وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

بیماری شناسی و پایش عوامل بیماریزا در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

مجری مسئول :
محمد افشار نسب

شماره ثبت
٤٦٠٦١

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور -پژوهشکده میگوی کشور

عنوان طرح : بیماری شناسی و پایش عوامل بیماریزا در تولید میگوی عاری از بیماری خاص
شماره مصوب طرح : K ۹۱۰۱-۹۱۰۳-۱۲-۸۰-۱٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمد افشار نسب
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : محمد افشار نسب
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد افشار نسب
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عقیل دشتیان نسب، مریم میربخش، محمدرضا مهرابی ، شاپور کاکولکی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۹۱/۱۲/۱
مدت اجرا : ۱ سال و ۷ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹٤
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح : بیماری شناسی و پایش عوامل بیماریزا در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

کد مصوب : K ۹۱۰۱-۹۱۰۳-۱۲-۸۰-۱٤

شماره ثبت (فروست) : ٤٦٠٦١ تاریخ : ۹۳/۷/۲۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد افشار نسب دارای مدرک تحصیلی دکتری‌در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

طرح توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۳/۶/۲۳ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشورمشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-کلیات ۲
۱-۱-بیماریهای ویروسی میگو ۳
۱-۲-بیماریهای باکتریائی میگو ۱۵
۱-۳-بیماریهای قارچی میگو ۱۹
۱-۴-بیماریهای انگلی میگو ۲۲
۱-۵-بیماریهای محیطی و تغذیهای مراکز تکثیر و پرورش میگو ۲۷
۱-۶-پایش بیماریها در مرکز تولید میگوی SPF ۲۸
۱-۷-اهداف طرح ۳۱
۲-مواد و روش کار ۳۲
۲-۱-نمونه برداری ۳۳
۲- ۲ - شناسایی اولیه بیماری توسط مطالعات بالینی ۳۴
۲-۳-شناسایی بیماری به روش آسیب شناسی ۳۵
۲-۴-اجرای آزمایشات PCR ۴۱
۲-۵-آزمایشات باکتری شناسی و انگل شناسی ۴۴
۳-نتایج ۴۷
۳-۱-پایش عوامل قارچی و ویروسی آب در تولید میگوی عاری از بیماری خاص ۵۳
۳-۲-بررسی موردی علت سفید شدن چشم میگوها ۵۶
۳-۳-بررسی موردی تخمدان میگو ۵۸
۳-۴-آنتی بیوگرام سویه های غالب باکتریایی جداسازی شده از آب محل تکثیر میگوها ۵۹
۳-۵-نگهداری طولانی مدت سویه های باکتریایی جداسازی شده ۵۹
۴-بحث ۶۰
منابع ۶۵
چکیده انگلیسی ۶۹

چکیده

دستیابی به روشهای تولید گونه‌های میگوی عاری از بیماری (Specific Pathogen Free) یا SPF از میگوهای بومی و یا وارداتی و تولید پست لاروهای سالم و بهداشتی، قدم اول موفقیت در جهت توسعه پایدار صنعت میگو در ایران محسوب می‌گردد. این اقدام نیازمند درک صحیحی از اصول اساسی مدیریت بهداشتی و ایمنی زیستی درمراکز تکثیر و پرورش میگوهای عاری از بیماریهای خاص است، تا بتوان به سهم پرورش سخت پوستان و میگو که طی برنامه پنجم توسعه اقتصادی، اجتماعی کشور ۲۵ هزار تن در نظر گرفته شده است، دست پیدا کرد. برای این منظور آشنائی با مهمترین بیماریهای که موجب خسارت در صنعت پروش میگو شده و همچنین بکارگیری روشهائی که بتواند با استقرار ایمنی زیستی موجب حذف عوامل بیماریزا در مولدین پرورشی گردد مهمترین اقدام در تولید میگوی عاری از بیمار ی خاص می‌باشد. برای این منظور از مجموع مهمترین عوامل ویروسی ، باکتریائی و قارچی در میگوهای مولد جمع آوری شده با انجام آزمایشات غربالگری نسبت به عاری بودن از آنها مطمئن شده وسپس مولدین را برای مراحل بعد وارد چرخه تولید پست لارو در زنجیره میگوی عاری از بیماری خاص می‌کنند. در این طرح بر اساس روشهای ارائه شده توسط سازمان، ابتدا نسبت به جمع آوری ۸۰۰۰ میگوی مولد از دو جمعیت مولاکای و های هلت در تاریخ مهر لغایت آبانماه ۱۳۹۱ از مراکز پرورشی در استان بوشهر جمع آوری گردید. مهمترین بیماریها در مراکز میگوی عاری از بیماری، به سه گروه عوامل بیماریزای مهم برای پایش و مراقبت در مرکز تولید میگوی SPF تقسیم نمودیم، گروه اول، عوامل بیماریزایی هستند که توانایی ایجاد تلفات شدید در یک گونه یا تعداد زیادی از گونه های میگو را دارند، گروه دوم، عوامل بیماریزایی هستند که می‌توانند موجب خسارات و آسیبهای خفیف تری شوند و گروه سوم، عوامل بیماریزایی که آسیبهای کمتری را وارد می نمایند ولی از مزارع یا مرکز تولید مولد بایستی دور باشند. این بیماریها به همراه ثبت علائم بالینی در مراحل مختلف تولید میگوی عاری از بیمار ی بر اساس روش PCR و روشهای آسیب شناسی برای ویروسها، کشت و تشخیصهای مولکولی برای قارچها و باکتریها در مراحل ورود اولیه مولد به مرکز، زمان تکثیر مولدین، زمان مولدسازی از پست لاروهای تولیدی در نسل اول و مولدسازی از میگوهای تولیدی در نسل دوم مورد آزمایش قراردادیم و در صورت مثبت بودن نمونه ها را حذف و در صورت منفی بوده وارد مرحله بعدی تولید شدند. در طی اجرای ازمایش کلیه نمونه از نظر بیماریهای ویروسی ویروس لکه سفید (WSSV)،ویروس سندرم تورا (TSV)، ویروس کله زرد (YHV)،ویروس عفونت زای هیپودرم و نکروز دهنده بافت خونساز (IHHNV)،مونودون باکلو ویروس (MBV)، پاروو ویروس هپاتوپانکراس (HPV)، ویروس نکروز دهنده عفونی عضلات (IMNV) منفی، باکتریهای بیماریزا فقط در یک مورد بیماری باکتریائی نکروز عفونی پانکراس(NHP) و تعدادی ویبریوهای مرسوم در مرامز تکثیر و پرورش گزارش و تک یاخته میکروسپوریدیا نیز در مراحل ازمایش منفی اعلام گردید.

واژه های کلیدی:پایش، شناسائی، بیماریهای میگو، SPF

۱-کلیات

خسارات اقتصادی ناشی از بیماری های آبزیان در جهان از مهمترین چالش های فراروی کشورهای پیشگام در عرصه آبزی پروری بوده و تبعات سیاسی ،اقتصادی و اجتماعی ناشی از آن بحران های جدی ایجاد کرده است. روند توسعهٔ آبزی پروری در کشور و عدم توجه کافی به زیر ساخت های مدیریت بهداشتی این صنعت در گذشته، زمینه ساز بروز آسیب های جدی در مقاطع زمانی حال و آینده شده است، بگونه ای که هر از چندگاه شاهد بروز همه گیری های متعددی در مزارع تکثیر و پرورش آبزیان کشور می باشیم . وقوع همه گیری بیماری ویروسی لکه سفید (WSD) در مزارع پرورش میگوی استانهای خوزستان , بوشهر, سیستان و بلوچستان موجب تحمیل میلیاردها ریال خسارت مستقیم به پرورش دهندگان میگو (بدون احتساب خسارات وارده به صنایع جانبی مانند مراکز عمل آوری ، کارخانه های تولید خوراک آبزیان و ...) گردیده و بحران های ناشی از آن تا مدتها گریبانگیر دست اندرکاران این صنعت خواهد بود(افشارنسب، ۱۳۸۶) . مهمترین عوامل بیماریزای کشنده میگوهای پرورشی در جهان، ویروسها میباشند. در حال حاضر بیش از بیست ویروس که در میگوهای خانواده پنائیده بیماریهای مهلک و مرگ و میر شدید ایجاد می نمایند، شناسایی شده است. بیماریهایی نظیر سندرم تورا (TS)، سندرم لکه سفید (WSS)، کله زرد (YHD) و نکروزعفونی بافتهای زیر پوستی و خونساز (IHHN) را میتوان مهمترین تهدید برای صنعت تکثیر و پرورش میگو درجهان محسوب نمود که از سال ۱۹۹۴ میلادی تاکنون، برخی از آنها هر ساله بیش از ۳-۱ میلیارد دلار خسارت اقتصادی به پرورش دهندگان میگو در قاره های آسیا، آمریکا و اقیانوسیه وارد نموده اند (افشارنسب، ۱۳۸۶). در آمریکا از سال ۱۹۸۹ که بیماری IHHN در میگوی وانامی تلفات زیادی را ایجاد نمود، تولید میگوهای عاری از عوامل بیماریزای خاص Specific Pathogen Free (SPF) در دستور کار قرار گرفت. استفاده از پست لاروهایSPF میگوی وانامی موجب جهشی عظیم در تولید میگوی پرورشی جهان شد(Wyban, 1992). در سال ۲۰۰۶ از ۲میلیون تن میگوی پرورشی تولید شده، بیش از ۷۵٪ به گونه وانامی اختصاص داشت. تولید میگوهایSPF به عنوان یکی از چرخه های زیربنایی تولید میگو، جایگاهی استراتژیک یافته و بسیاری از کشورها در حال تولید و یا برنامه ریزی تولید آن می باشند (wyban,2007). با اینحال تلاش بر این است که با اجرای پایلوت تحقیقاتی کسب و انتقال دانش فنی برای تولید میگوی عاری از بیماری خاص در کشور و قطع وابستگی زمینه و دانش فنی تولید این محصول در کشور فراهم گردد. توسط سازمان جهانی بهداشت دام The World Organisation for Animal Health (OIE) برخی از عوامل بیماریزای خطرناک آبزیان (از جمله میگو) که میتوانند مرگ و میر شدید در مراکز تکثیر، پرورش و مولدسازی میگو ایجاد نمایند، به عنوان بیماریهای اخطار کردنی(Notifiable Diseases) تعیین گردیده و فهرست شده اند، کلیه کشورهای جهان موظفند براساس روشهای استاندارد ویکسان تشخیص بیماریهای مذکور، نسبت به انجام آزمایشات اقدام نمایند. نقل و انتقال آبزیان بدون اخذ گواهی بهداشتی مبنی بر عاری بودن آبزی مورد نظر از بیماریهای قید شده در این فهرست منع شده است.

سازمان OIE در فهرست سال۲۰۱۱ بیماریهای اخطار کردنی میگو، نام پنج بیماری ویروسی کله زرد (YHD) Yellow Head Disease ، نکروز عفونی عضلات Infectious Myonecrosis (IMN) ، لکه سفید، سندروم تورا، نکروز عفونی بافتهای زیرپوستی و خونساز و یک بیماری خطرناک باکتریایی بنام نکروز هپاتوپانکراس (NHP) Necrotising Hepatopancreatitis را درج نموده است. حال آنکه در آخرین فهرست بیماریهای اخطار کردنی میگو که توسط شبکه مراکز تکثیر و پرورش آبزیان آسیا – اقیانوسیه (NACA) بطور مشترک با سازمان OIE منتشر شده، علاوه بر بیماریهای مذکور نام سه بیماری ویروسی Baculoviral Midgut Gland Necrosis, Tetrahedral Baculovirosis, Spherical Baculovirosis, نیز بچشم می خورد. در این قسمت مروری بر مهمترین بیماریهای مهم در مراکز تکثیر و پرورش میگو و بیماریهائی که باید در مراکز تولید عاری از بیماری نیز باید ردیابی گردند مورد مطالعه قرار میگیرند.

۱-۱-بیماری‌های ویروسی میگو

تاکنون ۲۰ بیماری ویروسی در میگو شناسایی شده است. این بیماریها خسارتهای سنگینی را به صنعت تکثیر و پرورش میگو وارد نموده اند. میگوها در مراحل مختلف زندگی به این ویروسها حساس بوده و باعث مرگ و میر، کاهش رشد و یا تغییر وضعیت ظاهری میگوها می‌شوند. در جدول ۱ مهمترین بیماریهای ویروسی میگو ارائه گردیده است.

جدول ۱: مهمترین بیماریهای ویروسی میگو

Family	Virus
DNA virus	
Parvoviridae	Infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus (IHHNV)[1]
	Hepatopancreatic parvovirus (HPV)[1]
	Spawner-isolated mortality virus (SMV)[2]
	Lymphoidal parvo-like virus (LPV)[1]
Baculoviridae	Baculovirus penaei (BP)[1]
	Monodon baculovirus (MBV)[1]
	Baculovirus midgut gland necrosis virus (BMNV)[1]
	Type C baculovirus of *Penaeus monodon*[3]
	Hemocyte infecting non-occluded baculo-like virus[4]
Iridovidae	Shrimp iridovirus (IRIDO)[5,6]
Nimaviridae	White spot syndrome virus (WSSV)[7]
RNA Virus	
Picornaviridae	Taura syndrome virus (TSV)[1]
Roniviridae	Yellow head virus (YHV)[8]
	Gill associated virus (GAV)[7]
	Lymphoid organ virus (LOV)9
Reoviridae	Reo-like virus (REO) type II and IV[1]
Rhabdoviridae	Rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)[1]
Togaviridae	Lymphoid organ vacuolization virus (LOVV)[1]
Totiviridae	Infectious myonecrosis virus (IMNV)[10]
Bunyaviridae	Mourilyan virus (MOV)[11]
unclassified	Monodon slow growth syndrome (MSGS)[12]

۱-۱-۱-بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و بافت زیرجلدی

(Infection Hypodermal and Heamatopoitic Necrosis Virus) IHHNV

-عامل بیماری

کوچکترین ویروس شناخته شده میگوهای پنائیده ویروس IHHNV است. ویروس IHHNV، فاقد پوشش با اندازه ۲۲-۲۰ نانومتر است و چگالی آن ۱/۴۰ گرم در میلی لیتر در CsCl است، دارای DNA تک رشته ای خطی با اندازه تقریبی 4.1 kb است و کپسیدی دارد که دارای چهار پلی پپتید با وزن مولکولی ۷۴، ۴۷، ۳۹ و ۳۷,۵ KD است. حداقل چهار ژنوتیپ متمایز IHHNV شناسایی شده اند ولی تنها دوژنوتیت از این چهار ژنوتیپ به عنوان عامل مسبب بیماری برای*L.vannamei* و یا *P.monodon* معرفی گردیده‌اند. البته بخشی از ژنوم IHHNV در میگوی

پنائیده آفریقای شرقی و ناحیه Indo-pacific غربی یافت شده و نشان می دهد که ممکن است عامل شناخته شده برای گونه‌های میزبان شاخص *L.vannamei* و *P.monodon* ، بیماری زا نباشد(Lightner and Redman, 1991; Lightner,1996).

-گستره جغرافیایی بیماری

با انتشار وسیع در کارگاه‌های پرورشی در آمریکا و آسیا و اقیانوسیه گزارش گردیده است. در آمریکا در جنوب شرق ایالات متحده امریکا، مکزیک، امریکای مرکزی، اکوادور، پرو، برزیل و چندین جزیره کارایبی گسترش یافت. در اقیانوس آرام مرکزی در هاوایی، گوام، هائیتی و کالدونیای جدید گزارش شده است همچنین این بیماری در آسیا و منطقه هند ـ آرام در سنگاپور، فیلیپین، تایلند، مالزی و اندونزی گزارش گردیده است. تصور می‌رود IHHNV در میگوهای پنائیده پرورشی یا وحشی هند ـ آرام و اکوادور بومی باشد و در میگوهای پنائیده پرورشی اکوادور، غرب پاناما و غرب مکزیک نیز مشاهده شده است(Lightner,1996; Flegel,2006).

-گستره میزبانی

این بیماری در گونه‌های *P.stylirostris*، *P.vannamei*، *P.occidentalis*، *P.californiensis*، *P. monodon*، *P.semisulcatus* دیده می‌شود. با توجه به اینکه گونه‌های دیگری از پنائیده‌ها از جمله *P.setiferus*، *P.duorarum* و *P.aztecus* به شکل تجربی آلوده شده‌اند، وجود آلودگی‌های طبیعی در سایر گونه‌ها محتمل است. به نظر می‌رسد گونه‌هایی مانند *P.indicus* و *P.merguiensis* نسبت به IHHNV مقاوم باشند(Lightner,1996; Flegel,2006)

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

اکثر گونه‌های پنائیده این قابلیت را دارند که آلوده به IHHNV شوند، از جمله گونه‌های پرورشی اصلی: *P. monodon* ، *L. vannamei* و *L. stylirostris* می‌باشند.عفونت با IHHNV در میگوی آبی اقیانوس آرام، *(L.stylirostris)* به شدیدترین حد است، در مورد این گونه ویروس می‌تواند همه‌گیری‌های حاد و مرگ و میر دسته جمعی (بیش از ۹۰ درصد) را موجب شود. در *L.stylirostris* مراحل زندگی نوجوانی و مرحله‌ای که هنوز به بلوغ نرسیده‌اند، مراحلی هستند که با بیشترین شدت تحت تاثیر ویروس قرار می‌گیرند (Aldy de Garcia and Flegel, 1999).

IHHNV موجب بیماری مزمن، «سندروم تغییر شکل کوتولکی» (RDS)، در *L. vannamei* می‌شود که در این شرایط به جای مرگ و میر، رشد نامنظم و کم و تغییر شکل کوتیکول، تأثیرات اصلی هستند. آلودگی با IHHNV در *L. vannamei* معمولاً به صورت Subclinical (غیرقابل تشخیص) است ولی به دلیل RDS، با کاهش

نرخ رشد و کاهش بازدهی (راندمان) پرورش، در ذخایر آلوده شده با IHHNV، همراه است (Bell and Lightner,1984,1987; Brock and Main, 1994).

این بیماری با بروز لکه های سفید بر روی بندهای سوم و ششم بدن و همچنین پدید آمدن حالت کوتولگی در ظاهر به همراه بی اشتهائی و خمیده شدن روستروم میگوها همراه میباشد. در آسیب شناسی اجسام بارز داخل هسته‌ای گنجیدگی Cowdry نوع A، می‌توان آلودگی به ویروس IHHNV را تشخیص داد. این اجسام گنجیدگی شاخص IHHN ائوزنیوفیل هستند و غالباً اجسام گنجیدگی داخل هسته‌ای هستند که به صورت هاله‌دار می‌شوند (با رنگ‌های هماتوکسیلین وائوزین بافت‌هایی که با فیکس‌کننده‌هایی که حاوی اسید استیک هستند، مثل محلول Davidson's AFA و Bouin، نگهداری شده اند.)، این اجسام گنجیدگی، در هسته‌های با حاشیه کروماتینی و هایپرتروفی شده سلول‌های بافت‌های با منشأ اکتودرمی (اپیدرم، اپی تلیوم هیپودرم روده جلویی و پشتی، طناب عصبی و عقده عصبی) و مزودرمی (اندامهای خونساز، غده آنتنی، گنادها و اندام لنفوئید و بافت پیوندی) وجود دارند. اجسام گنجیدگی داخل هسته‌ای مربوط به IHHNV ممکن است به آسانی با اجسام گنجیدگی داخل هسته‌ای ناشی از آلودگی به WSSV، اشتباه گرفته شوند. روشهای ملکولی از قبیل dot-blot و PCR ، بررسی هیبریدیزاسیون In-situ این بخش‌ها با یک نشانگر اختصاصی DNA برای IHHNV، تشخیص قطعی آلودگی با IHHNV را موجب می‌شود (Lightner, 1996; Lightner,1998).

۲-۱-۱-بیماری هپاتوپانکراس پاروا ویروسی HPV (Hepatopancreatic Parvolike Virus)

یک بیماری ویروسی است که ویروس عامل بیماری شبه پا رو و ویروس دارای DNA به ابعاد حدود ۲۴-۲۲ نانومتر می باشد. گونه‌های حساس به این بیماری گونه‌های *P.merguiensis*، *P.semisulcatus*، *P.chinensis*، *P.Japonicus*، *L.stylirostris*، *P.indicus* و *L.vannamei* می باشد. این بیماری ویروسی بیشتر در میگوهای جوان *P.merguiensis* و *P.semisulcatus* ایجاد بیماری کرده و ممکن است تلفاتی نزدیک به ۱۰۰٪ در این میگوها ایجاد کند(Lightner, 1996;Flegel etal., 2004).

انتشار جغرافیایی بیماری بسیار وسیع بوده و همه گیریهای متعددی از کشورهای مختلف از جمله کره، چین، تایوان، فیلیپین، اندونزی، مالزی، سنگاپور، استرالیا، کنیا، فلسطین اشغالی، کویت، آمریکای شمالی و جنوبی، مکزیک، السالوادور و برزیل گزارش شده است. این بیماری نخستین بار در میگوی *P.merguiensis* در سنگاپور تشخیص داده شد و در سال ۱۹۸۳ در مالزی تعیین هویت شد(Lightner,1996).

-علائم بالینی و آسیب شناسی

علائم کلینیکی مختلفی در میگوهای مبتلا به HPV ممکن است دیده شود: بی حالی و بی اشتهایی، کاهش فعالیت پاهای شناگر راه رونده و قلابهای نگهدارنده غذا، آلودگی شدید به تک یاخته‌های همزیست سطحی،

باکتریهای رشته‌ای و دیاتومه‌های کفزی و همچنین عفونتهای ثانویه از علایم قابل مشاهده در این بیماری است. ویروس باعث مرگ سلول ها شده و سلولهای توبولهای غده هپاتوپانکراس را آلوده کرده و باعث چروکیده شدن هپاتوپانکراس شده و همچنین سبب آتروفی و نکروز آن می شوند و به دنبال آن متابولیسم غیرطبیعی و در نهایت مرگ دیده می شود(Lightner,1996; Pantoga and Lightner, 2001).

هیپرتروفی هسته در سلولهای هپاتوپانکراس همراه با گنجیدگیهایی داخل هسته‌ای بازوفیلی یا ائوزنیوفیلی از مشخصات این بیماری می‌باشد، جابجایی هستک و حاشیه نشینی کروماتین‌ها در مراحل پیشرفته دیده می‌شود. در مراحل اولیه گنجیدگیها کوچک و ائوزنیوفیلی و در واقع در مرکز هسته می‌باشند و بعداً بازوفیلی می‌شوند. در برخی سلولها در کنار گنجیدگی crest یا هلال دیده می‌شود(Lightner et al.,1994).

۳-۱-۱-بیماری نکروز روده میانی باکلوویروسی BMN (Baculoviral Midgut Necrosis)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن باکولوویروس نوع C با اسید نوکلئیک از نوع DNA می باشد. باکولوویروس عامل بیماری دارای غشاء بوده و ابعاد آن ۷۲ در ۳۱۰ نانومتر تخمین زده می شود. منبع آلودگی مولدین ماده آلوده می‌باشد.این بیماری قبلاً دارای نام های متفاوتی بوده و تحت عنوان بیماری کبد سفید کدر، بیماری ابری غده روده میانی، بیماری کدورت سفید و بیماری باکولوویروسی نوع C گونه مونودون نامیده می شد(Sano et al., 1984; Lightner, 1996)

گونه‌های میزبان این بیماری *P.japonicus* ، *P.monodon* و *P. plebejus* می‌باشد و بیماری را به صورت آزمایشگاهی در *P.japonicus* گزارش کردند. این بیماری مخصوص مراحل لاروی و پست لاروی است. در ابتدای مرحله مایسیس ظاهر می‌شود و با تلفات بالا و حدود ۹۸٪ گزارش شده است. این بیماری در کشور ژاپن از مشکلات عمده مراکز تکثیر میگو می‌باشد و تلفات شدیدی را در لاروها ایجاد می کند.همه‌گیری BMN اولین بار از ژاپن در سال ۱۹۷۱ گزارش شده است ولی پس از آن این بیماری در *P.chinensis*، و *P.monodon* از فیلیپین، استرالیا و اندونزی نیز گزارش گردید(Villasante and Puent, 1993).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

هپاتوپانکراس در مراحل لاروی و پست لاروی ۹ و ۱۰ روزه به رنگ سفید کدر در می آید و با پیشرفت بیماری لکه‌های سفید بیشتر آشکار می شود. لاروها به طور غیرفعال در سطح آب شناور شده و روده میانی آنها به صورت یک خط سفید در ناحیه شکمی مشاهده می‌شود. ویروس موجب نکروز اپی‌تلیوم مجاری هپاتوپانکراس و احتمالاً اپی‌تلیوم موکوسی و مخاطی روده میانی می‌شود. این بیماری جز تیپ A باکولوویروس‌ها می‌باشد(Lightner and Redman, 1992; Lightner,1996).

از لحاظ هستیوپاتولوژی هسته سلولهای آلوده به صورت حلقه انگشتر دیده می‌شود زیرا بر اثر تحت فشار قرار گرفتن هسته، هستک‌ها به اطراف و حاشیه هسته می‌روند و کروماتین در حاشیه قرار می‌گیرد. در مواردی هسته دچار شکستگی شده و کروماتین آن کاهش می‌یابد و حالت حلقه انگشتر کمتر دیده می‌شود. نکروز سلولهای توبولی هپاتوپانکراس و هیپرتروفی آنها دیده می‌شود، اما ایجاد گنجیدگی داخل سلولی نمی‌کند (Lightner ad Redman, 1992; Lightner,1996).

٤-١-١-بیماری باکوویروسی مونودون MBV (Monodon Baculovirus)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن باکولوویروس از نوع A با DNA دو رشته‌ای و میله‌ای شکل می‌باشد و اندازه آن ۶۹ در ۲۷۵ نانومتر می‌باشد.این بیماری بیشتر در میگوی *P.monodon* گزارش شده است ولی میزبانهای این بیماری میگوهای گونه *P.monodon* ، *P.merguiensis*، *P.semisulcatus*، *P.indicus* و احتمالاً *L.vannamei* می باشد. گونه *P.semisulcatus* در عین داشتن علائم عفونی، علائم کلینیکی ندارد و حامل سالم محسوب می‌شود ولی گونه *P.merguiensis*، علائم کلینیکی را نشان می‌دهد (Lightner and Redman, 1981; Brock et al.,1983; Lightner, 1996)

انتشار جغرافیایی این بیماری در چین، تایوان، اندونزی، فیلیپین، مالزی، تایلند، سریلانکا، سنگاپور، استرالیا، هند، فلسطین، کویت، عمان، ایتالیا، کنیا، گامبیا و آفریقای جنوبی می‌باشد. گزارش آلودگی در کویت می‌تواند زنگ خطری برای میگوی بومی ایرانی باشد.این بیماری بیشتر در پست لاروهای ۲۰ تا ۳۰ روزه ایجاد بیماری می‌کند و عوامل استرس زا باعث تشدید این بیماری می‌گردند(Lightner, 1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

نشانه های بیماری عبارتند از: بی‌حالی، بی اشتهایی، تیره شدن رنگ بدن و آبشش‌ها، بوی بد پوسته که ناشی از تک یاخته‌ها می‌باشد. میگوهای مبتلا به رنگ خاکستری مایل به آبی تا سیاه دیده می‌شوند و با افزایش رشد و دیاتومه کفزی و باکتری رشته‌ای فساد پوسته خارجی در میگوی بیمار دیده می‌شود. تخریب لایه داخلی گوارش و هپاتوپانکراس نیز در میگوی بیمار دیده می‌شود. تراکم زیاد پست لاروها و شرایط بد نگهداری شدت بیماری را افزایش می‌دهد(Fegan etal., 1991; Liao et al., 1992; Flegel et al., 2004)

در هیستوپاتولوژی گنجیدگیهای ویروسی را می‌توان در مقاطع بافتی هپاتوپانکراس و روده میانی به صورت اجسام متعدد گرد در هسته سلولها دید. در سلولهای مبتلا هسته‌ها دچار هیپرتروفی می‌شوند و کروماتین در حاشیه هسته تجمع پیدا می‌کند(Lightner,1996; Flegel etal, 2004).

