دقیقه بجوشانید و فوراً بر روی یخ قرار دهید. کاوشگر را رقیق کرده و به غلظت ۵۰ -۳۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در محلول پیش آمیخته گر برسانید و ۵۰ میکرولیتر از آن را برای هر لام استفاده کنید.
- مرحله ۹:لام را بر روی یک هات‌پلیت با دمای ۸۵ تا ۹۵ درجه به مدت ۶ -۱۰ دقیقه قرار دهید (مطمئن شوید که لام به نقطه‌جوش نمی‌رسد). لام‌ها را بر روی یخ به مدت ۵ دقیقه خنک کنید و سـپس به یک حجره مرطوب به مدت ۱۶ تا ۲۰ سـاعت در دمای ۴۲ درجه انتقال دهید.
- مرحلـه ۱۰:بعـد از آمیخته گری، لام‌ها را دوبار، هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با SSC دو برابر در دمـای اتـاق و دوبار به مدت ۵ دقیقه با SSC یک برابر در دمای ۳۷ درجه و دوبار به مدت ۵ دقیقه با SCC نیم برابر در دمای ۳۷ درجه سـانتی‌گراد شـسـتشـو دهید.
- مرحلـه ۱۱:برای تعیین آمیخته گری، لام‌ها را با بافر اسـید مالئیک (۱۰۰ میلی‌مول اسـید مالئیک، ۱۵۰ میلی‌مول کلرید سدیم، با pH = ۷/۵) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق شستشو دهید.
- مرحله ۱۲:لام‌ها را با محلول مسـدودکننده (سـرم بز نرمال ۲٪ و ۰/۳٪ تریتون ۱۰۰-X در بافر اسید مالئیک) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه مسدود کنید.
- مرحله ۱۳:۲۵۰ میکرولیتر الکالین فسـفاتاز anti(AP)–DIG ملحق شده به محلول پادتن (یک میکرولیتر در میلی‌لیتر از جزء anti -DIG /AP -FAB در بافر اسـید مالئیک حاوی ۱٪ سرم نرمال بز و ۰/۳٪ ترتیون ۱۰۰- X) را به هر لام اضافه کنید و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار دهید.

1- pre- hybridise

- مرحله ۱۴:لام‌ها را دوبار با بافر اسـید مالئیک هر بار به مدت ده دقیقه شستشو دهید و یک بار نیز با بافر تعیین‌کننده[1] (۱۰۰ میلی‌مول Tris /HCl، ۱۰۰ میلی‌مول کلرید سدیم، pH=۹/۵) در دمای اتاق شستشو دهید.
- مرحله ۱۵:۵۰۰ میکرولیتر محلول رشـد (این محلول را درسـت قبل از اسـتفاده تهیه نمـایید. برای این امر، ۴۵ میکرولیتر محلول نمک NBT [۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دی‌متیل فورمامید ۷۰٪]، ۳۵ میکرولیتر ۵- برومو- ۴- کلرو- ۳- ایندول فسـفات، محلول نمـک تولوئیـدینوم [x- فسـفـات] [۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دی‌متیـل فورمامید] و یک میلی‌لیتر PVA ۱۰٪ به ۹ میلی‌لیتر محلول تعیین‌کننده بریزید) به هر لام اضافه کنید و در حجره تیره و مرطوب به مدت ۱-۳ ساعت قرار دهید.
- مرحله ۱۶:واکنش را با شـسـتن لام‌ها در بافر TE (۱۰ میلی‌مول Tris /HCl، یک میلی‌مول EDTA، pH = ۸/۰) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق متوقف کنید. لام‌ها را با ده بار فروبردن در آب مقطر شـسـتشـو دهید و با رنگ آبی ۰/۵٪ Bismarek Brown Y به مدت ۵ دقیقه رنگ متقابل کنید و سـپس با آب بشویید. سپس لام‌ها را به‌صـورت مرطوب با اسـتفاده از محیط کشت مونته کننده آبی برای مشاهده فوری مونتـه کنیـد، یا اینکه لام‌ها را آبگیری کرده و با محیط (Media) مونته کننده برای نگهداری درازمدت مونته کنید.
- مرحله ۱۷:لام‌ها را با لامل مونته کرده و با میکروسکوپ با زمینه روشن مورد آزمایش قرار دهید. آمیخته گری مثبت به‌صـورت رسـوب آبی تیره تا سـیاه در مقابل رنگ متقابل (زمینه) زرد تا قهوه‌ای دیده می‌شود.

خالص‌سازی عامل بیماری‌زا

ویریون WSSV را می‌توان بر روی یخ، به صـورتی که قبلاً توصـیف شـد، با اصـلاحات اندک خالص‌سـازی کرد (زی و یانگ، ۲۰۰۵). به‌طور خلاصـه، ۵ تا ۶ خرچنگ دراز آب شیرین یا میگو را (هرکـدام ۲۰ تـا ۲۵ گرم)، ۳ روز تـا یـک هفتـه پس از آلودگی جمع‌آوری کنیـد. همـه بافت‌ها را به‌استثنای اندام کبدی لوزالمعدی به مدت دو دقیقه با استفاده از دستگاه همگن کننده مکانیکی در ۱۲۰۰ میلی‌لیتر بافر TNE (۵۰ میلی‌مول Tris /HCl، ۴۰۰ میلی‌مول کلرید سـدیم، ۵ میلی‌مول EDTA، pH = ۸/۵) واجـد عـامـل ممـانعـت کننـده از آنزیم پروتئاز (یک میلی‌مول فنیل متیل سـولفونیل فلوراید، یک میلی‌مول بنزامیدین و یک میلی‌مول $Na_2S_2O_5$ همگن کنید. سـپس در

1- detection buffer

۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. محلول رویی را نگهداری کرده و پلت حاصله را در ۱۲۰۰ میلی‌لیتر بافر TNE مجدداً همگن کنید. محلول رویی ذخیره ای را از یک توری نایلونی (۴۰۰ مش) صاف کرده و در ۳۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کنید. محلول رویی را به دور ریخته و لایه شل رویی (صورتی‌رنگ) را به‌دقت با استفاده از پی‌پت پاستور شستشو دهید. لایه فشرده زیرین (خاکستری) را در ۱۰ میلی‌لیتر بافر TM (۵۰ میلی‌مول Tris /HCl، ۱۰ میلی‌مول $MgCl_2$، pH = ۷/۵) دوباره به حالت معلق درآورید. تعلیق خام ویروس را ذخیره‌سازی کنید و در ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نمایید. محلول رویی را دوباره با ۳۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کنید. محلول رویی و لایه شل صورتی را خارج کرده و پلت سفید را در ۱/۲ میلی‌لیتر بافر TM واجد ۰/۱٪ NaN_3 دوباره به حالت تعلیق درآورید. سپس آن را به لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال دهید. تعلیق را ۳ تا ۵ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه در ۶۵۰ دور سانتریفوژ کنید تا ناخالصی‌های صورتی خارج شوند. نهایتاً تعلیق واجد ویروس خالص شیر مانند را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا هنگام استفاده ذخیره نمایید.

روش‌های سرم‌شناسی

توسعه نیافته است.

رتبه‌بندی آزمایش‌ها با توجه به هدف استفاده

روش‌هایی که در حال حاضر برای نظارت هدفمند و تشخیص WSSV در دسترس هستند، در جدول ۱-۱۲ ارائه شده‌اند. اختصاصات مورداستفاده در جدول به شرح زیر است: a = این روش، روشی توصیه‌شده به خاطر قابل‌دسترس بودن، سودمندی، حساسیت و ویژگی تشخیصی است؛ b= این روش، روشی استاندارد با حساسیت و ویژگی تشخیصی خوب است؛ c = این روش در بعضی از شرایط قابلیت استعمال دارد، اما هزینه، دقت یا عوامل دیگر، کاربرد آن را شدیداً محدود می‌کند؛ و d = این روش در حال حاضر برای این هدف توصیه نمی‌شود. اگرچه همه این روش‌های درست‌شده که در طبقه‌بندی A یا B قرار نگرفته‌اند، استاندارد رسمی و اعتبار لازم را کسب نکرده‌اند، اما متداول بودن آن‌ها و این حقیقت که به‌طور گسترده‌ای بدون نتایج شک‌برانگیز مورداستفاده قرارگرفته‌اند، آن‌ها را قابل‌قبول می‌سازد.

جدول ۱۲-۱: روش‌های مورداستفاده برای نظارت هدفمند و تشخیص

روش‌ها	نظارت هدفمند				تشخیص اولیه	تأیید تشخیص
	نوزاد	پست لارو	جوان	بالغ		
علائم درشت بینی	d	d	c	c	c	d
زی سنجش	d	d	d	d	c	b
میکروسکوپ نوری مستقیم	d	d	c	c	c	c
آسیب‌شناسی	d	c	c	c	a	a
میکروسکوپ الکترونی گذاره	d	d	d	d	d	a
سنجش بر پایه تعیین پادتن	d	d	c	c	a	b
کاوشگرهای DNA- درجا	d	d	c	c	a	a
PCR	d	b	a	a	a	a
توالی	d	d	d	d	d	a

۶- آزمایش‌های توصیه‌شده برای برنامه‌های نظارتی هدفمند که عاری بودن جمعیت از بیماری لکه سفید را اعلام کند.

PCR دومرحله‌ای و تعیین توالی، روش‌های توصیه‌شده برای اعلام عاری بودن جمعیت از بیماری فقط برای میگوهای نوجوان و بالغ و احتمالاً پس نوزادان هستند.

نتایج منفی حاصل از PCR دومرحله‌ای ضروری است. در جایی که نتیجه مثبت حاصل از PCR دومرحله‌ای را نمی‌توان با تعیین توالی تأیید کرد، این امر را نیز می‌توان به‌عنوان نتیجه منفی به‌حساب آورد.

معیارهای تشخیصی تقویت‌کننده

تعیین موارد مشکوک

برای میگوهای نوجوان و بالغ: علائم درشت بینی WSD

برای میگوها در هر مرحله از زندگی (نوزادی تا بلوغ): مرگ‌ومیر

برای میگو و خرچنگ در هر مرحله از زندگی (نوزادی تا بلوغ): هسته‌های هیپرتروفی شده در فرآورده‌های گسترش اسکواش آبشش و \ یا بافت پوششی کوتیکولی؛ تجمع غیرمتعارف در همولنف توسط میکروسکوپ دارک فیلد (زمینه تیره)؛ گنجیدگی‌ها در بافت‌های هدف مقاطع بافت‌شناسی.

تعیین مورد تأییدشده

موارد مشکوک را باید ابتدا با PCR کنترل کرد. اگر در یک کشور\ منطقه\ ناحیه که قبلاً عاری از WSSV بودند، نتایج PCR مثبت باشد، آن‌ها را باید با تعیین توالی تأیید کرد. آسیب‌شناسی، کاوشگرها و میکروسکوپ الکترونی را نیز می‌توان برای تأیید این موارد مورداستفاده قرار داد.

طاعون خرچنگ دراز آب شیرین

عامل مسبب بیماری طاعون خرچنگ دراز آب شیرین، آفانومیسس استاسی، یکی از اعضای گروهی از موجودات زنده است که به‌طور متداول به آن‌ها کپک‌های آب می‌گویند. اگرچه تا مدت‌های طولانی این گروه را به‌عنوان قارچ و در گروه اوومیستیدا در نظر می‌گرفتند، اما امروزه آن‌ها را به‌عنوان پروتیست‌ها در نظر می‌گیرند و به همراه دیاتومه‌ها و جلبک‌های قهوه‌ای در گروهی تحت عنوان استرامنوپیلس[1] یا کرومیستا[2] دسته‌بندی می‌کنند.

روش‌های تشخیصی

تا همین اواخر، تشخیص طاعون خرچنگ دراز آب شیرین از گونه‌های بسیار حساس شدیداً نیازمند جداسازی و تعیین ویژگی عامل بیماری‌زا، آفانومیسس استاسی، با استفاده از محیط‌های کشت قارچی بود که واجد آنتی‌بیوتیک بودند تا آلودگی‌های باکتریایی را کنترل کند. جداسازی عامل بیماری‌زا احتمالاً تنها قبل یا در عرض ۲۴ ساعت پس از مرگ خرچنگ‌ها موفقیت‌آمیز خواهد بود. باوجوداین، هیچ بیماری یا آلاینده شناخته‌شده دیگری وجود ندارد که سبب چنین مرگ‌ومیری در خرچنگ‌ها شود، ولی حیوانات دیگر در همان آب آسیب نبینند؛ بنابراین، جداسازی عامل بیماری‌زا مطلوب است، اما ضروری نیست، خصوصاً در مناطقی که امکان گسترش آتی آلودگی به‌عنوان یک خطر بالقوه وجود دارد. علائم بالینی طاعون خرچنگ شامل تغییرات رفتاری و مجموعه‌ای از جراحات خارجی قابل‌مشاهده است. نوسان این جراحات آن‌قدر وسیع است که به‌غیراز افراد مجرب، برای افراد دیگر چنین علائم بالینی دارای ارزش تشخیصی محدودی هستند. باوجوداین، امروزه گسترش روش‌های مولکولی تشخیص راحت‌تر کرده است (اویتمن و همکاران، ۲۰۰۲، ۲۰۰۶).

1- Stramenopiles
2- Chromista

نکروز عفونی بافت‌های زیر جلدی و خونساز

نکروز عفونی بافت‌های زیر جلدی و خونساز (IHHN) در اثر آلودگی با ویروس نکروز عفونی بافت‌های زیر جلدی و خونساز (IHHNV) ایجاد می‌شود. دیده شده است که بخش بزرگی از ژنوم IHHNV در ژنوم بعضی از تیره‌های ژنتیکی پنئوس مونودون واردشده است. هیچ شاهدی وجود ندارد که نشان دهد این واریانت از IHHNV عفونی است (لایتنر، ۱۹۹۶).

IHHNV کوچک‌ترین ویروس شناخته‌شده میگوهای پنئید است. ویریون IHHN ۲۰ تا ۲۲ نانومتر اندازه دارد و بیست‌وجهی و فاقد پوشش است. چگالی این ویریون ۱/۴ گرم در میلی‌لیتر CsCl بوده و واجد DNA تک‌رشته‌ای خطی با اندازه تخمینی kb ۴/۱ است. کپسید این ویریون واجد چهار پلی پپتید با وزن مولکولی ۷۴، ۴۷، ۳۹ و ۳۷/۵ کیلو دالتون است.

روش‌های تشخیصی

شیوع و شدت آلودگی با IHHNV ممکن است در جمعیت‌های محصور افزایش یابد. این امر در هنگام پرورش میگوها در شرایط نسبتاً پرازدحام یا استرس‌زا روی می‌دهد. عوامل استرس تراکم، شامل تراکم‌های ذخیره بالا و کیفیت آب در حد مرزی (برای مثال، اکسیژن محلول پایین، بالا رفتن دمای آب، یا بالا رفتن آمونیاک یانیتریت) در آب مخازن نگهداری است. این امر باعث تشویق و تقویت بیان آلودگی‌های درجه پایین IHHNV و انتقال عامل بیماری‌زا از حاملین به میزبان‌های غیرآلوده در جمعیت می‌شود. نتیجه این امر، بالا رفتن میزان شیوع و شدت آلودگی‌ها است که می‌توان به‌راحتی با استفاده از روش‌های تشخیصی و تعیین IHHNV، آن را مشخص کرد (لایتنر، ۱۹۹۶).

نکروز عضلانی عفونی

نکروز عضلانی عفونی (IMN) بیماری ویروسی میگوهای پنئید است که در اثر آلودگی با ویروس نکروز عضلانی عفونی (IMNV) ایجاد می‌شود. گونه میزبان اصلی که IMNV در آن سبب همه‌گیری‌های معنی‌دار بیماری و مرگ‌ومیر می‌شود، پنئوس وانامی است. همه‌گیری‌های IMN با مرگ‌ومیر بالای ناگهانی به دنبال وقایع استرس‌زا مانند صید توسط تور Cast، تغذیه، تغییرات ناگهانی در شوری یا درجه حرارت و غیره روی می‌دهد. این همه‌گیری‌ها در پنئوس وانامی در مراحل اولیه نوجوانی، نوجوان‌ها یا بالغین در مناطقی که IMNV بومی است، یا در پنئوس وانامی که از مناطق یا کشورهای آلوده معرفی‌شده است، روی می‌دهد. میگوهای شدیداً مبتلا ممکن است قبل از آغاز استرس در حال تغذیه بوده باشند و واجد روده‌ای پر از مواد غذایی هستند. در این میگوها در مرحله حاد بیماری IMN، نواحی نکروز سفید موضعی تا گسترده در عضلات مخطط

(اسـکلتی)، خصوصاً در بندهای شکمی عقبی (دیستال) و باله دمی مشاهده می‌شود. این نواحی در بعضـی از میگوها ممکن اسـت نکروتیک و قرمز رنگ نشـوند. میگوهای شـدیداً مبتلابه حال مرگ می‌افتند و مرگ‌ومیر ممکن است به‌طور آنی بالا باشد و چندین روز ادامه یابد.

عارضه تورا

عارضـه تورا (TS)بیماری ویروسـی میگوهای پنئید اسـت که در اثر آلودگی با ویروس عارضـه تورا (TSV) ایجاد می‌شـود (لایتنر، ۱۹۹۶؛ ماری و همکاران، ۱۹۹۸). میزبان‌های اصـلی که TSV می‌تواند سـبب همه‌گیری‌ها و مرگ‌ومیرهای معنی‌دار در آن‌ها شود، شامل پنئوس وانامی و پنئوس استیلی روستریس هستند. TS سه مرحله متمایز دارد که شامل مراحل حاد، انتقالی و مزمن است. در مرحله حاد بیماری، جراحات واجد ارزش تشـخیصـی مشـخصـاً در مقاطع بافت‌شـناسـی بافت پوشـشـی کوتیکولی دیده می‌شـود، درحالی‌که در مراحل انتقالی و مزمن، هیچ جراحت واجد ارزش تشـخیصـی مشـاهده نمی‌شـود و لازم اسـت که روش‌های مولکولی و پادتنی برای تعیین TSV و تشخیص استفاده شود (لایتنر، ۱۹۹۶). آلودگی‌های مزمن TSV در میگوهای منفرد برای کل دوره زندگی تداوم می‌یابد. احتمال انتقال عمودی وجود دارد، اما به‌طور تجربی تأیید نشـده است (لایتنر، ۱۹۹۶).

بیماری دم‌سفید

بیماری دم‌سفید (WTD) یا بیماری عضله سفید (WMD) به‌عنوان یک آلودگی ویروسی توسط نوداویروس مـاکروبراکیوم روزنبرگی (MrNV) و ویروس کوچـک اضـافی مرتبط بـا آن (XSV) تعریف می‌شـود. آن‌ها سـبب تظاهر سـفید شـیری در نوزادان \ پس نوزادان (PL)\ مراحل اولیه نوجوانی می‌شـوند و مسـئول مرگ‌ومیر گسـترده در میگوی آب شـیرین، ماکروبراکیوم روزنبرگی هسـتند. عوامل مسبب، دو عامل بیماری‌زای ویروسی به نام‌های نودا ویروس ماکروبراکیوم روزنبرگی (MrNV) (عامل اصـلی) و ویروس کوچک اضـافی (XSV) (عامل مرتبط) هسـتند. MrNV در همـه‌گیری‌هـای WTD در میگوهـا حـائز اهمیت اسـت، هرچند که نقش XSV در بیماری‌زایی نامشـخص باقی‌مانده اسـت. سـویه‌های آن‌ها هنوز شناخته نشده‌اند. MrNV به خانواده نوداویریده تعلق دارد (بونامی و همکاران، ۲۰۰۵). XSV اولین ویروس اقماری در حیوانات اسـت و همچنین، اولین مورد ثبت‌شده از اقمار مرتبط با نوداویروس[1] به‌حساب می‌آید (بونامی و همکاران، ۲۰۰۵).

