

بیماری‌زایی باکتری (*Vibrio parahaemolyticus*) در میگوی جوان پاشید غربی پرورشی (*Litopenaeus vannamei*)

چکیده

عفونت ویبریو پاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*) در مزارع پرورش میگوی پاشید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در منطقه دلواری بوشهر در سال ۱۳۹۹ بروز نمود. از همولف و هیاتوپانکراس میگوهای بیمار، باکتری‌های مهاجم ویبریو پاراهمولیتیکوس جداسازی گردید. بیماری‌زایی *V. parahaemolyticus* در ۳۰ نمونه میگوی سالم پرورشی با متوسط وزن 4 ± 0.76 گرم و متوسط طول 5.5 ± 0.61 سانتی‌متر که از مزارع پرورشی نمونه‌برداری گردیده بود، مورد آزمایش قرار گرفت. تزریق سوسپانسیون باکتری به همولف و عضله دم میگو به میزان 0.5 میلی‌لیتر با غلظت‌های (cells/ml) 10^4 ، 10^5 ، 10^6 به‌وسیله سرنگ انسولین 2 میلی‌لیتری از طریق جفت دوم پاهای حرکتی به سینوس‌های همولف و از راه عضله بند سوم شکمی به زیر کوتیکول عضله انجام شد. میگوهای تلف‌شده و در حال تلف شدن جمع‌آوری و پس از جداسازی باکتری‌ها روی محیط TSA و TCBS نمونه‌ها برای آزمایش‌های آسیب‌شناسی در محلول دیویدسن فیکس گردیدند. مقاطع بافتی تهیه‌شده هیاتوپانکراس و عضله دم با هماتوکسیلین اتوزین (H & E) و گیمسا رنگ‌آمیزی و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت. در تولید تجربی این بیماری در آزمایشگاه در نمونه‌برداری میکروبی، باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس از هیاتوپانکراس و همولف میگوهای در حال تلف شدن جداسازی گردید. نکروز هیاتوپانکراس، ایجاد رنگ‌دانه‌های حاوی باکتری‌های مهاجم در توپول‌های هیاتوپانکراس و گرانوله شدن بافت در ناحیه زخم مشهود بود. در بعضی نمونه‌ها باکتری‌های مهاجم بافت مفصلی و اسفنجی کوتیکول تلسون را عفونی نموده و فاگوسیتوز باکتری‌های مهاجم به‌وسیله سلول‌های خونی در بافت‌های مختلف، عفونت سیستمیک را نشان داد. تزریق عضلانی و تزریق همولفی سوسپانسیون میکروبی با تراکم (cells/ml) $10^5 - 10^6$ به مرگ 50 الی 90 درصد میگوها منجر گردید. از آنجاکه در این تحقیق تزریق باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس به میگو، عفونت سیستمیک در میگوهای در حال مرگ ایجاد نمود و گرانوله شدن و حضور باکتری‌های انکسپوله در محل‌های تزریق از $4 - 2$ روز پس از تزریق مشاهده گردید؛ بنابراین در شرایط مناسب و در صورت بروز استرس این باکتری می‌تواند یک عامل بیماری‌زا در میگوی پاشید غربی پرورشی قلمداد گردد.

واژگان کلیدی: ویبریو پاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*)، میگوی پاشید غربی، نکروز هیاتوپانکراس، آسیب‌شناسی.

مقدمه

با توجه به اهمیت جهانی و منطقه‌ای صنعت تکثیر و پرورش میگو و توسعه روزافزون این صنعت در کشور و جهان، ضرورت شناخت و حل مشکلات بهداشتی و بیماری‌های آن هرچه بیشتر احساس می‌گردد. در این میان عوامل عفونی، باکتریایی به‌ویژه عوامل مولد ویبریوزیس

مهران آوخی کیسمی^{۱*}

عیسی شریف پور^۲

افشار ذوقی شلمانی^۳

بابک تیزکار^۴

۱، ۳، ۴. بخش شیلات، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

*مسئول مکاتبات:

dr.keysami@gmail.com

کد مقاله: ۱۴۰۰۴۰۹۴۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۵

این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح پژوهشی است.

(Vibriosis) در سنین لاروی، پست لاروی، جوانی و بلوغ میگوهای پنائیده (Penaeidae) دیده می‌شوند (Anaya-Rosas et al., 2019). ویبریوزیس یکی از مهم‌ترین و جدیدترین بیماری‌های باکتریایی است که تلفات و خسارات قابل توجهی از ۱۰۰ - ۵۰ درصد در کارگاه‌های تکثیر و پرورش میگو ایجاد می‌کند (López-León et al., 2016).

عوامل مولد این بیماری ارگانیسم‌های جنس ویبریو *Vibrio* شامل یک گروه از باکتری‌های گرم منفی و اکسیداز مثبت و با اندازه ۳/۵ - ۱ در ۱ - ۰/۳ میکرون هستند که به اشکال میله‌ای خمیده و یا مستقیم دیده می‌شوند هستند که در محیط‌های آبی وجود دارند و حتی به‌عنوان فلور میکروبی آبزیان مانند میگو و ماهیان دریایی به فراوانی دیده می‌شوند (Luangpan, 1983; Chen, 1994; Lightner, 1988). ویبریوها شامل اشکال گرم منفی به‌صورت باسیل‌های مستقیم یا کمی خمیده به ابعاد ۲/۶-۴/۱ در ۳-۵/۰ میکرون، دیده می‌شوند (Hong To 2020 et al.,).

