View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

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

عنوان :

پایش، جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

مجری:
مریم میربخش

شماره ثبت
۴۹۳۰۷

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

عنوان پروژه : پایش، جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در تولید میگوی عاری از بیماری خاص
شماره مصوب پروژه : k۹۱۰۱-۹۱۰۰۳-۹۱۰۳-۱۲-۸۰-۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مریم میربخش
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مریم میربخش
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : شهلا جمیلی ، محمد افشارنسب، بابک قائدنیا، وحید یگانه، عقیل دشتیان نسب، محمدرضا مهرابی، شاپورکاکولکی، عصمت محمدی باغملایی، محمد خلیل پذیر، عیسی کشتکار، مصطفی صبوحی، علی نظاری
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : مصطفی شریف روحانی
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۹۱/۱۲/۱
مدت اجرا : ۱ سال و ۷ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
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 : پایش، جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

کد مصوب : ۱۴-۸۰-۱۲-۹۱۰۳-۹۱۰۰۳-k۹۱۰۱

شماره ثبت (فروست) : ۴۹۳۰۷ تاریخ : ۹۵/۲/۷

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مریم میربخش دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته میکروبیولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۴/۱۲/۱۰ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت مسئول فنی آزمایشگاه مجاز غذا- دارو در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱- تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص ۳
۱-۲- تعریف میگوی عاری از بیماری خاص ۴
۱-۳- اهداف اصلی در تولید میگوهای عاری از بیماری خاص ۶
۱-۴- مهمترین پاتوژنهایی که میگوی عاری از بیماری خاص باید از آنها عاری باشد ۶
۱-۵- بیماری های باکتریایی ۸
۱-۶- بیماری های انگلی ۱۶
۱-۷- مروری بر منابع ۲۰
۱-۸- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در داخل کشور ۲۱
۱-۹- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در خارج از کشور ۲۳
۱-۱۰- فرضیه ۲۳
۱-۱۱- اهداف تحقیق ۲۳
۲- مواد و روشها ۲۴
۲-۱- تجهیزات مورد نیاز ۲۴
۲-۲- مواد مصرفی ۲۴
۲-۳- میکروارگانیسم های مورد پایش ۲۴
۲-۴- حجم نمونه گیری ۲۵
۲-۵- نمونه های مورد بررسی ۲۵
۲-۶- نحوه انتقال نمونه ها ۲۶
۲-۷- تعیین جمعیت های اولیه برای تولید میگوی مولد عاری از بیماری خاص ۲۶
۲-۸- روش مطالعه میگوهای جوان، بالغ و مولدین ۲۷
۲-۹- روش مطالعه مستقیم مرحله لاروی و پست لاروی ۲۸
۲-۱۰- روش شمارش و جداسازی باکتری های خانواده ویبریوناسه و باکتری های هوازی- بی هوازی اختیاری ... ۳۰
۲-۱۱- روش شناسایی باکتری بیماری نکروز عفونی پانکراس ۳۲
۲-۱۲- روش مطالعات انگل شناسی ۳۷
۲-۱۳- مطالعات موردی ۳۸

عنوان	«فهرست مندرجات «	صفحه

۳- نتایج ۴۰
۳-۱- انواع تعداد کل نمونه های مورد آزمون ۴۰
۳-۲- نتایج آزمون نمونه های مورد پایش ۴۰
۳-۳- نتایج مطالعات موردی ۴۲
۴- بحث و نتیجه گیری ۴۷
پیشنهادها ۴۹
منابع ۵۰
چکیده انگلیسی ۵۳

چکیده

امروزه آبزی پروری دارای سریعترین رشد در تولید غذای جهان است. تولید و پرورش میگو نیز بخشی از صنعت آبزی پروری جهان می باشد که متاسفانه مانند سایر آبزیان خسارات اقتصادی ناشی از بیماری های یکی از مهمترین چالش های این صنعت بوده است. علت عمده تلفات در مراکز تکثیر و پرورش میگو مربوط به کیفیت آب و حضور باکتری ها و انگل های پاتوژن می باشد. اکثر این میکروارگانیسم ها فرصت طلب بوده و بصورت معمول در مراکز تکثیر و پرورش، فلور روده و غذای زنده وجود دارند ولی در شرایط نامناسب پرورش سبب بروز بیماری می گردند. از آن جهت که روند توسعهٔ آبزی پروری در کشور نیاز به مدیریت بهداشتی دارد، یکی از مهمترین حلقه های تکمیلی در برنامه راهبردی میگو تولید میگوی عاری از بیماری خاص (Specific Pathogen Free) می‌باشد که در این طرح به آن پرداخته شده است. میگوی عاری از بیماری خاص یعنی میگویی که عاری از برخی عوامل بیماریزای خاص فهرست شده در لیست سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) هستند. این عوامل باید بطور قطعی قابل تشخیص باشند، بتوان آنها را ازمیگوهای درون سیستم تکثیر و پرورش جداسازی نمود. لذا در این پروژه مطابق با لیست بیماریهای ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام (OIE)، پایش عوامل بیماریزای باکتریایی (بیماری نکروز هپاتوپانکراس) و انگلی (میکروسپوریدیا و گرگارین ها) مطابق با لیست سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) در مراحل تکثیر و پرورش نسل های مختلف میگوی سفید غربی صورت گرفت و در مجموع ۷۵۶ قطعه میگو، ۶ نمونه غذای کنسانتره و ۹۷ نمونه غذای زنده مورد کنترل و غربالگری میکروبی قرار گرفتند. از مجموع نمونه های مورد بررسی ۱/۳۵ درصد نمونه های ماهی مرکب از نظر NHPB مثبت بودند که قبل از مصرف امحاشدند و ۵/۶ درصد پیش مولدین اولیه از نظر شدت انگل های اپی‌کمنسال و میکروسپوریدیا مثبت بودند که حذف گردیدند و به دلیل استقرار ایمنی زیستی و سیستم مراقبتی ایجاد شده در مرکز ملی تولید میگوی عاری از بیماری خاص در هیچ یک از مراحل و نسل های میگو عوامل باکتریایی و انگلی خاص جداسازی نگردید.

کلمات کلیدی:

لیتوپنئوس وانامی، عاری از پاتوژن، باکتری، انگل

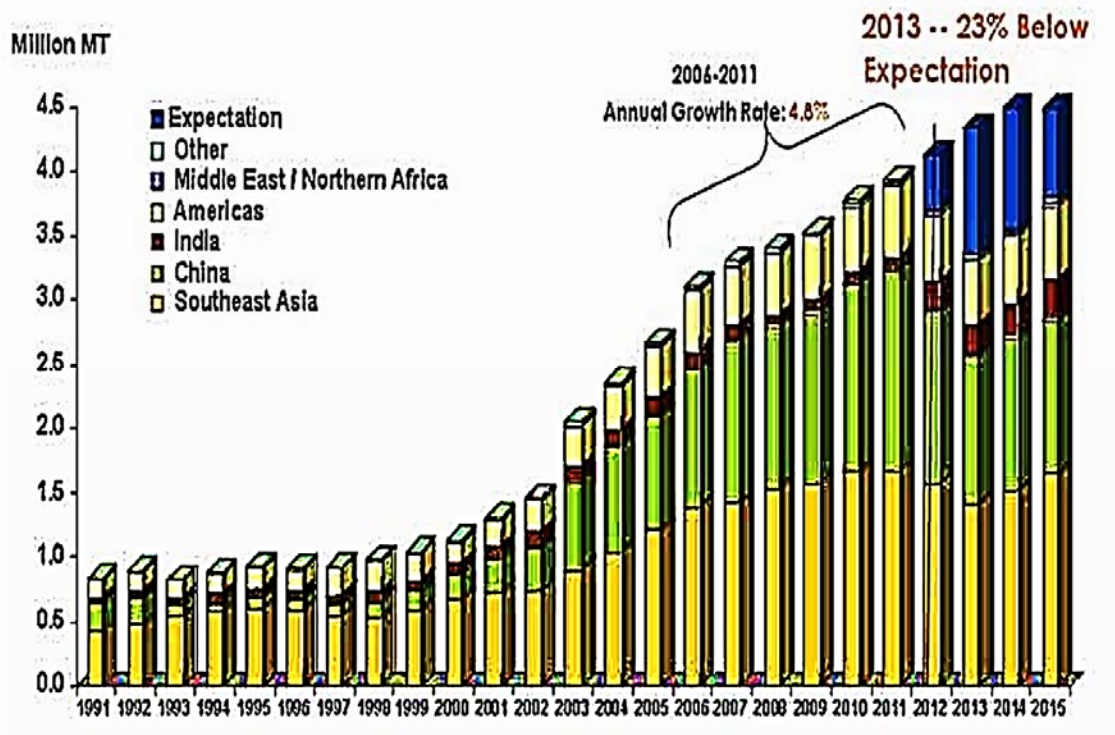
۱-مقدمه

عوامل بیماری زای آبزیان از جمله عواملی هستند که می‌توانند صنعت آبزی پروری را مورد تهدید قرار داده و باعث کاهش تولید در واحد سطح شوند. مدیریت بهداشت عوامل بیماریزا در صنعت پرورش میگو بر سه محور استوار است: تشخیص، پیشگیری و درمان. به دلیل افزایش فراوانی میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های پرورش مصنوعی، بیماری‌ها نیز شیوع روز افزون داشته و خسارات جبران ناپذیری را بر این صنعت وارد نموده‌اند به عنوان مثال در نمودار ۱ روند تولید میگوی پرورشی در جهان نشان داده شده است که از سال ۲۰۱۲ به دلیل شیوع بیماری مرگ زودرس کاهش داشته و ۲۳ درصد کمتر از حد انتظار بوده است. یکی از انواع مهم این عوامل بیماریزا، باکتری‌ها می‌باشند، که علاوه بر بیماری زا بودن، شرایط را برای بروز سایر بیماری‌های ویروسی و انگلی نیز مستعد می‌نمایند. باکتری‌های خانواده ویبریوناسه یکی از انواع مهم این باکتری‌ها در اکوسیستم‌های دریایی می‌باشند. این باکتری‌ها فلور طبیعی اکوسیستم های دریایی می باشند که به صورت ثانویه و تحت شرایط خاصی مانند وجود استرس، کمبود ویتامین ث، تراکم بالا، سموم جلبکی، بیماری‌های ویروسی و غیره موجب بروز بیماری ویبریوزیس در موجودات آبزی میگردند همچنین ریکتزیا ها یا باکتری های ریکتزیا شکل[1] نیز باکتری های گرم منفی داخل سلولی بوده که ارگان لنفاوی، بافت پیوندی (به صورت سیستمی) همولنف، فاگوسیتها و اپی تلیال سطح کوتیکول و هپاتوپانکراس میگو را مورد تهاجم قرار می دهد و سبب مرگ و میر می گردد(; Krol, Hawkins, & Overstreet, 1991Anderson I, Shariff M, Nash G, & Nash, 1987).

همچنین بیماری های انگلی نیز سبب ایجاد استرس در میگو شده و شرایط برای رشد سایر میکروارگانیسم ها و در نهایت مرگ ومیر آنها را فراهم می نماید. عوامل انگلی موجود در میگو عبارتند از: پروتوزوآها (تک یاختگان)، متازوآ ها (پریاختگان)، دیاتومه ها، بارناکل ها وایزوپودهای بوپیریده (Malelahi A, Lightner, 1996 ; 2001). گروهی از تک یاخته ها در شرایط نامساعد پرورش، سبب سندرم جرم گرفتگی بدن میگو می‌شوند. بیشتر این ارگانیسم ها آزادزی بوده و پاتوژن حقیقی نمی باشند و از میگو به عنوان جایگاهی برای اتصال استفاده می کنند. به این تک یاخته ها، اپی کمونسال یا تک یاخته های همخور سطحی زی گفته می شود. این تک یاخته ها به آبشش، سفالوتوراکس، پرئوپود، سطوح کوتیکولی وسایر ضمایم میگو متصل شده و در اکثر مواقع بدون تخریب مستقیم میگو، بصورت غیر مستقیم با اتصال به آبشش یا سطح کوتیکول مشکلاتی را برای میگو ایجاد می نمایند (Couch, 1983). به عنوان مثال تک یاخته های اپی کومنسال موجود بر روی آبشش بواسطه ممانعت از جریان مناسب آب در میان آبشش ها و مداخله در تبادل گاز از سطوح آبششی سبب خفگی ناشی از کاهش اکسیژن در میگو ها می گردند و همچنین با اتصال به سطح کوتیکولی و مداخله در پوست اندازی سبب سوء تغذیه، اختلال در حرکت میگوها، کاهش رشد و در نهایت فعال شدن میکروارگانیسم های فرصت طلب مانند باکتری ها و ویروس ها و مرگ و میر در میگوها می گردند. برخی از اپی کمونسال ها قادر به تولید

[1]) Ricketsia Like Bacteria (RLB)

اگزوتوکسین هایی هستند که بافت میزبان را تخریب می نمایند. بیماری‌های تک یاخته ای در میگوهای جوان و بالغ شایعتر است و بندرت در مرحله لاروی و پست لاروی میگو دیده میشوند(Foster CA, 1978 ; Couch, 1983). تک یاخته های انگلی سطحی شایع میگو عبارتند از: ۱) مژه‌داران پری تریش که تشکیل کلونی می دهند مانند: گونه های زوتامنیوم ، گونه های اپیستیلیس و گونه های ورتیسلا ۲) مژه داران آپوستوم مانند: گونه های لاژنوفریس و گونه های کارتیورینا ۳) سوکتوریا ها مانند: گونه‌های آسینتا ، گونه های افلوتا و غیره ۴) تاژکداران مانند: گونه های کریزیدلا و تک یاخته های انگلی داخلی میگو نیز عبارتند از: گرگارین ها ، میکروسپوریدیوم ها و هاپلوسپوریدیوم ها (Lightner, 1996) که در تولید میگوی عاری از بیماری خاص تاکید بر روی دو انگل داخلی گرگارین ها و میکروسپوریدیوم ها می باشد.



نمودار ۱- نمودار روند تولید جهانی میگوی پرورشی

۱-۱- تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص[۲]

شروع تکثیر و پرورش میگو در آمریکا به سال ۱۹۶۷ می رسد که در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ این صنعت به سرعت در آمریکا گسترش یافت. مهمترین گونه پرورشی میگو در آمریکا، گونه سفید غربی[۳] بود که ظاهراً به بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و بافت زیرجلدی[۴] مقاوم بود. از علائم مشخص این بیماری خم

[2] Specific Pathogen Free (عاری از بیماری خاص)

[3] *Litopenaeus vannamei*

[4] IHHNV (Infection Hypodermal and Heamatopoitic Necrosis Virus)

شدن میگو ها و کاراپاس آنها می باشد و به همین دلیل Runt deformity syndrome(RDS) نیز نامیده می شود و سبب بیش از ۳۰٪ تلفات در میگو های مزارع می گردد.

اما در سال ۱۹۸۱ این بیماری تلفات سنگینی در میگوی *P.stylirastris* در آمریکای لاتین ایجاد کرد و متاسفانه در میگوی سفید غربی نیز موجب بیماری شده و تلفات شدیدی را به همراه داشت.

و در نهایت پژوهشگران آمریکایی نسبت به توسعه میگوهایی که از این بیماری عاری باشند مبادرت نمودند. اولین تجربه آزمایشگاهی تولید میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص در سال ۱۹۸۹ توسط دکتر لایتنر و همکاران در دانشگاه آریزونا انجام و در این سال ایشان ۱۵۰۰۰ پست لارو میگوی سفید غربی را از یک هچری در مکزیک تهیه و به آمریکا منتقل نمود و آن را استوک میگوی سفید غربی عاری از ویروس نکروز عفونی بافت خونساز و بافت زیرجلدی نام نهادند.

در سال ۱۹۹۰ اتحادیه ICES [5] قوانین و مقرراتی جهت تولید میگوی عاری از بیماری خاص تنظیم و توسط آقای wyben و همکارانش در سال ۱۹۹۳ و با اعتبارات USMSFP [6] و رعایت قوانین و مقررات اعلام شده اولین ذخیره میگوی عاری از بیماری خاص را در امریکا تولید نمودند. این قوانین تصریح می کند که فقط بیماری هایی که قابل شناسایی بوده و بطور اختصاصی موجب تلفات در میگو ها می شوند مورد توجه قرار گیرند.

۲-۱- تعریف میگوی عاری از بیماری خاص

تعریف واقعی میگوی عاری از بیماری خاص به معنی عاری بودن از هرگونه پاتوژن یا میکروارگانیسم خاص است که موجب مرگ و میر وتلفات در میگوها می‌شود (پاتوژن های خاص مطابق با لیست ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام تعیین می شوند). این وضعیت میگوها بسته به سطوح ایمنی زیستی و محیط جغرافیایی و گونه میگو متفاوت است. پاتوژنهایی که درلیست اختصاصی میگوهای عاری از بیماری خاص قرار می گیرند دارای شرایط ذیل می باشند:

باید با اطمینان قابل تشخیص باشند.

بتوان به صورت فیزیکی آنها را از سیستم تکثیر و پرورش جدا نمود.

به طور مشخص باعث تهدید و آسیب به صنعت تکثیر وپرورش شوند.

به عنوان مثال برخی از گونه های ویبریو [7] می توانند سبب بروز بیماری شده و به طور قابل ملاحظه ای در میگو ها قابل تشخیص بوده، ولی نمی توان آن ها را در لیست پاتوژن های میگوی عاری از بیماری خاص قرار داد زیرا این باکتری ها جزو فلور طبیعی میگو بوده ودر شرایط خاص بیماریزا می شوند.

---

[5] The International Council for the Exploration of Sea
[6] US Marine Shrimp Farming Program
[7] Vibrio sp.

