وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران ـ پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان

عنوان :

ردیابی و شناسایی حاملین و میزبانهای حدواسط ویروس لکه‌سفید (White Spot Virus) در میگوهای وحشی و خرچنگ‌های خلیج‌فارس و دریای عمان

مجری :
بهروز قره وی

شماره ثبت
۸۸/۹۳٤

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مـؤسسه تحـقیقـات شیـلات ایـران- پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان

- **عنوان پروژه/** طرح: ردیابی و شناسایی حاملین و میزبانهای حدواسط ویـروس لکـه‌سـفید (White Spot Virus) در میگوهـای وحشی و خرچنگ‌های خلیج‌فارس و دریای عمان
- **شماره مصوب:**۸۶۰۳۴-۰۰۰۰-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۰۲۹-۴
- **نام و نام‌خانوادگی نگارنده/ نگارنده‌گان:** بهروز قره‌وی
- **نام و نام‌خانوادگی مجری مسئول(اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):**- -
- **نام و نام‌خانوادگی مجری/ مجریان:** بهروز قره‌وی
- **نام و نام‌خانوادگی همکاران:** سعید تمدنی- محمدافشارنسب- شاپور کاکولکی- عیسی کمالی- علی کریمـی- محمدرضـا صادقی- رامین کریم‌زاده- سیامک بهزادی
- **نام‌ونام‌خانوادگی مشاور(ان)** -
- **محل اجرا:** استان هرمزگان
- **تاریخ شروع:**۸۵/۱۰/۱
- **مدت اجرا:**۱ سال و ۹ ماه
- **ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران**
- **شمارگان(تیتراژ):۱۵ نسخه**
- **تاریخ انتشار: سال ۱۳۸۸**

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است- نقل مطالب تصاویر،جداول،منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Persian Gulf and Oman Sea
Ecology Research Center

Title:

Detection and identification of carriers of White spot Virus in wild shrimps and crabs in Persian gulf and Oman Sea(Hormozgan province)

Executor :
Behrooz Gharavy

Registration Number
2009.934

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION –Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center

---

Title : ***D****e*tection and identification of carriers of White spot virus in wild shrimps and crabs in Persian gulf and Oman Sea(Hormozgan province)
Apprpved Number: 4-029-200000-05-0000-86034
Author: Behrooz Gharavy
Executor *:* Behrooz Gharavy
Collaborator *:* Afsharnasab,M – Tmadoni,S – Kamali,E – Sadeghi,M.R — Kakolaki,S – Karimzadeh,R – Behzadi,S – Karimi,A
Location of execution : Hormozgan province
Date of Beginning : 2007
Period of execution : 1 Year & 9 Months
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : ***15***
Date of publishing : ***2009***
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Referenc

پروژه : ردیابی و شناسایی حاملین و میزبانهای حدواسط ویروس لکه‌سفید (White Spot Vir) در میگوهای وحشی و خرچنگ‌های خلیج‌فارس و دریای عمان

کد مصوب: ۸۶۰۳٤-۰۰۰۰-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۰۲۹-٤

با مسئولیت اجرایی : بهروز قره وی[۱]

توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان مورد ارزیابی و در تاریخ ۱۳۸۸/۵/۱۰ با نمره۱۷/۳۲ و رتبه خوب مورد تأیید قرار گرفت.

معاون تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات ایران

---

[۱]- آقای بهروز قره وی متولد سال ۱۳٤۹ در شهرستان بهشهر بوده و دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته دامپزشکی می‌باشد و در زمان اجرای پروژه: ردیابی و شناسایی حاملین و میزبانهای حدواسط ویروس لکه‌سفید White Spot Viru)در میگوهای وحشی و خرچنگ‌های خلیج‌فارس و دریای عمان

در ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت رئیس بخش بهداشت و بیماریها مشغول فعالیت بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- کلیات ۴
۱-۲- مروری بر مطالعات انجام شده ۹
۲- مواد و روش کار ۱۳
۲-۱- آماده کردن نمونه ها برای آزمایش PCR ۱۵
۲-۲- آماده کردن نمونه ها برای آزمایش آسیب شناسی بافتی ۱۷
۳- نتایج ۱۹
۴- بحث و نتیجه گیری ۲۲
پیشنهادها ۲۹
منابع ۳۰
پیوست ۳۲
چکیده انگلیسی ۳۶

چکیده

ویروس بیماری لکه سفید یک عامل بیماریزای شدید در میگوهای پنائیده بوده و دارای حاملین زیادی از قبیل خرچنگ های دریایی، کوپه پودها،میگوها وخرچنگ های آب شیرین می باشد. مطالعات زیادی در خصوص شناسایی و ردیابی بیماری لکه سفید میگو در دنیا صورت گرفته است. این تحقیق جهت ردیابی و شناسایی ویروس لکه سفید درمیگوهای وحشی و خرچنگ های سه منطقه از آبهای ساحلی استان هرمزگان شامل اطراف جزیره قشم، جزیره هرمز و آبهای ساحلی بندر جاسک انجام شد.نمونه برداری از مناطق یاد شده بصورت فصلی و به مدت یکسال و نیم از زمستان ۱۳۸۵ تا بهار ۱۳۸۷ انجام گرفت. در طول دوره نمونه برداری تعداد ۱۰۸۰عدد میگو ازهر گونه میگوی سفید هندی ، موزی ، ببری سبز و میگوی سفید(سر تیز) ، مجموعا" ۴۳۲۰ قطعه میگو، همچنین ۱۰۸۰ عدد خرچنگ جمع آوری شدند.اندام های مورد مطالعه آبشش و بااستفاده ازروشهای PCR واسیب شناسی بافتی بودند. آزمایشهای مولکولی PCR و آسیب شناسی بافتی تمامی نمونه های مورد مطالعه از لحاظ آلودگی به ویروس بیماری لکه سفید منفی بودند .

واژه های کلیدی : ویروس بیماری لکه سفید ، میگو، خرچنگ، خلیج فارس، حاملین

۱- مقد مه

درحال حاضر ۱۸۰۰۰۰ هکتار اراضی لم یزرع مناسب برای پرورش میگو در جنوب کشور و چند هزار هکتار در شرق استان مازندران و سواحل استان گلستان شناسایی شده است. تا پایان سال ۱۳۸۴ در حدود ۴۵۰۰۰ هکتار از این اراضی به متقاضیان واگذار شده است که حدود ۸۷۰۰ هکتار از این اراضی در حال تولید می باشند.

احداث ۳۶ واحد مرکز تکثیر و پرورش ۶ واحد کارخانه تولید خوراک میگو و ۳۰ واحد کارخانه عمل آوری بخشی از زیر ساخت های مورد نیاز صنعت تکثیر و پرورش میگوی کشوراست که در این سال ها بوجود آمده است. میزان تولید میگوی کشور از ۵۴ تن در سال ۱۳۷۳ به ۲۵۰۷/۵ تن در سال ۱۳۸۶ رسیده است.حداکثر میزان تولید میگوی پرورشی درکشور در اوج فعالیت صنعت پرورش میگو در سال ۱۳۸۳ به ۸۹۳۰ تن اسیده بود که استان بوشهر با ۵۶۰۰ تن (۶۳ درصد کل کشور) در این امر پیشرو بوده است. طی سال های اخیر بنا به دلایل متعدد رکود شدیدی دامنگیر این صنعت شد تا جایی که از کل اراضی واگذار شده بخش خصوصی تنها ۷۵۰۰ هکتار از انها به بهره برداری رسیده و از این مقدار نیز طی ۲ الی ۳ سال اخیر عملا کمتر از ۴۰ درصد ان به زیرکشت رفته است. بروز مسائلی مانند کاهش قیمت میگوی پرورشی در بازارهای جهانی میگو، بالا بودن نرخ تورم، بالا بودن نرخ سود و کار مزد تسهیلات بانکی ، عدم تکمیل زیر ساخت های مورد نیاز، پائین بودن راندمان تولید در مراکز تکثیر ، عدم دسترسی به منابع مولد مناسب، پائین بودن راندمان تولید در مزارع پرورشی ، پائین بودن نسبی سطح مدیریت و فن آوری در حلقه های مختلف تولید و بروز بیماریهایی مانند بیماری لکه سفید در استان های خوزستان و بوشهر و وقوع طوفان گونو در استان سیستان و بلوچستان تولید میگو را به حداقل رسانده و باعث شده تا این صنعت با تنگنا های بسیاری روبرو شود.

استان هرمزگان قطب اصلی آغاز فعالیت های پرورش میگو در کشور به شمار می آید. بسیاری از فعالیت های مربوط به تکثیر و پرورش میگو برای اولین بار در این استان انجام شده است. تاکنون ۶۹۵۰ هکتار از اراضی در قالب مجتمع ها و مزارع بزرگ پرورش میگو به متقاضیان واگذار شده است. سطح آماده کشت میگو بالغ بر ۱۴۳۰ هکتار است که در قطعات ۲۰ هکتاری واقع در مجتمع های پرورش میگوی پرورش میگوی تیاب جنوبی، شمالی و سایه خوش قرار دارد. میانگین تولید در واحد سطح در مزارع این استان در طی پنج سال اخیر در حدود ۱/۶ تا ۱/۸ تن در هکتار بوده است.

در حال حاضر،تمام فعالیت های تکثیر و پرورش میگوی کشور وابسته به صید و برداشت میگوی مولد مورد نیاز از دریا بوده و توجه کمتری به فعالیت مولد سازی می گردد. در این مورد استان هرمزگان تنها محل اصلی تامین میگوی مولد کشور (میگوی سفید هندی)در آبهای ساحلی بندر جاسک و اطراف آن می باشد.

استان هرمزگان از منظر صید و صیادی نیز دارای میگوهای تجاری مهم از قبیل میگوی موزی و میگوی ببری سبز در محدوده آبهای ساحلی خود می باشد، که گاهی فعالیتهای تحقیقاتی خاصی در خصوص تکثیر و پرورش آنها بنوان گونه های جایگزین میگوی سفید هندی انجام می گیرد.

در این سالها که علاقمندی به فعالیت های تکثیر و پرورش میگو در ایران و دنیا افزایش پیدا کرده تعدادی از بیماریها بعنوان تهد یدی بر صنعت پرورش میگو گسترش یافتند.

بسیاری از بیماری هایی که امروزه در میگو وجود دارند علل و اسباب آنها تحت ۵ عامل عمده طبقه بندی می شوند که شامل عوامل محیطی ، انگلی، قارچی ، باکتریایی و ویروسی می باشند. با وجودیکه ۴ عامل بیماریزای اولی باعث ایجاد مشکلاتی در صنعت تکثیر و پرورش میگو می شوند، این ویروس ها هستند که برای این صنعت مخرب و ویرانگر بوده اند. بخصوص ۵ بیماری ویروسی که عبارتند از : ۱- بیماری ویروسی مونودون باکلوویروس (MBV) ۲- بیماری ویروسی نکروز عفونی زیر پوستی و بافتهای خونساز(IHHNV) ۳- بیماری ویروسی تورآ (TSV) ۴- بیماری ویروسی کله زرد(YHD) ۵- بیماری ویروسی لکه سفید(WSD) (McCleannen,2004).

در سال ۱۹۸۹ در تمام جهان تنها ۶ ویروس درمیگو شناخته شده بود اما در سال ۱۹۹۶ این تعداد به بالای ۲۰ ویروس افزایش پیدا کرد. اولین شیوع بیماری ویروسی در مقیاس وسیع در سال ۱۹۸۷ به تایوان ضربه زد، زمانیکه ارزش تولیدات تایوان به کمتر از ۱ میلیون پوند رسید. بنابراین مهمترین تهد ید علیه تداوم پایداری صنعت پرورش میگو در دراز مدت همین بیماری های ویروسی هستند(McCleannen,2004).