باکتری‌های جنس ویبریو غیر اسپورزا و از طریق یک یا چند تاژک قطبی غلاف دار متحرک می‌باشند. همه این ارگانیسم‌ها هوازی اختیاری و کموارگانوتروفیک بوده و اکسیداز مثبت هستند. اکثر گونه‌ها به‌خوبی روی محیط‌های حاوی آب دریا رشد کرده و یون‌های سدیم موجب تحریک رشد همه گونه‌ها شده و برای رشد بسیاری از گونه‌ها ضروری است. ویبریوها باکتری‌های همه‌جا حاضرند به‌ویژه در جایی که میزان مواد آلی بالا باشد. تاکنون مشخص شده که تعدادی از گونه‌های این جنس برای میگوها بیماری‌زا می‌باشند. حتی نژادهای مشخصی در داخل یک گونه شدیداً بیماری‌زا هستند. سایر نژادها ممکن است غیر بیماری‌زا و نقش عوامل ثانویه را داشته باشند. ویبریوهای دریایی بیشتر در آب‌های راکد حاوی کف زیان نرم همراه با میزان بالای مواد آلی حضور دارند. تراکم این باکتری‌ها در سواحل صخره‌ای و سواحل با آب‌های با هوادهی خوب به میزان زیادی کاهش می‌یابد. این بیماری تاکنون از تعداد زیادی از مزارع پرورش میگو گزارش گردیده است و در بعضی کشورها مثل تایلند موجب تلفات قابل توجهی گردیده است (Cheng et al., 2021).

ویبریوها از فلور باکتریایی طبیعی میگو محسوب گردیده و روی سطح بدن و دستگاه گوارش جانوران دریایی نیز به‌وفور یافت می‌شوند. ویبریو اغلب به‌صورت یک عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب و یا ثانویه در جمعیت‌های تحت استرس عمل می‌نماید (Krummenauer et al., 2014). به‌طور کلی ویبریوهای بیماری‌زا که از میگوهای پرورشی بیمار جداسازی شده شامل *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* و *V. damsela* بوده است (Tuan et al., 2016). نتایج تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد که از بین گونه‌های ویبریو، گونه‌های شامل *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* و *V. harveyi* مهم‌ترین عوامل تلفات ناشی از بیماری ویبریوزیس هستند (Chen and Hanna, 1994). واژه ویبریوزیس به انواع عفونت‌هایی که توسط باکتری‌های جنس ویبریو به وجود می‌آیند اطلاق می‌گردد. عفونت‌های گونه‌های ویبریو یکی از معمول‌ترین شکل بیماری‌های باکتریایی در میگوهای پرورشی است که علت آن فرصت‌طلب بودن عفونت‌های گونه‌های ویبریو است. ویبریوها از عدم سلامت میگوها که به هر دلیل ممکن اتفاق می‌افتد استفاده کرده و نتیجه این روند تلف شدن میگو است. باوجود این توانایی باکتری‌های جنس ویبریو در آسیب زدن به میگوها متغیر است. همواره به دلیل ایجاد اثرات پاتولوژیک متفاوت تعیین گونه‌های آسیب‌رسان ویبریو کاری بسیار مشکل است، برخی گونه‌های ویبریو مهاجم‌تر هستند و در شرایطی که حداقل استرس وجود دارد بیماری به وجود می‌آورند (Hossain et al., 2020). از آنجاکه از ۱۶۴ نمونه باکتری‌های ویبریوی جداسازی شده از میگوهای پرورشی شامل *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* و *V. harveyi* گونه‌های غالب جداسازی شده را تشکیل داده‌اند (مقاتلی، ۱۳۹۱)، بنابراین این تحقیق به‌منظور تعیین بیماری‌زایی *V. parahaemolyticus* در میگوی پا سفید غربی پرورشی طراحی و در مراکز آموزش عالی شیلاتی خلیج فارس بوشهر و میرزا کوچک خان رشت اجرا گردیده است.

