وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور

عنوان پروژه تحقیقاتی :

ردیابی و شناسایی ویروس های WSSV، TSV و IHHNV در میگوهای پرورشی و سخت پوستان وحشی چوئبده آبادان و بررسی بیماری زایی آن ها

مجری :

مینا آهنگرزاده

شماره ثبت

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور

عنوان پروژه : ردیابی و شناسایی ویروس های WSSV، TSV و IHHNV **در میگوهای پرورشی و سخت پوستان وحشی چوئبده آبادان و بررسی بیماری زایی آن ها**
شماره مصوب پروژه : ۹۰۰۳۰-۱۲-۷۴-۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مینا آهنگرزاده
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مینا آهنگرزاده
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : حسین هوشمند- سید رضا سید مرتضایی- الهام جرفی- لفته محسنی نژاد- جمال سلیمانی- محمد سنجری- محمد افشار نسب- مهرداد محمدی دوست- کامران حاجب نژاد- مرتضی سوری
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : رحیم پیغان
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : عیسی شریف پور
محل اجرا : استان خوزستان
تاریخ شروع : ۹۰/۱/۱
مدت اجرا : ۲ سال و ۹ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۳
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 : ردیابی و شناسایی ویروس های WSSV، TSV و IHHNV در میگوهای پرورشی و سخت پوستان وحشی چوئبده آبادان و بررسی بیماری زایی آن ها

کد مصوب : ۹۰۰۳۰-۱۲-۷۴-۴

شماره ثبت (فروست) : **تاریخ :**

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مینا آهنگرزاده دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته دامپزشکی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۳/۷/۶ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس ارشد در پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور مشغول بوده است.

فهرست مطالب

صفحه عنوان

چکیده ۳
۱- مقدمه ۴
۱-۱-تاریخچه پرورش میگو ۴
۱-۲-مشخصات گونه وانامی و پرورش آن در جهان و ایران ۷
۱-۳- بیماری‌های عفونی میگو با تاکید بر بیماری‌های ویروسی ۸
۱-۳-۱- بیماری‌های ویروسی میگو ۹
۱-۳-۲- مروری بر سندرم لکه سفید (**WSSV**) ۱۱
۱-۳-۲-۱- بیماری‌زایی ویروس لکه سفید ۱۲
۱-۳-۲-۲- علائم بالینی بیماری لکه سفید ۱۳
۱-۳-۳- بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم **Infection Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)** ۱۴
۱-۳-۴- بیماری سندرم تورا **Taura syndrome disease (TSD)** ۱۵
۲- مواد و روش ها ۱۸
۲-۱- نمونه برداری جهت انجام آزمایشات ویروس شناسی و آسیب شناسی ۱۸
۲-۲- بررسی های مولکولی جهت ردیابی ویروس‌ها ۱۸
۲-۲-۱-آماده سازی نمونه و استخراج **DNA** برای تشخیص ویروس‌های **WSSV** و **IHHNV** با استفاده از کیت **IQ2000** ۱۸
۲-۲-۲- آماده سازی نمونه و استخراج **RNA** برای تشخیص ویروس **TSV** ۲۰
۲-۲-۳- عملیات **PCR** در کیت های تشخیصی ۲۰
۲-۳- روش آسیب شناسی بافتی ۲۳
۲-۳-۱- فرآوری بافت ۲۳
۲-۳-۲- قالب گیری ۲۳
۲-۳-۳- مقطع گیری ۲۴
۲-۳-۴- رنگ آمیزی و مونته کردن ۲۴
۲-۴- بررسی بیماری‌زایی ۲۵
۳-نتایج ۲۸

۳-۱-عامل بیماری‌زای لکه سفید ۳۱
۳-۲-عامل بیماری‌زای **TSV** ۳۱
۳-۳-عامل بیماریزای **IHHNV** ۳۱
۳-۴-مواجهه سازی ۳۴
۳-۵-نتایج آسیب شناسی ۳۷
۴-بحث و نتیجه گیری ۴۰
۵-پیشنهادها ۴۵
۶-منابع ۴۶
۷-خلاصه انگلیسی ۵۲

فهرست جداول

صفحه عنوان

جدول ۱- میزان تولید میگوی پرورشی در جهان از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۶(آمار سازمان جهانی **FAO**).....۵
جدول ۲- مهم‌ترین بیماریهای ویروسی میگو..... ۱۰
جدول ۳- گروه های چالش شده..... ۲۶
جدول۴- میزان مرگ و میر در تیمارهای مختلف و روزهای مختلف پس از چالش ۳۴
جدول ۵- نتایج **PCR** در گروهای مورد چالش..... ۳۶

فهرست تصاویر

صفحه عنوان

تصویر۱ – محلول‌های استفاده شده در مرحله استخراج به روش **DTAB-CTAB** ۱۹
تصویر۲ – کیت های تشخیص مولکولی ویروس های **TSV**، **WSSV** و **IHHNV** ۲۱
تصویر ۳- شرایط **PCR** جهت تشخیص ویروس لکه سفید ۲۲
تصویر ۴- شرایط **PCR** جهت تشخیص ویروس **TSV** ۲۲
تصویر ۵- شرایط **PCR** جهت تشخیص ویروس **IHHNV** ۲۲
تصویر۶- نمونه برداری جهت آسیب شناسی بافت میگو ۲۴
تصویر۷- دستگاه آماده سازی بافت یا**Tissue processor** ۲۴
تصویر۸- دستگاه برش بافت (**Microtome**) و حمام آب ۲۵
تصویر ۹- گروه های مورد چالش با ویروس لکه سفید ۲۶
تصویر ۱۰- برداشت میگوهای تلف شده از هر آکواریوم ۲۷
تصویر۱۱- تلفات در تیمار کنترل مثبت ۲۷
تصویر ۱۲- نمونه برداری از میگوهای تلف شده جهت بررسی های مولکولی و آسیب شناسی ۲۸
تصویر۱۳- راهنمای تفسیر نتایج حاصل از کیتهای تشخیصی تک ویروسی برای عوامل بیماریزای **TSV**، **WSSV** و **IHHNV** ۳۰
تصویر۱۴- راهنمای کیت **IQ2000-WSSV** ۳۱
تصویر۱۵- نمونه های **WSSV** کار شده با کیت**IQ2000** ۳۲
تصویر۱۶- نمونه های **WSSV** کار شده با کیت**IQ2000** ۳۲
تصویر۱۷- نمونه های **IHHNV** کار شده با کیت**IQ2000** ۳۳
تصویر۱۸- نمونه های **TSV** کار شده با کیت**IQ2000** ۳۳
تصویر۱۹- نمونه های چالش شده برای بررسی حضور ویروس لکه سفید با کیت**IQ2000** ۳۷
تصویر ۲۰- بروز گنجیدگی در هسته سلول بافت آبشش ۳۸
تصویر ۲۱- واکوئله شدن هپاتوسیت ها دربافت هپاتوپانکراس ۳۸
تصویر ۲۱- بروز گنجیدگی در بافت همبند هپاتوپانکراس ۳۹

فهرست نمودارها

صفحه عنوان

نمودار۱- رشد سالیانه تولید میگو پرورشی در جهان و سهم گونه وانامی از رشد سالیانه ۸
نمودار۲- مقایسه درصد تلفات در تیمارهای مختلف پس از چالش ۳۵
نمودار۳- مقایسه تعداد تلفات در تیمارهای مختلف پس از چالش..... ۳۵
نمودار۴-تلفات تجمعی میگوها در تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف پس از چالش..... ۳۶

Ministry of Jihad – e – Agriculture

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION –

South Aquaculture Research Center

Project Title : Identification of WSSV,TSV & IHHNV in wild and cultured shrimps and crustaceans in khuzestan province - Abadan and investigation of its pathogenicity

Approved Number: 4-74-12-90030
Author: Mina Ahangarzadeh

Project Researcher : Mina Ahangarzadeh

Collaborator(s) : Hossein Houshmand, S.Reza S.mortezaei, Mohammad Afsharnasab, Lefte mohseni nejad, Jamal soleimani, Mohammad sanjari, Elham Jorfi, Mehrdad Mohammadidust, Kamran Hajebnejad, Morteza Souri

Advisor(s): Rahim Peyghan

Supervisor: Issa sharifpour

Location of execution : Khuzestan province

Date of Beginning : 2011
Period of execution : 2 Years & 9 Months
Publisher : Iranian Fisheries Research Organization
Date of publishing : 2014
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 RESEARCH ORGANIZATION -

South Aquaculture Research Center

Project Title :

Identification of WSSV,TSV & IHHNV in wild and cultured shrimps and crustaceans in khuzestan province - Abadan and investigation of its pathogenicity

Project Researcher :

Mina Ahangarzadeh

Register NO.

چکیده

با توجه به بروز بیماری لکه سفید در طی سالهای ۸۱ و ۸۴ و خسارت ناشی از این بیماری به پرورش دهندگان، از سال ۱۳۸۵ گونه جدید پاسفید غربی به مزارع پرورش منطقه چوئبده آبادان معرفی گردید. از آنجایی که در سالهای ۱۳۸۷ و ۱۳۸۹ مزارع پرورشی استان مجدداً دچار تلفات ناشی از WSSV گردیدند احتمال آن می رود که ویروس به ذخایر بومی منطقه منتقل شده و یا بعضی از آبزیان موجود به صورت ناقل در آمده باشند و هر ساله با شروع دوره پرورش باعث تلفات در میگوهای پرورشی شود.لذا اطمینان از وجود یا عدم وجود این ویروس‌ها در آبزیان منطقه و احتمال بیماری زایی آنها در میگوهای پرورشی، شناسایی عواملی که می توانند این ویروس‌ها (WSSV,TSV,IHHNV) را در خود حفظ کرده و با انتقال آنها به مزارع پرورشی، سیستم پرورش را مورد تهدید قرار دهند بسیار حائز اهمیت می نماید.در نتیجه از اهداف اصلی این پروژه ردیابی ویروس‌هایWSSV وTSV و IHHNV در آبزیان منطقه ساحلی خوزستان با تأکید بر میگوهای وحشی و خرچنگ می باشد. بدین منظور در طول دوره پرورش از ۱۰ مزرعه فعال بر اساس تراکم مزارع، بصورت دو هفته یکبار و از پست لاروهای (۱۰۰ پست لارو) ۳ مرکز تکثیر فعال در منطقه قبل از ذخیره سازی نمونه برداری شد و نمونه ها با استفاده از روش مولکولی (کیت Iq2000) و آسیب شناسی برای شناسایی ویروس‌های WSSV، IHHNV و TSV مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج، حضور ویروس لکه سفید را در میگوهای پرورشی و وحشی و ویروس TSV را فقط در دو مورد از میگوهای پرورشی نشان داد ولی هیچ موردی از حضور ویروس IHHNV مشاهده نگردید.

جهت بررسی بیماری‌زایی ویروس لکه سفید جدا شده از میگوهای وحشی و پرورشی از روش مواجهه سازی استفاده گردید. نتایج مواجهه‌سازی نشان دادکه ویروس لکه سفید از میگوی وحشی و پرورشی آلوده به میگوی پرورشی سالم قابل انتقال است و میانگین درصد تلفات در تیمار تغذیه شده با میگوی وحشی آلوده به عامل بیماری‌زای لکه سفید ۱۰/۴ ± ۳۸/۳۳ و تیمار تغذیه شده با میگوی پرورشی آلوده ۷/۶۳ ± ۶۱/۶۶ و در تیمار کنترل مثبت ۳/۵± ۸۷/۵ بود.

لغات کلیدی:میگوی‌وانامی، لکه‌سفید، TSV، IHHNV، آسیب‌شناسی بافتی، مواجهه‌سازی، آبادان، استان خوزستان

۱- مقدمه

افزایش تقاضا برای آبزیان و محدود بودن ذخایر دریایی موجب گردیده تا آبزی‌پروری به عنوان مهم‌ترین راه تأمین پروتئین مورد نیاز جمعیت روبه رشد جهان مورد توجه قرار گیرد و همچنین کاهش تلاش صیادی از دریاها و افزایش درآمد ساحل نشینان به ویژه در کشورهای کم‌درآمد را نیز به دنبال دارد. در سال‌های آتی تولید به روش آبزی‌پروری به ویژه گونه‌هایی نظیر میگو رشد دو رقمی خواهد داشت و تولید آبزیان پرورشی بر تولید آبزیان دریایی به عنوان منبع اصلی منابع پروتئینی خوراکی، پیشی خواهد گرفت. بر اساس برآوردهای فائو، در صورتی که مصرف سرانه آبزیان ثابت بماند، در سال ۲۰۳۰ چهل میلیون تن آبزیان مازاد بر تولید کنونی، مورد نیاز جامعه بشری است(FAO, 2003).

افزایش سریع در تولید میگوی پرورشی بواسطه توسعه جغرافیایی و پیشرفت تکنولوژی در ظرفیت تکثیر، پرورش لارو، تغذیه مصنوعی و تراکم در سیستم پرورش ایجاد می شود.

سیستم های پرورش میگو در سراسر جهان تنوع زیادی دارند که این بستگی به عواملی از جمله تولید در واحدسطح، تراکم ذخیره سازی، نوع و میزان غذای استفاده شده، درصد تعویض آب، هوادهی، سایز و شکل استخر و همچنین عمق آب دارد (fast., 1992).

۱-۱-تاریخچه پرورش میگو

قدمت پرورش میگو نسبتاً طولانی است، اما پرورش تجاری آن به سال‌های نخست دهه ۱۹۶۰ میلادی و به کشور ژاپن برمی‌گردد. پرورش میگو در کشورهای آسیای جنوب شرقی از قبیل تایلند، فلیپین، اندونزی، سنگاپور، مالزی، هند و نیز کشورهای مکزیک، پاناما، کاستاریکا، اکوادور و پرو رشد سریع داشته است. درسال‌های اخیر، پرورش میگو یکی از عمده‌ترین موضوعات تجاری تعدادی از کشورهای آسیایی گردیده است بطوریکه میزان

بالای تولید سالانه و ارزآوری کلان و سود مناسبی که این پیشه برای کشورهای تولید کننده دارد مشخص کننده این موضوع است (زرشناس۱۳۸۶).

تراکم پرورش، میزان تولید و کاربرد تکنولوژیهای پیشرفته در رشد، باعث تفاوت بین کشورهای پرورش دهنده میگو می‌شود.

۵۰ کشور که بیشتر از آسیا، آمریکای جنوبی و شمالی و مرکزی هستند در پرورش میگو فعالیت دارند. (Fao, 2005)

از سال ۱۹۸۰ تا سال ۲۰۰۴ میزان صید میگو از دریا ۲/۳ برابر شده در حالی که پرورش میگو در همین مدت ۳۴ برابر گردیده است. آمار فائو نشان می‌دهد که تولید میگوی پرورشی از ۹۱۷۳۱۵ تن در سال ۱۹۹۶ به ۳۱۴۶۹۱۸ تن در سال ۲۰۰۶ رسیده است (جدول ۱). عمده‌ترین کشورهای تولید کننده میگوی پرورشی در جهان و درصد تولید آنها در سال ۲۰۰۶ به ترتیب چین ۳۹٪، تایلند ۱۶٪، ویتنام ۱۱٪، اندونزی ۱۱٪، هند ۴٪، مکزیک ۴٪ و برزیل ۲٪ بوده‌اند(FAO, 2005).

