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

عنوان:

شناسائی و تعیین هویت ویروسهای بیماریزا در میگو با استفاده از روشهای نوین به منظور ابداع و معرفی کیتهای مولکولی تشخیص

(کیت بیماریهای ویروسی میگو شامل TSV, HPV ,MBV)

مجری :

محمد افشارنسب

شماره ثبت
۴۶۶۰۲

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

عنوان پروژه : شناسائی و تعیین هویت ویروسهای بیماریزا در میگو با استفاده از روشهای نوین به منظور ابداع و معرفی کیتهای مولکولی تشخیص (کیت بیماریهای ویروسی میگو شامل TSV, HPV ,MBV)
شماره مصوب پروژه / طرح : ۸۹۰۶۱-۸۹۰۴-۱۲-۸۰-۱۲
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) : بهرام کاظمی – ابوالفضل سپهداری – شکوفه شمسی-محمدرضا مهرابی- سید رضا سید مرتضایی – الهام جرفی – حسین هوشمند- مینا آهنگرزاده-لفته محسنی نژاد-وحید یگانه- محمد خلیل پذیر-عقیل دشتیان نسب-کوروس رادخواه-سعیدتمدنی -محمدرضا صادقی – قاسم حسینی- اشکان اژدهاکش پور- سید حسین حسینی- محدث قاسمی – بابک رمضانی عاقله -آرمین عابدیان – بهروز قره وی -نیاز محمد کر- احمد حامی طبری-کاظم عبدی- محمد حسین ناظم شیرازی – محمدرضا حسن زاده – مهدی سیمیرونی -آذر صیدی-امراله قاجاری – رضا محمود علوی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : شاپور کاکولکی
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۸۹/۶/۱
مدت اجرا : ۴ سال و ۳ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
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 : شناسائی و تعیین هویت ویروسهای بیماریزا در میگو با استفاده از روشهای نوین به منظور ابداع و معرفی کیتهای مولکولی تشخیص (کیت بیماریهای ویروسی میگو شامل MBV, HPV ,TSV)

کد مصوب : ۸۹۰۶۱-۸۹۰۴-۱۲-۸۰-۱۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۶۶۰۲ تاریخ : ۹۳/۱۱/۲۵

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 آبزیان‌در تاریخ ۹۳/۱۰/۲۱ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هئیت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- کلیات ۳
۱-۱- مروری بر منابع ۸
۲- مواد و روش کار ۱۶
۱-۲- جمع کردن نمونه‌ها و نگهداری آنها برای استفاده در روش PCR ۱۶
۲-۲- مطالعات آسیب شناسی ۱۶
۳-۲-مطالعات میکروسکوپ الکترونی ۲۳
۴-۲- روش مواجهه ویروس با میگوی پا سفید غربی ۲۹
۵-۲- لام مرطوب ۳۱
۶-۲- روش مولکولی PCR ۳۱
۷-۲- روش کار تولید پرایمر پیشنهادی برای نمونه ویروس MBV تایید شده ۳۶
۳- نتایج ۴۲
۱-۳- بیماریزایی ۴۲
۲-۳- علائم کلینیکی ۴۲
۳-۳- گسترش مرطوب ۴۳
۴-۳- نتایج حاصل از بررسی آسیب شناسی ۴۴
۵-۳- نتایج میکروسکوپ الکترونی ۴۵
۶-۳- بررسی شدت عفونت ایجاد شده در بیماری ۴۹
۷-۳- نتایج PCR ۵۳
۸-۳- نتایج PCR با پرایمر طراحی شده ۵۴
۴- بحث ۵۶
منابع ۶۲
چیکده انگلیسی ۶۵

چکیده

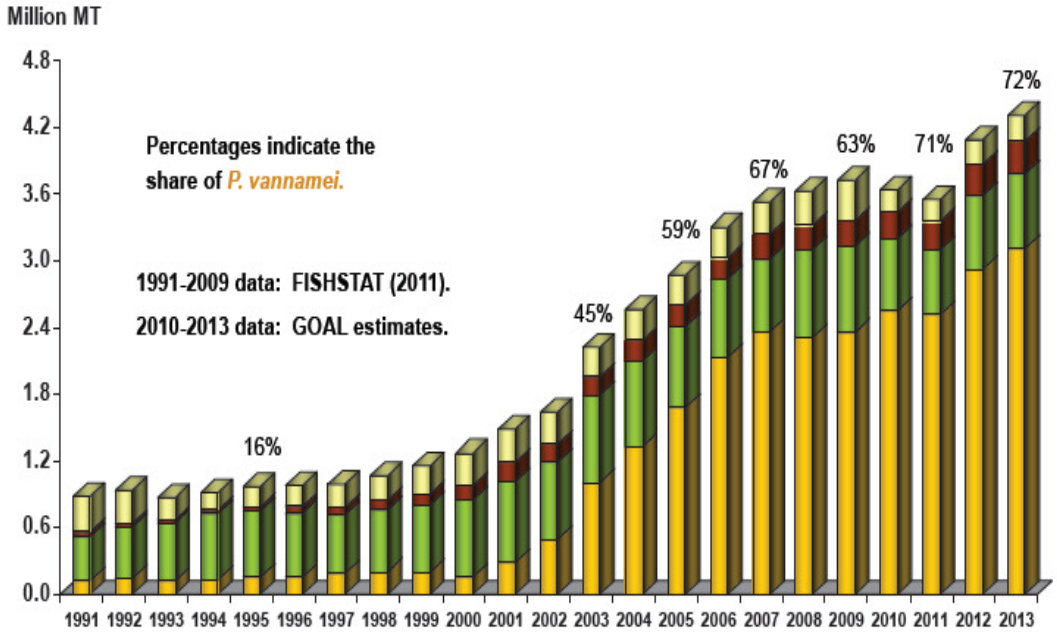
پرورش میگو در دنیا رشد فزاینده ائی داشته و در سال ۲۰۱۳ به رقم ۴/۲ میلیون تن رسید. ایران نیز روزبروز پرورش میگو در حال گسترش بوده و پیش بینی می‌شود در سال ۱۳۹۳ تولید به رقم ۲۰ هزارتن بالغ گردد. در این میان مهمترین چالش در تولید میگو موضوع بهداشت و بیماریها می‌باشد. بطوریکه در سال ۱۳۹۳ نیز مجددا بیماری لکه سفید مزارع پرورش میگو در چابهار را آلوده نموده و خسارت زیادی به این صنعت واردنمود. با توجه گسترش فعالیتهای آبزی پروری در سطح ملی، منطقه ائی و بین المللی، تعداد بیماریهای نوظهور(emerge) در حال افزایش بوده و روز به روز بر تعداد آنها افزوده می‌شود. در این میان نقش بیماریهای ویروسی از سایر بیماریها بیشتر بوده و این بیماریها نه موجب کاهش تولید شده، بلکه باعث تاثیر منفی بر تجارت و اقتصاد ملی نیز می‌شوند. بمنظور کنترل و پیشگیری از بیماریهای ویروسی شناخت روشهای دقیق و سریع که بتواند عامل بیماری (ویروس) را در پائین ترین سطوح و مقدار شناسائی و تشخیص نماید ضروری است. در این پروژه با استفاده از روش Polymerase Chain Reaction (PCR) که از حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) و کارائی (Efficiency) بالائی برخوردار و به صورت کیتهای تجارتی عرضه می‌شود برای این منظور استفاده شده است. تاکنون این کیتها از خارج کشور تامین گردیده است، اما با توجه به تغییرات شدیدی که در سویه های ویروس در هر منطقه وجود دارد ضرورت تولید این کیتها با سویه های که در داخل ایجاد بیماری میکنند اجتناب ناپذیر است. بعنوان مثال تاکنون ویروس سندرم تورا با بیش از ۱۰ سویه بیماریزا در مناطق مختلف ایجاد مرگ ومیر در میگو نموده است که با توجه به ماهیت ویروس و بروز موتاسیون در آن، سویه های هر منطقه از همدیگر متفاوت است. لذا ضرورت دارد کیتهائی طراحی شود که موجب شناخت سویه ایجاد کننده بیماری در داخل کشور گردد. این حالت برای سایر ویروسها از جمله ویرس بیماری لکه سفید (White spot syndrome virus) ، ویروس بیماری سر زرد (Yellow head virus(YHV، ویروس بیماری مونودن باکیلو ویروس (*Penaeus monodon* baculovirus)، ویروس بیماری پارو ویروس هپاتوپانکراس (Hepatopancreatic parvo like virus) ، ویروس بیماری نکروز عفونی بافتهای خونساز و هیپو درم (Infection hypoderamal and hematopoietic necrosis virus).نیز می‌باشد.
در این پروژه ابتدا ضمن شناسائی میگوهای بیمار نسبت به جمع آوری و انتقال آنها به آزمایشگاه اقدام شده و با استفاده از روشهای معمول ازجمله روش هیستوپاتولوژی، روشهای شیمیائی ،روش میکروسکوپ الکترونی، روش سنجش بیولوژیک (Bioassy) و کیتهای تحارتی وارداتی اقدام به تشخیص گردید. دراین پروژه فقط نسبت به شناسائی ویروس مونودن باکولوویرس (MBV) اقدام و دو ویروس دیگر یعنی ویروسهای تورا (TSV) و ویروس پارووویروس هپاتوپانکراس (HPV) به دلیل عدم تخصیص بودجه اقدامی نگردیده است. در این بیماری ابتدا نسبت به شناسائی ویروس بیماری با استفاده از روشهای مطالعات بالینی، آسیب شناسی، میکروسکوپ الکترونی و کیت تشخیص IQ2000 اقدام و سپس بیماری تایید و نسبت به استخراج DNA ویروس ها اقدام گردید. با استفاده از نرم افزار Oligoنسبت به طراحی پرایمر اقدام و با پرایمرهای تولیدی نسبت به شناسائی

ویروس اقدام و برای تایید از کیت نشخیصی IQ2000 استفاده گردید.تشخیص قطعی ویروس با پرایمر اختصاصی اقدام و با تشکیل باند ۱۸۵bp حساسیت و احتصاصیت پرایمر طراحی شده مورد بررسی قرار گرفته و تایید گردید.

کلمات کلیدی: شناسائی، ویروس، کیت تشخیصی، روشهای نوین مولکولی

۱-کلیات

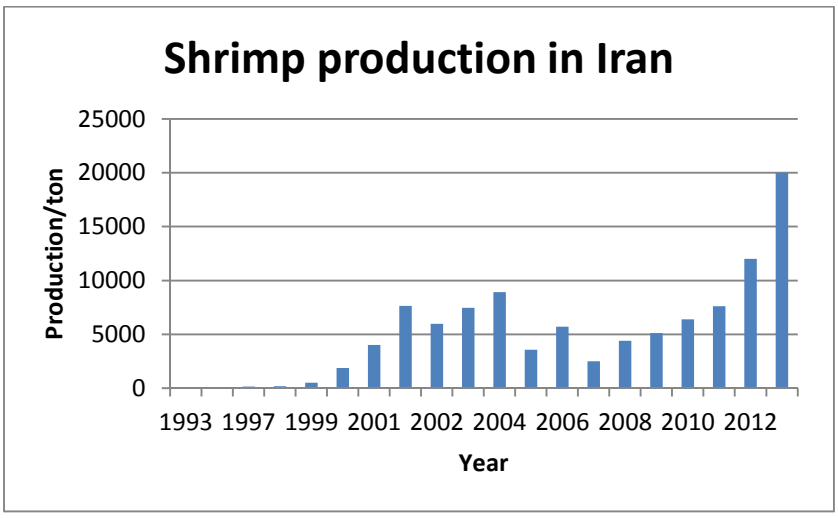
پرورش میگو در دنیا دارای سابقه نسبتا" طولانی است و پرورش تجاری آن به سالهای نخست دهه ۱۹۷۰ میلادی و به کشور ژاپن بر می گردد. تکثیر مصنوعی میگو برای نخستین بار توسط Hudinage انجام گرفته و ایشان در سال ۱۹۴۲ میلادی توانست لارو میگوی پنئوس ژاپونیکوس را پرورش داده و به مرحله پست لاروی برساند(صدیق مروستی، ۱۳۷۰).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



تصویر ۱-۱: تولید میگوی پرورشی تاسال ۲۰۱۲ و پیش‌بینی تا سال ۲۰۱۳ دردنیا

در این میان تولید میگو در ایران تا سال ۲۰۱۱میلادی یا ۱۳۹۱ خورشیدی بالغ بر ۱۲ هزارتن بوده و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۱۳ میلادی مطابق با ۱۳۹۲ خورشیدی به رقم ۲۰ هزارتن برسد (تصویر۱-۲).

براساس گزارش ارائه شده توسط Valderrama و Anderson (۲۰۱۱) از مهمترین چالشهای پرورش میگو موضوع بیماریها بوده (تصویر۱-۳) 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.

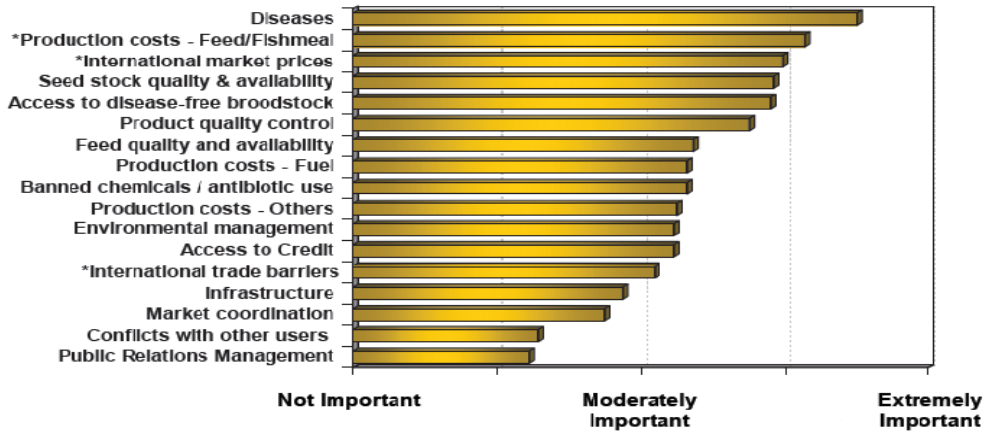


تصویر ۱-۲: میانگین تولید میگو درایران در سال ۱۳۹۱و پیش‌بینی در سال ۱۳۹۲

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 گونه‌های 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).



تصویر ۱- ۳: 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 همه‌گیری بیماری لکه سفید مبتلا شده و در برخی مناطق تا ۷۰٪ مزارع بـه حالـت رکـود و تعطیلی کشیده شده است (شریف روحانی، ۱۳۸۰).

- در تایلند سالهای ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳ میزان خسارت وارد شده بر اثر شیوع بیماری سرزرد بـه ۳۰ تـا ۴۰ میلیـون دلار رسیده و در همین کشور بین سالهای ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۷ بر اساس بیماری لکه سفید و سندرم تورا میـزان خسـارت بـه ۲۴۰ تا ۲۶۰ میلیون دلار افزایش یافته است (فائو، ۱۳۸۶).

- در هند در طی سالهای ۹۵-۱۹۹۴ بر اثر بیماریهای سرزرد و لکـه سـفید میـزان تولیـد ۱۰۰۰۰ تـا ۱۲۰۰۰ تـن از دست رفته و در سال ۱۹۹۴ تنها در اثر بیماری لکه سفید خسارت اقتصادی در حـدود ۱۷/۶ میلیـون دلار بـرآورد شده است (Bondad –Reantaso et al., 2005).

- در بنگلادش در سال ۱۹۹۶ در اثر بیماری لکه سفید علاوه بـر از بـین رفـتن صـادرات میگـو و از دسـت رفـتن 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 مونـودون در اثـر بیماریهای mid-crop mortality syndrome و ویـروس همـراه بـا آبشـش (Gill Association Virus) وارد آمـده اسـت (Bondad –Reantaso et al., 2005).

در سـال ۱۹۹۹، آمریکـای جنـوبی و مرکـزی نیـز بـا همـه گیریهـای شـدید بیماریهـای مختلفـی از قبیـل YHV,TSV,IHHNV و ویبریوزیس روبرو شدند که تا سال ۲۰۰۰ ادامه داشته است. در این سال شیوع بیماری لکـه سفید در کشور کلمبیا بعد از ورشکستگی پرورش دهندگان متعاقـب اپیـدمی سـندرم تـورا در سـال‌هـای ۱۹۹۴-۱۹۹۹۶ منجر به صرف هزینه‌های سنگین و اجرای برنامه‌های مقاوم سازی میگوهای پرورشی گردید. در اکوادور که تکثیر و پرورش میگو سومین صنعت کشور بعد از موز و نفت مـی‌باشـد در اواخـر سـال ۱۹۹۹ و اوایـل سـال ۲۰۰۰ با بزرگترین بحران سیاسی اقتصادی در تاریخ این کشور یعنی بیمـاری لکـه سـفید میگـو مواجـه شـد و ۵۰ درصد مراکز تکثیر میگوی این کشور تعطیل شده و مراکـز عمـل‌آوری تنهـا بـا ۵۰ در صـد ظرفیـت خـود فعـال بودند، در همین رابطه صادرات میگو از ۸۷۵ میلیـون دلار در سـال ۱۹۹۸ بـه کمتـر از ۳۶۰ میلیـون دلار در سـال ۲۰۰۰ رسید (شریف روحانی، ۱۳۸۰).

- در سال ۱۹۹۹ کشورهای مکزیک، نیکاراگوئه تحت تاثیر بیماری لکه سفید قرار گرفتنـد. در پانامـا ۲۵ درصـد پرورش دهندگان به دلیل بروز بیماری از تراکم ۳ تا ۵ قطعه پست لارو در مترمربع بـرای ذخیـره سـازی اسـتفاده کردند. در پرو پرورش دهندگان میگو به خاطرتلفـات سـنگین در نیمـه اول سـال ۲۰۰۰ بـه پـرورش تیلاپیـا روی آوردند. بطوریکه قبل از شروع بیماری لکه سفید سطح زیر کشت میگـو در ایـن کشـور ۳۰۰۰ هکتـار بـوده کـه اکنون به ۳۰۰ هکتار رسیده و کلیه هچری‌ها نیز تعطیل شده‌اند(شـریف روحـانی، ۱۳۸۰) و ۵۰۰۰ نفـر کـه بطـور مستقیم و غیر مستقیم درگیر بوده‌اند، شغلشان را از دست داده‌اند (Bondad –Reantaso et al., 2005).

تولید میگوی پرورشی در ایالات متحده آمریکا به دلیل شیوع سندرم تورا 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 هزینه‌های 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 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 (کاکولکی، ۱۳۹۱). با وقوع بیماری 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 موفقیت‌آمیزی 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 تاکنون نیز نتایج موفقیت‌آمیزی داشته و پیش‌بینی می‌شود تولید میگو در سال ۱۳۹۲ به رقم ۲۰ هزار تن افزایش یابد(تصویر۱- ۲).

بیماریهای ویروسی یکی از مهمترین مشکلات صنعت تکثیر و پرورش میگو می‌باشد. سالیانه بالغ بر هزاران تن میگو در اثر این بیماریها از بین میرود. برای تشخیص سریع و به موقع این بیماریها در مراکز تکثیر و پرورش کشور از کیتهای تشخیص سریع مولکولی (PCR)استفاده می‌شود. تا کنون از کیتهای وارداتی برای این منظور استفاده شده است ولی با توجه به تغییرات ناشی از سویه های ویروسی ممکن است کیتهای موجود از دقت و حساسیت لازم برخوردار نباشند. با توجه به اینکه سویه های مختلف این ویروسها در منناطق مختلف متفاوت میباشد، لذا ضرورت دارد که در هر منطقه با استفاده از مشخصات عامل ایجاد کننده بیماری نسبت به طراحی و تولید این کیتها اقدام شود.

از مهمترین راههای کنترل و پیشگیر ی از بیماریهای ویروسی شناخت آنها در طی چرخه تولید بالاخص در مراحل لاروی است (افشارنسب و همکاران ۱۳۸۴). از مهمترین روشهای تشخیص برای بیماریها در این مراحل روش Polymerase Chain Reactionمی‌باشد. نکته بسیار مهم در این خصوص شناخت عامل بیماری در مقدار و میزان بسیار کم می‌باشد تا قبل از اینکه شرایط برای تکثیر ویروس پیش آمده و موجب آسیب به مزارع تکثیر و پرورش شود نسبت به شناخت آنها اقدام گردد. اما ذکر این نکته حائز اهمیت است که کیتهای تولیدی در سایر کشورها با استفاده از سویه های ایجاد کننده بیماری طراحی و تولید شده است، لذا امکان اینکه نتواند موجب شناخت سویه های ایجاد کننده بیماری در سایر مناطق شود امکانپذیر بوده و به همین دلیل در هر کشور اقدام به

طراحی ساخت این دسته از کیتها می‌شود. در ایران نیز اهمیت تولید این کیتها با توجه به گسترده‌گی توسعه صنعت تکثیر و پرورش میگو اجتناب ناپذیر است. همچنین با توجه به برنامه شیلات ایران به منظور گسترش تکثیر و پرورش میگو در کشور که در افق ۱۴۰۰ با ۱۰۰هزار تن میگوی پرورشی و هزاران نفر شغل ایجاد شده، لذا ضروری است که در خصوص مسائل و مشکلات ناشی از بروز بیماریها که ممکن است این صنعت را با خطر مواجه نماید، راهکار های لازم اتخاذگردد. در بروز بیماری لکه سفید در سال ۱۳۸۱در استان خوزستان و همچنین بروز این بیماری در استان بوشهر در سال ۱۳۸۴ بالغ بر صدها تن میگو از بین رفت و خسارات فراوانی به پرورش دهندگان میگو در این استانها وارد گردید(افشار نسب و همکاران ، ۱۳۸۳. افشار نسب و همکاران ، ۱۳۸۵).

سالیانه برای خرید این دسته از کیتها در سطح کشور مبالغ زیادی هزینه پرداخت شده و پیش بینی می‌شود با توجه به اجرای طرحهای غربالگری و امنیت زیستی در مزارع تکثیر و پرورش استفاده از آنها بیشتر گردیده و از نظر اقتصادی تولید این کیتها در داخل مانع از خروج مبالغ هنگفتی ارز از کشور گردد. سازمان دامپزشکی و موسسات تحقیقاتی و بخشهای خصوصی از مهمترین مصرف کنندکان این کیتها بوده و دردسترس بودن این کیتها نیز با توجه به تاریخ مصرف محدود آنها ضرورت تولید داخلی آنها را اجتناب ناپذیر می‌کند.همچنین با طراحی پرایمرهای مورد استفاده در این کیتها امکان واگذاری تولید آن به شرکتهای تولید کننده داخلی و ایجاد شغل و درآمد برای متخصصین و تولید کنندگان داخلی نیز فراهم می‌شود.

از نظر اجتماعی نیز تولید این کیتها درداخل کشور موجب دلگرمی و اطمینان پرورش دهندگان شده و همچنین می‌تواند در زمینه اشتغالزائی شاغلین بخش که بالغ بر هزارن نفر می‌باشند موثر واقع شده و مارا در این زمینه بی نیاز نماید.

