دوره پانزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۳۹۸
DOI: 10.22055/ivj.2018.109965.1996

ردیابی بیماری کوی هرپس ویروس (KHVD) در برخی مزارع کپورماهیان کشور: مطالعه‌ی مولکولی و آسیب‌شناسی

علی طاهری‌میرقائد[۱*]، آلا عنایتی[۲]، مهدی سلطانی[۳]، مجتبی علیشاهی[۴]، هومن رحمتی‌هولاسو[۵]، عادل حقیقی‌خیابانیان‌اصل[۶] و پژمان حسینی‌شکرابی[۷]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۲

چکیده

بیماری کوی هرپس ویروس، سبب ایجاد یک ویرمی حاد با تلفات تا ۱۰۰ درصد در کپورماهیان می‌شود. با توجه به بروز تلفات هر ساله و قابل توجه در مزارع کپور ماهیان پرورشی به ویژه مزارع استان خوزستان، احتمال ویروسی بودن بیماری در این مزارع وجود دارد. لذا هدف از این مطالعه، امکان شناسایی ویروس عامل KHVD در این مزارع بوده است. با مراجعه به ۱۴ مزرعه درگیر در طی سال‌های ۹۵-۹۴، در صورت بروز تلفات، بلافاصله ماهی کالبدگشایی و از بافت‌های آبشش و کلیه هر کدام یک گرم نمونه اخذ و در الکل ۸۰ درصد قرار داده شد و پس از برچسب‌گذاری برای پروسه‌ی آزمایشگاهی به آزمایشگاه انتقال داده شد و به روش Nested PCR (کیت IQ2000) مورد مطالعه قرار گرفت. برای مطالعه‌ی آسیب‌شناسی از بافت‌های آبشش، کلیه، کبد، مغز، قلب و روده چهار گونه کپور پرورشی نمونه‌گیری و از فرمالین ۱۰ درصد استفاده شد. نتایج حاصل از PCR برای تعداد ۷ نمونه از نمونه‌های مورد آزمایش در استان‌های خوزستان و گیلان با ایجاد باندهای ۲۲۹ و یا ۴۴۰ bp برای بیماری KHV مثبت تشخیص داده شد. در مطالعات آسیب‌شناسی مقاطع بافت آبشش، هایپرپلازی سلول‌های اپیتیلیوم پوششی لاملاهای ثانویه به همراه نفوذ سلول‌های التهابی اغلب تک‌هسته‌ای (به ویژه لنفوسیت‌ها) در اغلب مقاطع بافتی مشاهده شد. همچنین در تعدادی از مقاطع بررسی شده، نکروز شدید سلول‌های اپیتلیوم پوششی لاملاهای آبششی دیده شد. در بررسی مقاطع بافتی، کلیه در اغلب مقاطع، ساختار طبیعی داشته و فقط در تعداد کمی از توبول‌های ادراری به ویژه توبول‌های پروگزیمال، تورم سلولی در اپیتیلوم پوششی دیده شد. گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای در تعدادی از سلول‌های بافت مغز، قلب و روده به صورت کروماتین مارژینه مشاهده شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که برخی مزارع کپورماهیان کشور در استان‌های خوزستان و گیلان، مبتلا به بیماری KHVD بوده که می‌تواند یکی از عوامل دخیل در ایجاد سندرم تلفات تابستانه‌ی کپور ماهیان محسوب شود.

کلمات کلیدی: هرپس ویروس، ماهی کپور، مولکولی، آسیب‌شناسی

مقدمه

بیماری کوی هرپس ویروس Koi herpesvirus disease (KHD)، یک بیماری شدیداً مسری است که دارای میزان ابتلا و تلفات بسیار بالا در خانواده‌ی کپورماهیان می‌باشد (Hedrick et al. 2000, OATA 2001). این بیماری، سبب ایجاد یک ویرمی شدید و حاد در کپورماهیان و ماهی کوی می‌گردد. عامل بیماری،

[۱*] دانشیار گروه بهداشت و بیماری‌های‌آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه‌تهران، تهران، ایران E-mail: mirghaed@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانشجوی PhD بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴] استاد گروه علوم‌درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۵] استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های‌آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه‌تهران، تهران، ایران
[۶] کارشناس ارشد بهداشت و بیماری‌های آبزیان، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران
[۷] استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

هرپس ویروس تیپ ۳ خانواده کپورماهیان cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) از خانواده‌ی Alloherpesviridae می‌باشد که شامل هرپس ویروس‌های است که ماهیان و دوزیستان را آلوده می‌نماید. این ویروس، سبب نکروز شدید آبشش و نفریت، زخم‌های پوستی و خونریزی، و مرگ و میر تا ۱۰۰ درصد ماهیان می‌گردد (Reed 2014). ویریون هرپس ویروس، شامل یک کپسید ایکوزاهدرال به قطر ۲۰۰- ۱۰۰ نانومتر است که از ۱۶۲ کپسومر تشکیل شده است، که یک ژنوم DNA دو رشته‌ای خطی را در برگرفته است. ژنوم ویروس هرپس، دارای یک بخش DNA خطی دو رشته‌ای بوده، که ۳۰۰-۱۲۰kbp طول دارد (Reed 2014). ویروس KHV در حال حاضر به عنوان یکی از اعضای راسته‌ی هرپس ویرال و در خانواده‌ی آلوهرپس ویریده می‌باشد (Waltzek et al. 2005). از نظر فیلوژنتیکی شبیه به دیگر اعضای خانواده آلوهرپس ویریده از جمله: هرپس ویروس تیپ ۱ و ۲ خانواده‌ی کپورماهیان، ایکتالوری هرپس ویروس تیپ ۱، رانید هرپس ویروس تیپ ۱ و ۲ است (Waltzek et al. 2009).

