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

عنوان:

بررسی وضعیت بهداشتی مولدین میگوی وانامی تولید شده در استخرهای خاکی و مقایسه آن با مولدین تولیدی در تانکهای فایبرگلاس یا بتونی

مجری :
محمد افشارنسب

شماره ثبت
٤٦٠٦٥

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

عنوان پروژه : بررسی وضعیت بهداشتی مولدین میگوی وانامی تولید شده در استخرهای خاکی و مقایسه آن با مولدین تولیدی در تانکهای فایبرگلاس یا بتونی
شماره مصوب پروژه : ۹۳۱۰۷-۱۲-۸۰-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمد افشارنسب
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد افشارنسب
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : بابک قائد نیا،محمدرضا مهرابی،وحید یگانه،علی نظاری، عقیل دشتیان نسب، مریم میربخش، شاپور کاکولکی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) :-
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) :-
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع :۹۳/۱/۱
مدت اجرا : ٦ 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»

پروژه : بررسی وضعیت بهداشتی مولدین میگوی وانامی تولید شده در استخرهای خاکی و مقایسه آن با مولدین تولیدی در تانکهای فایبرگلاس یا بتونی

کد مصوب :۹۳۱۰۷-۱۲-۸۰-۲

شماره ثبت (فروست) : ٤٦٠٦٥ تاریخ : ۹۳/۸/٤

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد افشارنسب دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

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

در زمان اجرای پروژه، 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-مقدمه ۲
۱-۲- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در ایران ۵
۱-۳-اهمیت مولدین در صنعت میگوی پرورشی ۸
۱-۴- مهمترین اهداف این پژوهش ۹
۱-۵-تاریخچه بررسی بهداشتی مولدین میگو در ایران ۹
۱-۶- تاریخچه تولید مولدین با سلامت بالا در دنیا ۱۱
۱-۷- بیماری های ویروسی ۱۱
۱-۸- بیماری لکه سفید میگو(WSD) ۱۲
۱-۹- بیماری نکروز عفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز (IHHNV) ۱۸
۱-۱۰- بیماری سر زرد (Yellow – head disease) ۲۳
۱-۱۱- سندرم تورآ (TSV) ۲۶
۱-۱۲- بیماری مونودون با کلوویروس (MBV) ۲۹
۱-۱۳- بیماری شبه پارو ویروسی هپاتوپانکراس (HPV) ۳۲
۱-۱۴- بیماریهای باکتریایی ۳۵
۱-۱۵- بیماری ویبریوزیس ۳۵
۱-۱۶- بیماریهای باکتریهای رشته ای ۳۷
۱-۱۷- بیماری باکتریایی رشته ای ۳۸
۱-۱۸- بیماریهای قارچی ۳۹
۱-۱۹- بیماری میکوز لاروی یا بیماری لاژنیدیوم ۳۹
۱-۲۰- بیمارهای انگلی ۴۱
۲- مواد و روش ها ۴۴
۲-۱-جمع آوری نمونه ها ۴۴
۲-۲-آزمایشهای باکتری شناسی ۴۶
۲-۳-آزمایشهای قارچ شناسی ۴۸

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۴-۲-آزمایشهای ویروس شناسی ۴۹
۵-۲-اجرای مطالعات PCR ۵۴
۳-نتایج ۵۷
۱-۳-نتایج حاصل از آزمایشات باکتری شناسی ۵۷
۲-۳- نتایج قارچ شناسی ۶۰
۳-۳- نتایج انگل شناسی ۶۳
۴-۳-نتایج حاصل از آزمایش PCR ۶۵
۵-۳- نتایج حاصل از بررسی آسیب شناسی ۶۵
۴-بحث و نتیجه گیری ۶۷
پیشنهادها ۷۲
منابع ۷۶
چکیده انگلیسی ۸۰

چکیده

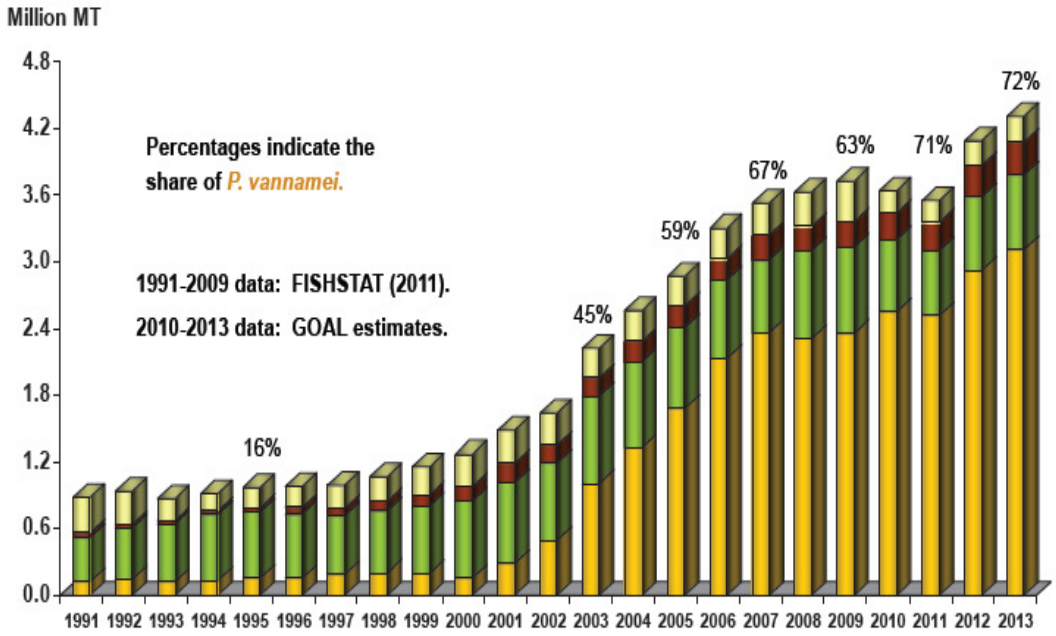
به منظور بررسی وضعیت بهداشت و بیماریهای مولدین میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) نگهداری شده در مراکز تکثیر و پرورش استان بوشهر از فروردین ماه ۱۳۹۳ لغایت خرداد ۱۳۹۳ تعداد ۱۰۰ عدد میگوی مولد از محل استخرهای پرروشی و ۱۰۰ میگو از محل تانکهای بتونی و فایبر گلاس از محل سالنهای هچری جمع آوری گردید. ابتدا ضمن ثبت علائم بالینی نمونه های جمع آوری شده در فرمهای مربوطه و انتقال آنها به آزمایشگاه بهداشت و بیماریهای پژوهشکده میگوی کشور، در شرایط کاملا بهداشتی از نمونه ها همولنف استخراج و برای آزمایشات باکتری شناسی و قارچ شناسی موردآزمایش قرار دادیم. از اندام آبشش و هپاتوپانکراس نیز برای آزمایش باکتری شناسی و قارچ شناسی نمونه برداری نمودیم. سپس بخشی از اندام حرکتی میگو ها را در الکل اتیلیک ۷۵٪ قرار داده و برای آزمایشات PCR و به منظور ردیابی ویروسهای مهم TSV,WSSV,IHHNV,HPV,MBV,YHD,IMNV و NHP مورد استفاده قرار دادیم.در مرحله بعد با تزریق محلول دیویدسون به بخشهای مختلف بدن میگوها بالاخص اندام هپاتوپانکراس و بندهای سوم و ششم بدن آنها رادر محلول دیویدسون قرار داده و برای آزمایشات آسیب شناسی مورد مطالعه قرار دادیم. بطور کلی در این مطالعه ۱۰ جنس و گونه باکتری بخصوص *V.harveyii, V.parahaemolyticus, V.anguillarum, V.vulnificus, V.mimicus, V.alginolyticus plesiomonas shigelloides V.proteolyticus, V.damsela,V.nereis,* و۶ گونه قارچ بخصوص آسپرژیلوس نایجر ، فومیگاتوس و فلاووس و ۲ جنس انگل ورتیسلا و زئوتامنیوم از مولدین پرورشی در اسخرهای خاکی و ۵ گونه باکتری از مولدین نمونه برداری شده از تانکهای بتونی جداسازی گردید. مهمترین باکتریهایی که از آبشش میگوهای مستقر در تانکها جداسازی گردید *V.alginolyticus, V.proteolyticus* ، *V.parahaemolyticus* ، *V. damsela* ، *V.mimicus* و می‌باشد ولی از هپاتوپانکراس فقط دو باکتری *V.mimicus* و *P. shigelloids* جداسازی و شناسائی شد. همچنین در این بررسی در این مطالعه همچنین ۱۰ گونه قارچی بخصوص پنی سیلیوم ، آسپرژیوس نیجر ، آسپرژیوس فلاووس ، آسپرژیوس فومیگاتوس ، اولوکلادیوم ، اکرومونیوم ، موکور ، ریزوپوس ، کلادوسپوریوم ، مخمر و آلترناریا در مولدین استخرهای خاکی و ۵ گونه در مولدین نمونه برداری شده در تانکهای فایبرگلاس شناسائی گردید. همچنین ۶ جنس انگل بخصوص زئوتامنیوم، اپیستیلیس، ورتیسلا،آسینتا، آپوستوم و افلوتا در استخرهای خاکی و سه نمونه در مولدین حاصل از تانکها شناسایی گردیدند. در آسیب شناسی نیز ضمن مشاهده آثاری از آلودگی باکتریهای ویبریو دراندامهای مختلف، مورد مشخص آلودگی دیگر درآسیب شناسی مولدین مشاهده نگردید بررسی ویروسی با PCR نیز مولدین را فاقد هرگونهآلودگی ویروسی نشان داد. برای اطمینان از سلامت کامل میگوهای مولد در صنعت تلاش در جهت بهبود کیفیت و تولید مولدین با سلامت بالا و استقرار کامل سیستم ایمنی زیستی که لازمه ایجاد صنعت میگوی عار ی از بیماری ضروری است.

کلمات کلیدی: میگوی مولد، بهداشت، بیماری ، آسیب شناسی، PCR

۱-کلیات

۱-۱-مقدمه

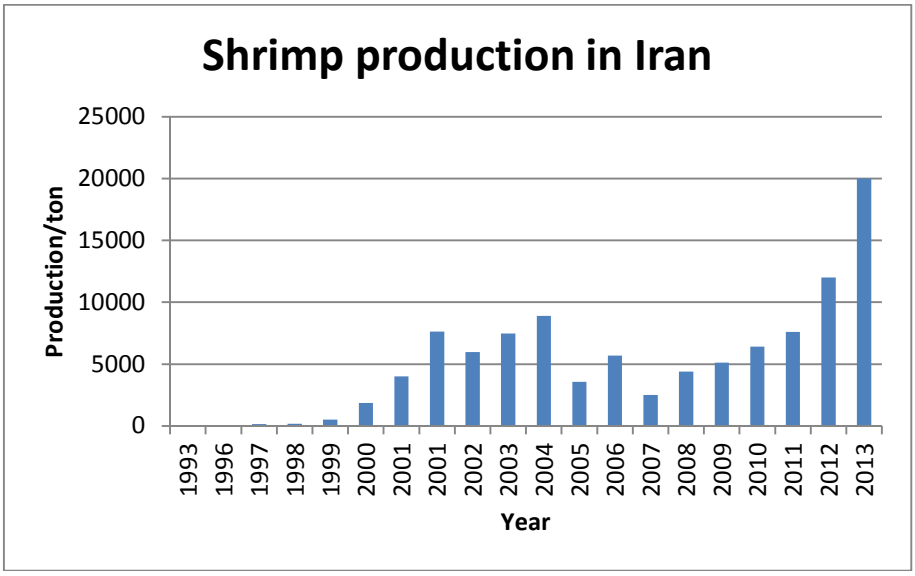
پرورش میگو در دنیا دارای سابقه نسبتا" طولانی است و پرورش تجاری آن به سالهای نخست دهه ۱۹۷۰ میلادی و به کشور ژاپن برمی‌گردد. تکثیر مصنوعی میگو برای نخستین بار توسط Hudinage انجام گرفته و ایشان در سال ۱۹۴۲ میلادی توانست لارو میگوی پنئوس ژاپونیکوس را پرورش داده و به مرحله پست لاروی برساند(صدیق مروستی،۱۳۷۰). هم اکنون پرورش میگو در دنیا رشد فزاینده ائی یافته و در سال ۲۰۱۳ پیش بینی می‌شود که تولید میگو به رقم ۴/۲ میلیون تن برسد (تصویر۱- ۱). دراین میان سهم میگوی وانامی به حدود ۷۲٪ میرسد (Valderrama and Anderson, 2011).



نمودار ۱-۱: تولید میگوی پرورشی تاسال ۲۰۱۲ و پیش بینی تا سال ۲۰۱۳ دردنیا

در این میان تولید میگودر ایران تا سال ۲۰۱۱میلادی یا ۱۳۹۱ خورشیدی بالغ بر ۱۲ هزارتن بوده و پیش بینی میشود در سال ۲۰۱۳ میلادی مطابق با ۱۳۹۲ خورشیدی به رقم ۲۰ هزارتن برسد (تصویر۲-۱).

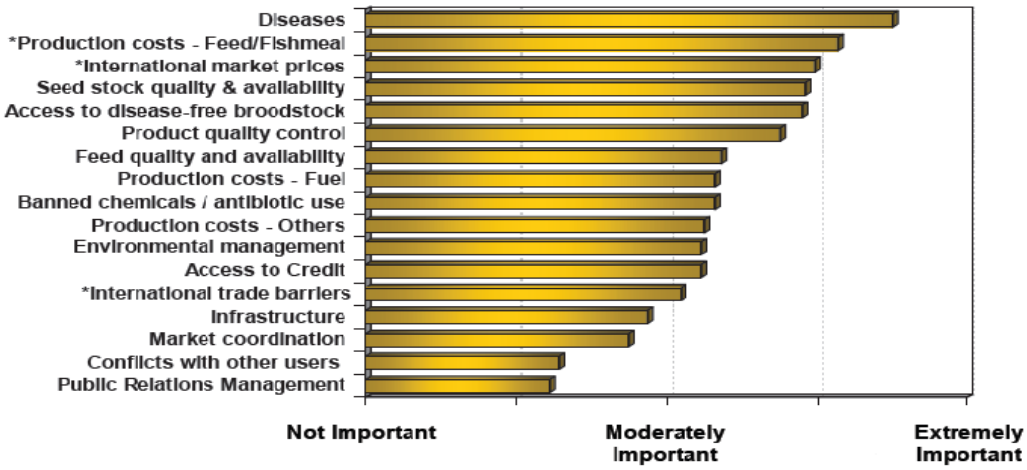
براساس گزارش ارائه شده توسط Valderrama و Anderson (۲۰۱۱) از مهمترین چالشهای پرورش میگو موضوع بیماریها بوده (تصویر۳-۱) و سالیانه از ناحیه بیماریهای میگو بالغ بر ۲۲٪ از میگوی تولیدی در دنیا از بین رفته که رقمی معادل ۶ میلیارد دلار سالیانه به این صنعت خسارت وارد می‌شود.



نمودار ۲-۱: میانگین تولید میگو درایران در سال ۱۳۹۱و پیش بینی در سال ۱۳۹۲

برخی از خسارتهای تخمینی وارده به کشورهای آسیایی در اثر بیماریها عبارتند از :

- در چین در سال ۱۹۹۳ بالغ بر ۲۵۰ میلیون دلار ناشی از ، از بین رفتن ۱۲۰۰۰۰ تن از تولیدات گونه های میگوی چینی، ژاپونیکوس و ببری سبز بر اثر بروز بیماری لکه سفید خسارت وارده شده و در سال ۲۰۰۲ نیز میزان کل خسارات اقتصادی ناشی از بروز تمامی بیماریهای میگو در این کشور به ۴۰۰ میلیون دلار رسیده است (فائو، ۱۳۸۶) .
- در ویتنام در سال ۱۹۹۳ بیماریهای مونودون باکلوویروس، بیماری لکه سفید و سرزرد حدود ۱۰۰ میلیون دلار به صنعت پرورش میگو خسارات وارد کرده است (Bondad –Reantaso et al., 2005)
-



نمودار ۳- ۱: مهمترین چالشهای میگو در حال و آینده

- در اندونزی در سال ۱۹۹۲ میزان خسارات وارده ناشی از شیوع بیماریهای سرزرد و لکه سفید حدود ۳۰۰ میلیون دلار تخمین زده شده و در سال ۲۰۰۰ کلیه مزارع پرورش منطقه جاوه ، یعنی قطب اصلی تولید میگوی پرورش این کشور به همه گیری بیماری لکه سفید مبتلا شده و در برخی مناطق تا ۷۰٪ مزارع به حالت رکود و تعطیلی کشیده شده است (شریف روحانی، ۱۳۸۰)
- در تایلند سالهای ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳ میزان خسارت وارد شده بر اثر شیوع بیماری سرزرد به ۳۰ تا ۴۰ میلیون دلار رسیده و در همین کشور بین سالهای ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۷ بر اساس بیماری لکه سفید و سندرم تورآ میزان خسارت به ۲۴۰ تا ۲۶۰ میلیون دلار افزایش یافته است (فائو ، ۱۳۸۶) .
- در هند در طی سالهای ۹۵-۱۹۹۴ بر اثر بیماریهای سرزرد و لکه سفید میزان تولید ۱۰۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰ تن از دست رفته و در سال ۱۹۹۴ تنها در اثر بیماری لکه سفید خسارت اقتصادی در حدود ۱۷/۶ میلیون دلار برآورد شده است (Bondad –Reantaso et al., 2005)
- در بنگلادش در سال ۱۹۹۶ در اثر بیماری لکه سفید علاوه بر این رفتن صادرات میگو و از دست رفتن اشتغال ، خسارات وارده حدود ۱۰ میلیون دلار تخمین زده شده است (Bondad –Reantaso etal., 2005).
- در استرالیا در طی سالهای ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۸ خساراتی بالغ بر ۳۲/۵ میلیون دلار در تولید میگوی مونودون در اثر بیماریهای mid-crop mortality syndrome و ویروس همراه با آبشش (Gill Association Virus) وارد آمده است (Bondad –Reantaso et al., 2005)

در سال ۱۹۹۹، آمریکای جنوبی و مرکزی نیز با همه گیریهای شدید بیماریهای مختلفی از قبیل YHV,TSV,IHHNV و ویپریوزیس روبرو شدند که تا سال ۲۰۰۰ ادامه داشته است . در این سال شیوع بیماری لکه سفید در کشور کلمبیا بعد از ورشکستگی پرورش دهندگان متعاقب اپیدمی سندرم تورآ در سال های ۱۹۹۴-۱۹۹۹۶ منجر به صرف هزینه های سنگین و اجرای برنامه های مقاوم سازی میگوهای پرورشی گردید. در اکوادور که تکثیر و پرورش میگو سومین صنعت کشور بعد از موز و نفت می باشد در اواخر سال ۱۹۹۹ و اوایل سال ۲۰۰۰ با بزرگترین بحران سیاسی اقتصادی در تاریخ این کشور یعنی بیماری لکه سفید میگو مواجه شد و ۵۰ درصد مراکز تکثیر میگوی این کشور تعطیل شده و مراکز عمل آوری تنها با ۵۰ در صد ظرفیت خود فعال بودند، در همین رابطه صادرات میگو از ۸۷۵ میلیون دلار در سال ۱۹۹۹۸ به کمتر از ۳۶۰ میلیون دلار در سال ۲۰۰۰ رسید (شریف روحانی، ۱۳۸۰)

- در سال ۱۹۹۹ کشورهای مکزیک ، نیکاراگوئه تحت تاثیر بیماری لکه سفید قرار گرفتند. د ر پاناما ۲۵ درصد پرورش دهندگان به دلیل بروز بیماری از تراکم ۳ تا ۵ قطعه پست لارو در مترمربع برای ذخیره سازی استفاده کردند. در پرو پرورش دهندگان میگو به خاطرتلفات سنگین در نیمه اول سال ۲۰۰۰ به پرورش تیلاپیا روی آوردند . بطوریکه قبل از شروع بیماری لکه سفید سطح زیر کشت میگو در این کشور ۳۰۰۰ هکتار بوده که

اکنون به ۳۰۰ هکتار رسیده و کلیه هچری ها نیز تعطیل شده اند (شریف روحانی، ۱۳۸۰) و ۵۰۰۰ نفر که بطور مستقیم و غیر مستقیم درگیر بوده اند ، شغلشان را از دست داده اند (Bondad –Reantaso et al., 2005).

تولید میگوی پرورشی در ایالات متحده آمریکا به دلیل شیوع سندرم تورآ از۱/۲میلیون پوند در ۱۹۹۴ به ۳۶۵۰۰۰ پوند کاهش یافت . در سال ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۶ به دلیل بیماری، بازماندگی میگو به ۱۹ درصد کاهش یافته و با صرف هزینه های سنگین و استفاده از تجهیزات پیشرفته و غیره در سال ۲۰۰۰ به ۳۰ درصد بازماندگی رسید (شریف روحانی، ۱۳۸۰).

در ایران پرورش میگو از سال ۱۳۷۰ در بندر شهید کلاهی آغاز گردیده و در طی سالهای اولیه دارای رشد نسبتا مناسبی بود. در سال ۱۳۸۰ اولین وقوع بیماری لکه سفید که یکی از بیماریهای مهم در صنعت تکثیر و پرورش میگو میباشد دراستان خوزستان گزارش گردید(افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۴). با وقوع بیماری لکه سفید در استان خوزستان در سال ۱۳۸۰، این بیماری سپس در سالهای ۱۳۸۳ در استان بوشهر، سپس در سیستان و بلوچستان(۱۳۸۷)، و مجددا در خوزستان(۱۳۸۸)، بوشهر(۱۳۸۹)سیستان وبلوچستان (۱۳۹۰و۱۳۹۱) گزارش شده است. با وقوع بمیاری لکه سفید دراستان خوزستان (۱۳۸۱) وبوشهر(۱۳۸۳)، موسسه تحقیقات شیلات ایران اقدام به واردات میگوی پا سفید غربی از کشور آمریکا نمود ودر همان سال به نتایج موفقت آمیزی دست یافت (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۶). بعد از موفقیت در تولید میگوی پاسفید غربی در بوشهر توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران، کلیه پرورش دهندگان در سایر استانها اقدام به استفاده ازاین گونه برای پرورش بجای گونه سفید هندی نمودند و تاکنو نیز نتایج موفقیت آمیزی داشته و پیش بینی میشود تولید میگو در سال ۱۳۹۲ به رقم ۲۰ هزار تن افزایش یابد(تصویر۲- ۱).

۲-۱- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در ایران

تکثیر و پرورش میگو در ایران دارای عمری کوتاه است . با توجه به شرایط آب و هوایی در سواحل جنوبی کشور و بدلیل امکان تکثیر و پرورش میگو در ایران ، شرکت سهامی شیلات ایران از اواخر دهه ۶۰ به بررسی و شناسایی امکان تکثیر و پرورش و همچنین مکانهای مناسب برای ایجاد این مراکز در استانهای جنوبی کشور پرداخت .

برای اولین بار در ایران به منظور مطالعه جهت چگونگی تکثیر و پرورش میگو از بهمن ماه ۱۳۶۳ در استان بوشهر بررسی هایی انجام شد . در بررسی های انجام شده از میگوی *P.semisulcutus* استفاده شد . در ادامه این بررسیها ، تخم کشی از گونه نامبرده در بهار ۱۳۶۸ در شیلات استان بوشهر انجام شد . سپس در همان سال اداره شیلات استان بوشهر ، با توجه به امکانات موجود اقدام به تاسیس مرکز تکثیر (هچری) کوچکی در منطقه بندرگاه بوشهر نمود و این کارگاه در اواخر سال ۱۳۶۹ مورد بهره برداری قرار گرفت و عملاً به تولید لارو در سطحی نسبتاً بالا شد .

در سال ۱۳۷۱ معاونت تکثیر و پرورش آبزیان شیلات ایران اقدام به ایجاد اداره کل تکثیر و پرورش میگو و آبزیان در تهران نمود تا این اداره کل بتواند تحقیقات و عملیات تکثیر و پرورش میگو را در کشور دنبال و پشتیبانی کند

در همین سال کارگاه دیگری در بندر کلاهی هرمزگان جهت تکثیر و پرورش میگو احداث گردید .

در سال ۱۳۷۱ اقداماتی از طرف شیلات ایران در زمینه پرورش میگو انجام شد . در ابتدا ۳۰۰۰۰۰ قطعه پست لارو ۱۵ روزه میگوی *P.monodon* از کشور مالزی وارد کشور گردید و جهت گذراندن دوره نرسری به بوشهر منتقل و مدت یک هفته در کارگاه بندرگاه نگه داری شدند که پس از طی این دوره و کسب شرایط مطلوب این میگوها به مزرعه پرورش قفاس در آبادان منتقل و در سه استخر با سطح مفید ۱/۳ هکتار رهاسازی گردیدند که پرورش آنها نتایج خوبی بدنبال داشت .

همچنین در سال ۱۳۷۱ ، ۱۰۰۰۰۰ قطعه پست لارو میگوی روزنبرگی نیز از کشور مالزی خریداری و وارد کشور گردید تا آزمایشات پرورشی بر گونه آب شیرین نیز صرت گیرد ، لذا این بچه میگوها جهت پرورش به کارگاه شهید ملکی اهواز انتقال داده شدند که پرورش آنها اگرچه با موفقیت همراه نبود ولی راهگشای اقدامات بعدی در این زمینه گردید . در بندر کلاهی هرمزگان نیز در آن سال اقدام به پرورش آزمایشی گونه های *Metapenaeus affinis* , *P.merguensis* , *P.semiulcatus* شد . .(شرکت سهامی شیلات ایران،۱۳۷۳)

در سال ۱۳۷۲ بود که پرورش میگو تقریباً در سطح وسیع انجام شد و بخش خصوصی نیز وارد صحنه پرورش میگو گردید . در این سال شرکت سهامی شیلات در سه استان هرمزگان ، بوشهر و خوزستان به پرورش میگو در سطحی گسترده تر اقدام کرد و این اقدامات در سال بعد (۱۳۷۳) توسعه بیشتری در دو بخش خصوصی و دولتی یافت . سال ۱۳۷۴ را می توان سال ورود ایران به عرصه تولید تجاری میگوی پرورشی دانست . که گونه *P.indicus* گونه رسمی پرورشی در ایران بود و روند روبه رشدی را داشت تا سال ۱۳۸۱ که مزارع پرورشی آبادان به بیماری ویروسی لکه سفید دچار شد و به دنبال آن در سال ۱۳۸۴ این بیماری مزارع پرورشی استان بوشهر را نیز در بر گرفت که باعث کاهش چشمگیری در میگوی پرورشی کشور گردید .

