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 :

شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای ویروسی در میگوی عاری از بیماری خاص

مجری:
وحید یگانه

شماره ثبت
۵۰۷۱۰

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه : شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای ویروسی در میگوی عاری از بیماری خاص

شماره مصوب پروژه : K ۹۱۰۱ -۹۱۰۰۲-۹۱۰۶-۱۲-۸۰-۱٤

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : وحید یگانه

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : وحید یگانه

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : سید جلیل ذریه زهرا-مریم میربخش-محمد افشارنسب- بابک قائدنیا- عقیل دشتیان نسب- عیسی کشتکار- محمدعلی نظاری - محمدرضا مهرابی-رضا بنادرخشان- فرخ انصاری- عصمت محمدی باغملایی- ژیلا رنجبری – محمد جواد شعبانی – حامد قناعتیان – غلامرضا جمالی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : سید جواد حسینی

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان بوشهر

تاریخ شروع : ۹۱/۱۲/۱

مدت اجرا : ۲ سال و ٤ 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 : شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای ویروسی در میگوی عاری از بیماری خاص

کد مصوب : ۹۱۰۱K -۹۱۰۰۲-۹۱۰۶-۱۲-۸۰-۱٤

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۷۱۰ تاریخ : ۹۵/۹/۳

با مسئولیت اجرایی جناب آقای وحید یگانه دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته تکثیر و پرورش آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۵/۸/۳ ارزیابی و با رتبه عالی گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس ارشد در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده 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 ۵
۱-۴- مهمترین پاتوژنهایی که میگوی عاری از بیماری خاص باید از آنها عاری باشد ۶
۱-۵-مروری برمهمترین بیماریهای ویروسی میگوهای خانواده پنائیده ۷
۱-۵-۱- بیماری ویروسی سندروم لکه سفید White Spot Disease(WSD) ۷
۱-۵-۲- - بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم (IHHNV) ۱۱
۱-۵-۳- بیماری شبه پارووویروسی هپاتوپانکراس (HPV) ۱۲
۱-۵-۴- بیماری ویروسی سندروم تورآ (TSV) ۱۳
۱-۵-۵- بیماری کله زرد (YHV) ۱۳
۱-۵-۶- بیماری نکروز عفونی عضلات میگو (IMNV) ۱۴
۱-۵-۷- بیماری باکیولوویروس مونودن (MBV) ۱۴
۱-۶- مروری بر منابع ۱۵
۱-۶-۱- تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص در آمریکا و آسیا ۱۵
۲- مواد و روشها ۱۷
۲-۱-تجهیزات مورد نیاز ۱۷
۲-۲- مواد مصرفی ۱۷
۲-۳- حجم نمونه گیری ۱۷
۲-۴- نمونه های مورد بررسی ۱۸
۲-۵- نحوه انتقال نمونه ها ۱۹
۲-۶- تعیین جمعیت های اولیه برای تولید میگوی مولد عاری از بیماری خاص ۱۹
۲-۷- آماده سازی نمونه ها و استخراج DNA ۱۹
۲-۷-۱- آماده سازی نمونه ها (استخراج DNA به روش DTAB- CTAB) ۱۹
۲-۷-۲- روش استخراج ۲۰
۲-۷-۳- استخراج DNA به توسط بافر لیزکننده ۲۱

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۴-۷-۲- حلالهای DNA ۲۱
۸-۲- آماده سازی محلول ها ۲۱
۹-۲- شرایط محیطی واکنش‌ها ۲۲
۱۰-۲- روش کار واکنش‌ها ۲۳
۱۱-۲- الکتروفورز ۲۳
۱-۱۱-۲- آماده‌سازی ژل آگارز ۲۳
۲-۱۱-۲- روش کار با الکتروفورز ۲۴
۱۲-۲- تشخیص ۲۵
۱-۱۲-۲- روش کار تشخیص‌ها ۲۵
۱۳-۲- آماده سازی نمونه ها و تخلیص RNA ۲۵
۱-۱۳-۲- روش کار تخلیص RNA ۲۵
۲-۱۳-۲- حلالهای RNA ۲۶
۳-۱۳-۲- پروتکل انجام آمپلیفیکاسیون ۲۶
۴-۱۳-۲- شرایط محیطی واکنش ها(دربرنامه Uni- IQ RT-PCR) ۲۷
۵-۱۳-۲- پروفایل واکنشی Nested PCR ۲۷
۶-۱۳-۲- روش کار واکنش ها ۲۷
۳-نتایج ۲۹
۱-۳- انواع و تعداد کل نمونه های مورد آزمون ۲۹
۲-۳- نتایج آزمون نمونه های مورد پایش ۲۹
۴- بحث ۳۳
۵- نتیجه گیری ۳۵
منابع ۳۶
چکیده انگلیسی ۴۰

چکیده

پس از بروز بیماری های مختلف ویروسی به ویژه بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی سفید غربی در سالهای گذشته و غیر بومی بودن این گونه میگو در ایران نیاز به مولدسازی با رویکرد عاری از بیماری احساس شد. پژوهشکده میگوی کشور به منظور رفع این نیاز و قطع وابستگی به مولدین خارجی و دستیابی به دانش تولید میگوی عاری از بیماری خاص طرح کلانی را به اجرا گذاشت که این پژوهش بخشی از بررسی های مولکولی ویروسی آن می باشد. برای این منظور از میگوها در ابتدای انتخاب از مزارع پرورش، طی دوران قرنطینه، دوره زمستان گذرانی، قبل از تخم ریزی، پس از تخم ریزی، پست لاروهای نسل F1 و تکرار پایش در نسل بعدی توسط کیت تشخیص تجاری IQ2000 کلیه بیماریهای ویروسی لیست OIE در آزمایشگاه پژوهشکده میگوی کشور و اداره کل دامپزشکی مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر میگو همه مواد غذای مصرفی میگوها شامل غذای تر، غذای زنده و غذای کنسانتره نیز از نظر بیماریهای لیست OIE طی دوران اجرای پروژه مورد پایش قرار گرفت. در صورت مشاهده ویروس در هر یک از موارد ذکر شده به منظور توالی یابی و بررسی های مولکولی نمونه های آلوده با پرایمرهای طراحی شده مورد بررسی قرار می گرفتند. نتایج همه آزمایشات در طول سه سال اجرای پروژه نشان دهندی عدم آلودگی میگوها و مواد غذایی مصرفی بود.

کلمات کلیدی: میگو، عاری از بیماری، ویروس

۱-مقدمه

در طول بیست سال گذشته توسعه مزارع پرورش میگو با افزایش چشمگیری همراه بوده است. به دنبال رشد و توسعه سریع صنعت تکثیر و پرورش میگو در جهان عوامل بیماریزای تهدید کننده این صنعت نیز سریعاً توسعه یافتند، بطوریکه بسیاری از عومل بیماریزا از مناطقی که بطور اولیه ظهور پیدا کرده بودند قبل از توسعه روش های شناسایی قابل اطمینان و نامگذاری عامل بیماری به مناطق جدید انتقال یافتند. این انتقال معمولاً از طریق ذخائر میگوهای زنده و یا فریز شده از کشوری به کشور دیگر و یا از قاره ای به قاره دیگر صورت پذیرفت. بطوریکه میگوهای منجمد شده نقش اصلی در انتقال ویروسهای بیماریزا از قبیل ویروس لکه سفید[1](WSSV) از آسیا به آمریکا را برعهده داشتند در حالیکه بیماری ویروسی سندروم تورآ[2](TSV) توسط مولدین زنده آلوده از آمریکای مرکزی به آسیا منتقل گردید (Nunan *et al*. 1998.)

اولین بار در سال ۱۹۷۴ شناسایی ویروس *Baculovirus penaei* توسط Couch در میگوهای *Penaeus duorarum* منشاء گرفته از خلیج مکزیک صورت گرفت (Couch, 1974). در حال حاضر بیش از ۲۰ نوع ویروس بیماریزا در میگوهای خانواده پنائیده شناسایی شده است (Lightner, 1996). که از این میان ۴ ویروس شامل WSSV، YHV[3]، TSV و IHHNV[4] به عنوان مهمترین عوامل بیماریزای میگوهای پرورشی که ایجاد بیشترین میزان خسارت و تلفات می نمایند محسوب می شوند که قادرند در هر نقطه ای از جهان در میگوهای پرورشی ایجاد بیماری نمایند. این عوامل با ضرر و زیان اقتصادی فراوانی همراه بوده و از عوامل محدود کنند توسعه صنعت پرورش میگو در جهان محسوب می شود (Lightner 1996; Flegel 1997). امروزه اکثر کشورهای آسیایی همانند چین ، تایلند، هند، اندونزی، بنگلادش، مالزی، تایوان، ویتنام، و ژاپن متأثر از این عوامل بیماریزا می باشند (Flegel, 2006; Brock and Main, 1994; Lightner, 1996). لیکن کشور ما نیز از این مسئله مستثنی نبوده است لذا در سال های گذشته ظهور بیماریهای ویروسی در مزارع پرورش میگوی کشور صدمات اقتصادی فراوانی را بهمراه داشته بطوریکه در بعضی مناطق موجب رکود این صنعت شد. از این رو در سالهای اخیر معرفی میگوی سفید غربی عاری از بیماری به عنوان اولین گام مقابله و پیشگیری از بروز بیماری موجب رونق گرفتن صنعت تکثیر و پرورش میگو در کشور شده است.

1 White Spot Syndrome Virus
2 Taura Syndrome Virus Disease
3 Yellow Head Virus
4 Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus

جدول۱-۱: ویروسهای ایجاد کننده بیماری های خطرناک در میگوهای خانواده پنائیده

Abbreviation/Full name	Nucleic acids	Virion size (nm)	References
WSSV (White Spot Syndrome Virus)	ss-DNA	80-120 by 250-380	Lightner and Redman, 1998; van Hulten and Vlak, 2001; Mayo, 2002; Flegel, 2006.
TSV (Taura Syndrome Virus)	ss-RNA	30-32	Brock *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995; Mayo, 2002.
YHV/GAV/LOV (Yellow Head Virus/Gill Associated Virus/Lymphoid Organ Virus)	ss-RNA	183-200 by 34-42	Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Cowley *et al.*, 2000; Mayo, 2002; Munro and Owens, 2007.
MBV (Monodon Baculovirus)	ds-DNA	75 by 300	Fegan *et al.*, 1991; Lightner *et al.*, 1985; Flegel, 2006.
HPV (Hepatopancreatic Parvovirus)	ds-DNA	22-23	Flegel *et al.*, 1995; Bonami *et al.*, 1995; Flegel *et al.*, 2004; Umesha *et al.*, 2003.
IHHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis)	ss-DNA	22-23	Bonami *et al.*, 1990; Lightner, 1996; Tang *et al.*, 2003.
IMNV (Infectious Myonecrosis Virus)	ds-RNA	40	Poulos *et al.*, 2006.
MoV (Mourilyan Virus)	ss-RNA	85-100	Cowley *et al.*, 2005a,b; Sellars *et al.*, 2006.
LSNV (Laem Singh Virus)	ss-RNA	27	Sritunyalucksana *et al.*, 2006a,b; Flegel, 2006.
ASDD (Abdominal Segment Deformity Diseases)	N/A	N/A	Flegel, 2007.
PvNV (*Penaeus vannamei* Nodavirus)	ds-RNA	22	Tang *et al.*, 2007.

ss = Single-stranded; ds = Double-stranded; N/A = Not available

۱-۱- تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص[1]

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[2] بود که ظاهراً به بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و بافت زیرجلدی[3] مقاوم بود. از علائم مشخص این بیماری که خم شدن میگو ها و کاراپاس آنها می باشد و به همین دلیل Runt deformity syndrome(RDS) نیز نامیده می شود و

[1] Specific Pathogen Free
[2] *Litopenaeus vannamei*
[3] Infection Hypodermal and Heamatopoitic Necrosis Virus (IHHNV)

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.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 قوانین و مقرراتی جهت تولید میگوی عاری از بیماری خاص تنظیم و توسط آقای wyben و همکارانش در سال ۱۹۹۳ و با اعتبارات US Marine Shrimp Farming Program (USMSFP) و رعایت قوانین و مقررات اعلام شده اولین ذخیره میگوی 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 میکروارگانیسمی اختصاصی است که موجب مرگ و میر وتلفات در میگوها می‌شود. 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:

۱- باید با اطمینان قابل تشخیص باشند.

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

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

به عنوان مثال برخی از گونه های ویبریو[1] می توانند سبب بروز بیماری شده و به طور قابل ملاحظه ای در میگوها قابل تشخیص بوده، ولی آنها را نمی‌توان 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.