خانواده‌ی آلوهرپس ویریده شامل ۴ جنس: باتراکو ویروس، سیپرینی ویروس، ایکتالوری ویروس و سالمونی ویروس می‌باشد. بر اساس شباهت، KHV متعلق به جنس سیپرینی ویروس، در کنار دیگر سیپرینی هرپس ویروس‌ها، CyHV-1، CyHV-2 و همچنین هرپس ویروس مارماهی آب شیرین I می‌باشد (Davison et al. 2009). KHV حداقل سه ژنوتیپ اصلی دارد: ۱- نژاد J از ژاپن و دو ژنوتیپ دیگر که بیش‌تر شبیه به یکدیگر هستند، ۲- نژاد I از فلسطین اشغالی و ۳- نژاد U از ایالات متحده‌ی آمریکا سرچشمه گرفته‌اند؛ بنابراین، این گونه‌ها به عنوان آسیا (-J) و اروپا (-I و -U) طبقه‌بندی می‌گردند (Avarre et al. 2011, Kurita et al. 2009).

نخستین مورد همه‌گیری شدید بیماری، در آلمان در سال ۱۹۹۷ میلادی گزارش شده است (Gilad et al. 2004)، در سال ۱۹۹۸، ویروس در ماهی کپور در آمریکا و فلسطین اشغالی تأیید شد. از آن به بعد موارد متعددی در آمریکا، فلسطین اشغالی، اروپا در کشورهای انگلستان، فرانسه، ایتالیا، هلند، بلژیک، دانمارک، سوئیس، استرالیا، لوکزامبورگ و نیز در برخی از کشورهای آسیا، مانند چین، هنگ کنگ، تایوان، اندونزی، ژاپن و جنوب آفریقا گزارش شده است (Radosavljevi et al. 2012). گسترش سریع این بیماری، می‌تواند به دلیل تجارت جهانی این ماهیان، بدون نظارت بهداشتی دامپزشکی باشد. محدوده‌ی میزبانی به طور مشخص و اثبات شده قطعی شامل کپور معمولی (*Cyprinus carpio carpio*) و کپورکویی (*Cyprinus carpio koi*) می‌باشد (Miyazaki et al. 2008). ولی به نظر می‌رسد سایر گونه‌های کپور ماهیان از جمله گلد فیش، کپورعلفخوار (*Carp Grass*)، کپور طلایی معمولی (*Golden Carp*)، کاراس (*Carassius carassius*) و کپور نقره‌ای به این بیماری مبتلا می‌شوند (El-Matbouli, et al. 2007, Fabian et al. 2013, Haenen and Hedrick 2006).

این بیماری، می‌تواند موجب ایجاد مرگ و میر ۱۰۰- ۸۰ درصدی شود و به نظر می‌رسد ماهیان در دمای آب ۲۷-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش‌تر به این بیماری حساس باشند. این بیماری ویروسی، ماهیان را در سنین مختلف مبتلا می‌نماید ولی تحقیقات نشان داده است که بچه ماهیان در مقایسه با ماهیان بالغ حساسیت بیش‌تری نسبت به این بیماری دارند (Reed 2014).

علائم بیماری شامل : الف) علایم رفتاری و فارمی: شروع تلفات سریع و سنگین، مرگ و میر ۴۸-۲۴ ساعت پس از علایم بالینی، باقی‌ماندن ماهی‌های آلوده و درگیر در سطح آب، شنای بی‌حال، ضربان آبشش شدید، کاهش اشتها، شنای تحریکی قبل از مرگ، بی‌رنگی پوست، رگه‌دار شدن آبشش به همراه PATCH های سفید رنگ، مشابهت با بیماری کلومناریس، مشاهده‌ی خونریزی در آبشش، گود رفتگی چشم‌ها، لکه‌های سفیدرنگ در پوست، زخم جلدی ناحیه‌ای (گاهی اوقات)، زخم و آزردگی شدید در آبشش، کم‌رنگی آبشش‌ها، وجود

PATCH در آبشش‌ها، وجود چسبندگی در حفره‌ی بدن، ابری شدن اندام‌های داخلی و تورم شدید در آبشش‌ها است.

ب) علایم آسیب‌شناسی : پرولیفراسیون توده‌های اپی‌تلیوم آبشش، نکروز در آبشش، وجود گنجیدگی‌های تکی در سلول‌های آبششی، نکروز سلول‌های پارانشیمی کبد، طحال، کلیه و لوله‌ی گوارشی، حضور ماکروفاژهای فراوان با ذرات هضم نشده در داخل آن، وجود گنجیدگی‌ها در بافت‌های عصبی، در کلیه‌ی سلول‌های خون‌ساز و سلول‌های اصلی هستند که تحت تأثیر قرار می‌گیرند. در موارد شدید، بسیاری از سلول‌های خون‌ساز دچار نکروزه شده و بسیاری از آن‌ها یک هسته پیکنوتیک دارند. بسیاری از سلول‌های اپی‌تلیال توبول‌های کلیه ظاهر ابری نشان می‌دهند (Miyazaki et al. 2008).

ویروس، حداقل ۴ ساعت در آب فعال و زنده است. راه‌های انتقال و انتشار عامل شامل: از طریق آبشش صدمه دیده به آب، گلبول‌های سفید و از آن طریق کلیه، ارتباط مستقیم با ماهی آلوده، مایعات خروجی ماهی آلوده، آب یا لجن سیستم‌های آلوده، ورود ویروس به بدن ماهی سالم از طریق آبشش یا روده (کاملاً مشخص نیست)، ماهی بهبود یافته از عوامل مهم انتشار بیماری می‌باشند. مانند سایر عفونت‌های هرپس ویروسی، اعتقاد بر این است که این ویروس در ماهیان مبتلا می‌تواند زنده باقی بماند. بنابراین، ماهیان در معرض و بهبود یافته از بیماری باید به عنوان حاملان بالقوه‌ی این ویروس در نظر گرفته شوند.