مهمترین اهداف این پروژه شامل:

۱- طراحی پرایمرهای اختصاتصی عوامل ایجاد بیماری ویروسی در آبزیان
۲- طراحی و تولید کیتهای تشخیص سریع بیماریهای ویروسی آبزیان
۳- تجاری کردن کیتهای تولیدی

و همچنین ا هداف فرعی شامل:

۱- جلوگیری از خروج ارز برای خرید کیتهای تشخیصی از خارج از کشور
۲- خودکفائی در تولید کیتهای تشخیصی در کشور
۳- شناخت سویه های ویروس ایجاد کننده بیماریهای ویروسی در کشور و مقایسه آن با سویه های خارج
۴- ارائه روشهای کنترل و پیشگیری بیماریهای ویروسی در کشور
۵- امکان صادرات کیتهای تولیدی

۱-۱-مروری بر منابع

بیماری ویروسی با کولوویروس مونودون یا MBV در همه جای دنیا وجود دارد و تمام سخت پوستان و میگو به این بیماری حساس می باشند این بیماری یکی از بیماری های خطرناک ویروسی در مراکز هچری و سالن های تکثیر میگو بوده که اپیدمی های وسیعی در بسیاری نقاط جهان گزارش شده است. مطالعاتی متعدد در موضوع بیماری MBV صورت گرفته است. *Penaeus monodon baculovirus* یا MBV ، برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ میلادی شناسایی شد (Lightner and Redman , 1981) و موجب آسیب رسانی شدید در بخش های هچری ، پست لاروی تا مراحل اولیه جوانی در میگوهای گونه ببری سیاه گردید (Lightner etal., 1983). براساس گزارش افشار نسب (1386 b) این بیماری توسط ویروس از خانواده با کولوویریده ایجاد می شود که آن را به نام های مختلف از جمله (*Penaeus monodon* یا PmSNPV (singly enveloped nuclear polyhedrosis virus from *Penaeus monodon* *NPV* یا Pemo NPV می نامند . بهترین نام برای این بیماری براساس گزارش کمیته تاکسونومی ویروس ها (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 شناسند . ویروس ایجاد کننده بیماری به صورت گرد ، دارای کپسول (capsid) بوده و در اطراف آن پوشش (envelope) قرار گرفته است . قطر آن nm ۴± ۷۵ و طول آن nm ۳۳ ±۳۲۴ می باشد . این ویروس از گروه ویروس های DNA بوده و در زیر گروه A جنس Baculovirus قرار می گیرد (افشار نسب ، b ۱۳۸۶ ؛ Lightner etal , 1983) . میگوهای آلوده به این بیماری بی حال و بی اشتها بوده و تمایلی به حرکت ندارند. همچنین از نظر اندازه از میگوهای سالم کوچکتر می باشند. به ندرت تمیز بوده و اغلب در سطح بدن و آبشش ها دارای لکه های فولینگ (Fouling) بوده که توسط ارگانیسم هایی نظیر *zoothamnium* و *oseilliatoria* و همچنین مواد آلی پوشیده اند. همچنین با این بیماری اغلب عفونت ثانویه توسط باکتریها نیز مشاهده می شود. از علائم مشخص این بیماری سفید شدن قسمت روده میانی می باشد که اغلب در مراحل زوا، مایسس و ابتدای دوره پست لاروی اتفاق می افتد (افشار نسب ، b ۱۳۸۶ ؛ Lightner and Redman , 1981). طبق گزارشات (Pynter etal , 1992) ، ویروس MBV می تواند از طریق انتقال عمودی (از والدین به فرزندان) نیز صورت بگیرد.

این بیماری در میگوهای وحشی و مولدین صید شده از گونه های پنئوس آزتکوس (*P.aztecus*)پنئوس دوراروم (*P.dourarum*) و احتمالاً گونه پنئوس ستی فروس(*P.setiferus*) در فلوریدا و می سی سی پی و همچنین در مولدین صید شده از دریا در گونه پنئوس مارجیناتوس (*P.marginatus*) در ایالت های اوهایو و هاوایی و در هچریهای منطقه فلوریدا و تگزاس در گونه های پا سفید غربی و پنئوس آزتکوس گزارش شده است . در کشور برزیل این بیماری در میگوهای وارداتی پا سفید غربی *L.vannamei* و پنئوس پنیسیلاتوس *P. penicillatus* و میگوهای بومی پنئوس سابتیلیس *(P.subtilis)* وپنئوس اشمیتی (*P.schimitti*) و پنئوس پائولنیس(P.paulensis) گزارش شده است . در اکوادور در خرچنگ گونه*Protrachypene precipua* وحشی صید شده از دریا نیز گزارش گردیده است (افشار نسب ، b ۱۳۸۶) .

استفاده از روش های سنتی نظیر کاربرد میکروسکوپ های نور بالا یا استاندارد جهت شناسایی و بررسی بیماری MBV مناسب نبوده لذا روش های توسعه یافته‌تر و با حساسیت بیشتری را می طلبد (Poulos etal ., 1994). مشاهده علائم بالینی (افشار نسب ، ۱۳۸۶ b ؛ Lightner etal ., 1981) .روشهای هیستو پاتولوژی (افشار نسب ، ۱۳۸۶ a ؛ Lightner , etal , 1981) ، لام مرطوب تهیه شده از بافت هپاتوپانکراس و مدفوع میگوهای آلوده (افشار نسب ، ۱۳۸۶ a,b ، Lightner etal 1983) روشهای مولکولی از قبیل Insitu hybridization , Dot blot hybridization , PCR و DNA probesto MBV (افشار نسب ۱۳۸۶ a,b) از جمله روش های تشخیص بیماری می باشد .

اولین گزارش شناسایی MBV به روش مولکولی مربوط به آقای (Vickers etal., 1992) می باشد. سپس در تایوان در سال ۲۰۰۵ پرایمر اختصاصی برای این ویروس طراحی گردید (Satid kanikul, 2005) . با توجه به اینکه ویروس در کشورهای مختلف دارای سویه های متفاوت می باشد لذا محققین در کشورهای خود پرایمرهای خاص برای این ویروس طراحی نموده‌اند (Boonsanong chkying, 2005) .

مطالعه ای که توسط Afsharnasab و همکاران (۲۰۰۶) در مورد تاثیر غلظت های مختلف شوری و pH بر بقاء ویروس(MBV) baculovirus *P.monodon*در میگوهای ببری سبز (*P. semisulcatus*) صورت گرفته نشان می دهد که ویروس MBV در شوری با غلظت هایppt ۵ تاppt ۴۰ و در pH با غلظت های ۵ ، ۷ ،۸ و ۹ خاصیت عفونت زایی خود را حفظ می نماید . در حالیکه این ویروس در pH با غلظت های ۳ و ۱۲ کاملاً غیر فعال شده و اثرات عفونی خود را از دست می دهد .

رسبتورهای ویژه‌ای برای ویروس MBV روی سطح سلول های میگو وجود دارد که در اثر شرایط مختلف این رسپتورها می توانند دچار تغییر شوند و ورود ویروس به داخل سلول های میگو دچار اختلال شود و در نتیجه عفونتی رخ ندهد (Afsharnasab etal , 2006). بنابراین رسپتورهای اختصاصی سطح سلول یک شرط لازم و ضروری برای ویروس در سلول های میزبان می باشد (Voyles , 1993) .

علائم بالینی ناشی از بیماری MBV شامل بی حالی، بی اشتهایی و توقف فعالیت های نمایشی می باشد میگوهای مبتلا کندی رشد ، تغییر رنگ خاکستری – آبی تا سیاه متمایل به آبی ، بیماری پوسته و فولینگ اپی بیوتیک میکروبی دارند (Brock etal , 1983) .

باکولوویروس ها (*Baculoviruses*) در خانواده *Baculoviridae* طبقه بندی می شوند و دارای سه زیر گروه ۱. Nuclear polyhedrosis viruses (NPVs) ۲. Granular virus (GV) ۳. Nonoccluded *baculoviruses* هستند . از زیر گروه NPVs دو باکولو ویروس در میگو گزارش شده است که شامل : *Baculovirus penaei (BP)* و *(MBV) penaeus monodon baculovirus* می باشند (couch , 1991) .

علائم عمده آسیب شناسی بیماری MBV، حضور گنجیدگی های سلولی گرد به صورت انفرادی یا چند گانه در هپاتوپانکراس و سلول های پوششی(اپی تلیال) روده میانی می باشد. MBV می تواند عفونت متوسط

تا شدیدی را در هپاتوبانکراس و روده قدامی همه مراحل میگوی خانواده پنائیده حساس (به استثناء مراحل تخم ، ناپلی ، زوآ ۱و۲) ایجاد کند . (Tokhmafshan et al , 2004 ; Lightner , 1996) .

از زمان شروع آلودگی میگوها با بیماری MBV ، تغییراتی در هسته سلول های برخی اندامها از جمله هپاتوپانکراس و روده میانی مشاهده شده که سبب تغییراتی در این بافت ها می گردد . این تغییرات را می توان با تهیه لام مرطوب از هپاپانکراس ، روده و مدفوع مشاهده نمود. در رنگ آمیزی لام مرطوب با سبزه مالا شیت ۰/۰۵ درصد گنجیدگی های درون سلولی Occlusion Body (OB) را می توان مشاهده نموده و آنها را از سلول های چربی ، سلول های ترشحی ، هستک و غیره تشخیص داد (افشار نسب ، b ۱۳۸۶) .

در مقاطع میکروسکوپی تهیه شده از بافت های پارافینه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین و فلوکسین (H&E/phloxine) ، آسیب های ناشی از بیماری MBV را نیز می توان در سلول های هپاتوپانکراس و اپیتلیوم سلول های روده میانی مشاهده نمود که در اولین مرحله تغییرات سلولی ، هسته های هیپرتروفی شده همراه با تغییرات و مهاجرت کروماتین ها ، جا به جایی هستک از مرکز و رقیق شدن مرکز سلول ها را می توان مشاهده نمود. تغییرات و مهاجرت کروماتینها در نتیجه متراکم شدن مواد بازوفیلی در اطراف هسته ایجاد می گردد. مواد بازوفیلی معمولاً دارای یک یا دو انتهای نازک بوده و ممکن است یکی از زوائد چسبیده به آن با هستک باقی بماند. در این حالت شکل ایجاد شده شبیه انگشتر نگین دار (Signet Ring) می باشد. در مرحله میانی (*Inter mediate*) ، در تغییرات سلولی هستک ها به طور کامل تجزیه شده و هسته بزرگ و به صورت هیپر تروفی مشاهده می شود . در این مرحله هسته دارای یک یا تعدادی گنجیدگی قرمز رنگ (Eosino Philic) بوده و به نظر می رسد که مرحله اولیه توسعه و ایجاد گنجیدگی های سلولی باشد . در مرحله پیشرفته (Advanced) ،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 های هیپرتروفی شده مشاهده می گردد (افشار نسب ، b ۱۳۸۶).

مطالعه کامل MBV با میکروسکوپ الکترونی سه مرحله را در بیماریزایی این ویروس نشان می دهد که در مرحله اول : سلول ها هیپرتروفی خفیف از خود نشان می دهند. هستک ها تغییر شکل داده و به طرف غشاء هسته مهاجرت می کنند. تعدادی از کروماتین ها تجزیه شده و به صورت نقاط روشن در مرکز سلول دیده می شود . در این حالت شکل سلول به صورت انگشتر نگین دار دیده می شود. در مرحله دوم بیماری سلول های دارای هسته هیپرتروفی و یک یا چند گنجیدگی کوچک می باشد . در مرحله سوم هسته سلول ها کاملاً هیپرتروفی شده به طوریکه فضای سلول را کاملاً پر کرده و فقط لایه نازکی از سیتوپلاسم باقی مانده است . در این حالت تعداد زیادی گنجیدگی درون هسته مشاهده می شود که ظاهری بیضی داشته و بعضی مواقع حالت سه بعدی می یابند . ویروس کامل نیز به تعداد زیاد در این حالت قابل مشاهده است . ویروس ها به صورت آزاد می باشند و ممکن است به صورت محصور در گنجیدگی ها قرار گیرند. در این مرحله بیماری احتمالاً سلول ها حالت نکروز یافته و غشاء آنها پاره شده و کلیه محتویات آنها به مجاری هپاتوپانکراس ریخته

می شود . همچنین ممکن است سلول ها پاره شده و کلیه محتویات از طریق مجاری هپاتوپانکراس به روده رفته و سپس از طریق مدفوع دفع شود (افشار نسب ، b ۱۳۸۶) .

نشانه های عمده آلودگی MBV کاهش تغذیه و کاهش سرعت رشد می باشد . لاروها و پست لاروهای با آلودگی شدید ممکن است یک خط سفید در ناحیه پشت داشته باشند (Lightner , 1996). تشخیص بیماری به وجود گنجیدگی های ویروس MBV در مقاطع میکروسکوپی اندامها و بافتهای هدف (هپاتوپانکراس و روده میانی) بستگی دارد . گنجیدگی های یاد شده به صورت اجسام کروی منفرد یا متعدد و ائوزینوفیلیک (رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین) داخل هسته سلول های هپاتوپانکراس و سلول های پوششی روده میانی وجود دارند . در مراحل اولیه آلودگی و یا در آلودگی های خفیف ممکن است گنجیدگی ها به آسانی مشاهده نشوند (Lightner , 1996) .

در مطالعه Dela pena و همکاران (2008) وجود MBV در جمعیت وحشی مولدین در فیلیپین تائید گردیده است و همچنین ذکر شده که این مولدین می توانند به عنوان حامل (ناقل) انتقال افقی و عمودی ویروس را در هچریها انجام دهند . در این مطالعه به طور نسبی متوسط شیوع MBV۲۰ درصد و ۹ درصد در فصل خشک و مرطوب مشاهده گردیده است .MBV یک عامل عفونی رایج در میگوهای وحشی است و به عنوان یک بیماری همه گیر بومی(اندمیک) در میگوهای گونه ببری پروشی در فیلیپین مورد توجه می باشد (Baticados etal , 1991). Ramasamy و همکاران ازهند (۲۰۰۰) با استفاده از لام مرطوب و رنگ آمیزی با مالاشیت گرین ۰/۰۵ درصد شیوع MBV را در مولدین ۲۱ درصد گزارش نموده اند . در تایلند نیز ۲۵ درصد از مولدین صید شده حامل(ناقل) MBV می باشند (Fegan etal ., 1991).

MBV همچنین در جمعیت های وحشی متاپنئوس مونوسروس *Metapenaeus monoceros* و متاپنئوس الگانس *M.* elegans در هند به طور نسبی با شیوع ۲۴ و ۱۴ درصد مشاهده گردیده است (Manivannan et al , 2004). از طرف دیگر Natividad و Lightner در سال ۱۹۹۲ مشاهده نمودند که MBV شایع ترین بیماری در هچریها و استخرهای پرورش میگوی ببری سیاه در فیلیپین می باشد و شیوع بیماری در هچریها و استخرهای پرورشی مشابه و برابر ۶۶/۹ درصد بوده است و این شیوع بالای بیماری می تواند به علت افزایش استرس ناشی از شرایط پرورش مثل تراکم و کانی بالیسم باشد . در ویتنام میزان شیوع MBV در هچریها و نوزاد گاه ها ۴۶/۴ درصد گزارش گردیده است (Oanh et al., 2005) .

در مطالعه vikers و همکاران (۲۰۰۰) مشاهدات میکروسکوپ الکترونی MBV در پنئوس مونودون تشریح شده است در این مطالعه ذکر شده که نوکلئوکپسید های محتوی ژنوم ویروس که به طور آزاد در سیتوپلاسم سلول دیده می شوند به غشاء هسته می چسبند و به نظر می رسد نوکلئوکسپیدها ابزاری (وسیله ای) برای انتقال ژن های ویروس از غشاء پلاسمایی سلول های هپاتوپانکراس به هسته های آنها می باشد .

مطالعات مورفولوژیک MBV اثبات می کند که ذرات پوشش دار دارای رنگ آمیزی منفی محتوی یک کپسید در هر پوشش می باشد. به علاوه مشخص گردیده که ذرات پوشش دار MBV دارای ضمایم ویژه در هر انتها می باشد که مشابه آنهایی است که برای بعضی از باکولوویروس های non-occluded شرح داده شده است (Pappalardo et al , 1986 ; Huger and krieg ,1991 ; Mari et al ., 1993).

در بررسی و مطالعه vijayan و همکاران (۱۹۹۵) در مورد شیوع و هیستو پاتولوژی عفونت MBV در پنئوس مونودون و پنئوس ایندیکوس در مزارع میگوی سواحل جنوب شرقی هند شیوع بالای عفونت MBV در هر دو میگوی پنئوس مونودون و پنئوس ایندیکوس بدست آمده که میزان آن ۳۷/۲۵ درصد می باشد . از لحاظ علائم کلینیکی اکثر میگوها ظاهراً سالم و تعداد کمی دارای ضعف ، بی اشتهایی و لکه های فولینگ و نقاط سفید رنگ (لکه های سفید) روی پوسته نشان می دادند. در هیستوپاتولوژی تعداد کمی از سلول ها هسته هیپرتروفی شده به صورت انگشتر نگین دار با جا به جایی به اطراف و هستک های متراکم دیده می شود بنابراین هیپرتروفی هسته و به دنبال آن تخریب سلولی و پوسته پوسته شدن سلول های اپی تلیال از تغییرات بافت شناسی روشن بودند . واکنش های التهابی نظیر نفوذ هموسیتو تشکیل نودول (Nodule) در نمونه های مورد بررسی وجود نداشت . بافت های داخل توبولی (Inter tubular) سالم و بدون تغییرات نکروتیک و التهابی بودند .

گاهی اوقات میگوهای آلوده به MBV از لحاظ علائم کلینیکی نرمال به نظر می رسند اما تغییرات هیستوپاتولوژیک و وجود گنجیدگی های داخل هسته ای (Interanuclear Occlusion Bodies) در هپاتوپانکراس عفونت به MBV را تائید می کند . ; Lightner and Rredman 1981 ; Lightner et al , 1983 ; Nash et al , 1988 . (Turnbull et al 1994) .

اکثر عفونت ها در میگوهای مایسس ۳ تا پست لارو ۲۰ ایجاد می شود و نشانه های بیماری در میگوهای با عفونت شدید شامل ظاهر شیری رنگ یا سفید غده گوارشی ، رفتارهای شناگری غیر عادی ، حرکت مارپیچی در ستون آب و شنای از پهلو (یکطرفه) در سطح می باشد (Paynter et al , 1992) .

Paynter و همکاران (۱۹۹۲) در مطالعه ای تحت عنوان انتقال تجربی MBV توانستند با مواجهه سازی ویروس از طریق آب به مدت ۲ ساعت بیماری را در PL ۶-۵ میگوی پنئوس مونودون ایجاد کرده که گنجیدگی ها (OB) بعد از دو روز قابل تشخیص بودند . در این مطالعه یک افزایش اولیه در میزان گنجیدگی ها در هفته اول به وجود آمده و سپس در هفته دوم این میزان کاهش یافته و در هفته سوم (روز ۱۶) دوباره افزایش میزان گنجیدگی ها را داریم و از هفته چهارم به بعد (روز ۲۲ به بعد) میزان گنجیدگی ها کاهش و غیر قابل تشخیص می باشد . افزایش میزان گنجیدگی ها در هفته اول نه تنها به دلیل عفونت اولیه بلکه به دلیل عفونت خود به خودی و عفونت مجدد ناشی از مصرف میگوهای آلوده و یا خوردن گنجیدگی های (OB) آزاد شده به داخل آب از طریق لوله گوارش می باشد و کاهش میزان گنجیدگی ها در هفته دوم می تواند با تغییر قابلیت دسترسی سلول های حساس مرتبط باشد .

Afsharnasab و همکاران (۲۰۰۶) نیز در یک مطالعه تحت عنوان تاثیر غلظت های مختلف شوری و pH بر بقاء ویروس MBVدر میگوی ببری سبز کارمواجهه سازی ویروس از طریق آب را در PL12 به مدت ۱۰ ساعت را انجام داده و بیماری را در پست لاروهای میگوی ببری سبز ایجاد نموده اند . از طرفی Chen و همکاران (۱۹۸۸) نیز یک یک انتقال خوراکی موفق از بیماری MBV را گزارش نموده اند .

در سال ۱۳۸۲ قراردادی مابین موسسه تحقیقات شیلات ایران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری تنظیم و مقرر گردید در ابتدا نسبت به بهینه نمودن کیت بیمار ی ویروسی لکه سفید اقدام و سپس نسبت به تولید آن اقدام گردید. این کار از روی اطلاعات بانک ژن انجام و در خصوص شناخت سویه ویروس عامل بیماری در ایران اقدام نشد. در سال ۱۳۸۳نیز در قالب همکاری با مرکز تحقیقات مولکولی دانشکده پزشکی داشگاه شهید بهشتی اقدام به طراحی پرایمری برای ویروس لکه سفید گردید که با استفاده از اطلاعات بانک ژن این کار انجام شد. هیچکدام از این دو پرایمر تولیدی امکان جایگزینی با کیتهای خارجی را پیدا نکرد و مشکلات عدیده ائی در حین آزمایش نشان دادند (قریشی و همکاران، ۱۳۸۳. صابری و همکاران، ۱۳۸۶) ولی با تعییراتی که بعدا در پرایمرها توسط افشارنسب و همکاران صورت گرفت کیت لکه سفید توانست با نمونه خارچی رقابت کند. البته در داخل کشور در زمینه تولید کیت برای سایر بیماریها از جمله بیماریهای دامی و انسانی اقدامات وسیعی صورت گرفته است و هم اکنون این کیتها از داخل کشور تهیه و در پاره ائی موارد کشور را دراین زمینه بی نیاز نموده است(صنعتی و همکاران، ۱۳۸۰).

در خارج از کشور اولین بار در تایوان نسبت به طراحی این کیتها اقدام گردید که امروز نیز مورد استفاده بسیار وسیعی از این کیتها می‌شود . تولید این کیتها گسترش یافته و سپس Kimuralو همکاران در سال ۱۹۹۶در چین نسبت به تولید کیت بیماری لکه سفید اقدام نمودند که امروزه این روش مورد تایید OIEنیز می‌باشد. در همین سال (۱۹۹۶) دکتر Lightnerموفق به تولید کیتهای تشخیص بیماریهای ویروسی در دانشگاه آریزونا شده و امروزه شرکت Diagxotic با استفاده از مشاوره ایشان اغلب کیتهای تشخیص سریع ویروسی را تولید می نماید. در سال ۲۰۰۰ در کشور مالزی دکتر Shariff و همکاران ایشان موفق به تولید کیت بیماری لکه سفید در مالزی شده و موفق به دریافت جایره ملی کشور مالزی گردیدند. در هند در سال ۲۰۰۳ آقای .Otta , S.Kو همکاران توانستند کیت تشخیصی PCRرا برای جداسازی بیماری MBVو WSSVطراحی نمایند و در سال ۲۰۰۵ در همان کشور Manjaniaik, Bو همکاران کیت بیماری HPVرا به صورت Nested –PCRطراحی و در شناسائی ویروسها مورد استفاده قرار دادند که امروزه در آزمایشگاهها و مزارع و سالنهای هچری در کشور هند استفاده می‌شود. امروزه استفاده از روشهای مولکولی در تشخیص سریع بیماریهای میگو منتج به نتایج بسیار ارزشمندی در تشخیص بیماریها شده است و برای هر بیماری از پرایمر اختصاصی و روش خاصی استفاده می‌شود تعداد زیادی از کیت‌ها بصورت تجارتی برای برخی از بیماریهای میگو قابل دسترس بوده و تعداد دیگری نیز طی سالهای آتی تولید می‌شود. این کیتها استاندارد بوده و به آسانی قابل استفاده می‌باشند. که تعدادی از آنها عبارتند از:

کیتهای ویروسی:

-کیت ویروس سندرم لکه سفید White spot syndrome virus(WSSV)

- کیت ویروسی عامل نکروز عفونی هیپودرم و بافت خونساز Infection hypodermal and haematopoictic necrosis virus (IHHNV)

- کیت مونودن باکولوویروس *Penaeus monodon* baculovirus (MBV)

- کیت پارو ویروس عامل عفونت هپاتوپانکراس Hepato pancreatic parvolike virus (HPV)

- کیت ویروس سندرم تورا Taura syndrome virus (TSV)

- کیت ویروس بیماری کله زرد Yellow head virus (YHV)

- کیت باکولویروس پنائی *Baculovirus penaei* (BP)

- کیت بیماری نکروز عفونی عضلات Infection myonecrosis

کیتهای باکتریائی:

- کیت عامل نکروز هپاتوپانکراس Necrotizing hepatopancreatitis (NHP)

کیتهای انگلی:

- کیت آگماسوما پنائی *Agmasoma penaei*

این کیتها در کشورهای مختلف بر اساس سویه های ویروسی آن کشورها طراحی و ساخته شده اند و در همه آنها از روش PCRاستفاده میگردد.