جدول ۱- میزان تولید میگوی پرورشی در جهان از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۶(آمار سازمان جهانی **FAO**)

سال / کشور	۲۰۰۰	۲۰۰۱	۲۰۰۲	۲۰۰۳	۲۰۰۴	۲۰۰۵	۲۰۰۶
چین	۲۱۷۹۹۴	۳۰۴۱۸۲	۳۸۴۱۴۱	۷۸۹۳۷۳	۹۳۵۹۴۴	۱۰۲۴۹۴۹	۱۲۴۲۳۸۵
تایلند	۳۰۹۸۶۲	۲۸۰۰۰۷	۲۶۴۹۲۴	۳۳۰۷۲۵	۳۶۰۲۹۲	۴۰۱۲۵۱	۵۰۰۸۰۰
ویتنام	۸۹۹۸۹	۱۴۹۹۷۹	۱۸۰۶۶۲	۲۳۱۷۱۷	۲۷۵۵۶۹	۳۲۷۲۰۰	۳۴۹۰۰۰
اندونزی	۱۳۸۰۲۳	۱۴۹۱۶۸	۱۵۹۵۹۷	۱۹۱۱۴۸	۲۳۸۵۶۷	۲۷۹۵۳۹	۳۳۹۸۰۳
هند	۹۶۷۱۵	۱۰۲۹۳۰	۱۱۴۹۷۰	۱۱۳۲۴۰	۱۱۷۵۸۹	۱۳۰۸۰۵	۱۳۱۵۳۵
مکزیک	۳۳۴۸۰	۴۸۰۱۴	۴۵۸۵۳	۴۵۸۵۷	۶۲۳۶۱	۹۰۰۰۸	۱۱۲۴۹۵
برزیل	۲۵۳۸۸	۴۰۰۰۰	۶۰۲۵۳	۹۰۱۹۰	۷۵۹۰۴	۶۳۱۳۴	۶۵۰۰۰
ایران	۴۰۵۰	۷۶۰۷	۵۹۶۰	۷۴۶۲	۸۹۰۳	۳۵۷۷	۵۷۰۰
سایر	۲۴۶۲۳۰	۲۶۴۷۵۹	۲۷۸۲۱۲	۳۲۵۸۳۰	۳۵۰۹۹۸	۳۷۷۸۷۰	۴۰۰۲۰۰
تولید جهانی	۱۱۶۱۷۳۱	۱۳۴۶۶۴۶	۱۴۹۴۵۷۲	۲۱۲۵۵۴۲	۲۴۲۶۱۲۷	۲۶۹۸۳۳۳	۳۱۴۶۹۱۸

۱-۲- مشخصات گونه وانامی و پرورش آن در جهان و ایران

لیتوپنئوس وانامی مهم‌ترین گونه میگو در سیستم تولید آبزی پروری است. سایر گونه های مهم میگو شامل: *P.monodon, P. chinesis , P.merguiensis* هستند.لیتوپنئوس وانامی به طور طبیعی در طول سواحل آمریکای مرکزی و جنوبی اقیانوس آرام حضور دارد (Holthuis, 1980).

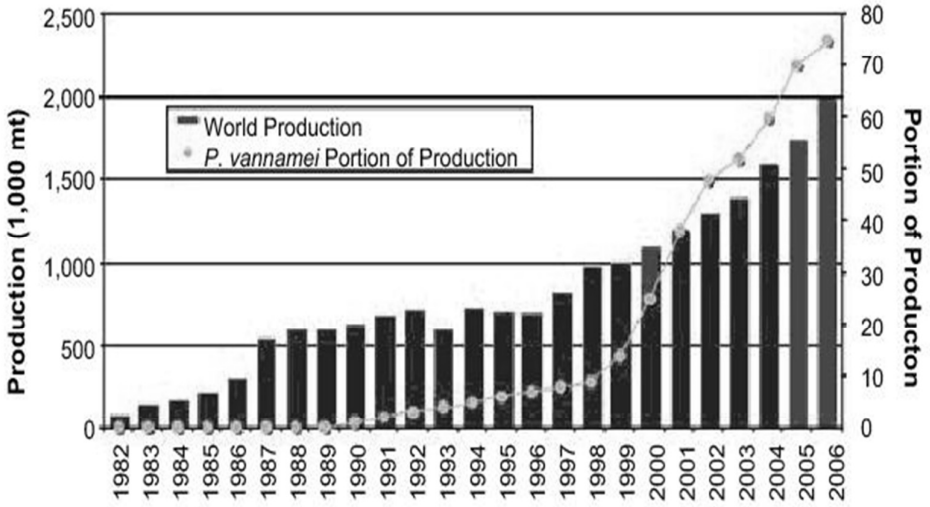
میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)، گونه بومی سواحل غربی اقیانوس آرام واقع در کشورهای آمریکای لاتین پرو در جنوب تا مکزیک در شمال می‌باشد که دمای آب این مناطق در تمام طول سال به طور طبیعی بالای ۲۰ درجه سانتی گراد می‌باشد (Wyban and Sweeny., 1991; Rosenberry., 2002).

در اواخر سال ۱۹۷۰ این گونه به آسیا معرفی شد و ابتدا از فیلیپین شروع شد، در سال ۱۹۸۸ به چین منتقل گردید و فقط چین توانست آن را در حد صنعتی تولید کند. لیکن انتقال اولین محموله تجاری میگوی مولد عاری از هر گونه ویروس، از هاوایی به تایوان در سال ۱۹۹۶ صورت گرفت. این معرفی از چین و تایوان آغاز و سپس تا فلیپین، اندونزی، ویتنام، تایلند، مالزی و هند گسترش یافت (Wyban., 2003).

پنئوس وانامی نسبت به سایر گونه‌ها مزیت‌هایی دارد که شامل تهیه سویه های بدون پاتوژن یا SPF و سویه‌های مقاوم به پاتوژن یا SPR، سرعت رشد بالا، مناسب برای ذخیره سازی با تراکم بالا، تحمل دامنه وسیع شوری و دمایی، نیاز پایین به پروتئین در جیره غذایی، سادگی تکثیر و تولید مثل و درصد بالای بقای لارو می‌باشد (Briggs et al., 2004).

پرورش میگوی وانامی در کشورهای جنوب شرق آسیا از سال‌های آغازین دهه ۱۹۹۰ آغاز شد و به سرعت رشد کرد. این روند ادامه دارد و در بسیاری از نقاط جهان میگوی وانامی جایگزین میگوی مونودون شده است. تولید میگوی مونودون از سال ۱۹۹۳ تا ۲۰۰۵ یک و نیم برابر شده ولی افزایش تولید میگوی وانامی در همین مقطع ۱۴/۷ برابر بوده است. در مجموع تولید وانامی در سال ۲۰۰۵، ۱/۶۸ برابر مونودون گزارش شده است. در سال ۲۰۰۵ میگوی سفید غربی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) با تولید ۱۱۹۳۲۴۸ تن و ۵۶/۴ درصد، مونودون با ۷۱۰۸۰۶ تن و ۳۳/۵۹ درصد و میگوی موزی با تولید ۸۱۱۰۵ تن ۳/۸۳ درصد، سهم عمده ای را در تولید جهانی

آبزی پروری دارا بوده اند. نزدیک به ۸۵٪ تولید میگوی وانامی، طی این سال‌ها مربوط به مناطق آسیایی است که این میگو گونه بومی آنجا نمی‌باشد (Fao, 2005). تولید جهانی میگو پرورشی گونه لیتوپنئوس وانامی از حدود ۱۰ درصد از کل تولید جهان در سال ۱۹۹۸ به ۷۵ درصد در سال ۲۰۰۶ رسید (نمودار۱).



نمودار۱- رشد سالیانه تولید میگو پرورشی در جهان و سهم گونه وانامی از رشد سالیانه

معرفی گونه وانامی به صنعت تکثیر و پرورش ایران توسط مؤسسه تحقیقات شیلات ایران در سال ۱۳۸۳ صورت گرفت و نتایج موفقت‌آمیزی به دنبال داشت. در ادامه این طرح در سال ۱۳۸۵، اجرای دو پایلوت تحقیقاتی در استان‌های خوزستان و بوشهر با هدف امکان سنجی پرورش میگوی وانامی با تأکید بر بیماری لکه سفید در زمینه بهبود تولید میگو در کشور صورت گرفت و همچنین مقایسه‌ای بین تولید میگوی وانامی و سفید هندی انجام گرفت.(افشار نسب و همکاران ۱۳۸۷)

۳-۱- بیماری‌های عفونی میگو با تأکید بر بیماری‌های ویروسی

بیماری‌ها در سیستم پرورش میگو یکی از محدودیت‌های اصلی برای افزایش تولید هستند و باعث کاهش چشم‌گیر در تولید و اشتغال، کاهش دستمزد، محدودیت در صادرات و کاهش اطمینان مشتری می‌شود.بیماری‌های میگو به دو دسته عفونی و غیر عفونی تقسیم می شوند(Lightner&Redman 1998- Bondad Reantaso et al., 2005)

بیماری‌های عفونی توسط ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها ایجاد می شود.فاکتورهای بیولوژیکی مانند فلور میکروبی حاضر در استخرها نقش مهمی را در تحمل میگو به پاتوژن‌ها بازی می‌کنند.از راه‌های جلوگیری از بیماری‌ها در میگو می‌توان به مدیریت مناسب فلور میکروبی بوسیله سنجش مدیریت زیستی، هوادهی، کاهش یا حذف پاتوژن‌ها و ناقلین آن‌ها، کاربرد پروبیوتیک‌ها، مدیریت پسماندهاو مدیریت و ضد عفونی آب ورودی اشاره کرد (Horowitz and horowitz., 2001).

۱-۳-۱- بیماری‌های ویروسی میگو

ویروس‌ها به عنوان پاتوژن‌های مهم در میگو شناخته شده اند. میگو در مراحل مختلف زندگی به ویروس‌های خاصی حساس می شود که باعث مرگ و میر، رشد کم و بد شکلی بدن می شود.

بیشتر از ۲۰ ویروس به عنوان پاتوژن برای میگو شناخته شده است.که در جدول ۲ به مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای میگو اشاره شده است.

جدول ۲- مهم‌ترین بیماریهای ویروسی میگو

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

به طور کلی پاتوژن‌ها به سه گروه بسته به پتانسیل عملشان تقسیم بندی می شوند:

گروه ۱: ویروس‌های WSSV، YHV، GAV، TSV، IHHNV، SMV

گروه۲: ویروس‌های BP، MBV، BMN، HPV، باکتری‌ها، تک‌یاخته‌ها، آلفا پروتوباکتریوم‌ها، تک‌یاخته‌های میکروسپوریدیا و هاپلوسپوریدیا

گروه ۳: انگل‌ها

پاتوژن‌های گروه اول ممکن است باعث تلفات فاجعه آمیز شود.

در این بین سندرم لکه سفید به عنوان یک پاتوژن جدی مورد توجه است و تولیدات میگوی پرورشی را در کشورهای آسیایی مانند بنگلادش، چین، هند، اندونزی، ایران، ژاپن، کره، تایلند، تایوان و... تحت تأثیر قرار داده است (Bondad-Reantaso., 2005). اولین شیوع این بیماری در مزارع پرورش میگو در تایوان در سال ۱۹۹۲ گزارش شد(Chou, 1995). به دنبال آن در سایر کشورهای تولید کننده آسیای جنوب شرقی، خاورمیانه و آمریکای شمالی، جنوبی و مرکزی بیماری دیده شد(Rossenbery, 2002; Flegel, 2006; Lightner, 1996).

۱-۳-۲- مروری بر بیماری لکه سفید (**WSSV**)

ویروس لکه سفید یک DNA ویروس غشاءدار، دو رشته ایی و از نظر شکل باسیلی و تخم مرغی به همراه یک انتهای دم مانند است (Yang, 2001; Van Hulten 2001) این ویروس از خانواده Nimaviridae و جنس Whispovirus است (Mayo, 2002).

این ویروس برای حداقل ۷۸ گونه خصوصاً برای سخت پوستان ده پا شامل میگوی آب شیرین و شور، خرچنگ، خرچنگ آب شیرین و لابستر بیماری‌زا است (Flegel, 2006 ; Lightner, 1996)

اولین شیوع این بیماری در مزارع پرورش میگو در تایوان در سال **۱۹۹۲** گزارش شد(Chou, 1995). به دنبال آن در سایر کشورهای تولید کننده آسیای جنوب شرقی، خاورمیانه و آمریکای شمالی، جنوبی و مرکزی بیماری دیده شد(Rossenbery, 2002; Flegel, 2006; Lightner, 1996).

بیماری لکه سفید (WSD) موجب بروز تلفات سنگین در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می شود به طوری‌که در چین (Huang et al., 1994)، تایلند (Wongteerasupay et al., 1995)، ژاپن (Takahashi et al., 1994)، تایوان، اندونزی ، هند(Wang et al., 1995) و ایران (افشارنسب و همکاران، **۱۳۸۴**) موجب میلیاردها دلار خسارت به صنعت تکثیر و پرورش میگو شده است.

ویروس لکه سفید بوسیله انواع درمان‌های فیزیکی و شیمیایی اعم از حرارت° **۵۵** به مدت **۹۰** دقیقه و یا ° **۷۰** برای **۱۰** دقیقه و یا خشک کردن در کاغذ صافی در دمای° **۲۶** به مدت **۳** ساعت از بین می رود همچنین توسط pH خیلی اسیدی معادل **۱** برای **۱۰** دقیقه، و یا **۳** به مدت **۱** ساعت و یا pH خیلی قلیایی معادل **۱۲** به مدت **۱۰** دقیقه غیر فعال می شود.(Balasubramania et al., 2006- Nakano et al., 1998- Chang et al., 1998).

۱-۳-۲-۱- بیماری‌زایی ویروس لکه سفید

به طور وضوح میگوها از pL6، pL10 ویا pL30 به بعد به این بیماری حساس می‌شوند.تفاوت یافته ها در این مطالعات به علت گونه‌های میگو، مراحل تلقیح، تیتر عفونی استفاده شده و همچنین نوع جدایه های WSSV است (Wang., 1999;Venegas et al., 1999; Flegel., 2007;Perez et al., 2005).

ویروس لکه سفید در همولنف، آبشش‌ها، معده، اپیتلیوم کوتیکولار بدن، بافت‌های خونساز، اندام‌های لنفوئیدی، غدد آنتنال، بافت‌های پیوندی، بافت‌های عضلانی، پاهای شنا و راه‌روی، بافت‌های عصبی، قلب، بیضه‌ها و تخمدان میگوی آلوده شده به طور طبیعی و آزمایشی قابل ردیابی است (Yoganandhan et al., 2003; Bonilla et al., 2007; Rajan et al., 2000).