از جمله عوامل مؤثر در وقوع و تشدید بیماری، دما، ضعف سیستم ایمنی، سن پایین ماهی، عوامل ثانویه و غلظت ویروس در محیط می‌باشد. بسته به درجه‌ی حرارت آب، شدت ابتلا متفاوت بوده و ماهی مبتلا به صورت حامل بیماری در می‌آید. اغلب مرگ و میر در دمای ۲۸-۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد، اما ماهیان در دمای پایین‌تر از ۱۳ درجه و بالاتر از ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دچار بیماری نمی‌شوند (Reed 2014).

تشخیص ویروس KHV از طریق ELISA، Nested PCR و semi-nested PCR، real-time PCR، real-time TaqMan PCR، LAMP (Loop-mediated amplification methods)، کشت سلول (CCB، KF1، Tol/FL، AU، FHM، EPC، CCO) صورت می‌گیرد. بیش‌ترین غلظت ویروس در آبشش، کلیه و طحال و پس از آن در موکوس، کبد، روده و مغز مشاهده شده است. سیاست مقابله با بیماری به صورت قرنطینه و حذف ماهیان آلوده به ویروس است (Reed 2014). در جلسه‌ی مشورتی OIE در سال ۲۰۰۵ میلادی به عنوان بیماری قابل اخطار (Notifiable) معرفی شد.

طی سال‌های اخیر، صنعت کپورماهیان کشور با تلفات قابل توجه‌ای به ویژه در ایام بهار و تابستان مواجه شده است که مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده به وجود نقش عوامل باکتریایی، عوامل محیطی و انگلی پرداخته است. با این حال در زمینه‌ی علل ویروسی بودن این تلفات و یا نقش عوامل ویروسی در بروز این تلفات مطالعات اندکی صورت گرفته است. از آن جایی که در اکثر مواقع ماهیان تلف شده دچار مشکلات تنفسی (نکروز آبشش) می‌شوند و احتمال نقش هرپس ویروس‌ها از جمله KHV در بروز این تلفات می‌رود. لذا، هدف از این مطالعه ردیابی ویروس عامل KHVD در برخی مزارع کپورماهیان مبتلا به روش‌های مولکولی و آسیب‌شناسی می‌باشد.

مواد و روش کار

عملیات نمونه‌گیری از ماهیان مرضی (با علائم بالینی) از ۱۴ مزرعه مختلف در ۳ منطقه‌ی جغرافیایی کشور شامل استان خوزستان (۱۰۰ نمونه)، استان گیلان (۲۰ نمونه)، استان مازندران (۲۰ نمونه) در طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ انجام و از هر مزرعه حداقل تعداد ۱۰ نمونه ماهی اخذ شد. با مراجعه به مزارع طی این ایام، در صورت بروز تلفات بلافاصله ماهی کالبدگشایی و از بافت آبشش و کلیه (بیش‌ترین غلظت ویروس در این اندام‌ها) هر کدام

یک گرم نمونه گرفته شد و در الکل۸۰ درجه قرار داده شد و پس از برچسب‌گذاری برای پروسه‌ی آزمایشگاهی به آزمایشگاه انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به منظور تأیید نهایی با استفاده از روش Nested PCR مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین از بافت‌های آبشش، کلیه، کبد، قلب و روده چهار گونه پرورشی کپور (کپور معمولی، کپور نقره‌ای، کپور علفخوار و کپور سرگنده) نمونه جهت تهیه‌ی لام پاتولوژی اخذ گردید. از مغز نیز نمونه اخذ گردید و در محلول دیویدسون قرار داده شد (تصویر ۱).

تصویر ۱: نمونه‌برداری از بافت آبشش ماهیان مرضی و قرار دادن آن در الکل ۸۰ درجه

استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA (Bioflux، ژاپن) به روش زیر انجام گردید. ابتدا ۶۰۰ لاندا DTAB درون میکروتیوب ریخته شد. سپس مقداری از بافت ماهی (بیش‌تر از ۰/۲۵ گرم) درون DTAB ریخته و بعد از آن ۵ دقیقه در ۷۵ درجه قرار داده شد. سپس ۱۰ ثانیه ورتکس شد. به آن ۷۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد و ۲۰ ثانیه ورتکس و سپس ۵ دقیقه سانتریفیوژ (با دور ۱۲ هزار) شد. در این مرحله کاملاً دو فاز شد، فاز رویی که شفاف بود برداشته شد و حذف گردید. سپس در میکروتیوپ ۲ml، ۱۰۰ لاندا CTAB + ۹۰۰ لاندا ddH_2O ریخته و ۱۰ ثانیه ورتکس شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (با دور ۱۲ هزار) و بعد محلول رویی بیرون ریخته شد. پلاک ته میکروتیوب با ۱۵۰ لاندا محلول Dissolve حل شد. ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه ماند. سپس ۵ دقیقه سانتریفیوژ (با دور ۱۲ هزار)، بعد ۳۰۰ لاندا اتانول ۹۵ درصد درون میکروتیوب ۰/۵ ml ریخته شد. محلول شفاف رویی برداشته شد و به میکروتیوب ۰/۵ ml انتقال یافت. سپس ۱۰ ثانیه ورتکس و ۵ دقیقه سانتریفیوژ (با دور ۱۲ هزار) شد و مایع رویی دور ریخته شد. به میکروتیوب دارای پلاک کوچک، ۲۰۰ لاندا اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید. ۲ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۲ هزار دور قرار داده شد. مایع رویی دور ریخته شد. میکروتیوب به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه روی دستمال کاغذی برعکس قرار گرفت تا خشک شد. سپس ddH2O اضافه گردید (میزان اضافه کردن براساس اندازه پلاک بود). برای انجام PCR به روش کیت IQ2000 (ساخت تایوان) به ترتیب به شرح زیر عمل شد. ابتدا محلول‌های کیت ورتکس و سپس ۳۰ ثانیه در ۴ هزار دور سانتریفیوژ شد. سپس از محلول FIRST PCR ۷/۵ لاندا به ازای هر نمونه و آنزیم DNA پلی‌مراز ۰/۵ لاندا به ازای هر نمونه به میکروتیوب اضافه گردید و ورتکس شد. ۸ لاندا از Premix حاصل شده به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه DNA را میکس کرده و ۲ لاندا از آن به Premix اضافه شد. در میکروتیوب کنترل منفی: ۲ لاندا ddH2O به Premix اضافه شد برای کنترل مثبت، ۲ لاندا ویروس موجود در کیت به Premix اضافه شد. طریقه‌ی ساخت کنترل مثبت، رقت 10^{3} : ۱۸ لاندا آب