در سال ۱۳۸۵ برخی از هچری داران بوشهر اقدام به ورود میگوی *L.vannamei* عاری از بیماریهای خاص (SPF) از هاوایی نمودند که به دلیل تولید خوبی که بدست آمد این مهم در سال ۱۳۸۶ به کمک شیلات در بوشهر و آبادان ادامه یافت . البته لازم به یادآوری است که پرورش دهندگان استان هرمزگان هنوز از *P.indicus* جهت پرورش در مزارع خود بهره می برند .(آمارنامه شیلات ایران،۱۳۸۶)

دلایل متعددی برای معرفی میگوی سفید غربی به مناطق جدید وجود دارد . به دلیل مشکلات ناشی از گونه های بومی و به منظور کسب درآمد بیشتر و به رغم وجود قوانین مختلف بین المللی ، منطقه ای و کشوری ؛ بخش خصوصی و دولتی درست یا نادرست خواهان معرفی گونه های غیر بومی هستند . معرفی این گونه ها مزایایی

برای بازاریابی داشته و امکان گسترش و تنوع بخشی به فعالیتهای آبزی پروری و افزایش تراکم را فراهم آورده است .

از جمله دلایل معرفی این گونه می توان به موارد زیر اشاره کرد :

- سرعت رشد میگوی سفید غربی تا رسیدن به وزن ۲۰ گرم است و در شرایط فعلی معمولاً سرعت رشد آن (۱/۵ – ۱ گرم در هفته) از میگوی ببری سیاه (۱ گرم در هفته) بیشتر است . اندازه میگو در موقع برداشت تقریباً کوچکتر است)

- تراکم ذخیره سازی این گونه که در تراکم های بالا (بطور نمونه ۱۵۰ – ۶۰ قطعه در هر متر مربع و حتی تا ۴۰۰ قطعه در هر متر مربع می توان انجام داد) .

- دامنه تحمل شوری این گونه که دامنه وسیعی از شوری (ppt ۴۵ – ۰/۵) را تحمل می کند و برای پرورش در مناطق غیر ساحلی مناسب تر است .

- دامنه تحمل درجه حرارت این گونه نسبت به درجه حرات های پایین (تا ۱۵ درجه سانتیگراد) می باشد که امکان پرورش آن در فصول سرد را نیز مقدور می سازد .

- نیاز به پروتئین در جیره غذایی میگوی سفید غربی (۳۵ – ۲۰ درصد) نسبت به میگوی ببری سیاه یا میگوی آبی (۴۲ – ۳۶ درصد) پایین تر می باشد که موجب پایین آمدن هزینه های تولید و امکان پرورش میگو در سامانه های بسته و فاقد تولیدات طبیعی می شود . در نتیجه کاهشی در ارزش عملکرد و سیستم های هتروتروفیک ایجاد می شود . ضریب تبدیل غذایی (FCR) ۱/۲ است که از میگوی ببری سیاه (۱/۶) پایین تر است .

- این گونه نسبت به بیماری ها مقاوم تر می باشد از این رو میزان بازماندگی میگوی سفید غربی در آسیا بطور معمول نسبت به میگوی ببری سیاه بیشتر می باشد و میزان تولید آن بالاست .

- سهولت تکثیر و بومی سازی این گونه که دسترسی به مولدین پرورشی ، قابلیت اجرای برنامه های بومی سازی و بهگزینی ، لاین های SPR و SPF که در حال حاضر موجودند ، رفع مشکلات ناشی از صید میگوی مولد وحشی یا جمع آوری پست لاروها ، تهیه پیش مولدین ارزان از استخرهای پرورشی ، کوچکی اندازه پیش مولدین که به معنی رسیدگی جنسی سریعتر و ایجاد نسل سریعتر است .

- میزان بازماندگی لارو این گونه در مراکز تکثیر ۶۰-۵۰ درصد است . در صورتیکه بازماندگی میگوی ببری سیاه ۳۰-۲۰ درصد است .

- بازاریابی خوب ؛ این گونه به دلیل طعم و مزه خود تقاضای بیشتری دارد . تقاضای داخلی زیادی برای میگوی سفید غربی در آسیا وجود دارد . میزان گوشت میگوی سفید غربی (۶۸-۶۶ درصد) نسبت به میگوی ببری سیاه (۶۲ درصد) بیشتر است (Wyban and Sweeny,1991).

۳-۱-اهمیت مولدین در صنعت میگوی پرورشی

براساس گزارشFlegel و Alday (1998) از مهمترین راههای انتقال بیماری به مزارع پرورش میگو پست لاروهای تولیدی از مولدین پرورشی و وحشی میباشد. در چرخه تولید میگوی پرورشی عوامل مهمی تاثیر گذار بوده که از جمله میتوان به تامین غذای مناسب، پست لارو مناسب، رعایت شرایط بهداشتی و کنترل عوامل عفونی ،متخصصین با تجربه و سایر عوامل اشاره نمود. با توجه به اینکه یکی از عوامل مهم انتقال پاتوژنها به مراکز پرورشی پست لاروها می‌باشند، موفقیت آینده پرورش میگو در دنیا ارتباط مستقیمی با تولید پست لاروهای سالم و بهداشتی دارد. از زمانیکه بیماری IHHNV در سال ۱۹۸۹در میگوی وانامی موجب تلفات بالائی شد، متخصصین در آمریکا به مثابه سایر موجودات زنده به فکر تولید مولدین میگوهای عاری از عوامل بیماریزای خاص(Specific Pathogen Free (SPF گردیدند (Wyban,1992). امروزه تولید مولدین میگوی عاری از بیماری خاص SPF به عنوان یکی از چرخه های تولید میگو جایگاه رفیعی پیدا نموده و به عنوان یک تکنیک انحصاری در اختیار برخی از کشورها قرار دارد. استفاده از پست لاروهای تولیدی در میگوی وانامی که امروزه به عنوان مهمترین گونه تولیدی SPF می‌باشد موجب انقلابی در صنعت پرورش میگو شده و موجب رشد فوق العاده‌ائی در تولید آن شده است. بطوریکه در سال ۲۰۱۳ بالغ بر ۴/۲ میلیون تن میگوی پرورشی تولید شده و بیش از ۷۵٪ از این تولیدات به گونه وانامی اختصاص داشته است که یکی از دلایل افزایش تولید در گونه وانامی به دلیل امکان تولید میگوهای مولد عاری از بیماری خاص SPFآن می‌باشد (Valderrama and Anderson,2011) در ایران نیز اگر برنامه تولید میگو در افق ۱۴۰۰تحقق یابد و امکان تولید ۱۰۰هزارتن میگو محقق شود ضرورت دارد (آمارنامه شیلات ایران،۱۳۸۶)، که در زمینه تولید و روشهای دستیابی به گونه های SPFاز میگوهای بومی و یا وارداتی اقدام شده و زمینه های تولید آن را فراهم نمائیم. تولید مولد از مهمترین زنجیره های تولید میگوی پرورشی می‌باشد. بخش مهمی از بیماریها بالاخص بیمارهای ویروسی از طریق مولدین به مزارع پرورشی منتقل می‌شود. در میان بیماریهای مهمی که در مزارع پرورش میگو موجب تلفات بسیار زیادی می‌شود بیماری ویروسی لکه سفید، سندرم توراو بیماری نکروز عفونی عضلات میگو میباشد. همچنین بخش مهمی از باکتریها نیز بالاخص بیماری ویبریوزیس از طریق مولدین به پست لاروها و مزارع پرورشی منتقل می‌شود. در سالهای اخیر توجه به اهمیت استفاده از مولد سالم و بهداشتی در زنجیره میگوی پرورشی بسیار حائز اهمت بوده و بهمین دلیل دراغلب کشورها از میگوی عاری از بیماری خاص Specific Pathogen Free(SPF) استفاده می‌کنند. با عنایت به اینکه در سایتهای پرورش میگو کشور سالیانه چندین هزارتن میگو تولید می‌شود و در سالهای اخیر گزارشاتی متعددی از بروز بیماریها بالاخص بیماری لکه سفید و ویبریو گزارش شده است، ضرورت استفاده از مولدین سالم و بهداشتی در زنجیره تولید حائز اهمیت بالائی است. در این مطالعه درخصوص وضعیت بهداشتی مولدین تولیدی در استان بوشهر که برای طرح کلان "کسب و انتقال دانش فنی برای تولید میگوی عاری از بیماری خاص و قطع وابستگی به محصولات خارجی " جمع آوری شده بود از نظر وضعیت بهداشتی مولدین

جمع آوری شده در اساخرهای خاکی و مولدین جمع آوری شدهدر استخرهای بتونی و فایبر گلاس مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت ی ب تنمنطقه و سلامت آنها از نظر بیماریهای مهم بالاخص بیماریهای ویروسی مهم لکه سفید، و راهکارههای کاهش خطرات ناشی از بیماریها برای تولید میگوی عاری از بیماری بیان می‌شود.

٤-١- مهمترین اهداف این پژوهش

۱- بررسی وضعیت بهداشتی مولدین تولید شده در استخرهای خاکی در کشور

۲- بررسی وضعیت بهداشتی مولدین تولید شده در تانکهای فایبر گلاس و استخرهای بتونی

۳- مقایسه وضعیت بهداشتی مولدین تولیدی

۴- ارائه راهکارهای کاربردی به منظور بهبود شرایط بهداشتی در تولید مولدین

اهداف فرعی:

۱- تعیین نقاط ضعف و قوت مدیریت بهداشتی مراکز تولید مولد

۲- تعیین روشهای مناسب مدیریت بهداشتی مراکز تولید مولد میگوی وانامی

٥-١-تاریخچه بررسی بهداشتی مولدین میگو در ایران

اولین گزارش جامع در خصوص وضعیت بهداشتی مولدین در ایران به سال ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷ و طرح ملی بهداشت و بیماریهای مراکر تکثیر و پرورش میگوی کشور برمیگردد (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۸). .دراین مطالعه که در کارگاههای تکثیر و پرورش میگوی انجام گرفته 15 جنس و گونه باکتری بخصوص ویبریو آلجینولیتیکوس ، ویبریوآنگوئیلاروم . یبریو اسپلندیدوس ، ویبریو ولنی فیکوس، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو پروتئولیتیکوس، پلزیوموناس شیگلوئیدس و آئروموناس هیدروفیلا جدا سازی گردید . همچنین هفت جنس و گونه قارچ بخصوص آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فومیگاتوس ، آسپر ژیلوس فلاووس ، فوزاریوم و پنی سیلیوم و2 جنس انگل ورتیسلا و زئوتامنیوم جدا سازی گردید. همچنین با کیت های IQ 2000 PCR در میگوهای مولد و پست لاروویروسهای IHHNV ، WSSV ، TSV ، HPV ، MBV شناسائی و با روش هیستوپاتولوژی انکلوژن بادی های ویروس هاشناسایی گردید (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۸) . در سال ۱۳۸۵ در راستای معرفی میگوی پاسفید غربی به کشور طرح احیا پرورش میگو دراستان خوزستان اجرا و به نتایج موفقت آمیزی رسید (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۶). بعد از این سال پرورش دهندگان اقدام به پرورش میگوی وانامی در مزارع خود نمودند و بعد از چندین سال پرورش میگو مجددا احیا گردید. همانگونه که بیان گردید براسا س گزارش Flegel و همکاران (۲۰۰۸)، پست لاروها مهمترین مسیر انتقال بیماری به مزارع پرورشی میباشند. بنابراین غربالگری مولدین تولید کننده پست لارو یکی از مهمترین راهکارهای کاهش خطر در مزارع پرورشی میباشد.

با پیدایش و بروز برخی از بیماریهای ویروسی در دهه 1990 توسعه پایدار و ادامه رشد صنعت میگو در جهان بخصوص در کشورهای آسیای جنوب شرقی با مشکلات جدی مواجه گردید . اولین بیماری ویروسی در سال ۱۹۷۴و توسط Couch در میگوی پنئوس دوراروم در خلیج مکزیک گزارش گردیده و آن را باکولوویروس پنائی(BP) نامگذاری نمودند. بعد از آن سایر بیماریها از جمله بیماری مونودن باکولوویروس (MBV) نیز گزارش گردید (افشارنسب ،a۱۳۸۶) .

برای اولین بار در سال 1991 بیماری لکه سفید (WSD) در تایوان گزارش وباعث خسارت بسیار زیادی در مزارع پرورش میگوی این کسور گردید (افشارنسب، b۱۳۸۶). سپس بیماری به سایر کشورها از جمله ژاپن ، کره و هندوستان منتقل و در سال 1994 بیماری در تایلند حدود 500 میلیارد دلار خسارت ایجاد کرد (؛افشارنسب ،a۱۳۸۶). بیماری لکه سفید مو جب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می شود بطوریکه در چین (Huang etal ,1994)در ژاپن (Takahashi etal,. 1994)، در تایلند (Wongterasupaya, 1995)، در تایوان (Wang etal., 1995)، اندونزی و هند (Anon, 1994) موجب میلیاردها دلار خسارت به مزارع پرورش میگو گردید. در ایران نیز طی سالهای 1381 و 1383 در استان خوزستان و سال 1384 در استان بوشهر بعنوان قطب تولید میگوی کشور اغلب استخرها و مزارع آلوده و کل صنعت با خطر تعطیلی مواجه و در حدود 10 میلیارد تومان خسارت به پرورش دهندگان وارد گردید (افشارنسب و همکاران ،۱۳۸۶؛ آمار نامه شیلات ایران،1384).

تا سال 1989 تنها 6 ویروس تاثیر گذار در میگو های پنائیده شناسایی شده بود ، اما در سال 1997 بیش از20 ویروس تشخیص داده شد که ذخایر و حشی و تولیدات تجاری را تحت تا ثیر قرار می دهند . اما در حال حا ضر سازمان بهداشت جهانی آبزیان(OIE) هفت بیماری ویروسی میگو را که شامل بیماری ویروسی لکه سفید (WSD) بیماری ویروسی سر زرد (YHV)، بیماری کشنده مولد(SMV) ، سندروم تورا (TSV) ، بیماری باکلو و یروس پنائی (BP)، بیماری ویروسی نکروزعفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز(IHHNV) و بیماری منودون با کلو ویروس(MBV) را در قالب قوانین سلامت موجودات وآبزی معرفی نموده است که گمان میرود توانایی سرایت داشته و از لحاظ اجتماعی ،اقتصادی و سلامت عمومی حایز اهمیت باشند . براساس گزارش(2003) FAO بیشتر بیماریهای ویروسی ذکر شده از طریق مولدین به مزارع پرورش میگو منتقل شده و موجب بروز بیماری میشوند. همچنین براساس گزارش Wybanو همکاران (۱۹۹۲و ۲۰۰۷) بیماری ویبریوسیس وبیماری باکتریائی نکروز هپاتوپانکراس (NHP)و برخی بیماریهای انگلی مثل میکروسپوریدیا و هاپلوسپوریدیوم نیز از طریق مولدین به مزارع پروش میگو منتقل میشوند. بعد از این گزارشات پایش مولدین از نظر سلامت و بهداشت مورد توجه جدی قرار گرفت و موضوع مولدین با سلانت بالا (High Health)و میگوی عاری از بیماری (SPF)مورد توجه جدی قرار گرفت.

٦-۱- تاریخچه تولید مولدین با سلامت بالا در دنیا

اولین تجربه آزمایشگاهی تولید میگوی SPF پا سفید 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 پاسفید *(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 (Wyban,1992).

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.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 ۱۹۹۲ 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. در سالهای بعد سایر کشورها از جمله چین، تایلند، هند و عربستان سعودی نیز مبادرت به تولید میگوی عاری از بیماری نمودند و موجب رشد فزاینده ائی در تولید میگوی این کشورها گردید.

با توجه به ورود میگوی وانامی به کشور و برنامه ریزی برای تولید میگوهای مولد از میگوهای پرورشی داخلی، ردیابی بیماریهای ویروسی که از مهمترین بیماریهای میگوهای وانامی می‌باشند، همچنین بیماریهای باکتریائی، انگلی و قارچی در مولدین جمع آوری شده در استخرهای خاکی و تانکهای بتونی و فایبرگلاس حائز اهمیت فراوان می‌باشد. با توجه به اهمیت این بیماریها در مراکز تکثیر مختصرا خصوصیات بیماریهای فوق الاشاره بیان می گردد.

۷-۱- بیماری های ویروسی

ویروس ها مهمترین عوامل بیماریزای میگو در نظر گرفته می شوند. میگو در مراحل مختلف زندگی ممکن است نسبت به آلودگی ویروسی حساس بوده و مرگ و میر ، کندی رشد و بد شکل هایی را بهمراه داشته باشد. بهر حال همراه با رشد و تکامل صنعت پرورش میگو بیماری های ویروسی نیز رو به تزاید گذاشته است، بطوریکه

در سال ۱۹۸۴ تنها ۶ بیماری ویروسی از میگوهای پنائیده پرورشی گزارش شده است (Lightner, 1984) ودر سال ۱۹۹۲ این تعداد به ۱۱ بیماری ویروسی افزایش پیدا کرده است (Lightner, 1992)، ودر سال ۱۹۹۷ بالای ۱۵ بیماری ویروسی از میگوهای پنائیده در سراسر دنیا مورد شناسایی قرار گرفته است (wang etal, 1995). در حال حاضر این تعداد به بالای ۲۰ بیماری ویروسی رسیده است (Rahman, 2007). در جدول (۱) عوامل بیماری زا ویروسی میگوهای پنائیده نشان داده شده است (Rahman, 2007) .

جدول ۱-۱: عوامل بیماریزای ویروسی میگوی پنائیده

ویروس	خانواده (Family)
DNA virus	
Infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus (IHHNV) Hepatopancreatic parvovirus (HPV) Spawner-isolated mortality virus (SMV) Lymphoidal parvo – like virus	parvoviridae
Baculovirus penaei(BP) Monodon baculovirus (MBV) Baculovirus midgut gland nesrosis virus (BMNV) Type C baculovirus of penaeus monodon Hemocyte infecting non-occluded bacvlo-like virus	Bacvloviridae
Shrimp irido virus (IRIDO)	Iridovidae
White spot syndrome virus(WSSV)	Nimaviridae
Taura syndrome virus(TSV)	picornavirdae
Yellow head virus (YHV) Gill associated virus(GAV) Lymphoid organ virus(LOV)	Roniviridae
Reo-like virus (REO)type II and IV	Reoviridae
Rabdovirus of penaeid shrimp(RPS)	Rhabdoviridae
Lymphoid organ vacuolization virus(LOVV)	Togaviridae
Infeetious myonecrosis virus(IMNV)	Totiviridae
Monodon slow growth syndrome (MSGS)	Unclassified

از میان این ویروس ها به نظر می رسد ویروس های *HPV,MBV,TSV,YHV,IHHNV,WSV* به دلیل توانایی سرایت آنها و ایجاد مرگ و میر و خسارات اقتصادی اهمیت بیشتری داشته باشند ، اما از عوامل ویروسی دیگر نیز نباید غفلت داشت .

۸-۱- بیماری لکه سفید میگو(WSD)

عامل بیماری

ویروس سالم عامل مولد بیماری یک ویروس دو رشته ای DNA دار به شکل بیضوی با یک کپسول سه لایه ای و یک تاژک انتهایی در یکی از قطب ها بوده و دارای شیارهای منظم مات و شفاف عمود بر محور طولی

نوکلئوکاپسید می باشد. این ویروس تنهاعضو خانواده نیماویریده از جنس ویسپوویروس (*Whispovirus*) می باشد(Rahman,2007) ابعاد این ویروس در کشورهای مختلف با هم اختلاف دارند بطوریکه ابعاد آن را در میگوهای پرورشی ۶ کشور آسیایی مشخص کرده اند(جدول ۲-۱) (Lightner,1996).

جدول ۲-۱: ابعاد ویروس های جدا سازی شده عامل بیماری لکه سفید در ٦ کشور آسیایی

کشور	اندازه ویریون(نانومتر)	اندازه نوکلئوکاپسید(نانومتر)
چین	۱۲۰×۳۳۰±۱۰	۸۵× ۲۷۰±۲۵
ژاپن	۸۳ × ۲۷۵	۵۴× ۲۱۶
اندونزی	۱۲۰ × ۳۲۰ ± ۲۰	۸۰× ۲۶۰ ± ۲۰
تایلند	۱۲۰ × ۲۷۵ ± ۲۲	۸۵ × ۲۳۶ ± ۱۳
مالزی	۱۲۰ × ۲۷۵ ± ۱۵	۸۵ × ۲۳۰ ± ۲۰
هند	۱۱۰ × ۲۷۰ ± ۳۰	۸۰ × ۲۶۰ ± ۳۵

پراکندگی جغرافیایی و گونه های حساس

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

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

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

نشانی های بیماری

عفونت حاصله از بیماری با پیدایش لکه های سفید در کوتیکول میگوهای مبتلا همراه با تلفات سنگین و ناگهانی تا ۱۰۰ درصد می باشد، که ممکن است در طول ۳-۷ روز پس از تهاجم ویروس صورت گیرد گاهی نیز ممکن است علامت فوق کمتر قابل مشاهده بوده ولی تلفات سریع ، ناگهانی و بسیار شدید باشد(سلطانی، ۱۳۸۱). بطور کلی علائم ظاهری بیماری در میگوهای آلوده بدین صورت است : لکه های سفید ابتدا در کاراپاس میگو(تصویر ۱-۱) و سپس در بند های پنجم و ششم بدن ظاهر می شوند سپس این این لکه ها توسعه یافته و تمام بدن را فرا می گیرند.اندازه لکه های سفید متغیر بوده و بین ۰/۵ تا ۲ میلیمتر می با شد. در اغلب موارد لکه ها بصورت دانه های تسبیح پشت سر هم قرار می گیرند. لکه های سفید غالبا در زیر کوتیکول ایجاد می شوند.علاوه بر ایجاد لکه سایر علائم کلینیکی و بالینی قابل مشاهده در میگو عبارتند از:

۱- جدا شدن آسان کوتیکول از لایه اپیدرم(تصویر۱-۱)

۲- بزرگ و شکننده شدن هپاتوپانکراس میگوهای آلوده

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

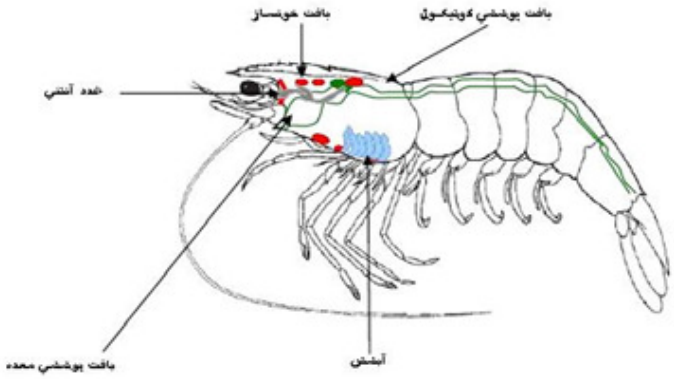
۴- بی اشتهایی میگوی الوده و عدم تمایل به خوردن غذا و فعالیت های حرکتی در میگو

۵- قرمز شدن اندام های بدن میگوی بیمار و ظاهر شدن آنها در در کناره های استخر وسطح آب
۶- در نهایت ایجاد مرگ و میربسیار زیاد بین ۷۰ تا ۱۰۰ درصد در طی یک هفته پس از شروع بیماری (افشارنسب، ۱۳۸۶)

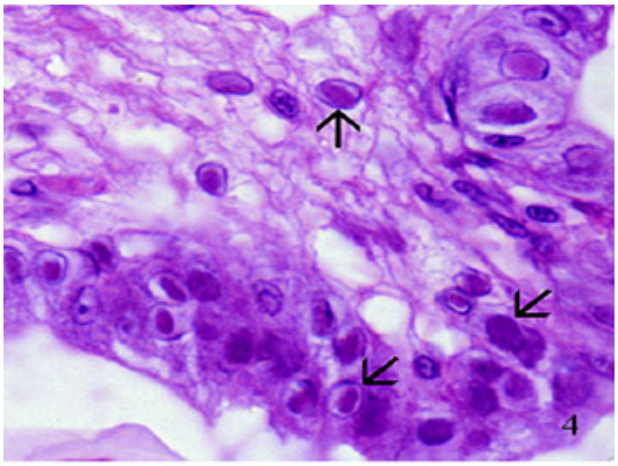
تصویر ۱-۱: مشاهده لکه های سفید بر روی کاراپاس میگو (سمت راست) و جداشدن کوتیکول (سمت چپ)

آسیب شناسی بافتی

درمطالعات آسیب شناسی بافتی نشان داده شده که ویروس عامل بیماری لکه سفید در میزبان های خود آسیب های بافتی وسیعی را باعث شده به طوری که باعث دژنرسانس سلولی در سطح وسیعی از بافت ها ، هیپرتروفی شدید هسته ای ، حاشیه نشینی کروماتین در بافت های اکتودرمی و مزودرمی می گردند. بطوریکه دراکثر بافتها و اندام های بدن(تصویر ۲-۱) میگوی آلوده از جمله: بافت پوششی زیر کوتیکول، آبشش، اپی تلیوم بافت معده کوتیکول بدن، بافت های خونساز، لمفوئید ارگان، بافت های عصبی، بافت عضلانی، هپاتوپانکراس، قلب، پاهای شنا و حرکتی، روده میانی، روده خلفی، چشم های مرکب، ساقه چشمی، بافت های تخمدان و بیضه و غدد آنتنی شناسایی شده اند.در اندام های هپاتوپانکراس و قلب میگوی آلوده ویروس تنها در بافت های همبند این اندام ها مشاهده شده اند(Rahmam,2007). مطالعات میکروسکوپیک بافت های آلوده نشان می دهد که تغییرات سلولی در همه بافت های مبتلا مشاهده شده به طوری که در مراحل اولیه غفونت سلول های حساس دچار هیپرتروفی هسته ، تجزیه یا حذف هستک و حاشیه نشینی کروماتین می شوند . سپس در این سلول های آلوده گنجیدگی های داخل هسته ای ائوزینوفیلی(تیپ Cowdry A) پیشرفته ظاهر می شود که بعدا" حالت بازوفیلی پیدا کرده و گنجیدگی های متراکم شده توسط یک ناحیه شفاف از کروماتین هسته جدا می گردد . در مراحل بعدی عفونت با از هم گسیختن غشاء هسته ، ناحیه شفاف هسته با سیتوپلاسم شفاف در هم آمیخته می شود . در مراحل انتهایی با تخریب سلول مبتلا ، هسته یا تمام سلول متلاشی و منجر به ایجاد فضاهای خالی در مقاطع بافتی می شود(سلطانی، ۱۳۸۱ ،افشارنسب، ۱۳۸۶) (تصویر۳-۱).



تصویر۲-۱: اندامهای هد ف ویروس ویروس لکه سفید.



تصویر۳-۱: مشاهده کنجیدگیهای بیماری لکه سفید در بافت معده میگو

راه های انتقال بیماری:

شیوع بیماری سندرم لکه سفید نیز مانند هر بیماری دیگر نتیجه یک سری اعمال یا تغییراتی است که منجر به شیوع بیماری در هر مرحله از چرخه تولید می گردد. در هر مرحله از تولید یک تعداد از فاکتور ها می توانند بر گسترش بیماری در تک تک میگو ها و همچنین در کل جمعیت میگو استخر تاثیر بگذارند. ویروس سندرم لکه سفید میتواند از راه های مختلفی به درون استخر و در نتیجه به بدن میگو وارد گردد، ولی عمده ترین راه های انتقال ویروس عبارتند از:

- تماس میگو های سالم با آ ب استخرهای آ لوده
- تماس میگوی سالم با مواد د فعی میگوهای آ لوده
- کانی بالیسم(خورده شدن میگوی مرده توسط میگوهای سالم)
- ایجاد آ لودگی از طریق غذای آ لوده
- تماس با وسا یل آ لوده

- انتقال از طریق پرندگان و انسان

میگوی آلوده منجمد نیز میتواند آ لودگی را در خود نگه داشته و باعث انتقال آ لود گـی بـه منـاطق غیـر آ لـوده شود. همانطوریکه با انتقال میگوی منجمد آ لوده به ویروس لکه سفید از کشورهای منطقه آسیای جنـوب شـرقی به قاره آمریکا گرد ید . همچنین انتقال عمودی این ویروس ازوالدین بـه فرزنـدا ن (مولـد بـه پسـت لارو) نیـز اثبات شده است(Lightner,1996).

