

تکنیک‌های نمونه‌برداری برای مطالعات آسیب‌شناسی در آبزیان

Pathology Sampling in Fish

تالیف:

دکتر عادل حقیقی

متخصص پاتولوژی، استادیار و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی

چاپ اول

سرشناسه : حقیقی خیابانیان اصل، عادل، ۱۳۵۲ -
 عنوان و نام پدیدآور : تکنیک‌های نمونه‌برداری برای مطالعات آسیب‌شناسی در آبزیان =
 Pathology sampling in fish / تألیف عادل حقیقی.
 مشخصات نشر : تهران: نوربخش، ۱۳۹۲.
 مشخصات ظاهری : ۲۱۰ ص: مصور، جدول.
 شابک : 9786007309063
 وضعیت فهرست‌نویسی : فیپا
 یادداشت : کتابنامه.
 موضوع : ماهی‌ها - - آسیب‌شناسی بافت‌ها
 موضوع : ماهی‌ها - - بیماری‌ها - - تشخیص
 موضوع : ماهی‌ها - - بیماری‌ها
 موضوع : میگو - - بیماری‌ها
 رده‌بندی کنگره : ۱۳۹۲ ق ۷ ج ۳۹/ QL۶۳۹
 رده‌بندی دیویی : ۵۷۱/۵۳۳۱۷
 شماره کتابشناسی ملی : ۲۳۳۳۴۴۳



تکنیک‌های نمونه‌برداری برای مطالعات آسیب‌شناسی در آبزیان

تألیف: دکتر عادل حقیقی

ناشر: انتشارات نوربخش

چاپ اول: ۱۳۹۳

شمارگان: ۱۰۰ نسخه

قیمت: ۲۰۰۰۰ تومان

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۷۳۰۹-۰۶-۳

تهران، خیابان انقلاب، ابتدای خیابان وصال شیرازی، بن‌بست قاجار، پلاک ۴، واحد ۲

تلفن: ۶۶۹۷۸۸۳۰، فکس: ۶۶۹۷۸۸۲۹

فهرست مطالب

۱۳		مقدمه
۱۵		فصل ۱ - روش‌های بررسی تغییرات پس از مرگ
۱۵		برداشت و آماده‌سازی نمونه
۱۷		نمونه‌گیری از خون و مرگ با ترحم
۱۸		روش کالبدگشایی
۲۰		انتخاب ماهی برای آزمایش
۲۵		فصل ۲ - آسیب‌شناسی
۲۵		پایدار کردن یا ثبوت بافت‌ها
۲۶		فیکساتیوها
۲۷		فیکساتیو فرمالین
۲۷		برای ساخت فرمالین بافر ۱۰٪
۲۸		فرمول تهیه
۲۸		فیکساتیو بوئن
۲۸		ترکیبات فیکساتیو بوئن
۲۹		فیکساتیو دیویدسون
۲۹		ترکیبات فیکساتیو دیویدسون
۲۹		اسید استیک گلاسیال
۳۰		الکل انیلیک
۳۰		مرکوری کلراید
۳۱		محلول زینکر
۳۱		پتاسیم دیکرومات
۳۲		روش استاندارد تهیه لام‌های هیستوپاتولوژیکی
۳۳		دستگاه اتوتکنیکون
۳۳		خطاهای پاسباز بافت
۳۴		آماده کردن بافت‌ها
۳۶		ابگیری