دپس + ۲ لاندا کنترل مثبت کیت = ۳ باند مشاهده شد. رقت $۱۰^{۲}$: ۱۸ لاندا آب دپس+ ۲ لاندا از رقت $۱۰^{۳}$=۲ باند تولید گردید. رقت $۱۰^{۱}$: ۱۸ لاندا آب دپس+ ۲ لاندا از رقت $۱۰^{۲}$ =۱ باند بر روی ژل مشاهده شد. پروتکل PCR مورد استفاده به شرح جدول ۱ بود. برای PCR دوم، ۱۴ لاندا از محلولNested PCR برای هر نمونه و ۱ لاندا از آنزیم DNA پلی‌مراز برای هر نمونه را به محصول PCR اول اضافه نمودیم. سپس طبق پروتکل جدول ۱، PCR انجام شد. الکتروفورز محصول PCR دوم در ژل ۲ درصد انجام پذیرفت.

جدول ۱: نحوه انجام آزمون Nested PCR

نوع PCR	نوع واکنش	تعداد چرخه	دما	زمان
مرحله اول	واسرشت اولیه	۱	۴۲	۳۰ دقیقه
	واسرشت	۱۵	۹۴	۲۰ ثانیه
	اتصال		۶۲	۲۰ ثانیه
	همانند سازی		۷۲	۳۰ ثانیه
	همانندسازی نهایی		۷۲	۳۰ ثانیه
مرحله دوم	واسرشت	۳۰	۹۴	۲۰ ثانیه
	اتصال		۶۲	۲۰ ثانیه
	همانند سازی		۷۲	۳۰ ثانیه
	همانندسازی نهایی		۷۲	۳۰ ثانیه

از بافت‌های آبشش، کلیه و کبد ماهیان مرضی در فرمالین ۱۰ درصد و از بافت مغز ماهیان مرضی نیز در محلول دیویدسون نمونه‌گیری و سپس به روش روتین هیستوتکنیک مقاطع بافتی ۵-۴ میکرونی تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و در زیر میکروسکوپ مطالعه شدند.

نتایج

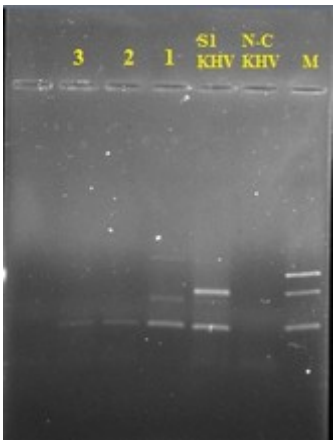
علائم بالینی مشاهده شده در تلفات مزارع کپورماهیان

در اکثر ماهیان تلف شده و ماهیان موجود در استخر دارای تلفات، علامت خون‌ریزی در تمام بدن به خصوص در سطح شکمی و ساقه‌ی باله و روی سرپوش آبششی مشاهده گردید. فراوانی این خون‌ریزی از میان چهار گونه کپورماهیان، بیش‌تر در ماهی فیتوفاگ مشاهده گردید. همچنین ضایعات آبششی و خون‌ریزی در چشم هم در ماهیان درگیر مشاهده گردید (تصویر ۲). در میان چهار گونه پرورشی کپور ماهی، بیش‌ترین میزان تلفات و علائم در ماهی کپور معمولی و کپور نقره‌ای مشاهده شد.

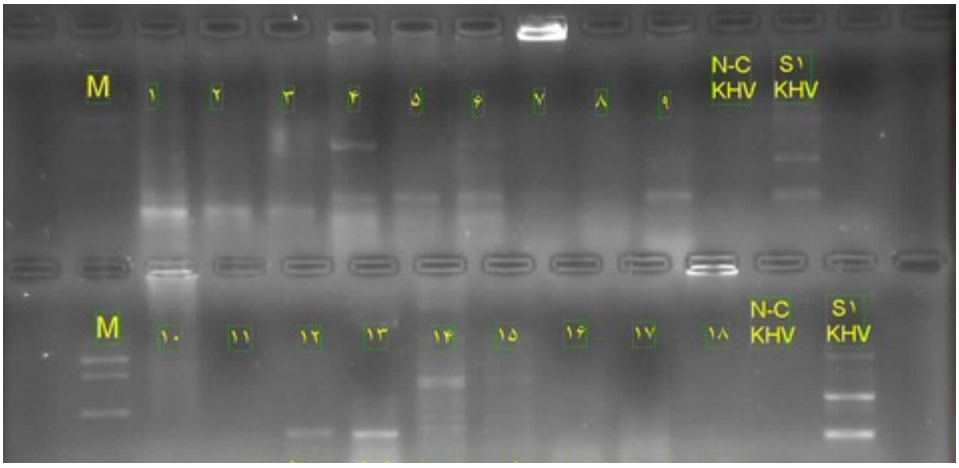
تصویر ۲: خون‌ریزی در چشم، ضایعات آبشش و علائم پتشی در سطح شکمی ماهی کپور معمولی