۱-۱-کلیات

به نظر می رسد که بیماری اولین بار در سال ۱۹۹۱ در مزرعه ای در تایوان ظاهر و سپس در سال ۱۹۹۲ از چین گزارش شد. پس از آن بیماری به سرعت در سواحل چین گسترش و به کشورهای کره و هندوستان منتقل شد . در سال ۱۹۹۴ بیماری در تایلند ظاهر و بسیاری از مزارع پرورش میگوی این کشور را مبتلا نمود . از آن زمان تاکنون بیماری از بسیاری از کشورهای آسیایی از جمله بنگلادش ، هند ، اندونزی ، ژا پن ، مالزی ، فیلیپین ، سری لانکا ، تایوان و ویتنام گزارش شده است . در سال ۱۹۹۵ بیماری در تگزاس امریکا ظاهرو در سال های ۲۰۰۰-۱۹۹۹ در طول سواحل اقیانوس آرام از مکزیک تا پرو (شامل کلمبیا، کاستاریکا، اکوادور، گواتمالا، هندوراس، نیکاراگوئه، پاناما) گسترش یافت(سلطانی ۱۳۸۱). در سالهای ۱۳۸۱ و ۱۳۸۴ این بیماری فعالیت تکثیر و پرورش ایران را نیز بی نصیب نگذاشت و در دو استان خوزستان و بوشهر باعث ایجاد خساراتی به پرورش دهندگان گردید (افشار نسب و همکاران ۱۳۸۶).

در حال حاضر این ویروس در آسیا و آمریکای لاتین تهدید بزرگی برای صنعت پرورش میگو محسوب می شود. در آسیا از سال ۱۹۹۴ خسارت های مستقیم وارده به صنعت سالانه بیش از یک هزار میلیون دلار بوده که احتمالا علت اصلی آن ، این بیماری می باشد. بهمین ترتیب خسارت های زیادی در امریکای لاتین توسط این ویروس وارد شده است. برای مثال در شش ماه اول نخستین سال ظهور بیماری در اکوادور به تولید میگوی آبی و میگوی سفید غربی پرورشی خساراتی در حدود ۶۳۰۰۰ تن به ارزش ۲۸۰ میلیون دلا رامریکا وارد نموده است.اطلاعات بدست آمده از از مرکز ملی آبزی پروری اکوادور نشان داد که به دنبال وقوع بیماری ویروسی لکه سفید، صادرات میگو از ۱۱۵۰۰۰ تن در سال ۱۹۹۸ به ۳۸۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۰ کاهش یافت و در سال ۲۰۰۲ با اندکی بهبودی به ۴۷۰۰۰ تن و احتمالا در سال ۲۰۰۳ به ۵۰۰۰۰ تن خواهد رسید(فائو، ۱۳۸۶). در ایران نیز بروز بیماری در مزارع آبادان در سال ۱۳۸۱ تنها موجب صرف هزینه ای بالغ بر ۷۰۰ میلیون تومان برای ضدعفونی استخر ها شده است (سلطانی ۱۳۸۱).

بهر حال با توجه به گستردگی شیوع این بیماری در بین کشورهای مختلف نام های مختلفی نیز برای این بیماری ذکر شده است(Sangamamaheswaran and Jeyaseelan,2001) از آن جمله:

۱- بیماری ویروسی لکه سفید۱(Wang *et al* 1997)

۲- سندرم لکه سفید ناشی از باکلوویروس۲(Chang *et al* 1996, Chou *et al* 1998)

۳- سندرم لکه سفید۳(Chou *et al* 1995, Shdha *et al* 1998 , Wang et al 1999)

۴- آلودگی ویروسی لکه سفید۴(Wongteerasupaya *et al* 1996 , flegel *et al* 1997)

۵- بیماری سیستمیک اکتودرمی و مزودرمی باکلوویروسی۵(Sahul hameed *et al* 1998, anon 1994)

۶- نکروز بافت خونساز و زیر پوستی باکلوویروسی۶ (Cai *et al* 1995)

۷- ویروس سندرم لکه سفید۷(Rajendran *et al* 1999).

ویریون عامل مولد بیماری لکه سفید یک ویروس دو رشته ای DNA دار به شکل بیضوی با یک کپسول سه لایه ای و یک تاژک انتهایی در یکی از قطب ها بوده و دارای شیارهای منظم مات و شفاف عمود بر محور طولی نوکلئوکاپسید می باشد. این ویروس تنهاعضو خانواده نیماویریده(Nimaviridae) از جنس ویسپوویروس (Whispovirus) می باشد(Rahman,2007)، ابعاد این ویروس در کشورهای مختلف با هم اختلاف دارند بطوریکه ابعاد آن را در میگوهای پرورشی ۶ کشور آسیایی مشخص کرده اند(جدول ۱) (Kasornchandra *et al* 1998).

جدول(۱) ابعاد ویروس های جدا سازی شده عامل بیماری لکه سفید در ٦ کشور آسیایی

کشور	اندازه ویریون(نانومتر)	اندازه نوکلئوکاپسید(نانومتر)
چین	۱۲۰×۳۳۰±۱۰	۸۵× ۲۷۰±۲۵
ژاپن	۸۳ × ۲۷۵	٥٤× ۲۱٦
اندونزی	۲۰ ± ۳۲۰ × ۱۲۰	۲۰ ± ۲٦۰ ×۸۰
تایلند	۲۲ ± ۲۷۵ × ۱۲۰	۱۳ ± ۲۳٦ × ۸۵
مالزی	۱۵ ± ۲۷۵ × ۱۲۰	۲۰ ± ۲۳۰ × ۸۵
هند	۳۰ ± ۲۷۰ × ۱۱۰	۳۵ ± ۲٦۰ × ۸۰

1 – White spot viral disease(WSVD)
2 – White spot syndrome associated baculovirus(WSBV)
3 – White spot syndrome(WSS)
4 – White spot viral infection
5 – Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus disease(SEMBVD)
6 – Hypodermal and haematodermal necrosis baculovirus (HHMBV)
7 – White spot syndrome virus(WSSV)

۱-۱-۱- نشانی های بیماری

عفونت حاصله از بیماری با پیدایش لکه های سفید در کوتیکول میگوهای مبتلا همراه با تلفات سنگین و ناگهانی تا ۱۰۰ درصد می باشد، که ممکن است در طول ۳-۷ روز پس از تهاجم ویروس صورت گیرد گاهی نیز ممکن است علامت فوق کمتر قابل مشاهده بوده ولی تلفات سریع ، ناگهانی و بسیار شدید باشد(سلطانی ۱۳۸۱). بطور کلی علائم ظاهری بیماری در میگوهای آلوده بدین صورت است : لکه های سفید ابتدا در کاراپاس میگو و سپس در بند های پنجم و ششم بدن ظاهر می شوند سپس این این لکه ها توسعه یافته و تمام بدن را فرا می گیرند.اندازه لکه های سفید متغیر بوده و بین ۰/۵ تا ۲ میلیمتر می با شد. در اغلب موارد لکه ها بصورت دانه های تسبیح پشت سر هم قرار می گیرند. لکه های سفید غالبا در زیر کوتیکول ایجاد می‌شوند.علاوه بر ایجاد لکه سایر علائم کلینیکی و بالینی قابل مشاهده در میگو عبارتند از:

۱- جدا شدن آسان کوتیکول از لایه اپیدرم

۲- بزرگ و شکننده شدن هپاتوپانکراس میگوهای آلوده

۳- تاخیر در انعقاد همولنف میگوی آلوده یا عدم انعقاد آن

۴- بی اشتهایی میگوی الوده و عدم تمایل به خوردن غذا و فعالیت های حرکتی در میگو

۵- قرمز شدن اندام های بدن میگوی بیمار و ظاهر شدن آنها در در کناره های استخر وسطح آب

۶- در نهایت ایجاد مرگ و میربسیار زیاد بین ۷۰ تا ۱۰۰ درصد طی یک هفته پس از شروع بیماری (تخم افشان و تمجیدی ۱۳۸۲)

اکثر پرورش دهندگان اعتقاد دارند که لکه های سفید موجود در اسکلت خارجی میگو به عنوان شاخص تشخیصی برای بیماری لکه سفید بوده و اقدام به برداشت اضطراری محصول بدون شناخت علت واقعی می کنند. در حالی که سه احتمال برای تشکیل لکه های سفید در میگو وجود دارد که عبارتند از : ۱) لکه های سفید ناشی از بیماری لکه سفید ویروسی ۲) لکه های سفید ناشی از بالا بودن PH آب ۳) لکه های سفید ناشی از آلودگی باکتریایی . تنها در نوع اول ایجاد لکه سفید است که میگو دارای تلفات معنی داری از خود نشان داده و آزمایشات PCR و آسیب شناسی بافتی آنها مثبت می گردند .

ویروس بیماری لکه سفید دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و تاکنون اغلب گونه های میگو در شرایط آزمایشگاهی به بیماری مبتلا شده اندو همگی از حساسیت بالایی نسبت به ویروس عامل بیماری برخوردار بوده‌اند . به طوری که تاکنون مشخص شده که بیماری براحتی در بیش از ۳۰ گونه میگوی پرورشی و وحشی قادر به ایجاد تلفات بالایی است. میگوهای سفید هندی ،ببری سبز و میگوهای موزی نیز از آن جمله هستند. به علاوه دامنه میزبانی عامل بیماری سایر سخت پوستان دریایی و آب شیرین را نیز در بر می گیرد که از آن جمله می توان به انواعی از گونه های خرچنگ دراز اب شیرین اشاره نمود (پیوست ۱) (Flegel 1996).

بنابر این با توجه به دامنه میزبانی وسیع به ویژه در خرچنگ ها (بدون بروز علائم بالینی بیماری) و با توجه به وجود خرچنگ ها و سایر سخت پوستان در نزدیکی مزارع میگو ، امر ریشه کنی بیماری را با سختی مواجه کرده است .

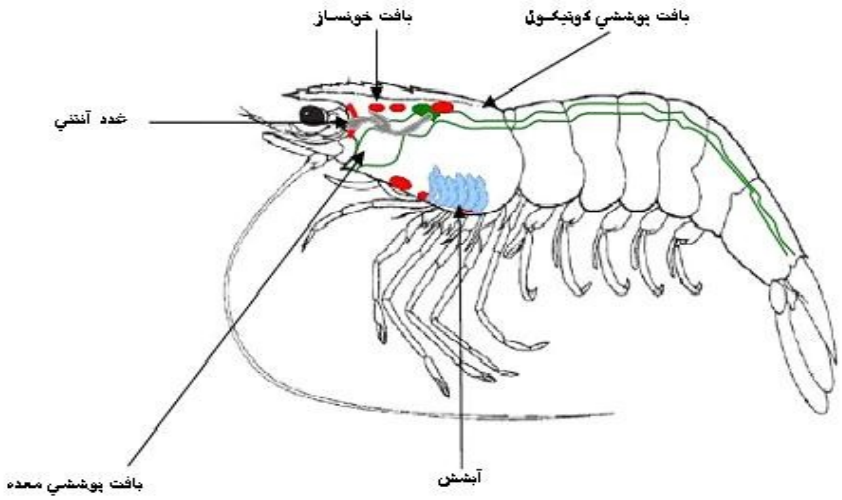
به نظر می رسد خرچنگ ها مخزن عمده ای برای ویروس عامل بیماری محسوب می شوند ، و از آنجایی که میگوهای مولد به عنوان حاملین بدون علامت ویروس عمل می کنند لذا به نظر می رسد که ویروس را در جمعیت های وحشی برای مدت طولانی حفظ می نمایند . به علاوه شواهد نشان می دهد که بیماری به صورت عمودی (مادرزادی) نیز قابل انتقال است که این موضوع خود ریشه کنی بیماری را مشکل تر می سازد ، ضمن این که باید توجه داشت که نتایج مطالعات نشان می دهد که ویروس عامل بیماری قادر به ادامه حیات برای مدتی (۳-۲ روز) در خارج از بدن میزبان (در ستون آب) می باشد که خود به انتقال بیماری از طریق آب کمک زیادی می نماید (سلطانی ۱۳۸۱) .

روش های تشخیصی متنوعی برای ردیابی و شناسایی بیماری استفاده می شود ، که این روش ها عبارتند از : آسیب شناسی بافتی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و نوری ، استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ، هیبریداسیون در جا DNA (Flegel 2004 Lightner 1996;) .