البته آزمایشات کمی نشان داده است که بافت هدف اصلی برای تکثیر، آبشش‌ها، معده، اپی تلیوم کوتیکولار بدن، بافت‌های خونساز، اندام‌های لنفوئیدی و غدد آنتنال است(Tan et al.,2001; Durand et al., 2002; Bonilla et al., 2007)

در میگوی وانامی آبشش‌هاو اپیتلیوم کوتیکولار روده قدامی به عنوان راه اصلی ورود ویروس به دنبال تلقیح به روش خوراکی است.بعد از تکثیر اولیه در این بافت‌ها، ویروس از غشای پایه عبور می‌کند و به سینوس‌های خونی وابسته می‌رسد و از طریق چرخش همولنف در بین اندام‌های داخلی گسترش می‌یابد که در این حالت یک موج جدیدی از عفونت ایجاد می شود.(Sudha et al., 1998).

یکی از موضوعات بسیار مهم درخصوص ویروس ایجادکننده این بیماری دامنه بسیار وسیع میزبانان آن می‌باشد. این ویروس نه تنها باعث ایجاد عفونت در تعداد زیادی از میگوها می‌شود، بلکه باعث ایجاد عفونت در تعداد زیادی از خرچنگ‌ها و سایر سخت پوستان نیز می‌گردد. همچنین انتقال عفونت از طریق آب و غذا نیز ممکن است باعث ایجاد بیماری در محیط شود. همچنین انتقال ویروس عامل بیماری از طریق مولدین به تخم و پست لاروها نیز تأیید گردیده است (Mohan etal, 1998; Lotz., 1997) .

براساس مطالعات انجام گرفته عوامل متعددی در انتقال بیماری نقش دارند اعم از مولدین (وحشی و پرورشی)، پست لاروهای تولیدی در سالن‌های هچری، موجوداتی که می‌توانند هم میزبان و هم ناقل ویروس بیماری باشند. به عنوان مثال تاکنون ۳۰ گونه میگوی وحشی و پرورشی به این بیماری حساس بوده و تلفات ناشی از بیماری لکه سفید در آن‌ها گزارش گردیده است. آب ورودی ،کارگران و شاغلین ، غذا و داروهای مصرفی در مزارع پرورشی و سالن‌های هچری، باد و حشرات موجود در طبیعت، مواد و آبزیان دریایی منجمد شده از موارد انتقال دهنده بیماری محسوب می‌شوند (.Wang, Y.G. 2000).

۱-۳-۲-۲- علائم بالینی بیماری لکه سفید

شیوع این بیماری به چند دسته تقسیم بندی می شود:

- فوق حاد،که تلفات در عرض ۲ تا ۳ روز رخ می دهد.
- حاد تا تحت حاد، که بعد از ۷ الی ۱۰ روز تلفات شروع می شود.
- مزمن، که ۱۵ تا ۲۸ روز بعد تلفات را نشان می دهد .

میگوهای آلوده علائمی مانند: بی اشتهایی (به طوری‌که خیلی سریع تمایل به غذا خوردن را از دست می‌دهند)، بی حالی، حضور نقاط سفید بر روی کوتیکول (اندازه این لکه ها ۰/۵ تا ۲ میلی متر می باشد) که ابتدا در روی کاراپاس ظاهر شده و سپس کلیه بندهای بدن را می پوشاند، جدا شدن راحت کوتیکول از لایه اپی درم زیرین، هپاتوپانکراس بزرگ و مایل به زرد و سفید، اشکال در ایجاد لخته در همولنف و تغییر رنگ میگوهای در حال مرگ را نشان می دهند.(افشار نسب و همکاران ۱۳۸۴ ; Wang., 1999; Sahul Hameed., 1998; Lightner., 1996)

البته قابل ذکر است که تنها با علائم کلینیکی نمی‌توان بیماری را تشخیص داد زیرا به عنوان مثال بی اشتهایی در میگوهای غیر آلوده قبل و بعد از پوست اندازی نیز دیده می شود و همچنین لکه‌های سفید روی بدن بوسیله عفونت‌های باکتریایی نیز ایجاد می شود(Wang., 2000; Jory., 2001).

روش‌های مختلفی جهت تشخیص این بیماری گزارش گردیده است از جمله روش PCR، روش Insitu hybridization، Dot blot hybridization، ELISA و روش پاتولوژی. امروزه جهت تشخیص سریع این بیماری کیت‌های تجاری مختلفی ساخته شده است که با روش PCR کار می کند و به صورت دو مرحله ای (Nested) می‌تواند در تشخیص سریع این بیماری بسیار مؤثر و مفید واقع شود (افشارنسب و همکاران ۱۳۸۴).

۱-۳-۳- بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم Infection Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)

این ویروس اولین بار در سال ۱۹۸۱ تشخیص داده شد که باعث مرگ ومیر در میگوی آبی یا Litopenaeus Stylirostris در هاوایی گردید و به طور جدی صنعت تولید میگو را تحت تاثیر قرار داد(Lightner., 1983).

ویروس عامل این بیماری از خانواده Parvoviridae و جنس Brevidensovirus می‌باشد (Shike., 2000; Bonami., 1990) .این ویروس یک DNA ویروس تک رشته‌ای بدون غشاء و ۲۰ وجهی است و ۲۲ نانومتر قطردارد (Berns et al., 1995) ویروس همچنین دارای یک کپسول با چهار پلی پپتید با وزن ۳۷/۵و۷۴،۴۷،۳۹ کیلو دالتون (KDa) می‌باشد.(Shike et al., 2000).

در حال حاضر این بیماری از قسمت‌های مختلف از جمله آمریکا، پرو تا مکزیک، آسیای جنوب شرقی، خاورمیانه و استرالیا گزارش شده است.(OIE., 2009).

اگرچه IHHNV به عنوان عامل مرگ و میر در میگوهای آبی شناخته شده است اما می تواند سایر گونه‌های میگوی پنائیده مانند وانامی و مونودون را به شکل تحت حاد درگیر کند

درصد مرگ ومیر وابسته به بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم به ۹۰٪ هم می تواند برسد.این بیماری در گونه میگوی آبی علائم پاتولوژیکی خاصی نشان نداد ولی در وانامی و مونودون این بیماری که به نام سندرم کوتولگی Runt deformity syndrome یا RDS نیز شناخته شده است خمیدگی یا بدشکلی روستروم، شکننده شدن پاهای راه‌روی ، خشن شدن کوتیکول و سایر بدشکلی‌های کوتیکولی را نشان می‌دهد.

از نظر بافت شناسی، بیماری IHHNV اساساً در هسته سلولهای اپی تلیوم زیر کوتیکول ضمائم دهانی، آبشش، غدد سینه‌ای و فیبرهای عصبی پاهای راه‌روی رخ می‌دهد اما گاهی به طور کم در سیتوپلاسم سلول های مذکور هم دیده می شود (Lightner et al., 1983).

ویروس بیماری IHHNV بافت‌های با منشا اکتودرمی و مزودرمی را آلوده می‌کند.بنابراین بافت هدف اصلی آن شامل آبشش‌ها، اپی‌تلیوم کوتیکولار (هیپودرم) بافت‌های پیوندی، بافت‌های خونساز و اندام لنفوئیدی است (Lightner D.V,. 1996a).

۱-۳-۴- بیماری سندرم تورا Taura syndrome disease (TSD)

سندرم تورا یکی از مهم‌ترین بیماری های تحت تأثیر قرار دهنده مزارع پرورش میگو است. این بیماری اولین بار در سال ۱۹۹۲ در میگوهای وانامی صید شده از مزارع میگو در رودخانه تورا در اکوادور گزارش شد(Lightner et al., 1995)

بعد از اولین گزارش TSV به طور سریع در بین میگوهای پنائیده پرورشی آمریکا در ساحل اقیانوس آرام از پرو تا مکزیک همچنین در اقیانوس اطلسو خلیج مکزیک گسترش یافت. در آسیای جنوب شرقی، TSV در سال ۱۹۹۹ در تایوان گزارش شد. سپس در چین، تایلند، مالزی و اندونزی نیز گزارش گردید.

TSV می تواند چندین گونه میگو شامل مونودون، میگوی آبی و ... را درگیر کند(OIE ., 2009) ویروس ایجاد کننده بیماری ازخانواده Dicistroviridae می باشد که یکRNA ویروس تک رشته ای بدون پوشش و بیست وجهی بوده ودارای سه پروتئین رمز دار به نام‌های VP1, VP2 و VP3 می‌باشدکه وزن هر کدام به ترتیب برابر ۵۵،۴۰ و ۲۴ کیلو دالتون است.(Mari et al., 2002).

این بیمـــاری یکی از عـــوامل اصلـــی مـــرگ و میـــر در مرحله لاروی و جوانی میگوی وانامی می باشد و درحد فاصل ۱۴ تا ۴۰ روزگی بعد از ذخیره سازی در استخرها گزارش گردیده است. علائم بالینی بیماری دارای سه حالت مشخص وکاملاً جدا ازهم می باشد که عبارتند از حالت حاد، بهبودی ومزمن.

در فاز حاد بیماری، میگوی آلوده به TSV با علائم بی حالی، بی اشتهایی، مات و کدر شدن عضلات، قرمز شدن دم و پلئوپود مشخص می‌شود به همین دلیل بیماری را دم قرمز نیز می‌نامند .در فاز بهبودی، نواحی ملانیزه کوتیکولی بر روی سفالوتوراکس، دم و ضمائم دیده می‌شود. اما در فاز مزمن علائم بالینی قابل ردیابی نیستند(Lightner et al., 1995)

از نظر بافت شناسی ۵ منطقه آناتومیکی بوسیله ویروس بیماری TSV آلوده می شودکه شامل: کوتیکول، آبشش‌ها، ضمائم، معده قدامی و معده خلفی است. البته گاهی ضابعات در بافت‌های عضلات شکمی نیز دیده می‌شود.

بیماری به وسیله نکروز منتشره و چند کانونی و حضور گنجیدگی‌های ویروسی ائوزینوفیلی و بازوفیلی در سیتوپلاسم سلولهای آلوده مشخص می شود(Mari et al., 2002).به طور کلی درمان موثری برای عفونت‌های ویروسی از جمله این بیماری وجود ندارد.

با توجه به بروز بیماری لکه سفید در استانهای خوزستان و بوشهر در طی سالهای ۸۱ و ۸۴ و رکود، ضرر اقتصادی و خسارت ناشی از این بیماری به پرورش دهندگان، از سال ۱۳۸۵ گونه جدید*Litopenaeus vannamei* به مزارع پرورش منطقه چوئبده آبادان معرفی گردید. از آنجایی که مزارع در سال ۱۳۸۷ و چندین مزرعه در سال ۱۳۸۹ دچار تلفات ناشی از WSSV گردید احتمال آن می رود که ویروس به ذخایر بومی منطقه منتقل شده و یا بعضی از آبزیان موجود به صورت ناقل در آمده باشند و هر ساله با شروع دوره پرورش باعث بروز تلفات در میگوهای پرورشی شود. همچنین، در طول این سالها ویروس های TSV و IHHNV نیزکه قبلاً در منطقه وجود نداشته اند مشاهده شده است و از آنجایی که انتقال افقی ویروس های TSV و IHHNV به اثبات رسیده است به جهت اطمینان از وجود یا عدم وجود این ویروس ها در آبزیان منطقه و احتمال بیماری زایی آن ها در میگوهای پرورشی، شناسایی عواملی که می توانند این ویروس ها (WSSV,TSV,IHHNV) را در خود حفظ کرده و با انتقال آن ها به مزارع پرورشی، سیستم پرورش را مورد تهدید قرار دهند بسیار حائز اهمیت می نماید، لذا ضرورت ردیابی و تعیین حضور این عوامل بیماریزا احساس گردید به همین علت پروژه ای تحت عنوان ردیابی و شناسایی ویروس

های WSSV، TSV و IHHNV در میگوهای پرورشی و سخت پوستان وحشی چوئبده آبادان و بررسی بیماری زایی آن ها با اهداف زیر مصوب و به اجرا در آمد:

۱- ردیابی ویروس های WSSV و TSV و IHHNV در آبزیان منطقه ساحلی خوزستان با تأکید بر میگوهای وحشی و خرچنگ

۲- بررسی وضعیت بهداشتی میگوهای پرورشی منطقه از نظر آلودگی به این ۳ ویروس

۳- بررسی بیماری زایی ویروس لکه سفید شناسایی شده در آبزیان وحشی

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه برداری جهت انجام آزمایشات ویروس شناسی و آسیب شناسی

نمونه برداری پس از جمع آوری اطلاعات اولیه در مورد وضعیت منطقه، ایستگاه‌ها براساس تعدادکارگاه های فعال و اهداف پروژه آغاز گردید برای این منظور از رودخانه بهمنشیر به صورت ماهیانه از دو ماه قبل از شروع دوره پرورش تا پایان دوره آزمایش(۳ ماه پس از پایان دوره پرورش) از ابتدای سایت پرورش میگو تا انتهای سایت (روبروی کانال آبرسانC5) توسط تور ترال نمونه گیری صورت گرفت.

پای شنا و آبشش میگو های وحشی و کل بدن خرچنگهای صید شده جدا گشته وجهت بررسی مولکولی در تثبیت کننده مناسب (الکل مطلق) قرار داده شد. همچنین کاراپاس، آبشش و بند ۶ بدن جهت آزمایشات آسیب شناسی در تثبیت کننده دیویدسون و مابقی بدن در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد به منظور انجام آزمایشات بیماریزایی قرار داده شد.

در طول دوره پرورش نیز از ۱۰ مزرعه فعال بدین صورت که از کانال C3 تعداد ۲، از کانال C4 ۶ و از کانال C5 ۲ مزرعه بر اساس تراکم مزارع فعال در هر کانال نمونه برداری شد. نمونه برداری از استخرهای این مزارع بصورت دو هفته یکبار انجام گردید و مطابق نمونه های وحشی ازبافتهای مورد نظر نمونه برداشته شد.

نمونه برداری از پست لاروهای مرحله ۱۲ (۱۰۰ پست لارو) ۳ مرکز تکثیر فعال در منطقه قبل از ذخیره سازی جهت شناسایی و ردیابی ویروسهای مورد نظر نیز صورت گرفت.

۲-۲- بررسی های مولکولی جهت ردیابی ویروس‌ها

۲-۲-۱-آماده سازی نمونه و استخراج **DNA** برای تشخیص ویروس‌های **WSSV** و **IHHNV** با استفاده از کیت **IQ2000**

مقداری از نمونه (آبشش، پای شنا، PL) درون میکروتیوب ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری قرار داده شده، ۰/۶ میلی لیتر از محلول DTAB (تصویر۱) به آن اضافه می شود. توسط گریندرهای یک بار مصرف نمونه درون آن خرد گردیده،

در حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد، پس از آن اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسد. پس از یک همزنی مختصر، ۰/۷ میلی لیتر کلروفرم اضافه نموده، همزنی به مدت ۲۰ ثانیه و بعد از آن ۵ دقیقه با دور rpm۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی آن به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CTAB و ۹۰۰ میکرولیتر ddH2O به آن افزوده شد.