مطالعات مولکولی

با توجه به نتایج PCR برای تعداد ۷ نمونه (۶ نمونه در استان خوزستان و یک نمونه در استان گیلان) باندهای ۲۲۹ و/یا ۴۴۰ bp رویت گردید. که موید وجود KHV می‌باشد. تصاویر ۳ و ۴ نشان دهنده‌ی تصویر محصول PCR دوم بر روی ژل الکتروفورز با استفاده از کیت IQ2000 می‌باشد. حرف M نشان دهنده‌ی مارکر کیت می‌باشد. مارکر سه وزن bp۸۴۸ ، bp ۶۳۰ و bp ۳۳۳ را نشان می‌دهد. در تصویر ۳ نمونه‌ی ۱ مثبت می‌باشد و بقیه‌ی نمونه‌ها منفی می‌باشند. در تصویر ۵ نمونه‌های ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۳ مثبت می‌باشند. S_1 KHV کنترل مثبت کیت می‌باشد. همچنین N-C KHV کنترل منفی می‌باشد.



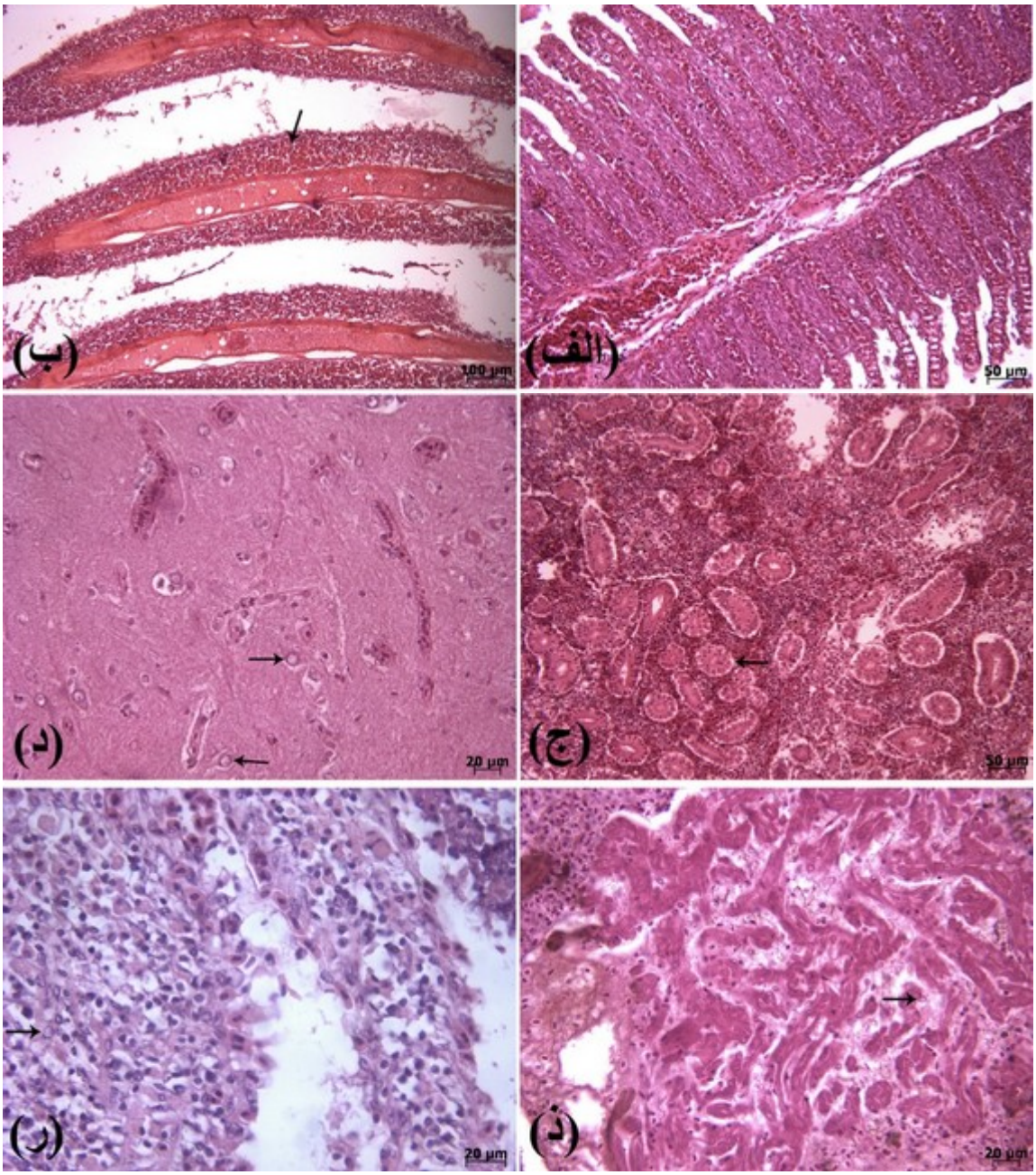
تصویر ۳: محصول مرحله دوم Nested PCR بر روی ژل الکتروفورز با استفاده از کیت IQ2000 (مارکر کیت=M، کنترل مثبت کیت = S1 KHV ، کنترل منفی =N-C KHV)



تصویر ۴: محصول مرحله دوم Nested PCR بر روی ژل الکتروفورز بر اساس کیت IQ2000 (مارکر کیت=M، کنترل مثبت کیت = S1 KHV ، کنترل منفی =N-C KHV)

یافته‌های هیستوپاتولوژی

در بررسی میکروسکوپی مقاطع بافت آبشش، هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم پوششی لاملاهای ثانویه به همراه نفوذ سلول‌های التهابی اغلب تک هسته‌ای (به ویژه لنفوسیت‌ها) در اغلب مقاطع بافتی مشاهده شد. همچنین در تعدادی از مقاطع بررسی شده، نکروز شدید سلول‌های اپیتلیوم پوششی لاملاهای آبششی دیده شد (شکل ۵ الف و ب). در بررسی مقاطع بافتی کلیه، اغلب مقاطع ساختار نرمال داشته و فقط در تعداد کمی از توبول‌های ادراری به ویژه توبول‌های پروگزیمال، تورم سلولی در اپیتلیوم پوششی دیده شد (شکل ۵ ج). در بررسی با بزرگ‌نمایی بیش‌تر از مقاطع هیستوپاتولوژی نمونه‌های بافتی، گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای در تعدادی از سلول‌های بافت مغز، قلب و روده به صورت کروماتین مارژینه مشاهده شد (شکل ۵ د، ذ، ر). همچنین در بررسی‌های میکروسکوپی مقاطع سایر بافت‌ها ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نشد.