درمطالعات آسیب شناسی بافتی نشان داده شده که ویروس عامل بیماری لکه سفید در میزبان های خود آسیب‌های بافتی وسیعی را باعث شده به طوری که باعث دژنرسانس سلولی در سطح وسیعی از بافت ها ، هیپرتروفی شدید هسته ای ، حاشیه نشینی کروماتین در بافت های اکتودرمی و مزودرمی می گردند. بطوریکه دراکثر بافتها و اندام های بدن میگوی آلوده از جمله: بافت پوششی زیر کوتیکول ، آبشش ، اپی تلیوم بافت معده ، بافت های هماتوپوئیتیک ، ارگان لمفوئید ی ، بافت های عصبی ، بافت عضلانی ، هپاتوپانکراس، قلب،

پاهای شنا و حرکتی، روده میانی، روده خلفی،چشم های مرکب، ساقه چشمی، بافت های تخمدان و بیضه و غدد آنتنی شناسایی شده اند.در اندام های هپاتوپانکراس و قلب میگوی آلوده ویروس تنها در بافت های همبند این اندام ها مشاهده شده اند(Rahmam,2007).

مهمترین بافتهای هدف برای تکثیر ویروس در بدن در شکل (۱) نشان داده شده اند. ویروس لکه سفید بعد از ورود به بدن و تکثیراولیه در این اندام ها از طریق گردش همولنف به سایر اندام های بدن منتشر گردیده و موج جدیدی از عفونت را در بدن ایجاد می کند(Escobbedo-Bonilla *et al*,2007).



شکل(۱) مهمترین بافتهای هدف تکثیر ویروس لکه سفید در بدن میگو

مطالعات میکروسکوپیک بافت های آلوده نشان می دهد که تغییرات سلولی در همه بافت های مبتلا مشاهده شده به طوری که در مراحل اولیه غفونت سلول های حساس دچار هیپرتروفی هسته ، تجزیه یا حذف هستک و حاشیه نشینی کروماتین می شوند . سپس در این سلول های آلوده گنجیدگی های داخل هسته ای ائوزینوفیلی(تیپ Cowdry A) پیشرفته ظاهر می شود که بعدا" حالت بازوفیلی پیدا کرده و گنجیدگی های متراکم شده توسط یک ناحیه شفاف از کروماتین هسته جدا می گردد . در مراحل بعدی عفونت با از هم گسیختن غشاء هسته ، ناحیه شفاف هسته با سیتوپلاسم شفاف در هم آمیخته می شود .

در مراحل انتهایی با تخریب سلول مبتلا ، هسته یا تمام سلول متلاشی و منجر به ایجاد فضاهای خالی در مقاطع بافتی می شود . (سلطانی ۱۳۸۱ ، افشارنسب ۱۳۸۷)

از آنجایی که تشخیص بیماری از طریق آسیب شناسی بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی زمان زیادی طول می کشد و در مواردی نیاز به یک پاسخ سریع جهت تشخیص بیماری می باشد امروزه از PCR به عنوان یک روش تشخیص مناسب و سریع استفاده می شود . روش PCR دو مرحله ای نسبت به روش یک مرحله‌ای آن ۱۰۰۰۰ مرتبه حساس تر می باشد به طوری که بیان می شود میگوهای آلوده ای که با PCR یک مرحله ای شناسایی می شوند ، طی ۳-۲ روز تلف می شوند در حالی که میگوی آلودهای که باPCR دو مرحله ای شناسایی می شوند ، ممکن است زنده مانده و حتی تخم ریزی نیز نمایند . (سلطانی ۱۳۸۱)

۲-۱- مروری بر مطالعات انجام شده

مطالعات زیادی در ارتباط با بررسی و ردیابی ویروس بیماری لکه سفید در میگوهای مولدین وحشی و خرچنگ ها انجام شده که می توان به موارد ذیل اشاره نمود :

- افشارنسب و همکاران (۱۳۸۶) به دنبال وقوع مرگ و میر شدید در میگوهای پرورشی منطقه چوئیبده آبادان در سال ۱۳۸۱ به دلیل ویروس لکه سفید پروژه ای را به منظور بررسی و تعیین منبع بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی منطقه آبادا ن در سال های ۱۳۸۵-۱۳۸۴ به انجام رسانده اند . در این بررسی در مجموع ۱۳۰نمونه مورد آزمایش قرار گرفته بود . نمونه های جمع آوری شده شامل انواع میگوها ، خرچنگ و ماهی از رودخانه های بهمنشیر و کانال های ورودی سایت پرورشی بوده است . بر اساس نتایج حاصل از آزمایش های PCR نمونه های جمع آوری شده در این پروژه ، میگوهای خنجری (*Parapenaeus stylifera*) و میگوی سفید (سر تیز)(*Metapenaeus affinis*) صید شده از رودخانه بهمنشیر نسبت به ویروس لکه سفید مثبت بوده اند و در سایر نمونه های جمع آوری شده علائمی از وجود ویروس لکه سفید مشاهده نکرده اند .

- LO و همکاران (۱۹۹۷) بررسی را با عنوان ردیابی و گرایش بافتی ویروس لکه سفید در میگوی مولد مونودون صید شده با تأکید بر اندام های تناسلی در تایوان انجام داده اند . این بررسی که از جولای سال ۱۹۹۵ تا فوریه ۱۹۹۶ صورت پذیرفته است ، تعداد ۴۰ قطعه میگوی مولد نر و ۴۸ قطعه میگوی مولد ماده با استفاده از

PCR دو مرحله ای مورد آزمایش قرار گرفته است . نتایج حاصل از بررسی نشان داده که از میان ۴۰ قطعه میگوی نر آزمایش شده ، ۴۰ درصد در آزمایش PCR دو مرحله ای و ۲۷/۵ درصد در PCR یک مرحله ای مثبت بوده اند و ۳۲/۵ درصد نیز در PCR دو مرحله ای از لحاظ وجود ویروس لکه سفید منفی بودند . همچنین در میان میگوهای مولد ماده ، ۱۲/۵ درصد با PCR یک مرحله ای ، ۶۲/۵ درصد با PCR دو مرحله ای مثبت بودند و ۲۵درصد بقیه نیز حتی با PCR دو مرحله ای منفی گزارش شده است . در این بررسی در میگوهایی که در PCR یک مرحله ای مثبت بوده اند ، از اندام های مختلف بدن جهت بررسی های آسیب شناسی بافتی نمونه برداری گردیده بود و ضایعات بافتی ناشی از وجود ویروس در پاهای شنا ، آبشش ها ، معده ، پاهای حرکتی و بافت ساقه های چشمی با روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) مشخص گردیده اند .

- Otta و همکاران (۱۹۹۹) بررسی را جهت ردیابی ویروس لکه سفید در سخت پوستان پرورشی و وحشی در هند با استفاده از روش PCR انجام داده اند . در این بررسی نمونه های میگوهای مولد و خرچنگ از آب های ساحلی منطقه گوا (Goa) هند صید شده بودند . در این بررسی از ۱۰ نمونه میگوی مولد آزمایش شده ۳ نمونه ظاهری سالم و ۷ نمونه نیز نشانی های بالینی آلودگی (لکه های سفید) به ویروس لکه سفید را نشان می دادند. ۳نمونه به ظاهر سالم نیز با استفاده از نستد PCR مثبت گردیدند.همچنین از میان ۱۰ نمونه خرچنگ آزمایش شده یک قطعه خرچنگ از لحاظ ظاهری نشانی های بالینی لکه های سفید را نشان می داد و بقیه خرچنگ ها به رغم ظاهری سالم ۴ قطعه آنها در آزمایش نستد PCR مثبت گردیده اند. این نتایج نشان می دهد که میگوها ی مولد و خرچنگ های بدست آمده از آبهای ساحلی هند به ویروس لکه سفید آلوده بوده و می توانند ویروس را براحتی با خود به درون مراکز تکثیر و پرورش منتقل نمایند.

– Hsu و همکاران (۱۹۹۹) مطالعه ای را بر روی رد یابی ویروس لکه سفید در میگوی مولد مونودون با استفاده از روش غربالگری PCR در آبهای تایوان انجام دادند.آنها میگوهای مولد را از آبهای ساحلی جنوب تایوان صید کرده بودند. آنها در این مطالعه ۴۵ قطعه میگوی مولد را بلافاصله بعد از صید از دریا با استفاده از روش PCR مورد مطالعه قرار داده اند. نتایج حاصل از آزمایشها نشان داده که ۱۵ قطعه میگو(۳۳ درصد) با PCR یک مرحله ای ۱۵ قطعه میگو (۳۳ درصد) با PCR دو مرحله ای مثبت بوده اند و ۱۵ قطعه دیگر نیز(۳۳ درصد) با PCR دو مرحله ای هم منفی بودند.

– Chakraborty و همکاران(۲۰۰۲) بررسی را در مورد بیماری لکه سفید در طول سواحل هند انجام داده اند آنها جمعا ۸۹ قطعه نمونه را از ۱۵ ایستگاه در طول سواحل هند را که شامل ۴۰ قطعه میگو ۳۶ قطعه خرچنگ و ۱۳ قطعه اسکوئیلا بوده اند مورد آزمایش قرار داده اند.

Chakraborty و همکارانش برای رد یابی بیماری لکه سفید از روش تشخیصی نستد PCR استفاده کرده اند. نتایج بررسی آنها نشان داده که میگو های وحشی مثل میگوی مونودون، پاراپنئوس ستی فروس، متاپنئوس دابسونی، متاپنئوس الگانس و اسکوئیلا نسبت به ویروس لکه سفید مثبت بوده اند و می توانند حامل این ویروس باشند. در این بررسی ویروس بیماری لکه سفید در خرچنگ های بظاهر سالم نیز ردیابی و شناسایی شده اند .این مطالعه نشان داده که بیماری لکه سفید بطور وسیعی در سخت پوستان وحشی سواحل شرقی و غربی هند پراکنده می باشند.

– Withyachumnarnkul و همکاران(۲۰۰۳) بررسی را بر روی میزان شیوع فصلی ویروس لکه سفید در میگوهای مولد وحشی مونودون در تایلند انجام داده اند. در این مطالعه اطلاعات پیوسته بیش از ۳ سال (از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۰) از ۸ آزمایشگاه که سرویس غربالگری مولدین وحشی میگوی مونودون و پست لاروها را با استفاده از PCR انجام می دادند جمع آوری شدند.تمام این آزمایشگاهها از پرایمر و پروتکل های مشابهی برای تشخیص ویروس لکه سفید استفاده می کردند. در طول این مدت در این آزمایشگاه ها بطور میانگین ۶۷۶ نمونه میگوی مولد در طول ماه برای ردیابی ویروس لکه سفید مورد آزمایش قرار گرفته اند.نتایج حاصل از این بررسی ها نشان داده که علاوه بر مثبت بودن میگوهای مولد وحشی میزان شیوع ویروس لکه سفید بطور کلی در طی اواسط سال کمتر و در اواخر سال تا اوایل سال بعد افزایش پیدا می کرده است. در این بررسی بالاترین میزان شیوع ویروس لکه سفید در میان مولدین وحشی میگوی مونودون با ۱۸ درصد درماه سپتامبر سال ۱۹۹۹ بوده است.

-East و همکاران (۲۰۰۴) بررسی را در خصوص ویروس لکه سفید در میان سخت پوستان وحشی آبهای استرالیا انجام دادند . در این بررسی آنها از ۶۴ ایستگاه نمونه برداری شامل ۴۷ ایستگاه در آبهای ساحلی برای نمونه های وحشی و ۱۲ مزرعه پرورش میگو و ۵ مرکز تحقیقات آبزی پروری از سراسر اطراف استرالیا نمونه (میگو ، خرچنگ ، خرچنگ دراز آب شیرین) را به تعداد ۳۰۵۱ قطعه جمع آوری کرده اند . در این بررسی به رغم استفاده از آزمایش PCR ، هیچگونه مورد مثبتی از نمونه های جمع آوری شده گزارش نگردیده است .

بررسی فوق در واقع مکمل بررسی اولیه انجام شده در سال ۲۰۰۰ بر روی میگوهای پرورشی استرالیا جهت ردیابی ویروس لکه سفید بوده که در آن سال نیز هیچگونه مورد مثبت از حضور ویروس گزارش نشده است .