میگوهای عاری از بیماری خاص تولیدی، به بیماری ها مقاوم نبوده و با مفهوم مقاوم بـه پـاتوژن خـاص [۸] تفـاوت داشته ولی می توان میگوهای عاری از بیماری خاص را به یک یا چند بیماری مقـاوم نمـوده و میگـوی مقـاوم بـه پاتوژن خاص تولید نمود. همچنین میگوی عاری از بیماری خاص را میتوان در یک زمان به یک یا چند بیمـاری مقاوم نموده و میگوی عاری از بیماری خاصی که مقاوم به پاتوژن خاص باشد نیز تولیـد کـرد. مفهـوم تحمـل بـه پاتوژن خاص[۹] نیز به میگو هایی اطلاق میشود که از نظر ژنتیکی به یک بیماری مقاوم باشند همچنین ویژگی های میگوهای عاری از بیماری خاص مادرزادی منتقل نشده و ارثی نمی باشد و این خصوصیات از مـادر بـه فرزنـدان منتقل نمی‌شود. مفهوم عاری از بیماری خاص بسته به محل پرورش و تولید میگو و سطو ح ایمنی زیستی متفاوت بوده و اگر در شرایط ویژه تولیدی که در اصطلاح Nuclear Breeding Center (NBC) می نامند تولید شوند آنهـا را عاری از بیماری خاص گویند. در شرایط NBC میگوها برای دو سال تحت مراقبت بوده و بـرای کلیـه بیماریهـای خاص غربالگری میشوند. اگر میگوها را به سطوح ایمنی زیستی متوسط منتقل نماییم آنها را میگوهای با سـلامتی بالا [۱۰] می نامند.

عاری از بیماری خاص بودن میگو به حضور یا عدم حضور پـاتوژن هـای خـاص در میگـو بسـتگی داشـته و ایـن وضعیت بستگی به درجه ایمنی زیستی تغییر میکند. بنابراین پرورش دهندگانی که بدنبال خرید میگوی عـاری از بیماری خاص می باشند لازم است این سوالات را از تولیدکنندگان میگوی عاری از بیماری خاص کنند:

چه پاتوژن هایی در لیست تولید میگوی عاری از بیماری خاص از طـرف تولیـد کننـدگان قـرار دارد کـه آنهـا را حذف می کنند؟

چه ابزار تشخیصی برای شناخت پاتوژن ها در مرکز تولید عاری از بیماری خاص برای غربـالگری اسـتفاده شـده است ؟

در چه زمانی آخرین غربالگری و توسط چه کسی انجام شده است ؟

تولید کننده میگوی عاری از بیماری خاص از چـه برنامـه مراقبتـی بـرای پـایش ذخـایر عـاری از بیمـاری خـاص استفاده نموده است ؟

تاریخچه بیماری در تاسیسات تولید عاری از بیماری خاص چگونه است؟

همچنین خریداران میگوی عاری از بیماری خاص باید یـک گـواهی از غربـالگری مهمتـرین بیمـاری هـا را نیـز دریافت دارند.

[8] Specific Pathogene Resistanse (SPR)
[9] Specific Pathogene Tolerance (SPT)
[10] High Health (HH)

۳-۱- اهداف اصلی در تولید میگوهای عاری از بیماری خاص

اهداف اصلی در تولید میگوهای عاری از بیماری خاص شامل:

ایجاد ذخیره میگوی عاری از پاتوژنهای خاص

جلوگیری از تلاقی نژادهای یکسان یا هم خونی[11]

از نظر اصلاح نژاد نیز تولید میگوهایی که ویژگی‌های اقتصادی مثل رشد مناسب، بقا مناسب و وزن مناسب را داشته باشند باید به‌گزینی و انتخاب شوند.

۴-۱- مهمترین پاتوژنهایی که میگوی عاری از بیماری خاص باید از آنها عاری باشد

سازمان جهانی بهداشت دام[12] برخی از عوامل بیماریزای خطرناک آبزیان (از جمله میگو) که می توانند مرگ و میر شدید در مراکز تکثیر، پرورش و مولدسازی میگو ایجاد نمایند را به عنوان بیماریهای اخطار کردنی[13] تعیین نموده و در کتاب سلامت آبزیان سازمان بهداشت جهانی دام[14] فهرست کرده است، کلیه کشورهای جهان موظفند براساس روشهای استاندارد ویکسان تشخیص بیماریهای مذکور که در کتاب راهنمای آزمونهای تشخیصی بیماریهای آبزیان[15] موجود می باشد، نسبت به انجام آزمایشات اقدام و در صورت تائید بروز این قبیل بیماریها، موارد را به سازمان جهانی بهداشت دام گزارش نمایند. نقل و انتقال آبزیان بدون اخذ گواهی بهداشتی مبنی بر عاری بودن آبزی مورد نظر از بیماریهای قید شده در این فهرست منع شده است . بسته به محیط و سطوح ایمنی و نوع میگو، تعداد پاتوژن هایی که باید در تولید عاری از بیماری خاص مورد توجه قرار گیرند متفاوت بوده، بطوریکه برا ی تولید میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص، ۹ ویروس ولی برای تولید میگوی مونودن عاری از بیماری خاص، ۷ ویروس مورد توجه بوده و بیماری های باکلوویروس پنه ای[16] و بیماری نکروز روده میانی باکلوویروسی[17] که از ویروس های باکلوویروسی بوده و در میگوهای مونودن گزارش نشده است در لیست قرار نمی‌گیرند. پاتوژن هایی که به عنوان عامل بیماری و مرگ ومیر در میگوی سفید غربی که مهمترین گونه تولیدی عاری از بیماری خاص می‌باشد شامل ۹ ویروس، یک باکتری و سه پروتوزوا می‌باشند که در جدول ۱ اسامی آنها ارائه گردیده است. لازم به ذکر است که این جدول در طی زمان های مختلف تغییرات فراوانی نموده است، بطوریکه تا قبل از سال ۱۹۹۲بیماری لکه سفید[18] در این لیست نبوده و بعداً به لیست اضافه شده

---

[11] Inbreeding
[12] The World Organisation for Animal Health (OIE)
[13] Notifiable Diseases
Code [14] OIE Aquatic Animal Health
Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals [15]
[16] *Baculovirus Penaei*
[17] Baculoviral Midgut Necrosis
[18] White Spot Disease

است، یا در سال ۲۰۰۲ بیماری نکروز عفونی عضلات میگو[19] به لیست اضافه و امروز این لیست شامل ۹ ویروس می‌باشد و چه بسا با شناخت پاتوژن های جدید این لیست تغییر نماید.

بخشی از پاتوژن های اعلام شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام، به عنوان پاتوژن های قابل گزارش اعلام گردیده و کلیه کشورها موظفند در صورت بروز این قبیل بیماری ها موارد را به مجامع بین المللی گزارش نموده و همچنین از نقل و انتقال میگو با داشتن این پاتوژن ها خودداری نمایند. بهتر است میگوهای مولد اولیه که برای تولید عاری از بیماری خاص انتخاب می‌شوند از مرکزی باشند که دارای ایمنی بالایی بوده و به سلامت آنها اطمینان شده و سپس در چرخه تولید مولد سازی استفاده گردد.

این پاتوژن ها نیز خود به سه گروه یا category تقسیم می‌شوند :

C–۱ (گروه اول) : پاتوژن هایی که استثنایی بوده و توانایی ایجاد مرگ و میر شدید در یک گونه یا تعداد زیادی از گونه های میگو را دارند .

C–۲ (گروه دوم): پاتوژن هایی که خطرناک بوده و می‌توانند موجب تخریب شوند.

C–۳ (گروه سوم): پاتوژن هایی که حداقل اثرات را دارند ولی باید از مزارع یا مراکز تولید مولد دور بمانند.

جدول ۱- فهرست مهمترین پاتوژنهایی که باید در میگوهای عاری از بیماری خاص نباشد.

ردیف	نام بیماری	عامل بیماری	دسته پاتوژنها
۱	White Spot Syndrome virus(WSSV)	ویروس	گروه اول
۲	Taura Syndrome Virus(TSV)	ویروس	گروه اول
۳	Yellow Head Virus/ Gill-Associated Virus(YHV/GAV)	ویروس	گروه اول و دوم
۴	Infectious Myonecrosis virus(IMNV)	ویروس	گروه اول و دوم
۵	Hepatopancreatic Parvolike Virus(HPV)	ویروس	گروه اول و دوم
۶	Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)	ویروس	گروه دوم
۷	Baculovirus Penaei (BP)	ویروس	گروه دوم
۸	Baculovirus Midgut Gland Necrosis Virus(BMN)	ویروس	گروه دوم
۹	*Penaeus monodon* Baculovirus(MBV)	ویروس	گروه دوم
۱۰	Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP)	باکتری	گروه دوم
۱۱	Microsporidia	انگل	گروه دوم
۱۲	Haplosporidia	انگل	گروه دوم
۱۳	Gregarines	انگل	گروه سوم

[19] Infection Myonecrosis Virus (IMNV)

خصوصیات پاتوژن های باکتریایی

باکتری هایی که در بروز بیماریهای میگودرگیرهستند به دو دسته طبقه بندی می شوند:

- عوامل باکتریایی فرصت طلب مانند اکثر باکتریهای خانواده ویبریوناسه
- عوامل باکتریایی پاتوژن مانند باکتری عامل بیماری نکروز عفونی پانکراس

عوامل باکتریایی پاتوژن، زمانی موجب عفونت می‌شود که تعداد این عوامل پاتوژن به حد مشخصی برسد که به آن دوز عفونی عامل بیماریزا می گویند ولی عوامل باکتریایی پاتوژن فرصت طلب در شرایط طبیعی نیز در زیستگاه و اندام های مختلف آبزی یافت می شوند ولی عمدتاً زمانی می‌توانند بیماری را ایجاد کنند که وضعیت فیزیولوژیک میزبان و وضعیت محیطی سیستم پرورشی مناسب نباشند و در واقع موجود تحت استرس باشد. بیماریهای باکتریایی درمیگو ممکن است مرگ و میر، ضایعات جلدی، نکروز، کدر و مات شدن عضلات بدن، تغییر رنگ آبششها، کاهش رشد، از دست دادن کوتیکول، ایجاد روده سفید، بی حالی شده و کاهش مصرف غذا را به همراه داشته باشند(Horowitz, 2001; Jayasree et al, 2006; Lightner, 1996; Nunan et Goarantet al, 2006 ; al, 2005).

۵-۱- بیماری های باکتریایی

۱-۵-۱- بیماری ویبریوزیس[۲۰]

باکتری های جنس ویبریو از نظر مرفولوژی میله‌ای کوتاه، به سایز ۰.۵ – ۱.۰ × ۱.۰ – ۴.۰ µm با یک تاژک منفرد قطبی و گرم منفی می باشند که واکنش اکسیداز آنها مثبت بوده، قادر به تخمیر کربوهیدرات ها می باشد و تولید اسید بدون گاز می نمایند و نسبت به مواد مهار کننده رشد ویبریو مانند O129 مقاوم هستند. قادر به تولید ایندول، لیزین و ارنیتین دی کربوکسیلاز هستند اما آرژنین دی کربوکسیلاز تولید نمی کنند، از سلوبیوز، گلوکز و ساکارز، ترهالوز اسید تولید می‌کنند، احیای نیترات را انجام می‌دهند، در غلظت ۱- ۶٪ (w/v) سدیم کلراید رشد می‌کنند، خون، DNA، و ژلاتین را تجزیه می‌کنند، و واکنش ووگس – پروسکئور آنها مثبت نمی‌باشد (Wijayati, 2004;Lightner, 1996).

- اپیدمیولوژی

ویبریوزیس یکی از بیماری‌های مهم منجر به مشکلات در صنعت آبزی پروری می‌باشد. ویبریوزیس بیماری باکتریایی است که مسئول مرگ و میر میگوهای پرورشی در سراسر جهان می‌باشد. گونه‌های ویبریو بطور وسیعی در مراکز پرورش میگوی جهان انتشار یافته‌اند. عفونت ناشی از ویبریو عمدتاً در مراکز تکثیر رخ می‌دهد، اما همه گیری‌هایی نیز در استخر های پرورش گونه‌های مختلف میگو دیده شده است(F. R. Chen, Liu,

[20] Vibriosis

& Lee, 2000). این بیماری توسط یک باکتری گرم منفی از خانواده ویبریوناسه ایجاد می‌شود. شیوع این بیماری زمانی رخ می‌دهد که عوامل محیطی سبب افزایش سرعت تکثیر باکتری گردند، این باکتری ها در شرایط طبیعی با سطوح کم در خون میگو وجود داشته و توسط جانور تحمل می‌شود. پوشش محافظ خارجی آبزی مانع فیزیکی موثر در مقابل پاتوژن‌هایی است که سعی دارند از سطوح خارجی سخت پوست وارد بدن آن شوند؛ این مسئله در مورد مجاری گوارشی فوقانی و تحتانی آبزی نیز صادق است، هرچند که گونه‌های کیتینوکلاستیک ویبریو جزء باکتری‌های مرتبط با بیماری‌های پوسته و صدف می‌باشند و ممکن است از طریق زخم‌ها یا سوراخ و منافذ روی پوسته خارجی آبزی وارد بدن شوند. آبشش با پوسته نازکی پوشیده شده است بنابراین نسبت به نفوذ باکتری ها حساس تر می‌باشد، اما سطوح آن توسط استوبرانش‌ها تمیز می‌شوند. روده‌های آبزی با پوسته‌ای پوشیده نشده است، بنابراین روده، مستعد ترین محل برای نفوذ پاتوژن‌ها از طریق آب، همولنف و رسوبات کف بستر می‌باشد (Rao, 2013).

ویبریو هاروی باکتری گرم منفی، درخشنده می‌باشد که یکی از مهمترین علل اصلی منجر به مرگ و میرهای تکثیر لاروهای پنئوس مونودن و لیتوپنئوس وانامی در سیستم‌های پرورش بوده است. هزاران واحد تکثیر و تولید لارو در جهان به این آلودگی مبتلا شده اند و ضررهای اقتصادی بی شماری را تجربه کردند (Rao, 2013).

از میان گونه‌های ویبریو هاروی جداسازی شده، بعضی بیماری زا بوده و تعدادی بیماری زا نیستند، که حاکی از وجود تنوع ملکولی و ژنتیکی زیاد این گروه از باکتری می‌باشد. اخیراً مکانیسم بیماری زایی آن را به باکتریوفاژ نسبت داده‌اند(Shivu MM, 2007).

ویبریوزیس دارای گسترش جهانی در میان تمامی سخت پوستان دریایی حساس به آن از جمله میگوها می‌باشد و در تمام فصول سال شیوع دارد. اپیدمی‌های آن در تمامی مراحل زندگی میگو رخ می‌دهد، اما بیشتر در تخم ریزی‌ها شایع است. اپیدمی‌های بزرگی از ویبریوزیس در پنئوس مونودن از نواحی اندونزی و سواحل اقیانوس آرام، پنئوس ژاپونیکوس در ژاپن، و پنئوس وانامی از اکوادور، پرو، کلمبیا و آمریکای مرکزی گزارش شده است. این بیماری بصورت مجموعه ای از علائم یا همان سندرم بیان می‌شود. که شامل ویبریوزیس دهانی و روده ای، ویبریوزیس ضمائم و پوست، ویبریوزیس موضعی زخم، بیماری پوسته، ویبریوزیس سیستمیک و کبدی پانکراسی سمی می‌باشند (Lightner, 1996).

عوامل ایجاد کننده ویبریوزیس شامل انواعی از گونه‌های باکتری ویبریو مانند: ویبریو هاروی ، ویبریو وولنیفیکوس[۲۱] ، ویبریو پاراهمولتیکوس[۲۲] ، ویبریو آلجینولتیکوس[۲۳] ، ویبریو پنایسیدیا می باشد (Lightner, 1993). گزارشات متفرقه‌ای مبنی بر وقوع ویبریوزیس در اثر ویبریو دامسلا[۲۴] و ویبریو فلوویالیس[۲۵] و سایر

[21] *V.vulnificus*
[22] *V.parahaemolyticus*
[23] *V.alginolyticus*
[24] *V.damsella*
[25] *V.fluvialis*

گونه‌های ناشناخته نیز وجود دارد (۶، ۷، ۹ و ۱۰).گونه‌های ویبریو جزء فلور طبیعی میکروبی میگوهای وحشی و پرورشی می‌باشند (Sindermann, 1990b) و زمانی که مکانیسم‌های دفاعی طبیعی جانور تضعیف می‌شوند، به پاتوژن‌های فرصت طلب تبدیل می‌شوند که این امر بواسطه عوامل مستعد کننده متعددی ایجاد می گردد.

علایم کلینیکی

این بیماری باعث مرگ و میر شدید بالاخص در پست لاروها و میگوهای جوان می شود. میگوهای آلوده به بیماری علائمی از قبیل هیپوکسی[۲۶] و آمدن به سطح و کناره های استخر را نشان می دهند. با توجه به اینکه میگوها جهت دریافت اکسیژن به سطح می آیند، پرندگان دریایی جهت گرفتن میگوها در روی استخرها به فراوانی دیده می شوند. معمولاً در شب میگوهای آلوده حالت نورافشانی[۲۷] از خود نشان می دهند. عفونت ناشی از ویبریوها در میگو ممکن است جلدی[۲۸] ، روده ای[۲۹] یا عمومی[۳۰] باشد. این حالت ها بالاخص در لاروها و پست لاروها مشاهده می شود. میگوهای آلوده (لاروها و پست لاروها) به انواع گونه های ویبریوهای نورافشان به ویژه ویبریو هاروی، به طور مشخص کلنی های باکتریایی زیادی به رنگ آبی نشان می دهند. در بزرگنمایی بالا این پلاکها به صورت تجمعی از باکتریهای میله ای شکل در سطح کوتیکول یا قسمتهای دهان، ضمایم حرکتی و در سطح کوتیکول مری و قسمتهای دستگاه گوارش و معده دیده می شوند (F. R. Chen et al., 2000 ; S. N. Chen, P.S. Chang, G. H. Kou, 1992; Sindermann, 1990b).