۵-۱-۱-بیماری باکولوویروسی پنایی BP (Baculovirus Penaei)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن باکولوویروس نوع A با اسید نوکلئیک DNA، میله‌ای شکل و با اندازه ۷۴ در ۲۷۰ نانومتر می‌باشد. همه‌گیریهای شدیدی در لاروها، پست لاروها و میگوهای جوان گونه‌های مختلف میگوها از جمله میگوی*P.aztecus*، *P.duorarum* ,*P.vannamei*، *P.monodon*، *P.setiferus* ایجاد کرده است. تا کنون محدود به ایالات متحده آمریکا و سواحل مرکزی و جنوبی بوده است. در لاروها مرگ و میر نزدیک به ۱۰۰٪ ایجاد می کند در حالی که در میگوهای بزرگتر بیماری فرم خفیف‌تری دارد و درصد کل تلفات در آنها کمتر است(Couch, 1974; Brock et al., 1983).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائمی مانند کاهش مصرف غذا و رشد و بزرگ شدن آبشش‌ها به خاطر حضور سایر ارگانیسم‌ها را می‌توان دید. گنجیدگی‌های باکولوویروس در هپاتوپانکراس و روده میانی دیده می‌شوند. گنجیدگی‌های BP هرمی و چهاروجهی ائوزینی می‌باشند. هیپرتروفی هسته، حاشیه نشینی کروماتین و دژنراسیون هسته سلول‌های اپی‌تلیال هپاتوپانکراس دیده می‌شود. به خاطر تکثیر دستگاه گلژی سیتوپلاسم سلول آلوده واکوئله دیده می‌شود که در مراحل آخر عفونت می‌باشد(Johnson and Lightner, 1988;Lightner,1996).

۶-۱-۱-بیماری شبه رئو (Reo – likevirus)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن رئوویروس دارای اسید نوکلئیک RNA دو رشته‌ای با اندازه ۷۰-۵۰ نانومتر می‌باشد. گونه‌های*P.japonicus* ، *P.monodon*و *L.vannamei* حساس به این بیماری می‌باشند. در گونه *P.chinensis* بیماری در دریای زرد نیز مشاهده شده است. این بیماری در کشورهای، ژاپن، مالزی، فرانسه، منطقه هاوایی و اکوادور گزارش شده است. در سال ۱۹۸۷ در فرانسه از گونه *P.japonicus* جدا شد و در سال ۱۹۸۸ از گونه *P.monodon* آسیای شرقی جدا شد. با افزایش تراکم درصد آلودگی بیشتر می‌شود. شیوع بیماری آهسته است و حدود ۴۵ روز برای گسترش زمان لازم دارد(Lightner et al., 1985).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم این بیماری عبارتند از کاهش رشد، بی‌اشتهایی، سرگیجه، کاهش فعالیت شنا و متعاقب آن افزایش موجودات همزیست روی بدن و آبشش و گاهی کدورت عضلات شکمی، آبشش به رنگ سیاه و تلسون، اوروپودها و هپاتوپانکراس به رنگ قرمز در می‌آید. اختلالاتی مثل نکروز و رنگ پریدگی و آتروفی در هپاتوپانکراس دیده می‌شود. این بیماری یک بیماری تحلیل برنده مزمن است(Mari and Bonami.,1988).

گنجیدگی‌های سیتوپلاسمی ائوزینی تا بازوفیلی کمرنگ در حاشیه غشاء سلول‌های هپاتوپانکراس نوع F و R دیده می‌شود. ضایعات بخش قدامی روده میانی و آتروفی هپاتوپانکراس می‌تواند به تشخیص کمک کند. میگوها در طول روز در اطراف استخر در سطح جمع می‌شوند. میزان تلفات از ۵ تا ۱۰ درصد و در برخی نقاط ۸۵ تا ۹۵٪ می باشد(Lightner, 1988; Lightner,1996).

۷-۱-۱-بیماری کله زرد YHV (Yellow Head Virus)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن یک ویروس RNA دو رشته‌ای میله‌ای شکل پوشش‌دار می‌باشد که هنوز مشخص نشده که رابدوویروس است یا پارامیکسوویروس. با این حال در بررسی با میکروسکوپ الکترونی ویروس عامل این بیماری به صورت یک ویروس غشاءدار میله‌ای شکل به طول ۲۰۰- ۱۵۰ نانومتر و به قطر ۵۰- ۴۰ نانومتر است و محل تکثیر آن در سیتوپلاسم سلولهای اکتودرمی و مزودرمی می‌باشد. گونه‌های حساس به بیماری *P.monodon* پرورشی در آسیا و هند، *P.styllferus* می‌باشد. به صورت آزمایشی در گونه *L.vannamei*، *P.durarom*، *P.aztecus* و میگوی آبهای غربی دیده شده است. در تایلند، مالزی، اندونزی، چین و فیلیپین گزارش شده است، بیماری عمدتاً در آسیا دیده می‌شود (Limsuwan, 1991; Boonayaratpalin et al.,1993; Lightner, 1996) بیماری در میگوی *P.monodon* با تلفات شدید حدود ۱۰۰٪ همراه بوده است. این میگو از مرحله پست لارو ۱۵ به بعد به بیماری حساس می شود و قبل از آن مقاوم است.انتقال بیماری عمدتاً توسط آب آلوده صورت می گیرد. با این حال غذای آلوده، وسایل و حاملین غیربیمار (سخت پوستان) در انتقال بیماری نقش به سزایی دارند. ترشحات جنسی میگوهای آلوده نیز حاوی ویروس می‌باشد. انتقال ویروس از مناطق آلوده به مناطق عاری از بیماری احتمالاً توسط انتقال میگو یا سخت پوستان زنده و یا محصولات منجمدشده آلوده صورت می گیرد(Flegel etal., 1997).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

در طی ۲ تا ۴ روز از شروع آلودگی، میگوهای بیمار علائم بیماری را ظاهر می کنند که در ابتدا با کاهش شدید یا عدم تمایل به غذا و مرگ و میر شدید ظاهر می‌شود. در میگوی مبتلا رنگ زرد روشن دیده می‌شود و بعد تعداد میگوهای مبتلا افزایش می‌یابد و تلفات زیاد می گردد. سفالوتراکس متورم، آبشش به رنگ زرد تا قهوه‌ای و هپاتوپانکراس زرد کمرنگ دیده می‌شود(Nash etal., 1995).

در هیستوپاتولوژی نکروز شدید در بافتهای با منشاء اکتودرمی و مزودرمی دیده می‌شود. گنجیدگی سیتوپلاسمی اطراف هسته‌ای کروی بازوفیلی در هموسیت، اندام‌های لمفوئیدی و بافت‌های خونساز، آبشش‌ها و سلول‌های اپی تلیال تیغه‌های آبششی و بافت همبند عضلات، عضلات روده و اعصاب دیده می‌شود. در مراحل اول ممکن

است هیپوتروفی هسته‌ای، مرزنشینی کروماتین و جابجایی هستک دیده می‌شود (Nash etal., 1995; Flegel et al., 1997)

۸-۱-۱-بیماری شبه پارالمفوئیدی LPV (Like – paralymphoid virus)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن شبه پارو با اندازه ۱۸ تا ۲۰ نانومتری می‌باشد و ویژه اندام‌های لمفوئیدی است. این بیماری فقط در میگوهای پنائیده استرالیایی در گونه *P.monodon*، *P.merguiensis* و *P.esculentus* مشاهده شده است(Owens etal., 1991).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم کلینیکی مشخصی گزارش نشده است، حتی زمانی که ضایعات شدید در ارگان های لمفوئیدی در نمونه های هستیوپاتولوژی مشاهده می‌شود. در مقاطع بافت شناسی گنجیدگی‌های کروی ائوزینی بازوفیلی داخل هسته ای در سلول‌های اندام‌های لمفوئیدی، خونساز و بافت همبند بافتهای مختلف و آبشش دیده می‌شود که بسیار شبیه گنجیدگی IHHNV است. فقط تفاوت در این است که همه کروی‌اند ولی در IHHNV گنجیدگی شکل نامنظم دارد و بازوفیلی تیره می‌باشد. نکروز صفحات سلولی چند کانونی در اندام‌های لمفوئیدی، هیپرتروفی هسته ها با کروماتین کمرنگ و هسته‌های پیکنوزه دیده می‌شود(Owens et al., 1991; Lightner, 1996)

۹-۱-۱-بیماری واکوئلیزه شدن اندامهای لمفوئیدیLOVV

(Lymphoid Organ Vacuolization Virus)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن توگاویروس غشاءدار، دارای RNA با اندازه حدود ۵۲ نانومتر می‌باشد. این بیماری واکوئله شدن اندام‌های لمفوئیدی را باعث شده و فقط در پنائیده‌های آمریکا و گونه *L.vannamei* گزارش شده است و شرایط مشابهی با بیماری LPV به ویژه در گونه *P.monodon* در آسیا دارد (Bonami et al., 1992).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم مشخصی برای این بیماری گزارش نشده است. حتی زمانی که ضایعات شدیدی در اندام‌های لمفاوی با روش هستیوپاتولوژی یافت شده است. در مقاطع هستیوپاتولوژی ضایعات اندام‌های لمفوئیدی شامل نکروز چند کانونی در صفحات سلولی و تشکیل اسفروئید می‌باشد. هیپرتروفی هسته با کروماتین رنگ پریده و هسته پیکنوزه و گنجیدگی سیتوپلاسمی ائوزینی تا بازوفیلی تیره در سیتوپلاسم های واکوئله شدید دیده می شود.(Bonamei et al., 1992; Lightner, 1993)

۱۰-۱-۱-بیماری رابدوویروس (Rabdo Viridae)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن رابدوویروس گونه پنائیده می‌باشد و RNA ویروس دورشته‌ای با شکل گلوله و اندازه حدود ۴۵ در ۱۶۰ نانومتر می باشد.از گونه های *L.vannamei* و میگوهای آبهای غربی در امریکا و اکوادور و هاوایی جدا شده است(Lu and Philip, 1994).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

ضایعات بافت‌های لمفوئیدی مشابهYHVاست. در هیستوپاتولوژی هیپرتروفی وندول‌های بزرگ هیپرتروفی و اسفروئید در اندام‌های لمفوئیدی دیده می‌شود. در سیتوپلاسم واکوئل، کانون‌های نکروز و التهاب حضور دارد(Lightner,1996).

۱۱-۱-۱-بیماری TSV یا سندروم تورا (Taura Syndrome Virus)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن پیکورنا ویروس است. این ویروس دارای RNA دورشته‌ای با اندازه حدود ۳۲-۳۰ نانومتر، بدون غشاء و با شکل بیست وجهی است. محل تکثیر آن سیتوپلاسم سلول می‌باشد. در گونه های *L.vannamei* ، میگوی آبهای غربی و *P. setiferus* بیماری مشاهده شده است. پست لاروها و جوانها در گونه *P.durarome* و *P.aztecus* به بیماری مقاوم می‌باشند. گسترش جغرافیایی بیماری محدود به سواحل اقیانوس آرام امریکای جنوبی و مرکزی می باشد. اولین بار در سال ۱۹۹۲ در ناحیه Taura در اکوادور گزارش شد. انتقال بیماری توسط آب آلوده، غذای آلوده به ویروس و هم جنس خواری میگوها صورت می گیرد. حامل‌های بدون علائم در انتقال بیماری به میگوهای حساس نقش اساسی دارند. انتقال عمودی نیز احتمالاً صورت می گیرد، هر چند هنوز ثابت نشده است. این بیماری از طریق گونه وانامی به دیگر کشورها نیز گسترش یافت (Hasson et al., 1995; Fauquet et al., 2004; Mayo, 2005)

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

این بیماری در ۱۴ تا ۴۰ روز بعد از ذخیره سازی پست لاروهای *L.vannamei* در استخرهای پرورش دیده می‌شود و دارای سه فاز مشخص است: فاز حاد، گذرا و مزمن که این سه حالت از هم قابل تشخیص هستند. در فاز حاد، کروماتورفورها قرمزرنگ پوست گسترش یافته و رنگ میگو متمایل به قرمز می‌شود. این تغییر رنگ در اوروپودها و پلئوپودها بسیار واضح‌تر است. به همین دلیل نام دیگر بیماری به دم قرمز معروف است و میگو در مراحل پوست اندازی می‌میرد که نکروز کانونی اپی تلیال در این میگوها دیده می‌شود. پوسته نرم و روده خالی نیز مشاهده می‌شود. در انتهای مرحله حاد بیماری، مرحله گذرا ظاهر می‌شود که در این مرحله در تعدادی از میگوها لکه‌های ملانیزه در کوتیکول ظاهر می‌شود. این لکه‌های سیاه مدور بوده و به دلیل تجمع هموسیتها در

محل‌های نکروز کوتیکول می‌باشد. میگوهایی که تلف نمی‌شوند وارد مرحله مزمن می‌شوند که عفونت را در بافت‌های لمفوئید خود تا آخر عمر نگه می‌دارند. این بیماری حدود ۸۰ تا ۹۵٪ خسارت به استخرهای آلوده وارد می کند(Hasson et al., 1999).

در هیستوپاتولوژی نکروز چند کانونی در اپی‌تلیوم در سطح بدن و زوائد و آبشش و روده خلفی و معده و مری دیده می‌شود. بافت‌های مجاور کوتیکول مثل عضلات و بافت همبند نیز درگیر می‌شوند. سلولهای ائوزنیوفیلی افزایش می‌یابد، پیکنوز هسته و کاریوکسی، اجسام کروی فراوان و سیتوپلاسم ائوزینوفیلی تا بازوفیلی کمرنگ دیده می‌شوند(Nielsen et al., 2005).

۱۲-۱-۱-بیماری لکه سفید WSD (White Spot Disease)

یک بیماری ویروسی است که عامل آن یک ویروس با DNA دورشته ای، میله ای شکل و گاهی بیضوی است و دارای یک کپسول سه لایه است. ابعاد این ویروس ۳۵۰-۲۵۰ در ۱۲۰-۸۰ نانومتر گزارش شده است و در رنگ آمیزی منفی دارای یک زائده دم مانند است(Van Hulten and Valk, 2001., Van Hulten et al., 2001)

این ویروس دارای پوشش می‌باشد و بسیار سریعتر از ویروس‌های بدون پوشش غیرعفونی می‌شود. بیماری لکه سفید از اکثر کشورهای آسیایی مانند چین، ژاپن، تایلند، تایوان، مالزی، هند و اخیراً در ایران گزارش شده است. این بیماری علاوه بر میگوهای خانواده پنائیده در برخی دیگر از گونه‌های ده پایان مانند میگوی آب شیرین، خرچنگها، لابستر و بسیاری از سخت‌پوستان غیرخوراکی ایجاد آلودگی می‌کند. این بیماری تقریباً در تمام دوران زندگی میگو از زمان لاروی تا بلوغ ظاهر شده و وابسته به سن خاصی نیست. اگرچه طبق گزارشات جهانی بیشتر همه‌گیری‌ها در میگوهای جوان نابالغ بروز کرده است. درصد تلفات بسیار بالاست و در برخی شرایط در مدت کمتر از ۱۰ روز تلفات به ۱۰۰٪ می رسد(Wogteerasupaya et al., 1996)

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

بسته به مرحله زندگی میزبان و حضور عوامل استرس‌زای خارجی مثل تغییرات دما، درجه شوری، حضور بیماری‌های باکتریایی و سایر آلاینده‌ها، بیماری با درجات متعدد دیده می‌شود. این بیماری با بی‌اشتهایی و عدم تمایل میگوها به غذا شروع شده و با تلفات شدید که پس از چند روز ظاهر می شود، ادامه می یابد. میگوهای بیمار و در حال مرگ در حاشیه استخرها دیده می‌شوند. با مشاهده میگوهای بیمار، می توان لکه سفید را به صورت مدور که به قطر حدود چند میلی متر می‌رسد و گاهی هم به هم متصل شده و لکه‌های بزرگتری ایجاد می کند دید. این لکه‌های سفید بیشتر در سطح داخلی کاراپاس، روی زوائد و کوتیکول ظاهر می‌شود. لکه‌های سفید حاصل رسوب نمک‌های کلسیمی در اپیدرم کوتیکول می‌باشد.(Wang etal., 2000)

این ویروس علاوه بر بافت پوششی کوتیکول در تمام سطح بدن به بافتهای مختلفی از جمله بافتهای عصبی، ماهیچه‌ای، لمفاوی و خونی حمله می‌کند. همچنین باعث آسیب آبشش، هپاتوپانکراس و قلب میگو می‌شود. در بررسی هستیوپاتولوژیک آبششها، روده‌ها و هپاتوپانکراس، تغییرات دژنراتیو و نکروتیک در سلول‌های این بافت ها قابل مشاهده است. هیپرتروفی هسته‌ها همراه با کناره‌گیری کروماتین و ایجاد واکوئل‌های درشت از مشخصات این بیماری است در هسته سلول‌های روده نیز گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای نوع کودری A (Cowdry Type A) ممکن است دیده شود.(Aldy de Garcia and Flegel, 1999, Lightner,1996)

۱۳-۱-۱-بیماری نکروز عفونی عضلات میگو Infection Myonecrosis Virus (IMNV)

این بیماری در سال ۲۰۰۲ در شمال غربی برزیل و در میگوی *L. vannamei* مشاهده و موجب خسارتی معادل ده میلیون دلار در این کشور گردید. عامل ایجاد کننده بیماری ویروسی با اندازه ۴۰ نانومتر ، بیست وجهی و اندازه ژنوم آن ۷۵۶۰bp می باشد. ویروس فاقد پوشش بوده و دارای چهار پروتئین اصلی در قسمت کپسول با وزنهای ۱۰۶، ۱۴۹، ۴۲و ۲۴ کیلو دالتون می باشد. بررسی وضعیت نوکلئوتید ویروس نشان داده است که ویروس به صورت double stranded RNA (dsRNA) بوده و فاقد قطعه (segment) می باشد. بر اساس ردیف بازهای سازنده اسید نوکلئیک ویروس مشخص شده است که عامل بیماری متعلق به خانواده Totiviridae و جنس Giardivirus می باشد(Poulous et al., 2006)

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

از علائم مشخص بیماری کاهش رشد در میگوها بالاخص در مراحل جوانی می باشد. در میگوهای بیمار از ناحیه دم و بند ششم بدن، بافت عضلانی سفید ، نکروز شده و مات می شود و سپس به سایر بندهای بدن این حالت سرایت کرده و تمام عضلات ناحیه شکمی را در بر می گیرد. بیماری با ایجاد استرس از جمله تغییرات شدید آب وهوا ، استفاده از غذای نا مرغوب و افزایش ذخیره سازی در میگو های جوان بروز کرده و در ابتدا با مرگ ومیر شدید همراه بوده ولی درادامه به صورت مزمن خود را نشان می دهد. دربرخی ازنمونه ها دم میگوها رنگ قرمز گرفته و تلفات حداکثر تا ۷۰درصد می رسد.اندامهای مبتلا به بیماری در آسیب شناسی دارای نقاط نکروزه لخته مانند در عضلات بوده و دراین اندامها حالت ادم مشاهده می شود. در میگوهائی که بعد از یک همه گیری شدید نجات یافته و یا بیماری در آنها به صورت مزمن باقی مانده باشد نقاط نکروزه بصورت لخته ائی مایع شکل دیده می شود و این حالت نیز غالبا با ادم همراه است. توسعه بیماری با نفوذ هموسیتها در بافت آلوده و فیبروز شدن بافت همراه است. دراین بیماری ارگان لنفاوی میگو به شکل کروی تغییر یافته و سیتوپلاسم سلولهای لنفاوی در هموسلها و بافت پیوندی سلولهای ناحیه قلب و مجاری غد آنتی به شدت کاهش می یابد.

همچنین در سلولهای عضلانی، بافت پیوندی و هموسیتها گنجیدگیهای قرمز تا آبی رنگ را میتوان مشاهده نمود(Lightner etal., 2004).

۱٤-۱-۱-بیماری Mourilyan virus(MOV)

این بیماری در زمان مطالعه بیماری ویروس همراه آبشش (Gill Association Virus)و به صورت اتفاقی شناسائی گردید. این بیماری به صورت بومی در میگوهای مونون استرالیا، مالزی و تایلند گزارش گردیده است. همچنین به نظر میرسد بصورت تدریجی در میگوهای *P. japonicus* نیز موجب مرگ و میر گردد. عامل ایجاد کننده بیماری احتمالا از خانواده Bunyaviridaeمیباشد و به صورت تخم مرغی شکلو دارای پوشش با ابعاد ۸۵-۱۰۰نانومتر بوده و در سیتوپلاسم تکثیر میابد.تکمیل ویروس در غشاء اندوپلاسمی صورت گرفته و ویوس به میگوهای دریایئ و لب شور حساس بوده و میزبان اصلی آن میگوی مونودن و میگوی *P. japonicus* میباشد. بیشترین آسیب وارده به میگوهای جوان و بالغ واردشده و معمولا با روش RT-nested- PCR قابل ردیابی است(Cowley etal., 2005).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

در بررسی بالینی، هیچ علائمی در میگوهای بیمار مشاهده نشده ولی در آسیب شناسی اندامهای ارگان لنفاوی، اپیتلیوم کوتیکول، بافت پیوندی معده و قسمت سفالو تراکس، غدد آنتنی، آبشش، قلب، بافتهای خونساز،بافت پیوندی هپاتوپانکراس در این بیماری آسیب دیده و ویروس در آنها قابل دیدن میباشد. با رنگ آمیزی H&Eتجمعی از سلولها با هسته متورم و تغییر شکل سلولها به تخم مرغی تا بیضی از مشخصات بیماری است(Sellars etal., 2005).

۲-۱-بیماریهای باکتریائی میگو

باکتریائی که در بروز بیماری میگودرگیرهستند یا باکتریایی فرصت طلب بوده یا پاتوژن می باشند. درشرایط محیطی نامساعد باکتریهای فرصت طلب باعث بروزبیماری می شوند. بیماریهای باکتریایی درمیگو ممکن است باعث مرگ و میر، ضایعات جلدی، نکروز، کدر و مات شدن عضلات بدن، تغییر رنگ آبششها، کاهش رشد، از دست دادن کوتیکول، ایجاد روده سفید، بی حالی و کاهش مصرف غذا را به همراه داشته باشند. مهمترین بیماری باکتریایی میگو عبارتند از بیماری ویبریوسیس، بیماری نکروز هپاتوپانکراس (NHP) ، بیماری مایکوباکتریوم، بیماری ریکتزیا، بیماری باکتریایی کیتینوز پوسته میگو، بیماری زوائد حرکتی میگو (filamentous bacterial disease) (Lightner, 1996, Horawitz and Horwitze, 2001., Nunan et al., 2005, Goarant et al., 2006, Jayasree et al., 2006)

۱-۲-۱-بیماری ویبریوسیس (Vibriosis in shrimp)

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم منفی، اکسیداز مثبت، استوانه ای و متحرک می باشند. این باکتری غیرهوازی اختیاری بوده و حرکت آنها توسط تاژک صورت می گیرد. دارای متابولیسم هوازی بوده و قادر به تخمیر کربوهیدراتها می‌باشد و تولید اسید بدون گاز می نماید. ابعاد این باکتری ۲/۶μm – ۱/۴ × ۰/۸ – ۰/۵ می باشد. به ویبریواستات ۱/۲۹ حساس و معمولاً در محیطهای آبی بالاخص در میان سخت پوستان و در سطح پوست و اندامهای داخلی سخت پوستان به ظاهر سالم، همچنین در رسوبات و در ستونهای آب جدا شده و در محیطهایی که آلودگی بالا یا شوری بالا داشته باشد، بالاترین میزان شیوع را دارا هستند.

مهمترین گونه هائی که در میگو موجب بروز بیماری می شوند عبارتند از : *V.harveyi*، *V.vulnificus* ، *V.parahaemolyticus* و *V.alginolyticus* که به ترتیب فراوانی در هچریها ایجاد بیماری می کنند . در مزارع پرورشی و نرسریها بیشتر گونه ها *V.parahaemolyticus* ، *V.alginolyticus* ، *V.harveyi* و *V.vulnificus* به ترتیب ایجاد بیماری می کنند . در پاره ای مواقع *V.damsela* و *V.fluviallis* نیز موجب بروز بیماری می-شوند(Lightner,1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

این بیماری باعث مرگ و میر شدید بالاخص در پست لاروها و میگوهای جوان می شود. میگوهای آلوده به بیماری علائمی از قبیل هیپوکسی (Hypoxia) و آمدن به سطح استخر و کناره های استخر را نشان می دهند. با توجه به اینکه میگوها جهت دریافت اکسیژن به سطح می آیند، پرندگان دریایی جهت گرفتن میگوها در روی استخرها به فراوانی دیده می شوند. معمولاً در شب میگوهای آلوده حالت نورافشانی (Luminescent) از خود نشان می دهند. عفونت ناشی از ویبریوها در میگو ممکن است جلدی (cuticular) ، روده ای (enteric) یا عمومی (systemic) باشد. این حالتها بالاخص در لاروها و پست لاروها مشاهده می شود. میگوهای آلوده (لاروها و پست لاروها) آلوده به ویبریوهای نورافشان به طور مشخص کلنی های باکتریایی زیادی به رنگ آبی و به شکل پلاک نشان می دهند. در بزرگنمایی بالا این پلاکها به صورت تجمعی از باکتریهای میله ای شکل در سطح کوتیکول یا قسمتهای دهان، زوائد حرکتی و در سطح کوتیکول مری و قسمتهای دستگاه گوارش و معده دیده می شوند(Chen et al.,1992; Chen et al., 2000)

به همراه علائم سطحی آلودگیهای باکتریهایی سطح دهان و قسمت پیش معده دستگها گوارشی، معمولاً مجاری هپاتوپانکراس و اپی تلیال روده میانی نیز گرد و کنده شده و بداخل مجاری هپاتوپانکراس رها شده و به همین دلیل بیماری را Bolitias blancas یا Little white balls گویند.باکتریهایی مهاجم به سطح روده میانی و مجاری هپاتوپانکراس ممکن است موجب گسترش پلاکهای باکتریایی شده و باعث ایجاد عفونت سیستمی و عمومی شده و مرحله نهایی بیماری شروع شود(Sinderman,1990).

علائم آسیب شناسی در میگوهای جوان و بالغ متفاوت بوده و با توجه به اینکه این باکتریها ممکن است جزء میکروفلور طبیعی این میگوها بوده، در اثر ضربه یا تأثیرات شدید محیطی یا به صورت عفونت ثانویه ناشی از سایر باکتریها یا در نتیجه افزایش میزان گونه های بیماریزا، باعث بروز بیماری در این دسته از میگوها می شود. عفونتهای ناشی از این باکتریها در میگوهای جوان و بالغ یا به صورت زخم های سطحی بوده که به طور مشخص بوسیله کپسولی از هموسیتها یا درپوشی به صورت ملانوزه احاطه شده است و باکتریها به طور مشخص در داخل زخم ها یا کناره های آن قابل دیدن می باشد(Lightner,1996).