۳۷	شفاف کردن و الکل‌گیری
۳۷	آغشتگی به پارافین
۳۸	غوطه‌ور ساختن در پارافین
۳۸	قالب‌گیری
۳۸	انواع قالب‌ها
۳۹	روش قالب‌گیری با پارافین
۳۹	خطاهای قالب‌گیری
۳۹	برش بافت
۴۱	اصلاح کردن
۴۲	تهیه سیکشن یا برش‌های نواری
۴۳	رنگ‌آمیزی
۴۳	حلال‌های رنگ در هیستوتکنیک
۴۳	انواع رنگ‌آمیزی‌ها
۴۳	انواع رنگ‌ها
۴۴	مکانیسم رنگ‌آمیزی
۴۴	آماده کردن رنگ‌آمیزی برش‌ها
۴۵	۱- آبگیری
۴۵	۲- شفاف کردن
۴۵	رنگ‌آمیزی دوباره
۴۶	چسباندن لامل
۴۶	روش قرار دادن لامل و انواع چسبها
۴۷	رنگ‌آمیزی معمولی
۴۷	رنگ‌آمیزی همانوکسیلین و ائوزین
۴۸	رنگ ائوزین یا اریتروزین
۴۸	روش رنگ‌آمیزی همانوکسیلین هریس و ائوزین
۴۹	نتیجه رنگ‌آمیزی
۴۹	رنگ‌آمیزی برش‌های شناور با همانوکسیلین و ائوزین
۴۹	روش رنگ‌آمیزی
۵۰	رنگ‌آمیزی اختصاصی (تری کروم ماسون)
۵۰	آماده‌سازی
۵۲	روش‌های تیز کردن تیغه میکروتوم

۵۲	 محلول‌های مورد استفاده برای تیز کردن تیغه‌ها
۵۲	 تیغ تیزکن اتوماتیک
۵۳	 روش‌های انجمادی
۵۴	 انتخاب محلول سرمازا
۵۶	 میکروتوم در برش‌های انجمادی
۵۶	 میکروتوم‌های انجمادی
۵۷	 پایدار کردن
۵۷	 محیط‌های قابل نفوذ
۵۷	 روش آغشتگی به ژلاتین
۵۷	 مواد مورد نیاز
۵۸	 روش کار
۵۸	 روش آغشتگی OCT
۵۸	 آماده کردن میکروتوم انجمادی (مدل تجارتی CO ₂)
۵۹	 انجماد و برش نمونه‌ها
۵۹	 روش کار
۵۹	 شناور کردن برش‌ها با موارد مختلف
۶۰	 طرز استفاده از میکروسکپ نوری در مطالعات آسیب‌شناسی
۶۱	 ۱. روش قرار دادن نمونه زیر میکروسکپ
۶۲	 ۲. مشاهده نمونه
۶۲	 ۳. تنظیم عدسی‌ها با محور چشم
۶۲	 ۴. تنظیم درجه دیوپتری عدسی‌های چشمی
۶۲	 ۵. تنظیم تصویر میکروسکپ
۶۴	 ۶. تغییر بزرگنمایی در میکروسکپ
۶۴	 ۷. به کارگیری کندانسور در میکروسکپ
۶۴	 ۸. به کارگیری ابژکتیو روغنی یا ۱۰۰×
۶۴	 ۹. اندازه دهانه عدسی ابژکتیو
۶۵	 ۱۰. قدرت تمیز میکروسکپ
۶۶	 انواع میکروسکپ‌ها
۶۶	 ۱. میکروسکپ فاز کنتراست
۶۶	 ۲. میکروسکپ پلاریزه
۶۷	 ۳. میکروسکپ الکترونی گذاره