- Chapman و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه ای بر روی ارزیابی ویروس لکه سفید در میگوهای مهم پنائیده تجاری دریای آتلانتیک شامل میگوهای ستی فروس ، آزتکوس و دوراروم وحشی با استفاده از صید از طریق تور ترال در مناطق ساحلی مثل کارولینای شمالی ، کیپ کاناورال و فلوریدا انجام دادند . در این بررسی مجموعاً ۱۱۵۰ قطعه میگو مورد بررسی قرار گرفته است . از این تعداد ۳۲ قطعه (۲/۸ درصد) از میگوهای صید شده از لحاظ ویروس لکه سفید مثبت بوده اند . در این بررسی آزمایشهای آسیب شناسی بافتی نیز از اندام های مختلف بدن میگو انجام شده است ، که هیچگونه آثاری از آلودگی به علت پائین بودن درجه آلودگی مشاهده نشده است و تنها در یک نمونه که از لحاظ شدت درجه آلودگی بالا(درجه ۴) بوده است ، آسیب شناسی بافتی مشاهده شده است .

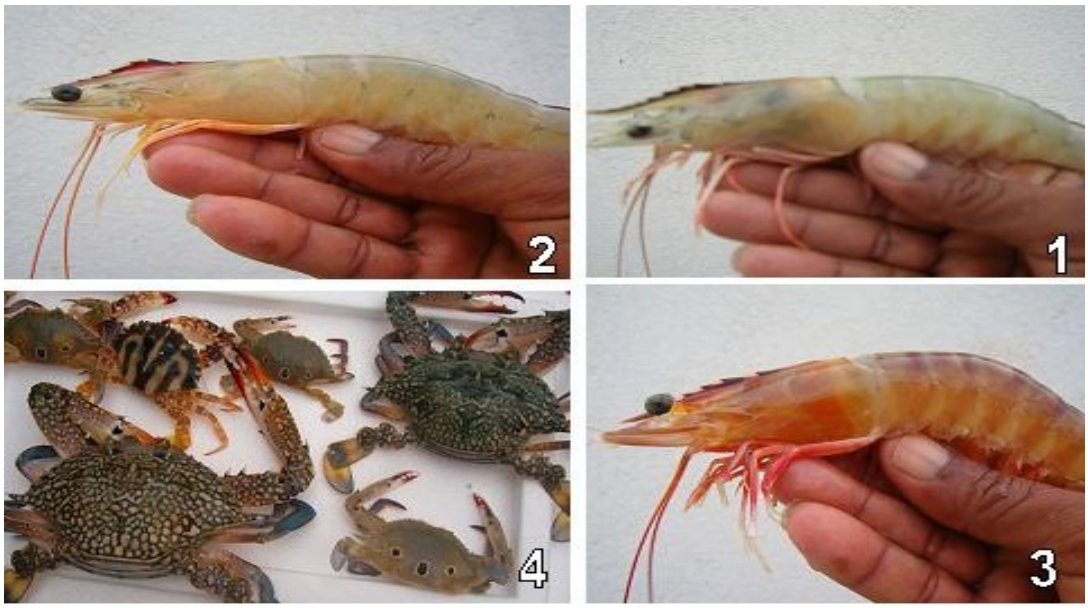
گر چه در اکثر موارد نحوه انتقال بیماری به مناطق جدید از جمله ایران مشخص نشده است ، اما بدون تردید راههای انتقال بیماری و منابع احتمالی حضور ویروس در شیوع این همه گیری موثر بوده و شناخت عوامل ایجادکننده و جلوگیری از ورود آنها می تواند در کنترل و پیشگیری از بیماری موثر باشد . بخصوص در کشور ما ایران که صنعت تکثیروپرورش در اکثر استان های ساحلی که میگوی سفید هندی گونه اصلی پرورشی است، متکی به منابع و مولدین وحشی می باشد . به همین منظور به دنبال وقوع بیماری لکه سفید در استان های خوزستان و بوشهر و احتمال ورود عامل مولد بیماری لکه سفید میگو به آبهای طبیعی طرح " ردیابی و شناسایی حاملین و میزبان های واسط ویروس لکه سفید در میگوهای وحشی و خرچنگ های خلیج فارس و دریای عمان " در استان هرمزگان به سفارش و تامین بودجه اداره کل شیلات هرمز تنظیم و اجراء گردید . هدف از اجرای این طرح ، شناسایی منبع ویروس بیماری لکه سفید به عنوان عامل ایجادکننده بیماری در آبهای ساحلی استان هرمزگان و در نهایت در صورت آلودگی میگوهای وحشی کنترل و پیشگیری از وقوع بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگو بود .

۲- مواد و روش کار

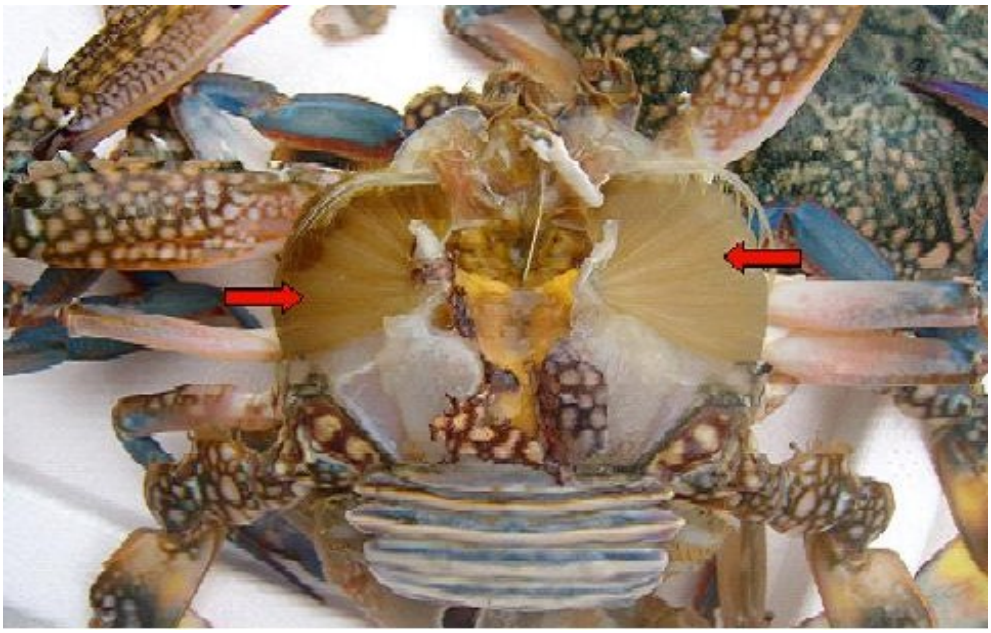
به منظور انجام پروژه ، نمونه های میگو (میگوی سفید هندی ، موزی ، ببری سبز، میگوی سفید(سر تیز) و خرچنگ های دریایی (شکل ۳ و ۴)از سه منطقه اطراف قشم (از منطقه کشتی سوخته تا طولا) ، منطقه جزیره هنگام و آبهای ساحلی بندر جاسک نمونه برداری گردید(شکل ۲) . نمونه برداری از مناطق یاد شده بصورت فصلی به مدت یک سال و نیم از زمستان ۱۳۸۵ تا بهار ۱۳۸۷ انجام گرفت . تعداد نمونه ها بر اساس جدول Wedmeyer and Ossiander با درصد شیوع ۵ درصد (Bondad – Reantaso *et.al* 2001) انتخاب گردید . بر اساس این جدول تعداد نمونه های لازم میگو از هر گونه در هر بار نمونه برداری تعداد ۶۰ قطعه تعیین گردیدند . بنابر این در طول دوره نمونه برداری تعداد ۱۰۸۰ قطعه میگو از هر گونه اشاره شده در بالا (مجموعا" ۴۳۲۰ قطعه میگو) و ۱۰۸۰ قطعه خرچنگ جمع آوری شدند . اندام های نمونه برداری آبشش ها بودند(شکل ۴) به طوری که آبشش های یک طرف بدن بلافاصله بعد از صید به عنوان نمونه های لازم برای آزمایشهای مولکولی (PCR) و آبشش های طرف دیگر بدن نیز برای اهداف آسیب شناسی بافتی در نظر گرفته می شدند. نمونه های میگوها و خرچنگ های لازم با استفاده از لنج های محلی و روش صید تور ترال صید می شدند (شکل۵). میگوهای صید شده در ابتداء درون تانک های هوادهی شده جمع آوری و سپس نمونه برداری از آنها انجام می گرفت(شکل ۶)

نمونه های برداشت شده برای آزمایشهای PCR در الکل اتیلیک ۹۵ درجه نگهداری شده و نمونه های مربوط به آسیب شناسی بافتی نیز ابتدا در محلول تثبیت کننده دیویدسون قرار داده می شد و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت به الکل ۷۰ درجه منتقل می شدند (Lightner 1996) .

شکل(۲) مکان های نمونه برداری میگو و خرچنگ



شکل(۳) نمونه میگو و خرچنگ های مورد استفاده در نمونه برداری و آزمایشهای PCR و آسیب شناسی بافتی



شکل(٤) محل قرار گرفتن آبشش های خرچنگ ها که از آنها برای نمونه برداری استفاده شدند بطوریکه از آبشش های یکطرف برای آزمایشات PCR و از طرف دیگر برای آزمایشات آسیب شناسی استفاده می گردیدند. در خصوص میگوها نیز به همین روش استفاده گردیدند.

شکل(۵) انواع میگو و ماهی و خرچنگ صید شده با استفاده از تور ترال در لنج های صیادی

شکل (٦) میگو های صید شده ازدریا که ابتداء در تانک های پلاستیکی هوادهی شده نگهداری و سپس نسبت به نمونه برداری از آبشش آنها جهت آزمایشات PCR و آسیب شناسی بافتی استفاده می گردیدند.

۱-۲- آماده کردن نمونه ها برای آزمایش PCR

با توجه به تعداد زیاد نمونه برای آزمایشات PCR نمونه های آبشش هر ۱۰ قطعه میگو به عنوان یک Sample در نظر گرفته می شد . در آزمایشگاه در شرایط استریل نمونه های آبشش در داخل هاون چینی به خوبی هموژنیزه

می گردیدند ، سپس مقدار ۱۰۰-۵۰ میلی گرم از نمونه هموژنیزه شده درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته می شد . پس از قرار دادن نمونه در میکروتیوب ، مقدارµl ۱۰۰۰ محلول استخر DNA اضافه و مدت ۱۰دقیقه با دستگاه شیکر تکان داده می شد و سپس بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ می گردیدند.پس از سانتریفوژ توسط میکروپیپت لایه رویی جدا و بداخل یک میکروتیوپ دیگر منتقل می گردیدند(رسوب باقیمانده دور ریخته می شد). مقدارµl ۵۰۰ اتانول ۱۰۰ درصد به محلول اضافه و بخوبی با هم مخلوط شده و مجدا بمدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ می گردیدند. در این مرحله لایه رویی را دور ریخته و مقدار µl۱۰۰۰ اتانول ۷۰ درصد به رسوب ته لوله اضافه و پس از چند بار تکان دادن بمدت ۲دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ می شدند.پس ازسانتریفوژ لایه رویی دور ریخته می شد و به رسوب با قیمانده مقدارµl ۱۰۰ آب مقطر استریل اضافه می گردید و لوله به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷درجه سانتی گراد قرار داده می شد تا DNA در آب حل گردد .

جهت انجام PCR مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده مورد استفاده قرار می گرفت . برای انجام PCR از کیت مخصوص بیماری لکه سفید میگو fast target به نام

(Single–tube Nested DNA Amplification kit for detection whitespot syndrome virus)

محلول واکنش در یک میکروتیوب ml ۰/۲ بشرح ذیل آماده سازی گردید . شایان ذکر است که تمامی مقادیر مورد استفاده بر اساس دستورالعمل کیت های مورد استفاده بود .

PCR Reaction mix	23.2µl
PCR Nucleotide mix(dNTP)	0.5µl
Taq DNA Polymerase	0.3 µl
Target DNA	1- 2 µl

برنامه PCR

دستگاه PCR مورد استفاده ساخت شرکت Eppendorf مدل پرسنال بود .

۹۴ درجه سانتی گراد در سه دقیقه	Pre-denaturation
۹۴ درجه سانتی گراد در سی ثانیه	5 Cycle of
۶۰ درجه سانتی گراد در سی ثانیه	
۷۲ درجه سانتی گراد در سی ثانیه	

۹۴ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه	15 Cycle of
۶۰ درجه انتی گراد در بیست و پنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی گراد در سی ثانیه	
۹۴ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه	6 Cycle of
۵۰ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه	
۹۴ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه	25 Cycle of
۴۹ درجه سانتی گراد در بیست وپنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی گراد درسه دقیقه	

Finalextension

پس از انجام PCR نمونه ها همراه با ۱۰۰bp DNA marker بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و باندهای ایجاد شده با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم برماید و ترانس لومیناتور UV مشاهده گردیدند .