۲-۲-۱-بیماری نکروز عفونی پانکراس(Necrotizing Hepatopancrititis) (NHP)

باکتری ایجاد کننده NHP یک باکتری گرم منفی ، کوچک و پاتوژن اجباری داخل سلول می باشد که تمایل به بافتهای اپی تلیال بالاخص هپاتوپانکراس میگو دارد. بر اساس گزارش Frelier و همکاران (۱۹۹۲) از نظر تاکسونومی این باکتری متعلق به خانواده Proteobacter و یک جنس جدیدی از این خانواده عامل بیماری می باشد.

دو شکل از این باکتری در عفونت NHP مشخص شده است. یک فرم شکل استوانه ای ریکتزیا مانند با اندازه µm ۰/۹ × ۰/۳ که فاقد تاژک می باشد. فرم دیگر آن حالت مارپیچی و حلزونی مانند بوده و اندازه ان ۲/۹µm تا ۲/۶ µm × ۰/۲می باشد. فرم مارپیچی (Helical) آن دارای ۸ تاژک بوده که در قسمت نوک این باکتری قرار گرفته است. همچنین یک تار و تاژک اضافه نیز در قسمت تیغه مارپیچی وجود دارد. مطالعات ژنوتیپی نشان داده است که کلیه سویه های باکتری ایجاد کننده NHP در نقاط مختلف دنیا خیلی بهم نزدیک می باشد(Loy etal., 1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم کلینیکی بیماری شامل کاهش مصرف غذا ، لاغری و روده ها خالی می باشد. میزان غذای مصرفی (FCR) افزایش یافته و رشد میگو کاهش می یابد. نسبت طول میگو به وزن میگو و پهنای بدن میگو کاهش یافته و میگوها لاغر می شوند. پوسته میگو نرم و بدن میگوها سست می شود. آبشش های میگوها سیاه و تیره شده و رنگدانه های کروماتوفور در قسمتهای انتهایی اندامهای حرکتی میگو بالاخص Uropods و Pleopods گسترش یافته و باکتریهای رسوب کننده در سطح پوسته میگو افزایش یافته و میگوها بی حال شده و بعد از مدتی از بین می روند(Lightner and Redman, 1994).

هپاتوپانکراس میگوها آتروفی و کوچک شده و مرکز هپاتوپانکراس سفید بی رنگ شده و کاملاً با حالت طبیعی هپاتوپانکراس قابل تمایز می باشد. همچنین در بافت هپاتوپانکراس رگه‌هایی سیاه ناشی از ملانوزه شدن مجاری هپاتوپانکراس مشاهده می شود و بافت هپاتوپانکراس نرم و آبکی شده و حالت ادماتوز داشته و مرکز آن آبکی است(Johnson, 1991; Lightner, 1996).

مطالعات آسیب شناسی هپاتوپانکراسهای آلوده به NHP نشان دهنده آتروفی ملایم تا شدید مجاری هپاتوپانکراس بوده و تعداد زیادی کانونهای گرانولوماتوزی که ممکن است در یک یا چند مجاری وجود داشته باشند در این اندام قابل مشاهده است. سلولهای مجاری این تلیال که نزدیک به کانونهای گرانولوماتوزی می‌باشند نیز کاملاً آتروفی شده و از حالت ستونی به حالت مربعی تغییر شکل داده‌اند. این سلولها حاوی مقدار کمی بافت چربی بوده یا دارای واکوئلهای چربی می باشند، بالاخص در R-cell و به طور مشخص تعداد سلولهای ترشحی آنها کاهش یافته است(Johnson, 1991; Lightner, 1996).

۳-۲-۱-عفونتهای ریکتزیائی (Ricketsial infection)

ریکتزیا یا باکتریهای ریکتزیا شکل (Ricketsia Like Bacteria)(RLB) با اندازه ۱/۶μm – ۰/۸× ۰/۷ – ۰/۲ از مهمترین عوامل عفونی در این بیماری می باشند. این باکتریها گرم منفی بوده و به صورت استوانه ای می باشند. باکتری بوسیله یک پوشش سلولی احاطه شده که خود دارای سه لایه داخلی ، میانی و خارجی می باشند. مهمترین اندامهایی که باکتری به آنها حمله می کند شامل ارگان لنفاوی، بافت پیوندی (به صورت سیستمی) همولنف، فاگوسیتها و اپی تلیال سطح کوتیکول و هپاتوپانکراس می باشد. این باکتری انگل اجباری داخل سلولی بوده و فقط در سیتوپلاسم سلولهای بافت هدف رشد می کند ولی در پاره ای مواقع در هسته نیز رشد می کند(Anderson et al., 1987; Krol et al., 1991)

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم کلینیکی بیماری بسته به نوع عفونت متفاوت می باشد. در پاره ای مواقع عامل ایجاد کننده بیماری (RLB) ممکن است با حمله به بافت پیوندی ایجاد عفونت سیستمیک نموده و در این حالت میگو بی حال بوده، غذا نمی خورند و در محل های کم عمق استخرها در کناره های لبه ها تجمع می کنند. در پاره ای از میگوها که در کناره ها جمع شده اند دارای آبشش قهوه ای رنگ، عضلات شکمی میگوها کدر و هپاتوپانکراس آنها شکننده می باشند. در پاره ای مواقع عامل بیماری فقط هپاتوپانکراس را مورد تهاجم قرار داده و این حالت بالاخص در میگوهای *P.marginatus* ، *P.mergucensis* ، *P.stylirostris* مشاهده می شود. در این میگوها هپاتوپانکراس آتروفی شده و بی رنگ می باشند. همچنین میگوها بی حال بوده و تمایلی به غذا خوردن ندارند (Bonamei and Papalardo, 1980).

در مطالعات آسیب شناسی در اغلب اوقات باکتری را در داخل سیتوپلاسم دیده و به صورت کلنی های کوچک به شکل اینکلوژن بادی می باشند. اطراف باکتریها یک پوشش با غشاء سه لایه وجود دارد و اندازه این میکروکلنی ها ۵۰μm–۵ می باشد . با رنگ آمیزی H&E رنگ آبی را جذب نموده و گرم منفی بوده و با رنگ آمیزی Feulgen مثبت می باشند. با رنگ آمیزی گیمسا و درشت نمایی ۴۰۰ اطلاعات مهمتری از این باکتری به

دست می آید. البته رنگ آمیزی Steiners silver stain به منظور مشاهده باکتریهای داخل سلولی اطلاعات کاملتری را نشان می دهد(Lightner,1996; Linda et al., 2003).

سلولهای هپاتوپانکراس در عفونت RLB به صورت چند شکلی تغییر یافته و معمولاً دو اندازه مشخص از باکتری ممکن است در سلولها دیده شود. در عفونت سیستمی باکتریها که در بافتها و سلولهای مختلف از جمله در سلولهای فاگوسیتوز، بافت پیوندی، غدد آنتنی، ارگان لنفاوی ثابت شده اند دیده می شوند. میگوهای آلوده به صورت ثابت نشان دهنده یک واکنش ثابت ، سیستمی و مشخص از سلولهای همولنف می باشند و این موضوع احتمالاً بیشتر در عفونت ریکتزیا اتفاق می افتد. ضایعات التهابی ممکن است مرکزی بوده و به خوبی در ندولها مجزا نمی باشد. تجمع زیادی از سلولهای لنفاوی معمولاً باعث بستن مجاری و ایجاد واکوئل می شود. مهمترین قسمتی که چنین حالتی اتفاق می افتد عروق آبشش ها می باشد(Lightner,1996).

٤-۲-۱-بیماری سل میگو (Shrimp Tuberculosis)

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم مثبت، اسید فست و استوانه ای شکل بنام Mycobacterium بوده که معمولاً با ایجاد ندولهای ملانوزه و ضایعات گراتولوماتوزی همراه می باشد. برای جدا سازی این باکتری نیاز به محیطهای اختصاصی بوده و یک بیماری مشترک با انسان می باشد و موجب ایجاد ضایعاتی بر روی دستهای پرورش دهندگان میگو یا کارگران واحدهای عمل آوری می نماید. از مهمترین گونه هایی که ایجاد بیماری می کنند عبارتند از : *M.marinum* و *M.fortuitum* (Lightner and Redman, 1986;Lightner, 1993; Lightner,1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم ظاهری همراه این بیماری به صورت تعداد زیادی کانونهای ملانوزه در قسمتهای مختلف بدن میگو و نواحی عضلات، تخمدان، قلب و آبشش مشاهده می شود. در پاره ای مواقع یک زخم های بزرگ غیر منظم در سطح کوتیکول ظاهر می شود و نقاط ملانوزه متعدد دیده نمی شود. در رنگ آمیزی H&E ضایعات ایجاد شده بر روی بدن و اندامهای مختلف شامل کانونهای ملانوزه با تجمعی از سلولهای هموسیت و یا ضایعات گرانولوماتوزی مشاهده می شود. در این ضایعات و کانونهای ملانوزه باکتریهای آبی کم رنگ استوانه ای شکل ممکن است به همراه تجمع سلولهای هموسیتی مشاهده شود. در رنگ آمیزی گرم این باکتریها در ندولها یا گره‌ها به صورت گرم مثبت بوده و در رنگ آمیزی زیل تلسون یا Carbol fuchsine که رنگ آمیزیهای خاص باکتریهای اسید – فست می باشد، رنگ باکتریها به صورت قرمز روشن مشاهده می شود (Lightner and Redman, 1986;Lightner, 1993; Lightner,1996)

۳-۱-بیماریهای قارچی میگو

تعداد زیادی از قارچها باعث عفونت میگوها شده و تعدادی از آنها بیماریزا می باشند. بعضی از آنها باعث

ضایعاتی در آبشش میگوها شده و بیماری آبشش یا (Gill disease) را باعث می شوند. در این حالت آبشش میگو تخریب شده و میزبان بر اثر خفگی ناشی از کاهش اکسیژن تلف می شود (Lightner , 1996) . دو دسته از قارچها در میگوها ایجاد بیماری می کنند.

۱-۳-۱-بیماری مایکوزلاروی (Larval mycosis)

این بیماری را بنامهای مختلفی از جمله مایکوزلاروی، بیماری قارچی (Fungus disease) بیماری لاژیندیوم یا سیرولپدیوم (Lagenidiom or sirolpidium disease) می نامند. عامل ایجاد کننده بیماری در اغلب اوقات توسط فاکوماستهای قارچ لاژیندیوم (جنس *L.callinetes*) و سیرولپدیوم ایجاد می شود. سایر فاکوماستها از قبیل جنس فیتیوم (*Phythium spp*)، جنس لپتولژنیا مارینا (*Leptolegnia marina*) و جنس هالیفتورس میلفوردنسیس (*Haliphthoros milfordensis*) ممکن است در پاره ای مواقع باعث بروز این بیماری شوند (Lightner, 1983; Lightner,1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

مرگ و میر ناگهانی در لاروها و پست لاروها از اولین علائم بروز بیماری می باشد. عفونت ناشی از لاژیندیوم معمولاً در تخم ها، ناپلی، پروتوزآ و مایسیس اتفاق می افتد. در حالیکه عفونت ناشی از سیرولپیدیوم معمولاً در مراحل انتهایی دوره مایسیس و مراحل اولیه پست لاروی گزارش گردیده است.

عفونت ناشی از این قارچ در لاروها و پست لاروها باعث ایجاد یک میکوز سیستمی پیش رونده شده که اغلب اوقات موجب کاهش یا توقف پاسخ های التهابی در بدن میگو می شود. (این اتفاق ناشی از کپسوله شده هموسیتها یا پدیده ملانیزه شدن هایف های قارچ ها می باشد). عفونت انفرادی میگوها معمولاً کشنده بوده و با آلودگیهای ناشی از ویبریوسیس یا بیماری terminal bacterimia همراه می باشد. لاروها و پست لاروهای آلوده (مشاهده شده با بزرگنمایی ۲۰ یا بالاتر) به صورت گسترده دارای میسیسلیوم هایی بوده که تمام سطح بدن و اندام های حرکتی را پوشانده و معمولاً به صورت پیوسته و رشته ای می باشد. هایف ها به صورت ظاهری کلیه بافتهای بدن لاروها یا پست لاروها را پوشانده و رنگ آن به صورت زرد کمرنگ متمایل به سبز که حاوی قطراتی شبیه روغن می باشد پوشانده است(Lightner,1996).

مشاهدات آسیب شناسی هایف ها و تشخیص لوله های ترشحی که از سطح بدن میگوها خارج می شوند، نشانه های مهمی در تشخیص این بیماری ایجاد می کند. قارچ لاژیندیوم در این روش به صورت مجاری ترشحی که دارای کیسه انتهایی بوده و حاوی زئوسپور می باشد از سطح کوتیکول میگو به همراه اسپورانژیوم در توده میسیلیوم خارج شده است. در حالیکه قارچ سیرولپدیوم به صورت مجاری ترشحی کوتاه و فاقد کیسه انتهایی حاوی زئوسپورهای بیرون زده از سطح بدن میگوها دیده می شود(Lightner,1996) .

۲-۳-۱-بیماری فوزاریوم(Fusarium disease)

این بیماری را بنامهای فوزاریوم، فوزاریوسیس یا بیماری آبشش سیاه (Black gill disease) می شناسند. عامل ایجاد کننده بیماری قارچ *F.solani* و سایر گونه های این جنس از جمله *F.moniliforme* می باشند. همچنین قارچهای فایکوماست شبیه *Atkinsiella dubia* و جنس *Haliphthoros* در مواقعی به صورت پاتوژن در میگوها ایجاد بیماری می کنند. امّا این قارچها معمولاً با آبشش یا ضایعات جلدی همراه بوده و شبیه قارچ فوزاریوم ضایعات در بدن میگو ایجاد می کنند(Lightner,1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم کلینیکی این بیماری عبارتند از بروز ضایعات ناشی از پاسخهای التهابی که به صورت ملانوزه در سطح بدن میگوها نمایان می شود. ضایعات ملانوزه همراه با قرمزی و نکروز شدن قسمت انتهایی اندامهای مختلفی از جمله تاژکها، آنتن ها، پایکهای چشمی، پاهای شنا و پاهای حرکتی دیده می شود. همچنین در مراحل بلوغ یا پایین تر میگوهای حساس، می توان اندامهای حرکتی که نوک آنها خمیده شده یا از بین رفته را از نزدیک مشاهده نمود(Brock and Main,1994).

قارچ فوزاریوم تمایل شدیدی به عفونت Basal coax یا پاهای حرکتی دارد. همچنین این قارچ به شدت به بافت آبشش حمله نموده و موجب بروز ضایعات ملانوزه در این اندام می شود. به همراه این قارچ، سایر قارچهایی که تمایل دارند به قسمت نوک یا پایه اندامهای حرکتی میگو هجوم بردند نیز در این بیماری دیده می شود. ضایعات گسترده ملانوزه شده و قطع شدن برخی از اندامهای حرکتی به همراه زخمهای روی سطح بدن یا ضایعات ناشی از فوزاریوم مشاهده می شود(Brock and Lightner,1990).

در روش آسیب شناسی با استفاده از روش H&E ضایعات ناشی از این قارچ را می توان به صورت ضایعات گرانولوماتوزی به همراه ندولهای هموسیتی با مرکز ملانوزه مشاهده نمود. همچنین رشته های هیف قرمز یا زردرنگ در ندولهای یا هیف ها یا در کونیدها در گوشه ها با سطح ضایعات را می توان در بررسی دقیق و از نزدیک مشاهده نمود(Lightner, 1996).

در ضایعات پیشرفته که متشکل از بافتهای نکروز و کانونهای ملانوزه بوده و همچنین سطوح ضایعات، فیبروز و هجوم هیف ها از بافتهای مجاور را می توان مشاهده نمود. در رنگ آمیزی PASو PAS همراه با رنگ نقره ای به روشنی رشته های هیف فوزاریوم را نشان می دهد و کونیدیای درون یا در سطح ضایعات قابل دیدن می باشد. با رنگ آمیزی PAS، هیف ها و کونیدیاها به رنگ صورتی تا قرمز رنگ دیده شده و در رنگ آمیزی PAS با نقره هیف ها به رنگ سیاه نمایان می شوند(Lightner,1996).

٤-١-بیماریهای انگلی میگو

١-٤-١-بیماری میکروسپوریدیا یا میگوی پنبه ای (cotton shrimp)

این بیماری را که بیماری میگوی پنبه ای، میگوی شیری، میکروسپوریدیا و یا بیماری نوزما (nosema disease) می نامند یکی از بیماریهای مهم انگلی میگو می باشد. عامل ایجاد کننده بیماری جنس های مختلفی از جمله Agmasoma(=Thelohania),(=Nosema)Ameson و(=plistophora)Pleistophora از میکروسپوریدیها بوده که از این جنس‌ها گونه‌های *P.penaei , Am.nelsoni , Ag.duorava , Ag.penaei* از مهمترین آنها می باشند(Johnson, 1990).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

سه جنس از چهار جنس معرفی شده از میکروسپوریدیا (Thelohania , Nosema, Ameson) باعث عفونت عضلات میگو شده و عضلات مخطط میگو را به صورت مات و سفید تغییر می دهند. این تغییرات شبیه به تغییراتی است که در میگوهای پخته اتفاق می افتد(Owens and Glazebrook, 1988)

گونه *Ag.penaei* موجب عفونت گنادها، قلب، مجاری همولنف، آبشش، هپاتوپانکراس و روده میانی می‌شود. این انگل موجب ایجاد گنادهای مات و سفید رنگ و همچنین در اغلب اوقات باعث بروز اجسام تومور مانندی بر روی آبشش و بافت زیرجلدی کوتیکول و زوائد حرکتی می شود. میگوهایی که به شدت از این انگل آسیب دیده اند علاوه بر داشتن عضلات و گنادهای سفید و مات، همچنین دارای رنگ آبی تا سیاه در سطح کوتیکول می باشد که ناشی از پراکنش ملانوفور در سطح کوتیکول می باشد(Lightner,1996).

در مطالعه با میکروسکوپ نوری با لام مرطوب و یا گسترشهای تهیه شده از بافتهای آلوده تجمعی از اسپورهای انگل را در اندازه ۱ تا ۸ میکرومتر می توان مشاهده نمود. کلیه اسپورهای انگل میکروسپوریدیا دارای یک فیلامنت قطبی بوده که در اثر فشارهای مکانیکی از سطح اسپور خارج می‌شود(Lightner,1996).

٢-٤-١-هاپلوسپوردیا

هاپلوسپوردیا یا عفونت هاپلوسپوردیایی یا هاپلوسپوردیای هپاتوپانکراس یکی از بیماریهایی است که توسط چند هاپلوسپوردیای مشهور در میگو ایجاد می شود. با این وجود به نظر می رسد برخی از هاپلوسپوردیاها شبیه آنچه در میگوی مونودن در آسیا در گونه های وحشی خلیج مکزیک ایجاد بیماری می کند از نظر تاکسونومی هنوز مطالعات کاملی روی آنها صورت نگرفته است و برای این منظور مطالعات TEM لازم است تا تاکسونومی آنها مشخص شود(Brock and Lightner,1990; Lightner,1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

در این روش انگل را در صورت آلودگی از مجاری هپاتوپانکراس و در سلولهای اپی تلیال می توان مشاهده

نمود. بطور مشخص انگل پرتوزا را در قسمت بالائی و بیرونی مجاری هپاتوپانکراس به صورت یک هسته و به صورت پلاسمید چند هسته ای می توان مشاهده نمود. این سلول تک هسته ای را می توان در مجاری هپاتوپانکراس که به نظر می رسد بعد از رها شدن از سلولهای نکروزه جدا شده است مشاهده نمود. مجاری به شدت عفونی شده هپاتوپانکراس به این پرتوزاء به طور مشخص توسط توده ای از هموسیتها پوشیده شده است و حالت کپسول ملانینی در بخشی از مجاری هپاتوپانکراس قابل روئیت است(Flegel et al,1992; Lightner,1996)

۳-٤-۱-بیماری فولینگ آبشش، زوائد حرکتی و سطح پوششی میگو

میگوهای پرورش یافته در سیستم های پرورشی گسترده، متراکم و نیمه متراکم یا در محیطهایی که دارای آب با کیفیت پایین می باشند، معمولاً دچار بیماری فولینگ آبشش یا سطوح پوششی می شوند. همه یا بخش عمده ای از ارگانیسم هایی که در این بیماری درگیر می باشند معمولاً ارگانیزمهای آزاد هستند و پاتوژن واقعی نمی باشند. به دلیل اینکه این ارگانیزمها، میگو را به عنوان یک ماده جهت چسبیدن انتخاب می نمایند، این ارگانیزمها را epicommonsal و یا epbionet می نامند. در اغلب اوقات این ارگانیزمها، بطور مستقیم موجب صدمه به میگو نمی-شوند ولی به طور غیرمستقیم با چسبیدن به آبشش میگوها یا سطوح بدن موجب مزاحمتهایی برای این موجود زنده می شوند. این ارگانیزمها ممکن است موجب کشتن میگو از طریق جلوگیری از تبادل آب در سطح آبشش یا تبادل گاز شده و باعث تلفات میگو می شوند. همچنین این ارگانیزمها ممکن است در پوست اندازی، در حرکت و در تغذیه نیز مزاحمتهایی ایجاد نمایند. برخی از این ارگانیزمها نیز باعث تولید توکسین های خارج سلولی شده که باعث درجاتی از آسیب های بافتی می شود. این بیماری را به نامهای مختلف می شناسند، از جمله بیماری Filamentous gill disease یا بیماری Bacterial gill disease، بیماری Fouled gill ، Black gill، Protozoan fouling یا Brown gill می شناسند(Sinderman,1990).

عامل ایجاد کننده بیماری

عوامل متعددی از جمله باکتریها، جلبکها، پروتوزوا به عنوان عامل ایجاد کننده این بیماری شناخته می‌شوند. از میان مهمترین این عوامل می توان به ارگانیزم‌های زیر اشاره داشت:

- گروهی از باکتریهای گرم منفی، PAS مثبت و ارگانیزمهای (Leucothrix Lik Origanism) LLO مثل Leucothrix mucor ، Leucothrix SPP ، Thiothrix sp
- باکتریهای دارای تاژکهای کوتاه یا Small Little Filaments (SLF) از گروه باکتریهای تاژک دار دارای زنجیره مثل فلاو باکتریاها، سایتوفاگا، فلکسی باکتر، ویبریوها، اسپروکیتها و سایر گونه های باکتری.
- پرتوزواءها شامل Peritrichous، Colonial Ciliate مثل *Zoothamanium*، *Epistylis* و *Vorticella*.

Apostome ciliate مثل جنس *Ascophrys* و سایرین

Loricate ciliate مثل جنس *Lagenophrys* و جنس *Cothurnia*

گروه Suctorian مثل جنس Acineta ، جنس Ephelota و سایرین

پروتوزآهای فلاژلا شبیه Bodo – like flagellate و Chrysidella را می توان نام برد.

- جلبکها

دیاتومه ها شبیه جنس Pennate diatom شبیه جنس Nitzchia ، جنس Amphiprora و جنس Navicula

جلبکهای سبز شبیه جنس Enteromorpha و سایر جلبکهای تاژک دار

- جلبکهای سبز – آبی شبیه Spirulina subsala ، Lyngbya و جنس Schizothrix می‌باشد.
- عوامل غیر زنده نیز شامل نمک و آهن از عوامل این بیماری می‌باشند(Overstreet,1985; Lightner,1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم کلینیکی معمولاً یک عامل مهم و تعیین کننده از آبشش یا فولینگهای سطحی می باشند. زیرا در این بیماری آبشش ها تغییر رنگ می دهند. علاوه بر اینها در آبشش ها تغییرات ذیل حادث می شود:

- آبشش قهوه ای یا سیاه با تغییرات اندامهای حرکتی ممکن است ناشی از عوامل ریز (detritus ، رس و یا سایر مواد خارجی) که توسط ارگانیزمهای فولینگ به دام می افتند و در سطح آبشش یا زوائد حرکتی موجب ایجاد یک منطقه آلوده یا تغییر رنگ سیاه تا قهوه ای می شود.
- آبشش سبزیا سبزقهوه ای ممکن است ناشی از تجمع جلبک ها بر روی آبشش ها باشد.
- حالت کرکی یا پنبه ای یا قارچی زوائد حرکتی میگو: این اندامها یا کوتیکول سطح کاراپاس ممکن است نشان دهنده این وضعیت بوده و این حالت در زمانیکه عفونت شدید فولینگهای سطحی اتفاق افتد مشاهده می شود.
- تهیه لام مرطوب از چنین مناطقی و آزمایش با میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ تا ۲۰۰ نشان دهنده ارگانیزمهای سطحی موجود می باشد. میگوهایی که به شدت آلوده به این آرگانیزمها باشند ممکن است در حین پوست اندازی تلف شده یا اینکه دارای پوسته ای تمیز ولی سفت و محکم می باشد. این دسته از میگوها نیز ممکن است بصورت طبیعی غذا خورده و یا رفتار طبیعی از خود نشان دهند. کاهش اکسیژن در هنگام صبح ممکن است اوضاع را جهت این میگوها وخیم تر نماید(Lightner,1996).

فولینگ ارگانیزمها در سطح بدن، آبشش و زوائد حرکتی ممکن است در روش معمولی آسیب شناسی با رنگ آمیزی H&E شناسایی شوند. در این روش شدت عفونت نیز بر اساس میزان آلودگی ناشی از این ارگانیزمها محاسبه می باشد(Lightner,1996).

٤-١-٤-بیماری گریگارین

این بیماری را گریگارین، Gregarine parasitism و یا Gregarine disease می نامند. عامل ایجاد کننده این بیماری حداقل سه جنس از گریگارینها (Protozoa Apicomplexa) در آن دخالت دارند که عبارتند از جنس *Nematopsis*، جنس *Cephalolobus* و جنس *Paraophioidina* می باشند(Brock and Main, 1994; Lightner,1996).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

میگوهای جوان آلوده به این انگل کاهش رشد نشان داده و مصرف غذا (FCR) آنها افزایش می یابد. روده میانی این دسته از میگوها به رنگ زرد تغییر یافته و این تغییر رنگ به آسانی از زیرکوتیکول پیدا است. در لاروها و پست لاروها، تروفوزئیت گریگارین که در روده میانی قرار دارد براحتی با بزرگنمایی ۱۰ یا ۲۰ میکروسکوپ و یا با لام مرطوب قابل مشاهده می باشد,(Brock and Lightner,1990).

در روش آسیب شناسی انگل را می توان در قسمت روده میانی (غالباً در مجاری قدامی روده میانی)، مجاری اولیه هپاتوپانکراس، قسمت عقبی معده و بخش جلویی روده خلفی مشاهده نمود. در هنگام بروز عفونت شدید، ضایعات مشخص همراه با کاهش میزان موکوز در روده میانی، هیپرپلازی در اپی تلیوم روده میانی و سوراخ شدن روده میانی قابل رویت است (Couch, 1983; Lightner,1996).