به همراه علایم سطحی آلودگیهای باکتریایی، معمولاً مجاری هپاتوپانکراس و اپی تلیال روده میانی نیز متورم شده و بداخل مجاری هپاتوپانکراس رها می گردد و به همین دلیل بیماری را Bolitias blancas یا Little white balls می‌گویند.تهاجم باکتری به سطح روده میانی و مجاری هپاتوپانکراس، ممکن است موجب گسترش پلاکهای باکتریایی گشته و با ایجاد عفونت سیستمی و عمومی فاز نهایی بیماری شروع شود (Sindermann, 1990a).

آسیب شناسی

علایم آسیب شناسی در میگوهای جوان و بالغ متفاوت بوده و با توجه به اینکه این باکتریها ممکن است جزء میکروفلور طبیعی میگوها باشند، در اثر ضربه یا تأثیرات شدید محیطی یا به صورت عفونت ثانویه ناشی از سایر باکتریها یا در نتیجه افزایش میزان گونه های بیماریزا، باعث بروز بیماری در این دسته از میگوها می شود. عفونتهای ناشی از این باکتریها در میگوهای جوان و بالغ یا به صورت زخم های سطحی بوده که به طور مشخص

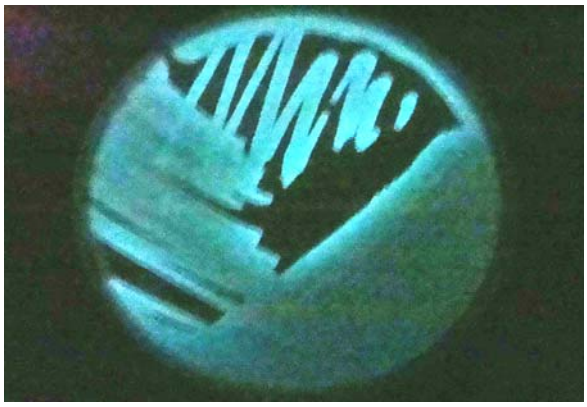
[26] Hypoxia
[27] Luminescent
[28] cuticular
[29] enteric
[30] systemic

بوسیله کپسولی از هموسیتها یا درپوشی به صورت ملانوزه احاطه شده است و باکتریها به طور مشخص در داخل زخم ها یا کناره های آن قابل دیدن می باشد(Lightner, 1996).

در مقاطع بافتی تهیه شده از میگوی مبتلا به ویبریوزیس سیستمیک معمولا ندول‌های هموستیک عفونی در اندام‌های لنفی، قلب، بافت پیوندی آبشش ها، هپاتوپانکراس، غدد شاخکی، طناب نخاعی، تلسون و عضلات مشاهده می‌گردد. هپاتوپانکراس آلوده ممکن است به صورت بافتی با تخلخل و حفره کم ظاهر شود که نشانگر کم بودن ذخائر چربی و گلیکوژن می‌باشد (Lightner 1996; Lightner 1993).

تشخیص

تشخیص عفونت ویبریوزیس براساس نشانه‌های بالینی و مطالعات بافت شناسی می باشد. از دستگاه گوارش و هپاتوپانکراس مقطع تهیه شده و ممکن است از همولنف و هپاتوپانکراس بر روی پلیت‌های حاوی آگار عمومی یا آگار انتخابی ویبریو (TCBS) کشت داده شوند. در بررسی پست لارو کل جانور را له کرده و سپس بر روی پلیت حاوی آگار انتخابی تلقیح می نمایند. گاه کلنی‌های درخشان در مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت پس از گرماگذاری پلیت ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس مشاهده می شوند (تصویر ۱).



تصویر ۱- باکتری درخشان (ویبریو هاروی)

گونه‌های ویبریو به روش‌های متفاوتی شناسایی می شوند از جمله رنگ آمیزی گرم، تست تحرک، تست اکسیداز، شیوه مصرف گلوکز، رشد در حضور کلرید سدیم، کاهش نیترات و تست درخشندگی. که برای این منظور می توان از کیت های تجاری مانند API و Biolog بهره برد. البته امروزه از روش های ملکولی مانند توالی یابی ژن ۱۶S rDNA به منظور تشخیص دقیق گونه ها و سویه های باکتریایی استفاده می گردد. روش دیسک کربی–بائور یا تست حداقل غلظت مهاری (Owens & Glazebrook) برای شناسایی گونه های ویبریو استفاده می شود (Rao, 2013;Lightner, 1996).

روش انتقال:

گونه‌های ویبریو در آب مورد استفاده برای تکثیر و پرورش میگو و همچنین بیوفیلم تشکیل شده بر روی ساختارهای در تماس با آب در سالن‌های تکثیر و مزارع پرورش میگو؛ وجود دارد. باکتری از طریق زخم، منافذ پوشش حیوان یا تغذیه وارد بدن میگو می‌شود. منبع اصلی ویبریو هاروی در سالن تکثیر محتویات روده میانی میگوهای ماده آماده تخم ریزی می‌باشد که در طی تخم ریزی از بدن آن خارج می‌شوند (Lavilla – pitogo et al, 1990).

پیشگیری و درمان

آلودگی های ویبریویی را می‌توان با مدیریت مناسب بهداشتی آب کنترل نمود تا از این طریق مانع بروز ویبریوزیس در محل تکثیر و پرورش میگو گردید و همچنین میزان استرس وارده به میگوها را کاهش داد. عوامل موثر در پیشگیری از انتقال بیماری شامل: انتخاب مکان مناسب، طراحی خوب استخر، و آماده سازی قبل از ریختن بچه میگو می باشد. افزایش تعویض آب روزانه و کاهش توده زیستی موجود در استخر در زمان پرورش به منظور کاهش مرگ و میر ناشی از ویبریوزیس توصیه شده است. همچنین زه‌کشی، خشک کردن و آهک پاشی استخرها پس از برداشت توصیه می‌گردد.

به منظور کنترل ویبریوهای درخشان سالن تکثیر، شستن تخم‌ها با ید و فرمالدئید و همچنین جلوگیری از آلوده شدن تخم‌ها با مدفوع میگو، توصیه می شود. از دیگر راهکار های مناسب جهت پیشگیری از بروز ویبریزیس می توان به ضد عفونی آب توسط کلر، استفاده از پروبیوتیک ها و مواد محرک سیستم ایمنی اشاره نمود.

۲-۵-۱- بیماری نکروز عفونی هپاتوپانکراس[۳۱]

عامل:

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم منفی، چند شکلی و پاتوژن اجباری داخل سلولی می باشد. از نظر تاکسونومی این باکتری متعلق به خانواده پروتئوباکتریاسه[۳۲] می باشد. این باکتری را آلفا پرتئوباکتریوم[۳۳] نیز می نامند. دو شکل از این باکتری در بیماری نکروز عفونی هپاتوپانکراس مشخص شده است. یک فرم شکل استوانه ای ریکتزیا مانند با اندازه ۰/۹ × ۰/۳میکرون که فاقد تاژک می باشد. فرم دیگر آن حالت مارپیچی و حلزونی مانند بوده و اندازه آن ۲/۹× ۰/۲ میکرون می باشد. فرم مارپیچی[۳۴] آن دارای ۸ تاژک بوده که در قسمت نوک این باکتری قرار گرفته است. همچنین یک تار و تاژک اضافه نیز در قسمت تیغه مارپیچی وجود دارد. مطالعات

[31] Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP)
[32] Proteobacteriaceae
[33] *Alfa proteobacterium*
[34] Helical

ژنوتیپی نشان داده است که کلیه سویه های باکتری ایجاد کننده بیماری نکروز عفونی هپاتوپانکراس در نقاط مختلف دنیا خیلی بهم نزدیک می باشد (Loy et al, 1996).

اپیدمیولوژی:

بیماری تاکنون در میگوهای آزتکوس[۳۵] ، پنئوس استلیفروس[۳۶]، لیتوپنئوس استیلیورستیس[۳۷]، لیتوپنئوس وانامی و پنئوس کالیفرنینسیس[۳۸] و از کشورهای آمریکای لاتین از جمله پرو، اکوادور،برزیل، ونزوئلا، پاناما و کاستاریکا و اخیراً از کشورهای آسیای جنوب شرقی از جمله تایلند، سنگاپور، مالزی وچین نیز گزارش شده است.

علایم کلینیکی:

علایم کلینیکی بیماری شامل کاهش مصرف غذا، لاغری و روده ها خالی، افزایش ضریب تبدیل غذایی،کاهش رشد، نسبت طول میگو به وزن میگو و پهنای بدن میگو کاهش یافته و میگوها لاغر می شوند. پوسته میگو نرم و بدن میگوها سست می شود. آبشش های میگوها سیاه و تیره شده و رنگدانه های کروماتوفور در قسمتهای انتهایی اندامهای حرکتی میگو بالاخص یوروپد[۳۹] و پلئوپد[۴۰] گسترش یافته و باکتریهای رسوب کننده در سطح پوسته میگو افزایش یافته و میگوها بی حال شده و بعد از مدتی از بین می روند (Lightner et al., 1994) (تصویر ۲).

هپاتوپانکراس میگوها آتروفی و کوچک شده و مرکز هپاتوپانکراس سفید بی رنگ شده و کاملاً با حالت طبیعی هپاتوپانکراس قابل تمایز می باشد. همچنین در بافت هپاتوپانکراس رگه هایی سیاه ناشی از ملانوزه شدن مجاری هپاتوپانکراس مشاهده می شود و بافت هپاتوپانکراس نرم و آبکی شده و حالت ادماتوز داشته و مرکز آن آبکی است (Lightner, 1996;Johnson, 1990).

آسیب شناسی:

در آسیب شناسی آتروفی ملایم تا شدید به همراه نقاط شدید گرانولوماتوز در مجاری هپاتوپانکراس دیده می شود که ممکن است در یک یا چند مجاری وجود داشته باشند. سلولهای مجاری هپاتوپانکراس از حالت ستونی به حالت مربعی تغییر شکل داده و این سلولها حاوی مقدار کمی مولکولهای چربی بوده وفاقد واکوئل می باشند به ویژه در R-cell و به طور مشخص تعداد سلولهای ترشحی آنها کاهش یافته است همچنین تجمعی از باکتری های ایجاد کننده بیماری در مجاری هپاتوپانکراس قابل تشخیص است (Lightner, 1996;Johnson, 1990)

---

[35] *P.aztecus*
[36] *P. steliferus*
[37] *L. styliorostis*
[38] *P.californiensis*
[39] Uropods
[40] Pleopods

تصویر ۲- علایم ظاهری بیماری NHP

عفونتهای ریکتزیایی [41]

ریکتزیا یا باکتری های ریکتزیا شکل[42] با اندازه ۱/۶µm – ۰/۸× ۰/۷ – ۰/۲ از مهمترین عوامل عفونی در این بیماری می باشند. این باکتریها گرم منفی بوده و به صورت استوانه ای می باشند. باکتری بوسیله یک پوشش سلولی احاطه شده که خود دارای سه لایه داخلی ، میانی و خارجی می باشند. مهمترین اندامهایی که باکتری به آنها حمله می کند شامل ارگان لنفاوی، بافت پیوندی (به صورت سیستمی) همولنف، فاگوسیتها و اپی تلیال سطح کوتیکول و هپاتوپانکراس می باشد. این باکتری انگل اجباری داخل سلولی بوده و فقط در سیتوپلاسم سلولهای بافت هدف رشد می کند ولی در پاره ای مواقع در هسته نیز رشد می کند (Krol Anderson et al., 1987 ; et al., 1991).

علایم کلینیکی:

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

آسیب شناسی

در مطالعات آسیب شناسی در اغلب اوقات باکتری را در داخل سیتوپلاسم دیده و به صورت کلنی های کوچک به شکل اینکلوژن بادی می باشند. اطراف باکتریها یک پوشش با غشاء سه لایه وجود دارد و اندازه این

[41] Ricketsial infection
[42]) Ricketsia Like Bacteria (RLB

میکروکلنی ها ۵۰µm-۵ می باشد . با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آبی را جذب نموده و گرم منفی بوده و با رنگ آمیزی فولگن مثبت می باشند. با رنگ آمیزی گیمسا و درشت نمایی ۴۰۰ اطلاعات مهمتری از این باکتری به دست می آید. البته رنگ آمیزی نقره[۴۳] به منظور مشاهده باکتریهای داخل سلولی اطلاعات کاملتری را نشان می دهد (Lightner, 1996).

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

۳-۵-۱- بیماری سل میگو[۴۴]

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم مثبت، اسید فست و استوانه ای شکل بنام مایکوباکتریوم[۴۵] بوده که معمولاً با ایجاد ندولهای ملانوزه و ضایعات گراتولوماتوزی همراه می باشد. برای جدا سازی این باکتری نیاز به محیطهای اختصاصی بوده و یک بیماری مشترک با انسان می باشد و موجب ایجاد ضایعاتی بر روی دستهای پرورش دهندگان میگو یا کارگران واحدهای عمل آوری می‌شود. از مهمترین گونه هایی که ایجاد بیماری می کنند عبارتند از : مایکوباکتریوم مارینوم[۴۶] و مایکوباکتریوم فورتوئیتوم[۴۷] (Lightner &Lightner, 1993 ,1996; Redman, 1986)

علایم کلینیکی

علایم ظاهری همراه این بیماری، به صورت تعداد زیادی کانونهای ملانوزه در قسمتهای مختلف بدن میگو و نواحی عضلات، تخمدان، قلب و آبشش مشاهده می شود. در پاره ای مواقع یک زخم بزرگ غیر منظم در سطح کوتیکول ظاهر می شود و نقاط ملانوزه متعدد دیده نمی شود.

---

[43] silver stain
[44] Shrimp Tuberculosis
[45] *Mycobacterium*
[46] *M.marinum*
[47] *M.fortuitum*

آسیب شناسی

در رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین ضایعات ایجاد شده بر روی بدن و اندامهای مختلف شامل کانونهای ملانوزه با تجمعی از سلولهای هموسیت و یا ضایعات گرانولوماتوزی می‌باشد. در این ضایعات و کانونهای ملانوزه باکتریهای آبی کم رنگ استوانه ای شکل ممکن است به همراه تجمع سلولهای هموسیتی مشاهده شود. در رنگ آمیزی گرم این باکتریها در ندولها یا گره‌ها به صورت گرم مثبت بوده و در رنگ آمیزی زیل نلسون یا کربول فوشین[۴۸] که رنگ آمیزی های خاص باکتریهای اسید – فست می باشد، رنگ باکتری ها به صورت قرمز روشن مشاهده می شود (, 1996; Lightner & Redman, 1986Lightner, 1993).

۶-۱- بیماری های انگلی

۱-۶-۱- بیماری میکروسپوریدیا یا میگوی پنبه ای[۴۹]

این بیماری را که بیماری میگوی پنبه ای، میگوی شیری، میکروسپوریدیا و یا بیماری نوزما[۵۰] می نامند یکی از بیماریهای مهم انگلی میگو می باشد. عامل ایجاد کننده بیماری جنس های مختلفی از جمله (Ameson(=Nosema، Agmasoma (=Thelohania) و(Pleistophora(=plistophora از میکروسپوریدیاها بوده که از این جنس‌ها گونه‌های آگمازوما پنئی[۵۱]، آگمازوما دوراوا[۵۲]، آمزون نلسونی[۵۳] و پلیستوفورا پنئی[۵۴] از مهمترین آنها می باشند (Johnson, 1990).

علائم کلینیکی

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

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

---

[48] Carbol fuchsine
[49] Cotton shrimp
Nosema disease[50]
[51] *Ag.penaei*
[52] *Ag.duorava*
[53] *Am.nelsoni*
[54] *P.penaei*

آسیب شناسی

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

۲-۶-۱- هاپلوسپوردیا

هاپلوسپوردیا یا عفونت هاپلوسپوردیایی یا هاپلوسپوردیای هپاتوپانکراس یکی از بیماریهایی است که توسط چند هاپلوسپوردیای مشهور در میگو ایجاد می شود. برخی از هاپلوسپوردیاهای جداسازی شده از میگوی مونودن آسیایی سبب ایجاد بیماری مشابهی در گونه های وحشی میگوهای خلیج مکزیک می‌شود. از نظر تاکسونومی هنوز مطالعات کاملی روی آنها صورت نگرفته است و برای این منظور مطالعات میکروسکوپ الکترونی گزاره (TEM) لازم است تا تاکسونومی آنها مشخص شود(J. A. Brock, and D.V. Lightner, 1990; Lightner, 1996).

آسیب شناسی

در این روش انگل را در صورت آلودگی از مجاری هپاتوپانکراس و در سلولهای اپی تلیال می توان مشاهده نمود. بطور مشخص انگل پرتوزا را در قسمت بالائی و بیرونی مجاری هپاتوپانکراس به صورت یک هسته و به صورت پلاسمید چند هسته ای می توان مشاهده نمود. این سلول تک هسته ای را می توان در مجاری هپاتوپانکراس که به نظر می رسد بعد از رها شدن از سلولهای نکروزه جدا شده است مشاهده نمود. مجاری به شدت عفونی شده هپاتوپانکراس به این پرتوزاء به طور مشخص توسط توده ای از هموسیتها پوشیده شده است و حالت کپسول ملانینی در بخشی از مجاری هپاتوپانکراس قابل روئیت است (J. A. Brock, and D.V. Lightner, 1990; Flegel etal, 1992; Lightner, 1996).

۳-۶-۱- بیماری فولینگ آبشش، ضمایم حرکتی و سطح پوششی میگو

میگوهای پرورش یافته در سیستم های پرورشی گسترده، متراکم و نیمه متراکم یا در محیطهایی که دارای آب با کیفیت پایین می باشند، معمولاً دچار بیماری فولینگ آبشش یا سطوح پوششی می شوند. همه یا بخش عمده ای از میکروارگانیسم هایی که در این بیماری درگیر می باشند معمولاً میکروارگانیسمهای آزاد هستند و پاتوژن واقعی نمی باشند. به دلیل اینکه این میکروارگانیسمها، میگو را به عنوان یک ماده جهت چسبیدن انتخاب می‌نمایند، این میکرو ارگانیسمها را همخورسطحی زی[55] و یا اپی بیونت[56] می‌نامند. در اغلب اوقات این میکروارگانیسمها، بطور مستقیم موجب صدمه به میگو نمی‌شوند ولی به طور غیرمستقیم با چسبیدن به آبشش

[55] epicommonsal
[56] epibiont

میگوها یا سطوح بدن موجب مزاحمت‌هایی برای این موجود زنده می شوند. این ارگانیسمها ممکن است با جلوگیری از تبادل آب در سطح آبشش یا تبادل گاز، باعث ایجاد تلفات در میگو ها شوند. همچنین این ارگانیسمها ممکن است در پوست اندازی، حرکت و تغذیه نیز مزاحمت هایی ایجاد نمایند. برخی از این ارگانیسمها نیز باعث تولید توکسین های خارج سلولی شده که باعث درجاتی از آسیب های بافتی می شود. این بیماری را به نامهای مختلف ، از جمله بیماری Filamentous gill disease یا بیماری Bacterial gill disease، بیماری Fouled gill ، Black gill، Protozoan fouling یا Brown gill می‌شناسند(Sindermann, 1990a).