میگوهای عاری از بیماری خاص تولیدی، به بیماری ها مقاوم نبوده و با مفهوم مقاوم به پاتوژن خاص[2]تفاوت داشته ولی می توان میگوهای عاری از بیماری خاص را به یک یا چند بیماری مقاوم نموده و میگوی مقاوم به پاتوژن خاص تولید نمود. همچنین میگوی عاری از بیماری خاص را میتوان در یک زمان به یک یا چند بیماری

[1] Vibrio sp.
[2] Specific Pathogene Free (SPR)

مقاوم نموده و میگوی عاری از بیماری خاصی که مقاوم به پاتوژن خاص باشد نیز تولید کرد. مفهوم تحمل به پاتوژن خاص[1] 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 مادر به فرزندان منتقل نمی‌شود. مفهوم عاری از بیماری خاص بسته به محل پرورش و تولید میگو و سطوح ایمنی زیستی متفاوت بوده و اگر در شرایط ویژه تولیدی که اصطلاحا Nuclear Breeding Center (NBC) می نامند تولید شوند آنها را عاری از بیماری خاص گویند. در شرایط NBC میگوها برای دو سال تحت مراقبت بوده و برای کلیه بیماریهای خاص غربالگری میشوند. اگر میگوها را به سطوح ایمنی زیستی متوسط منتقل نماییم آنها را میگوهای با سلامتی بالا یا High Health (HH) می نامند.

عاری از بیماری خاص بودن میگو به حضور یا عدم حضور پاتوژن های خاص در میگو بستگی داشته و این وضعیت بستگی به درجه ایمنی زیستی تغییر میکند. بنابراین پرورش دهندگانی که بدنبال خرید میگوی عاری 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 طرف تولید کنندگان قرار دارد که آنها را حذف می کنند؟

چه ابزار تشخیصی برای شناخت پاتوژن ها در مرکز تولید عاری از بیماری خاص برای غربالگری استفاده شده است ؟

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

تولید کننده میگوی عاری از بیماری خاص از چه برنامه مراقبتی برای پایش ذخایر عاری از بیماری خاص استفاده نموده است ؟

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

همچنین خریداران میگوی عاری از بیماری خاص باید یک گواهی از غربالگری مهمترین بیماری ها را نیز دریافت دارند.

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

اهداف اصلی در تولید میگوهای عاری از بیماری خاص شامل:

۱- ایجاد ذخیره میگوی عاری از پاتوژنهای خاص.

۲- جلوگیری از تلاقی نژادهای یکسان یا هم خونی[2].

[1] Specific Pathogene Tolerance (SPT)
[2] Inbreeding

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

٤-١- مهمترین پاتوژنهایی که میگوی عاری از بیماری خاص باید از آنها عاری باشد.

سازمان جهانی بهداشت دام[1] 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[2] تعیین نموده و در کتاب سلامت آبزیان سازمان بهداشت جهانی دام[3] فهرست شده اند، کلیه کشورهای جهان موظفند براساس روشهای استاندارد ویکسان تشخیص بیماریهای مذکور که در کتاب راهنمای آزمونهای تشخیصی بیماریهای آبزیان[4] 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[5] و بیماری نکروز روده میانی باکلوویروسی[6] که از ویروس های باکلوویروسی بوده و در میگوهای مونودن گزارش نشده است در لیست قرار نمی گیرند. 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 ۱-۲ 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[7] در این لیست نبوده و بعداً به لیست اضافه شده است، یا در سال ۲۰۰۲ بیماری بیماری نکروز عفونی عضلات میگو[8] به لیست اضافه و امروز این لیست شامل ۹ ویروس می-باشد 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

[1] The World Organisation for Animal Health (OIE)
[2] Notifiable Diseases
[3] OIE Aquatic Animal Health Code
[1] Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals
[5] *Baculovirus Penaei*
[6] Baculoviral Midgut Necrosis
[7] White Spot Disease
[8] Infection Myonecrosis Virus (IMNV)

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 دسته یا category تقسیم می‌شوند :

C-۱ (دسته 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 (دسته دوم): پاتوژن هایی که خطرناک بوده و می‌توانند موجب تخریب شوند.

C-۳ (دسته سوم): پاتوژن هایی که حداقل اثرات را دارند ولی باید از مزارع یا مرکز تولید مولد دور بمانند.

جدول۱- ۲: فهرست مهمترین عوامل بیماری که در میگوهای عاری از بیماری خاص نباید باشند.

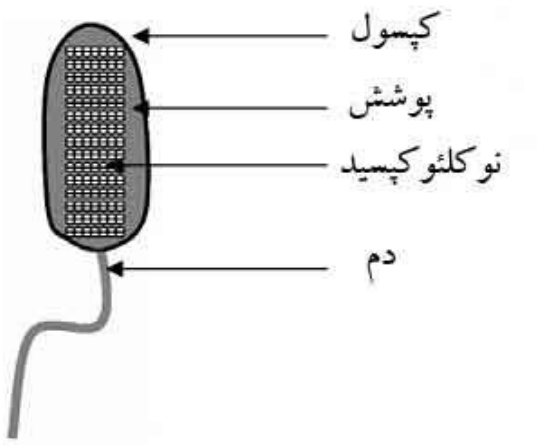
ردیف	نام بیماری	عامل بیماری	دسته پاتوژنها
۱	White Spot Syndrome virus(WSSV)	ویروس	C1
۲	Tauar Syndrome Virus(TSV)	ویروس	C1
۳	Yellow Head Virus/ Gill-Associated Virus(YHV/GAV)	ویروس	C1-2
۴	Infection Myonecrosis virus(IMNV)	ویروس	C1-2
۵	Hepatopancreatic Parvolike Virus(HPV)	ویروس	C1-2
۶	Infection Hypodermal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

۱-۵- مروری برمهمترین بیماریهای ویروسی میگوهای خانواده پنائیده

۱-۵-۱-بیماری ویروسی سندروم لکه سفید White Spot Disease(WSD)

ویروس لکه سفید یکی از مخربترین ویروس های بیماریزا در میگوهای خانواده پنائیده بوده این بیماری اولین بار در سال ۱۹۹۲ در میگوهای ژاپنی (*P. japonicas*) در کشور تایوان شهرستان I-Lan مشاهده شد (Wang *et al.*, 2000) این بیماری تا سال ۱۹۹۳ سایر گونه ها بویژه میگوهای ببری سیاه (*P. monodon*) در اکثر کشورهای آسیایی و ایالات متحده آمریکا را تحت تأثیر خود قرار داد (Lo *et al*., 1999). افشارنسب و همکاران (۲۰۰۴) اولین بار این بیماری را در میگوهای سفید هندی پرورشی در منطقه چوئبده آبادان – ایران گزارش نمودند از

سوی دیگر این بیماری به فاصله سه سال بعد در مزارع پرورش میگوی سفید غربی منطقه مذکور مجدداً شیوع پیدا کرد (Afsharnasab et al., 2007). عامل بیماری یکی از بزرگترین ویروس های جدا شده از میگوهای خانواده پنائیده می باشد این ویروس دارای یک پوشش سه لایه بوده که واجد یک کپسول همراه با یک DNA دو رشته ای می باشد. ویروس به اشکال تخم مرغی تا میله ای شکل[1] دیده می شود و دارای یک زائده دم مانند در انتهای خود می باشد (افشار نسب، ۱۳۸۶ a ;Van Hulten *et al*., 2001). این ویروس جزء خانواده *Nimaviridae* جنس *Whispovirus* بوده تاکنون ژنوم های متفاوتی از ویروس در دامنه kbp ۳۰۷ – ۲۹۲ جدا شده است (Van Hulten *et al*., 2001; Chen *et al*., 2002) (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: ساختار ویروس WSSV

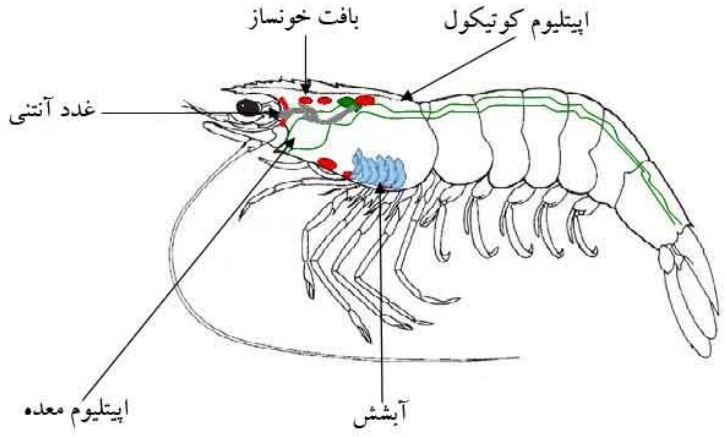
ویروس قادر است حداقل در ۷۸ گونه از سخت پوستان شامل میگوهای آب شور، شیرین، خرچنگ، شاه میگو (لابستر) بیماری ایجاد نماید (Lightner, 1996; Flegel, 2006).

این ویروس می تواند توسط روش های متفاوت فیزیکی و شیمیایی شامل درجه حرارت (^{0}C ۵۵ به مدت ۹۰ دقیقه ، ^{0}C ۷۰ به مدت ۱۰ دقیقه، خشک کردن بر روی کاغذ صافی به مدت ۳ ساعت، در محیط اسیدی (pH=1) به مدت ۱۰ دقیقه، pH=3 به مدت ۱ ساعت، محیط قلیایی (pH=12) به مدت ۱۰ دقیقه، اشعه مادون قرمز[2] به میزان $\mu W\ s/cm^2$ $۱۰^5 \times ۹$ به مدت ۶۰ دقیقه، غلظت های متفاوت از مواد ضد عفونی کننده (µg/ml ۰/۸ – ۰/۵) همانند اُزن، فرمالین با دوز ppm ۲۰۰، سدیم کلراید ۲۵٪ به مدت ۲۴ ساعت و کلروفرم در مدت زمان ۱۵ دقیقه غیرفعال شود. همچنین غلظت های مؤثر سدیم هیپوکلرید، بتادین و بنزوالکونیوم کلرید با دوز ppm ۲۰۰ – ۷۵ بر روی ویروس مؤثر می باشد (Balasubramanian *et al*., 2006).

تکثیر ویروس لکه سفید در هسته سلول های آلوده انجام می گیرد (Wongteerasupaya *et al*., 1995; Durand and Lightner, 2002). مطالعات اخیر نشان داده که علت آلودگی سلولهای سطحی به ویروس لکه سفید ممکن است

1 Bacilliform
2 Ultera Violet

ناشی از وجود گیرنده های ویروس در سطح سلول باشد (Li *et al*., 2007). ویروس بصورت طبیعی و تجربی در همولنف، آبشش ها، معده، اپیتلیوم کوتیکول، بافت خونساز، قلب، قسمت انتهایی روده، بافت عصبی، غدد آنتنی، چشم، پایه چشمی، پاهای شنا، پاهای حرکتی، گناده ها و تخمدان میگوهای آلوده یافت می‌شود (شکل۱-۲) (Wongteerasupaya *et al*., 1995; Escobedo-Bonilla *et al*., 2007). لذا تکثیر ویروس معمولاً در سلولهای بافت های هدف (آبشش، معده، اپیتلیوم کوتیکول، بافت خونساز، بافت لنفاوی و غدد آنتنی) صورت می گیرد (Tan *et al*., 2001; Durand and Lightner, 2002; Escobedo-Bonilla *et al*., 2007).



شکل۱-۲: بافت های هدف تکثیر ویروس WSSV در میگو

روند ورود ویروس لکه سفید و مکانیسم انتشار آن در میان سلولهای میزبان توسط Escobedo-Bonilla و همکاران (۲۰۰۷) مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای بافت آبشش و اپیتلیوم کوتیکول قسمت ابتدایی روده[1] میگوی سفید غربی واجد منافذی می باشند که ویروس قادر است بعد از بلع توسط موجود از طریق این منافذ وارد سلول شده و تکثیر نماید که پس از تکثیر اولیه، ویروس از لایه زاینده[2] عبور کرده و خود را به سینوس خونی می رساند و توسط جریان لنفی در تمامی ارگان های داخلی پخش می شود، این روند می تواند با موج جدیدی از عفونت همراه باشد. بیماری ویروسی لکه سفید بطور طبیعی بصورت فوق حاد، حاد تا تحت حاد و مزمن دیده می شود که مرگ و میر آنها به ترتیب بعد از ۳ – ۲ روز، ۱۰ – ۷ روز و ۲۸ – ۱۵ روز رخ می دهد(Sahul Hameed *et al*., 2006).