مواد و روش‌ها

بیماری‌زایی باکتری *V. parahaemolyticus* در ۳۰ نمونه میگوی سالم پرورشی با متوسط وزن 4 ± 0.75 گرم و متوسط طول 5.5 ± 0.61 سانتی‌متر که از مزارع پرورشی سایت دلوار بوشهر نمونه‌برداری گردیده بود، مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور از مواد و روش‌های استاندارد آزمایش‌های باکتریایی، تهیه مقاطع میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی اسلایدهای میکروسکوپی استفاده شد. (Leangphibul and Nilakul, 1985). قبل از انجام آزمایش، جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه، میگوها در تانک ۱۰۰ لیتری فایبرگلاس که با استفاده از پمپ هوا، هوادهی گردید به مدت یک هفته نگهداری و با غذای پلت ساخت شرکت هوراش ۲ بار در روز تغذیه شدند. سپس باکتری مورد مطالعه (اهدایی از آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) روی محیط TSA حاوی ۲ درصد نمک، کشت آمیخته و کشت خطی گردید و در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. پس از رشد باکتری، با استفاده از محلول استریل ۲ درصد نمک، سوسپانسیون باکتری تهیه شد. تزریق سوسپانسیون باکتری به همولف و عضله دم میگو به میزان $0.5/0$ میلی‌لیتر با غلظت‌های 10^4 ، 10^5 ، 10^6 cells/ml به وسیله سرنگ انسولین ۲ میلی‌لیتری از طریق جفت دوم پاهای حرکتی به سینوس‌های همولف و از راه عضله بند سوم شکمی به زیر کوتیکول عضله انجام شد. پنج عدد میگو نیز به عنوان شاهد فقط با محلول استریل ۲ درصد نمک و به میزان $0.5/0$ میلی‌لیتر تزریق شدند. بعد از تزریق، میگوها به آکواریوم‌های با شوری ۳۸ قسمت در هزار و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد که به وسیله پمپ هوا، هوادهی شدند منتقل گردیدند. مرگومیر میگوها به مدت ده روز در هر تانک کنترل و ثبت گردید، هرروز ضمن کنترل و ثابت نگه‌داشتن شوری و درجه حرارت، میگوهای تلف شده و در حال تلف شدن جمع‌آوری و پس از جداسازی باکتری‌ها با کشت میکربی روی محیط TSA و TCBS، نمونه‌ها برای آزمایش‌های آسیب‌شناسی در محلول دیویدسن تثبیت گردیدند. به منظور بهتر تثبیت شدن، به بخش‌هایی از بدن میگو شامل هپاتوپانکراس و عضله ۲-۱ میلی‌لیتری محلول دیویدسن تزریق گردید. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از محلول فیکساتور به الکال ۷۰ درصد منتقل شد. بعد از جداسازی بافت‌های مورد نظر در ابعاد 1×1 سانتی‌متر، نمونه‌ها کدگذاری شده و به دستگاه تیشیوپروسور (DS2080/H) منتقل گردیدند. سپس در پارافین جامد قالب‌گیری گردیده و با استفاده از میکروتوم (YD 335) از آن‌ها مقاطع بافتی ۸-۶ میکرونی تهیه گردید. مقاطع بافتی هپاتوپانکراس و عضله دم با هماتوکسیلین ائوزین (H & E) و گیمسا با روش (Bell and Lightner, 1988) رنگ‌آمیزی گردیدند (2006, Scholnick, et al.).

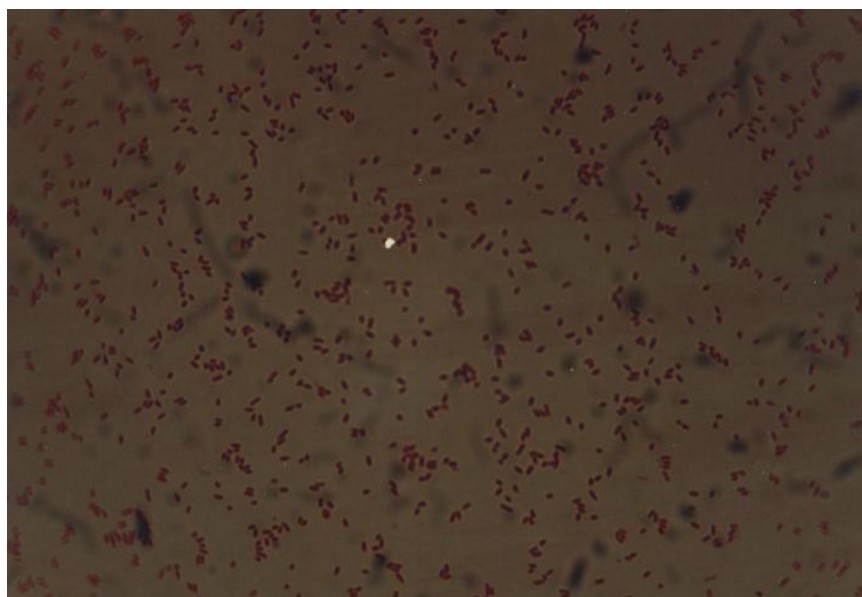
نتایج

مرگومیر حاصل از تزریق باکتری به همولف و عضله دم میگو در تراکم باکتریایی 10^4 صفر بود، اما در تراکم 10^5 - 10^6 cells/ml مرگومیر از روز چهارم تا روز دهم به ۹۰-۵۰ درصد رسید. از طرفی در مورد نمونه‌های کنترل (شاهد) هیچ تلفاتی ثبت نگردید. اگرچه تیمارهای قرار گرفته در معرض باکتری‌های ویبریو در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش علائم ظاهری و رفتاری طبیعی داشتند، اما بعد از ۷۲ ساعت علائمی مانند بی‌اشتهایی، شنای غیرطبیعی و در میگوهای در حال تلف شدن تغییرات ظاهری بی‌رنگ شدن بدن، خوابیدن در بستر آکواریوم و شنای جهشی بدون حرکت پاها، قرمزی ضمام حرکتی بدن، کم‌خونی و سفید شدن آب‌شش‌ها، لکه‌های قهوه‌ای یا سیاه‌روی پوسته، هپاتوپانکراس نرم و رنگ‌پریده، خالی بودن روده، خم شدن و پیچ خوردن در قسمت بند سوم شکمی، شکنندگی پوسته و خورده شدن تلسون بود و ناحیه تزریق ابتدا سفیدرنگ شده و پس از یک هفته زخم سیاهی از خود نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱: علائم ظاهری کلینیکی در میگوهای پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) تزریق شده با سوسپانسیون باکتری *Vibrio parahaemolyticus* با غلظت 10^5 (cells/ml) شامل خورده شدن تلسون (پیکان بزرگ).