1- satellite – nodavirus association

بیماری سرزرد

ویروس سرزرد (ژنوتیپ ۱) یکی از شش ژنوتیپ شناخته‌شده در مجموعه ویروس‌های سرزرد و تنها عامل شناخته‌شده بیماری سرزرد می‌باشد. ویروس مرتبط با آبشش[1](GAV) به‌عنوان ژنوتیپ ۲ قلمداد شده است. GAV و چهار ژنوتیپ شناخته‌شده دیگر در این مجموعه (ژنوتیپ‌های ۳ تا ۶) به‌طور متداول در پنئوس مونودون سالم در شرق آفریقا، آسیا و استرالیا دیده می‌شوند و به‌ندرت با بیماری در ارتباط هستند، یا هرگز ارتباطی ندارند. YHV و ژنوتیپ‌های دیگر در مجموعه سر زرد توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها به‌عنوان یک گونه منفرد (ویروس مرتبط با آبشش) در جنس اوکاویروس[2]، خانواده رونی‌ویریده[3]، راسته نیدو ویرال‌ها[4] طبقه‌بندی شده است (والکر و همکاران، ۲۰۰۴). شواهدی از نوترکیبی بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد.

ویریون‌های YHN ذراتی پوشش‌دار و میله‌ای شکل (به ابعاد ۶۰-۴۰ نانومتر× ۱۵۰- ۲۰۰ نانومتر) هستند. پوشش‌ها توسط ساختارهای چند زنجیره‌ای (پپلومرهای[5]) برجسته‌ای مزین شده‌اند که تقریباً ۱۱ نانومتر از سطح بیرون زده‌اند. نوکلئوکپسیدها دارای تقارن مارپیچی هستند (قطر آن‌ها ۲۰ تا ۳۰ نانومتر است) و تناوب آن‌ها ۵- ۷ نانومتر است. ویریون‌ها شامل سه پروتئین ساختاری (نوکلئوپروتئین p24 و گلیکوپروتئین‌های پوشش gp64 و gp116) و یک ژنوم RNA سنس- مثبت تک‌رشته‌ای هستند (والکر و همکاران، ۲۰۰۴).

پارو ویروس کبدی لوزالمعدی[6](HPV)

این نام بر اساس تمایل ویروس بیماری و اندازه و ظاهر ویریون‌های فاقد پوشش آن استوار است. ویروس مذکور هیچ علائم درشت‌بینی متمایزی ایجاد نمی‌کند.

- عامل بیماری ویروس DNA سنس منفی و تک‌رشته‌ای است که حالت بیست‌وجهی داشته و فاقد پوشش می‌باشد. ویروس مذکور عضوی از گروه پارو ویروس‌ها می‌باشد.
- راه شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس وانامی، ایندیکوس، مونودون، استیلی روستریس، مرگوئنسیس، چیمنسیس[7]، ژاپنیکوس، پنی‌سیلاتوس[8]

1-Gill- associated virus
2- Okavirus
3- Roniviridae
4- Nidovirals
5- peplomers
6- Hepatopancreatic parvovirus
7- *P. chimensis*
8- *P. penicilatus*

- آلودگی تجربی: موفقیت‌آمیز نبوده است.

مراحل شناخته‌شده ابتلا: نوجوانی- بالغین

عارضه در پنئوس مونودون: عارضه کوتولگی

عفونت HPV با کندی رشد در پنئوس مونودون در رابطه است

- مکان‌های شناخته‌شده انتشار: آمریکا، آسیا، استرالیا

- میزبان شناخته‌شده: پنئوس مونودون

مراحل شناخته‌شده ابتلا- نوجوان‌ها- بالغین

باکولو ویروس- تیپ پنئوس مونودون[1] (MBV)

نام‌گذاری این ویروس بر اساس گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای چندوجهی متمایزی استوار است که در سلول‌های توبول‌های (لوله‌های) بافت کبدی لوزالمعدی و سلول‌های روده میانی پنئوس مونودون تولید می‌شوند. این گنجیدگی‌های چندوجهی، اجسام پروتئین پاراکریستالین هستند که حاوی ذرات فرورفته (مسدود شده) ویروس می‌باشند. به خاطر همین، گاهی اوقات آن‌ها را اجسام مسدود یا اجسام گنجیده[2] می‌نامند. هیچ علائم درشت‌بینی متمایزی در رابطه با این بیماری وجود ندارد.

- عامل این بیماری یک ویروس DNA دو رشته‌ای است که به گروه باکولو ویروس‌ها تعلق دارد. اندازه ویریون‌های پوشش‌دار بین ۶۰-۷۵ و ۳۲۴-۴۲۰ نانومتر و اندازه نوکلئوکپسید آن بین ۴۲-۵۲ و ۲۴۶-۳۰۰ نانومتر قرار دارد.
- روش شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس مونودون، پلبیوس[3]، پنی‌سیلاتوس[4]، سمی سولکاتوس[5]، ایندیکوس، مرگوئنسیس[6]، وانامی (احتمالاً)، اسکولنتوس[7]، کراتبوروس[8]، هستند.
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: پروتوزوا[9]- مایسیس[10]- پس نوزادان- نوجوان‌ها- بالغین

1-*Pnaeus monodon*- type baculovirus
2-inclusion
3-*P. plebejus*
4-*P. penicillatus*
5-*P. semisulcatus*
6-*P. merguiensis*
7-*P.esculentus*
8-*P. keratburus*
9- protozoeae
10-mysis

ویروس نکروز غده روده میانی باکولو ویروس[1] (BMNV)

نام‌گذاری این ویروس پس از مشاهده نکروز وسیع در غده روده میانی (غده روده میانی= اندام کبدی لوزالمعدی) نوزادان پرورش‌یافته در کارگاه‌های تکثیر میگوی ژاپن صورت گرفت. علائم درشت‌بینی بیماری شامل کدورت سفیدرنگ[2] غده روده میانی (اندام کبدی لوزالمعدی) در نوزادان و پس‌نوزادان است. نوزادان و پس‌نوزادان در حال مرگ به‌طور غیرفعال در سطح آب شناور می‌شوند و کدورت سفیدرنگ در غده روده میانی (اندام کبدی لوزالمعدی) نشان می‌دهند و یک خط سفید در روده میانی از ناحیه شکم مشاهده می‌شود.

این ویروس ابتدا برای پنئوس ژاپونیکوس توصیف شد. در این میگو دیده شده است که بیماری ایجاد می‌شود. این ویروس را باکولو ویروس تیپ C نامیده‌اند، اما اکنون در فهرست ویروس‌های طبقه‌بندی نشده قرار می‌دهند. آلودگی‌های ویروسی که گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای مشابهی در میگوهای پنئید دیگر مانند پنئوس مونودون ایجاد می‌کنند، نیز باکولو ویروس‌های تیپ C نامیده شده‌اند. ارتباط بین این ویروس‌ها ناشناخته مانده است. در مورد پنئوس مونودون، در مراحل اولیه آلودگی‌های MBV هسته‌های هیپرتروفی شده شبیه باکولو ویروس‌های تیپ C هستند و امکان تفکیک آلودگی‌های مختلط MBV و BMNV از دیدگاه بافت‌شناسی وجود ندارد. در حقیقت، ارتباط بین این ویروس‌ها اگر وجود داشته باشد، ناشناخته مانده است.

عامل این بیماری یک باکولو ویروس DNA غیر مسدود است که اندازه ویریون پوشش‌دار آن بین ۷۲ تا ۳۱۰ نانومتر و اندازه نوکلئوکپسید آن بین ۳۶ تا ۲۵۰ نانومتر است.

- روش شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس مونودون، ژاپنیکوس و پلبیوس دچار آلودگی طبیعی می‌شوند: پنئوس سمی سولکاترس و چیننسیس[3] به‌طور تجربی آلوده شده‌اند؛ متاپنئوس انسیس[4] مقاوم است.
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: پرتوزوا- مایسیس- پس‌نوزادان- نوجوان‌ها

1-Baculoviral midgut gland necrosis virus
2-white turbid
3-*P. chinensis*
4-*Metapenaeus ensis*

باکولو ویروس تیپ C[1] (TCBV)

علائم این بیماری و آسیب‌شناسی آن، مشابه بیماری BMNV می‌باشد.

باکولو ویروس پنئی[2] (BP)

این ویروس ابتدا بر اساس گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای چهاروجهی که در سلول‌های اندام کبدی لوزالمعدی میگوهای پرورش‌یافته پنئید در کشورهای آمریکایی ایجاد می‌کرد، یک باکولو ویروس نامیده شد. ویروس مذکور هیچ‌گونه علائم درشت‌بینی متمایزی ایجاد نمی‌کند.

- عامل این بیماری، یک باکولو ویروس DNA دو رشته‌ای پوشش‌دار به ابعاد ۵۶- ۷۹ تا ۲۸۶- ۳۳۰ نانومتر است. ویروس مذکور گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای چهاروجهی پاراکریستالین تولید می‌کند که ذرات ویروسی در داخل آن‌ها فرورفته‌اند (یا مسدود شده‌اند)؛ بنابراین، گاهی اوقات آن را باکولو ویروس مسدود می‌نامند.
- روش شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس وانامی، دئوداروم[3]، آزتکوس[4]، ستی فروس[5]، مارجیناتوس[6]، پنی سیلاتوس، اشمیتی[7]، پائولنسیس[8]، سوبتیلیس[9] به‌صورت طبیعی آلوده می‌شوند.
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: پروتوزوآ- مایسیس- پس‌نوزادان- نوجوان‌ها- بالغین

ویروس عارضه مرگ‌ومیر مولدین[10] (SMSV)

نام‌گذاری این ویروس به خاطر مرگ‌ومیر زیاد در پنئوس مونودون مولد در کارگاه‌های میگوی بالغ در استرالیا در سال ۱۹۹۳ بوده است. علائم درشت‌بینی بیماری در آلودگی‌های طبیعی و تجربی شامل سستی و بی‌حالی، ناتوانی در تغذیه، سرخی سخت جامه (کاراپاس) و پاهای شنا (پلئوپود) و مدفوع قرمز است. این ویروس همچنین با عارضه مرگ‌ومیر در زمان میان – محصول در میگوی پنئوس مونودون استرالیای شمالی در ارتباط بوده است.

1-Baculovirus Type C
2-*Baculovirus penaei*
3-*P. duodarum*
4-*P. aztocus*
5-*P. setiferus*
6-*P. marginatus*
7-*P. schmitti*
8-*P. paulensis*
9-*P. subtilis*
10-spawner mortality syndrome virus

- عامل این بیماری، یک ویروس DNA فاقد پوشش به ابعاد تقریبی ۲۰- ۲۵ نانومتر است. ریخت‌شناسی و اندازه آن نشان می‌دهد که احتمالاً باید یک پاروویروس[1] باشد.
- روش شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس مونودون و پنئوس اسکولنتوس[2] به‌طور طبیعی و پنئوس مرگوئنسیس، پنئوس ژاپنیکوس و متاپنئوس انسیس[3] (با حساسیت کمتر) به‌طور تجربی آلوده شده‌اند.
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: بالغین

شبه- رئو ویروس[4]

علت نام‌گذاری این ویروس بر اساس ظاهر ویریون‌های آن بود. این ویروس هیچ علائم درشت‌بینی متمایزی ایجاد نمی‌کند.

- عامل این بیماری یک ویروس RNA دو رشته‌ای و بیست‌وجهی است که قطر آن از ۵۰ تا ۷۰ نانومتر متغیر می‌باشد. چهار ویروس از خانواده رئوویریده از سخت‌پوستان ده‌پا توصیف‌شده است و حداقل دو ویروس به میگوهای پنئید تعلق دارد.
- روش شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس وانامی، مونودون، چیننسیس و ژاپونیکوس به آلودگی طبیعی دچار می‌شوند.
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: نوجوان‌ها- بالغین

شبه- پارو ویروس لنفوییدی[5](LPV)

نام‌گذاری این ویروس، بر اساس تمایل آن به بافت، اندازه و ظاهر ویریون‌های آن استوار است. ویروس مذکور هیچ‌گونه علائم درشت‌بینی متمایزی تولید نمی‌کند.

- اعتقاد براین است که عامل بیماری یک ویروس DNA تک‌رشته‌ای به قطر ۲۵- ۳۰ نانومتر است که به خانواده پارو ویریده[6] تعلق دارد.
- روش شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی

1-Parvovirus
2-*P. sculentus*
3-*Metapenaeus ensis*
4-Reo- like virus
5-Lymphoidal parvo- like virus
6-Parvoviridae

- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس مونودون، مرگوئنسیس و اسکولنتوس به‌طور طبیعی به این ویروس آلوده شده‌اند.

ویروس تهان‌دار کننده اندام لنفوید[1] (LOVV)

نام‌گذاری این ویروس بر اساس تمایل آن به بافت و تغییرات خاص بافت‌شناسی که تولید می‌کند، صورت گرفته است. این ویروس هیچ‌گونه علائم درشت‌بینی متمایزی از بیماری تولید نمی‌کند.

- اعتقاد براین است که عامل بیماری یک ویروس RNA تک‌رشته‌ای به قطر ۳۵ تا ۵۵ نانومتر است که به خانواده توگا ویریده تعلق دارد.
- روش شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس وانامی، مونودون و استیلی روستریس به‌صورت طبیعی به این ویروس آلوده می‌شوند.
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: نوجوان‌ها- بالغین

بیماری‌های باکتریایی میگو

گونه‌های باکتریایی مختلفی با میگوها در ارتباط هستند. بعضی از آن‌ها بیماری‌زا می‌باشد؛ برخی اپی کامنسال[2] (هم‌غذا) هستند و بعضی از آن‌ها نیز مفید واقع می‌شوند. از انواع بیماری‌زا، برخی داخل سلولی و برخی نیز خارج سلولی هستند. انواع داخل سلولی (برای مثال، ریکتزیا) خصوصاً متداول نیستند، اما گاهی اوقات می‌توانند تلفات جدی ایجاد کنند. معمولاً از انواع خارج سلولی، باکتری‌های رشته‌ای اپی کامنسال (هم‌غذا) هستند و سبب مزاحمت برای میزبان می‌شوند. از انواع خارج سلولی بیماری‌زا، به نظر می‌رسد که گونه‌های ویبریو مانند ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو هاروه‌ای و ویبریو وولنیفیکوس[3] جدی‌ترین عوامل به‌حساب می‌آیند و انواع مایکو باکتریایی به‌دفعات کمتر یافت می‌شوند. اگرچه گونه‌های ویبریو متداول‌ترین گونه‌های باکتریایی یافت شده در میگوهای در حال مرگ هستند، اما آن‌ها اعضای متداول جمعیت آب‌های دریایی و لب‌شور یا دستگاه گوارش میگو به‌حساب می‌آیند و غالباً به میگوهای سالم آسیبی وارد نمی‌سازند. این امر نشان می‌دهد که آن‌ها عوامل فرصت‌طلبی هستند که در شرایط استرس سبب بروز بیماری می‌شوند. از طرف دیگر، تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که بعضی از گونه‌های ویبریو قادر به تولید سموم قوی هستند و این امکان وجود دارد که بعضی از سویه‌هایی که این سموم را تولید می‌کنند،

1-Lymphoid organ vacuolization virus
2- epi- commensal
3- *V. vulnificus*

بتوانند درواقع، عفونت‌زا باشند. به‌طورکلی، تجارب حاصل از کار با میگوهای پرورشی در استخرها نشان می‌دهد که مدیریت دقیق می‌تواند جلوی بیشتر مشکلات جدی ناشی از باکتری‌ها را بگیرد. اگرچه میگوهای تحت استرس در اثر عفونت‌های فرصت‌طلب یا ثانویه تلف می‌شوند، اما راه‌حل این مشکل، حذف عوامل بنیادی استرس می‌باشد. یک راه مناسب برای تعیین اینکه آیا یک عامل باکتریایی عفونی باعث بیماری شده است، این است که از استخرهای مشکل‌دار نمونه‌برداری کرده و به جستجوی انواع باکتری‌ها در همولنف آن‌ها بپردازیم. اگر جدایه‌های[1] مختلفی از یک نمونه منفرد یا نمونه‌های متفاوت وجود داشته باشد، آنگاه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استرس منجر به این عفونت‌های فرصت‌طلب شده است. باوجوداین، اگر یک نوع باکتری وجود داشته باشد و این باکتری در همه میگوها غالب باشد، می‌توان آن را به‌عنوان یک عفونت در نظر گرفت. به نظر می‌رسد که در مورد نوزادان میگو در کارگاه‌های تکثیر، وضعیت تا حدی نسبت به استخرهای پرورشی متفاوت باشد و این احتمال وجود دارد که نوزادان خصوصاً در مراحل اولیه، نسبت به میگوهای بزرگتر در استخرهای پرورشی، در مقابل آلودگی باکتریایی حساس‌تر باشند.

کشت و شناسایی باکتری‌های میگو

در روش‌های سنتی تعیین عامل مسبب عفونت‌های باکتریایی، لازم است که کشت‌های خالص آن‌ها را جدا کرده و تعدادی آزمایش فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بر روی آن‌ها انجام دهیم. باوجوداین، روش‌های مولکولی سریع برای شناسایی در عصاره خام به‌طور فزاینده‌ای در دسترس است. به‌علاوه، روش‌های باکتری‌شناسی دیگری مانند شمارش پلت[2] و آزمایش‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی نیز برای ارزیابی بیماری و درمان‌های بالقوه مفید واقع می‌شوند.

شمارش پلت

این روش امکان تعیین کمی (مقداری) عوامل باکتریایی را در میگوهای بیمار، آب یا آرتمیا فراهم می‌سازد. نمونه‌ها را در ظروف سترون سرد شده[3] جمع‌آوری کنید و آن‌ها را طی ۳ تا ۴ ساعت عمل‌آوری نمایید. اگر از بافت میگو یا آرتمیا استفاده می‌کنید، حجم ثبت‌شده‌ای از نمونه را در مقدار معینی سرم نمکی (کلرید سدیم ۲/۵٪) سترون به‌صورت تعلیق درآورید و حجم نهایی را ثبت کنید. بافت را آسیاب کنید و سپس اجازه دهید که رسوب به مدت ۵ دقیقه بماند تا ته‌نشین شود و سپس بخشی از قسمت رویی را برای رقیق کردن خارج سازید. از لوله‌هایی که قبلاً آماده کرده‌اید،

1- isolates
2- Plate cuonting
3- refrigerated

برای تهیه رقت‌های پی‌درپی استفاده نموده و برای این امر ۹ یا ۰/۹ میلی‌لیتر سرم نمکی سترون (کلرید سدیم ۲/۵٪) را مورداستفاده قرار دهید. یک یا ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه را برای تهیه رقت ده برابر مورداستفاده قرار دهید و به‌خوبی با چرخاندن آن به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط کنید و سپس یک نمونه برای رقت بعدی بردارید. همیشه یک پی‌پت سترون تازه برای برداشتن یک یا ۰/۱ میلی‌لیتر و انتقال به لوله رقت بعدی استفاده کنید. هر انتقال، یک رقت 10^{-1} از نمونه قبلی را فراهم می‌کند؛ بنابراین، آن‌ها را مخلوط کرده و انتقال دهید تا رقت‌های مطلوب به دست آید. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه رقیق نشده یا رقیق‌شده را به یک پتری دیش مجزا حاوی TSA سترون (کلرید سدیم ۲/۵٪) اضافه کنید و فوراً به‌صورت یکنواخت توسط یک میله سترون پخش کنید تا اینکه مایع به‌طور کامل توسط آگار جذب شود. این امر ممکن است چندین ثانیه به طول انجامد. این نکته حائز اهمیت است که پس از پخش کردن، هیچ مایع اضافی بر روی پلیت باقی نماند. این امر منجر به انتشار غیریکنواخت پرگنه‌ها (کلنی‌ها) و شمارش‌های کاذب و غیرواقعی خصوصاً به خاطر تقسیم و حرکت باکتری‌های متحرک قبل از جذب می‌شود. جذب بطئی می‌تواند مشکلی برای آگارهای تازه تهیه‌شده باشد؛ بنابراین، بهتر است که آگار را حداقل از دو روز قبل تهیه کرد؛ بنابراین، سطح آن به‌خوبی خشک می‌شود تا بتواند مایع مورداستفاده برای پلیت را جذب کند. این نکته نیز حائز اهمیت است که مایع مورداستفاده برای پلیت را قبل از پخش کردن، مدت طولانی به حال خود نگذاریم، زیرا این امر موجب جذب اضافه‌تر در یک نقطه و گسترش غیریکنواخت پرگنه‌ها می‌شود. توصیه می‌شود که برای هر رقت سه تکرار تهیه شود. ازآنجاکه ویبریو آلجینولیتیکوس به‌طور متداول یافت می‌شود و تجمع می‌یابد، ممکن است لازم باشد که پس از پخش کردن رقت‌ها، بر روی پلیت، آگار مغذی (نوترینت آگار) ریخته شود. پلیت‌ها را در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه برای انکوباسیون قرار دهید و در ۱۲ تا ۲۴ ساعت برای شمارش پرگنه‌ها کنترل کنید. نتیجه را باید به‌صورت واحدهای تشکیل پرگنه[1](CFU) به ازای واحد نمونه اصلی (یعنی CFU\g، CFU\ml، CFU\Artemia و غیره) گزارش کرد. اگر نظری درباره سطوح باکتری‌های مورد انتظار دارید، می‌توانید فقط از رقت‌های مناسب برای پلیت استفاده کنید.

