

آشنایی با بیماری EHP در میگو

دکتر رضا اسدی – مدیر کل دفتر بهداشت ، پیشگیری و مدیریت بیماریهای آبزیان
سازمان دامپزشکی کشور

۱- EHP چیست؟

EHP مخفف Enterocytozoon hepatopenaei است. این عامل یک میکروسپوریدی (Microsporidian) داخل سلولی و اسپورزا است که عمدتاً سلولهای اپی تلیال هپاتوپانکراس (Hepatopancreas) میگو را آلوده می کند. در منابع جدید، بیماری مرتبط با EHP گاهی با عنوان Hepatopancreatic Microsporidiosis یا HPM نیز بیان می شود.

اهمیت EHP از این جهت است که معمولاً برخلاف بیماری هایی مانند WSSV باعث مرگ و میر گسترده و ناگهانی نمی شود؛ بلکه عمده خسارت آن از طریق توقف یا کاهش شدید رشد، افزایش اختلاف اندازه میگوها، افزایش دوره پرورش و کاهش بازده اقتصادی ایجاد می شود .

۲- عامل بیماری:

EHP یک انگل بسیار کوچک از گروه Microsporidia است.

ویژگی های مهم انگل :

- تک سلولی است.
- داخل سلول زندگی می کند.
- اسپور تولید می کند.

- اسپورها مقاومت محیطی نسبتاً بالایی دارند.
- بافت هدف اصلی، هپاتوپانکراس است.
- در داخل سلول‌های اپی‌تلیال توبول‌های هپاتوپانکراس تکثیر می‌شود.
- در مراحل پیشرفته، اسپورها درون لومن توبول‌های هپاتوپانکراس آزاد می‌شوند

۳- چرا هپاتوپانکراس مهم است؟

برای آشنایی با EHP باید اهمیت هپاتوپانکراس را بدانیم.

هپاتوپانکراس در میگو عملکردهایی شبیه ترکیبی از کبد و بخش‌هایی از دستگاه گوارش دارد و در موارد زیر نقش مهمی ایفا می‌کند:

- تولید و ترشح آنزیم‌های گوارشی
- هضم و جذب مواد غذایی
- ذخیره مواد غذایی
- متابولیسم
- برخی عملکردهای سم‌زدایی و تنظیمی

وقتی EHP سلول‌های اپی‌تلیال توبول‌های هپاتوپانکراس را آلوده می‌کند، عملکرد طبیعی این اندام مختل می‌شود.

نتیجه مهم این است که میگو ممکن است غذا بخورد، اما نتواند به شکل مطلوب مواد مغذی را برای رشد استفاده کند.

این یکی از دلایل اصلی ارتباط EHP با کندی رشد است

۴- چرخه بیماری چگونه است؟

اسپور پس از ورود به میزبان، با مکانیسم اختصاصی میکروسپوریديا وارد سلول می‌شود. یکی از ساختارهای مهم این گروه، polar tube است که برای انتقال محتویات اسپور به سلول میزبان نقش دارد. پس از تکثیر، تعداد زیادی اسپور تولید می‌شود. با آسیب و تخریب سلول‌های آلوده، اسپورها می‌توانند وارد فضای توپول‌های هیپاتوپانکراس شوند و بعد از طریق محتویات گوارشی و مدفوع وارد محیط شوند.

۵- راه‌های انتقال EHP :

یکی از مهم‌ترین نکات در مدیریت EHP ، شناخت مسیر انتقال است.

۵-۱- انتقال افقی

مهم‌ترین مسیر، انتقال افقی در جمعیت است.

میگوی آلوده اسپور را وارد محیط می‌کند و میگوی سالم می‌تواند از طریق تماس با مواد آلوده یا خوردن مواد آلوده، اسپور را دریافت کند.

بنابراین تراکم بالای میگو، حضور مواد آلی، مدیریت ضعیف کف و وجود میگوهای آلوده می‌تواند چرخه آلودگی را تقویت کند.

۵-۲- هم‌خواری و خوردن میگوی آلوده

میگوها رفتار cannibalism دارند.

میگوی بیمار یا مرده می‌تواند منبع بسیار مهمی برای انتقال اسپور باشد.

به همین دلیل جمع‌آوری سریع میگوهای تلف‌شده یکی از اصول مهم مدیریت زیستی مزرعه است.

۵-۳- آب آلوده

آب می‌تواند حامل اسپور باشد و موجب انتقال EHP بین بخش‌های مختلف مزرعه شود.