روشهای تشخیص بیماری

روشهای تشخیص متنوعی برای مشاهده و تعیین بیماری استفاده می‌شود، ولی بطور کلی تشخیص این بیماری بر اساس علائم بالینی، درصد بالای تلفات ، ضایعات پاتولویک و مشاهده ویروس با میکروسکوپ الکترونی است. از روش PCR، هیبریداسیون DNA ، روش وسترن بلوت (Western blot) نیز می‌توان برای تائید تشخیص استفاده کرد. همچنین از روش PCR برای شناخت حاملین آلوده به ویروس نیز می‌توان استفاده کرد(Lightner,1996).
سازمان OIE اهمیت انواع روشهای تشخیصی را جهت سرویلانس، ردیابی و تشخیص قطعی بیماری لکه سفید را بصورت جدول ذ یل ارائه داده است(جدول(۳)) (OIE,2006).

جدول۳-۱: روشهای تشخیص ردیابی و سرویلانس ویروس بیماری لکه سفید

روش	سرویلانس				تشخیص احتمالی	تشخیص قطعی
	لارو	پست لارو	جوان	بزرگسالی		
نشانیهای بالینی	D	D	C	C	C	D
سنجش زیستی	D	D	D	D	C	B
مشاهده مستقیم با میکروسکوپ نوری	D	D	C	C	C	C
آسیب شناسی بافتی	D	C	C	C	A	A
میکروسکوپ الکترونی	D	D	D	D	D	A
سنجش بر پایه آنتی بادی	D	D	C	C	A	B
گاوشگر in situ DNA	D	D	C	C	A	A
PCR	D	B	A	A	A	A
Sequenc	D	D	D	D	D	A

A= این روش به دلیل قابلیت دسترسی، سودمندی اختصاصیت و حساسیت روش پیشنهادی است

B= یک روش استاندارد با اختصاصیت و حساسیت تشخیصی خوب می باشد

C= روش در موقعیت های خاص قابل استفاده بوده اما هزینه دقت و دیگر فاکتورها عوامل محدود کننده استفاده از آن است

D= روش در حال حاضر برای مقاصد تعریف شده پیشنهاد نمی شود

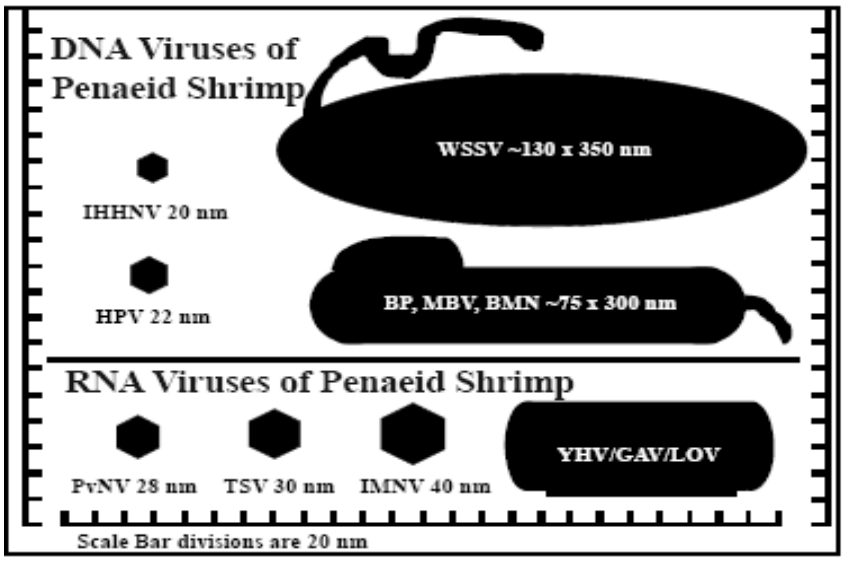
کنترل و پیشگیری از بیماری

تا کنون برای بیماریهای ویروسی درمانی یا دارویی شناخته نشده و عمده ترین راه مبارزه با بیماری‌های ویروسی کنترل و پیشگیری از بیماریهاست. برخی از راه های پیشگیری از و کنترل بیماری لکه سفید درمراکز و مزارع پرورش میگو در گزارشات افشار نسب ۱۳۸۶ ذکر شده است.

۹-۱- بیماری نکروز عفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز (IHHNV)

عامل بیماری:

این بیماری که آن را Runt deformity syndrome یا RDS نیز می نامند، یکی از بیماریهایی است که در غالب گونه های میگوهای پرورشی گزارش گردیده است. ویروس ایجاد کننده بیماری یکی از کوچکترین ویروسها به اندازه ۲۰تا ۲۲ نانومتر(تصویر۴-۱) و از خانوادهparvoviridae جنسBrevidensovirus می باشد. ویروس بصورتssDNA و حالت بیست وجهی ، بدون پوشش با اندازه تقریبی kb ۱/۴می باشد (افشار نسب ،۱۳۸۶)



تصویر٤-۱: مقایسه اندازه انواع ویروس های بیماریزای میگو

پرا کندگی جغرافیایی و میز بانهای حساس

این ویروس اولین بار در سال ۱۹۸۱ در میگوی سفید غربی و میگوی آبی در کشور آمریکا کشف شد، که شروع بیماری از ها وایی بود. احتمال می رود که این ویروس بومی آمریکا نبوده و از طریق معرفی میگوی ببری سیاه زنده از آسیا وارد شده باشد. احتمالاً ویروس نکروز عفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز از مدت ها پیش بدون آنکه شناسایی شود در آسیا وجود داشته چون اثر ناچیزی بر میگوی ببری سیاه گذاشته است .

مطالعات اخیر در رابطه با جدا سازی بیماری ویروس نکروز عفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز مشخص ساخت که منبع اصلی عفونت در هاوایی و در اکثر مناطق پرورش میگوی آمریکای لاتین کشور فیلیپین بوده است . هم اکنون ویروس نکروز عفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز در میگوهای پنائیده پرورشی و وحشی در سواحل اقیانوس آرام از مکزیک تا پرو یافت می شود. همچنین در میگوهای پنائیده پرورشی و وحشی در سر تاسر منطقه هند و اقیانوسیه (منطقه ایندوپاسفیک) نیز گزارش شده است (فائو ۱۳۸۶)

گونه های متعددی از میگوها به این ویروس آلوده شده و بیماری را بطور طبیعی از میگوهای سفید غربی ، میگوی آبی ،P.monodon , P.californiensis , P.schmitti , P.occidontalis و میگوی ببری سبز گزارش کرده اند(افشار نسب، ۱۳۸۶، فائو، ۱۳۸۶، ۱۹۹۷,Avsvet). همچنین آلودگی را بطور تجربی از میگوهای ژاپو نیکوس ، ستی فروس ، میگوی دوراروم و میگوی آزتکوس گزارش نموده اند(Avsvet, 1997) با این حال میگوهای موزی و سفید هندی نسبت به آلودگی با ویروس نکروز عفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز از خود مقاومت نشان داده اند (افشار نسب، ۱۳۸۶، فائو،۱۳۸۶؛Avsvet, 1997 ،Flegel,2006) لیکن آنها به عنوان حاملین همیشگی ویروس محسوب می شوند (فائو، ۱۳۸۶) .

نشانی های بالینی

این بیماری به صورت حاد باعث تلفات شدیدی در میگوهای جوان گونه های حساس به بیماری می شود . در میگوهای آلوده به بیماری به طور مشخص کاهش مصرف غذا و تغییر در رفتار و ظاهر میگو قابل مشاهده می باشد . میگوی آلوده به این بیماری در تانک ها یا استخرهای پرورش بصورت بی حال در سطح آب ظاهر شده و حرکاتشان کاهش می یابد و سپس از یک طرف به کف تانک یا استخر فرو رفته و به طور آهسته روی شکم و پهلو می افتند. در میگوهای بیمار در سطح کوتیکول لکه های سفید یا زرد رنگ مشاهده می شود، این لکه ها بخصوص در محل اتصال بندهای شکمی بیشتر دیده می شود و یک حالت خال مانندی به میگوها می دهد . این لکه ها سپس روی بدن میگوها کم رنگ شده و میگوهای آلوده و بی حال به رنگ آبی در آمده و عضلات میگوها در زیر کوتیکول شیری رنگ می شوند.

در بعضی از گونه ها از جمله میگوی وانامی این بیماری بصورت مزمن دیده می شود . این حالت با خمیدگی بدن میگو همراه است که آن راRunt deformity syndrome (RDS) می نامند . میگوهای جوان دارای روستروم خمیده یا غیر طبیعی با آنتن های کوتاه و شکسته بوده و سطح بدن آنها خشن و ناصاف است .

میگوهای جوان در این بیماری دارای اندازه های متفاوت بوده و اندازه آنها کمتر از اندازه ای است که بطور طبیعی دارند. میانگین اندازه میگوهای آلوده ۳۰تا ۵۰ در صد کمتر از اندازه طبیعی بوده در صورتیکه در جمعیت هایی از میگو که فاقد بیماری می باشد، میانگین تغییرات اندازه ۱۰تا ۳۰ درصد می باشد(تصویر۵-۱) (افشار نسب، ۱۳۸۶) .

تصویر۵-۱: اختلاف اندازه در اثر بیماری IHHNV(شکل از دکتر لایتنر)

آسیب شناسی بافتی

ویروس نکروز غدد زیر پوستی و بافت خونساز در سیتو پلاسم سلولهای با منشاء و بافت اکتودرمی (اپی درمیس ، آبشش ، روده قدامی و میانی ، غدد آنتنی و عصبی) و با منشاء بافت مزودرمی (بافت خونساز ، ماهیچه مخطط ، قلب ، بافت لمفوئیدی و بافتهای پوششی) تکثیر پیدا می کنند(Ausvet, 1997) در مشاهدات آسیب شناسی بافتی ، گنجید گیهای داخلی سلولی ائوزینوفیلیک به همراه مهاجرت کروماتین و بزرگ شدن هسته را می توان مشاهده نمود(تصویر۶-۱) (افشار نسب، ۱۳۸۶ ;**Lightner,1996**;)

تصویر٦-۱: مشاهده کنجیدگیهای بیماری در بافت آبشش

جدول ۴-۱ بافتهای اصلی مورد هجوم ویروس IHHNV و محلهائی را نشان می دهد که برای تشخیص ضایعات سلولی استفاد می شود (افشار نسب ۱۳۸۶)

جدول٤-١: مهمترین اندام ها یا بافتهای میگو برای تشخیص IHHNV که هنگام شدت آلودگی آزمایش و درجه بندی می شوند .

بافت یا اندام	بهترین محل برای فیکس کردن بافتها وضایعات **IHHNV**
آبشش و سلولهای آبششی	اپی تلیوم کوتیکول و سلولهای پشتیبان
سلولهای عصبی (طناب عصبی)	رشته های عصبی در قسمت شکمی طناب عصبی
گانگیلوهای عصبی	سلولهای محافظت کننده گانگیونهای عصبی ، چشم و طناب عصبی
گره های هماتوپوتیک قسمت بالای معده	گره های هماتوپوتیک موجود در امتداد آئورت چشمی
غدد آبششی	سلولهای اپی تلیال مجاری
اپی درم	اپی تلیوم کوتیکول به ویژه در محلهائی که خمیدگی کوتیکول وجود دارد و همچنین قسمت پشتی قلب
پیش معده	اپی تلیوم کوتیکول و بافت زیرین پیوندی
قلب	بافت پیوندی که قلب را احاطه کرده است
ارگان لمفوئیدی	بافت پیوندی یا بافت پارانشیمی

راههای انتقال بیماری

ویروس IHHNV به صورت افقی و عمودی انتقال می یابد (افشار نسب، ۱۳۸۶) که انتقال افقی از طریق هم جنس خواری میگوهای در حال مرگ یا ضعیف صورت می گیرد . و انتقال از طریق آب کمتر موثر می باشد . انتقال عمودی نیز از طریق مولدین به لاروها انجام می گیرد و مشاهده شده که ویروس از تخمدان ماده های مبتلا منشاء می گیرند (در حالی که بطور معمول اسپرم نرها عاری از ویروس می باشد . همچنین انتقال ویروس توسط ناقلین از قبیل حشرات نیز بعنوان حاملین فعال بیماری مطرح هستند (فائو، ۱۳۸۶).

روشهای تشخیص بیماری

بیماری از طریق علائم ظاهری میگوهای بیمار و مشاهده گنجید گیهای داخلی سلولی cowdry تیپA با روشهای هیستو پاتولوژیکی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین قابل شناسایی می باشند . روشهای مولکولی از قبیل dot-blot, RCR ،روش in-situ hybridization نیز امروزه در تشخیص بیماری مورد استفاده قرار می گیرند. برای شناسایی دقیق ویروس ، از روشهای میکروسکوپ الکترونی و روش RT-PCR در اغلب آزمایشگاههای تشخیص استفاده می شود .

سازمان OIE اهمیت انواع روشهای تشخیصی را جهت سرویلانس، ردیابی و تشخیص قطعی بیماری بصورت جدول ذیل ارائه داده است(جدول(۵-۱) (OIE,2006).

جدول ۵-۱: روشهای تشخیص ردیابی و سرویلانس ویروس نکروز غدد زیر پوستی و بافت خونساز

روش	سرویلانس				تشخیص احتمالی	تشخیص قطعی
	لارو	پست لارو	جوان	بزرگسالی		
نشانیهای بالینی	D	D	D	D	D	D
سنجش زیستی	D	D	D	D	C	C
مشاهده مستقیم با میکروسکوپ نوری	D	D	D	D	D	D
آسیب شناسی بافتی	D	D	C	C	A	A
میکروسکوپ الکترونی	D	D	D	D	C	C
سنجش بر پایه آنتی بادی	D	D	D	C	D	D
گاوشگر in situ DNA	D	D	B	B	A	A
PCR	A	A	A	A	A	A
Sequenc	D	D	D	D	D	A

کنترل و پیشگیری

تا کنون واکسنی بر ضد این بیماری ساخته نشده است ، همچنین مواد شیمیایی خاصی در جهت غیر فعال نمودن ویروس یا افزایش سیستم ایمنی میگوها در برابراین ویروس شناسایی نشده است (افشار نسب، ۱۳۸۶) . بهمین دلیل یکی از بزرگترین مشکلات بیماری ویروس نکروز عفونی غدد زیر پوستی و بافت خونساز ریشه کنی آن در مراکزی است که ناگهان مبتلا شده اند . همچنین مشاهده شده که ویروس IHHNV نسبت به کلیه روشهای معمول ضد عفونی از قبیل کلر ، آهک ، فرمالین و سایر مواد ضد عفونی کننده در مراکز تکثیر و پرورش مقاومت بالایی دارند، لذا از بین بردن کامل ذخایر ، ضد عفونی کامل مرکز تکثیر و پرورش، و پرهیز از ذخیره سازی مجدد با میگوهایIHHNV مثبت با استفاده از روشهای غربالگری یا استفاده از میگوهایSPF توصیه می شود (فائو، ۱۳۸۶) .

۱۰-۱- بیماری سر زرد (Yellow – head disease)

عامل بیماری

ویروس ایجاد کننده بیماری به صورت یک ویروسRNA تک رشته ای(ssRNA)، گرد دارای پوشش ودر سیتوپلاسم قرار گرفته است .اندازه قطر آنnm۶±۴۴ و طول آنnm ۱۳± ۱۷۳ می باشد اندازه نوکلئو کپسید nm ۱۵ در قطر وnm ۸۰-۴۵۰ در طول می باشد

در سال ۲۰۰۴ کمیته طبقه بندی ویروسها(*ICTV*) عامل ایجاد بیماری سرزرد را از جنس okavirus متعلق به خانوادهRonaviridae و راستهNidoviridles طبقه بندی نمود. تاکنون شش ژنوتیپ از این ویروس شناسایی شده که عبارتند از : سویه اصلی از تایلند(YHV1) سویه دوم از استرالیا(YHV2) سویه سوم که هنوز بیماریزایی آن به اثبات نرسیده از اندونزی(YHV3) ، سویه چهارم مجدداً از تایلند که موجب کاهش رشد در میگو می شود(YHV4) ، سویه پنجم از هند(YHV5) و سویه ششم از مادا گاسکار(YHV6) می باشد .

ویروس می تواند تا ۷۲ ساعت در آب زنده ماند ه و بیماریزایی خود را حفظ نماید . ویروس در درجه حرارت ۶۰درجه سانتی گراد به مدت ۱۵دقیقه غیر قابل فعال می شود . همچنین کلر بادوز ppm ۳۰ویروس را غیر قابل فعال می کند. (افشار نسب، ۱۳۸۶)

پرا کندگی جغرافیایی و میز بانهای حساس ویروس

ویروس سرزرد از جائیکه میگوی ببری سیاه پرورش داده می شود نظیر تایلند ، تایوان ، اندونزی ، مالزی ، چین ، فیلیپین و ویتنام گزارش شده است (فائو، ۱۳۸۶) . آلودگی را بصورت تجربی در میگوهای سفید غربی ، میگوی آبی ، P. aztecus , P.durarum،P.setifervs گزارش نموده اند(افشارنسب، ۱۳۸۶، فائو، ۱۳۸۶، Ausvet, 1997).

همچنین میگوی موزی و متاپنئوس انسیس بطور موفقیت آمیزی در مطالعات آزمایشگاهی آلودگی را نشان دا ده اند ، اگرچه آنها در حوضچه های پرورشی نسبت به ویروس سرزرد از خود مقاومت نشان دا ده اند .(Ausvet,1997)

نشا نه های بالینی

ویروس سرزرد میگوهای جوان (۵تا ۱۵گرمی) را تحت تاثیر قرار می دهد .میگو های مبتلا به مدت ۲ روز بطور بی رویه و بشدت غذا می خورند و سپس تغیه آنها ناگهان متوقف شده و در کناره های استخر شنا می کنند . چند ساعت قبل از مرگ هپاتو پانکراس آنها متورم شده و به رنگ زرد روشن در می آیند(تصویر ۷-۱) و در میگوهای مبتلا رنگ پریدگی کلی مشاهده می شود . بعد از ظهور علائم بالینی در عرض سه روز تلفات کلی شروع می شود . و پس از ۳تا ۹ روز ۱۰۰درصد تلفات را در بر می گیرد (افشار نسب، ۱۳۸۶، فائو، ۱۳۸۶، . (Ausvet,1997 .

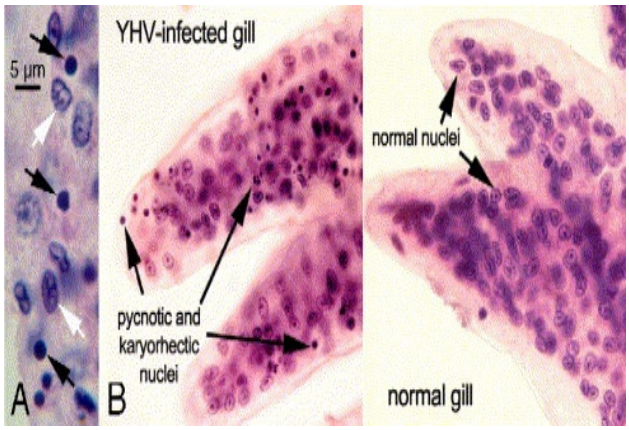
تصویر۷-۱: علائم ظاهری بیماری سرزرد

آسیب شناسی بافتی

در آسیب شناسی بافتی تعدادی مناطق نکروز با هسته بر آمده و بزرگ در بافتهای آلوده دیده می شود . همچنین گنجیدگیهای آبی رنگ ، گرد یا دارای شکلهای نا منظم در اطراف هسته بخصوص در هموسیتها، دستگاه لنفاوی، سلولهای اپی تلیال و سلولهای پیلار رشته های ثانویه آبشش و همچنین در قسمت بافت عضلات ، معده و غدد آنتنی ، اعصاب و گانگیونهای عصبی دیده می شود .

اولین تغییرات سلولهای آلوده باYHV شامل هیپرتروفی هسته، کاهش و مهاجرت کروماتین ها ، جابجایی هسته به طرف غشاء سلول می باشد . سپس سلولها تخریب شده و چند ناحیه نکروز در سطح آنها بصورت پرا کنده دیده می شود(تصویر ۸-۱).

در میان اندامهای آلوده تغییرات مشخص هیستوپاتولوژیکی را می توان در غدد لمفاوی آبششها و روده میانی مشاهده نمود (افشار نسب ۱۳۸۶) .



تصویر۸-۱: مقایسه سلولهای آبشش سالم (سمت راست) و مبتلا بیماری سر زرد (وسط و سمت چپ)

تشخیص بیماری

تشخیص احتمالی بیماری از طریق مشاهده علائم ظاهری، تاریخچه بیماری در مزارع پرورشی ناحیه و یا گونه های پرورشی ممکن است. روش رنگ آمیزی هموسیت ها برای تشخیص سریع بیماری در مراحل اولیه با استفاده از رنگ رایت و یا گیمسا و مشاهده هسته های پیکنوزه و یا کاریورکسی شده در زیر میکروسکوپ نوری امکان پذیر می باشد (Ausvet1997). همچنین ویروس سرزرد را می توان از طریق تست RT-RCR یا پروب های dot – blot ودر میگوهای در حال مرگ با استفاده از آزمایشات آسیبی شناسی بافتی تشخیص و با روش میکروسکوپ الکترونی بیماری را تائید نهایی کرد (Ausvet,1997 ، افشار نسب، ۱۳۸۶) .

با این حال سازمان OIE اهمیت روشهای مختلف تشخیصی را جهت تشخیص ، ردیابی و سرویلانس به صورت جدول ذیل طبقه بندی کرده است (جدول۶-۱)) (OIE,2006) .

جدول٦-۱: روشهای تشخیص ردیابی و سرویلانس ویروس سرزرد

روش	سرویلانس				تشخیص احتمالی	تشخیص قطعی
	لارو	پست لارو	جوان	بزرگسالی		
نشانیهای بالینی	D	D	C	C	C	D
آسیب شناسی بافتی	D	D	C	C	A	B
میکروسکوپ الکترونی	D	D	C	C	D	A
سنجش زیستی	D	D	D	D	C	B
سنجش بر پایه آنتی بادی	D	D	C	C	A	B
PCR	A	A	A	A	A	A
گاوشگرin situ DNA	D	D	C	C	A	A
Se quence	D	D	D	D	D	A

کنترل و پیشگیری

ماده ای که بتواند در مزارع پرورش میگو استفاده شده و از بروز بیماری جلوگیری کرد، هنوز شناسایی نشده است. بنابراین بهترین روش به منظور کنترل و پیشگیری از بیماری استفاده از مولدین SPF و رعایت اصول بهداشتی در مزارع و سالنهای هچری می باشد (افشار نسب، ۱۳۸۶) که عبارتند از : آماده سازی استخرها از طریق ضد عفونی و حذف ناقلین، ذخیره سازی یا ضدعفونی آبی که به منظور تعویض بکار برده می شود با کلر (ppm ۳۰ ماده فعال)، تصفیه آب ورودی به استخر با تورهای ریز، پرهیز از دادن غذای تازه ، ضدعفونی استخرهای آلوده با ویروس ، پایش به روشPCR و استفاده از پست لاروهای عاری از ویروس برای ذخیره سازی استخرها می باشد (فائو ، ۱۳۸۶).

۱۱-۱- سندرم تورآ (TSV)

عامل بیماری

ویروس ایجادکننده بیماری از خانواده Dicistroviridae می باشد که اندازه آن ۳۲ نانومتر است ویروس بدون پوشش و بیست وجهی بوده و دارای بارمثبت است و به صورت ssRNA (single stranded RNA)می باشد ژنوم آن ۱۰/۲۰۵ نوکلئوتید درست شده و دارای سه پروتئین رمزدار بنام های VP1 ، VP2 و VP3می باشد، که وزن هر کدام به ترتیب برابر ۴۰ ، ۵۵و ۲۴ کیلو دالتون است بر اساس مطالعات مولکولی ویروس دارای سویه های مختلفی بوده و در هر منطقه سویه خاصی ایجاد بیماری می کند ، بطوریکه تاکنون سه سویه آمریکایی – آسیای جنوب شرقی و سویه بلیز(Belize) در آن مناطق موجب بروز بیماری شده است (افشار نسب، ۱۳۸۶)

پراکندگی جغرافیایی و میزبانهای حساس ویروس

اولین بار در سال ۱۹۹۲ ، ویروس سندرم تورآ در مزارع اطراف رودخانه تورآ در اکوادور شناسایی شد و سپس در عرض سه سال به سرعت در سرتاسر آمریکای لاتین و شمالی منتشر گردید. در سال ۱۹۹۳ ویروس سندرم تورآ سرتاسر اکوادور تا پرو، در سال ۱۹۹۴ کلمبیا، هندوراس ، کواتمالا ، السالوادور ، نیکاراگوئه ، هاوائی ، فلوریدا و برزیل، و در سال ۹۶- ۱۹۹۵ مکزیک ، تگزاس ، کارولینای جنوبی و برزیل و سپس از سال ۱۹۹۹ در آسیا در چین و تایوان ، و در سال ۲۰۰۳ در تایلند شیوع یافته است (فائو ۱۳۸۶). آلودگی طبیعی به سندرم تورا در میگوهای پرورشی سفید غربی ، P.aztecus , P.stylirostris ,P.setiferus در آمریکا اثبات شده است .

آلودگی تجربی در P.stylirostris , P.setiferus , P.schmitti , P.vannamei همراه با نشانیهای بالینی بیماری بوده است در صورتیکه p.aztecus,P.dourarum,P.Japonicus,P.monodon نسبت به بیماری مقاوم بوده اند (Ausvet, 1997).

