نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۴ پاییز ۱۳۹۳

افزایش حساسیت میگوی وانامی آلوده به ویروس لکه سفید نسبت به ویبریوها در مزارع پرورشی چوئبده آبادان

• **سیدرضا سیدمرتضایی (نویسنده مسئول)**
عضو هیئت علمی‌بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور
• **مینا آهنگرزاده**
پژوهشگر بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور
• **حسین هوشمند**
پژوهشگر بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور
• **الهام جرفی**
عضو هیئت علمی‌بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور
تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: شهریورماه ۱۳۹۱
Email: rmortezaie@yahoo.com

چکیده

با ورود گونه جدید میگوی سفید غربی *L. vannamei* به سیستم پرورش کشور بعد از تلفات در مزارع آبادان در سال ۱۳۸۱ و در بوشهر در سال ۱۳۸۳، شناسایی احتمالی ورود آلودگی‌های عفونی بخصوص ویروس‌ها و ارتباط آن با باکتری جنس ویبریو مد نظر قرار گرفت. لذا ازاستخرهای پرورش میگو در سایت چوئبده آبادان، ۲۴۰ نمونه از میگوهای پرورشی جهت ردیابی ویروس لکه سفید و ۱۲۰ نمونه برای شناسایی باکتری‌های جنس ویبریو استفاده گردید. همچنین بافت‌های آبشش، هپاتوپانکراس و کوتیکول از میگوها برای ردیابی ویروس لکه سفید با روش آسیب شناسی بافتی جدا و در محلول دیویدسون تثبیت گردید. با استفاده از کیت تشخیصی WIT Multi Vir IQ۲۰۰۰ و روش آسیب شناسی بافتی، ویروس WSSV شناسایی گردید. در این مطالعه باکتری‌های جنس ویبریو در میگوهای وانامی تشخیص داده شد. همزمان با افزایش تنوع ویروس‌ها بخصوص WSSV تعداد ویبریوها در بافت هپاتوپانکراس به $۴/۹ \times ۱۰^{۵}$ cfu/gr رسید. نتایج حاصل از آسیب شناسی بافتی و کیت تجاری نشان داد که ۴۰ درصد نمونه‌های مورد آزمایش به ویروس لکه سفید آلوده بودند.

لغات کلیدی: میگوی وانامی، ویروس لکه سفید، ویبریو، آسیب شناسی بافتی، آبادان

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 104 pp: 53-59

Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to vibrios infection in farms of Choebdeh Abadan

By: Mortezaei, S.R., (Corresponding Author), Faculty member of Aqutic Health and Disease Department. South of Iran Aquaculture Research Center. Khuzestan, Ahvaz, Iran

Ahangarzadeh M., Researcher of Aqutic Health and Disease Department. South of Iran Aquaculture Research Center. Khuzestan - Ahvaz - Iran

Houshmand, H., Researcher of Aqutic Health and Disease Department. South of Iran Aquaculture Research Center. Khuzestan, Ahvaz, Iran

Jorfi, E., Researcher of Biotechnology Department. South of Iran Aquaculture Research Center

Received: August 2011 Accepted: August 2012

The introduction of *L. vannamei* to Iran was initiated when high mortality occurred in shrimp farms of Abadan in 2002 then in Bushehr during summer of 2004.. Inspection of *L. vannamei* for infectious agents , specially virus and bacteria and relationship between them were the main objectives of this study. Therefore about 240 samples consisting of shrimps of *L. vannamei* were collected from farms in Abadan for virology studies by PCR procedure (Iq2000 diagnostic kits and WIT multi vir Iq2000). Also 120 shrimps of *L.vannamei* were tested for bacterial infection and for histopathology had been collected randomly and preserved in Davidsons fixation and then transferred to 75% ethyl alcohol for storage. (Hepatopancreas , gills and cuticule). Finally it has been detected vibrio sp.in various organs of *L. vannamei*. Histopathological studies have shown inclusion bodies of WSSV in various tissues. Also 40% shrimps with WSSV and histopathology infected. Total vibrio in hepathopancreas increase (4.9×105 cfu/gr) with intensity WSSV in tissue.