٥-١-٤-بیماری حباب گازی Gas babble disease

این بیماری را که بنام بیماری حباب گازی می شناسند در اثر اشباع اتمسفر از گازهای نیتروژن و اکسیژن حاصل می شود. در بین این دو گاز نقش نیتروژن بیشتر است زیرا بیش از ۸۰٪ هوا را نیتروژن تشکیل می دهد و هنگامی که حد اشباع نیتروژن در بالای ۱۰۴٪ قرار گیرد موجب بروز این بیماری می شود. نیتروزن از گازهایی نمی باشد که در پدیده متابولیسم نقش داشته باشد. بلکه در اثر فوق اشباع شدن آن موجب توقف گردش گازها در آبشش شده و باعث هیپوکسیا می شود. در این حالت مرگ و میر ممکن است به بالای ۱۰۰٪ رسیده (در این حالت پمپاز قوی هوا به منظور خروج از حالت اشباع لازم است) (Brock, 1992).

بیماری معمولاً وقتی اتفاق می افتد که آب وارده به تانک دارای گاز فوق اشباع باشد. این گازها ممکن است ناشی از نشت پمپهاباشد و عملاً گاز اکسیژن با نیتروژن فوق اشباع وارد آب شود. یا اینکه آب از چاههایی که آب دریا را پمپاز می کنند و در مسیر سوراخی ایجاد شود یا اینکه آب تحت فشار گرما وارد تانک شده و یا اینکه از طریق گازهای فاضلاب مزارع گیاهی وارد تانک شوند. اکسیژن نیز گاهی باعث این بیماری می شود. این حالت وقتی بوجود می آید که گاز اکسیژن در یک سیستم پرورشی با فشار وارد استخر شده و حالت فوق اشباع اکسژن بوجود آید. حالت دیگر زمانی اتفاق می افتد که اکسیژن توسط پدیده فتوسنتز از جلبکها بیش از حد تولید شود و نتواند از طریق هوادهی، باد یا فعالیتهای متابولیسمی تولید شود. همچنین وقتی اکسیژن محلول

در سطح ۲۵۰٪ باشد حالت فوق اشباع بوجود آمده و باعث بیماری حباب گاز می شود. صدمات وارده ناشی از این بیماری به میگوها بیشتر فیزیکی بوده و میزان مرگ و میر ممکن است پایین باشد (میزان آن بستگی به اکسیژن یا نیتروژن موجود در محیط دارد)و اگر به سرعت در خصوص اصلاح آن اقدامی صورت گیرد، مرگ و میر کاهش مییابد(Lightner,1993; Lightner,1996).

-علائم کلینیکی بیماری

علائم کلینیکی این بیماری عبارتند از سرگردانی و حرکات سریع میگو و به دنبال آن یک مرحله از گیجی میگو، که میگوهای گیج و سرگردان غالباً در کنار سطح آب شنا نموده و سر آنها در سطح آب بالاتر از قسمت شکمی آنها است. این بیماری ممکن است در حالتهای شدید بالاخص در آبشش یا زیرکوتیکول قابل مشاهده باشد. همچنین آبشش سفید برفی یا کانونهای سفید در آبشش یک علائم ظاهری در بیماری حباب گازی می باشد(Lightner,1996).

٦-٤-١-بیماری آماس روده ای هموسیتی Hemocytic entuntis (HE)

عامل ایجاد کننده بیماری افزایش میزان جلبکهای سبز ـ آبی در محیط می باشد. از جلبکهای سبزـ آبی رشته ای شبیه Schizothrix Calcicola Gamont (Agardh) به صورت آزمایشگاهی با این بیماری ارتباط داشته است. با توجه به اینکه در سیستم های پرورشی بدون حضور *S.calcicola* بیماری HE مشاهده شده است، ممکن است که اندوتوکسین های ترشحی از برخی گونه های جلبکهای سبز ـ آبی یا از Leucothrix mucor یا برخی باکتریهای گرم منفی باعث بروز این بیماری شوند(Lightner, 1988).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی

علائم کلینیکی این بیماری یکسان نمی باشد. در میگوهای جوان *P.stylirostris* زمانیکه با این بیماری مواجه شوند علائمی شبیه بیماری IHHNV درآنها بروز نموده و رنگ بدن میگوها به رنگ آبی در آمده و لکه های سفید رنگ روی کوتیکول آنها ظاهر می شود. در میگوهای جوانی که این بیماری بروز می کند میگوها بی حال شده، بی اشتها و بی رنگ و به شدت با فولینگ ارگانیسم ها پوشیده شده اند. در برخی گونه‌های جوان قسمتهائی از روده کور و روده میانی بزرگ و ملانوزه شده و از نظر ظاهری به صورت یک لکه سیاه از بیرون از قسمت پشتی روده در قسمت انتهایی بند ۶ بدن قابل مشاهده است. نکروز عمومی یا کانونی و التهاب هموسیتی سلولهای موکوئیدی اپی تلیال از روده میانی و همچنین قسمت جلوئی و عقبی روده کور، در حالتهای شدید کل روده میانی و روده کور (در قسمت اپی تلیال سلولهای موکوئیدی) با چند لایه هموسیت جایگزین شده و به صورت سنگفرشی سطح موکوئیدی روده میانی را پوشانده است. روده جلویی و معده که توسط یک لایه کوتیکول

پوشیده شده آسیبی ندیده‌اند و چنین به نظر می رسد سمی که موجب ایجاد ضایعات در قسمتهای دیگر روده شده است نمی تواند از قسمت کوتیکول معده و روده جلویی عبور نماید. این بیماری یک بیماری مزمن بوده و میگوها در مراحل اولیه بیماری می توانند زنده بمانند و میگوهایی که به صورت مزمن به این بیماری آلوده شده اند، دارای رشد کم بوده و به نژاد آنها بستگی دارد. وقتی در یک گروه زیادی از میگوها این حالت اتفاق افتد، بیماری مزمن HE با حالت خمیدگی در میگوها همراه بوده که با آسیب شناسی بیماری قابل تشخیص است(Lightner,1996).

۵-۱-بیماریهای محیطی و تغذیه‌ای مراکز تکثیر و پرورش میگو

یکی از مهمترین مشکلات مزارع میگوهای پرورشی در جنوب کشور، کاهش رشد در مزارع می‌باشد. این دسته از میگوها دارای عضلاتی سفید و مات بوده و همچنین وجود کیسه آبکی زیر کاراپاس نیز در ماههای آخر پرورش مشاهده می‌گردد. این بیماری را سندرم نکروز خودبخودی عضلات (Idopoitic Musle Necrosis Syndrome) یا IMNS و همچنین بیماری سندرم کیسه آبکی زیر کاراپاس (Sub Carapace Watery Sac Syndrome) یا (SWSS) می نامند(Yuvabenjapol., 2006).

۱-۵-۱-سندرم کمبود اسید آسکوربیک (Ascorbic acid deficiency)

اولین بیماری تغذیه ای میگو را بنام سندرم کمبود اسید اسکوربیک یا بیماری مرگ سیاه (Black death disease) نامیده‌اند و علت این نامگذاری ناشی از ضایعات ملانوزه بزرگی است که در میگوهای مرده مشاهده می شود. میگوهایی با این علائم در بافت ها با تجمعی از کلاژن همراه می باشند، این ضایعات در دیواره معده، دیواره روده قدامی، آبشش و بافت زیرجلدی بالاخص در محل انتقال بدن به زوائد حرکتی دیده می باشد. این بیماری در میگوهای بالغ یا نزدیک به بلوغ دیده نمی شود(Lightner,1988; Lightner etal., 1977)

۲-۵-۱-بیماری میگوهای خمیده (Cramped Muscle Syndrome)

سندرم میگوهای خمیده حالتی است که میگوها از طرف شکم بعد از مردن خمیده شده و چنان عضلات آن سفت و محکم می شود که نمی توانند به صورت مستقیم در آیند. حالت شدید سندرم خمیدگی میگوها موجب مرگ سریع میگوها می شوند. آسیب شناسی و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده نکروز عضلات با پاسخ های التهابی و فیبروزه شدن مناطق آسیب دیده می‌باشد. آنالیز بدن میگوها و کاتیون عضلات نشان دهنده کاهش در نسبت یونهای Na:K , K:Ca , Ca:Mg می باشد و این تغییر در نسبت یونها باعث به هم خوردن سیستم عصبی عضلانی شده و باعث بروز این بیماری می شود(Lightner,1988).

۳-۵-۱-سندرم نرم شدن پوسته میگو Chronic soft shell syndrome

این بیماری به ندرت در مزارع پرورش میگوی ببری سیاه و میگوی وانامی مشاهده می شود. در این بیماری پوسته میگوها نازکتر از پوسته میگوهای طبیعی بوده و پوسته نرم ، ناصاف و چروکیده می باشد. مطالعات آسیب شناسی و مطالعه شیمیایی این دسته از میگوها نشان می دهد که لایه های خارجی و داخلی کوتیکول نازکتر از حالت طبیعی می باشد(MPEDA/NACA,2003; Gopalakrishnan, A and Parida,A,2005)

مطالعات شیمیایی نیز نشان می دهد که میزان کلسیم در میگوهای با پوسته نازک و میگوهای طبیعی در هپاتوپانکراس و اسکلت خارجی متفاوت بوده و در این دسته از میگوها میزان آن کمتر است و بیماری معمولاً در اثر تغذیه با موادی که میزان نسبت کلسیم و فسفر آن نامتعادل بوده و یا مجاورت با علف کشها بروز می‌نماید .(MPEDA/NACA,2003; Gopalakrishnan, A and Parida,A,2005)

٤-٥-١-مسمومیت با آفلاتوکسین (Aflatoxicosis)

مواجهه آزمایشگاهی میگوهای خانواده پنائیده با آفلاتوکسین، ایجاد ضایعات در بافت هپاتوپانکراس و به مقدار کمتری در سایر بافتها از جمله ضایعات در دستگاه لنفاوی و بافتهای خونساز می نماید , 1988 , Lightner) (Lightner etal , 1982 . چنین ضایعاتی به طور طبیعی نیز در مراکز پرورش میگو اتفاق می افتد و چنین احتمال می دهند که سم آفلاتوکسین در مزارع نیز در حالت طبیعی آثار و ضایعاتی در میگوها ایجاد می کند. این ضایعات در بیماری دیگر میگو که بیماری نکروز عفونی هپاتوپانکراس Septic Heapatopancreatic Necrosis (SHN) می نامند نیز اتفاق افتاده و بیشتر در میگوی ببری سیاه مشاهده می شود. بیماری قرمزی در میگوی ببری سیاه یکی از حالتهایی است که موجب بروز SHN در این گونه می‌شود. پاره‌ای از گزارشات نیز نشان دهنده مقاومت میگوی ببری سیاه و میگوی وانامی در برابر آفلاتوکسین می‌باشد(Lightner , 1988 , Lightner etal , 1982)

٦-١-پایش بیماریها در مرکز تولید میگوی SPF

میگوی SPF یعنی میگویی که عاری از برخی عوامل بیماریزای خاص فهرست شده ملی یا بین المللی هستند. این عوامل باید بطور قطعی قابل تشخیص باشند، بتوان آنها را ازمیگوهای درون سیستم تکثیر و پرورش جداسازی نمود، تهدیدی جدی برای صنعت تکثیر وپرورش میگو باشند و موجب مرگ و میر شدید در میگوها شوند. میگوهای SPF تولیدی، به بیماریها مقاوم نبوده و با مفهوم میگوی مقاوم در برابر بیماری خاص Specific Pathogen Resistance (SPR) تفاوت دارند ولی میتوان میگوهای SPF را نسبت به یک یا چند بیماری مقاوم و میگوی SPR تولید نمود. به میگو هائی که از نظر ژنتیکی به یک بیماری مقاوم باشند.Specific Pathogen Tolerance (SPT) می-گویند. قابل ذکر است که ویژگیهای میگوهای SPF بصورت مادرزادی منتقل نمی شود ولذا وراثتی نمی‌باشد. میگوهای SPF در مراکز ویژه ای بنام Nuclear Breeding Center (NBC) که دارای سیستمهای ایمنی زیستی و

قرنطینه ای کامل هستند، تولید می‌شوند. در مرکزNBC میگوها برای دو سال تحت مراقبت بوده و برای کلیه بیماریهای خاص در نظر گرفته شده، غربالگری می‌شوند(wyban,1992). پس از آن، وقتی میگوها را به تاسیسات دارای سطوح متوسط ایمنی زیستی منتقل نمایند، به آنها، میگوهای با سلامتی بالا یا (HH) High Health می گویند. در یک مرکز تولید میگوی SPF باید فهرست بیماریهائی که میگوهای SPF تولیدی، عاری از آنها هستند، اسلوبهای مرافبت (Survillance System)، روشهای غربالگری (Screening Test) و نوع آزمایشات تشخیصی (Diagnostic Test) ، تاریخ آخرین غربالگری و تاریخچه بررسیهای مراقبتی مشخص باشند و گواهی بهداشتی مبنی بر عاری بودن میگوها از بیماری های خاص صادر گردد. پست لاروها و یا میگوهای مولد اولیه که برای تولید SPF انتخاب می‌شوند بایستی از مرکزی باشند که دارای سیستم ایمنی زیستی بالا و برنامه پایش، مراقبت و تاسیسات آزمایشگاهی کامل بوده و سلامتی آنها مورد تائید قطعی باشد تا بتوان در چرخه مولد سازی از آنها استفاده کرد. چنانچه در نظر باشد که از میگوهای وحشی برای ایجاد جمعییت اولیه استفاده شود بایستی از مناطقی جمع آوری شوند که فاقد سابقه بروز بیماریهای موجود در فهرست مربوطه طی ۱۰ سال اخیر باشند وپس از انتقال به یک مرکز قرنطینه اولیه مناسب و طی برنامه مراقبتی شدید و غربالگری و آزمایشات تشخیصی اولیه و تائیدی مورد برسیهای کامل قرار گیرند و در صورت عاری بودن از بیماریهای مورد نظر به مرکز تولید میگوی SPF و چرخه مولد سازی وارد شوند، هر چند که تامین پست لارو از منابع تولیدی معتبر برای شروع عملیات مولد سازی SPF ارجحیت کامل دارد. بر حسب شرایط محیط، سطوح ایمنی و نوع میگو، تعداد عوامل بیماریزایی که باید در تولید میگوی SPF مورد توجه قرار گیرند متفاوت بوده، بطوریکه برا ی تولید میگوی SPF وانامی ۹ ویروس مورد توجه بوده ولی برا ی تولید میگویSPF مونودن ۷ ویروس مورد توجه بوده و بیماریهای BP وBMN که در میگوهای مونودن گزارش نشده‌اند در فهرست آن قرار نمی‌گیرند. معمولا" با جدا سازی و شناسایی عوامل بیماریزای جدید که موجب ایجاد تلفات درمیگوها میشوند، این فهرست تغییر می نماید. در برخی موارد ممکن است تعدادی بیماری از این فهرست حذف شوند. برای مقایسه فهرست بیماریهای اخطار کردنی سازمان OIE و تفاوت آن با فهرست بیماریهای اخطار کردنی منطقه آسیا و اقیانوسیه، در کنار سابقه ایجاد همه گیری در ایران جدول ۲ فهرست بیماریهای اخطار کردنی سازمان OIE و منطقه آسیا و اقیانوسیه و سابقه همه گیری در ایران را نشان میدهند.

جدول ۲: بیماریهای اخطار کردنی سازمان OIE و منطقه آسیا و اقیانوسیه و سابقه همه گیری در ایران

ردیف	نام بیماری	موجود در فهرست OIE ۲۰۱۱	موجود در فهرست NACA ۲۰۰۹	همه گیری در ایران
۱	Taura Syndrome	بله	بله	خیر
۲	White Spot Disease	بله	بله	بله
۳	Yellowhead Disease – Yellowhead Virus	بله	بله	خیر
۴	Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis	بله	بله	خیر
۵	Infectious Myonecrosis	بله	بله	خیر
۶	Monodon SlowGrowth Syndrome	خیر	بله	خیر
۷	Necrotising Hepatopancreatitis	بله	خیر	خیر

عوامل بیماریزای مهم برای پایش و مراقبت در مرکز تولید میگوی SPF به سه گروه یا Category مطابق جدول شماره ۳ تقسیم می‌شوند:

- C۱: گروه اول، عوامل بیماریزایی هستند که توانایی ایجاد تلفات شدید در یک گونه یا تعداد زیادی از گونه های میگو را دارند .
- C۲ : گروه دوم، عوامل بیماریزایی هستند که می‌توانند موجب خسارات و آسیبهای خفیف تری شوند.
- C۳: گروه سوم، عوامل بیماریزایی که آسیبهای کمتری را وارد می نمایند ولی از مزارع یا مرکز تولید مولد بایستی دور باشند .

جدول۳: فهرست عوامل بیماریزای مهم برای پایش و مراقبت در مرکز تولید میگوی SPF

ردیف	نام بیماری	عامل بیماری	گروه
۱	White Spot Syndrome virus (WSSV)	ویروس	C1
۲	Tauar Syndrome Virus (TSV)	ویروس	C1
۳	Yellow Head Virus/ Gill-Associated Virus (YHV/GAV)	ویروس	C1-2
۴	Infection Myonecrosis virus (IMNV)	ویروس	C1-2
۵	Hepatopancreatic Parvolike Virus (HPV)	ویروس	C1-2
۶	Infection Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)	ویروس	C2
۷	Baculovirus Penaei (BP)	ویروس	C2
۸	Baculovirus Midgut Gland Necrosis Virus (BMN)	ویروس	C2
۹	Penaeus monodon Baculovirus (MBV)	ویروس	C2
۱۰	Necrotizing Hepatopancratitis (NHP)	باکتری	C2
۱۱	Microsporidia	انگل	C2
۱۲	Haplosporidia	انگل	C2
۱۳	Gregarines	انگل	C3

۷-۱-اهداف طرح

- شناسائی بیماریهای ویروسی ، باکتریائی و قارچی میگو در طرح تولید میگوی عاری از بیماری
- پایش مهمترین بیماریهای شناسائی شده در طول دوره تولید
- استقرار ایمنی زیستی و شناسائی محلهای ریسک و خطر در طرح تولید میگوی عاری از بیماری

۲-مواد و روش کار

به منظور تضمین تولید میگوی SPF نیاز به برنامه ریزی راهبردی و ایجاد یک شبکه مدیریتی قوی استقرار سیستم های بهداشتی، ایمنی زیستی و برقراری شرایط قرنطینه ای و ایزوله برای عدم ورود، انتقال و سرایت یک عفونت به آب و میگوها در مدت زمان مشخص و نظام مند می باشد تا بتوان محافظت در مقابل تهدیدات منابع خارج و داخل تاسیسات را افزایش داد. برای استقرار روشهای نظارتی و پایشی از نظر حضور و یا عدم حضور یک عفونت یا بیماری و پیشگیری از آنها بایستی اطلاعات جامعی از وضعیت سلامتی میگوها درجمعیتهای موجود در قسمتهای مختلف مرکز جمع آوری، تحلیل و تلفیق شوند. بدین منظور لازم است سیستمهای مرافبت (Survillance System) شامل روشهای غربالگری (Screening Test) براساس جدول و نوع آزمایشات تشخیصی (Diagnostic Test) و تائیدی (Confirmatory Test) تعریف و پیاده سازی شده باشند. ضمنا" اصول معتبر سازی روشهای ارزیابی تشخیصی بیماریهای عفونی(Validation of Diagnostic Assay) بایستی بطور کامل انجام شوند (Lightner, 1996) بر مبنای درصد شیوع احتمالی یک بیماری در جمعیت، حجم نمونه مورد نیاز برای انجام آزمایشات غربالگری بر اساس جدول شماره ۴ می باشد. بدیهی است میزان حساسیت و اختصاصی بودن روش تشخیص آزمایشگاهی نیز در تعین تعداد نمونه تاثیر گذار است

جدول ٤: تعیین تعداد نمونه مورد بررسی بر مبنای درصد شیوع احتمالی بیماری در جمعیت

	Prevalence (%)						
Population Size	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	10.0
50	46	46	46	37	37	29	20
100	93	93	76	61	50	43	23
250	192	156	110	75	62	49	25
500	314	223	127	88	67	54	26
1000	448	256	136	92	69	55	27
2500	512	279	142	95	71	56	27
5000	562	288	145	96	71	57	27
10000	579	292	146	96	72	29	27
100000	594	296	147	97	72	57	27
1000000	596	297	147	97	72	57	27
>1000000	600	300	150	100	75	60	30

Table C.1.3.3[1]. Sample sizes needed to detect at least one infected host in a population of a given size, at a given prevalence of infection. Assumptions of 2% and 5% prevalences are most commonly used for surveillance of presumed exotic pathogens, with a 95% confidence limit.

دراین طرح براساس روشهای مرسوم و مطابق برنامه ذیل نسبت به آزمایشهای مورد نظر اقدام گردید.

۱-۲-نمونه برداری

با توجه به اینکه مراکز تکثیر، در طی سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱، مولدین خود را از مولدین پرورشی مراکز پرورش به ویژه در استان‌های بوشهر و هرمزگان تهیه نموده بودند، نسبت به ترسیم تاریخچه مولدین مراکز تکثیر اقدام و مراکز پرورش میگو جهت تهیه و جمع‌آوری مولد انتخاب شد. از این رو در تاریخ ۹۱/۰۶/۰۵ لیست مراکز پرورش میگو همراه با تاریخ تقریبی زمان برداشت برای مولد سازی میگوی عاری از بیماری خاص ارائه گردید. بر اساس مراکز انتخاب شده (جدول)، و به منظور پایش، جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزای ویروسی، باکتریایی و انگلی در تاریخ‌های ۲۵ و ۹۱/۰۶/۲۶ از دو مزرعه در سایت پرورش میگوی حله و در تاریخ‌های ۸ و ۹۱/۰۷/۰۹ از مزارع انتخاب شده در سایت‌های پرورش حله، رودشور و دلوار ۱۴، دلوار ۲ و بندر ریگ هر کدام ۶۰ قطعه بطور تصادفی نمونه برداری صورت گرفت و به آزمایشگاه پژوهشکده منتقل گردید (

جدول)

جدول ۵: لیست مراکز انتخابی جهت جمع آوری پیش مولد

ردیف	سایت پرورشی	مزرعه	شماره استخر	زمان برداشت
۱	دلوار ۱۴	پارس دریا	۸	نیمه دوم مهر ماه
۲	دلوار ۱۴	یاسین میگو	۲	اواخر شهریور و اوایل مهر
۳	رود شور	رنگین کمان	طرح ۴(استخر ۱) طرح ۴(استخر۲) طرح ۶ (استخر۱)	نیمه دوم مهر ماه
۴	شیف	تعاونی ۷۴۰	۳	نیمه دوم مهر و اوایل آبان
۵	حله	بوشهر میگو	۶ و ۷	اوایل مهر ماه
۶	حله	خارگ میگو	۱۱ و ۱۶	اوایل مهر ماه
۷	حله	تحقیقات	B1	نیمه دوم مهر
۸	حله	۲۷۲	استخر ۶	اوایل آبان ماه

جدول ٦: لیست استخرهای نمونه برداری شده جهت پایش عوامل بیماریزای ویروسی و انگلی شهریور و مهر ۱۳۹۱

ردیف	نام سایت	تاریخ نمونه برداری	نام مدیر مزرعه	شماره استخر	تعداد نمونه
۱	حله	۹۱/۰۶/۲۵	رستمایی	۶و۱۱	هر استخر ۶۰ قطعه
۲		۹۱/۰۶/۲۶	فتحی	۷و۸	هر استخر ۶۰ قطعه
۳	دلوار	۹۱/۰۷/۰۸	دلواری	۴	۶۰ قطعه
۴		۹۱/۰۷/۰۸	موسوی	۲	۶۰ قطعه
۵	ریگ	۹۱/۰۷/۰۹	موسوی	۶	۶۰ قطعه
۶	حله	۹۱/۰۷/۲۱	سیار	۶	۶۰ قطعه

در ابتدا نمونه ها را از نظر بالینی مطالعه نموده و سپس آنها را به را به سه دسته تقسیم و برای آزمایشهای مختلف مورد استفاده قرار دادیم.

۲- ۲ - شناسایی اولیه بیماری توسط مطالعات بالینی

به منظور شناسایی بالینی بیماریها مولدین مذکور را از نظر ظاهری بازبینی و چنانچه علایمی از قبیل کندی رشد، کم تحرکی، بی حالی، بی اشتهایی و حرکت های غیر معمول از جمله جهش های ناگهانی به دور خود و همچنین وجود علایم غیر طبیعی در بدن، از جمله وجود لکه های لزج و تیره رنگ بر روی سطح کوتیکول و در برخی از آن ها حتی بر روی سطح آبشش ها و نیز داشتن رگه های سفید در پشت خط کمری مشاهده گردید را در فرم ثبت اطلاعات ثبت نمودیم. بررسیهای کلی (مشاهدات بالینی، مشاهدات رفتاری نظیر شنا ، تغذیه ، تلفات و مشاهدات سطحی بدن نظیر زخمها، تغیرات رنگ بدن و ضمائم، زخمها و نکروزهای کانونی، نرمی پوسته و بررسی بافتهای نرم سطحی). همچنی بررسی فاکتورهای محیطی و در فرمهای ثبت علائم بالینی گزارش میگردید.

جدول ۷: جمع آوری اطلاعات بالینی میگوهای موردآزمایش

ردیف	گلخانه شماره: تعداد میگوی نمونه برداری:	تاریخ:
	ثبت علائم بالینی	**مشاهدات**
۱	نوع حرکات میگوها	
۲	مشاهدات سطح کوتیکول	
۳	وضعیت روده میگوها از نظر سطحی	
۴	وجود یا عدم وجود لکه های سیاه بر روی کوتیکول(TSV)	
۵	وجود یا عدم وجود لکه های سفید بر روی بدن میگوها(WSSV)	
۶	وجود خمیدگی در بدن میگوها(IMNV)	
۷	میزان و نوع غذای مصرفی	
۸	نوع ماده ضد عفونی	

۳-۲-شناسایی بیماری به روش آسیب شناسی

در این روش از متد ارائه شده توسط دکتر افشار نسب (۱۳۸۶) و روش دکتر لایتنر (۱۹۹۶) جهت انجام عملیات آسیب شناسی که روش استاندارد در مورد شناسایی بیماری‌های میگو می‌باشد، استفاده نمودیم.

برای آماده کرن نمونه‌ها و انجام آزمایش آسیب شناسی اقدامات ذیل صورت پذیرفت:

۱-۳-۲-جمع‌آوری نمونه‌ها

میگوهای زنده و مشکوک به بیماری را که حالت غیر طبیعی در وضعیت ظاهری و رفتاری آنها دیده می شد را با حداقل تنش و دستکاری جمع آوری و آن ها را با ظروف مملو از آب کاملا اکسیژن دار نموده و سپس به آزمایشگاه منتقل نمودیم. در جمع‌آوری نمونه‌ها این نکته بسیار حایز اهمیت است که فقط نمونه‌های زنده باید جمع آوری گردند. میگوهای مرده یا میگوهایی که در یخ نگه داری می‌شوند برای انجام عملیات آسیب شناسی مناسب نیستند. در جمع‌آوری نمونه‌ها این نکته بسیار حایز اهمیت است که فقط نمونه‌های زنده باید جمع آوری گردند. میگوهای مرده یا میگوهایی که در یخ نگه داری می‌شوند برای انجام عملیات آسیب شناسی مناسب نیستند.