۲-۲- آماده سازی نمونه ها برای آسیب شناسی بافتی

آماده سازی نمونه ها برای آسیب شناسی بافت بر اساس روش Bel and lightner انجام پذیرفت .

برای انجام این کار نمونه های اخذ شده برای آسیب شناسی بافتی ابتدا در محلول دیویدسون قرار داده شدند .

محلول دیویدسون شامل :

۳۵۰ میلی لیتر	اتانول ۹۶ درصد
۲۲۰ میلی لیتر	فرمالین
۱۱۵ میلی لیتر	اسید استیک خالص
۳۵۵ میلی لیتر	آب مقطر

می باشد . نمونه ها در دمی اطاق برای مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت قرار گرفتند و سپس به الکل اتیلیک ۵۰ تا ۷۰ درصد انتقال یافتند ، این عمل باعث نگهداری نمونه ها برای مدت زمان نامحدود را فراهم می کند . نمونه های بافت بعد از عملیات فرآوری (آبگیری ، نفوذ پارافین در بافت) به صورت بلوک های پارافینی قالب بندی گردیده و از آنها برش هایی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرون تهیه گردید .

۱-۲-۲- عملیات رنگ آمیزی

به دلیل این که در مطالعه آسیب شناسی بافت ها ی میگو بهترین رنگ مورد استفاده رنگ هماتوکسیلین و ائوزین میباشد، بافت های تهیه شده را روی لام ثابت و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و مونت کردیم .

روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بشرح ذیل می باشد :

۱- گزیلول به ۵ دقیقه ۲ بار

۲- الکل ۱۰۰ درصد ۱۰ بارغوطه ور کردن ۲ بار

۳ – الکل ۹۵ درصد ۱۰ بارغوطه ور کردن ۲ بار

۴ – الکل ۸۰ درصد ۱۰ بارغوطه ور کردن ۲ بار

۵ – الکل ۵۰ درصد ۱۰ بارغوطه ور کردن ۱بار

۶ – شستن با آب مقطر ۶ بار در ظروف جداگانه

۷ – هماتوکسیلین ۶-۴ دقیقه

۸ – شستن در آب جاری ۶-۴ دقیقه

۹ – فلوکسین / ائوزین ۲ دقیقه

۱۰ – الکل ۹۵ درصد ۱۰ بارغوطه ور کردن ۲ بار

۱۱ – الکل ۱۰۰ درصد ۱۰ بارغوطه ور کردن ۲ بار

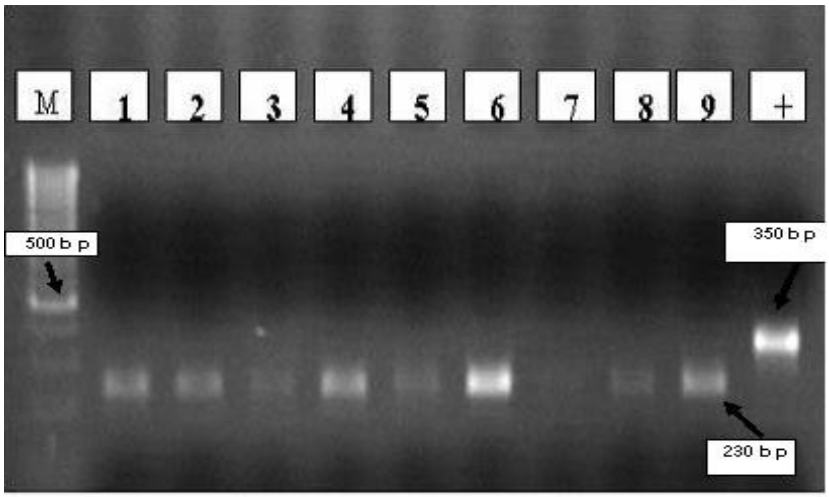
۱۲ – گزیلول ۱۰ بارغوطه ور کردن ۴ بار

۱۳ – پوشش دادن با مواد چسبنده و گذاشتن لام

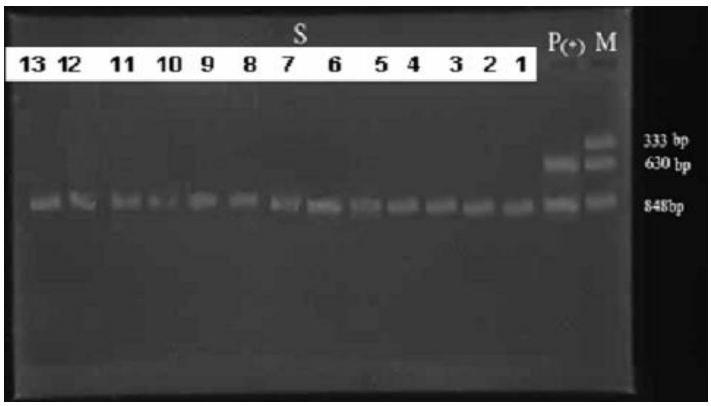
۱۴ – مشاهده زیر میکروسکوپ

۳-نتایج

نتایج آزمایشات حاصل از روش مولکولی PCR در تمام نمونه های اخذ شده از میگوها و خرچنگ ها در مناطق نمونه برداری اطراف قشم ، جزیره هرمز و آبهای ساحلی جاسک منفی بودند(شکل۷). در مواردی برای صحت آزمایش PCR در پژوهشکده اکولوژی بندر عباس، نمونه هایی نیز به پژوهشکده های میگوی کشور(بوشهر) و آبزی پروری جنوب کشور(اهواز) ارسال می گردید.نتایج نمونه های ارسالی به مراکز دیگر نیزهمگی منفی بودند(اشکال۸و۹). با توجه به نتایج منفی حاصل از PCR ، به تبع آن در نمونه های آماده شده برای آسیب شناسی بافتی نیز هیچ گونه ضایعه پاتولوژیک خاصی در اثر بیماری لکه سفید میگو که شامل هیپرتروفی شدن سلولهای آبشش وایجاد گنجیدگی های Cowdry Type_ A باشد ، مشاهده نشدند(اشکال ۱۰ و ۱۱).



شکل(۷) نتایج آزمایش PCRنمونه میگوهای سفید هندی مناطق بندر جاسک،جزیره هرمز، اطراف قشم. تمام نمونه های مورد مطالعه منفی بودند(آزمایش PCR انجام شده در بندرعباس). برای میگوهای موزی ، ببری سبز ،میگوی سفید وخرچنگ ها نیز بطور جداگانه انجام گردید که نتایج همه آزمایشاتانجام شده منفی بودند.
M = مارکر + = کنترل مثبت
شماره های ۱،۲ و۳ نمونه های منطقه جاسک
شماره های ٤،٥ و٦ نمونه های اطراف جزیره هرمز
شماره های ۸،۷ و۹ نمونه های اطراف قشم



شکل(۸) نتایج آزمایش PCR(بوشهر) نمونه میگوهای سفید هندی مناطق بندر جاسک،میگوی ببری سبزاطراف جزیره هرمز و میگوهای موزی اطراف قشم.تمام نمونه های مورد آزمایش همانند نتایج نمونه های انجام شده در بندرعباس منفی بودند

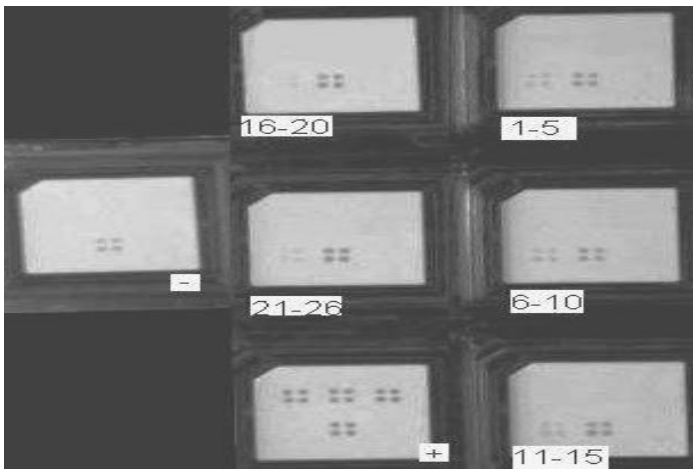
M = مارکر +(P) = کنترل مثبت و S = نمونه های آزمایش شده

شماره های ۳،۲،۱ و٤ نمونه های میگوی سفید هندی منطقه جاسک

شماره های ٦،٥ و۷ نمونه های میگوی ببری سبز اطراف جزیره هرمز

شماره های ۹،۸ و۱۰ نمونه های میگوی موزی اطراف قشم

شماره های ۱۱، ۱۲ و۱۳ نمونه های میگوی سفید جاسک



شکل(۹) نتایج PCR(اهواز) نمونه میگوهای مناطق بندر جاسک، جزیره هرمزواطراف قشم. تمام نمونه های مورد مطالعه منفی بودند.این روش بر اساسکیت چند گانه IQ2000 TM WIT Multi virus System است،که علاوه بر تشخیص بیماری لکه سفید میگو بیماری های دیگر میگو ازقبیل IHHNV، TSV را نیز رد یابی می کند.

شماره های ۱-۵ نمونه های مربوط به میگوی سفید هندی اطراف جزیره هرمز

شماره های ٦-۱۰ نمونه های مربوط به میگوی موزی اطراف قشم

شماره های ۱۱-۱۵ نمونه های مربوط به میگوی ببری سبز منطقه جاسک

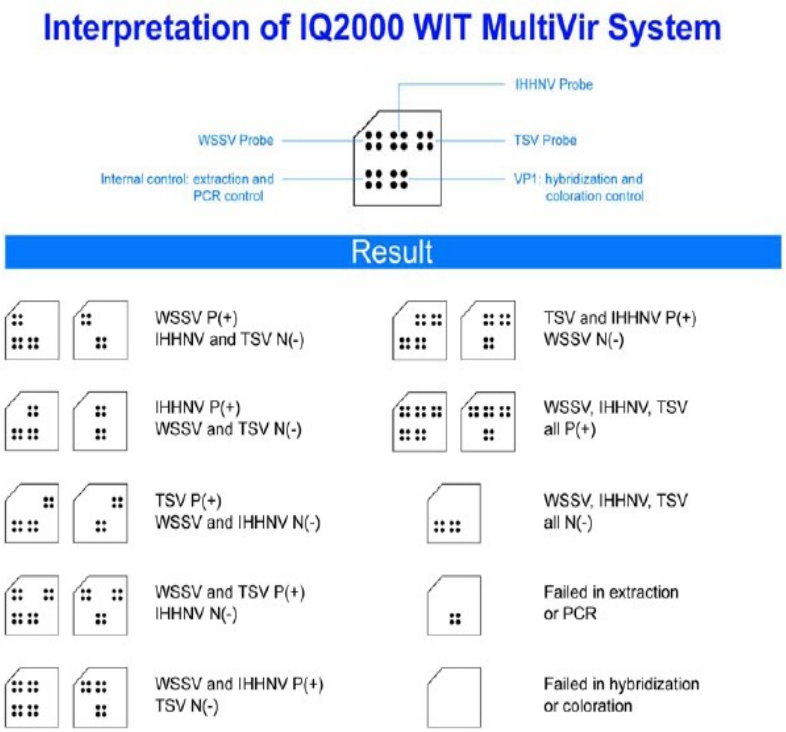
شماره های ١٦-۲۰ نمونه های مربوط به میگوی سفید اطراف قشم

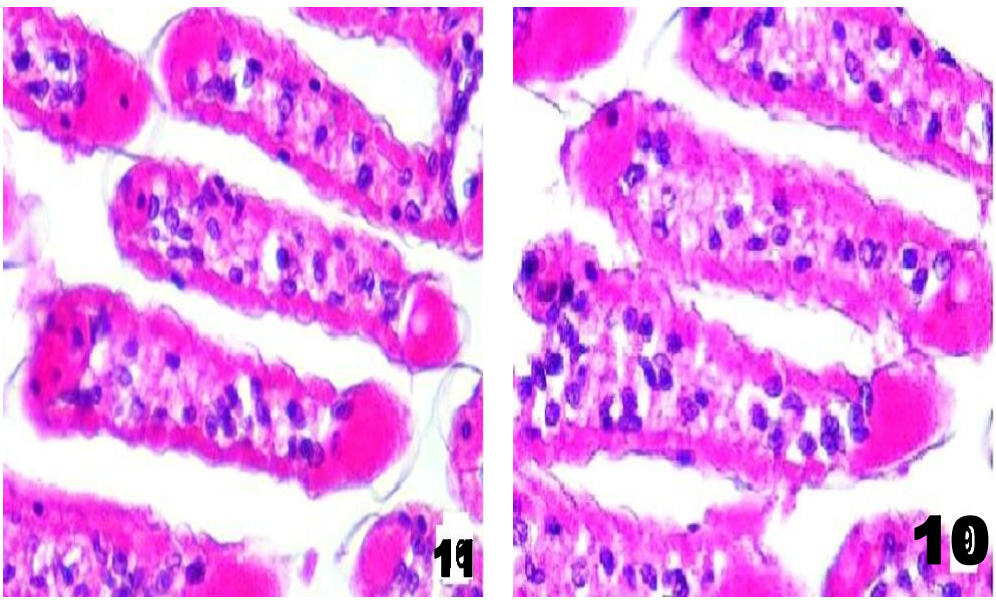
شماره های ۲۱-۲٦ نمونه های مربوط به خرچنگ های منطقه جاسک می باشد.