Key words: *L. vannamei*; WSSV; Vibrio; Histopathology; Choebdeh Abadan

مقدمه

صنعت آبزی پروری و بـه خصوص پرورش میگو از ابتدای دهه ۱۹۸۰ رشـد بسیار چشمگیری داشته است اما به دنبال افزایش تولید، بیماری‌های عفونـی بعنوان یـک فاکتور محدود کننده این صنعـت را تا حدودی تحت تاثیر قرار داده اسـت. بیماری‌های عفونی با افزایش نقل و انتقال موجودات آبـزی بصورت منجمد یا زنده باعث جابجایـی پاتوژن‌ها بالاخص ویروس‌ها بین کشـورها شده است. این موضوع از سال ۱۹۹۱ که بیماری لکه سفید (White spot disease) درکشـور تایلند مشـاهده گردید اهمیت بیشتری پیـدا نموده و تاکنون میلیاردها دلار خسـارت اقتصادی وارد کرده اسـت. (Flegel,۱۹۹۷, ۲۰۰۶). این بیماری از دیگر کشـورها ی آسـیایی از جمله بنـگلادش، اندونـزی ، مالزی، فیلیپین، سـریلانکا، ویتنـام و در ایران نیز گزارش شـده است (افشـار نسـب و همکاران؛ ۱۳۸۵و ۱۳۸۶). تا به حال نزدیک به ۲۰ ویروس بعنوان عامل بیماری در میگوها شناسـایی شده است که متعلق به Picornavirus، Baculovirs، Parvovirus و Toga like virus هسـتند. میزبان‌های مهم ویروس لکه سـفید میگوهای *P. monodon* , *P. japonicus*, *P. indicus*, *P. chinensis*, *P. mergueinsis*, *P. aztacus*, *P. stylirostris*, *L. vannamei*, *P. duorarum* , *P. setiferus* می‌باشـد. البته دیگر میگوهای وحشـی و آب شیرین و سخت پوسـتان نیز این ویروس را پنـاه می‌دهند (Karunasagar et al، ۲۰۰۴). ویروس لکه سـفید بافت‌های اپـی تلیوم زیر کوتیکولی، ارگان‌های لنفاوی، بافت خونسـاز، بافت همبند، تخمدان و طناب عصبی شکمی‌را آلوده می‌کند. از علایم اصلی این بیماری وجود لکه‌های سـفید به قطـر ۲-۰/۵ میلی متر، کم اشـتهایی، لاغری، از دسـت دادن کوتیکول و تغییر رنگ صورتی تا قرمز بدن می‌باشـد. از دیگر عوامل عفونی که باعث کاهش رشـد و تلفات سـنگین در میگوها می‌شود بیماری‌های باکتریایی می‌باشد که از مهمترین آنها میتوان به جنس ویبریو اشـاره نمود. ویبریوها بطور طبیعـی در محیط‌های آبی و یکی از مهمترین باکتری‌های دوره لاروی و پرورش میگو محسـوب می‌شوند. تا بحال حدود ۶۳ گونه ویبریو در محیط طبیعی شـناخته شـده که تعـداد زیادی ازآنها پاتـوژن اصلی عفونت میگو محسـوب می‌شـوند. ویبریوهایـی که بصورت گسترده در هچری‌های میگو، استخرهای پرورشی و رسوبات دیده می‌شوند شـامل , *V. anguillarum*, *V. penaeicida* , *V. splendidus* , *V. harveyi* , *V. alginolyticus* , *V. parahaemolyticus* و *V. vulnificus* هستند . برای مثال آلودگی با ویبریوهارویی سـبب بیماری سـندرم درخشـنده و تلفات سـنگین در مراحل لاروی میگوهای پرورشی در استرالیا، امریکای جنوبی، مکزیک و کشورهای آسیای جنوب شرقی شده است (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۵). مفهوم چند میکروبی (polymicrobial) در مورد حیوانات و انسان

خوب شناخته شده است اما در مورد آبزی پروری این موضوع و اثرات ناشی از آن همچنان در حال بررسی است. Phuoc etal، ۲۰۰۸ تلفات ناشی از آلودگی همزمان ویروس لکه سفید و باکتری *Vibrio campbellii* گزارش کرده است. حضور همزمان ویروس‌های WSSV، IHHNV و TSV در میگوهای وانامی‌در تایلند (LimsuWan، ۲۰۰۳) ویروس‌های WSSV، MBV و HPV در منودون در هند (Otta et al، ۲۰۰۳; Umesha et al، ۲۰۰۳) نیز گزارش شده است. همچنین محققین گزارش کرده‌اند که هر وقت آلودگی HPV، MBV و IHHNV در میگوهای منودون در هچریهای هندوستان مشاهده گردید آلودگی شدید به تک یاخته‌های زئوتامنیوم و باکتری‌های جنس ویبریو نیز بوفور جداسازی شد (Manivannan et al، ۲۰۰۲).