عامل ایجاد کننده بیماری

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

- گروهی از باکتریهای گرم منفی، PAS مثبت و ارگانیسمهای شبیه لوکوتریکس[۵۷] مانند: *Leucothrix* spp. و *Thiothrix* sp.
- باکتریهای دارای تاژک های کوتاه[۵۸] یا از گروه باکتریهای تاژک دار دارای زنجیره مثل فلاو باکتریاها، سایتوفاگا، فلکسی باکتر، ویبریوها، اسپروکیتها و سایر گونه های باکتری.
- پرتوزواها شامل Peritrichous، Colonial Ciliate مثل *Zoothamanium* ، *Epistylis* و *Vorticella*.
  - Apostome ciliate مثل جنس *Ascophrys* و سایرین
- Loricate ciliate مثل جنس *Lagenophrys* و جنس *Cothurnia*
- گروه Suctorian مثل جنس *Acineta* ، جنس *Ephelota* و سایرین
- پروتوزآهای فلاژلا شبیه *Bodo – like flagellate* و *Chrysidella* را می توان نام برد.
- جلبکها
- دیاتومه ها شبیه جنس *Pennate diatom* شبیه جنس *Nitzchia* ، جنس *Amphiprora* و جنس *Navicula*
- جلبکهای سبز شبیه جنس *Enteromorpha* و سایر جلبکهای تاژک دار
- جلبکهای سبز – آبی شبیه *Spirulina subsala* ، *Lyngbya* و جنس *Schizothrix*
- عوامل غیر زنده نیز شامل نمک و آهن از عوامل این بیماری می‌باشند(Lightner, 1996; Overstreet, 1985).

علائم کلینیکی و آسیب شناسی

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

---

[57] Leucothrix Lik Origanism (LLO)
[58] Small Little Filaments (SLF)

- آبشش قهوه ای یا سیاه با تغییرات اندامهای حرکتی ممکن است ناشی از عوامل ریز[۵۹]، (رس و یا سایر مواد خارجی) که توسط میکروارگانیسمهای مولد فولینگ به دام می افتند و در سطح آبشش یا زوائد حرکتی موجب ایجاد یک منطقه آلوده یا تغییر رنگ سیاه تا قهوه ای می شود.
- آبشش سبزیا سبزقهوه ای ممکن است ناشی از تجمع جلبک ها بر روی آبشش ها باشد.
- حالت کرکی یا پنبه ای یا قارچی زوائد حرکتی میگو: این اندامها یا کوتیکول سطح کاراپاس ممکن است نشان دهنده این وضعیت بوده و این حالت در زمانیکه عفونت شدید فولینگهای سطحی اتفاق افتد مشاهده می شود.

تهیه لام مرطوب از چنین مناطقی و آزمایش با میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ تا ۲۰۰ نشان دهنده میکروارگانیسمهای سطحی موجود می باشد (Anderson I et al., 1987; Overstreet, 1985; Lightner, 1996;).

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

۴-۶-۱- بیماری گریگارین

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

علایم کلینیکی و آسیب شناسی

میگوهای جوان آلوده به این انگل کاهش رشد نشان داده و مصرف غذا (FCR) آنها افزایش می یابد. روده میانی این دسته از میگوها به رنگ زرد تغییر یافته و این تغییر رنگ به آسانی از زیرکوتیکول پیدا است. در لاروها و پست لاروها، تروفوزئیت گریگارین که در روده میانی قرار دارد براحتی با بزرگنمایی ۱۰ یا ۲۰ میکروسکوپ و یا با لام مرطوب قابل مشاهده می باشد(Lightner, 1993, 1996;J. A. Brock, and D.V. Lightner, 1990)

در روش آسیب شناسی انگل را می توان در قسمت روده میانی (غالباً در مجاری قدامی روده میانی)، مجاری اولیه هپاتوپانکراس، قسمت عقبی معده و بخش جلویی روده خلفی مشاهده نمود. در هنگام بروز عفونت شدید، ضایعات مشخص همراه با کاهش میزان موکوس در روده میانی، هیپرپلازی در اپی تلیوم روده میانی و سوراخ شدن روده میانی قابل رویت است(Lightner, 1996 Couch, 1974 ;).

[59] Detritus

۷-۱- مروری بر منابع

تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص در آمریکا و آسیا:

اولین بار در سال ۱۹۸۵ پست لارو میگوی وانامی از پاناما به کارولینای جنوبی آمریکا وارد شد و هر ساله برمیزان جمعیت و تولید آن بعنوان گونه اصلی تکثیر و پرورش در آمریکای شمالی افزوده میشود. شش گونه از میگوهای خانواده پنائیده شامل پنئوس ژاپونیکوس[۶۰]، پنئوس استیلیروستریس[۶۱]، پنئوس مونودون[۶۲]، پنئوس چاینسیس[۶۳]، لیتوپنئوس وانامی[۶۴]، پنئوس ایندیکوس[۶۵] برای مقاصد تحقیقاتی و پرورشی به هاوایی وارد گردیدند ولی فقط تولید میگوی وانامی عاری از بیماری خاص در حال حاضر موفقیت آمیز و تجارتی شده است، هرچند سایر گونه ها هنوز نگهداری و مورد تحقیق قرار می گیرند (فقط گونه سفید هندی بدلیل عدم امکان عاری شدن از عوامل بیماریزای مهم، مورد حذف قرار گرفت)(Carlos et al , 2005).

در سال ۱۹۸۹ دکتر لایتنر و همکارانش در دانشگاه آریزونا، از یک مرکز تکثیر واقع در مکزیک ۱۵۰۰۰ پست لارو میگوی وانامی را به آمریکا منتقل نمودند تا نسبت به تولید میگوهای مولد عاری از بیماری IHHN اقدام شود. سپس Wyban و همکارانش در سال ۱۹۹۳ با استفاده از بودجه دولتی "برنامه پرورش میگوی دریایی آمریکا" (USMSFP) و با رعایت قوانین و مقررات اتحادیه ICES که در سال ۱۹۹۰ وضع شده بود، اولین ذخیره میگوی عاری از بیماری خاص که عاری از عوامل مهم بیماریزای قابل شناسایی تا آن زمان بود را از گونه وانامی تولید نمودند.

در قاره آسیا اولین بار، واردات میگوی وانامی عاری از بیماری خاص در سال ۱۹۹۶ از هاوایی آمریکا به تایوان انجام شد. پس از موفقیت درایجاد رسیدگی جنسی مولدین، تولید پست لارو و پرورش این گونه، موج عظیمی از درخواستها برای واردات مولد وانامی ایجاد شد و متعاقب آن اولین محموله های مولدین وحشی از کشورهای مختلف آمریکای لاتین در سال ۱۹۹۷ وارد گردید. تولید ۱۲ تن در هکتار میگوی وانامی ۱۵-۱۲ گرمی ظرف مدت ۷۵ روز رکورد بسیار چشمگیری بود که در تایلند و اندونزی نیز تکرار شد. در اواسط سال ۱۹۹۸ پرورش دهندگان چینی و تایوانی نسبت به مولدسازی میگوهای پرورشی وانامی تولیدی خودشان اقدام نمودند ولی شیوع بیماری تورا سندرم ناشی از واردات میگوهای مولد وحشی از آمریکای لاتین موجب تلفات بیش از ۸۰٪ میگوهای جوان ظرف سه روز در تایوان شد. پس از آن بروز تلفات ناشی از بیماری ویروسی لکه سفید و وقوع بیماریهای کندی رشد و سندروم بد شکلی و کوتولگی[۶۶]ناشی از فرم مزمن بیماری IHHNV نیز مشاهده شد. در چین پس از یکسال موفقیت در برداشت زیاد میگو در واحد سطح مزارع پرورشی ، مشکلات حاصل از واردات

---

[60] *P. japonicus*
[61] *P. stylirostris*
[62] *P. monodon*
[63] *P. chinensis*
[64] *L. vannamei*
[65] *P. indicus*
[66] Runt deformity syndrome (RDS)

مولدین غیر عاری از بیماری خاص از تایوان وتولید مولدین پرورشی وانامی بدون توجه به مسائل همخونی و ایمنی زیستی در سالهای بعد، گسترش یافت و بیماریهای بیشتری نظیر سندروم تورا در مراکز تکثیر و پرورش میگو ایجاد شد که مرگ و میر پست لاروها و میگوهای جوان را بدنبال داشت. بیماریهای که در مراکز تکثیر و مزارع پرورشی میگوی وانامی شایع هستند در جداول جدول ۲ وجدول ۳ آورده شده اند.

جدول ۲- مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مراکز تکثیر

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

جدول ۳- مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مزارع پرورشی

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

۸-۱- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در داخل کشور

در ایران از مزارع پرورش میگوی سفید هندی در سایت حله استان بوشهر باکتری های ویبریو پاراهمولیتیکوس[۶۷]، ویبریو آنگوئیلاروم[۶۸]و ویبریو هاروی[۶۹] جداسازی شده است (آوخ کیسمی ۱۳۷۷).

بر اساس مطالعه دشتیان نسب و همکاران (۱۳۸۹) بر عوامل بیماریزای باکتریایی در مراکز تکثیر میگوی سفیدهندی و سفید غربی استان بوشهر در سالهای ۸۵ و ۸۶ ، شش گونه ویبریو از مراکز تکثیر استان بوشهر شامل ویبریو آلجینولیتیکوس[۷۰]، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو هاروی، ویبریو فلاویالیس[۷۱]، ویبریو

[67] *Vibrio parahaemolyticus*
[68] *Vibrio anguillarum*
[69] *Vibrio harveyi*
[70] *V. alginolyticus*
[71] *V.fluvialis*

ولنیفیکوس[۷۲] و ویبریو آنگوئیلاروم و یک گونه ویبریوی ناشناخته جداسازی گردید که بیشترین فراوانی در سال ۱۳۸۵ مربوط به ویبریو آلجینولیتیکوس و در سال ۸۶ مربوط به ویبریو پاراهمولیتیکوس بود (دشتیان نسب ۱۳۸۹) .

میربخش و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه ای بر روی میزان فراوانی و گوناگونی گونه های ویبریو در میگوهای پرورشی سفید غربی استان بوشهر، ۹ گونه ویبریو شامل: ویبریو آلجینولیتیکوس(۹۵/۳۰درصد)، ویبریو آنگوئیلاروم (۹۲/۱۷درصد)، ویبریو پاراهمولیتیکوس (۴۶/۱۷ درصد)، ویبریو میمیکوس[۷۳] (۲۶/۶درصد) ویبریو مچنیکووی[۷۴](۲۶/۶درصد)، ویبریو ولنیفیکوس(۱/۸۵ درصد)، ویبریو سینسیناتینسیس[۷۵]((۴/۸۷ درصد)، ویبریو دامسلا[۷۶] (۱/۸۵ درصد)، ویبریو فلوویالیس (۴/۸۷ درصد) و گونه های ویبریوی ناشناخته جدا سازی و شناسایی کردند که گونه ویبریو آلجینولیتیکوس بیشترین فراوانی را دارا بود و میانگین تعداد کل باکتریها در هپاتوپانکراس میگوها بیشتر از سایر ارگانهای مورد بررسی بود (میربخش ۱۳۸۹).

در تحقیقی که تمجیدی و همکاران در سال ۱۳۷۴ بر روی میگوهای پرورشی ببری سیاه و سفید هندی در منطقه قفاس آبادان انجام دادند تک یاخته اپیستیلیس[۷۷] بیشترین درصد فراوانی و بعد به ترتیب زوتامنیوم[۷۸] و ورتیسلا[۷۹]قرار داشتند و در ضمایم بیشتر از آبشش ها مشاهده شد (تمجیدی ۱۳۸۳).

در بررسی میگوهای پرورشی منطقه حله بوشهر در سال ۱۳۷۹ نیز زوتامنیوم در سطح میگو با فراوانی زیادی گزارش گردیده است (مال الهی ۱۳۸۰).

در مطالعه ای که در منطقه گواتر چابهار روی انگل های میگوی سفید هندی پرورشی در سال ۱۳۸۲صورت گرفت علاوه بر سه جنس تک یاخته نامبرده تک یاخته آسینتا[۸۰] نیز گزارش شده و بالاترین میزان شیوع مانند پژوهش حاضر متعلق به تک یاخته زوتامنیوم بودکه بر روی پاهای شنا بیشتر از سایر سطوح بدن میگومشاهده شد (عابدیان ۱۳۸۵).

بر اساس گزارش میربخش و همکاران (۱۳۹۱) میزان شیوع آلودگی به انگل های سطحی در میگوی جوان و بالغ پنئوس ایندیکوس ۶۰/۸ درصد محاسبه شد. بیشترین میزان شیوع مربوط به تک یاخته زوتامنیوم با شیوع۵۵/۸ ٪ در ضمایم و ۱۹/۲٪ در آبشش بود و پس از آن به ترتیب تک یاخته اپیستیلیس با شیوع ۲۰ ٪ در ضمایم و ۱/۶۷٪ در آبشش و تک یاخته ورتیسلا با شیوع ۲/۵ ٪در ضمایم در آبشش جدا سازی و شناسایی شدند، همچنین هیچگونه انگل کرمی و داخلی مشاهده نشد (میربخش ۱۳۹۱).

---

[72] *V. vulnificus*
[73] *V.mimicus*
[74] *V.metschnikovii*
[75] *V.cincinnatiensis*
[76] *V.damsella*
[77] *Epistylis* spp.
[78] *Zoothamnium* spp.
[79] *Vorticella* spp.
[80]. *Asineta* sp

۹-۱- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در خارج از کشور

از دهه ۱۹۹۰ باکتری های خانواده ویبریو به خصوص ویبریو هاروی سبب ضررهای اقتصادی بسیاری به صنعت تکثیر و پرورش میگو در کشورهای آمریکای جنوبی ، آسیا و استرالیا گردیده است که گاه میزان این تلفات به ۱۰۰ درصد می رسید .

در سال ۱۹۹۰ Song و همکارانش تلفات سنگین از مزارع پرورش میگوی کروما[81] را در تایوان گزارش کردندکه عامل آن باکتری ویبریو فلویالیس بود (Song, 1990).

Lavilla و همکاران (۱۹۹۰) مرگ و میر لاروهای میگوی پنئوس مونودون را به دلیل شیوع باکتری ویبریو هاروی و ویبریو اسپلندیدوس[82] در مراکز تکثیر فیلیپین گزارش کرده اند(Lavilla - pitogo, 1990).

Gomez و همکاران (۱۹۹۸) از هپاتوپانکراس میگوهای غیر بیمار سفید غربی ویبریو آلجینولیتیکوس،ویبریو دامسلا و گونه ناشناخته دیگری جداسازی کردند(Gomez B.G., 1998) .

در مطالعاتی که در خلیج مکزیک و فلوریدا بر روی میگو های پرورشی و وحشی لیتوپنئوس وانامی، فارفانتپنئوس آزتکوس[83]، لیتوپنئوس ستیفروس[84] و همچنین بر روی خرچنگ ها صورت گرفته است همگی نشانگر این است که سه تک یاخته زوتامنیوم، ورتیسلا و اپیستیلیس از شایعترین همخورهای سطحی زی بر روی بدن سخت پوستان می باشند و دارای گسترش جهانی می باشند (Itani et al, 2002; Norma Hongwei M.A., 2006 ; A. López-Téllez, 2009; Vidal-Martínez, Jiménez, & Simá, 2002; Villela, Inversen, & Sinderman, 1970)

۱۰-۱- فرضیه

- بیماری باکتریایی (نکروز هپاتوپانکراس) و انگلی (Microsporidians و Gregarines) مطابق با لیست سازمان جهانی بهداشت دام برای میگوها بیماریزا می باشند.
- میگوهای عاری از بیماری خاص عاری از عوامل پاتوژن لیست سازمان جهانی بهداشت دام می باشند.

۱۱-۱- اهداف تحقیق

- پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی در مراحل مختلف تولید میگوی عاری از بیماری خاص
- جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی پاتوژن جداسازی شده از میگوی سفید غربی پرورشی عاری از بیماری خاص

---

[81] *Penaeus japonicus*
[82] *V.splendidus*
[83] *Farfantepenaeus aztecus*
[84] *Litopenaeus setiferus*

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- تجهیزات مورد نیاز

دستگاه ترمال سایکلر - دستگاه میکروسانترفیوژ - دستگاه الکتروفورز - دستگاه UV transluminator -- دستگاه گرداننده[۸۵] - دستگاه حرارتی برای لوله ها – میکروپیپت- سیستم عکس برداری دیجیتال- اتوکلاو- انکوباتور- ترازو- هیتر- هود لامینار- چراغ گاز آزمایشگاه

لوازم شیشه ای و غیره :

ظروف نمونه برداری استریل- لوله آزمایش- ارلن- پی پت مدرج- پلیت استریل- هاون چینی- میله شیشه ای ال شکل- قیچی- اسکالپل- پنس- جا لوله ای

۲-۲- مواد مصرفی

محیط کشت **تیوسولفات سیترات نمک صفراوی ساکارز آگار (TCBS)**- کلرید سدیم **(NaCl)**- کلروفرم- اتانول ۹۵ درجه- اتیدیوم بروماید- بافر الکترو فورز- ژل آگارز- آب مقطر

کیت تخلیص شامل:

محلول DTAB- محلول CTAB- محلول حلال

کیت آمپلیفیکاسیون توالی ویژه NHPB

پیش مخلوط اولین PCR شامل :

بافر واکنش، dNTPs ، پرایمرهای ویژه NHPB

پیش مخلوط Nested PCR شامل:

بافر واکنش ، dNTPs ، پرایمرهای ویژه NHPB-

محلول استاندارد مثبت:

tRNA مخمر

IQzyme DNA polymerase

6X loading dye

شاخص وزن مولکولی DNA شامل: وزن های مولکولی bp ۸۴۸، bp ۶۳۰ و bp ۳۳۳.