مواجهه با ویروس لکه سفید بطور تجربی در میگوهای سفید غربی عاری از عوامل بیماریزا[3] ، سایر گونه ها و گونه های میگوی آب شیرین ممکن است با بیماری و مرگ و میر همراه باشد. در رابطه با عفونت های طبیعی فاکتورهای زنده و غیرزنده می توانند بر شیوع بیماری ویروسی لکه سفید تأثیر گذار باشند. همچنین سایر

1 For-Gut
2 Base meant membrane
3 Specific Pathogenic Free

بیماریهای ویروسی از قبیل بیماری شبه پارووویروسی هپاتوپانکراس(HPV)[1] ، بیماری باکیولوویروس مونودن MBV[2]، IHHNV قادرند با بیماری ویروسی لکه سفید (WSD)[3] مشاهده شوند (Manivannan *et al*., 2002; Flegel *et al*., 2004; Umesha *et al*., 2006).

علائم کلینیکی بیماری ویروسی لکه سفید در میگوهای آلوده شامل کاهش اشتها، بی حالی، التهاب بافت آبشش (به دلیل تجمع مایعات)، مشاهده لکه های سفید بر روی کوتیکول، شل شدن و جداشدگی کوتیکول از بافت اپیدرم زیرین، بزرگ شدگی هپاتوپانکراس، عدم انعقاد همولنف و قرمز شدن انتهای زوائد میگوهای در حال مرگ می باشد (Lightner, 1996; Sahul-Hameed *et al*., 2006; Wang, Y. *et al*., 2000). فقط مشاهده علائم کلینیکی نمی تواند تأئید کننده بیماری ویروسی لکه سفید باشد (Flegel, 2006) چونکه کاهش اشتها در میگوهای سالم می تواند قبل و بعد از پوست اندازی دیده شود (Jory *et al*., 2001)، همچنین وجود لکه های سفید بر روی کاراپاس می تواند به دنبال عفونت های باکتریایی یا تغییرات pH آب نیز ایجاد گردد از سوی دیگر سایر علائم بیماری می تواند جزء علائم غیراختصاصی و عمومی سایر بیماریها باشد(Wang, Y. *et al*., 2000).

فاکتورهای محیطی نقش مهمی در شدت شیوع بیماری لکه سفید در موجودات آبزی دارند. دمای آب، شوری، اکسیژن محلول در آب، آمونیاک، pH و سموم مشتق شده از آفت کش ها می توانند با مرگ دسته جمعی میگوهای آلوده شده به بیماری WSD همراه باشند (Fegan & Clifford, 2001) بطوریکه افزایش دما و کاهش ناگهانی شوری موجب افزایش مرگ و میر در میگوهای آلوده شده به ویروس می شود (Liu, B. *et al*., 2006; Peinado-Guevara and López-Meyer, 2006). همچنین تصور می شود افزایش غلظت آمونیاک (۵ میلی گرم در لیتر) در مزارع پرورشی موجب کاهش ابتلا به ویروس WSSV می شود (Jiang *et al*., 2004). لذا تغییرات شدید فاکتورهای محیطی موجب سرکوب سیستم ایمنی میگوها شده که معمولاً با کاهش میزان کل هموست های همولنف THC[4]، فعالیت پروفنواکسیداز[5]، فاگوسیتوز[6] و رادیکال های آزاد[7] (O_2^-) همراه است (Le Moullac and Hafner, 2000).

سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) در سال ۲۰۱۴ جهت شناسایی مولکولی ویروس لکه سفید روش کار استانداردی را معرفی نمودند که در این روش پرایمر اختصاصی ویروس لکه سفید هم ارائه شد.

مرحله اول PCR

146F1	5’-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3’
146R1	5’-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3’.

1 Hepatopancreatic Parvolike Virus
2 Penaeus Monodon Baculovirus
3 White Spote Disease
4Total Heamocyte Count
5Prophenoxidase
6 Phagocytosis
7 Free Radical

مرحله دومPCR

146F2	5’-GTA-ACT-GCCCCTTCC-ATC-TCC-A-3’
146R2	5’-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3

این روش با حساسیت حداقل ۲۰ویروس است و محول حاصله دارای ۹۴ جفت باز است.

جهت ایجاد باند منفی (باند میگو) پرایمری که مربوط به سخت پوستان است را ارائه داده است که درbp ۸۴۸ باند تشکیل می دهد.

143F	5’-TGC-CTT-ATC-AGCTNT-CGA-TTG-TAG-3
145R	5’-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3’

جهت انجام Real-time PCR پرایمرهای زیر توسط همان سازمان ارائه شده است.

WSS1011F	5’-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3’
WSS1079R	5’-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3’
Taqman Probe	5’-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-3’

۲-۵-۱- بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم (IHHNV)

عامل ایجاد کننده این بیماری یک *Parvovirus* با اندازه ۲۲ نانومتر و وزن تقریبی Kb ۴/۱ می باشد. این ویروس یک ویروس بیست وجهی بدون پوشش همراه با ژنوم ssDNA و هسته تکراری یکی از کوچکترین ویروس های سخت پوستان بحساب می آید (Bonami *et al*., 1990). ویروس اولین بار در سال ۱۹۸۱ در مزارع پرورشی متراکم یا نیمه متراکم میگوی آبی (*P. stylirostris*) با منشاء مکزیک ، اکوادرو و پاناما در هاوایی آمریکا مشاهده شد (Lightner *et al*. 1983, b; Bell and Lightner 1987). این ویروس معمولاً میگوهای جوان و نابالغ وحشی و پرورشی را تحت تأثیر قرار داده و اغلب موجب درگیری بافت های اکتودرمال، مزودرمال و ندرتاً اندودرمال می شود (Bell and Lightner, 1984). ویروس قادر است از طریق عمودی یا افقی منتقل شد و طیف وسیعی از میزبانان از جمله میگوهای خانواده پنائیده پرورشی را درگیر سازد (Motte *et al*., 2003). عامل ایجاد کننده بیماری بطور معمول در ذخائر پرورشی و وحشی میگوی سفید غربی یافت می شود لذا انتشار بیماری همراه با توسعه صنعت پرروش میگو از طریق حاملین بدون علامت در بسیاری از کشورها صورت پذیرفت (Lightner & Redman, 1991). با توجه به مقاوم بودن نسبی میگوی سفید غربی به ویروس، تظاهر بیماری بیشتر بصورت مزمن بوده و ضایعات ناشی از بیماری در این گونه بسیار کم می باشد، بطوریکه در مناطق پرورشی تحت عنوان سندروم ناهنجاری رانت[1](RDS) نامیده می شود در نتیجه با کاهش رشد و ایجاد ناهنجاریهای در رستروم، کوتیکول، آنتن و اسکلت خارجی سروسینه و شکم همراه است (Browdy *et al*. 1993). لذا در صورت مشاهده بیش از ۳۰

1 Runt Deformity Syndrom

درصد RDS در یک جمعیت، محصول با یک کاهش بازده اقتصادی از ۱۰ تا ۵۰ درصد روبرو می شود (Brock and Main 1994; Lightner 1996).

سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) در سال ۲۰۱۴ جهت شناسایی مولکولی ویروس بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم(IHHNV) روش کار استانداردی را معرفی کرده است. به دلیل اینکه این ویروس typ های مختلفی دارد بنابراین پرایمرهای مختلفی نیز برای هر دسته از این typها ارائه نمئده است. تایپ های 3A و 3B که در گونه میگوی موندون دیده می شود بیشتر در مناطقی مانند هندوستان، استرالیا، شرق آفریقا و غرب اقیانوس آرام دیده می شود. تایپ ۱ و ۲ این ویروس برخلاف تایپ 3A و 3B میگوهای مونودون را آلوده نمی نماید.

جدول ۱-۳: پرایمرهای ارائه شده توسط سازمان جهانی بهداشت دام(OIE) جهت شناسایی .IHHNV

Primer	Product	Sequence	G+C%/Temp.	GenBank & References
389F	389 bp	5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	50%/72°C	AF218266
389R		5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	45%/71°C	(Tang *et al.*, 2000)
77012F	356 bp	5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'	50%/68°C	AF218266
77353R		5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	55%/63°C	(Nunan *et al.*, 2000)
392F	392 bp	5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	50%/68°C	AF218266
392R		5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'	50%/71°C	(Tang *et al.*, 2000; 2007)
309F	309 bp	5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'	36%/68°C	AF218266
309R		5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'	40%/69°C	(Tang *et al.*, 2007)
MG831F	831 bp	5'-TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'	45%/58°C	DQ228358
MG831R		5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'	55%/62°C	(Tang *et al.*, 2007)

۳-۵-۱- بیماری شبه پارووویروسی هپاتوپانکراس (HPV)

این بیماری اولین با در سال ۱۹۸۵ توسط Lightner and Redman از چهار گونه میگوی خانواده پنائیده متعلق به مناطق پرورشی چین، سنگاپور، کویت و فیلیپین جدا سازی گردید. در حال حاضر این بیماری اکثر میگوهای خانواده پنائیده در مناطق پرورشی میگو در آسیا، استرالیا، آفریقا و بعضی از کشورهای جنوب آمریکا را درگیر ساخته است (Brock and Lightner, 1990; Lightner, 1996) که این موضوع با افت شدید محصول برداشتی و زیان اقتصادی فراوانی همراه بوده است (Flegel , 2006). عامل بیماری از خانواده *Parvovirus* و جزء ویروس های DNA دار بوده که اندازه آن ۲۴ – ۲۲ نانومتر می باشد. علائم غیر اختصاصی این بیماری شامل کاهش رشد، بی اشتهایی، کاهش تحرک و افزایش باکتریهای رسوب کننده بر روی سطح بدن و آبشش می باشد. علاوه بر این علائم مرگ و میر بالا در طول مرحله جوانی (۱۰۰-۴۰٪) به مدت ۸ – ۴ هفته نیز گزارش شده است (Lightner *et al.*, 1993). این بیماری فاقد علائم اختصاصی بوده و اغلب با دیگر بیماریهای ویروسی همراه است (Pantoja and

Lightner, 2003). مهمترین ضایعه آسیب شناسی این بیماری وجود گنجیدگی های داخل سلولی بازوفیلیک در سلولهای نوع E اپیتلیال لوله های دیستال بافت هپاتوپانکراس می باشد.

٤-۵-۱- بیماری ویروسی سندروم تورآ (TSV)

ویروس عامل ایجاد کننده این بیماری بصورت RNA تک رشته ای (ssRNA) از خانواده Dicistroviridae با قطر ۳۲ نانومتر، بدون پوشش و بیست وجهی می باشد (Mari *et al*., 1998). این بیماری اولین بار در اواسط سال ۱۹۹۲ در مزارع پرورش میگوی جوان سفید غربی واقع در مصب رودخانه تورآ در خلیج Guayaquil اکوادور مشاهده شد که با زیان اقتصادی فراوان و مرگ و میر ۶۰ تا ۹۰ درصدی همراه بود (Jimenez 1992). به دنبال شناسایی این بیماری در میگوهای سفید غربی اکوادور، ویروس بیماری به سرعت تمام مناطق پرورش میگو در آمریکای لاتین و قسمتی از ایالات متحده آمریکا را تحت تأثیر خود قرار داد (Lightner, 1996). این ویروس قادر است بصورت طبیعی یا آزمایشگاهی میگوهای پرورشی آمریکا (*P. vannamei*، *P. stylirostris*، *P. schmitti*، *P. setiferus* و *P. aztecus*) و آسیا (*P. monodon*، *P. japonicus* و *P. chinensis*) را مبتلا سازد. از این رو میگوی سفید غربی حساسیت بالایی نسبت به این ویروس داشته و یکی از عوامل مرگ و میر در مراحل لاروی این گونه بحساب می آیند (Hasson *et al*. 1995; Lightner, 1996, Overstreet *et al*. 1997). میگوهای سفید غربی آلوده به ویروس سندروم تورآ موجب انتقال ویروس از کشور اکوادور به سایر کشورها شدند. عواملی همچون حشرات و پرندگان آبزی و محصولات دریایی منجمد و سایر عوامل در انتقال افقی ویروس نقش دارند. بدین صورت که حشرات و پرندگان آبزی به عنوان ناقل مکانیکی با خوردن لاشه، محتویات روده و مدفوع میگوهای آلوده موجب انتقال عامل بیماری در مزارع نزدیک به هم می شوند همچنین ویروس قادر است تا ماهها در محصولات دریایی منجمد زنده مانده و از این طریق موجب انتقال عامل بیماری به مناطق عاری از آلودگی شوند (Lightner 1996).