در تابستان ۱۹۹۳ بدلیل سندرم لکه سفید روی کاراپاس تلفات سنگینی در میگوی ژاپنی مشاهده گردید که بعد از بررسی‌های بعمل آمده از هپاتوپانکراس این میگوها ویبریو آلجینولیتیکوس جدا سازی گردید(Lee et al, ۱۹۹۶). همچنین تلفات سنگینی در میگوی منودون ناشی از بیماری لکه سفید و آلودگی همزمان با باکتری‌های ویبریو آلجینولیتیکوس وهارویی در همولنف و هپاتوپانکراس گزارش گردید (Sarathi et al، ۲۰۰۷).

در ایران گونه اصلی پرورش میگوی سفید هندی *P. indicus* بوده اما بعد از بروز بیماری لکه سفید در استان خوزستان در سال ۱۳۸۱ و در استان بوشهر در ۱۳۸۳، موسسه تحقیقات شیلات ایران گونه وانامی‌را به پرورش دهندگان معرفی نمود. لذا با توجه به ورود گونه جدید، با هدف شناسایی عوامل عفونی بخصوص ویروس لکه سفید و ارتباط آن با گونه‌های ویبریو این تحقیق صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

۳۶۰ قطعه میگوی پرورشی وانامی‌از ۶ استخر پرورش میگو در طول دوره پرورش سال ۱۳۸۷، هر دو هفته یک بار جهت انجام آزمایشات باکتری و ویروس شناسی مورد بررسی قرار گرفت. میگوها با روش PCR و با استفاده از ۲ کیت wssv Iq۲۰۰۰ و WIT Multivir (TSV-IHHNV-WSSV) مورد ردیابی ویروس لکه سفید قرار گرفتند.

همچنین از ۸۰ قطعه بچه میگو و میگوهای مولد، اندام‌های کوتیکول، آبشش و هپاتوپانکراس لام آسیب شناسی تهیه گردید.

روش نمونه برداری باکتری شناسی

جهت شناسایی ویبریوها در میگوهای کوچک، میگو بصورت هموژن ، و در میگوهای با وزن بیش از ۲ گرم از آبشش و هپاتوپانکراس با روش تلقیح بر روی محیط کشت مخصوص ویبریوها (TCBS+نمک) و با روش Pour plate استفاده و تعداد تقریبی باکتری‌های موجود در ۱ گرم نمونه محاسبه می‌شد.

جهت تشخیص باکتری‌ها از تست‌های بیوشیمیایی مرسوم و با استفاده از جداول موجود بر اساس منابع شناسایی می‌گردید (Buller، ۲۰۰۴).

روش کار تشخیص مولکولی ویروس

برای تشخیص عوامل ویروسی از دو نوع کیت IQ۲۰۰۰ (Farming IntelliGene Tech. Corp., Taiwan) یکی به صورت تشخیص جداگانه ویروس‌های WSSV و دیگری به شکل بررسی همزمان آنها در کیتی با نام WIT Multivir system ، که شامل مجموعه‌ای از روش‌های PCR، دات بلات و immunoassay می‌باشد، استفاده شد.

منبع بافت استفاده شده غالبا آبشش یا پای شنای میگو (دو قطعه) بوده است پس از استخراج DNA نمونه با استفاده از محلول استخراج موجود در کیت، کلروفرم و اتانول، پلت به دست آمده با مقدار متناسبی آب مقطر حل می‌شد. در این مرحله به منظور یکسان سازی اثر مقدار کمی DNA به کارگرفته شده در همه آزمایش‌ها، با کمک یک دستگاه اسپکتروفتومتر (Genova MK۲) غلظت هر یک از نمونه‌های به دست آمده اندازه گیری شده و به تجربه مشخص گردید که بهترین مقدار برای غلظت DNA مورد استفاده ۱۵۰ ng/µl می‌باشد. لذا برای هر نمونه در مرحله واکنش PCR غلظت متناسب تهیه و به کار گرفته می‌شد.