۴. میکروسکپ الکترونی نگاره ۶۹

فصل ۳ - باکتری‌شناسی (Bacteriology) ۷۰

روش‌های آزمایش نمونه‌های بافتی ۷۴

تهیه لام مرطوب ۷۴

۱. گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده ۷۶

۲. کشت و جداسازی ۷۸

انتقال و نگهداری باکتری‌ها ۷۹

انتقال ۷۹

نگهداری ۸۱

کشت متوالی ۸۱

انجماد ۸۲

نیترژن مایع (N₂) ۸۴

لیوفیلیزه کردن (انجماد خشک) ۸۵

روش‌های رنگ‌آمیزی باکتری‌های ماهی ۸۵

روش رنگ‌آمیزی گرم ۸۶

روش رنگ‌آمیزی ذیل - نیلسون ZN ۸۷

روش تلقیح نمونه در پلیت برای کشت و خالص‌سازی باکتری‌ها ۸۸

آزمایش‌های تفریقی اولیه برای باکتری‌های ماهی، کشت داده شده روی محیط‌های کشت

عمومی ۸۸

آزمایش کاتالاز ۸۸

آزمایش اکسیداز ۸۸

آزمایش اکسیداسیون - تخمیر گلوکز ۸۹

آزمایش‌های تشخیصی مرحله دوم برای باکتری‌های گرم منفی ماهی، کشت داده شده

روی محیط‌های کشت عمومی ۸۹

آزمایش حرکت ۸۹

آزمایش حساسیت به ویبریوستات 0/129 ۹۰

آزمایش میزان نیازمندی و تحمل نمک ۹۰

تریتون سوپا برات فاقد نمک ۹۱

آزمایش تحمل حرارت ۹۱

سایر آزمایش‌های شناسایی خواص باکتری‌ها ۹۱

۹۳	چند بیماری مهم باکتریائی
۹۳	یرسینیوزیس
۹۳	استریتوکوکوزیس
۹۵	فرونکلوزیس
۹۵	سمی سمی خونریزی دهنده باکتریایی (آنرومونس هیدروفیلا)
۹۶	فصل ۴ - ویروس‌شناسی (Virology)
۹۶	ارسال نمونه‌های ماهی به آزمایشگاه برای آزمایشهای ویروس‌شناسی
۹۶	نمونه‌گیری ماهی برای آزمایش ویروس‌شناسی
۹۸	جداسازی ویروسها از محیط‌های کشت سلولی
۹۸	کشت تیره سلولی
۹۸	محیط کشت
۹۹	بیماری‌های مهم ویروسی ماهیان آب شیرین
۱۰۰	چند بیماری ویروسی مهم
۱۰۰	ویروس گربه ماهی روگامی
۱۰۰	تشخیص
۱۰۰	نکروز عفونی پانکراس
۱۰۱	تشخیص
۱۰۲	ویرمی بهاره کیور
۱۰۳	تشخیص
۱۰۴	سپتی سمی هموراژیک ویروسی
۱۰۵	تشخیص
۱۰۵	نکروز عفونی مراکز خونساز
۱۰۶	تشخیص
۱۰۷	هرپس ویروس کوئی
۱۰۷	علائم بیماری
۱۰۸	محدوده میزبانی
۱۰۸	سایر آبزیان تحت مطالعه و مشکوک
۱۰۸	راههای انتقال و انتشار عامل
۱۰۸	عوامل مؤثر در وقوع و تشدید بیماری
۱۰۹	آزمایشات تشخیصی

۱۱۱	بیماری رئوویروس آمور
۱۱۱	محیط و انتقال
۱۱۱	محدوده میزبانها
۱۱۲	سن ابتلا
۱۱۲	شرایط مناسب بروز بیماری، میزان مرگ و میر
۱۱۲	علائم
۱۱۲	روش‌های تشخیصی
۱۱۳	روش‌های کنترل
۱۱۳	بیماری ویروسی نکروز عصبی
۱۱۳	اختصاصات عامل بیماری
۱۱۴	اختصاصات میزبان
۱۱۴	الگوی بیماری
۱۱۴	روش‌های تشخیص
۱۱۴	روش‌های تشخیص و جداسازی عامل بیماریزا
۱۱۴	کنترل و پیشگیری
۱۱۵	نمونه‌برداری
۱۱۷	بیماری White sturgeon iridoviral disease – WSIVD
۱۱۸	اختصاصات عامل بیماری
۱۱۸	اختصاصات میزبان
۱۱۸	الگوی بیماری
۱۱۹	روش‌های تشخیص
۱۱۹	روش‌های تشخیص کلینیکی
۱۱۹	روش‌های تشخیص و جداسازی عامل بیماریزا
۱۱۹	کنترل و پیشگیری
۱۱۹	بیماری Red seabream iridoviral disease - RSIVD
۱۲۰	اختصاصات عامل بیماری
۱۲۰	اختصاصات میزبان
۱۲۰	الگوی بیماری
۱۲۱	روش‌های تشخیص
۱۲۱	روش‌های تشخیص کلینیکی
۱۲۱	روش‌های تشخیص و جداسازی عامل بیماریزا