بیماری به اشکال حاد، انتقالی و مزمن مشاهده می شود. در شکل حاد بدن میگوها بصورت قرمز رنگ مشاهده می شود بویژه در ناحیه دم بهمین دلیل به این بیماری دم قرمز گفته می شود در حالیکه در شکل انتقالی که معمولاً بعد از گذشت چند روز از یک همه گیری ایجاد می شود با نقاط ملانیزه در سطح کوتیکول همراه است و در حالت مزمن ملانیزه شدن و نرم شدن پوسته تظاهر پیدا می کند.

۵-۵-۱- بیماری کله زرد (YHV)

بیماری اولین بار در سال ۱۹۹۳ در میگوهای پرورشی کشور تایلند گزارش گردید (Booryaratpalin *et al*. 1993; Chantanachookin *et al*. 1993) دو بیماری LOV[1] و GAV[1] (Spann *et al*. 1997) از استرالیا علائمی شبیه به بیماری

1 Lymphoid Organ Virus

YHV دارند. ویروس ایجاد کننده بیماری بصورت RNA تک رشته ای (ssRNA) با قطر ۶±۴۴ نانومتر، پوشش دار و میله ای شکل بوده و در ستوپلاسم تکثیر می کند. ویروس می تواند متعلق به خانواده Rhabdoviridae و یا جزء گروه Filamentous متعلق به خانواده Paramyxoviridae باشد (Booryaratpalin *et al*. 1993; Chantanachookin *et al*. 1993). در حال حاضر آنرا جزء خانواده Coronaviridae محسوب نموده اند (Flegel , 2006).

این بیماری موجب درگیری شدید میگوهای ببری سیاه در سیستم های متراکم واقع در کشورهای جنوب شرقی آسیا (Flegel *et al*., 1997) و میگوهای *P. japonicus* در تایوان همراه با ویروس بیماری WSSV شد (Wang *et al*. 2004). ویروس ارتباط نزدیکی با ویروس بیماریزای GAV دارد لذا موجب درگیری شدید میگوهای ببری سیاه پرورشی در استرالیا می شود (Spann *et al*. 1997). YHV و GAV بطور بارز در میگوهای جوان و نابالغ حادث می شود (Boonyaratpalin *et al*. 1993; Flegel *et al*. 1997; Lightner 1996). میگوهای آب های لب شور گونه *Palaemon styliferu* (grass shrimp)، *Euba sia superba* و *Acetes sp*. (planktonic shrimps) که اغلب با میگوهای ببری سیاه پرورش داده می شوند می توانند به عنوان ناقل ویروس YHV محسوب شوند (Flegel *et al*. 1997; Alda De Grainorge and Flegel 1999). با توجه به مقاوم بودن میگوهای موزی (*P. merguiensis*) و *Metapenaous ensis* این گونه ها نیز بطور آزمایشگاهی در مواجهه با ویروس YHV مبتلا شوند (Flegel *et al*. 1997). همچنین میگوهای خانواده پنائیده بخصوص میگوهای جوان گونه *P.vannamei*، *P. stylirostris*، *P. setiferus*، *P. aztecus* و *P. duorarum* حساسیت بالایی نسبت به ویروس دارند در حالیکه مراحل پست لاروی نسبت به ویروس مقاوم می باشد (Lightner 1996).

٦-٥-١- بیماری نکروز عفونی عضلات میگو (IMNV)[2]

این بیماری اولین بار در سال ۲۰۰۲ در میگوهای سفید غربی پرورشی واقع در شمال غربی برزیل مشاهده شد. عامل ایجاد کننده بیماری یک ویروس RNA دار دو رشته ای (dsRNA)، بیست وجهی با اندازه ۴۰ نانومتر می باشد. این بیماری موجب کاهش رشد در میگوهای جوان سفید غربی می شود از علائم اختصاصی این بیماری نکروز شدن، سفید، و مات شدن عضلات ناحیه دم و بند های شکمی می باشد (افشارنسب، ۱۳۸۶a؛ Flegel, 2006;).

۷-۵-۱- بیماری باکیلوویروس مونودن (MBV)

این بیماری اولین بار در سال ۱۹۸۳ در زمان انتقال میگوهای بالغ ببری سیاه از تایوان به مکزیک مشاهده شد. عامل بیماری ویروسی از خانواده *Baculovirus* جزء ویروس های DNA دار با قطر ۴±۷۵ نانومتر بوده که بصورت

1 Gill Associated Virus
2 Infection Myonecrosis Virus

گرد و واجد کپسول می باشد که اطراف آن پوشش قرار گرفته است. عامل بیماری از طریق مدفوع، بافت های آلوده و ذرات معلق در آب منتقل می گردد. میگوهای مبتلا بی حال، بی اشتها و بی حرکت بوده و نسبت به میگوهای سالم کوچکتر می باشند. از علائم بارز این بیماری سفید شدن قسمت میانی روده بوده که اغلب در مراحل لاروی (زوآ، مایسیس و ابتدای دوره پست لاروی) اتفاق می افتد (افشارنسب، a ۱۳۸۶؛ Flegel, 2006;).

بیماری بیشتر پست لاروها، میگوهای جوان و بالغ گونه های *P.monodon*، *P.merguiensis*، *P.semisulcatus*، *P.indicus*، *P.plebejus*، *P.pencillatus*، *P.esculentus*، *P.kerathurus* و *L.vannamei* را درگیر می سازد. بیماری اولین بار در سال ۱۳۸۰ در میگوهای ببری سبز از خلیج فارس گزارش شد (افشارنسب، a ۱۳۸۶).

٦-۱- مروری بر منابع

۱-٦-۱- 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 (*P. vannamei, P. monodon, P. stylirostris, P. japonicus, P. chinensis* and *P. indicus*) 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 میگیرند (فقط گونه سفید هندی *P. indicus* بدلیل عدم امکان عاری شدن از عوامل بیماریزای مهم ، مورد حذف قرار گرفت).

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 آقای 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 TS 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 slow growth و سندروم بد شکلی و کوتولگی runt deformity syndrome (RDS) ناشی از فرم مزمن بیماری Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) نیز مشاهده شد. در چین پس از یکسال موفقیت در برداشت زیاد میگو در واحد سطح مزارع پرورشی ، مشکلات حاصل از واردات 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 TS در مراکز تکثیر و پرورش میگو ایجاد شد که مرگ و میر پست لاروها و میگوهای جوان را بدنبال داشت. وضعیت نقل و انتقالات میگوی وانامی در کشورهای مختلف و برخی تبعات آن در جدول مشاهده می شود. بیماریهای که در مراکز تکثیر و مزارع پرورشی میگوی وانامی شایع هستند نیز در جداول ۱-۴ و ۱-۵ آورده شده اند.

جدول ۱-٤: مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مراکز تکثیر

ردیف	ویروس	باکتری	قارچ	انگل
۱	BP	*Vibrio* sp	*Laginidium* sp	*Vorticella* sp.
۲	IHHNV	Fouling bacteria	*Sirolpidum* sp.	*Zothamnium* sp.
۳	HPV			
۴	REO			
۵	RPS			
۶	TSV			
۷	LOVV			

جدول ۱-۵: مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مزارع پرورشی

ردیف	ویروس	باکتری	انگل
۱	BP	*Vibrio* sp	Nematods
۲	IHHNV	NHPB	Microsporidiae
۳	HPV	–	–
۴	IMNV	–	–
۵	WSSV	–	–
۶	TSV	–	–
۷	LOVV	–	–

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- تجهیزات مورد نیاز

دستگاه ترمال سایکلر - دستگاه میکروسانترفیوژ - دستگاه الکتروفورز - دستگاه UV transluminator - دستگاه گرداننده[1] - دستگاه حرارتی برای لوله ها – میکروپیپت- سیستم عکس برداری دیجیتال

۲-۲- مواد مصرفی

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 مولکولی۸۴۸ bp ،۶۳۰bp و ۳۳۳ bp.

۲-۳- 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 گیرند، 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 ۲-۱میزان حجم نمونه بر اساس در صد شیوع و اندازه جمعیت آورده شده است.

[1] Vortex

جدول۲-۱: تعیین تعداد نمونه مورد بررسی بر مبنای درصد شیوع احتمالی بیماری در جمعیت

Population Size	Prevalence (%)						
	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	10
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 ویروس های مورد بررسی در شرایطی تلفات و یا کـه علایـم کلینیکـی بیماری مشاهده می شد، حداقل ۱۰ نمونه که دارای علایم کلینیکی شاخص بود از نظر بیماری مورد بررسی قرار گرفتند.

٤-۲- نمونه های مورد بررسی

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

جدول ۲-۲: نمونه برداری های صورت گرفته در هر نسل.

نسل‌ها و مراحل اجرایی در هر فاز		
فاز اول(F_0نسل) شامل	**فاز دوم (نسل F_1) شامل**	**فاز سوم (نسل F_2)**
به گزینی و تکثیر مولدینF_0	پرورش لاروهایF_1 تا مرحله پیش مولد، مولد-سازی میگوهایF_1 تا مرحله رسیدگی جنسی و به گزینی و تکثیر مولدینF_1	پرورش لاروهایF_2 تا مرحله پیش مولد و مولدسازی میگوهایF_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، کنسانتره و زنده قبل از مصرف مورد پایش ویروسی قرار می گرفتند 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.

۲-۵- نحوه انتقال نمونه ها

نمونه ها را سریع به آزمایشگاه انتقال داده و با توجه به روش آزمون مورد نظر، در شرایطی که میگو ها باید ذخیره یا انتقال داده شوند (غیر از میگو های زنده) آنها را در الکل ۹۰٪ و یا در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال داده می‌شدند.

۲-٦- 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 ۲-۳: فهرست استخرهای نمونه برداری شده جهت پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و انگلی شهریور و مهر ۱۳۹۱

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

۲-۷- آماده سازی نمونه ها و استخراج DNA

۲-۷-۱- آماده سازی نمونه ها (استخراج DNA به روش DTAB- CTAB)

۲-۷-۱-۱- پایه چشمی مولدین

۱) قرار دادن پایه چشمی در آب تمیز

۲) قرار دادن نمونه در داخل لوله با حجم ۲ میلی لیترکه محتوی ۰/۶ میلی لیترمحلول DTAB است.

۳) خرد کردن پایه چشمی در لوله توسط آسیابگر یکبار مصرف.

۲-۷-۱-۲- لارو، پست لارو، میگوی جوان

۱) حدود ۲۰ میلی گرم نمونه را در لوله‌ای به حجم ۲ میلی لیتر که محتوی ۰/۶ میلی لیتر محلول DTAB می‌باشد وارد کرده (در این آزمایش حداقل ۵۰ قطعه لارو، و ۳۰ قطعه پست لارو زیر ۱۲، و برای پست لاروهای۱۲تا ۳۰ تنها نیمه‌ی دمی آنها باید استفاده شود، بدون استفاده از سر یا هپاتوپانکراس).

۲) خرد کردن نمونه‌ها در لوله توسط آسیابگر یکبار مصرف.

۲-۷-۱-۳- پاهای شنا، پاهای حرکتی و آبشش میگوی بالغ

۱) دو قطعه از نمونه را در داخل لوله ای با حجم ۲میلی لیترکه محتوی ۰/۶ میلی لیتر محلولDTAB است، قرار دهید.

۲) درون لوله توسط آسیابگریکبار مصرف نمونه‌ها را خرد کنید.

۲-۷-۱-٤- دم یا ماهیچه میگو بالغ

۱) قرار دادن یک دم یا حدود ۲۰ میلی گرم ماهیچه در داخل لوله ای با حجم ۲ میلی لیتر که محتوی ۰/۶ میلی لیتر محلولDTAB می‌باشد.

۲) خرد کردن نمونه ها در لوله توسط آسیابگر یکبار مصرف

۲-۷-۲: روش استخراج

۱)نمونه آماده شده را در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت۵ دقیقه آنکوبه کرده سپس در دمای اتاق خنک نموده.

۲) آن را در ورتکس با دور آرام و به میزان کم بهم زده، سپس ۰/۷ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه کرده وآن را به مدت ۲۰ثانیه بوسیله ورتکس بهم زده و در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه(قطر جایگاه لوله ۷-۵ سانتی متر ، rpm ۱۲۰۰۰)سانترفیوژ نموده.

۳) از فاز بالایی محلول ۲۰۰ میکرولیتر را برداشته و به داخل یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتر جدید وارد کرده و ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول CTABرا به همراه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه نموده و آن را با دور آرام در ورتکس بهم زده، سپس در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه نموده.