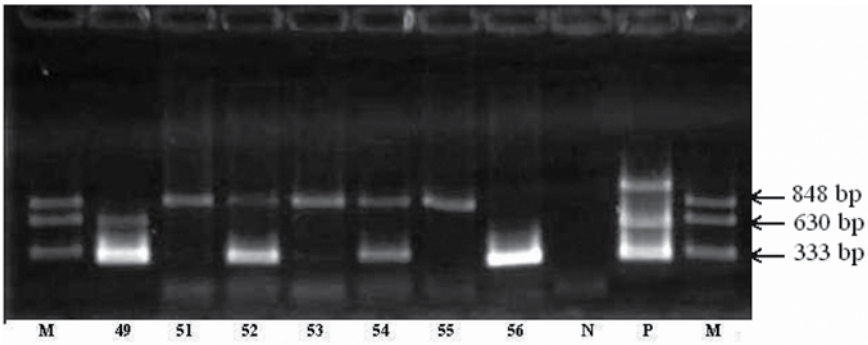
کلیه مراحل PCR در تیوبهای ۰/۲ میلی لیتری و با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر متعلق به شرکت Corbet (AUS) با چرخه‌های دمایی بر طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. پس از پایان واکنش PCR، در روش چند ویروسی با استفاده از یک چیپ تشخیصی و اجرای مراحل هیبریداسیون و رنگ آمیزی (بر اساس روش کیت) در نهایت یک سری نقاط سیاه رنگ بر روی آن ظاهر می‌شد و طبق روش ارائه شده در راهنمای کیت مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفت (شکل ۱). همچنین محصول به دست آمده در روش تشخیصی ویروس‌ها به صورت تکی، پس از رانده شدن در ژل ۱ تا ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، در دستگاه ژل داکیومنت (UVidoc) عکس برداری و نتایج آن ثبت می‌گردید. در صورتی که تنها باند ۸۴۸ bp ظاهر شده باشد بیانگر منفی بودن آن نمونه است زیرا این باند در واقع حاصل تکثیر شدن محدوده حاوی ژن بیماری مورد نظر می‌باشد یا همان باندی که به باند میگو معروف می‌باشد (House keeping gene). برای عامل بیماریزای WSSV در صورتی باند ۲۹۶ bp همراه یا بدون باند ۵۵۰ bp ظاهر شود نشانه مثبت بودن نمونه برای این بیماری است.

روش بافت‌شناسی

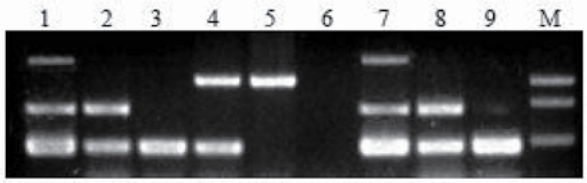
جهت تائید نمونه‌هایی که با روش PCR ردیابی ویروس‌ها انجام می‌گرفت از بافت کوتیکول،آبشش و هپاتوپانکراس همان میگوجهت انجام آزمایشات بافت شناسی نمونه برداری بعمل می‌آمد. نمونه‌های بافت با وسایل استریل جداسازی و در محلول دیویدسون نگهداری می‌شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌های بافتی از محلول دیویدسون خارج و در الکل ۷۰ درجه نگهداری می‌شدند. نمونه‌ها با دستگاه عمل آوری بافت (Tissue processor) آبگیری و سپس قالب‌گیری و بعد از آن توسط دستگاه برش بافت (Microtome) با ضخامت ۵ میکرون برش تهیه و بر روی لام تثبیت و سپس با ائوزین- هماتوکسیلین رنگ آمیزی و مونت می‌گردیدند.

نتایج

در این مطالعه از میگوهای کوچک (زیر ۲ گرم) که کل بدن آنها هموژن شده و بر روی محیط کشت تلقیح گردید، باکتریهای جنس ویبریو شناسایی شد. همچنین در میگوهای بالای ۲ گرم که امکان جداسازی آبشش و هپاتوپانکراس وجود داشت این بافت‌ها بطور مجزا مورد آزمایش



تصویر ۱- نمونه های ۴۹،۵۲،۵۴ و ۵۶ که آلوده به ویروس WSSV می باشند (بالا) و راهنمای تشخیص باندهای به دست آمده با توجه به استانداردهای کیت (پایین)



Lane 1: Sample of severe WSSV infection
Lane 2: Sample of moderate WSSV infection
Lane 3: Sample of light WSSV infection
Lane 4: Sample of very light WSSV infection
Lane 5: WSSV negative sample
Lane 6: Negative control (Yeast tRNA or ddH_2O)
Lane 7: WSSV P(+) standard, 2000 copies/reaction
Lane 8: WSSV P(+) standard, 200 copies/reaction
Lane 9: WSSV P(+) standard, 20 copies/reaction

قرار گرفت و در هر دو اندام باکتریهای جنس ویبریو توسط محیط کشت اختصاصی ویبریوها (TCBS) و تستهای بیوشیمیایی و تفریقی شناسایی شدند.