روش شمارش قطره‌ای[2]

اگر یک آزمایشگاه مجهز به پی‌پت خودکار باشد، شمارش قطره‌ای را می‌توان با استفاده از نمونه‌های تهیه‌شده انجام داد و رقت‌ها را بر اساس روش توصیف‌شده در مورد شمارش پلیت تهیه نمود. این روش از روش شمارش پلیت متفاوت است و تفاوت آن این است که قطرات ۲۰ میکرولیتری از

1- colony forming units
2- Drop count metbod

تعلیق‌های نمونه‌های رقیق‌شده و رقیق نشده را بر سطح پلیت آگار می‌ریزند و اجازه می‌دهند که به‌صورت نقاط منفرد جذب آگار شوند. این نکته حائز اهمیت است که قطرات در عرض ۲ تا ۳ دقیقه جذب آگار شوند. یک پتری دیش را می‌توان برای پنج تکرار قطرات هر رقت مورداستفاده قرار داد، هرچند که باید از نوک‌های[1] مجزا برای هر تکرار استفاده نمود. دوایری را توسط یک قلم مارکر بر روی ته پلیت رسم کنید تا محلی را که قطرات بر روی آن قرار خواهند گرفت، مشخص شود. این علائم همچنین کمک می‌کنند تا جایی را که باید به جستجوی پرگنه‌ها پرداخت، مشخص شود. متوسط تعدادی که باید به ازای هر قطره شمارش شود، در محدوده ۲۰- ۳۰ قرار دارد. شمارش تعدادی کمتر از ۲۰ به ازای هر قطره قابل‌اتکا نخواهد بود. فایده این روش این است که پلیت‌های کمتری برای تکرارهای بیشتر، در مقایسه با شمارش پلیت متعارف موردنیاز خواهد بود. از معایب آن این است که این امر نیازمند پی‌پت‌های خودکار و استفاده از تعداد زیادی نوک پی‌پت است. به‌علاوه، ممکن است لازم باشد که برای شمارش پرگنه‌ها از یک استریومیکروسکوپ استفاده کنیم و اگر پرگنه‌ها مدت طولانی به حال خود گذاشته شوند، به خاطر تلفیق سریع پرگنه‌ها با یکدیگر، غیرقابل‌شمارش خواهند شد. نتایج به‌صورت CFU به ازای واحد نمونه بیان می‌شوند و از این نظر، مشابه روش شمارش پلیت‌هاست.

آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک

آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی[2] دارای استفادهٔ محدودی است، زیرا حساسیت در شرایط غیر آزمایشگاهی[3] ممکن است به میزان بسیار زیاد تحت تأثیر عوامل محیطی باشد.

محیط مولر- هینتون[4] غنی‌شده با کلرید سدیم ۲/۵٪ برای اجتناب از هرگونه ممانعت ممکن توسط محیط کشت توصیه می‌شود (محیط کشت را با آب دریا آبدهی نکنید). عمق آگار باید ۵- ۶ میلی‌لیتر باشد، زیرا آنتی‌بیوتیک‌ها به سمت پایین و همچنین به سمت بیرون انتشار پیدا می‌کنند. تعلیق سنگینی از یک کشت خالص (با ظاهر شیر پس چرخ) آماده کرده و در داخل پلیت پخش کنید. اجازه دهید که پلیت به مدت ۵ دقیقه خشک شود. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی انتخاب‌شده را به کمک یک پخش‌کننده یا پنس سترون در داخل پلیت قرار دهید و بگذارید انکوباسیون صورت گیرد. رشد اطراف دیسک‌ها را موردتوجه قرار دهید و نواحی ممانعت از رشد را اندازه‌گیری کنید.

1- Tips
2- in vitro
3- in viro
4- Muller- Hinton

توجه داشته باشید که ظاهر یک منطقه ممانعت از رشد به‌خودی‌خود نشان‌دهنده حساسیت نیست. پهنای منطقه، اهمیت بحرانی دارد و در مورد چارت‌ها باید مشورت صورت گیرد تا تعیین شود که آیا این پهنای اندازه‌گیری شده نشان‌دهنده حساسیت است یا مقاومت.

مسلماً، این چارت‌ها برای طب انسانی آماده شده‌اند، اما می‌توان آن‌ها را به‌عنوان یک نقطه مرجع استاندارد برای مطالعات مربوط به میگو مورداستفاده قرار داد.

گونه‌های ویبریو

گزارش‌ها در مورد جداسازی گونه‌های ویبریو در عفونت‌های باکتریایی میگوهای پنئید بسیار متعدد است. باوجوداین، مجادلاتی درباره ماهیت بیماری‌زا بودن حقیقی این باکتری‌ها وجود دارد. گونه‌های ویبریو در محیط‌های دریایی متداول هستند و بخش متعارفی از میکروفلور آبشش‌ها، دستگاه گوارش و کوتیکول میگوها را به خود اختصاص می‌دهند. بیشتر گونه‌های ویبریو را که به‌عنوان باکتری بیماری‌زا گزارش کرده‌اند، به‌عنوان بخشی از میکروفلور طبیعی نیز گزارش شده‌اند. باوجوداین، این باکتری‌های فرصت‌طلب درنتیجه شرایط اولیه‌ای مانند عفونت‌های ویروسی یا بیماری‌های تغذیه‌ای باعث عفونت‌های کشنده می‌شوند. ماحصل امر این است که غالباً میگوها بدون توجه به عامل اولیه‌این مشکل، در مقابل گونه‌های ویبریو از پا در می‌آیند. به‌رغم ماهیت فرصت‌طلب آشکار این باکتری‌ها، اخیراً مواردی از همه‌گیری وجود داشته که به نظر می‌رسد گونه‌های ویبریو به‌صورت عامل بیماری‌زای حقیقی رفتار کرده‌اند، هرچند که تأیید Coch's postulates برای گونه‌های ویبریو عمدتاً ناموفق بوده است. باکتری‌هایی که از بسیاری از همه‌گیری‌های ویبریوز با تلفات بالا جداشده‌اند، هیچ اثری از بیماری در آلودگی‌های تجربی ایجاد نمی‌کنند. اخیراً پیشنهاد شده است که قابلیت تغییر در حدّت باکتری ممکن است با تولید سموم در رابطه باشد. در یک مورد پیشنهاد شد که سمیت ویبریو هاروه‌ای ممکن است به‌واسطه یک باکتریوفاژ (ویروس ضد باکتری) اعمال شود که ژن (های) یک سم یا یک ژن کنترل‌کننده تولید سم را انتقال داده است (عارضه آبشش چای قهوه‌ای)[1].

علاوه بر گونه‌های ویبریو، ارگانیسم‌های گرم منفی دیگری نیز از میگوهای بیمار جداشده‌اند. این ارگانیسم‌ها شامل پسودوموناس، آئروموناس و فلاوو باکتریوم هستند.

علائم خارجی بیماری، غیراختصاصی است و شامل سستی و بی‌حالی، جمع شدن در حاشیه استخر، کاهش تغذیه، قرمز رنگ شدن (اتساع کروماتوفورها)، نکروز بافت زیر کوتیکولی در دم و ضمایم است که غالباً با ملانیزه شدن (تیره رنگ شدن) همراه می‌باشد.

1- tea- brown gill syndrome

عفونت‌های ویبریو سه شکل مختلف به خود می‌گیرند: عفونت‌های عمومی (سیستمیک) (عارضه سیگول[1])، تورم کبدی لوزالمعدی عفونی[2] (عارضه آبشش چای قهوه‌ای) و عفونت‌های موضعی که منجر به ملانیزه شدن کوتیکول و بافت‌های مجاور می‌شوند (بیماری پوسته باکتریایی[3]، بیماری کله سیاه[4] و بیماری تراشه سیاه[5]). به‌علاوه، تغییرات آسیب‌شناسی ناشی از سموم باکتریایی را می‌توان بدون استقرار (کلونیزه شدن) فعال مشاهده کرد (عارضه بولیتاس)[6]. نشان داده شده است که در مراحل نوزادی، استقرار باکتریایی در بخش‌های دهانی و آسترکوتیکولی مری و معده شروع می‌شود و به عفونت عمومی پیشرفت می‌کند. این عارضه همچنین با عارضه بولیتاس همراه می‌شود. بعضی از گونه‌های ویبریو (برای مثال، ویبریو هاروه‌ای) مولد نور (لومینسنت) هستند و اگر به تعداد زیاد وجود داشته باشند، سبب می‌شوند که حیوانات مبتلا در تاریکی شروع به تابش کنند. این نوع از آلودگی قبلاً در کارگاه‌های تکثیر بیشتر متداول بود، اما امروزه در استخرهای میگوهای در حال رشد مشکل بیشتری ایجاد می‌کند (عارضه باکتریایی تولید نور)[7]

- راه‌های انتقال شناخته‌شده: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده ابتلا: همه مراحل
- گونه‌هایی از میگو که به نظر می‌رسد در ایجاد بیماری در میگوهای پنئید اهمیت بیشتری داشته باشند: ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو هاروه‌ای، ویبریو وولنیفیکوس، ویبریو آلجینولیتیکوس.

شناسایی ویبریو

گونه‌های دریایی ویبریو را می‌توان به‌راحتی در هر محیط کشت عمومی و همچنین محیط‌هایی که با ۲/۵٪ نمک (NaCl) غنی‌شده‌اند، کشت داد. نمونه‌های همولنف را می‌توان در شرایط استریل جمع‌آوری کرد (ضدعفونی سطح بدن میگو با اتانول یا پوویدون- آیوداین ۲٪) و مستقیماً بر روی محیط آگار باکتری‌شناسی انتقال داد و گسترش خطی داد. اگر حیوان به‌اندازه کافی بزرگ نیست تا بتوان همولنف آن را جمع‌آوری کرد، یا اینکه قصد نمونه‌برداری از یک جراحت موضعی را دارید، سطح میگو را ضدعفونی کنید و توسط ابزاری که توسط شعله الکل ضدعفونی شده‌اند، بافت موردنظر را بردارید. بافت را توسط یک لوپ بردارید و بر روی آگار قرار دهید و گسترش خطی از

1- seagull
2- septic hepatopancreatitis
3- bacterial shell disease
4- black spot disease
5- Black splinter disease
6- Bolitas syndrome
7- luminescent bacterial syndrome

محـل تماس به روش متعارف ایجاد نمایید. اگر قرار اســـت که از مراحل اولیه نوزادی نمونه‌برداری شـود، کل بدن نوزاد را با شستن توسط سرم نمکی استریل (نمک ۲/۵٪) به‌دفعات متعدد ضدعفونی کرده و سپس کل بدن آن را بر روی محیط کشت قرار دهید. سپس در اینجا می‌توانید آن را توسط لوپ تلقیح خرد کرده و به روش متعارف گسـترش تهیه کنید. به‌طور جایگزین، می‌توانید سطح بدن میگوهای نوزاد را با فرو بردن مختصـــر در محلول‌های ضـــدعفونی‌کننده مانند بنزالکونیوم کلراید یا پوویدون- آیوداین ۲٪ ضـدعفونی نموده و سـپس با سـرم نمکی اسـتریل شستشو دهید و گسترش تهیه کنید. محیط‌های کشـــت (پلیت‌ها) را باید در دمای ۲۵-۳۰ درجه قرار داد. پرگنه‌ها (کلنی‌ها) در کمتر از ۲۴ ســـاعت ظاهر خواهند شـــد. انواع پرگنه‌های مختلف را باید انتخاب کرد و دوباره بر روی محیط کشـــت جدید کشـــت داد تا خالص‌ســـازی صـــورت گیرد. همچنین می‌توان نمونه‌ها را مســـتقیماً بر روی آگار TCBS کشـــت داد. بدین ترتیب فقط ویبریو و گونه‌های مربوطه انتخاب خواهند شد.

باوجوداین، از نواقص این روش این اســـت که بعضـــی از انواع دیگر باکتری‌های مرتبط با روند بیماری ممکن اسـت از دست بروند. لازم است که باکتری‌های رشد کرده در آگار TCBS را قبل از آزمایش‌های شناسایی دوباره بر روی تریپتیکازسوی آگار (TSA) (با نمک ۲٪) کشت مجدد دهید. علت این امر این اسـت که بعضـی از باکتری‌هایی که رشـد نمی‌کنند، اما بر روی TBCS به بقای خود ادامه می‌دهند، پرگنه‌های ویبریو را آلوده می‌کنند.

شناسایی هر یک از گونه‌های ویبریو

تعیین و شـناسـایی بیوشـیمیایی گونه‌های ویبریو، به خاطر تنوع وسیع آن‌ها، مشکلات معینی را به همراه دارد. ردیفی از کیت‌های تجاری برای شـــناســـایی عوامل باکتریایی در دســـترس هســـتند (API,Biology). این کیت‌ها اســـاســـاً دربرگیرنده مجموعه‌ای از حفرات مینیاتوری هســـتند که حاوی مواد (سوبسترای) آبگیری شده‌اند و در داخل یک بسته پلاستیکی یا پلت‌هایی با حفرات ریز قرار دارند. بعد از افزودن تلقیح و انکوباسیون، تغییرات رنگ به‌صورت بصری قرائت می‌شود. در مورد API، معرف‌ها را باید قبل از قرائت به بعضـــی از حفرات اضـــافه نمود. باوجوداین، هیچ‌کدام از این کیـتهـا و بـانک‌های اطلاعاتی همراه آن‌ها اختصـــاصـــاً برای آزمایش باکتری‌های دریایی طراحی نشـده‌اند و قبل از استفاده در بیماری‌های میگو ممکن است سازگاری‌ها و کسب تجاربی نیاز داشته باشد. توصیف زیر، روش‌های متداول شناسایی را پوشش می‌دهد. اولین روش را می‌توان انجام داد تا مشـخص شود که آیا موارد جداشده به جنس ویبریو تعلق دارند یا خیر: گرم منفی، متحرک، اکسید از مثبت و قادر به رشـــد در محیط کشـــت TCBS. مجموعه دوم کلیدها، گونه‌های مختلف جنس

ویبریو را به هشت گروه تقسیم می‌کند و این امر بر پایه آزمایش‌هایی برای آرژینین دی‌هیدرولاز[1] (A)، لیزین دکربوکسیلاز[2](L) و اورنیتین دکربوکسیلاز[3](O) استوار است. گونه‌هایی از ویبریو که بیشترین اهمیت را در بیماری‌های میگوهای پنئید دارند، شامل ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو هاروه‌ای، ویبریو وولنیفیکوس و ویبریو آلجینولیتیکوس هستند. همه این‌گونه‌ها به یک گروه تعلق دارند: آرژینین دی‌هیدرولاز منفی (-A)، لیزین دکربوکسیلاز مثبت (+L) و اورنیتین دکربوکسیلاز مثبت (+O). سپس این چهارگونه را می‌توان بر اساس مجموعه دیگری از کلیدهای تشخیص شناسایی کرد (رشد در ۰٪ یا ۸٪ نمک، رشد بر روی سیترات، واکنش ووگز- پروسکوئر[4] و تخمیر D- گلوکوزآمین و L- آرابینوز). با استفاده از این کلیدها، می‌توان مرتبط‌ترین گونه‌های ویبریو را در پرورش میگو با حداقل تعداد آزمایش‌ها شناسایی کرد.

ویبریو پاراهمولیتیکوس:A منفی، L مثبت، O مثبت، رشد مثبت در نمک ۸٪، رشد مثبت بر روی سیترات، واکنش ووگز- پروسکوئر منفی، D گلوکوزآمین مثبت.

ویبریو هاروه‌ای:رشد بر روی سیترات ممکن است مثبت یا منفی باشد، لذا شناسایی را می‌توان از طریق مجموعه متفاوتی از آزمایش‌ها انجام داد:

- رشد مثبت بر روی سیترات، A منفی، L مثبت، O مثبت، رشد مثبت در نمک ۸٪، واکنش ووگز- پروسکوئر منفی، D- گلوکوزآمین منفی.
- رشد مثبت بر روی سیترات، A منفی، L مثبت، O مثبت، رشد مثبت در نمک ۸٪، واکنش ووگز- پروسکوئر منفی، D- گلوکوزآمین منفی.
- رشد مثبت بر روی سیترات، A مثبت، L مثبت، O مثبت، رشد مثبت در نمک ۸٪ L- آرابینوز منفی.

ویبریو وولنیفیکوس:A منفی، L مثبت، O مثبت، رشد منفی در نمک ۸٪، رشد منفی در نمک ۰٪، رشد مثبت بر روی سیترات.

ویبریو آلجینولیتیکوس:A منفی، L مثبت، O مثبت، رشد مثبت در نمک ۸٪، رشد مثبت بر روی سیترات، واکنش ووگز- پروسکوئر مثبت.

علاوه براین، دو محیط کشت انتخابی و افتراقی برای ویبریو وولنیفیکوس و ویبریو هاروه‌ای وجود دارد. آگار سلوبیوز[5] برای جداسازی و شناسایی ویبریو کلرا[6] و ویبریو وولنیفیکوس تهیه‌شده

1- arginine dihyrolase
2- lysine decarboxylase
3- ornithine decarboxylase
4- voges- proskauer reaction
5- callobiose agar
6- *V.cholerae*

است. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه، ویبریو وولنیفیکوس پرگنه‌های زرد به همراه ناحیه زردرنگی در اطراف پرگنه تولید می‌کند. ویبریو کلرا پرگنه‌های ارغوانی تولید می‌کند که دارای ناحیه آبی‌رنگ در حاشیه آن است. گونه‌های دیگر باکتری به‌ندرت در این محیط کشت رشد می‌کنند. آگار ویبریو هاروه‌ای نیز برای جداسازی و شناسایی ویبریو هاروه‌ای تهیه‌شده است. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵- ۲۸ درجه پرگنه‌های ویبریو هاروه‌ای به‌صورت پرگنه‌های کوچک (به قطر ۲- ۵ میلی‌متر) به رنگ سبز روشن و مرکز سبز تیره ظاهر می‌شوند. ویبریو وولنیفیکوس در این آگار در طی ۴۸ ساعت رشد نمی‌کند. ویبریو پاراهمولیتیکوس و ویبریو آلجینولیتیکوس پرگنه‌های بزرگ (بیش از ۵ میلی‌متر) به رنگ آبی روشن یا تیره یا پرگنه‌های کوچک (۲ تا ۵ میلی‌متر) به رنگ آبی- سبز تیره تولید می‌کنند. آن‌ها را می‌توان به‌راحتی از یکدیگر تشخیص داد. این امر از طریق مشاهده حرکت تجمعی و انبوه ویبریو آلجینولیتیکوس صورت می‌گیرد که باعث می‌شود پرگنه گسترش یابد.

تولید نور، ویژگی تعدادی از گونه‌های ویبریو است که شامل ویبریو هاروه‌ای، ویبریو فیشری[1]، ویبریو لوگئی[2]، ویبریو اورینتالیس[3] و ویبریو اسپلندیدوس بایو وار ۱ هستند. اگر تولید نور توسط یکی از جدایه‌های باکتریایی بیماری میگو صورت گیرد، به‌احتمال‌زیاد آن مورد، ویبریو هاروه‌ای خواهد بود. باوجوداین، همه جدایه‌های ویبریو هاروه‌ای تولید نور نمی‌کنند. غالباً تولید نور را می‌توان در محیط‌های کشت معمولی تشخیص داد. باوجوداین، در مواردی که انتظار می‌رود باکتری تولید نور کند، اما این امر مشاهده نمی‌شود، توصیه می‌شود که آن جدایه در آگار لومینسنس[4] کشت داده شود. تولید نور را می‌توان در یک اتاق کاملاً تاریک ۱۸ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح و گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه بر روی محیط کشت تازه مشاهده کرد (این امر موقتی است و با ادامه گرمخانه گذاری ناپدید می‌شود).