۴) به آرامی آن را در دمای اتاق خنک نموده و سپس در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ نموده.

۵) با احتیاط بسیار محلول رویی را خالی کرده و مجددا به این پلت باقی مانده ۱۵۰میکرو لیتر محلول حلال اضافه نموده و آن را در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه کرده و سپس در دمای اتاق خنک نموده.

۶) به مدت ۵ دقیقه در دور g۱۲۰۰۰ سانترفیوژ نموده. سپس محلول شفاف را به لوله ۱/۵ میلی لیتر جدید همراه با ۳۰۰ میکرو لیتر از اتانول ۹۵٪ انتقال داده شد.

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

۳-۷-۲- استخراج DNA به توسط بافر لیزکننده

(فقط برای نمونه‌های پاهای شنا، آبشش، پست لارو کمتر از۱۲)

۱)میزان ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر لیزکننده را در لوله ۱/۵ میلی لیتری اضافه نموده.

۲)نمونه‌ها را در لوله وارد کرده و آنها را با آسیابگر یکبار مصرف خرد کرده.

۳) نمونه‌های آماده شده را در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه آنکوبه کرده وسپس در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت۱۰ دقیقه سانترفیوژ نموده.

۴) میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شفاف بالایی را برداشته و به داخل یک لوله ۱/۵ میلی لیتری همراه با ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه شد.

۵) به آرامی آن در ورتکس بهم زده و در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ کرده و سپس اتانول را دور ریخته و اجازه داده شدتا پلت خشک شود.

۶) پلت را در آب مقطر استریل یا بافر TE حل نموده.

٤-۷-۲- حلالهای DNA

الف) غلظتDNA با توجه به نمونه‌های مختلف گرفته شده متفاوت می‌باشد. غلظت DNA با استفاده از حجم‌های مختلفی از آب مقطر استریل یا بافر TE تنظیم گردید.

۸-۲- آماده سازی محلول ها

الف) مخلوط اولین واکنش PCR: ۸ میکرولیتر به ازای هر واکنش مخلوط کردن مواد ذیل:

- پیش مخلوط PCR ابتدایی(First PCR Premix).....۷/۵ میکرو لیتر
- IQzyme DNA polymerase(۲واحد در هر میکرولیتر).....۰/۵ میکرو لیتر

ب- مخلوط واکنشی PCR لانه ای(Nested PCR reaction reagent mixture) :

۱۵ میکرولیتر به ازای هر واکنش

مخلوط کردن مواد ذیل :

- پیش مخلوط Nested PCR pre-mix .....۱۴ میکرو لیتر
- IQzyme DNA polymerase(۲واحد در هر میکرولیتر).....۱ میکرو لیتر

۹-۲- شرایط محیطی واکنش‌ها

الف)برنامه های واکنشی , اولین واکنش PCR:

- ۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه؛ ۶۲ درجه سانتیگراد ۳۰ثانیه؛ ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه، که ۵ سیکل تکرار می شود.

-۹۴ درجه سانتیگراد ۱۵ثانیه؛ ۶۲ درجه سانتیگراد ۱۵ثانیه؛۷۲ درجه سانتیگراد ۲۰ثانیه، که ۱۵ سیکل تکرار می شود. سپس.

- سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه؛۲۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، انجام می شود.

ب) برنامه های واکنشی Nested PCR:

-۹۴ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه؛۶۲ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه،۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، که ۲۵ سیکل تکرار می شود.

- در پایان سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه؛ ۲۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه انجام می‌شود.

سیستم محافظتی و تشخیصی ویروس سندرم لکه سفید IQ2000 با بکارگیری برنامه Uni- IQ می تواند صورت پذیرد.

شرایط واکنشی در برنامه Uni- IQ :

الف) برنامه 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 سانتیگراد بـه مـدت ۳۰ ثانیه که ۱۵ سیکل تکرار می شود، سپس
- در سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام می شود.

ب) برنامه های واکنشی Nested PCR :

-۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه که ۳۰؛ ۷۲درجه سانتیگراد بـه مدت ۳۰ ثانیه، که ۳۰ سیکل تکرار می شود، سپس
- سیکل انتهایی ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام می شود.

۱۰-۲- روش کار واکنش‌ها

۱) آماده سازی محلول‌های واکنشی مربوط به اولین واکنش PCR و Nested PCR بر اساس تعداد نمونه‌هـا. بـرای هر کدام از محلول‌های آزمایشی آماده شده کاربر نیاز دارد که سه 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 لوله‌ای به حجم ml ۰/۲ که برچسب زده شده است ریخته می شود.

۳) سپس ۲ میکرولیتر از DNA تخلیص شده نمونه و یا استاندارد را به هر مخلوط واکنشی اضافه می کنیم.

۴) برروی مخلوط‌های واکنشی مقدار ۲۰ میکرولیتر از روغن معدنی اضافه می کنیم، مگر اینکه دسـتگاه ترمـال-سیکلر به گونه طراحی شده باشد که نیازی اضافه کردن روغن نباشد.

۵) سپس واکنش PCR اولیه را انجام می دهیم.

۶) ۱۵ میکرولیتر از مخلوط واکنشی Nested PCR را به هر کدام از لوله هـایی کـه PCR مرحلـه اول بـرروی آنهـا صورت گرفته، اضافه نمایید. مطمئن شوید که محلول از روغن عبورکرده وبه مواد زیرین رسیده است.

۷) سپس مرحله واکنشی Nested PCR را انجام می دهیم.

۸) پس از پایان و کامـل شـدن واکـنش لانـه ای (Nested)، ۵ میکرولیتـراز محلـول 6X loading dye را بـه هرلولـه واکنشی اضافه نموده و بخوبی آن مخلوط کنید.

۹) آنگاه نمونه جهت انجام مراحل الکتروفورز آماده است.

از tRNA مخمر به عنوان رقیق کننده در محلول‌های استاندارد مثبت استفاده شد.

۱۱-۲- الکتروفورز

۱-۱۱-۲- آماده‌سازی ژل آگارز

الف) ابتدا یک سیستم بافری الکتروفورز را از بین TAEوTBE تعیین شد. سپس جهت انجام پروسه الکتروفورز و تولید ژل آگارز غلظت رقیق شده‌ی آن به میزان1X آماده نموده. از یک نوع بافر برای انجام الکتروفورز و تولید ژل آگارز استفاده شد.

ب) ژل آگارز ۲ ٪ جهت انجام الکتروفورز تهیه شد. برای تهیه ژل آگارز۲ ٪، میزان ۲ گرم پودرآگارز را به داخل فلاسکی که حاوی ۱۰۰ میلی لیتری بافر الکتروفورز است، اضافه شد.

ج) مخلوط را حرارت داده تا اینکه یک حالت شفاف بخود بگیرد بدون آنکه ژلی شکل بگیرد.

د) پس از آنکه ژل آگارز را در دمای محیط اندکی خنک شد و وقتی دمایش به حدود ۵۰ درجه‌سانتیگراد رسید، آن را به آرامی به درون ظرف مخصوص ژل، خالی نموده. پس از خنک شدن ژل و منعقد شدن آن شانه ای که درون ژل بود را به آرامی جدا کرده.

۲-۱۱-۲- روش کار با الکتروفورز

۱) ژل آگارز را در ظرف مخصوص ژل قرار دهید. بطوری که چاهک های ایجاد شده توسط شانه به سمت قطب منفی بودند.(مولکول DNA بدلیل داشتن بار منفی به سمت قطب مثبت حرکت می کند)

۲) بافر 1X الکتروفورز را به داخل تانک الکتروفورز افزوده تا اینکه روی ژل را بپوشاند.

۳) ۵ میکرولیتر از محصول رنگی PCR product loading dye به هر کدام از چاهک‌ها اضافه کرده.

۴) حدود ۵ میکرولیتر مارکرDNA نیز جهت انجام هر آزمایش الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت.

۵) هنگامی که تمامی نمونه‌ها در جایگاهشان قرار داده شد. سپس ولتاژ ورودی را بین ۱۰۰تا ۱۵۰ ولت تنظیم نموده.

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

رنگ آمیزی ژل و جمع آوری اطلاعات:

الف-محلول غلیظ رنگی اتیدیوم برماید را بیست هزار بار رقیق شده(۵ میکرولیتر اتیدیوم برماید را به ۱۰۰ میلی لیتری آب مقطر افزوده).

ب) پس از تهیه محلول رنگی، آن را در ظرف پلاستیکی همراه با ژل آماده شده قرار داده. محلول رنگی روی ژل را کاملا پوشانده بود.

ج) آن را در دمای اتاق به مدت ده دقیقه بهمین صورت نگه داشته سپس ژل را در ظرف پلاستیکی به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از آب مقطر رنگ زدایی نموده، تا صفحه زمینه آن کاملا پاک گردد.

د) سپس ژل را زیر دستگاه UV transluminator جهت خواندن نتایج قرار داده شد.

۱۲-۲- تشخیص

جهت تشخیص ویروس های مختلف بر اساس نوع کیت مورد استفاده راهنماهایی وجود دارد بطور مثال دستورالعمل تشخیص بیماری WSSV بصورت زیر است.

شکل۲-۱:راهنمای تشخیص نمونه های مثبت و استاندارد برروی ژل آگارز.

ستون ۱: نمونه‌ای با عفونت شدید WSSV.

ستون ۲: نمونه ای با عفونت متوسط WSSV

ستون ۳: نمونه ای با عفونت خفیف WSSV

ستون ٤: نمونه ای با عفونت خیلی خفیف WSSV

ستون٥: نمونه منفی از نظر وجود WSSV

ستون٦: کنترل منفی (tRNA مخمر یا آب مقطر استریل)

ستون۷: استاندارد مثبت 2000copies/reaction

ستون۸: استاندارد مثبت 200copies/reaction

ستون۹: استاندارد مثبت 20copies/reaction

ستون M: مارکر وزن مولکولی ۸٤۸ bp، ٦۳۰bp، ۳۳۳ bp.

نمونه منفی تنها یک باند روشن را در۸٤۸ bp نشان می‌دهد بدلیل آنکه محصول ژن نگهدارنده خانگی رابه عنوان کنترل داخلی دارد.

۱-۱۲-۲- روش کار تشخیص‌ها

۱) باند روشن تشکیل شده در ۲۹۶ bp ویا ۵۵۰ bp : به عنوان استاندارد مثبت

۲) باند روشن تشکیل شده تنما در ۸۴۸ bp : به عنوان نمونه منفی (N)

هر آزمایشی به کنترل منفی و یک کنترل مثبت نیاز دارد. اگر در استاندارد ۱۰۰، باند روشن در۲۹۶ bp تشکیل نشد ممکن بدلیل انجام واکنش PCR باشد ویا سایر موارد دیگر.از سوی دیگر اگردر نتیجه حاصل از کنترل منفی ، باند روشن در ۲۹۶ bp وجود داشت این معنی وجود آلودگی در آزمایشات است.

۱۳-۲- آماده سازی نمونه ها و تخلیص RNA

۱-۱۳-۲- روش کار تخلیص RNA

۱) نمونه ها را به داخل لوله ای به حجم ۱/۵سی سی همراه با محلول خالص ساز RNA وارد می کنیم.

۲) خرد کردن نمونه ها در لوله توسط آسیابگر یکبار مصرف انجام می گیرد سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می کنیم.

۳) ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب CHCl3 (کلروفورم) اضافه نموده و سپس آن را به مدت ۲۰ ثانیه در ورتکس بهم می زنیم. آن را به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می کنیم، سپس آن را در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ می کنیم.

۴) میزان ۲۰۰ میکرولیتر ازمحلول شفاف بالایی را برداشته وبه داخل یک لوله ml ۰/۵ همراه با ۲۰۰ میکرولیتر ۲-پروپانول (ایزوپروپانول) می ریزیم.

۵) به آرامی آن در ورتکس بهم می زنیم ودر دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم وسپس ایزو پروپانول را دورمی ریزیم.

۶) به پلت حاصله ml ۰/۵ اتانول ۷۰ درصد جهت شستشو اضافه می نماییم و به مدت ۵ دقیقه در دور g ۷۵۰۰ (9000 rpm) سانتریفیوژ می کنیم، تا مجددا پلت RNA را بدست آوریم . آنگاه اتانول را دور ریخته و پلت را خشک می کنیم.

۷) پلت را با DEPC dd H20 حل می کنیم.