+ کنترل مثبت - کنترل منفی

نمونه میگوها (موزی ، ببری سبز ، میگوی سفید) وخرچنگ های مناطق دیگر آزمایش شده با این روش نیز ،منفی بوده اند

تفسیرنتایج آزمایش در روش کیت چند گانهIQ2000 TM WIT Multi virus System براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت با توجه به نمونه زیر انجام می گیرد.





اشکال(۱۰و۱۱)نتایج حاصل از مطالعات آسیب شناسی بافتی اندام آبشش درمیگوهای سفید هندی(شکل۱۰)و میگوی ببرس سبز(شکل۱۱)موردمطالعه ضایعات پاتولوژیک خاصی از قبیل: هیپرتروفی هسته ، تجزیه یا حذف هستک و حاشیه نشینی کروماتین و گنجیدگی های داخل هسته ای ائوزینوفیلی(تیپ Cowdry A) را در ارتباط با ویروس لکه سفید نشان ندادند.

٤- بحث و نتیجه گیری

همانطور که نتایج این تحقیق نشان می دهد میگو های مولد وحشی و خرچنگ های دریایی آزمایش شده در سه منطقه مذکور عاری با ضریب اطمینان ۹۵ درصد عاری از بیماری لکه سفید میگو بودند، بخصوص منطقه جاسک که زیستگاه طبیعی و محل اصلی تامین میگوهای مولد سفید هندی برای مراکز تکثیر و پرورش میگو در جنوب کشور می باشد،که از این لحاظ اهمیت بسیار دارد.آبهای ساحلی استان خاستگاه دو گونه میگوی مهم تجاری دیگر یعنی میگوی ببری سبز و میگوی موزی می باشد که همه ساله توسط اداره کل شیلات استان از این گونه ها جهت تکثیر و بازسازی ذخایر دریا استفاده می شود. عاری بودن این دو گونه نیز به نوبت خود بسیار مهم و حیاتی می باشد.با توجه به اینکه قریب ۷ سال از وقوع بیماری لکه سفید در کشور می گذرد، بغیر از یک تحقیق که توسط افشار نسب و همکاران (۱۳۸۶) جهت بررسی و تعیین منبع بیماری لکه سفید در میگو های پرورشی منطقه آبادان بر روی میگو ها و خرچنگ های رود خانه بهمنشیر انجام شده و طی آن موفق به گزارش مثبت از آلودگی میگو های خنجری و سفید به بیماری لکه سفید شدند ، کار تحقیقاتی خاصی در مورد رد یابی و شناسایی حاملین بیماری لکه سفید در آبهای ساحلی بخصوص استانهای خوزستان و بوشهر که بیماری لکه سفید درمزارع پرورشی آن استانها بوقوع پیوسته انجام نشده است.

در بررسی حاضر تمام آزمایشهای PCR انجام شده با استفاده از روش PCR دو مرحله ای(نستد PCR) بوده است. PCR دو مرحله ای نسبت به PCR یک مرحله ای از حساست بالاتری بر خوردار است.بطوریکه بیان می شود روش یک مرحله ای ۱۰۰۰۰ مرتبه حساس تر می باشد(سلطانی ۱۳۸۱). بهمین خاطراکثر مطالعات انجام شده در خصوص ردیابی و شناسایی ویروس لکه سفید با استفاده از روش PCR دو مرحله ای بوده است.

برای مثال ،Lo و همکاران (۱۹۹۶) در تحقیقی جهت شناسایی ویروس لکه سفید در میگوهای پرورشی و وحشی، خرچنگ ها و دیگر ده پایان از جولای تا دسمبر سال ۱۹۹۵ ، ۶۶ قطعه میگوی مونودون ، ۲۳ قطعه میگوی ژاپنی ، ۳۲ قطعه میگوی ببری سبز و ۲۳ قطعه میگوی پنی سیلاتوس را از آبهای ساحلی جنوب تایوان صید کردند.گاها به همراه صید میگو، خرچنگهایی نیز صید می شدند که آنها نیز برای رد یابی ویروس لکه سفید مورد استفاده قرار گرفته اند. Lo و همکاران در این بررسی به منظور به حداقل رساندن اثر شرایط استرس زا که می تواند باعث تکثیر سریع ویروس در میگو گردد، بلافاصله یک قطعه از پای شنا را جهت آزمایش

نمونه‌برداری می کردند و زمانیکه نمونه ها با PCR یک مرحله ای مثبت می شدند میگوها جهت بررسی های آسیب شناسی بافتی نمونه برداری می شدند. آنها علاوه بر گزارش آلودگی میگوها و خرچنگهای صید شده از دریا ، مقایسه ای را در رابطه با آلودگی میگوها با استفاده از PCR یک مرحله ای و دو مرحله ای انجام دادند.نتایج تحقیقات آنها نشان داده که در آزمایشات PCR یک مرحله ای از ۶۶ قطعه میگوی مونودون ۲۲قطعه، از ۲۳ قطعه میگوی ژاپنی ۵ قطعه نسبت به ویروس لکه سفید مثبت بودند و در میگوهای ببری سبز و پنی سیلاتوس هیچ گونه مورد مثبتی گزارش نکرده اند.در حالیکه در آزمایشات PCR دو مرحله ای از ۶۶ قطعه میگوی مونودون ۵۰ قطعه ، از ۲۳ قطعه میگوی ژاپنی ۱۴ قطعه ، از ۳۲ قطعه میگوی ببری سبز ۲ قطعه و از ۲۷قطعه میگوی پنی سیلاتوس ۳ قطعه نسبت به ویروس لکه سفید مثبت بودند. این نتایج بیانگر حساست بالای PCR دو مرحله ای نسبت به PCR یک مرحله ای می باشد. Lo و همکاران همچنین در خصوص میزان بالای آلودگی میگوی مونودون نسبت به سایر میگوهای آزمایش شده بیان کردند که اولا حضور مکرر میگوی مونودون را در آبهای کمتر از ۳۰ متر عمق و ثانیا عدم مخفی شدن آنها در زیر شن وماسه و باقی ماندن بر روی سطح کف دریا دانستند که این موارد شانس آنها را برای در معرض قرار گرفتن نسبت به ویروس لکه سفید در ابهای ساحلی آلوده ناشی از آبهای مزارع پرورش میگو بیشتر می کند.

Itami و همکارن(۱۹۹۸) نیز PCR دو مرحله ای را به دلیل حساسیت بالا جهت رد یابی ویروس لکه سفید در میگوها و دیگر سخت پوستان وحشی بهتر می دانند. به همین خاطر در مطالعات همه گیر شناسی و حاملین میگوی ژاپنی در طبیعت (دریا) و دیگر سخت پوستان از PCR دو مرحله ای استفاده کرده اند. آنها تعداد ۲۰۲ قطعه میگوی ژاپنی مولد ماده را در سال ۱۹۹۶ و ۱۷۲ قطعه را در سال ۱۹۹۷ جمع آوری کردند.میزان نمونه های مثبت با PCR دو مرحله ای ۲۵/۲ درصد در سال ۱۹۹۶ و ۲۳/۳ درصد در نمونه های سال ۱۹۹۷ بودند. همچنین آنها دریافتند که شیوع ویروس لکه سفید در میان میگوهای ماده نابالغ بطور معنی داری کمتر(۱۴/۵درصد) از مولدین بالغ(۲۳/۳ – ۲۵/۲درصد) می باشد.

در بررسی حاضر با وجود استفاده از PCR دو مرحله ای ، موارد مثبت یا مشکوکی نسبت به ویروس لکه سفید در میان میگوها و خرچنگ های مورد آزمایش مشاهده نشدند .

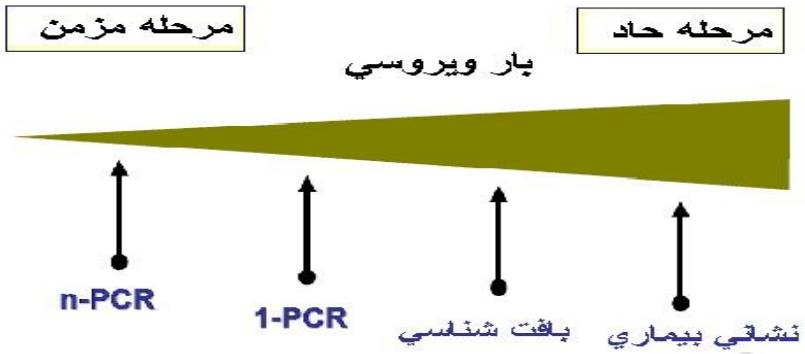
علاوه بر مواد فوق فعالیت های تحقیقاتی فراوانی در خصوص شناسایی بیماری لکه سفید بر روی مولدین وحشی صورت پذیرفته که علاوه بر نتایج مثبت گاهی نیز نتیجه بررسی آنها منفی بوده است . برای مثال East و همکاران در سال ۲۰۰۴ بررسی را در خصوص ردیابی بیماری لکه سفید در میان سخت پوستان وحشی آب های اطراف و داخل استرالیا انجام دادند . در این بررسی تعداد ۳۰۵۱ قطعه سخت پوست (میگو ، خرچنگ،خرچنگ دراز آب شیرین) با استفاده از نستد PCR آزمایش گردیدند . نتیجه بررسی آنها هیچگونه مورد مثبتی از نمونه‌های جمع آوری شده گزارش نشده است . همچنین در یک بررسی دیگر Cavalli وهمکاران (۲۰۰۸) به دنبال شیوع بیماری لکه سفید در مزارع پرورش میگوی وانامی در منطقه Laguna در جنوب برزیل با فرض این که ویروس همراه با آب های خروجی مزارع به محیط وارد شده باشد ، مطالعه ای در خصوص ارزیابی بیماری لکه سفید در میگوهای وحشی انجام دادند . آنها نمونه هایی از میگوهای جوان سه گونه مختلف (*Litopenaeus schmitti , Farfantepenaeus brasillien Farfantepenaeus pavlensis*) را در تابستان (فوریه) ۲۰۰۶ به تعداد ۴۸ قطعه و در زمستان (آگوست) به تعداد ۶۶ قطعه میگو جمع آوری کردند. در این مطالعه نمونه ها بلافاصله بعد از صید در محلول تثبیت کننده فیکس شده و به آزمایشگاه منتقل شده اند. در آزمایشگاه نمونه ها با استفاده از روش های PCR یک مرحله ای و Nested PCR آزمایش شدند . نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان دادند که تمام نمونه ها از لحاظ وجود بیماری لکه سفید میگو منفی بودند . آنها نتیجه گرفتند که میزان شیوع این بیماری در میگوهای وحشی با وجود شیوع بالای آن در مزارع پرورشی بایستی بسیار پایین بوده باشد .