ویروس ایجاد کننده بیماری در تمام مراحل رشد میگو از پست لاوری تا بزرگسالی با میگو بوده و ایجاد بیماری می کند ولی مراحل لاروی و تخم میگو حساسیتی به بیماری ندارد (افشار نسب، ۱۳۸۶ ، Ausvet, 1997)

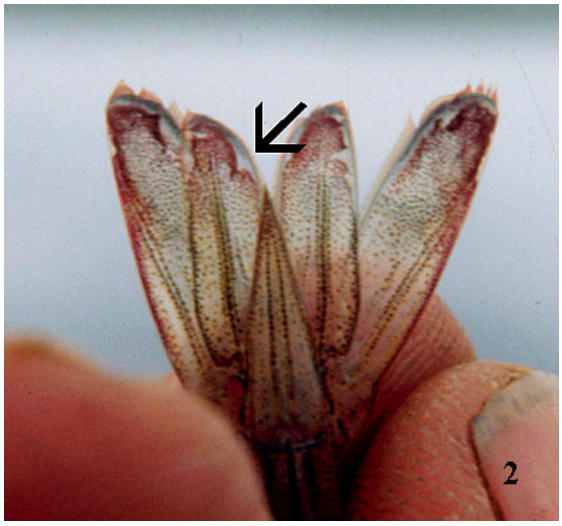
راههای انتقال بیماری

مکانیسم انتشار ویروس سندرم تورآ هنوز ناشناخته است (فائو ۱۳۸۶) ، اما عوامل متعددی در انتقال بیماری به صورت افقی نقش دارند که مهمترین آنها عبارتند از پرندگان دریایی ، حشرات آبی و محصولات دریایی (افشار نسب ، ۱۳۸۶) . تحقیقات اخیر نشان داده که مکانیسم انتقال از طریق حشرات و پرندگان ممکن است مسیر یکسان را از نظر مبتلا شدن داشته باشد . همچنین در نمونه های بافتی حشرات و شیرابه های حاوی ویروس این حشرات در شرایط آزمایشگاهی موجب مبتلا شدن میگوهای سفید غربی SPF شده است (فائو ، ۱۳۸۶) . بطوریکه حشرات آبی نقش ناقل مکانیکی را در انتشار بیماری داشته و از طریق خوردن لاشه های آلوده بیماری را منتقل می کنند (افشار نسب ، ۱۳۸۶ : فائو، ۱۳۸۶) .

انتقال بیماری به صورت انتقال از مادر به پست لاروها نیز مشاهده گردیده ولی هنوز به صورت تجربی به اثبات نرسیده است (افشار نسب، ۱۳۸۶).

علائم بالینی

ویروس سندرم تورآ در عرض دو تا چهار هفته بعد از ذخیره سازی استخرها یا تانک ها (۱/۵-۱ گرم وزن بدن) سبب ابتلا میگوهای جوان می شود که بیشتر در زمان پوست اندازی اتفاق می افتد . مرحله حاد بیماری ، قبل از پوست اندازی اتفاق می افتد که در این رابطه ضعیف شدن میگوها ، نرم شدن پوسته ، خالی بودن دستگاه گوارش و انتشار رنگدانه های قرمز رنگ بویژه در ناحیه دم (به این لحاظ نام عمومی آن بیماری دم قرمز است) مشاهده می شود(تصویر ۹-۱) . معمولاً چنین میگوهایی در طول پوست اندازی (۹۵-۵درصد) می میرند ، اگرچه علت نوسان در میزان بازماندگی ناشناخته باقی مانده ولی میگوهای بالغ نسبت به میگوهای جوان مقاومت بیشتری دارند . میگوهایی که زنده می مانند علائم بهبودی را نشان داده و وارد مرحله مزمن بیماری می شوند . روی کوتیکول میگوها ضایعات متعدد ، پراکنده ، نامنظم و ملانیزه (تیره رنگ) مشاهده خواهد شد . امکان دارد این ضایعات ماکروسکوپی یا میکروسکوپی در طول پوست اندازی کم شود و میگوها رفتار طبیعی نشان دهند . میگوهایی که بصورت مزمن باقی می مانند به عنوان ناقل های بدون علامت برای تمام زندگی محسوب می شوند (فائو ، ۱۳۸۶) .



تصویر ۹-۱: میگوی آلوده به سندرم تورا ، دیواره دم حالت نکروز در سلولهای اپتلیال

آسیب شناسی بافتی

اندام های اصلی میگو که به ویروس حساس بوده و در آنجا تکثیر یافته و بیماریزایی خود را بروز می دهند عبارتند از : اپی تلیوم کوتیکول (یا هیپودرم) ، روده ابتدائی و انتهایی ، آبشش، اندام های حرکتی و در پاره ای

اوقات بافت پیوندی ، بافت هماتوپتیک ، ارگان لنفاوی و غدد آنتنی می باشد . سایر اندام ها از جمله هپاتوپانکراس ، روده میانی ، گانگلیونهای عصبی و اعصاب شکمی حساسیتی به ویروس نداشته و آلوده نمی شوند .

در نقاط نکروزه حاصل از ویروس در اندام های مختلف سیتوپلاسم سلولهای آلوده قرمز رنگ ، هسته ها متورم ، اجسام کروی شکی ، با اندازه ۱ تا ۲۰ میکرومتر و با رنگ قرمز تا آبی دیده می شود . نقاط نکروزه و هسته های متورم در رنگ آمیزی Fuelgen واکنش مثبت داشته و رنگ سبز تولید می کنند و مشخص کننده وجود DNA در این اجسام می باشد . در صورتیکه اجسام گنجیدگی Fuelgen منفی بوده و نشان دهنده وجود RNA ویروس در این اجسام می باشد . وجود هسته های متورم و بزرگ و گنجیدگیهای کروی شکل در مراحل حاد و تحت حاد بیماری ظاهری قرمز خال مانند به این نقاط می دهد . همچنین در حالت مزمن زخم های روی کوتیکول حالتی شبیه به بیماری نرمی پوسته باکتریایی دارد (افشار نسب، ۱۳۸۶).

راههای تشخیص بیماری

اگرچه برای تشخیص و شناسایی بیماری از روش های استاندارد بافت شناسی و مولکولی استفاده می شود ، ولی در حال حاضر بهترین روش تشخیص ویروس ، کاربرد پروب های DNA همراه با برش های پارافینی است .

سازمان OIE اهمیت و درجه روشهای تشخیصی بیماری رابه صورت جدول ذیل ارائه کرده است(جدول ۷-۱) .(OIE,2006)

جدول۷-۱: روشهای تشخیص ، ردیابی و سرویلانس ویروس سندرم تورآ

روش	سرویلانس				تشخیص احتمالی	تشخیص قطعی
	لارو	پست لارو	جوان	بزرگسالی		
نشانیهای بالینی	D	D	C	C	B	C
آسیب شناسی بافتی	D	B	B	B	A	A
میکروسکوپ الکترونی	D	D	D	D	C	C
سنجش زیستی	D	D	D	D	C	C
سنجش بر پایه آنتی بادی	D	D	C	C	B	B
RT-PCR	A	A	A	A	A	A
گاوشگر **in situ DNA**	D	D	B	B	A	A
Sequence	D	D	D	D	D	A

کنترل و پیشگیری

بر اساس آخرین اطلاعات، واکسن بیماری ویروس سندرم تورآ تهیه گردیده و نتایج موفقی نیز داشته است ولی هنوز به صورت تجارتی قابل دسترس نمی باشد . همچنین تاکنون مواد شیمیایی یا تحریک کننده سیستم ایمنی که بتواند از بروز بیماری پیشگیری نماید ، بطور اختصاصی شناسایی و تأیید نگردیده است (افشار نسب، ۳۸۶).

امکان ریشه کنی بیماری ویروسی سندرم تورآ وجود دارد که بستگی بالایی به معدوم سازی ذخیره های مبتلا شده ، ضد عفونی مرکز پرورش ، پرهیز از ورود مجدد ویروس (از مراکز نزدیک ، میگوهای وحشی وحاملین) و ذخیره سازی توسط پست لاروهای فاقد ویروس سندرم تورآ دارد، که از مولدین عاری از ویروس سندرم تورآ بدست می آید . سایر روش های توصیه شده برای کنترل نمودن ویروس عبارتند از : استفاده از میگوهای آبی مقاوم ، نگه داشتن شرایط زیست محیطی مساعد ، استفاده هفتگی از آهک آبدیده (CaOH) به میزان ۵۰ کیلوگرم در هر هکتار ، کشت توام با ماهی می باشد (فائو ، ۱۳۸۶) .

۱۲-۱- بیماری مونودون با کلوویروس (MBV)

عامل بیماری

این بیماری توسط ویروسی از خانواده باکلو ویروس (Baculovirus) ایجاد می شود که آن را به نامهای مختلف از جمله (singly enveloped nuclear polyhedrosis) PmSNPV یا virus from P.monodon یا P.monodonNPV یا PemoNPV می نامند .

بهترین نام برای این بیماری بر اساس گزارش کمیته تاکسونومی ویروسها (ICTV) نام « PemoNPV » می باشد ولی با توجه به اینکه از ابتدا بیماری به نام MBV نامگذاری شده است، هم اکنون نیز بیماری را به همین نام می شناسد .

ویروس ایجاد کننده بیماری بصورت گرد ، دارای کپسول (capsid) بوده و در اطراف آن پوشش (envelope) قرار گرفته است . قطر آن ۴nm ±۷۵ و طول آن nm ۳۳±۳۲۴ می باشد . این ویروس از گروه ویروسهای DNA بوده و در زیر گروه A جنس Baculovirus قرار می گیرد . (افشار نسب، ۱۳۸۶).

پراکندگی جغرافیایی و میزبانهای حساس

بیماری مونودون باکلوویروس بطور وسیعی از میگوهای پنائیده نیمکره غربی و نیز گزارشاتی یا مشاهداتی در کشورهای اقیانوس آرام و هند مثل چین ، تایوان ، فیلیپین ، مالزی ، سنگاپور ، تایلند ، سری لانکا ، هند ، اندونزی و استرالیا وجود دارند (Gabried and Felipe, 2000; Lighther, 1996). در کشورهای خاورمیانه بیماری مونورون با کلوویروس در کشورهای کویت ، عمان و اسرائیل شناسائی شده اند (Lighther, 1996)، و در کشور

ایران در سال ۱۳۸۰ از میگویی ببری سبز (P.semislcatus) از خلیج فارس گزارش گردیده است (افشار نسب، ۱۳۸۶).

این بیماری اولین بار در اوایل دهه ۱۹۸۰ در میگوی مونودون مشاهده گردید، اما در حال حاضر بیماری در تمام جمعیت های گونه های مختلف میگو از قبیل میگوی موزی ، میگوی ببری سبز ، میگوی سفید هندی – میگوی پنی سیلاتوس ، میگوی پلبجوس ، میگوی کراتوروس و میگوی وانامی شناخته شده است (Lighther, 1996)

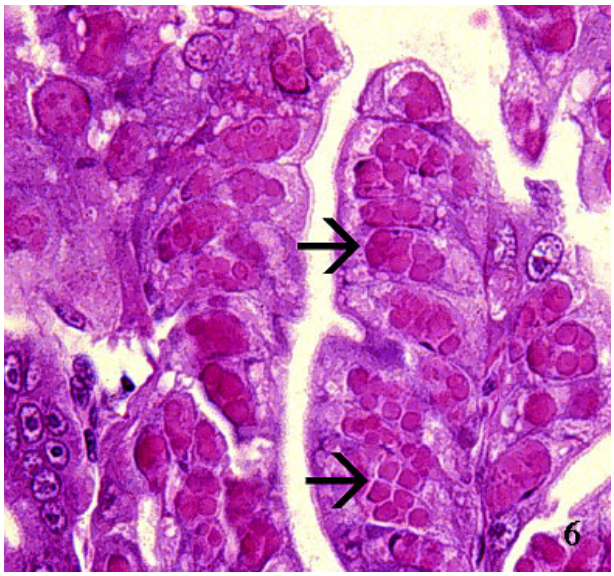
علائم بالینی

مشاهدات بالینی نشان می دهد که میگو های آلوده به این بیماری بی حال و بی اشتها بوده و تمایلی به حرکت ندارند و همچنین از نظر اندازه از میگوهای سالم کوچکتر می باشند . بندرت تمیز بوده و اغلب در سطح بدن و آبشش ها دارای لکه های فولینگ (fouling) بوده که توسط ارگانیسم هایی نظیر Oseilliatoria , zoothamnium و همچنین مواد آلی پوشیده شده اند (افشارنسب، ۱۳۸۶) .

آسیب شناسی بافتی

در مقاطع میکروسکوپی تهیه شده از بافتهای پارافیند با رنگ آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین وفلوکسین (H&E/phloxine) آسیبهای ناشی از بیماری MBV را می توان در سلولهای هپاتوپانکراس و اپی تلیوم سلولهای روده میانی مشاهده نمود .

در اولین مرحله تغییرات سلولی ، هسته های هیپرتروفی شده همراه با تغییرات و مهاجرت کروماتینها ، جابجایی هستک از مرکز و رقیق شدن مرکز سلولها را می توان مشاهده نمود . تغییرات و مهاجرت کروماتین ها در نتیجه متراکم شدن مولد بازوفیلی در اطراف هسته ایجاد می گردد . در مرحله بعد، در تغییرات سلولی هستکها بطور کامل تجزیه شده و هسته بزرگ و بصورت هیپرتروفی مشاهده می شود در این مرحله هسته دارای یک یا تعدادی گنجیدگی قرمز رنگ (eosinophilic) بوده، به نظر می رسد که مرحله اولیه توسعه و ایجاد گنجیدگی های سلولی باشد . در مرحله پیشرفته ، هسته کاملاً هیپرتروفی شده و به نظر می رسد اندازه آن دو برابر هسته در حالت طبیعی است . همچنین تعدادی گنجیدگی های قرمز رنگ به صورت بسته هایی در هسته هیپرتروفی شده مشاهده می شود(تصویر ۱۰-۱) (افشار نسب ، ۱۳۸۶).



تصویر ۱۰-۱: سلولهای هپاتوپانکراس در مرحله پیشرفته آلودگی

تشخیص بیماری

از مشاهده علائم بالینی و روشهای هیستوپاتولوژی ، لام مرطوب تهیه شده از بافت هپاتوپانکراس و مدفوع میگوهای آلوده ، روشهای مولکولی از قبیل Insitu- hybridization . Dot – bolt- hybridization ,DNA probes to MBV,PCR در تشخیص بیماری مورد استفاده قرار می گیرند (افشار نسب ، ۱۳۸۶) .

با این حال سازمان OIE درجه اهمیت روشهای تشخیص و ردیابی و سرویلانس MBV را به صورت جدول ذیل می دارد(جدول۸-۱) (OIE,2006).

جدول۸-۱: روشهای تشخیص ، ردیابی و سرویلانس ویروس مونودن با کلوویروس

روش	سرویلانس				تشخیص احتمالی	تشخیص قطعی
	لارو	پست لارو	جوان	بزرگسالی		
نشانیهای بالینی	C	D	D	D	D	D
آسیب شناسی بافتی	B	B	C	C	A	A
میکروسکوپ الکترونی	D	D	D	D	D	A
سنجش زیستی	D	D	D	D	C	C
سنجش بر پایه آنتی بادی	D	D	D	C	D	D
PCR	A	A	A	A	A	A
گاوشگر in situ DNA	C	C	C	C	A	A
Sequence	D	D	D	D	D	A

کنترل و پیشگیری

در صورتیکه بیماری در مراکز تکثیر شناسایی شود ، با شستشوی تخم ها یا ناپلی به شرح ذیل می توان بیماری را پیشگیری و کنترل نمود .

الف) تخم ها را بعد از رها شدن از میگو بوسیله یک توری جمع آوری نموده و با آبی که قبلاً ضد عفونی شده شسته و سپس با فرمالین با دوز ppm ۲۰۰ به به مدت ۳۰ ثانیه و آیدین با دوز ppm ۲۰ به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شده و مجدداً با آبی که ضدعفونی شده است به مدت ۱-۲ دقیقه شسته و به تانکهای موجود در هچری معرفی می کنیم .

ب) در روش دیگر که با جمع آوری ناپلی انجام می شود . بعد از جمع آوری ناپلیها آنها را با آبی که ضدعفونی شده به مدت ۱ تا ۲ دقیقه شستشو و سپس با فرمالین با دوز ppm ۳۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه و یدوفور با دوز ppm ۵۰ به مدت ۳۰ ثانیه و آب به مدت ۱ تا ۲ دقیقه شسته و به تانکهای موجود در هچری معرفی می کنیم .

استفاده از این دو روش در شستشوی تخمها و ناپلی ها تا حدود زیادی موجب کاهش آلودگی شده و خطر بیماری را کاهش می دهد. با توجه به اینکه این بیماری از طریق تخم نیز منتقل می شود ، لذا آزمایش مولدین با PCR قبل از وارد شدن به هچری الزامی است (افشار نسب ، ۱۳۸۶).

۱۳-۱- بیماری شبه پارو ویروسی هپاتوپانکراس (HPV)

عامل بیماری

این بیماری توسط ویروسی از خانواده پاروو ویروس (parvovirus) ایجاد می شود که اندازه آن nm ۲۲/۲۴ و از ویروسهای DNA دار می باشد . ویروس ایجا د کننده بیماری در هستک تجمع یافته و گنجیدگی ایجاد شده توسط آن از نظر آسیب شناسی سلولی شبیه پاروویروسهایی است که در حشرات و مهره داران ایجاد بیماری می کند (افشار نسب ، ۱۳۸۶) .

پراکندگی جغرافیایی و میزبانهای حساس ویروس

آلودگی به ویروس شبه پاروهپاتو پانکراس برای اولین بار از نمونه های میگوهای پنائیده بدست آمده از کشورهای چین ، کویت ، سنگاپور و فیلیپین گزارش گردید ه است . HPV انتشار جغرافیایی وسیعی در منطقه اقیانوس آرام – هند دارد و در تعدادی از گونه های میگوهای پرورشی در کره ، تایوان ، فیلیپین ، مالزی ، اندونزی و استرالیا تا کینا مشاهده شده است . HPV در قاره آمریکا (جائیکه فرض بر آنست بیماری بومی آن منطقه نبوده و بعداً به آنجا وارد شده است) معمولاً همراه با میگوهای پنائیده وارداتی جهت پرورش از منطقه اقیانوس آرام – هند وارد شده است (Lightner, 1996). این یافته ها بیانگر آن است که HPV در حال حاضر ممکن است انتشار جهانی داشته باشد (Lightner et al, 1993).

علائم بالینی

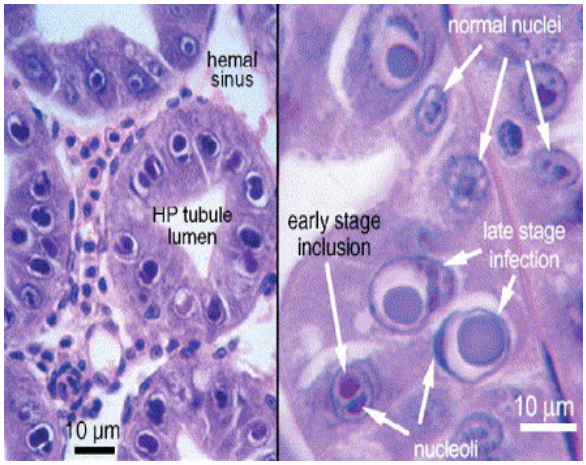
بر اساس مشاهدات مزارع آلوده ، تاریخچه و علائم ظاهری آن ، این بیماری بیشتر در میگوهای جوان بروز می کند. علائم بیماری در این دسته از میگوها شامل کاهش رشد ، بی اشتهایی ، کاهش نوک زدن به غذا ، افزایش باکتریهایی رسوب کننده بر روی سطح بدن و آبشش میگوها می باشد (افشار نسب، ۱۳۸۶) . اگرچه این نشانیها مختص به HPV نمی باشند (Lighther, 1996 ; Cattap et al, 2003). Flegel و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که درجه آلودگی به HPV بطور معنی داری با کندی رشد میگوی مونودون در تایلند مرتبط می باشد و اکثر میگوهای آلوده به HPV دارای رشد خیلی کند بوده و توقف رشد را در طول کل ۶ سانتی متر می دارند(تصویر۱۱-۱) . به رقم و عدد درآوردن تلفات ناشی از HPV مشکل است زیرا همه گیریهایی با تلفات شددی در بیمرای HPV بندرت مشاهده می شوند و شدت تلفات در چنین همه گیریهایی معمولاً ناشی از چند عامل بیماریزای عفونی می باشند (Lighther, 1996) .

تصویر ۱۱-۱: مقایسه میگوهای سالم و میگوهای آلوده به بیماری HPV ، میگوهای سالم بزرگتر از میگوهای بیمار می‌باشند.

آسیب شناسی بافتی

مشاهدات آسیب شناسی با میکروسکوپ نوری نشان می دهد که مهمترین اندامی که مورد هجوم ویروس قرار گرفته ، هپاتوپانکراس ، سلولهای تشکیل دهنده اپی تلیال و مجاری آن از همه سلولها بیشتر آسیب می بینند و هیچ ارگان و اندام دیگری با این بیماری آلوده نمی شود . در ابتدای بیماری سلولهای آسیب دیده دارای هیپرتروفی هسته ، هستکها در هسته جابجا شده و به نزدیکی غشاء مهارجت نموده اند . همچنین مهاجرت کروماتین ها و ایجاد گنجیدگی های داخلی هسته در سلولها مشاهده می شود(تصویر۱۲-۱) .

در عفونت های خفیف ، گنجیدگی ها معمولاً در سلولهای انتهایی مجاری هپاتوپانکراس مشاهده می شوند و بندرت می توان آنها را در قسمت های میانی یا انتهایی مجاری هپاتوپانکراس مشاهده نمود . اما در عفونت های شدیدی بیش از ۹۰٪ سلولهای اصلی هپاتوپانکراس آلوده شده و چهار نوع سلول هپاتوپانکراس که شامل سلولهای B , R , F , E هستند آلوده می شوند (افشار نسب ، ۱۳۸۶).



تصویر۱۲-۱: هپاتوپانکراس مسگوس آلوده به HPV که دارای کنجیدگیهای بازوفیلیک و بزرگ میباشد.

تشخیص بیماری

امکان تشخیص بیماری از طریق مشاهده علائم ظاهری و گنجیدگیهای بیماری با روش رنگ آمیزی گیما می باشد . تشخیص این بیماری از طریق رنگ آمیزی با گیما با دقت بالایی همرا هبوده که مشابه به روش آسیب شناسی بافتی می باشد . از روش آسیب شناسی بافتی ، روش های مولکولی PCR و ژن پروبها نیز در تشخیص بیماری استفاده شده اند که دارای دقت بسیار بالائی می باشد (افشار نسب، ۱۳۸۶) .

کنترل و پیشگیری

استفاده از مولدین عاری از بیماری در کنترل و پیشگیری از بیماری بسیار مهم می باشد . همچنین با توجه به اینکه بیماری را می توان براحتی در گروههای تولید با روش رنگ آمیزی گیمسا تشخیص داد ، لذا ضروری است قبل از ذخیره سازی نسبت به عاری بودن لاروها از بیماری HPV مطمئن بود (افشار نسب، ۱۳۸۶) .

۱۴-۱- بیماریهای باکتریایی

بسیاری از بیماریهای گزارش شده در مراحل مختلف زندگی میگوهای پنائیده ، مربوط به بیماریهای باکتریایی است . تعدادی از بیماریهای باکتریایی عامل اولیه اند ، ولی اکثر آنها به شکل ثانویه بروز می کنند (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

بیماریهای باکتریایی ممکن است باعث ایجاد طیف وسیعی از مشکلات از قبیل مرگ و میر گروهی تا کاهش رشد و مرگ و میر انفرادی را باعث می شوند . گونه های ویبریو مهمترین عامل بیماریزای باکتریایی میگو می باشد . گونه های ویبریو یک باکتری آبزی است که انتشار وسیعی در آبهای شیرین، خورها و آبهای دریایی دارند . بیش از ۲۰ گونه ویبریو تشخیص داده شده اند . برخی از این گونه ها عامل بیماریزای انسانی هستند (مثل ویبریوکلرلا ، ویبریو پاراهمولیتیکوس و ویبریو ولنیفیکوس) در حالیکه برخی دیگر از گونه ها برای آبزیان از جمله میگو عامل بیماریزا می باشند (مثل ویبریوهاروی ، ویبریواسپلندیدوس ، ویبریوپنائیسیدا، ویبریوآ نگوئیلاروم ، ویبریوپاراهمولیتیکوس ویبریو ولنیفیکوس برخی از این باکتریها قسمتی از فلورمیکروبی ارگانیسم های دریایی بوده و جزو اکوسیستم هایشان می باشد . انواع مختلفی از درمانهای آب ، تراکم های بالای ذخیره سازی میگو ، مواد آلی فراهم شده از طریق تغذیه ، میگوهای مرده و غیره ،جمعیت باکتریایی را از وضعیت عادی خارج کرده و باعث تحریک رشد باکتریایی فرصت طلب در استخرها و تانکهای پرورشی میگو می گردند . باکتریهای فرصت طلب باعث ایجاد خسارتهای جدی در تولید میگو گردیده و اثرات بخصوصی مثل مرگ و میر میگو ، آسیب بافتی (نکروز) ، تغییر شکل بدن ، کندی رشد و تغییر شکل لارو را بهمراه دارند . همچنین این باکتریها به دستگاه گوارش هجوم آورده و عفونتهای مشخصی را در لارو در تمام سیستم دستگاه گوارش بوجود می آورند (Gabrid and Felipe , 2000) .

مهمترین بیماریهای باکتریایی میگو عبارتند از :

۱- بیماری ویبریوزیس

۲- بیماری باکتریایی درخشنده

۳- بیماری باکتریایی رشته ای

۱۵-۱- بیماری ویبریوزیس

عامل بیماری :

گونه های ویبریو مختلفی بعنوان عامل اصلی بیماریزا نسبت به میگوهای پنائیده گزارش شده اند از قبیل : ویبریو پاراهمولیکتوس ، ویبیوولینیفیکوس ، ویبیوآلژینولیتیکوس ، ویبریونرئیس ، ویبریوفلاویالیس (Gabried and Felipe, 2000).

پراکندگی جغرافیایی

گونه های ویبریو ظاهراً در تمام مناطق دنیا پراکنده اند . این عوامل از کلیه مناطق پرورش میگو ، دریاها و خلیج ها گزارش شده است . برخی از محققین بر این باورند که ویبریوها در حقیقت عوامل بیماریزای فرصت طلب هستند و این عوامل جزو میکروفلور طبیعی بدن میگو محسوب می شوند . ویبرویوزیس به عنوان یکی از مهمترین و جدی ترین بیماریهای ذکر شده در استخرها پرورش میگو مطرح می باشند، و می توانند سبب تلفات و خسارات قابل توجهی تا ۱۰۰٪ گردند (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷). برای این بیماری نامهای دیگر از قبیل: بیماری سپتی سمی باکتریایی پنائیده ، ویبروزیس پنائیده ، ویبریوزیس درخشان ، بیماری پا قرمز ، مرگ و میر توده ای لارو میگو گزارش گردیده است (Gabriel and Felipe , 2000)

علائم بالینی بیماری

علائم بالینی بیماری ویبریوزیس شامل ایجاد جراحات موضعی قهوه ای یا تیره و نکروز اندامهای ضمیمه و حرکتی بدن بوده، و همچنین با تغییر رنگ پوست در نتیجه ملانین تولیدی حاصل از سلولهای خونی می باشد .
در آلودگیهای شدید میگوها بشدت بی اشتها می شوند ، در نتیجه روده آنها عموماً خالی است و نوارهای مدفوعی که نشانه تغذیه کامل میگوست ، دیده نمی شود . این بیماری تمام سنین لاروی ، پست لاروی ، جوانی و بلوغ را تحت تأثیر قرار می دهد (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

تشخیص بیماری

مشاهده نشانیهای بیماری ، لام مرطوب ، بافت شناسی و کشت باکتریایی روشهای تشخیص ویبریوزیس هستند (Gabried and Felipe, 2000) اما جدا کردن گونه های ویبریو از نمونه های بافت یا همولنف میگوی در حال مرگ به صورت استریل به عنوان بهترین راه حل تشخیصی عنوان شده است .
از محیط های کشت تیوسولفات سیترات بایل ساکاروز آگار (TCBS) ، تریتیک سوی آگار (TSA) و غیره می توان استفاده کرد . پرگنه های به وجود آمده روی این محیط متغیرند و گونه های ویبریو را می توان با استفاده از رنگ این پرگنه ها و ویژگیهای بیوشیمیایی دیگر شناسایی کرد (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .
همچنین نکروز و آماس اعضای مختلف از قبیل اندام لمفوئیدی ، آبشش ها ، قلب ، هپاتوپانکراس و غیره به آسانی با روش آسیب شناسی بافتی قابل تشخیص می باشند (Gabried and Falipe, 2000) .