۲-۱۳-۲- حلالهای RNA

الف) غلظت RNA با توجه به نمونه های مختلف گرفته شده متفاوت می باشد. غلظت RNA با حل کردن پلت RNA درحجم های مختلفی از DEPC dd H20 تنظیم می گردد.

جدول۲-٤: میزان حجم DEPC dd H20 بر اساس بافتی که RNA از آن استخراج شده است.

حجم	نوع نمونه ها
۵۰۰ میکرولیتر	پست لارو
۲۰۰ میکرولیتر	آبشش

ب)لطفا از میزان مناسبی حجم ماده DEPC dd H20 با توجه به میزان واقعی احیاء محلول استفاده شود.

۳-۱۳-۲- پروتکل انجام آمپلیفیکاسیون

برای انجام آمپلیفیکا سیون از لوله هایی ml ۰/۲ با دیواره نازک یا پلیت های ۹۶ خانه استفاده می شود.

آماده سازی محلول ها:

۱) محلول واکنشی RT- PCR : ۸ میکرولیتر با ازاء هر واکنش که متشکل از:

- پیش مخلوط RT- PCR PreMix ۷ میکرولیتر
- IQzyme DNA polymerase(۲واحد در هر میکرولیتر) ۰/۵ میکرولیتر
- مخلوط آنزیمی RT ۰/۵ میکرولیتر

۲) مخلوط واکنشی PCR لانه ای (Nested PCR): ۱۵ میکرو لیتر به ازاء هر واکنش که متشکل از:

- پیش مخلوط Nested PCR : ۱۴ میکرو لیتر
- IQzyme DNA polymerase(۲واحد در هر میکرولیتر): ۱ میکرو لیتر

٤-۱۳-۲- شرایط محیطی واکنش ها(دربرنامه Uni- IQ RT-PCR)

الف) پروفایل واکنشی RT-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 سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که ۱۵ سیکل تکرار می شود، سپس
- در پایان سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام می شود.

۵-۱۳-۲- پروفایل واکنشی Nested PCR

- ۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ ثانیه که ۳۰ سیکل تکرار می شود، سپس
- در سیکل انتهایی ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام می شود.

٦-۱۳-۲- روش کار واکنش ها

۱) آماده سازی محلولهای واکنشی مربوط به اولین واکنش PCR و Nested PCR بر اساس تعداد نمونه ها. برای هر کدام از محلولهای آزمایشی آماده شده کاربرنیاز دارد که سه تا استاندارد مثبت(۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰) و یک کنترل منفی (آب مقطر استریل و tRNA مخمر) قرار دهد.

۲) ۸ میکرولیتر از مخلوط واکنشی RT-PCR برداشته می شود به داخل لوله های واکنشی به حجم ۰/۲ سی سی همراه با برچسب ریخته می شود.

۳) سپس ۲ میکرولیتر از RNA تخلیص شده نمونه ویا استاندارد را به هر مخلوط واکنشی اضافه می کنیم.

۴) سپس واکنش RT- PCR را انجام می دهیم.

۵) ۱۵ میکرولیتر از مخلوط واکنشی Nested PCR را به هر کدام از لوله هایی که RT- PCR مرحله اول برروی آنها صورت گرفته ، اضافه می کنیم.

۶) سپس واکنش Nested PCR را انجام می دهیم.

۷) پس ازپایان و کامل شدن واکنش، ۵ میکرولیتراز محلول 6X loading dye را به هرلوله واکنشی اضافه نموده و بخوبی آنرا مخلوط می کنیم.

۸) آنگاه نمونه ها جهت انجام مراحل الکتروفورز آماده هستند.

نمونه های مثبت باید برای بیماری TSVباندهای ۲۸۴bp و یا ۴۷۶bp و نمونه های منفی تنها باندهای ۶۸۰ bp را نشان دهند.برای بیماری WSSV نمونه های مثبت باندهای ۲۹۶bp و یا ۵۵۰bp و نمونه های منفی تنها باند ۸۴۸bp و برای بیماری IMNV نمونه های مثبت باندهای ۱۰۰bp و یا ۲۰۰bp و نمونه های منفی تنها باند ۳۳۳bpرانشان میدهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری HPVباندهای ۳۳۹bp و یا ۵۵۳bp و نمونه های منفی تنها باندهای bp ۷۳۰ را نشان دهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری IHHNV باندهای ۶۴۴bp و ۴۳۸bp نمونه های منفی تنها باندهای bp ۲۴۳ را نشان دهند. نمونه های مثبت باید برای بیماری MBV باندهای ۲۲۵bp و یا ۴۴۴bp و نمونه های منفی تنها باندهای bp ۶۶۵ را نشان دهند. همچنین نمونه‌های مثبت باید برای بیماری YHDباندهای ۴۰۶bp و ۷۷۷bp و نمونه های منفی تنها باندهای bp ۲۷۷ یا ۷۷۷bp یا و ۶۸۰bpرا نشان دهند و نمونه های مثبت باید برای بیماری NHPباندهای ۸۴۸bp و نمونه های منفی تنها باندهای bp ۳۲۵ را نشان دهند.

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، جگر گاو) 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 ۳-۱ می باشد.

جدول ۳-۱: 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

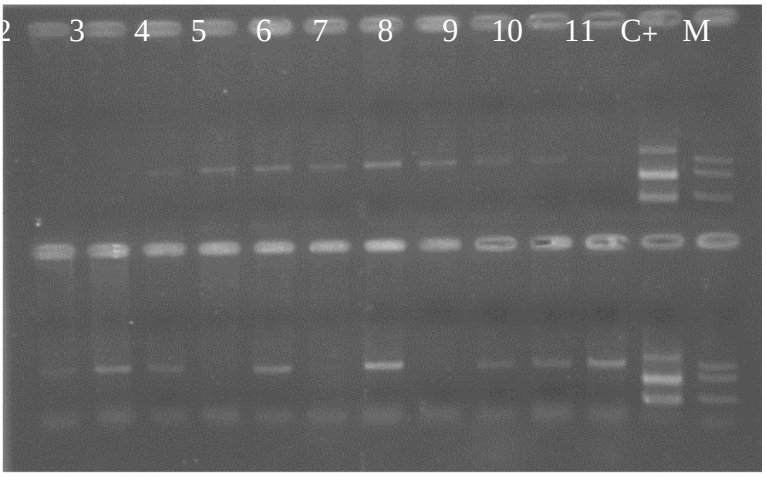
۳-۲-نتایج آزمون نمونه های مورد پایش

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 از نظر وجود ۷ ویروس TSV، YHV، IHHNV، MBV، HBV، IMNV، WSSV قرار گرفتند.

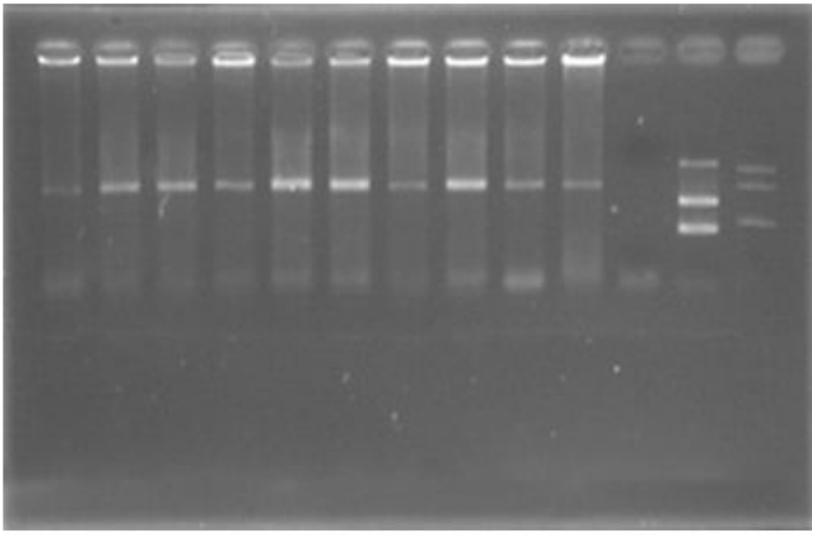
کلیه آزمون ها توسط مرکز تشخیص بیماری های میگو وابسته به اداره کل دامپزشکی استان بوشهر کنترل و گواهی سلامت میگوها صادر گردید.

همچنین براساس بررسی های صورت گرفته در کلیه نمونه های مورد آزمایش جهت ردیابی ویروسهای مورد مطالعه، هیچ مورد مثبتی مشاهده نشد و از نظر وجود ویروس نمونه های مورد بررسی منفی بودند. این بررسی

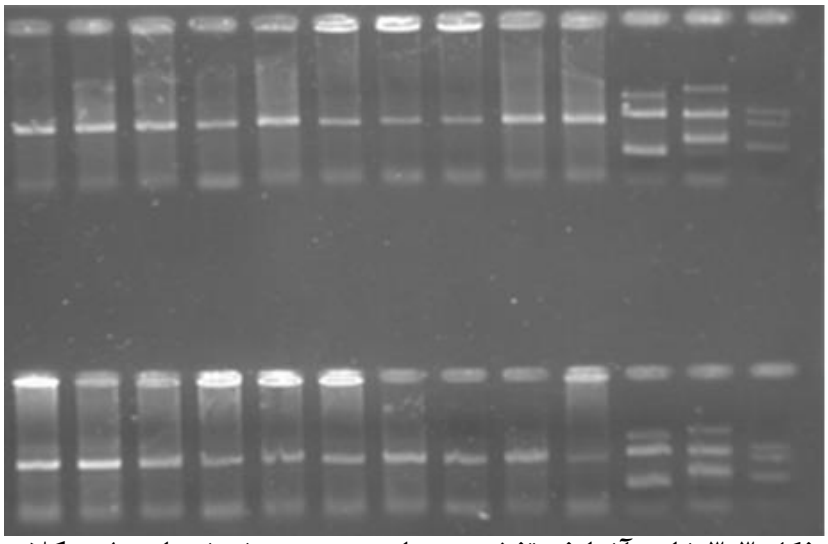
شامل کلیه نمونه های میگو در مراحل مختلف طرح بوده و در مورد نمونه های غذا نیز همین نتیجه به‌دست آمد (شکل ۹).



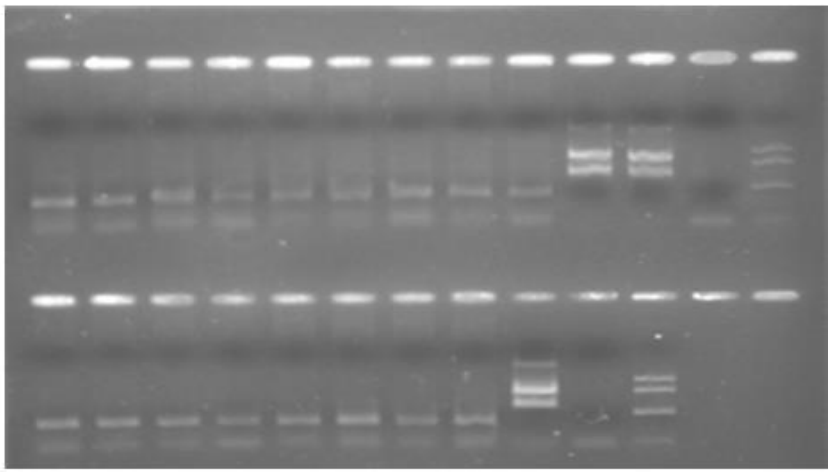
شکل ۳-۱: نتایج آزمایش شناسایی ویروس wssv در نمونه های طرح کلان SPF .



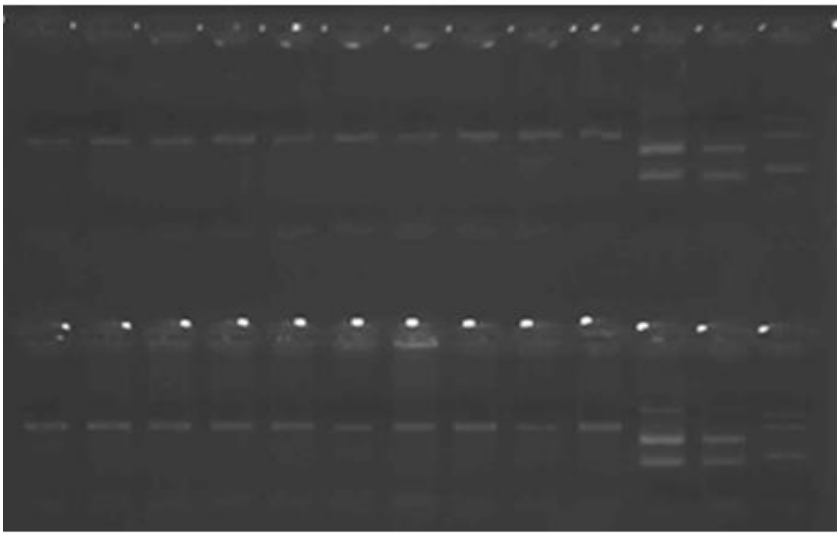
شکل ۳-۲: نتایج آزمایش تشخیص بیماری IMNV در نمونه های طرح کلان SPF



شکل ۳-۳: نتایج آزمایش تشخیص بیماری YHV در نمونه های طرح کلان SPF.