نتایج شمارش کل ویبریوها در میگوی هموژن شده(میگوهای کوچک زیر ۲ گرم) و اندامهای آبشش و هپاتوپانکراس نشان داد بافت هموژن شده میگو با تعداد (CFU/g) ۷/۵۷×۱۰^{۴}±۶/۰۹ بیشترین میزان باکتریهای جنس ویبریو و هپاتوپانکراس با تعداد (CFU/g) ۲/۵۷×۱۰^{۴}±۱/۰۳ کمترین میزان را در بین اندامهای مورد مطالعه داشته است (جدول شماره ۱).

بطورکلی با استفاده از دو روش کیت Iq۲۰۰۰wssv و WITmultivir و روش بافت شناسی ویروس WSSV در میگوهای وانامی‌شناسایی گردید. در بافت آبشش هیپرتروفی سلول‌های آبشش و مهاجرت کروماتین به طرف دیوار غشا و گنجیدگی‌های نوع coWdry type A مشاهده گردید. در بافت کوتیکول حالت متراکم بودن و ائوزینوفیلی بودن هسته مشاهده گردید. بطور کلی ۴۰ درصد میگوها با دو کیت تشخیصی آلوده به ویروس لکه سفید بودند که با روش آسیب شناسی بافتی نیز تایید گردید. (تصاویر ۱ الی ۵).

بحث

میگوی پاسفید غربی یکی از مهمترین گونه‌هایی می‌باشد که در کشورهای قاره امریکا پرورش داده می‌شود (Brock & Main، ۱۹۹۴). این گونه برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ و بصورت میگوی عاری از بیماری (specific pathogen free) به منظور تولید ازهاوایی به تایوان وارد گردید (Wyban، ۲۰۰۳). با ورود میگوی پاسفید غربی به کشورهای آسیای جنوب شرقی به منظور تنوع گونه‌ای، بطور معمول، صنعت آبزی‌پروری میگو تحت تاثیر آثار مثبت و منفی قرار داشته است. یکی از پیامدهای ناشی از معرفی این گونه به نقاط مختلف جهان، آلودگی ویروسی بوده که موجب خسارت‌های زیادی به مزارع پرورشی شده است (Weyban، ۲۰۰۳ ;Reantaso & et al، ۲۰۰۵).

اما دلایل قانع کننده‌ای وجود دارد که اغلب شیوع بیماری‌های اصلی با جابجایی میگوی زنده (مولد، ناپلی، پست لارو) و منجمد شده رابطه دارد (Lightner، ۲۰۰۴ Flegel, ۲۰۰۶، LimsuWan، ۲۰۰۳)

مفهوم چند میکروبی (polymicrobial) در مورد حیوانات و انسان خوب شناخته شده است اما در مورد آبزی پروری این موضوع و اثرات ناشی از آن همچنان در حال بررسی است. این آلودگی چند میکروبی می‌تواند بصورت باکتری- باکتری، ویروس – ویروس و یا باکتری – ویروس باشد. Selvin و همکاران (۲۰۰۳) عنوان نمودند که تلفات میگوهای منودون در هند که علایم بیماری لکه سفید را داشتند بعد از ضعیف شدن به باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس حساس شده بودند.

Phuoc و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۰۹) طی یک آزمایشی اثرات سینرژیستی بین *V. campbellii* و ویروس لکه سفید را ثابت نموده‌اند. آنها همچنین متوجه شدند که آلودگی همزمان میگوهای وانامی‌با ویروس لکه سفید و ویبریو باعث افزایش تلفات می‌گردد در صورتیکه میگوهایی که با ویبریو یا ویروس به تنهایی آلوده بودند تلفات بسیار کمتری را نشان دادند. آنها همچنین ویبریوهای مهم آلوده کننده میگوی وانامی را ویبریو آلجینولیتیکوس، انگوئیلاروم، پاراهمولیتیکوس، هارویی، پنائیسیدا و کامبلی در هچریها و در سیستم پرورش دانسته اند. در این مطالعه نیز میگوهایی که آلودگی شدید به ویروس لکه سفید بودند دارای تعداد بیشتری از ویبریو در بافت آنها مشاهده گردید.