۲-۳- میکروارگانیسم های مورد پایش

مطابق با جدول ۱ باکتری و انگل های اصلی مورد بررسی در سیستم مراقبتی این پروژه به ترتیب عامل بیماری باکتریایی نکروز عفونی هپاتوپانکراس و و انگل های میکروسپوریدیا و گرگارین بودند و همچنین جهت

[85] Vortex

استقرار و نظارت کامل بر سیستم مراقبتی، پایش باکتری های خانواده ویبریوناسه، در شرایطی که علایم کلینیکی بیماری مشخص بود در دستورکار قرار گرفت.

۴-۲- حجم نمونه گیری

برای این منظور نمونه گیری به روش تصادفی انجام شد، از این روش زمانی استفاده می شود که جمعیتی از میگوها را از نظر شرایط سلامتی یا بیماری و یا شیوع پاتوژن های خاص مورد بررسی قرار می دهند، در این پژوهش، حجم نمونه بر اساس شیوع مورد انتظار پاتوژن های خاص(۵ درصد) و یا درجه اطمینان آماری (۹۵ درصد) تعیین گردید. در جدول ۴ میزان حجم نمونه بر اساس در صد شیوع و اندازه جمعیت آورده شده است (Lightner, 1996).

جدول ۴- تعیین تعداد نمونه مورد بررسی بر مبنای درصد شیوع احتمالی بیماری در جمعیت

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

نمونه گیری غیر تصادفی: به منظور پایش باکتری های خانواده ویبریوناسه، در شرایطی که علایم کلینیکی بیماری مشخص بود، حداقل ۱۰ نمونه که دارای علایم کلینیکی شاخص بودند از نظر بیماری مورد بررسی قرار گرفتند.

۵-۲- نمونه های مورد بررسی

انواع نمونه های مورد بررسی و زمان نمونه برداری در هر نسل در فازهای مختلف اجرا مطابق جدول ۵ بود.

جدول ۵ - نمونه برداری های صورت گرفته در هر نسل

نسل ها و مراحل اجرایی در هر فاز		
فاز اول(نسلF_0) شامل: به گزینی و تکثیر مولدینF_0	فاز دوم (نسل F_1) شامل: پرورش لارو هایF_1 تا مرحله پیش مولد، مولد سازی میگو هایF_1 تا مرحله رسیدگی جنسی و به گزینی و تکثیر مولدینF_1	فاز سوم (نسل F_2): پرورش لارو های F_2تا مرحله پیش مولد و مولد سازی میگو های F_2
میگوی پیش مولد، آب، غذای تر، غذای خشک	میگوی مولد، لارو، آب، غذای تر، غذای خشک	مراحل لاروی، آب، غذای خشک، غذای زنده

در کلیه مراحل، غذای مورد مصرف میگوها اعم از غذای تر(ماهی مرکب، کرم نرئیس و صدف ملالیس)، کنسانتره و زنده(جلبک اسپیرولینا و آرتمیا) قبل از مصرف مورد پایش قرار گرفته: غذای کنسانتره، غذای تر و غذای زنده) همچنین و همچنین علاوه بر پاتوژن های باکتریایی و انگلی لیست شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام، باکتری های خانواده ویبریوناسه در آب و در موارد لزوم میگوها نیز شمارش و پایش گردیدند و همچنین پایش وضعیت سلامت میگوها و تلفات آنها به صورت روزانه از طریق حضورکارشناسان بخش بهداشت و بیماریها در پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص انجام گردید.

۶-۲- نحوه انتقال نمونه ها

نمونه ها را سریع به آزمایشگاه انتقال داده و در شرایطی که نمونه شامل: آب، غذای تر و یا میگو ها ی غیر زنده بود انتقال آن ها، در فلاسک مناسب، در مجاورت یخ و دور از نور مستقیم انجام شد.

۷-۲- تعیین جمعیت های اولیه برای تولید میگوی مولد عاری از بیماری خاص

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

جدول ۶- لیست استخرهای نمونه برداری شده جهت پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی شهریور و مهر ۱۳۹۱

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

در ابتدا نمونه ها مورد مشاهده مستقیم قرار گرفته (تصویر ۱) و سپس مورد آزمایشات باکتری شناسی و انگل شناسی قرار داده شدند.

تصویر ۱- تعیین جمعیت های اولیه برای تولید میگوی مولد عاری از بیماری خاص

۸-۲- روش مطالعه میگوهای جوان، بالغ و مولدین (Lightner, 1996)

روش مطالعه مستقیم[۸۶]:

بررسی میگو از نظر تغییر شکل، روستروم خمیده، آنتن پیچ خورده، پوسته نازک، پوسته خشن، تاول، ملانیزه شدن نواحی مرکزی پوسته یا ضمایم.

بررسی آبشش ها:

۱. تغییر رنگ آبشش ها بر اثر حضور میکروارگانیسم ها، آشغال، سیاه شدن
۲. وجود نواحی سفید برفی در آبشش ها که نشان دهنده بیماری حباب گاز است.

[86] Gross Examination

بررسی محتویات دستگاه گوارش:

هپاتوپانکراس از نظر آتروفی ، رنگ و بافت آن مورد بررسی قرار گرفت.

الف) سفید و پر از مایع: آتروفی شدید

ب) رگه های سیاه : نکروز عفونی هپاتوپانکراس (SHPNS) ، احتمال عفونت وبیریو وجود دارد و یا مسمومیت با آفلاتوکسین)

ج) هپاتوپانکراس نارنجی یا قرمز : معمولاً طبیعی است.

بررسی عضلات یا گناد ها از نظر رنگ وبافت

۱- بررسی از نظر میگوی پنبه ای (عامل میکروسپوریدیوزیس)

۲- سندرم انقباض عضلات : یک ناهنجاری است که بر اثر تغذیه بوجود می آید ومیگو از ناحیه شکم منقبض شده و صاف نمی شود. در موارد حاد مرگ و میر بسیار بالاست (Lightner, 1996).

۹-۲- روش مطالعه مستقیم مرحله لاروی و پست لاروی

۱. نمونه را در یک پتری یا ظرف مناسب قرار داده و توسط میکروسکوپ تشریح از نظر فعالیت، محتویات روده، مدفوع، سطح خارجی، تغییر شکل، شکستگی، سیاه شدن یا از دست دادن ضمایم و غیره مورد بررسی قرار داده شد.

۲. میگوهای مشکوک را جدا کرده و به روی لام انتقال داده و یک قطره آب دریای استریل روی آن قرار داده و لامل گذاری گردید. ابتدا با بزرگنمایی کم عدسی شیئی و سپس با بزرگنمایی بیشتر میگو از جنبه های زیر مورد بررسی قرار گرفت:

۱. سطح ضمایم و کوتیکول از نظر وجود باکتری های رشته ای ، انگل ها و پلاک باکتریایی (گونه های ویبریو)

۲. مشاهده هیف ، زئوسپور های متحرک و میسلیوم استریل که دال بر مایکوزیس لاروی است

۳. آتروفی ماهیچه های شکمی خصوصاً بند ششم (ماهیچه باید ۱/۲ فضا را پر کند).

۴. آتروفی هپاتوپانکراس، واکوئلیزه شدن، قطرات چربی و BPPIBs

۵. (Bolitias blancas White ball): سلول های اپی تلیال هپاتوپانکراس و روده میانی زبر شده و احتمال بروز بیماری ویبریوزیس می باشد..

۷. تروفوزوئیت گرگارین در هپاتوپانکراس یا روده میانی

۸. تغییر شکل کوتیکولی

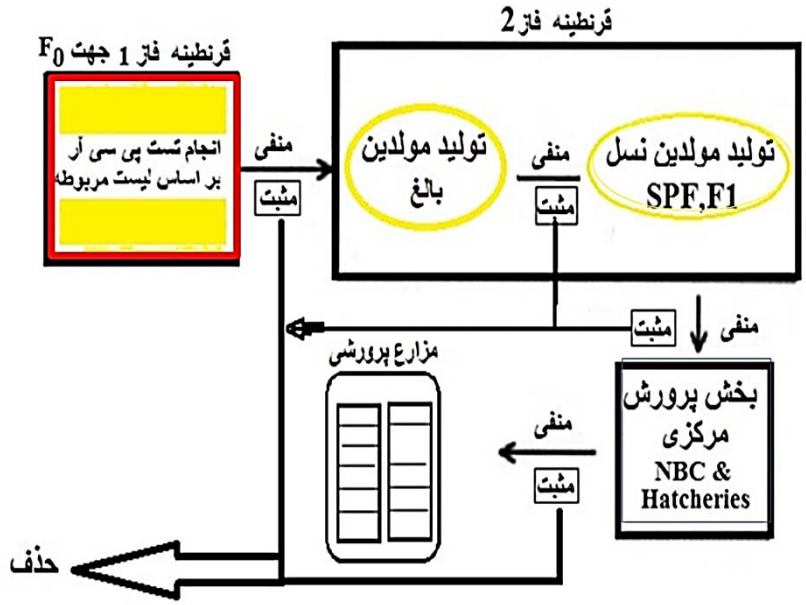
۹. ملانیزه شدن ضمایم

۱۰. باکتری های میله ای شکل متحرک در هموسل (مشکوک به ویبریوز)

پس از انجام آزمایشات تکمیلی شناسایی مولکولی باکتریایی و اطمینان از عدم وجود عوامل باکتریایی، انگلی و ویروسی مطابق با لیست ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام و در صورتیکه درجه شدت بیماری مطابق جدول ۷ که به صورت نیمه کمی تهیه شده صفر بود، میگوها قرنطینه و به عنوان فاز F0 در مرکز ملی تکثیر و پرورش میگوی عاری از عوامل بیماریزا نگهداری شدند و مطابق تصویر ۳ در هر مرحله از انتقال نسل ها آزمایشات نامبرده تکرار گردید.

جدول ۷- تعیین شدت بیماری در میگوها بر اساس یافته های کلینکی

درجه شدت بیماری	یافته های کلینیکی یا بافت شناسی
۰	هیچ علامتی از عفونت با پاتوژن، انگل یا اپی کمنسال وجود ندارد.
	هیچ ضایعه ای که شاخص سندرومی باشد موجود نیست.
۱	پاتوژن، انگل یا اپی کمنسال وجود دارد ولی توسط روش های تشخیصی مقادیر کمی شناسایی شده اند.
	ضایعاتی که شاخص سندروم باشند وجود دارند ولی بیماری دیده نمی شود.
	پیش آگهی برای اثر عوامل نامشخص است، بجز عفونت های پیشرفته با بیماریزایی بالا.
۲	مقدار کم یا متوسطی از پاتوژن، انگل و یا اپی کمنسال وجود دارد.
	ضایعات خفیف یا متوسطی که شاخص سندروم است وجود دارد.
	پیش آگهی برای کاهش احتمالی تولید و یا افزایش جزئی مرگ و میر است در صورتیکه هیچ درمانی (اگر درمان پذیر باشد) انجام نشود.
۳	مقادیر متوسطی از پاتوژن، انگل یا اپی کمنسال وجود دارد.
	ضایعات جدید یا متوسطی که شاخص سندروم است موجود می باشد.
	در صورت عدم درمان (اگر درمان پذیر باشد) پیش آگهی کشنده باشد.
۴	مقادیر زیادی پاتوژن، انگل یا اپی کمنسال وجود دارد.
	ضایعات شدیدی که شاخص سندروم است وجود دارد، پیش آگهی کشنده است.



تصویر ۳- مراحل نمونه برداری از فازهای مختلف تولید مولدین عاری از بیماری خاص

۱۰-۲- روش شمارش و جداسازی باکتری های خانواده ویبریوناسه و باکتری هـای هـوازی- بی هوازی اختیاری:

تهیه محلول های رقیق کننده:

محلول نمکی ۲/۵ درصد :	مقدار
کلرید سدیم (NaCl)	۲۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده شد سپس محلول حاصل را بـه میـزان ۹ میلی لیتر در لوله آزمایش تقسیم کرده و پس از پنبه گذاری، لوله ها را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱درجـه سلسـیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردید.

آماده سازی انواع نمونه (استاندارد ملی ایران شماره های ۴۲۰۷، ۷۲۲۳، ۹۸۹۹، ۸۹۲۳):

آب:

نمونه گیری از آب محل تکثیر یا پرورش در ظروف نمونه برداری استریل صورت گرفـت (بـرای هـر نمونـه سـه تکرار در نظر گرفته شد).

همولنف (مولدین و میگوهای بالغ):

پیش از آزمون سطح میگو را توسط الکل ۷۰ درصد یـا بتـادین اسـتریل کـرده و سـپس توسـط سـرنگ انسـولین همولنف میگو آسپیره می گردد.

تخم:
نمونه ها در شرایط استریل به آزمایشگاه حمل شد و پس از هموژن کردن نمونه ها در محیط کشت TSA و TCBS کشت داده شد.

مراحل لاروی:
تعداد ۱۰ عدد لارو میگو هموژن شده سپس به میزان مشخصی در محیط کشت TSA و TCBS کشت داده شد.
مراحل پست لاروی: از پست لارو میگوها نیز نمونه گیری انجام شده و عملیات باکتری شناسی مطابق مراحل قبل انجام گردید.

بافت عضله، تخمدان و سایر ارگان ها:
پیش از آزمون سطح میگو را توسط الکل ۷۰ درصد یا بتادین ضدعفونی کرده سپس با توجه به بافت مورد نظر، توسط قیچی تشریح در شرایط آسپتیک از بافت مورد نظر برداشت و پس از هموژن کردن، یک گرم از نمونه را در شرایط استریل توزین و مطابق زیر از آن رقت تهیه شد.

تهیه رقت از نمونه:
در صورتی که نمونه نیاز به رقیق شدن داشته باشد در کنار شعله و توسط پی پت استریل، ۱ گرم از نمونه را به ۹ میلی لیتر محلول نمکی ۲/۵ درصد استریل اضافه و به آرامی مخلوط گردید (رقت ۰/۱).
از لوله اول (رقت ۰/۱) ۱ میلی لیتر به ۹ میلی لیتر محلول نمکی ۲/۵ درصد استریل اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید (رقت ۰/۰۱) و این مراحل را تا تهیه رقت مورد نظر، به گونه ای که تعداد مورد انتظار کلنی های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد و تعداد کل کلنی های تیپیک و غیرتیپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ باشد ادامه داده شد.

روش کشت:
برای هر رقت حداقل دو پلیت محیط کشت در نظر گرفته شد، تمام نمونه ها و رقت های تهیه شده توسط شیکر مکانیکی به مدت ۱۵ ثانیه خوب مخلوط گردید و سپس ۰/۱ میلی لیتر از آزمونه روی پلیت ریخته شد و با میله شیشه ای ال شکل که قبلاً توسط الکل ۷۰درصد و شعله استریل شده است روی سطح محیط پخش گردید. پس از جذب نمونه تلقیحی، پلیت ها را به صورت وارونه در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. تعداد کلنی ها روی پلیت ها در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش وثبت گردید.

۱۱-۲- روش شناسایی باکتری بیماری نکروز عفونی پانکراس

به منظور تشخیص این باکتری از کیت IQ 2000 بهره برده شد که با همکاری وتلاش تیم تحقیقی متشکل از دکتر لایتنر این سیستم شناسایی با حساسیت بالا جهت تشخیص NHPB طراحی گردیده است و این سیستم با اجرای Nested PCR می تواند عفونت های مختلف را در میگو به سه شکل نشان دهد: شدید ، متوسط، خفیف (A. G. Vincent & Lotz, 2005Vincent, Breland, V.M., Lotz, J.M., 2004;).

آماده سازی نمونه ها و تخلیص DNA:

آماده سازی نمونه ها:(جهت انجام روش DTAB-CTAB)

الف) پست لاروها:

۱) حدود ۳۰ عدد از پست لاروها را به درون میکروتیوب ۱/۵ سی سی که محتوی ۰/۶ سی سی محلول DTAB می‌باشد ریخته شد.

۲) نمونه ها در لوله توسط میله یکبار مصرف هموژن گردید.

ب) هپاتوپانکراس:

۱) ۱۰۰میکرو لیتراز محلول ۵۰۰ میلی مولار EDTA به میکروتیوب ۱/۵ سی سی حاوی ۰/۶ سی سی محلول DTAB اضافه و کاملاً مخلوط گردید.

۲)حدود ۲۰ میلی گرم از هپاتوپانکراس به داخل لوله بالا اضافه شد.

۳)هموژن کردن نمونه ها در میکروتیوب توسط میله یکبار مصرف انجام شد.

ج) نمونه مدفوع

۱) میزان ۱ سانتی متر از نمونه مدفوع به داخل میکروتیوب ۱/۵ سی سی حاوی ۰/۶ سی سی محلول DTAB اضافه و کاملاً مخلوط شد.

۲) نمونه ها توسط آسیابگر یکبار مصرف هموژن شدند.

تخلیص DNA:

۱) نمونه آماده شده را در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه گرماگذاری سپس در دمای اتاق خنک گردید.

۲) ورتکس با دور آرام بهم زده شد، سپس ۰/۷ سی سی کلروفرم به آن اضافه کرده وآن را به مدت ۲۰ثانیه بوسیله ورتکس مخلوط شد و در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۳) میزان ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی محلول را برداشته و به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ سی سی جدید وارد گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول CTAB را به همراه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و آن را با دور آرام در ورتکس بهم زده شد ، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد نگهداری می کنیم.