روش Polymerase Chain Reaction (PCR)

این روش یک روش آزمایشگاهی است که در آن با ساختن و تکثیر مصنوعی بخشی از DNA بوسیله دستگاه ترموسایکلر انجام می گیرد. روش PCR استاندارد شامل دو پرایمر مناسب و اختصاصی می‌باشد. پرایمر بخش کوچکی از DNA سنتز شده است که برای ساختن سری DNA بصورت کد و رمز عمل می کند. هر پرایمر طراحی شده از یک Probe (ردیاب) اختصاصی و حساس بوده که مانند یک کامپیوتر کوچک عمل می‌نماید. هر وقت ردیف بازهای آن شناخته شوند می‌توان براحتی برای ساخت آن درخواست نمود. غلظت متعادلی از اجزاء اصلی و پرایمر باید مخلوط شده و شرایط انجام PCR بهینه شده و سپس هر آزمایش را می‌توان انجام داد. نوع و میزان Template (بخشی از DNA پاتوژن که به عنوان الگو باید تکثیر شود) باید در روش PCR ساخته و تکثیر شود. الگو یا Template آماده شده باید عاری از آنزیمهای مهارکننده همچون حلالهای ارگانیک یا EDTA باشد. اکثر نمونه‌ها نیر باید رقیق شده تا از غلظت سایر مهارکننده‌ها کاسته شود. سایر مواد PCR شامل DNA Polymerase که باعث تسریع در ساختن رشته پرایمر می‌شود، نوکلئونید dNTPS که حاوی نوکلئوتیدهای اصلی و بافراصلی می باشد. پلی‌مراز DNA (DNA Polymerase) شامل تعداد زیادی زنجیر DNA است که در مقابل حرارت مقاوم می‌باشند و Taq polymerase اولین آنها است که به صورت تجاری ساخته و بیشترین استفاده را دارد.

Vent™, Pfu polymerase و Tth polymerase هم موادی هستند که توانائی استفاده از آنها در مقایسه با Taq بالاتر و نتایج گرفته شده ازآنها مطمئن تر می‌باشد. ماده Tth بطور مشخص در مورد استفاده از RT-PCR معرفی شده و در درجه حرارت ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد و با حضور منگنز قابل استفاده است.

برنامه PCR برای تعداد زیادی از سیکل‌ها در سه مرحله انجام می‌گیرد. نمونه‌ها را باید در دستگاه ترموسیکلر در سه مرحله شامل سه درجه حرارت مختلف قرار داد. این سه مرحله شامل واسرشتگی (Denaturation)، هم سرشتگی (Annealing) و مرحله گسترش (Extension) می‌باشد.

۱- در مرحله اول هر سیکل template را به حالت واسرشتگی تغییر یافته، در این مرحله درجه حرارت به حدود ۹۵-۹۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه افزایش و دو رشته DNA از هم باز شده و یک رشته می‌شوند.

۲- در مرحله دوم حالت هم سرشتگی (پختن یا گرم شدن) می‌باشد که در این مرحله پرایمر شروع به تکمیل رشته‌های DNAنموده و این دستور را از templaet می‌گیرد. در این مرحله درجه حرارت به ۶۰-۴۰ درجه‌سانتی‌گراد رسیده و به مدت ۱۲۰-۶۰ ثانیه ادامه می‌یابد.

۳- در مرحله سوم یا بسط که مرحله نهائی است، هر سیکلی از DNA توسعه یافته (extension) و کپی‌برداری از نسخه اصلی کامل شده و پرایمر نهائی را با مشخصاتی می‌سازدکه در هر انتهای templaet اولیه بوده است و این مرحله در درجه حرارت ۷۵-۷۰ درجه‌سانتی‌گراد انجام می‌گیرد.

مدت نگهداری در گرمخانه دستگاه ترموسیکلر بستگی به دستگاه و قطر تیوبهای مورد استفاده شده دارد. این مراحل ۴۰- ۲۵ بار تکرار شده تا DNA دو رشته‌ای قبلی به عنوان template جدید شکل‌گیرد. همچنین میزان DNA اختصاصی در هر مرحله تکیه‌گاه اصلی جهت ساخت پرایمر دو رشته‌ای قرار گرفته و در نتیجه DNA اصلی که پرایمر است، در این مرحله شکل می‌گیرد. محصول PCR در ژل آگاروز، الکتروفورز گردیده و بوسیله اتیدیوم بروماید، DNA تولید شده در زیر نور UV قابل دیدن می‌باشد. آنالیز اندازه ردیف‌بازهای تولیدی تکثیر شده ممکن است نیازمند تأئیدیه از سوی فردی آشنا و مسلط به این تکنیک باشد. در آزمایش PCR مهمترین مشکل ناشی از آلودگیهای حین آزمایش می‌باشد.

۲-مواد و روش کار

۲-۱- جمع‌کردن نمونه‌ها و نگهداری آنها برای استفاده در روش PCR

بهترین روش جمع کردن نمونه‌ها برای استفاده در این روش و استخراج DNA یا RNA، روش جمع‌کردن آنها و گذاشتن در یخ خشک یا نیتروژن مایع و نگهداری در درجه حرارت ۸۰ - درجه‌سانتی‌گراد می‌باشد. بهر حال این روش در محیط ممکن است قابل استفاده نباشد. گاهی اوقات که نیازمند اجرای سریع کارها هستیم، روشی سریع و ساده مورد نیاز است که بهترین روش نگهداری بافتهای میگو، همولنف یا لاروها در الکل ۹۵-۷۰درصد برای مدت معین می‌باشد. نمونه‌های همولنف را باید با مقدار کمی سدیم سیترات ۱درصد جمع‌آوری نموده تا از انعقاد آنها جلوگیری شود. نگهداری بافتها برای مدت زمان طولانی با این روش توصیه نمی‌شود. همچنین بافتهای نگهداری شده در ماده دیویدسون نیز جهت استخراج DNA توصیه نمی‌شود، مگر بعد از اینکه بافتهای قالب‌گیری شده در پارافین، DNA آنها استخراج شده و مورد استفاده قرار گیرند. همچنین پیشنهاد می‌شود که بافتها، همولنف و لاروها را بسرعت هموژنیز نموده و در یک بافر لیزکننده (Lysis buffer) نگهداری نمائیم. تعداد زیادی از این دسته بافرها وجود دارند و همه آنها دارای عوامل دناتوره (denature) شبیه Sodium dodecyl sulfat (SDS) یا cetyl-trimethylamonium bromide(CTAB) می‌باشند. معمولاً نمونه‌ها را با بافر SDS-Lysis تا بیش از ۶ هفته بدون هر گونه مشکلی نگهداری نموده یا می‌توان با افزودن مواد ضدقارچی در CTAB Lysis buffer، برای مدت بیش از یکسال نگهداری نمود. این روش جهت استفاده از نمونه‌های میگو بسیار حائز اهمیت است. ویروس مونودون با کولوویروس مورد استفاده در آزمایش از میگوهای ببری سبز آلوده به بیماری MBV که در هچریهای استان بوشهر بروز نموده و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری و در آزمایش مورد استفاده قرار گرفت . این نمونه ها را به چهار گروه تقسیم و در آزمایشهای آسیب شناسی، میکروسکوپ الکترونی، آزمایشات مولکولی و روش زیست سنجی مورد استفاده قرار دادیم.

۲-۲- مطالعات آسیب شناسی

همانطور که قبلاً ذکر گردید نمونه برداری جهت انجام کارهای آسیب شناسی از گروه هایی مختلف میگوهای بالغ و پست لارو صورت گرفت و لازم به ذکر است که تمامی مراحل فیکس کردن و آماده سازی نمونه های آسیب شناسی براساس روش Rama samy و همکاران (۱۹۹۹) اصلاح شده توسط افشار نسب (a ۱۳۸۶) انجام شد برای انجام مطالعه ، بافت های انتخاب شده برای بررسی آسیب شناسی هپاتوپانکراس و روده میانی از میگوهای آلوده و غیر آلوده می باشند .

۱-۲-۲- فیکس کردن نمونه ها

به منظور جلوگیری از تغییرات بعد از مرگ لازم است که میگوها به صورت زنده بلافاصله بعد از خارج شدن از آب فیکس شوند . چنانچه نمونه ها به موقع فیکس نگردند ، تغییرات بعد از مرگ اتفاق می افتد که شامل گرد و لایه لایه شدن سلول ها به خصوص سلول های هپاتوپانکراس می باشد . هر چه زمان فیکس شدن نمونه ها بعد از مرگ طولانی باشد تغییرات سلول ها بیشتر است . از بهترین فیکس کننده ها برای میگو محلول دیوید سون فیکساتور می باشد . زیرا این فیکساتور دارای اسید استیک بوده و می تواند کلسیم را از پوسته خارجی میگو جدا نموده و به عمل برش دادن بافت ها کمک کند . فیکس کننده های دیگر نیز مانند بافر فرمالین ۱۰ درصد را می توان برای فیکس کردن میگو استفاده نمود . در این مطالعه از فیکساتور دیوید سون برای فیکس کردن نمونه ها استفاده گردید . مواد تشکیل دهنده برای تهیه یک لیتر از محلول دیوید سون شامل :

- ۳۳۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد
- ۲۲۰ میلی لیتر فرمالین ۱۰۰ درصد (فرمالدهید ۳۷ درصد)
- ۱۱۵ میلی لیتر گلاسیال استیک اسید
- ۳۳۵ میلی لیتر آب مقطر یا آب معمولی

این فیکساتور را می توان در دمای آزمایشگاه به مدت طولانی نگهداری نموده و باید دقت نمود که بدلیل سمی بودن ، هنگام کار با آن حتماً از دستکش استفاده شده و از عمل استنشاق مستقیم آن جلوگیری شود .

لاروها و پست لاروها را می توان مستقیماً در محلول فیکس کننده به مدت ۲۴-۱۲ ساعت نگهداری نمود . سپس باید آنها را به الکل اتانول ۷۰-۵۰ درصد منتقل و در محیط آزمایشگاه نگهداری کرد .

در نمونه های بزرگتر (بزرگتر از ۲ سانتی متر) ، باید ابتدا فیکساتور را در هپاتوپانکراس و سپس در قسمت های واقع در دو طرف بند سوم و بند ششم بدن تزریق نمود و بعد به وسیله یک قیچی از عرض بند ششم بدن تا وسط قسمت سر سینه و در نهایت تا انتهای سر و نزدیک روستروم و پشت پا یک چشمی برش داد.

در برش عرضی میگو باید دقت نمود که فقط قسمت کوتیکول میگو را برش داده و از بریدن بافت های زیر کوتیکول خود داری کرد. برای نمونه های خیلی بزرگ یک شکاف عمیق نیز در حد فاصل بدن و سر، در محل اتصال آنها و به صورت عرضی ایجاد می گردد. این برش ها، سبب می شود که ماده فیکساتور به خوبی در سلول ها نفوذ کرده و بعد از ایجاد این برش ها میگو را در ماده فیکساتور قرار می دهیم . حجم فیکساتوری که نمونه ها را در آن قرار می دهیم به نسبت ۱۰ برابر حجم میگوها یا بافتی از میگو می باشد که باید فیکس نموده و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت براساس اندازه میگوها (میگوهایی بزرگتر زمان بیشتری نیاز دارند) در محلول فیکساتور قرار می دهیم . نمونه ها را سپس به الکل اتانول ۷۰-۵۰ درصد منتقل نموده و در درجه حرارت آزمایشگاه نگهداری می کنیم .

۲-۲-۲-آماده سازی و برش بافت ها

بعد از فیکس کردن، بافت ها را قبل از اینکه برای قالب گیری آماده کنیم برش می دهیم . برای اینکه بافت ها دچار صدمه یا خراشی نشوند، از قیچی یا تیغی تیز استفاده می کنیم. اگر اندازه میگوها کمتر از cm ۳ باشد ، می توان آنها را به صورت طولی برش داد و اگر میگوها بزرگتر از cm ۳ باشند ، برشها را باید در جاهای مختلف انجام داد .

۳-۲-۲-آماده کردن و آبگیری بافت ها

قبل از اینکه بافت ها در پارافین قرار بگیرند عمل آبگیری از بافت ها به آرامی و با گذاشتن آنها در الکل با غلظت های پائین و سپس رسیدن به غلظت ۱۰۰ درصد انجام می شود . اگر یکباره بافت را در الکل ۱۰۰ درصد قرار دهیم ، موجب تخریب بافت ها می شود الکل به طور مشخص با پارافین مخلوط شده ، بنابراین بعد از آبگیری بافت را با یک ماده حل کننده الکل مثل زایلین (xylene) شستشو داده تا الکل از بافتها خارج شده و عمل نفوذ پارافین در بافت به طور کامل انجام شود . استفاده از دستگاه پردازشگر بافت Tissue processor مناسبترین روش عمل آوری بافت ها می باشد (تصویر ۳-۱) . عملیات آماده کردن بافت ها و آبگیری به شرح ذیل می باشد :

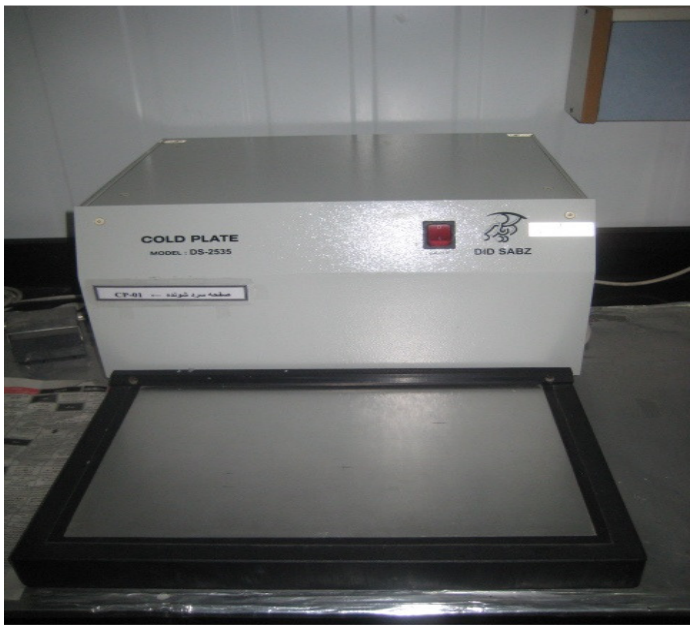
- الکل ۷۰ درصد به مدت یک ساعت (دو بار)
- الکل ۸۰ درصد به مدت یک ساعت (دو بار)
- الکل ۹۵ درصد به مدت یک ساعت (دو بار)
- الکل ۱۰۰ درصد به مدت یک ساعت (دو بار)
- زایلین یا سایر مواد پاک کننده به مدت یک ساعت (دو بار)
- پارافین به مدت یک ساعت (دو بار)

تصویر ۳-۱- دستگاه پردازشگر بافت

٤-۲-۲- قالب گیری بافت ها با پارافین مذاب

در این مرحله بافت های پردازش شده را در قالب های پلاستیکی مشبک قرار داده و پارافین مذاب موجود در دستگاه ذوب پارافین paraffin dispenser (تصویر ۳-۲) را بر روی بافت می ریزیم و پس از سرد شدن قالب توسط صفحه سرد شونده (تصویر ۳-۳) آنرا در یخچال تا قبل از مرحله برش گیری با میکروتوم قرار می دهیم .

تصویر ۳-۲- دستگاه ذوب پارافین



تصویر ۳-۳- صفحه سرد شونده

۵-۲-۲- تهیه برش های بافتی

در این مرحله از میکروترم دوار (تصویر ۳-۴) و حمام آب گرم(تصویر ۳-۵) 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 ۳-۶) 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 ۳-٤- دستگاه میکروتوم

تصوير ٣-٥- حمام آب گرم

تصوير ٣-٦- صفحه گرم شونده

٦-۲-۲- رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین / فلوکسین

- زایلین و یا ماده پاک کننده به مدت ۵ دقیقه (۲ بار)
- الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه ور کردن (۲ بار)
- الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه ور کردن (۲ بار)
- الکل ۸۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه ور کردن (۲ بار)
- الکل ۵۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه ور کردن (۱ بار)
- شستن با آب مقطر ۶ بار در ظروف جداگانه
- هماتوکسیلین به مدت ۶-۴ دقیقه
- شستن در آب جاری به مدت ۶-۴ دقیقه
- فلوکسین / ائوزین به مدت ۲ دقیقه
- الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه ور کردن (۲ بار)
- الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه ور کردن (۲ بار)
- زایلین به مدت ۱۰ بار غوطه ور کردن (۴ بار)
- پوشش دادن با مواد چسبنده و گذاشتن لامل
- مشاهده زیر میکروسکوپ

عمل مشاهده با میکروسکوپ بهتر است بعد از ۲۴ ساعت انجام گیرد تا لامل کاملاً روی لام چسبیده و خشک شود .

۷-۲-۲- بررسی آسیب شناسی مقاطع بافتی

تعداد زیادی از بیماری های میگو را می توان با این روش و با استفاده از میکروسکوپ نوری و مشاهده ضایعات وارده به بافت ها را با رنگ آمیزیها توضیح و تشخیص داد . علائم آسیب شناسایی ناشی از بیماری MBV را می توان در سلول های هپاتوپانکراس ، اپی تلیوم سلول های روده میانی مشاهده نمود . می توان علائمی از قبیل هیپروتروفی هسته سلول ها ، تغییرات حجم سلول ها نسبت به قطر هسته ، وجود گنجیدگی های داخل سلولی ، نکروز سلول های هپاتوپانکراس و روده میانی ، واکنش های التهابی در فضای بین سلولی و ... را مورد بررسی قرار داد (افشار نسب b ۱۳۸۶ ؛ Ramasamy , etal , 1999) .

۳-۲- مطالعات میکروسکوپ الکترونی

۱-۳-۲- تهیه نمونه برای میکروسکوپ الکترونی

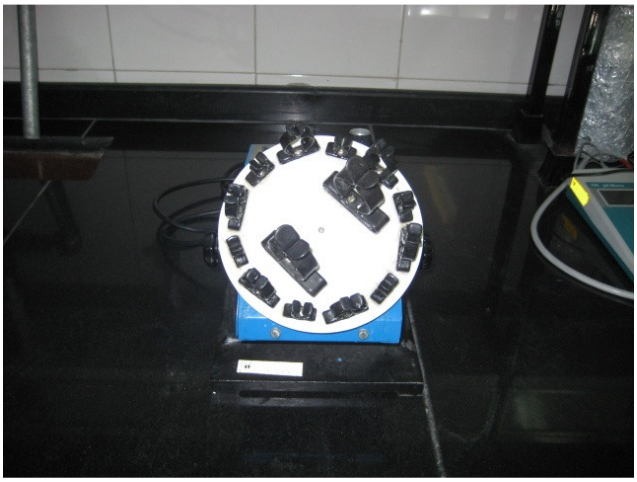
تهیه مقاطع بافتی میکروسکوپ الکترونی براساس روش Ramasamy و همکاران (۱۹۹۹) و اصلاح شده توسط افشار نسب (a ۱۳۸۶) صورت پذیرفت .

۲-۳-۲- فیکس کردن اولیه primary fixation

نمونه برداری جهت بررسی میکروسکوپ الکترونی در ساعات مختلف که قبلاً ذکر گردید انجام شد و با توجه به آزمایشات مولکولی PCR و همچنین علائم هیستوپاتولوژی نمونه هایی که از نظر بیماری مثبت بودند برای بررسی میکروسکوپ الکترونی انتخاب گردیدند . نمونه گیری به این صورت بود که ابتدا با سرنگ ماده فیکساتور گلوتارالدهید ۲/۵ درصد به داخل بافت هپاتوپانکراس میگوی زنده تزریق می شد و در ادامه بعد از برش کوتیکول خارجی توسط قیچی و جدا سازی بافت هپاتوپانکراس با استفاده از تیغ تیز قطعات بافتی به ابعاد ۲×۲ میلیمتر از بافت مورد نظر تهیه می شد لازم به ذکر است که پست لاروهای ۱۵-۱۰ روزه را مستقیماً در محلول فیکساتور قرار می دادیم . نمونه های حاصله با نسبت ۱ به ۱۰ در محلول فیکساتور گلوتار الدهید ۲/۵ درصد سرد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند . بعد از سپری شدن زمان مذکور نمونه ها به محلول فیکساتور گلوتار الدهید یک درصد انتقال داده شد و تا زمان تهیه مقاطع در دمای ۴ درجه سانتیگراد یخچال نگهداری شدند .

۳-۳-۲- شستشوی بافت washing

در این مرحله محلول فیکساتور گلوتار الدهید یک درصد حذف گردید و سپس نمونه های فیکس شده به ابعاد ۱×۱ میلیمتر برش و در درون ظرف شیشه ای درب دار به طور جداگانه قرار گرفتند . نمونه ها سه بار هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از محلول بافر کاکودیلید سدیم sodium cacody late buffer ۰/۱ مولار با PH ۷/۳ در دمای اتاق شسته شدند . لازم به ذکر است پس از هر بار تعویض بافر شیشه ها در دستگاه دوار Rotary (تصویر ۳-۷) قرار داده می شدند .



تصویر ۳-۷- دستگاه دوار

٤-۳-۲- فیکس کردن ثانویه secondry fixation

پس از اتمام عمل شستشوی بافتی ، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول یک درصد اسمیوم تتراکسید Osmium tetroxide همراه با بافر ۰/۱ مولار کاکودیلید سدیم قرار داده شدند . جهت تهیه محلول فوق ۲۰۰ میلی گرم از ماده اسمیوم تتراکسید را با ۱۰ سی سی آب مقطر مخلوط نموده تا محلول ۲ درصد بدست آید سپس با آب مقطر دو بار تقطیر غلظت آن به یک درصد رسانده شد .

٥-۳-۲- شستشوی مجدد نمونه

مواد ثابت کننده را دور ریخته و سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه نمونه ها را با محلول بافر سدیم کاکودیلید ۰/۱ مولار شستشو می دهیم .

٦-۳-۲-آبگیری نمونه ها Dehydration

پس از عمل شستشو ، نمونه ها را جهت آبگیری در محلول استون با رقت های مختلف و زمان مناسب مطابق جدول ۳-۴ قرار می دهیم . هنگام آبگیری نمونه ها لازم است درب شیشه حاوی نمونه بسته بوده و عمل آبگیری را با استفاده از استون مطلق (۱۰۰ درصد) سه مرتبه تکرار نماییم .

جدول ۳-۱- چگونگی آبگیری نمونه های بافتی

مرحله	غلظت استون (درصد)	زمان (دقیقه)
۱	استون ۳۵	۱۰
۲	استون ۵۰	۱۰
۳	استون ۷۵	۱۰
۴	استون ۹۵	۱۰
۵	استون ۱۰۰	۱۰ (سه بار تکرار می شود)

۷-۳-۲- تهیه رزین (Epon 812)

جهت تهیه رزین مواد زیر با نسبت های مختلف با هم مخلوط شد .

- Tab 812 Rezin به میزان ۴۸ گرم ، لازم به ذکر است که ماده مذکور به عنوان ماده پایه محسوب می شود .
- DDSA EM grid به میزان ۱۹ گرم ، این ماده قسمت Hardness محلول را تشکیل می دهد .
- MNA EM grid به میزان ۳۳ گرم ، این ماده قسمت softness محلول را تشکیل می دهد .
- DMP 30 به میزان ۳۰ گرم که تسریع کننده پلیمریزاسیون است .