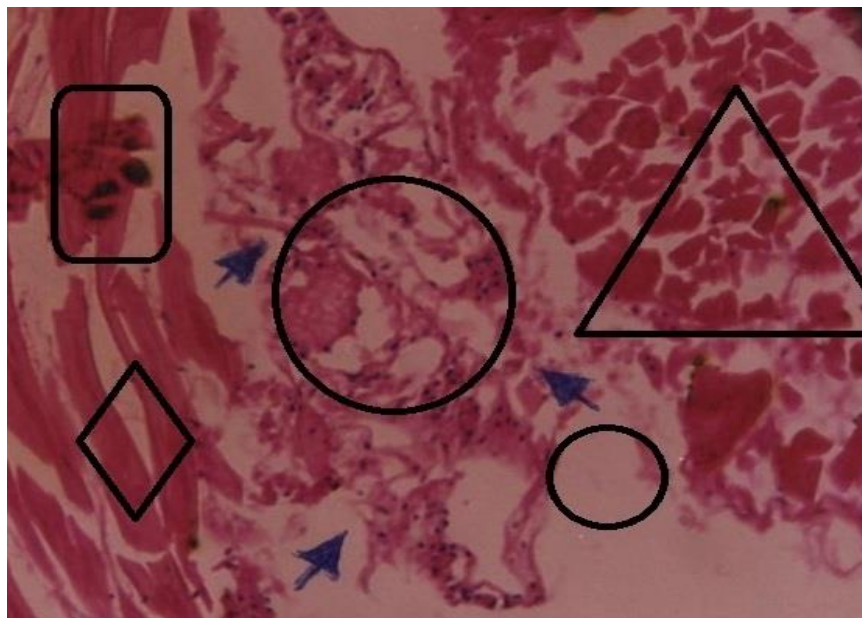
گروه شاهد در طول دوره ۹۶ ساعت ظاهر و رفتار طبیعی نشان داد. در نمونه‌برداری میکروبی از نمونه‌های میگوی تیمار، باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس از هپاتوپانکراس و همولنف میگوهای در حال تلف شدن جداسازی گردید. ویژگی‌های بیوشیمیایی و مرفولوژی باکتری جدا شده از میگوی در حال تلف شدن از جمله رشد روی TCBS، حساسیت به $10-129$ μg ، $\text{O}+/129$ ، رنگ سبز پرگنه، گرم منفی و اکسیداز مثبت بودن همان ویژگی‌های باکتری‌های تزریق شده بود (شکل ۲).



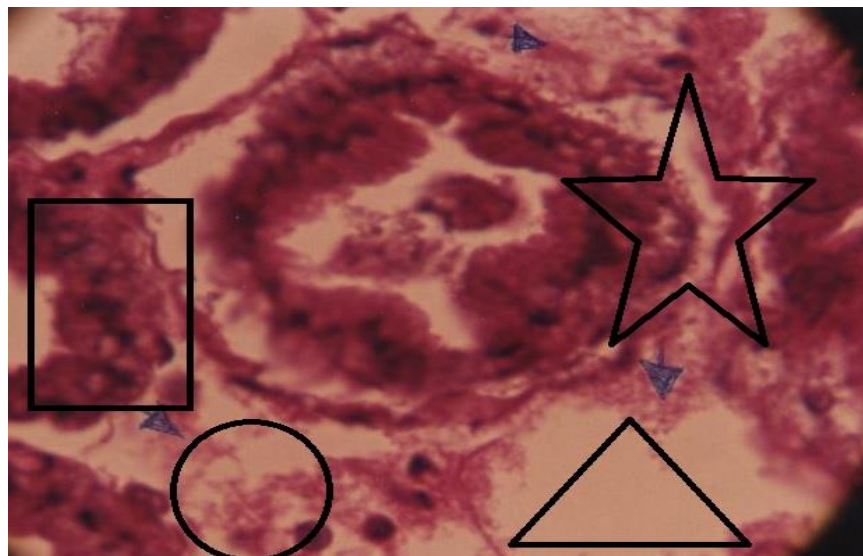
شکل ۲: شکل میکروسکوپی ویبریو بیماری‌زا (*Vibrio parahaemolyticus*) (X: 1000) تزریق شده به میگوهای تیمار در این تحقیق، حساس به $10-129$ μg ، $\text{O}+/129$ ، گرم منفی و اکسیداز مثبت.

در مطالعه میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه‌شده از عضله و هپاتوپانکراس میگوهای تزریق‌شده، سلول‌های باکتریایی در بافت پوششی (Epithelial tissue) میگوها مشاهده گردیده و در محل تزریق نکروز عضلانی ایجاد گردید. آسیب بافتی ویبریو در عضلات در محل تزریق، روی سطح کوتیکول نیز ملاحظه گردید. در برش‌های عرضی و طولی عضله میگوی پا سفید غربی ۹۶ ساعت پس از تزریق با باکتری و ویبریو پاراهمولیتیکوس با غلظت‌های (cells/ml) $10^6 - 10^5$ ، جداسازی رشته‌های بافت عضلانی از یکدیگر و ایجاد فاصله بین رشته‌ها و از بین رفتن بافت همراه با نکروز دیده شد که با بروز واکنش‌های دفاعی میگو به‌صورت ایجاد کپسول گرانوله توسط هموسیت‌ها همراه بود (شکل ۳).