تصویر۱ – محلول‌های استفاده شده در مرحله استخراج به روش **DTAB-CTAB**

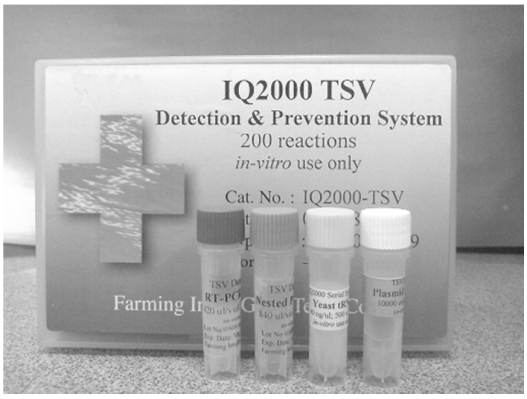
همزنی مختصر نموده، درون حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته، پس از آن اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسد. به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. با دقت مایع رویی بیرون ریخته شده و با ۱۵۰ میکرولیتر Dissolve solution پلت دوباره حل گردیده، به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از آن تا رسیدن به دمای اتاق، خنک گردید. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، محلول شفاف به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شده، به میزان ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه گردید. بعد از همزنی مختصر، سانتریفیوژ با دور rpm۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، شستن پلت با اتانول ۷۰٪ به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر، آن را اسپین نموده، پلت خشک شد (محلول فوقانی را بیرون ریخته پلت موجود در کف میکروتیوب خشک گردید). حدود ۵۰ میکرولیتر ddH2O به میکروتیوب افزوده شد.

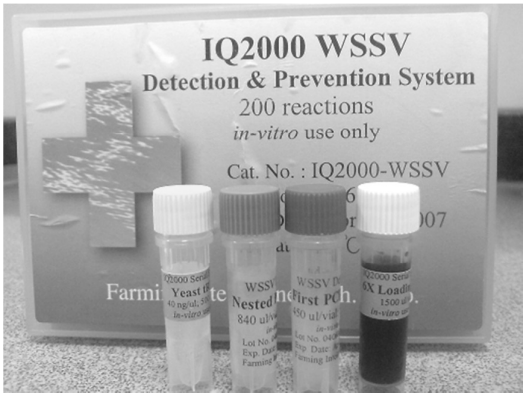
۲-۲-۲- آماده سازی نمونه و استخراج RNA برای تشخیص ویروس TSV

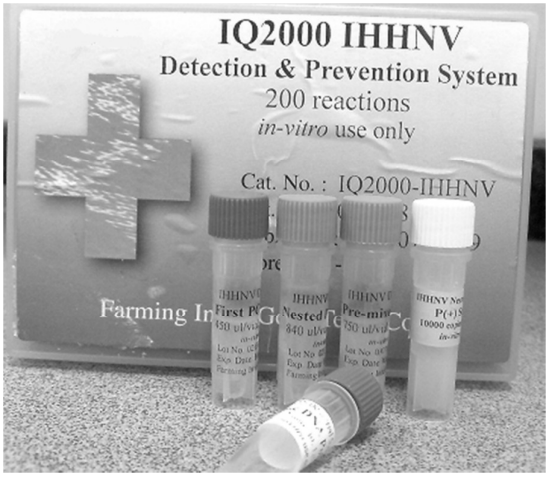
نمونه را در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده، ۵۰۰ میکرولیتر محلول استخراج RNA اضافه می شود. نمونه توسط گریندرهای یک بار مصرف به خوبی همگن گردیده، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم ($CHCl_3$) به آن اضافه کرده، همزنی به مدت ۲۰ ثانیه، نگهداری به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق و سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه از مراحل بعدی هستند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی آن به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردیده، ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه می‌شود.پس از همزنی مختصر، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دور ریختن ایزوپروپانول صورت می‌گیرد. سپس شستن پلت با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪، سانتریفیوژ با دور ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه و دور ریختن اتانول انجام می‌شود و پس از آن پلت RNA خشک گردید. در پایان ۳۰ میکرولیتر آب DEPC به پلت افزوده شد.

۲-۲-۳- عملیات PCR در کیت های تشخیصی

به منظور یکسان سازی اثر مقدار کمّی DNA به کارگرفته شده در همه آزمایش ها، با کمک یک دستگاه اسپکتروفتومتر (Genova MK2) غلظت هر یک از نمونه‌های به دست آمده اندازه گیری شده و به تجربه مشخص گردید که بهترین مقدار برای غلظت DNA مورد استفاده ۱۵۰ ng/µl می باشد. لذا برای هر نمونه در مرحله واکنش PCR غلظت متناسب تهیه و به کار گرفته می شد (تصویر۲).







تصویر۲ – کیت های تشخیص مولکولی ویروس های **TSV**، **WSSV** و **IHHNV**

کلیه مراحل PCR در تیوب های ۰/۲ میلی لیتری و در دو مرحله PCR اولیه و Nested PCR مطابق چرخه های دمایی ذکر شده در دستورالعمل کیت (تصویر۳، ۴و ۵) و با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر متعلق به شرکت Corbet (AUS) انجام گردیدمحصول به دست آمده، پس از رانده شدن در ژل ۱ تا ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با محلول Safe Stain، در دستگاه ژل داکیومنت (UVidoc) عکس برداری و نتایج آن ثبت می گردید.

a. First PCR reaction profile:

94℃ 2min; then

94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30sec, repeat 15 cycles, then add

72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

b. Nested PCR reaction profile:

94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30 sec, repeat 30 cycles, then add

72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

تصویر ۳- شرایط **PCR** جهت تشخیص ویروس لکه سفید

a. RT-PCR reaction profile:

42℃ 30 min; 94℃ 2min; then

94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30sec, repeat 15 cycles, then add

72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

b. Nested PCR reaction profile:

94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30 sec, repeat 30 cycles, then add

72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

تصویر ۴- شرایط **PCR** جهت تشخیص ویروس **TSV**

a. First PCR reaction profile:

94℃ 2min; then

94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30sec, repeat 15 cycles, then add

72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

b. Nested PCR reaction profile:

94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30 sec, repeat 30 cycles, then add

72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

تصویر ۵- شرایط **PCR** جهت تشخیص ویروس **IHHNV**

۲-۳- روش آسیب شناسی بافتی

جهت تأیید نمونه‌هایی که با روش مولکولی نتیجه مثبت را از نظر حضور ویروس نشان دادند از روش آسیب شناسی بافتی استفاده گردید.بدین صورت که نمونه‌های بافت مورد نظر با وسایل استریل جداسازی و در محلول دیویدسون نگهداری شدند(تصویر۶). پس از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌های بافتی از محلول دیویدسون خارج و در الکل ۷۵ درجه نگهداری شدند.

مراحل تهیه اسلاید بافتی به شرح زیر می باشد:

۲-۳-۱- فرآوری بافت

بوسیله دستگاه عمل آوری بافت (Tissue processor): بافتهای میگو به ترتیب زیر در محلولهای مورد نظر جهت عمل آوری قرار گرفتند(تصویر ۷):

حمام الکل اتیلیک ۷۰ درصد در دو ظرف جداگانه	به مدت ۱ ساعت
حمام الکل اتیلیک ۸۰ درصد در دو ظرف جداگانه	به مدت ۱ ساعت
حمام الکل اتیلیک ۹۵ درصد در دو ظرف جداگانه	به مدت ۱ ساعت
حمام الکل اتیلیک ۱۰۰ درصد در دو ظرف جداگانه	به مدت ۱ ساعت
حمام با مواد شفاف کننده(گزیلن) در دو ظرف جداگانه	به مدت ۱ ساعت
حمام پارافین در دو ظرف جداگانه	به مدت ۱ ساعت

۲-۳-۲- قالب گیری

بافت ها که در روش بالا به خوبی محکم شده انددر قالب‌های مخصوص جهت تشکیل بلوک(قالب) قرار داده شدند.برای قالب گیری از پارافین مذاب و سینی سرد استفاده گردید.

۲-۳-۳- مقطع گیری

برای تهیه مقطع از دستگاه برش بافت (Microtome) و یک حمام آب استفاده گردید. با ضخامت ۵ میکرون برش تهیه و بر روی لام فیکس گردیدند(تصویر ۸).

۲-۳-۴- رنگ آمیزی و مونته کردن

لام ها با رنگ هماتوکسیلین - ائوزین / فلوکسین رنگ آمیزی و مونت گردیدند.(مخیر ۱۳۸۵).

تصویر۶- نمونه برداری جهت آسیب شناسی بافت میگو

تصویر۷- دستگاه آماده سازی بافت یا**Tissue processor**

تصویر۸- دستگاه برش بافت (**Microtome**) و حمام بافتی

۲-۴- بررسی بیماری‌زایی

جهت بررسی بیماری‌زایی ویروس لکه سفید جدا شده از میگوهای وحشی و پرورشی، تعداد ۲۵۰ قطعه میگوی با متوسط وزن ۱ گرم که از نظر ظاهری سالم بودنداز مجتمع پرورشی شهید کیانی واقع در چوئبده آبادان به سوله تکثیر و پرورش پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور انتقال یافت.

به منظور آداپته شدن با شرایط آزمایشگاهی میگوها در یک تانک حاوی آب دریای فیلتر شده و با شوری ppt ۲۵ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و همراه با هوادهی مناسب نگهداری شدند. جهت اطمینان از عدم حضور ویروس از مخزن نگهداری میگوها نمونه برداری انجام و با کیت Iq2000 بررسی گردید.

بعد از گذراندن دوره سازش پذیری (به مدت ۴۸ ساعت) و عدم مشاهده تلفات و علائم بیماری، میگوها به ۴ گروه تقسیم بندی شدند .

بدین صورت که ۱۲ عدد آکواریوم به ابعاد ۵۰×۳۰× ۲۵ و با گنجایش ۳۰ لیتر آب آماده گردید.در هر آکواریوم ۲۰ قطعه میگو به همراه یک هواده مناسب قرار داده شد.به منظور در معرض قراردادن میگوها با میگوهای آلوده وحشی و پرورشی، عضلات و اندام‌های مختلف میگوهای وحشی و پرورشی آلوده به‌طور جداگانه با استفاده از هاون چینی استریل کاملا خرد شد و عمل تغذیه میگوهای مورد آزمایش با این بافتهای آلوده صورت گرفت.

جهت تهیه کنترل مثبت آزمایش، میگوها بوسیله بافت خرد و له شده خرچنگهای آلوده به ویروس که آلودگی آنها تأیید شده بود تغذیه شدند.

کنترل منفی نیز با قرار دادن میگوهای وانامی عاری از بیماری در آکواریوم‌هایی با شرایط یکسان ولی در محیطی جدا از گروه‌های دیگر تهیه گردید(جدول شماره۳).

جدول ۳- گروه های چالش شده

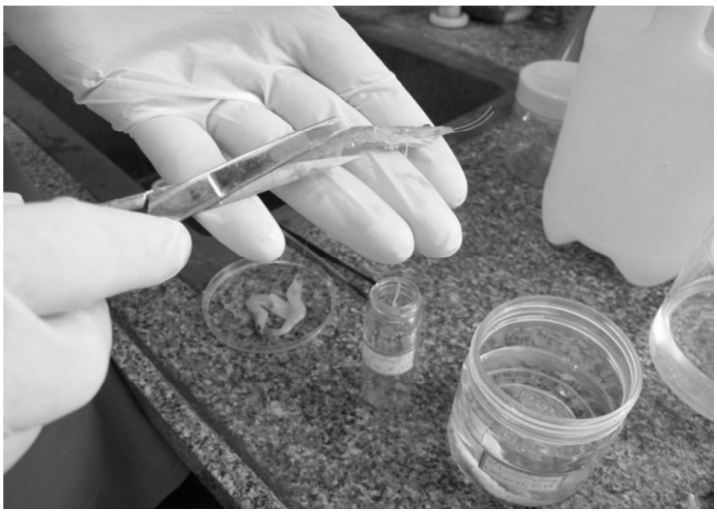
نام گروه	تعداد	نوع تغذیه
تیمار۱	۲۰قطعه در ۳ تکرار	تغذیه با میگوهای وحشیWSSV مثبت صید شده از رودخانه بهمنشیر
تیمار۲	۲۰ قطعه در ۳ تکرار	تغذیه با میگوهای پرورشیWSSV مثبت صید شده از مزارع پرورشی
تیمار۳ (کنترل منفی)	۲۰ قطعه در ۲ تکرار	تغذیه با میگوهای سالم و عاری از ویروس
تیمار۴ (کنترل مثبت)	۲۰ قطعه در۲ تکرار	تغذیه با خرچنگهای آلوده به ویروس تایید شده

میگوهای هر تیمار روزانه معادل ۵٪ وزن بدن با غذاهای تعیین شده تغذیه شدند. شرایط به طور مرتب بررسی می‌شد و پس از مشاهده هر گونه تلفات، نمونه‌های تلف شده سریعاً جهت بررسی‌های مولکولی ویروسی و آسیب‌شناسی بافتی در تثبیت کننده مناسب قرار گرفتند (تصاویر۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲).(کاکولکی ۱۳۸۹ ، Mohankumar (Chou et al., 1998 ; and Ramasamy .,2006

تصویر ۹- گروه های مورد چالش با ویروس لکه سفید

تصویر ۱۰- برداشت میگوهای تلف شده از هر آکواریوم

تصویر۱۱- تلفات در تیمار کنترل مثبت



تصویر ۱۲- نمونه برداری از میگوهای تلف شده جهت بررسی های مولکولی و آسیب شناسی

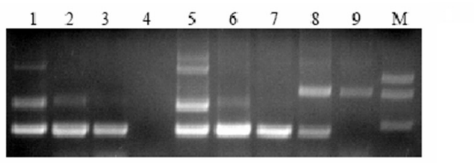
۳-نتایج

به طور کلی در طول مدت نمونه برداری پروژه در سال‌های ۱۳۸۹و ۱۳۹۰، از آنجایی‌که سه کانال آب رسان C3، C4 و C5 آبگیری می شد بصورت تصادفی از ۱۱ مزرعه و ۴۶ استخر نمونه برداری شد. بر اساس تراکم مزارع مربوط به هر کانال آبرسان ۳ مزرعه مربوط به کانال C3، ۶ مزرعه از کانال C4 و ۲ مزرعه از کانال C5 انتخاب شد. در مجموع ۱۲ بار از رودخانه بهمنشیر نمونه‌برداری شد که بیش از ۱۲۰ قطعه میگوی وحشی و خرچنگ جهت آزمایشات مربوطه جمع آوری گردید. از استخرهای پرورشی در طول دوره پرورش هر دوهفته یکبار نمونه‌برداری صورت گرفت که مجموعاً تعداد ۱۴۰ میگوی وانامی از مزارع پرورشی نمونه‌برداری گردید. همچنین از ۳ کارگاه تکثیر فعال درمنطقه و از ۲۳ تانک پست لارو، قبل از ذخیره سازی نیز نمونه برداری انجام شد.