شکل ۳-٤: نتایج آزمایش تشخیص بیماری IHHNV در نمونه های طرح کلان SPF.



شکل ۳-٥: نتایج آزمایش تشخیص بیماری TSV در نمونه های طرح کلان SPF.

جدول ۳-۲: نتایج بدست آمده از آزمایشات مولکولی PCR نمونه های جمع آوری شده در فازهای مختلف طرح تولید میگوی عاری از بیماری خاص جهت شناسایی ویروس های مورد مطالعه.

ویروس	مرحله	غذا(پلت، زنده، تر)	لارو و پست لارو	میگوی نابالغ	میگوی مولد
		تعداد نمونه مثبت	تعداد نمونه مثبت	تعداد نمونه مثبت	تعداد نمونه مثبت
HPV	فاز ۰	۰	۰	۰	۰
	فاز۱	۰	۰	۰	۰
	فاز۲	۰	۰	۰	۰
TSV	فاز ۰	۰	۰	۰	۰
	فاز۱	۰	۰	۰	۰
	فاز۲	۰	۰	۰	۰
IMNV	فاز ۰	۰	۰	۰	۰
	فاز۱	۰	۰	۰	۰
	فاز۲	۰	۰	۰	۰
WSSV	فاز ۰	۰	۰	۰	۰
	فاز۱	۰	۰	۰	۰
	فاز۲	۰	۰	۰	۰
YHV/GAV	فاز ۰	۰	۰	۰	۰
	فاز۱	۰	۰	۰	۰
	فاز۲	۰	۰	۰	۰
IHHNV	فاز ۰	۰	۰	۰	۰
	فاز۱	۰	۰	۰	۰
	فاز۲	۰	۰	۰	۰
MBV	فاز ۰	۰	۰	۰	۰
	فاز۱	۰	۰	۰	۰
	فاز۲	۰	۰	۰	۰

٤- بحث

اولین ذخایر میگوهای SPF توسط USMSFP آمریکا و بر اساس دستورالعملهای ICES و برای بیماری IHHNV در آمریکا تولید شدند (Wyban *et al.*, 1992). تعیین اینکه میگوهای SPF عاری ازکدام بیماریها باشند بستگی به لیست بیماریهای موجود، قابل تشخیص بودن آنها و قابلیت حذف آنها دارد (Lightner, 2011). لیست بیماریها برای تولید میگوی SPF لازم است در زمانهای مختلف براساس بروز و شیوع بیماریهای جدید تغییر کند مثل آنچه در مورد بروز و شیوع جهانی بیماریهای IHHNV، TSV، WSSV و IMNV[1] اتفاق افتاد (Lightner et al., 2009). در این پروژه از ویروس های معرفی شده توسط سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از تعیین لیست بیماریهایی که نیاز است میگوهای SPF عاری از آن باشد مهمترین عامل در اجرای پروژه اجرایی کردن روند دقیق و بدون نقص دستورالعملهای بیوسکیوریتی(ایمنی زیستی) است.

ایمنی زیستی در آبزی پروری، مجموعه روش هائی است که در مراکز تکثیر و مزارع پرورش اعمال میگردد تا آبزیان پرورشی را از ابتلا، شیوع و انتقال بیماری و یا هرنوع شرایط نامطلوب بهداشتی مصون نگاه دارد (Moss *et al.* 1998) . اما تعریف جدیدی که در سال ۲۰۰۰ در این خصوص (در زیر بخش امور دام) ارائه شد موجب تکمیل این تعریف گردید، ایمنی زیستی به مجموعه روش های ضروری گفته می شود که به منظور پیشگیری، مهار و ریشه کنی بیماریهای عفونی واجد اهمیت اقتصادی در دامداری ها بکار گرفته می شود. امروزه در حقیقت ایمنی زیستی در آبزی پروری تلفیق و یا مجموعه دو تعریف بالاست. به عبارتی این واژه ترکیبی از طب پیشگیری،آزمایشات تشخیصی، عملیات ضد عفونی و درنهایت ریشه کنی است که در سطوح مختلف عملیاتی اجرا و پیگیری می شود (Moss *et al.*, 2003).

به عبارت دیگر امنیت زیستی عبارت است از محافظت موجودات زنده در برابر عامل بیماری، ودر مزارع آبزی پروری به معنی حفاظت آبزیان در برابر عوامل عفونی شامل(ویروسها، باکتریها، قارچها و انگلها) بوده و برای طراحی برنامه موثر برای اجرای آن نیاز به دانش پرورش آبزیان و مدیریت مزرعه و شناخت بیولوژی موجود زنده و عوامل پاتوژن و همچنین شناخت راههای انتقال پاتوژنها می باشد(Lee and O'Bryen 2003).

منابع زیادی وجود دارند که می توانند اجرام عفونی را وارد مزرعه نمایند. این منابع شامل تخم انواع آبزیان مانند تخم چشم زده ماهی، تخم میگو،تخم دیگر سخت پوستان(خرچنگ) ، لارو ، بچه ماهی یا بچه میگو ، ماهی مولد یا میگوهای مولد ، آب، خوراک، اشخاص، حیوانات، تجهیزات، وسایل کار و ماهیان یا میگوهای بیمار بظاهر سالم (تحت کلینیکی) موجود در مرکز تکثیر یا مزرعه پرورشی می باشند. هر یک از این منابع احتیاج به ارزیابی و پایش مداوم جهت پیشگیری از ورود اجرام عفونی به مرکز تکثیر یا مزرعه را دارد. بنا بر این، بنظر می

[1] Infectious Myonecrosis Virus

رسد برنامه ایمنی زیستی در آبزی پروری شامل پیشگیری و پایش بیماریها، تمیز نمودن و ضدعفونی مزرعه و پیش بینی ایمنی متداول و مداوم می باشد (Horowitz and Horowitz 2003).

قسمت ضروری دیگر در برنامه ایمنی زیستی، پایش بیماریها بوده که شامل برنامه ریزی منظم جهت ارزیابی بهداشتی همه تانکها یا استخرهای مورد استفاده است و با توجه به موقعیت و وضعیت مرکز تکثیر یا مزرعه، نمونه گیری از میگوهای تلف شده و یا میگوهای های زنده و یا از هر دو بعمل می آید. چندین نمونه براساس لیست مورد نظر بیماریها، جهت تستهای لازم اخذ شده وبه آزمایشگاه مرجع ارجاع می گردد(Lightner, 2003).

میگوی SPF به میگوی زنده ای گفته می شود که چند نسل از آن در شرایط بسیار دقیق ایمنی زیستی و سختگیرانه قرنطینه ای در محیط محصور نگهداری شده و در آن شرایط مورد پایش های عوامل بیماری قرار گرفته باشد و عاری از همه عوامل بیماری ذکر شده در استاندارد ارائه شده باشد.

هرگاه موجود (و یا زاده های مولدین یاد شده)از این شرایط خارج شودمادامی که نهایت تلاش در خصوص حفظ شرایط بهداشتی رعایت شودمیتوان به آن High health اطلاق نمود اما دیگرآن موجود SPF نیست.

تعریف واقعی میگوی عاری از بیماری خاص به معنی عاری بودن از هرگونه پاتوژن یا میکروارگانیسمی اختصاصی است که موجب مرگ و میر وتلفات در میگوها می‌شود. این وضعیت میگوها بسته به سطوح ایمنی زیستی و محیط جغرافیائی و گونه میگو متفاوت است. 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[1] بر اساس اهداف این پروژه پایش عوامل ویروسی در فازهای مختلف و در نسل های F_0 الی F_2 صورت گرفت و میزان شیوع عوامل ویروسی مطابق لیست ارائه شده توسط سازمان جهانی بهداشت دام صفر بود و در مرحله غربالگری اولیه و انتخاب جمعیت ها موارد مثبتی مشاهده نشد. در طی اجرای سیستم مراقبتی این پروژه کلیه اصول مرتبط شامل: روشهای غربالگری[2]، آزمایشات تشخیصی[3] و تائیدی[4] 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.

[1] Survillance System
[2] Screening Test
[3] Diagnostic Test
[4] Confirmatory Test

۵- نتیجه گیری

اجرای عملیاتی تولید میگوی عاری از بیماری خاص(SPF) در پایلوت تحقیقاتی ایجاد شده در پژوهشکده میگوی کشور با توجه به استاندارد های تعریف شده و ایجاد شرایط قزنطینه ای و اجرای دقیق دستورالعمل های ایمنی زیستی به معنی واقعی کلمه طی سالهای ۱۳۹۱ الی ۱۳۹۳ به اجرا گذاشته شد. و طی این مدت همه ی نمونهای میگو از زمان انتخاب تا تغییر مراحل مختلف و انتقال و جابجایی مورد سنجش عوامل بیماریزای مختلف به ویژه ویروس ها قرار گرفتند. در این طرح مجموعاً ۶۰۱۳ آزمایش شناسایی ویروسی انجام شد. نتایج نشان دادند هیچ عامل ویروسی در بین نمونه های مورد بررسی وجود ندارد و با سطح اطمینان ۹۵٪ می توان اعلام نمود که این میگوها عاری از بیماری های ویروسی هستند.

منابع

۱- افشار نسب ، م. **a** ۱۳۸۶. بیماریهای ویروسی میگوهای خانواده پنائیده. وزارت جهاد سازندگی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۰ صفحه

۲- جلالی، ب.، برزگر، م.۱۳۷۸. مدیریت بهداشتی مزارع پرورش میگو. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۹۸صفحه.

3- Afsharnasab, M., Dashtyannasab, A., Yeganeh, V. and Soltani, M., 2007. Incidence of white spot disease (WSD) in *P. indicus* farms in Bushehr Province, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 7:15-26.

4- Afsharnasasb, M., Mortezaei, R., Yegane, V. and Kazemi, B., 2009. Gross sign, histopathology and polymerase chain reaction observation of white spot syndrome virus in shrimp specific pathogen free *Litopeneaus vannamei* in Iran. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4, 297-305.

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

6- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan C., Thomas, J. and Sahul Hameed, A.S., 2008. Studies on the immunomodulatory effect of extract of Cyanodon dactylon in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 820–828.

7- Bauchau, A. G., 1981. Crustaceans. *In*: Ratcliffe N. A. and Rowley, A. F. (editors). Invertebrate blood cells. Academic Press, London and New York, pp. 385-420.

8- Bell, T. A. & Lightner, D. V., 1984. IHHND virus: Infectivity and pathogenecity studies *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 38, 185-194.

9- Bell, T.A. & Lightner, D. V., 1987. IHHN disease of *Penaeus stylirostris:* effects of shrimp size on disease expression. *Journal of Fish Diseases*, 10:165-170.

10- Bonami, J.R., Brehelin, M., J. Mari, M., Trumper, B. and Lightner D.V., 1990. Purification and characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*, 71:2657-2664.

11- Brock, J.A. and Lightner, D. V., 1990. Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. pp. 245-349 *In*: Diseases of Marine Animals, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.

12- Brock, D. M., Tacon, A. G.J., Poulos, B., Lightner, D. V., 2007. Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, 265, 41–48.

13- Browdy, C.L., Holloway, J.D., King, C.O., Stokes, A.D., Hopkins, J.S. and Sandifer, P.A., 1993. IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *Journal of Crustacean Biology*, 13:87-94.

14- Burgents, J., Burnett, K. and Burnett, L. E., 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*, 231, 1 –8.

15- Chang, P-S., Lo, C-F., Wang, Y-C. and Kou, G-H., 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis. Aquat. Org*, 27, 131-139.

16- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Lo, C.F., Kou, G.H., Liao, I.C., 1999. Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org*, 36, 163– 168.

17- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S. and Flegel, T.W., 1993. History and ultrastructure reveal a newgranulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by ‘‘yellow head’’ disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17:145-157.

18- Chen, L.L., Wang, H.C., Huang, C-J., Peng, S-E., Chen, Y-G., Lin, S-J., Chen, W-Y., Dai, C-F., Yu, H-T., Wang, C-H., Lo, C-F. and Kou, G-H., 2002. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology*, 301, 136-147.

19- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. and Phongdara, A., 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, 233:23-30.

20- Claydon, K., Cullen, B. and Owens, L., 2014. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in Cherax quadricarinatus. *Dis. Aquat. Org*, 62, 265-268.

21- Durand, S.V, Lightner, D.V., Redman, R.M. and Bonami, 'J.R., 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 205-211.

22- Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2007. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 74, 85-94.
23- Fegan, D.F. & Clifford III, H.C., 2001. Health management for viral diseases in shrimp farms. *In*: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, *Aquaculture*, The world aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168-198 pp.
24- Flegel, T.W., 1997. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal Microbiol. Biotechnology*, 13, 433–442.
25- Hossain, M.D. Otta, S.H., Chakraborty, S.K., Kumar, A., Karunasagar, H.S., and Karunasagar, I., 2004. Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. *Aquaculture*, 237, 59–71.
26- Hsieh, C. Y., Chuang, P. C., Chen, L. C., Tu, C., Chien, M. S., Huang, K. C., Kao, H. F., Tung, M. C. and Tsai, S. S., 2006. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHND) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 258, 73–79.
27- Hsu, H.C., Lo, C.F., Lin, S.C., Liu, K.F., Peng, S.E., Chang, Y.S., Chen, L.L., Liu, W.J. and Kou, G.H., 1999. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. *Dis. Aquat. Org*, 39, 13-19.
28- Jian, X.F., Lu, L., Chen, Y.G., Chan, S.M. and He, J.G., 2005. Comparison of a novel in situ polymerase chain reaction (ISPCR) method to other methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org*, 67, 171-176.
29- Jimenez, R., 1992. Sindrome de Taura (Resumen). Pages 1-16 *In*: Acuacultura Del Ecuador. Camara Nacional de Acuacultura, Guayaquil, Ecuador.Johnson, R.W. l997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated review. *J. Anim. Sci.*, 75: 1244-1255.
30- Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, B., Khongpradit, R. and Akpanithanpong, U., 1995. Mass mortality caused by systemic bacilliform virus incultured Penaeid shrimp, *Penaeus monodon*, in Thailand. *Asian Shrimp News*, 5, 2–3.
31- Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S. and Itami, T., 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured Penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 164, 243–251.
32- Li, C.C., Yeh, S.T. and Chen, J.C., 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following Vibrio alginolyticus injection. *Fish & Shellfish Immunology*, 25:853–60.
33- Lightner, D.V., Redman, R.M. and Bell, T.A., 1983. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis: a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J. *Invertebr. Pathol*, 42, 62–80.
34- Lightner, D.V. & Redman, R.M. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45, 47-53.
35- Lightner, D.V., Redman, R.M., Moore, D.W. and Park, M.A. 1993. Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 116, 15-23.
36- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Mari, J.L., Bonami, J.R. and Shariff, M., 1994. Distinction of HPV-type viruses in *Penaeus chinensis* and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe. *Asian Fish. Sci*, 7, 267–272.
37- Lightner, D. V., 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. *World Aquaculture Society*, Press, Baton Rouge. Section 3.11.
38- Lightner, D.V. and Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201-220.
39- Liu, B., Yu, Z., Song, X., Guan, Y., Jian, X. and He, J., 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 253, 163-170.
40- Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, CH. and Chen, CH., 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25,133–141.
41- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen,, C.H., Liu, K.F., Chiu, Y.L., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H., 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Dis. Aquat. Org. 30, 53-72.
42- Lo, C.F., Hsu, H.C., Tsai, M.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Kou, G.H. and Lightner, D.V., 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Disease Aquatic Organization*, 35: 175–185.
43- Maeda, M., Itami, T., Kondo, M., Henning, O., Takahashi, Y. and Hirono, I., 1997. Characteristics of penaeied rod shaped DNA virus of kuruma shrimp. *In*: New approaches to viral disease of aquatic animals, NRIA international workshop, National Research Institute of *Aquaculture. Nansei, Mie, Japan*: 218–28.

44- Manivannan, S., Otta, S.K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 2002. Multiple viral infections in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. *Dis. Aquat. Org*, 48, 233-236.
45- Mari, J., Bonami, J.R. and Lightner, D.V., 1998. Taura syndrome of Penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33:11-17.
46- Martinez, J. G. S., Guzman, G. A. and Ruiz, H. M., 2007.White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp, Review Article. *Aquaculture Research*, 38, 1339 – 1354.
47- Melena, J., Bayot, B., Betancourt, I., Amano, Y., Panchana, F., Alday, V., Calder, J., Stern, S., Roch, Ph. and Bonami, J.R., 2006. Pre-exposure to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae. *J. Fish Dis*, 29, 589–600.
48- Mishra, S.S., Shekhar, M.S. and Azad, I.S. 2005. Concurrent infection with WSSV and MBV in Tiger prawn, *Penaeus monodon* (Fabricious) in West Bangal and their detection using PCR and DNA Dot-blot hybridization technique. *Indian Journal of Biorechnology*, 4, 506-515.
49- Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narváez, A., Tenorio, N., Cedeño, V., Mialhe, E. and Boulo, V., 2003. Prevention of IHHND vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219, 57-70.
50- Natividad, K. D. T., Migo, M.V.P., Albaladejo, J.D., Magbanua, J.P.V., Nomura, N. and Matsumura, M., 2006. Simultaneous PCR detection of two shrimp viruses (WSSV and MBV) in postlarvae of *Penaeus monodon* in the Philippines. *Aquaculture*, 257, 142-149.
51- Nunan, L.M., Poulos, B.T. and Lightner, D.V., 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, 160:19-30.
52- OIE (World Organisation for Animal Health) Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, 2003. Office International Des Epizooties, Paris, France.
53- Overstreet, R.M., Lightner, D.V., Hasson, K.W., McIlwain, S. and Lotz, J., 1997. Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69:165-176.
54- Pantoja, C. R. & Lightner, D. V., 2003. Similarity between the histopathology of white spot syndrome virus and yellow head syndrome virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture*, 218, 47–54.
55- Peinado-Guevara, L.I. and López-Meyer, M., 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. *Aquaculture*, 251, 33-45.
56- Perez, F., Volckaert-Filip, A.M. and Calderon, J., 2005. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Aquaculture*, 250, 586– 591.
57- Persson M, Cerenius L and Soderhall, K., 1987. The influence of haemocytes number on the resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus Aphanomyces astaci. *J Fish Dis*, 10:471–7.
58- Primavera, J.H. & Quinitio, E.T., 2000. Runt deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon. Journal Crustacean Biology*, 20, 796–820.
59- Pruder G.D., Brown, C.L., Sweeney, J.N. and Carr, W.H., 1995. High health shrimp systems: seed supply - theory and practice. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), swimming through troubled water, Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture '95. 1-4 February 1995, San Diego. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 40-52.
60- Raa, J., Rtwstad, G., Engstad, R. and Robertsen, B., 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: *Diseases in Asian Aquaculture* (I. M. Shariff, R. P. Subasinghe and J. R. Arthus, eds.), p. 39-50. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. *Res.* 42(11). Nr. 10
61- Rai, P., Pradeep, B., Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 2009. Detection of viruses in *Penaeus monodon* from India showing signs of slow growth syndrome. *Aquaculture*, 289, 231–235.
62- Rajendran, K.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C. and Rajan, J.J.S., 2006. White spot syndrome virus (WSSV) infection in tiger shrimp *Penaeus monodon*: A non-lethal histopathological rapid diagnostic method using paraffin and frozen sections. *Journal of Fish Disease*, 22, 183–191.
63- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L. and Van Wormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol, 268, 47– 67.*
64- Sahul Hameed, A.S., Sarathi, M., Sudhakaran, R., Balasubramanian, G. and Musthaq, S.S., 2006. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV) infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis. *Aquaculture*, 256, 111-120.
65- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172, 63–92.

66- Saksmerprome, V., Puiproma, O., Noonin, Ch. and Flegel, T. W., 2010. Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNDV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture*, 298, 190–193.
67- Shekhar, M.S., Azad, I.S. and Ravichandran, P., 2006. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 261, 1122-1127.
68- Shike, H., Dhar, A.K., Burns, J.C., Shimizu, C., Jousset, F.X., Klimpel, K.R., Bergoin, M., 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. *Virology*, 277, 167–177.
69- Singhapan, J., Limsuwan, Ch., and Chuchird, N., 2004. Effect of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) on Growth, Survival Rate and Histopathological Changes of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Department of Fishery Biology, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.pp.5
70- Spann, K.M., Cowley, J.A., Walker, P.J. and Lester, R.J.G., 1997. A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31:169-179.
71- Sun, Zh. F., Hu, Ch. Q., Ren, Ch. H. and Shen, Q., 2006. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal andhematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 131 , 41–46.
72- Tang, K.F.J. & Lightner, D.V., 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 189, 11-21.
73- Tang, K.F.J. & Lightner, D.V., 2002. Low sequence variation amongisolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating fromHawaii and theAmericas.*Dis. Aquat.Org*, 49, 93–97.
74- Tang, K.F.J., Durand, S.V., White, B.L., Redman, R.M., Mohney, L.L. and Lightner, D.V., 2003. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus a preliminary study. *Aquaculture*, 216, 19–29.
75- Tang, K.F.J., Navarro, S.A. and Lightner, D.V., 2007. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNDV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74, 165–170.
76- Tokhmafshan, M., Akbari, S., Tamjidi, M., Laloi, F. and Soltani, M., 2004. Occurance of white spot syndrome disease in farmed *Penaeus indicus* in Iran. Applied Fisheries & Aquaculture, 4:42-47.
77- Tsai, J.M., Shiau, L.J., Lee, H.H., Chan, P.W.Y., Lin, C.Y., 2002. Simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) by multiplex reverse transcription-polyemerase chain reaction (RT-PCR) in pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org*, 50, 9-12.
78- Tu, Ch., Huang, H.T., chuang, Sh.H., HSU, J.P., KUO, Sh.T., Li, N.J., Hsu, T.L., Li, M.Ch. and Lin, Sh.Y. 1999. Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38: 159-161.
79- Van Hulten, M.C., Wittevel Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K. and Vlak, J.M., 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286: 7–22.
80- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat.Org*, 21, 69-77.
81- Yang, B., Song, X.L., Huang, J., Shi, C.Y., Liu, Q.H. and Liu, L., 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *J. Fish. Dis*, 29, 301-305.

Abstract:

After the outbreak of various viral diseases, specifically white spot syndrome (WSS) in farmed Litopenaeus vannamei in the past few years, this non-native shrimp species in Iran requires a generator-builder with specific a pathogen-free approach. This Research was done by the Iran Shrimp Research Center (ISRC) to access accurate information regarding specific pathogen-free shrimp production and avoid using shrimp broodstock production through foreign investors. This research was part of the molecular viral study. For this trial, selected shrimps in farms were sampled and screened for main viruses (OIE list). Shrimps without infection were brought to the quarantine system for one month and at the end of the quarantine they were screened again. In addition, in winter spending, before and after spawning, it's offspring in F1 and F2 were also screened for viral pathogens by IQ2000 kit at the Iran Shrimp Research Center lab and Iranian veterinary organization lab. All shrimp products such as fresh and consumed food were tested for OIE list at all stages during project performance and the result of tests were negative. Sequenced and molecular tests with specific primers were used to determine the presence of infected samples carrying the virus in any of the products, such as shrimp and consumed food, the infected samples. The result of all the tests during last three years, shows that all the shrimp and their food products were pathogen-free and safe to use.

Keywords: Shrim, SPF, virus

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shrimp Research Center

---

Project Title : Molecular identification of viral pathogens in SPF(Specific pathogen free) shrimp
Approved Number: 14-80-12-9106-91002-9101K
Author: Vahid Yeganeh
Project Researcher : Vahid Yeganeh
Collaborator(s) *:* S.J. Zorieh Zahra, M. Mirbakhsh, B. Ghaednia, A. Dashtiannasab, M.A. Nazari. E keshtkar., M.R. Mehrabi, R. Bnadrakhshan, F. Ansari, E. Mohmmadi, Zh. Ranjbari, M.J. Shabani, H. Ghanatian, Gh. Jamali, M. Afsharnasab
Advisor(s): S.J. Hosseini
Supervisor: -
Location of execution : Bushehr Province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 2 Year & 4 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

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 :

Molecular identification of viral pathogens in SPF(Specific pathogen free) shrimp

Project Researcher :

Vahid Yeganeh

Register NO.

50710