۸-۳-۲- نفوذ ماده رزین در بافت (Infiltration)

عمل نفوذ ماده رزین (Epon 812) در نمونه ها را با استفاده از رقیق کردن رزین در استون خالص طبق جدول ۳-۵ انجام می دهیم . که در هر کدام از مراحل بعد از اضافه نمودن مواد ، شیشه ها در دستگاه دوار با دور بسیار کند قرار داده می شدند تا نفوذ رزین به خوبی صورت گیرد از سوی دیگر در این مطالعه از محلول حد واسط پروپیلن اکساید propylene oxide استفاده نشد .

جدول ۳-۲ - چگونگی رقیق رزین در استون (تزریق رزین ، داخل نمونه های بافت)

مرحله	زمان (ساعت)	رزین (درصد)	استون خالص (درصد)
۱	۲۴-۷۲	۵۰	۵۰
۲	۲۴-۷۲	۷۵	۲۵
۳	۱۲	۱۰۰	۰

۹-۳-۲- قالب گیری Embedding

جهت انجام عمل قالب گیری ، نمونه را در کپسولهای کوچک پلاستیکی (قالب گیری عمودی) قرار داده و در ابتدا کپسول قالب گیری را به صورت افقی قرار داده و شماره مورد نظر را در قالب قرار داده و از رزین خالص پر می کنیم .

۱۰-۳-۲- انجماد رزین polymerization

منجمد کردن رزین در قالب ها را با قرار دادن قالب های محتوی نمونه در آون ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت صورت پذیرفت (تصویر ۳-۱۰) .

تصویر ۳-۸- دستگاه آون جهت انجماد رزین

۱۱-۳-۲- تهیه مقاطع ضخیم بافتی Thick sectioning

تهیه مقطع ضخیم بافتی را با استفاده از اولترامیکروتومUltra microtom (تصویر ۳-۱۱) و تیغه شیشه ای انجام داده و مقاطع را با ضخامت یک میکرون ($1\mu m$) تهیه و آنها را روی لام قرار داده و با محلول تولوئیدون آبیToluidine Blue رنگ آمیزی صورت پذیرفت مقاطع رنگ آمیزی شده را بر روی هیتر داغ خشک کرده و پس از شستشو و خشک کردن مجدد ، زیر میکروسکوپ نوری مقاطع بافتی را بررسی می نمائیم .

تصویر ۳-۹- دستگاه اولترا میکروتوم

۱۲-۳-۲- تهيه مقاطع نازک بافتی Ultra thin sectioning

از طريق مقطع ضخيم در زير ميكروسكوپ نوری موقعيت مورد نظر را مشخص كرده و همان ناحيه را جهت تهيه مقطع نازک انتخاب می نماييم . مقطع را به قطر 80 nm – 60 تهيه و كنترل ضخامت مقطع را با ايجاد انكسار نور لايه تهيه شده به رنگ نقره ای يا طلايی در داخل سطح آب پشت تيغه اولترا ميكروتوم كنترل می نماييم . لايه های مناسب را به وسيله گريد grid مسی از سطح آب برداشت كرده و سپس آنرا روی كاغذ صافی خشک می كنيم .

۱۳-۳-۲- رنگ آميزی بافت staining

بعد از خشک شدن گريدهای حاوی مقاطع بافتی (۲۴ ساعت) ، مقاطع تهيه شده به مدت ۲۰ دقيقه با استات اورانيل uranyl acetate (فيلتر نمودن ۰/۵ گرم اورانيل استات حل شده در ۱۲/۵ سی سی متانول) و قرار گيری در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت جهت رسوب ذرات معلق رنگ و در ادامه برداشت فاز بالايی رنگ و ذخيره سازی در يخچال با دمای ۴ درجه سانتيگراد رنگ آميزی شدند ، پس از شستشو در آب مقطر دو بار تقطير به آرامی (۱۰-۸ مرتبه) ، توسط رنگ رينولد Reynold يا سيترات سرب Lead citrate (۰/۳۳ گرم نيترات سرب Lead Nitrate همراه با ۰/۴۴ گرم سديم سيترات sodium citrate در ۱۲/۵ سی سی آب مقطر دو بار تقطير) به مدت ۵ دقيقه رنگ آميزی شدند در ادامه شستشوی آنها با استفاده از آب مقطر دو بار تقطير گرفت . در نهايت با استفاده از پنس گريدها به آرامی بر روی كاغذ صافی تعبيه شده در پتری ديش شيشه ای درب دار منتقل شدند . لازم به ذكر است كه با استفاده از كاغذ صافی آب اضافی جذب شده به منظور جلوگيری از جدا شدن مقاطع بافتی رنگ آميزی شد بعد از خشک شدن ، گريدها به آرامی به جعبه گريد Grid box منتقل شدند .

۱٤-۳-۲- بررسی مقاطع بافتی توسط ميكروسكوپ الكترونی

جهت بررسی مقاطع بافتی از ميكروسكوپ الكترونی مدل Philips دانشكده دامپزشكی دانشگاه شيراز (تصوير ۳-۱۲) و ميكروسكوپ الكترونی LEO 906 دانشگاه علوم پزشكی شيراز استفاده شد (تصوير ۳-۱۳). بعد از قرار گيری گريد (carbon coated Grid) حاوی مقطع بافتی در قسمت Holder دستگاه با استفاده از ولتاژ 120 kv اجزاء مختلف سلول جهت مشاهده ساختار ويروس های بيماريزا مورد بررسی قرار گرفت .

تصویر ۳-۱۰- میکروسکوپ الکترونی Philips دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

تصویر ۳-۱۱- میکروسکوپ الکترونی LEO 906 دانشگاه علوم پزشکی شیراز

٤-۲- روش مواجهه ویروس با میگوی پا سفید غربی

برای مواجهه میگوها با ویروس از روش Afsharnasab و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. برای این منظور ۵۴۰ قطعه میگوی جوان پا سفید غربی با وزن متوسط ۷ تا ۱۲ گرم (سن یکسان) و در مرحله بین پوست اندازی پس از دو روز نگهداری در محیط آزمایشگاه به گروه های ۶۰ تایی تیمار (A,B) برای مواجهه با ویروس از طریق آب و غذا با سه تکرار تقسیم شدند و یک گروه کنترل (C) نیز با سه تکرار در نظر گرفته شد (تصویر ۳-۱) (جدول ۳-۱) . همچنین پست لاروهای مورد استفاده در آزمایش به تعداد ۳۶۰۰ پست لارو ۱۰ تا ۱۵ روزه انتخاب و آنها را به دو گروه کنترل و تیمار برای مواجهه با ویروس از طریق آب (تیمار D) و گروه کنترل برای پست لاروها (E) تقسیم کردیم (جدول ۳-۲) . تعداد پست لاروها در هر آکواریوم به تعداد ۶۰۰ عدد و برای هر آزمایش با سه تکرار ۱۸۰۰ عدد انتخاب نمودیم . در این گروه ها دما ، شوری ، PH ثابت است . دمای آب بین ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتیگراد ، شوری ppt ۴۰-۳۰ و PH برای کلیه مراحل آزمایش ۸-۷/۵ انتخاب کردیم . همچنین میگوهای ۷ تا ۱۲ گرمی با غذای پلت شماره ۴۰۳ و پست لاروها با غذای پلت شماره ۴۰۱ روزانه در سه نوبت غذادهی شدند . همچنین روزانه دوبار آب تانک ها تعویض گردید تا آلودگی ثانویه ایجاد نشود .

در گروه های تیمار ، میگوها به دو شکل مواجهه از طریق آب و غذا برای میگوهای ۷ تا ۱۲ گرمی و برای پست لاروها فقط از طریق آب به مدت ۲۴ ساعت به صورت غوطه وری (بدون تعویض آب) باویروس مواجهه داده شد و سپس بعد از شستشو به آب تمیز منتقل شدند . روزانه تعداد مرگ و میر میگوها ثبت شد و نمونه گیری برای انجام PCR و آسیب شناسی و میکروسکوپ الکترونی در ساعات ۰ ، ۱۲ ، ۲۴، ۴۸ ،۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از مواجهه با ویروس انجام شد . نمونه هایی که در تانکها تلف شده بودند از محیط خارج و نمونه هایی که از نظر رفتاری غیر طبیعی به نظر می رسیدند آنها را جمع آوری و برای آزمایش PCR و آسیب شناسی و میکروسکوپ الکترونی انتخاب می کردیم . همچنین این نمونه ها از طریق لام مرطوب نیز مورد آزمایش قرار می گرفت و نسبت به شناسایی گنجیدگی های ویروسی در هپاتوپانکراس یا معده آنها مورد بررسی قرار می دادیم .

تصویر ۳-۱۲- نمونه ای از آکواریوم های مورد استفاده در مطالعه

جدول ۳-۳- گروه بندی تیمارها و کنترل در میگوهای ۷ تا ۱۲ گرمی

	مواجهه با ویروس از طریق آب	مواجهه با ویروس از طریق غذا	بدون مواجهه با ویروس	تعداد
A_1	+	–	–	۶۰
A_2	+	–	–	۶۰
A_3	+	–	–	۶۰
B_1	–	+	–	۶۰
B_2	–	+	–	۶۰
B_3	–	+	–	۶۰
C_1	–	–	+	۶۰
C_2	–	–	+	۶۰
C_3	–	–	+	۶۰

جدول ۳-٤ - گروه بندی تیمارها و کنترل در پست لاروهای ۱۰ تا ۱۵ روزه

	مواجهه با ویروس از طریق آب	بدون مواجهه با ویروس	تعداد
D_1	+	–	۶۰۰
D_2	+	–	۶۰۰
D_3	+	–	۶۰۰
E_1	–	+	۶۰۰
E_2	–	+	۶۰۰
E_3	–	+	۶۰۰

۲-۵- لام مرطوب

آزمایش لام مرطوب را ابتدا با خارج کردن بخشی از ارگانهای اصلی و اضافه کردن چند قطره آب مقطر استریل شده با کلرید سدیم ۲/۸ درصد و یا آب دریای استریل انجام می دادیم . سپس اندام مورد نظر را به آرامی روی لام کشیده و با قرار دادن لامل روی آن با میکروسکوپ مطالعه می کردیم لام مرطوب تهیه شده از هپاتوپانکراس و مدفوع را با مالاشیت گرین ۰/۱ درصد رنگ آمیزی و به این طریق گنجیدگی های مربوط به بیماری MBV را تشخیص می دادیم (افشار نسب ، a ۱۳۸۶) .

۲-٦- روش مولکولی PCR

بهترین روش جمع کردن نمونه ها برای استفاده در این روش و استخراج DNA یا RNA روش جمع کردن آنها و گذاشتن در یخ خشک یا نیتروژن مایع و نگهداری در درجه حرارت ۸۰- درجه سانتیگراد می باشد به هر حال این روش در محیط ممکن است قابل استفاده نباشد . گاهی اوقات که نیازمند اجرای سریع کارها هستیم ، روشی سریع و ساده مورد نیاز است که بهترین روش ، نگهداری بافت های میگو در الکل ۹۵-۷۰ درصد برای مدت معین می باشد (افشار نسب ، a ۱۳۸۶) در این مطالعه ما برای جمع آوری نمونه ها از الکل ۷۰ درصد استفاده نمودیم . در این روش از دستگاه PCR و کیت تشخیصی IQ2000 استفاده شد .

۲-٦-۱- مواد مورد نیاز جهت استخراج DNA

کیت استخراج DNA (200 reaction/kit) شامل محلول های زیر است :

- محلول DTAB (125 ml/btl) که می بایست در دمای اتاق نگهداری شود .
- محلول CTAB (25ml/btl) که می بایست در دمای اتاق نگهداری شود .
- محلول حلال (30 ml/btl) که می بایست در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود .

- بافرلیز کننده (200 reaction/kit) : 100ml/btl که می بایست در دمای اتاق نگهداری شود .

کیت تکثیر سکانس اختصاصی ویروس MBV (200 reaction/kit) که می بایست در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود .

معرف premixed : ۴ ویال (750ul/vial)

شامل بافرواکنش ، dNTPs و پرایمر اختصاصی ویروس MBV .

- استاندارد کنترل مثبت (+) P : یک ویال (100ul / vial)

شامل 10^5 copies/ul از پلاسمید حاوی بخشی از ویروس MBV .

- tRNA مخمر (40 ng/ul) : یک ویال (500 ul/vial) .
- آنزیم IQzyme DNA پلی مر از (2U/ul) : یک ویال (125 ul/Vial) .
- محلول 6x loading dye : یک ویال (1500 ul/vial) .
- شاخص وزن مولکولی DNA : یک ویال (100ul/vial) .

۸۴۸ bp ، ۳۶۰ bp ، ۳۳۳ bp

۲-٦-۲ - ابزار و وسایل مورد نیاز

۱. دستگاه ترموسایکلر، ۲. میکروسانتریفیوژ با سرعت بالا ۱۲۰۰۰ rpm ، (با قطر ۵/۸ سانتیمتر)، ۳. دستگاه الکتروفورز، ۴. لامپ UV ۵. مخلوط کن گردابی، (vortex) ۶. گرمازا ،۷. میکروپیپت، ۸. دوربین دیجیتال ،۹. کلروفورم ، ۱۰. اتانول ۹۵ درصد، ۱۱. اتیدیوم برماید ، ۱۲. بافر الکتروفورز TAE یا TBE و ۱۲. آگاروز .

۳-٦-۲- جمع آوری نمونه ها و نگهداری و انتقال آنها به آزمایشگاه

بعد از نمونه گیری از میگوهای ۷ تا ۱۲ گرمی و پست لاروهای ۱۰ تا ۱۵ روزه در ساعات مختلف که قبلاً ذکر شد با استفاده از الکل ۷۰ درصد نمونه ها به آزمایشگاه مرکز تشخیص بیماریهای میگوی استان بوشهر وابسته به اداره کل دامپزشکی استان بوشهر منتقل گردید .

٤-٦-۲- آماده سازی نمونه ها

در این مطالعه با توجه به دستور العمل کیت IQ2000 آماده سازی و استخراج DNA از نمونه های جمع آوری شده با توجه به اینکه پست لارو و میگوی جوان بودند صورت پذیرفت لذا روش کار در کیت به صورت ذیل می باشد (جدول ۳-۳) :

پست لاروها

- گذاشتن حدود ۳۰ پست لارو در میکروتیوب ۱/۵ ml حاوی ۰/۶ml محلول DTAB
- خرد و له کردن نمونه ها در تیوب با استفاده از آسیابک.

هپاتوپانکراس

- اضافه کردن 100 ul , 500 mM EDTA با PH=8 به تیوب ۱/۵ ml حاوی ۰/۶ ml محلول DTAB و به خوبی آنها را مخلوط می کنیم .
- در حدود ۲۰ mg هپاتوپانکراس به لوله بالا اضافه گردد .
- نمونه داخل تیوب با استفاده از آسیابک خرد و له می گردد .
-

نمونه مدفوعی

- در حدود 1 cm از نمونه مدفوع جمع آوری شده به تیوب ۱/۵ ml حاوی ۰/۶ ml محلول DTAB اضافه می گردد .
- نمونه داخل تیوب با استفاده از آسیابک خرد و له می گردد .

فرایند استخراج DNA براساس روش DTAB-CTAB

- بعد از آماده سازی نمونه های فوق ، محلول مورد نظر در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد سپس در دمای اتاق سرد گردید .
- در این مرحله با استفاده از vortex محتویات به شدت مخلوط شدند سپس ۰/۷ ml کلروفورم به تیوب ها اضافه شد . در ادامه مجدداً به مدت ۲۰ ثانیه vortex شد و در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شد .
- ۲۰۰ ul از فاز بالایی به یک میکروتیوب ۱/۵ ml منتقل گردید ، سپس ۱۰۰ ul از محلول CTAB و 900 ul از ddH_2o به آن اضافه شد که بعد از مخلوط نمودن در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید .
- بعد از خنک شدن در دمای اتاق در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد .
- در ادامه بعد از حذف مایع رویی با اضافه نمودن ۱۵۰ ul محلول حلال ، پلت کف مجدداً به صورت سوسپانسیون در آورده شد (حل شد) و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و سپس در دمای اتاق سرد شد .
- در این مرحله محتویات میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شدند سپس محلول شفاف را به یک میکروتیوب ۰/۵ ml حاوی ۳۰۰ ul اتانول ۹۵درصد منتقل شدند .

- بعد از مخلوط نمودن آنها مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردیدند و در ادامه پلت باقی مانده را با ۲۰۰ ul اتانول ۷۰ درصد شسته و بعد از خشک کردن آنها در بافر ddH_2o یا TE حل گردیدند .

استخراج DNA توسط بافر lysis

(برای نمونه های پلئوپودها ، آبشش یا پست لاروهای کمتر از ۱۲ روز)

- اضافه نمودن ۵۰۰ ul بافر Lysis به میکروتیوب های ۱/۵ ml .
- قرار دادن نمونه ها در میکروتیوب های فوق و خرد کردن آنها توسط آسیابک .
- انکوبه کردن نمونه تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و سپس سانتریفوژ کردن محصول در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه .
- انتقال ۲۰۰ ul از محلول شفاف رویی به میکروتیوب ۱/۵ ml جدید حاوی ۴۰۰ ul اتانول ۹۵ درصد .
- مخلوط نمودن آنها و سانتریفوژ کردن آن به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ ، در ادامه حذف اتانول و خشک کردن پلت .
- حل شدن پلت خشک شده در بافر ddH_2o یا TE .

DNA dissolution (تجزیه DNA)

- تغلیظ نمودن DNA بر حسب نوع نمونه متفاوت است بنابراین برای این کار پلت DNA با حجم های متفاوت از بافر ddH_2o یا TE حل می گردد .
-

جدول ۳-۵ میزان حجم نمونه ها

نمونه	حجم
پست لاروها	۲۰۰ ul
مدفوع مولدین	۵۰ ul
هپاتوپانکراس	۵۰۰ ul

- براساس دستور العمل کیت ، جهت ذخیره سازی نمونه ها برای مدت طولانی می توان آنها را در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت یکسال ذخیره سازی نمود .

دستور العمل تکثیر

به منظور تکثیر از لوله های ۰/۲ ml یا پلیت های ۹۶ تایی استفاده می شود .

- آماده سازی معرف : Reaction / ul ۱۳ .

مخلوط معرف به صورت زیر تهیه می گردد :

pre –mixed reagent = 12.5 ul
IQzyme DNA polymerase (2U/ ul)=0.5 ul

شرایط واکنش

94℃ 20 *seconds* ; 58℃ 20 *seconds* ; 72℃ 30 *secounds* ; *repeat* 35 *cycles* ,
then add 72 ℃ 30 *secounds* ; 20℃ 30 *seconds at the end of the final cycle*.

-فرایند واکنش

- نکته قابل ذکر اینکه در این مطالعه برای هر مخلوط تهیه شده سه نمونه استاندارد کنترل مثبت ($۱۰^۴$ ، $۱۰^۳$ و $۱۰^۲$) و یک نمونه استاندارد کنترل منفی (tRNA مخمر یا ddH_2o) در نظر گرفته شد .
- با استفاده از پیپت ul ۱۳ از مخلوط معرف (دارای IQ zyme DNA polymerase) به داخل هر یک از لوله های ml ۰/۲ ریخته شد .
- اضافه نمودن ul ۲ از DNA استخراج شده یا استاندارد به هر کدام از لوله ها .
- پوشاندن لوله ها توسط ul ۲۰ از روغن معدنی .
- انجام واکنش PCR .
- بعد از اتمام واکنش ul ۳ از 6 x loading dye به هر کدام از لوله های واکنش اضافه و به خوبی مخلوط می شود . بعد از مخلوط کردن نمونه جهت قرائت در دستگاه الکتروفورز آماده می باشند .

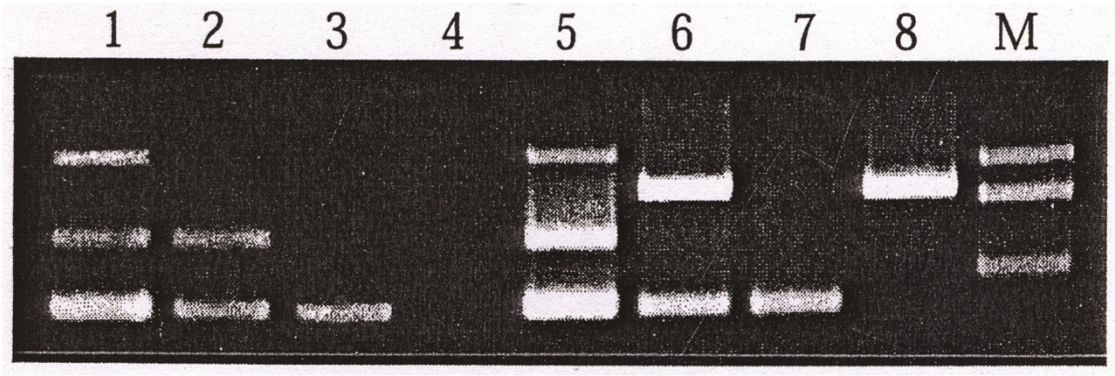
- آنالیز نتایج در دستگاه ژل الکتروفورز

برای مشاهده محصول PCR از دستگاه الکتروفورز استفاده گردید . بدین صورت که پس از حل نمودن ۲ درصد آگاروز در بافر TBE زمانیکه دمای ماده حاصله درآون به ۵۰ درجه سانتی گراد رسید شانه های نشان دار دستگاه الکتروفورز وارد ژل شدند . بعد از آماده سازی ژل محصول PCR شده را به میزان $8\mu l$ همراه با $4\mu l$ از loading dye بر روی ژل در محل سوراخ های موجود قرار داده شد . بعد از پر کردن تانک دستگاه توسط بافر TBE ، ژل های حاوی محصول PCR در قطب منفی دستگاه قرار داده شد سپس ولتاژ دستگاه بر روی 110ولت تنظیم نموده و دستگاه به مدت ۲۰ دقیقه راه اندازی گردید . از آنجا که قطعات DNA دارای بار منفی می باشند لذا به طرف قطب مثبت کشیده می شوند .

رنگ آمیزی ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید (mg/ml ۰/۵ آب مقطر) به مدت ۵-۳ دقیقه صورت گرفت سپس رنگ آمیزی ژل ها به مدت ۳۰ دقیقه به طول انجامید و در نهایت رنگ ها توسط آب مقطر شسته شدند و در انتها ژل ها توسط نور UV مورد بررسی قرار گرفتند .

تشخیص

براساس دستورالعمل کیت نمونه ها مورد بررسی قرار می گیرد (تصویر ۳-۲)



تصویر ۳-۱- تصاویر حاصل از نمونه های مختلف در بیماری ویروسی MBV بر روی ژل الکتروفورز در کیت IQ -2000 .

ردیف ۱: نمونه استاندارد مثبت ویروس MBV با 20000 copies/reaction .

ردیف ۲ : نمونه استاندارد مثبت ویروس MBV با 2000 copies / reaction .

ردیف ۳ : نمونه استاندارد مثبت ویروس MBV با 200 copies / reaction .

ردیف ۴ : کنترل منحنی (tRNA مخمر یا ddH_2o) .

ردیف ۵ : نمونه هپاتوپانکراس که آلودگی شدید به MBV دارند .

ردیف ۶ : نمونه هپاتوپانکراس که آلودگی خفیف به MBV دارند .

ردیف ۷ : نمونه مدفوعی در آلودگی با MBV .

ردیف ۸ : نمونه منفی

ردیف ۹ : نشانگر وزن مولکولی DNA ، ۸۴۸ bp ، ۶۳۰ bp ، ۳۳۳ bp .

نمونه های منفی تنها یک باند در ۶۶۵ bp تشکیل می دهند .

باندهایی که در ۲۲۵ bp و یا ۴۴۴ bp تشکیل می شود مثبت می باشند تنها باند تشکیل شده در ۶۶۵ bp منفی می باشد .