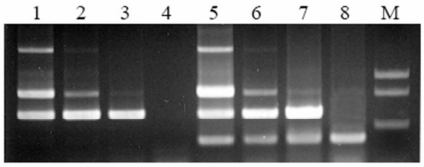
نمونه ها با سه کیت WSSV, TSV و IHHNV (Iq2000) به صورت جداگانه بررسی شدند.

در کیت های تشخیصی تکی برای هر کدام از ویروس های TSV، WSSV و IHHNV روش کار برای استخراج نتایج به شرح ذیل بوده است:

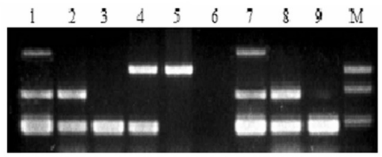
در صورتی که در کیت تشخیصی لکه سفید تنها باند bp ۸۴۸، در کیت تشخیص TSV ۶۸۰bp و bp ۲۴۳ در کیت IHHNV مشاهده گردد بیانگر منفی بودن آن نمونه است زیرا این باند در واقع حاصل تکثیر شدن محدوده حاوی ژن بیماری مورد نظر می باشد یا همان باندی که به باند میگو معروف می باشد (House keeping gene). برای عامل بیماری‌زای WSSV در صورتی باند bp ۲۹۶ همراه یا بدون باند bp ۵۵۰ ظاهر شود نشانه مثبت بودن نمونه برای این بیماری است. برای بیماری TSV، داشتن باند در bp ۲۸۴ همراه یا بدون bp ۴۷۶ بیانگر مثبت بودن نمونه برا ی بیماری TSV می باشد. همچنین در نتایج حاصل از بررسی بیماری IHHNV، وجود باند ۴۳۸bp همراه یا بدون باند bp ۶۴۴ گویای مثبت بودن نمونه برای این بیماری می باشد (تصویر ۱۳).



ردیف ۱: استاندارد مثبت **TSV** با غلظت ۲۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۲: استاندراد مثبت **TSV** با غلظت ۲۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۳: استاندراد مثبت **TSV** با غلظت ۲۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ٤: شاهد منفی (**Yeast tRNA** یا آب دوبار تقطیر)
ردیف ٥: نمونه دارای آلودگی شدید **TSV**
ردیف ٦: نمونه دارای آلودگی میانه **TSV**
ردیف ۷: نمونه دارای آلودگی ضعیف **TSV**
ردیف ۸: نمونه دارای آلودگی بسیار ضعیف **TSV**
ردیف۹: نمونه منفی **TSV**
ردیف **M**: نشانگر وزنی مولکولی، **۸٤۸bp**، **٦۳۰bp**، **۳۳۳bp**



ردیف۱: استاندارد مثبت **IHHNV** با غلظت ۲۰۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۲: استاندارد مثبت **IHHNV** با غلظت ۲۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۳: استاندراد مثبت **IHHNV** با غلظت ۲۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ٤: شاهد منفی (**Yeast tRNA** یا آب دوبار تقطیر)
ردیف ٥: نمونه دارای آلودگی شدید **IHHNV**
ردیف ٦: نمونه دارای آلودگی میانه **IHHNV**
ردیف ۷: نمونه دارای آلودگی ضعیف **IHHNV**
ردیف ۸: نمونه منفی **IHHNV**
ردیف **M**: نشانگر وزنی مولکولی، **۸٤۸bp**، **٦۳۰bp**، **۳۳۳bp**



ردیف۱: نمونه دارای آلودگی شدید **WSSV**
ردیف۲:نمونه دارای آلودگی میانه **WSSV**
ردیف۳: نمونه دارای آلودگی ضیعف **WSSV**
ردیف٤: نمونه دارای آلودگی بسیار ضعیف **WSSV**
ردیف٥: نمونه فاقد آلودگی **WSSV**
ردیف٦: نمونه شاهد منفی (**Yeast tRNA** یا آب دوبار تقطیر)
ردیف۷: استاندارد مثبت **WSSV** با غلظت ۲۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف۸: استاندارد مثبت **WSSV** با غلظت ۲۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۹: استاندارد مثبت **WSSV** با غلظت ۲۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف **M**: نشانگر وزنی مولکولی، **۸٤۸bp**، **٦۳۰bp**، **۳۳۳bp**

تصویر۱۳- راهنمای تفسیر نتایج حاصل از کیتهای تشخیصی تک ویروسی
برای عوامل بیماریزای **TSV**، **WSSV** و **IHHNV**

۳-۱- عامل بیماری‌زای لکه سفید

در میگوهای وحشی رودخانه بهمنشیر چندین بار ویروس لکه سفید از فرم شدید تا خیلی خفیف شناسایی گردید(تصاویر۱۵ و ۱۶) اما در خرچنگ‌ها هیچ موردی از حضور ویروس مشاهده نگردید.

در پست لاروها قبل از ذخیره سازی نیز فقط یک مورد از فرم خیلی خفیف ویروس لکه سفید مشاهده شد.

در میگوهای پرورشی نیزموارد زیادی از حضور ویروس لکه سفید شناسایی شد که از فرم خیلی خفیف تا فرم شدید را شامل می‌شد همچنین چندین مورد تلفات در استخرها گزارش گردید که در نمونه‌های تلفاتی نیز ویروس لکه سفید به فرم شدید ردیابی شد.

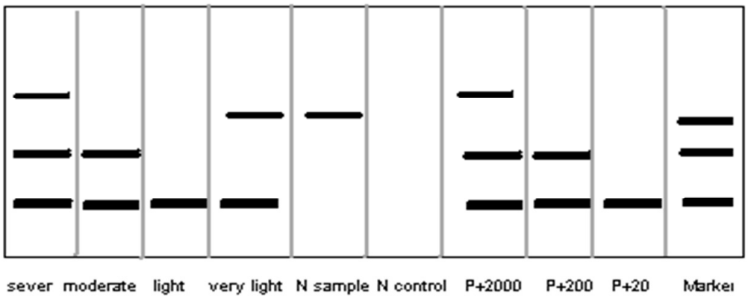
۳-۲- عامل بیماری‌زای **TSV**

این عامل بیماری‌زا نه در میگوهای وحشی و نه در خرچنگ‌های صید شده از رودخانه بهمنشیر شناسایی نشد.

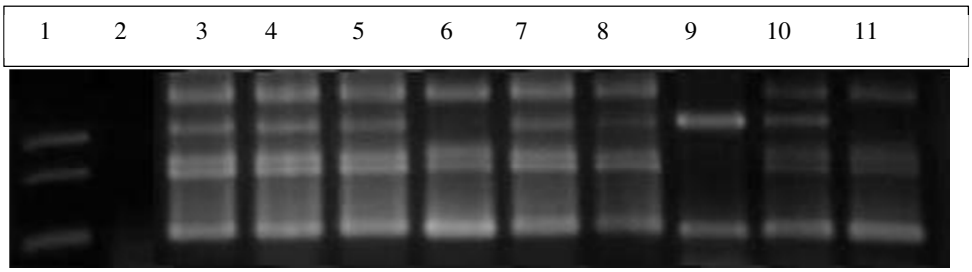
همچنین در پست لاروها نیز این عامل شناسایی نگردید. در میگوهای پرورشی فقط ۲ مورد آن‌هم به فرم خیلی خفیف ردیابی شد.(تصویر ۱۸)

۳-۳- عامل بیماریزای**IHHNV**

این عامل بیماری‌زا نیز در میگوهای وحشی، خرچنگ‌های صید شده از رودخانه بهمنشیر، پست لاروها قبل از ذخیره سازی و میگوهای پرورشی شناسایی نشد (تصویر ۱۷).



تصویر۱۴- راهنمای کیت **IQ2000-WSSV**

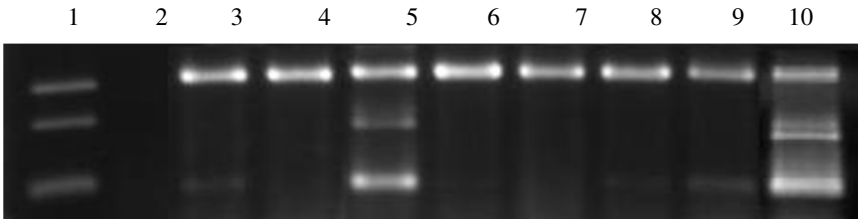


تصویر۱۵- نمونه های **WSSV** کار شده با کیت**IQ2000**

ردیف۱: نشانگر(M)، ردیف۲: کنترل منفی(N)، ردیف۱۱: کنترل مثبت(P)

ردیف۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۰: نمونه دارای آلودگی شدید به ویروس WSSV

ردیف ۹: نمونه دارای آلودگی ضعیف به ویروس WSSV



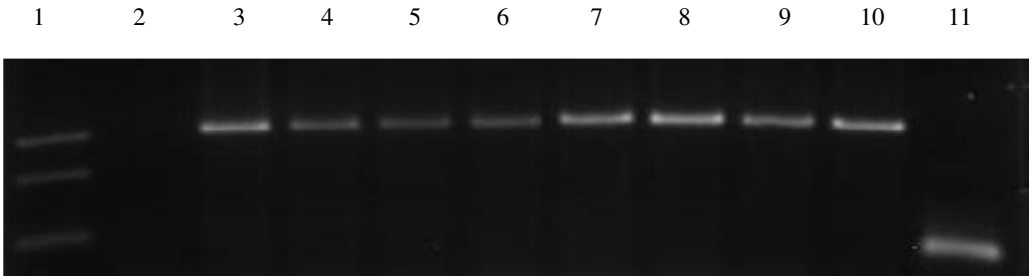
تصویر۱۶- نمونه های **WSSV** کار شده با کیت**IQ2000**

ردیف۱: نشانگر(M)، ردیف۲: کنترل منفی(N)، ردیف۱۰: کنترل مثبت(P)

ردیف ۳، ۶، ۸ و۹: دارای آلودگی خیلی ضعیف(V.L) به ویروس WSSV

ردیف ۵: دارای آلودگی شدید(S) به ویروس WSSV

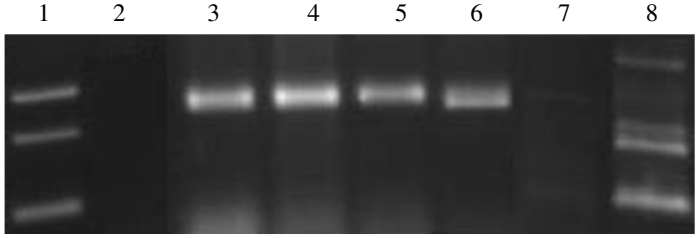
ردیف ۴ و ۷: نمونه منفی



تصویر۱۷- نمونه های **IHHNV** کار شده با کیت**IQ2000**

ردیف۱: نشانگر(M)، ردیف۲: کنترل منفی(N)، ردیف۱۱: کنترل مثبت(P)

ردیف ۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹و ۱۰: نمونه فاقد آلودگی به ویروس IHHNV



تصویر۱۸- نمونه های **TSV** کار شده با کیت**IQ2000**

ردیف۱: نشانگر(M)، ردیف۲: کنترل منفی(N)، ردیف۸: کنترل مثبت(P)

ردیف ۳،۴،۵ و۶: نمونه فاقد آلودگی به ویروس TSV

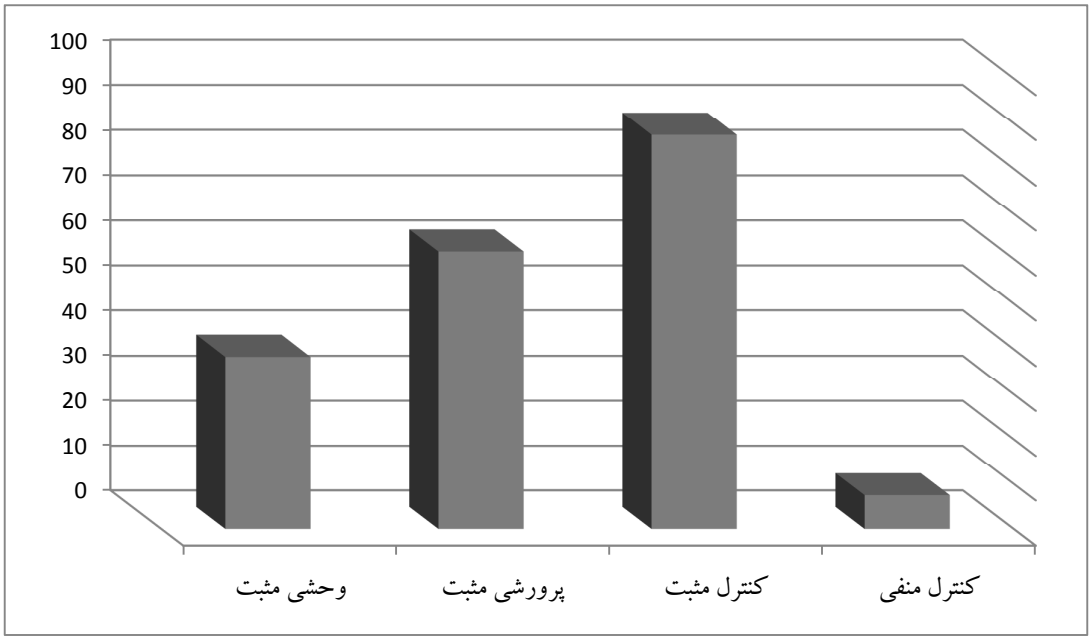
ردیف ۷: دارای آلودگی خیلی ضعیف(V.L) به ویروس TSV

۳-۴- مواجهه سازی

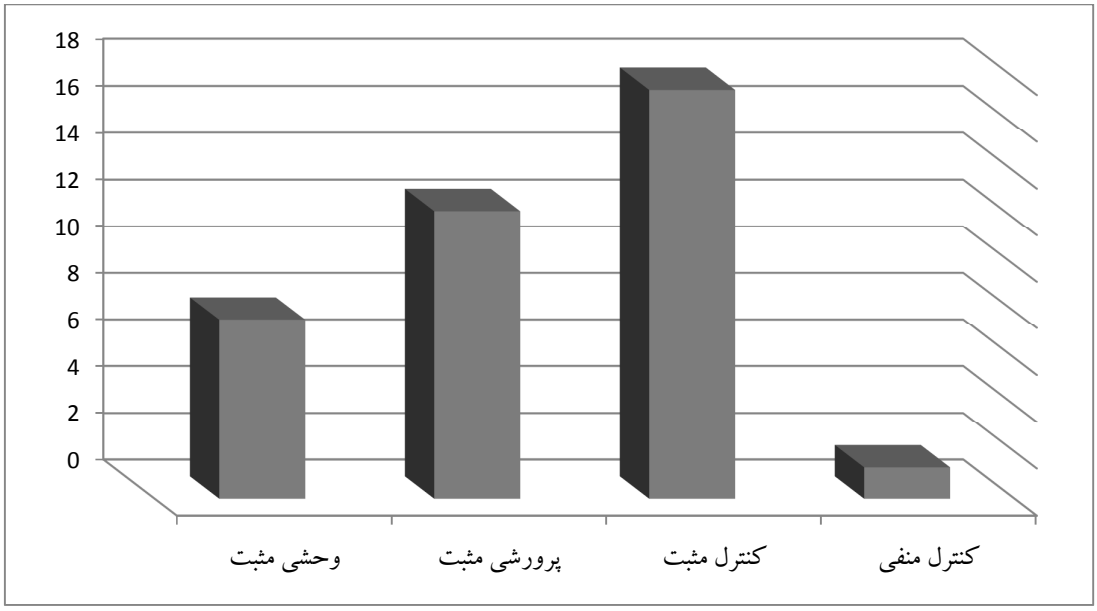
میگوها به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند و در طول مدت چالش تلفات روزانه ثبت شد. نمونه‌های تلف شده جهت شناسایی ویروس لکه سفید مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصل از در معرض قرارگرفتن میگوها با منابع مختلف ویروس لکه سفید در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج مواجهه‌سازی نشان دادکه میانگین درصد تلفات در سه تکرار مربوط به تیمار تغذیه شده با میگوی وحشی آلوده به عامل بیماری‌زای لکه سفید ۱۰/۴ ± ۳۸/۳۳ و تیمار تغذیه شده با میگوی پرورشی آلوده ۷/۶۳ ± ۶۱/۶۶ و در تیمار کنترل مثبت و منفی به ترتیب ۳/۵± ۸۷/۵ و ۳/۵ ± ۷/۵ بود (نمودارهای۲، ۳ و ۴).