کنترل و پیشگیری

افزایش کیفیت آب ، کاهش میزان فلورباکتریایی توسط فیلتراسیون ، تصفیه آب ورودی به داخل تانکها (بویژه درمراکز تکثیر) ، استفاده از غذای کامل و تغذیه مناسب در مزارع پرورش ، کاهش جابجایی و دستکاری میگو و به حداقل رساندن سایر فاکتورهای استرس زا ، جهت پیشگیری از این بیماری پیشنهاد شده است (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

۱۶-۱- بیماریهای باکتریهای رشته ای

عامل بیماری

ویبریو هاروی و ویبرویوا سپلندیدوس را عامل این بیماری می دانند .

علائم بالینی

در این بیماری ، که اکثراً در مراکز تکثیر دیده می شود ، لاروها ضعیف و سفید کدر می شوند . لاروهای بسیار آلوده وقتی در تاریکی مورد مشاهده قرار می گیرند . دائماً پرتو سبز رنگی از خود ساطع می کنند . هنگامی که این لاروها زیر میکروسکوپ مشاهده می شوند ، بافتهای داخلی آنها به وسیلله باکتریهایی بسیار متحرک پوشیده شده است افزایش تعداد باکتریها تا حد خطرناک ، ممکن است به دلیل وجود غذا در آب باشد و لاروها بسرعت و تا ۱۰۰٪ موارد آلوده می شوند . این بیماری اکثراً از میگوهای مونودون ، مرگوئنسیس و سفید هندی و از مراحل تخم ، لاروی و پست لاروی گزارش شده است (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

روش تشخیص

جداسازی ویبریوهاروی روی محیط TCBS , TSA است . روی این محیط ها باکتریها حالت درخشنده ندارد .

پیشگیری و کنترل

جهت ، پیشگیری و کنترل رعایت مسائل بهداشتی کاملاً ضرروی است، از قبیل :

استفاده از اشعه ماوراء بنفش یا بکارگیری یکسری از فیلترها مانند فیلتر شنی ، فیلتر کیسه ای، همچنین با کلرزنی آب ورودی به کارگاه ، می توان از ورود باکتریهای درخشنده به داخل سیستم هچری جلوگیری کرد .

- سیفون و تمیز کردن مواد ته نشین شده وفضولات در تانکهای تکثیر ، زیرا این مواد می توانند به عنوان محیطی مناسب جهت رشد باکتریها مطرح باشند .
- ضد عفونی کردن میگوها، تمیز و ضدعفونی نمودن کلیه لوزام و تانکهای هچری به طوری که لوازم عاری از باکتری باشند (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

۱۷-۱- بیماری باکتریایی رشته ای

عامل بیماری

باکتریهای رشته ای لوکوتریکس موکور ، عامل اصلی شکل عمومی بیماری ، بیماری باکتریایی رشته ای است (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) . سایر جنس های باکتریایی رشته ای مثل Cytophaga sp Flexibacter sp . Thiothrix sp و یا Flavobactarium به تنهایی یا همراه بالوکوتریکس موکور بطور وسیعی در دنیا ، بخصوص در مراکز تکثیر و تانکهای نرسری و در مزارع پرورش به عنوان مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری رشته ای محسوب می شوند (مجیذی نسب ، ۱۳۷۷ ؛ Gabridel and Felipe, 2000) .

پراکندگی جغرافیایی

لوکوتریکس موکور و سایر باکتریهای رشته ای نامبرده شده ، جزو میکروارگانیسم هایی هستند که در آبهای دریایی وخورها دیده می شوند . این باکتریها در آن دسته از مزارع تکثیر و پرورش که از آب دریا با مواد غذایی بالا استفاده می کنند، شایعند . میگوها در تمام مراحل زندگی خود به این بیماری دچار می شوند (مجیدی نسب، ۱۳۷۷) .

علائم بالینی بیماری

در لاروهای بیمار ، اغلب رنگ پریدگی آبشش ها و عضلات بدن دیده می شود . میگوهای بیمار معمولاً با مشکلات تنفسی ، تغذیه ای ، حرکتی و پوست اندازی دیده می شوند . در آلودگیهای شدید ، رنگ آبشش ها با توجه به رنگ ذرات فضولات یا جلبکها تغییر می کند و از زرد تا قهوه ای یا سبز متفاوت می باشند (مجیدی نسب ۱۳۷۷) و همچنین این تغییر رنگ بستگی به حضور پیگمانهای موجود در باکتریهای رشته ای دارند (Gabried and Falipe, 2000). در درجات بالاتر عفونت ، ایجاد نکروز و تغییرات جدی بافت شناسی در بافت آبششی می گردند و بنابراین عفونت بر روی فعالیت سیستم تنفسی میگو اثر می گذارد و گاها باکتریهای رشته ای یک رشته محکمی برای چسبیدن دیگر میکروارگانیسم ها ، یا مواد آلی و فیلامنیت ها بوده، همچنین یک مانع برای تنفس طبیعی میگو ایجاد می کنند (Gabridel and felipe, 2000) . به همین دلیل علت مرگ میگوهای جوا ن و بالغ را معمولاً هیپوکسی و اختلال تنفسی ذکر می کنند (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

روش تشخیص

تهیه گسترش مستقیم و مرطوب از سطح بدن و آبشش ها ، باکتریهای رشته ای شکل ، بیرنگ و ظریفی را می توان در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰×مشاهده کرد (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷ ، Gabridel and Felipe 2000) . همچنین می توان از تکنیک بافت شناسی برای تشخیص این بیماری استفاده کرد . (Gabridel and Felipe, 2000)

پیشگیری

در کنترل و پیشگیری از بیماری رعایت موارد ذیل مهم می باشند . (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

- کاهش و کنترل اجرام و رسوبات کفزی و سطحی باسیفون و تعویض آب
- بالانگه داشتن کیفیت آب
- استفاده از غذا به میزان صحیح
- تعویض آب به میزان مورد نیاز و ضدعفونی آن
- ضدعفونی وسایل و تجهیزات مزارع تکثیر و پرورش

۱۸-۱- بیماریهای قارچی

قارچها عوامل فرصت طلب هستند . در سراسر دنیا حدود ۵۰۰ گونه قارچ از محیط های دریایی وخورها جداسازی شده است که این بیانگر ۱٪ تمام گونه های قارچ می باشد(Gabridel and Felipe, 2000)

قارچ ها به عنوان مزاحمترین عوامل موجود در سیستم های تکثیر و پرورش میگو مطرحند، و با گسترش جهانی در آب ، خاک و هوا ، مشکلاتی را برای پرورش دهنده گان میگو به وجود می آورند . معمولاً دو نوع بیماری قارچی در میگوهای پنائیده اتفاق می افتند .

الف) میکوز عمومی غیر التهابی در لاروها و پست لاروها

ب) میکوز موضعی در میگوهای جوان و بالغین که در حالت تیپیک با واکنش های التهابی همراه می باشد . (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

۱۹-۱- بیماری میکوز لاروی یا بیماری لاژنیدیوم

عامل بیماری

این بیماری بوسیله Leptolegnia marina , Phythium spp ,Sirolpidium spp . L.callinectes . Lagenidum spp ایجاد می شوند و به نامهای عمومی میکوزلاروی ، بیماری قارچی ، بیماری لاژیندیوم یا بیماری سیرولیپیدیوم نامیده می شوند .

(Gabridel and Felipe, 2000)

پراکندگی جغرافیایی

گونه های قارچی عامل بیماری ، ظاهراً در همه جا حضور دارند و بعضاً چندین گونه مشخص از این عوامل در مناطق جغرافیایی معینی مانند فیلیپین ، تایلند و مالزی گزارش شده است . قارچ های عامل میکوز لاروی از مزارع و مراکز تکثیر و پرورش میگو در آمریکا و بیشتر مناطق پرورشی گزارش شده اند .

منشأ عفونتهای قارچی لاروها می تواند مولدین تکثیر شده در سالنهای هچری باشد . میزبانهای ناقل در آب دریا نیز می توانند این عامل را منتقل کنند . بنابریان مدیریت بهداشتی و ضد عفونی میگوهای جوان و بالغی که به عنوان مولد وارد کارگاه تکثیر می شوند ، بسیار مهم هستند . این بیماری عمدتاً در لاروها و پست لاروهای میگو اتفاق می افتد و میگوهای مولد به عنوان حامل بظاهر سالم مطرح هستند (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

اثرات روی میزبان و نشانه های بیماری

مرگ و میر شدید تا ۱۰۰٪ جمعیت مبتلا، در مراحل لاروی بویژه مرحله زوآ ومایسیس دیده می شود. سطح وزوائد بدن و همچنین بافتهای داخلی میگو ، پوشیده از میسلیومهای (هایفه های) قارچی است . لوله های ترشحی از بدن میگو به خارج کشید ه شده و از انتهای آنها ژئوسپورهای متحرک خارج می شوند . در میگوهایی که بتازگی مرده اند ، این لوله های ترشحی بهتر دیده می شوند .

رشد قارچ در تانکهای تکثیر ، بسرعت و طی چند ساعت به وقوع می پیوندد . همین امر باعث می شود تا مرگ و میر شدید تا ۱۰۰٪ جمعیت طی ۴۸ ساعت بروز بکند . عفونت ابتدا با بی تحرکی لاروها آغاز می شود .

بر اساس مطالعات انجام شده ، بنئوس آزتکوس حساسترین گونه بوده و پس از آن گونه های پنئوس مونودون، پنئوس مرگوئنسیس و پنئوس ژاپوینکوس قرار دارند . البته تمام گونه های جنس پنئوس به این بیماری حساس بوده و به آن مبتلا می شوند(مجیدی نسب ، ۱۳۷۷).مشاهدات میکروسکوپی ، روش لام مرطوب و آسیب شناسی بافتی روشهای متداول برای تشخیص این بیماری می باشند (Gabridel and Felipe, 2000).

درمان

چندین روش دارو درمانی برای بیماری قارچی سخت پوستان گزارش شده است . در حال حاضر دو ماده شیمیایی اکسالات مالا شیت گرین و ترفلان مورد استفاده می باشند . امروزه معتقدند که موثرترین مواد شیمیایی بر میکوزلاروی عبارت است از: مالا شیت گرین ppm ۰/۱ و ترفلان ppm ۲۰۰-۵ است (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

پیشگیری

- ضدعفونی وسایل و تانکهای پرورشی قبل از بهره برداری با ا ستفاده از فرمالین و کلرو نیز شستشوی آنها با مواد پاک کننده نظیر پودرهای شستشو (تاید) با غلظت ppm ۱۰۰ به مدت ۲۴ ساعت .
- کاهش تراکم لارو و پست لاروها و افزایش تعویض آب جهت تحریک پوست اندزای در میگو و همچنین سیفون کردن و تخلیه مواد ته نشین شده و میگوهای تلف شده .
- ضد عفونی تخم ها با مواد پاک کننده (Detergent) به مدت ۲ ساعت و باغلظت ppm ۲۰
- استفاده از ترفلان با دوز ثابت ppm ۰/۱ به مدت ۳-۲ روز در مناطق آلوده

- بررسی مداوم میگوها و تخم ها به وسیله میکروسکوپ (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷).

۲۰-۱- بیمارهای انگلی

بیماریهای تک یاخته ای

تک یاخته ها مجموعه جانوری سطح زی (Epibiotic) آزاد می باشند، که روی اجسام موجود در حوضچه ها ، دیواره ها ، بستر استخرها و یا بصورت همزیست سطحی روی بدن میگو زندگی می کنند . میگو در تمام مراحل زندگی ممکن است به این تک یاخته ها آلوده شوند . ولی بیشتر گزارشات مربوط به مراحل پست لاروی تا بلوغ می باشد . بر پایه بررسیهای اندام شده ، ظهور آلودگیهای تک یاخته ای در مزارع پرورش ، ناشی از سوء مدیریت است . این سوء مدیریت می تواند شامل گل آلودگی آب دریا ، پا ئین بودن اکسیژن محلول در آب و وجود مواد فاسد و بویژه باقیمانده غذا در کف حوضچه ها باشد .

آلودگی شدید آبشش ها به تک یاخته های همزیست سطحی ، به تنهایی یا همراه با سایر اجرام سطح زی ، ممکن است موجب تلفاتی در مخازن و حوضچه های پرورش میگو شود ، بویژه اگر الودگی شدید و میزان اکسیژن محلول پایئن تر از ۳ تا ۴ پی پی ام باشد . لاروهایی که روی بدنشان به میزان زیادی تک یاخته استقرار یافته باشد ، قادر به پوست اندازی نیستند . پست لاروها و میگوهای جوانی که آلودگی خفیف دارند ، به علت پوست اندازی سریع ، تک یاخته ها را به آسانی دفع کرده وتلفات در آنها کمتر دیده می شود اما در میگوهای بالغ به علت رشد کمتر و بطئی و کاهش تعداد پوست اندزای ، تک یاخته بسرعت حذف نمی شود و میزان تلفات در آنها نسبتاً زیاد است (مجیدی نسب ، ۱۳۷۷).

مهمترین عوامل تک یاخته بیماریزا عبارتند از :

زئوتامنیوم (zoothamnium)

به صورت پرگنه بوده ، دارای ساقه انقباضی است . آلودگی با این مژه دار در مراحل آخر مایسیس و پست لاروی اتفاق می افتد . این مژه دار روی پوست و آبشش میگوها استقرار یافتند و باعث اختلال در تنفس و حرکت میگو می شود .

اپیستیلیس (Epistylis)

به صورت پرگنه زنگوله ای شکل ، با ساقه ای که می تواند منقبض شود . این تک یاخته انگل آبشش ها ، پاهای حرکتی و ضمائم شنای لارو میگوست ، ولی عمده ترین مکانهای هجوم ، پاهای حرکتی و ضمائم شنا می باشند .

در آلودگیهای شدید ، سایر زواید شنا نیز ممکن است آلوده شوند . مشخص شده است که قاعده ساقه چشمی و پوسته پشتی و شکمی نیز آلوده می شوند .

ورتیسلا (vorticella)

خورشیدی شکل بوده دارای یک ساقه انقباظی است .

آسینتا (Acneta)

این تک یاخته از گروه سوکتوریا و دارای لوله های تغذیه ای و مکنده می باشد . در حالت کامل و بالغ ، بدون مژه است .

افلوتا (Ephelota)

این مژه دار ، متعلق به زیر رده سوکتوریا و دارای ساقه های بدون خاصیت انقباظی است . تک یاخت های مکنده و دارای لوله های تغذیه ای می باشد . در شکل بالغ خود ، بدون مژه است.

مژه دار آپوستوم

این تک یاخته ، میگوهایی را که در حال پوست اندازی هستند مورد حمله قرار داده ، خود را به سطح خارجی بدن متصل نموده و دوره زندگی خود را دراسکلت خارجی جدا شده از میگو کامل می کند .

گونه ها و سینن حساس

احتمالاً تمام گونه های پنائیده و سنین لاروی ، پست لاروی ، جوانی و بلوغ به این تک یاخته ها حساس می باشند .

روش تشخیص

با تهیه لام مرطوب (wet mount) از زواید آبشش ، ضمائم حرکتی ، پاهای شنا ، سطح بدن و اندام های حرکتی و بررسی میکروسکوپی آن ، می توان به آلودگی با این تک یاخته ها ، بویژه اشکال پایه دار مژه داران به صورت منفرد و یا تجمعات شاخه ای به تعداد کم و زیاد پی برد .

درمان :

بهرین روش درمان – حفظ کیفیت آب و تعویض آن است . فرمالین ، داروی شیمیایی انتخابی جهت درمان و همچنین پیشگیری از رشته تک یاخته های همزیست سطحی است .

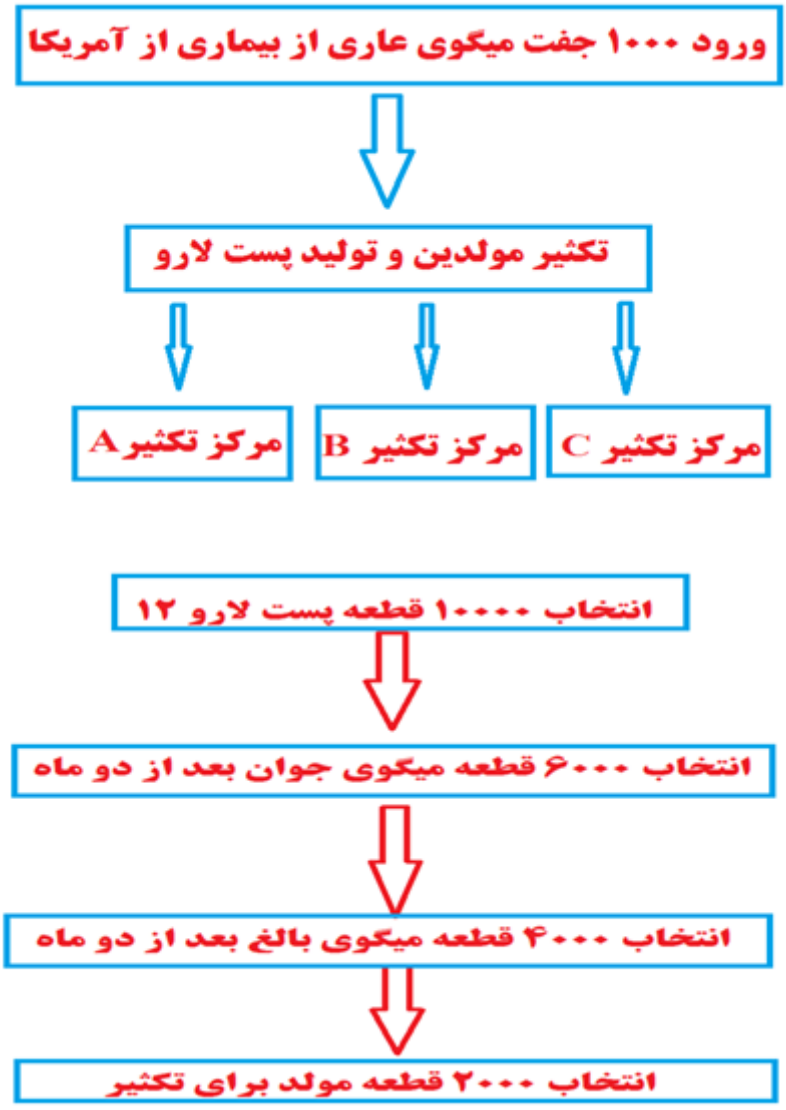
پیشگیری

- پیشگیری به وسیله فرمالین در حوضچه ها ، مخازن بویژه در سیستم های نیمه متراکم و متراکم.
- پرهیز از تجمع مواد آلی و لجن زیاد در کف استخر ، کدورت آب و کاهش اکسیژن
- تعویض روزانه آب اسخرها و تانکها برای خروج مواد غذایی اضافی و باقیمانده مدفوع
- تصفیه مداوم آب ورودی به استخرها و حوضچه های تکثیر
- تخلیه و جمع آوری ذرات آلی در حال فساد ، بویژه پوسته های سیت آرتمیا در تانکهای تکثیر که جایگاه مناسبی برای اتصال زئوتامنیوم، اپیستیلیس و اجرام مشابه می باشد مجیدی نسب ، ۱۳۷۷) .

۲- مواد و روش ها

۱-۲-جمع آوری نمونه‌ها

در ایران مولدین میگوی پاسفید غربی مطابق نمودار زیر معمولا به تعداد ۱۰۰۰ جفت وارد و بین مراکز تکثیر توزیع می‌گردند. مراکز تکثیر برای هر سال از میان میگوهای تولیدی در گلخانه مولد تولید می‌کنند و احتمال انتقال بیماری از مولدین تولیدی در گلخانه ها به مزارع پرورشی وجود دارد(تصویر ۱-۲و ۲-۲). دراین تحقیق و بر اساس جدول آماری Lightner,1996 (جدول ۱-۲) تعداد ۱۰۰ عدد مولد از محل استخرهای پرورشی و ۱۰۰ مولد از محل استخرهای بتونی و تانکهای فایبرگلاس جمع آوری و به پژوهشکده میگوی کشور منتقل گردید.



تصویر ۱-۲: مراحل تولید مولد در مراکز هچری و توزیع بین سایر هچریها

تصویر۲-۲: مولدین نگهداری شده در مراکز تکثیر مورد آزمایش در تحقیق

برای ردیابی بیماریهای مهم ابتدا از مولدین همولنف گرفته و برای آزمایشهای باکتری شناسی بر روی محیط TSAو محیط TCBS و برای آزمایشهای قارچ شناسای بر روی محیط سابرو دکسترو آگار کشت دادیم. سپس بخش کوچکی از مولدین را در الکل ۹۵٪ قرار داده وبرای تشخیص بیماریهای ویروسی با آزماشهای PCRمورد آزمایش قرار دادیم. سپس کلیه مولدهای مورد آزمایش را با تزریق محلول یویدسون توسط سرنگ در بخشهای مختلف بدن میگوها بالاخص در پاتوپانکراس و بندهای سوم و ششم بدن در ظروف حاوی محلول دیویدسون (حاوی ده برابر حجم نمونه ها) برای آزمایشهای آسیب شناسی آماده نمودیم.

جدول۱-۲: محاسبه برداشت نمونه های مورد آزمایش براساس شیوع ۲٪

Population Size	Size of Sample Needed at Prevalence						
	۲٪	۵٪	۱۰٪	۲۰٪	۳۰٪	۴۰٪	۵۰٪
۵۰	۵۰	۳۵	۲۰	۱۰	۷	۵	۲
۱۰۰	۷۵	۴۵	۲۳	۱۱	۹	۷	۶
۲۵۰	۱۱۰	۵۰	۲۵	۱۰	۹	۸	۷
۵۰۰	۱۳۰	۵۵	۲۶	۱۰	۹	۸	۷
۱,۰۰۰	۱۴۰	۵۵	۲۷	۱۰	۹	۹	۸
۱,۵۰۰	۱۴۰	۵۵	۲۷	۱۰	۹	۹	۸
۲,۰۰۰	۱۴۵	۶۰	۲۷	۱۰	۹	۹	۸
۴,۰۰۰	۱۴۵	۶۰	۲۷	۱۰	۹	۹	۸
۱۰,۰۰۰	۱۴۵	۶۰	۲۷	۱۰	۹	۹	۸
>/=۱۰۰,۰۰۰	۱۵۰	۶۰	۳۰	۱۰	۹	۹	۸

۲-۲-آزمایشهای باکتری شناسی

ابتدا نمونه های جمع آوری شده از مراکز تولید را به صورت زنده به آزمایشگاه پژوهشکده میگوی کشور منتقل و سپس آنها را ضد عفونی می نمائیم. بعد از ضد عفونی ابتدا توسط سرنگ، همولنف آنها را خارج نموده و برای شمارش تعداد باکتریها در محیط TSA و جهت شمارش تعداد ویبریوها در محیط TCBS کشت میدهیم (تصویر۳-۲ ، ۴-۲ و ۵-۲). همچنین آبشش و هپاتوپانکراس را هموژن نموده ورقت های مختلف بوسیله حلال نمک طعام ۲/۵ درصد تهیه و در محیط TCBS و TSA کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور و در دمای

۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از رشد باکتریها، کلنی باکتریها را به کمک دستگاه شمارش کلنی و از روش Lightner(۱۹۹۶) شناسایی و ثبت نمویم.

تصویر ۳-۲: نحوه استخراج همولنف از میگوهای مولد و کشت بر روی محیطهای مورد نظر

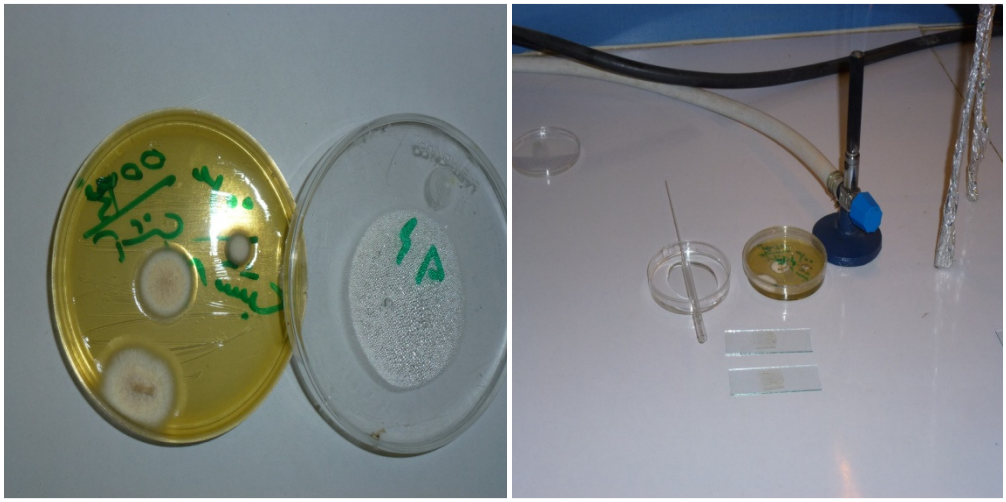
برای شناسایی باکتریهای شمارش شده نیز بعد از جدا سازی کلنی های مختلف و بر اساس روش Lightner (1996) ، پرگنه های مختلف را انتخاب ودر محیط های اختصاصی مانند محیط TSA آگار (تریپتیک سوی آگار) با محلول نمک طعام ۲ درصد یاBHI به اضافه ۲تا۲/۵درصد نمک طعام جهت خالص سازی کشت دادیم. آنگاه این کلنی ها بوسیله رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی شده و با انجام تست های بیو شیمیایی شامل تست تحمل نمک با درصدهای مختلف (۰٪ ، ۳٪ ، ۶٪ ، ۸٪ ، ۱۰٪) ، تست های دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه (اورنیتین، آرژنین و لیزین)، تستهای تخمیر قندها (گلوکز، لاکتوز، سوکروز، سلوبیوز، اینوزیتول و مانیتول) سیمون سیترات، احیای نیترات، ژلاتیناز، MR-VP و 0/129 نسبت به شناسایی باکتریها اقدام می گردد.