مایکو باکتری‌ها

مایکو باکتریوم مارینوم گاهی اوقات از میگوهای منفرد جداشده است. این باکتری در سطح جمعیت مشکل ایجاد نمی‌کند. مایکو باکتریوم مارینوم، باکتری گرم مثبت و اسیدفاست است که سبب جراحات ملانیزه (تیره رنگ) مزمن در کوتیکول و اندام‌های داخلی می‌شود. اگرچه باکتری باعث تلفات نمی‌شود، اما در کارخانجات فرآوری مواد غذایی آن‌ها را به خاطر ملانیزه بودن دور می‌اندازند.

1- *V. fischeri*
2- *V. logei*
3- *V. orientalis*
4- Luminescence agar

- راه انتقال: انتقال افقی
- میزبان شناخته‌شده: همه میگوهای پنئید
- مرحله شناخته‌شده میزبان: بالغین
- ممکن است خطر انتقال به انسان (زئونوزیس)[1] از طریق تماس با حیوانات بیمار یا آب آلوده با پوست مجروح وجود داشته باشد

علائم درشت‌بینی بیماری

کوتیکول

تغییر رنگ ممکن است هم در کوتیکول و هم بافت‌ها روی دهد. ملانیزه شدن کوتیکول ممکن است در خلال پوست‌اندازی از بین برود و کوتیکول جدید و متعارفی جایگزین آن شود، خصوصاً اگر عفونت یا جراحات زیر آن برطرف شده باشد. ملانیزه شدن کوتیکول علاوه بر مایکوباکتریوز، در فوزاریوز[2]، آلودگی با ویروس عارضه تورا (TSV) و کمبود ویتامین C نیز مشاهده شود.

عضله

گاهی اوقات بافت عضله میگو به رنگ قهوه‌ای یا سیاه قابل‌مشاهده در می‌آید. علت این امر علاوه بر مایکوباکتریوز، مایکوز بالغین و ویبریوز- تراشه سیاه می‌باشد. در این حالت، ممکن است کوتیکول رویی درگیر باشد یا نباشد و در بعضی از موارد ممکن است تا زمانی که کوتیکول برداشته نشود، قابل‌مشاهده نباشد. مشخصاً تغییر رنگ همیشه در اثر واکنش‌های دفاعی میگو در مقابل میکروب‌های مهاجم (برای مثال، ملانیزه شدن) نمی‌باشد.

آلودگی با میکروسپوریدی‌ها باعث کدورت سفیدرنگ عضله دم می‌شود. در تمام موارد، آزمایش‌های بافت‌شناسی برای تعیین عامل بیماری ضرورت دارد.

آسیب‌شناسی

آلودگی با مایکو باکتری‌ها را معمولاً می‌توان به‌وسیله جراحات گرانولوماتوز تشخیص داد. این جراحات شامل توده‌هایی از هموسیت‌ها در داخل کپسول هستند که به‌صورت لایه‌های متحدالمرکز در اطراف باکتری‌های مهاجم مشاهده می‌شوند. این باکتری‌ها را نمی‌توان در لام‌های مونته شده هماتوکسیلین و ائوزین H&E تشخیص داد، اما به‌راحتی توسط رنگ‌آمیزی اسیدفاست قابل‌مشاهده

1- Zoonosis
2- Fusariosis

هســتند. اطلاعات اندکی درباره این آلودگی‌ها وجود دارد و این احتمال وجود دارد که منشــأ آن‌ها، زخم‌ها و جراحات باشند.

ریکتزیا و کلامیدیا[1]

ریکتزیا و کلامیدیا ارگانیســم‌های کوچک گرم منفی داخل ســلولی هســتند که اگر درمان نشــوند، می‌توانند تلفات کم تا زیاد ایجاد کنند. اگرچه در مراحل پیشـــرفته عفونت، اندام کبدی لوزالمعدی (هپاتوپانکراس) ظاهر ســفیدرنگ به همراه رگه‌های سیاه پیدا می‌کند، اما معمولاً علائم بالینی واضح یا متمایز دیگری مشاهده نمی‌شود.

- میزبان‌های شناخته‌شده: -

تورم کبدی لوزالمعدی نکروز دهنده[2](NHP)

این بیماری توســط یک ارگانیسم شبه- ریکتزیایی ایجاد می‌شود که سلول‌های پوششی بافت کبدی لوزالمعدی را مبتلا می‌کند. این امر با وقوع عارضه سالیانه‌ای در ارتباط است که طی آن دمای بالا و شــوری بالا (بالای ۱۰ قســمت در هزار= ppt ۱۰) برای یک دوره طولانی تداوم می‌یابد. این بیماری را همچنین به نام عارضه مرگ‌ومیر میگوهای استخری تگزاس می‌شناسند.

- راه شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- گونه‌های میزبان شناخته‌شده: -
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: نوجوانی- بلوغ

مایکو پلاسماها[3]

ارگانیســـم‌هایی که به مولیکوتس[4] (فاقد دیواره ســـلولی) تعلق دارند، از میگوهای در حال مرگ در اســترالیا و چین جداســازی شــده‌اند. در اســترالیا دوگونه جدید دریایی (مایکوپلاســما P_1 و مایکو پلاســما P_2) شــناســایی‌شــده‌اند. هیچ علائم درشت بینی یا آسیب‌شناسی متمایزی در ارتباط با این عوامل بیماری‌زا وجود ندارد و به نظر می‌رســد که آن‌ها سبب مرگ‌ومیر تدریجی می‌شوند. تشخیص بیماری نیازمند جداسازی و شناسایی، آمیخته‌گری لکه‌گذاری نقطه‌ای یا PCR است.

- راه‌های شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی

1- Rickettsia & Chlamydia
2- Necrotizing hepatopancreatitis
3- Mycoplasma
4- Mullicutes

- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس مونودون
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: بالغین

کشت مایکو پلاسماها

مایکو پلاسماها ارگانیسم‌هایی پلئومورفیک (چندشکلی) هستند که دیواره سلولی ندارند و می‌توانند از صافی‌هایی به‌اندازه ۰/۴۵ و ۰/۲ میکرومتر عبور کنند. آن‌ها کاتالاز منفی بوده و در مقابل آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم هستند. همچنین، آن‌ها پرگنه‌های بسیار کوچک (به قطر کمتر از یک میلی‌متر) تشکیل می‌دهند و پرگنه‌های تیپیک در شرایط کافی رشد، ظاهر تخم‌مرغ سرخ‌شده[1] (نیمرویی) دارند. آلودگی‌های مایکوپلاسمایی گزارش شده از میگو را نمی‌توان از طریق آسیب‌شناسی تشخیص داد، زیرا آن‌ها جراحات اختصاصی تولید نمی‌کنند. اگر میگوهایی مشکوک به آلودگی با مایکو پلاسماها باشند، نمونه‌هایی (بافت‌های همگن‌شده حاصل از چشم، بافت‌های عصبی و آبشش جمع‌آوری و در شرایط سترون فرآوری شوند) را باید جمع‌آوری کرد و از صافی‌های غشایی با قطر چشمه ۰/۲ میکرومتر عبور داد و بر روی محیط کشت مایکو پلاسما تلقیح کرد. انکوباسیون باید در دمای ۳۰- ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتمسفر مرطوب با ۵٪ CO_2 صورت گیرد. رشد باکتریایی را باید در زیر میکروسکوپ برای مشاهده پرگنه‌های نیمرویی شکل پایش کرد. خالص‌سازی را باید با جمع‌آوری پرگنه‌های تک، رقیق کردن آن‌ها در MBM[2] و تلقیح در MAM[3] انجام داد.

آسیب‌شناسی

آلودگی‌های مایکو پلاسمایی گزارش شده از میگو را نمی‌توان از طریق آسیب‌شناسی تشخیص داد، زیرا آن‌ها جراحات اختصاصی تولید نمی‌کنند. روش‌های شناسایی شامل کشت بر روی محیط‌های کشت میکروب‌شناسی و استفاده از کاوشگرهای تشخیصی مولکولی است که اخیراً توسعه‌یافته‌اند.

روش‌های زیست‌شناسی مولکولی

مخلوط PCR مطلوب برای آغازگرهای قادر سوهی و همکاران (در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنشی) به شرح زیر است: ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ده برابر، ۱۰ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۱ میلی‌مول از هر یک از dNTP ها، ۳ میلی‌مول از $MgCl_2$ و یک واحد از پلی‌مراز TaqDNA. روی این

1- Fried egg
2- Mycoplasma broth medium
3- Mycoplasma agar medium

مخلوط را با روغن معدنی سبک بپوشانید. ۳۸ دور را در دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه به جریان بیندازید. گرمخانه گذاری را در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام دهید و سپس آن را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید تا این‌که نمونه‌ها در داخل ژل به حرکت درآیند.

آغازگرها: 5' CTCTGCACTATCTGATCAGTA 3': sense

5' GAATTGGGGCTGGTGAAGTAA 3': anti sense

فرآورده حاصله باید ۲۵۴bp باشد.

باکتری‌های مزاحم

تعدادی از باکتری‌های رشته‌ای به‌صورت موجودات سطحی (اپی بیونت) بر روی میگوهای پنئید ظاهر می‌شوند. بیشتر گزارش‌ها، لوکوتریکس موکور[1] را به‌عنوان گونه‌ای که در بیشتر موارد باعث بیماری می‌شود، بیان کرده‌اند. باکتری‌های رشته‌ای قادر به استقرار بر روی سطح بدن میگو خصوصاً آبشش‌ها هستند. مراحل نوزادی و پس‌نوزادی میگوهای پنئید آن‌چنان تحت تأثیر این مزاحمت قرار می‌گیرند که تنفس، تغذیه، حرکت و پوست‌اندازی آن‌ها دچار نقصان می‌شود و نتیجه این امر، مرگ آن‌ها خواهد بود. باکتری‌های رشته‌ای حالت مهاجم[2] ندارند و آسیب‌شناسی آشکاری بر روی سطح بدن ایجاد نمی‌کنند و تصور می‌شود که مرگ‌ومیر به‌واسطه هیپوکسی (کمبود اکسیژن) بروز کرده باشد. غالباً جمعیت مختلطی از ارگانیسم‌ها علاوه بر باکتری‌های مزاحم در آلودگی نقش دارند که ازجمله می‌توان به تک‌یاخته‌های مزاحم، دیاتومه‌ها و جلبک‌های سبز- آبی رشته‌ای اشاره کرد. حضور ارگارنیسم‌های مزاحم شاخص خوبی دال بر کیفیت نامناسب آب و \ یا وضعیت نامناسب بهداشتی میگو است.

- راه شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: همه میگوهای پنئید
- بیشترین گونه‌های متداول: *لوکوتریکس موکور*، گونه‌های *تیوتریکس*، گونه‌های *فلاووباکتریوم*، گونه‌های *فلکسی باکتر*، گونه‌های *سیتو فاگا*.

آسیب‌شناسی

باکتری‌های مزاحم را می‌توان به‌راحتی از طریق تهیه لام مرطوب از نوزادان، پس‌نوزادان یا آبشش‌ها و ضمایم میگوهای در حال رشد تشخیص داد. آن‌ها در این لام‌ها، به‌صورت رشته‌های قابل‌انعطاف ظریف به قطر یک میکرومتر ظاهر می‌شوند و گاهی اوقات حرکات سرخوردن یا خم و راست شدن

1- *Leucothrix mucor*
2- invasive

از خود به نمایش می‌گذارند. معمولاً این رشته‌ها فاقد انشعاب (فاقد شاخه)، صاف، بندبند و بدون رنگ هستند، هرچند که بعضی از انواع ممکن است با دانه‌های سولفور پرشده باشند. آن‌ها در مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E به‌صورت رشته‌های بازوفیلیک کم‌رنگ (آبی‌رنگ) دیده می‌شوند که به کوتیکول چسبیده‌اند و به لایه‌های زیرین نفوذ نمی‌کنند. این باکتری‌ها شاخصی از محیط پرورشی ضعیف و \ یا طولانی بودن فاصله از پوست‌اندازی قبلی محسوب می‌شوند. آن‌ها هیچ تهدید مستقیمی برای میگو به‌حساب نمی‌آیند، هرچند که این امکان وجود دارد که اگر تراکم آن‌ها بر روی آبشش زیاد باشد، با تبادل اکسیژن در تعارض قرار گیرند. همچنین، اگر تعداد آن‌ها به‌اندازه کافی زیاد باشد، ممکن است با حرکت و تغذیه نوزادان نیز تعارض داشته باشند.

انگل‌های سخت‌پوستان (پریاخته‌ها)

میگوهای پنئید، میزبان‌های حد واسط نوزادان پریاخته‌ای‌های متعدد (نماتودها، سستودها، ترماتودها) هستند و بنابراین، مراحل نوزادی را می‌توان گاهی اوقات در بافت‌های میگو پیدا کرد. این امر به‌ندرت به‌عنوان یک مشکل در میگوهای پرورشی به‌حساب می‌آید، زیرا میزبان‌های نهایی انگل‌ها به‌طور متعارف در استخرهای میگو حضور ندارند. این انگل‌ها به‌طور متداول در مولدین جمع‌آوری‌شده از طبیعت یافت می‌شوند.

- راه‌های شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: همه میگوهای پنئید

آسیب‌شناسی

معمولاً آلودگی به نوزاد پریاخته‌ای در دستگاه گوارش میگو یافت می‌شود. این نوزادان را می‌توان همانند گرگارین‌ها به‌راحتی در گسترش‌های حاصل از خراش روده شناسایی کرد. باوجوداین، آن‌ها را می‌توان به‌صورت ارگانیسم‌های بزرگ، ائوزینوفیلیک و چند سلولی در مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E شناسایی نمود.

تک‌یاخته‌ها

تک‌یاخته‌های مزاحم

متداول‌ترین تک‌یاخته‌های مزاحم، مژه‌داران پری‌تریش[1] هستند. آن‌ها شامل جنس‌های اپیستیلیس[2]، زئوتامنیوم[3]، وورتیسلا[4] و آنوفریس[5] (مهاجم) می‌باشند. سوکتورین‌هایی مانند گونه‌های آسینتا[6] و گونه‌های افلوتا[7] و یک تاژکدار شبه- بودو[8] نیز مشاهده می‌شوند.

آلودگی‌های شدید با این ارگانیسم‌ها، همانند باکتری‌های رشته‌ای، سبب آسیب به تنفس، تغذیه، حرکت و پوست‌اندازی می‌شود و حتی ممکن است در اثر کمبود اکسیژن (هیپوکسی) باعث مرگ سخت‌پوست شود. بااینکه بیشتر تک‌یاخته‌های مزاحم غیرمهاجم هستند و هیچ آسیب آشکاری را به ساختارهای داخلی وارد نمی‌کنند، اما یک مژه‌دار شناسایی نشده را توصیف کرده‌اند که سبب نکروز و آماس در آبشش‌ها می‌شود.

آلودگی غالباً دربرگیرنده جمعیت مختلطی از ارگانیسم‌ها به‌علاوه تک‌یاخته‌های مزاحم هستند. سایر اعضای جمعیت ممکن است شامل باکتری‌های مزاحم، دیاتومه‌ها و جلبک‌های آبی- سبز رشته‌ای باشند. حضور ارگانیسم‌های مزاحم، شاخص خوبی از کیفیت ضعیف آب و \ یا وضعیت ضعیف سلامتی میگو است.

راه‌های شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی

میزبان‌های شناخته‌شده: همه میگوهای پنئید

مراحل شناخته‌شده ابتلا: همه مراحل

آسیب‌شناسی

مزاحمت در اثر انگل‌های ساقه‌دار: این ارگانیسم‌ها، انگل‌های غیربیماری‌زای مزاحم هستند که به کوتیکول میگو می‌چسبند و به بافت‌های زیرین نفوذ نمی‌کنند. آن‌ها از ذرات مواد آلی و میکروارگانیسم‌های موجود در آب پرورشی تغذیه می‌کنند و بنابراین، شاخصی از کیفیت پایین آب به‌حساب می‌آیند. آن‌ها تهدید مستقیمی برای میگو محسوب نمی‌شوند، هرچند که درصورتی‌که در تراکم بالا بر روی آبشش حضور داشته باشند، این امکان وجود دارد که با تبادلات اکسیژن در

1- peritriched
2- *Epistylis*
3- *Zoothamnium*
4- *Vorticella*
5- *Anophrys*
6- *Acineta* spp.
7- *Ephelota*
8- *Bodo*- like

آبشش در تعارض قرار گیرند. آن‌ها همچنین ممکن است با تحرک و تغذیه میگو نیز در صورت زیاد بودن تعداد تعارض داشته باشند. این ارگانیسم‌ها را می‌توان به‌راحتی با مشاهده ریزبینی لام مرطوب کل بدن نوزادان، پس‌نوزادان یا آبشش‌ها و خراش کوتیکول تشخیص داد. آن‌ها را می‌توان همچنین در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با H&E شناسایی کرد. آن‌ها در اینجا به رنگ صورتی (اسیدوفیلیک)، با هسته‌های U شکل مشاهده می‌شوند، اما به خاطر اندازه و ماهیت انعطاف‌پذیرشان، به‌ندرت می‌توان به‌صورت کامل آن‌ها را مشاهده کرد.

آسینتا

این ارگانیسم یک سوکتورین[1] (شاخک‌دار=تانتاکول دار) است که دستجاتی از ضمایم چسبنده دارد و به کمک آن‌ها میکرو ارگانیسم‌های هدف خود را به دام می‌اندازد و سپس آن‌ها را می‌بلعد.

اپیستیلیس

این تک‌یاخته یک مژه‌دار ساقه‌دار است که با وورتیسلا ارتباط دارد و از ارگانیسم اخیر به لحاظ داشتن عادات شاخه‌شاخه شدن و فقدان یک رشته انقباضی مرکزی در ساقه خود متمایز می‌شود.

وورتیسلا

این ارگانیسم یک مژه‌دار ساقه‌دار است که یک سر مژه‌دار منفرد بر روی یک ساقه غیر منشعب دارد. یک رشته قابل انقباض مرکزی نیز دارد که منقبض می‌شود، اما مثل یک فنر پیچ نمی‌خورد.

زئوتامنیوم[2]

این ارگانیسم نیز مژه‌دار ساقه‌دار دیگری است که با اپیستیلیس و وورتیسلا رابطه دارد. ویژگی آن، داشتن ساقه‌های منشعب (شاخه‌شاخه) است که حاوی رشته‌های انقباضی مرکزی هستند.

آنوفریس[3]

این ارگانیسم یک تک‌یاخته مژه‌دار تک‌سلولی با شنای آزاد است که بر روی سطح خارجی بدن میگو دیده می‌شود. این تک‌یاخته در موارد نادر ممکن است به‌صورت یک عامل بیماری‌زای داخل سلولی درآید. تک‌یاخته مذکور را می‌توان در نمونه‌های مونته شده و رنگ‌آمیزی شده با H&E

1- Sucturian
2- *Zoothamnium*
3- *Anophrys*

به‌صورت سلول دوکی‌شکل کوتاه به رنگ بازوفیلیک کم‌رنگ و حاشیه مژه‌دار مشاهده کرد. همچنین، می‌توان آن را با رنگ‌آمیزی گیمسا[1] با وضوح بیشتری مشاهده کرد.

روش‌های آزمایش و شناسایی انگل‌ها

تثبیت و رنگ‌آمیزی سریع آبشش

این روش سریع، امکان تثبیت و آزمایش بر روی آبشش‌ها را در عرض دو ساعت فراهم می‌کند. علاوه بر انگل‌ها، بیماری‌های ویروسی مانند عفونت‌های ناشی از YHV,WSSV و IHHNV را می‌توان از این طریق تشخیص داد. باکتری‌ها و تک‌یاخته‌های مزاحم، گونه‌های ویبریو، مایکوزیس و حضور ملانین را نیز می‌توان تعیین کرد:

۱- یک نمونه از آبشش را برداشته و به مدت یک ساعت در داخل لوله اپندورف به همراه تثبیت‌کننده اسیدکلریدریک دیویدسون[2] قرار دهید. همه مراحل این روش در داخل لوله اپندورف صورت می‌گیرد.