جدول۴- میزان مرگ و میر در تیمارهای مختلف و روزهای مختلف پس از چالش

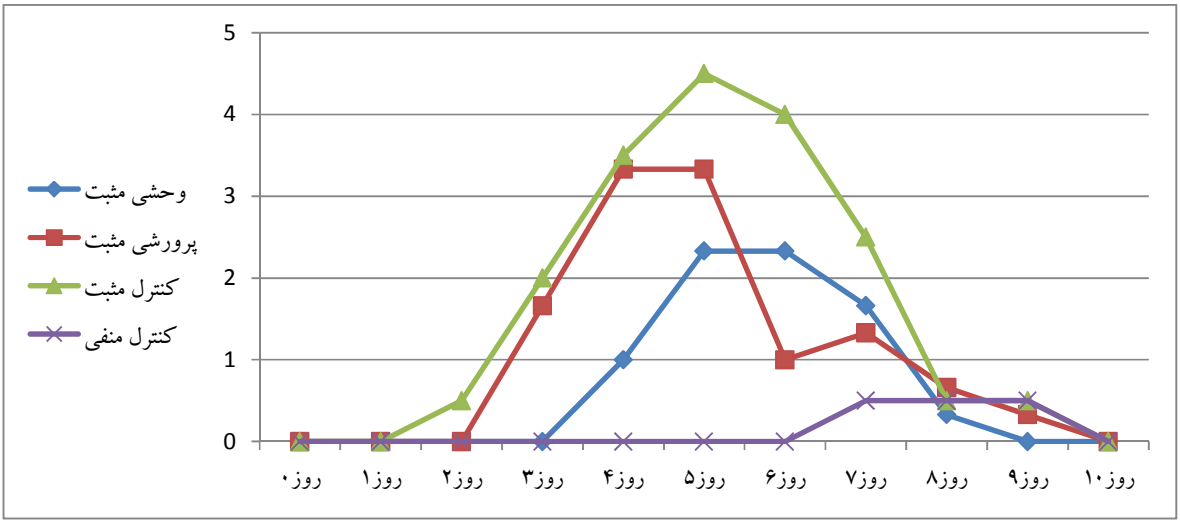
تیمار	روزهای چالش											تعداد تلفات	درصد تلفات
	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰		
وحشی مثبت(۱)	۰	۰	۰	۰	۲	۲	۳	۲	۱	۰	۰	۱۰	٪۵۰
وحشی مثبت(۲)	۰	۰	۰	۰	۰	۳	۱	۲	۰	۰	۰	۶	٪۳۰
وحشی مثبت(۳)	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۳	۱	۰	۰	۰	۷	٪۳۵
پرورشی مثبت(۱)	۰	۰	۰	۳	۳	۴	۱	۱	۰	۰	۰	۱۲	٪۶۰
پرورشی مثبت(۲)	۰	۰	۰	۰	۴	۴	۲	۱	۲	۱	۰	۱۴	٪۷۰
پرورشی مثبت(۳)	۰	۰	۰	۲	۳	۲	۰	۲	۰	۰	۰	۱۱	٪۵۵
کنترل مثبت(۱)	۰	۰	۱	۲	۴	۵	۴	۲	۰	۱	۰	۱۸	٪۹۰
کنترل مثبت(۲)	۰	۰	۰	۲	۳	۴	۴	۳	۱	۰	۰	۱۷	٪۸۵
کنترل منفی(۱)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۲	٪۱۰
کنترل منفی(۲)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱	٪۵



نمودار۲- مقایسه درصد تلفات در تیمارهای مختلف پس از چالش



نمودار۳- مقایسه تعداد تلفات در تیمارهای مختلف پس از چالش

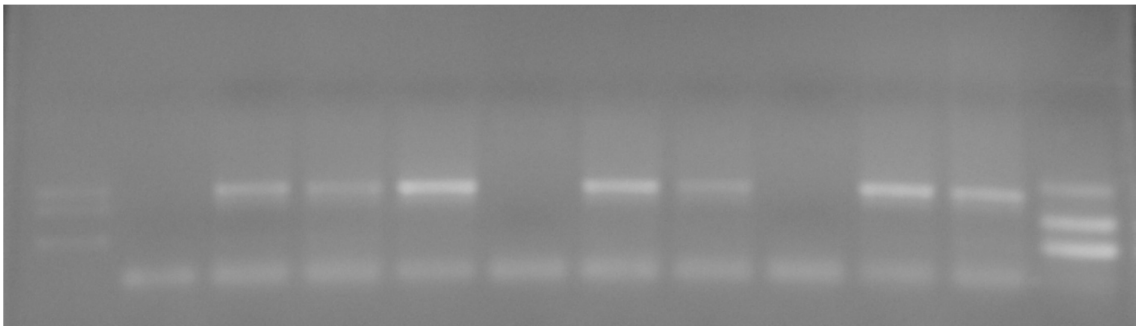


نمودار۴-تلفات تجمعی میگوها در تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف پس از چالش

برای تأیید علت تلفات اقدام به انجام آزمایش PCR از میگوهای تازه تلف شده در آزمایش چالش شد تا حضور ویروس شناسایی گردد (تصویر۱۹). نتایج نشان داد که در نمونه‌های اخذ شده ویروس لکه سفید شناسایی گردید (جدول ۵)

جدول ۵- نتایج **PCR** در گروهای مورد چالش

تیمار	نتایج **PCR**
نمونه میگوی قبل از چالش	–
میگوهای تغذیه شده با میگوی وحشی آلوده به ویروس	+
میگوهای تغذیه شده با میگوی پرورشی آلوده به ویروس	+
کنترل مثبت	+
کنترل منفی	–



تصویر۱۹- نمونه های چالش شده برای بررسی حضور ویروس لکه سفید با کیت**IQ2000**

ستون۱: نشانگر(M)، ستون۲: کنترل منفی(N)، ردیف۱۲: کنترل مثبت(P)

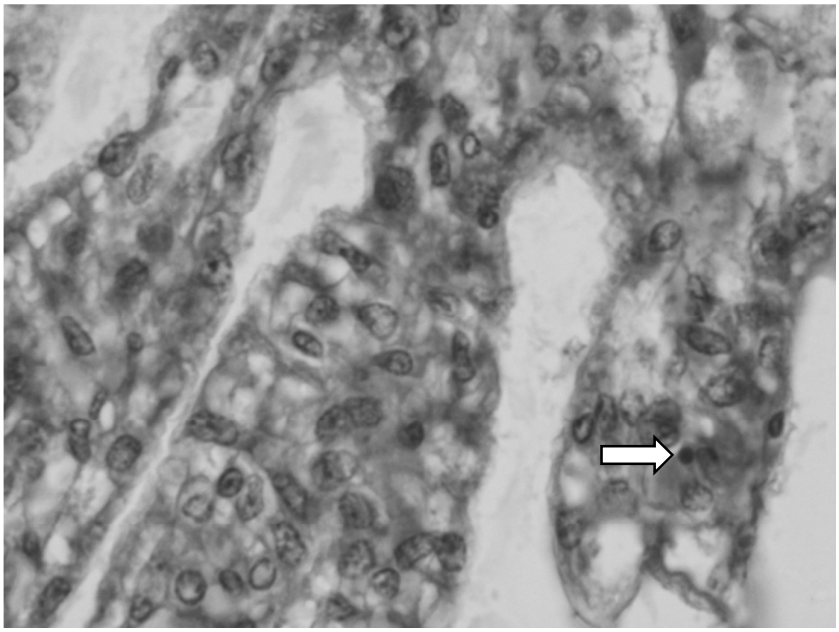
نمونه۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۱: دارای آلودگی به ویروس WSSV

نمونه ۶ و ۹: فاقد آلودگی به ویروس WSSV

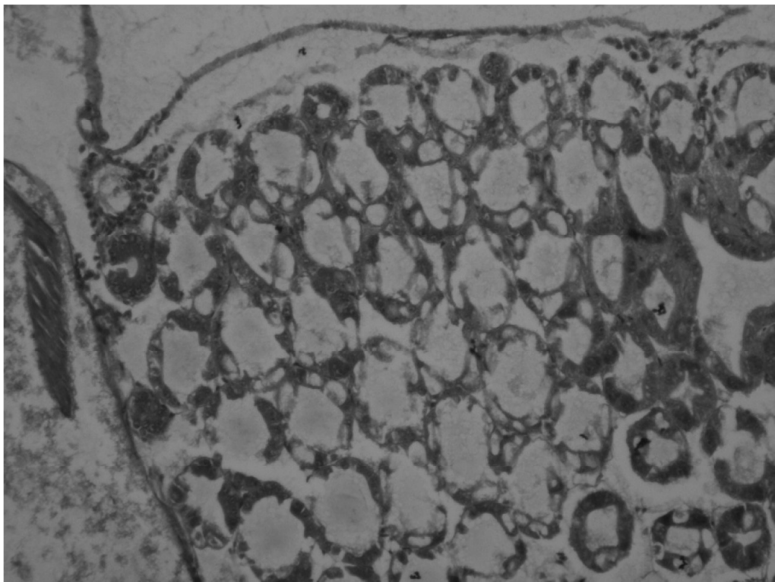
۳-۵- نتایج آسیب شناسی

با توجه به شناسایی ویروس لکه سفید در تعدادی از نمونه‌های میگوی پرورشی و وحشی و همچنین نمونه‌های تلف شده در آزمایش چالش، به منظور بررسی صحت پاسخ‌های بدست آمده از نمونه های مثبت لام هیستوپاتولوژی تهیه گردید. نتایج بدست آمده از بافت های نمونه برداری شده وجود ویروس لکه سفید را اثبات نمود

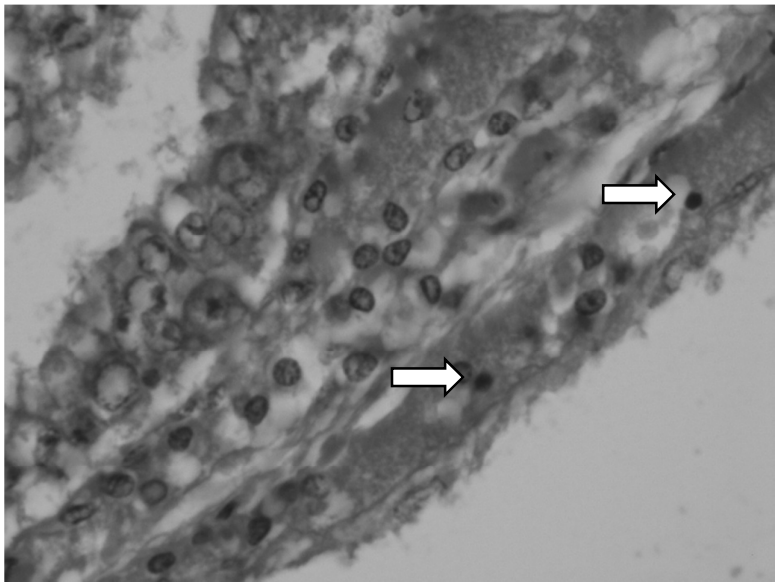
(تصاویر۲۰، ۲۱ و۲۲).



تصویر ۲۰- بروز گنجیدگی در هسته سلول بافت آبشش
رنگ آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین، فلوکسین- بزرگنمایی X۱۰۰۰



تصویر ۲۱- واکوئله شدن هپاتوسیت ها دربافت هپاتوپانکراس
رنگ آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین، فلوکسین- بزرگنمایی X۱۰۰۰



تصویر ۲۱- بروز گنجیدگی در بافت همبند هپاتوپانکراس

رنگ آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین، فلوکسین- بزرگنمایی X۱۰۰۰

۴- بحث و نتیجه گیری

صنعت آبزی پروری جهان از دیرباز تحت تأثیر آثار مثبت و منفی حاصل از تنوع گونه ای قرار داشته است. میگوی سفید غربی به دلیل برخورداری از امتیازهای ویژه همچون رشد بیشتر، هزینه های پائین‌تر به دلیل نیاز پروتئینی کمتر و تا حدودی مقاومت به بعضی از میکروارگانیسم‌ها مورد توجه بسیاری از کشورهای شرق آسیا قرار گرفته و مقام نخست را در بین گونه‌های پرورشی کسب کرده است. این گونه، بومی آب‌های سواحل غربی آمریکای لاتین از پرو تا مکزیک بوده که در سال ۱۹۹۶ از هاوایی به صورت رسمی وارد کشور تایوان و دیگر کشورهای آسیایی گردید. در ایران نیز به دلیل مشکلات بیماری بخصوص بیماری لکه سفید و تنگناهای موجود در پرورش اقتصادی میگوی سفید هندی، به نظر می‌رسد که میگوی وانامی به عنوان یک گونه مکمل میگوی بومی می‌تواند جایگاه مناسبی در صنعت آبزی پروری ایران داشته باشد. اما معرفی این گونه به نقاط مختلف جهان به عنوان یک گونه پرورشی جدید، پیامدهایی ناشی از آلودگی ویروسی را بدنبال داشته که موجب خسارتهای زیادی به مزارع پرورشی شده است (Weyban., 2003; Krol et al., 1990 ; Jory et al, 1999; Reantaso., et al, 2005).