۵-۴- تجهیزات آلوده

تور، سینی، شلنگ، ظروف، چکمه و سایر تجهیزات می‌توانند در انتقال آلودگی از یک استخر به استخر دیگر نقش داشته باشند.

بنابراین یک استخر آلوده می‌تواند به‌صورت غیرمستقیم سایر استخرها را نیز آلوده کند.

۶- آیا EHP از تخم و مولد به لارو منتقل می‌شود؟

موضوع انتقال عمودی EHP همچنان از جنبه‌های مهم اپیدمیولوژیک است.

در مدیریت عملی، استفاده از مولد و پست‌لاروی عاری از EHP و غربالگری مولکولی اهمیت بسیار زیادی دارد.

به همین دلیل، در مراکز تکثیر، وضعیت سلامت مولدین و PL باید با روش‌های معتبر آزمایشگاهی بررسی شود.

۷- علائم بالینی EHP :

یکی از خطرناک‌ترین ویژگی‌های EHP این است که علائم ظاهری اختصاصی و واضحی ندارد.

یعنی ممکن است میگو ظاهراً سالم باشد ولی PCR آن مثبت باشد.

مهم‌ترین علامت اقتصادی و مزرعه‌ای:

کاهش رشد - میگوهای بسیار کوچک در کنار میگوهای بزرگ - اختلاف شدید اندازه - افزایش تعداد میگوهای عقب‌مانده از رشد - طولانی شدن دوره پرورش - کاهش میانگین وزن - کاهش تولید نهایی

۸- ناهمگونی اندازه؛ علامت بسیار مهم:

فرض کنید در یک استخر، تمام PL ها تقریباً هم‌سن و هم‌اندازه وارد شده‌اند.

بعد از چند هفته، مشاهده می‌کنید:

گروه اول: رشد طبیعی

گروه دوم: رشد متوسط

گروه سوم: میگوهای بسیار کوچک

اگر این اختلاف اندازه به شکل قابل توجهی ایجاد شده باشد، باید EHP را در فهرست تشخیص‌های احتمالی قرار داد.

البته این علامت اختصاصی EHP نیست.

کیفیت نامناسب خوراک، تراکم، شرایط آب، بیماری‌های دیگر، استرس و مشکلات تغذیه‌ای نیز می‌توانند باعث رشد ناهمگون شوند.

۹- علائم دیگری که ممکن است دیده شوند:

در برخی مطالعات و شرایط مزرعه‌ای موارد زیر نیز گزارش شده‌اند:

- کاهش اشتها
- بی‌حالی

- روده خالی
- نرم شدن پوسته
- کاهش رشد
- اختلاف شدید اندازه
- ضعف عمومی

اما این علائم اختصاصی EHP نیستند و در بیماری‌های دیگر نیز دیده می‌شوند

۱۰- ارتباط EHP با مدفوع سفید:

یکی از موضوعات مهم در مزارع میگو، White Feces Syndrome یا WFS است. در برخی مناطق، مشاهده رشته‌های سفید مدفوع در آب به عنوان یک شاخص احتمالی برای وجود EHP مطرح شده است.

اما باید بسیار دقت کرد:

مدفوع سفید به معنی EHP قطعی نیست.

WOAH نیز آن را یک شاخص احتمالی در مناطق اندمیک می‌داند، نه یک روش تشخیص قطعی

بنابراین اگر در استخر مدفوع سفید دیده شد، بهتر است EHP با PCR بررسی شود.

۱۱- آیا EHP باعث مرگ میگو می‌شود؟

این سؤال بسیار مهم است.

در حالت معمول:

EHP بیماری با تلفات مستقیم و گسترده نیست.

با این حال، EHP می‌تواند وضعیت میگو را ضعیف کند و حساسیت آن را به برخی عوامل بیماری‌زا افزایش دهد.

به‌خصوص WOAH ارتباط افزایش حساسیت میگوهای آلوده به *Vibrio parahaemolyticus* و بیماری AHPND را گزارش کرده است

۱۲- تفاوت EHP با AHPND :

این دو بیماری گاهی با یکدیگر اشتباه گرفته می‌شوند.