اما در بررسی های دیگر انجام شده در اکثر موارد علاوه بر اینکه نمونه های میگوی مثبت با PCR دو مرحله ای گزارش گردیده اند ، در مواردی با PCR یک مرحله ای (در موارد خیلی شدید بیماری) نیز مثبت بوده اند . برای مثال ، Hsu و همکاران در سال ۱۹۹۹ در مطالعه ای که بر روی ردیابی ویروس لکه سفید در میگوهای مولد مونودون با استفاده از روش PCR در آب های ساحلی تایوان انجام داده اند ، از ۴۵ قطعه میگوی مولد مورد آزمایش ، ۱۵ قطعه میگو (۳۳ ٪) با PCR یک مرحله ای ، ۱۵ قطعه میگو (۳۳ ٪) با PCR دو مرحله ای مثبت بوده و ۱۵ قطعه دیگر نیز (۳۳ ٪) با PCR دو مرحله ای منفی بوده اند . ۱۵قطعه میگوی مولد که با PCR دو مرحله ای منفی بودند در مراحل بعدی آزمایش به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول آنهایی که در تمام طول دوره آزمایش منفی باقی ماندند و گروه دیگر آنهایی که بعد از تخمریزی مثبت شده و یا تلف شدند.

Hsu و همکاران تنها مولدینی را که بعد از تخمریزی با PCR دو مرحله ای منفی گردیدند را بعنوان مولدین حقیقی عاری از بیماری قلمداد کردند.آنها اختلاف بین نتایج مولدین قبل و بعد از تخمریزی را ناشی از انواع مختلف شرایط استرس زا مثل استرس تخمریزی که می تواند باعث تکثیر سریع ویروس سندرم لکه سفید در هنگام تخمریزی شود، دانستند. استرس تخمریزی تنها در عرض چند ساعت می تواند باعث بالا رفتن مقدار ویروس به میزانی گردد که به آسانی و سادگی با PCR دو مرحله ای قابل رد یابی و شناسایی گردد. در نهایت آنها نتیجه گیری کردند که جهت ردیابی ویروس، مولدین بایستی قویا بعد از تخمریزی مورد آزمایش قرار گیرند.

با توجه به این که در دو مطالعه East و همکاران (۲۰۰۴) و Cavalli و همکاران (۲۰۰۸) به رغم شیوع شدید بیماری لکه سفید در مزارع پرورشی ، تمام نمونه ها که بلافاصله بعد از صید از دریا تثبیت شده بودند، در آزمایشهای PCR نسبت به ویروس لکه سفید منفی بودند . با نتایج حاصل از آزمایشهای این بررسی نیز، که نمونه‌ها بلافاصله بعد از صید در محلول فیکساتیو تثبیت شده و سپس مورد آزمایش قرار میگرفتند، هماهنگ میباشد. از طرف دیگر در مولدین صید شده از دریا جهت استفاده در مراکز تکثیر که با نمونه برداری های بررسی حاضر در فصول زمستان و اوایل بهار هماهنگ بود، موارد مشکوک ویا مثبتی از مراکز تکثیر گزارش نگردیدند. این حالت می تواند بیانگر عدم وجود بیماری لکه سفید در میان میگوها و خرچنگ های آبهای ساحلی استان هرمزگان و یا میزان بسیار پایین شیوع بیماری در صورت وجود در بین میگوها و خرچنگ ها باشد.

روش دیگر آزمایش مورد استفاده در این بررسی مطالعات آسیب شناسی بافتی بود . با توجه به این که تمام نمونه‌های مورد مطالعه از لحاظ PCR منفی بودند ، هیچ گونه علائم پاتولوژیکی در نمونه های آزمایش شده دیده نشدند. با توجه به اینکه حساسیت آسیب شناسی بافتی نسبت به آزمایشات PCR خیلی کمتر می باشد (Karunasadgar and Karunasagar,??)(شکل ۱۲).

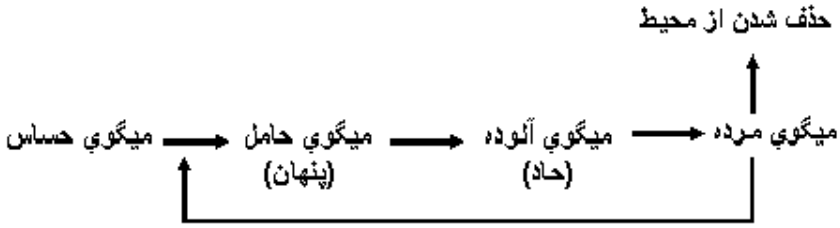


شکل (۱۲) مقایسه حساسیت روشهای مختلف تشخیص و ردیابی بیماری لکه سفید

در مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر نیز تنها در یک مورد مطالعه آسیب شناسی بافتی به ثبت رسیده که براساس آن Chapman و همکاران (۲۰۰۴) علاوه بر روش PCR ، آزمایشات آسیب شناسی بافتی را در اندام‌های مختلف بدن میگو انجام دادند. در این مطالعه علیرغم گزارش مثبت از بیماری لکه سفید میگو به علت پائین بودن درجه آلودگی هیچگونه آثاری از اسیب بافتی در اندام ها مشاهده نکرده اند، و تنها در یک مورد که از لحاظ شدت درجه آلودگی(درجه ۴) بالا بوده ضایعات بافتی مشاهده شده است.

تمام این مطالعات بیانگر آنست که سخت پوستان وحشی (میگو و خرچنگ)می توانند به عنوان مخازن و حاملین ویروس و بیماری عمل نموده و تهدیدی جدی برای سیستم های پرورشی باشند. در تمام مطالعات ذکر شده همراه با موارد مثبت ازآلودگی به ویروس لکه سفید ، اکثر نمونه های آزمایش شده منفی بودند. شاید علت این امر را در روش انتشار ویروس در محیط های طبیعی ذکر کرد. میگو به چندین طریق می تواند در معرض ویروس لکه سفید قرار گرفته و آلوده گردد، از قبیل: تزریق عصاره بافت آلوده، غوطه ور شدن در آب حاوی عصاره بافت آلوده به ویروس، خوردن بافت آلوده و همزیست شدن میگوی حساس با میگوی آلوده. راه انتقال طبیعی در استخرها از طریق همزیست شدن با میگوی آلوده و انتشار ویروس ار طریق پخش شدن در محیط و یا خوردن لاشه میگوی آلوده می باشد(Lotz and Soto, 2002). اما به نظر می رسد که در محیط های طبیعی مثل دریا بعلت بزرگ بودن محیط در مقابل میزان تراکم تنها راه انتقال از طریق خوردن میگوی آلوده باشد. بنابراین

در چنین محیط هایی میگوی زنده اگر آلوده هم باشد اهمیت کمتری نسبت به میگوی مرده در انتشار بیماری دارد(Lotz and Soto, 2002).(شکل ۱۳)



شکل(۱۳) چرخه ساده اپید می بیماری لکه سفید در محیط طبیعی.

در این چرخه میگوی مرده ۲ حالت در پیش رو خواهد داشت. ۱- خورده شدن توسط موجودات دیگر و حذف شدن از محیط ۲- خورده شدن توسط میگوی حساس دیگر و تکرار چرخه. اگر در یک محل که میزان تراکم میگوها زیاد باشد این چرخه تند تر تکرار شده و یک حالت اپیدمی ایجاد خواهد شد. اما انچه که در چرخه برای صنعت تکثیر و پرورش خطرناک خواهد بود، صید و استفاده از میگوی حامل(پنهان) خواهد بود.

با توجه به اینکه در سال های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۴ بیماری لکه سفید در استان های خوزستان و بوشهر به وقوع پیوسته بود(تخم افشان و تمجیدی ۱۳۸۲) و در اکثر وارد نحوه انتقال بیماری به مناطق جدید مشخص نشده است. به نظر می رسد که واردات ناپلی ، پست لارو و مولدین زنده برای مراکزتکثیر و نیز میگوهای حاصل از صید مناطق آلوده مهمترین راه های انتقال و ورود بیماری به مناطق دیگر باشد، ازسویی دیگر باتوجه به دامنه میزبانی وسیع بیماری در طبیعت و نیز موجود مخازن و میزبان های واسط فراوان آن احتمال وجود بیماری در بسیاری از مناطق دنیا از جمله ایران وجود دارد(سلطانی ۱۳۸۱).

علاوه بر موارد مذکور، تعداد دیگری از راههای بالقوه ورود بیماری به مناطق جدید و عاری از بیماری وجود دارند که عبارتند از: انتقال طبیعی از طریق مهاجرت پرندگان و پستانداران ، جریان های اوقیانوسی، انتقال از طریق آب توازن کشتی ها و محصولات آبزیان می باشد(Arthur,1998). ورود ویروس های بیماریزای میگو به میگوهای وحشی علاوه بر میگوی زنده از طریق میگوهای بیمار ،مرده یا در حال فساد موجود در آب توازن کشتی ها و خورده شدن آنها توسط سخت پوستان وحشی صورت بگیرد.آب توازن کشتی ها می تواند منبع

بسیاری از گونه های سخت پوستان از قبیل لارو خرچنگ ، آمفی پودها و ایزوپودها باشد و این طریق ویروسهای بیماریزا از یک منطقه به منطقه دیگر منتقل گردد(Mcllwain *et al*,1997).

با توجه به اینکه تنگه هرمز درمحدوده آبهای ساحلی استان هرمزگان روزانه محل تردد انواع و اقسام کشتی های تجاری ونفتکش از تمام نقاط دنیا به منطقه می باشد، این خود می تواند یک عامل بالقوه برای ورود عوامل بیماریزای خطرناک برای میگوهای منطقه و بخصوص برای میگوهای مولد موجود در استان هرمزگان باشد. همچنین پرندگان دریایی با پرواز آزادانه بخصوص بین مزارع آلوده و دریا می توانند براحتی بیماری را به محیط طبیعی منتقل بکنند.

بطورکلی با این بررسی و با نمونه برداری های انجام شده از مهمترین مناطق صیادی استان هرمزگان و بخصوص بندر جاسک که محل اصلی تامین میگوهای مولد برای مراکز تکثیر و پرورش می باشد تا زمان انجام آزمایشات ، نمونه های آزمایش شده از آن مناطق عاری از بیماری لکه سفید بودند، ولی با توجه به نتایج بدست آمده از بررسیهای Hsu و همکاران(۱۹۹۹) جهت ردیابی ویروس، مولدین بایستی قویا بعد از تخمریزی مورد آزمایش قرار گیرند.

پیشنهادها

۱- با توجه به اهمیت موضوع رد یابی و شناسایی بیماری لکه سفید در میگوهای وحشی و خرچنگ ها پیشنهاد می شود که موضوع همه ساله در دو نوبت صید سالانه میگو در استان و قبل از شروع فصل صید میگوی مولد جهت پایش میگوها انجام پذیرد.

۲- با توجه به اهمیت موضوع پیشنهاد می شود که بجای صید میگوهای مرحله ۴ از میگوی مولد با مراحل پائین صید شده و در یک مرکزتمام مولدین قرنطینه شده و پس از اطمینان از عاری بودن آنها در بین مراکز تکثیر پخش گردد.

۳- با توجه به اینکه خاستگاه میگوی مولد سفید هندی آبهای ساحلی جاسک می باشد، بمنظور عدم وابستگی زیاد به مولدین دریایی، مرکزی جهت مولد سازی در شهرستان جاسک احداث گردد.