در برش‌های عرضی و طولی هپاتوپانکراس میگوی پا سفید غربی ۹۶ ساعت پس از تزریق با باکتری و ویبریو پاراهمولیتیکوس با غلظت‌های (cells/ml) $10^6 - 10^5$ ، تغییر ساختار لوله‌های هپاتوپانکراس به‌طرف چروکیدگی و نکروزه شدن دیده شد. بدین شکل که سلول‌های پوششی ترش‌های لوله‌ها کاهش‌یافته و گاهی از بین رفته بود. محتویات سیتوپلاسم خارج‌شده از سلول‌های از بین رفته ترش‌های و سلول‌های نکروزه و هسته‌های کوچک‌شده آن‌ها در مجرای لوله‌های هپاتوپانکراس مشاهده گردید. بعلاوه نکروز دیواره لوله‌های هپاتوپانکراس و بافت‌های بین لوله‌ای باکم شدن تعداد سلول‌های زایا، سلول‌های ترش‌های کیسه‌ای و سلول‌های جذبی ذخیره‌ای و در نتیجه از بین رفتن لوله‌های هپاتوپانکراس در محل تزریق دیده شد که با بروز واکنش‌های دفاعی میگو به‌صورت ایجاد کپسول گرانوله توسط هموسیت‌ها همراه بود و تغییر ساختار سلول‌های ترش‌های از استوانه‌ای به مکعبی و اتساع دهانه مجاری ترش‌های و کاهش مواد ترش‌های درون مجاری بروز نمود (شکل ۴). برخی میگوها که عفونت هپاتوپانکراس داشتند در بافت کوتیکول کاراپاس نیز لکه‌هایی نشان دادند.



شکل ۳: برش عرضی و طولی عضله میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) ۹۶ ساعت پس از تزریق با باکتری *Vibrio parrahaemolyticus* با غلظت‌های (cells/ml) $10^6 - 10^5$ ، با جداسازی رشته‌های بافت عضلانی از یکدیگر (لوزی) و ایجاد فاصله بین رشته‌ها (مثلث) و از بین رفتن بافت همراه با نکروز (دایره‌ها) و ایجاد کپسول گرانوله توسط هموسیت‌ها (مستطیل) (H & E, X: 400).



شکل ۴: برش‌های عرضی و طولی هپاتوپانکراس میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) ۹۶ ساعت پس از تزریق با باکتری *Vibrio parahaemolyticus* با غلظت‌های $10^5 - 10^6$ (cells/ml).

تغییر ساختار لوله‌های هپاتوپانکراس به طرف چروکیدگی و نکروزه شدن (ستاره)، کاهش سلول‌های پوششی ترش‌چی، محتویات سیتوپلاسم خارج‌شده از سلول‌های از بین رفته ترش‌چی و سلول‌های نکروزه و هسته‌های کوچک‌شده آن‌ها در مجرای لوله‌های هپاتوپانکراس، کم شدن تعداد سلول‌های زایا، کاهش سلول‌های ترش‌چی کیسه‌ای و سلول‌های جذبی ذخیره‌ای و بعلاوه نکروز لوله‌های هپاتوپانکراس و از بین رفتن لوله‌ها در محل تزریق (مثلاً، کپسول گرانوله ایجادشده توسط هموسیت‌ها (مستطیل)، تغییر ساختار سلول‌های ترش‌چی از استوانه‌ای به مکعبی و اتساع دهانه مجاری ترش‌چی و کاهش مواد ترش‌چی درون مجاری (دایره) (H & E, X: 1000)

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق علائم بالینی و میکروسکوپی میگوهای در حال تلف شدن در آزمایشگاه مشابه علائم بالینی نمونه‌های مزارع پرورشی بود که قبلاً باکتری تزریق‌شده از آن‌ها جداسازی شده بود. بعلاوه باکتری‌های جداسازی شده در تولید تجربی بیماری در آزمایشگاه همان نمونه‌هایی بودند که به میگوها تزریق شده بود. گرچه جراحی در سطح کوتیکول و این بیماری تنها با ویبریونی که به هپاتوپانکراس حمله نموده است، بدون کمک عوامل بیماری‌زای دیگر مثل باکولوویروس و انگل‌ها نمی‌تواند کشنده باشند (Austin and Kumar *et al.*, 2021; Zhang, 2006).

جداشدگی رشته‌های بافت عضلانی از یکدیگر و ایجاد فاصله بین رشته‌ها و از بین رفتن بافت همراه با نکروز که با بروز واکنش‌های دفاعی میگو به‌صورت ایجاد کپسول گرانوله توسط هموسیت‌ها همراه بود و همچنین تغییر ساختار لوله‌های هپاتوپانکراس به طرف چروکیدگی و نکروزه شدن و نتایجی که در این تحقیق در هپاتوپانکراس دیده شد قبلاً به‌وسیله محققین مختلفی گزارش گردید (Kumar *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2021; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015).

هپاتوپانکراس در سطح فوقانی قسمت ابتدایی روده میانی و در سطح خلفی کیسه پشتی معده پیلوریک میگو قرار دارد. ساختار هپاتوپانکراس متشکل از لوله‌هایی با انتهای مسدود شده و دهانه ستاره‌ای شکل و حاوی ۴ نوع سلول می‌باشد. این سلول‌ها شامل سلول‌های خونی (Haemocytes)، سلول‌های ترشحی کیسه‌ای (B-cells)، سلول‌های جذبی ذخیره‌ای (R-cells)، سلول‌های زایشی (E-cells) می‌باشد. در تهاجم میکربی به بافت هپاتوپانکراس میگوی پرورشی با تحلیل و کاهش این سلول‌ها غیر از هموسیت‌ها مواجه هستیم. سلول‌های جذبی ذخیره‌ای موجود در دیواره لوله‌های هپاتوپانکراس حساس‌ترین سلول‌های بخش سطحی دیواره لوله‌های هپاتوپانکراس می‌باشد که تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Thao et al., 2020). نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با این یافته همخوانی دارند. بروز این تغییرات در بافت‌های عضلانی و هپاتوپانکراس میگوها می‌تواند به علت مسمومیت ناشی از سموم مترشح از باکتری تزریق‌شده باشد (Nguyen et al., 2021).