AHPND	EHP	ویژگی
باکتریایی	میکروسپوریدی	عامل
سویه‌های خاص <i>V. parahaemolyticus</i> و برخی <i>Vibrio</i> ها	<i>E. hepatopenaei</i>	عامل اصلی
هپاتوپانکراس	هپاتوپانکراس	بافت مهم
بیماری حاد و تلفات	کاهش رشد	مشکل اصلی
ممکن است دیده شود	بسیار مهم	رشد ناهمگون
ممکن است بسیار شدید باشد	معمولاً خیر	تلفات شدید
PCR و بررسی پاتولوژی/عامل	PCR/qPCR	تشخیص
مدیریت و درمان وابسته به شرایط و تشخیص	وجود ندارد	درمان اختصاصی قطعی

۱۳- تغییرات هپاتوپانکراس در EHP :

در میگوی سالم، توبول‌های هپاتوپانکراس ساختار منظم دارند.

در EHP ، با پیشرفت عفونت ممکن است موارد زیر مشاهده شوند:

- وجود مراحل مختلف رشد انگل در سلول‌های اپی‌تلیال
- اجسام درون سلولی بازوفیلیک
- تجمع اسپور
- تخریب سلول‌های اپی‌تلیال
- دژنراسیون توبول‌ها
- نکروز
- آزاد شدن اسپورها به داخل لومن توبول

۱۴- تشخیص EHP :

تشخیص باید بر اساس نتایج آزمایشگاهی باشد، نه فقط علائم مزرعه.

روش اول PCR :

PCR یکی از روش‌های رایج تشخیص EHP است.

مزیت:

- نسبتاً سریع
- اختصاصیت بالا، در صورت استفاده از هدف و پرایمر مناسب
- مناسب برای غربالگری

اما حساسیت PCR به روش مورد استفاده و مقدار عامل بیماری‌زا وابسته است.

WOAH اشاره می‌کند که برخی روش‌های one-step PCR ممکن است برای عفونت‌های با بار بسیار پایین یا carrier کافی نباشند .

روش دوم: qPCR .

qPCR برای EHP بسیار مهم است.

تفاوت اصلی این است که PCR معمولی بیشتر برای پاسخ:

مثبت یا منفی استفاده می‌شود. در حالی که qPCR می‌تواند برای برآورد بار EHP به کار رود.

مطالعات نشان داده‌اند که بار EHP در هیپاتوپانکراس می‌تواند با رشد میگو ارتباط منفی داشته باشد

روش سوم : Nested PCR .

Nested PCR نیز برای EHP استفاده می‌شود.

یکی از مشکلات روش‌های قدیمی‌تر، احتمال واکنش متقاطع با میکروسپوریدی‌های نزدیک بود.

روش چهارم : LAMP و RPA

برای تشخیص سریع‌تر در محل، روش‌های ایزوترمال مانند:

LAMP .

RPA .

نیز توسعه یافته‌اند.

مزیت آنها این است که در مقایسه با PCR کلاسیک، می‌توانند با تجهیزات ساده‌تر انجام شوند.

این موضوع برای مناطق دور از آزمایشگاه اهمیت دارد

روش پنجم : هیستوپاتولوژی

در هیستوپاتولوژی، هپاتوپانکراس نمونه برداری و پس از تثبیت، برش و رنگ آمیزی می شود. معمولاً از H&E استفاده می شود.

مزیت:

- نشان دادن محل و شدت آسیب
- مشاهده مراحل مختلف عامل
- ارزیابی آسیب بافتی

عیب:

- حساسیت پایین تر در عفونت های خفیف
- نیاز به فرد متخصص
- زمان بر بودن
- دشواری تشخیص در مراحل اولیه

روش ششم : ISH .

In Situ Hybridization (ISH) می تواند برای شناسایی EHP در بافت مورد استفاده قرار گیرد. این روش نسبت به مشاهده ساده با H&E اختصاصیت بیشتری دارد و می تواند در مواردی که اسپورها هنوز به وضوح دیده نمی شوند، به تشخیص کمک کند.

ولی برای پایش روزمره مزرعه، پیچیده تر و پرهزینه تر است

۱۵- نمونه‌گیری برای تشخیص:

بهتر است نمونه‌ها بشکل زیر اخذ شوند :

- از نقاط مختلف استخر
- از میگوهای با اندازه‌های مختلف
- به‌خصوص از میگوهای عقب‌مانده از رشد
- و در صورت امکان از چند استخر

برای تشخیص دقیق، آزمایشگاه باید مشخص کند که چه بافتی، چه مقدار نمونه و چه شرایط نگهداری لازم است.

۱۶- آیا میگوی PCR مثبت حتماً بیمار است؟

این نکته بسیار مهم است.