تصویر ۵: الف) هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم پوششی لاملاهای ثانویه بافت آبشش. ب) نکروز شدید سلول‌های اپیتلیوم پوششی لاملاهای آبششی (فلش) به همراه نفوذ سلول‌های التهابی اغلب تک هسته‌ای به ویژه لنفوسیت‌ها. ج) تورم سلولی متوسط (فلش) اپیتلیوم پوششی در توبول‌های ادراری بافت کلیه. د-ر) گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای در سلول‌های بافت مغز، قلب و روده به صورت کروماتین مارژینه (فلش‌ها) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).

بحث

علی‌رغم توسعه‌ی آبزی‌پروری در کشور و رشد تولید ماهیان گرم آبی طی سال‌های اخیر، خسارات ناشی از بروز برخی بیماری‌ها نیز رو به افزایش می‌باشد. به طوری که بر اساس آمار سازمان شیلات ایران هر ساله بیش از پنج هزار تن خسارت به صنعت کپورماهیان کشور وارد می‌شود (آمارنامه سالیانه سازمان شیلات کشور). بیماری KHV یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی خسارت‌زا می‌باشد که شیوع و گسترش آن در سال‌های

اخیر موجب نگرانی‌های جدی در تکثیر و پرورش ماهیان گرم آبی به ویژه گونه‌های کپورماهیان گردیده است. این بیماری هر ساله موجب خسارات فراوانی در برخی مناطق دنیا از جمله شرق آسیا می‌شود (Agus Sunarto et al. 2005). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر که بر روی تلفات کپورماهیان تعدادی از مزارع واقع در استان‌های شمالی و جنوبی (گیلان، مازندران و خوزستان) انجام گرفت، نشان می‌دهد که برخی از مزارع مذکور مبتلا به هرپس ویروس عامل بیماری KHVD می‌باشند. یافته‌های مولکولی بیان‌گر وجود باندهای ۲۲۹ و/یا ۴۴۰ bp در تعداد ۷ نمونه ماهی کپور معمولی بوده است. نتایج بررسی میکروسکوپیک بر روی بافت‌های آبشش نمونه-های مذکور نیز نشان داد که هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم پوششی لاملاهای ثانویه به همراه نفوذ سلول‌های التهابی اغلب تک هسته‌ای (به ویژه لنفوسیت‌ها) در اغلب مقاطع بافتی مشاهده شد. همچنین در تعدادی از مقاطع بررسی شده نکروز شدید سلول‌های اپیتلیوم پوششی لاملاهای آبششی دیده شد که از جمله علائم پاتوگونومیک این بیماری محسوب می‌شود. همچنین گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای در تعدادی از سلول‌های بافت مغز، قلب و روده به صورت کروماتین مارژینه و در توبول‌های پروگزیمال ادراری، تورم سلولی در اپیتلیوم پوششی مشاهده گردید که با یافته‌های مطالعه Miyazaki و همکاران در سال ۲۰۰۸ هم‌خوانی دارد.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که هرپس ویروس کوی موجب بروز ضایعات آسیب‌شناسی شامل پرولیفراسیون سلول‌های اپیتلیوم آبشش، نکروز در آبشش، وجود گنجیدگی‌های تکی در سلول‌های آبششی، نکروز سلول-های پارانشیمی کبد، طحال، کلیه و لوله‌گوارشی، حضور ماکروفاژهای فراوان با ذرات هضم نشده در داخل آن، وجود گنجیدگی‌ها در بافت‌های عصبی، ظاهر ابری در بسیاری از سلول‌های اپیتلیال توبول‌های کلیه در برخی گونه‌های کپورماهیان از جمله کپور کوی و کپور معمولی می‌شود (Miyazaki et al. 2008)، که با ضایعات میکروسکوپی به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد.

با توجه به انجام مطالعات باکتریولوژی، انگل‌شناسی، قارچ‌شناسی بر روی نمونه‌های مذکور، لذا این گونه تلفات را می‌توان به بیماری KHV نسبت داد. به علاوه بخش فاکتورهای کیفی آب شامل آمونیاک و نیتریت در مزارع آلوده نشان داد که مقادیر گازهای سمی مذکور در حد قابل قبول بوده است. بنابراین با توجه به عدم وجود یافته‌های میکروبیولوژیک (باکتری، انگل، قارچ) و مناسب بودن کیفیت آب از طرفی و یافته‌های ماکروسکوپی (بالینی) و میکروسکوپی (هیستولوژی) از طرف دیگر همراه با یافته‌های مولکولی می‌توان بروز بیماری KHV را در برخی مزارع کپورماهیان تأیید نمود. به هر حال تأیید قطعی بیماری مستلزم کشت و جداسازی و شناسایی ویروس و نیز آزمایشات بیماری‌زایی تجربی است که نیازمند مطالعات آتی می‌باشد.