۴) به آرامی آن رادر دمای اتاق خنک کرده و در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۵) بسیار با احتیاط محلول رویی را خالی کرده و مجددا به پلت باقی مانده ۱۵۰میکرو لیتر محلول حلال اضافه و آن را دردمای به مدت ۵ دقیقه دردمای ۷۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری و سپس دردمای اتاق خنک شد.

۶) سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ انجام شد. سپس محلول شفاف به میکروتیوب ۱/۵ سی سی جدید حاوی ۳۰۰ میکرو لیتر از اتانول ۹۵درصد انتقال داده شد.

۷) آن رادر ورتکس به آرامی مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ سانترفیوژ گردید. سپس به پلت حاصله ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و پلت را خشک کرده ودر آب مقطر استریل ویا بافر TE حل شد .

پروتکل انجام آمپلیفیکاسیون:

برای انجام آمپلیفیکاسیون از میکروتیوب های ml ۰/۲ یا پلیت های ۹۶ خانه استفاده شد

آماده سازی محلول ها:

۱) مخلوط اولین واکنش PCR:

مخلوط کردن مواد ذیل:

- پیش مخلوط PCRابتدایی ۷/۵ میکرولیتر
- IQzyme DNA polymerase(۲واحد در هر میکرولیتر) ۰/۵ میکرولیتر

۲) مخلوط واکنشی Nested PCR :(۱۵میکرولیتر در هر واکنش)

مخلوط کردن مواد ذیل:

-پیش مخلوط Nested PCR ۱۴ میکرو لیتر

-IQzyme DNA polymerase (۲واحد در هر میکرولیتر) ۱میکرولیتر

شرایط محیطی واکنش ها:

الف) برنامه های واکنشی، اولین واکنش PCR

-۹۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲ دقیقه سپس

- ۹۴ درجه برای مدت ۲۰ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ثانیه ،۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ ثانیه که ۱۵ سیکل تکرار می شود.

– ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد، ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه کـه در پایـان سیکل انتهایی انجام می شود .

ب) برنامه های واکنشی Nested PCR :

–۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه،۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه،۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ ثانیه که ۳۰ سیکل تکرار می شود،

– ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه ، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که در پایـان سـیکل انتهـایی انجـام می شود.

سیستم محافظتی و تشخیصی NHPB IQ2000 با بکار کیری برنامه Uni- IQ می تواند صورت پذیرد.

الف) برنامه های واکنشی، اولین واکنش PCR

– ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه ، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه ،

– ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه ، ۷۲ درجه سـانتیگراد بـه مـدت ۳۰ ثانیه که ۱۵ سیکل تکرار می شود،

– ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که در پایـان سـیکل انتهـایی انجـام می شود.

ب) برنامه های واکنشی Nested PCR :

–۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه که ۳۰ سیکل تکرار می شود،

– ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که در پایـان سـیکل انتهـایی انجـام می شود.

روش کار واکنش ها:

۱) آماده سازی محلولهای واکنشی مربوط به اولین واکنش PCR و Nested PCR بر اساس تعداد نمونـه هـا. بـرای هر کدام از محلولهای آزمایشی آماده شده کاربرنیـاز دارد کـه سـه اسـتاندارد مثبـت (۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰) و یـک کنترل منفی (آب مقطر استریل و tRNA مخمر) قرار دهد.

۲) ۸ میکرولیتر از محلول اولین واکش PCR به داخل لوله به حجم ۰/۲ سی سی همراه با برچسب ریخته شد.

۳) سپس ۲ میکرولیتر از DNAتخلیص شده نمونه ویا استاندارد را به هر مخلوط واکنشی اضافه گردید.

۴) سپس واکنش PCR اولیه را انجام می دهیم.

۵) ۱۵ میکرولیتر از مخلوط واکنشی Nested PCR را به هر کدام از لوله هایی که PCR مرحلـه اول بـرروی آنهـا صورت گرفته ، اضافه گردید.

۶) سپس مرحله واکنشی Nested PCR انجام شد.

۷) پس از پایان و کامل شدن واکنش لانه ای (Nested)، ۵ میکرولیتراز محلول 6X loading dye را به هرلوله واکنشی اضافه نموده و بخوبی مخلوط گردید.

الکتروفورز

آماده سازی ژل آگارز:

الف) جهت انجام پروسه الکتروفورز از بافر TAB به میزان غلظت عملی 1X استفاده شد. بافری که برای انجام پروسه الکتروفورز و تولید ژل آگارز استفاده می شود بایستی یکسان باشد.

ب) تهیه ژل آگارز ۲ درصد:

میزان ۲گرم آگارز را به داخل فلاسکی که حاوی ۱۰۰ سی سی بافر الکتروفورز است، اضافه گردید. مخلوط را حرارت داده، تا اینکه یک حالت هیالینی بخود بگیرد بدون آنکه ژلی شکل بگیرد. پس از خنک شدن ژل آگارز در دمای (حدود ۵۰ درجه سانتیگراد)، آن را به آرامی به درون ظرف مخصوص ژل ،خالی گردیدو بدقت شانه پلاستیکی و بلاکراز دو طرف جعبه مخصوص ژل برداشته شد.

انجام الکتروفورز

۱) قرار دادن ژل آگارز در ظرف مخصوص ژل، ریختن بافر 1X الکتروفورز به داخل ظرف ژل

۲) ۵ میکرولیتر از محصول رنگی PCR product loading dye به هر کدام از دیواره اضافه شد

۳) مارکر DNA نیز لود گردید

۴) هنگامی که تمامی نمونه ها در جایگاهشان قرار داده شد. قبل از آنکه جریان برق برقرار شود سیم جریان برق را به ظرف مخصوص ژل متصل می کنیم سپس ولتاژ ورودی را بین ۱۰۰تا ۱۵۰ ولت تنظیم گردید.

۵)ماده ویژه لود کننده رنگ که در کیت استفاده می شود شامل دو ماده رنگی است: رنگ برومونفنول بلو که آبی تیره است.و رنگ زیلین سیانول آبی روشن است.

هنگامی که گستره رنگ آبی به حدود ۱/۲ تا ۲/۳ ژل رسید، دستگاه الکتروفورز را خاموش و ژل از درون ظرف خارج گردید وآن را با روش رنگ آمیزی بروماید اتیدیوم (EtBr) رنگ آمیزی شد.

رنگ آمیزی ژل و جمع آوری اطلاعات:

الف) یک محلول غلیظ رنگی با غلظت ۱۰ mg/ml از بروماید اتیدیوم تهیه شد.

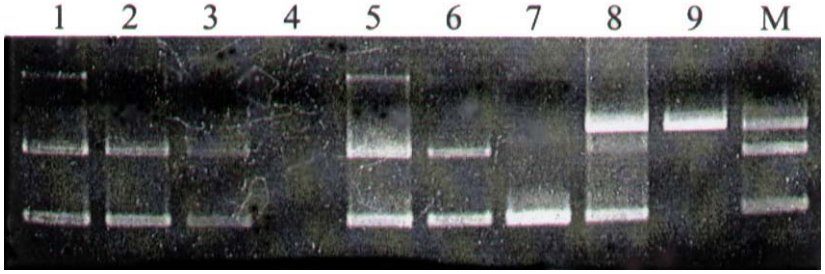
ب) محلول غلیظ رنگی بیست هزار بار رقیق گردید.

ج) پس از تهیه محلول رنگی بالا ، در دمای اتاق به مدت ده دقیقه بر روی ظرف پلاستیکی همراه با ژل قرار داده شد

د) سپس ژل در ظرف پلاستیکی به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از آب مقطر رنگ زدایی گردید و توسط دستگاه UV transluminator نتایج قرائت گردید.

تشخیص:

تشخیص طبق راهنمای کیت وتصویر ۴ برروی ژل الکتروفورز انجام گردید.



تصویر ۴- نمونه های NHPB مثبت و استاندارد برروی ژل الکتروفورز

ستون۱: استاندارد مثبت 2000copies/reaction

ستون۲: استاندارد مثبت 200copies/reaction

ستون۳: استاندارد مثبت 20copies/reaction

ستون۴: کنترل منفی (tRNA مخمر یا آب مقطر استریل)

ستون ۵: نمونه از عفونت شدید NHPB

ستون ۶: نمونه از عفونت متوسط NHPB

ستون ۷: نمونه از عفونت خفیف NHPB

ستون ۸: نمونه از عفونت خیلی خفیف NHPB

ستون۹: نمونه منفی از نظر وجود NHPB

ستون M: مارکر وزن مولکولی ۸۴۸ bp، ۶۳۰ bp، ۳۳۳ bp.

- نمونه منفی تنها یک باند روشن را در ۸۴۸ bp نشان می دهد بدلیل آنکه محصول ژن نگهدارنده خانگی رابه عنوان کنترل داخلی دارد.

البته تفسیر باندها وابسته به مرحله میگو نیز می باشد.

۱۲-۲- روش مطالعات انگل شناسی (Lightner, 1996)

در هر سه نسل F0، F1 و F2 با توجه به مرحله رشد میگو مطابق روش ذیل مطالعه و شناسایی انگلی صورت گرفت. ابتدا نمونه ها مورد مشاهده مستقیم قرار گرفته سپس مشاهده میکروسکوپی اندام های با توجه به مرحله میگو به شرح ذیل انجام شد:

مولدین و میگوی بالغ: ابتدا اندام های خارجی شامل آبشش ها و ضمایم بدن به منظور شناسایی انگل های خارجی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت، سپس اندام های داخلی شامل هپاتوپانکراس و روده و عضله در سرم فیزیولوژی از نظر انگل های داخلی، زیر میکروسکوپ بررسی و در صورت مشاهده موارد مشکوک به گرگارین یا میکروسپوریدیا آزمایشات بافت شناسی روی آن ها انجام شد.

مراحل لاروی و پست لاروی: اندامهای خارجی این مراحل از رشد میگوها از لحاظ آلودگی و شدت آلودگی به انگل های خارجی مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۱).

پایش تک یاخته میکروسپوریدیا

بررسی عضله و غدد از میکروسپوریدیا:

۱- بافت مشکوک را با چاقو یا پنس جداکرده و از آن روی لام گسترش تهیه گردید و پس از قرار دادن یک قطره آب در زیر نور کم میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در صورت وجود بیماری میکروسپوریدیایی توده یکنواخت اسپور (که در بزرگ نمایی 200X الی 400 X) قابل رویت است.

در صورت مشاهده اجرام مشکوک، گسترش ها را فیکس کرده وبا رنگ آمیزی گیمسا برای مشاهده بهتر اسپورها مورد بررسی قرار گرفت.

پایش انگل گرگارین:

بررسی محتویات بخش میانی دستگاه گوارش[۸۷]:

۱- بخش میانی دستگاه گوارش را از محل خود خارج نموده و اتصال آن را با هپاتوپانکراس در ابتدای بخش خلفی دستگاه گوارش و بند شکمی قطع گردید.

۲- بخش میانی دستگاه گوارش روی لام شیشه ای تمیز قرار داده شد و توسط پنس و لبه لامل محتویات آن خارج شد.

۳- یک قطره آب دریای استریل را برروی محتویات بخش میانی دستگاه گوارش قرار داده شد و پس از لامل گذاری موارد زیر مورد بررسی قرار گرفت:

- تروفوزآیت های گرگارین و یا گامتوسیت ها

---

[87] Mid gut

پایش تک یاخته های همخور سطحی زی:

بررسی آبشش و ضمائم:

۱- آبشش و ضمائم برروی یک لام تمیز حاوی یک قطره آب دریای تمیز قرار داده شد.

۲-لامل را روی لام قرار داده و با بزرگ نمایی کم مورد بررسی قرار گرفت.

۳- انگل ها، اپی کمنسال ها و عوامل باکتریایی احتمالی مورد پایش عبارتند از:

- لکوتریکس موکور: جلبک رشته ای سبز - آبی و باکتری رشته ای
- پروتوزآها : زئوتامنیوم ، اپیستیلیس ، آسینتا ،Bodo like وغیره
- دیاتومه ها
- ملانیزه شدن تیغه های آبششی
- فضولات کف استخر ، شکوفایی جلبک ها و غیره

در این مطالعه به منظور تعیین دامنه وشدت آلودگی میگوها به تک یاخته های مشاهده شده میزان آلودگی به تک یاخته ها را بر اساس تعداد کلونی های مشاهده شده طبقه بندی گردید و به صورت خیلی کم(very Low): تعداد کمتر از ۵ کلونی ، کم(Low) تعداد کلونی ها تا ۵ عدد، متوسط(Medium) کلونی های بین ۵ تا ۱۰ عدد و زیاد (High) کلونی های بیش از ۱۰ عدد، گزارش کردیم و برای هرکدام از آنها ارزش عددی به شرح ذیل در نظر گرفته شد: خیلی کم(۱)، کم(۲)، متوسط (۳)، زیاد (۴) (Overstreet, 1973).

۱۳-۲- مطالعات موردی

در کلیه مراحل اجرای پروژه، بر اساس نیاز از میگوهای مشکوک، تجهیزات ضدعفونی آب و غیره نمونه برداری و مطابق با اصول میکروب شناسی آزمون های ضروری صورت گرفت.

روش بررسی موردی علت سفید شدن چشم میگوها

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

در بررسی انگل شناسی از چشم میگوها، اسلاید مرطوب تهیه شد.

از همولنف میگوهای تحت بررسی گسترش سطحی تهیه شده و مورد رنگ آمیزی می گرانوالد گیمسا قرار گرفتند و سلول های خونی از نظر وجود عامل بیماریزا توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند و درضمن به منظور جداسازی عوامل باکتریایی احتمالی از همولنف میگوها در محیط کشت های میکروبی کشت تهیه شد.

به منظور بررسی حضور احتمالی اجرام میکروبی مشاهده شده، از بقایای دفعی میگوها در تانک ها نمونه برداری و پس از تهیه لام مرطوب توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی موردی تخمدان میگو

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

بررسی انگل شناسی، تک یاخته های سطحی زی در سطح میگو و تخمدان میگو از طریق تهیه اسلاید مرطوب و رنگ آمیزی با لوگول انجام شد.

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

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

۳- نتایج

۳-۱- انواع و تعداد کل نمونه های مورد آزمون

در این طرح از شهریور ۱۳۹۱ لغایت شهریور ۱۳۹۳، پایش و غربالگری غذای مورد استفاده در تکثیر و پرورش میگو شامل: غذای کنسانتره، غذای تر (ماهی مرکب، کرم نرئیس و صدف ملالیس) و غذای زنده (جلبک اسپیرولینا و آرتمیا) همچنین میگوها در مراحل مختلف تکثیر و پرورش در هر مرحله انتقال در فازهای اجرایی طرح صورت گرفت و تعداد نمونه های مورد آزمایش مطابق جدول ۸ می باشد.

جدول ۸- تعداد نمونه های مورد بررسی از شهریور ۱۳۹۱ لغایت شهریور ۱۳۹۳

ردیف	نام نمونه	تعداد
۱	میگو	۷۵۶
۲	غذای کنسانتره	۶
۳	ماهی مرکب	۶۶
۴	کرم نرئیس	۲۴
۵	جگر گاو	۲
۶	صدف ملالیس	۲
۷	جلبک اسپیرولینا	۱
۸	آرتمیا	۲
جمع		۸۵۹

۳-۲- نتایج آزمون نمونه های مورد پایش

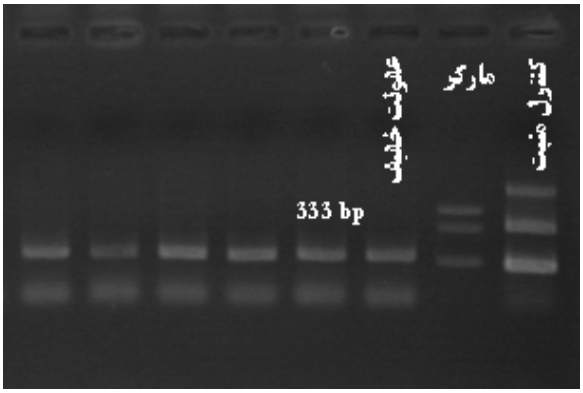
در مجموع ۷۵۶ قطعه میگو، ۶ نمونه غذای کنسانتره، ۶۶ نمونه ماهی مرکب، ۲۴ نمونه کرم نرئیس، ۲ نمونه جگر گاو، ۲ نمونه صدف ملالیس، ۱ نمونه جلبک اسپیرولینا و ۲ نمونه آرتمیا مورد کنترل و غربالگری باکتریایی از نظر وجود باکتری NHPB قرار گرفتند. همچنین میگو ها از نظر وجود میکروسپوریدیا و گرگارین از نظر علایم بالینی پایش گردیدند.

جدول ۹- نتایج پایش انگلی و باکتریایی از شهریور ۱۳۹۱ لغایت شهریور ۱۳۹۳

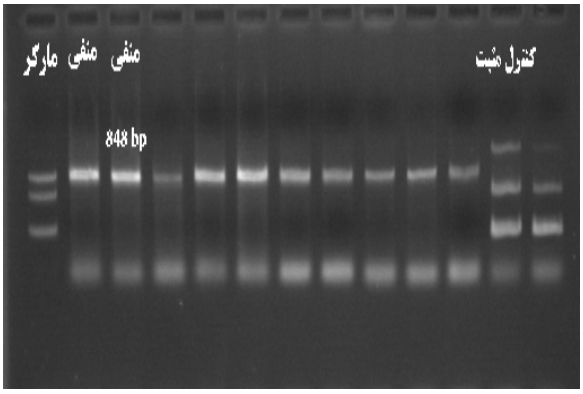
ردیف	نام نمونه	درصد موارد مثبت NHPB	درصد موارد مثبت میکروسپوریدیا	درصد موارد مثبت گرگارین
۱	میگو	۰	۵/۶	-
۲	غذای کنسانتره	۰	-	-
۳	ماهی مرکب	۱/۳۵	-	-
۴	کرم نرئیس	۰	-	-
۵	جگر گاو	۰	-	-
۶	صدف ملالیس	۰	-	-
۷	جلبک اسپیرولینا	۰	-	-
۸	آرتمیا	۰	-	-

از مجموع نمونه های مورد بررسی ۱/۳۵ درصد نمونه های ماهی مرکب از نظر NHPB مثبت بودند (تصویر ۵ وتصویر ۶) که قبل از مصرف امحاشدند و ۵/۶ درصد پیش مولدین اولیه از نظر شدت انگل های اپی‌کمنسال و میکروسپوریدیا مثبت بودند که حذف گردیدند.

