



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۴۱، زمستان ۱۴۰۰
ص:ص: ۶۵~۷۲

مشاهده میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) انگل انکوسرکا فاسیاتا در شترهای تک کوهانه ایران

یونس قهویی^۱، محمد میرزایی^۲، شادی هاشمیا^۳، رضا خیراندیش^۴، علیرضا سازمند^۵

۱. دانشجوی دکتری انگل شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. استاد، گروه انگل شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۴. استاد، گروه پاتولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۵. استادیار، گروه انگل شناسی، دانشگاه بوعلی همدان

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۶۳۴۲۵۶۰۰۱

Email: dr.younes2015@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2022.126121

چکیده:

زمینه مطالعه: ضایعات پوستی حاصل از آلودگی با کرم‌های نخی شکل در حیوانات خانگی شایع است. در شترها، بیشترین گونه گزارش شده *انکوسرکا فاسیاتا* می باشد که به بافت پیوندی زیرپوست آسیب می رساند. اهداف: مطالعه حاضر باهدف بررسی مورفولوژیکی، نمونه‌های کرم نر و ماده بالغ، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ SEM انجام شد. علاوه بر این شناسایی میکروفیلرها آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام گرفته شد. مواد و روش کار: کرم‌های نر و ماده بالغ استخراج شده به ترتیب با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین میکروفیلرها جمع آوری شده بارتنگ‌های مختلف رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

نتایج: در بررسی SEM از انتهای خلفی کرم نر *انکوسرکا فاسیاتا*، پیچیدگی و زائدهای دمی مشاهده شد. همچنین در کرم های ماده، قسمت میانی آنها به صورت خطوط دنداندار خشن ظاهر و انتهای خلفی آنها به صورت مارپیچ مشاهده گردید. در رنگ آمیزی میکروفیلرها قسمت های مختلف آنها مشخص شد و اندازه طول میکروفیلرها به مقدار $197\mu\text{m}$ تا $221\mu\text{m}$ تخمین زده شد.

نتیجه گیری: پژوهش حاضر پیشگام تحقیقات در توصیف جامع مورفولوژیکی *انکوسرکا فاسیاتا* بر اساس SEM در ایران است. بنابراین از یافته‌های به دست آمده در مطالعه حاضر توصیه می‌شود که در تحقیقات آینده بخصوص در مورد این انگل استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: انکوسرکا، شتر یک کوهانه، میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ

Applied Animal Science Research Journal No 41 pp: 65-72

Scanning Electron Microscope observations of *Onchocerca fasciata* in dromedary camels from Iran

By: Younes Ghahvei^{1*}, Mohammad Mirzaei², Shadi Hashemni³, Reza Kheirandish⁴, Alireza Sazmand⁵

1. Student, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran; Postal Code: 76169141112.

2. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

4. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

5. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Postal Code: 6517658978, Hamedan, Iran

Received: November 2021

Accepted: February 2022

BACKGROUND: Skin lesions of filaria worms are usually common in domestic animal. In camels, the most reported species is *O. fasciata*, which involves subcutaneous connective tissue. **OBJECTIVES:** The present study was conducted morphologically characterize adult *O. fasciata* through scanning electron microscopy (SEM). In addition, microfilariae were identified by light microscopy. **METHODS:** SEM suggested cloacal and the caudal papillae in the coiled posterior end of the male *O. fasciata*. In the females, annulations appeared as rough dentate lines and the posterior end was pointed and spirally coiled. The collected *Microfilaria* were also stained and examined by light microscope. Different parts were identified in the microfilariae staining. The size of microfilariae was estimated to be 197 μm to 221 μm . **RESULTS:** The present research pioneered the comprehensive morphological and morphometric description of *O. fasciata* based on SEM in Iran. The findings obtained from the present study are recommended to be used in future research on this parasite

Key words: *Onchocerca*, one-humped camel, Scanning Electron Microscope

مقدمه

بهتری تسهیل کرده است که قبلاً غیرقابل دستیابی بود (۱۰). در ایران، قبلاً هیچ گونه توصیفی از لحاظ مورفولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در مورد انگل انکوسرکا فاسیاتا شتر صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر، بر اساس داده‌های مورفولوژیکی که بر اساس استفاده از تصویربرداری با استفاده از SEM به دست آمد، برای اولین بار مورفولوژی انگل بالغ انکوسرکا فاسیاتا با وضوح بهتری در ایران نشان داد شد.