Karunasagar و همکاران (۱۹۹۷ و ۱۹۹۹) و Mohan و همکاران (۲۰۰۲) میگوهای منودون آلوده به ویروس لکه سفید را که به گونه‌های ویبریو حساس شده بودند نیز گزارش کرده اند. George و همکاران (۲۰۰۶) نیز ثابت کرده‌اند که اگر میگوهای منودون با نژادهای بیماریزا ویبریوهای آلجینولیتیکوس،کامبلی،پاراهمولیتیکوس و بخصوص‌هارویی تزریق شوند علیه ویروس لکه سفید از خود مقاومت نشان خواهند داد. Lee و همکاران (۱۹۹۶) در تایوان نیز از همولنف میگوهای منودون آلوده به بیماری لکه سفید، ویبریو آلجینولیتیکوس جداسازی کرده‌اند این محققین تلفات ناشی

جدول ۱- تعداد کل ویبریو در اندام‌های مختلف

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

از همزمانی این باکتری و ویروس لکه سفید را بیشتر از میگوهایی دانسته اندکه به تنهایی به ویروس آلوده بودند.

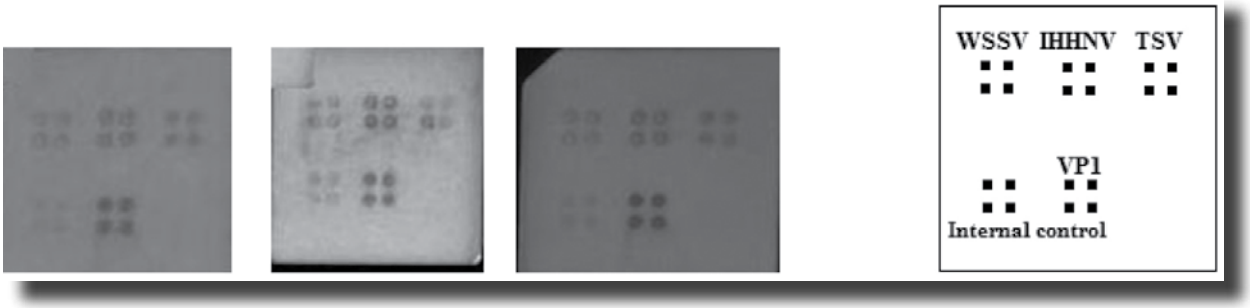
دراین بررسی نیز حضور باکتریهای جنس ویبریو در میگوهای آلوده به ویروس لکه سفید بیشتر از میگوهای سالم بود. در این مطالعه بیش از ۹۰ درصد میگوهای مورد آزمایش علاوه بر شناسایی ویروس لکه سفید به باکتریهای جنس ویبریو آلوده بودند. Sarathi و همکاران (۲۰۰۷) اظهار داشته‌اند که افزایش جمعیت ویبریو یا ناشی از عوامل محیطی یا آلودگی به ویروس‌ها بخصوص لکه سفید است و همچنین عنوان کرده‌اند که پاسخ ایمنی میگوی ایندیکوس به ویبریوها بسیارشدیدتر از پاسخ به ویروس لکه سفید است. Phuoc و همکاران (۲۰۰۹) آلودگی همزمان IHHNV و WSSV نیز در میگوی وانامی گزارش کرده است . در این مطالعه ۴۰ درصد میگوهای وانامی با روش PCR کیت تجاری و آسیب شناسی بافتی به ویروس WSSV آلوده بودند، ویروس در بافت‌های کوتیکول و آبشش مشاهده گردید. Jayasree و همکاران (۲۰۰۸) سندرم پوسته نرم Loose Shell Syndrome را در میگوی منودون ناشی از ویبریوهای هارویی، آلجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس، انگوئیلاروم، اسپلندیدوس و ولنیفیکوس دانسته است. از این میگوها نیز ویروس لکه سفید و MBV جدا شده است. Mishra و همکاران (۲۰۰۵) ویبریوهای آلجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس و آئروموناس را از میگوهای بیمار جدا کرده و به میگوهای سالم تزریق کردند ولی هیچگونه علایم بیماری مشاهده نکردند مگر اینکه با ویروس لکه سفید همراه باشد. Sung و همکاران (۲۰۰۱) نیز درابتدای سیستم پرورش منودون تغییرات گونه‌ای ویبریوی بسیار کمی را مشاهده کرده که با افزایش دوره پرورش تعداد و تنوع ویبریوها بخصوص ویبریو آلجینولیتیکوس افزایش یافته بود. در این تحقیق نیز بیشترین تنوع ویبریوها در انتهای دوره پرورش بوده است. همچنین در این تحقیق مشخص گردیدکه زمانی که ویروس لکه سفید به همراه ویروس سندرم تورا باشد تعداد ویبریوها در هپاتوپانکراس افزایش و به ۴/۹× ۱۰^۴ رسید این میگوها علایمی همچون لکه‌های سفید روی کاراپاس و قرمزی روی بدن آنها مشهود بود. Tendencia & Duleza (۱۹۹۷) ۵۹ درصد میگوهای منودون را که بدنشان قرمز بود را مشاهده کرد که آلوده به ویبریوهای پاراهمولیتیکوس، هارویی و فلاویالیس بودند. هنگامی‌که میگوهای سالم با ویبریوهای هارویی و پاراهمولیتیکوس تزریق شدند سندرم بیماری قرمز را نشان دادند.