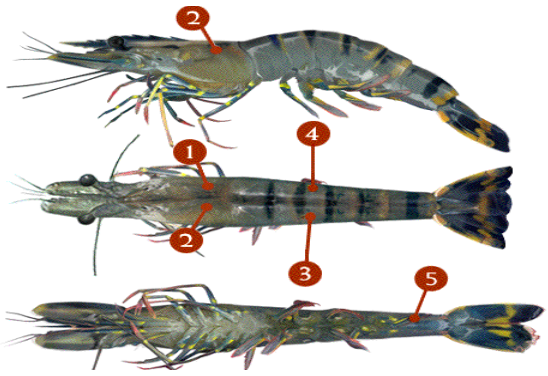
۲-۳-۲- فیکس کردن نمونه‌ها

به منظور جلوگیری از تغییرات پس از مرگ و ضربه‌های وارد شده به بافت ها، لازم است که میگوها به صورت زنده بلافاصله پس از خارج شدن از آب فیکس شوند. در هنگامی‌که باید نمونه‌ها را در محل دیگری مثل آزمایشگاه فیکس نمود باید با یک سطل که مجهز به سیستم هوادهی باشد نمونه‌ها را به‌صورت زنده به آزمایشگاه منتقل نمود. چنانچه نمونه‌ها به موقع فیکس نگردند تغییرات پس از مرگ که شامل گرد و لایه‌لایه

شدن سلول ها به ویژه سلول های هپاتوپانکراس است، اتفاق می‌افتد. هر چه زمان فیکس شدن نمونه‌ها پس از مرگ طولانی باشد تغییرات سلول ها بیشتر است.

از بهترین فیکس کننده‌های میگو، محلول دیویدسیون می‌باشد. زیرا این فیکساتور دارای اسید استیک بوده و می‌تواند کلسیم را از پوسته بیرونی میگو جدا نموده و به عمل برش دادن بافت ها کمک کند. فیکس کننده‌های دیگری نیز مانند بافر فرمالین ۱۰ درصد می‌تواند در فیکس کردن میگو استفاده شود، اما با این فیکساتور ممکن است شکل ظاهری سلول ها و بافت ها با حالتی که توسط دیویدسون فیکس شده است متفاوت باشد. برای ساختن یک لیتر محلول دیویدسون، از ۳۳۰ میلی لیتر اتیل الکل ۹۵ درصد، ۲۲۰ میلی لیتر فرمالین ۱۰۰ درصد (فرمالدهید۳۷ – ۳۱درصد)، ۱۱۵میلی لیتر گلاسیال استیک اسید، ۳۳۵ میلی لیتر آب مقطر یا آب معمولی استفاده می کنیم.

این فیکساتور را می‌توان در دمای آزمایشگاه به مدت طولانی نگه داری کرد و باید دقت نمود که به دلیل سمی بودن، حتما از دستکش استفاده نموده و از عمل استنشاق مستقیم آن جلوگیری شود. لاروها و پست‌لاروها را می‌توان به طور مستقیم در محلول فیکس کننده به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت نگه داری و سپس آن ها را به الکل ۵۰ درصد منتقل و در محیط آزمایشگاه نگه داری نمود. در نمونه‌های بزرگ تر از ۲ سانتی متر، ابتدا فیکساتور را در هپاتوپانکراس و سپس در سایر قسمت ها که دو طرف بند سوم و بند ششم می‌باشند تزریق نموده و سپس به وسیله یک قیچی از عرض بند ششم بدن تا وسط قسمت سر سینه و در نهایت تا انتهای سر ونزدیک روستروم و پشت پا یک چشمی برش می دهیم (شکل ۱).



شکل ۱: محل های تزریق ماده فیکس‌کننده در میگوی بزرگ تر از دو سانتی متر (تصویر از لایتنر)

این برش باید فقط قسمت کوتیکول میگو را شامل شود و از برش دادن بافت های زیر کوتیکول خودداری گردد. برای نمونه‌های خیلی بزرگ یک شکاف عمیق نیز در حد فاصل سر و بدن و در محل اتصال آن ها و به صورت عرضی ایجاد نمودیم. این برش ها سبب می‌شود که ماده فیکساتور به خوبی در سلول ها نفوذ کند. سپس میگو را در حجمی از ماده فیکساتور معادل ۱۰ برابر حجم میگوها و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر اساس اندازه میگوها (میگوهای بزرگ تر به مدت زمان بیشتری نیاز دارند) در محلول فیکساتور قرار می دهیم. نمونه-های نگه داری شده در الکل را با دستمال تمیز خشک کرده و الکل آن را خارج نموده و سپس درون پلاستیک هایی نفوذ ناپذیر ذخیره کرده و مشخصات لازم را بر روی آن ها یادداشت می نماییم.

۳-۳-۲-مرحله آماده کردن بافت ها و برش بافت ها

پس از فیکس کردن بافت ها، میگوها را پیش از این که بافت ها را برای قالب گیری آماده کنیم برش می‌دهیم. برای این که بافت ها دچار صدمه یا خراشی نشوند از قیچی یا تیغی تیز استفاده می کنیم. چنانچه بخواهیم اندام مشخصی را برای قالب گیری آماده نماییم، باید دقت کنیم که بافت های آن اندام را از یک طرف برش داده و از انجام برش سه بعدی جلوگیری کنیم. اگر میگوها کوچک تر از ۳ سانتی متر باشند، میگوها را به صورت طولی و از قسمت بیرونی به طرف میانی برش می دهیم(شکل۲). برش های کوچک را در بلوک های به وجود آمده قرار داده تا آبشش ظاهر شود. همچنین برش های بزرگ تر را می توان جهت مشاهده اندام‌های دیگر انجام داد. اگر میگوها بزرگ تر از ۳ سانتی متر باشند، برش‌ها را باید در جاهای مختلف انجام داد (شکل ۳).

شکل۲ : انجام برش سه بعدی در میگوهای کوچک تر از ۳ سانتیمتر (تصویر از لایتنر)

شکل۳ : انجام برش سه بعدی درمیگوهای بزرگ تر از ۳ سانتی متر (تصویر از لایتنر)

٤-۳-۲-آماده سازی و برش بافت‌ها

بعد از فیکس کردن، بافت‌ها را قبل از این که برای قالب‌گیری آماده کنیم برش دادیم. برای این که بافت‌ها دچار صدمه یا خراشی نشوند، از قیچی یا تیغی تیز استفاده کردیم. چنانچه اندام یا بافت مشخصی را برای قالب‌گیری آماده می‌کنیم باید دقت شود که بافت‌های آن اندام را از یک طرف برش داده و از آنجام برش سه بعدی جلوگیری کنیم. اگر اندازه میگوها کمتر از ۳ سانتی‌متر باشد، می‌توان آنها را به صورت طولی و از قسمت بیرونی به طرف میانی برش داد. برش‌های کوچک را می‌توان در بلوک‌های به وجود آمده انجام داد تا آبشش ظاهر شود. همچنین برش‌های بزرگتر را می‌توان جهت مشاهده اندام‌های دیگر انجام داد. اگر میگوها بزرگتر از ۳ سانتی‌متر باشند، برش‌ها را باید در جاهای مختلف انجام داد.

٥-۳-۲-عملیات آبگیری از بافتها

عمل آبگیری از بافت‌ها به آرامی و با گذاشتن آنها در الکل با غلظت‌های پایین و سپس رسیدن به غلظت ۱۰۰ درصد انجام دادیم. اگر یک باره بافت را در الکل ۱۰۰ درصد قرار دهیم، موجب تخریب بافت‌ها می‌شود. الکل به طور مشخص با پارافین مخلوط شده، بنابراین بعد از آبگیری بافت را با یک ماده حل کننده الکل مثل زایلین (xylene) شستشو دادیم تا الکل از بافت‌ها خارج شده و عمل نفوذ پارافین در بافت به طور کامل انجام شود. استفاده از دستگاه پروسس اتوماتیکی بافت‌ها و پمپ تخلیه مناسبت‌ترین روش عمل‌آوری بافت‌ها می‌باشد. عملیات آبگیری بافت‌ها به شرح ذیل می‌باشد:

الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ ساعت (دو بار)

الکل ۸۰ درصد به مدت ۱ ساعت (دو بار)

الکل ۹۵ درصد به مدت ۱ ساعت (دو بار)

الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱ ساعت (دو بار)

زایلین یا سایر مواد پاک کننده به مدت ۱ ساعت (دو بار)

پارافین به مدت ۱ ساعت (دو بار)

٦-۳-۲-جاگذاری بافت‌ها در پارافین یا تهیه بلوک از بافت‌ها با پارافین (Embedding)

بعد از آماده کردن بافت‌ها شامل عملیات آبگیری، نفوذ پارافین و عمل تخلیه هوا (Vacuum)، در دستگاه عمل‌آوری بافت (Tissue Processor) به طور کامل انجام گردید، بافت‌ها را به صورت قالب‌های پارافینی در آوردیم. برای این منظور بافت‌ها را در یک قالب فلزی قرار داده و با پارافین مایع پر نمودیم. قبل از قالب‌گیری بافت‌ها، آنها را با دستگاه پمپ خلا به مدت ۲۰ دقیقه از هوا تخلیه نمودیم و سپس عمل قالب‌گیری را انجام دادیم. عملیات قالب‌گیری را نیز در دستگاه پلیت سرد و گرم (Hot plate and Cold plate) انجام دادیم. قالب‌ها را سپس سرد نمودیم تا پارافین جامد به همراه بافت به صورت قالب ایجاد گردید.

اگر عملیات فیکس کردن، آبگیری، نفوذ پارافین در بافت و قالب‌گیری به طور کامل انجام گیرد، عملیات برش بافت‌ها و رنگ‌آمیزی به خوبی انجام می‌شود. بلوک‌های پارافینی ایجاد شده را در یک جای سرد (یخچال) نگهداری نمودیم و دقت گردید تا سطحی که قرار است برش داده شود، از خراش با اجسام نوک تیز دور بماند. بافت‌هایی که برای مطالعات میکروسکوپی مورد استفاده قرار می‌گیرند، در قالب‌های پارافینی بهتر نگهداری می‌شوند تا در یک فیکس کننده نگهداری شوند. عملیات برش از این بافت‌ها باید به ضخامت ۶-۳ میکرون باشد.

۷-۳-۲-تهیه برش های بافتی

در این مرحله از میکروترم دوار (شکل ۴) و حمام آب گرم(شکل ۵) استفاده می‌شود. قالب‌ها را درگیره دستگاه محکم کرده و با تنظیم تیغه دستگاه با سطح قالب ، پارافین اضافی را تا نمایان شدن بافت بر می‌داریم . سپس برش هایی به ضخامت ۶-۳ میکرون از بافت ها تهیه می نماییم . برش های تهیه شده را در حمام آب گرم(water bath) قرار داده و پس از باز شدن و صاف شدن روی لام قرار داده می شوند به این صورت که لام را با زاویه ۴۵ درجه وارد آب نموده و مقطع بافتی به آرامی روی لام قرار می گیرد لام های حاوی مقاطع بافتی بر روی سطح شیب دار یا صفحه گرم شونده (شکل ۶) قرار داده تا خشک شود. در ادامه به منظور حذف پارافین اضافی، لام‌ها را برای مدت معین و در دمای مناسب در اون قرار می دهیم .

شکل ٤: دستگاه میکروتوم مورد استفاده در تحقیق

شکل ٥: دستگاه حمام آب گرم مورد استفاده در تحقیق

شکل ٦: صفحه گرم کننده مورد استفاده در تحقیق

۸-۳-۲-عملیات رنگ‌آمیزی (Staining)

برای کلیه روش‌های رنگ‌آمیزی سلولی، برش‌های ایجاد شده از قالب‌های پارافینی ابتدا باید از پارافین پاک شده و سپس آبگیری شود. این نکته بسیار حائز اهیمت است که بافت‌ها باید از پارافین پاک شده تا رنگ‌ها جذب بافت گردند. به منظور جداسازی پارافین از برش‌های تهیه شده، مقاطع تهیه شده را روی یک حوله کاغذی در یک آون یا کوره با حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم. در این حالت پارافین آب شده و جذب حوله کاغذی گردیده و مقاطع جهت آبگیری آماده شدند. بعضی از مقاطع تهیه شده شبیه گسترش تهیه شده از همولنف یا لام مرطوب با پارافین قالب‌گیری نمی‌شوند، لذا این گسترش‌ها را در هوا خشک نمودیم و دیگر نیازی به آبگیری نداشتند. به منظور ساختن لام‌های دائمی، ضروی است بعد از رنگ‌آمیزی نیز عملیات آبگیری انجام شده و لام‌ها را با مواد ضد آب پوشاند. برای مطالعه بافت‌های میگو در آسیب‌شناسی، بهترین رنگ مورد استفاده رنگ هماتوکسیلین ائوزین/فلوکسین می‌باشد که بافت‌های تهیه شده را که روی لام ثابت نموده، آبگیری و با هماتوکلسیلین و ائوزین/فلوکسین رنگ‌آمیزی نمودیم(شکل ۷).

روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین/ فلوکسین

زایلین و یا ماده پاک کننده به مدت ۵ دقیقه (۲ بار)

الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)

الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)

الکل ۸۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)

الکل ۵۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۱ بار)

شستن با آب مقطر ۶ بار در ظروف جداگانه

هماتوکسیلین ۶-۴ دقیقه

شستن در آب جاری ۶-۴ دقیقه

فلوکسین/ ائوزین ۲ دقیقه

الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)

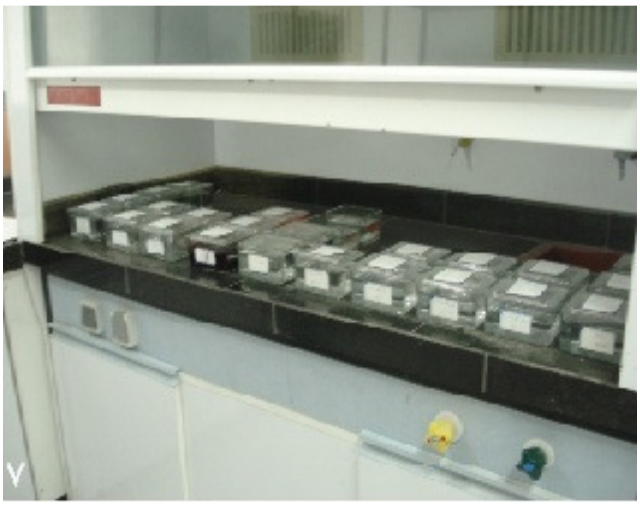
الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)

زایلین به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۴ بار)

پوشش دادن با مواد چسبنده و گذاشتن لامل

مشاهده زیر میکروسکوپ

عمل مشاهده لامها با میکروسکوپ بعد از ۲۴ ساعت انجام گردید تا لامل کاملاً روی لام چسبیده و مواد چسبیده و خشک شوند.



شکل ۷: مراحل رنگ‌آمیزی

٤-۲-اجرای آزمایشات PCR

میگوهای نمونه برداری شده به روش PCR از نظر حضور عوامل پاتوژن ویروسی (WSV,IHHNV,HPV,TSV,IMNV,YHV و BP) مطابق با لیست OIE مورد غربالگری و آزمون قرار گرفتند. در کلیه مراحل از کیتهای تشخیصی IQ2000که مرد تایید سازمان OIE میباشد، استفاده گردید.

۱-٤-۲-استخراج DNA

بخش کوچکی از اندام حرکتی میگوهای نمونه برداری شده در اتیل الکل ۹۵ درصد به منظور بررسی PCR نگهداری گردیدند.ابتدا بر اساس دستورالعمل کیت و با استفاده روش DTAB/CTAB نسبت به استخراج DNA نمونه ها اقدام نمودیم. برای استفاده از روش PCR، باید در کلیه روش ها DNA را استخراج و خالص نموده و

سپس برای تکثیر DNA از آن استفاده کرد. آماده سازی نمونه‌های تهیه شده برای PCR مطابق پروتکل مربوطه ابتدا با قرار دادن نمونه، درون یک میکروتیوپ ۱/۵میلی لیتر با ۶۰۰ میکرولیتر محلول DTAB و در ادامه، آسیاب کردن نمونه با آسیاب کننده یکبار مصرف و یا هموژنیزه کردن بافت تا رسیدن به حالت له شدن کامل و یکنواخت انجام دادیم.

سپس مطابق دستورالعمل کیت مورد استفاده مراحل زیر عمل انجام گردید:

۱- نمونه آماده شده از مرحله قبل را، توسط دستگاه حمام آب جوش (بن ماری)، در دمای ۷۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم، سپس اجازه داده شد تا خنک شده و به دمای اتاق برسد. آنگاه، نمونه، توسط دستگاه میکسر حلقه‌ای، به صورت مختصر، به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط نمودیم.

۲ – ۷۰۰ میکرولیتر، کلروفرم اضافه نموده و دوباره به مدت ۲۰ ثانیه مخلوط، سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ نمودیم.

۳ - ۲۰۰ لاندا از فاز آبدار و شفاف بالایی را به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محلول CTAB، سپس۹۰۰ میکرولیترddH2O (آب دیونیز) به یک تیوب تازه ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال دادیم.آن گاه به مدت ۱۰ ثانیه به طور مختصر مخلوط نمودیم، سپس، توسط دستگاه حمام آب جوش (بن ماری)، در دمای ۷۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم.

۴ – اجازه دادیم تا محلول خنک شده تا به دمای اتاق برسد، سپس با دور ۱۲۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم.

۵ – با دقت مایع بالائی آن را بیرون ریخته و پلاک های تشکیل شده ی ته آن ها را با مقدار ۱۵۰ میکرولیتر محلول Dissolve حل نموده و مجدد توسط دستگاه حمام آب جوش (بن ماری)، در دمای ۷۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم، سپس اجازه دادیم تا خنک شده و به دمای اتاق برسد.

۶ – با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم، آن گاه محلول شفاف رویی، که معمولا درحدود ۱۷۰ – ۱۵۰ میکرولیتر می باشد را برداشته و به یک تیوب جدید ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل نمودیم، سپس به میزان ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به آن اضافه نمودیم.

۷ - به طور مختصر، به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط ، سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس مایع درون لوله را خالی کرده و به رسوب ته آن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد برای شستشوی پلاک اضافه نمودیم.آن گاه به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس میکروتیوب ها را خالی کرده و روی یک کاغذ قرار داده تا خشک شوند و در پایان به رسوب ته آن(پلاک DNA)، بافر TE یا آب دیونیز اضافه نمودیم تا پلاک حل شود.

۲-٤-۲-کیتهای مورد استفاده PCR

کیتهای مولکولی مختلفی برای تشخیص بیماریهای مختلف میگو از قبیل *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) ، Infection Hypodermal and Hematopoeitic Necrosis Virus (IHHNV)و سایر بیماریها متل TSV,IMNVو WSSV وجود دارد که ما در این تحقیق از سه کیت مولکولی PCRبه منظور مطالعه آلودگی سندرم تورا(TSV)، بیماری IMNVو بیماری WSSVو بنامهای

IQ 2000 TM for Detection and Prevention WSSV
IQ 2000 TM for Detection and Prevention TSV
IQ 2000 TM for Detection and Prevention IMNV
IQ 2000 TM for Detection and Prevention HPV
IQ 2000 TM for Detection and Prevention IHHNV
IQ 2000 TM for Detection and Prevention MBV
IQ 2000 TM for Detection and Prevention YHD
IQ 2000 TM for Detection and Prevention NHP

استفاده نمودیم. برای این منظور و بر اساس دستورالعمل سازنده کیت، DNA استخراج شده را در یک میکروتیوب ۲/. میلی لیتری و با آماده سازی معرف‌ها در دو مرحله که در اولین مرحله ۸µl مخلوط واکنش RT-PCR بوده به شرح ذیل مخلوط و آماده نمودیم:

۷RT-PCR PreMixµl

۰/۵RT Enzymeµl

۰/۵µl ۲IQzyme DNA polymeraseU/µl

بخش دوم شامل ۱۵µl مخلوط واکنش Nested PCR می باشد که به شرح زیر مخلوط و آماده گردید:

۱۴ Nested PCR PreMixµl

۱ µl ۲ IQzyme DNA PolymeraseU/µl

۳-٤-۲- برنامه PCR

برنامه واکنش RT-PCR در ابتدا به شرح ذیل بود:

C˚ ۴۲ به مدت ۳۰ دقیقه ، C˚ ۹۴به مدت ۲ دقیقه ، سپسC˚ ۹۴ به مدت ۲۰ ثانیه ، C˚ ۶۲ به مدت ۲۰ ثانیه ؛ ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه ، ۱۵ دور تکرار شده ، سپس C˚ ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه ؛ C˚ ۲۰ به مدت ۳۰ ثانیه در پایان سیکل انتهایی افزوده گردید.

برنامه واکنش Nested PCR شامل : C˚ ۹۴ به مدت ۲۰ ثانیه ؛ C˚ ۶۲ به مدت ۲۰ ثانیه ؛ C˚ ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه ، ۳۰ دور تکرار شده ، C˚ ۷۲به مدت ۳۰ ثانیه ؛ C˚ ۲۰ به مدت ۳۰ ثانیه در پایان سیکل نهایی افزوده گردید. محصول Nested PCR در دستگاه الکتروفورز با ژل آگارز ۲درصد قابل دیدن می باشد ، بدین شرح که برای تهیه ژل آگاروز ۲ درصد، ۱/۰۵ گرم از پودر آگاروز را با ۵۰ سی سی آب بافر مخصوص الکتروفورز، مخلوط نموده و در دستگاه ماکروفر با دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد، به مدت۹۰ دقیقه قرار داده، سپس در محیط گذاشتیم تا

حدود ۶۰ درجه سانتی گراد خنک شود، آن گاه در سینی الکتروفورز ریخته و شانه های نشان دار دستگاه الکتروفورز را در ژل وارد نمودیم. وقتی که ژل آماده شد، محصول PCR شده را به میزان ۱۰ میکرولیتر به همراه ۲ میکرولیتر از ماده متیلن بلو را روی ژل، در محل سوراخ هایی که توسط شانه ایجاد شده بود قرار دادیم. سپس مخزن دستگاه را از آب بافر مخصوص الکتروفورز پر کرده و ژل را با نمونه ها در قطب منفی قرار داده و دستگاه را با ولتاژ ۱۱۰ ولت برای ۳۰ دقیقه راه اندازی نمودیم. سپس ژل را در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر آب مقطر) که به شدت سمی است برای مدت زمان ۳ تا ۵ دقیقه رنگ آمیزی نمودیم. در نهایت، ژل را با آب مقطر شستشو داده و به آن اجازه دادیم تا در هوای محیط خشک شده و آن را زیر یک ترانسلومیناتور UV مشاهده کردیم. نمونه های مثبت باید برای بیماری TSVباندهای ۲۸۴bp و یا ۴۷۶bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۶۸۰ bp را نشان دهند.برای بیماری WSSV نمونه های مثبت باندهای ۲۹۶bp و یا ۵۵۰bp و نمونه های منفی تنها باند ۸۴۸bp و برای بیماری IMNV نمونه های مثبت باندهای ۱۰۰bp و یا ۲۰۰bp و نمونه های منفی تنها باند ۳۳۳bpرانشان میدهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری HPVباندهای ۳۳۹bp و یا ۵۵۳bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۷۳۰ bp را نشان دهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری IHHNV باندهای ۶۴۴bp و ۴۳۸bp نمونه های منفی تنها باندهای ۲۴۳ bp را نشان دهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری MBV باندهای ۲۲۵bp و یا ۴۴۴bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۶۶۵ bp را نشان دهند. همچنین نمونه‌های مثبت باید برای بیماری YHDباندهای ۴۰۶bp و ۷۷۷bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۲۷۷ bp یا ۷۷۷bp یا و ۶۸۰bpرا نشان دهند و نمونه های مثبت باید برای بیماری NHPباندهای ۸۴۸bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۳۲۵ bp را نشان دهند.

نمونه های مورد نیاز برای اجرای آزمایشات مولکولی مطابق فرمهای ضمیمه به آزمایشگاه مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی کشور واقع در بوشهر ارسال و نتیجه آن اخذ میگردید. همچنین در برنامه پایش نمونه های مرتبط با غذا نیز به آن مرکز فرستاده و از نظ کلیه پاتوزنها مورد ارزیابی قرار میگرفت.

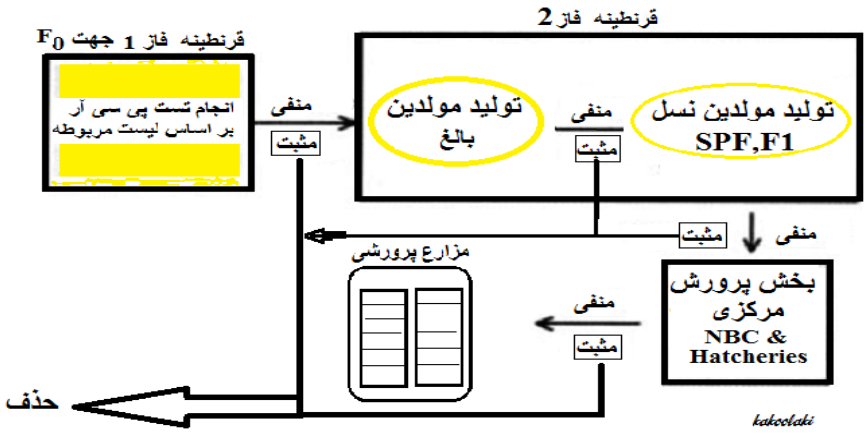
۵-۲-آزمایشات باکتری شناسی و انگل شناسی

بررسیهای باکتری شناسی در فاز اول نسل F_0 و برای ردیابی ویبریو های پاتوژن در مولدین، نمونه های همولنف و هپاتوپانکراس میگو ها در محیط کشت TSA و TCBS کشت داده شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری و پس از طی زمان انکوباسیون شمارش کلونی های باکتریایی انجام گردید. در صورتیکه نمونه از مولد دارای علایم بیماری گرفته شده باشد، برای شناسایی باکتریایی، کلنی های جداسازی شده در محیطهای غنی کننده پاساژ داده و شناسایی آن توسط تستهای بیوشیمیایی مانند: دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه (اورنیتین،آرژینین و لیزین)، تخمیر قندها(گلوکز،لاکتوز،سوکروز،سلوبیوز،اینوزیتول و مانیتول)، سیمون سیتراتاز، احیای نیترات، ژلاتیناز، متیل رد وژسپرکوئر و غیره صورت می گیرد.

در فاز ۲ از نسل F_1 نیز تخم میگوهای مورد استفاده در طرح جمع آوری و نمونه ها در شرایط استریل به آزمایشگاه حمل و پس از هموژن کردن نمونه ها در محیط کشت TSA و TCBS کشت داده شدو سایر مراحل آزمایش طبق روش ذکر شده در مورد مولدین انجام می شود. برای مراحل لاروی و پست لاروی نیز تعداد ۱۰ عدد لارو میگو هموژن شده سپس به میزان مشخصی در محیط کشت TSA و TCBS کشت داده می شود و سایر مراحل آزمایش طبق روش ذکر شده در مورد مولدین انجام می شود. این روش در انجام نمونه های نسل F۲ مانند نسل F1 انجام گردید. برای بیماری نکروز عفونی پانکراس (NHP) (Necrotizing Hepatopancrititis) در کلیه مراحل نمونه گیری بالا به منظور پایش این باکتری نیز نمونه برداری انجام شده و آزمایشات آسیب شناسی و تشخیص توسط کیت صورت می گیرد.