PCR مثبت $\neq$ الزاماً بیماری شدید بالینی

PCR می‌تواند وجود DNA عامل را نشان دهد، اما شدت بیماری به موارد زیر بستگی دارد :

- بار عامل
- مرحله عفونت
- وضعیت فیزیولوژیک میگو
- شرایط محیطی
- تغذیه
- استرس
- عفونت‌های همزمان
- به همین دلیل در تصمیم‌گیری مزرعه‌ای بهتر است نتیجه PCR/qPCR را همراه با وضعیت رشد، علائم، تاریخچه استخر و در صورت امکان هیستوپاتولوژی تفسیر کرد.

۱۷- عوامل تشدیدکننده بیماری :

مواردی مانند: تراکم بسیار بالا- مواد آلی زیاد- مدیریت نامناسب کف - کیفیت نامناسب آب - خوراک نامناسب تغذیه - استرس های محیطی - وجود میگوهای بیمار یا مرده - جابه جایی تجهیزات بین استخرها - ورود آب آلوده - بیوسکیوریتی ضعیف می توانند کنترل بیماری را دشوارتر کنند.

۱۸- آیا برای EHP داروی قطعی وجود دارد؟

در حال حاضر درمان اختصاصی و اثبات شده ای که بتواند EHP را به طور قابل اعتماد از میگوی پرورشی حذف کند وجود ندارد. یکی از دلایل مهم، ویژگی داخل سلولی بودن عامل و مقاومت اسپورهاست.

بنابراین رویکرد اصلی: پیشگیری + تشخیص زودهنگام + قطع چرخه انتقال + بیوسکیوریتی است.

۱۹- پیشگیری از بیماری :

برای این کار باید روی سه مرحله تمرکز کرد:

قبل از ذخیره سازی

- استفاده از PL معتبر
- بررسی وضعیت EHP در مرکز تکثیر
- آزمایش مولدین طبق برنامه بهداشتی
- آماده سازی مناسب استخر
- ضد عفونی و خشک کردن مناسب در صورت امکان
- جلوگیری از ورود آب و تجهیزات آلوده

در طول پرورش

- پایش رشد
- پایش مصرف خوراک
- نمونه‌گیری منظم
- بررسی میگوهای کوچک
- کنترل مواد آلی
- مدیریت کف
- جمع‌آوری سریع میگوهای مرده
- جلوگیری از انتقال تجهیزات بین استخرها

هنگام انتقال یا برداشت

- جلوگیری از انتقال آب آلوده به استخرهای سالم
- تفکیک تجهیزات
- رعایت مسیر کار از استخر سالم به مشکوک/آلوده
- ضدعفونی مناسب تجهیزات

۲۰- رابطه EHP و تغذیه:

در EHP، هپاتوپانکراس درگیر است و بنابراین وضعیت تغذیه‌ای اهمیت زیادی دارد. ولی یک اشتباه رایج این است که تصور کنیم با دادن مکمل، ویتامین یا محرک ایمنی می‌توان EHP را درمان کرد. چنین محصولاتی ممکن است در بهبود وضعیت عمومی و کاهش استرس نقش داشته باشند، اما نباید آنها را درمان قطعی EHP تلقی کرد.

۲۱- EHP و کیفیت آب:

کیفیت نامناسب آب می‌تواند:

- استرس میگو را افزایش دهد
- رشد را کاهش دهد
- وضعیت ایمنی را ضعیف کند
- عفونت‌های ثانویه را تشدید کند

در نتیجه کنترل مناسب:

- اکسیژن محلول
- آمونیاک
- نیتريت
- pH
- شوری
- دما
- قلیائیت
- مواد آلی

جزء مدیریت کلی مزرعه است.

اما نباید تصور کرد که صرفاً با اصلاح pH یا آمونیاک، EHP از بین می‌رود.

۲۲- EHP از دیدگاه اقتصادی:

خسارت EHP بیشتر پنهان و تدریجی است.

برای مثال ممکن است:

- تلفات فقط اندک باشد
- اما وزن نهایی پایین بیاید
- دوره پرورش طولانی شود

- تعداد میگوهای کوچک افزایش یابد
- خوراک بیشتری مصرف شود
- FCR بدتر شود
- برداشت به تأخیر بیفتد
- قیمت فروش متوسط کاهش پیدا کند

بنابراین ممکن است استخر ظاهراً «زنده و سالم» باشد، اما از نظر اقتصادی عملکرد بسیار ضعیفی داشته باشد.