کنترل و پیشگیری ۱۲۱

فصل ۵ - قارچ‌شناسی (Fungal diseases) ۱۲۲

تشخیص کیک‌ها و قارچ‌های رشته‌ای ماهیان آب شیرین و ماهیان دریایی ۱۲۳

روش‌های آزمایشگاهی ۱۲۳

۱. روش جداسازی ۱۲۳

۲. روش کشت ۱۲۳

۳. روش‌های آماده‌سازی ۱۲۵

فصل ۶ - انگل‌شناسی (Parasitology) ۱۲۶

الف) تک‌یاخته‌های انگلی ۱۲۶

کلید کاربردی برای تعیین تک‌یاخته‌های ماهی در نمونه‌های تازه ۱۳۰

نحوهٔ فیکس کردن انگلها ۱۳۳

پروتوزوآها ۱۳۳

ترماتودها ۱۳۳

سستودها ۱۳۴

نماتودها ۱۳۴

آکانتوسفالها ۱۳۵

کرم‌های مرده ۱۳۵

کوپه پودها، ایزوپودها و سایر سخت پوستان انگلی ۱۳۵

فیکساتیوها مورد استفاده برای انگلها ۱۳۵

فصل ۷ - هماتولوژی (Hematology) ۱۳۶

نمونه‌گیری از خون ۱۳۶

۱. نمونه‌گیری از خون بچه ماهی نورس ۱۳۶

۲. جمع آوری خون در ماهیان بالای ۲۰۰g و مولدین ۱۳۷

روش فیکس کردن خون ۱۳۹

اندازه‌گیری پارامترهای گلبول قرمز ۱۳۹

۱. شمارش اریتروسیت‌ها (Er, RBC) ۱۳۹

اندازه‌گیری برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی در پلاسمای خون ۱۴۱

فصل ۸ - سم‌شناسی (Toxicology) ۱۴۴

آزمایش شیمیایی بافت ۱۴۴

آنزیم‌های بافتی ۱۴۵

فصل ۹ - نمونه‌برداری پاتولوژیکی برای طرح پایلوت بررسی بیماری‌های

ماهیان ۱۴۶

اهداف استراتژیک ۱۴۶

بیماری‌های مهم تحت مراقبت ۱۴۷

بیماری‌های مهم ماهیان سردآبی ۱۴۷

بیماری‌های مهم ماهیان گرمابی ۱۴۸

بیماری‌های مهم سخت‌پوستان و سایر نرم‌تنان آبی ۱۴۸

بیماری‌های مهم ماهیان دریایی و آبزیان زینتی ۱۴۸

فصل ۱۰ - تکنیک‌ها و روش‌های نمونه‌برداری برای آزمایشات اختصاصی ۱۵۰

روش سرولوژیکی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و روش ایمونوهیستوشیمی (مولدین)

..... ۱۵۱

روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای تشخیص ویروس نکروز عفونی و غیره ۱۵۲

روش کار و مواد مصرفی ۱۵۲

روش ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص IHN در ماهی ۱۵۳

مواد مصرفی کار ۱۵۳

طرز تهیه محلول‌های مورد نیاز در روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی ۱۵۵

روش کار و متد رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی ۱۵۶

روش ملکولی PCR ۱۵۸

روش تشخیص ملکولی PCR برای ویروس IHN ماهی ۱۵۸

روش کار Nested-PCR ۱۵۸

روش کشت باکتریایی ۱۶۰

هیستوپاتولوژی ۱۶۱

باکتری شناسی و قارچ شناسی ۱۶۱

لام اثر انگشتی ۱۶۲

روش‌های دیگر ارسال نمونه به آزمایشگاه تشخیص در صورتی و نحوه ارسال نمونه

..... ۱۶۳

- ۱۶۳ ماهی تازه مرده در کنار یخ
 ۱۶۴ کشت سلولی ویروس
 ۱۶۵ روش کار
 ۱۶۶ شناسایی عامل بیماری بر اساس اصول Koch's postulates