انگل شناسی در هر سه نسل F0، F1 و F2 با توجه به مرحله رشد میگو صورت گرفت بطوریکه در مولدین و میگوی بالغ، ابتدا اندام های خارجی شامل آبششها و ضمایم بدن به منظور شناسایی انگلهای خارجی در زیر میکروسکوپ بررسی گردید، سپس اندامهای داخلی شامل هپاتوپانکراس و روده و عضله در سرم فیزیولوژی از نظر انگلهای داخلی، زیر میکروسکوپ بررسی و در صورت مشاهده موارد مشکوک به گرگارین یا میکروسپوریدیا آزمایشات بافت شناسی روی آن ها صورت گرفت.مراحل لاروی و پست لاروی نیز اندامهای خارجی این مراحل از رشد میگوها از لحاظ آلودگی و شدت آلودگی به انگل های خارجی مورد مطالعه قرار گرفت.

برای اجرای عملیات ایمنی زیستی نیز بر اساس مقالات و بررسیهای علمی اجرای طرح ایمنی زیستی در تولید میگوی عاری از بیماری بر موضوعات ، مولد ، غذا، آب، پرسنل و ساختارهای فیزیکی مرتبط است. برای این منظور مطابق شکل ۸ باید در طی اجرای طرح کلیه محلهائی که امکان بروز خطر وجود دارد را شناسائی نموده و نسبت به کنترل بالاخص در زمینه بیماریها اقدام و غربالگری نمود.

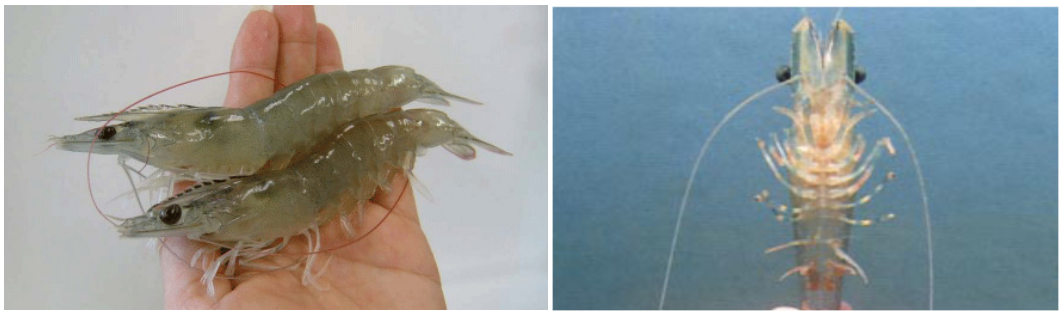


شکل ۸: مراحل اجرای تولید میگوی عاری از بیماری و مراحل غربالگری

با توجه به اینکه در طرح کلان میگوهای پرورشی برای تولید مولدین عاری از بیماری مورد استفاده قرار میگیرند، لذا در مرحله اول باید کلیه میگوهای مولد انتخابی را از نظر بیماریهای مهم از جمله MBV,IHHNV,TSV,YHV,WSSVرا با روش PCR و روشهای مرسوم غربالگری نمود. این اقدام باید در مراحل تولید مولدین f0,f1 و f2نیز انجام گیرد. همچنین در این زمینه کلیه غذاهای وارد شده درمرکز تکثیر از نظر این بیماریها باید کنترل و غربالگری شود. لاروهای تولیدی نیز باید غربالگری شود. برای هر مورد پروتکل اجرای عملیات باید تنظیم و دردسترس همکاران قرارداد. ورودی کلیه مکانها باید نسبت به استفاده از مواد ضدعفونی اجباری نموده و کلیه امکانات مورد استفاده در هر بخش باید جداگانه و مجزا نگهداری شوند. چنانچه در هر مرحله انجام آزمایش نمونه ها عاری از هرگونه بیماری باشد وارد مرحله بعد شده و در صورت مثبت بودن از مسیر تولید خارج می‌شود تا درنهایت درمرحله تولید میگوی SPF و قرار گرفتن در NBC میگوها از هر گونه پاتوژن عاری باشند.

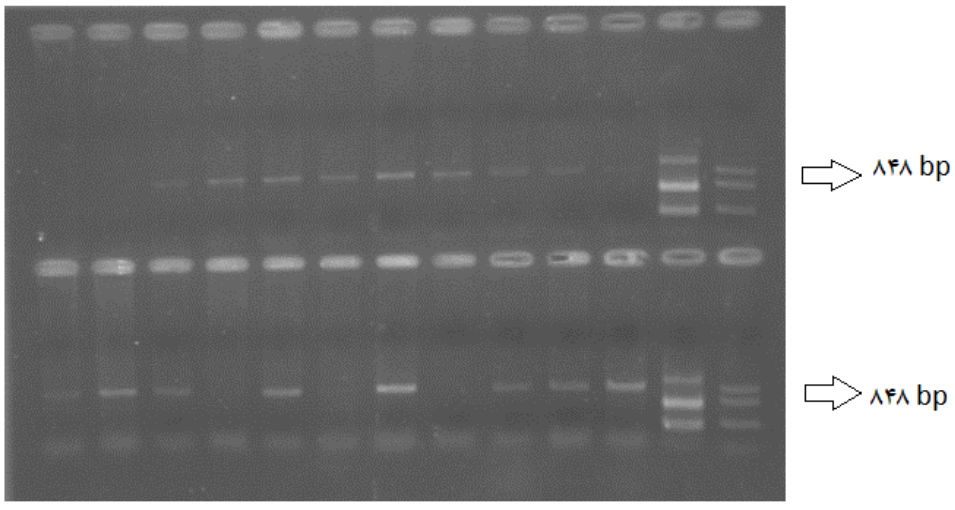
۳-نتایج

بر اساس بررسیهای کلی شامل مشاهدات بالینی، مشاهدات رفتاری نظیر شنا، تغذیه، تلفات و مشاهدات سطحی بدن نظیر زخمها، تغیرات رنگ بدن و ضمائم، زخمها و نکروزهای کانونی، نرمی پوسته و بررسی بافتهای نرم سطحی و بررسی فاکتورهای محیطی بعمل آمده (شکل ۹) نشان داد که مولدین انتخابی شرایط لازم را برای استفاده در طرح داشته و عاری از ضایعات بالینی بوده و چنانچه بررسیهای آزمایشگاهی ویروسی هم تایید نمابند این نمونه ها را میتوان به عنوان مولدین جمعیت پایه (Founder population) مورداستفاده قرار داد.

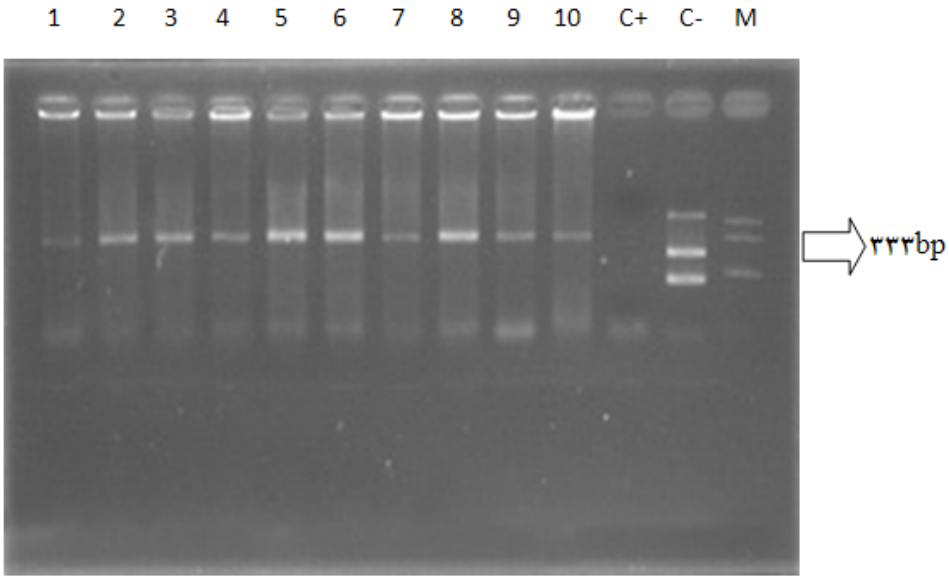


شکل ۹: مولدین جمعیت پایه

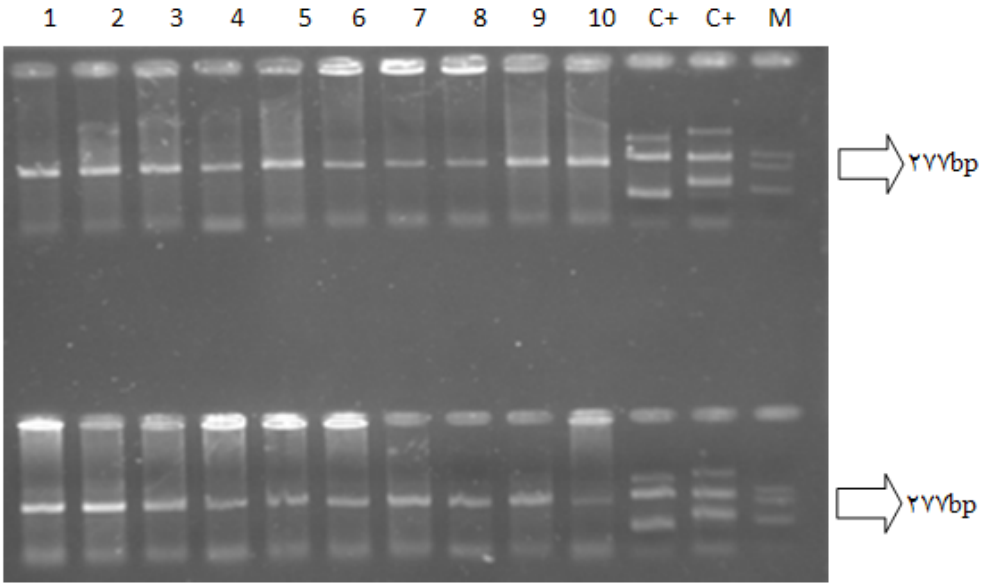
همچنین براساس بررسی های صورت گرفته تاکنون در کلیه نمونه های ارسالی برای ردیابی ویروسهای هیچ مورد مثبتی گزارش نگردید و از نظر وجود ویروس نمونه های مورد بررسی منفی اعلام گردید. این بررسی شامل کلیه نمونه های میگو در مراحل مختلف طرح بوده و در مورد نمونه های غذا نیز همین نتیجه بهدست آمد (شکل ۹).



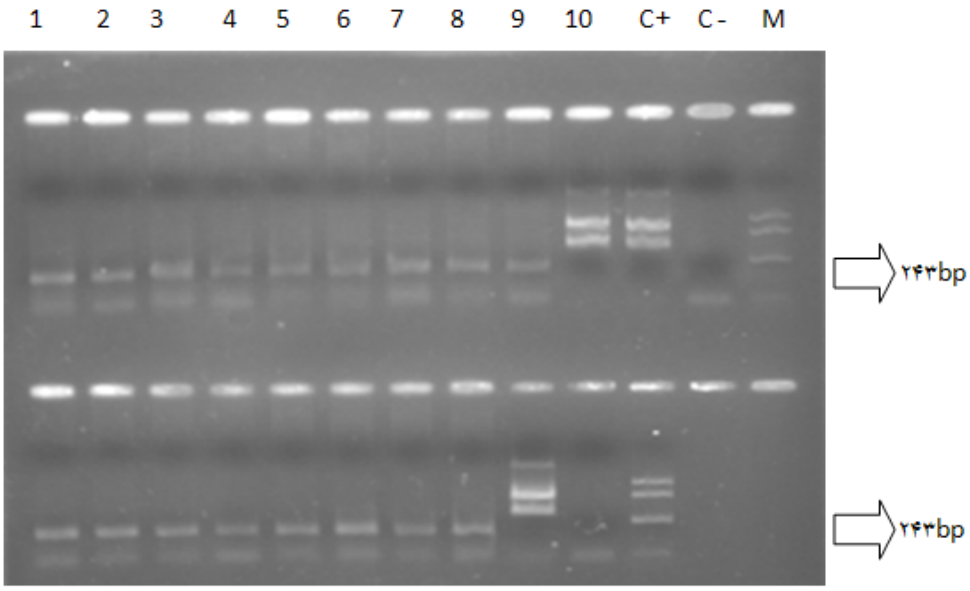
شکل ۱۰: نتایج آزمایش تشخیص بیماری لکه سفید درنمونه ها که همگی منفی بوده و فاقد آلودگی میباشند.



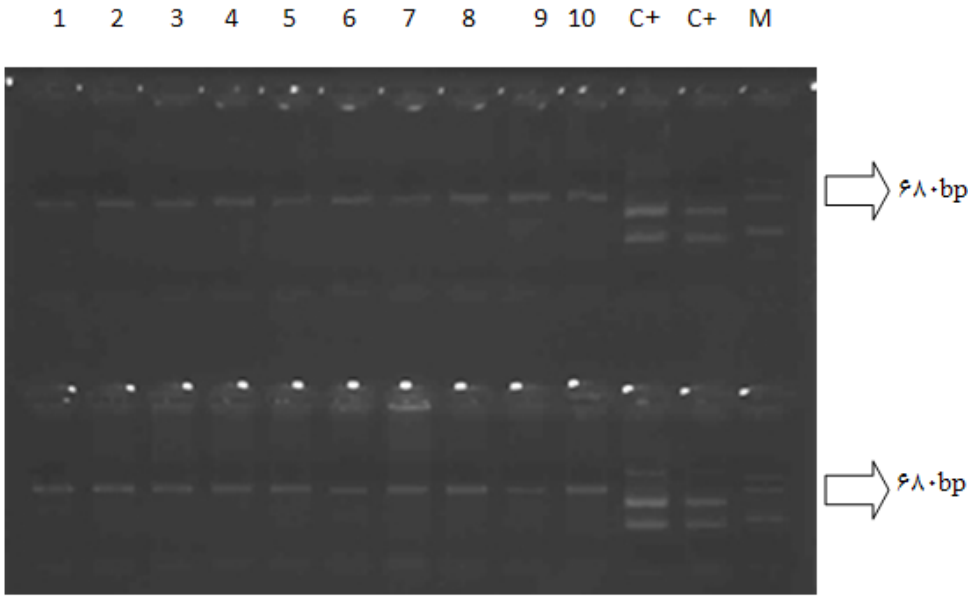
شکل ۱۱: نتایج آزمایش تشخیص بیماری IMNV درنمونه ها که همگی منفی بوده و فاقد آلودگی میباشند.



شکل ۱۲: نتایج آزمایش تشخیص بیماری YHV درنمونه ها که همگی منفی بوده و فاقد آلودگی میباشند.

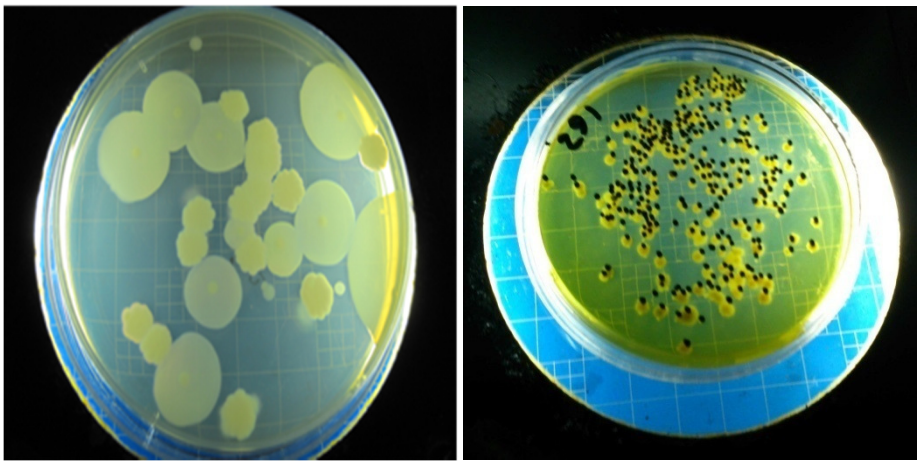


شکل ۱۳: نتایج آزمایش تشخیص بیماری IHHNV درنمونه ها که همگی منفی بوده و فاقد آلودگی میباشند.

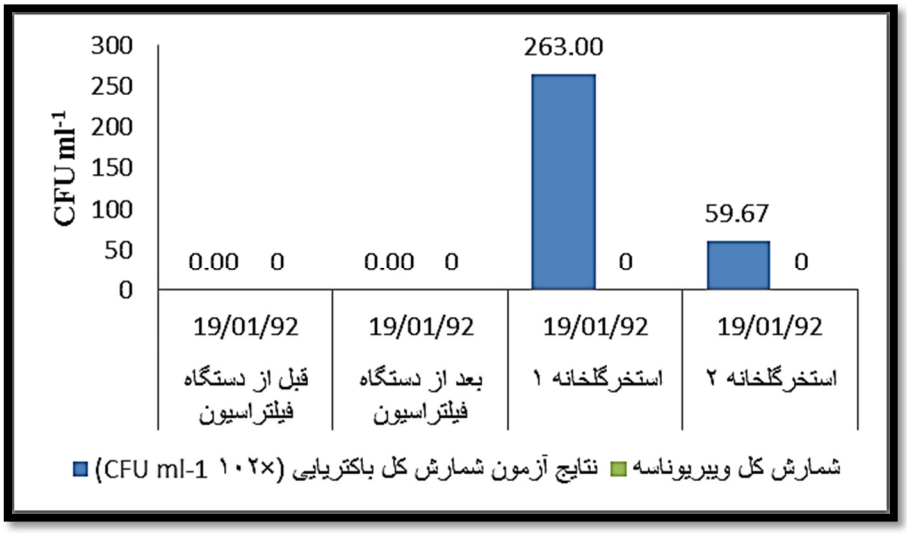


شکل ١٤: نتایج آزمایش تشخیص بیماری TSV درنمونه ها که همگی منفی بوده و فاقد آلودگی میباشند.

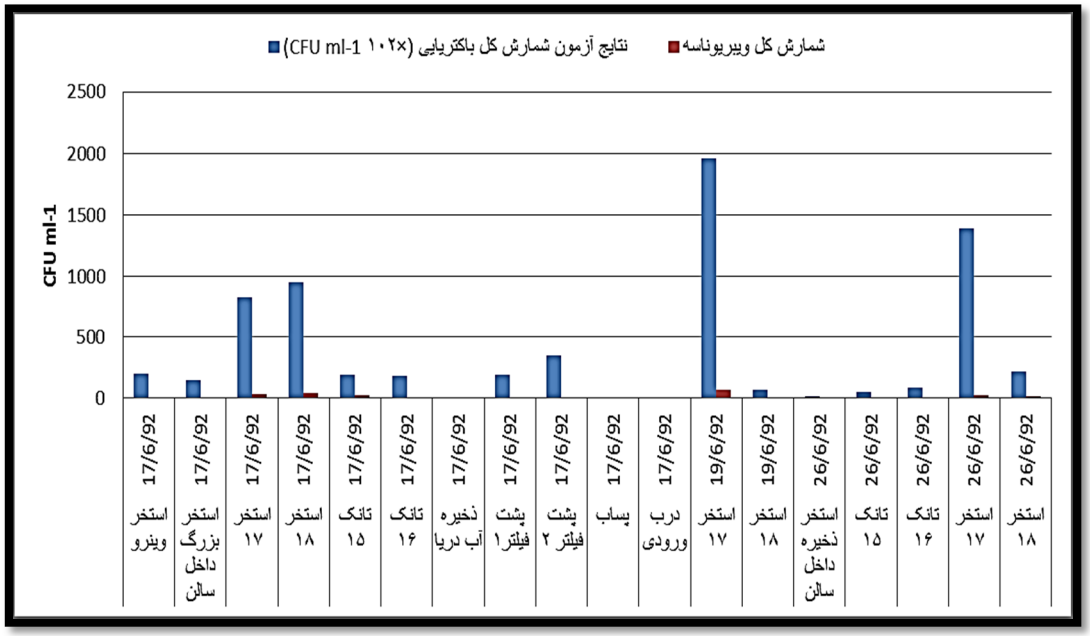
در طی پایش صورت گرفته از فروردین ۱۳۹۱ لغایت تیر سال ۱۳۹۲ در مجموع ۵۴۰ نمونه آب و از فروردین لغایت اوایل خرداد ۱۳۹۳ نیز ۱۹۳ نمونه آب از نظر باکتری های هتروف هوازی و بی هوازی و باکتری های خانواده ویبریوناسه مورد آنالیز قرار گرفت (شکل ۱۱). نمونه برداری از بخش های مختلف پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) شامل تانک ها، گلخانه، آب استخر کلرزنی، فیلتراسیون و دریا صورت می-گرفت و چنانچه فراوانی باکتریایی در محل نمونه برداری بالاتر از حد مجاز بود، گزارش و اقدامات لازم انجام می شد (نمودار ۱ الی ۶).



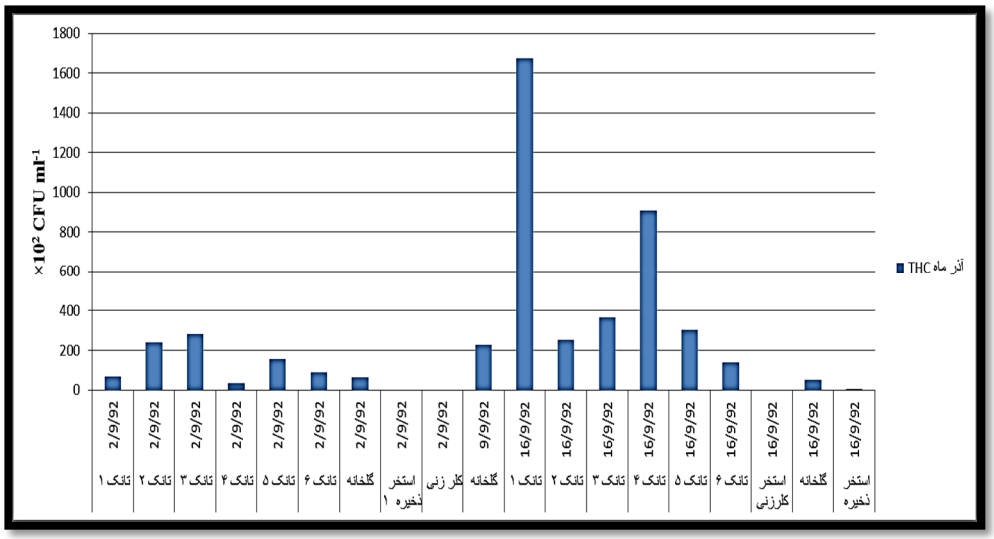
شکل ۱۵: پلیت های شمارش باکتریایی کل و باکتری های خانواده ویبریوناسه



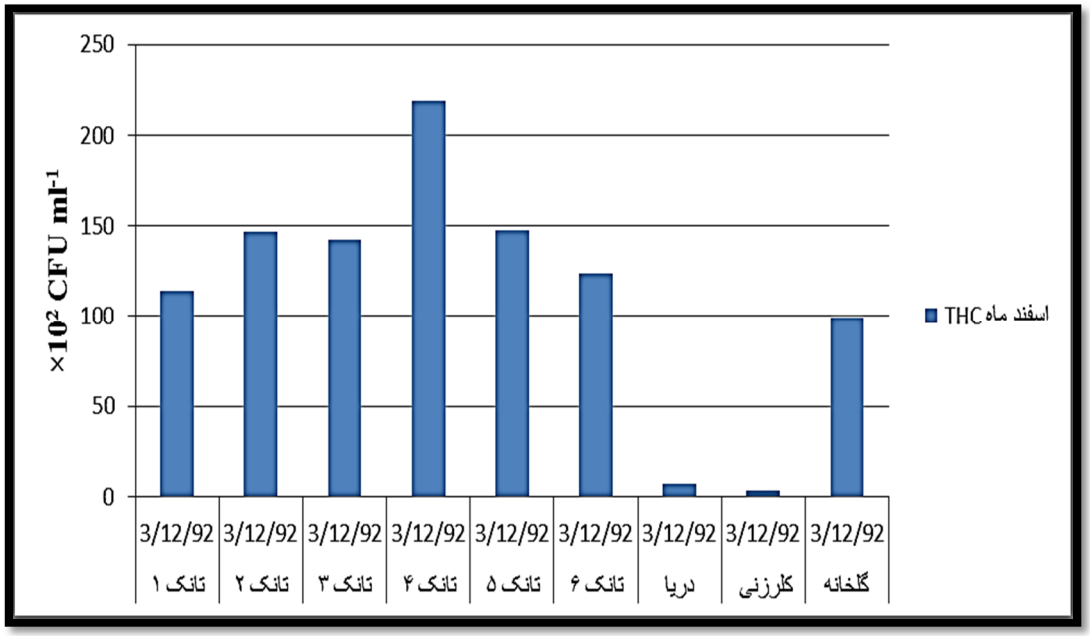
نمودار ۱: فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری و خانواده ویبریوناسه در بخش های مختلف پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) فروردین ۱۳۹۲



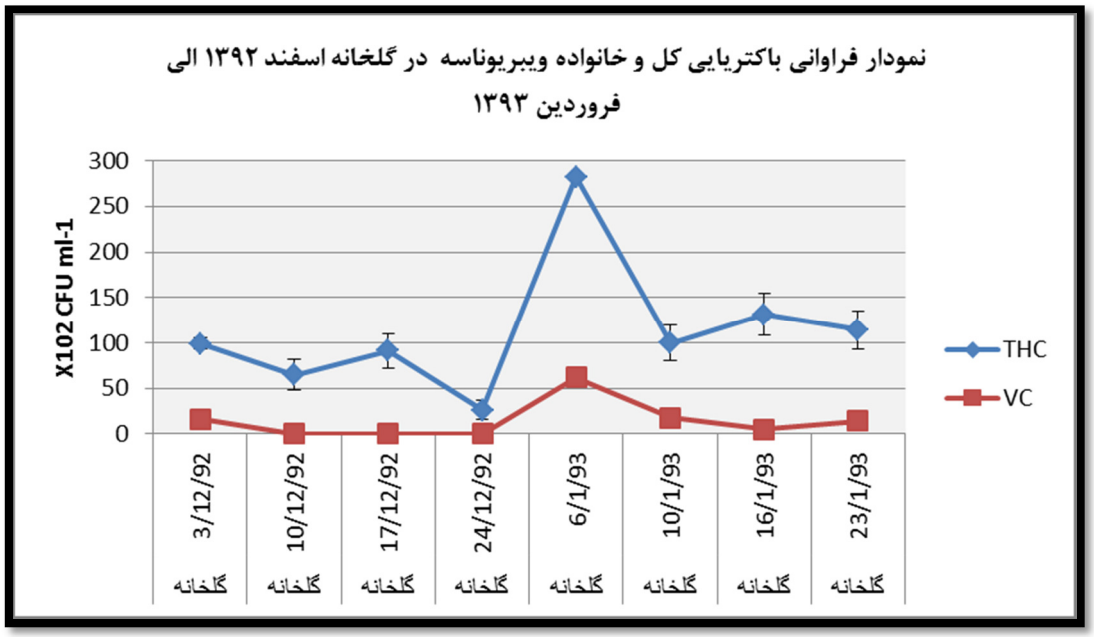
نمودار ۲: فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بیهوازی اختیاری و خانواده ویبریوناسه در بخش های مختلف پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) شهریور ۱۳۹۲



نمودار ۳: فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بیهوازی اختیاری در بخش های مختلف پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) آذر ۱۳۹۲

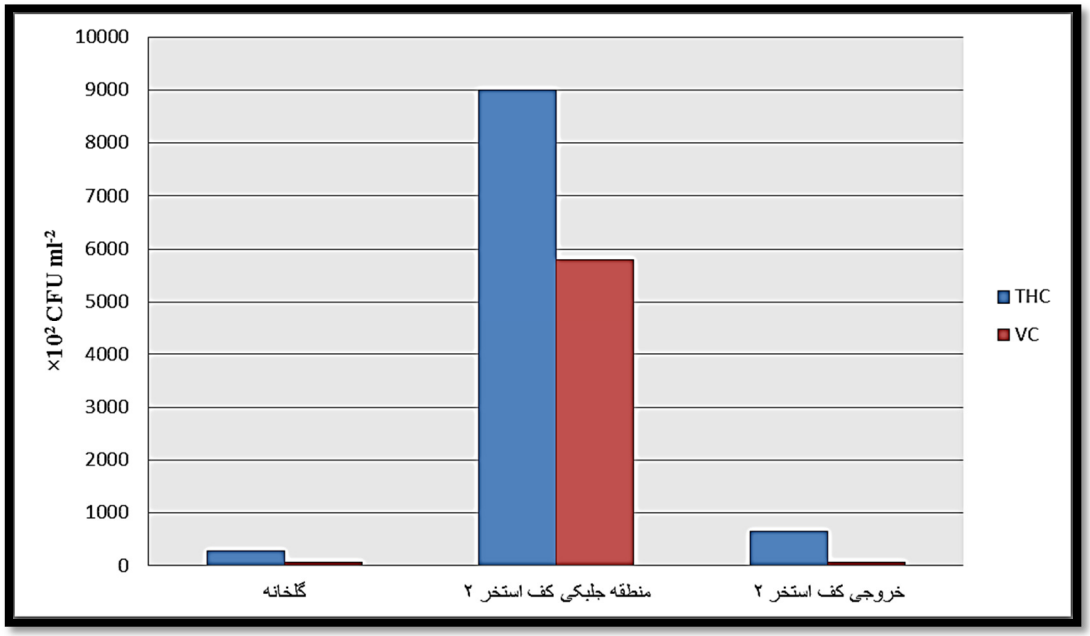


نمودار ٤: فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بیهوازی اختیاری در بخش های مختلف پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) اسفند ۱۳۹۲



نمودار ٥: فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بیهوازی اختیاری و خانواده ویبریوناسه در بخش های مختلف پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) اسفند و فروردین ۱۳۹۳

در تاریخ ۶ فروردین ۱۳۹۳ ، مرگ و میر میگو از استخر گلخانه گزارش گردید که پس از اعزام کارشناسان و نمونه برداری فراوانی باکتریایی در آب و کف استخر نسبت به اسفند ماه بالاتر بود (نمودار۵ و ۶) و نمونه برداری جهت احتمال وجود عامل بیماریزای باکتریایی یا ویروسی نیز صورت گرفت.