از جمله فاکتورهای مستعد کننده‌ی بروز این بیماری می‌توان به نقش درجه‌ی حرارت اشاره نمود به طوری که بیماری در دامنه‌ی درجه‌ی حرارت‌های ۲۸-۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد از شیوع بالاتری برخوردار است، از آن جایی که درجه‌ی حرارت آب استخرهای ماهیان مزارع آلوده (تشخیص داده شده) در این مطالعه در دامنه‌ی ۲۸-۲۵ درجه بوده است، لذا احتمال بروز و تشدید بیماری در مزارع کپور کشور در فصل گرما (اواخر بهار، تابستان و اوایل پاییز) وجود دارد. تنها، تشخیص موارد مثبت در مزارع استان خوزستان نیز مؤید نقش درجه‌ی حرارت بر بروز بیماری است. تا کنون مطالعات اندکی پیرامون علل تلفات تابستانه‌ی کپورماهیان کشور صورت گرفته است. Mortezaee و همکاران در سال ۲۰۱۳ به ردیابی بیماری ویرمی بهاره کپور پرداخته اما با نتایج منفی مواجه شدند. در مطالعه‌ی دیگری در کپور علفخوار تنها موفق به مشاهده‌ی برخی اجرام ویروسی با ساختمان رئوویروسی شدند اما با توجه به دامنه‌ی وسیع ویروس‌های آکوا و رئوویروسی نقش بیماری‌زایی آن تعیین نگردید

(Ahangarzadeh et al. 2015). در مورد ماهیان زینتی نیز مطالعات اندکی صورت گرفته است از جمله این موارد می‌توان به تشخیص مولکولی KHV (PCR) در ماهی دم شمشیری وارداتی توسط Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۷ اشاره نمود. همچنین ردیابی این ویروس در ماهی کوی به دنبال تلفات سنگین در سال ۲۰۱۵ توسط رحمتی و همکاران انجام گرفت (Rahmati-Holasoo et al. 2016).

علاوه بر این مطالعات دیگری به نقش باکتریایی علت تلفات تابستانه‌ی کپورماهیان پرداخته که از آن جمله می‌توان به مطالعات Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۶، Alishahi و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Ahangarzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۵ اشاره نمود که موفق به کشت و جداسازی و شناسایی برخی ایزوله‌های آئروموناس هیدروفیلا و آئروموناس سوبریا شدند. اما از آن جایی که عوامل باکتریایی مذکور عمدتاً نقش ثانویه دارند، لذا بروز تلفات سنگین و خسارت‌زا در ایام تابستان در برخی مزارع کپورماهیان می‌تواند ناشی از عواملی غیر از باکتری‌های مذکور مانند KHV باشد.

در خصوص منابع و مخازن ویروس هرپس کوی نیز مطالعات اندکی انجام شده است. Bergmann و همکاران در سال ۲۰۰۹ موفق به شناسایی ویروس در تعدادی از گونه‌های کپور ماهیان به ظاهر سالم و غیر کپور ماهیان شدند.

با توجه به یافته‌های مولکولی و هیستوپاتولوژی و نیز علائم بالینی بروز بیماری KHV در برخی مزارع کپورماهیان کشور از احتمال بالایی برخوردار می‌باشد که تأیید قطعی آن مستلزم مطالعات بعدی (کشت و جداسازی و شناسایی و مطالعه‌ی بیماری‌زایی ویروس) می‌باشد. از آن جایی که منابع و مخازن ویروس می‌تواند متنوع و از جمله ماهیان زینتی می‌باشد لذا احتمال می‌رود که ویروس از طریق واردات ماهیان زینتی آلوده به کشور وارد شده و از این طریق به برخی مزارع کپورماهیان سرایت نموده است. بنابراین، با توجه به حجم بالای واردات ماهیان زینتی و از جمله ماهی کپور کوی به کشور و عدم انجام آزمایشات ویروسی، قرنطینه توصیه می‌شود و سازمان دامپزشکی کشور تدابیر لازم برای نظارت و کنترل بیش‌تر به ویژه آزمایشات لازم ویروس‌شناسی را به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب حمایت مالی گرنت دانشگاه تهران و نیز قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران صورت گرفته است. نگارندگان از جناب آقای دکتر قاجاری مدیر کل محترم دفتر بهداشت و بیماری‌های آبزیان و جناب آقای دکتر مکی‌نیا رئیس بخش بیماری‌های آبزیان دامپزشکی استان خوزستان به خاطر حمایت‌هایشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Ahangarzadeh, M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Sharif rohani, M. and Soltani, M. (2015). Role of Aeromonas hydrophila in bacterial septicemia of cultured carps in khouzestan province. Iranian Veterinary Journal, 11(3): 5-16.

Alishahi, M.; Soltani, M. and Zargar, A. (2009). Bacteriological study of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) mortality in Khuzestan province. Iranian Veterinary Journal, 5(1): 25-34.

Avarre, J.C.; Madeira, J.P.; Santika, A.; Zainun, Z.; Baud, M.; Cabon, J. et al. (2011). Investigation of Cyprinid herpesvirus-3 genetic diversity by a multi-locus variable number of tandem repeats analysis. Journal of Virological Methods, 173(2): 320-327.

Bergmann, S.M.; Schütze, H.; Fischer, U.; Fichtner, D.; Riechardt, M.; Meyer, K. et al. (2009). Detection of koi herpes virus (KHV) genome in apparently healthy fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 29(5): 145-152.

Davison, A.J.; Eberle, R.; Ehlers, B.; Hayward, G.S.; McGeoch, D.J.; Minson, A.C. et al. (2009). The order herpesvirales. Archives of virology, 154(1): 171-177.

El-Matbouli, M.; Saleh, M. and Soliman, H. (2007). Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (Cyprinus carpio koi). Veterinary Record, 161(23): 792.

Fabian, M.; Baumer, A. and Steinhagen, D. (2013). Do wild fish species contribute to the transmission of koi herpesvirus to carp in hatchery ponds?. Journal of fish diseases, 36(5), 505-514.