۲- به مدت ۱۵ دقیقه با آب شهر جریان‌دار شستشو دهید (لوله اپندورف را با پارچه گاز استریل[3] بپوشانید تا بافت آبشش شناور نشود و آن را فرو ببرد).

۳- آب را دور ریخته، به مدت ۱۰ دقیقه هماتوکسیلین اضافه کنید و سپس دور بریزید.

۴- به مدت ۱۵ دقیقه در آب شهر جریان‌دار شستشو دهید.

۵- به مدت دو دقیقه ائوزین اضافه کنید و سپس دور بریزید.

۶- به مدت یک دقیقه اتانول ۵۰٪ اضافه کرده و سپس دور بریزید.

۷- به مدت یک دقیقه اتانول ۷۰٪ اضافه کنید و سپس دور بریزید.

۸- به مدت یک دقیقه اتانول ۹۵٪ اضافه کنید و سپس دور بریزید. این عمل را یک بار دیگر تکرار کنید.

۹- به مدت یک دقیقه اتانول ۱۰۰٪ اضافه کنید و سپس دور بریزید. این عمل را نیز یک بار دیگر تکرار کنید.

۱۰- به مدت ۳۰ ثانیه گزیلول اضافه کنید. این عمل را دوبار تکرار کنید و سپس نمونه را مونته کنید.

1- Geimsa
2- HCl Davidson’s Fixative
3- gauze tissue

لام مرطوب آبشش

لام مرطوب را می‌توان با برداشتن قسمتی از بافت هدف، قرار دادن آن بر روی یک قطره سرم نمکی (سالین) استریل (کلرید سدیم ۲/۸٪) یا آب دریایی استریل، فشردن ملایم آن توسط یک لامل انجام داد و سپس در زیر میکروسکوپ مشاهده نمود. لام مرطوب غیر تخریبی[1] را می‌توان از مواد زیر تهیه کرد.

آبشش‌ها

چیزهایی را که می‌توان به این روش تعیین کرد، شامل: مشاهده حضور ملانین، باکتری‌های مزاحم، تک‌یاخته‌ها، باکتری‌های میله‌ای متحرک (به‌احتمال‌زیاد گونه‌های ویبریو)، مایکوزیس، دیاتومه‌ها و جلبک‌های سبز- آبی و دترتیوس (بقایای گیاهی در حال فساد) در بین لاملاها (تیغه‌ها) هستند.

ضمایم

چیزهایی را که می‌توان توسط این روش تعیین کرد، شامل علائم اختصاصی TSV، باکتری‌های مزاحم، تک‌یاخته‌ها و مایکوزیس هستند.

مدفوع

رشته‌های مدفوع را جمع‌آوری کرده، بر روی یک لام به همراه یک قطره سرم نمکی (کلرید سدیم ۲/۸٪) قرار دهید و به‌آرامی به کمک یک لامل فشار دهید. یک قطره سبز مالاشیت ۰/۰۱٪ اضافه کنید. در زیر میکروسکوپ ترکیبی[2] مشاهده نمایید. گنجیدگی‌های باکولوویروس پنئی (BP)[3] و باکولوویروس تیپ- پنئوس مونودون (MBV)[4] را می‌توان توسط این روش تعیین کرد.

خراش کوتیکول

نواحی ملانیزه (تیره رنگ) کوتیکول را توسط لبه یک تیغ خراش داده و خراش را در داخل یک قطره سرم نمکی (کلرید سدیم ۲/۸٪) بر روی یک لام قرار دهید. باکتری‌های مزاحم، تک‌یاخته‌ها و فوزاریوم[5] را می‌توان با این روش تعیین کرد.

1- non- destructive
2- Compound microscope
3- *Baculovirus penaei*
4- *Penaeus monodon*- type *baculovirus*
5- *Fusarium*

بیماری‌های قارچی میگو

عفونت‌های قارچی در میگوهای پروش یافته در استخر مشکل کوچکی[1] محسوب می‌شوند و از بیشتر موارد می‌توان با روش‌های مدیریتی صحیح اجتناب ورزید. یک گروه از قارچ‌ها، دربرگیرنده اشکالی از شاخه اوومایکوتا[2] هستند که دارای اجداد جلبکی زرد- سبز[3] می‌باشند، درحالی‌که گروه دیگر، دربرگیرنده قارچ‌های حقیقی از شاخه آسکومایکوتا[4] هستند. اشکالی از شاخه اوومیکوتا، عفونی هستند و ممکن است خصوصاً در پرورش نوزادان میگو مشکل‌ساز باشند، درحالی‌که اشکالی از شاخه آسکومایکوتا شدیداً فرصت‌طلب هستند و به‌احتمال‌زیادتر در استخرهای میگوهای در حال رشد ظاهر می‌شوند.

بیماری‌های قارچی (مایکوز) نوزادان

قارچ‌هایی که سبب این بیماری می‌شوند، همگی کپک‌های آب (رده اوومیست‌ها)[5] هستند. این ارگانیسم‌ها برخلاف قارچ‌های حقیقی، دارای اجداد جلبکی هستند.[6] شناخته‌شده‌ترین عوامل بیماری‌زای نوزادان میگو، لاجنیدیوم کالی‌نکتس[7] و گونه سیرولپیدیوم[8] هستند. این عوامل را می‌توان عوامل جدی مرگ‌ومیر دانست، زیرا نوزادان در مراحل اولیه فاقد توان مبارزه با آن‌ها (فاقد پاسخ آماسی) هستند و آن‌ها به‌صورت نامحدود رشد می‌کنند و هایفه‌ها (رشته‌ها) جایگزین بافت‌های نرم نوزادان می‌شوند تا اینکه کاملاً جای آن‌ها را بگیرند. در این نقطه، تولید هاگ (اسپوروژنز)[9] با شکل‌گیری هاگدان‌ها (اسپورانجیوم‌ها) در داخل بدن میگو شروع می‌شود و سپس شکل‌گیری لوله‌های دفعی[10] و نهایتاً رهاسازی هاگ‌ها (زئوسپورها) انجام خواهد شد.

- راه شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- گونه‌های میزبان شناخته‌شده: همه پنئیدها
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: مراحل نوزادی

1- minor problom
2- Oomycota
3- yellow- green algal ancestors
4- Ascomycota
5- Oomycetes
6- algal ancestors
7- *Lagenidium callinectes*
8- *Sirolpidium* sp.
9- Sporogenesis
10- discharge

آسیب‌شناسی

این ارگانیسم‌ها سبب مایکوز نوزادی می‌شوند و دارای اجداد جلبکی هستند؛ بنابراین، فقط ارتباط دوری با قارچ‌های حقیقی دارند. معمولاً آن‌ها را در لام‌های مرطوب نوزادان کامل حاصل از کارگاه‌های تکثیر میگو شناسایی می‌کنند. عوامل مسبب این بیماری، بدن نوزاد را با رشته‌های هایفه‌ای وسیع و فاقد دیواره پر می‌کنند و در هنگام بلوغ هاگهای (زئوسپورهای) متحرک کلیه‌ای شکل با دو تاژک تولید می‌کنند که به گسترش افقی آلودگی منجر می‌شود. در مورد تولید هاگ در لاجنیدیوم، سیتوپلاسم به داخل یک وزیکول در انتهای رشته دفع می‌شود و این رشته از طریق اسکلت خارجی قارچ به داخل آب اطراف توسعه می‌یابد: سیتوپلاسم به داخل هاگ‌های بالغ در عرض چند دقیقه ظاهر می‌شود و وزیکول نهایتاً با افزایش فعالیت‌های شنای آن‌ها باز می‌شود. در مورد سیرولپیدیوم[1]، هاگها در داخل رشته‌ها در درون بدن نوزادان بالغ می‌شوند و آن‌ها از طریق یک پاپیلای خروجی کوتاه که از کوتیکول نفوذ می‌کند، به داخل آب اطراف راه می‌یابند.

مایکوز بالغین[2]

عامل این بیماری فوزاریوم سولانی است. این ارگانیسم یک عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب است که به‌راحتی بر روی بافت‌های مجروح گونه‌های حساس عفونت ایجاد می‌کند. فوزاریوم در خاک‌ها و بقایای گیاهی در حال تجزیه (دتریتوس) وجود دارد و ممکن است به داخل کارگاه‌های آبزی‌پروری از طریق گل‌ولای کف استخر یا منابع آب دریا راه یابد. ارگانیسم مذکور باعث جراحات موضعی می‌شود و به همراه آن، پاسخ آماسی ظاهر می‌شود که درنهایت به تیرگی (ملانیزه شدن) شدید ختم می‌شود. آبشش‌ها، قاعده ضمایم یا کوتیکول‌ها بیش از بقیه اندام‌ها مبتلا می‌شوند. آلودگی به فوزاریوم معمولاً باعث مرگ‌ومیر نمی‌شود. باوجوداین، حیوانات مبتلا در کارخانجات فرآوری مواد غذایی به خاطر ملانیزه بودن به دور انداخته می‌شوند.

- راه‌های شناخته‌شده انتقال: انتقال افقی
- میزبان‌های شناخته‌شده: همه میگوهای پنئید
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: نوجوانان- بالغین

گونه‌های حساس

پنئوس ژاپونیکوس، پنئوس کالیفرنیکوس: بسیار حساس

پنئوس استیلی روستریس، پنئوس وانامی: حساسیت متوسط

1- *Sirolpidium*

2- adult mycosis

پنئوس مونودون، پنئوس مرگوئنسیس[1]: نسبتاً مقاوم

آسیب‌شناسی

مایکوز بالغین را در صورت وجود، می‌توان اغلب با آزمایش‌های ریزبینی لام مرطوب آبشش‌های میگو یا خراش جراحات ملانیزه در کوتیکول تشخیص داد. این آزمایش‌ها، حضور رشته‌های هایفه‌ای را به همراه مایکروکونیدی‌های[2] تخم‌مرغی یا بیضی‌شکل و ماکروکونیدی‌های قایقی شکل[3] چند جداره آشکار می‌سازد. در مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E هایفه‌های خارجی و کونیدی‌ها را می‌توان به‌راحتی شناسایی کرد، اما رشته‌های هایفه‌ای در بافت‌ها به‌راحتی قابل‌تشخیص نیست. رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی مانند PAS را می‌توان برای تشخیص این هایفه‌ها به‌صورت آشکار مورداستفاده قرار داد.

کشت و شناسایی قارچ‌ها

لاجنیدیوم و سیرولپیدیوم

محیط کشت مناسب برای این قارچ‌ها، سابورو دکستروز آگار یا آگار پپتون- عصاره مخمر- گلوکز (PYG) است که باکلرید سدیم ۲/۵٪ و همچنین محلول پنی‌سیلین- استرپتومایسین برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی غنی‌شده است (پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر میلی‌لیتر و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر).

هر دوی این قارچ‌ها در محیط کشت آگار رشد می‌کنند تا شبکه‌ای از رشته‌های (هایفه‌های) نسبتاً فاقد دیواره تولید کنند که نسبتاً «مرطوب» به نظر می‌رسند و هیچ کونیدی[4] تولید نمی‌کنند. اگر یک قطعه آگار برداشته‌شده و در آب دریای سترون قرار داده شود، زئوسپورها (هاگهای جانوری) تولید خواهند شد. دو جنس مذکور را می‌توان از روی مدل رشد زئوسپورها و نحوه دفع (خروج) آن‌ها از یکدیگر تفکیک کرد. در لاجنیدیوم ویژگی لوله دفعی، وجود وزیکول انتهایی در میزبان است که سیتوپلاسم از هایفه‌ها به داخل آن حرکت می‌کند. در آنجا هاگها توسط شکاف سیتوپلاسمی رشد می‌کنند (روندی که تقریباً ۱۵ دقیقه به طول می‌انجامد). هاگها پس از شکل‌گیری به‌سرعت حرکت می‌کنند تا اینکه وزیکول‌ها شکسته شوند و آن‌ها شناکنان به جستجوی میزبان جدید بپردازند. در سیرولپیدیوم، لوله دفعی ظاهری شبیه نوک پستان کوتاه دارد

1- *P. merguensis*
2- microconidia
3- canoe – shaped macroconidia
4- Conidia

و هیچ وزیکول انتهایی شکل نمی‌گیرد. در عوض، هاگها در داخل شبکه میسلیومی در داخل میزبان شکل می‌گیرند و از طریق لوله دفعی خارج می‌شوند.

کشت و شناسایی قارچ فوزاریوم

محیط کشت مناسب برای قارچ فوزاریوم، سابورو دکستروز آگار یا آگار سیب‌زمینی دکستروز است که با کلرید سدیم ۲/۵٪ و همچنین محلول پنی‌سیلین- استرپتومایسین جهت جلوگیری از آلودگی باکتریایی غنی‌شده است (پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر میلی‌لیتر و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر). گرمخانه گذاری در دمای ۲۸ درجه به مدت ۲- ۳ روز صورت می‌گیرد. باید جستجو کرد تا ویژگی این قارچ که وجود مایکرو کونیدی‌های قایقی شکل، میسلیوم دیواره‌دار شاخه‌شاخه و رنگدانه‌های قابل‌انتشار قهوه‌ای یا قرمز (ماگنتا) است، مشاهده شود.

بیماری‌های متفرقه میگو

این گروه‌بندی شامل بیماری‌هایی است که نمی‌توان آن‌ها را در فهرست فوق دسته‌بندی کرد، یا اینکه بیماری‌هایی هستند که عامل مسبب آن‌ها به‌اندازه کافی شناسایی نشده‌اند.

تورم روده هموسیتیک[1]

به نظر می‌رسد که سبب‌شناسی این بیماری مربوط به سمومی‌باشد که در اثر بلع جلبک‌های آبی- سبز در دستگاه گوارش آزاد می‌شوند. این سموم به سلول‌هایی که آستر روده میانی و روده‌های کور هستند و هیچ لایه کوتیکولی ندارند، آسیب می‌رساند. آن‌ها سبب آماس شدید می‌شوند و ممکن است اندام کبدی لوزالمعدی (هپاتوپانکراس) را نیز مبتلا کنند. عفونت ثانویه با باکتری‌های فرصت‌طلب منجر به مرگ‌ومیر شدید می‌شود. میگوهایی که از شکل مزمن این بیماری رنج می‌برند، رشد ضعیفی نشان می‌دهند.

- میزبان‌های شناخته‌شده: همه میگوهای پنئید
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: عمدتاً جوان‌ها، هرچند که میگوهای بالغ نیز درصورتی‌که برای بار اول در معرض جلبک‌ها قرار گیرند، بیمار می‌شوند.

1-Haemocytic entritis

علائم درشت‌بینی بیماری

آبی‌رنگ شدن کوتیکول

آبی‌رنگ شـدن کوتیکول میگو ممکن اسـت به‌سادگی، نتیجه شرایط محیطی باشد که میگو در آن رشـد می‌کند، یا این‌که از رنگدانه‌هایی که در جیره میگو وجود دارند، یا غایب هستند، نشأت گرفته باشد. از طرف دیگر، گزارش شده است که این حالت ممکن است با حضور بعضی از عوامل بیماری‌زا نیز در ارتباط باشـــد. در منابع، آبی‌رنگ شـــدن بدن در ارتباط با ویروس نکروز عفونی زیر جلدی و بافت‌های خونساز (IHHNV)، تورم روده هموسیتیک و فقدان آستازانتین[1] توصیف‌شده است.

کدورت سفیدرنگ بافت‌های عضلانی[2]

معمولاً بافت عضـلانی در بندهای شـکمی میگوهای سـالم شـفاف یا کدر اسـت. کدورت سفیدرنگ، شـاخصی برای وجود حالت غیرمتعارف است که ممکن است در اثر عوامل بیماری‌زا باشد، یا نباشد. در منابع، کدورت سفیدرنگ عضلات در رابطه با تورم روده هموسیتیک، نکروز عضلانی ایدیوپاتیک[3] (با منشأ ناشناخته)، عارضه گرفتگی عضله[4] و عفونت مایکروسپوریدیوم[5] توصیف‌شده است.

پر بودن روده و رنگ آن[6]

پر بودن روده و رنگ آن غالباً به‌عنوان شـاخصـی برای وضـعیت بهداشـتی میگو محسـوب می‌شود. ازآنجاکه عضـلات شـکمی میگو به رنگ کدر اسـت، روده میانی را می‌توان در امتداد نوک بندهای شـکمی مشـاهده کرد و این امر در حالتی اسـت که نمونه میگوی پرورشی را به سمت بالا در مقابل نور نگه داریم. این فرآیند آشـکار می‌سـازد که آیا دسـتگاه گوارش خالی از غذا اسـت، یا اینکه پر می‌باشـد. این امر زمان کوتاهی پس از تغذیه صـورت می‌گیرد و می‌تواند روشـن سـازد که آیا میگو تغذیه کرده اسـت یا خیر. روده خالی نشـان می‌دهد که میگو در حال تغذیه نیست و این امر به‌نوبه خود نیـازمنـد تحقیقـاتی برای تعیین علت آن خواهد بود. علاوه بر خالی بودن و پر بودن دسـتگاه گوارش، رنگ غیرطبیعی آن نیز نشـان می‌دهد که لازم اسـت آزمایش‌هایی برای تعیین علت آن صـورت گیرد. سـفید شـدن دسـتگاه گوارش نوزادان در رابطه با عفونت و ویروس نکروز روده میانی

1-astaxanthin
2-white opague muscle tissue
3-Idiopathic muscle necrosis
4- cramped muscle syndrome
5-Microsporidium
6-Gut fullness and color

باکولوویروسی[1](BMNV) توصیف‌شده است. زردرنگ شدن دستگاه گوارش در رابطه با آلودگی با گرگارین، ملانیزه شدن سکوم روده میانی خلفی[2] و تورم روده هموسیتیک توصیف‌شده است.

آسیب‌شناسی

ویژگی تورم روده هموسیتیک، جایگزینی بافت پوششی استوانه‌ای روده میانی با تجمع شدید هموسیت‌ها (به معنی آماس هموسیتیک یا تجمع هموسیت‌ها) می‌باشد. در یک مورد، تحقیق تجربی انجام شد تا شرایطی را که در اثر بلع جلبک آبی سبز شیزوتریکس کالسی‌کولا[3] حاصل می‌شود، نشان دهد.پیشنهاد شده است که جلبک‌های آبی- سبز کفزی دیگر نیز ممکن است سبب این جراحات شوند.

عارضه گرفتگی عضله[4]

عارضه گرفتگی عضله که به آن عارضه دم خمیده[5] نیز گفته می‌شود، با انحنای دم میگو به سمت شکمی همراه است. این عارضه به‌صورت خودبه‌خودی و ناگهانی ظاهر می‌شود و با وصله‌های سفیدرنگ کدر در عضلات همراه است که گویای نکروز عضلانی است. اگر حیوان در این شرایط دست‌کاری شود، یا در معرض استرس اضافی قرار گیرد، این فرآیند تشدید می‌شود و سفتی انحنا و نکروز (وصله‌های سفید) افزایش می‌یابد. معمولاً در این مرحله، آسیب غیرقابل‌برگشت است و غالباً مرگ‌ومیر روی می‌دهد. به نظر می‌رسد که سبب‌شناسی این عارضه، عدم تعادل تغذیه‌ای یا محیطی پتاسیم در رابطه با کاتیون‌هایی چون کلسیم، سدیم و منیزیوم باشد

- میزبان‌های شناخته‌شده: احتمالاً همه میگوهای پنئید
- مراحل حساس ابتلا: نوجوان‌ها- بالغین

علائم درشت‌بینی بیماری

بافت عضلانی کدر سفید

معمولاً بافت عضلانی در بندهای شکمی میگوهای سالم شفاف تا کدر است. رنگ کدر سفید شاخصی از وجود حالت غیرمتعارف است و ممکن است در اثر عوامل بیماری‌زا ایجادشده باشد، یا

1- Baculovirus midgut necrosis virus
2- melanised posterior midgut cecum
3- *Schizothrix calcicola*
4- cramped muscle syndrome
5- bent tail syndrome

اینکه بدین‌گونه نباشد. در منابع، عضله سفید کدر در رابطه با تورم روده هموسیتیک، نکروز عضلانی ایدیوپاتیک، عارضه گرفتگی عضله و عفونت مایکروسپوریدیوم توصیف‌شده است.