توسعه پایدار پرورش میگو مستلزم رعایت شرایط بهداشتی و ایمنی زیستی در کلیه مراحل تولید است. وقایع بوجود آمده در صنعت میگو در جهان نشان‌دهنده این موضوع است که پرورش پایدار میگو به شدت از بروز بیماری‌ها تأثیرپذیر می‌باشد. به طوری‌که هم‌اکنون این صنعت در اغلب نقاط جهان از ناحیه این بیماری‌ها آسیب دیده است. در حالی‌که روز به روز مصرف میگو در جهان به عنوان یک غذای کامل در حال توسعه است تعداد زیادی از این ویروس‌ها در کشورهای صاحب صنعت به صورت بومی درآمده است و مبارزه با آن‌ها بسیار پیچیده و سخت می‌شود. بنابراین شناخت راه‌های توسعه پایدار میگو و تعیین محل‌های ریسک و خطر که باعث بروز بیماری‌های ویروسی در صنعت می‌شود بسیار حائز اهمیت است.(تخم افشان و همکاران ۱۳۸۳)

ویروس‌ها به عنوان پاتوژن‌های مهم در میگو شناخته شده‌اند، میگو در مراحل مختلف زندگی ممکن است به عفونت‌های ویروسی خاصی حساس شودکه باعث مرگ ومیر، کاهش رشد و بد شکلی می‌گردد (Rahman, 2007)

ویروس‌ها از میان دیگر میکروارگانیسم ها حدود ۸۰٪ عامل تلفات در بین آبزیان بخصوص میگو می باشند. از بین ۲۰ ویروس شناسایی شده در میگو های پنائیده چهار ویروس YHV، WSSV، IHHNV و TSV از مهم‌ترین علل تلفات در بین میگوها گزارش شده است. پاتوژن های TSV و IHHNV در منطقه هاوایی و آمریکا تلفات می‌گیرند در حالیکه بیماری ویروسی WSSV و YHV اولین بار در سال ۱۹۹۱ در آسیا گزارش و باعث تلفات سنگین گردیدند(مرتضایی و همکاران ۱۳۸۸) و در طی دو دهه اخیر در اکثر کشورهای آسیای جنوب شرقی و آمریکا موجب تلفات سنگین و خسارات اقتصادی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده شده اند (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۴؛ افشارنسب ،۱۳۸۶؛ تخم افشان و همکاران ،۱۳۸۳).

با توجه به این‌که عوامل خطر سازی می‌توانند در شیوع بیماری‌های ویروسی و ایجاد تلفات مؤثر باشند محققین بسیاری همچون افشار نسب و همکاران ۱۳۸۵، Corsin et al, 2001، Selvin et al, 2003، Mohan et al, 2005 و Limsuwon et al, 2003 روی کنترل حاملین ویروس‌ها (خرچنگ‌ها و میگوهای وحشی و به طور کلی ایمنی زیستی (Biosecurity)) در سطح استخر، مزرعه، منطقه وغربالگری گونه های جدید برای پیشگیری از آلودگی‌های جدید تأکید کرده اند(مرتضایی و همکاران ۱۳۸۸).

براساس مطالعات صورت گرفته در سال ۱۹۹۷ در آمریکا توسط Mcllwain و همکاران به منظور شناخت خطرات ویروس‌ها لازم است منابع طبیعی ویروس‌ها و راه‌های انتقال آن‌ها در صنعت تکثیر و پرورش مشخص شود (Mcllwain et al., 1997).

درمان مؤثری برای عفونت‌های ویروسی وجود ندارد،لذا شناسائی راه‌های جلوگیری کننده و عملیاتی که از گسترش پاتوژن جلوگیری می‌کند و یا تشخیص سریع آن از کارهای مهم است.معمولاً علائم بالینی، پارامترهای ایمنی و آنالیز هیستوپاتولوژی اولین تست‌های بکار رفته برای ارزیابی سلامت موجود است (Lightner et al., 2006). به هر حال این روش‌ها برای تشخیص کافی نیستند زیرا تعداد زیادی از فاکتورها می‌توانند باعث علائم مشابهی شوند. به همین علت، راه‌های دقیق و حساس و اختصاصی توسعه یافته است خصوصاً روش‌هایی که بر پایه مولکولی و ایمنی شناسی است(Caroline et al., 2012). شناسایی و ردیابی ویروس‌ها توسط روش‌های مختلفی همچون PCR،

Insitu Hybridization، مونوکلونال آنتی بادهای TEM (میکروسکوپ الکترونی) و حتی به صورت مستقیم با استفاده از میکروسکوپ نوری (مشاهده علائم روی کاراپاس) و یا مدفوع میگو قابل انجام است. (مرتضایی و همکاران ۱۳۸۸). اما به طور کلی استفاده از تکنولوژی RT PCR/PCR و همچنین Nested RT PCR/PCR روش‌های مؤثر در غربالگری مولدین و پست لاروها است (Caroline et al., 2012). شناسایی ویروس های IHHNV، TSV و WSSV در میگوی وانامی در این تحقیق با استفاده از روش nested PCR انجام گرفته است که روش بسیار دقیقی می‌باشد.

ویروس لکه سفید بیماری‌زا ترین و ماندگارترین عامل ویروس بدون اقدامات پیشگیرانه و کنترلی در بین عوامل بیماری زای میگو می باشد (Flegel, 2009).

در تحقیق حاضر ویروس لکه سفید از میگوهای وحشی رودخانه بهمنشیر بارها شناسایی شد و بوسیله آزمایشات هیستوپاتولوژی نیز تأیید گردید ولی نتایج ردیابی این ویروس در خرچنگ‌ها منفی بود.

ویروس بیماری لکه سفید از طرق مختلف از جمله تخم و پست لاروهای تولیدی و همچنین تعداد زیادی ناقل و حامل به مزارع پرورشی وارد شده و باعث تلفات میگوها می گردد(Lotz., et al 1997; Mohan., et al 1998 ; Escobedo-Bonilla etal., 2008; Smal and pagenkopp., 2011)

در این مطالعه با توجه به آزمایش پست لاروهای وارد شده به مزارع هیچ گونه نمونه مثبتی از مولدین و پست لاروها گزارش نشدکه این نتایج با تحقیقی که شریف پور و همکاران در سال ۱۳۸۹ انجام دادند مطابقت دارد(پروژه اپیدمی لکه سفید منتشر نشده). با این حال میگوهای پرورشی در سنین مختلف دچار بیماری شدند که شاید ورود ویروس به دلیل آلودگی غذا، ناقلین موجود در منطقه پرورش و حتی میگوهای وحشی وارد شده به مزارع بوده باشد. به همین منظور و جهت بررسی امکان انتقال عامل بیماری‌زای لکه سفید از میگوهای وحشی آلوده به میگوهای پرورشی سالم آزمایش چالش انجام گرفت و نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیماری هم از میگوهای وحشی آلوده به میگوهای پرورشی و هم از میگوهای پرورشی آلوده به میگوی پرورشی سالم انتقال می‌یابد همچنین نتایج نشان داد که از زمان معرفی ویروس به میگو تا بروز تلفات ۲ الی ۳ روز طول می کشد.که این نتایج با نتایج افشارنسب و همکاران (۱۳۸۶) مطابقت دارد. بر اساس گزارش Lightner (۱۹۹۶) دوره کمون این

بیماری نیز در گونه‌های مختلف، متفاوت است. نتایج بدست آمده بسته به مقاومت ایمنی میگوها متغیر است(Lightner, D.V., 1996).

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که درصد تلفات در گروهی که با میگوی وحشی آلوده تغذیه شده بودند کمتر از گروهی که با میگوی پرورشی آلوده تغذیه شده بودند می باشد.

افشار نسب و همکاران (۱۳۸۶) عنوان کردند که مرگ و میر ناشی از ویروس لکه سفید در میگوهای پاسفید در مقایسه با میگوهای سفید هندی با شدت کمتری همراه است. این موضوع بیانگر آن است که مقاومت میگوی پاسفید در مقایسه با میگوی سفید هندی بیشتر است. همچنین Briggs و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند که مقاومت میگوی پاسفید در مقابل بیماری لکه سفید در مقایسه با سایر گونه‌های میگو بیشتر است (Briggs *et al*.,2004).

یکی دیگر از فاکتورهای خطر در بروز بیماری لکه سفید استرس می باشد عوامل استرس‌زا معمولاً مرتبط با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب و بستر استخرها می‌باشد. عوامل استرس‌زا می‌توانند با کاهش توان دفاعی میگو سبب افزایش خطر بروز بیماری لکه سفید شوند(Mohan. et. al 2008). بنابراین برخی شرایط فیزیکی و شیمیایی ممکن است سبب تحریک تکثیر سریع ویروس لکه سفید و در نتیجه تلفات میگوها شوند. نوسانات در شوری و دما سبب تضعیف سیستم ایمنی میگو شده و روی تکثیر ویروس مؤثراست. (Yu *et al* 2003). همچنین کاکولکی (۱۳۹۰) عنوان کرده است که دماهای بالاتر از ۲۹ درجه سانتی‌گراد برخلاف دماهای پایین‌تر امکان ضعیف‌تری را برای تکثیر ویروس لکه سفید فراهم می‌کند.همچنین به‌نظر می‌رسد که شوری ۴۰ در هزار به‌عنوان شوری مناسب میگوی وانامی در شرایط محیطی ایران بر خلاف شوری‌های پایین‌تر و بالاتر در کاهش شدت بیماری لکه سفید مؤثر است (کاکولکی ۱۳۸۹)

سندرم تورا در تمام مراحل پرورش میگو گزارش شده است اما بیشتر در ماه اول زندگی میگو را مورد تهاجم قرار می‌دهد.در زمانی که کوتیکول میگوی جوان درگیر می‌شود علائمی به شکل ملانیزه شدن مشاهده می‌گردد و همچنین روده‌ها نیمه پر و کروماتوفورها زیاد می‌شود.تغییرات هیستوپاتولوژیک این بیماری شامل نکروز چند

کانونی در اپی تلیوم زیر کوتیکول و بافت همبند می‌باشد.به علت آسیب به ناحیه زیر کوتیکول، میگوی آلوده توانایی پوست اندازی را از دست می‌دهد، بنابراین در این مرحله از زندگی می‌میرد. حال اگر از این مرحله بگذرد نجات یافته و پوست اندازی می‌کند.(Carlos et al., 2010.)

عامل نکروز عفونی هیپودرم و بافت خونساز یک DNA ویروس است که باعث بدفرمی در میگوی وانامی می‌شود. روش‌های بر پایه اسید نوکلئیک مانندsitu hybridization و PCR به‌طور معمول برای شناسایی این ویروس استفاده می‌شود (Tang etal., 2006) دراین مطالعه هیچ یک از ویروس‌های TSV و IHHNV در میگوهای وحشی و خرچنگ‌های رودخانه بهمنشیر مشاهده نشد ولی در میگوهای صید شده از مزارع پرورشی دو مورد به‌صورت خیلی خفیف ویروس TSV شناسایی گردیدکه فاقد هر گونه علائم بودند اما موردی از حضور ویروس IHHNV شناسایی نگردید. اما در مطالعه ای که مرتضایی و همکاران در سال ۱۳۹۰ انجام دادند حضور همزمان ویروس های TSV، HPV و WSSV بارها مشاهده گردید که یافته های این پروژه با مطالعات دیگر محقیقن همچون otta & et al, 2003 و Umesha & et al, 2003 در میگوهای مونودون به ظاهر سالم توسط روش PCR در هند مطابقت دارد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد که بیماری لکه سفید قابلیت انتقال از میگوهای وحشی ناقل یا بیمار به میگوهای پرورشی را دارا می‌باشد ولی این انتقال از میگوهای پرورشی شدیدتر و تلفات بالاتری راسبب می‌شود همچنین با توجه به این که در طول دوره پرورش ویروس بارها از میگوهای وحشی رودخانه بهمنشیر شناسایی گردید و علیرغم وجود توری های مختلف در ورودی استخرهای پرورش میگو احتمال ورود میگوهای وحشی به استخرها دور از ذهن نبوده و شاید بتوان گفت که از این طریق ویروس می تواند به مزرعه پرورشی راه پیدا کند هرچند که انتقال ویروس از طریق غذا و منابع انسانی را نیز نباید نادیده گرفت.

در طول دوره تحقیق موردی از وجود ویروس‌های TSV و IHHNV در میگوهای وحشی رودخانه شناسایی نشد. با توجه به این که این ویروس ها در دوره های پرورش میگوی سفید هندی در منطقه شناسایی نشده بودند می‌توان وجود این ویروس ها را که در مطالعات چندساله اخیر گزارش شده است به دلیل حضور میگوی غیر بومی وانامی مرتبط دانست وعدم حضور این ویروس ها در میگوهای وحشی را می توان به عدم انتقال به منطقه ربط داد.

۵-پیشنهادها

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق موارد زیر پیشنهاد می‌گردد:

۱. طراحی پروژه‌ای به منظور بررسی راه‌های انتقال ویروس لکه سفید از طریق غذا و یا آرتمیا.

۲. تعیین توالی ویروس‌های لکه سفید در میگوهای وحشی و پرورشی و مطالعه قرابت آنتی‌ژنیکی آن‌ها.

۳. با توجه به امکان انتقال ویروس لکه سفید بین میگوهای وحشی وپرورشی طراحی پروژه‌ای برای بررسی امکان تولید میگوهای مقاوم به لکه سفید.

۴. بررسی دقیق و کامل تر میگوهای منطقه از نظر آلودگی به ویرس تورا.

۵. در صورت امکان مطالعه تجربی انتقال ویروس تورا به میگوهای بومی منطقه.

۶- تشکرو قدردانی

از ریاست محترم سازمان جهاد کشاورزی استان خوزستان و اعضاء محترم ستاد میگوی استان به جهت تصویب اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می گردد.

از ریاست محترم پژوهشکده، معاونین محترم و پرسنل زحمتکش پژوهشکده که در مراحل مختلف اجرای این پروژه ما را یاری نمودند قدردانی می‌گردد.

از مدیر کل محترم شیلات استان جناب آقای دکتر مغینمی و همکاران ایشان در اداره میگو و سایر آبزیان دریایی سپاسگزاری می‌گردد.

۷-منابع

۱. افشار نسب، م. ۱۳۸۶. بیماری ویروسی میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۰ ص

۲. افشار نسب، م؛ م. محمدی دوست؛ ع. قوام پور؛ ع. متینی فر؛ س. ر. سیدمرتضایی؛ م. سوری؛ ا. جرفی؛ غ. فقیه؛ خ. پذیر؛ م. حق نجات؛ م. ر. مهرابی و ش. کاکولکی. ۱۳۸۵. گزارش نهایی احیاء پرورش میگو در سایت چوئبده آبادان؛ با رعایت اصول بهداشتی و پیشگیری از بیماریهای میگو بر تاکید بر بیماری لکه سفید. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۹ ص.