مواد و روش کار انگل‌ها

نماتود انکوسرکا فاسیاتا به عنوان یک کرم بالغ در ندول‌های بافت فیبروزی (*fibrous*) که به خوبی در بخش‌های مختلف بدن شتر توسعه یافته زندگی می‌کند. این انگل برای اولین بار در شترهای استرالیایی توسط کلند یافت شد (۵). این انگل نخستین بار توسط رایلیت و هنری (۱۵) توصیف شده و توسط باین و ناشر مورد بازنویسی قرار گرفت (۲). همچنین مطالعات مورفولوژیکی این نماتود بر اساس بررسی قسمت‌های کرم و کوتیکول توسط هنری و ماسون در سال ۱۹۳۳، بدائین سال ۱۹۳۸ و باین و ناشر سال ۱۹۸۱ انجام شده است (۱، ۲، ۹). در سال‌های اخیر، مطالعه SEM اطلاعات مورفولوژیکی خارجی کرم‌ها را با بزرگنمایی و وضوح

تا مرحله فیکس اولیه صورت پذیرد. پس از آن در بافر کاکودیلات سدیم با شرایط $\text{pH} = 7$ شستشو شده و به منظور فیکس ثانویه در تتروکسید اسمیوم قرار می گیرند. سپس نمونه ها در غلظت های صعودی اتانول آبیگری می شوند. پس از خشک شدن بر روی استاب قرار گرفته و در ادامه با روکش طلا پوشش داده شده و آماده مشاهده و تصویر برداری با میکروسکوپ SEM می گردند.

نتایج

توزیع ندول های انکوسرکا

وجود ضایعات ندول ها عمدتاً در دو طرف گردن، (به ویژه در قسمت های نزدیک پایین گردن متمرکز شده) اندام های پیشانی، سر، زیر چشم و شانه ها وجود داشت. ولی ندول ها به ندرت در ناحیه پشت حیوانات آلوده مشاهده می شدند. در تصویر ۱ نواحی ندول های پیداشده در طول یک سال کامل ۱۳۹۷-۱۳۹۸ مشخص شده است. ندول ها از نظر بافت، بیضی شکل، مسطح و از نظر ظاهری به یک گره های لنفوی کوچک بزرگ شده شبیه بودند، از لحاظ لمسی سخت به نظر می آمدند. حیوانات به شدت آلوده شامل گروه های گسترده تری از این ندول ها بودند این انگل ها توسط یک کپسول بافت فیبری صاف احاطه شده بودند. در برش نمونه ها، توده های درهم برهم از کرم های نازک فیلا ریایی نشان داده شده است تصویر ۲.



تصویر ۲ ندول احاطه شده در کپسول فیبروزی

کرم های بالغی که به وسیله ندول های حاوی بافت فیبروزی احاطه شده بودند، با استفاده از محلول اسیدی پپسین ۲٪ (HCl) pepsin) هضم شدند. البته حجم محلول هضم بر اساس اندازه ندول های مورد بررسی در نظر گرفته شد. سپس محلول هضمی حاوی ندول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مدت ۴-۸ ساعت ندول ها هضم شدند و برای وجود انگل های بالغ با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (۴).

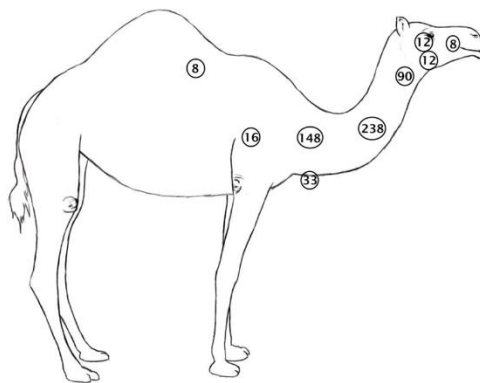
میکروفیلرها

برای جستجو میکروفیلرها، پوست های اطراف ندول ها در محلول سرم فیزولوژی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور انکوبه گردید. سپس به وسیله سانتریفیوژ با شرایط ۱۰۰۰ دور دقیقه، به مدت ۱۰min محتویات نمونه ها رسوب داده شد (۷). میکروفیلرهای به دست آمده به صورت تازه یا بعد از رنگ آمیزی بارینگ گیمسا، متیلن بلو، همتوکسلین اتوزین، با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱). همچنین طول و قطر میکروفیلرها اندازه گیری و خصوصیات آنها از نظر مورفولوژیکی توصیف گردید.

میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ (SEM) از انکوسرکا

فاسیانا

به منظور آماده سازی انگل برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ (SEM)، تعدادی از نمونه ها را در گلو تار آلدئید ۲.۵٪ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار می دهیم



تصویر ۱ محل ندول های حاوی کرم زنده و کلسیفه شده بر روی شتر

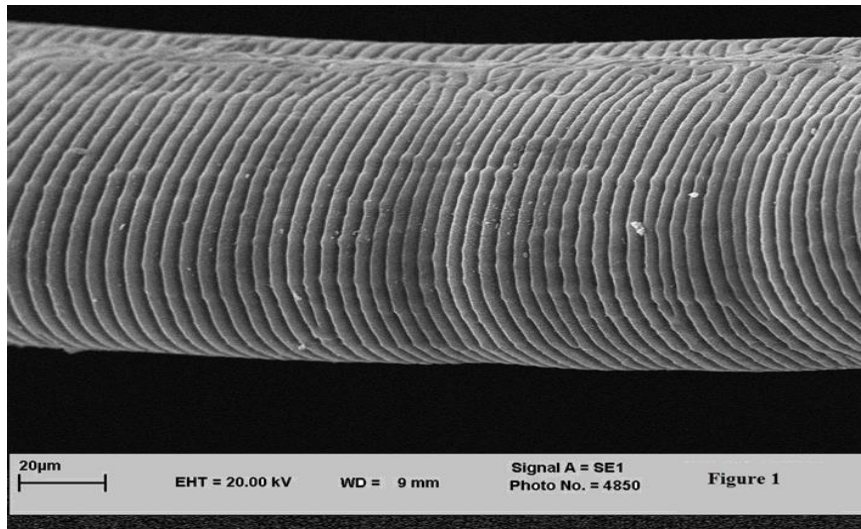
مشاهدات SEM دو جنس نر و ماده

الف. جنس نر/انکوسرکا

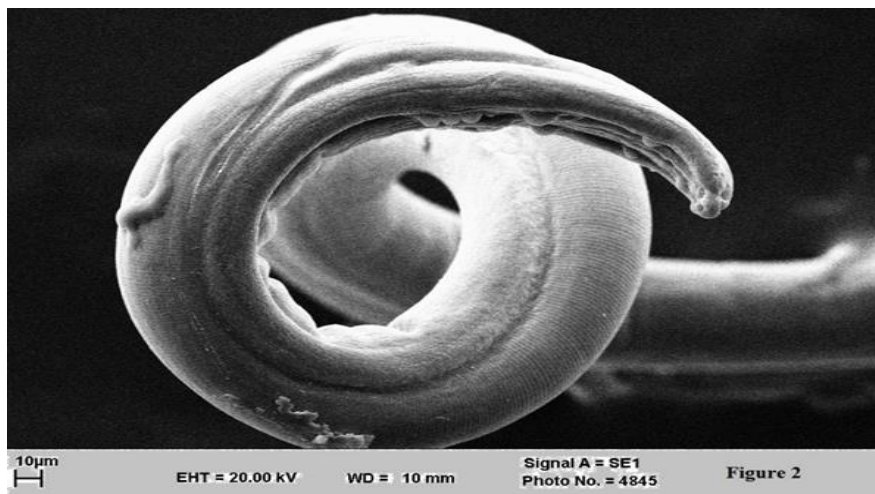
بر روی کوتیکول آنها خط‌های عرضی برجسته‌ای مشاهده گردید. همچنین کوتیکول‌ها، واجد ضخامت‌های پوستی مارپیچی مشخصی بودند که در کناره‌های جانبی قطع می‌شوند. مطابق تصویر ۳، ضخامت‌های پوستی در کناره‌های جانبی قطع می‌شوند. مطابق تصویر ۴، انتهای خلفی انکوسرکا فاسیاتا جنس نر به سمت شکمی پیچیده خورده است. و در انتهای آن نیز زائده‌های کوچک مشاهده می‌شود.

ب. جنس ماده/انکوسرکا

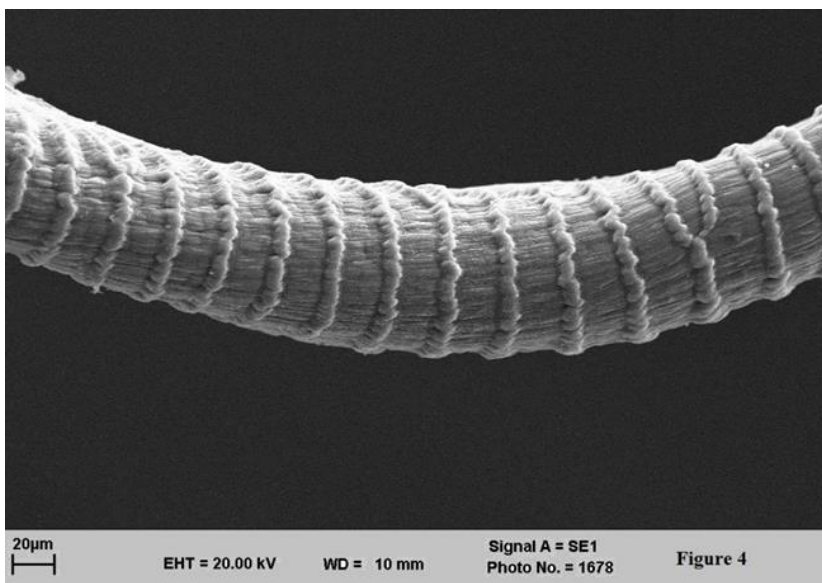
لایه بیرونی کوتیکول جنس ماده شامل خط‌های عرضی برجسته‌ای بودند که مانند جنس نرها واجد ضخامت‌های پوستی مشخصی بودند که در کناره‌های جانبی قطع می‌شوند. همچنین این خط‌ها در قسمت میانی به صورت خطوط دندان‌ه خشن ظاهر می‌شوند تصویر ۵. در تصویر ۶ به انتهای خلفی کرم ماده اشاره شده است که به صورت مارپیچ می‌باشد. تصویر ۷، منفذ دفعی در جنس ماده را نشان می‌دهد.



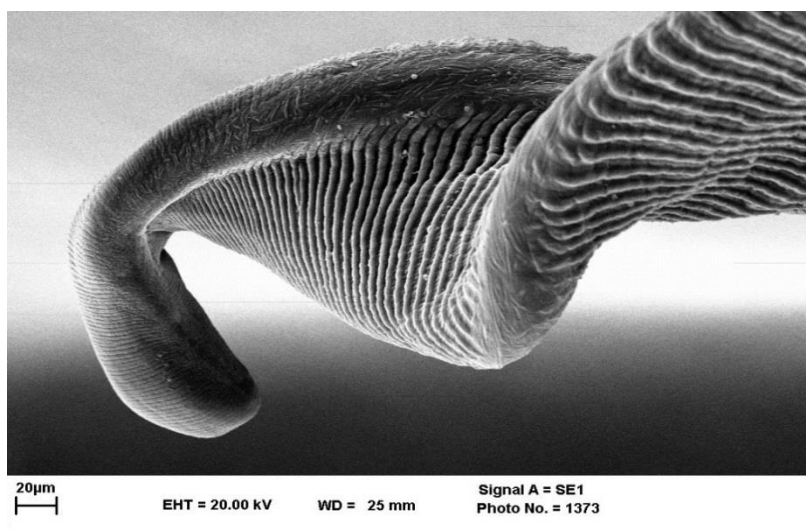
تصویر ۳ SEM جنس نر انکوسرکا فاسیاتا که نشان‌دهنده خط‌های عرضی برجسته است.



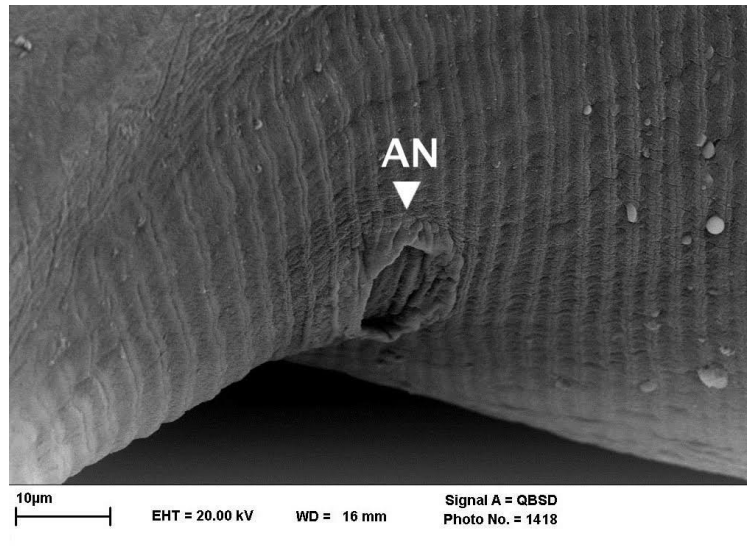
تصویر ۴ SEM انتهای خلفی جنس نر انکوسرکا فاسیاتا حالت پیچ‌خورده‌گی به سمت شکم دیده می‌شود.



تصویر ۵ خط‌های عرضی برجسته در قسمت میانی جنس ماده به صورت دانه‌های خشن ظاهر شده است.



تصویر ۶ پیچ خوردگی انتهای دم کرم ماده نشان داده شده است.

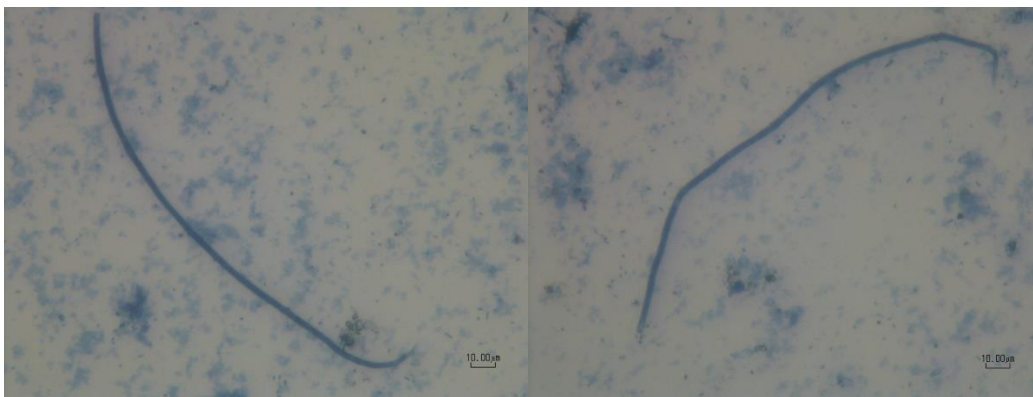


تصویر ۷ قسمت منفذ دفعی در کرم ماده بالغ با فلش نشان داده شده است.

میکروفیلر

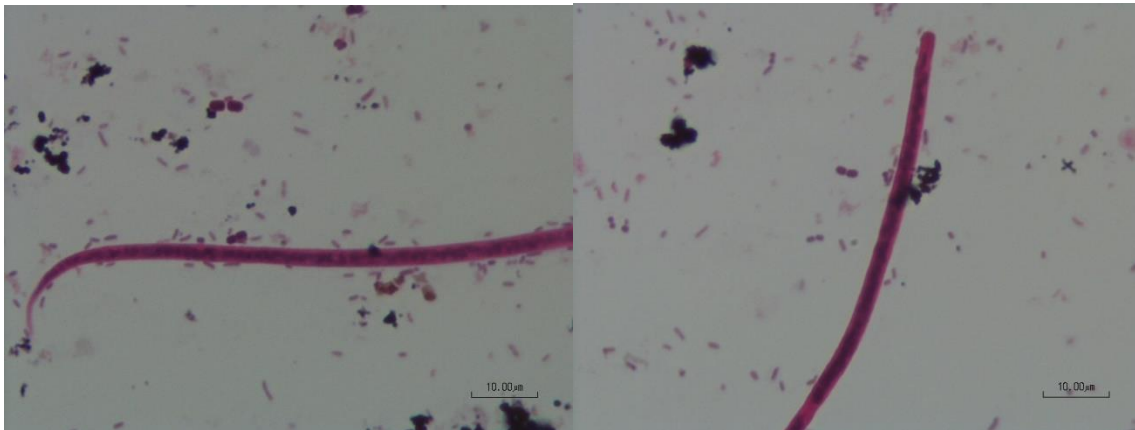
وگیمسا رنگ آمیزی گردیدند نشان داه شده است. میکروفیلرها با انتهای قدامی صاف و گردی داشتند، در صورتی که انتهای دمی آنها به صورت ظریف و باریک مشاهده گردید. و در تصویر ۱۱ و ۱۲ قسمت قدامی و دمی میکروفیلرها با رنگ آمیزی هماتوکسین اتوزین به ترتیب مشخص شده است.

میکروفیلاریا *Microfilariae* از بافت زیر جلدی در نزدیکی ضایعات انکوسرکا استخراج گردیدند. در واقع محل میکروفیلرها به طور کلی موازی با محل ندول های حاوی انگل بالغ بودند. میکروفیلرها نسبتاً طولانی، نازک و بدون غلاف بودند لاروها اندازه گیری شده به طول $197\mu\text{m}$ تا $221\mu\text{m}$ و عرض $3\mu\text{m}$ - $6\mu\text{m}$ تخمین زده شدند. در تصویر ۸ و ۹ میکروفیلرها با ترتیب بارنگ آمیزی متلین بلو



تصویر ۹ میکروفیلر رنگ آمیزی شده با متلین بلو

تصویر ۸ میکروفیلر رنگ آمیزی شده با گیمسا



تصویر ۱۱ قسمت دمی باریک میکروفیلر رنگ شده با هماتوکسین

تصویر ۱۰ قسمت قدامی گرد میکروفیلر رنگ شده با هماتوکسین

بحث

جانبی به جز *O. eberhardi* گزارش نشده است (۱۶). انتهای خلفی پیچ خورده ماده *انکوسرکا فاسیاتا* همانند *O. eberhardi* بود (۱۶). همچنین انتهایی دم جنس ماده بامنفذ دفعی واقع در سطح شکمی آن کاملاً شبیه به *O. sweetae* بود (۱۴). اما، یک انقباض کاملاً اتفاقی درمنفذ دفعی واقع در قسمت دمی باعث ایجاد یک طرح سوسیسی ماندندی در *O. gibsoni* شد که تفاوت آشکاری را با این گونه موجود نشان می‌دهد (۱۳).

نتیجه گیری

داده‌های ارائه شده در مطالعه حاضر به روشن شدن بیولوژی این کرم نادر شناسایی شده کمک می‌کند. اگرچه، عملکرد خطوط جانبی عرضی سطح جانبی بدن و پهلوهای دنداندار خشن در قسمت میانی هنوز مشخص نیست، اما آن‌ها می‌توانند در هنگام اتصال به بافت زیر جلدی میزبان و آسیب رباط‌ها، نقش اساسی در تغذیه انگل‌ها داشته باشند.

از ساختارهای مانند خط‌های جانبی، زائده‌های پیچ خورده انتهای خلفی نرها و خطوط دنداندار خشن در قسمت میانی توصیف شده با استفاده از SEM توصیه می‌شود که در تحقیقات آینده همچنین از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و کارکردهای آن‌ها نیز جهت شناسایی این گونه‌ها استفاده شود. انکوسرکیازیس نوعی ضایعه پوستی نسبتاً شایع در شتر موجود در ایران است. با این وجود میزبان واسط این انگل هنوز در ایران مشخص نشده است. بنابراین توصیه می‌شود مطالعات دیگری برای شناسایی میزبان‌های واسط و

در مطالعه حاضر میکروفیلرپیدا شده به موازات ندول‌های حاوی انگل بالغ *انکوسرکا فاسیاتا* بر روی شترها پیدا شد. از این رو وجود میکروفیلرها می‌تواند توزیع ندول‌ها در شترها را منعکس کنند. یافته‌های حاضر با نتایج به دست آمده توسط چیمه و همکاران در سال ۱۹۸۴ مطابقت دارد. هر چند، یافته‌های موجود مغایر با عفونت لاروهای *انکوسرکا گوتوروزوا* مورد بررسی در گاوها توسط ایشلر در سال ۱۹۷۳ است. شاید دلیل این تفاوت به علت این موضوع که میکروفیلرها در نقاط بخصوصی تمرکز داشتند مربوط گردد (SEM: (۴،۶،۱۲). مشخصه‌های مورفولوژیکی اندام خلفی و میانی هر دو جنس نر و ماده بالغ *انکوسرکا فاسیاتا* را مشخص کرد. به این صورت تعداد زائده‌های انتهایی دم نر می‌تواند بین گونه‌ها مختلف متفاوت باشد. این زائده‌های کوچک همچنین از نظر موقعیت و اندازه می‌توانند متفاوت باشند؛ اما در مطالعه حاضر زائده‌های کوچک انتهایی دم جنس نر *انکوسرکا فاسیاتا* مانند زائده‌های کوچک انتهایی دم جنس نر موجود در گونه *O. jakutensis* که قبلاً مشاهده شده است می‌باشد (۳).