۷-۲- روش کار تولید پرایمر پیشنهادی برای نمونه ویروس MBV تایید شده

۱-۷-۲- آماده سازی نمونه‌ها

برای استفاده از روش PCR، باید در کلیه روشها DNA را استخراج و خالص نموده و سپس برای تکثیر از آن استفاده کرد. هدف از خالص‌سازی این است که تعداد زیادی مهارکننده از بین بروند که در عصاره استخراج شده خام (نا پخته) وجود دارند و ممکن است سبب نتیجه کاذب شوند. در مراحل خالص‌سازی DNA، ابتدا بافت

را هموژنیزه نمودیم و با یک آنزیم لیزکننده پروتئین مثل آنزیم پروتئیناز K (Protolytic enzyme proteinase k) این کار را کامل نموده و عمل هموژنیزه شدن را تکمیل و سپس بوسیله محلول فنل، کلروفورم DNA را استخراج و سپس با الکل DNA استخراج شده را رسوب دادیم. الکل را به آهستگی خارج نموده و DNA را توسط یک بافر برداشته تا عمل ساخت template (قطعه‌ای از DNA) تکمیل گردید. یکی از نتایج غیر واقعی که طی استخراج DNA ممکن است حاصل شود، زمانی است که این مرحله کامل شده و امکان از دست دادن تکه‌ای از DNA در حین آماده‌سازی می‌باشد. به منظور غلبه بر این حالت لازم است بافتها را در بافر حاوی آنزیم پروتئیناز K هموژنیزه کرده و با جوشاندن آن آنزیمها و کلیه پروتئینهای مهارکننده دناتوره وغیرفعال شوند. بعد از جوشاندن، نمونه‌ها را سانتریفوژ نمودیم و سپس بخش شناور سانتریفوژ شده را به عنوان template در انجام آزمایش PCR مورد استفاده قرار دادیم.

استخراج DNA در روشهای مختلف متفاوت اعلام شده و تکنیک یکسانی ندارد. اما این تکنیک با نهایت احتیاط و توجه می‌تواند روش مناسبی جهت استخراج DNA در میگو باشد.

به عنوان یک پروتکل اساسی روش Wang *etal*.,1996 را در کلیه آزمایشگاهها به عنوان روش استخراج DNA مورد استفاده قرار می‌دهند که اساس این روش به شرح ذیل در این پروژه انجام گردید:

۱- حدود ۲۰ میلی گرم از بافت میگو را برداشته ودر ۱۰۰µL از بافر هموژنیز کننده قرار می‌دهند(ترکیب بافر شامل ۵۰ میکرومول KCL ، ۱۰ میکرومول Tris-HCL با pH حدود ۸/۳ ، ۱۰ میلی گرم ژلاتین، ۴۰- Nonidet P ۰/۴۵درصد، ۲۰- Tween ۰/۴۵ درصد و ۸ میلی گرم پروتئیناز k)

۲- بافت را هموژنیز نموده و سپس در ۶۰ درجه‌سانتی گراد برای یک ساعت و سپس در ۹۵ درجه‌سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه حرارت می‌دهیم.

۳- سپس ۳۰۰ میکرومول از بافر رقیق کننده را به آن اضافه می کنیم (ترکیب بافر شامل ۱۰ میکرومول Tris-HCl با pH =۸ و یک میکرومول EDTA). سپس عصاره بافت را با ۴۰۰ میکرومول محلول فنل، ایزوامیل الکل و کلروفروم به نسبت (۲۵ و ۱ و ۲۴) به آرامی برای ۵ دقیقه تکان داده و وارونه می کنیم و برای ۵ دقیقه دیگر عصاره را می گذاریم تا بماند و سپس در دور ۱۲۰۰۰xg برای ۲ دقیقه سانتریفوژ می‌نمائیم سپس ۳۰۰ میکرومول از محلول بالائی را به یک تیوب دیگر وارد می کنیم.

۴- عصاره برداشت شده را با ۳۰۰ میکرومول از کلروفروم مخلوط نموده و ۲۵۰ میکرومول از قسمت بالائی آن را در یک لوله جدید می‌ریزیم.

۵- به منظور رسوب DNA حدود ۴۰ µl از گیلکوژن (۲ µl از ۲۰ mg/ml ذخیره اصلی)، ۱۲۵ µl از استات امونیوم ۷/۵ مول و ۷۵۰µl از اتانول ۱۰۰درصد به لوله اضافه و سپس درجه حرارت ۲۰- درجه‌سانتی گراد برای یک ساعت قرار می‌دهیم و سپس در دور ۱۲۰۰۰xg برای ۵ دقیقه ساتریفوژ نموده تا DNA به صورت گلوله‌های

کوچک رسوب نماید. سپس با اتانول ۷۰درصد شستشو داده تا امونیوم استات اضافی خارج شود. آنگاه در خلاء خشک نموده و در درجه حرارت ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری و در زمان نیاز از این DNA استفاده می‌کنیم.

۲-۷-۲- استخراج سریع DNA از لاروها

روش ذیل که توسط دکتر Woongtrasupayaو همکاران از گروه بیوتکنولوژی دانشگاه Mahidol در سال ۱۹۹۶ ارائه شده است، به طور بسیار موفقی جهت استخراج DNA از لارو میگو مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش لاروهای جمع‌آوری شده از سالنهای هچری و مزارع بطور مستقیم در ماده اتانول ۱۰۰درصد نگهداری و سپس برای مدت کوتاهی در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده، سپس آن را به آزمایشگاه جهت استفاده از پرایمر طراحی شده ساخت شرکت DiagXotic مورد استفاده قرار می‌دهیم. این تکنیک که بیشتر برای تشخیص WSSV بکار می‌رود ممکن است جهت سایر ویروسها نیز کاربرد داشته باشد، روش کار بدین شرح است:

۱- تعداد ۳۰-۲۰ عدد ازپست لاروهای ۱۵- ۵ روزه را در یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتر قرار داده و الکل وارد شده به لوله را برای فیکس کردن با نمونه ها، با میکروپیپت خارج می‌کنیم.

۲- سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هیدروکسید سدیم با نرمالیته ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ درصد محلول SDS را به لوله اضافه می‌کنیم.

۳- سپس لاروها را درون لوله ریز و هموژنیز می‌کنیم.

۴- سرپوش لوله را با یک تیغ سوراخ نموده تا از انفجار لوله جلوگیری شده و سپس لوله را در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه‌سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه قرار می‌دهیم.

۵- سپس لوله را فوراً در یخ قرار داده تا سرد شود، آن را سانتریفوژ نموده (به مدت کوتاهی) و سپس ۵ µl از محلول روئی که شفاف و روشن می‌باشد را جهت انجام PCR خارج می‌کنیم.

۶-سپس اجزا PCR به شرح ذیل آماده می‌کنیم: ۵ میکرولیتر از نمونه template را در ۴۵µl که 1 x PCR buffer و ۲۰۰ میکرومول dNTP و۱/۵ میکرومول MgCl2 و ۰/۵ µM پرایمر ۱ و ۰/۵ µM پرایمر ۲ و دو واحد Taq پلی مراز (2u U Taq).

۷- سپس به آرامی مخلوط را سانتریفوژ تا کلیه معرفها در ته لوله جمع شوند.

۸- نمونه را در دستگاه PCR (ترموسایکلر) به شرح ذیل قرار می‌دهیم.

برای ۳۵ سیکل

دقیقه ۳	۹۳ درجه‌سانتی‌گراد (a
ثانیه ۳۰	۹۳ درجه‌سانتی‌گراد (b
ثانیه ۳۰	۶۰ درجه‌سانتی‌گراد
ثانیه ۳۰	۷۲ درجه‌سانتی‌گراد
دقیقه ۵	۷۲ درجه‌سانتی‌گراد (c

۳-۷-۲- استخراج سریع همولنف

این تکنیک توسط دکتر Woongtrasupayaو همکاران از گروه بیوتکنولوژی دانشگاه Mahidol تنظیم شده و به صورت موفق برای آزمایش همولنف در بیماری WSSV با استفاده از پرایمر شرکت DiagXotic مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش ممکن است برای استخراج DNA سایر ویروسها نیز بکار رود. اگر نمونه‌ها از آزمایشگاه دور باشند برای استخراج همولنف µl ۱۰ از همولنف را به ۲۰µl بافر لایزکننده (Lysis buffer) اضافه و سپس مستقیما مخلوط نموده و در یخچال نگهداری می‌کنیم. برای نمونه‌های موجود دراین پروژه روش کار به شرح ذیل انجام گردید:

۱- ۲۰ میکرولیتر از محلول Lysis buffer را (مواد NaOH با نرمالیته ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵درصد SDS را به نسبت ۱به ۱ مخلوط می‌کنیم)در یک لوله قرار دادیم.

۲- سپس ۱۰ میکرولیتر از همولنف تازه به لوله اضافه نموده و بوسیله یک همزن مخلوط نمودیم.

۳- سر لوله را سوراخ نموده تا از انفجار جلوگیری شود و سپس آن را در دستگاه PCR و در درجه حرارت ۱۰۰درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه قرار دادیم.

۴- لوله را به فوریت در یخ قرار داده تا سرد شده و سپس آن را سانتریفوژ نموده و µl ۱۰ از محلول بالائی آن را که شفاف است خارج نموده و به مجموعه PCR اضافه نمودیم.

٤-۷-۲- طراحی پرایمر

با استفاده از برنامه نرم افزاری Oligo primer and analysis software Version 7 و استفاده از ژن بانک یک پرایمر اختصاصی برای ویروس MBVطراحی گردید. (در برنامه پروژه بنا بود ویروس تایید شده MBV از نمونه های جدا شده ابتدا تعیین توالی ژنوم شده (Sequencing) شده و از آن پرایمر طراحی گردد ولی بدلیل مشکلات مالی از توالی ثبت شده در ژن بانک استفاده گردید).

این پرایمر شامل

Forward:5´-CTATACTGTTATCATTTT-´3
Revers:5´-TATATAGCGTTAACACGT-´3

میباشد. این پرایمر میتواند یک قطعه ۱۸۵bp از ژنوم ویروس MBV را تکثیر نماید. درجه حرارت دناتوره شدن یا (Annealing temperatures) شامل درجه حرارتهای ۵۵ ، ۵۷ و ۶۰ درجه سانتی گراد انتخاب و ازمایش و در ۴۰ سیکل کار تکثیر انجام گردید.

۵- اجزا PCR شامل: ۲ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر بافر 1x PCR ، ۱/۵ میکرومول ۲mMdNTP، ۱میکرولیتر از ۱۵ میکرومول $MgCl_2$، یک دهم میکرولیتر از **Taq DNA**تگ پلی مراز(۱۰۰واحد) یکمیکرومول از نمونه DNA template که حجم محلول نهائی را با آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر میرسانیم.

۲-۷-۵- برنامه دستگاه ترموسایکلر به شرح ذیل قرار می‌دهیم:

برای ۴۰ سیکل

دقیقه ۳	۹۵ درجه‌سانتی گراد (a
ثانیه ۳۰	۹۵ درجه‌سانتی گراد (b
ثانیه ۳۰	۶۰و۵۷و۵۵ درجه‌سانتی گراد
ثانیه ۶۰	۷۲ درجه‌سانتی گراد
دقیقه ۵	۷۲ درجه‌سانتی گراد (c

۲-۷-۶- آنالیز نتایج در دستگاه ژل الکتروفورز

محصول PCR در دستگاه الکتروفورز به وسیله ژل آگاروز قابل دیدن می‌باشد. برای این منظور به شکل ذیل اقدام می‌شود.

۱- آگاروز ۱/۵ درصد را در بافر TBE و در آون حل نمودیم.

۲- اجازه می‌دهیم تا حدود ۶۰ درجه‌سانتی گراد خنک شده و سپس در سینی دستگاه الکتروفورز ریخته و شانه‌های نشان دار دستگاه الکتروفورز را در ژل وارد کردیم.

۳- وقتی که ژل آماده شد، محلول PCR شده را به میزان ۱۰ میکرولیتر به همراه ۲ میکرولیتر از متیلن بلو روی ژل در محل سوراخهایی قرار می‌دهیم که توسط شانه ایجاد شده است و برای سایر نمونه‌ها به همین شکل اقدام نموده و دقت می کنیم تا آلودگی ایجاد نشود.

۴- سپس تانک دستگاه را از بافر TBE پر می کنیم و ژل را با نمونه‌ها در قطب منفی قرار داده و چون DNA خصوصیت بار منفی دارد، به طرف قطب مثبت کشیده می‌شود.

۵- دستگاه را با ولتاژ ۱۱۰ ولت برای ۳۰ دقیقه راه اندازی می کنیم.

۶- سپس ژل را در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میلی گرم/ میلی‌لیتر آب مقطر) برای مدت ۵-۳ دقیقه رنگ می کنیم (اتیدیوم بروماید به شدت سمی است).

۶- ژل را در آب مقطر برای ۳۰ دقیقه می‌شوییم تا رنگ آن از بین رفته و سپس در زیر نور UV آن را نگاه می کنیم (چشم‌ها و پوست را در معرض نور UV قرار ندهید). یک روش جایگزینی دیگر برای رنگ‌آمیزی اضافه کردن ۶ میلی‌لیتر از اتیدیوم بروماید به ژل قبل از سردشدن کامل آن بوده و قبل از ریختن ژل به سینی دستگاه الکتروفورز می‌باشد. گر چه این روش سریعتر است ولی امکان آلودگی با اتیدیوم بروماید بیشتر می‌باشد. بعد از رنگ آمیزی باید باندی با وزن ۱۸۵bp برای مثبت بودن نمونه ها تشکیل گردد.

٣-٧-٦- در نظر گرفتن نمونه های کنترل در آزمایش PCR

در آزمایش PCR ضروری است از کنترل منفی و مثبت استفاده گردد.

اگر در محلول PCR نهائی کنترل مثبت روی ژل آگاروز قابل دیدن نباشد، نتایج قابل قبول نمی‌باشد. این موضوع ممکن است ناشی از غیرفعال بودن DNA سنتز شده، اشتباه یا فراموشی در برخی از مواد که باید در مراحل کار استفاده شوند و یا خراب شدن ماده کنترل مثبت DNA می‌باشد. چنانچه کنترل منفی مثبت شود نشان می‌دهد که طی آزمایش آلودگی اتفاق افتاده است.

نتیجه کاذب منفی نیز ممکن است در نتیجه حضور بعضی از مهارکننده‌ها در نمونه‌ها اتفاق بیافتد. این موضوع را می‌توان با اضافه‌کردن ۱ میلی‌لیتر از کنترل مثبت به نمونه‌های تکراری به انجام رساند. اگر نتیجه منفی بود وجود آلودگی در حین کار مورد تایید قرار می‌گیرد که باید مجددا نمونه‌ها تکرار شود و اگر نتیجه مثبت بود مشخص می‌شود که نمونه بدرستی منفی بوده وآزمایش مورد تایید است.دراین آزمایش از آب مقطر برای کنترل منفی استفاده گردید.

٤-٧-٦-اختصاصیت و حساسیت پرایمر طراحی شده:

برای تعیین حساسیت پرایمر طراحی شده ، از DNA ژنومی که برای برنامه PCR به عنوان الگو انتخاب شده بود ۸ سری محلول رقیق شده با حجمهای

۱- $1\ \mu g\ DNA\ mL^{-1}$
۲- $0.1\ \mu g\ DNA\ mL^{-1}$.
۳- $10ng\ DNA\ mL^{-1}$
۴- $1ng\ DNA\ mL^{-1}$
۵- $100pg\ DNA\ mL^{-1}$
۶- $10pg\ DNA\ mL^{-1}$
۷- $1pg\ DNA\ mL^{-1}$
۸- $100fg\ DNA\ mL^{-1}$
۹- آب مقطر
۱۰- 100-bp DNA marker

و برای تعیین اختصاصیت ویروس پرایمر طراحی شده را رابا نمونه ها ی ویروس لکه سفید (WSSV)و ویروس پارو ویروس هپاتوپانکراس (HPV) آزمایش داده و اختصاصیت آن را بررسی می کنیم.

۳-نتایج

۳-۱- بیماریزایی

پس از انجام عملیات مواجهه سازی ویروس با میگوهای پا سفید غربی بالغ با وزن ۷ تا ۱۲ گرم و همچنین پست لاروهای ۱۰ تا ۱۵ روزه میگوی پا سفید غربی که شرح آن بیان شد نتایج حاصل از این مطالعه با توجه به روش های تشخیصی مختلف به کار گرفته در این تحقیق حاکی از ایجاد بیماری در میگوهای تیمار تحت مطالعه بود. در ادامه نتایج حاصل از روش های تشخیصی مذکور در قسمت های مربوطه آورده شده است .

۳-۲- علائم کلینیکی

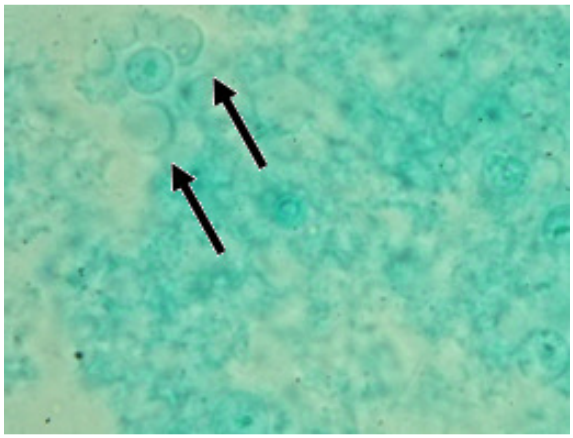
علائم بالینی که در طی انجام مطالعه در میگوهای تیمار مشاهده گردید می توان به بی اشتهایی ، بی حالی ، تحریک پذیری در میگوهای بالغ اشاره کرد و در واقع در مورد میگوهای بالغ می توان اینطور اظهار نظر کرد که علائم بالینی شاخصی که بتوان به قطعیت گفت ناشی از این بیماری و در واقع نشانه پاتوگونومیک بیماری است مشاهده نگردید . در پست لاروها علائم بالینی ناشی از بیماری شامل بی حالی ، بی اشتهایی ، سفید شدن قسمت روده میانی ، رفتارهای شناگری غیرعادی ، حرکت مارپیچی در ستون آب ، شنای یکطرفه و همچنین مرگ و میر و تلفات مشاهده گردید. لازم به ذکر است در میگوهای کنترل بالغ و پست لارو هیچ گونه علائمی از بیماری مشاهده نشد. در مورد تلفات نیز در بالغین چه گروه کنترل و چه گروه تیمار تلفاتی وجود نداشت. اما در پست لاروها تلفات وجود داشت و میزان مرگ و میر تجمعی در گروه تیمار ۱۸/۸۳ درصد و در گروه کنترل ۲/۸۳ درصد بود . (جدول ۴-۱).

جدول ٤-۱- میزان مرگ و میر تجمعی در گروه های مختلف میگوی مورد آزمایش

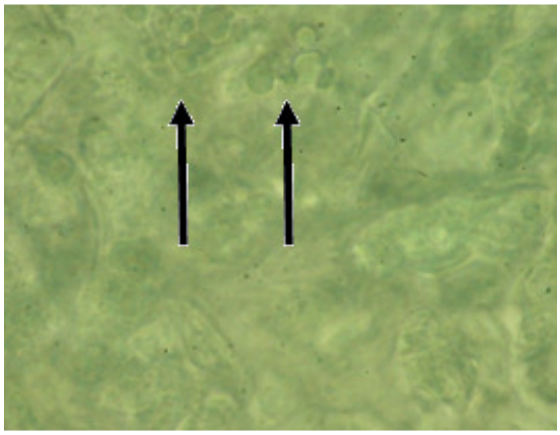
میزان مرگ و میز تجمعی (٪)	گروه ها
۰	تیمار بالغ (مواجهه با ویروس از طریق آب)
۰	تیمار بالغ (مواجهه با ویروس از طریق غذا)
۰	کنترل بالغ (بدون مواجهه با ویروس)
۱۸/۸۳	تیمار پست لارو (مواجهه با ویروس از طریق آب)
۲/۸۳	کنترل پست لارو (بدون مواجهه با ویروس)

۳-۳- گسترش مرطوب

در طی انجام مطالعه گسترش مرطوب از میگوهای هردو گروه سنی صورت گرفت . به این صورت که در بالغین از هپاتوپانکراس و مدفوع و در پست لاروها از هپاتوپانکراس گسترش مرطوب تهیه می شد . در پست لاروها از روز دوم به بعد گنجیدگی های داخل هسته ای (OB) در هپاتوپانکراس تصویر (۴-۱) را مشاهده نمودیم . در بالغین نیز در هر گروه مواجهه داده شده از طریق آب و غذا در روز پنجم در هپاتوپانکراس گنجیدگی های داخل هسته ای (تصویر ۴-۲) مشاهده شد و در مدفوع تا روز پایانی مطالعه هیچ گنجیدگی مشاهده نشد .



تصویر ٤-۱- گسترش تهیه شده از هپاتوپانکراس پست لارو میگوی وانامی که عفونت به MBV را نشان می دهد (پیکان) . رنگ آمیزی مالاشیت گیری ۰/۱ درصد ، بزرگنمایی x ۱۰۰۰ .



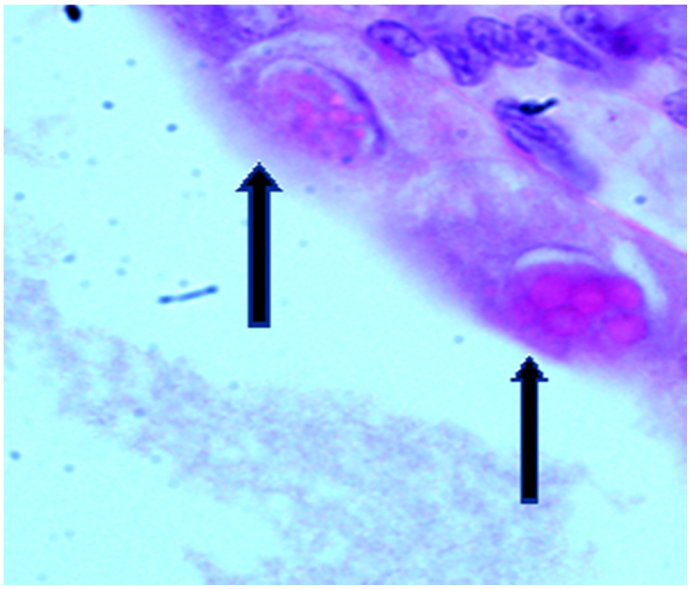
تصویر ٤-۲- گسترش تهیه شده از هپاتوپانکراس میگوی بالغ وانامی که عفونت به MBV را نشان میدهد(پیکان) . رنگ آمیزی مالاشیت گیری ۰/۱ درصد ، بزرگنمایی x ۱۰۰۰ .

.

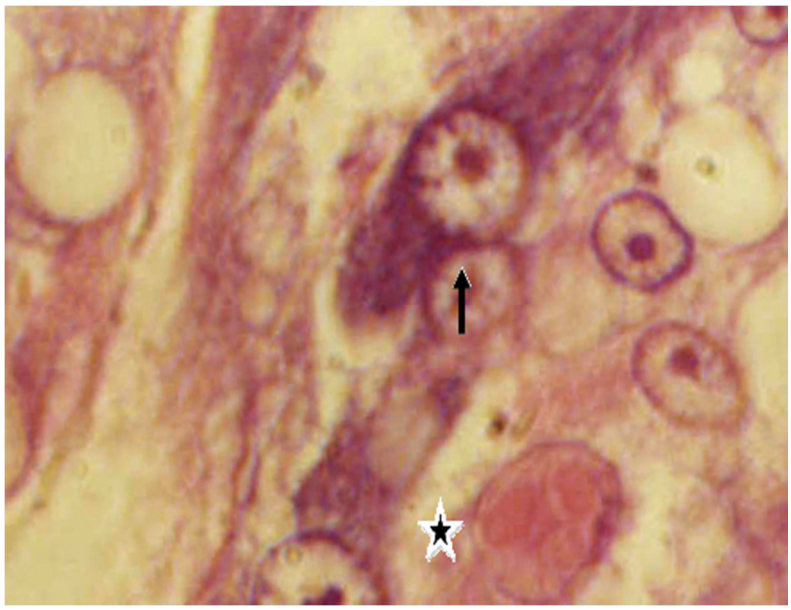
٤-٣- نتایج حاصل از بررسی آسیب شناسی

در مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده توسط رنگ هماتوکسیلین ائوزین و فلوکسین (H & E / PH) آسیب های ناشی از بیماری MBV در سلول های هپاتوپانکراس و اپی تلیوم روده میانی میگوهای بالغ و سلول های هپاتوپانکراس پست لاروها قابل مشاهده بودند .