تغییر ساختار سلول‌های ترشحی از استوانه‌ای به مکعبی و اتساع دهانه مجاری ترشحی و ضخیم شدن سلول‌های جذبی-حفره‌ای در این تحقیق مشاهده گردید. ضایعات بافتی هپاتوپانکراس و ضخیم شدن قاعده سلول‌های لامینا در لوله‌های هپاتوپانکراس که بعد از تهاجم سلول باکتری به وجود می‌آید، درواقع یک دفاع و عکس‌العمل در برابر حضور باکتری در این ناحیه محسوب می‌گردد (Nguyen et al., 2021). این عکس‌العمل به تولید فیبرهای کلاژن جدید و سلول‌های چسبنده و با هسته و دوکی‌شکل (فیبروبلاست) منجر شده و باعث ضخیم شدن لامیناها می‌گردد و در نتیجه اتساع دهانه لوله‌های آسیب‌دیده هپاتوپانکراس در مراحل اولیه تهاجم باکتری می‌گردد (Thao et al., 2016).

فیبروبلاست‌ها با تولید رشته‌های کلاژن در بافت‌های گرانوله تجمع می‌یابند. این سلول‌ها درواقع یک نوع فیبر در قاعده سلول‌های لامینا در لوله‌های هپاتوپانکراس محسوب می‌شوند (Jiravnichpaisal and Myiazaki, 1994)، اما منشأ هموسیتی ندارند و هموسیت‌ها گرانول‌ها را به وجود می‌آورند که باکتری‌ها را فاگوسیتوز می‌کند (Thao et al., 2020). کپسول گرانول ایجادشده در لوله‌های آسیب‌دیده و عفونی هپاتوپانکراس از انتشار باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (Santos, 2020; Nguyen et al., 2021). ویبرو پاراهمولیتیکوس تاکنون توسط محققین مختلفی در دنیا از میگوهای پرورشی جداسازی گردیده است (Chandrakala and Priya, 2017; Rahman et al., 2010; Goarant et al., 2006). ویبریوز به دو حالت حاد و مزمن ظاهر می‌شود. البته برخی اشکال و حالت‌های همه‌گیر اسم ویژه‌ای دارند. مثلاً سندروم مرگ‌ومیر میگوی یک‌ماهه و عفونت‌هایی که مربوط به خراب شدن شرایط محیط استخر می‌باشند که ایجاد زخم‌های پوسته‌ای و عفونت‌های عمومی می‌نماید. شیار سیاه (Black splinter) درواقع زخم ملانیزه مزمن در عضلات ناحیه شکمی است. سندروم (Bolitos syndrome) بولیتوس که به حضور اشکال کروی کوچک و زنگوله‌ای مخلوط گل و سلول‌های اپیتلیال پوسته‌پوسته در روده میگو اشاره دارد و در آمریکای شمالی اتفاق افتاده است- سندروم مرغ دریایی به جذب مرغ‌های دریایی به میگوهای مرده استخر اشاره دارد (Kumar et al., 2020).

نوعی ویبریوزیس نیز وجود دارد که به نکروز هپاتوپانکراس شناخته‌شده و منجر به انهدام بخش بزرگی از هپاتوپانکراس می‌شود که در آن اندازه هپاتوپانکراس میگو کوچک و رنگ آن تیره می‌شود (Zhang et al., 2016) عفونت عمومی (Systemic infection) زمانی به وجود می‌آید که باکتری درون بدن میگو پراکنده‌شده باشد.

در شرایط استرس شدید و حدت بالای باکتری و بیماری‌زایی شدید تعداد زیادی از میگوها در یک دوره زمانی کوتاه تلف می‌شوند. بدون اینکه میگوها علائمی از خود نشان دهند به‌هرحال در عفونت‌های حاد میگوهای مبتلا علائم تغییر رفتاری از خود نشان داده و درحالی‌که بی‌حال می‌باشند در کناره‌ها و سطح آب استخر جمع می‌شوند. این‌گونه میگوها فاقد اشتها بوده و گاهی به رنگ‌های قرمز و آبی تغییر رنگ می‌دهند؛ اما اگر میگوها بعد از عفونت حاد تلف شوند ممکن است باکتری‌ها از بدن میگو حذف شوند و یا اینکه بیماری مزمن شود عفونت‌های مزمن در بافت‌های مختلف گره‌های تیره‌ای ایجاد می‌کند که امکان تشخیص آن فقط با آزمایش‌های آسیب‌شناسی به وجود می‌آید (Lu et al., 2020). در تایلند ویبرو پاراهمولیتیکوس عامل تلفات دسته‌جمعی میگوی مونودون پرورشی (Penaeus monodon) گزارش گردید. Aguirre-Guzmán و همکاران (۲۰۱۰)، Soto-Rodriguez و Gomez-Gil (۲۰۱۵)، Chandrakala و Priya (۲۰۱۷) نیز طی مطالعات

بیماری‌زایی باکتری (*Vibrio parahaemolyticus*) در میگوی جوان پاشید غربی پرورشی (*Litopenaeus vannamei*) / آوخ کیسمی و همکاران