تصویر٤-۲: رنگ آمیزی گرم در نمونه های مورد آزمایش

تصویر۵-۲:اجرای آزمایشات مختلف بر روی کلنهای جدا شده باکتریائی

۳-۲-آزمایشهای قارچ شناسی

از نمونه های جمع آوری شده، بر اساس روش Lightner (1996) ابتدا آنها را ضد عفونی نموده و سپس توسط سرنگ انسولین و و به مثابه آزمایشهای باکتری شناسی و در شرایط آسپتیک و در کنار شعله همولنف نمونه های میگو جمع آوری شده و در محیط کشت سابرودکستروزآگار حاوی کلروآمفنیکل و جنتامایسین به میزان ۰/۱ میلی لیتر بر روی محیط کشت فوق تلقیح می نماییم. از سایر قسمتها شامل هپاتوپانکراس و آبشش نیز با کشیدن سواپ خطی بر روی محیط کشت سابرودکستروزآگار تلقیح شده و پس از انکوبه شدن در دمای ۲۸°C و به مدت ۴۸ ساعت تا چند روز منتظر رشد مانده و پس از رشد کلنی های قارچی توسط کلیدهای شناسایی موجود و زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفته و نسبت به شناسایی آنها اقدام گردید.(تصویر ۶-۲).



تصویر شماره۶-۲ :اجرای آزمایشات قارچ شناسی

٤-۲-آزمایشهای ویروس شناسی

۱-٤-۲-ثبت علائم بالینی

به منظور مطالعات بالینی و براساس روش Lightner(1996)و افشارنسب ۱۳۸۶و مطابق جدول ۲-۲ کلیه مشاهدات بالینی میگوهای مورد آزمایش را ثبت می نماییم. ابتدا حرکات و رفتار میگوهای جمع آوری شده را درمحل گلخانه ثبت نموده و سپس میزان غذا و نوع غذای مصرفی، وضعیت ظاهری میگوها ازقبیل وجود لکه های سفید بر روی بدن میگوها بالاخص کاراپاس به منظور مشکوک شدن به بیماری لکه سفید، وجود یا عدم وجود لکه های سیاه بر روی بدن میگوها برای مشکوک شدن به بیماری TSV و کوچکی میگوها به نسبت سن آنها و خمیدگی در بدن میگوها به منظور بررسی دقیق به بیماری IMNV ثبت نمودیم.

جدول۲-۲: فرم 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	

۲-٤-۲-روش آسیب شناسی

نمونه های جمع آوری شده بعد از ثبت علائم بالینی در ماده فیکساتور دیویدسون به منظور بررسی آسیب شناسی فیکس نمودیم. فیکساتور با یک سرنگ یکبار مصرف در مناطق مختلف بدن همانند هپاتوپانکراس ، سرسینه و ناحیه شکمی تزریق شده و پس از تزریق فیکساتور ، کوتیکول توسط قیچی از ششمین بند شکمی تا پایه روستروم شکاف داده شده و نمونه ها در محلول فیکساتور قرار داده می‌شوند. میگوها در فیکساتور در دمای اتاق بمدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شده سپس آنها به اتیل الکل ۷۰-۵۰ درصد منتقل نموده و برای مطالعه آسیب شناسی بر اساس شیوه Bell و Lightner (۱۹۸۸) آماده می‌شوند.

-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.

- 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)

- 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.

-تهیه برش های بافتی

در این مرحله از میکروترم دوار (تصویر ۷-۲) و حمام آب گرم(تصویر ۸-۲)استفاده می شود قالب ها را در گیره دستگاه محکم کرده و با تنظیم تیغه دستگاه با سطح قالب ، پارافین اضافی را تا نمایان شدن بافت بر می داریم . 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 (تصویر ۹-۲) قرار داده تا خشک شود . در ادامه به منظور حذف پارافین اضافی ، لام ها را برای مدت معین و در دمای مناسب در اون قرار می دهیم .

تصویر ۷-۲: دستگاه میکروتوم مورد استفاده در تحقیق

تصویر۸-۲: دستگاه حمام آب گرم مورد استفاده در تحقیق

تصویر ۹-۲: صفحه گرم کننده مورد استفاده در تحقیق

- 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(تصویر ۱۰-۲).

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)

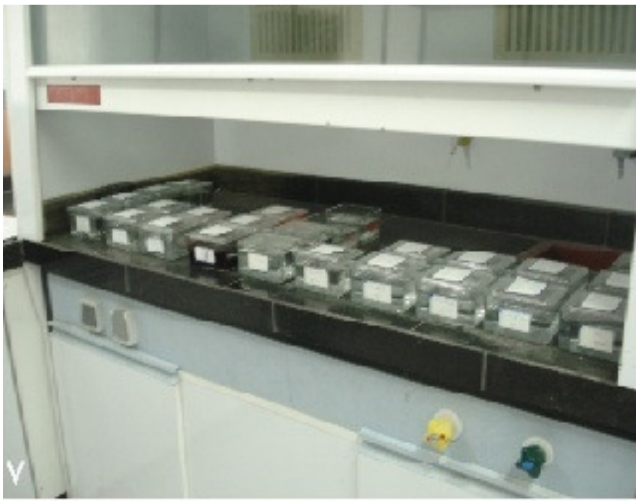
الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)

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.



تصویر۱۰-۲-: مراحل رنگ‌آمیزی

۵-۲-اجرای مطالعات PCR

۱-۵-۲-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 انچام 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.

۲-۵-۲-کیتهای مورد استفاده PCR

کیتهای مولکولی مختلفی برای تشخیص بیماریهای مختلف میگو از قبیل baculovirus *Penaeus monodon* (MBV) ، Infection Hypodermal and Hematopoeitic Necrosis Virus (IHHNV)و سایر بیماریها متل TSV,IMNVو WSSV وجود دارد که ما در این تحقیق از هشت کیت مولکولی PCR 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 ۰/۲ 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

۲IQzyme DNA polymeraseU/µl ۰/۵µl

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

۳-۵-۲- برنامه PCR

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

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

برنامه واکنش Nested PCR شامل : ۹۴ ˚C به مدت ۲۰ ثانیه ؛ ۶۲ ˚C به مدت ۲۰ ثانیه ؛ ۷۲ ˚C به مدت ۳۰ ثانیه ، ۳۰ دور تکرار شده ، ۷۲ ˚Cبه مدت ۳۰ ثانیه ؛ ۲۰ ˚C 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 ژل را توسط رنگ آمیزی برامید اتیدیوم رنگ نمودیم 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 ۷۳۰bp را نشان دهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری IHHNVباندهای ۶۴۴bp و ۴۳۸bp نمونه های منفی تنها باندهای ۲۴۳bp را نشان دهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری MBV باندهای ۲۲۵bp و یا ۴۴۴bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۶۶۵bp را نشان دهند. همچنین نمونه‌های مثبت باید برای بیماری YHDباندهای ۴۰۶bp و ۷۷۷bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۲۷۷bp یا ۷۷۷bpیا و ۶۸۰bpرا نشان دهند و نمونه های مثبت باید برای بیماری NHPباندهای ۸۴۸bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۳۲۵bp را نشان دهند.

۳-نتایج

۱-۳-نتایج حاصل از آزمایشات باکتری شناسی

نتایج بررسیهای صورت گرفته در زمینه شناسائی باکتریها در مولدین نمونه برداری شده در مراکز تکثیر و نتایج آزمایشهای مختلف شیمیائی در جدول ۱-۳ بیان شده است. در این مطالعه باکتریهای *V.alginolyticus, V.harveyii, V.parahaemolyticus, V.anguillarum, V.vulnificus, V.mimicus, V.damsela,V.nereis, V. proteolyticus, plesiomonas shigelloides* در میگوهای مولد در اسخرهای پرورشی و ۵ گونه ویبریو *V.proteolyticus*،*V.mimicus*، *V.alginolyticus*،*V.parahaemolyticus*، *V. damsela* از میگوهای مولد در تانکها و حوضچه های فایبرگلاس جداسازی گردید(تصاویر۱-۳).

براساس جدول ۲-۳ باکتریهای مختلف در برابر آزمایشات، واکنش مختلفی نشان میدهند. در این مطالعه باکتریهائی که از بافتهای آبشش و هپاتوپانکراس شناسایی گردید معرفی شده اند. شایان ذکر است که ازهمولنف میگو های مولد هیچ نوع باکتری جدا نشد. مهمترین باکتریهایی که از آبشش میگوها جداسازی گردید *V.alginolyticus*, *V.proteolyticus* ، *Plesiomonas shigelloides* ، *V.mimicus* و *A.hydrophila* می‌باشد ولی از هپاتوپانکراس فقط دو باکتری *V.mimicus*و *Plesiomanas shigelloids* جداسازی و شناسائی شد(تصویر۱-۳). بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین فراوانی باکتریهای گزارش شده به باکتری *V. mimicus*مربوط می‌شود که ۵۷٪در بافت هپاتوپانکراس و ۲۸,۵٪ در بافت آبشش می‌باشد و به ترتیب باکتریی *Plesiomonas shigelloides* با ۱۴,۲٪ در بافت آبشش و هپاتوپانکراش و باکتریهای *V.proteolyticus*، *V.alginolyticu* و *A.hydrophila* با ۱۴,۲٪ در آبشش گزارش می‌شود(جدول ۲-۴). نتایج شمارش باکتریها از اندام های میگو نشان داد که متوسط شمارش ویبریوها ازمیگوی هموژن ۶/۰۹±۷/۵۷×10^4 ، آبشش ۱/۳۷±۳/۳× 10^4 وهپاتوپانکراس ۱/۰۳±۲/۵۷×10^4 پرگنه در یک گرم بافت بود ولی در همولنف باکتری جدا نشده است (جدول ۲-۵).

جدول ۱-۳: نتایج آزمایشهای بیوشیمیائی برای شناسائی باکتریهای مختلف مولدین مراکز در تانکهای فایبرگلاس

آزمایش	*V.vulnificus*	*V.harveyii*	*V.nereis*	*V.damsela*	*V.parahaemolyticus*	*V. alginolyticus*	*V.mimicus*	*V.proteolyticus*	*V.anguillarum*	*Plesimoanasshigelloides*
آزمایش گرم	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-
رنگ کلنی در TCBS	G	Y	G	Y	G	Y	G	G	Y	G
تحمل نمک ۰٪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تحمل نمک ۳٪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تحمل نمک ۶٪	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
تحمل نمک ۸٪	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
تحمل نمک ۱۰٪	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
اورنیتین دکربوکسیلاز	-	+	–	+	-	-	–	-	+	–
آرژنین دکربوکسیلاز	+	+	–	+	+	+	–	+	+	–
لیزین دکربوکسیلاز	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوز	-	-	-	-	-	–	+	-	-	-
سوکروز	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
سلوبیوز	-	+	–	+	-	–	+	-	+	–
اینوزیتول	+	+	-	+	+	+	–	+	+	-
مانیتول	-	-	-	-	-	–	–	-	-	-
سیمون سیترات	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
نیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ژلاتیناز	V	-	+	-	V	+	+	V	-	+
MR-VP	V	+	_	+	V	+	-	V	+	_
0/129	-	-	_	-	-	+	–	-	-	_
نورافشانی	-	-	-	-	-	+	–	-	-	-

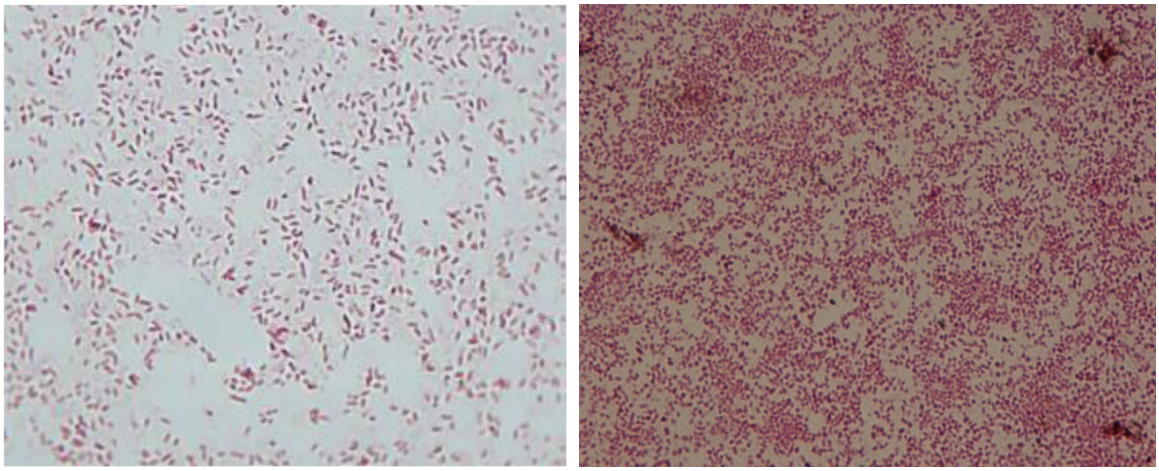
واکنش مثبت =+ ، واکنش منفی= – ، واکنش متغیر=V

جدول۲-۳: باکتریهای شناسایی شده در مراکز تکثیر بر اساس درصد میزان شیوع نمونه ها به آلودگی باکتریهای مختلف در تانکهای فایبر گلاس

نام باکتری	همولنف(٪)	آبشش (٪)	هپاتو پانکراس(٪)
V.mimicus	–	۴۰(٪۲۸,۵)	۸۰ (٪۵۷)
Plesiomanas shigelloids	–	۲۰(٪۱۴,۲)	۲۰(٪۱۴,۲)
V.alginolyticus	–	۲۰(٪۱۴,۲)	–
V.proteolyticus	–	۲۰(٪۱۴,۲)	–
A.hydrophila	–	۲۰(٪۱۴,۲)	–

جدول۳-۳ :تعداد کل باکتریها در گرم بافت و سایر اندامهای میگو

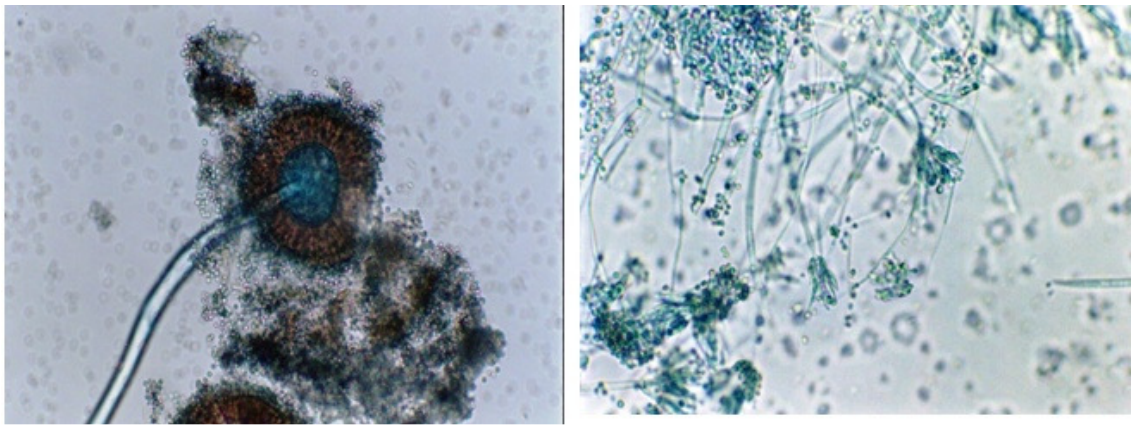
اندام	Total Bacterial Count (CFU/g)		
	حداقل	حداکثر	میانگین± SE
میگوی هموژن	۰/۰۵×۱۰^{۴}	۵۶/۶۲×۱۰^{۴}	۷/۵۷×۱۰^{۴}±۶/۰۹
هپاتوپانکراس	۰/۰۳×۱۰^{۴}	۲۵/۳×۱۰^{۴}	۲/۵۷×۱۰^{۴}±۱/۰۳
آبشش	۰/۰۱×۱۰^{۴}	۹/۲×۱۰^{۴}	۳/۳× ۱۰^{۴}±۱/۳۷



تصویر۱-۳: باکتریهای ویبریو جداسازی شده در رنگ آمیزی گرم، همانگونه که مشاهده میشود در تصویر سمت راست باکتریهای ویبریو به صورت باسیل ولی در تصویر سمت چپ گرد و حال کوکسی میباشند. Gram staining :X1000

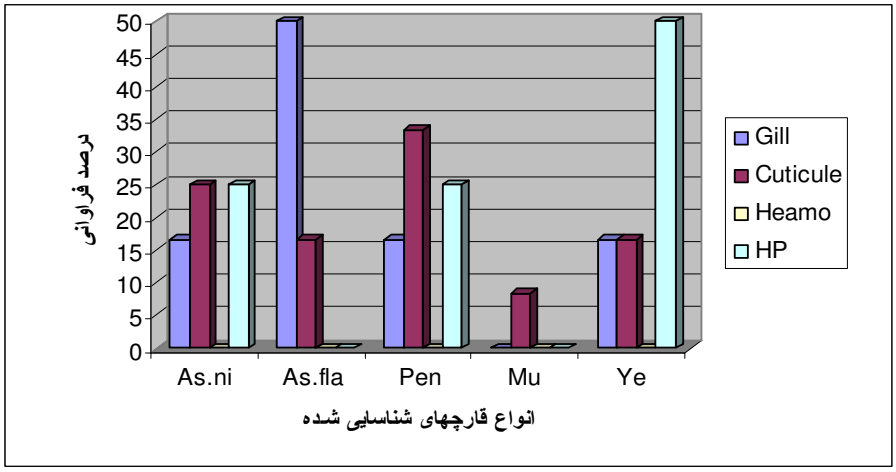
۲-۳- نتایج قارچ شناسی

در این مطالعه در مولدین استخرهای پرورشی ۱۰ جنس و گونه قارچ شناسی گردیدند. از مهمترین قارچ های شناسایی شده در مولدین نمونه برداری شده در تانکهای فایبرگلاس می توان به آسپرژیوس فلاووس ، آسپرژیلوس نیجر ، آسپرژیوس فومیگاتوس ، پنی سیلیوم(تصویر ۲-۳) ، ریزوپوس و مخمر اشاره کرد . همچنین درمولدین نمونه برداری شده در مزارع پرورش میگو نیز از قارچ های شناسایی شده می توان به پنی سیلیوم ، آسپرژیوس نیجر ، آسپرژیوس فلاووس ، آسپرژیوس فومیگاتوس ، اولوکلادیوم ، اکرومونیوم ، موکور ، ریزوپوس ، کلادوسپوریوم ، مخمر و آلترناریا اشاره کرد.

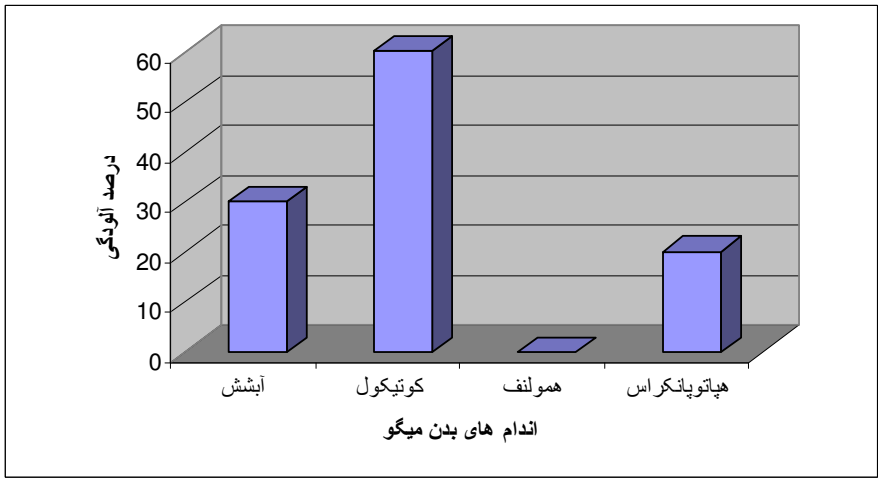


تصویر ۲-۳: قارچ پنی سیلیوم (سمت راست) و قارچ آسپرژیلوس نیجر (سمت چپ)

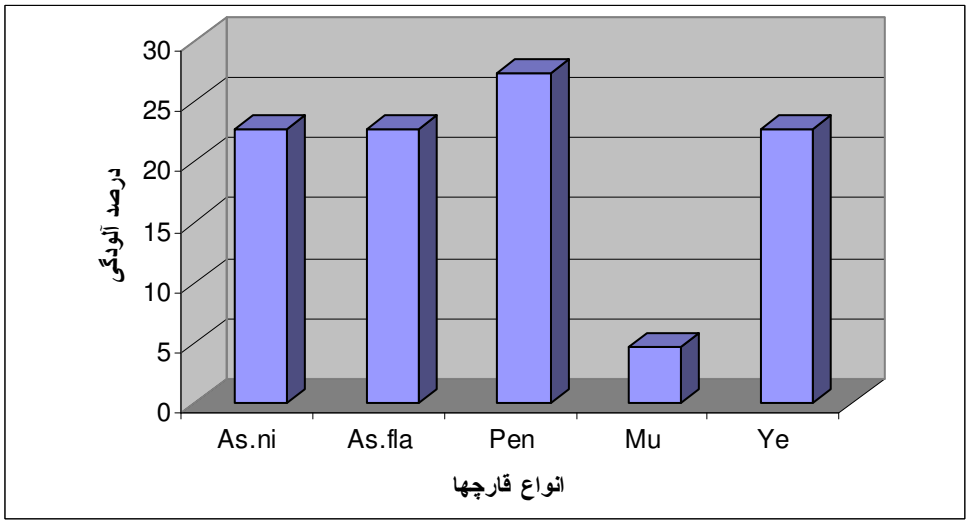
در بین اندام های مولدین بیشترین گونه قارچ شناسایی شده در آبشش آسپرژیلوس فلاووس با ۵۰ درصد، در کوتیکول پنی سیلیوم با ۳۳,۴ درصد و در هپاتوپانکراس مخمر با ۵۰ درصد فراوانترین قارچ های شناسایی شده بودند (نمودار۱-۳ و نمودار ۲-۳) . در بین اندام های مورد بررسی نیز کوتیکول (۶۰٪) بیشترین اندام آلوده به انواع قارچ های جداسازی شده بوده است. همچنین پنی سیلیوم با ۲۷,۳ درصد بیشترین آلودگی قارچی و موکور با ۴٪ کمترین آلودگی را در بین قارچ های شناسایی شده داشته است (نمودار۳-۳).



نمودار۱-۳ :فراوانی قارچهای شناسایی شده در اندام های بدن میگوهای مولد در تانکهای فایبرگلاس

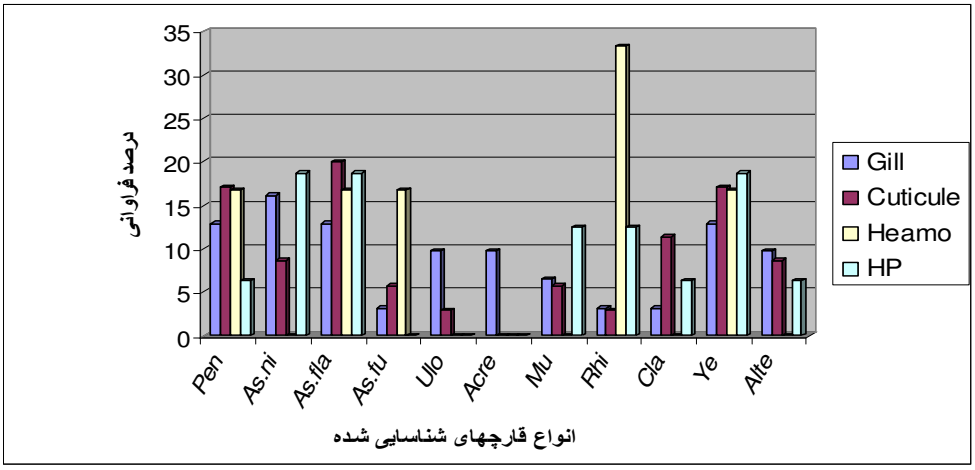


نمودار۲-۳: درصد آلودگی قارچی اندام های بدن میگوهای مولد در تانکهای فایبرگلاس

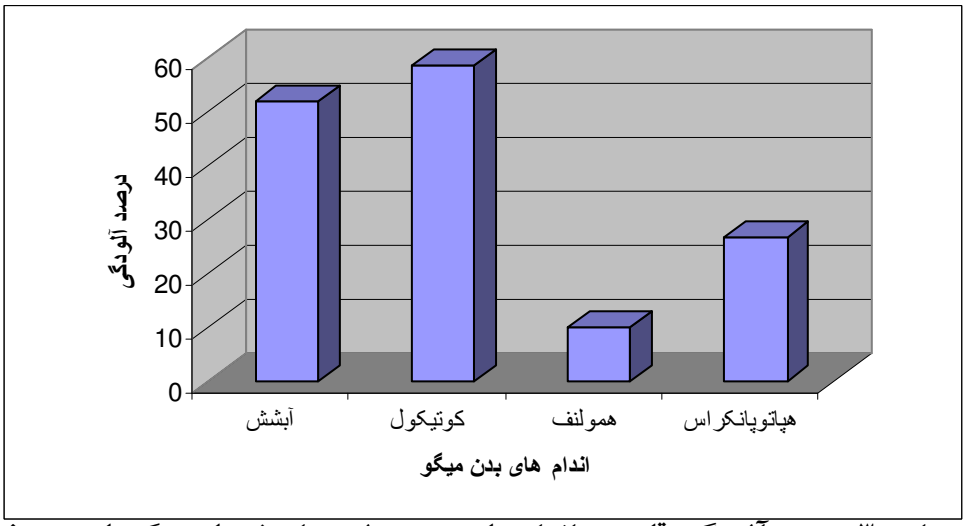


نمودار۳-۳: درصد فراوانی انواع قارچها در میگوهای مولد در تانکهای فایبرگلاس

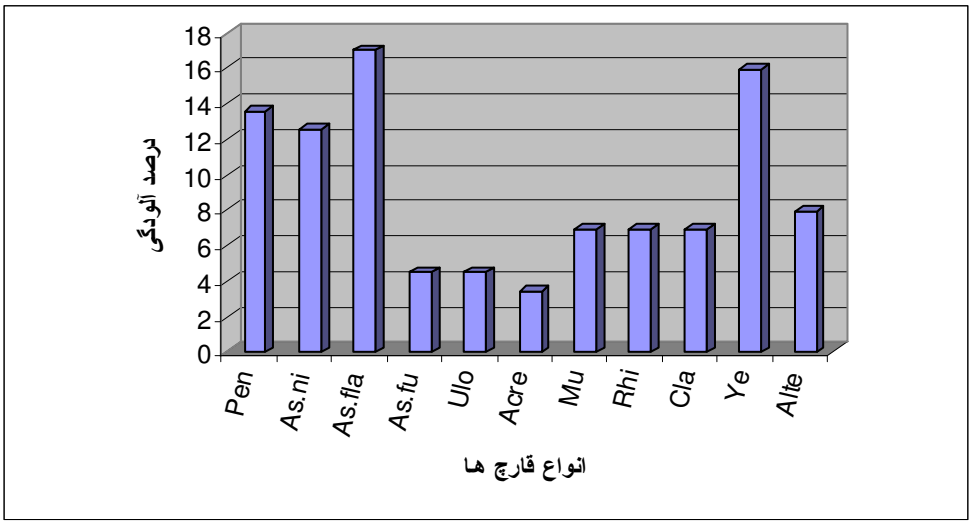
در مولدین مزارع پرورش میگو نیز بیشترین قارچ شناسایی شده در آبشش آسپرژیلوس نیجر با ۱۶,۱ درصد، در کوتیکول آسپرژیلوس فلاووس با ۲۰ درصد، در همولنف ریزوپوس با ۳۳,۳ درصد و در هپاتوپانکراس آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس فلاووس و مخمر با ۱۸,۷ درصد فراوانترین قارچ های شناسایی شده بودند. در بین اندام های مورد بررسی نیز کوتیکول (۵۸,۳٪) بیشترین اندام آلوده به انواع قارچ های جداسازی شده بوده است (نمودار ۴-۳ و ۵-۳).. همچنین آسپرژیلوس فلاووس با ۱۷ درصد بیشترین آلودگی قارچی و آکرونیوم با ۳٪ کمترین آلودگی را در بین قارچ های شناسایی شده داشته است (نمودار ۶-۳) .