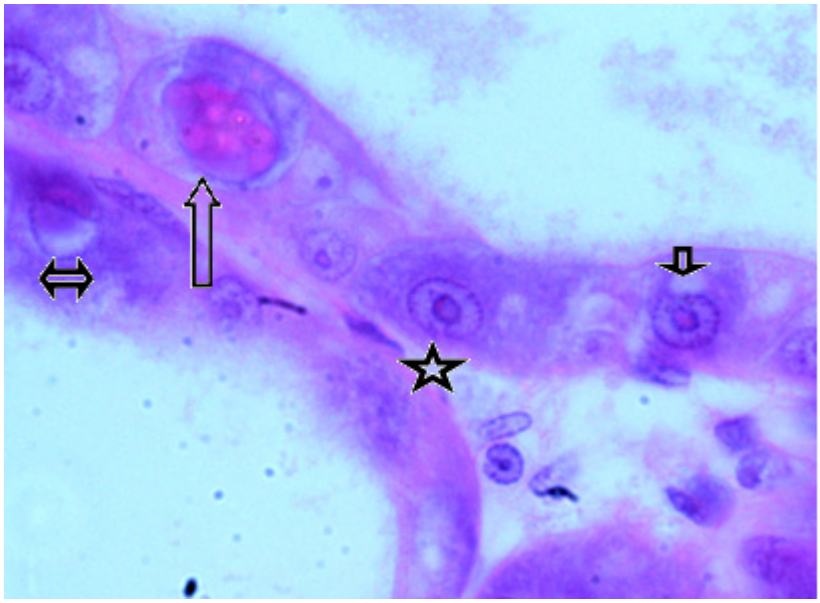
تشخیص بیماری براساس وجود گنجیدگی های MBV و تغییرات ایجاد شده در مقاطع بافت های هدف هپاتوپانکراس و روده میانی صورت گرفت . گنجیدگی ها به صورت تکی یا چند تایی داخل هسته سلول های هپاتوپانکراس و سلول های پوششی روده میانی وجود داشتند (تصویر ۴-۳) . در مراحل اولیه آلودگی ، گنجیدگی ها قابل مشاهده نبودند و سلول های آلوده در مراحل اولیه دارای هیپرتروفی هسته با کروماتین های هسته ای کاهش یافته بودند به طوریکه هستک به کنار رفته و هسته شکل انگشتر نگین دار به خود گرفته بود(تصویر۴-۴) . در بررسی های صورت گرفته از مقاطع بافتی میگوهای بالغ و پست لاروها به طور کلی تغییرات سلولی شامل هسته های هیپرتروفی شده ، مهاجرت کروماتین ها ، جا به جایی هستک ، وجود گنجیدگی های داخل هسته ای ، واکنش های التهابی به صورت نفوذ هموسیت ها در فضای بین سلولی ، نکروز سلول های اپی تلیال هپاتوپانکراس و روده میانی به صورت ملایم تا شدید قابل مشاهده بودند (تصویر ۴-۵) .



تصویر ٤-٣- بافت هپاتوپانکراس در میگوی آلوده به MBVبا آلودگی در سلولهای هپاتوپانکراس و تعداد زیاد گنجیدگی Occlusion body(OB) به رنگ قرمز (پیکان). H&E/Ph/Mag.1000



تصویر ٤-٤- بافت هپاتوپانکراس در پست لارو که دارای هیپرتروفی هسته (پیکان) و حالت حلقه انگشتری در هسته(ستاره) می باشد..H&E/Ph.Mag 1000

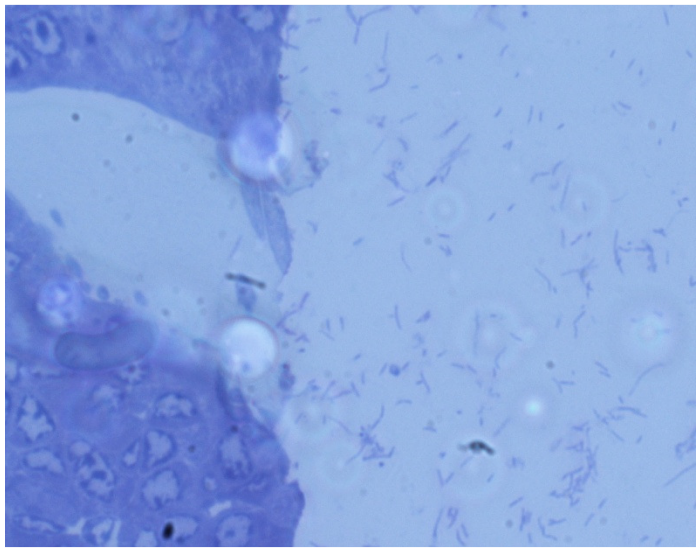


تصویر ٤-٥- بافت هپاتوپانکراس در میگوی آلوده به MBV که در این تصویر مراحل مختلف شامل هیپرتروفی هسته (ستاره)، مهاجرت کروماتینها(پیکان کوچک)، جابجائی هستک (پیکان دو طرفه) و کنجیدگیهای داخل سلول OB(پیکان) مشاهده می‌شود..H&E/Ph.Mag 1000

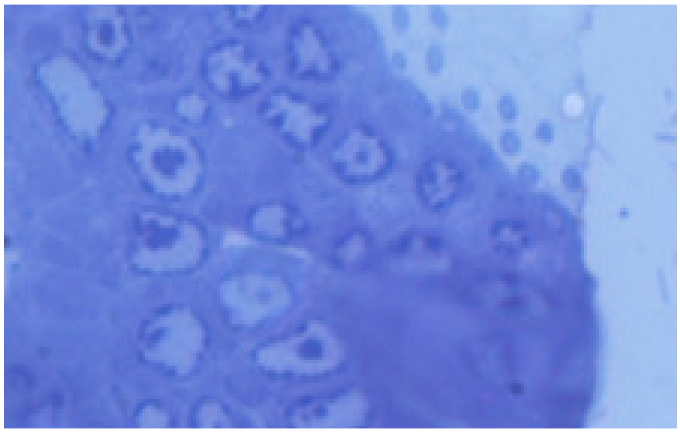
٥-٣- نتایج میکروسکوپ الکترونی

مطالعه نمونه های تهیه شده از میگوهای مواجهه داده شده با ویروس به وسیله میکروسکوپ الکترونی وجود ویروس را مورد تائید قرار داد . همچنین در مطالعات میکروسکوپ الکترونی مراحل مختلف بیماریزایی ویروس

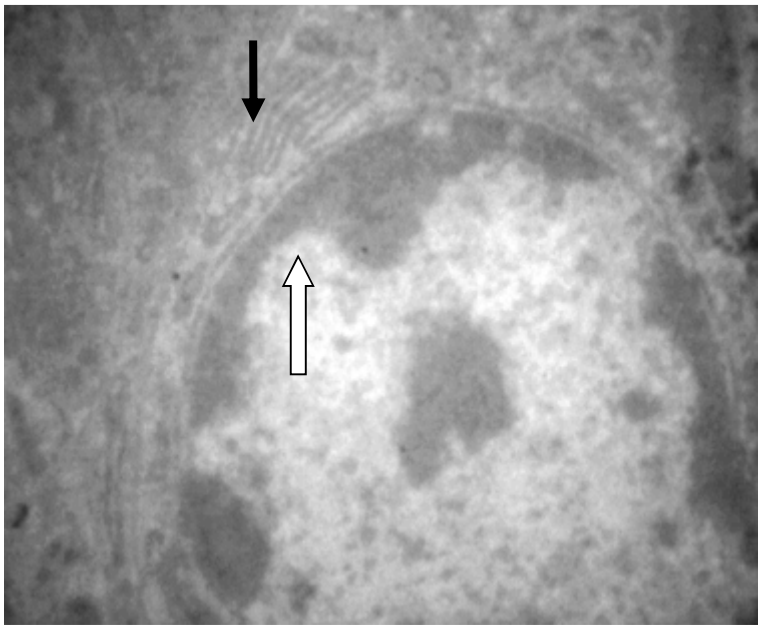
مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات میکروسکوپ الکترونی ابتدا با رنگ امیزی متیلن بلو بافتهائی که تهیه شده را بررسی و بافت مناسب که کنجیدگیهای ویروسی در بافتها قابل دیدن باشد برای برش نهائی آماده میکنیم (تصوی ۴-۶و تصویر۴-۷). سه مرحله بیماریزایی این ویروس مشاهده شد مرحله اول سلول های هیپرتروفی کمی از خود نشان می دادند و هستک تغییر شکل داده و به سمت غشاء هسته مهاجرت کرده بود کروماتین ها تجزیه شده و به صورت نقاط روشن در مرکز سلول دیده می شدند حالت انگشتر نگین دار در سلول مشاهده می شد(تصویر ۴-۸). مرحله دوم دارای هسته هیپرتروفی و یک یا چند گنجیدگی کوچک بودند(تصویر ۴-۹). در مرحله سوم هسته سلول ها کاملاً هیپرتروفی شده به طوریکه فضای سلول را کاملاً پر کرده و فقط یک لایه نازکی از سیتوپلاسم باقی مانده بود (تصویر۴-۱۰) . در واقع نتایج بدست آمده حاکی از هیپرتروفی سلول ها ، تغییر شکل هستک و مهاجرت آن ، تجزیه کروماتین ها ، حالت حلقه انگشتری هسته ، وجود گنجیدگی های سلولی می باشد . با بزرگنمائی بالاتر ویروس مونودون باکولوویروس که دارای پوشش بوده و در حال عرضی و طولی است مشاهده میشود (تصویر ۴-۱۱).



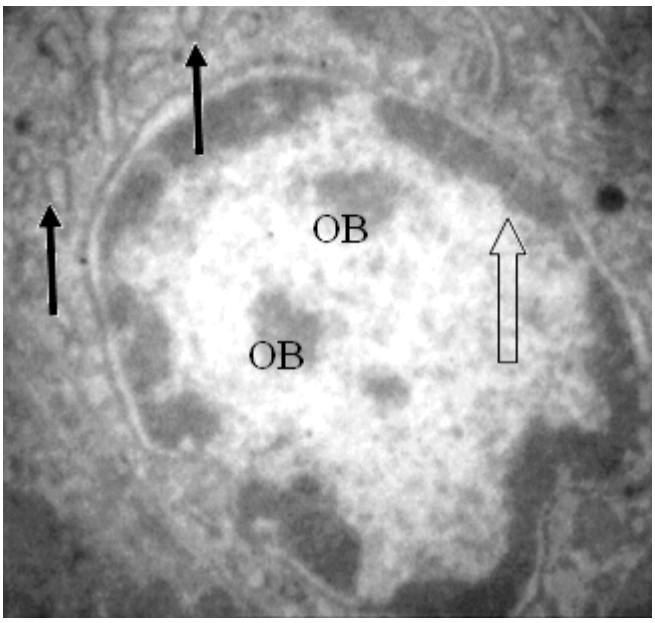
تصویر ٤-٦- رنگ آمیزی متیلن بلو برای انتخاب بافت مناسب در تهیه برشهای میکروسکوپ الکترونی .رنگ آمیزی متیلن بلو. Mag1000



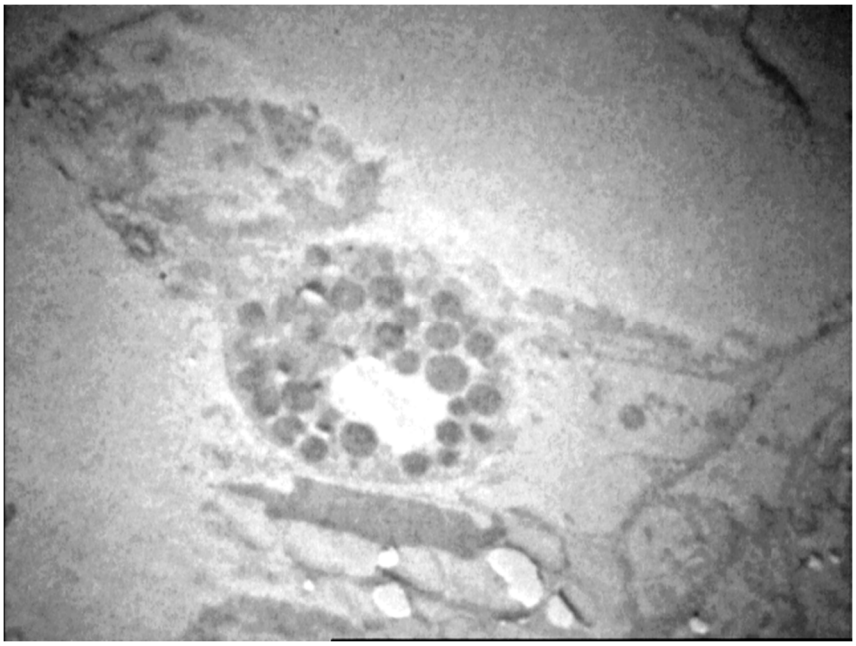
تصویر ٤-٧- رنگ آمیزی متیلن بلو برای انتخاب بافت مناسب در تهیه برشهای میکروسکوپ الکترونی . در این تصویر کنجیدگیهای ویروسی جهت تهیه برشهای مناسب میکروسکوپ الکترونی انتخاب گردیدند.رنگ آمیزی متیلن بلو. Mag1000



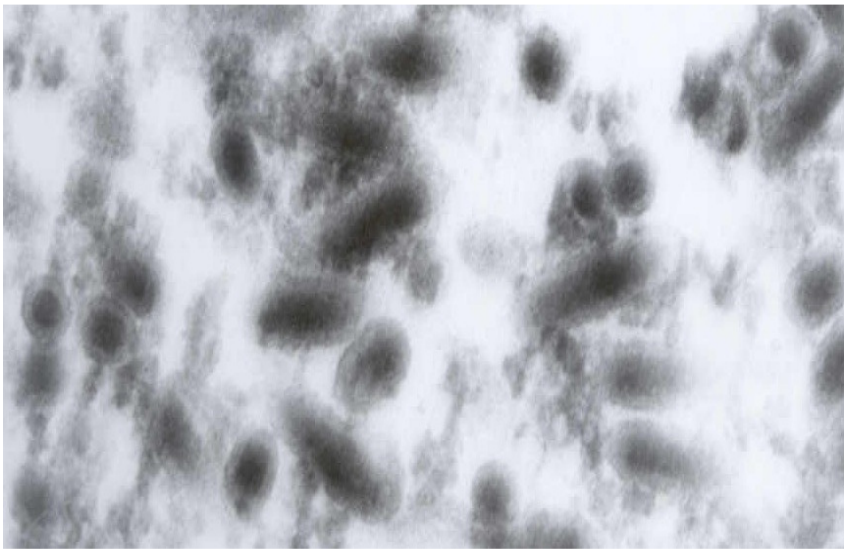
تصویر ٤-٨- مرحله اول بیماری MBV . بزرگ شدن هسته سلولهای آلوده و مهاجرت کروماتینها(پیکان سفید) و شبکه آندوپلاسمیک (پیکان سیاه) بزرگنمای ٦٠٠٠ ، میکروسکوپ الکترونی



تصویر ٤-٩- مرحله دوم بیماری MBV. مرحله دوم هسته هیپرتروفی و یک یا چند گنجیدگی کوچک (OB)در سلول مشاهده میشود.همچنین مهاجرت کروماتینها (پیکان سفید) و تغییرات شبکه آندوپلاسمیک (پیکان سیاه) بزرگنمای ٦٠٠٠ ، میکروسکوپ الکترونی



تصویر ٤-١٠- مرحله سوم بیماری MBV که تعداد زیادی گنجیدگی های سلولی در داخل هسته مشاهده می شود .



تصویر ٤-١١- مشاهده ویروس مونودن باکولوویروس در برشهای عرضی و طولی

٦-٣- بررسی شدت عفونت ایجاد شده در بیماری

در این مطالعه با توجه به یافته های آسیب شناسی شدت عفونت طبق جدول ۴-۲ درجه بندی گردید . از طرفی میزان عفونت نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت . بر این اساس نمونه های مربوط به روزهای بعد از مطالعه مورد بررسی قرار گرفت و درجه شدت عفونت و میزان عفونت مشخص گردید (جدول های (۴-۳) ، (۴-۴) .

بر اساس جدول ۴-۲ شدت عفونت به پنج درجه درجه تقسیم میگردد. درجه صفر در بافتهای آسیب شناسی نشانه ائی از آلودگی و آسیب به بافتها مشخص نمی‌باشد و میتوان گفت بافت سالم است (تصویر ۴-۱۲). در درجه ۱ شدت آلودگی آسیب های مختصری مشاهده ولی بیماری قابل ملاحظه نیست(تصویر ۴-۱۳) ، در درجه دوم آسیب های خفیف از بیماری در بافتها قابل مشاهده میگردد(تصویر ۴-۱۴) ولی در درجه سوم و چهارم عفونت گسترده (تصویر ۴-۱۵) و در درجه چهارم بیماری به اوج خود رسیده است (تصویر ۴-۱۶).

جدول ٤-٢- درجه بندی شدت عفونت (*SOI*) براساس یافته های آسیب شناسی

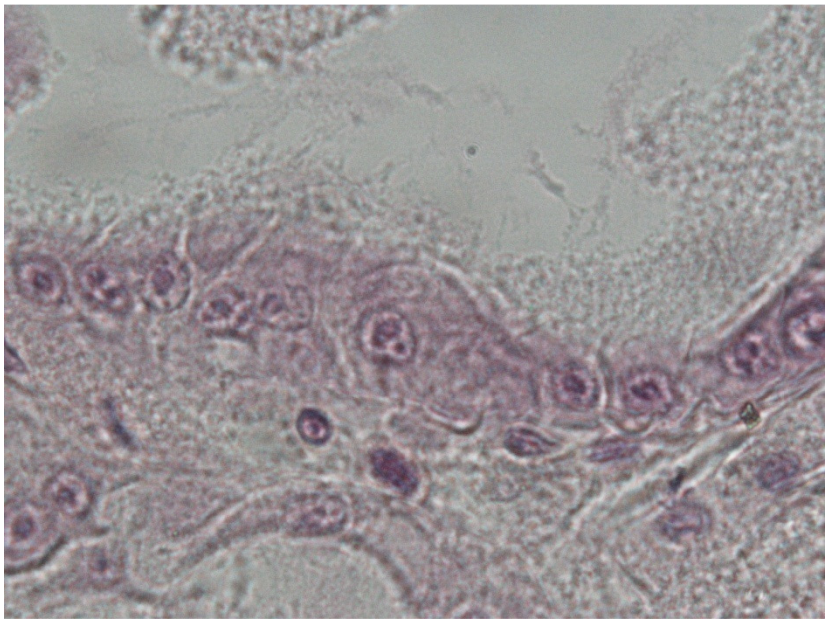
درجه شدت	یافته های آسیب شناسی
۰	بدون نشانه آلودگی و بدون آسیب مشخص بیماری در بافت ها .
۱	آسیب های مشخص بیماری موجود ولی بیماری قابل ملاحظه نیست .
۲	آسیب های خفیف یا متوسط مشخص بیماری موجود می باشد .
۳	آسیب های متوسط تا شدید مشخص بیماری موجود می باشد .
۴	آسیب های شدید مشخص بیماری موجود می باشد .

جدول ٤-٣-درجه شدت عفونت در گروه های کنترل و تیمار دو گروه سنی میگوی مورد مطالعه

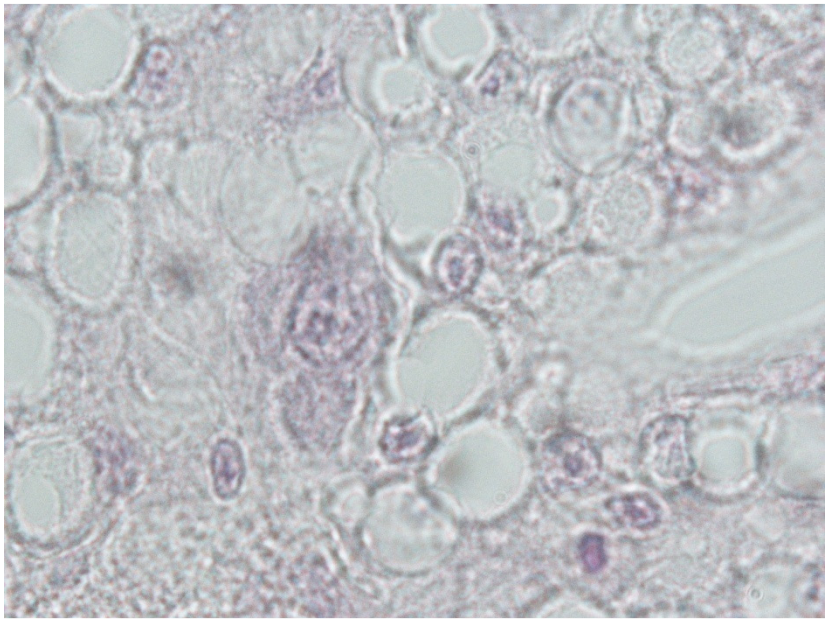
گروه ها / روز	تیمار بالغ (مواجهه با ویروس از طریق آب)	تیمار بالغ (مواجهه با ویروس از طریق غذا)	کنترل بالغ (بدون مواجهه)	تیمار پست لارو (مواجهه با ویروس از طریق آب)	کنترل پست لارو (بدون مواجهه)
۱	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۰	۱	۰
۳	۰	۰	۰	۲	۰
۴	۱	۱	۰	۳	۰
۵	۲	۲	۰	۴	۰
۶	۲	۲	۰	۴	۰

جدول ٤-٤- میزان درصد عفونت در گروه های کنترل و تیمار دو گروه سنی میگوی مورد مطالع

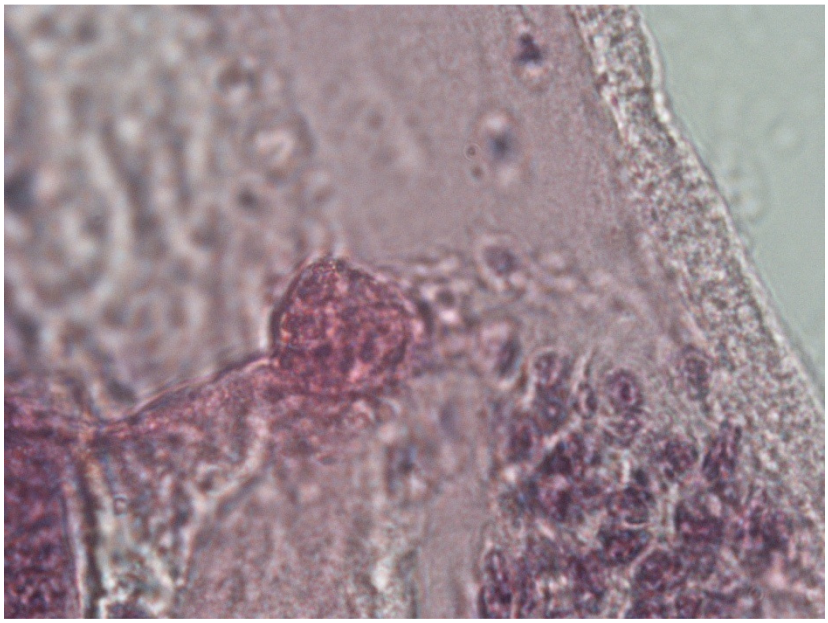
گروه ها / روز	تیمار بالغ (مواجهه با ویروس از طریق آب)	تیمار بالغ (مواجهه با ویروس از طریق غذا)	کنترل بالغ (بدون مواجهه)	تیمار پست لارو (مواجهه با ویروس از طریق آب)	کنترل پست لارو (بدون مواجهه)
۱	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۰	۶۰	۰
۳	۰	۰	۰	۸۰	۰
۴	۱۰	۱۰	۰	۹۰	۰
۵	۱۵	۱۵	۰	۱۰۰	۰
۶	۲۵	۲۵	۰	۱۰۰	۰