آزمایشگاهی بیماری‌زایی این گونه را تأیید نمودند. در تحقیقات تجربی مشابهی Chen و همکاران (۱۹۹۲)، Jirvanichpaisal و همکاران (۱۹۹۴) و Zhang و همکاران (۲۰۱۶) نیز این نوع تلفات و ضایعات بافتی را گزارش نمودند. Liu و همکاران (۱۹۹۶) با تزریق دو گونه *V. parahaemolyticus* و *V. harveyi* به میگوهای پرورشی (Zhang et al., 2016; Baticados et al., 1991; Baticados, 1988) در میگوی سفید غربی، بیماری و ویبریوزیس ایجاد نمودند. در جداسازی و شناسایی باکتری تزریق‌شده که قبلاً از مزارع میگو جداسازی شده بود، علائم بالینی و ظاهری میگوهای بیمار مشابه با علائم گزارش‌شده از مزارع پرورشی می‌باشد (آوخ کیسمی، ۱۳۷۷). تلفات (۵۰-۹۰) درصد میگو، ضایعات هپاتوپانکراس و عضله که با حضور و تهاجم این باکتری‌ها به این اندام‌ها روبرو بوده است (Khimmakthong and Sukkarun, 2017) نشان می‌دهد که *V. parahaemolyticus* که از مزارع پرورشی جداسازی گردیده در شرایط مناسب و در صورت بروز استرس قادر به ایجاد بیماری و تلفات در میگوی سفید غربی بوده و می‌تواند یکی از علل ایجاد عفونت ویبریوزیس و یک عامل بیماری‌زا در میگوهای سفید غربی پرورشی قلمداد کرد (Nguyen et al., 2021). بنابراین این مطالعه نشان داد که قرار گرفتن در معرض غلظت‌های $10^5 - 10^6$ (cells/ml) باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس می‌تواند منجر به آسیب‌های بافتی هپاتوپانکراس و عضله‌ای در میگوی پاشید غربی شده و در نهایت عوارض ایجادشده می‌تواند منجر به بروز تلفات در این میگو شود.

سپاسگزاری

این تحقیق در واحد آموزش علوم شیلاتی خلیج فارس بوشهر و واحد آموزش علوم شیلاتی میرزا کوچک خان اجرا گردید که بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت کارکنان این واحدها و سایر دست‌اندرکاران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- آوخ کیسمی، م.، ۱۳۷۷. بررسی آلودگی ویبریوزیس در مزارع پرورش میگوی بوشهر. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۷۸ ص.
- اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۷. مطالعه تأثیر تغییرات برخی فاکتورهای محیطی بر گسترش آلودگی باکتریایی ویبریو هاروی در میگو سفید هندی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ۸۹ ص.
- مقاتلی، م.، ۱۳۹۱. بررسی آلودگی ویبریوزیس در مزارع پرورش میگوی سایت دلوار بوشهر. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی چهرم، ۹۸ ص.
- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J. G., Pérez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T. and Cruz-Hernández, N. E. D., 2010. Pathogenicity and Infection Route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the world Aquaculture Society, 41: 464-469.
- Austin, B. and Zhag, X. H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in applied microbiology, 43: 119-124.
- Baticados, M. C. L., 1988. Diseases in: Biology and culture of *Penaeus monodon*, Chapter 6: Seafsec Aquaculture Philippines. (pp. 139-178). Tigbauan, Iloilo, Philippines:
- Baticados, M. C. L., Lavilla – pitago, C.R. and Cruz, E.R., 1991. Studies on the chemical control of luminous bacteria *vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from *penaeus monodon* larvae and rearing water. Disease Aquaculture, 9: 133-139.
- Bell, T. A. and Lightner, V. D., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture society, 114p.