نمودار ٤-۳: فراوانی قارچهای شناسایی شده دراندام های بدن میگو مولد در استخرهای پرورش



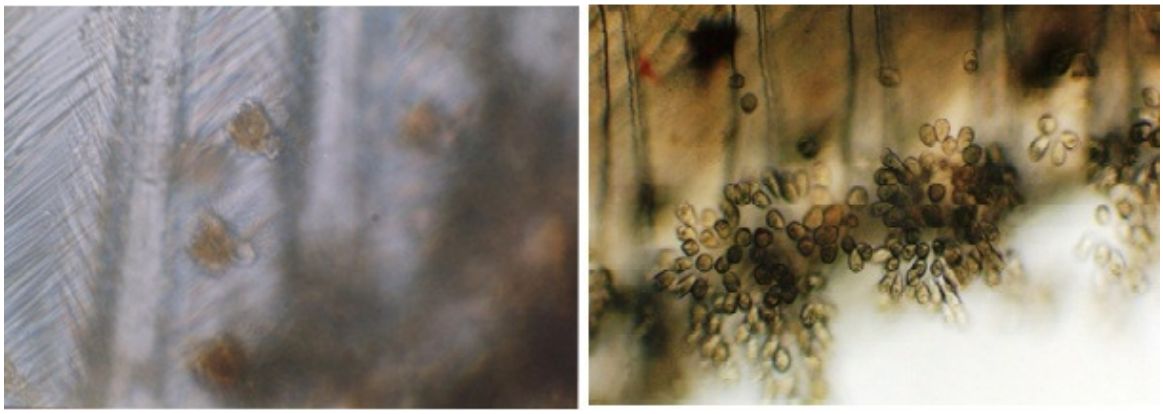
نمودار۵-۳: درصد آلودگی قارچی اندام های بدن مولدین استخرهای میگوهای پرورشی



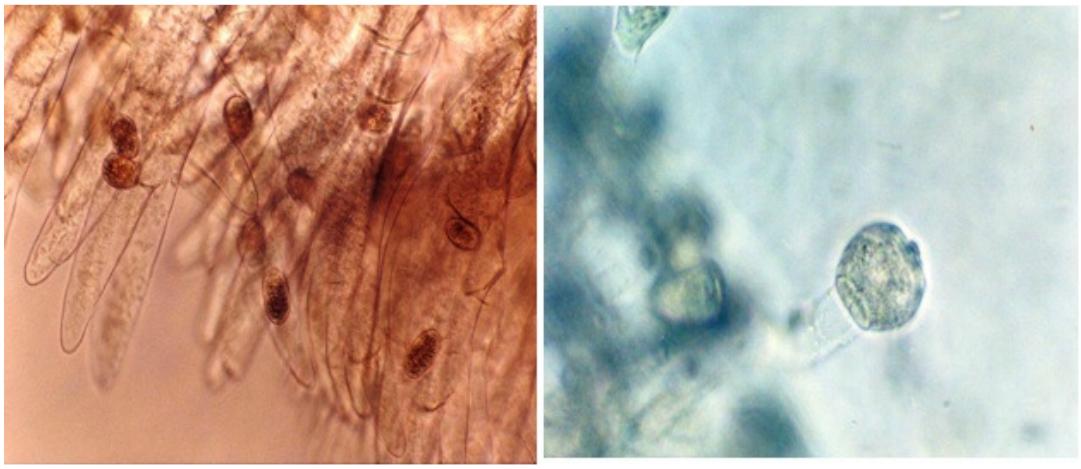
نمودار ٦-۳: درصد فراوانی انواع قارچها در مولدین مزارع پرورشی

۳-۳- نتایج انگل شناسی

در این بررسی در سطح مولدین مزارع پرورشی از مهمترین انگل های تک یاخته شناسایی شده می توان به زئوتامینوم، اپیستیلیس ، ورتیسلا ، آسینتا، آپوستومو افلوتااشاره کرد (حدول تصویر ۳-۳ و ۴-۳) .در بین انگلهای زئو تامنیوم بیشترین انگل تک یاخته شناسایی شده و کوتیکول بیشترین اندام آلوده به انگل های تک یاخته بوده است . همچنین انگل آپوستوم کمترین انگل شناسائی شده در اندامهای میگوهای مولد در استخرهای پرورشی گزارش میشود (جدول ۴-۳).



تصویر۳-۳: انگل زئوتامنیوم (سمت راست) و آسینتا (سمت چپ)



تصویر٤-٣: انگل افلوتا (سمت راست) و اپوستوم (سمت چپ)

جدول٤-٣: نتایج انگل های شناسایی شده درمولدین مزارع پرورش میگو

نام انگل	کوتیکول(پاهای شنا)			آبشش		
	تعداد میگوی آلوده	شد ت	شیوع(درصد)	تعداد میگوی آلوده	شد ت	شیوع(درصد)
زئوتامنیوم	۵۲	۱-۳	۸۶,۶	۳۷	۱-۲	۶۱,۶
اپیستیلیس	۲۹	۱-۲	۴۸,۳	۱۸	۱	۳۰
ورتیسلا	۱۱	۱	۱۸,۳	۱۰	۱	۱۶,۶
آسینتا	۱	۱	۱,۶	۰	۰	۰
آپوستوم	۰	۰	۰	۱	۱	۱,۶
افلوتا	۱	۱	۱,۶	۱	۱	۱,۶

در مولدین پرورشی جمع آوری از تانکهای فایبرگلاس فقط انگلهای زئو تامنیوم، اپیستلیس و ورتیسلا شناسائی و بیشترین میزان آلودگی در کوتیکول مربوط به انگل زئوتامنیوم و کمترین مربوط به انگل ورتیسلا در پاهای شنا بود (جدول ۵-۳).

جدول ٥-٣: انگلهای شناسائی شده در مولدین جمع آوری شده در تانکهای بتونی و فایبرگلاس

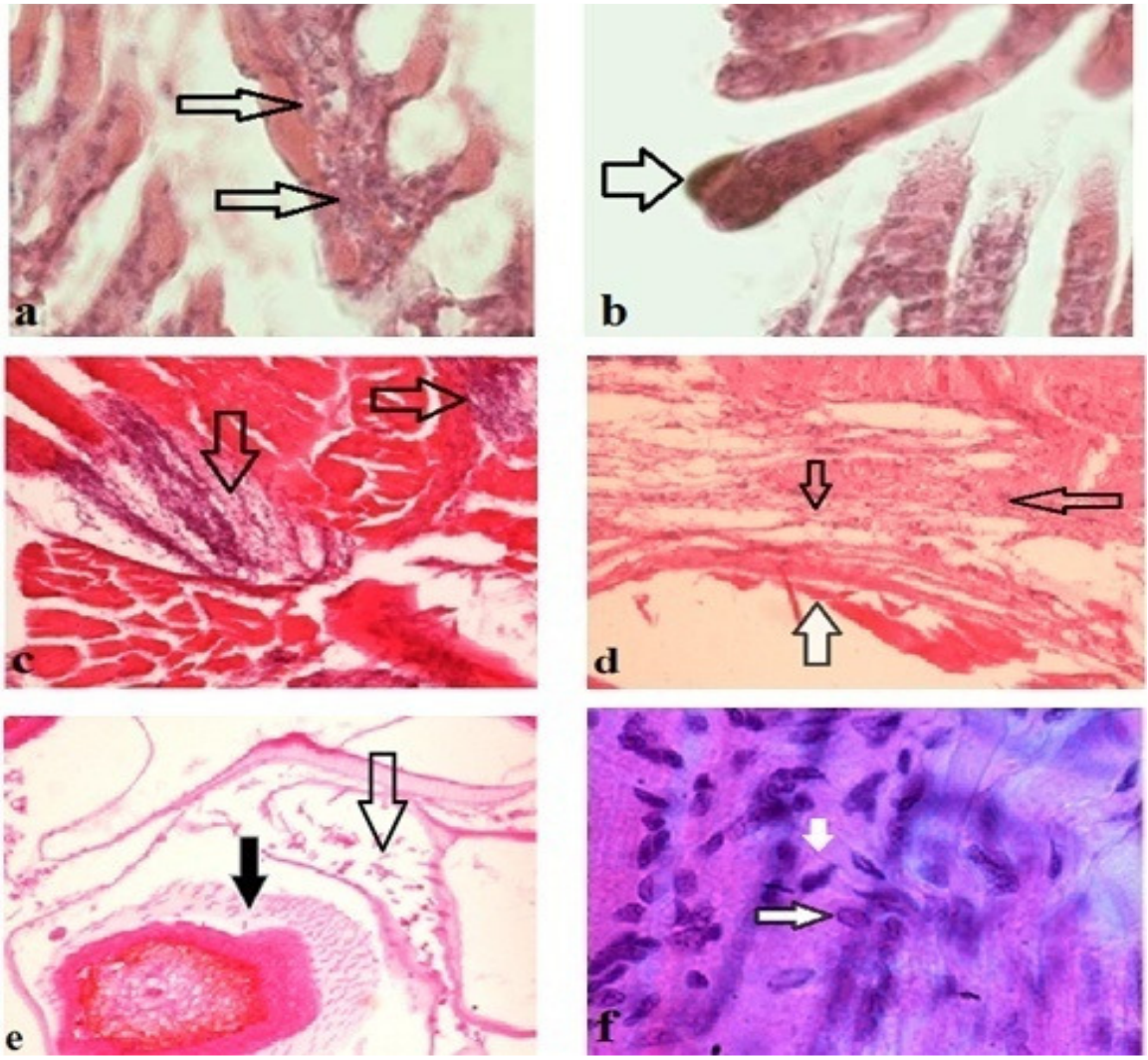
نام انگل	کوتیکول(پاهای شنا)			آبشش		
	تعداد میگوی آلوده	شد ت	شیوع(درصد)	تعداد میگوی آلوده	شد ت	شیوع(درصد)
زئوتامنیوم	٨٦	٣-١	٩٥,٥	٥٦	٢-١	٦٢,٥
اپیستیلیس	٣٨	٣-١	٤٢,٢	١٧	٢-١	١٨,٨
ورتیسلا	١٩	٢-١	٢١,١	٠	٠	٠
آسینتا	٠	٠	٠	٠	٠	٠
آپوستوم	٠	٠	٠	٠	٠	٠
افلوتا	٠	٠	٠	٠	٠	٠

٤-٣-نتایج حاصل از آزمایش PCR

به منظور ردیابی ویروسهای مهم ایجاد کننده بیماری لکه سفید (WSSV) ، سندرم تورا (TSV) و بیماری نکروز عضلانی ویروسی(IMNV) و سایر بیماریها در نمونه های جمع آوری شده، با استفاده از کیتهای تشخیصی وبررسی IQ 2000 بافتهای جمع آوری شده را هموژن نموده و آمیخته (Pool) نمودیم. نتایج حاصل از بررسیهای PCRبا استفاده از کیتهای ذکر شده برای ویروسهای فوق منفی اعلام گردید.

٥-٣- نتایج حاصل از بررسی آسیب شناسی

در بررسی آسیب شناسی مولدین مورد آزمایش آلودگیهای ناشی از باکتریها بالاخص باکتریهای ویبریو کاملا مشخص می‌باشد.دراین نمونه ها باکتریهای ویبریو در بافتهای مختلف و به شدتهای مختلف قابل روئیت بوده و باتوجه به اینکه ویبریوها به عنوان فلور طبیعی میگوها بالاخص در روده ها می‌باشند امری طبیعی است ولی در صورتیکه میگوها در معرض استرس قرار بگیرند ممکن است میزان آنها افزایش یابد. در برخی از نمونه ها در بافت آبشش لکه های ملانوزه در آسیب شناسی نیز موجب سیاه شدن لاملاهای ثانویه شده و این حالت با افزایش باکتری در شرایط خاص میتواند بیماریزا باشد (تصویرa ٥-٣ وb). همچنین در بافت عضلات و دیواره روده تجمعی از باکتریها قابل روئیت بوده و در صورت افزایش تعداد باکتریها دیواره روده بصورت توپی‌هائی بنام Bolitas ظاهر شده بیماری در حالت حاد میباشد که دراین میگوها حالت Bolitasمشاهده نگردید (تصویر c ٥-٣ و تصویر d ٥-٣) .همچنین در بزرگنمائی بالاتر باکتریها به وضوع در بافتها قابل روئیت میباشد. در بزرگنمائی بالا مشخص گردید که تعدادی از باکتریها دارای زدائده ائی کشیده شبیه دم می‌باشند (تصویر e٥-٣ و تصویر f ٥-٣). این موارد در میگوهای پرورشی در استخرها بیشتر از مولدین نگهداری شده در تانکهای فایبرگلاس بود.



تصویر ۵-۳: مشاهده وضعیت آسیب شناسی باکتریائی در میگوهای مورد آزمایش که در تصاویر a وb بافتهای آبشش را نشان میدهد که حالت ملانیزاسیون خفیف (پیکان) را از خود نشان میدهند H&E/Pheloxin:X400.همچنین بافتهای مختلف میگوهای مورد آزمایش که نشان از آلودگی باکتریائی است را در بافت عضلانی (پیکان) در تصویر c و همچنین بافت اپیتلیوم روده (پیکان) و لایه لایه شده عضلات (پیکان سفید) در تصویر d قابل روئیت میباشدH&E/Pheloxin:X400 . با سایر بخشهای بافتی حالت granolomatose (التهاب) در تصویر e (پیکان سیاه) و وجود باکتری بین بافتها (پیکان) مشاهده میشودH&E/Pheloxin:X400 . در بزرگنمائی بالا اندازه باکتریها که بصور باسیل (پیکان) که درای دومیباشند (پیکان سفید) مشخص است، H&E/Pheloxin:X1000.

٤-بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده از مراکز تکثیر در استان بوشهر در مطالعه حاضر در مقایسه با نتایج بررسیهای انجام شده قبلی (افشارنسب و همکاران ، ۱۳۸۶) میگوهای مورد آزمایش از وضعیت بهداشتی مطلوبتری برخوردار می‌باشند. در گزارش افشارنسب و همکاران(۱۳۸۶) تعداد ۱۵ جنس و گونه باکتری جدا شده بود ولی در مطالعه حاضر تنها ۵ گونه باکتری در میگوهای مولد در تانکهای فایبرگلاس و ۱۰ گونه در استخرهای خاکی جدا گردیده که شامل باکتریهای *V.alginolyticus, V.harveyii, V.parahaemolyticus, V.anguillarum, V.vulnificus, V.mimicus, V.damsela,V.nereis, V. proteolyticus, plesiomonas shigelloides* در میگوهای مولد در اسخرهای پرورشی و ۵ گونه ویبریو*V.proteolyticus*،*V.mimicus*، *V.alginolyticus*،*V.parahaemolyticus* ،*V. damsela*در تانکهای فایبرگلاس میباشند. گونه های باکتری جدا شده در این مطالعه با گونه های جدا شده در مطالعات قبلی مطابقت دارد و فقط تعدادی از گونه ها از جمله *V.splendidus*، *V.parahemolyticus, V.campbell* ، *V.gazogenez* ، *V.neris* ، *V.pelagius* ، ، *Pasteurella* ، *V.flavious* در این تحقیق جداسازی و گزارش نشده است. همچنین گونه‌های قارچی جداشده دراین تحقق شامل ده گونه و جنس می‌باشددر حالیکه در گزارش سال۱۳۸۶ تعداد قارچهای جداشده ۷ جنس و گونه قارچ که شامل *Asp.niger* ،*Asp.fumigatus*، *Chladosporidium sp.*، *Fusarium sp.*، *Aspergilus niger*، *Trichophyton sp.*،*Penicillium sp.* می‌باشد. از مهمترین دلایل کاهش بار آلودگی باکتریائی توسعه روشهای ایمنی زیستی (Biosecurity)در مراکز تولید مولد می‌باشد. براساس گزارش Flegelو همکاران (۲۰۰۸) از مهمترین روشهای کاهش بار آلودگی درمراکز تکثیر میگو و مولد سازی اجرای روشهای ایمنی زیستی در این مراکز می‌باشد.

در کشورهای گوناگون باکتریهای آلوده کننده مولدین تا حدی با هم متفاوتند. در مالزی*V.ordalii* ،*V.anguillarum* و*V.vulnificus* (Mohammad etal., 2005)، در تایلند *V.parahaemolyticus*، *V.anguillarum*، *V.vulnificus*، *V.damsela* و*V.alginolyticus* (Nash,1990) و در ایران در استان بوشهر در منطقه حله به ترتیب *V.parahaemolyticus*، *V.alginolyticus*، *V.marinus*، *V.mimicus*، *V.vulnificus*، *V.flavialis* بیشترین سهم را در آلودگی داشته اند(صادق نبوی و همکاران ۱۳۷۸)، در استان هرمزگان در منطقه تیاب *V.anguillarum*، *V.parahaemolyticus*، *V.alginolyticus* و جنس آئروموناس درصدهای بالای آلودگی را داشته اند(صالحی ۱۳۷۸). به طور کلی گونه های زیر بعنوان زیر اصلی ترین گونه های ویبریو بیماریزا نسبت به میگوهای پنائیده شناخته شده اند(Gabriel and Felipe,2000): *V.parahaemolytcus*، *V.vulnificus*، *V.alginolyticus*، *V.damsela*، *V.harvei*، *V.penaeicidae*، *V.anguillarum*، *V.nereis* *V.tubiashi*و*V.fluvialis* . علی رغم اینکه گفته می شود گونه های ویبریو، باکتری هایی فرصت طلب هستند، برخی از ویبریو مانند ویبریوهارویی و ویبریو پناسیدا می توانند پاتوژنهای واقعی باشند و به صورت اولیه ایجاد بیماری کنند(Saulnier *et al*. 2000 de la pena *et al*. 1995: karunasagar *et al*. 2004. با این حال در این تحقیق نشانه ائی از بروز بیماری ناشی از این باکتریها دراستخرهای

پرورشی و تانکهای بتونی مشاهده نگردید و یکی از دلایل اصلی آن چنین بیان می‌شود که ویبریوها در غلظت های پایین بصورت فرصت طلب و در غلظت های بالا بصورت بیماری زا درمی آید بطوری که در غلظت های پایین و بررسی سلامت میگوها با اندازه گیری TPC و THC از آن، این باکتریها نمی تواند در پارامترهای خونی میگو تغییری ایجاد کند، در صورتی که در غلظت های بالا با تاثیر بر روی ایمنی میگو و و همچنین تأثیر بر روی سیستم فیزیولوژیک میگو باعث تغییر این فاکتورها می گردند(Li *et al,*. 2010, Van de Break *et al.* 2002). بر اساس گزارش Mohajeri و همکاران (۲۰۱۱) در صورتیکه تعداد باکتریهای ویبریو بالاخص ویبریو هاروئی به میزان $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۸}$ باکتری در cell/ml برسد موجب بروز بیمار ی ویبریوسیس در میگوهای مولد می‌شود ولی در غلظتهای $۱۰^{۲}$ و $۱۰^{۴}$ باکتری در cell/ml بیماری در میگوهای مولد مشاهده نمی‌شود. این افزایش تعداد باکتریها موجب تغییرات سلولهای ایمنی میگو و تغییر در تعداد THCو TPPمیگوها میشود. با بروز بیماری تغییرات در سایر اندامها ازجمله تغییر در بافت اپیتلیوم روده میگوها و ایجاد توپیهای گرد بنام Bolitas در میگوها ی مولد قابل مشاهده بوده و میتواند مشخصه ائی برای بیماری ویبریو باشد(Lightner,1996). در بررسی آسیب شناسی علیرغم عدم گزار ش ناشی از بیماری ویبریوسیس در میگوهای مولد ولی در آسیب شناسی تعداد زیادی باکتری در مفاطع مشخص بود. گرچه ویبریوها بعنوان فلور طبیعی اندامهای مختلف بدن میگوها بالاخص دستگاه گوارش و آب استخرهای مولد سازی می‌باشند ولی در صورت افزایش بار آلودگی این باکتری موجب بیماریزائی میشوند. با این حال الودگی ناشی از این باکتری موجب تاثیر در اندام آبشش و سایر بافتها بطور خفیف شده است.

با توجه به اینکه در تمام طول دوره نمونه برداری فراوانترین باکتریهای شناسایی شده و*V.alginolyticus*, *V.proteolyticus. V.mimicus*، *Plesiomonas shigelloides* و *A.hydrophila* بوده تا حدودی با یافته های دیگر محققین همخوانی دارد در بررسی حاضر علیرغم شناسایی گونه های مهم بیماریزای ویبریو در مراکز تکثیر استان، هیچ گونه مرگ و میر یا تلفاتی که ناشی از بیمارهای باکتریایی باشد، مشاهده نگردید. اگرچه در این خصوص مدیریت بهداشتی در درجه اول اهمیت قرار دارد. بعنوان مثال در یک کار تحقیقاتی که در خصوص ارتباط میان افزایش تراکم مولدین با تعداد باکتریهای ویبریو انجام شده بود، نشان داد که این از یک رابطه مستقیمی برخوردار بوده و با افزایش تراکم مولدین میگو در هر متر مکعب بر میزان باکتریهای ویبریو نیز افزوده می شود(تمدنی و قره وی،۱۳۸۳). با این حال تفاوت در فلور باکتریایی مناطق مختلف در جنوب کشور به عوامل متعددی از جمله تغییرات شوری، pH، در جه حرارت و میزان اکسیژن آب بستگی دارد. از جمله عوامل مهمی که در بروز بیماری ویبریوسیس می تواند مؤثر باشد وجود استرس است. در صنعت تکثیر و پرورش میگو عوامل متعددی در بروز استرس دخالت دارند که استرس ناشی از حمل و نقل، استرس ناشی از افزایش تراکم، استرس ناشی از تغییر شدید فاکتورهای محیطی از مهمترین آنها می باشند. بروز استرس موجب تضعیف سیستم ایمنی میگوها شده و در نهایت باعث بروز بیماری می شود. بنابراین یکی از راههای کنترل بیماری باکتریایی

ویبریوسیس در میگوهای مولد پیشگیری از بروز استرس می باشد. همچنین آلودگی ناشی از ویبریو که یک باکتری عفونت زای فرصت طلب می باشد و در محیطهای دریایی و آبهای لب شور یافت می شود، یکی از مهمترین و جدی ترین بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگو بوده و می‌تواند باعث ضرر و زیان بالا و مرگ و میر ۱۰۰٪ شود. بعنوان نمونه آلودگی با گونه ویبریو نقش مهمی در مرگ و میر میگوها در تایوان طی سالهای ۸۸-۱۹۸۷ داشته است (Nash, 1990).

در یک بررسی در استان هرمزگان نشان داده شده که برای تنظیم شوری در استخرهای پرورشی آب استخرهای پرورشی مرتباً تعویض شده و این تعویض آب استخرهای پرورشی از عوامل مهم است که موجب حفظ کیفیت آب و در نهایت کاهش تراکم باکتری های ویبریو می گردد.(صالحی، ۱۳۷۸). مجیدی نسب (۱۳۷۴) بیشترین آلودگی ویبریو را در بافت هپاتوپانکراس گزارش کرده در صورتیکه دراین گزارش بیشترین الودگی ناشی از ویبریوها در بافت آبشش گزارش گردیده است و در بافت هپاتوبانکراس تنها دو باکتری *V.mimicus* و *Plesiomonas shigelloides* گزارش گردید. براساس گزارش سایر محقیقن نیزاز هپاتوپانکراس میگوهای غیر بیمار پاسفید غربی نیز گونه های *V. alginolyticus*و *V. mimicus* و گونه ناشناخته دیگری جداسازی شده است(Gomez et al., 1998) ولی برخی نویسندگان ادعا کرده اند که باکتریها عموما نمی توانند در هپاتوپانکراس میگوها وجود داشته باشند چونکه هپاتوپانکراس دارای لایه ای است که مانع ورود اجسام بزرگتر از ۰/۱ میلی متر می شود(Hopkin and Nott., 1980).حدس زده می شود ترکیب این لایه و آنزیمهای گوارشی مانع از ورود باکتریها به هپاتوپانکراس شود و حضور باکتریها در هپاتوپانکراس به دلیل نقصی در این مکانیسم است (Alday-sanz, 1994) ولی در مطالعه حاضر گونه هایی از ویبریو در هپاتوپانکراس میگوهای مولد سالم دیده شد.

در میان باکتریهای شناسائی شده گونه پلسیموناس شیگلا نیز شناسائی شده است. این باکتری یکی از باکتریهائی است که موجب عفونت روده ائی در انسان شده و از طریق آبزیان و سایر موجودات دریائی در محیط گسترش پیدا می‌کند (Christiane و همکاران، ۲۰۰۸). بنا براین کنترل این باکتر ی در محیط نیز حائز اهمیت می‌باشد. این باکتری نیز در خانواده ویبریوناسه قرار دارد و درمحیطهای دارای آبهای قلیائی بیشتر گزارش شده و با توجه به اینکه آب استخرهای پرورشی دراستان خوزستان معمولا دارای pH قلیائی (۸ تا ۸/۵) می‌باشند (افشارنسب و همکاران،۱۳۸۶).یکی از دلایل گزارش آن در استان خوزستان شاید به دلیل این موضوع باشد. برای اثبات این مهم نیاز به تحقیقات بیشتر ضروری است.

مهمترین قارچ شناسائی شده دراین بررسی آسپرژیلوس فلاووس بود. در بررسی مرتضائی و همکاران (۱۳۸۷) قارچهای پنی سیلسوم، آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس فلاووس، موکور، رایزوپوس و مخمر مهمترین قارچهای میگوهای مولد را تشکیل می دادند. قارچها عوامل فرصت طلب هستند و در سراسر دنیا حدود ۵۰۰ گونه قارچ از محیط دریایی و خورها جداسازی شده است. برخی از این قارچها برای میگو بیماریزا می باشند. قارچهایی مثل لاژنیدیوم و سیرولپیدیوم بطور مشخص لاروهای میگو را مورد حمله قرار می دهند در حالیکه جنس فوزاریوم

مراحل پست لاروی و جوانی را بیشتر تحت تاثیر قرار می دهند(Gabriel and Felipe,2000). در این بررسی قارچهای بیمارزای فوق شناسایی نشدند اما آسپرژیلوس فلاووس مهمترین قارچ شناسایی شده بود. قارچهای شناسایی شده در این بررسی نسبت به قارچهای جدا سازی شده در سال ۱۳۷۸، همخوانی نداشته و این موضوع ممکن است بدلیل تغییر در گونه میگوی مولد در سال ۱۳۸۷ و سال ۱۳۹۲ باشد. همچنین شرایط نگهداری مولدین نیز طی سالهای گذشته بهبود یافته و در گلخانه و با شرایط بهداشتی بهتری نگهداری میشوند. همچنین تعویض مکرر آب و ضدعفونی وسایل موجب جلوگیری از بروز آلودگیهای قارچی میشود.