منابع

- افشارنسب.م; کر.ن.م; جرفی.ا; اسکندری.غ.ر; مرتضایی.س.م.س; مهرابی.م.ر; جافریان.ا; ماهیانه; خورشیدیان.ک; آل خورشید(۱۳۸۶) بررسی و تعیین منبع بیماری لکه سفید(White spot disease) در میگوهای پرورشی منطقه آبادان .گزارش نهایی موسسه تحقیقات شیلات ایران ۳۲ صفحه
- تخم افشان.م؛تمجیدی.ب(۱۳۸۲)علائم ظاهری واسیب شناسی بیماری لکه سفید white spot syndrome disease (wssv)درمیگوهای پرورشی سفیدهندی(*Penaeus indicus*) در استان خوزستان.مجله علمی شیلات ایران،شماره۲،تابستان۱۳۸۲ صفحات ۱۵ تا ۲۸
- سلطانی.م(۱۳۸۱) اثرات ملی و بین المللی ناشی از بیماری ویروسی لکه سفید در صنعت میگو.فصلنامه نظام دامپزشکی شماره۲ ،زمستان ۱۳۸۱، صفحات ۵۳تا۵۷
- فائو(۲۰۰۴) معرفی و انتقال میگوی سفید غربی(*Penaeus vannamei*) و میگوی آبی(*Penaeus stylirotris*) به آسیا و اوقیانوسیه.مترجمین غلامعباس زرشناس و محمد خلیل پذیر،۱۳۸۶ ریالناشر موسسه تحقیقات شیلات ایران،۱۷۳ صفحه

- Arthur.J.R(1998) Disease prevention and health management in costal shrimp culture in Bangladesh.FAO Technical cooperation program.no.4
- Bondad-Reantaso.M.G; McGlsddery.S.E; East.I;Subasinghe.R.P(2001) Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Disease.FAO Fisheries Technichal Paper.402/2
- Chakraberty.a;Otta.K;Joseph.B;Kumar.S;Hossain.MD.S; Karunsagar.I;Yenugopal.M.N;Karunasagar.I(2002) Prevalence of white spot syndron virus in wild crustacean along the coast of India.Current Science, Vol82,No11,10 june 2002
- Cavalli.L.S;Marins.L.F;Netto.S;Abreu.P.C(2008)Evalution of white spot syndromvirus(WSSV)in waild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna,southern brazil.Atlantica,Rio Grande,30(1) 45-52,2008
- Chang.P.S;Chen.H.C;Wang.Y.C(1998) Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization.Aquaculture:164(1998)233-242
- Chapman.R.W;Browdy.C.L;Savin.S;Prior.S;Wenner.E(2004)– Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks.Dis Aquat org.Vol.59:179-158,2004
- East.I.J;Black.P.F;McColl.K.A;Hodgson.K.A.J;Bernoth.E.M(2004)Survey for the presence of white spot syndrome virus in Australian crustaceans.Australian Veterinary journal.Vol,82.No,4.April 2004
- Flegel.T.W(2006) Detection of major penaeid shrimp viruses in Asis,a historical prepective with emphasis on Thiland.Aquaculture.258(2006)1-33
- Hus.H.C;Lo.c.f;Lin.K.F;Peng.S.E;Chang.Y.S;Cheng.L.L Liu.W.J;Kou.G.H(1999) Studies on effective PCR
- screening strategies for white spot syndrome virus(wssv); detection in Penaeus monodon brooders.Dis Aquat Org.vol 39 :13-19,1999
- Itami.T;Maeda.M;Suzuki.N;Tokushige.K;Nakagawa.A;Hennig.O;

- Kondo.M;Kasornchandra.J;Hirono.I;Aoki.T;Kusuda.R;Takahashi.Y(1998)Possible prevention of white spot syndrome(WSSV) in kuruma shrimp,Penaeus Japonicus,in Japan. In T.W.Flegel(ed) Advances in shrimp Biotechnology.
- National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,Bangkok.
- Karunasagagar..J;Boonyaratpaline.S;Itami.T(1998)Detection of white spot syndrome in cultured Penaeid shrimp in Asia:Microscopic, observation and polymerase chain reaction.Aquaculture164(1998)243-251
- Karunasagar.I;Karunasagar.I(????)Biotechnological approaches towards health management in aquaculture.university of agriculture sciences.college of fisheries,Mangalore-575002
- Lotz.J.M; Soto.M.A(2002)Model of whote spot syndrome virus(WSSV) Epidemics in Litopenaeus vannamei.Dis aquat Org Vol.50:199-209,2002
- Lightner,D.V(1996) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured Penaein shrimp. World Aquaculture Society,Baton Rouge,LA;USA,305P
- Madhavi.R;Janakiram.P;Jayasree.L;Murth.P.S.N(2002) Occurrence infections with multiple viruses in Penaeus monodon from culture ponds of north coastal Andhra Pradesh.Current Science ,Vol 82.No 11. 10 june 2002
- Mohan.C.V;Corsin.F;Thakur.P.C;Padiar.P.A;Mdhusudan.M; Turnbull.J.F; Hao.N.V;Morgan.K.L(2002) usefull of dead shrimp specimen in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (wssv) and chronic bacterial infection.Dis Aquat Org.Vol 50,1-8,2002
- Rahman.M.M(2007) Differences in virulence between white spot syndrome virus(wssv) isolates and testing of some strategies in wssv infected shrimp.Thesis for obtaining the degree of Doctor in veterinary sciences(ph.D).Faculty of veterinary medicine ,Ghent university 2007
- Sahul Hameed.AS;Anilkumar.M;Stephen Raj.M.L;Jayaraman.K(1998) studies on th pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods.Aquaculture 160(1998) 31-45
- Sangamahheswaran.A.P ; Jeyaseenlan.M.J.P(2001)White spot viral disease in penaeid shrimp-A Review.Naga.The ICLARM Quarterly(Vol.24,Nos.3&4) july-december 2001
- Vanpatten.K.A;Candidate.M.S;Lightner.D.V(2004)Seabirds as vectors for penaeid shrimp viral disease. Industry brief the U.S.marine shrimp program.januvary 2004-Vol.10 No.1 Withyachumnarnkul.B;Boonsaeng.V;Chomsoong.R;Flegel.T.W;
- Muangsin.S;Nash.G.L(2003) seasonal variation in white spot syndrome virus – positive samples in broodstock and post – larvae of Penaeus monodon in Thailand.Dis Aquat Org.Vol 53:167 – 171,2003
- Yoganandhan.K;Thirupath;Sahul Hameed.A.s(2003) Biochemical,physiological ; hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp Penaeus indicus.Aquaculture, 221(2003) 1-11

پیوست

انواع میزبان های ویروس لکه سفیددر گونه های مختلف میگوو سایر سخت پوستان همراه با روش تشخیص آنها

میزبان های ویروس	آلودگی طبیعی یا تجربی	روش تشخیص				منابع و رفرانس
		H&E	TEM	In situ	PCR	
میگوهای پنائیده						
P. aztecus	E	+				Lightner, 1996a and Lightner, 1996b
P. chinensis	N	+	+	+		Lightner, 1996a and Lightner, 1996b and others
P. duorarum	E	+				Lightner, 1996a and Lightner, 1996b
P. indicus	N	+				Lightner, 1996a and Lightner, 1996b and others
P. japonicus	N	+	+	+	+	Lightner, 1996a and Lightner, 1996b and others
P. merguiensis	N	+		+		Lightner, 1996a and Lightner, 1996b and others
P. monodon	N	+	+	+	+	Lightner, 1996a and Lightner, 1996b and others
P. penicillatus	N	+			+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b
P. schmittii	E	+			+	Unpublished
P. semisulcatus	N	+			+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b
P. setiferus	E	+				Lightner, 1996a and Lightner, 1996b
P. stylirostris	E	+				Lightner, 1996a and Lightner, 1996b
P. vannamei	N	+		+		Lightner, 1996a and Lightner, 1996b, and others
سایر گونه های میگو		H&E	TEM	In situ	PCR	
Acetes sp.	E	+	+	+		Supamattaya et al. (1998)
Exopalaemon orientalis	N	+		+	+	Wang et al., 1998 and others
Macrobrachium idella	E	+			+	
Macrobrachium lamerrae	E	+			+	

میزبان های ویروس	آلودگی طبیعی یا تجربی	روش تشخیص				منابع و رفرانس
Macrobrach. rosenbergii	N	+/−		+	+	Peng et al. (1998)
Metapenaeus dobsoni	N				+	Hossain et al. (2001)
Metapenaeus ensis	N	+		+	+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b and others
Palaemon adspersus	E					Corbel et al. (2001)
P. sirrifer	N				+	
P. styliferus	N	+		+		Unpublished
Parapenaeopsis stylifera	N				+	Hossain et al. (2001)
Scyllarus arctus	E					Corbel et al. (2001)
Solenocera indica	N				+	Hossain et al. (2001)
Squilla mantis	N				+	Hossain et al. (2001)
Trachypenaeus curvirostris	E				+	Wang et al. (1998)
خرچنگ ها		H&E	TEM	In situ	PCR	
Cancer pagurus	E					Corbel et al. (2001)
Calappa philarigus	N				+	Kou et al. (1998)
C. lophos	E				+	Wang et al. (1998)
Charybdis annulata	N				+	Hossain et al. (2001)
C. cruciata	N				+	Hossain et al. (2001)
C. feriatus	N	+		+	+	Kou et al. (1998)
C. granulata	E				+	Wang et al. (1998)
C. japonica	N				+	
C. lucifera	N				+	
C. natotor	N				+	Kou et al. (1998)
Gelasimus marionis nitidus	N				+	Hossain et al. (2001)
Helice tridens					+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b

میزبان های ویروس	آلودگی طبیعی یا تجربی	روش تشخیص				منابع و رفرانس
Helice sp.	N				+	
Hemigrapsus sanguineus	N				+	
Liocarcinus depurator	E					Corbel et al. (2001)
L. puber	E					Corbel et al., 2001
Macrophthalmus sulcatus	N				+	Hossain et al. (2001)
Mangrove crab	N	+		+	+	Unpublished
Mantura sp.	N				+	
Matula planipes	N				+	
Metopograpsus messor	N				+	Hossain et al. (2001)
Paratelpusa hydrodomous	E	+			+	Sahul Hameed et al. (2001)
خرچنگ ها						
P. pulvinata	E	+			+	Sahul Hameed et al. (2001)
Portunus pelagicus	N	+	+	+	+	Supamattaya et al. (1998)
P. sanguineolentus	N	+	+	+	+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b
P. trituberculatus	N				+	
Scylla serrata	N	+	+	+	+	Supamattaya et al., 1998 and others
Sesarma oceana	N				+	
Sesarma sp.	N	+		+	+	Kanchanaphum et al. (1998)
Somannia thelpusa sp.	E					Unpublished
Thalamita sp.	N				+	Unpublished
Uca pugilator	E	+		+	+	Kanchanaphum et al. (1998)
لابسترها		H&E	TEM	In situ	PCR	
Panulirus longipes	E				+	Wang et al. (1998)
P. ornatus	E				+	Wang et al. (1998)
P. penicillatus	E				+	Wang et al. (1998)
P. versicolor	E				+	Wang et al. (1998)

میزبان های ویروس	آلودگی طبیعی یا تجربی	روش تشخیص				منابع و رفرانس
Misc.		H&E	TEM	In situ	PCR	
Copepods	N				+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b
Insect larva	N				+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b
Artemia salina	N				+	Chang et al. (2002)
Astacus leptodactylus	E					Corbel et al. (2001)
Cherax quadricarinatus	E				+	Shi et al. (2000)
Cambarus clarkii	E	+	+			Huang et al. (2001)
Orconectes limosus	E					Corbel et al. (2001)
O. punctimanus	N				+	Lo et al., 1996a and Lo et al., 1996b
Pacifastacus leniusculus	E	+			+	Jiravanichpaisal et al. (2001)
From Maeda et al., 1998						
Alpheus brevicristatus	N				+	Maeda et al. (1998)
Alpheus lobidens	N				+	Maeda et al. (1998)
Ocypode stimpsoni	N				+	Maeda et al. (1998)
Petrolisthes japonicus	N				+	Maeda et al. (1998)
Upogebia major	N				+	Maeda et al. (1998)

Abstact

More than 20 viruses have been reported as pathogenic to shrimp.WSV has been found to be highly pathogenic not only to penaeid shrimps, but also to a wide range of hosts which include marine crabs , copepods,freshwater crabs and prawns. Main objective of this study was detection and identification of white spot virus from wild shrimp and crabs population on the costal waters of Hormozgan Province.The samples were collected from three area seasonaly include: costal waters of Qeshm island,Hengam island and Jask.In this survey have been examined 1080 shrimp from each species of P.indicus, P.semisulcatus,P.merguiensis, Metapenaeus affinis and 1080 crabs (gill organs) by PCR and histopathological methods.Diagnostic kit for this survey have been prepaired from Genesis Biotechnology CO.in Malaysia,so called"Single-Tube Nested PCR for WSSV". The analysis results revealed that all samples which examined from these area were free from WSV.Following PCR tests that were negative for all samples so no observed any damages of histology due to WSV on gills.

Key words: white spot disease, Virus,Penaeus, PCR , Histopathology, Persian gulf

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.