- Chandrakala, N. and Priya, S., 2017.** Vibriosis in shrimp aquaculture a review. International journal of scientific research in science, engineering and technology, 3(2): 27-33.
- Chen, S. N., Huang, S. L. and Kou, G. H., 1992.** Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial injections in cultured giant tiger prawn, *Penaeus monodon* in Taiwan. Oceanic institute, PP. 195-205.
- Chen, D. and Hanna, P. J., 1994.** Immuno detection of specific *Vibrio* bacteria attaching to tissues of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms, 20: 159-162.
- Cheng, Y., Ge, C., Li, W. and Yao, H., 2021.** The Intestinal Bacterial Community and Functional Potential of *Litopenaeus vannamei* in the Coastal Areas of China. Microorganisms. 2021 Aug 24; 9(9): 1793. doi: 10.3390/microorganisms 9091793. PMID: 34576689.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D. and De Decker, S., 2006.** Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. Systematic and applied microbiology, 29(7): 570-580.
- Hong To, T. T., Yanagawa, H., Khanh Thuan, N., Hiep, D. M., Cuong, D. V., Khai, L. T. L., Taniguchi, T., Kubo, R. and Hayashidani, H., 2020.** Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* Causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Shrimp in Shrimp, Molluscan Shellfish and Water Samples in the Mekong Delta, Vietnam. Biology (Basel). Sep 25; 9(10): 312. doi: 10.3390/biology9100312. PMID: 32992682 Free PMC article.
- Hossain, M. M. M., Uddin, M. I., Islam, H., Fardoush, J., Rupom, M. A. H., Hossain, M. M., Farjana, N., Afroz, R., Hasan-Uj-Jaman., Roy, H. S., Shehab, M. A. S. and Rahman, M. A., 2020.** Diagnosis, genetic variations, virulence, and toxicity of AHPND-positive *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon*. Aquaculture International, 28(6): 2531-2546. doi: 10.1007/s10499-020-00607-z. Epub 2020 Sep 28. PMID: 33013009 Free PMC article.
- Jiravnichpaisal, P. and Myiazaki, T., 1994.** Histopathology biochemistry and pathogenicity of *vibrio harveyi* infecting. Journal of Aquatic Animal Health, 6: 27-35.
- Khimmakthong, U. and Sukkarun, P., 2017.** The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. Microbial pathogenesis, 113: 107-112. doi: 10.1016/j.micpath.2017.
- Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G. and Wilson Wasielesky Jr., 2014.** The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT System. Journal of the world Aquaculture society, 45(1): 3-14.
- Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Raj, J. R. M., Rai, P., Shivanagowda, B. M. and Karunasagar, I., 2014.** Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. Aquaculture, 3(1): 433- 247.
- Kumar, R., Ng, T. H. and Wang, H. C., 2020.** Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. Reviews in Aquaculture, 2020 - Wiley Online Library.
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P. and Das, B. K., 2021.** Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. Toxins (Basel). 27; 13(8): 524. doi: 10.3390/toxins13080524. PMID: 34437395 Free PMC article. Review.
- Leangphibul, P., Nilakul, C., 1985. Investigation of pathogenic bacteria from shrimp farms. Journal of kasetsart sciences. 7: 171-199.
- Liu, P. C., Lee, K. K. and Chen, S. N., 1996.** Pathogen city of different isolates of *vibrio harveyi* in tiger prawn. Applied Microbiology, 22: 413-416.
- López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, P., María del Carmen Flores-Miranda, M. C., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P. and Diarte-Plata, G., 2016.** Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Latin American Journal, 44(3): 470-479.
- Lu, Y., Yang, L., Meng, J., Zhao, Y., Song, Y., Zhu, Y., Ou, J., Pan, Y. and Liu, H., 2020.** Microevolution of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Clinical, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Infecting Shrimps, and

- Aquatic Production in China. Microbes Environment, 35(2): ME19095. doi: 10.1264/jsme2.ME19095. PMID: 32201414 Free PMC article.
- Nash, N. and Tungmandi, C., 1992.** Vibriosis and its control in pond reared *penaeus monodon*. Asian Fisheries Society. Manila, PP. 143-155.
- Nguyen, H. T., Van, T. N., Ngoc, T. T., Boonyawiwat, V., Rukkwamsuk, T. and Yawongsa, A., 2021.** Risk factors associated with acute hepatopancreatic necrosis disease at shrimp farm level in Bac Lieu Province, Vietnam. Veterinary World, 14(4): 1050-1058. doi: 10.14202/vetworld.2021.1050-1058. Epub 2021 Apr 30. PMID: 34083959 Free PMC article.
- Nguyen, T. V., Alfaro, A., Arroyo, B. B. and Leon, J. A. R., 2021.** Metabolic responses of penaeid shrimp to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture, 533:71-49.
- Owens, L. and Muir, P., 1992.** The pathology of microbial disease in crustaceans. Asian fisheries Society. Manila, 165-172.
- Rahman, S., Khan, S. N. and Naser, M. N., 2010.** Isolation of *Vibrio* spp. From penaeid shrimp hatcheries and coastal waters of cox's bazar, Bangladesh, Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 1: 288-293.
- Santos, H. M., Tsai, C. Y., Maquiling, K. R. A., Tayo, L. L., Mariatulqabtiah, A. R., Lee, C. W. and Chuang, K. P., 2020.** Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. Aquaculture International, 28(1): 169-185. doi: 10.1007/s10499-019-00451-w, Review.
- Scholnick, D. A., Burnett, K. G. and Burnett, L. E., 2006.** Impact of Exposure to Bacteria on Metabolism in the Penaeid Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Biology Bulletin, 211: 44 -49.
- Song, Y. L. and Cheng, W., 1990.** Occurrence of *Vibrio vulnificus* in Taiwan. National society council. Taipei, p. 175-179.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M. and Morales-Covarrubias, M. S., 2015.** Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Microbiol. Applied Environmental Microbiology, 81(5): 1689-99. Doi: 10.1128/AEM.03610-14. Epub 2014 Dec 29.
- Soto-Rodriguez, S. A., Lozano-Olvera, R., Ramos-Clamont Montfort, G., Zenteno, E., Sánchez-Salgado, J. L., Vibanco-Pérez, N. and Aguilar Rendón, K. G., 2022.** New Insights into the Mechanism of Action of PirAB from *Vibrio Parahaemolyticus*. Toxins (Basel). Marine, 30:14(4): 243. doi: 10.3390/toxins14040243. PMID: 35448852 Free PMC article. Review.
- Thao, V., Nguyen, T. V., Alfaro, A., Bayot, B., Arroyo, B., Rodriguez Leon, J. Rodriguez Leon, A. and Sonnenholzner, S., 2016.** Metabolic responses of penaeid shrimp to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture, 533: 736174. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736174.
- Thao, V., Nguyen, T. V., Alfaro, A., Rodríguez, J., Bayot, B. and Sonnenholzner, S., 2020.** Changes in metabolic profiling of white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) under hypoxic stress. Journal of invertebrate pathology, 193: 107798. DOI: 10.1016/j.jip.2022.107798.
- Zhang, X., Song, X. and Huang, J., 2016.** Impact of *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) co-infection on survival of penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 34 (6): 1278-1286.