فصل ۱۱ - آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی آب و خاک ۱۶۷

- ۱۶۷ بیومس: وزن کل ماهیان
 ۱۶۹ برداشت نمونه آب به منظور انجام آزمایشات باکتریولوژی
 ۱۶۹ برداشت نمونه آب به منظور انجام آزمایشات جلبکی
 ۱۷۱ بطور کلی نمونه‌برداری از آب به منظورهای ذیل انجام می‌شود
 ۱۷۲ لوازم موردنیاز برای نمونه‌برداری از آب جهت اندازه‌گیری و
 ۱۷۲ معرف‌های لازم
 ۱۷۳ شرایط کلی نیازمندی‌های محیطی آبی پروری ماهیان سردآبی
 ۱۷۴ بعضی از معیارهای مهم فیزیکوشیمیایی آب
 ۱۸۰ فاکتورهای فیزیکوشیمیایی خاک مزارع پرورشی گرمابی

فصل ۱۲ - نمونه‌برداری از مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو ۱۸۵

- ۱۸۵ بیماری‌های مهم و اخطارکردنی OIE در سخت‌پوستان
 ۱۸۵ روش آزمایشگاهی در تشخیص بیماری‌های میگو
 ۱۸۵ روش نمونه‌برداری
 ۱۸۶ نمونه‌برداری در صورت بروز بیماری
 ۱۸۷ نمونه‌برداری از مراکز تکثیر میگو
 نگهداری نمونه‌ها برای آزمایشات مبتنی بر آنتی بادی یا آزمایشات زنجیره‌ای پلی‌مراز
 ۱۸۷ PCR
 ۱۸۷ نوع نمونه
 ۱۸۸ نمونه برداری از مزارع پرورشی میگو
 ۱۸۸ ۱. نمونه موجود زنده
 ۱۸۹ ۲. نمونه همولنف
 ۱۹۱ ۳. نمونه‌های سرد شده و کنار یخ
 ۱۹۱ ۴. نمونه‌های فریز شده
 ۱۹۱ ۵. نمونه‌های نگهداری شده در الکل (جهت آزمایش PCR)

۶. روش ثابت کردن نمونه‌ها (فیکس کردن با ماده فیکساتیو دیویدسون) به منظور	
آزمایشات هیستوپاتولوژی	۱۹۱
طرز تهیه محلول فیکساتیو (دیویدسون)	۱۹۳
۷. نگهداری RNA و DNA در بافت‌ها با استفاده از RNA Later	۱۹۳
چند بیماری مهم در میگو	۱۹۳
بیماری لکه سفید	۱۹۳
بیماری تورا	۱۹۳
بیماری کله زرد	۱۹۴
بیماری Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis	۱۹۴
بیماری Spherical Baculovirus (MBV)	۱۹۵
بیماری Tetrahedral Baculovirus (B.P)	۱۹۵
بیماری Crayfish plague	۱۹۵
علائم بیماری	۱۹۵
میزبان‌های حساس	۱۹۶
پراکندگی (اپیدمیولوژی)	۱۹۶
تشخیص تفریقی	۱۹۷
درمان	۱۹۷
بیماری نکروز عفونی عضلات (IMN) Infectious myonecrosis	۱۹۷
فهرست منابع	۱۹۹
الف : منابع فارسی	۱۹۹
ب : منابع انگلیسی	۲۰۰