بیش از ۱۷ گونه باکتری تا به حال از میگوی سفید هندی (*P. indicus*) و میگوی وانامی (*L. vannamei*) گزارش شده که ویبریوها بخصوص *V. anguillarum*، *V. alginolyticus* و *V. parahaemolyticus* از مهم ترین عوامل آلوده کننده باکتریایی بوده است(افشارنسب و همکاران ۱۳۸۵، سیدمرتضائی و همکاران ۱۳۸۱،۱۳۸۶، عابدیان و همکاران۱۳۸۶).

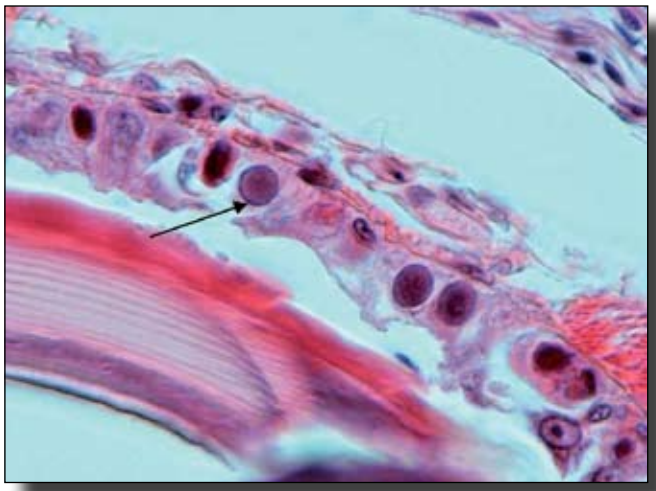
با توجه به اینکه بیماری لکه سفید در منطقه آبادان در سال‌های گذشته مشاهده گردیده است بنظر می‌رسد که این ویروس در میزبان‌های مخزن وجود داشته و با وجود شرایط استرس زا مانند افزایش شوری و عدم مدیریت مناسب در کارگاه‌های پرورشی که موجودات مزاحم به راحتی وارد استخرها می‌شوند افزایش ویبریوهای فرصت طلب و بروز بیماری لکه سفید را شاهد بوده ایم.

منابع مورد استفاده

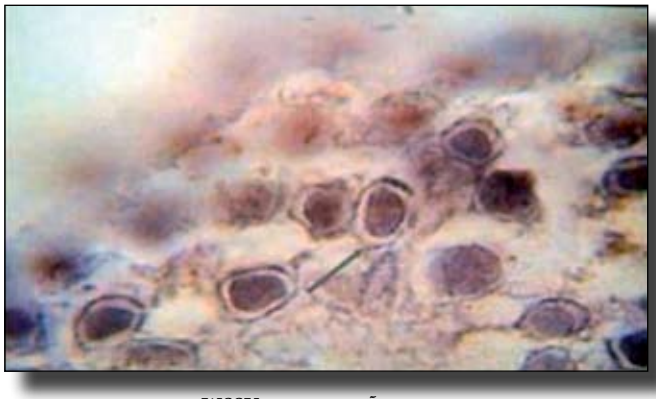
۱- افشار نسب، م. ۱۳۸۶. بیماری ویروسی میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۰ ص



تصویر۲ : شمایی از موقعیت هر کدام از ویروسها در چیپ همراه با کنترل داخلی (سمت راست)و آلودگی نمونه ها به سه ویروس WSSV,IHHNV,TSV (سمت چپ)



تصویر۳: آلودگی نمونه‌ها به ویروس WSSV



تصویر۴-کوتیکول آلوده به ویروس WSSV (۴۰۰×)

۲- افشـــار نسب، م.؛ س. ر. ســـید مرتضایی؛ غ. اسکندری؛ ن. م. کر؛ ا. جرفی و ف. لالویی. ۱۳۸۵. گزارش نهایی بررسی و تعیین منبع بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی منطقه آبادان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۵ ص

۳ -سید مرتضایی، س،ر. سبزعلیزاده؛ ع. ا. حجاری؛ ع. ا. جهانشاهی؛ ب. تمجیدی و ع. قـــوام پـــور. ۱۳۸۱. گزارش نهایـــی ارزیابی عوامل موثر بـــر تولید لارو میگو در کارگاههای تکثیر میگو استان خوزستان، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۶۳ ص.