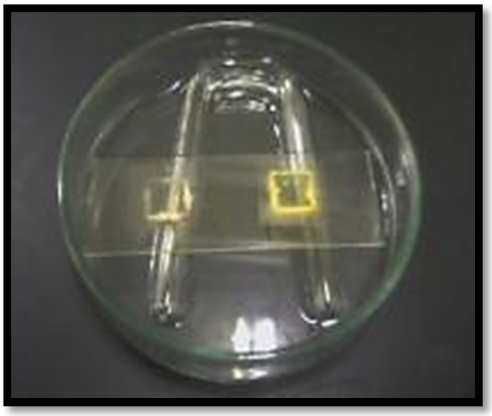


نمودار ٦: فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بیهوازی اختیاری و خانواده ویبریوناسه در بخش های مختلف استخر گلخانه پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) ٦ فروردین ۱۳۹۳

۱-۳-پایش عوامل قارچی و ویروسی آب در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

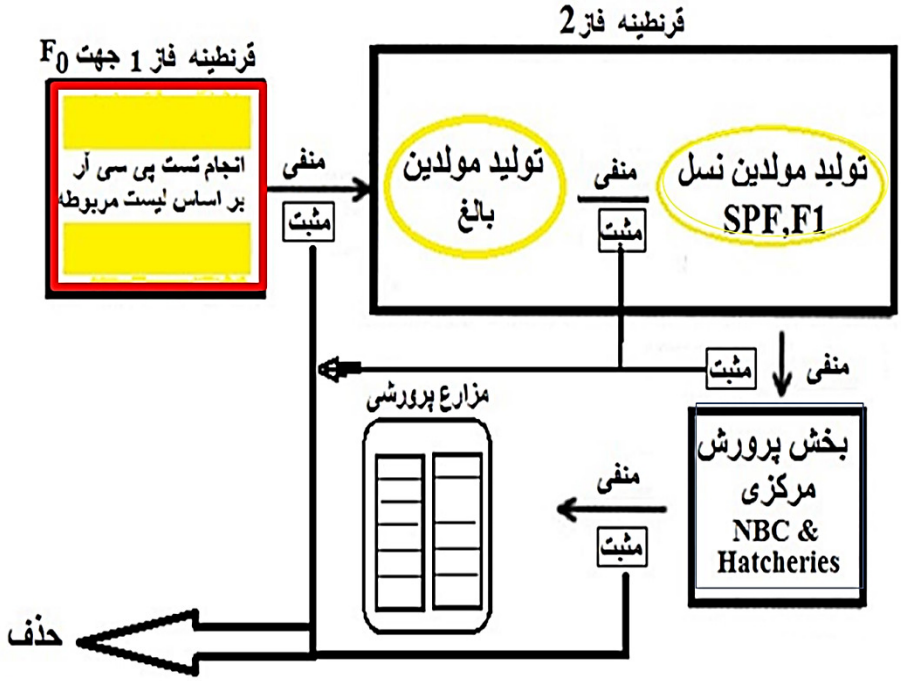
به منظور جداسازی عوامل قارچی آب و افزایش احتمال جداسازی قارچ ها از محیط های کشت مالت اکسترکت آگار(MEA)، سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و سابورو دکستروز آگار(SDA) استفاده گردید. برای شناسایی قارچ‌های جداسازی شده از نمونه‌ها، براساس روش‌های رایج در آزمایشگاه قارچ‌شناسی و با توجه به کلیدهای تخصصی موجود برای شناسایی قارچ های رشته ای، اختلاف‌های مرفولوژیک آنها روی محیط کشت و بررسی دقیق ساختار زایای قارچ ها از روش کشت روی لام اقدام گردید (شکل ۱۲).

بررسی های به عمل آمده نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به قارچ های جنس *Aspergillus*، *Penicillium* و *Mucor* بود. در آب استخر کلرزنی، هیچ کلنی قارچی جداسازی نشد. نمونه‌های آب، پس از فیلتر شدن مورد ارزیابی های ویروسی قرار گرفت که در تمامی موارد جواب ها منفی بود.



شکل ١٦: کشت روی اسلاید جهت مشاهده دقیق اندام زایای قارچی و شناسایی در حد گونه

در این طرح از فروردین ۱۳۹۲ لغایت اسفند ۱۳۹۲، پایش و غربالگری غذای مورد استفاده در تکثیر و پرورش میگو شامل: غذای کنسانتره، غذای تر (ماهی مرکب، کرم نرئیس و صدف ملالیس) و غذای زنده (جلبک اسپیرولینا و آرتمیا) همچنین میگوها در مراحل مختلف تکثیر و پرورش در هر مرحله انتقال در فازهای اجرایی طرح صورت گرفت (شکل ۱۳) که تعداد نمونه های مورد آزمایش مطابق جدول شمره ۷ و ۸ می باشد.



شکل ۱۷: مراحل پایش عوامل بیماریزا در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

جدول۷: تعداد نمونه های مورد بررسی از فروردین لغایت اسفند ۱۳۹۲

ردیف	نام نمونه	تعداد
۱	میگو	۸۲
۲	غذای کنسانتره	۴
۳	ماهی مرکب	۵۴
۴	کرم نرئیس	۲۱
۵	جگر گاو	۲
۶	صدف ملالیس	۲
۷	جلبک اسپیرولینا	۱
۸	آرتمیا	۱
	جمع	۱۶۷

جدول۸: تعداد نمونه های مورد بررسی از فروردین لغایت خرداد ۱۳۹۳

ردیف	نام نمونه	تعداد
۱	میگو	۱۰۴
۲	غذای کنسانتره	۲
۳	ماهی مرکب	۹
۴	کرم نرئیس	۱
۵	آرتمیا	۱
	جمع	۱۱۷

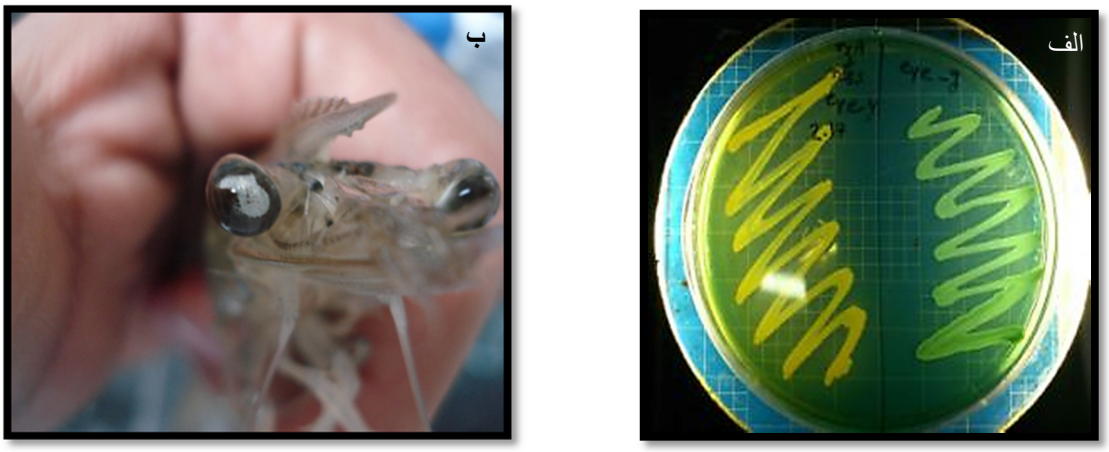
بنابراین از فروردین ۱۳۹۲ لغایت خرداد ۱۳۹۳، ۱۸۶قطعه میگو، ۶ نمونه غذای کنسانتره، ۶۳ نمونه ماهی مرکب، ۲۲ نمونه کرم نرئیس، ۲ نمونه جگر گاو، ۲ نمونه صدف ملالیس، ۱ نمونه جلبک اسپیرولینا و ۲ نمونه آرتمیا مورد کنترل و غربالگری میکروبی از نظر وجود ۷ ویروس TSV، YHV، IHHNV، MBV، HBV، IMNV، WSSV و باکتری NHPB قرار گرفتند. همچنین میگو ها از نظر وجود میکروسپوریدیا نیز از نظر علایم بالینی پایش می گردیدند.

تاکنون در تمامی آزمایشات نتایج از نظر عوامل باکتریایی و ویروسی مورد بررسی منفی بودند و نتایج آزمون های صورت گرفته بر روی میگوهای تلف شده در تاریخ ۶ فروردین ۱۳۹۳ نیز از نظر این عوامل منفی بود و با توجه به بالا بودن فراوانی باکتریایی در آب و کف استخر و همچنین تجمع جلبکی در کف، علت مرگ و میر کمبود اکسیژن و شکست شکوفایی پلانکتونی اعلام شد که با تعویض آب و انتقال میگوها به استخر مجاور مشکل برطرف گردید.

براساس نتایج شمارش باکتریایی کل و باکتری های خانواده ویبریوناسه در غذای میگو، میانگین فراوانی باکتریایی کل در هر گرم ماهی مرکب $۴۴/۷۲\pm۰/۱)\times۱۰^{۴}$، غذای کنسانتره میگو $۱/۴۰\pm۰/۰۲)\times۱۰^{۴}$ و آرتمیا $۰/۰۶۰\pm۰/۰۰۳)\times۱۰^{۴}$ می باشد و همچنین میانگین فراوانی باکتری های خانواده ویبریوناسه در هر گرم کرم نرئیس $۵/۸\pm۰/۰۱)\times۱۰^{۴}$ می باشد ولی در هر گرم ماهی مرکب، غذای کنسانتره میگو و آرتمیا در حجم آزمونه قابل شناسایی نبود.

۲-۳-بررسی موردی علت سفید شدن چشم میگوها

با توجه به گزارشات متعدد از سفید شدن چشم میگوها و به دنبال مشاهده این مساله در چشم میگوهای مورد پایش این طرح، به منظور بررسی علت سفیدی چشم میگوها و پایش وضعیت چشم آنها ۱۰ قطعه میگو از پایلوت تولید میگوی عاری از پاتوژن خاص (ایستگاه بندرگاه)، به آزمایشگاه مواجهه بخش بیماری ها انتقال داده شد. سپس در شرایط آسپتیک نمونه گیری از چشم میگوها و کشت آن در محیط کشت‌های تریپتیک سوی آگار (TSA)، تریپتیک سوی براث (TSB)، ویبریو سلکتیو آگار (TCBS)، سابورو دکستروز آگار (SDA)، مالت اکسترکت آگار (MEA) و سیب زمینی آگار(PDA) صورت گرفت (شکل ۱۴ الف-ب).

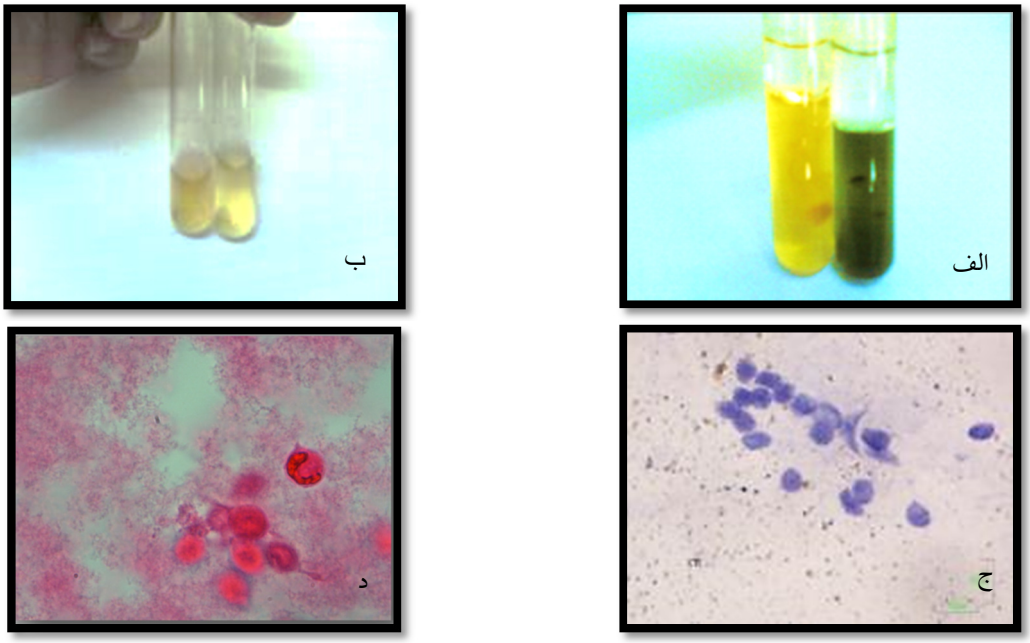


شکل ۱۸: الف- باکتری های جداسازی شده از چشم میگو ب-تصویر چشم سفید

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی، دو ایزوله باکتریایی متعلق به جنس ویبریو از چشم باکتری ها جداسازی و خالص سازی شد (تصویر ۵ الف و ب) که شناسایی مولکولی آن ها به روش توالی یابی 16S rDNA از طریق کلونینگ صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز 16S rDNA باکتری های IS013 و IS014 با استفاده از نرم افزار Blast و EZ taxon هر دو باکتری متعلق به خانواده ویبریوناسه و جنس ویبریو بودند که باکتری IS013 دارای ۹۹/۸۷ درصد مشابهت با باکتری *Vibrio nigripulchritudo ATCC 27043* (T) و همچنین باکتری IS014 دارای ۹۹/۲۱ درصد مشابهت با باکتری *Vibrio brasiliensis LMG 20546* (T) بود.

در نتایج آنتی بیوگرام مشخص شد هر دو باکتری در ۴۸ ساعت اولیه به اکسی تتراسایکلین حساس بوده ولی بعد از این مدت مقاومت نشان می دهند و مجدداً رشد می نمایند و ایزوله قارچی جداسازی نگردید.

در بررسی انگل شناسی از چشم میگوها، اسلاید مرطوب تهیه شد که باکتری های فراوانی در زمینه لام مشاهده شد و همچنین اجرام کیست مانندی برای اولین بار مشاهده گردید که شناسایی آن ها در حال انجام است. مقطع بافتی از چشم سفید میگوها نیز مطابق اصول بافت شناسی تهیه و مورد مطالعه قرار گرفت.از همولنف میگوهای تحت بررسی گسترش سطحی تهیه شده و مورد رنگ آمیزی می‌گرانوالد گیمسا قرارگرفتند و سلول های خونی از نظر وجود عامل بیماریزا توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱۵). درضمن به منظور جداسازی عوامل باکتریایی احتمالی از همولنف میگوها در محیط کشت های میکروبی کشت تهیه شد که ایزوله ای جداسازی نگردید. به منظور بررسی حضور احتمالی اجرام میکروبی مشاهده شده، از بقایای دفعی میگوها در تانک ها نمونه برداری و پس از تهیه لام مرطوب توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.



شکل ۱۹: الف- تست افتراقی گلوکز هوازی و بی هوازی، اینوزیتول و سوکروز بر روی ایزوله های خالص شده، ب- تست افتراقی رشد در محیط نمک صفر درصد بر روی ایزوله های خالص شده، ج- رنگ آمیزی می گرانوالد کیمسا از همولنف میگوها، د- رنگ آمیزی سلول های خونی همولنف.

۳-۳-بررسی موردی تخمدان میگو

در طی پایش میگوها دو قطعه میگوی ماده از جمعیت ملوکای (از نظر ظاهری نسبت به جمعیت های هلث از سلامت کمتری برخوردار بودند) به آزمایشگاه میکروبیولوژی انتقال داده شد و در شرایط آسپتیک نمونه گیری از تخمدان میگوها و کشت آن در محیط کشت های تریپتیک سوی آگار (TSA)، تریپتیک سوی براث (TSB)، ویبریو سلکتیو آگار (TCBS)، سابورو دکستروز آگار (SDA)، مالت اکسترکت آگار (MEA) و سیب زمینی آگار(PDA) صورت گرفت.

بررسی انگل شناسی، تک یاخته های سطحی زی در سطح میگو و تخمدان میگو از طریق تهیه اسلاید مرطوب و رنگ آمیزی با لوگول انجام شد. بر اساس نتایج باکتری شناسی و قارچ شناسی، هیچ ایزوله قارچی رشد نکرد ولی در بررسی باکتری شناسی یک باکتری از خانواده ویبریوناسه جداسازی گردید که به اکسی تتراسایکلین تا ۴۸ ساعت حساس است. ایزوله IS012، به عنوان یکی از باکتری های غالب از آب تانک ها در طی پایش ها خالص سازی و مورد شناسایی مولکولی قرارگرفت که مشخص شد باکتری دارای ۹۸/۹۲ درصد مشابهت با *Vibrio azureus* LC2-005(T) داشت.

در بررسی انگل شناسی، باکتری های فراوان، تخمک و اجرام انگلی مشاهده شد که مشابه اجرام مشاهده شده در چشم میگو بودند و شناسایی آن ها توسط تهیه مقطع و بررسی با میکروسکوپ الکترونی گذاره در دست انجام است.

٤-۳-آنتی بیوگرام سویه های غالب باکتریایی جداسازی شده از آب محل تکثیر میگوها

به منظور تعیین پروفایل آنتی بیوگرام باکتری های غالب در آب محل تکثیر میگوها، تست آنتی بیوگرام دیسک های آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل،سولفامتوکسازول، آمپی سیلین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، فورازولیدون، اریترومایسین، دوکسی سایکلین و کاناماسین بر روی دو ایزوله باکتریایی غالب صورت گرفت

بر اساس نتایج آنتی بیوگرام صورت گرفته ایزوله ۱، نسبت به ۵۵/۶ درصد آنتی بیوتیک های مورد آزمون مقاوم، ۱۱/۱ درصد نیمه حساس و ۳۳/۳ درصد حساس بود و ایزوله ۲ نسبت به ۴۴/۴ درصد آنتی بیوتیک های مقاوم، ۱۱/۲ درصد نیمه حساس و ۴۴/۴ درصد حساس بود. که نتایج بیانگر هشداری در رابطه با شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد.

۵-۳-نگهداری طولانی مدت سویه های باکتریایی جداسازی شده

به منظور تهیه بانک میکروبی از سویه های جداسازی شده در هر بار نمونه گیری و کشت نمونه ها، از کلنی هایی که از نظر تعداد غالب بودند برداشت کرده و توسط کشت خطی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار خالص سازی آن ها انجام می شد، پس از حصول اطمینان از خالص بودن ایزوله ها به منظور نگهداری باکتری ها از روش کشت در محیط کشت شیبدار و لئوفلیزه استفاده شد. تاکنون ۳۶ ایزوله باکتریایی در این طرح خالص سازی شده که ۱۲ سویه توسط کلکسیون ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران، لئوفلیزه (شکل ۱۶) و سایر سویه ها در محیط کشت شیبدار نگهداری و مقدمات لئوفلیزه آن ها در دست اقدام است.

شکل ۲۰: دستگاه فریز درایر

٤-بحث

بر اساس بررسیهای صورت گرفته در طرح کلان ملی کسب و انتقال دانش فنی برای تولید میگوی عاری از بیماری خاص و قطع وابستگی به محصولات خارجی بیماریهای ویروسی مورد مطالعه شامل SV,WSSV,IMNV,HPV,IHHNV,MBVو YHD همچنین بیماریهای باکتریائی ، قارچی و انگلی که بعنوان بیماریهای با ریسک بالا میباشد گزارش نگردید. این وضعیت میگوهای انتخاب شده برای تولید میگوی عاری از بیماری را از نظر یکی از خصوصیت تعریف شده که آن عاری بودن از بیماریهای اعلام شده عاری اعلام نموده و میتواند موضوع مهمی برای طرح باشد. اولین تجربه آزمایشگاهی تولید میگوی SPF (*L.vannamei*)در سال ۱۹۸۹ توسط دکتر لایتنر و همکاران در دانشگاه آریزونا انجام و در این سال ایشان ۱۵۰۰۰ پست لارو میگوی وانامی را از یک هچری در مکزیک تهیه و به آمریکا منتقل نمود. شروع تکثیر و پرورش میگو در آمریکا به سال ۱۹۶۷ میرسد که در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ این صنعت به سرعت در آمریکا گسترش یافت. مهمترین گونه ای که در آمریکا پرورش داده می‌شد گونه *L. vannamei* بوده زیرا بنظر می‌رسید که این گونه به بیماری IHHNV مقاوم باشد. این بیماری در سال ۱۹۸۱ و وقتی تلفات سنگینی در میگوی *P.stylirastris* در آمریکای لاتین اتفاق افتاد شناسایی شده اما متاسفانه این بیماری در میگوی *L.vannamei* نیز موجب بیماری شده و تلفات شدیدی را به همراه داشت. از علائم مشخص این بیماری که با خم شدن میگو ها و کاراپاس آنها همراه بوده و بنام Runt deformity syndrome(RDS) نیز نامیده شده تلفات بیش از ۳۰٪ میگو های مزارع می‌باشد (Wyban,1992).

این بیماری باعث گردید که محققین آمریکایی نسبت به توسعه میگوهایی که از این بیماری عاری باشند مبادرت نموده و آن را SPF stock for *L.vannamei* free of IHHNV نام نهادند . در این ارتباط تولید SPF در سایر صنایع تولید کننده مواد غذایی از جمله دامپروری نیز رایج گردید. در سال ۱۹۹۰ اتحادیه ICES قوانین و مقرراتی جهت تولید میگوی SPF تنظیم و توسط آقای wyben و همکارانش در سال ۱۹۹۳ و با اعتبارات US Marine Shrimp Farming Program (USMSFP)و رعایت قوانین و مقررات اعلام شده اولین ذخیره میگوی SPF را در امریکا تولید نمودند. این قوانین تصریح می کند که فقط بیماریهایی که قابل شناسایی بوده و بطور اختصاصی موجب تلفات در میگو ها می شوند مورد توجه قرار گیرند.

تعریف واقعی میگوی SPF به معنی عاری بودن از هرگونه پاتوژن یا میکروارگانیسمی اختصاصی است که موجب مرگ و میر وتلفات در میگوها می‌شود. این وضعیت میگوها بسته به سطوح ایمنی زیستی و محیط جغرافیائی و گونه میگو متفاوت است. پاتوژنهائی که درلیست اختصاصی میگوهای SPF قرار میگیرند اولا باید با اطمینان قابل تشخیص باشند، ثانیا بتوان بصورت فیزیکی آنها را از سیستم تکثیر و پرورش جدا نموده و ثالثا بطور مشخص باعث تهدید و آسیب به صنعت تکثیر وپرورش شوند. به عنوان مثال برخی از گونه های ویبریو(Vibrio) میتوانند باعث بروز بیماری شده و به طور قابل ملاحظه ای در میگو ها قابل تشخیص بوده ، ولی آنها را نمیتوان

در لیست پاتوژن های میگوی SPF قرار داد زیرا این باکتری ها جزو فلور طبیعی میگو بوده ودر شرایط خاص بیماریزا میشوند.

میگوهای SPF تولیدی، به بیماریها مقاوم نبوده و با مفهوم Specific Pathogen Resistance (SPR) تفاوت داشته ولی میتوان میگوهای SPFرا به یک یا چند بیماری مقاوم نموده و میگوی SPRتولید نمود. همچنین میگوی SPF را میتوان در یک زمان به یک یا چند بیماری مقاوم نموده و میگوی SPF/SPRتولید نمود. مفهوم SPT (Specific Pathogen Tolerance) نیز به میگو هائی اطلاق میشود که از نظر ژنتیکی به یک بیماری مقاوم باشند. همچنین ویژگیهای میگوهای SPF,مادرزادی منتقل نشده و ارثی نمی باشد و این خصوصیات از مادر به فرزندان منتقل نمی‌شود. مفهوم SPF بسته به محل پرورش و تولید میگو و سطو ح ایمنی زیستی متفاوت بوده و اگر در شرایط ویژه تولیدی که اصطلاحا(NBC) Nuclear Breeding Center می نامند تولید شوند آنها را SPF گویند. در شرایطNBCمیگوها برای دو سال تحت مراقبت بودند و برای کلیه بیماریهای خاص غربالگری شدند. اگر میگوها را به سطوح ایمنی زیستی متوسط منتقل نمائیم آنها را میگوهای با سلامتی بالا یا High Health (HH) می نامند. SPF بودن میگو به حضور یا عدم حضور پاتوژنهای خاص در میگو بستگی داشته و این وضعیت بستگی به درجه ایمنی زیستی تغییر می‌کند بنابراین پرورش دهندگانی که بدنبال خرید میگوی SPF می باشند لازم است این سوالات را از تولیدکنندگان میگوی SPFکنند (افشارنسب b، ۱۳۸۶)

- چه پاتوژن هائی در لیست تولید میگوی SPFاز طرف تولید کنندگان قرار دارد که آنها را حذف می‌کنند؟
- چه ابزار تشخیصی برای شناخت پاتوژن ها در مرکز تولید SPF برای غربالگری استفاده شده است ؟
- در چه زمانی آخرین غربالگری و توسط چه کسی انجام شده است ؟
- تولید کننده میگوی SPF از چه برنامه مراقبتی برای پایش ذخایر SPF استفاده نموده است ؟
- تاریخچه بیماری در تاسیسات تولید SPF چگونه است؟
- همچنین خریداران میگوی SPF باید یک گواهی از غربالگری مهمترین بیماری ها را نیز دریافت دارند .