بدشکلی

شکل غیرمتعارف بدن یا ضمایم میگو ممکن است ناشی از عوامل عفونی، شرایط محیطی نامناسب یا تغذیه ناکافی باشد. گاهی اوقات این عوامل سبب مشکلاتی در خلال پوست‌اندازی می‌شوند و این مشکلات منجر به بدشکلی پس از پوست‌اندازی می‌شوند. در بعضی از موارد، نوزادان، پس‌نوزادان و نوجوانان ممکن است قادر به جداسازی پوسته قدیمی (اکسوویوم)[1] نباشند و این امر نهایتاً ممکن است منجر به مرگ آن‌ها شود.

در عارضه رشد کند \ کوتولگی[2](RDS) و عارضه گرفتگی عضله، با این بدشکلی‌ها مواجه می‌شویم. در شرایط کمبود اکسیژن محلول و استرس زیاد، گاهی اوقات عضله شکمی میگو دچار خمیدگی شده و به شکل منقبض هلالی درمی‌آید که باقی‌مانده و منجر به سفید شدن عضلات و مرگ می‌شود. آزمایش‌های بافت‌شناسی، آسیب عضلانی و نکروز در غیاب عوامل بیماری‌زای میکروبی را نشان می‌دهد.

عارضه بدشکلی نوزادی

مشکلات مربوط به پوست‌اندازی نوزادان و پس‌نوزادان غالباً منجر به بدشکلی می‌شود که با چشم غیرمسلح قابل‌مشاهده است. معمولاً آزمایش‌های ریزبینی در اولین مرحله نیازمند تعیین عامل است. در بعضی از موارد ممکن است در اثر تغذیه باشد. برای مثال، نوزادانی که از کمبود لسیتین[3] رنج می‌برند، قادر به جداسازی پوسته قدیمی نخواهند بود و این امر ممکن است منجر به مرگ شود.

عارضه نکروز عضله ایدیوپاتیک[4] (با منشأ ناشناخته)

ویژگی عارضه نکروز عضله ایدیوپاتیک (با سبب‌شناسی ناشناخته) (IMNS)، وجود وصله‌های سفید کدر در عضله دمی است. هیچ عامل عفونی در رابطه با این نکروز شناخته نشده است و آماس بسیار اندکی دیده می‌شود، یا ممکن است مشاهده نشود. همان‌طور که از نام این عارضه برمی‌آید،

1- exuvium
2- Slowgrowth \ Runting syndrome
3- lecithin
4- Idiopathic muscle necrosis syndrome

سـبب‌شناسی این بیماری ناشناخته است، اما احتمال براین است که با عدم تعادل کاتیون: آنیون در غذا و \ یا محیط (همانند گرفتگی عضـله) در رابطه باشـد و به دنبال آن، اسـترس اضافی به این امر کمک می‌کند. مرگ‌ومیر به‌ندرت روی می‌دهد، مگر اینکه جراحات بسـیار گسـترده باشـد. اگر دست‌کاری به‌درستی صورت گیرد، میگوهای مبتلا ممکن است شرایط را معکوس کنند. باوجوداین، اگر اسـترس تداوم یابد، جراحات ممکن اسـت به اسـتقرار باکتری‌ها منجر شود و به پوسیدگی دم[1] تبدیل گردد.

- میزبان‌های شناخته‌شده: احتمالاً همه میگوهای پنئید
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: پس‌نوزادان- نوجوانان- بالغین

عارضه مرتبط: عارضه عضله قهوه‌ای[2](BMS)

عارضه عضله قهوه‌ای، یک نوع نکروز عضله ایدیوپاتیک (با منشأ ناشناخته) است که با پاسخ آماسی و مواردی از ملانیزه شـدن همراه می‌شـود. بافت عضـلانی مبتلا و تازه میگو به رنگ قهوه‌ای روشـن درمی‌آیـد، امـا در هنگـام پخت‌وپز به رنگ سـیاه درمی‌آید. این میگوهای مبتلا هیچ ارزش تجاری نخواهند داشـت. همانند IMNS، نکروز بافت عضـلانی با عفونت باکتریایی همراه نیسـت. به نظر می‌رسـد که کاهش تراکم و تغذیه مناسـب (به معنی کاهش اسـترس) از این شـرایط جلوگیری می‌کند. گزارش شـده اسـت که در تایلند یک ذره شـبه- ویروسـی سـیتوپلاسـمی فاقد پوشش ۴۵ نانومتری که تعیین ویژگی نشده است، با بیماری BMS رابطه دارد.

بیماری اسپرماتوفور سیاه

ویژگی بیماری اسـپرماتوفور سـیاه، تغییر رنگ آمپول اسـپرم، اسـپرماتوفور و وازدفران‌ها به رنگ قهوه‌ای تا سـیاه اسـت. در این بیماری، بخش زیادی از اسـپرم‌های تولیدشـده غیرمتعارف هسـتند. ممکن است این بیماری با عفونت‌های ثانویه ناشی از باکتری‌های فرصت‌طلب همراه شود.

- عامل اصلی بیماری ناشناخته است
- میزبان‌های شناخته‌شده: پنئوس وانامی
- مراحل شناخته‌شده ابتلا: بالغین

1- tail rot
2- Brown muscle syndrome

علائم درشت‌بینی بیماری

قهوه‌ای تا سیاه شدن اسپرماتوفور و قسمت‌های پایین‌تر دستگاه تولیدمثل ویژگی بیماری اسپرماتوفور سیاه است. این بیماری به‌ندرت منجر به مرگ می‌شود. بااین‌وجود، بسیاری از اسپرم‌ها غیرمتعارف هستند. برای تأیید بیماری نیازی به‌روش‌های آزمایشگاهی دیگری نیست.

بیماری آبشش سیاه

آبشش‌های سیاه (و ضمایم و کوتیکول سیاه) تظاهر متداول تعدادی از عارضه‌ها (ویبریوز، ارگانیسم‌های مزاحم، مایکوز، عفونت مایکو باکتریوم، کمبود اسید آسکوربیک) می‌باشد. علاوه بر سبب‌شناسی عفونی یا تغذیه‌ای، تعدادی از فلزات سنگین (برای مثال، کادمیوم یا مس که در استخرهای پرورش میگو به‌عنوان جلبک‌کش استفاده می‌شوند) و مواد شیمیایی معین دیگر (برای مثال، آمونیاک، نیترات، کلر، پرمنگنات پتاسیم) نیز باعث جراحات ملانیزه (تیره رنگ) می‌شوند. این سبب‌شناسی را باید از آبشش های سیاه تفکیک کرد که در اثر تجمع مواد آلی حاصل می‌شود و به‌راحتی در آب‌هایی با کدورت بالا روی می‌دهد.

- گونه‌های مبتلا: همه میگوهای پنئید
- مراحل حساس ابتلا: همه مراحل

آسیب‌شناسی

تشخیص بیماری آبشش سیاه را می‌توان با تهیه لام مرطوب برای آزمایش ریزبینی انجام داد. باوجوداین، شناسایی عامل امری پیچیده است. عوامل زیادی باعث تیره رنگ شدن (ملانیزه شدن) آبشش می‌شوند که می‌توان از فلزات سنگین، آمونیاک، آب‌اسیدی، کمبود اسید آسکوربیک و حتی کمبود اکسیژن نام برد. بررسی‌های ریزبینی، اطلاعاتی درباره محل، انتشار و اندازه جراحات آبشش، حضور ارگانیسم‌های مزاحم، دتریتوس (بقایای گیاهی در حال تجزیه) یا تیره رنگ شدن ناشی از کروماتوفورهای اتساع یافته یا گره‌های (ندول‌های) ملانیزه در داخل تیغه‌ها برای ما فراهم می‌کند.

کمبود اسید آسکوربیک[1]

ویژگی این بیماری که به آن مرگ سیاه[2] نیز می‌گویند، وجود نواحی ملانیزه (تیره رنگ) گسترده در غیاب جراحات کوتیکولی است. این بیماری در میگوهایی دیده می‌شود که در کارگاه‌های پرورشی بسته با غذای دستی ناکافی پرورش می‌یابند، اما در استخرهایی که رشد میکروآلجی‌ها (جلبک‌های

1- Ascorbic acid deficiency
2- black death

میکروسـکوپی) صـورت می‌گیرد، یافت نمی‌شود. عفونت‌های ثانویه با باکتری‌های فرصت‌طلب منجر به مرگ می‌شود.

- گونه‌های مبتلا: همه میگوهای پنئید.
- مراحل ابتلا: همه مراحل.

علائم درشت‌بینی

تیره رنگ شدن (ملانیزه شدن)و تغییر رنگ کوتیکول.

آسیب‌شناسی

کمبود واقعی اسید آسکوربیک (ویتامین C) باعث ملانیزه شدن تحت کوتیکولی در میگوهای پنئید می‌شـــود. باوجوداین، شـــک و تردید وجود دارد که میگوها در کارگاه‌های پرورشـــی هرگز مبتلابه کمبود این ویتامین شـــوند، زیرا مقدار کمی از آن برای تأمین نیازها کفایت می‌کند و این مقدار در غـذاهـای طبیعی وجود دارد. ویژگی جراحات مذکور از دیدگاه ریزبینی، فقدان زخم‌های آشـــکار یا عفونت‌های میکروبی است.

اسفروییدها (اجسام کروی شکل)

به نظر می‌رسـد که اسفروییدها نتیجه پاسخ عمومی به هر نوع ماده خارجی ازجمله عوامل بیماری‌زا (برای مثال، باکتری‌ها، ویروس‌ها و غیره) و حتی مواد خنثی مانند سـلول‌های مخمری کشته‌شده یا ذرات کربن هسـتند. آن‌ها احتمالاً دربرگیرنده تجمعاتی از سلول‌های بیگانه‌خوار در حال گردش و \ یا ثابت هسـتند. بدون بررسـی‌های دقیق (برای مثال، میکروسـکوپ الکترونی یا آمیخته‌گری درجا) نمی‌توان این اسفروییدها را به عوامل بیماری‌زای خاص (ویروسی یا باکتریایی) نسبت داد.

آن‌ها غالباً در اندام لنفویید دیده می‌شـوند، اما همچنین می‌توان آن‌ها را به‌صـورت خودبه‌خود[1] در آبشـش‌ها یا بافت همبند خصوصاً در زیر اپیدرم در ناحیه سرسینه (سفالوتوراکس) مشاهده کرد. همچنین، پیشـنهاد شـده است که اسفروییدها می‌توانند از اندام لنفویید به بافت‌های دیگر مهاجرت کنند. دکتر لیگ اوونس (دانشگاه جمیز کوک، استرالیا) اظهار داشته است که اسفروییدها می‌توانند در بافت تحت اپیدرمی تجمع یابند و در خلال پوست‌اندازی دفع شوند.

1- spontaneously

آسیب‌شناسی

به نظر می‌رسد که اسفروییدها در اندام لنفویید و بافت همبند میگوهای پنئید در اثر بیگانه‌خواری مواد خارجی مختلف و سلول‌های مرده توسط هموسیت‌ها ایجاد می‌شوند. آن‌ها بخشی از پاسخ دفاعی عمومی میگوها هستند و حضور آن‌ها را نمی‌توان برای استنتاج حضور عامل بیماری‌زای خاص مورداستفاده قرار داد، مگر اینکه در مورد محتویات فاگوزوم‌ها بررسی و آزمایش صورت گیرد. گاهی اوقات ممکن است نیاز باشد که بررسی دقیق توسط میکروسکوپ الکترونی یا آزمایش‌هایی با کاوشگرهای تشخیصی مولکولی صورت گیرد.

عارضه دستگاه گوارش و عصبی[1]

سبب‌شناسی عارضه دستگاه گوارش و عصبی با عفونت‌های رئو ویروسی در پنئوس ژاپنیکوس به‌صورت اتفاقی ارتباط دارد.

آسیب‌شناسی

عارضه دستگاه گوارش و عصبی، هیپرتروفی غالب در غشای پایه مخاطی ناحیه قدامی‌روده میانی، آتروفی اندام کبدی لوزالمعدی (هپاتوپانکراس) و هیپرپلازی اپی‌نوریوم[2] طناب عصبی شکمی و شکل‌گیری لایه‌های چندگانه در آن است.

1- Gut and nerve syndrome
2 - epineurium

منابع

۱- ابراهیمی، ا.؛ ستاری، م.؛ حیدرنژاد، م.س.؛ بانی، ع.؛ کاشفی، پ.؛ (۱۳۸۹). بررسی یادگیری زمان – مکان و تغییرات فعالیت حرکتی بر اساس دسترسی به غذا در فیل ماهی جوان (*Huso huso*) در شب و روز، شانزدهمین کنفرانس سراسری و چهارمین کنفرانس بین‌المللی زیست‌شناسی ایران، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران، ص ۲۰۴۶.

۲- اسدی، ه.؛ ستاری، م.؛ ایگدری، س. (۱۳۹۳). بررسی عوامل تعیین‌کننده در انتخاب پذیری و ترجیح زیستگاه سیاه ماهی، مجله علمی شیلات ایران، شماره: ۲۳، جلد: ۳، صص ۱۰-۱.

۳- اکبر زاده، آ.؛ خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ موسوی، س.ع.، جوادی، س.ا.؛ آذرخش، م.؛ شامخی، ر.؛ طالشیان، ح.؛ (۱۳۹۰). مقایسه ویژگی‌های ریخت‌شناسی و برخی خصوصیات ریخت‌شناسی قزل‌آلای خال قرمز رودخانه‌های چسلی و خرما در استان گیلان، مجله علوم و فنون دریایی خرمشهر، ش.۴، صص ۴۶-۳۴.

۴- بازاری مقدم، س.؛ ستاری، م.؛ معصومیان، م.؛ شناور ماسوله، ع.؛ معصوم زاده، م.؛ جلیل پور، ج.؛ (۱۳۸۱). بررسی انگلی دستگاه گوارش مولدین قره برون و ازون برون در مجتمع تکثیر و پرورش شهید دکتر بهشتی، دومین همایش ملی – منطقه‌ای ماهیان خاویاری، رشت، ایران، صص ۲۱۳-۲۱۲.

۵- بازاری مقدم، س.؛ ستاری، م.؛ معصومیان، م.؛ شناور ماسوله، ع.؛ معصوم زاده، م.؛ جلیل پور، ج.؛ (۱۳۸۱). بررسی انگلی دستگاه گوارش مولدین تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) تکثیرشده در مجتمع تکثیر و پرورش شهید دکتر بهشتی، دومین همایش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، تهران، ایران، ص ۳۹.

۶- باقرزاده لاکانی، فروزان، مسعود ستاری، رضوان‌الله کاظمی، محمدعلی یزدانی ساداتی، پوردهقانی، عشوری (۱۳۹۴). اثرات هیپوکسی، نورموکسی و هیپراکسی بر فاکتورهای هماتولوژی و پارامترهای بیوشیمیایی خون در دو گروه وزنی از فیل ماهی (*Huso huso*). نشریه اقیانوس‌شناسی، سال ۶، شماره ۲۲، صص ۶۸-۵۹.

۷- باقرزاده لاکانی، فروزان، مسعود ستاری، عیسی شریف پور، رضوان‌الله کاظمی، علی حلاجیان (۱۳۹۵). اثرات سطوح مختلف اکسیژن بر بافت طحال در دو گروه وزنی فیل ماهی (*Huso huso*). مجله توسعه آبزی‌پروری، جلد ۱۰، شماره ۲، صص ۳۰-۲۱.

۸- باقرزاده لاکانی، ف.؛ ستاری، م.؛ یزدانی، م.؛ کاظمی، ر.؛ جعفر زاده، ا.؛ (۱۳۹۱). اثرات سطوح مختلف اکسیژن بر رشد و ترکیب عضله در دو گروه وزنی فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی، مجله علوم و فنون دریایی خرمشهر، ش. ۱۱ (۴)، صص ۲۴-۱۳.

۹- بیسـواس، اس. پی. (۱۳۷۸). مبانی زیست‌شناسی ماهی (ترجمه افشین عادلی)، نشر علوم کشاورزی، ص ۱۶۴.

۱۰- جلیل پور، ج.؛ بازاری مقدم، س.؛ سـتاری، م.؛ شـناور ماسـوله، ع.؛ فدایی، ب.؛ (۱۳۸۱). بررسـی ارتباط آماری شـیوع و شـدت آلودگی‌های انگلی بر رشد و بازماندگی بچه ماهیان خاویاری در اسـتخرهای خاکی، دومین همایش ملی – منطقه‌ای ماهیان خاویاری، رشت، ایران، صص ۱۸۸-۱۸۷.

۱۱- حاجی وند، ص.؛ ستاری، م.؛ سجادی، م.م.؛ عبدالملکی، ش. (۱۳۹۵). ساختار سنی، رشد و ضـریب مرگ‌ومیر کفال طلایی Liza *aurata* (Risso, 1810) در سـواحل جنوب غرب دریای خزر (اسـتان گیلان). مجله پژوهش‌های کاربردی ماهی‌شناسی، ش.۴، صص ۴۱-۵۴ .

۱۲- حقیقی، ا.؛ سـتاری، م.؛ درافشـان، س.؛ کیوانی، ی.؛ خوش‌خلق، م.ر.؛ موسـوی ثابت، ح.؛ (۱۳۹۱). ریخت سـنجی مقایسـه‌ای ماهی خیاطه (Cyprinidae: *Alburnoides eichwaldii*) رودخانه‌های کرگان رود و چالوس با اسـتفاده از سـیستم شبکه‌ای تراس، مجله‌ی پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ش.۱، س.۱، صص ۵۲-۴۱.

۱۳- حقیقی، ا؛ سـتاری، م؛ درافشـان، س.؛ کیوانی، ی.؛ (۱۳۹۴). نوع ریختی میان جمعیتی ماهی خیاطه در رودخانه‌های کرگان رود و لمیر، مجله علمی پژوهشـی زیسـت‌شـناسی جانوری تجربی، شماره: ۳ جلد: ۱۲؛ صص ۴۶-۳۷.

۱۴- حقیقی، ا؛ سـتاری، م؛ درافشـان، س.؛ کیوانی، ی.؛ خوش‌خلق، م.ر.؛ موسـوی، س.ح.؛ (۱۳۹۳). ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه (Cyprinidae: *Alburnoides eichwaldii*) در رودخانه‌های کرگانرود و چالوس؛ مجله تاکسـونومی و بیوسـیسـتماتیک ؛ ش.۱۹ س.۶ صص۱۴-۱.

۱۵- خـاتمی نژاد، س.س.؛ موسـوی ثـابـت؛ ح.؛ سـتاری، م.؛ وطن دوسـت, ص.؛ (۱۳۹۲). خصـوصـیات مورفومتریک و مریستیک ماهی کولی ایرانی (Cyprinidae: *Alburnus hohenackeri*) در رودخانه مهابادچای ارومیه، اولین کنفرانس ماهی شـناسـی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، صص ۹۲-۸۷.

۱۶- خاتمی نژاد، س.س.؛ موسـوی ثابت؛ ح.؛ سـتاری، م.؛ وطن دوست, ص.؛ (۱۳۹۴). مطالعه مقـایسـه‌ای ویژگی‌هـای ریخـت شـناختی ۵ گونـه از مـاهیان جنس مروارید ماهی (Cyprinidae: *Alburnus)*در آب‌های داخلی ایران با اسـتفاده از سـیسـتم شبکه‌ای تراس، مجله محیط‌زیست جانوری شماره: ۷ ؛ جلد: ۱؛ صص ۲۲۵-۲۳۶.

۱۷- خارا، ح.؛ ستاری، م.؛ نظامی، ش.؛ میرهاشمی نسب، س. ف.؛ باقرزاده، س. د.؛ یوسفی، م.؛ (۱۳۸۴). بررسی میزان شیوع و شدت آلودگی‌های انگلی لای ماهی (*Tinca tinca*, L) تالاب امیرکلایه لاهیجان. مجله زیست‌شناسی ایران. ج. ۱۸. ش ۳. صص ۱۸۰-۱۸۸.

۱۸- خارا، ح.؛ ستاری، م.؛. نظامی، ش.؛ موسوی، س.ع.؛ جعفرزاده، ا.؛ آژنگ، ب.؛ (۱۳۸۳). بررسی میزان شیوع و شدت آلودگی‌های انگلی اردک‌ماهی تالاب امیرکلایه لاهیجان، مجله دانشکده دامپزشکی، ش.۴، د.۵۹، صص ۳۳۹-۳۳۳.