مقدمه

تشخیص عامل بیماری از ماهیان تازه تلف شده به خاطر دامنه تغییرات بافتی پس از مرگ و مورد هجوم قرار گرفتن آن‌ها توسط پاتوژن‌های مختلف باکتریایی، ویروسی، انگلی و قارچی که بستگی به فاکتورهایی نظیر درجه حرارت و میزان ضایعات بافتی دارد، امری مشکل است. پس لازم است که پاتولوژیست آبزین کاملاً با نیازمندی‌های مربوطه قبل از انجام برنامه تشخیصی آزمایشگاهی در خصوص اصول نمونه‌برداری صحیح و استاندارد آشنا باشد. برخلاف پستانداران که پس از مرگ سرد می‌شوند و تجزیه بافتی را نشان می‌دهند، ماهی در خارج از آب اغلب گرم می‌شود. بنابراین بافت‌ها باید هرچه سریع‌تر در داخل مواد فیکساتیو نگهدارنده مناسب قرار داده شوند، در غیر این صورت تغییرات ناشی از اتولیز بافت‌ها می‌تواند شروع به ممانعت از تفسیر درست تشخیصی نمایند. در نمونه‌برداری از آبزین، باید تلاش شود که ماهی بیمار به صورت زنده به آزمایشگاه ارسال گردد و در صورتی که به دلایل مختلف، همچون بُعد مسافت و... امکان ارسال نمونه زنده نباشد، بایستی ماهی را در کنار یخ، منجمد و یا به صورت فیکس شده، ارسال نمود. این امر به‌خصوص در مورد بافت‌های خاصی مثل آبشش‌ها صدق می‌کند و اتلاف وقت به مدت بیش از چند دقیقه، شاید باعث ایجاد تغییرات شدید کاذب در سلول‌های پوشاننده تیغه‌ای و جدا شدن از غشای پایه شود. احتمالاً ماهی‌های زنده اما بیمار، سودمندترین نمونه‌ها برای دست یافتن به اهداف تشخیصی هستند؛ در مرحله بعد ماهی‌های که مرده‌اند و در مکانی سرد و نه یخ‌زده نگهداری شده‌اند، بهترین نمونه هستند. بایستی از مواد پایدارکننده مناسب آبزین و متناسب با بافت‌های مختلف مثل فرمالین بافره ۱۰ درصد استفاده نمود. روش‌های رنگ‌آمیزی مورد استفاده در هر آزمایشگاه آسیب‌شناسی برای آماده‌سازی مقاطع پارافینی به صورت متدهای استاندارد انجام می‌پذیرد. نمونه‌های خونی و نمونه‌های گسترش اثر انگشتی و رنگ‌آمیزی شده با یک دستگاه اتوماتیک رنگ‌کننده مقاطع بافتی با استفاده از یک رنگ متیلن بلو پلی کروم برای اکثر مقاصد، نتایج خوبی به همراه دارد. باید دقت کرد که ماهیان مرده بلافاصله اتولیز شده و فاسد می‌گردند. ماهیان مرده برای تشخیص آزمایشگاهی مناسب نیستند و فقط زمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که نمونه دیگری وجود نداشته باشد. آزمایشات میکروبی، ویروسی، انگلی، قارچی، هماتولوژی و

سم‌شناسی در کنار مطالعات و بررسی‌های دقیق آسیب‌شناسی ضایعات در ماهیان بیمار رهیافت‌های بسیار خوب و مطمئن در تشخیص را به همراه خواهند داشت. در پایان از همه همکاران عزیزم در دفتر بهداشت و مدیریت بیماری‌های آبریان سازمان دامپزشکی و نیز همکاران گروه بهداشت و بیماری‌های آبریان و گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی که در نگارش این کتاب همراه و یاور من بودند، قدردانی می‌نمایم. همچنین از رحمت خالصانه دوست و همکار ارزشمندم، جناب آقای مهندس حمید گردان، که زحمت طراحی جلد کتاب را بر عهده داشتند، سپاسگزاری می‌نمایم.

دکتر عادل حقیقی

متخصص پاتولوژی، استادیار و عضو هیئت علمی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران