



بیماری باکتریایی نکروز حاد هیپاتوپانکراس (AHPND/EMS) (با تاکید بر علائم بیماری و تشخیص)

عقیل دشتیان نسب

adashtiannasab@gmail.com

پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREO)، بوشهر، ایران.

چکیده

مرگ را در کف استخر دید، برای تشخیص بیماری علاوه بر علائم بالینی، نشانه منحصر به فرد لجنی شدن شدید و فساد سلول های اپی تلیال توبول های هیپاتوپانکراس تا حد زیادی به تشخیص قطعی بیماری کمک می کند ولی برای کمک به شناسایی مخازن و منابع انتقال بیماری، کیت های تشخیصی تجاری PCR براساس پرایمرهای طراحی شده موجود می باشد. بیماری نکروز حاد هیپاتوپانکراس هم اکنون جزء لیست بیماری های اخطار کردنی سخت پوستان OIE است و کشورهای عضو ملزم به پایش و گزارش آن می باشند.

بیماری نکروز حاد هیپاتوپانکراس (AHPND) مهمترین بیماری غیرویروسی میگوهای پرورشی است که با خصوصیات نظیر تلفات شدید طی ۳۵ روز اول پرورش مشخص میشود. از سال ۲۰۰۹ یک الگوی جدید از تلفات در مزارع پرورش میگو برخی کشورهای شرق آسیا دیده شده که خیلی سریع در حال گسترش بود و خسارات زیادی به صنعت میگوی این کشورها وارد کرد. این بیماری در سال ۲۰۰۹ در جزیره هاینان در جنوب چین دیده شد، سپس در سال ۲۰۱۰ به ۴ استان های دیگر چین گسترش پیدا کرد، در سال ۲۰۱۰ حدود ۱۰۰۰۰۰ هکتار از مزارع پرورشی ویتنام را درگیر کرد، در سال ۲۰۱۱ در مالزی تولید میگوی پرورشی را بیش از ۳۰ درصد کاهش داد، طی سال های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ تولید میگوی تایلند را از ۶۰۰۰۰۰ تن به ۳۰۰۰۰۰ تن تقلیل داد و در سال ۲۰۱۳ باعث کاهش ۴۵ درصدی میگوی مکزیکی شد. این بیماری طی سال های اولیه بروز ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۴ باعث کاهش ۲۵ درصدی تولید جهانی میگو شد از این جهت به تجارت جهانی صنعت میگو خسارات زیادی وارد نموده است. از علائم بالینی این بیماری کم رنگ یا سفید شدن هیپاتوپانکراس بدلیل از دست دادن رنگدانه های بافت، کوچک شدن مشخص (گاهی نصف اندازه معمول) هیپاتوپانکراس، نرم بودن پوسته میگو و خالی یا نیمه پر بودن روده می توان اشاره کرد، شروع علائم بالینی و مرگ و میر معمولاً در ده روز بعد از ذخیره سازی دیده می شود و در نهایت می توان میگوهای مرده یا در حال

واژگان کلیدی: نکروز حاد هیپاتوپانکراس، علائم بالینی، آسیب شناسی، تشخیص

مقدمه

بیماری ها در آبی پروری به دو دسته مهم عفونی و غیر عفونی دسته بندی می شوند. بیماری های عفونی را می توان در سه مقوله تقسیم کرد: گروه اول بیماری هایی هستند که از نظر آثار تجاری مهم هستند (جزء لیست OIE) می باشند. این بیماری ها توسط یک سری استانداردهای بین المللی کنترل می شوند. برای اینکه یک بیماری جزء این دسته قرار بگیرد بایستی دارای یک سری شرایط و معیارهایی (گسترش شیوع، تلفات، واگیری و ...) باشد (Bondad-Reantaso et al., 2005). گروه دوم، بیماری هایی هستند که به طور پایدار و مستمر گونه های آبی را در مراکز تکثیر، نرسری ها و مزارع پرورش تحت تاثیر قرار می

برای تشخیص بیماری علاوه بر علائم بالینی، نشانه منحصر به فرد لجنی شدن شدید و فساد سلول های اپی تلیال توبول های هیپاتوپانکراس تا حد زیادی به تشخیص قطعی بیماری کمک می کند.



می کنند، عامل AHPND گونه ای است که فاقد دسته ژن های فوق الذکر بوده و برای انسان ایجاد بیماری نمی کند. شبکه آبی پروری آسیا (NACA) در گزارش فصلی بیماری ها در سال ۲۰۱۴، این بیماری را در لیست گزارش خود آورد و همان سال درخواست داد که در لیست بیماری های اخطارکردنی OIE (سازمان بهداشت جهانی دام) قرار گیرد، ولی کمیسیون استاندارد بیماری های آبیان OIE براساس شرایط موجود ورود این بیماری به لیست مذکور را مورد تایید قرار نداد. تا اینکه در مارس ۲۰۱۵ دوباره درخواست داده شد که بیماری جزء بیماری های اخطارکردنی سازمان بهداشت جهانی دام قرار گیرد، این بار با تصمیمی که توسط کمیسیون مذکور در ماه می ۲۰۱۵ اخذ شد، موجب شد که بیماری نکروز حاد هپاتوپانکراس از ژانویه ۲۰۱۶ به عنوان یکی از بیماری های اخطارکردنی سخت پوستان در لیست OIE قرار گیرد.

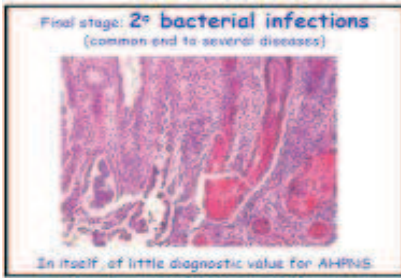
دانش کنونی در مورد عامل بیماری AHPND

عامل ایجادکننده بیماری که در سال ۲۰۱۳ (Tran et al., 2013) کشف شد یک سویه از ویبریو پاراهمولیتیکوس (VPAPHND) است که یک پلاسمید (pAPI) با وزن مولکولی حدود ۶۹ kbp با خود حمل می کند. این پلاسمید شامل دو ژن است که سم تولید می کنند (یکی با وزن مولکولی ۱۲,۷ KD و دیگری ۵,۱ KD) که هر دو با همدیگر قادرند موجب بروز بیماری نکروز حاد هپاتوپانکراس در میگو بشوند. ژن های PirA/B در پلاسمید برای ایجاد سمیت و تولید پروتیین های سمی در میگو رمزنگاری می شوند که ایجاد AHPND می کنند. این ژن ها مشابه ژن های سمی PirA/B شناخته شده در گونه های فتورابدوس *Photobacterium* spp. (باکتری گرم منفی، درخشان و میله ای شکل که عضو خانواده انتروباکتریاسه می باشد). در طبیعت گونه های *Photobacterium* spp. دارای زندگی اجباری یا نیمه وابسته به نماتود *Heterorhabditis* spp. می باشند که انگل لارو حشرات هستند. *Photobacterium*

دهند و ممکن است توسط باکتری ها، انگل ها، قارچ ها و ویروس ها ایجاد شوند. علاوه بر این موارد، گروه سوم، بیماری های نوپدید هستند، این گروه می توانند شامل بیماری های شناخته شده باشند که در یک جغرافیای جدید بروز می کنند یا بیماری های با اتیولوژی ناشناخته باشند. طبق این دسته بندی بیماری نکروز حاد هپاتوپانکراس که طی سال های اخیر در برخی کشورهای میگوپرور بروز کرده است و از سال ۲۰۱۶ در لیست OIE قرار گرفته است برای کشور ما هر چند که یک بیماری نوپدید هست ولی طبق دستورالعمل OIE بایستی بصورت فعالانه مورد پایش و گزارش قرار بگیرد.

بیماری نکروز حاد هپاتوپانکراس مهمترین بیماری غیرویروسی میگوهای پرورشی است که با خصوصیات نظیر تلفات شدید طی ۳۵ روز اول پرورش مشخص می شود، حالت فساد و لجنی شدن سلول های اپی تلیال هپاتوپانکراس در میگوهای بیمار دیده می شود که پس از این علامت معمولاً خواهند مرد. بروز این بیماری برعکس غالب بیماری های میگوهای پرورشی بخاطر گوارش سموم (Pir A, Pir B) تولید شده توسط یک نوع پلاسمید که سویه مشخصی از ویبریو پاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*) آن را حمل می کند و در محیط دریا و آب های لب شور موجود است می باشد. این پاتوژن می تواند در بدن میگوهای پرورشی، محیط پرورش، رسوبات و سایر ارگانیسیم های زنده موجود در محیط پرورش وجود داشته باشد. جنس ویبریو شامل ۳۰ گونه باکتری است که عموماً برای رشد به نمک طعام نیاز دارند. ویبریو پاراهمولیتیکوس به طور طبیعی در سواحل و خوریاات هر دو قسمت بخش استوایی و غیراستوایی کره زمین وجود دارد و تاکنون از آب، رسوبات، نرم تنان، سخت پوستان، ماهیان و سایر جانداران جداسازی شده است، شرایط محیطی شامل دما، شوری، اکسیژن محلول، جریان مد، زئوپلانکتون ها در رشد و زنده مانی این میکروارگانیسیم نقش دارند. ژنوم ویبریو پاراهمولیتیکوس شامل چندین دسته ژن است که برای انتقال نیازمند یک انتقال دهنده افقی هستند، برخی از آنها (Tdh, Trh) در انسان ایجاد بیماری

بیماری نکروز حاد هپاتوپانکراس مهمترین بیماری غیرویروسی میگوهای پرورشی است که با خصوصیات نظیر تلفات شدید طی ۳۵ روز اول پرورش مشخص می شود.



۳

شکل ۲. سلول های عملکردی در یک بافت نرمال هیپاتوپانکراس نمایش داده شده است (شکل شماره ۱). نکروز بافت هیپاتوپانکراس و لجنی شدن آن، سلولهای عملکردی در لوبول مشخص شده دیده نمی شود (شکل شماره ۲). هجوم باکتریهای فرصت طلب به بافت هیپاتوپانکراس، پس از آلودگی با بیماری EMS (شکل شماره ۳)

میزبانها و توزیع جغرافیایی AHPND

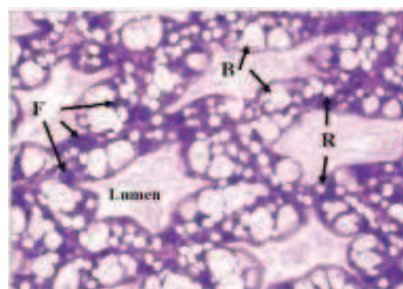
بیماری نکروز حاد هیپاتوپانکراس اولین بار در سال ۲۰۰۹ در چین مشاهده شد (بیماری مرگ پنهان خوانده می شد)، سپس در سال ۲۰۱۱ در ویتنام ثبت شد و در همان سال در مالزی و یکسال بعد در تایلند گزارش شد و در سال ۲۰۱۳ از میگوهای پرورشی در مکزیک جداسازی شد، در سال ۲۰۱۵ هم از فیلیپین این بیماری گزارش شد (Tran et al., 2013; Joshi et al., 2014; Soto-Rodriguez et al., 2015; Dabu et al., 2015; dela Peña et al., 2015). حدس زده می شود در سایر کشورهای میگوپرور هم وجود داشته باشد ولی تاکنون گزارش نشده است. این بیماری تاکنون بیشتر از میگوهای سفید غربی گزارش شده ولی در میگوهای منودون و چینی هم دیده شده است (Jushi et al., 2014).

روشهای تشخیص بیماری AHPND

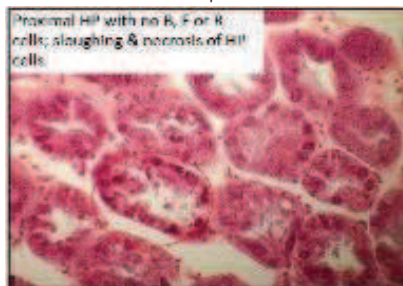
براساس علائم بالینی در میگوهای پرورشی، خالی بودن معده و روده، رنگ پریدگی و چروکیدگی هیپاتوپانکراس، مرگ و میر میگوها در ابتدای ذخیره سازی تا حدود ۳۵ روز پس از ذخیره سازی پست لاروها، می تواند ما را به بروز این بیماری مشکوک کند، البته علائم

و حتی اختصاصی تر و فقط منحصر به بافت هیپاتوپانکراس است و درگیری در سایر ارگان ها دیده نمی شود، لذا به دلیل وجود علائم آسیب شناسی در این بافت نام اختصاصی بیماری سندروم نکروز حاد هیپاتوپانکراس (AHPNS) می باشد که دارای ۳ فاز یا مرحله تشخیص داده شده است (Flegel, 2012).

در مرحله اول یا فاز اول بیماری، تغییرات فاسد شونده و نکروز حاد بافت هیپاتوپانکراس، کاهش فعالیت میتوزی در سلول های زیای (E (Emberionic Cell B,F,R)-F-cell (fibrillar), B-cell (blister-like), R-cell (resorptive))، تخریب عملکردی سلول های تخریب سلولهای اپی تلیال هیپاتوپانکراس که باعث گسستن و جدا شدن دیده می شود. در مرحله دوم یا فاز دوم بیماری، پاسخ التهابی مشخص (نفوذ هموسیت ها) دیده می شود و در مرحله سوم یا فاز سوم بیماری، عفونت ثانویه باکتریایی نیز به مجموعه علائم آسیب شناسی افزوده خواهد شد (شکل های شماره ۲). پس از تخریب بافتی و عملکردی بافت هیپاتوپانکراس و نفوذ سلول های خونی در بافت مذکور محیط بسیار مناسبی جهت رشد باکتری های مختلف در هیپاتوپانکراس ایجاد می شود که باعث لجنی شدن این بافت می گردد.



۱

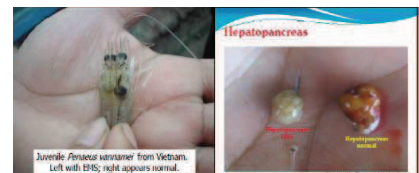


۲

Heterorhabditis دارای گسترش وسیع جغرافیایی بوده که از سال ۱۹۸۰ به طور گسترده برای کنترل حشرات مورد تحقیق قرار گرفته است. خوشبختانه VPAHPND برای سلامت انسان خطری ندارد.

علائم بالینی بیماری

رنگ پریدگی و سفیدرنگ هیپاتوپانکراس میگوهای مبتلا، آتروفی (کوچک شدن) بارز در هیپاتوپانکراس (تا ۵۰٪)، نرمی پوسته به همراه خالی بودن یا منقطع بودن غذا در روده ها، گاهی مشاهده نقاط یا رگه های سیاه رنگ در هیپاتوپانکراس، سفید شدن مدفوع میگوهای مبتلا به سختی له شدن بافت هیپاتوپانکراس به دلیل از دست دادن سلول های چربی بین دو انگشت و همراه با افزایش مرگ میگوها در حین یا پس از پوست اندازی می باشد. معمولا علائم بالینی و مرگ و میر از ۱۰ روز پس از ذخیره سازی دیده می شود و عموماً تا ۳۵ روز ادامه می یابد. میگوهای مرده یا در حال مرگ بر خلاف اکثر بیماری ها که در کناره های استخر دیده می شوند، در کف استخر هستند لذا تلفات کمتر دیده می شوند.



شکل ۱. کوچک و سفید شدن هیپاتوپانکراس در میگوی مبتلا نسبت به هیپاتوپانکراس میگوی سالم (تصویر سمت راست)، علاوه بر رنگ پریدگی و کوچک شدن هیپاتوپانکراس، خالی بودن روده میگوی مبتلا (سمت چپ) به خوبی نشان داده شده است.

همانطور که ملاحظه می شود علائم بالینی بیماری منحصر به دستگاه گوارش میگوهای مبتلا بوده و در سایر بافت ها علائم مشخصه ای دیده نمی شود.

علائم آسیب شناسی بیماری

علائم آسیب شناسی نیز مثل علائم بالینی منحصر به دستگاه گوارشی میگوها



با محیط کشت باکتریایی به مدت ۴ ساعت قبل از PCR لازم است.

برای رفع مشکل نمونه هایی که قابلیت غنی سازی و کشت باکتریایی ندارند (مثل نمونه هایی که در الکل ذخیره سازی شده اند) یک روش Nested-PCR یا دومرحله ای به نام AP4 ایجاد شده که توسط ناکا در ۲۰ فوریه

۲۰۱۵ خبررسانی شده است. هدف این روش توالی کل زنجیره ژن توکسین کوچکتر KD ۱۲.۷ و ۷۰٪ زنجیره ژن توکسین بزرگ می باشد که نتایج آن با ۱۰۴ نمونه مثبت و منفی آزمایش شده با AP3، دار ۱۰۰ درصد یکی بوده است. این روش ۱۰۰ برابر حساسیت بیشتری نسبت به روش تشخیصی قبلی دارد و نمونه های با کمتر از ۱۰۰ فیکوگرم DNA را تشخیص می دهد. آیین آزمایشات توسط شرکت دانش بنیان Centex و با همکاری دانشگاه Sakarindrwirete در بانکوک انجام شده است.

یکسری آنتی بادی هایی نیز علیه سم AHPND تولید شده که برای تشخیص از روش الیزا (ELISA) استفاده می شوند، این روش اجازه خواهد داد که میزان کمی توکسین AHPND در غذا و محیط توسط آزمایشگاه تشخیص داده شود، از این روش برای تعیین پیشرفت درمان و همچنین ایجاد مولدین مقاوم به بیماری می توان استفاده کرد.

فهرست منابع

۱. دشتیان نسب ع، غربی بی ق. ۱۳۹۵. معرفی مرگ زودرس میگو. مجله میگو و سخت پوستان. سال اول شماره اول. ص ۳۲-۳۷.
2. Bondad-Reantaso, M.G., R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, Tan, Zilong, and M. Shariff. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology* 132: 249-272.
3. Dabu, I.M., J.J. Lim, P.M.T. Arabit, S.J.A.B. Orense, J.A.

مشابه در سایر بیماری ها هم ممکن است اتفاق بیفتد که برای تایید بیماری آزمایشات بافت شناسی بسیار موثر است، عارضه مهم و منحصر بفرد فساد و لجنی شدن شدید سلولهای اپی تلیال توبولهای هیپاتوپانکراس تا حد زیادی به تشخیص قطعی بیماری کمک می کند.

برای کمک به شناسایی مخازن و منابع انتقال بیماری، ۲ کیت تشخیصی تجاری PCR براساس پرایمرهای طراحی شده با عناوین AP1 و AP2 توسط ناکا (NACA) در دسامبر ۲۰۱۳ معرفی شد که کمی بعدتر هم به روز رسانی شده است. پرایمر AP2 با ۳ درصد مثبت کاذب نتایج بهتری نسبت به AP1 نشان می دهد، به جز این نقص و ضعف در نشان دادن نتایج مثبت کاذب، روش استفاده شده به طور موفقیت آمیزی شیوع VPAHPND را در مولدین و غذای زنده (کرم های پلی کت و صدف ها) در استخرهای تولید مولدین و همچنین پست لاروهای ذخیره سازی شده در استخرهای پرورشی مشخص می کرد. در بررسی ها و پایش عامل AHPND در تایلند، مدارکی از آلودگی پست لاروهای عاری از بیماری (SPF) پس از ذخیره سازی در استخرهای پرورشی مشاهده شد که این مورد نشان دهنده عدم رعایت بیوسکیوریتی مناسب در استخرهای پرورشی بود.

برای غلبه بر مشکل مثبت کاذب در نتایج PCR، یک روش تشخیصی بهبود یافته PCR به نام AP3 براساس کشف ۲ ژن عامل توکسین AHPND و با استفاده از توالی ژن توکسین کوچکتر ۱۲.۷ KD تولید شده است. روش AP3 که در وب سایت ناکا (NACA) در ژوئن ۲۰۱۴ بارگذاری شد، در ۱۰۴ مورد جدایه باکتریایی هیچ نتایج مثبت یا منفی کاذبی نداشته است. با توجه به اینکه روش های AP1- AP3 برای تشخیص VPAHPND، PCR یک مرحله ای هستند، لذا نمونه هایی که دارای بار آلودگی کمی هستند را بخوبی تشخیص نمی دهند، برای رفع این معضل یک مرحله غنی سازی

یکسری آنتی بادی هایی نیز علیه سم AHPND تولید شده که برای تشخیص از روش الیزا (ELISA) استفاده می شوند، این روش اجازه خواهد داد که میزان کمی توکسین AHPND در غذا و محیط توسط آزمایشگاه تشخیص داده شود.

9. NACA-FAO 2012. Asia Pacific Emergency Regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS) / Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) (Asia and Pacific Region), 910- Aug. 2012. NACA, Bangkok, Thailand.
10. Soto-Rodriguez S.A., B. Gomez-Gil, R. Lozano- Olvera, M. Betancourt-Lozano, M.S. Morales- Covarrubias. 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in north-western Mexico. *Appl Environ Microbiol* 81:1689–1699.
11. Tran L., Nunan L, Redman R M., Mohney L. L., Pantoja C. R., Fitzsimmons K., Lightner D. V., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*. Vol. 105: 45–55, 2013. doi: 10.3354/dao02621
- Tabardillo Jr, V.E. Corre Jr., and M.B.B. Maningas. 2015. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.* 1–8
4. dela Peña, L.D., N.A.R. Cabillon, D.D. Catedral, E.C. Amar, R.C. Usero, W.D. Monotilla, A.T. Calpe, D.D.G. Fernandez, and C.P. Saloma. 2015. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreak in the *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, 116:251- 254.
5. Flegel, T.W. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* 110:166- 173.
6. Joshi, J., J. Srisala, V.H. Truong, I.T. Chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, C.F. Lo, T.W. Flegel, K. Sritunyalucksana, and S. Thitamadee. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428–429: 297- 302.
7. Lightner, D.V., 2013. EMS—The Perfect Killer—A Webinar. On December 10, 2013, from Vietnam, the Global Aquaculture Alliance (GAA)
8. Lightner, DV, Redman, RM, Pantoja, CR, Noble, BI, Tran, L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, January/ February 2012:40.