۱۹- خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ موسوی، س. ع.؛ کوثری، آ.؛ دانشور، س.؛ علی نیا، م. ر.؛ (۱۳۸۶). بررسی میزان شیوع و شدت آلودگی‌های انگلی اردک‌ماهی رودخانه چمخاله لنگرود. مجله علمی شیلات ایران. س ۱۶. ش ۲. صص ۳۷-۵۰.

۲۰- خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ موسوی، س. ع.؛ موسی پور، م؛ حاجی پور، ع.؛ (۱۳۸۴). بررسی میزان شیوع و شدت آلودگی‌های انگلی ماهی سوف حاجی طرخان (*Perca fluviatilis* L. 1758) در تالاب امیرکلایه لاهیجان. مجله پژوهش و سازندگی. ش ۶۷. صص ۹۲-۱۰۱.

۲۱- خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ میرهاشمی نسب، س. ف.؛ موسوی، س. ع.؛ (۱۳۸۴). بررسی آلودگی ماهیان تالاب امیرکلایه لاهیجان به انگل دیپلوستوموم اسپاتاسئوم. مجله علمی شیلات ایران. س ۱۴. ش ۴. صص ۴۹-۶۶.

۲۲- خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ میرهاشمی نسب، س. ف.؛ موسوی، س. ع.؛ (۱۳۸۴). بررسی آلودگی‌های انگلی ماهی اسبله (*Silurus glanis*) تالاب امیرکلایه لاهیجان، نخستین همایش ملی شیلات و توسعه پایدار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر، ص ۱۷۸.

۲۳- خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ میرهاشمی نسب، س. ف.؛ موسوی، س. ع.؛ (۱۳۸۵). بررسی انگل‌های گوارشی ماهیان تالاب بوجاق کیاشهر. مجله علمی شیلات ایران. س ۱۵. ش ۲. صص ۱۸-۹.

۲۴- خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ میرهاشمی نسب، س. ف.؛ موسوی، س. ع.؛ (۱۳۸۶). بررسی آلودگی ماهیان اقتصادی تالاب بوجاق کیاشهر به انگل *Diplostomum spathaceum*، مجله انجمن زیست‌شناسی ایران، ج. ۲۰، ش.۴، صص ۱۸-۹.

۲۵- خارا، ح.؛ نظامی، ش.؛ ستاری، م.؛ یوسفی، ر.؛ ابراهیم سعیدی، س.؛ گودرزی، ل.؛ (۱۳۸۳). بررسی انگل‌های گوارشی ماهیان خاویاری صیدشده از سواحل تنکابن (دریای خزر)، اولین همایش علمی پژوهشی علوم شیلاتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران، ص۸۹ .

۲۶- خـارا، ح؛ نظـامی، ش.؛ احمدی، م.ر.؛ ســـتاری، م.؛ دقیق روحی، ج.؛ احمدنژاد، م.؛ بالالان فرد، ز.، فیض، س.؛ جعفرزاده، ع.؛ طاهرخانی، آ.؛ پورمحمدی، ر.؛ مهدوی نیا، ح.؛ (۱۳۹۰). آلودگی مـاهیـان تـالاب ســـرخـانکـل انزلی بـه انگـل دیپلوســـتوموم اســـپاتاســـه اوم (*Diplostomum spathaceum* Rudolphi,1891)؛ مجلـه علوم زیســـتی واحـد لاهیجان؛ ش.۱؛ صص ۲۰-۷.

۲۷- دقیق روحی، ج.؛ ســتاری، م.؛ (۱۳۸۳). بررسی آلودگی‌های انگلی چهار گونه از گاوماهیان دریای خزر در آب‌های ســـاحلی اســـتان گیلان. دومین همایش بهداشـــت و بیماری‌های آبزیان، تهران، ایران، ص ۵۲.

۲۸- دقیق روحی، ج.؛ ستاری، م.؛ (۱۳۸۳). بررسی شیوع آلودگی بعضی از گاوماهیان صیدشده از ســواحل جنوب غربی دریای خزر. مجله دانشــکده دامپزشــکی دانشــگاه تهران. د. ۵۹ . ش. ۱ ؛ صص۲۲-۱۷.

۲۹- دقیق روحی، ج.؛ ســتاری، م.؛ (۱۳۸۸). بررســی انگل‌های کرمی دستگاه گوارش گاوماهی عمق زی (*Neogobius bathybius*) در سواحل جنوب غربی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. س. ۱۸ ش. ۴ صص ۱۶۵-۱۷۲.

۳۰- دل افکار، خ.؛ ســـتاری. م.؛ خارا، ح.؛ فلاحتکار، ب.؛ (۱۳۹۲). تأثیر اســـانس گل میخک و کتامین بر بیهوشـــی بچه ماهی اســـترلیاد (*Acipenser ruthenus*)، دومین کنفرانس ملی ماهی‌شناسی ایران، تهران، ص۹۱.

۳۱- دهقان نواز، متین، مســعود ســتاری، زهره رمضــانپور (۱۳۹۴) . تغییرات آســپارتات آمینو ترانســفراز و لاکتات دهیدروژناز تحت تأثیر سمیت جلبک *Nodularia spumigena* در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius* مجله توســعه آبزی‌پروری، جلد ۹ شماره ۴، صص ۴۲-۳۱.

۳۲- ذاکر، فاطمه، جاوید ایمانپور نمین، مســـعود ســـتاری، مهوش هادوی (۱۳۹۴). فعالیت لایزوزیم ســـرم خون و موکوس پوســـت ماهی ســـفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) در اکوســیســتم آب لب‌شــور و آب شیرین. مجله توسعه آبزی‌پروری، جلد ۹، شماره ۳، صص ۳۹-۳۱.

۳۳- رهبر، م؛ ســـتاری، م. ؛ موســـوی ثابت، ح.؛ ایگدری، س.؛ منصـــوری چرهی، م. (۱۳۹۴). بررسی انتوژنی و رشد ماهی کوریدوراس برنزی (*Corydoras aeneus*) در طی مراحل اولیه زندگی. مجله توسعه آبزی‌پروری، ج. ۹ ش. ۲ صص ۹-۱.

۳۴- زهرایی صالحی، ت.؛ ستاری، م.؛ (۱۳۷۵). اولین گزارش جداسازی ادواردزیلا تاردا از ماهی اسکار در ایران؛ پژوهش و سازندگی؛ س. ۹، ج. ۴، صص ۹۵-۹۴.

۳۵- ستاری، م.، (۱۳۸۱)، ماهی‌شناسی ۱ (تشریح و فیزیولوژی)، انتشارات نقش مهر، گیلان.
۳۶- ستاری، م.، (۱۳۸۳)، ماهی‌شناسی ۲ (سیستماتیک)، نشر حق شناس، ص ۵۰۲.
۳۷- ستاری، م.؛ شفیعی، ش.؛ (۱۳۷۵). بررسی دیپلوستومیازیس در بین ماهیان تالاب انزلی؛ پژوهش و سازندگی؛ س. ۹، ج. ۲، صص ۱۰۵-۱۰۳.
۳۸- ستاری، م.؛ شفیعی، ش.؛ شرافتی، آ.؛ (۱۳۸۰). بررسی شیوع آلودگی به سستودهای جنس کاریوفیله اوس در بعضی از ماهیان تالاب انزلی، اولین همایش ملی ماهیان استخوانی دریای خزر، بندر انزلی، ایران، ص ۶۷.
۳۹- ستاری، م.؛ روستایی علی مهر، م.؛ شفیعی، ش.؛ (۱۳۸۰). بررسی شیوع آلودگی به نماتود رافیدآسکاریس در بعضی از ماهیان تالاب انزلی، پژوهش و سازندگی؛ ج. ۱۴، ش.۳، صص ۸۳-۷۹.
۴۰- ستاری، م.؛ شفیعی، ش.؛ (۱۳۷۵). اولین گزارش آلودگی لای ماهی ایران به انگل ترماتود آسیمفیلودورا، ماهنامه آبزیان، ش. ۶۴، ص ۲۳.
۴۱- ستاری، م.؛ شفیعی، ش.؛ دقیق روحی، ج.؛ عبداله پور بی‌ریا، ح.؛ بخست، ن.؛ (۱۳۸۱). بررسی شیوع آلودگی به نوزاد نماتود اوسترونژیلیدس در بعضی از ماهیان استخوانی دریای خزر و حوضه آبریز آن؛ مجله دانشکده دامپزشکی، ش.۱، د.۵۷، صص ۴۱-۳۷.
۴۲- ستاری، م.؛ فرامرزی، ن.؛ (۱۳۷۵). اولین گزارش آلودگی به تک‌یاخته هنگویا در اردک‌ماهی ایران، ماهنامه آبزیان، ش. ۶۴، ص ۲۳.
۴۳- ستاری، م.؛ فرامرزی، ن.؛ (۱۳۷۵). بررسی میزان آلودگی برخی از ماهیان تالاب انزلی به انگل‌های جنس کاریوفیله اوس؛ مجله علمی شیلات ایران، ش. ۴، س. ۵، صص ۷۲-۶۳.
۴۴- ستاری، م.؛ فرامرزی، ن.؛ شفیعی، ش.؛ (۱۳۷۵). معرفی بعضی از آلودگی‌های انگلی اردک‌ماهی تالاب انزلی؛ پژوهش و سازندگی؛ س. ۹، ج. ۱، صص ۱۷۴-۱۷۵.
۴۵- ستاری، م.؛ مخیر، ب.؛ اسلامی، ع.؛ بکایی، س.؛ (۱۳۷۹). بررسی شیوع انگل‌های کرمی داخلی ماهی قره برون صیدشده از سواحل جنوب غربی دریای خزر؛ مجله دانشکده دامپزشکی، ش.۳، د.۵۵، صص ۲۴-۱۹.
۴۶- ستاری، م.؛ مخیر، ب.؛ میرهاشمی نسب، م.ف.؛ (۱۳۷۹). بررسی شیوع انگل‌های کرمی گوارشی ازون برون *(Acipenser stellatus)* صیدشده از سواحل جنوب غربی دریای خزر؛ پژوهش و سازندگی؛ س. ۹، ج. ۱۳، ش.۴، صص ۱۰۱-۹۲.
۴۷- ستاری، م.؛ مخیر، ب.؛ میرهاشمی نسب، م.ف.؛ (۱۳۸۱). بررسی شیوع آلودگی‌های کرمی گوارشی چالباش، شیپ و فیل ماهی صیدشده از سواحل جنوب غربی دریای خزر؛ دومین همایش ملی منطقه‌ای ماهیان خاویاری؛ رشت؛ ایران؛ ص۶۶ .

۴۸- ستاری، م.؛ (۱۳۷۸). بررسی شیوع آلودگی‌های انگلی داخلی ماهیان خاویاری صیدشده از سواحل جنوب غربی دریای خزر، پایان‌نامه دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ص ۲۸۰.

۴۹- شناور ماسوله، ع. ر.؛ معصومیان، م.؛ ستاری، م.؛ بازاری مقدم، س.؛ جلیل پور، ج.؛ شفیعی، ش.؛ نوشی ماسوله، ن.؛ نوشالی، م.؛ معصوم زاده، م.؛ (۱۳۸۱). بررسی آلودگی‌های انگلی بچه ماهیان خاویاری در استخرهای خاکی، دومین همایش ملی منطقه‌ای ماهیان خاویاری؛ رشت؛ ایران؛ ص۷۶.

۵۰- شناور ماسوله، ع. ر.؛معصومیان، م.؛ ستاری، م.؛ بازاری مقدم، س.؛ جلیل پور، ج.؛ شفیعی، ش.؛ نوشی ماسوله، ن.؛ نوشالی، م.؛ معصوم زاده، م.؛ (۱۳۸۵). بررسی شیوع و شدت سه نوع انگل بچه ماهیان خاویاری در استخرهای خاکی، مجله علمی شیلات ایران. س ۱۵. ش ۲. صص ۶۲-۵۵.

۵۱- صباغی، آ، سلیمانی، م. (۱۳۹۵)، مروری برتکنیک‌های توالی یابی DNA (نسل اول، نسل دوم و نسل سوم). مجله علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی، صص۶۰-۴۸.

۵۲- عبداله پور بی ریا، ح.؛ بخست، ن.؛ ستاری، م.؛ (۱۳۸۳). بررسی میزان شیوع و شدت آلودگی انگلی ماهی سوف حاجی طرخان تالاب انزلی، اولین همایش علمی پژوهشی علوم شیلاتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران، ص۹۱.

۵۳- عزیزی، ف؛ خوش‌خلق، م.ر.؛ رحمانی، ح.؛ ستاری، م.؛ (۱۳۹۰). بررسی اثر سد بر تنوع و تمایز ریخت سنجی ماهی خیاطه در رودخانه تجن ساری؛ اولین همایش ملی علوم آبزیان؛ دانشگاه آزاد اسلامی بوشهر؛ صص ۱۸-۱.

۵۴- عزیزی، ف؛ خوش‌خلق، م.ر.؛ رحمانی، ح.؛ ستاری، م.؛ انوری فر، ح. (۱۳۹۴). بررسی اثر سد شهید رجایی بر تنوع و تمایز ریخت سنجی و شمارشی ماهی خیاطه در رودخانه تجن ساری، فصلنامه علمی پژوهشی محیطزیست جانوری، شماره: ۱، جلد: ۷، صص ۲۹-۳۹.

۵۵- عزیزی، ف؛ خوش‌خلق، م.ر.؛ رحمانی، ح.؛ ستاری، م.؛ انوری فر، ح. (۱۳۹۴)پویائی جمعیت ماهی خیاطه*(Alburnoides bipunctatus)* در بالادست و پایین دست سد شهید رجائی رودخانه تجن ساری فصلنامه علمی پژوهشی محیطزیست جانوری، شماره: ۴، جلد: ۶، صص ۱۲۱-۱۳۴.

۵۶- کیوان شکوه، س.، درافشان، س.، (۱۳۸۹)، زیست‌فناوری و ژنتیک در شیلات و آبزی‌پروری(ترجمه)، انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان. ص ۲۰۲.

۵۷- مسلمی اقدم، م.؛ ایمانپور نمین، ج.؛ ستاری، م.؛ عبدالملکی، ش.؛ بانی، ع.؛ (۱۳۹۲). رابطهٔ طول-وزن و فاکتور وضـــعیت اردک‌ماهی (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) تالاب انزلی (جنوب غربی دریـای خزر)، کنفرانس انجمن علوم و فنون دریایی ایران، تهران، ص ۱۳۱.

۵۸- مســـلمی اقـدم، م.؛ ایمانپور نمین، ج.؛ ســـتاری، م.؛ عبدالملکی، ش.؛ بانی، ع.؛ (۱۳۹۲). شـاخص وزنی گناد و کبد در جنس نر و ماده اردک‌ماهی (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) تـالاب انزلی (جنوب غربی دریای خزر)، انجمن علوم و فنون دریایی ایران، تهران، ص۱۳۲ .

۵۹- مسلمی اقدم، م.؛ ایمانپور نمین، ج.؛ ستاری، م.؛ عبدالملکی، ش.؛ بانی، ع.؛ (۱۳۹۲). برخی خصـــوصـــیات تغذیه‌ای اردک‌ماهی (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) تالاب انزلی (جنوب غربی دریای خزر)، اولین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار، صص ۸ -۱.

۶۰- مصلحی، ف؛ ستاری، م.؛ خوش‌خلق، م.ر.؛ شناور ماسوله، ع.ر.؛ عباسعلی زاده، ع.ر. (۱۳۹۳) اثر پروبیوتیـک پدیوکوکوس پنتوســـاســـئوس بر فاکتورهای رشـــد و ایمنی تاس ماهی ســـیبری(*Acipenser baerii*)، مجلـه علوم و فنون شـــیلات، شـــمـاره: ۳، جلـد: ۴، صص۸۱-۹۲.

۶۱- معصوم زاده، م.؛ معصومیان، م.؛ ستاری، م.؛ شناور ماسوله، ع.؛ جلیل پور، ج.؛ بازاری مقدم، س.؛ (۱۳۸۵). بررســـی شـــیوع انگـل‌هـای داخلی مولـدین قره برون (*Acipenser persicus*) صیدشده از سواحل جنوب غربی دریای خزر (۱۳۸۰-۱۳۸۲)، مجله علمی شیلات ایران. س ۱۵. ش ۴. صص ۱۳۴-۱۲۹.

۶۲- نوری زاد، سـولماز، مسـعود سـتاری (۱۳۹۳). تأثیر سطوح چربی جیره بر عملکرد رشد و ترکیب شـیمیایی لاشه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)* . مجله تغذیه و بیوشیمی آبزیان، جلد ۲ شماره ۱ صص ۴۴-۳۵.

۶۳- وثاقی، محمدجواد، علی‌اصـغر خانی پور، مسعود ستاری، محمد فروهر واجارگاه (۱۳۹۵). بررسی خصوصیات مورفومتریک ومریستیک ماهی گِل چراغ *Garra rufa* در رودخانه دینور استان کرمانشاه، مجله علمی پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی، سال پنجم، شماره دوم، پیاپی هجدهم، صص ۹۶-۸۷.

۶۴- هاشـمی مفرد، س. م.؛ سـتاری، م.؛ خوش‌خلق، م.ج.؛ شـناور ماسوله، ع.؛ (۱۳۹۵). مطالعه تأثیر باکتری ویســـلا ســـیبریا بر فاکتورهای رشـــد و تعداد باکتری‌ها در ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*). مجله علمی شیلات ایران، ج. ۲۵، ش. ۲، صص ۲۸-۱۷.

65. Ahmadnezhad, M., Oryan, Sh., Sahafi, H.H., Khara, H., Sattari, M., (2012). Effects of LHRH-A2 and chlorpromazine (dopamine antagonists) on induced spawning of Caspian Kutum, *Rutilus frisii kutum*, from the southwest of the Caspian Sea, Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol.10, No.1, pp. 33-42.
66. Alizadeh Rudposhti, M., Sattari, M., Shenavar Masouleh, A., Khara, H., Jalilpour, J., Masoumzadeh, M., Bazari Moghadam, S., (2010). Identification of bacterial flora of Persian sturgeon intestine in earthern ponds of Shahid Beheshti hatchery in Guilan province, 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran, p.119.
67. Alizadeh Rudposhti, M., Sattari, M., Shenavar Masouleh, A., Khara, H., Jalilpour, J., Masoumzadeh, M., Bazari Moghadam, S., (2010). Comparative study on bacterial flora of intestine in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings reared in fiberglass tanks and earthen Ponds. Iranian Journal of Fisheries Sciences (In Press).
68. Anvari Far, H., Mousavi Sabet, H., Sattari, M., Vatandoust, S., Khiabani, A.R., Anvari Far, H., (2014). Occurrence and intensity of Tracheliastes polycolpus on *Capoeta capoeta gracilis* (Pisces: Cyprinidae) in Tajan River from the Southeast of the Caspian Sea, European Journal of Zoological Research 3: 103-107.
69. Asadi, H., M., Sattari, M., Eagderi, S., (2016). Habitat suitability index of *Barbus cyri* (Heckel, 1843) in Tootkabon River, the South Caspian Sea basin, Iran. Caspian J. Environ. Sci., Vol. 14 No.1 pp. 33~42.
70. Asadi H., Sattari M., Motalebi Moghanjoghi Y., Zamani Faradonbeh M., (2017). Length-weight relationship and condition factor of seven fish species from Shahrbijar River, Southern Caspian Sea basin, Iran, Iranian Journal of Fisheries Sciences, 16: 733-741.
71. Avise, J.C., (1994) Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Chapman and Hall, New York, NY. 511 pp.
72. Bagherzadeh Lakani, F., Sattari, M., Yazdani, M., Kazami, R., (2010). Effect of hyperoxia, hypoxia and normoxia on growth of Great sturgeon (*Huso huso*), 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran, p. 123.
73. Bagherzadeh Lakani, F., Sattari, M., Yazdani, M., Kazami, R., (2010). Cortisol and glucose changes in juvenile Great sturgeon (*Huso huso*) cultured in hyperoxia, hypoxia and normoxia

conditions, 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran, p. 123.