کلیه آزمون ها توسط مرکز تشخیص بیماری های میگو وابسته به اداره کل دامپزشکی استان بوشهر کنترل و گواهی سلامت میگوها صادر گردید.



تصویر ۵- تصویر ژل الکتروفورز NHPBمثبت



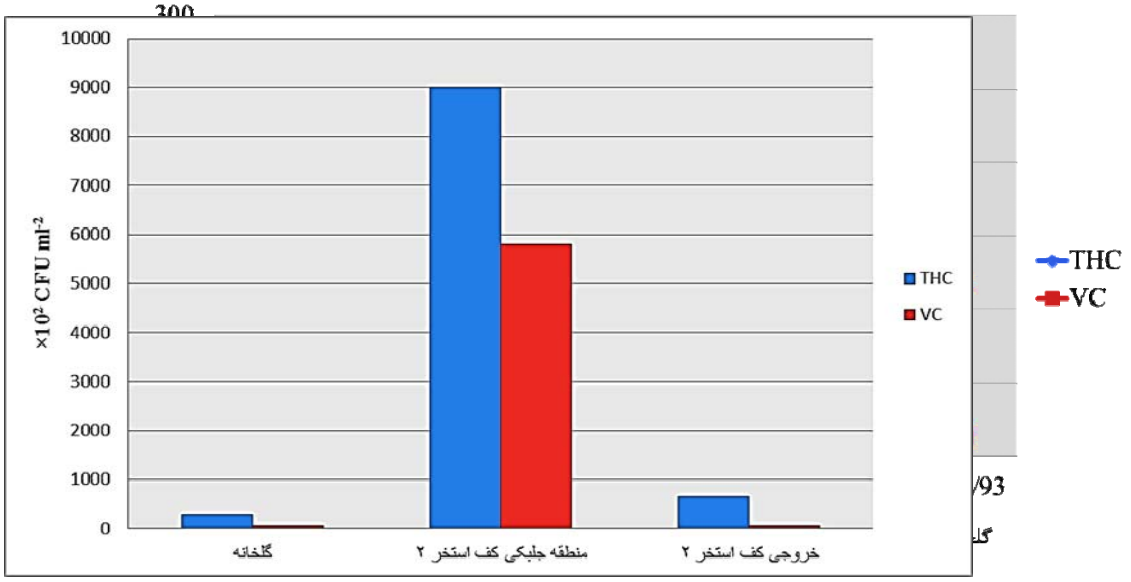
تصویر ۶- تصویر ژل الکتروفورز NHPB منفی

همچنین براساس نتایج شمارش باکتریایی در غذای میگو، میانگین فراوانی باکتریایی کل در هر گرم ماهی مرکب $۱۰^{۴}$×(۰/۱±۴۴/۷۲)، غذای کنسانتره میگو $۱۰^{۴}$×(۰/۰۲±۱/۴۰) و آرتمیا $۱۰^{۴}$×(۰/۰۰۳±۰/۰۶۰) بود و میانگین فراوانی باکتری های خانواده ویبریوناسه در هر گرم کرم نرئیس $۱۰^{۴}$×(۰/۰۱±۵/۸) ولی در هر گرم ماهی مرکب، غذای کنسانتره میگو و آرتمیا در حجم آزمونه قابل شناسایی نبود.

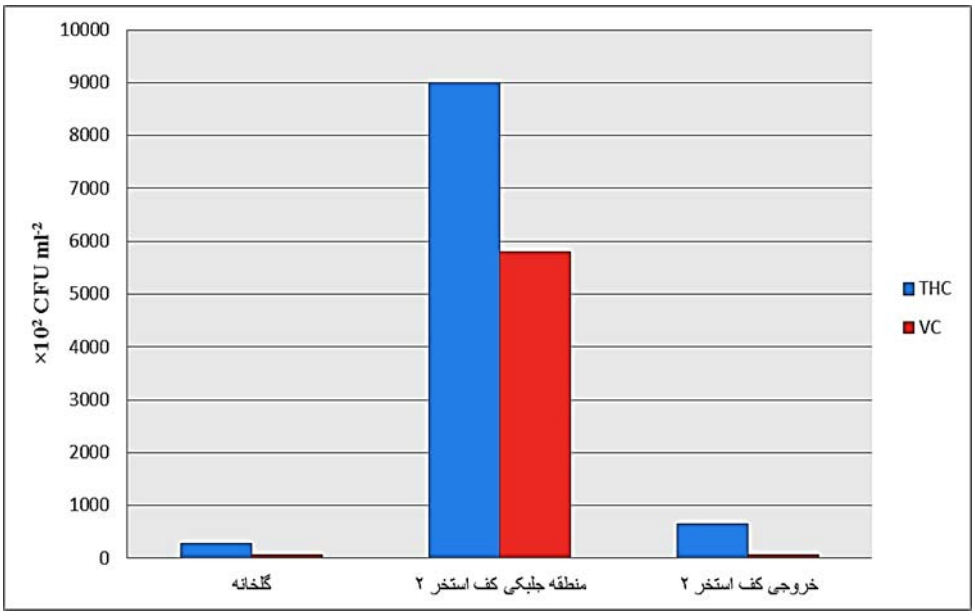
۳-۳- نتایج مطالعات موردی

بررسی علت تلفات میگوها در فروردین ۹۳

در تاریخ ۶ فروردین ۱۳۹۳ ، مرگ و میر میگو از استخر گلخانه گزارش گردید که پس از اعزام کارشناسان و نمونه برداری فراوانی باکتریایی در آب و کف استخر نسبت به اسفند ماه بالاتر بود (نمودار ۳). نمونه برداری جهت احتمال وجود عامل بیماریزای باکتریایی یا ویروسی نیز صورت گرفت.



نمودار ۲- نمودار فراوانی باکتریایی کل و خانواده ویبریوناسه در گلخانه از اسفند ۱۳۹۲ لغایت فروردین ۱۳۹۳



نمودار ۳- فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بیهوازی اختیاری و خانواده ویبریوناسه در بخش های مختلف استخر گلخانه پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) ۶ فروردین ۱۳۹۳

بر اساس نتایج آزمون های صورت گرفته کلیه عوامل احتمالی میکروبی منفی بود و علت مرگ و میر با توجه به بالا بودن فراوانی باکتریایی در آب و کف استخر و همچنین تجمع جلبکی در کف، کمبود اکسیژن و شکست شکوفایی پلانکتونی اعلام شد که با تعویض آب و انتقال میگوها به استخر مجاور مشکل برطرف گردید.

بررسی موردی علت سفید شدن چشم میگوها

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی، دو ایزوله باکتریایی متعلق به جنس ویبریو از چشم میگوها جداسازی و خالص سازی شد (تصویر ۸- الف و ب) در نتایج آنتی بیوگرام مشخص شد هر دو باکتری در ۴۸ ساعت اولیه به اکسی تتراسایکلین حساس بوده ولی بعد از این مدت مقاومت نشان می دهند و مجدداً رشد می نمایند و ایزوله قارچی جداسازی نگردید.

تصویر ۷- الف- باکتری های جداسازی شده از چشم میگو، ب-تصویر چشم سفید

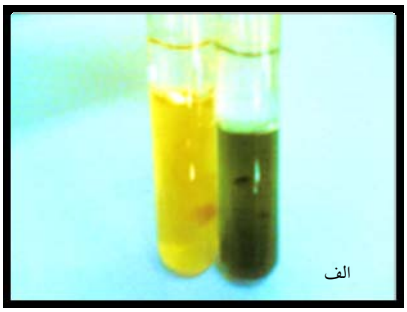
.

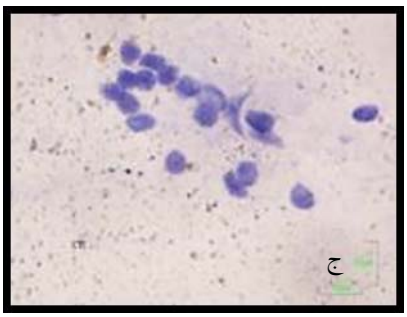
در بررسی میکروسکوپی از چشم میگوها، باکتری های فراوانی در زمینه لام مشاهده شد و همچنین اجرام کیست مانندی برای اولین بار مشاهده گردید.

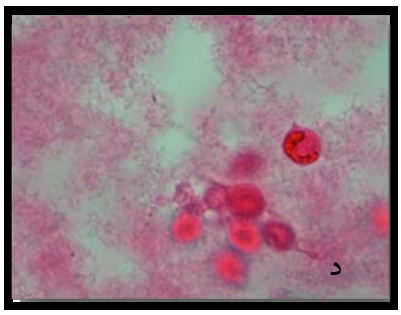
مقطع بافتی از چشم سفید میگوها نیز مطابق اصول بافت شناسی تهیه و مورد مطالعه قرار گرفت.

در رنگ آمیزی گیمسا و کشت از همولنف (تصویر ۸- ج و د) ایزوله ای جداسازی نگردید.

در بررسی بقایای دفعی میگوها نیز اجرام بسیار ریزی مشابه اسپور و انواع باکتری ها مشاهده گردید.







تصویر ۸- الف- تست افتراقی گلوکز هوازی و بی هوازی، اینوزیتول و سوکروز بر روی ایزوله های خالص شده، ب- تست افتراقی رشد در محیط نمک صفر درصد بر روی ایزوله های خالص شده، ج- رنگ آمیزی می گرانوالد کیمسا از همولنف میگوها، د- رنگ آمیزی سلول های خونی همولنف.

بررسی موردی تخمدان میگو

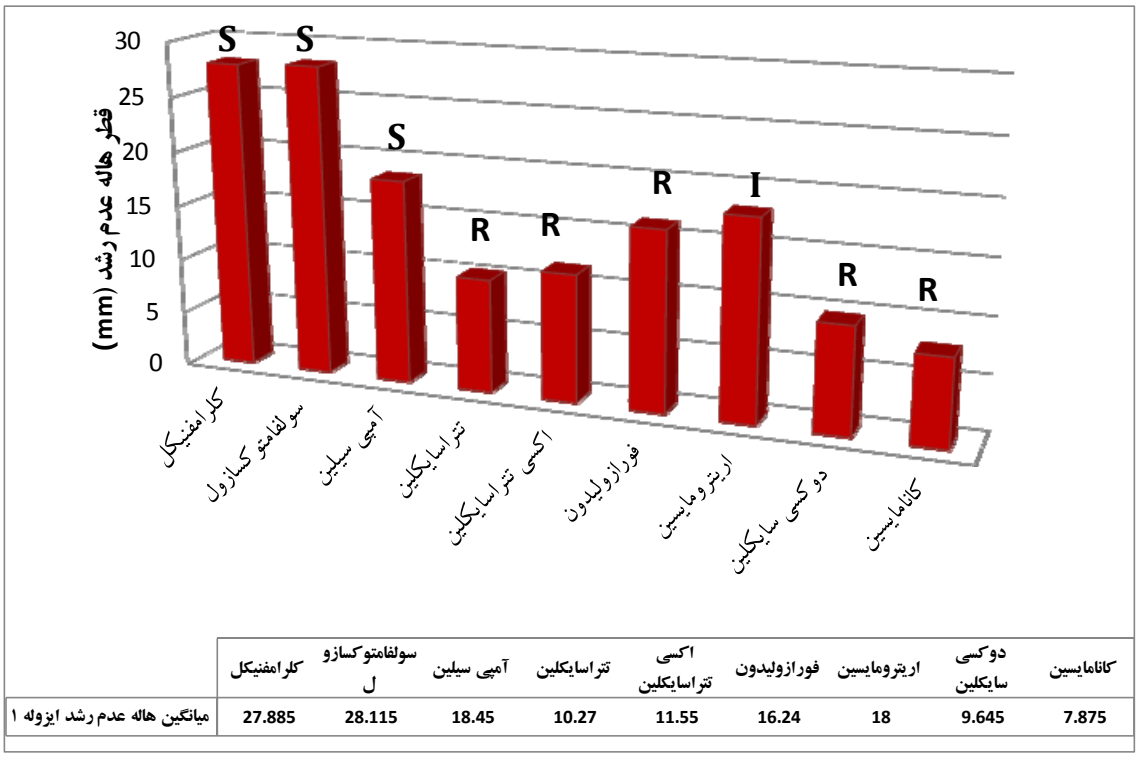
بر اساس نتایج باکتری شناسی و قارچ شناسی، هیچ ایزوله قارچی رشد نکرد ولی در بررسی باکتری شناسی یک باکتری از خانواده ویبریوناسه جداسازی گردید که به اکسی تتراسایکلین تا ۴۸ ساعت حساس بود.

در بررسی میکروسکوپی، باکتری های فراوان و اجرام انگلی مشاهده شد که مشابه اجرام مشاهده شده در چشم میگو بودند.

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

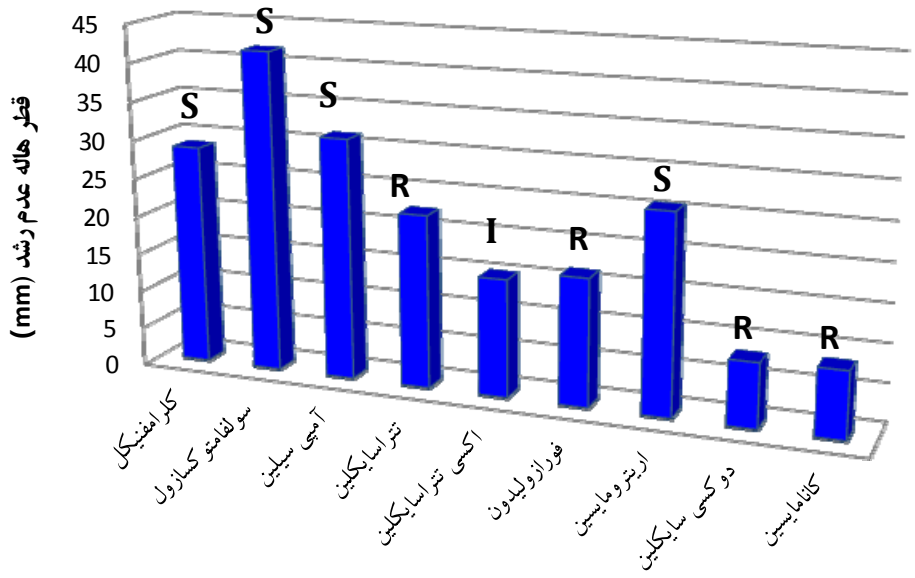
بر اساس نتایج آنتی بیوگرام صورت گرفته ایزوله ۱، نسبت به ۵۵/۶ درصد آنتی بیوتیک های مورد آزمون مقاوم، ۱۱/۱ درصد نیمه حساس و ۳۳/۳ درصد حساس بود و ایزوله ۲ نسبت به ۴۴/۴ درصد آنتی بیوتیک های مقاوم، ۱۱/۲ درصد نیمه حساس و ۴۴/۴ درصد حساس بود. که نتایج بیانگر هشداری در رابطه با شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد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

.



	کلرامفنیکل	سولفامتوکسازول	آمپی سیلین	تتراسایکلین	اکسی تتراسایکلین	فورازولیدون	اریترومایسین	دوکسی سایکلین	کانامایسین
میانگین هاله عدم رشد ایزوله ۱	27.885	28.115	18.45	10.27	11.55	16.24	18	9.645	7.875

نمودار ۴- نتایج آنتی بیوگرام بر روی ایزوله ۱



	کلرامفنیکل	سولفامتوکسازول	آمپی سیلین	تتراسایکلین	اکسی تتراسایکلین	فورازولیدون	اریترومایسین	دوکسی سایکلین	کاناماسین
میانگین هاله عدم رشد ایزوله ۲	28.715	41.775	31.38	22.505	15.31	16.565	25.805	8.38	8.645

نمودار ۵- نتایج آنتی بیوگرام بر روی ایزوله ۲

۴- بحث و نتیجه گیری

تعریف واقعی میگوی عاری از بیماری خاص به معنی عاری بودن از هرگونه پاتوژن یا میکروارگانیسمی خاص است که موجب مرگ و میر وتلفات در میگوها می‌شود. این وضعیت میگوها بسته به سطوح ایمنی زیستی و محیط جغرافیائی و گونه میگو متفاوت است. به منظور تضمین تولید میگوی عاری از بیماری خاص نیاز به برنامه ریزی راهبردی و ایجاد یک شبکه مدیریتی قوی استقرار سیستم های بهداشتی، ایمنی زیستی و برقراری شرایط قرنطینه ای و ایزوله برای عدم ورود، انتقال و سرایت یک عفونت به آب و میگوها در مدت زمان مشخص و نظام مند می باشد تا بتوان محافظت در مقابل تهدیدات منابع خارج و داخل تاسیسات را افزایش داد.

پس از استقرار سیستم ایمنی زیستی در پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص و اجرای سیستمهای مراقبتی[۹۳] بر اساس اهداف این پروژه پایش عوامل باکتریایی و انگلی در فازهای اجرا و نسل های F_0الی F_2 صورت گرفت و میزان شیوع عوامل باکتریایی و انگلی مطابق لیست ارائه شده توسط سازمان جهانی بهداشت دام صفر بود و در مرحله غربالگری اولیه و انتخاب جمعیت ها موارد مثبت حذف گردیدند. بطورکلی انگل های کرمی و داخلی مانند گرگارین ها و میکروسپوریدیاها بیشتر از میگوهای وحشی گزارش شده اند زیرا این انگلها دارای چرخه زندگی پیچیده ای بوده و به میزبان واسط برای تکمیل چرخه زندگی شان نیاز دارند و به علت عدم وجود میزبان های واسط در استخرهای پرورش میگو و در نتیجه کامل نشدن چرخه زندگی این انگل ها، شیوع آن ها در مزارع پرورش میگو اندک و حتی صفر می باشد(Johnson, 1978). در طی اجرای سیستم مراقبتی این پروژه کلیه اصول مرتبط شامل: روشهای غربالگری[۹۴]، آزمایشات تشخیصی[۹۵] و تائیدی[۹۶] تعریف و پیاده سازی گردید. برای این منظور پایش مستمر وضعیت سلامتی میگوها درجمعیت های موجود در قسمتهای مختلف پایلوت جمع آوری و مورد آزمون قرار گرفت.