در ایران صنعت میگوی پرورشی کشور با قریب ۶۵۸ میلیارد ریال سرمایه گذاری مستقیم دولتی در تأسیساتی زیر بنایی و ۳۶۷۷/۵ میلیارد ریال سرمایه گذاری بخش خصوص جهت احداث ۵ حلقه صنعت میگو (مولد سازی و تکثیر، پرورش، تولید غذا، فرآوری و صادرات) که بیش از ۱۲۴۸/۵ میلیارد ریال آن با مشارکت بانک ها بوده از سال ۱۳۷۰ فعالیت خود را آغاز نمود. میزان تولید میگوی پرورشی در جمهوری اسلامی ایران از ۱۳۶ تن در سال ۱۳۷۴ به حداکثر ۸،۸۸۹ تن در سال۱۳۸۳ رسید و سپس بدلیل بروز بیماری لکه سفید که در سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر رخ داد میزان تولید میگوی پرورشی به ۳،۵۷۷ کاهش یافت. همزمان با بروز بیماری لکه سفید در استان بوشهر، میگوی وانامی توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران به صنعت آبزی پروری کشور معرفی گردید و از سال ۱۳۸۵ به بعد صنعت تولید میگوی پرورشی مجددا به رشد نسبی خود ادامه داد به نحوی که میزان تولید آن در سال ۱۳۹۲ به حدود ۱۲۰۰۰ تن رسید.

روند تولید میگوی پرورشی در کشور و مقایسه آن با اهداف کمی تولید در برنامه پنجساله پنجم نشان می دهد که علیرغم دارا بودن شرایط آب و هوایی، اقتصادی ، اجتماعی و فرهنگی مناسب و نقش ارزنده این صنعت در اشتغالزایی، بهره برداری از آب دریا و اراضی شوره زار (با درجه خاک ۶)، تولید و صادرات، کاهش مهاجرت روستاییان، کاهش فشار صید ذخایر دریایی و همچنین ارتقای شاخصهای کمی و کیفی تولید میگوی پرورشی در طول برنامه سوم و چهارم توسعه، اهداف کمی تولید و توسعه متوازن زیر ساخت هائی که در برنامه پیش بینی گردیده بود، تحقق نیافته است. علیرغم موارد فوق به دلیل مشکلاتی اعم از مناسبات و شرایط اقتصادی، نوپا بودن صنعت و مشکلات چرخه تولید، عوامل و شرایط منطقه ای، و محدویت ها و موانع ساختار سازمانی ، صنعت میگوی پرورشی رشد متوازن ننموده و انتظارات را مطابق پیش بینی ها برآورده نساخته و متأسفانه موجب بروز خسارت و ورشکستگی عده کثیری از شاغلین این بخش گردیده است. در حال حاضر بخش کوچکی از این صنعت ارزنده به فعالیت خود ادامه می دهد، که حمایت دولت برای احیای این صنعت لازم و ضروری است. با توجه به مشکلاتی که در صنعت تولید میگوی پرورشی وجود داشت از سال ۱۳۸۶ تهیه "برنامه راهبردی میگو" در اولویت کاری موسسه تحقیقات شیلات ایران قرار گرفت. برنامه راهبردی میگو توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران، و با همکاری دستگاههای اجرایی مانند سازمان شیلات ایران، سازمان دامپزشکی کشور، محیط زیست و مشارکت فعالین صنعت پرورش میگو تهیه گردید. یکی از مهمترین حلقه های تکمیلی در برنامه راهبردی میگو تولید میگوی عاری از بیماری خاص Specific Pathogen Free(SPF)می‌باشد. در برنامه راهبردی میگو برای دستیابی به تولید اقتصادی میگوی پرورشی و توسعه پایدار صنعت پرورش میگو می بایست همه حلقه های زنجیره تولید را در نظر گرفت با اینجال مهمترین راهبرد های پیشنهادی عبارتند(متین فر، ۱۳۸۶) از:

۱- توجه به بازار داخل: با توجه به افت قیمت جهانی میگو،افزایش هزینه ها، اشباع شدن بازارهای جهانی توسط کشور های تایلند و چین، و سیاست های داخلی در ثابت نگه داشتن نرخ ارز و افزایش ارزش ریال در مقابل دلار ضرورت دارد تولید میگوی پرورشی را با هدف توجه به بازار داخل تنظیم نمود. هر چند با افزایش جمعیت جهان و نیاز به غذا، در کنار توجه به بازار داخلی می توان در آینده با هدف صادرات به توسعه زیر ساخت های صنعت پرداخت. با توجه به جمعیت ۷۵ میلیونی کشور ظرفیت بازار داخلی به مراتب بیشتر از تولید فعلی میگو است. توجه ویژه به بازار داخلی و تشویق جامعه به منظور افزایش مصرف میگوی پرورشی، انگیزه لازم را در چرخه های مختلف تولید فراهم می آورد. استفاده از میگوی پرورشی در سامانه های عمومی مصرف مواد غذائی در داخل کشور از دیگر راهبرد های کوتاه مدت جهت آشنائی و تغییر ذائقه هموطنان است. بالطبع موضوع بازاریابی داخلی و خارجی محصول که ظاهرا آخرین حلقه زنجیره تولید محسوب می گردد، بایستی به عنوان هدف اول و راهبردی در برنامه ریزی تولید میگوی پرورشی مورد تاکید باشد.

۲- حمایت از تشکل ها و اتحادیه های غیر دولتی: مجموعه عوامل دست اندرکار تولید میگوی پرورشی که وظایف نظارتی، حمایتی یا راهبردی را عهده دارند، نیاز به تحول در سیاست گذاری و برنامه ریزی دارند. تشکل ها و اتحادیه های غیر دولتی بایستی مسئولیت های بیشتری را پذیرفته و خود سکان هدایت و برنامه ریزی تولید را در دست گرفته، و در مرحله اول تولید کنندگان فعال را شناسایی کرده و مورد حمایت جدی قرار داده و تکلیف سایت و مزارع غیر فعال را روشن نمایند. تشویق و حمایت از گروهها و تشکل های متمرکز تکثیر، پرورش، ... و همچنین حمایت از ایجاد سامانه های متمرکز تولید تا فروش میگو توسط تشکل های مزرعه داران خرد و تولید کننده های بزرگ (کنسرسیوم های تولیدی) از راهبرد هائی است که کشور های پیشرو صنعت میگوی پرورشی جهان را به تولید های بالای ۵۰۰ هزار تن رسانده است.

گرچه حل مشکلات بجامانده از گذشته یکی از نیازهای عمده تولید میگوی پرورشی است، اما ایجاد زمینه تولید اقتصادی میتواند دیدگاههای منفی موجود را تغییر داد و شرایط مشارکت بیشتر را فراهم آورد. بهبود ساختار سازمانی و ارتقاء کارآمدی مدیریت در بخش های مختلف دولتی و غیر دولتی از اهداف سازنده و تاثیرگذار بر بهره برداری بهینه از پتانسیل موجود می باشد. با توجه به توان تحقیقاتی کشور و سطح دانش فنی و ظرفیتهای موجود، به منظور ایجاد رویکرد و فصل جدیدی در این صنعت مهم، دو برنامه کوتاه مدت و میان مدت در بخش های ۵ گانه صنعت میگو بطور همزمان قابل اجرا می باشد.

الف – در برنامه کوتاه مدت ضرورت دارد در یک دوره سه ساله تدابیر لازم جهت زیر کشت قرار دادن تمامی ۹۷۱۰ هکتار استخر آماده به کار موجود (با ظرفیت تولید تقریبی ۲۵ هزار تن میگو) اتخاذ گردد. با توجه به آماده بوده ۱۶۱۵۲ هکتار مزارعی که تأسیسات زیر بنایی آن آماده می باشد و ۳۹۳۰ هکتار مزارعی که در حال حاضر عملیات ساخت آن در حال انجام است (۲۷۵۰ هکتار مزارع مفید) می توان ۱۸۹۰۲ هکتار مفید را با ظرفیت تولید ۵۰ هزار تن میگو زیر کشت برد.

ب- بر اساس راهبرد های پیشنهادی "برنامه راهبردی میگو" جهت دستیابی به اهداف برنامه های توسعه ای کشور و سند چشم انداز ایران ۱۴۰۴ و بکارگیری تمام ظرفیت اراضی قابل کشت میگو در کشور، ضرورت دارد سیاست ارتقاء شاخص های کمی و کیفی میگوی پرورشی با هدف افزایش سهم آبزیان در امنیت غذائی جامعه محور تولید قرار گیرد. برای اجرائی نمودن این سیاست راهبرد های زیادی ارائه گردیده که در صدر آنها تولید مولدین عاری از بیماری (SPF) می‌باشد. بنابراین در راستای این موضوع طرح کلان میگوی عاری از بیماری خاص با اهداف ذیل تعریف گردید:

- دستیابی به دانش فنی تولید میگوی عاری ازبیماری خاص (SPF)
- ذخیره سازی مناسب از میگوی عاری از پاتوژنهای خاص در کشور
- ایجاد پایلوت تحقیقاتی به منظور پایش دائمی میگوی SPFدر کشور
- برطرف نمودن مشکلات ناشی از تلاقی نژادهای یکسان یا هم خونی در گونه های پرورشی

- ایجاد بانک ژن میگوهای بومی کشورو پاتوژنها
- ارائه آموزشهای کاربردی تخصصی و صدور گواهی آموزش برای حداقل ۵۰ نفر از بهره‌برداران
- ترویج و انتقال یافته های حاصل از اجرای طرح

برنامه‌ریزی برای تولید انبوه دستاوردهای حاصل از طرح (تولید حداقل ۵۰ هزارتن میگو در سال)

دراین طرح که بر روی گونه وانامی وارداتی متمرکز شده است میتواند زمینه برای تولید در سایر گونه های بومی از جمله میگوی ببری سبز و میگوی سفید هندی مهیا نماید. مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مراکز تکثیر با گونه های بومی از جمله سفید هندی متفاوت میباشد (جدول ۹)

جدول ۹: مهمترین عوامل بیماریزای گونه‌های بومی

انگل	قارچ	باکتری	ویروس
1.Vorticella 2.Zothamnium	1.Laginidium 2.Sirolpidum	1.Vibrio 2.Fouling bacteria	1.BP 2.IHHNV 3.HPV 4.REO 5.RPS 6.TSV 7.LOVV

جدول ۱۰: مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مزارع پرورشی

انگل	باکتری	ویروس
1.Nematods 2.Microsporidiae	1.Vibrio 2.NHP	1.BP 2.IHHNV 3.HPV 4.LOVV 5.TSV 6.IMNV 7.WSSV

بااین حال باید در خصوص تولید گونه‌های بومی عاری از بیماری با توجه به تواید در مقیاس تجار یبرای پرورش میگو تصمصم گیری نمود. در این زمینه مهمترین پیشنهادات عبارتند از :

- بررسی امکان تولید میگوی عاری از بیماری خاص از گونه های بومی
- استانداردسازی روشهای ایمنی زیستی درایران
- تهیه پروتکلهای مشخص در زمینه اصلاح نژاد برای گونه های بومی
- ارسال نمونه های تولیدی در پایلوت تحقیقاتی به مراکز پرورش میگو وردیابی وضعیت آنها
- تلاش در جهت آموزش فراگیران مراکز تکثیر در خصوص تولید میگوهای با سلامت بالا

منابع

- افشار نسبa م.، ۱۳۸۶. بیماریهای ویروسی میگو، انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، مدیریت اطلاعات علمی، ۲۱۰ صفحه.
- افشارنسبb م،۱۳۸۶. روشهای تشخیص بیماریهای میگو، انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، مدیریت اطلاعات علمی، ۱۸۰ صفحه
- افشارنسب ،م، دشتیان نسب،ع،قره وی،ب،مرتضائی،س وعابدیان،ا.۱۳۸۸.طرح ملی بهداشت و بیماریهای مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۳۸۸
- سالنامه آماری شیلات ایران.۱۳۸۶. سازمان شیلات ایران. معاونت توسعه نیروی انسانی. ۱۳۸۶

- Alday de Graindorge, V., Flegel, T.W. 1999. Diagnosis of Shrimp Diseases with Emphasis on the Black Tiger Prawn Penaeus monodon. Interactive CD ROM. Multimedia Asia, Bangkok.
- Anderson I, Shariff M, Nash G, Nash, M.1987. Mortalities of juvenile shrimp Penaeus monodon, associated with Penaeus monodon baculovirus, cytoplasmic reo-like virus,and rickettsial and bacterial infections, from Malaysian brackishwater ponds. Asian Fish Sci 1:47–64.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner.1984. IHHN virus: infectivity and pathogenecity studies in Penaeus stylirostris and Penaeus vannamei. Aquaculture 38: 185-194.
- Bell, T.A. and D. V. Lightner .1987. IHHN Disease of Penaeus stylirostris: effects of shrimp size on disease expression. J. Fish Dis. 10: 165-70.
- Bonami JR, and Pappalardo R.1980. Rickettsial infection in marine crustacea. Experientia 36:180–181.
- Bonami, J.R., D. V. Lightner, R. M. Redman and B. T. Poulos.1992. Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathologyical changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. Dis. Aquat. Org.14: 145-52.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong and C. Chantanachooklin.1993. Non-occluded baculo- like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (Penaeus monodon). Gyobyo Kenkyu 28 (3): 103-109.
- Brock, J.A., and D.V. Lightner. 1990. Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. pp. 245-349. In: O. Kinne (ed.), Diseases of Marine Animals, Vol. III. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.
- Brock, J.A. 1992. Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp. pp. 209-232. In: W. Fulks and K. Main (eds.), Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Published by The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, HI.
- Brock, J.A., and K. Main. 1994. A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured Penaeus vannamei. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, .O. Box 25280, Honolulu, HI. 241.
- Brock, J.A., D. V. Lightner and T. A. Bell. 1983. A review of four virus (BP, MBV, BMN and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. In International Council for the Exploration of the Sea. Hawaii: The Oceanic Institute, pp. 1-17.
- Chen, S.N., P.S. Chang, G. H. Kou.1992. Infection route and eradication of Penaeus monodon Baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, Penaeus monodon. In W. Fulks, and K.L. Main (eds.) Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Hawaii: The Oceanic Institute, pp. 177-184.
- Chen, FR., Liu, PC., Lee, KK. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by Vibrio alginolyticus strains in Kurama Prawn Penaeus japonicus. Zool Naturforsch 55:94–99.
- Couch, J.A.1974. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp:ultrastuctures, prevalence, and enhancement. J. Invertebr. Pathol. 24: 311-331.
- Couch, J.A. 1983. Diseases caused by protozoa. pp. 79-111. In: A.J. Provenzano, Jr. (ed.), The Biology of Crustacea, Vol. 6. Academic Press, N.Y.
- Cowley,J.A., Mcculloch, R,J., Rajendran, K,V., Cadogan, L.C., Spann, K.M & Walker, P.J.2005. RT-nested PCR detection of Mourilyan virus in Australian Penaeus monodonand its tissue distribution in healthy and moribund prawns. Diseases of Aquatic Organisms, 66, 91–104.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A.2004. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam.

- Fegan, D.F., T.W. Flegel, S. Sriurairatana and M. Waiyakruttha.1991. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in Penaeus monodon in southern Thailand. Aquaculture 96: 205-217.
- Flegel, T.W., D.F. Fegan, S. Kongsom, S. Vuthikornudomkit, S. Sriurairatana, S. Boonyaratpalin, C. Chantanachookhin, J.E. Vickers, and O.D. MacDonald. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. pp. 57-112. In: W. Fulks and K.L. Main (eds.), Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States, Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii.
- Flegel, T.W., Sriurairatana, S., Morrison, D.J., Waiyakrutha, N.1997. Penaeus monodon captured broodstock surveyed for yellow-head virus and other pathogens by electron microscopy.In: Flegel, T.W., Menasveta, P., Paisarnrat, S. (Eds.), Shrimp Biotechnology in Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 37–43.
- Flegel, T.W., Nielsen, L., Thamavit, V., Kongtim, S., Pasharawipas, T.2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivatedshrimp at harvest. Aquaculture 240, 55–68.
- Flegel, T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258, 1-33.
- Frelier, P.F., Sis, R.F., Bell, T.A. and D.H. Lewis. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing Hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (Penaeus vannamei) cultured in Texas. Veterinary Pathology 29: 269-277.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture 253, 105-113.
- Gopalakrishnan, A.and Parida,A. 2005.Incidence of loose shell syndrome disease of the shrimp Penaeus monodon and its impact in the grow-out culture. CURRENT SCIENCE, VOL. 88, NO. 7, 10 APRIL 2005.
- Hasson, K.W., D.V. Lightner, B.T. Pouloss, R.M. Redman, B.L. White, J.A. Brock and J.R. Bonami.1995. Taura syndrome in Penaeus vannamei: demonstration of a viral etiology. Dis. Aquat. Org. 23: 115-129.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Mohney, L.L., Redman, R.M., Poulos,B.T., White, B.M. 1999. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp Penaeus vannamei. Dis. Aquat. Org. 36, 81–93.
- Horowitz, A., Horowitz, S., 2001. Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 199-218 pp.
- Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R., 2006. Characterization of *Vibrio spp*. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). J. World Aquac. Soc. 37, 523-532.
- Johnson, S.K. 1990. Handbook of shrimp diseases. Texas A&M University Sea Grant College Program. Galveston. TX. TAMU-SG-90-601. 25 pg.
- Johnson, P.T. and D.V. Lightner.1988. Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut infecting species. Dis. Aquat. Org. 4: 123-141.
- Krol RM, Hawkins WE, Overstreet RM. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured.
- Liao, I.C., M. Su and C.F. Chang .1992. Diseases of Penaeus monodon in Taiwan: a review from 1977 to 1991. In W. Fulks, and K.L. Main (eds.) Proceding of workshop on Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Hawaii, April 27-30, 1992. The Oceanic Institute, pp. 113-138.
- Lightner, D.V., L.B. Colvin, C.Brend and Danold, D.A. 1977. Black death, a disease syndrome related to a dietary deficiency of ascorbic acid. Proc. World Mariculture Soc. 8:611.
- Lightner, D.V. 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp.0. In: J.P. McVey (ed.), CRC Handbook of Mariculture. Volume 1. Crustacean Aquaculture. CRC ress, Boca Raton, FL.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, R.R. Williams, J.P.M. Mohney, T.A. Bell and J.A. Brock.1985. Recent advances in penaeid virus disease investigations. J. World Maricul. Soc. 16: 267-274.
- Lightner, D.V. 1988 Diseases of penaeid shrimp. In C.J. Sindermann, and D.V. Lightner (eds.) Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture.Amsterdam: Elsevier Science Publishing. pp. 8-37.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of penaeid shrimp. pp. 393-486. In: J.P. McVey (ed.) CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture. Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Mari, J.L., Bonami, J.R., Shariff, M., 1994. Distinction of HPV-type virus in Penaeus chinensis and Macrobrachium rosenbergii using a DNA probe. Asian Fish. Sci. 7, 267–272.
- Lightner, D.V., and R.M. Redman. 1986. A probable Mycobacterium sp. infection of the marine shrimp Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda). J. Fish Diseases 9: 357-369.

- Lightner, D.V. 1988. Diseases of Penaeid Shrimp. In: C.J. Sindermann and D.V. Lightner (eds.), Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Second Edition. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, pp. 8-133.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1991. Hosts, geographic range and diagnostic procedures for the penaeid virus diseases of concern to shrimp culturists in the Americas. In: DeLoach, P., Dugherty,W.J.,Davidson, M.A. (Eds.), Frontiers of Shrimp Research. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 173–196.
- Lightner, D.V. and R.M. Redman. 1992. An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. Aquaculture 122: 9-18.
- Lightner, D.V., 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid *Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.*
- Lightner, D. V., Pantoja, C. R., Poulos, B. T., Tang, K. F. J., Redman,R. M., Pasos de Andrade, T. & Bonami, J. R. 2004. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. Glob Aquac Advocate 7:85.
- Limsuwan, C., 1991. Handbook for cultivation of black tiger prawns.Tansetakit Co. Ltd., 222 Tansetakit Building, Wipawadee-Rangsit Road, Ladyaw, Chatujak, Bangkok, 202 pp.
- Linda M. Nunan1, Bonnie Poulos, Rita Redman1, Marc Le Groumellec2, Donald V. Lightner.2003. Molecular detection methods developed for a systemic rickettsia-like bacterium (RLB) in Penaeusmonodon (Decapoda: Crustacea).DAO Vol. 53: 15–23, 2003.
- Loy, J.K., Frelier, P.F., Varner, P. and J.W. Templeton. 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing Hepatopancreatitis in cultured Penaeus vannamei from Texas and Peru by polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms. 25: 117-122.
- Lu, Y. and C.L. Philip.1994. Viral structural proteins and genome analyses of the rabdovirus of penaeid shrimp (RPS). Dis. Aquat. Org.19: 187-192.
- Mayo, M.A.2005. Changes to virus taxonomy. Arch. Virol. 150,189–198.
- Mari, J. and J.R. Bonami.1988. W2 infection of the crustacean Carcinus mediterraneus a reovirus disease. J. General Virology 69: 561-571.
- MPEDA/NACA, *Shrimp Health Management Extension Manual*, MPEDA, Cochin, 2003.
- Nash, G.L., Akarajamorn, A., Withyachumnarnkul, B.1995.Histology and rapid haemocytic diagnosis of yellow-head disease in Penaeus monodon. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Diseases in Asian aquaculture, vol. II. Fish Health.
- Nielsen, L., Sang-oum, W., Cheevadhanarak, S., Flegel, T.W. 2005.Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. Dis. Aquat. Org. 63, 101–106.Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 89–98.
- Nunan, L.M., Lightner, D.V., Oduori, M.A., Gasparich, G.E., 2005. *Spiroplasma penaei sp nov*., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 2317-2322.
- OIE. 2003. Manual of Diagnostics Tests and Vaccines for Aquatic Animals. 4th Edn. Office International des Epizooties, Paris. (http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm)
- Overstreet, R.M. 1985. Some parasitological aspects of shrimp culture in the United States. pp. 117-121. In: W.J. Hargis, Jr. (ed.), Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean.NOAA Tech. Rep. NMFS 25.
- Owens, L. and J. S. Glazebrook, 1988. Microsporidian infections in commercial prawns from northern Australia. Australian J. Marine Freshwater Research 39: 301-305.Pacific white shrimp (Penaeus vannamei). J Invertebr Pathol 57:362–370.
- Owens, L., S. de Beer and J. Smith.1991. Lymphoidal parvovirus-like particles in Australian penaid prawn. Dis. Aqaut. Org. 11: 129-134.
- Pantoja, C.R., Lightner, D.V., 2001. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp by in situ hybridization at the electron microscope level. Dis. Aquat. Org. 44, 87–96.
- Poulos BT, Tang KF,Pantoja CR, Bonami JR, Lightner D.V.2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. J Gen Virol 87:987–996.
- Sano. T., T. Nishimura, H. Fukuda,T. Hayashida and K. Momoyama. 1984. Baculovirus mid-gut gland necrosis (BMN) of kuruma shrimp (Penaeus Japonicus) larvae in Japanese intensive culture systems. Helgolander Meeresunters 37: 255-264.
- Sellars, M.J., Keys, S.J., Cowley, J.A., Mcculloch, R.J. & Preston, N.P. 2005. Association of Mourilyan virus with mortalities in farm-reared Penaeus (Marsupenaeus) japonicustransferred to maturation tank systems. Aquaculture, 252, 242–247.
- Sindermann, C.J. 1990. Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish, Vol. 2, 2nd edition. Academic Press, New York.

- Van Hulten, M.C., Vlak, J.M. 2001. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. Virus Genes 22, 201–207.
- van Hulten, M.C.,Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K., Vlak, J.M. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology286, 7–22.
- Villasante-vega, F. and M.E. Puent.1993. A review of viral diseases of cultured shrimp. Preventive Veterinary Medicine 17: 271-282.
- Wang, Y.G., Lee, K.L., Najiah, M., Shariff, M., Hassan, M.D. 2000. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp Penaeus monodon and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. Dis. Aquat. Org. 41, 9–18.
- Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W.1996. DNA fragment of Penaeus monodon baculovirus PmNOBIIgives positive in situ hybridization with viral infections in six penaeid shrimp species. Aquaculture 143, 23–32.
- Wyban J.,Swingle,J.,Sweeney ,J.N.,pruder ,G.D.,1992. Development and commercial performance of high helath shrimp from SPF broodstock penaeus vannamei . World Aquculture Socity pp.254-
- Wyban J.,2003 . Penaeuse vannamei seedstock production recent development in Asia.Global Aquaculture Advocate .December 2003.pp.78-79
- Wyban J.,2007.Thailands shrimp revolution . AQUA culture AsiaPacific Magazine . May/June 2007 .pp.16-17
- Yuvabenjapol, E., 2006. Sub-carapace Watery Sac Syndrome**,** Shrimp news internati

Abstract
The production of specific pathogen free (SPF) of native shrimp is the first step for sustainable shrimp culture in Iran. This concept needs better understanding of health managmet and biosecurity in shrimp broodstock production for produc 25000MT in the five programe and development of Iran. In SPF center the main pathogen consist of viruses, bacteria and fungei that will be exclude the shrimp SPF.Theses pathogen divided to three categories, the first category consist of highly virlent pathogen such as white spot syndrome virus, Tura syndrome virus, Infection myonecrosis virus, infection hypodermal and hematopoietic virus. The second category are hepatopancratuc parvo like virus, and vibrio bacteria, Necrotizing hepatopnacratits, microsporidia and haplosporidia and the third category consist gregarines with light virlent.In the high level project that conducted in Iran between 2011 untill now about 8000 brodstoock collectd from farm culture in bousher province during September and October of 2012 from high health and Moluky stock. All shrimp tested for viruse, bacteria and fingai and the results showed the shrimp wrer free of viruse and bacterial pathogen. During the study one sample showed necrotizing hepatopancreatitis and we removed from the center.
Key word: Survillence, disease, identification.SPF

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE – Shrimp Researsh Center

---

Project Title : Screening of pathological agent and recognize of disease in shrimp specific pathogen free (SPF) production
Approved Number: 14-80-12-9103-9101 k
Author: Mohammad Afsharnasab
Project leader Researcher : Mohammad Afsharnasab
Collaborator(s) : Aghil Dashtyannasab, Maryam mirbakhsh,Mohmmad reza Mehrabi,Shapoor Kakolaki
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 1 Years & 7 Months
Publisher : ***Iranian Fisheries Science Research Institute***
Date of publishing : 2015
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

Project Title :

Screening of pathological agent and recognize of disease in shrimp specific pathogen free (SPF) production

Project leader Researcher :
Mohammad Afsharnasab

Register NO.
46061