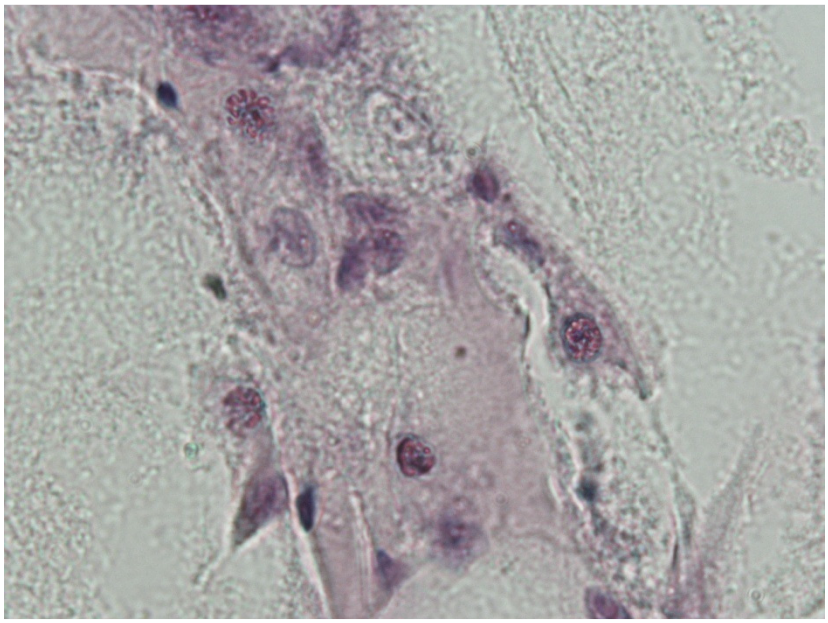
تصوير ٤-١٢- بافت هپاتوپانکراس ميگوی بالغ سالم.H&E/Ph.Mag٤٠٠



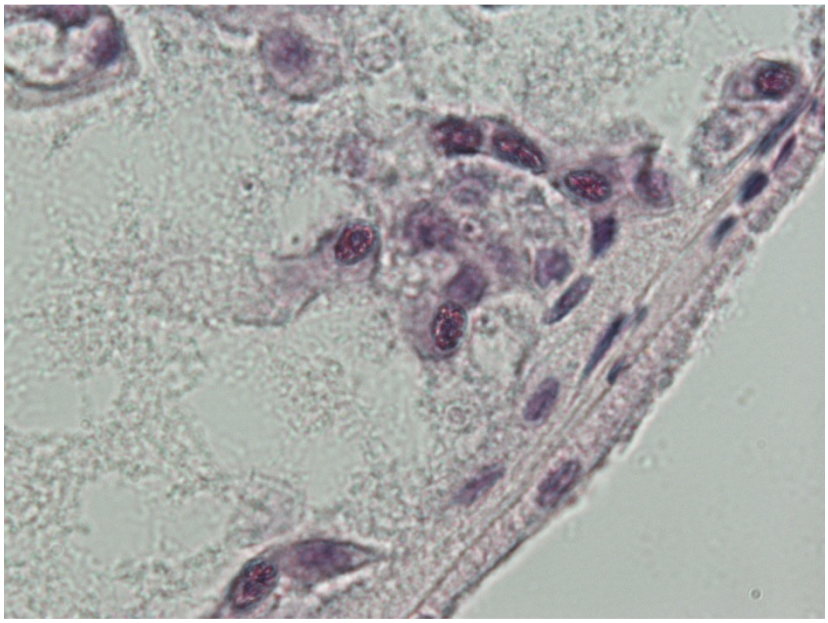
تصوير ٤-١٣-بافت هپاتوپانکراس ميگوی بالغ آلوده به MBV که دارای هيپرتروفی هسته و حالت حلقه انگشتری (درجه شدت عفونت ١). H&E/Ph.Mag٤٠٠



تصویر ٤-١٤- بافت هپاتوپانکراس میگوی بالغ آلوده با MBV که دارای هیپرتروفی هسته و حالت نگین انگشتری در هسته و همچنین دارای گنجیدگی داخل هسته ای می باشد (درجه شدت عفونت ۲). H&E/Ph.Mag٤٠٠



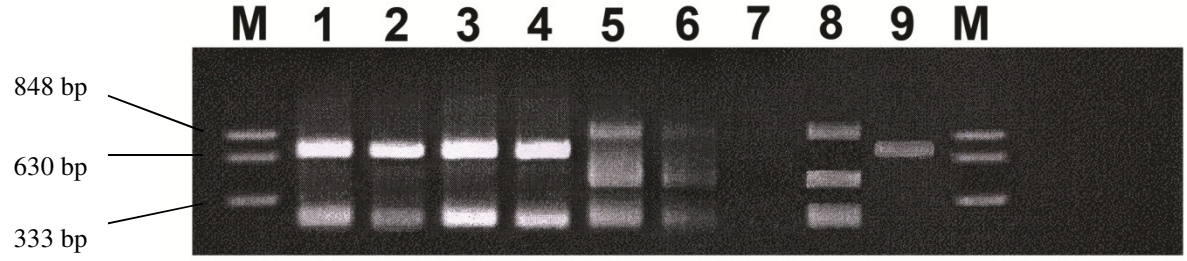
تصویر ٤-١٥- بافت هپاتوپانکراس دارای هیپرتروفی زیاد هسته و چندین گنجیدگی داخل سلولی (درجه شدت عفونت ۳). H&E/Ph.Mag٤٠٠



تصوير ٤-١٦- بافت هپاتوپانكراس داراى هيپرتروفى هسته و بزرگ شدن هسته و غالب سلول ها دچار آلودگى هستند (درجه شدت عفونت ٤). H&E/Ph.Mag٤٠٠

٧-٣-نتايج PCR

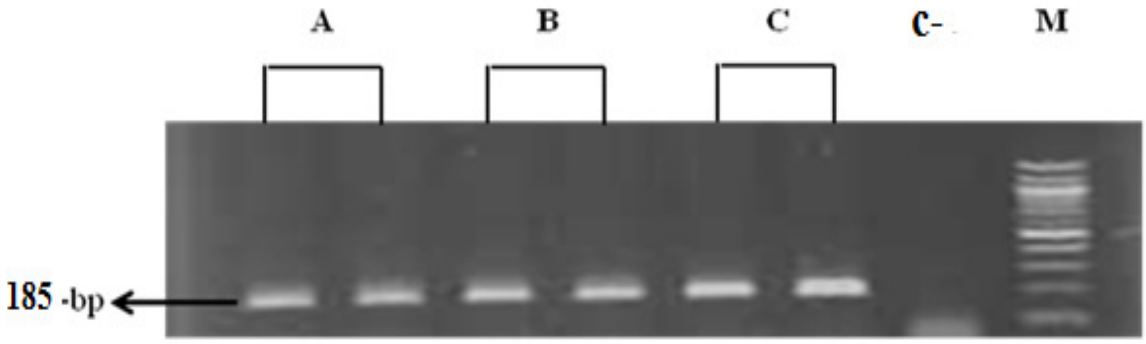
نتايج حاصل از بررسى آزمايشات مولكولى PCR نمونه هاى اخذ شده از پست لاروها و ميگوهاى بالغ مواجهه داده شده با ويروس حاكى از وجود ويروس مونودون با كولوويروس در اين نمونه ها بود و وجود بيمارى را تائيد كرد (تصوير ۴-۳) . نمونه هاى مثبت با تشكيل باندهاى و 225bp و 444bp بر روى ژل آگاروز مشخص ميباشند.اين نتايج بااستفاده از كيت IQ2000بدست آمد.(تصوير ۴-۱۷).



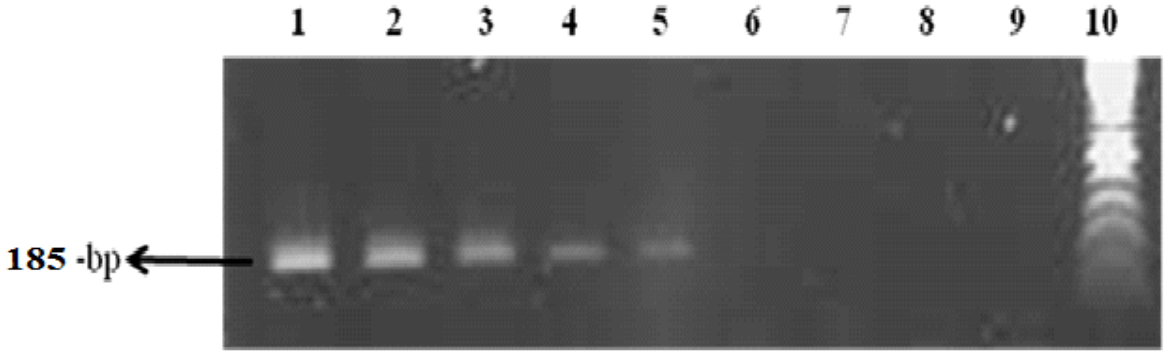
تصوير ٤-١٧- نتايج PCR نمونه هاى اخذ شده از پست لاروها به ميگوهاى بالغ . marker : M ، ١ و ٢ : ميگوى بالغ مواجهه داده شده از طريق آب ، ٣ و ٤ : ميگوى بالغ مواجهه داده شده از طريق غذا ، ٥ و ٦ : پست لارو مواجهه داده شده از طريق آب ، ٧ : كنترل منفى ، ٨ : كنترل مثبت ، ٩ : نمونه منفى

۸-۳- نتایج PCR با پرایمر طراحی شده:

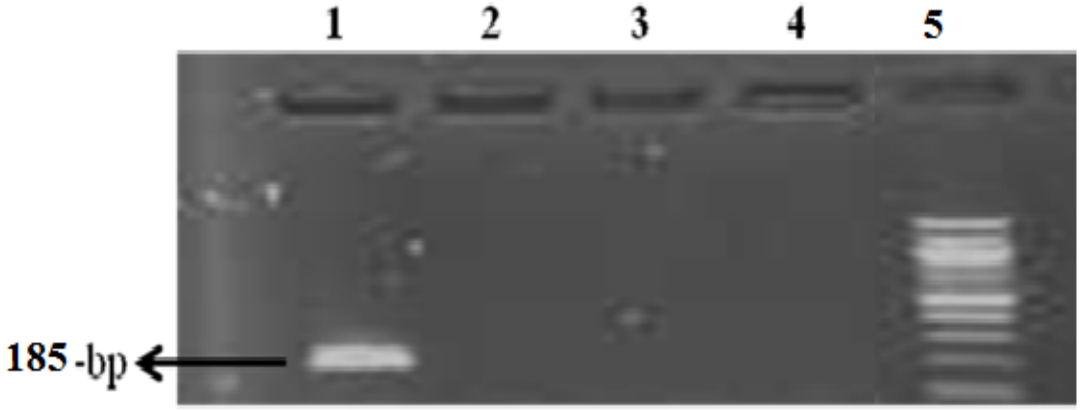
نتایج آزمایش مولکولی پرایمر طراحی شده نشان میدهد کـه ویـروس MBV در نمونـه هـای آلـوده بـر روس ژا آگاروز باند ۱۸۵bpرا در درجه حراراتهای مختلف ۵۵، ۵۷ و ۶۰ درجه تشـکیل میدهـد ولـی بـه نظـر میرسـد در درجه حرارت ۶۰ درجه باند تشکیل شده بهتر و مشخص تر است (تصویر.....). در خصـوص حساسـیت پرایمـر طراحی شده آزمایش نشان میدهد که پرایمر و روش ایجاد شده با میزان ۱۰۰ pg دارای حساسیت بوده و قادر بـه شناسائی نمئنه هائی با این میزان DNA آلوده میباشد.(تصویر.....). همچنین به منظـور بررسـی اختصاصـیت پرامیـر طراحی شده و آزمایش پرایمر با نمونه ویروس لکه سفید و پاروویرس هپاتوپانکراس و همچنین آب مقطر نشان میدهد که این پرایمر فقط به ویروس MBV حساسیت نشـان میدهـد و بـه ویروسـهای دیگـر حساسـیتی نداشـته و اختصاصی مونودن باکولوویروس میباشد (تصویر.....).



تصویر٤-۱۸: آزمایش پرایمر طراحی شده با سه درجه حرارت ۵۵درجه سانتی گراد(A)، ۵۷ درجه سانتی گراد (B) و ٦٠ درجه سانتی گراد (C). حساسیت ٦٠ درجه از بقیه درجه حرارتها بیشتر و باند واضح تری را تشکیل میدهد.باند تشکیل شده در هر سه درجه حرارت ۱۸۵bpمیباشد.



تصویر٤-۱۹: حساسیت پرایمر طراحی شده در تشخیص نمونه های الوده به میزان ۱۰۰ pgبوده و کمتر از قادر به تشخیص نمی‌باشد.



تصوير ٤-٢٠.: اختصاصيت پرايمر طراحي شده كه در آزمايش با دو ويروس لكه سفيد(٢) و پاروويرس (٣) و آب مقطر(٣) فقط ويروس MBV (١) را ميتواند شناسائي كند.

٤-بحث

در این مطالعه ابتدا نسبت به شناسائی ویروس مونودن باکولوویروس بر اساس روشهای مختلف شامل علائم بالینی بیماری، تهیه لام مرطوب ، آسیب شناسی ، استفاده از روشهای مولکولی و میکروسکوپ الکترونی اقدام و بعد از تایید ویروس نسبت به طراحی پرایمر برای شناسائی ویروس اقدام نمودیم. Brock و همکاران (۱۹۸۳) علائم بالینی ناشی از بیماری MBV راشامل بی حالی و بی اشتهایی و توقف فعالیت های نمایشی دانسته و عنوان نموده اند که میگوهای مبتلا کندی رشد ، تغییر رنگ خاکستری – آبی تا سیاه متمایل به آبی ، بیماری پوسته و فولینگ اپی بیوتیک میکروبی دارند . Paynter و همکاران (۱۹۹۲) عنوان می دارند که اکثر عفونت های MBV در میگوها در محدوده سنی مایسس ۳ (Mysis 3) تا پست لارو ۲۰ (Pl20) ایجاد می شود و علائم بالینی بیماری در میگوهای که به طور شدید آلوده شده اند شامل ظاهر شیری رنگ تا سفید غدد گوارشی ، رفتارهای شناگری غیر عادی ، حرکت مارپیچی در ستون آب و شنای یک طرفه می باشد.

این علائم در آزمایش زیست سنجی نیز شامل بی اشتهایی ، بی حالی ، تحریک پذیری میتوان اشاره کرد . در پست لاروها علائم بالینی ناشی از بیماری شامل بی حالی ، بی اشتهایی ، سفید شدن قسمت روده میانی ، رفتارهای شناگری غیر عادی ، حرکت مارپیچی در ستون آب ، شنای یکطرفه و همچنین مرگ و میر و تلفات مشاهده گردید در میگوهای نابالغ (پست لارو) در هر دو گروه تیمار و کنترل تلفات مشاهده شده و میزان مرگ و میر تجمعی در گروه تیمار ۱۸/۸۳ درصد و در گروه کنترل ۲/۸۳ درصد بود . با توجه به میزان مرگ و میر تجمعی میتوا گفت به دنبال ایجاد بیماری در گروه های تیمار پست لارو از لحاظ آماری اختلاف معنی داری بین گروه تیمار پست لارو و کنترل پست لارو وجود دارد ($p<0/05$) و همچنین اختلاف آماری معنی دار در مرگ و میر تجمعی گروه تیمار پست لارو و گروه های تیمار بالغ (از طریق غذا و آب) وجود دارد ($p<0/05$) .

در مطالعات صورت گرفته توسط Lightner و همکاران (۱۹۸۱) و افشار نسب (۱۳۸۶ b)ذکر گردیده است که میگوهای آلوده به این بیماری بی حال و بی اشتها بوده و تمایلی به حرکت ندارند و همچنین از علائم شخص این بیماری سفید شدن قسمت روده میانی می باشد که اغلب در مراحل زوآ ، مایسس و ابتدای دوره پست لاروی اتفاق می افتد .

انجام مطالعه از طریق گسترش مرطوب وجود گنجیدگی های داخل هسته ای (OB) در هپاتوپانکراس پست لاروهای مشکوک به بیماری مشاهده گردید. ای علائم در نمونه های مواجهه شده نیز از روز دوم بعد از مواجهه را مشاهده گردید. در بالغین نیز در هر دو گروه تیمار از طریق غذا و آب گنجیدگی ها در روز پنجم مطالعه در هپاتوپانکراس مشاهده شد و در مدفوع بالغین نیز تا روز پایان مطالعه هیچ گنجیدگی مشاهده نشد . در مطالعه Paynter و همکاران گنجیدگی های ناشی از بیماری MBV در پست لاروهای میگوی گونه *Penaeus monodon* دو روز پس از مواجهه قابل مشاهده بوده اند که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد و نشان می دهد که در پست لاروهای میگوی وانامی نیز همانند پست لاروهای پنئوس مونودون دو روز پس از مواجهه با ویروس

گنجیدگی های ناشی از بیماری در گسترش مرطوب هپاتوپانکراس قابل مشاهده است . از طرفی در این مطالعه گنجیدگی های ناشی از بیماری در هپاتوپانکراس بالغین مواجهه داده شده از طریق آب و غذا در روز پنجم بعد از مواجهه در گسترش مرطوب مشاهده شده است و گنجیدگی ها نیز تا روز پایان مطالعه در مدفوع مشاهده نشده اند که این مسئله می تواند ناشی از مقاومت بیشتر بالغین نسبت به پست لاروها به بیماری دانست که دیرتر گنجیدگی ها در هپاتوپانکراس مشاهده گردیده است همچنین در مورد عدم اختلاف در زمان مشاهده گنجیدگی در میگوهای بالغ تیمار از طریق غذا و آب می توان اینطور اظهار کرد که مواجهه از طریق غذا و آب هر دو قادر به ایجاد بیماری می باشد و از لحاظ بیماریزایی اختلاف چندانی با هم ندارند از طرفی عدم مشاهده گنجیدگی در مدفوع بالغین با توجه به این مسئله که در مورد میگوی پنئوس مونودون مبتلا به بیماری نمی توان تا سه هفته بعد از عفونت گنجیدگی را در مدفوع و همچنین مرگ و میرهای غیر معمولی را مشاهده کرد (Paynter , unpub Lished) می توان به مقاومت میگوهای بالغ نسبت به این بیماری نسبت داد .

نتایج حاصل از بررسی های هیستوپاتولوژیکی با میکروسکوپ نوری آسیب های ناشی از بیماری MBV را در سلول های هپاتوپانکراس و اپی تلیوم روده میانی میگوهای بالغ و پست لارو را نشان داد که این تغییرات هیستوپاتولوژیک را می توان به این صورت بیان داشت که مرحله اولیه تغییرات سلولی شامل هیپرتروفی هسته همراه با مهاجرت کروماتین ، جا به جایی هستک از مرکز و ایجاد حالتی شبیه انگشتر نگین دار signet ring می باشد در مرحله میانی هستک ها کاملاً تجزیه گردیده و هسته کاملاً بزرگ و هایپر تروفی شده و دارای تعدادی گنجیدگی قرمز رنگ می باشد و به نظر می رسد تشکیل گنجیدگی از این مرحله آغاز می گردد . در مرحله پیشرفته هسته کاملاً هیپرتروفی و بزرگ می شود و گنجیدگی ها در هسته ای هایپر تروفی شده مشاهد می شود . در تقسیم بندی مراحل تغییرات هیستوپلاتوژیک مطالعه حاضر از مطالعه افشار نسب b ۱۳۸۶ پیروی گردیده است که در مطالعات خود تغییرات سلولی ناشی از MBV را در بافت های هدف را در سه مرحله اولیه ، میانی و پیشرفته قرار داده است . لازم به توضیح است که در مطالعه حاضر در خصوص تعداد گنجیدگی ها در هسته در مواردی تعداد گنجیدگی ها بیش از آنچه که در مطالعات قبلی بیان شده (یعنی بین ۵-۳ گنجیدگی در هسته) مشاهده شد یعنی در مواردی بیشتر از ۵ گنجیدگی در هسته مشاهده کردیم که شاید بتوان اینطور اظهار داشت که ممکن است با سویه متفاوتی از ویروس رو به رو هستیم .

در بررسی و مطالعات هیستوپاتولوژیک Vijayan و همکاران ۱۹۹۵ تعداد کمی از سلول ها ، هسته هیپرتروفی شده به صورت signetcell با جا به جایی هستک به پیرامون و هستک های متراکم ذکر گردیده است و همچنین آنها هیپرتروفی هسته و به دنبال آن تخریب سلولی و پوسته پوسته شدن سلول های اپی تلیال را از تغییرات بافت شناسی روشن عنوان نموده اند . در مطالعه فوق واکنش های التهابی نظیر نفوذ هموسیت هاو تشکیل نودول و همچنین تغییرات نکروتیک و التهابی در نمونه های مورد بررسی وجود نداشته است .

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می دهد که پست لاروهای میگوی وانامی استفاده شده در مواجهه نسبت به بالغین در مقابل ویروس MBV حساستر می باشند به این صورت که در میگوهای تیمار از طریق آب پست لارو از روز دوم پس از مواجهه ما علائم هیستوپاتولوژیک ناشی از بیماری را در مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده نمودیم و در واقع از لحاظ درجه بندی شدت عفونت در روز دوم پس از مواجهه درجه شدت عفونت یک ، در روز سوم درجه شدت ۲ و در روز چهارم درجه شدت ۴ ، در روز پنجم و ششم پس از مواجهه درجه شدت ۴ را مشاهده نمودیم . در تیمارهای بالغ چه در مواجهه از طریق غذا و چه از طریق آب در روز چهارم پس از مواجهه درجه شدت یک و در روزهای پنجم و ششم درجه شدت ۲ را مشاهده نمودیم . همچنین نتایج فوق مقاومت بیشتر بالغ ها نسبت به بیماری تائید می کند و از طرفی در مورد تیمارهای بالغ می توان چنین بیان نمود که تفاوتی بین مواجهه از طریق آب و از طریق غذا از لحاظ علائم آسیب شناسی وجود ندارد و هر دو طریقه مواجهه توانسته بیماری را در میگوها ایجاد نماید . در مطالعه حاضر در ارتباط با میزان درصد عفونت که حاصل بررسی های بافت شناسی صورت گرفته می باشد در تیمارهای از طریق آب در پست لاروها از روز دوم پس از مواجهه تا روز ششم به ترتیب ۶۰ ، ۸۰ ، ۹۰ ، ۱۰۰ ، ۱۰۰ میزان درصد عفونت بود و در تیمارهای میگوی بالغ از طریق آب و غذا از روز چهارم پس از مواجهه تا روز ششم به ترتیب ۱۰ ، ۱۵ ، ۲۵ میزان درصد عفونت حاصل گردید . در مطالعه ای که تخم افشان و همکاران در رابطه با مراحل حساس لاروی و پست لاروی پنئوس سمی سولکاتوس نسبت به MBV انجام داده اند نتایج مشابهی با مطالعه حاضر در ارتباط با پست لاروها دارد به این صورت که پست لارو ها علائم MBV را از روز دوم پس از مواجهه به بعد را نشان داده اند . Natividad and lightner 1992 نشان داده اند که مرحله mysis و لاروهای با سن دو روز پنئوس مونودون به ویروس MBV خیلی حساس هستند . اما Paynter و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کرده اند که میزان اکولوژن بادی ها بعد از یک افزایش اولیه در طی هفته اول ، کاهش می یابد . افزایش اولیه احتمالاً به علت نه تنها عفونت اولیه بلکه به دلیل عفونت خود بخودی و عفونت مجدد ناشی از مصرف لاروهای مرده یا ناشی از مصرف گنجیدگی های آزاد شده به داخل آب از طریق لوله گوارشی می باشد . سپس عفونت در هفته دوم کاهش می یابد و در ادامه در هفته سوم یک افزایش ثانویه در روز ۱۶ را داریم و مجدداً از هفته چهارم به بعد یعنی روز ۲۲ میزان گنجیدگی ها کاهش و به سطوح غیر قابل تشخیص می رسد . کاهش میزان گنجیدگی در هفته دوم می تواند با تغییر قابلیت دسترسی سلول های حساس مرتبط باشد .

afsharnasab همکاران (۲۰۰۶) کار مواجهه سازی ویروس MBV را در میگوی پنئوس سمی سولکاتوس را به مدت ۱۰ ساعت انجام داده و توانسته اند بیماری را در پست لاروهای سمی سولکاتوس ایجاد نمایند . Paynter و همکاران ۱۹۹۲ به صورت آزمایشگاهی نشان داده اند که دو ساعت مواجهه سازی برای انتقال MBV به پنئوس مونودون کافی می باشد و در اکثر گروه های آزمایش عفونت در طی دو روز قابل تشخیص بود .