74. Bagherzadeh Lakani, F., Sattari, M., Falahatkar, B., (2013). Effect of different oxygen levels on growth performance, stress response and oxygen consumption in two weight groups of Great sturgeon, *Huso huso*, Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(3), 533-549
75. Bagherzadeh Lakani, F., Sattari, M., Sharifpour, E., Kazami, R., (2013). Effect of Hypoxia, Normoxia and Hyperoxia conditions on gill histopathology in two weight groups of Great Sturgeon (Huso huso), Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol.11, No.1, pp.77-84.
76. Beaumont, A, Boudry, P, Hoare, K., (2012). Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Wiley Blackwell, 202p.
77. Billington, N., (1993). Genetic variation in lake Erie yellow perch (*Perca flavescens*) demonstrated by mitochondrial DNA analysis. *Journal of Fish Biology* 43, 941-943.
78. 78- Billington, N. & Hebert, D. N., (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48 (Suppllement 1), 80–94.
79. Bonami J.R., Trumper B., Mari J., Brehelin M. & Lightner D.V., (2005). Purification and characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol*., 71, 2657–2664.
80. Brown K.H., (2008). Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. *Journal of Fish Biology* 72, 355–374.
81. Bykhovskaya-Pavlovskaya, I.E., Gusev, A.V., Dubinina, M.N., Izyumova, N.A., Smirnova, T. S., Sokolovskaya, A. L., Schtein, G.A., Shulman, S.S. and Epshtein, V. M., (1962). Key to parasites of freshwater fishes of the USSR. Academy of Science of the USSR, Zoological Institute, USSR. 919 p.
82. Castro, P. and M.E. Huber, (2010). Marine biology. 8th ed. Mc Graw Hill Companies, 461 p.
83. Daghigh Roohi, J., Sattari, M., Asgharnia, M., Roofchaei, R., (2014). Occurrence and intensity of parasites in European catfish, Silurus glanis , 1785. from Anzali wetland, southwest of the Caspian Sea, Iran, RIBARSTVO- Croatian Journal of Fisheries, 72, online first.

84. Daghigh Roohi, J., Sattari, M., Asgharnia, M., Roofchaei, R., (2014). Occurrence and intensity of parasites in Prussian carp, Carassius gibelio from Anzali wetland, southwest of the Caspian Sea, Iranian Journal of Fisheries Sciences, 13 (2), 276-288.
85. Daghigh Roohi, J. Pazooki, J., Sattari, M., (2015). The first record of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) in Chub, *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Teleostei) from Gamasiab River, Hamedan, Iran. Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol. 13, No. 2, pp. 173-178.
86. Daghigh Roohi, J., Sattari, M., Mirhasheminasab, F., (2015). Occurrence and intensity of parasites in common carp, *Cyprinus carpio* from Anzali Wetland, southwest of the Caspian Sea, Iran. Journal of Persian Gulf, 21: 25-32.
87. Davis, R.E., Morrell,.1. and Pfaff, D.W., (1977). *Genetic and Comparative Endocrinology*, 33: 496-505.
88. Ebdon, L. 1982, An Introduction to Atomic Adsorption Spectroscopy. Heyden press, 78p.
89. Ebrahimi, E., Heydarnezhad, M.S., Sattari, M., Bani, A., Kashefi, P., (2012). A test of time plac learning in single and grouped great sturgeon, Acta ethologica, DOI=10.1007/s 10211-012-0139-8
90. Eslami, V., Sattari, M., Imanpour Namin, J., S.D., (2014)., Concentration of heavy metals (Pb, Cd) in muscle and liver of *Perca fluviatilis* and *Tinca tinca* in Anzali Wetland, southwest of the Caspian Sea, International Journal of Aquatic Biology 2(6): 319-324
91. Ferguson, H.W.,(1989). In *Systemic Pathology of Fish* (ed. H.W. Ferguson), pp. 41-42. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
92. Garcia, M.N. and Johnson, H.A. (1972). *Cell Tissue Kinetics*, 5: 331-339.
93. Grunwald, C., Stabile, J., Waldman, J. R., Gross, R. & Wirgin, I., (2002). Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology* 11: 1885–1898.
94. Hoelzel, A.R., (1993). Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. Current Biology, 3: 891-895.
95. Hoole, D, Bucke, D, Burgess, P & Wellby, I 2001, Diseases of carp and other cyprinid fishes. Blackwell Science Publication, 264p.

96. Hoseini, A., Forouhar Vajargah, M, Sattari, M., (2016). The Effect of Preservation in Alcohol on The Morphological Characters of The Zagros Tooth-Carp, *Aphanius vladykovi* Coad, 1988. Journal of Environmental Treatment Techniques, 4: 118-120
97. Houston, AH., (1980), Carbonic anhydrase (acetazolamide-sensitive esterase) activity in the blood, gill and kidney of the thermally acclimated rainbow trout, Salmo gairdneri. J. Exp. Biol. 73: 15–27.
98. Jafari, F., Ramezanpour, Z., Sattari, M., (2015). First record of *Ebria tripartita* (Schumann) Lemmermann, 1899 from south of the Caspian Sea. Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol. 13, No. 3, pp. 195-208
99. Khara, H., Sattari, M., Nezami, S., Mirhasheminasab, S.F, Mousavi, S.A., (2005). Parasites of some bonyfishes in Amirkelayeh wetland from the southwest of the Caspian Sea, 12th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shelfish, Copenhagen, Denmark.
100. Khara, H., Sattari, M., Nezami, S., Shafiei, S., Mousavi, A., and Javadi, A., (2005). First report of *Cystidicoloides ephemeridarum* (Linstow, 1872) in brown trout, Salmo trutta fario, L. 1785 from Chesli River (Masal, Iran), 13th Iranian Biology Conference, Guilan University, Rasht, Iran, p. 153.
101. Khara, H., Nezami, S., Sattari, M., Mirhasheminasab, S.F., Yarmohammadi, M., (2005). A survey on parasitic infection of Roach (*Rutilus rutilus caspius*) in Amirkelayeh wetland, Lahijan, Iran, 13th Iranian Biology Conference, Guilan University, Rasht, Iran, p. 160.
102. Khara,H, Sattari,M., Nezami,S., (2007). Parasites of some minnows (Cypriniformes: Cyprinidae) from the southwest of the Caspian Sea, 13th international Conference of EAFP, Italy, p. 181
103. Khara, H., Sattari, M., Nezami, S., Saeidi, A.A., Mohammadi, Z., Abdoulahi, N., Ahmadnezhad, M., (2008). Parasites of migratory Kutum (*Rutilus frisii kutum* Kamenski, 1901) brood stocks to the Shirood River (Mazandaran Province, Iran), The 7th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Taipei, Taiwan, p. 94
104. Khara, H., Nezami, S., Sattari, M., Yousefi, R., Saeedi, S. E., and L. Goodarzi, (2009). Parasitic worms of some sturgeons (Acipenseriformes: Acipenseridae) from the southern coast of the

Caspian Sea, 14th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Prague, Czech Republic, p. 220.

105. Khara, H., Sattari, M., Nezami, S., Mirhasheminasab, S.F., Mousavi, S.A., (2011). Parasites of some bonyfish species in Boojagh wetland from the southwest of the Caspian Sea, Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol. 9, No. 1, pp. 47-53.
106. Khara, H., Alijanpour, N., Fallah Shamsi, S.Z., Sattari, M., Amiri, K., Rahbar, M., Ahmadnezhad, M., (2012). Effects of water temperature and migration time on some of the fecundity indices and fertilization rate in female Kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901 (immigrant to Shiroud River in the southwest of the Caspian Sea (in Iran), Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol.10, No.1, pp. 9-14.
107. Khara, H., Sattari, M., (2014). Occurrence and intensity of parasites in Wels catfish catfish, Silurus glanis L ,.1758 from Amirkelayeh wetland, southwest of the Caspian Sea, Journal of Parasitic Diseases, DOI 10.1007/s 12639-014-0591-7, online first
108. Khataminezhad, S. S., Mousavi Sabet, H., Sattari, M., Vatandoust, S., (2013). First record of *Alburnus atropatenae* (Berg, 1925) (Cyprinidae) in Namak basin ,Central Iran, RIBARSTVO-Croatian Journal of Fisheries, 71,77-79.
109. Khataminezhad, S. S., Mousavi Sabet, H., Sattari, M., Vatandoust, S., Eagderi, S., (2013). A comparative study on body shape of the genus Alburnus (Rafinesque, 1820) in Iran, using geometric morphometric analysis, Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol.11, No.2, pp. 205-215.
110. Khataminezhad, S. S., Mousavi Sabet, H., Sattari, M., Vatandoust, S., (2013). Morphometric and Meristic Characteristics Studies of Kuli-ye Kura (cyprinidae :Alburnus filippii) in the Baleqlu Chai River, northwestern of Iran, Aquaculture Europe 2013, European Aquaculture Society,Trondheim, Norway, 236-240.
111. Kleinow, K.M., Smith, A.A., McElroy, A.E. and Wiles, J.E. (1996). *Marine Environ. Res.* 42, 65-73.
112. Klontz, G.W. and Smith, L.S. (1968). In *Methods in Animal Experimentation*, vol. 3, 3rd ed. (ed. W. Gay), pp. 323-385. Academic Press, London.
113. Lewbart, G.A., Stone, E.A. and Love, N.E. (1995). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 207: 319-321.

114. LIGHTNER, D.V., (1996). The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 15, 579–601.
115. Mansouri Cherehi, M, Mousavi Sabet, H., Sattari, M., Narolahzadeh, A, Hedaiati, M, Age, sex ratio, spawning season and fecundity of *Alburnoides eichwaldii* (Pisces: Cyprinidae) from the southwestern Caspian Sea basin. BIHAREAN BIOLOGIST, 10: 93-97.
116. Mari J., Bonami J.R. & Lightner D.V., (1998). Taura syndrome of Penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, 33, 11–17.
117. Medina, M., Reperant, J., Ward, R., Rio, J.P. and Lemire, M., (1993). *Anatomy and Embryology*, 187: 167-19l.
118. Moslehi, F., Sattari, M., Shenavar Masouleh, A., (2016). Assessment of *Pediococcus pentosaceus* as a probiotics on growth factors and hematological parameters of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)., International Journal of Aquatic Biology, 4(1): 10-15.
119. Moslemi-Aqdam, M., Imanpour Namin, J., Sattari, M. Abdolmaleki, Sh., Bani, A., (2014). Length-length, length-weight relationship, and relative condition factor of pike, Esox lucius Linnaeus 1758, in Anzali wetland, (Southwest of the Caspian Sea), Caspian Journal of Environmental Sciences, Vol.12, No.1, pp. 109-117.
120. Moslemi-Aqdam, M., Imanpour Namin, J., Sattari, M. Abdolmaleki, Sh., Bani, A., (2016). Reproductive characteristics of Northern pike, Esox lucius (Actinopterigii: Esociformes: Esocidae) in the Anzali Wetland, southwest Caspian Sea. Acta Ichthyologica et Piscicatoria, 46:313-323.
121. Mousavi Sabet, H., Sattari, M., (2013). First report of *Neoechinorhynchus rutili* in *Cobitis faridpaki* (Cobitidae), from the southern Caspian Sea BASIN, Ribarstvo Croatian Journal of Fisheries, 97-110, Online first.
122. Miya, M., Satoh, T. R. & Nishida, M., (2005). The phylogenetic position of toadfishes (order Batrachoidiformes) in the higher ray-finned fish as inferred from partitioned Bayesian analysis of 102 whole mitochondrial genome sequences. Biological Journal of the Linnean Society 85, 289–306.

123. Nazari, S., pourkazemi, M., and Rebelo porto, J. I., (2009), Comparative karyotype analysis of two Iranian *cyprinids*, *Alburnoides bipunctatus* and *Alburnus filippii* (*Cypriniformes*, *Cyprinidae*), Iranian Journal of Animal Biosystematics, 5: 23-32.
124. Nei, M., (1978). Genetic distance between population. Am. Naturalist. pp. 283-242.
125. Nelson, J.S., (1994). Fishes of the world. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. 600pp.
126. Nezami, S., Sattari, M., Khara, H., (2005). Parasites of some bonyfishes in Boojagh wetland from the southwest of the Caspian Sea, 12th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Copenhagen, Denmark.
127. Noga, EJ., (2010), Fish disease, diagnosis and treatment, Mosby-Year Book, Inc., 365p.
128. Noei, MR, Sattari, M., Ibrahimov, Sh., (2015). Histopathological effects of parasitic worms in *Acipenser stellatus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. nudiventris* and *Huso huso* (Chondrostei: Acipenseridae) from the southwest shores of the Caspian Sea. International Journal of Aquatic Biology, 2: 313-323
129. Noei, MR, Sattari, M., Ibrahimov, Sh., (2015). Parasitic worms of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897 from the southwestern shores of the Caspian Sea (2015). International Journal of Ichthyology, 2: 283-295
130. Oidtmann B., Bausewein S., Hölzle L., Hoffmann R. & Wittenbrink M., (2002). Identification of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Veterinary Microbiology*, 85: 183–194.
131. Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A. & Hoffmann R.W., (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 72, 53–64.
132. Ostrander, GK., (2000), The laboratory fish, Academic Press, 678p.
133. Post, G., (1987). Fish Health, TFH publications, Inc., 288p.
134. Quilhac, A and Sire, J.Y. *(1999). Anatomy Record*, 254: 435-451.
135. Ramzanpour, Z., Sattari, M., Imanpour Namin, J., Chobian, F., Halajian, A., (2014). Histopathological changes in liver and gill of

Acipenser persicus fry in short term exposure to *Nodularia spumigena.* Caspian Journal of Environmental Sciences, 11(2): 205-215

136. Rao, P.D.P. and Sharma, S.C., (1982). *Journal of Comparative Neurology*, 210: 37-48.
137. Rasooli, S., Sattari, M., Ramezanpour, Z., Imanpour Namin, J., (2015). Antibacterial activities of bioactive compounds extracted from Marine algae *Gracilaria salicornia* against *Aeromonas hydrophila*, International Journal of Aquatic Biology, 3(3): 155-160.
138. Rastorguev, S., Mugue, N., Volkov, A & Barmintsev, V., (2008). Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species. *Journal of Applied Ichthyology* 24 (Suppllement 1), 46–49.
139. Roberts, RJ., (2001). Fish pathology, (3rd Ed.) WB Saunders, 472p.
140. Roberts, R.J., Mac Queen, A, Shearer, W.M. and Young, H. (1973). *Journal of Fish Biology*, 5: 497-503.
141. Safarpour Amlashi, A., Falahatkar, B., Sattari, M., Tolouei Gilani, M.H., (2011). Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga Huso huso L. Journal of Fish and Shellfish Immunology, pp. 1-8.
142. Santos Ruiz, L., Santa Maria, J.A and Becerra, J., (1996). *International Journal of Developmental Biology*, Suppl.1, 183S-184S.
143. Sasani, F., Mokhayer, B., Sattari, M., (1999). Histopathological study of intestinal lesions due to parasites of sturgeons (Chondrostei: Acipenseridae) in southwest of the Caspian Sea, Fourth Sypmosium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA IV), Cebu city, Philippines, p. 69.
144. Sattari, M., (1996). Parasites of some bonyfish species of Anzali Wetland from the southwest of the Caspian Sea [In Persian], Report to the University of Guilan, Iran, pp. 45-50.
145. Sattari, M., (1999). Parasites of sturgeons (Chondrostei: Acipenseridae) from the southwest of the Caspian Sea [In: Persian], Ph.D Dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, The University of Tehran, Iran, 280p.
146. Sattari, M., T. Dick, (2001). Parasites of *Acipenser persicus* (Chondrostei: Acipenseridae) from the southwest of the Caspian

Sea, 4th International Symposium on Sturgeon, Oshkosh, Wisconsin, USA, p. 55

147. Sattari, M., Shafii, S., Daghigh Roohi, J., (2002). Occurrence and intensity of *Eustrongylides excisus* (L.) (Nematoda: Dioctophymidae) from some bonyfish species in the Caspian Sea and its basin [In Persian], Journal of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran, 57, 1:37-41.
148. Sattari, M., Khara, H., Nezami, S., Roohi, J.D., Shafii, S., (2005). Occurrence and intensity of some nematodes in the bonyfish species of the Caspian Sea and its Basin, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 25 (4): 166-178.
149. Sattari, M., Mokhayer, B., (2005). Occurrence and intensity of some Parasitic worms in five sturgeon species (Chondrostei: Acipenseridae) southwest of Caspian Sea, CURRENT SCIENCE, Vol. 89, No. 2, pp. 259-263.
150. Sattari, M., Mokhayer, B., (2005). Occurrence and intensity of some Parasitic worms in *Acipenser gueldenstaedtii, A. nudiventris* and *Huso huso* (Chondrostei: Acipenseridae) from the southwest of the Caspian Sea, Turk. J. Vet. Anim.Sci. (29), pp.1279-1284.
151. Sattari, M., Mokhayer, B., (2006). Parasitic worms of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) from the southwest of the Caspian Sea, Bulletin of European Association of Fish Pathologists, 26: 131-136.
152. Sattari,M., Mokhayer,B., Khara,H.,Roohi, J.D., Nezami,S., (2007). Parasitic worms of some bony fish species from the southern shore of the Caspian Sea, 13th international Conference of EAFP, Italy, p. 184
153. Sattari, M., Mokhayer, B., Khara, H., Nezami,S., Shafii, S., (2007). Occurrence and intensity of Parasites in some bony fish species of Anzali wetland from the southwest of the Caspian Sea, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 27(2): 54-60
154. Sattari, M., Mokhayer, B., Khara,H., Roohi, JD, Nezami,S., (2008). Parasitic worms of some bony fish species from the southern shore of the Caspian Sea, Bull. Eur. Ass. Fish pathol. 28 (1).
155. Sattari, M., Khara, H., Nezami, S., Shafii, S., (2008). Occurrence and intensity of some parasites in *Esox lucius* (Esociformes: Esocidae) from the south west of the Caspian Sea, The 7th

Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Taipei, Taiwan, p. 102.

156. Sattari, M., Khara, H., Nezami, S., Ahmadi, M. R., Rohii, J. D., Balalanfard, Z., Faez, S., Jafarzadeh, A., Taherkhani, A., Pourmohammadi, R., and H. Mahdaviniya, (2009). Parasites of some bony fishe species in Sourkhankol River from the southwest of the Caspian Sea, 14th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Prague, Czech Republic, p. 218
157. Smith, A., Trudeau, V. L., Williams, L.M., Martinoli, M.G. and Priede, I.G., (1996). *Journal of Neuroendocrinology*, 8: 655-658.
158. Stoskopf, M. K. 1993. Fish medicine. WB Saunders Company, Philadelphia, USA. 882 pp.
159. Sumich, J.L., and J.F. Morrissey, (2004). Introduction to the biology of Marine life, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 449 p.
160. Szamier, R.B. & Ripps, H., (1983). *Journal of Comparative Neurology*, 215*:* 51-62.
161. Turan, C., (1999), A note on the examination of morphometric differentiation among fish populations: The truss system, Turkish Journal Of Zoology, 23: 259-263.
162. Turan, C., (2000), Otolith shape and meristic analysis of Herring,*Clupea harengus*, in the northeast Atlantic, Archive Of Fishery And Marine Research, 48: 283–295.
163. Van Eys, G.J.J.M., Lowik, CW.G.M. and Wendelaar Bonga, S.E., (1983). *Genetic and Comparative Endocrinology*, 49: 277-285.
164. Walker P.J., Bonami J.R., Boonsaeng V., Chang P.S., Cowley J.A., Enjuanes L., Flegel T.W., Lightner D.V., Loh P.C., Snijder E.J. & Tang K., (2004). Roniviridae. *In:* Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier/Academic Press, London, UK, 973–977.
165. Wagner, G.N., Stevens, E.D. and Harvey-Clark, C., (1999). Journal of *Aquatic Animal Health.* 11: 373-382.
166. Wildgoose, WH., (2001). BSAVA manual of Ornamental fish (2th Ed.), British Small Animal Veterinary Association (BSAVA), Gloucester, Great Britain, 304p.
167. Wirgin I., Grunwald C., Carlson E., Stabile J., Peterson D. & Waldman J., (2005). Range-wide population structure of shortnose

sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Estuaries* 28, 406-421.

168. Zahraei Salehi, T., Sattari, M., (2005). Isolation of *Edwardsiella tarda* in Oscar fish in Iran, Indian Vet. J., 82: 788-789.