شکل ظاهری کوتیکول و خط‌های عرضی در جنس ماده *انکوسرکا فاسیاتا* با خط‌های عرضی کوتیکول در قسمت میانی جنس ماده گونه‌های *O. gibsoni*، *O. jakutensis* و *O. sweetae* که قبلاً گزارش شده بود هم‌خوانی داشت (۳، ۱۳، ۱۴). دوشاخه شدن خطوط عرضی در گونه *انکوسرکا فاسیاتا* مشاهده شد که در هیچ کدام از گونه‌های دیگر خطوط شاخه‌ای در قسمت

8. Franz, M., & Schulz-Key, H. (1981). Scanning electron microscope studies on the anterior region of the larvae of *Onchocerca volvulus* in the vector. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 75(1), 141-142.
9. Henery, A., Masson, G. (1933a). Onchocercose du dromadaire (1). Bull. Acad. Vet. France 6, 208-213.
10. Hirschmann, H. (1983). Scanning electron microscopy as a tool in nematode taxonomy. In Concepts in nematode systematics: Proceedings of an international symposium held jointly with the Association of Applied Biologists, in Cambridge/edited by AR Stone, HM Platt, and LF Khalil. London: New York: Academic Press, 1983.
11. Hussein, M.F., Abdel Nur, O., Gassouma, M.S., Nelson, G.S. (1975). *Onchocerca gutturosa* (Neumann, 1910) infection in Sudanese cattle. Br. Vet. J. 131, 76-84
12. Muller, R. (1979). The identification of *Onchocerca*. In: Taylor, A.E.R., Muller, E. (Eds.), Problems in the identification of parasites and their vectors. 17th Symp. Br. Soc. Parasitol. Blackwell, Oxford, pp. 175-206.
13. P.A. Holdsworth. (1987). Scanning electron microscopy of viable and calcified *onchocerca gibsoni*, International Journal for Parasitology, 17: 957-964,
14. P.A. Holdsworth. (1988). Scanning electron microscopy of *onchocerca sweetae*, International Journal for Parasitology, 18(4): 561-563,
15. Railliet, A., Henry, A., 1910. Le onchocercques, nematodes parasites due tissu conjonctif. C. R. Soc. Biol. Paris 151, 248-251.
16. Uni S, Bain O, Agatsuma T, Harada M, Torii H, Fukuda M, Takaoka H. (2007). *Onchocerca eberhardi* n sp. From sika deer in japan; relationships between species parasitic in cervids and bivids in the holarctic region, parasite, 14: 199-211.

پیشگیری از بیماری آنها انجام شود.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از مسئول کشتارگاه کرمان آقای مهندس بیگزاده و کارشناس آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان آقای امین زاده که در انجام این پروژه مساعدت نموده اند تشکر نمایم.

منابع

1. Badanine, N.V. (1938). Sur la question d'helminthofaune du chameau en Turkmnie, Vol. 3. Livro Jubilar do Professor Lauro Travassos, Rio de Janeiro, pp. 61-73.
2. Bain, O., Nasher, E. (1981). Redescription de l'onchocercu du dromadaire, *O. fasciata* (Railliet and Henry 1910). Ann. Paraist (Paris) 56, 401-406.
3. Bosch F, et al. (2016). first description of *onchocerca jakutensis* in red deer in switzerland, International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 5 192-197.
4. Cheema, A.H., El-Bihari, S., Ashour, N.A., Ali, A.S. (1984). Onchocercosis in camels (*Camelus dromedarius*) in Saudi Arabia. J. Helminth. 58, 279-285
5. Cleland, J.B. (1909). Trypanosomiasis and other diseases in camels. Transaction of the 8th session of the Australian Medical Congress. J. Trop. Vet. 1909, 324.
6. Elchier, D. A. (1973). Studies on *Onchocerca gutturosa* (Neumann, 1910) and its development in *Simulium ornatum* (Meigen, 1818). 3. Factors affecting the development of the parasite in its vector. Journal of helminthology, 47.1: 73-88.
7. Ferenc, S.A., Copeman, D.B., Turk, S.R., Courtney, C.H. (1986). *Onchocerca gutturosa* and *Onchocerca lienalis* in cattle: effect of age, sex and origin on prevalence of onchocercosis in subtropical and temperate regions of Florida and Georgia. Am. J. Vet. Res. 47, 2266-2268