زمان مواجهه سازی برای انتقال MBV به پست لاروها در مطالعات مختلف که تشریح شد ثابت نمی باشد و در مطالعه حاضر پست لاروها و همچنین بالغین به مدت ۲۴ ساعت در مواجهه با ویروس قرار گرفتند . یافته های مطالعه ما در مورد پست لاروها با مطالعات تخم افشان و همکاران ، Paynater و همکاران ۱۹۹۲ در ارتباط با انتقال تجربی ویروس MBV سازگار است .

چهار روش به وسیله Lightner , Natividad ۱۹۹۲ برای برنامه عفونت زایی به کار رفته است که شامل ۱- روش تلقیح با منشا آب برای ناپلی و زوآ ، ۲. روش تلقیح به وسیله غذا با استفاده از ناپلی Artemia salina ۸ روزه به عنوان حامل برای mysis ، ۳. غذادهی مستقیم با استفاده از تکه های ریز پست لاروهای آلوده به ویروس به میگوهای مورد مواجهه، ۴. روش تلقیح تزریقی برای بالغ ها و جوان ها . Paynter و همکاران ۱۹۹۲ گزارش نموده اند که تحت شرایط هچری انتقال افقی خیلی موثر است هر چند که chen و همکاران ۱۹۸۸ یک انتقال خوراکی موفق از بیماری MBV را گزارش نموده اند . در مطالعه ما انتقال از طریق آب در پست لاروها و از طریق آب و غذا در بالغ ها صورت گرفته که به نظر می رسد انتقال ویروس از طریق آب روش مناسبی برای انتقال برای مراحل پست لاروی و بالغ می باشد با مد نظر قرار دادن این نکته که در انتقال بیماری از طریق آب و غذا در بالغین علائم ناشی از بیماری تقریباً یکسان بوده است .

Martin و همکاران ۱۹۸۷ عنوان می دارند که سن میزبان یکی از مهمترین متغیرها در مطالعه با کولوویروسها می باشد . Lightner , Natividad ۱۹۹۲ گزارش نموده اند که شیوع MBV در میان پست لاروهای مراحل بالاتر پنئوس مونودون بیشتر است در حالیکه در پست لاروهای مراحل پائین تر آنقدر به عفونت MBV حساس نیستند . مطالعه حاضر تنوع حساسیت در مراحل پست لاروی و بلوغ را نشان می دهد و این مطلب را می رساند که میگوهای بالغ نسبت به پست لاروها مقاومت بیشتری در برابر MBV دارند . Lightner , Natividad (۱۹۹۲) گزارش نموده اند که در شرایط هچری و شرایط تولید حساسیت پنئوس مونودون به عفونت با MBV به طور زیادی متاثر از سه فاکتور سن ، عادات غذایی حیوان و مقدار پارتیکل های MBV در محیط می باشد .

مطالعات میکروسکوپ الکترونی (TEM) در مطالعه حاضر هیپرتروفی سلول ها ، تغییر شکل هستک و مهاجرت آن ، تجزیه کروماتین ها ، حالت نگین انگشتری هسته و وجود گنجیدگی های سلولی را نشان داد . در مشاهدات و بررسی های صورت گرفته مراحل بیماریزایی ویروس با آنچه که افشار نسبت b ۱۳۸۶ در مورد بیماریزایی ویروس عنوان کرده اند مشابهت دارد . ایشان در مورد مطالعه کامل MBV با میکروسکوب الکترونی (TEM) سه مرحله را در بیماریزایی این ویروس نشان می دهد که مرحله اولیه هیپرتروفی خفیف سلول ها ، تغییر شکل هستک و مهاجرت آن ، تجزیه کروماتین و حالت نگین انگشتری هسته را داریم . در مرحله دوم هیپرتروفی هسته سلول ها و یک یا چند گنجیدگی را داریم و در مرحله پیشرفته یا سوم هسته سلول ها کاملاً هیپرتروفی شده به طوریکه فضای سلول را کاملاً پر می کند و فقط لایه نازکی از سیتوپلاسم باقی می ماند و در این حالت تعداد زیادی گنجیدگی درون هسته مشاهده می شود .

در مطالعه Vikers و همکاران ۲۰۰۰ مشاهدات میکروسکوپ الکترونی در پنئوس مونودون تشریح شده است در این مطالعه آورده است که نوکلئوکپسید های محتوی ژنوم ویروس که به طور آزاد در سیتوپلاسم سلول دیده می شوند به غشاء هسته می چسبند و به نظر می رسد نوکلئوکپسیدها وسیله ای برای انتقال ژنوم ویروس از غشاء پلاسمایی سلول های هپاتوپانکراس به هسته های آنها می باشد .

بررسی های مولکولی وجود بیماری را در پست لاروها و میگوهای بالغ مواجهه داده شده با ویروس را تایید کرد. لازم به ذکر است که استفاده از آزمایشات مولکولی PCR جهت مطمئن شدن از وجود بیماری در نمونه ها و پشتیبان سایر روش های آزمایشگاهی صورت گرفت . در این آزمایشات از کیت تشخیص IQ 2000 استفاده شد که نشان داد این کیت کفایت لازم را در تشخیص بیماری MBV دارد . با توجه به اینکه ویروس در کشورهای مختلف دارای سویه های متفاوت می باشد و لذا محققین در کشورهای خود پرایمر های خاص برای این ویروس طراحی نموده اند (Boonsanong chokying , 2005) . که در این پروژه نیز ما پرایمر خاصی را طراحی و استفاده نمودیم. پرایمر طراحی شده در این مطالعه میتواند باندی به وزن ۱۸۵bpرا بر روی ژل آگاروز تشکیل دهد. پرایمر طراحی شده در درجه حرارتهای ۵۵،۵۷ و ۶۰ درجه بعنوان دمای اتصال (Anneaaling) آزمایش گردید و مشخص گردی بهترین و مشخصترین باندها در درجه حرارت ۶۰ درجه آشکار میشود. بطورکلی دمای اتصال به عنوان یک شاخص در طی مرحله PCR استفاده میشود. دمای اتصال که دمای ذوب (Melting Temperature) یا T_Mنیز گفته میشود بر اساس میزان بازهای موجود در پرایمر و با فرمول

$T_M=[(G+C) \times 4^oC + (A+T)\times 2^oC$

محاسبه میشود. در این فرمول جفت بازهای G/C به دلیل دارا بودن پیوندهای هیدروژنی بیشتر از جفت بازهای A/T پایدارتر هستند. با محاسبه نسبتهای بازهای G/Cو بازهای A/T میتوان درجه حرارت اتصال در پرایمر را محاسبه نمود. دمای اتصال در پرایمر طراحی شده توسط Belcher and Young (1998) از درجه حرارتهای ۶۰ و ۶۵ درجه سانتی گراد برای Nested -PCRاستفاده نمود در حالیکه Surachetpong etal(2005) از درجه حرارت ۶۰ درجه استفاده نموده و بهترین میزان تکثیر DNA این ویروس رادر ۳۵ سیکل داشته در حالیکه در برنامه پیشنهادی ما ۴۰ سیکل ارائه گردید. در خصوص حساسیت این پرایمر توانائی جداسازی میزان ۱۰۰ pg از نمونه های آلوده به MBV را دارد. در حالیکه

Surachetpong etal(2005) حداقل میزان DNA در نمونه ها رابه میزان ۱۳,۴۲pg از DNA نمونه های الوده را قادر به شناسائی میباشد. میزان حساسیت در کیت یک مرحله ائی IQ2000 قادر به شناسائی ۱۰۰ ویروس بوده و در حالت Nested میتواند ۱۰ ویروس را نیز درنمونه ها شناسائی نماید. در بررسی اختصاصیت پرایمر پیشنهادی مشخص گردید که این پرایمر میتواند فقط نمونه های مثبت با MBVرا تکثیر نموده و نمونه های الوده به ویروس لکه سفید(WSSV) و ویروس پارووویروس هپاتوپانکراس (HPV) را نمیتواند تکثیر نموده و دارای ااختصاصیت برای این ویروس میباشد. در مطالعات Surachetpong etal(2005) و Belcher and Young (1998) نیز دارای اختصاصیت

بودند. باتوجه به ورود میگوی پاسفید به کشور امکان اینکه سویه های دیگر این ویروس به کشور معرفی گردند وجود داشته و چون این سویه های جدید از کشورهای دیگر میایند ممکن است با پرایمر پیشنهادی قادر به شناسائی آن نباشیم.

منابع

۱. افشار نسب ، م . a ۱۳۸۶ . روشهای تشخیص بیماریهای میگو . وزارت جهاد کشاورزی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران . ۱۷۵ صفحه .

۲. افشار نسب ، م . b ۱۳۸۶ . بیماری های ویروسی میگو . وزارت جهاد کشاورزی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران . ۲۱۰ صفحه .

۳. افشار نسب ، م . ۱۳۸۳ . ردیابی بیماری لکه سفید (white-spot syndrome virus) در میگوی پرورشی سفید هندی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران ، ۴۱ صفحه .

۴. افشار نسب محمد ، دشتیان نسب عقیل و یگانه وحید. ۱۳۸۶. بررسی بیماریزائی ویروس سندرم لکه سفید (White Spot Syndrome Voirus) در میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران. سال شانزدهم، شمارع ۱، بهار ۱۳۸۶. صفحه ۱تا ۸

۵. صابری مسعود، کاطمی بهرام و افشار نسب محمد .۱۳۸۶. شناسائی ویروس ایجاد کننده سندرم لکه سفید (WSSV)در میگوی پرورشی سفید هندی در ایران با استفاده با PCR . شماره فروست ۸۶/۸۴۲.

۶. صدیق مروستی س.ع.، ۱۳۷۰. بیوتکنیک تکثیر و پرورش میگو و وضعیت آن در ایران، پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۰۶۸.

۷. 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.

۸. شریف روحانی.م.۱۳۸۰. بهداشت و توسعه صنعت تکثیر و پرورش میگو در ایران. فصلنامه آبزی پرور سال نهم پائیز ۱۳۸۰

9. Afshar nasab , m., Akbari , s ., shariff , M., yousef , F ., Hassan , D., 2006 . Effect of different pH and Salinity Levels on the Viability of penaeus monodon baculovirus (MBV) in penaeus semisulcatus . Iranian journal of Fisheries science 6(1) , 1-18 .

10. Afsharnasab , M., Dashtyannasab , A., yeganeh , V. and soltani , M., 2007 . Incidence of white spot disease (WSD) in P. indicus Farms in Bushehr province , Iran . Iranian Journal of Fisheries science , 7 , 15-26 .

11. Baticados , M.C.L., pitogo , C.R., Paner , M.G ., de La pena , L.D ., Tendencia , E.A., 1991 . occurrence and pathology of penaeus monodon baculovirus infection in hatcheries and pond in the Philippines . lsr , J. Aquac . Bamidgeh 43, 35-41 .

12. Belcher,C.R., young,P.R.,1998.colourimetric PCR-based detection of monodon basulovirus in whole penaeus monodon post larve .J.virol . methods ,74,21-29.

13. Boonsanong chokying , c.2005 . Development of Monoclonal Anti bodies to polyhedrin of Monodon Baculovirus . Biotechnology . Mahidol un iversity , Bangkok .

14. 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

15. Brock , J. A., Lightner , D.V., Bell , T.A. 1983 . A review of four virus (BP , MBV and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical signify cance , diagnosis and control in shrimp aquaculture . In International council for Exploration of the sea . Hawaii : The oceanic Institute , PP.1-17.

16. Chen , S.N., chang , P.S., kou , G.H.1988. studies on penaeus monodon bacalovinus (MBV) infection in cultured penaeid shrimp . International Fish Health con ference , American Fisheries Society , Vancouver . (Abstract) .
17. couch , J.A., 1991. Nuclear polyhedrosis virus of invertebrates other than insect . In: J.R.Adams and J.R.Bonamei (eds) Atlas of Invertebrate virues . Boca Rato : CRC press , Inc ., PP. 205 – 226 .
18. Delapena ,L.D., Lavill a- pitogo , C . R ., villar , C.B.R., Paner, M.G., capulos , G.C., 2008 . prevalence of monodon baculovirus (MBV) in wild shrimp penaeus monodon in the Philippines . Aquaculture , 285 , 19-22.
19. Fegan , D.F., Fleg el , T.W., sriurairatana, S., waiyakruttha, M., 1991. The occnrrence , development and histo pathology of monodon baculovirus in penaeus monodon in southern Thailand . Aquaculture 96 , 205 -217 .
20. Ghorashi, S.A, Morshedi, D, Tokhmafshan, M, Pourgholam, R, Rezvani, S. (2003) Detection of white spot syndrome virus in Prawn by PCR. Journal of clinical virology, vol.27, 16-72.
21. Huger , A.M.,Krieg , A.1991.Baculoviridae . Nonoccluded baculoviruses . In: Adams . J.R., Bonami , J.R.(eds) Atlas of Invertebrate viruses , chap . IX . CRC press, Boca Raton , P.287 – 319 .
22. Kimura T, Yamano K, Nakano H, Momoyama K, Hiraoka M, Inouye K (1996) Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. Gyobo Kenyu (Fish Pathology) 31: 93-98.
23. Lightner , D.V. Redman , R.M., 1981 . A baculovirus caused disease of the penaeid shrimp (*Penaeus monodon*) . J. Invertber . pathol . 38 , 299-302.
24. Lightner , D.V., 1996 . A Hand book of pathology and Diagnostic procedures for Disease of penaeid shrimp . world Aquaculture society , Baton Rouge , La , 236 PP .
25. Lightner , D.V., Redman , R.M., Bell , T.A. 1983 . observation on the geographic distribution pathogenesis and morphology of the baculovirus from penaeus monodon , A quaculture , 32 , 209 -233.
26. Manajanaik. B, Umesha,K.R, Karunasagar I and Karunasagar I.,2005. Detection of Hepatopancreati parv like virus in wild shrimp farm fromindia by nested polymerase chain reaction (PCR).Dis. Aqu.Org .Vol.63;255-259.
27. Manivannan , s., kennedy , B., karunasagar , I.,2004. Prevalence of monodon boculovirus in wild metapenaeus species along the south west coast of India . Aquaculture 232 ,63 – 67 .
28. Mari .J., Bonami , J.R., Poulos , B., Lightner , D.V. 1993. Preliminary charac terization and partial cloning of the genome of a baculovirus from penaeus monodon (PmSNpV = MBV). Diseases of Aquatic organisms . Vol . 16 : 207 – 215.
29. Martin , S.W., Meek , A.H., willeberg,P.1987. Veterinary epidemiology . Amesterdam : Lowa state university Press . PP.343-350.
30. Nash , G ., Poemomo , A., Nash , M.B. 1988 . Baculovirus infection in brackish water pond cultured penaeus monodon Fabricius in Indonesia , Aquaculture 73: 1-6.
31. Natividad , J.M., Lightner , D.V.1992.susceptibility of the different Larval and post larval stages of black tiger prawn , penaeus monodon Fabricius to monodon Baculovirus (MBV) . In M.shariff., R.P.subasinghe and J.R.Arthur (eds)Diseases in Asian Aquaculturel . Manila , Philippines: Asian Fisheries Society , pp.111-125 .
32. Oanh , D.T.H., Phuong ,N.T. ,presto, N., Hodgson , R., Walker , P., 2005 .prevalence of white spot syndrome virus (wssv) and monodon baculovirus (MBV) infection in penaeus monodon post larve in vietnam . In : walker , P., Lester , R ., Bondad-Reantaso , M.G. (Eds) , Disease in Asian Aquaculture V.Fish Health Section . Asian Fisheries society , Manila , PP. 393- 404 .
33. Otta,S.K. Karunasagar, I and Karunasagar, I.,2003. Detection of monodon baculovirus and white spot syndrome virus in apparently healthy penaeus monodon postlarvae from India by polymerase chain reaction. Aquaculture 220 (2003) 54-67.
34. Pappalardo , R., Mari , J., Bonami , J.R. 1986 . 5 (Tau)virus infection of carcinus mediterraneus ; histology , cytology , cytology , pathology and experimental transmission of the disease . J.Invertebr .Pathol . 47 :361-368 .
35. Paynter , J.L., vikers , J.E., Lester , R.J.G.1992. Experimental transmission of penaeus monodon-type baculovirus (M.B.V) Dis . Asian Aquac . 97-110 .
36. Ramasamy , P., Rajan , P.R., Purushothaman , V. and Brennan , G.P., 2000 . Ultrastracture and pathogenesis of monodon baculvirus (Pm SNPV) in cultured larvae and natural brooders of penaeus monodon . Aquaculture , 184 , 45-66 .
37. Ramasamy . p ., Bermear, G.P.,1999 . ultrastructure of the surface structures and haptor of Empsuro soma Pyri forme (Ancyro cepha linae ; Mono pisthocotyla; Monogenea) From the gill of the teleost fish therapon jarbua . J. parasitology Research.

38. Ramasamy P, Rajan PR, Purushothaman V, Brennan GP., 2000.Ultrastructure and pathogenesis of monodon baculovirus (PmSNPV) in cultured larvae and natural brooders of Peneaus monodon. Aquaculture. 2000;184:45–66.
39. Satidkanitkul , A., sithigorngul , P., Sangoum , W., Rukpratan porn , S., sriurairatana , S., withayacham narnkul , B., Flegel , T.W.2005 . Synthetic petide used to develop antibodies for de tection of polyhedrin from monodon baculovirus (MBV) . Dis. Aquat . org . 65 , 79-84 .
40. Surachetpong W, Poulos BT, Tang KFJ, Lightner DV.2005. Improvement of PCR method for the detection of monodonbaculovirus (MBV) in penaeid shrimp. Aquaculture. 2005;249:69–75.
41. Tokhmafshan,M., shariff , M., Hassan , D., wang , y . G . 2004 . Identification of penaeus monodon Baculovirus (MBV) in cultured penaeus semisul catus in Islamic Republic of Iran . Iranian Journal of Fisheries sciences . 4 (1) , 25-44.
42. Valderama, D. & Anderson, J. L. 2011. Shrimp production review. GOAL 2011,Santiago, Chile, November , 2011, 9-6
43. Vickers , J.E., Lester , R.J.G., Spradbrow ,P.B., Pemberton , J.M.1992 . Detection of penaeus monodon type baculovirus (MBV) in digestive gland of post larval prawns using polymerase chain reaction . In : shariff , M., subasinghe , R.P.,Arthur, J.R(Eds) , Disease in Asian Aquaculture , vol , I. Fish Health section , Asian Fisheriws society , Manila , Philippines , PP. 127-133.
44. Vickers JE, Webb R, Young PR. Monodon baculovirus from Australia: ultrastructural observations. Dis Aquat Organ. 2000;39:169–76 .
45. Vijayan. K.K., Alavandi , S.V., Rajendran , K.V., Ala garswami , k. 1995 . prevalence and Histopathology of monodon Baculovirus (MBV) Infectien in penaeus monodon and penaeus indicus in shrimp farms in the south East coast of India . Asian Fisheries Science 8 : 267-272 .
46. Voyles , B.A, 1993 . The , Biology of virus . St . Louis Mosby .
47. Wang S.Y., Hong C. and Lotz J.M., 1996. Development of a PCR procedure for the detection of Baculovirus penaei in shrimp. Dis. Aquat. Org., 25, 123–131.
48. Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withayachumnarnkul, B. and Flegel, T.W.. 1996. DNA fragment of Penaeus monodon baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six Penaeus shrimp species. Aquaculture 143, 23-32

Abstract:

Shrimp production increasing rapidly in the world and in2013 the production reaches 4.2 MT. In Iran the shrimp production is under development and estimated in 1393, 20 thousand tons produced. In this regards the important subject is health and disease in shrimp farm. The white spot syndrome virus for second time appears in chabahar and damage many farms. Because the aquaculture activity expand in the world in national, regional and international scale, many emerge disease are endanger. In this regard the viral disease is very important and not only decrease the production but also has a side effect in business and national economy. For control and prevention the viral disease, the accurate methods such as PCR kit were developed. In this project the PCR methods with sensitivity, specificity and efficacy was designed and used for detection viral disease. Many viruses have several serotypes and in different area maybe new serotype induce the disease. For this reason, the specific kit will be design. Three viruses consist of MBV, TSV and IHHNV are very pathogenic in shrimp farm and need the specific PCR kit for detection them. In this project the MBV virus was identified and designs a new primer with Oligo software and the primer amplified a part of DNA with 185 bp in the gel. The specificity and sensitivity of primer were checked by IQ2000 Kit and the primer used for detection unknown samples.
Key world: Identification, Virus, Kit detection, New molecular methods.

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

---

Project Title : Identification and characterization of pathogenic viruses in Aquatic Animal Using Advanced Techniques in Order to Develop Rapid Diagnostic kit (shrimp viral disease Kit as well as TSV, HPV and MBV)
Approved Number: 12-80-12-8904-89061
Author: Mohammad Afsharnasab
Project Researcher : Mohammad Afsharnasab
Collaborator(s) *:* B. kazemi, A. Sepahdary, S. Shamsei, M. Reza Mehrabi, R. Mortezaei, H. Hoshmand, V. Yeganeh, A. Dashtyan nasab, K. Pazir, K. Radkhah, S. Tamadoni, A. Seidi, A. Aghagari, R. Mahmoud Alevi, A. Abediyan, E. Jorfi, M. Ahangarzadeh, L. Mohseni nezhad,M.R.Sadeghi,Gh.Hossieni,A.Azhehakosh,S.H.Hossieni,M.Ghasemi,B.Ramezani, B.Gharahvi,N.Mohammd Kor,A.Hamitabari,A.Abdi,M.H.Nazem Shirazi,M.R.Hassanzadeh,M.Simironi,
Advisor(s): -
Supervisor: Sh.Kakolaki
Location of execution :Boushehr province
Date of Beginning : 2010
Period of execution : 4 Years & 3 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

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 :

Identification and characterization of pathogenic viruses in Aquatic Animal Using Advanced Techniques in Order to Develop Rapid Diagnostic kit (shrimp viral disease Kit as well as TSV, HPV and MBV)

Project Researcher :

Mohammad Afsharnasab

Register NO.

46602