Gilad, O.; Yun, S.; Zagmutt-Vergara, F.J.; Leutenegger, C.M.; Bercovier, H. and Hedrick, R.P. (2004). Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected Cyprinus carpio koi as assessed by real-time TaqMan PCR. Diseases of Aquatic Organisms; 60(2):179-87.

Haenen, O.L.M. and Hedrick, R. (2006). Koi herpesvirus workshop. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 26(1): 26-37.

Hedrick, R.P.; Gilad, O.; Yun, S.; Spangenberg, J.V.; Marty, G.D.; Nordhausen, R.W. et al. (2000). herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. Journal of Aquatic Animal Health, 12(1): 44-57.

Kurita, J.; Yuasa, K.; Ito, T.; Sano, M.; Hedrick, R.P.; Engelsma, M. et al. (2009). Molecular epidemiology of koi herpesvirus. Jpn. Soc. Fish Pathol. 44: 59-66.

Miyazaki, T.; Kuzuya, Y.; Yasumoto, Sh.; Yasuda, M. and Kobayashi, T. (2008). Histopathological and ultrastructural features of Koiherpesvirus (KHV)-infected carp Cyprinus carpio, and the morphology and morphogenesis of KHV. Diseases of Aquatic Organisms, 80: 1-11.

Mortezaei, S.R.S.; Alishahi, M.; Seifi, M.R. and Qhasemi, M. (2013). Comparison of four RNA isolating methods for identification of spring viraemia of carp virus (SVCV). Iranian Scientific Fisheries Journal, 22(4): 51-60.

OATA: *O*rnamental *A*quatic *T*rade *A*ssociation; a British organization representing the interests of ornamental fish importers, breeders, wholesalers, retailers, and manufacturers (2001).

Radosavljević, V.; Jeremić, S.; Ćirković, M.; Lako, B.; Milićević, V.; Potkonjak, A. and Nikolin, V. (2012). Common fish species in polyculture with carp as cyprinid herpes virus 3 carriers. Acta veterinaria, 62(5-6): 675-681.

Rahmati-Holasoo, H., Zargar, A.; Ahmadivand, S.; Shokrpoor, S.; Ezhari, S. and Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. (2016). First detection of koi herpesvirus from koi, Cyprinus carpio L. experiencing mass mortalities in Iran: clinical, histopathological and molecular study. Journal of fish diseases, 39(10), 1153-1163.

Reed, A.N. (2014). The conserved biology of herpesvirus latency: a study in cyprinid herpesvirus 3.

Soltani, M., Moghimi, S.M., Ebrahimzade Mousavi, H., Abdi, K. and Soltani, E., 2016. Isolation, phenotypic and molecular characterization of motile Aeromonas species, the cause of bacterial hemorrhagic septicemia in affected farmed carp in Iran. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 10(3), pp.209-216.

Sunarto, A.; Rukyani, A. and Itami, T. (2005). Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (Cyprinus carpio). Bulletin of Japan Fisheries Research: Supplement, 2: 15-21.

Waltzek, T.B.; Kelley, G.O.; Stone, D.M.; Way, K.; Hanson, L.; Fukuda, H. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. Journal of General Virology, 86(6): 1659-1667.

Waltzek, T.B.; Kurobe, T.; Goodwin, A.E. and Hedrick, R.P. (2009). Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish. Journal of aquatic animal health, 21(1): 60-67.

Study of Koi Herpes Virus Disease (KHVD) in Some Carp farm of Iran: A Molecular and Pathological Study

Taheri Mirghaed, A.[1]; Enayati, A.[2]; Soltani, M.[3]; Alishahi, M.[4]; Rahmati-Holasoo, H.[5]; Haghighi Khiabanian Asl, A.[6] and Hosseini Shekarabi, P.[7]

Received: 11.03.2018 Accepted: 13.11.2018

Abstract

Koi herpesvirus (KHV) is a highly contagious virus that causes significant mortality up to 100% in carp varieties. Considering the annual and significant casualties in carp farms, especially in Khuzestan province farms, there is a possibility of viral disease in these farms. The aim of this study was to detect the virus that causes KHVD in these farms. By referring to 14 farms with casualties during the years 2015-2016, fish were immediately slaughtered. Gill and kidney tissue samples were taken for one gram of sample and placed in 80% alcohol, and labeled for laboratory process, and transferred to the laboratory. Then by Nested PCR (Kit IQ2000) were studied. To study the pathology of gills, kidneys, liver, brain, heart and intestines samples were taken from four species of carp (common carp, grass carp, bighead carp and silver carp) and 10% formalin was used. The results of the PCR for 7 samples of the tested specimens in the provinces of Khuzestan and Gilan by creating bands 229 and / or 440 bp positive for KHV disease was diagnosed. In the pathological studies of gill tissue, epithelial hyperplasia of the secondary lamella enclosure with the infiltration of inflammatory cells, often single-nuclei (especially lymphocytes), was observed in most tissue sections. Also, in a number of examined sections, acute necrotic lesions of epithelium cells were observed. In the study of the kidney tissues, most sections of the normal structure were present and only in a small number of urinary tubules, especially proximal tubules, cellular swelling was observed in the epithelium. Intranuclear inclusion body was observed in a number of brain, heart and intestinal cells in the form of marginal chromatin. The results of this study indicate that some carp farm of Iran has been affected by KHV disease, which can be considered as one of the factors contributing to the occurrence of summer mortality syndrome in carp.

Key words: Herpes, Virus, Carp, Molecular, Pathology

1- Associate Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- PhD Student of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
5- Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
6- Aquatic Animal Health Expert, Office of Health and Control of Aquatic Animal Diseases, Iranian Veterinary Organization, Tehran, Iran
7- Assistant Professor, Department of Fisheries Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Taheri Mirghaed, A., E-mail: mirghaed@ut.ac.ir