۳. افشار نسب؛ م، ف؛ لالویی و س. رضوانی. ۱۳۸۴. شناسایی بیماری لکه سفید (WSSD) با روش PCR در میگوی سفید هندی در ایران. مجله علمی شیلات. شماره ۱. بهار ۱۳۸۴ صفحات ۱ تا ۱۲

۴. تخم افشان، م؛ ب. تمجیدی، ف. لالویی؛ ن. م. کر و م. ر. مهرابی. ۱۳۸۳. گزارش نهایی ردیابی بیماری لکه سفید در میگوی پرورشی سفید هندی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۴۱ ص

۵. زرشناس، غ.، خلیل پذیر، م.، ۱۳۸۶، معرفی و انتقال میگوی سفید غربی (Penaeus Vannamei) و میگوی آبی (Penaeus Stylirstris) به آسیا و اقیانوسیه. موسسه تحقیقات شیلات ایران.

۶. سید مرتضایی،س.ر.، آهنگرزاده، م.، هوشمند، ح.، کر، ن.م.، جرفی،ا....(۱۳۸۸). گزارش نهایی پایش عوامل عفونی در استخرهای پرورش میگوی وانامی در چوئبده آبادان.. موسسه تحقیقات شیلات ایران .

۷. کاکولکی،ش .(۱۳۸۹).مطالعه تاثیر برخی عوامل محیطی(درجه حرارت و شوری) بر بیماریزایی ویروس عامل بیماری لکه سفید در میگوی وانامی.رساله برای دریافت درجه دکترای تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان. ۶۰ صفحه.

۸. مخیر، ب.مخیر، ز. (۱۳۸۵). کتاب راهنمای بیماری شناسی و روش های تشخیصی بیماری های میگوهای پنه اید. انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

9. afsharnasab, M., dashtyannasab, A., yeganeh, V. 2005. Prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in the cultured shrimp Penaeus indicus along the coast of Bushehr Province.

10. Balasubramanian, G., Sudhakaran, R., Musthaq, S.S., Sarathi, M., Sahul Hameed, A.S., 2006. Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. J. Fish. Dis. 29, 569-572.

11. Berns, KI., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzyczka, N., Siegl, G., Tal, J., Tattersall, P. 1995. Parvoviridae: VIth report of international committee on taxonomy of viruses. Arch Virol Suppl 10:169–178.
12. Bonami JR, Trumper B, Mari J, Nrehelin M, Lightner DV (1990) Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J Gen Virol 71:2657–2664.
13. Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M., 2005. Disease and health management in Asian Aquaculture. Vet. Parasitol. 132, 249-272.
14. Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., Philips, M., 2004. Introductions and movement of Penaeus vannamei and Penaeus stylirostris in Asia and the pacific. FAO, Bangkok, 32 pp.
15. Carlos A. Ching and Chalor Limsuwan(2010). Escription of a Treatment for The Control of Taura Syndrome Virus in *Litopenaeus Vannamei* under Intensive Culture. Boletines nicovita.
16. Caroline H. Seibert, Aguinaldo R. Pinto(2012). Challenges In Shrimp Aquaculture Due To Viral Diseases: Distribution And Biology Of The Five Major Penaeid Viruses And Interventions To Avoid Viral Incidence And Dispersion. Brazilian Journal of Microbiology (2012): 857-864 ISSN 1517-8382.
17. Chang, P-S., Chen, L-J., Wang, Y-C., 1998. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. Aquaculture 166, 1-17.
18. Chou , H.Y. ., Huang, C.Y. , Lo ,C.F. , Kou, G.H..(1998)Studies on transmission of white spot syndrome / associated baculovirus WSBV in Penaeus monodon and P. japonicus via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture164.263–276.
19. Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C., Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis. Aquat. Org., 23, 165-173.
20. Corsin, F.; J.F. Turnbull; N.V. Hao; C.V. Mohan; T.T. phi; L.H. phuoc; N.T.N. Tinh and K.L. Morgan. 2001. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice- shrimp farming system. DAO, vol. 47, pp:1-12.
21. Durand, S.V, Lightner, D.V., 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. J. Fish Dis. 25, 381-389.
22. Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2005. In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in Specific pathogen free Litopenaeus vannamei by intramuscular and oral routes. Dis.Aquat. Org. 66, 163–170.
23. Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2007. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 74, 85-94.
24. FAO fisheries department, fisheries information, data and statistics unit, 2005. Fishstat, universal software for fishery statistical time series. Version 2.3.
25. FAO.2003.Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (p.vannamei) hatcheries in latin America FAO no.450 Rom .2003.64p.
26. Fast, A.W.,1992. Penaeid growout systems: an overview. In: Marine shrimp culture: principles and practices: Edited by Fast, A.L., and Lester, L.J. ELSEVIER Science publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands, 842 p.
27. Flegel, T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258, 1-33.
28. Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. Dev. comp. immunol. 31, 217-231.
29. Flegel, T.W., 2009. Current status of viral diseases in Asian shrimp aquaculture. Israeli Journal of Aquaculture—Bamidgeh 61, 229–239.
30. Holthuis, L.B., 1980. FAO species catalogue. Vol. 1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish. Synop., (125) vol. 1: 261 p.
31. Horowitz, A., Horowitz, S., 2001. Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 199-218 pp.
32. Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castañeda, J., 2001. In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001. The world aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 104-152 pp.
33. Jory,D.:T.Cabrera; B.polanco; R.sanchez; J.Millan; J.Rosas ;C.Alceste; E.Garcia; M.Useche and R.Agudo.1999. Aquaculture in Venezuela Aquaculture magazine sep/oct .vol.25,no.5, pp:12-16.

34. Krol, R.M; W.E.Hawkins and R. M. Overstreet. 1990. Reo- like virus in white shrimp P.vannamei (Crustacea: Decapoda): Co- occurrence with Baculovirus penaei in experimental infections.Dis. Aquat. Org, vol. 8, pp:45-49.
35. L.M.; Navarro, S.A.; Redman, R.M.; Mohney, L.L. (2006). Application of molecular diagnostic methods to penaeid shrimp diseases: advances of the past 10 years for control of viral diseases in farmed shrimp. Dev Biol (Basel).126, 117-122.
36. Lighter, D.V.;C.R.pantoja ;B.T.poulos ; K.F.J.Tang; T.M.Redman; T.Andreans and J.R.Bonami .2004.Infectious myonecrosis (IMN) a new virus diseases of *Litopenaeus vannamei* . Book of Abstracts. World Aquaculture .2-5
37. Lightner D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
38. Lightner, D.V., 1996. A hand book of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.
39. Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164, 201-220.
40. Lightner, D.V.; Redman, R.M.; Bell, T.A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J. Invertebr. Pathol. 42, 62-70.
41. Lightner, D.V.; Redman, R.M.; Hasson, K.W.; Pantoja, C.R. (1995). Taura syndrome in Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. Dis. Aquat. Org. 21, 53-59.
42. Limsuwan, C. 2003. Diseases of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thailand The AAHRI news letter , vol. 12, no .1 pp:1-5.
43. Lotz,J,M. 1997. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotecnology, 13, 405-413.
44. Mari, J.; Poulos, B.T.; Lightner, D.V.; Bonami, J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome virus, genomic characterization and similarity with member of the genus Cricket paralysis-like viruses. J. Gen. Virol. 83, 915–926.
45. Mayo, M. A., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Arch. Virol. 147, 1655–1663.
46. Mcllwain,T., Austin, K., Bastian, B., Erbacher, J., Fite, R., Kern, F., Orr, R., Siewieki, T., van der Schalie, B and Zein-Eldin, Z. 1997. An evaluation of potential shrimp virus impact on cultured shrimp and wild shrimp population in the Gulf of Mexico and southeastern U.S. Atlantic coastal waters. A report to the joint subcommittee on aquaculture prepared by the JSA shrimp virus work group.
47. Mohan, C.V., Phillips, M.J., Bhat, B.V., Umesh, N.R., Padiyar, P.A., 2008. Farm-level plans and husbandry measures for aquatic animal disease emergencies. Rev. Sci. Tech.Off. Int. Epiz. 27 (1), 161–173.
48. Mohan, C.V.; F.corsin and A. padiyar. 2005. Disease prevention focus: Farm- Level biosecurity and white spot Disease of shrimp. Aquaculture Health Internationl, nov. 2005, pp:16-20.
49. Mohankumar .,K., Ramasamy ,P. (2006) White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in Fenneropenaeus indicus. Virus Research 115 (2006) 69–75.
50. Nakano, H., Hiraoka, M., Sameshima, M., Kimura, T., Momoyama, K., 1998. Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viremia (PAV), by some chemical and physical treatments. Fish Pathol. 33, 65-71.
51. Oganandhan, K., Narayanan, R.B., Sahul Hameed, A.S., 2003a. Larvae and early post-larvae of Peaneus monodon (Fabricus) experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality. J. Fish. Dis. 26, 385-391.
52. OIE - World Organization for Animal Health. (2009). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009. OIE, Paris.
53. Otta ,S.K.and I.Karunasagar. 2003. Detection of MBV and WSSV in apparently healthy p.monodon from India by PCR.Aquaculture, vol.220, pp:56-69.
54. Pérez, F., Volckaert, F.A.M., Calderón, J., 2005. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of Penaeus (Litopenaeus) vannamei. Aquaculture 250, 586- 591.

55. Rahman, M.M.(2007). Differences in virulence between white spot syndrome virus (WSSV) isolates and testing of some control strategies in WSSV infected shrimp. Thesis for obtaining the degree of Doctor in Veterinary Sciences (PhD) Laboratory of Virology.
56. Rajan, P.R., Ramasamy, P., Purushothaman, V., Brenan, G.P., 2000. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp Penaeus monodon and P. indicus. Aquaculture 184, 31- 44.
57. Reantaso , M.G.B; R.P.Subasinghe; J.R.Arthur ; K.Ogawa; S.Chinabut; R.Adlard ; Z.Tan and M.Shariff. 2005. Disease and health management in Asian Aquaculture. Veterinary parasitology, Article In press p:25-47.
58. Rosenberry, B. (editor) 2002. World shrimp farming 2002, San Diego, Shrimp News International.
59. Sahul Hameed, A.S., Sarathi, M., Sudhakaran, R., Balasubramanian, G., Musthaq, S.S., 2006. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV) infected penaeid shrimp, Penaeus monodon and Penaeus indicus, by flow cytometric analysis. Aquaculture 256, 111-120.
60. Selvin, J. and A.P.Lipton. 2003. vibrio alginloyticus associated with white spot disease of penaeus monodon. Dis Aquat organ, vol.3, no. 57, pp:1-2.
61. Shike, H.; Dhar, A.K.; Burns, J.C.; Shimizu, C.; Jousset, F.X.; Klimple, K.R.; Bergoin, M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. Virology. 277, 167–177.
62. Small, H.J., Pagenkopp, K.M., 2011. Reservoirs and alternate hosts for pathogens of commercially important crustaceans: a review. Journal of Invertebrate Pathology 106, 153–164.
63. Sudha, P.M., Mohan, C.V., Shankar, K.M., Hegde, A., 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. Aquaculture 167, 95-101.
64. Takahashi , Y., T.Itami , M. Kondo, M. Maeda, R.fujios Tomogo , k.Supamattaga and S.Bo onyaratpalin.1994Eleetron Microscopic evidence of baciliform Virus infection in kuruma shrimp (P.Japonicus). Fish Pathol. 29:121-125.
65. Tan, L.T., Soon, S., Lee, K.L., Shariff, M., Hassan, M.D., Omar, A.R., 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in Penaeus monodon Fabricus using competitive polymerase chain reaction. J. Fish. Dis. 24, 315- 323.
Teng, O.H., Lee, P.Y., Lee, F.C., Chien, H.W., Chen, M.S., Sung, P.F., Su,C., Ou, B.R.2006. Detection of infectious hypodermal and hematopoiet necrosis virus (IHHNV) in itopenaeus vannamei by ramification amplification assay. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org. Vol. 73: 103–111.
66. Umesha , K.R.;A.Uma;S.K.Otta and I.karunasagar. 2003. Detection By PCR of hepatopancreatic parvo virus (HPV) and other virus in hatchery – reared P. monodon post larve. Dis .Aquat org , vol. 57, pp: 141-146.
67. van Hulten, M.C.W.,Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K., Vlak, J.M., 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology 286, 7 –22.
68. Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Shimizu, K., Nishizawa, T., Muroga, K., 1999. Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. Fish pathol. 34, 19-23.
69. Wang, C.H., C.F. Lo, J.H. Leu. CM.Chou, P,Y.Yeh, H.Y.Chon M.C.Tung, C.F. Chang, M.S.Su and G.H. Kou.1995.Purification and genomic analysis of baculovirus associated with while spot syndrome (WSBV) of P.monodon. Dis. Aquat. Org.23:239-2420.
70. Wang, Q., Poulos, B.T., Lightner, D.V., 2000a. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. Arch. Virol. 145, 263-274.
71. Wang, Q., White, BL, redman, RM, Lightner, DV. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and Farfantepenaeus duorarum juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture 170, 179-194.
72. Wang, Y.G. 2000. Epidemiology of diseases of cultured Black tiger shrimp (Penaeus monodon) in Peninsular Malaysia. Ph.D thesis, Faculty of Veterinary Medicine. Universiti Putra Malaysia.
73. Wongteerasupaya. C,Y.E. Vickers, S .Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T.W.Felgel. 1995. A non- occluded systemic baculovirus that occure in the cells of ectodermal and mesodermal origin and cause high mortality in black tiger prawn. (P.monodon). Dis. Aquat. Org. 21.69-770.
74. Wyban ,J. 2003. penaeus vannamei seedstock production recent developments in Asia. Global Aquacure Advocate.pp:78-79.

75. Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., Xu, X., 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. J. Virol. 75, 11811-11820.
76. Yu, Z., Li, C., Guan, Y., 2003. Effect of salinity on the immune responses and outbreak of white spot syndrome in the shrimp Marsupenaeus japonicus. Ophelia 57, 99–106.

7- Abstract

According to the white spot disease during 2002 until 2005 and the damages caused by the disease to the farmers a new species *L.vannamei* were introduced to the farming region of Abadan Choebdeh from 2006. Hight mortality occurred in Khuzestan province farms in 2007 and 2008 again.

Probably viral agent was transferred to native shrimps or other aquatic animals, therefore it is very important that presence of viruses in local aquatic animals and its vectors detected. Detection of WSSV, TSVand IHHNV in aquatic animal from Khuzestan costal region imphasis to wild shrimp and craps is the main objectives of this study.

So samples were taken from 10 active farms twice a week and 100 postlarves from 3 active breeding center befor stocking.Samples for viral detection were studied by molecular and histopathology asseys. Results was shown presence of the White spot virus in cultured and wild shrimp and TSV infection in only two cultured shrimps but there was negative result for IHHN virus.

To study the pathogenesis of white spot virus isolated from wild and farmed shrimps, exposure method was used. Results of challenge showed that WSSV can be transmited from diseased cultured and wild shrimp to cultured shrimp.

Mean mortality percent in the treatment that fed with infected wild shrimp was 38.33± 10.4 and treatment that fed with infected cultured shrimp 61.66 ± 7.63 and in the positive control treatment was 87.5 ±3.5.