در استان بوشهر نیز در سال ۱۳۷۸ بیشترین قارچهای شناسایی شده از مزارع پرورش میگوی حله مربوط به پنی سیلیوم، آسپرژیلوس ها و کلادوسپوریومها بوده اند(حسین خضری،۱۳۷۸).که باز با قارچهای شناسایی شده در این بررسی منطبق نمی‌باشد. در سال ۱۳۷۶، زرگر علاوه بر قارچ فوزاریوم، قارچهای آسپرژیلوس فلاووس، آلترناریا و پنی سیلیوم را بعنوان قارچهای سمی از مراکز تکثیر شناسایی کرده است(زرگر،۱۳۷۶).

قاچهایی مانند آسپرژیلوس و پنی سیلیومها توانایی تولید آفلاتوکسین و مایکوتوکسین را دارند. آفلاتوکسین ها موجب بی اشتهایی و کاهش رشد میگوها و حتی مرگ ومیر آنها می شوند.غذاهایی که در محیط های گرم و مرطوب نگهداری می شوند امکان رشد انواع آسپرژیلوس ها به خصوص آسپرژیلوی فلاووس در آنها وجود دارد که در نتیجه این مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین می شوند و این سم موجب نکروز اپی تلیوم توبولهای هپاتوپانکراسی میگو می شوند(Bell and Lightner,1988).

نتایج حاصل ازاین بررسی نشان داد که از نظر ویوسی، عامل خاص بیماریزا دیده نشد. بر اساس گزارش (2011) Harpeni یکی از عواملی که موجب مقاومت میگوهای بالغ دربرابر ویروسها شده و میتواند مانع از بروز بیماری گردد فاکتور انترفرون بوده که این عامل بالاخص در میگوی بالغ پاسفید غربی بیشتر از سایر میگوها بوده و در مراحل جوانی و بلوغ از طریق سلولهای تولید کننده هموسیت بالاخص در بافتهای هماتوپیتیک در ایندسته از میگوها تولید می‌شود و لی این عامل در میگوهای پست لارو بدلیل عدم رشد بافتهای هماتوپیتیک تولید نشده و ویروسها در مقیاس کم نیز می‌توانند بیماریزائی خود را نشان دهند. از طرفی علیرغم اجرای آزمایش Nested – PCR برای نمونه های میگوی مورد آزمایش در مولدین این انتظار است که ویروسها در مقیاس خیلی کم نیز شناسائی شوند ولی باتوجه به اینکه کیتهای تولید شده دارای میزان حساسیت (Sensitivity) خاص بوده و توانائی حداکثر ۲۰ ویروس در بافت را دارند، امکان اینکه میزان ویروسها در مقیاس خیلی کم بوده(کمتر هز ۲۰ ویروس در بافت) و یا نوع ویروس ایجاد کننده بیماری لکه سفید در میگوهای پاسفید نگهداری شده در شرایط ایران با ویروسی که بر اساس آن کیت IQ2000 تولید شده است متفاوت باشد، این کیت نتواند ویروس سویه ایران را در مراکز هچری تشخیص دهد.کیت IQ2000 می‌تواند تا ۲۰ کپی از ویروس را تشخیص داده وکمتر از آن را نمی‌تواند تشخیص دهد در صورتیکه بر اساس تحقیق LOو همکاران(۱۹۹۸) کیت تولیدی در تایوان تا ۱۰ کپی از ویروس نیز میتواند تشخیص دهد. همچنین بر اساس گزارش Semironi (۲۰۱۳) میزان اختلاف در ژنوم

ویروس لکه سفید تولید کننده بیماری در ایران با سایر مناطق بر اساس اختلاف در قالب خواندنی باز (Open Reading Frame) شماره ۹۴(ORF94) ویروس لکه سفید درایران در مناطق خوزستان و بوشهر با سیستان و بلوچستان اختلاف داشته و این احتلاف با ویروسهای لکه سفید در کشورهای چین، تایلند و تایوان نیز وجود دارد. بنابر این ضروری است که کیتهای تشخیصی با بخشی از ژنوم ویروسهای ایجاد کننده بیماری در ایران تولید گردد.

در بررسی آسیب شناسی میگوهای مورد آزمایش علائمی در برخی از میگوها مشاهده گردید که در تصاویر ۵-۳ مشخص گردیده است. براساس گزارش Flegel و **Pasharawipas** (۱۹۹۸) در پاره ائی از آلودگیهای سخت پوستان بالاخص ناشی از باکتریها و قارچها حالت Accomodation و یا تطابق در میگوها بوجود میاید که موجود زنده علیرغم آلودگی در مقابل آن از خود ایمنی نشان داده (Krol etal., 1990; Lightner, 1996) این موضوع نیازمند برسی بیشتر در ایران را دارد.

بااین حال نتایج حاصل ازاین بررسی نشان میدهد هرچند شرایط نگهداری مولدین میگو درایران هر روز بهتر میشود و لی با این وجود اعمال شیوهای مدیریتی بهتر و تلاش در جهت تولید میگوی عاری از بیماری از مهمترین الویتهای این صنعت میباشد.

جدول ۱-٤: میزان مولدین مورد استفاده در کشور طی سالهای ۱۳۹۰-۱۳۹۲

سال	تعداد مولدین ماده	تعداد مولدین نر	تعدا پست لارو تولیدی (میلیون قطعه)
۱۳۹۰	۱۳۰۰۳	۱۲۶۳۰	۸۶۶
۱۳۹۱	۱۴۷۲۰	۱۲۵۰۰	۱۱۱۵
۱۳۹۲	۱۴۵۶۷	۱۴۴۳۰	۱۱۵۰
جمع	۴۲۲۹۰	۳۹۵۶۰	۳۱۳۱

بر اساس گزارش اداره آمار سازمان شیلات ایران طی سه سال گذشته و مطابق جدول 1-4 تعداد مولد مورد استفاده در کشور بالغ بر ۸۱۷۹۰ مولد بوده است که جمعا بالغ بر ۳۱۳۱ قطعه پست لارو از آنها تولید شده است. با احتساب هر قطعه پست لارو به میزان ۶۰ ریال ارزش تولید پست لارو حاصل از مولدین به رقمی معادل ۱۸۷۸۶۰ میلیون ریال میگردد. بااین ارزشی که مولدین میگو درتولید پست لارو دارند ضرورت بررسی بهداستی و جلوگیر از آلودگی آنها دو چندان می‌شود.

پیشنهادها

دراین ارتباط و به منظور حفظ سلامتی میگوهای مولد پیشنهادات ذیل ارائه میگردد:

۱- دور نگه داشتن مراکز تکثیر از مزارع پرورشی:

مراکز تکثیر که در کنار مزارع پرورشی قرار گرفته‌اند به راحتی می‌توانند آلوده شوند. منبع آلوده کننده مراکز تکثیر می‌تواند آب خروجی استخرهای پرورشی که آلوده به پاتوژن است، باشد. همچنین ویروس می‌تواند از طریق موجودات آبزی یا غیره به مراکز تکثیر منتقل شود، به منظور جلوگیری از انتشار بیماری از طریق آب و هوا، باید مراکز تکثیر را در محلی دور از مزارع پرورشی ایجاد نموده و سیستم را کاملاً بسته نگهداری نمود.

۲- رعایت نکات بهداشتی

کلیه مراکز تکثیر باید در محل ورودی از مواد ضد عفونی کننده مثل یدوفور با دوز ppm ۲۰۰ یا سایر ضد عفونی کننده‌ها مثل آهک استفاده نمایند. افرادی که وارد هچری می‌شوند باید کاملاً رعایت نکات بهداشتی از قبیل ضد عفونی کردن دست و پاها با مواد ضد عفونی کننده را نموده و بعداً وارد هچری شوند. وسایلی که بطور منظم مورد استفاده قرار می‌گیرند از قبیل تور و وسایل شیشه‌ای نیز باید قبل و بعد از استفاده در هر تانک مورد ضد عفونی قرار گیرند. ابزار و وسایل مورد استفاده باید در مواد ضد عفونی کننده از قبیل یدوفوربادوز ppm ۲۰۰ یا هیپوکلرید کلسیم با دوز ppm ۲۰۰ برای ۵ دقیقه ضد عفونی شوند براحتی می‌توان تعدادی ظرف محتوی مواد ضد عفونی کننده را همیشه در هچری بصورت آماده در اختیار داشت و همچنین اگر مورد استفاده قرار نگرفت تعویض نمود.

۳- ضد عفونی کردن آب

آب قبل از استفاده در هچری بایستی ضد عفونی شود تا ویروسها و سایر ارگانیسم‌های آسیب رسان را حذف نمود. آب دریا را باید فیلتر نمود (فیلتر شنی/ فیلتر توری) و به مدت یک شب نگه داشت تا اگر ذرات معلقی دارد رسوب شده و سپس با هیپوکلریت کلسیم ppm ۳۰ (کلر فعال ۶۵٪) برای ۱۲ ساعت نگه داشت و سپس با محلول سودا (در g/m^3 ۳۰ از $Na_2S_2O_3$) خنثی نمود و قبل از وارد کردن در هچری هوادهی نموده فیلترها را هم می‌توان با اشعه ماوراء بنفش یا ازن ضد عفونی کرد.

۴- انتخاب مولدین بدون ویروس

انتقال بیماری می‌تواند از طریق مولدین به نوزادان از طریق تخم‌های آلوده اتفاق بیافتد بنابراین انتخاب مولدین از طریق تست‌های حساس مثل PCR بسیار ضروری است. اگر مولدین قبل از غربال کردن و انتخاب، تخم‌ریزی نماید باید تخم‌ها و پست لاروها را با تست PCR غربال کرد.

۵- جلوگیری از واردات مولدین و لاروها

تعداد زیادی از بیماری ها از طریق وارد کردن مولدین و پست لاروها ممکن است به مزارع و مراکز تکثیر معرفی شوند، یک بی ملاحظه‌گی ابتدائی می‌تواند باعث انتقال بیماری به مراکز تکثیر شود. معرفی و انتقال جانوران و آبزیان از طریق کشورهای همسایه، هر چند که در شرایط قرنطینه و بهداشتی انجام شود، نمی‌توانند ۱۰۰٪ قابل اعتماد باشند. همچنین انتقال میگوی زنده با یستی بین مناطق مختلف کشور نیز باید به حداقل کاهش یابد تا از گسترش بیماریها جلوگیری شود.

۶- پیشگیری در حین انتقال یا نگهداری

در زمان انتقال میگو باید از آبی استفاده شود که میگو ازآن صید شده است، زیرا ممکن است آب محلهای دیگر آلوده به این ویروس باشد. آب موجود در تانکها جهت نگهداری مولدین نیز باید ضد عفونی شود، تا مطمئن گردید که آب فاقد ویروس است.

۷- نگهداری مولدین مناطق مختلف در تانکهای جداگانه

به منظور جلوگیری از آلودگی بین میگوهای مولد منابع مختلف، میگوها را که از محلهای مختلف وارد هچری می‌شوند باید جداگانه نگهداری نمود. تخم‌های خارج شده از مولدین مختلف نیز همچنین باید جداگانه نگهداری و پرورش یابند.

۸- جلوگیری از استفادهTrash fish در غذای مولدین

تعداد زیادی از گونه‌های Trash fish مثل خرچنگ، میگو و صدفها می‌توانند یا حمل کننده ویروس بیماری باشند یا بوسیله این ویروس آلوده شده باشد. بنابراین تغذیه میگوهای مولد با Trash fish می‌تواند منبعی جهت آلوده کردن مولدین به ویروس باشد. همچنین باید از مصرف محصولات یخ زده در مولدین جلوگیری کرد. جهت کاهش احتمالی ویروس باید Trash fish را بخار داد و بعد بعنوان غذای مولدین استفاده نمود.

۹- بهینه سازی تراکم میگو و نگهداری آنها

ذخیره کردن لارو با تراکم پایین باعث به حداقل رساندن استرس بر میگوها می‌شود. این عمل باعث می‌شود که میگو حالت ایمنی نسبت به پاتوژن پیدا نموده و شانس زنده ماندن میگوها افزایش یابد. بهترین و عملی ترین میزان ذخیره سازی در مراکز تکثیر تعداد ۲۰۰-۱۵۰ هزار ناپلی در هر متر مکعب می‌باشد. همچنین سلامت میگوها به کیفیت آب تانکها نیز بستگی دارد. کیفیت خوب آب باعث کاهش استرس، به حداقل رساندن ایجاد بیماری می‌شود. همچنین در هچری‌ها باید تغییرات درجه حرارت به حداقل کاهش یافته و مواد آلی را با خارج کردن غذای اضافی به حداقل رساند، همچنین میگوهای مرده نیز باید به طور منظم از حوضچه ها خارج شوند، پارامترهای دیگر مثل pH ، اکسیژن محلول، آمونیوم باید به طور منظم ثبت شده و در حد مطلوب نگهداری شوند.

۱۰- ضد عفونی کردن آب خروجی مراکز تکثیر

کلیه هچریها باید استخر ضد عفونی داشته باشند و آب خروجی را قبل از خارج کردن ضد عفونی کنند. آب باید ضد عفونی شده و سپس از هچری خارج نمود. خارج کردن آب بدون ضد عفونی از هچری ممکن است دارای ویروس بیماری لکه سفید یا سایر پاتوژنهای آسیب رسان به میگو باشند و این عوامل می‌توانند اثر مخربی بر روی هچریهای دیگر داشته باشند و بیماری دوباره به هچری یا مراکز تکثیر برگردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات ریاست، معاونین و همکاران محترم پژوهشکده میگوی کشور تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱. افشار نسب محمد ، فرامرز لالویی و سهراب رضوانی(۱۳۸۴) شناسایی بیماری لکه سفید White Spot Syndrome Disease با روش PCR در میگوی سفید هندی در ایران. مجله علمی شیلات ایران ، سال چهاردهم، شماره یک، بهار ۱۳۸۴.

۲. افشار نسب محمد.، متین فر عباس.، محمدی دوست مهرداد.، قوام پور علی.، مرتضائی رضا.، سبز علیزاده سارا.، پذیر خلیل.، فقیه غلامحسین .، حق نجات مختار.، قاسمی شهرام.(۱۳۸۶): تعین نرخ رشد، ،میانگین وزن ،میزان بقا، ضریب تبدیل غذا و تولید کل در پرورش میگوی وانامی (Litopenaeu svannamei)در ایران. مجله علمی شیلات ایران. سال ۱۳۸۶. شماره ۴

۳. افشارنسب محمد.، دشتیان نسب عقیل.، قره وی بهروز.،مرتضائی رضا وعابدیان آرمین. (۱۳۸۸).طرح ملی بهداشت و بیماریهای مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۳۸۸

۴. افشارنسب محمد.(۱۳۸۶a)بیماریهای ویروسی میگو.چاپ موسسه تحقیقات شیلات.۲۱۰ صفحه

۵. افشارنسب محمد.(۱۳۸۶b) روشهای تشخیص بیماریهای میگو.چاپ موسسه تحقیقات شیلات.۱۹۰ صفحه

۶. افشارنسب محمد.؛دشتیان نسب عقیل؛ یگانه وحید.(۱۳۸۶) بررسی بیماریزایی ویروس سندرم لکه سفید(*White spot syndrome virus*) در میگوی پا سفید(*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران.سال شانزدهم،شماره ۱،بهار.

۷. صدیق مروستی علی. (۱۳۷۰). بیوتکنیک تکثیر و پرورش میگو و وضعیت آن در ایران، پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۰۶۸.

۸. فائو.(۱۳۸۶). معرفی و انتقال میگوی سفیدغربی و میگوی آبی به آسیا و اوقیانوسیه . ترجمه غلامعباس زرشناس و محمد خلیل پذیر. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران.

۹. مجیدی نسب، ا (۱۳۷۷). بیماریهای میگوی های پرورشی ، انتشارات نوربخش ، ۲۰۸ صفحه.

۱۰. سالنامه آماری شیلات ایران(۱۳۸۶). سازمان شیلات ایران. معاونت توسعه نیروی انسانی. ۱۳۸۶.

۱۱. سلطانی مهدی. (۱۳۸۱). اثرات ملی و بین المللی ناشی از بیماری ویروسی لکه سفید در صنعت میگو، ماهنامه نظام دامپزشکی، ۰۲/۰۶/۱۳۸۱، ۳،

۱۲. حسین خضری پریسا.(۱۳۷۸) بررسی وضعیت مدیریت پرورش میگو در سایت حله – بوشهر.گزارش نهایی موسسه تحقیقات شیلات ایران.۱۷۶ صفحه

۱۳. زرگر اشکان.(۱۳۷۶) جداسازی و شناسایی فلور قارچی میگوهای پرورشی ایران در مرحله تکثیر.پایان نامه دانشگاه تهران- شماره ۲۵۶۹ .

۱۴. تمدنی جهرمی سعید؛ قره وی بهروز.(۱۳۸۳) تاثیر تراکم ذخیره سازی میگوی سفید هندی(*Penaeus indicus*) بر شرایط بهداشتی استخرهای پرورشی در منطقه تیاب شمالی استان هرمزگان

۱۵. شریف روحانی مصطفی.(۱۳۸۰) بهداشت و توسعه صنعت تکثیر و پرورش میگو در ایران. فصلنامه آبزی پرور سال نهم پائیز ۱۳۸۰

۱۶. صالحی عیسی(۱۳۷۸) بررسی وضعیت مدیریت پرورش در مزارع پرورش میگوی منطقه تیاب.گزارش نهایی موسسه تحقیقات شیلات ایران.۱۲۴ صفحه

۱۷. صادق نبوی سید محمد؛ حسامیان سارا؛ سهرابی بهروز؛ مهرابیمحمد رضا.(۱۳۷۸)مطالعه آلودگیهای ویبریو در میگوهای پرورشی سفید هندی و ببری سبز منطقه حله – بوشهر.گزارش نهایی موسسه تحقیقات شیلات ایران.

۱۸. مرتضایی رضا.، آهنگر زاده مینا.، هوشمند حسین.، محمد کر نیاز.، جرفیالهام.، سبز علیزاده سارا.، محسنی نژاد لفته.(۱۳۸۸) طرح ملی بهداشت و بیماریهای مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور. گزارش استان خوزستان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۳۸۸.

19. Alday-Sanz, V. (1994). Studies on the pathogenesis of Vibrio spp. infection in *Penaeus monodon* Fabricius. PhD thesis, Univ. of Stirling, Scotland.
20. Anon. (1994). Fisheries statistics of Indonesia 1993. Jakarta, Agriculture Department, Directorate General of Fisheries,118p.
21. Ausvet.(1997) scientific review of prawn disease report to AQIS
22. Bell,T.A and Lightner,D.V.(1988) A handbook of normal penaeid shrimp Histology.Baton Roug,LA:World Aquaculture Society.
23. Bondad-Reantaso.M.g.-; Subsinghe.R.P;Arthr J.R;Ogawa.k;Chinabut S;adlard.R;Tan.Z;Shariff.M.(2005). Disease and health management in asian aquaculture.Veterinary parasitology 132(2005)249-272.
24. Christiane, S. P., Simone, D. A., André Felipe das, M. S., Salvatore, S., Ignacio, B. M., Paulo, H.O., Dalia, D.P.R. (2008): *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonadace* family pathogen isolated from marine mammals of southern and south eastern Brazilian coast. Brazilian Journal of Microbiology (2008) 39:749-755.
25. De la Peña, L.D., Kakai, T., Muroga, K. (1995). Dynamics of *Vibrio sp* PJ in organs of orally infected kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. Fish. Pathol. 30: 39-45.
26. Flegel, T. W. and Alday-sanz, V. (1998). The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. Journal of Applied Ichthyology, 14, 269-273.
27. Flegel, T.W., Pasharawipas, T., (1998). Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogen. In: Flegel, T.W. (Ed.), Advances in Shrimp Biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok,pp. 245– 250.
28. Flegel, T. W., V. Thamavit, T. Pasharawipas and V. Alday-Sanz .(1999). "Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp (Penaeus monodon)." Aquaculture 174(3–4): 197-206.
29. Flegel, T.W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258, 1-33.
30. Flegel, T.W., Lightner, D.V., Lo, C.F. and Owens, L. (2008). Shrimp disease control: past, present and future, pp. 355-378. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
31. FAO. 2003. Review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886, Rev. 2. FAO, Rome, 95 pp.
32. Gabriel, A. G and Felipe, A. V. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Resent. Devel. Microbiology, 4 (2000): 333-348.

33. Gomez B.G., Mayen L.T., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V., Goerra F., (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus* v*annamei*. Aquaculture 163 ,pp. 1–9.

34. Hopkin, S.P., Nott, J.A., (1980). Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* L. with special reference to the B cells in the hepatopancreas. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 60, 891–907.
35. Harpeni, E. (2011). The potential roles of interferon in managing viral diseases in crustacean.J. Coastal Development.Vol 14. No.2
36. Huang J, Song XL, Yu J, Yang CH (1994) Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis –pathology of the shrimp explosive epidermic disease. Abstract. Yellow Sea Fishery Research Institute Qingdao PR China.
37. Karunasagar I., Karunasagar I. and Umesha R.K.(2004). Microbial Diseases in Shrimp Aquaculture.Marine Microbiology:Factets & opportunities:Ramaiah,N(Ed), 121-134.National Instiute of oceanography.Goa. (http://drs.nio.org/drs/handle/2264/78)
38. Krol R.M, Hawkins W.E, Overstreet R.M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured.
39. Li C. C., Yeh S.T., Chen J.C. (2010). Innate immunity of the white shrimp *Litopena eus vannamei* weakened by the combination of a Vibrio alginolyticus injection and low-salinity stress. Fish & Shel lfish Immunology. 28,121–127.
40. 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.
41. Lightner,D.V.(1996) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured Penaein shrimp. World Aquaculture Society,Baton Rouge,LA;USA,305P.
42. Lo CF, Chang YS, Cheng CT, Kou GH (1998) PCR monitoring of cultured shrimp for white spotsyndrome virus (WSSV) infection in growout ponds. In Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
43. Mohajeri, J., Afsharnasab, M., Jalali, B., Kakoolaki, S., Sharifrohani, M. and Haghighi, A., (2011). Immunological and histopathological changes in penaeus semisulcatus challenged with vibrio harveyi. *Iranian Journal of Fisheries Sciences,* 10 (2), 254-265.
44. Mohammad, A.R., Hashim, J.K., Gunasalam, J. and Radu,S., (2005). Microbiological risk assessment: Risk Assessment of Vibrio parahaemolyticus in Black Tiger Prawn (Penaeus monodon). Technical report, Ministry of Health Malaysia
45. Nash, G. L. (1990). Penaeus monodon grow- out disease. Ed. By New, M. B. Sarsam, H. D. Singh, T. Technical and economic uspects of shrimp farming Proceeding of the Aquatech90 conference,Kualalampur,Malaysia11-14 june1990.
46. - Rahman.M.M.(2007) Differences in virulence between white spot syndrome virus(wssv) isolates and testing of some strategies in wssv infected shrimp.Thesis for obtaining the degree of Doctor in veterinary sciences(ph.D).Faculty of veterinary medicine ,Ghent university 2007
47. Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P. and Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191: 133–144.
48. Semironi (2013) Genetic analysis of ORF94 in different White Spot Syndrome Virus (WSSV) isolates of Iran, Under publiseing.
49. Takahashi, Y. ;Itami, T. ; Kondo, M. ; Maeda, M. ; Fujii, R. ; Tomonaga, S. ; Supamattya, K. and Boonyaratpalin, S., (1994). Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (penaeus japonicus). Fish pathol. Vol.29, No.2, pp.121-125
50. Valderama, D. & Anderson, J. L. (2011). Shrimp production review. GOAL 2011,Santiago, Chile, November .2011, 9-6

51. .Van de Braak C.B.T., Botterblom M.H.A. , Taverne N., van Muiswinkel W.B., Rombout J.H.W.M., van der Knaap W.P.W. (2002). The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. Fish & Shellfish immunology;13:293–309.
52. Wyban. J.A. and Sweeney.J.N. (1991). " Intensive shrimp production technology." High Health Aquaculture Inc., Hawaii. pp.158.
53. Wyban, J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. In: W. Fulks and K.L. Main (editors), Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Honolulu, USA. pp. 257-268.

54. Wyban, J. 2007a. Domestication of Pacific white shrimp revolutionizes aquaculture.Global Aquaculture Advocate, 10(4):42-44.25-Wyban, J. 2007b. Thailand s white shrimp revolution. Global Aquaculture Advocate,10(3):56-58.
55. Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriuraiwatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajorn A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in Penaeus monodon. Dis Aquat Org 21: 69-77.
56. 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.
57. Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou GH (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of Penaeus monodon. Dis Aquat Org 23: 239-242.

Abstract:

The investigation of health and diseas situation of shrimp broodstook (*Litopenaeus vannamei*) in Boushehr province in earthen pond and cancreat and fiberglas was carried out from May 2014 until July 2014 with collected 100 samples brood stook from earthen pond and 100 samples from earth and fiberglas thank.The clinical sign of samples documented in take history form and then the samples transport to Iran Shrimp Research Instituet in Bousheher. The bacterial and fungal studied was carried out with hemolymp, hepatopacreas and gill tissue and then the shrimp preserved in Davidson Fixative for histopathology. A part of uropoda also preserved in ethyl alcholo for PCR study and detecting viruses. The result showed *10 bacteria consist V.harveyii, V.parahaemolyticus, V.anguillarum, V.vulnificus, V.mimicus, V.damsela,V.nereis, plesiomonas shigelloides V.alginolyticus V.proteolyticus*, in earthen pond and 5 bacteria consit ,*V.alginolyticus V.proteolyticus*، *V.parahaemolyticus*، *V. damsela* ،*V.mimicus* were identified in fiberglas thank. In this study 10 fungi consist Penecilium, Asp. Niger, Asp. Flavious, Asp. fomigatus, Acromonium, Ulocladium, Mucor, Cladosporium, Alternaria, Rhizopus, and 5 of them were identified in both broodstock from earthen pond and fiberglas thank. However 6 parasite consist of zoothamnium, vorticella, Acneta, Ephelota, Epistylis, Epistylis and Apastomom identified in earthen pond and three of them were identified in fiberglas thank. In histoplatholgy some tissue showed the effect of vibrio infecting in different organs as well in gill and midgut and the PCR examined were negative for all viruses. Regarding the produce healthy broodstock we need excuted the High Health procdure.

Key words: Shrimp broodstock, Health, Disaes, Histopathology, PCR

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

---

Project Title : The Study on health situation of shrimp *Litopenaus vannamei* brood-stoock production in earthen pond and comparing with fiberglass or cement thanks
Approved Number: 2-80-12-93107
Author: Mohammad Afsharnasab
Project Researcher : Mohammad Afsharnasab
Collaborator(s) *:* Babak Ghaednia, Aghil Dashtyannasab, Maryam mirbakhsh, Shapoor Kakolaki,Mohammad reza Mehrabi,Vahid Yeganeh,Ali Nazari
Advisor(s): -
Supervisor:-
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2014
Period of execution : 6 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 :

The Study on health situation of shrimp *Litopenaus vannamei* broodstoock production in earthen pond and comparing with fiberglass or cement thanks

Project Researcher :
Mohammad Afsharnasab

Register NO.
46060