لذا نتایج حاصل تایید کننده این موضوع می باشد که ارزیابی های بهداشتی در مرکز تولید میگوی عاری از بیماری خاص باید در سه سطح مختلف و تاکید بر سطح ۳ انجام گردد که عبارتند از:

تکنیکهای ارزیابی بهداشتی سطح ۱: اولین قدم بررسی های بهداشتی محسوب می شوند و کارشناسان مرتبط با بازدیدهای روزانه وضعیت سلامتی میگو را پایش می کنند ولی این تکنیک سطح ۱ اغلب برای تصمیم گیری مناسب جهت تعیین تکلیف وضعیت میگوها کافی نیست. برای مثال، انتخاب ناپلی براساس پاسخ به نور، بدون نیاز به آزمایشهای میکروسکوپی صورت می گیرد. اگر گروهی از ناپلی‌ها، حرکت ضعیف ورفتارشنای ضعیفی نشان دهند، این گروه بدون آزمایشهای بعدی، رد خواهند شد. تکنیکهای ارزیابی بهداشتی در سطح ۲: در این تکنیک از میکروسکوپ برای آزمایشهای دقیق تر مانند بررسی شرایط میگوها و مشاهده مستقیم معیارهای

[93] Survillance System
[94] Screening Test
[95] Diagnostic Test
[96] Confirmatory Test

مختلف سلامتی استفاده می گردد. به عنوان مثال زمانی که لاروها ضعیف باشند جهت تعیین و شناسایی پاتوژنهای احتمالی، آزمایشات باکتریولوژی پایه انجام میشود و بر اساس اطلاعات حاصل تصمیم گیری در جهت درمان و یا معدوم سازی انجام می پذیرد.

تکنیکهای ارزیابی بهداشتی در سطح ۳ : با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR)، دات‌بلات و سایر آزمایشهای ایمنی‌شناسی وضعیت سلامت میگوها به ویژه از نظر عوامل بیماریزای لیست سازمان بهداشت جهانی دام انجام می‌شود (; Carlos R. Pantojaa, 2005; Wyban, 1992J. A. Brock & Main., 1994). کاربردهای ارزیابی بهداشتی در سطوح ۳،۲،۱ در مرکز تولید میگوی عاری از بیماری خاص در جدول ۱۰ آورده شده است.

جدول ۱۰- کاربرد ارزیابی بهداشتی در سطوح ۳،۱،۲ در مرکز تولید میگوی عاری از بیماری خاص

سطح ۱	تعیین جنسیت، مرحله رسیدگی تخمدانی و کیفیت بهداشتی مولدین، تعین مرحله پوست‌اندازی، خارج ساختن میگوهای بیمار و یا در حال مرگ
	انتخاب ناپلی به کمک پاسخ فتوتاکتیک، تغذیه زوآ / مایسیس با مشاهده رشته‌های مدفوع، فعالیت لارو، فعالیت و رفتار پست‌لارو، آزمایشهای استرس
سطح ۲	بررسی فلور باکتریایی آب و میگوها
	بررسی میکروسکوپی کیفیت تخم، ناپلی. لارو و میگوهای جوان
سطح ۳	آزمایش مولدین توسط دات‌بلات یا PCR
	آزمایش ناپلی و پست لارو توسط دات‌بلات یا PCR

همچنین علاوه بر اجرای سیستم مراقبتی در مراحل تکثیر و پرورش میگو بایستی کلیه موادغذایی مورد تغذیه میگو اعم از غذای خشک، زنده و تر قبل از استفاده مورد بررسی و پایش میکروبی قرار گیرد و پس از اطمینان از عدم آلودگی، برای تغذیه میگو استفاده گردد (; Wyban, 1992Carlos R. Pantojaa, 2005) در این پروژه نیز در طی پایش صورت گرفته براساس نتایج شمارش باکتریایی کل و باکتری های خانواده ویبریوناسه در غذای میگو، بیشترین میزان میانگین فراوانی باکتریایی کل در هر گرم ماهی مرکب ۱۰۴×(۰/۱±۴۴/۷۲) بود و این میزان در آرتمیا ۱۰۴×(۰/۰۰۳±۰/۰۶۰) کمترین بود و در نتایج بررسی غذای مورد استفاده از نظر باکتری NHPB نیز در یک مورد از نمونه های ارسالی ماهی مرکب نتیجه مثبت اعلام شد که نشانگر مقاومت این باکتری در دمای یخچال و فریزر می باشد. از نظر فراوانی باکتری های خانواده ویبریوناسه، بیشترین میانگین در هر گرم کرم نرئیس ۱۰۴×(۰/۰۱±۵/۸) بود ولی در هر گرم ماهی مرکب، غذای کنسانتره میگو و آرتمیا در حجم آزمونه قابل شناسایی نبود که به علت عدم مقاومت ویبریو در دمای ۴ درجه و پایین تر می باشد و نتایج حاصل بیانگر اهمیت پایش مواد غذایی مورد تغذیه میگو می باشد و پیشنهاد می گردد درصورت استفاده از غذای تر، بشرطی که قابلیت پذیرش برای میگو را حفظ کنند و یا کیفیت آنها تغییر نکند، ابتدا پخته و سپس مورد تغذیه آبزی قرار گیرد همچنین بهتر است انواع مختلف غذاهای تر، منجمد و در فریزرهای مجزا نگهداری شوند.

پیشنهادها

- بررسی امکان تولید میگوی عاری از بیماری خاص از گونه های بومی
- تلاش در جهت آموزش فراگیران مراکز تکثیر در خصوص تولید میگوهای با سلامت بالا

منابع

- استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷، سال ۱۳۸۶، آیین کار آزمون های میکروبیولوژی آب، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
- استاندارد ملی ایران ۷۲۲۳، سال ۱۳۸۲، آب - جستجو و شناسایی ویبریوکلرا –روش آزمون میکروبیولوژی، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
- استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹ : سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-راهنمای الزامات کلی برای آزمون ، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
- استاندارد ملی ایران ۱-۸۹۲۳ : سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی- قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
- استاندارد ملی ایران ۳-۸۹۲۳ : سال ۱۳۸۵، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی-قسمت سوم :مقررات ویژه برای آماده سازی ماهی وفرآورده های آن، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
- آوخ کیسمی،م. ۱۳۷۷ .بررسی آلودگی ویبریوزیس در مزارع پرورش میگوی منطقه حله بوشهر. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور.
- تمجیدی،ب ، ف. داوودی ،ن.کر ۱۳۸۳.بررسی فون انگلی میگوهای پرورشی منطقه قفاس آبادان،مجله علمی شیلات ایران،سال سیزدهم-شماره ۳ .ص ۲۱۰-۱۹۹
- دشتیان نسب، ع.، میربخش م.، افشار نسب م.، یگانه و.، قائدنیا ب.، ۱۳۸۹ ، بررسی عوامل بیماریزای باکتریایی در مراکز تکثیر میگوی سفید هندی(*Penaeus indicus*) در استان بوشهر، سومین همایش ملی میگوی ایران، آذر ۸۹
- میربخش م.، دشتیان نسب، ع .، افشار نسب م.، یگانه و.، قائدنیا ب.، ۱۳۸۹ ، بررسی میزان فراوانی و گوناگونی گونه های ویبریو در میگوهای پرورشی سفید غربی استان بوشهر، سومین همایش ملی میگوی ایران، آذر ۸۹
- میربخش م.، قائدنیا ب.، افشارنسب م.، یگانه و.۱۳۹۱، بررسی میزان شیوع انگل های خارجی در میگوهای پرورشی، مجله علوم آبزیان شماره ۳
- عابدیان امیری، آ.، ابراهیمی، م. ۱۳۸۵. بررسی و شناسایی انگل های میگوهای پرورشی(*Penaeus indicus*) در منطقه گواتر چابهار، مجله علمی شیلات ایران، سال پانزدهم، شماره ۱، صفحات ۱۰۹-۱۱۷.

- مال الهی، ا.، ۱۳۸۰، جداسازی و شناسایی تک یاخته زئوتامنیوم در استخرهای پرورش میگو منطقه حله-بوشهر،، مجله علمی شیلات ایران، سال دهم، شماره ۴، صفحات۹۷-۱۰۵.

- Anderson I, Shariff M, Nash G, & Nash, M. (1987). Mortalities of juvenile shrimp *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus,and rickettsial and bacterial infections, from Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fish Sci, 1*, 47-64 .
- Brock, J. A., and D.V. Lightner. (1990). *Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms* (Vol. III). Hamburg, Germany: Biologische Anstalt Helgoland.
- Brock, J. A., & Main., K. (Producer). (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei* .
- Carlos R. Pantojaa, X. S., Lee Xiab, Hui Gongc, Josh Wilkenfeldc, Brenda Noblea, Donald V. Lightner. (2005). Development of a specific pathogen-free (SPF) population of the Chinese fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* Part 1: Disease Pre-screening and Primary Quarantine. *Aquaculture*, 573-578 .
- Chen, F. R., Liu, P. C., & Lee, K. K. (2000). Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kurama Prawn *Penaeus japonicus*. *Zool Naturforsch, 55*, 94-99 .
- Chen, S. N., P.S. Chang, G. H. Kou. (1992). *Infection route and eradication of Penaeus monodon Baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, Penaeus monodon*. Hawaii: The Oceanic Institute.
- Couch, J. A. (1974). An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp:ultrastuctures, prevalence, and enhancement. *J. Invertebr. Pathol, 24*, 311-331 .
- Couch, J. A. (1983). Diseases caused by protozoa. *A.J. Provenzano* (Vol. 6, pp. 79-111). N.Y.: Academic Press.
- Flegel, T. W., D.F. Fegan, S. Kongsom, S. Vuthikornudomkit, S. Sriurairatana, S. Boonyaratpalin, C. Chantanachookhin, J.E. Vickers, and O.D. MacDonald. (1992). *Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand.* Honolulu, Hawaii: Oceanic Institute.
- Foster CA, S. T., Hawkins WE (1978). Fine structure of peritrichous ectocommensal *Zoothamnium* sp. With emphasis on its mode of attachment to penaeid shrimp. *J fish Dis, 1*, 321-335 .
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S. (2006). Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture, 253*, 105-113 .
- Gomez B.G., M. L. T., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V., Goerra F. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus* v*annamei*. *Aquaculture, 163*, 1-9 .
- Hongwei M.A., O. R. M. (2006). Two new species of Epistylis (Ciliophora: Peritrichida) on the blue crab (Callinectes sapidus) in the Gulf of Mexico. *J Eukaryot Microbiol, 53*, 85-95 .
- Horowitz, A., Horowitz, S. (2001). *Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective* (C. L. a. J. Browdy, D.E. Ed.). Baton Rouge, Louisiana, USA,: The World Aquaculture Society.
- Itani, G., Makoto, K., Shirayama, Y. (2002). Behaviour of the shrimp ectosymbionts, *Peregrinamor ohshimai* (Mollusca: Bivalvia) and Phyllodurus sp. (Crustacea: Isopoda) through ecdyses. *J. Mar. Biol. Assoc. UK., 82*, 69-78 .
- Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *J. World Aquac. Soc, 37*, 523-532 .
- Johnson, S. K. (1978). Handbook of shrimp diseases *Texas A&M University Sea Grant College Program* (pp. 75-603): Texas Publication TAMU-SG.
- Johnson, S. K. (1990). *Handbook of shrimp diseases*. Galveston. Texas: Texas A&M University Sea Grant College Program.
- Krol, R. M., Hawkins, W. E., & Overstreet, R. M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (Penaeus vannamei). *J Invertebr Pathol, 57*(3), 362-370 .
- Lavilla - pitogo, C. R., C. L. Baticados, E. R. Cruz - Lacierda and L. D. de la pena. (1990). Occurance of luminus bacterial dicease of penaeus monodon larvae in the Philippines. *Aquaculture, 91*, 1-3 .
- Lightner, D. V. (1993). *Diseases of penaeid shrimp*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lightner, D. V. (1996). *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society: Louisiana, USA.
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1986). A probable *Mycobacterium* sp. infection of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Fish Diseases, 9*, 357-369 .

- Lightner ,D. V., Redman, R. M., Poulos, B. T., Mari, J. L., Bonami, J. R., & Shariff, M. (1994). Distinction of HPV-type virus in Penaeus chinensis and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe. *Asian Fish. Sci., 7*, 267-272 .
- Loy, J. K., Frelier, P.F., Varner, P .and J.W. Templeton. (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing Hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms, 25*, 117-122 .
- Malelahi A, M. B. (2001). Isolation and diagnosis of Zoothamnium in cultured shrimp of Helle site in Bushehr provience. *Iranian Sientific Fisheries Journal, 4*, 97-105 .
- Norma A. López-Téllez, V. M. V.-M., Robin M. Overstreet. (2009). Seasonal variation of ectosymbiotic ciliates on farmed and wild shrimps from coastal Yucatan, Mexico. *Aquaculture, 287*, 271-277 .
- Nunan, L. M., Lightner, D.V., Oduori, M.A., Gasparich, G.E. (2005). *Spiroplasma penaei* sp nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *Int. J. Syst .Evol. Microbiol, 55*, 2317-2322 .
- Overstreet, R. M. (1973). Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. *Aquaculture, 2*, 105- 140 .
- Overstreet, R. M. (1985). Some parasitological aspects of shrimp culture in the United States. In J. W.J. Hargis (Ed.), *Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean*: NOAA Tech. Rep.NMFS
- Owens, L., & Glazebrook, J. S. (1988). Microsporidian infections in commercial prawns from northern Australia. *Australian J. Marine Freshwater Research, 39*, 301-305 .
- Rao, V. (2013). Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review Article, Neospark Drugs and Chemicals Private limited Corporate Centre. 1-9 .
- Sindermann, C. J. (1990a). *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish* (2nd ed. Vol. 2). New York : Academic Press.
- Sindermann, C. J. (1990b). *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish* (Vol. 2nd). New York: Academic Press.
- Song, Y. L., Cheng, W. (1990). Occurrence of *vibrio vulnificus* in Taiwan. *National science coucil. Taipei*, 172-179 .
- Vidal-Martínez, V., Jiménez, A., & Simá, R. (2002). Parasites and symbionts of native and cultured shrimps from Yucatan, Mexico. *J Aquat Anim Health, 14*, 57-64 .
- Villela, J., Inversen, E., & Sinderman, C. (1970). Comparison of the parasites of pond-reared and wild pink shrimp (*P. duorarum*) in South Florida. *T. Am. Fish. Soc, 99*, 789-794 .
- Vincent, A. G., Breland, V.M., Lotz, J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. *Dis. Aquat. Org, 61*, 227 - 233 .
- Vincent, A. G., & Lotz, J. M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat .Org, 67*, 163-169 .
- Wijayati, A. (2004). *Efficacy of Some Herbs on Controlling Vibrio Spp. And Their Toxicity to Black Tiger Shrimp (Penaeus Monodon Fabricius) Postlarva.* Kasetsart University Thesis .
- Wyban, J. (1992). Proceeding of the special session on shrimp farming, Specific Pathogene Free concept. *World Aquaculture Society*, 254-260 .

Abstract:
Aquaculture is the fastest growing food industry in the world. Shrimp culture industry is also part of it, unfortunately, like other marine animal culture economic losses caused by the disease has been one of the major challenges of this industry. The major cause of mortality in shrimp hatcheries and rearing centers is related to water quality and the presence of pathogenic bacteria and parasites. These are common opportunistic microorganisms in the hatchery, rearing centers, flora and living food but poor conditions of culture are caused diseases. Since the development of aquaculture in the countries need health management, one of the important additional rings in the shrimp strategic plan is specific pathogen free shrimp production, which has been addressed in this plan. Specific pathogen free shrimp define as the shrimps which are free of the specific pathogens listed in world organization for animal health (OIE). These factors should be conclusively diagnosed and can be isolated from shrimp hatcheries and culture system. Therefore in this project screening and surveillance of shrimp in several generations according to the list of OIE were done and they were monitored for of bacterial pathogens (Necrosis Hepatopancreas Bacteria) and parasites (Microsporidian and Gregarins). At total 756 pieces of shrimp, 6 sample of dry food and 97 samples of live foods were controlled and tested. 1.35 percent of live foods were positive for NHPB and 5.6 percent of pre broodstocks have eppicommensal and microsporidia which were disposed in quarantine phase. Because of biosecurity and surveillance system establishment, there were no bacterial or parasitic isolation or diagnosis during SPF shrimp production.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, SPF, Bacteria, Parasite

Ministry of Jihad – e – Agriculture

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shrimp Research Center

---

Project Title : Monitoring, Isolation and identification bacterial and parasitic agents in specific pathogen free shrimp production
Approved Number: 14-80-12-9103-91003-K9101
Author: Maryam Mirbakhsh
Project Researcher : Maryam Mirbakhsh
Collaborator(s) *:* Sh. Jamili, M. Afsharnasab, B. Ghaednia, V. Yeganeh, A. Dashtiannasab, M.R. Mehrabi, S.H. Kakoolaki, M.Kh. Pazir, E. Mohammadi baghmollai, M.A. Nazari, M. Saboohi, I. Keshtkar
Location of execution: Bushehr province
Advisor(s):-
Supervisor: Mostafa Sharifrohani
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 1 Year & 7 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 –Shrimp Research Center

Project Title :

Monitoring, Isolation and identification bacterial and parasitic agents in specific pathogen free shrimp production

Project Researcher :

Maryam Mirbakhsh

Register NO.

49307