۴ -سید مرتضایی، س،ر. و ن. م. کر؛ ۱۳۸۶؛ فلور باکتریایی و قارچی در کارگاههای تکثیر میگوی اســـتان خوزستان؛ سمینار ملی زیســـت شناسی؛ اردیبهشت ۱۳۸۶؛ ص: ۷۹

۵ - ســـیدمرتضایی؛ س. ر ؛ ن. م. کـــر؛ م. آهنگـــرزاده ؛ ح. هوشـــمند؛ ا. جرفی؛ م. افشارنســـب؛ ی. میاحی؛ س. عباسی؛ ف. کیان ارثی؛ س. سبزعلیزاده، م. مزرعاوی؛ ف. اســـماعیلی؛ س. دهقان؛ م. محمدی دوســـت؛ ع. قوام پور؛ ل. محسنی نژاد و ج. بنـــی طرفی زادگان. ۱۳۸۶. گزارش نهایی بررســـی وضعیت مدیریتی اســـتخرهای پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در چوئبده آبادان با تاکید بر عوامل عفونی و غیر عفونی. اداره کل شیلات استان خوزستان. ۱۰۵ ص.

۶ - عابدیان امیری. ا.،م. افشـــار نســـب؛ ا. اژدهاکش، م راد خواه. ۱۳۸۶. مروری بر وضعیت بهداشـــت و بیماریهای میگوی پرورشی سفید هندی *P. indicus* در استان سیستان و بلوچستان. مجله علمی شیلات ایران. شماره۴. زمستان ۱۳۸۶. صفحات ۱۰۷ تا ۱۲۰

7-Alapide – Tendencia, E. V. and Dureza, L. A., 1997. Isolation of Vibrio spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. Aquaculture, Vol. 154, No. 2, pp: 107 – 114.

8-Brock, A. J. and Main, K. L., 1994. A Guide to the common problems and disease of cultured *Litopenaeus vannamei*. The oceanic institute, Honolulu, Hawaii, USA, pp: 90–97.

9-Buller, N. B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI publishing. 361p.

10-Flegel, T. W., 2006. The special danger of viral pathogens in shrimp translocated to Aquculture. Science Asia, Vol.32, pp:215-221.

11-Flegel, T. W., 1997. Special topic review: major viral disease of the black tiger prawn (*P. monodon*) in Thailand. Microbiology and biotechnology, Vol: 13, pp: 33–442.

12-George, M. R., Maharajan, A., John, K. R. and Prince jeyasseelan, M. J., 2006. Shrimps survive white spot syndrome virus challenge following treatment with vibrio bacterin. Indian Journal EXP Biol., Vol. 44, No. 1, pp: 63 –67.

13-Jayasree, L., Janakiram P. and Madhavi R., 2008. Isolation and characterization of bacteria associated with cultured *Penaeus monodon* affected by loose shell syndrome. The Israeli journal of Aquaculture, Vol. 60, No. 1, pp: 46 – 56.

14-Karunasagar, I., Otta, K. S. and Karunasagar, I., 1997. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. Aquaculture, Vol. 153, pp: 9–13

15- Karunasagar, I., Karunasagar, I. and Umesha, R. K., 2004. Shrimp Health management in Asia: Microbial Diseases in shrimp. Aquaculture University of Aquaculture sciences, Mangalor, India, pp: 121–134.

16- Karunasagar, I. and I., Karunasagar, 1999. Diagnosis, treatment and prevention of microbial diseases of fish and shellfish. Current science, Vol. 76, No.3, pp: 387–399.

17- Lee, K. K., YU, S. R., Chen, F. R., yang, T. I. and Liu, P. C., 1996. Virulence of Vibrio alginolyticus isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. Current Microbiology, Vol. 32, No.4, pp: 229–31.

18- Lee, K. K., YU, S. R., Yang, T. I., Liu, P. C. and Chen, F. R., 1996. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonnicus*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 22, No. 2, pp: 111–4.

19- Limsuwan, C., 2003. Diseases of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thailand.The AAHRI newsletter , Vol. 12, No.1, pp:1-5.

20- Lightner, D.V. 2004. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSVand YHV: History in the Americas and current status Arizona, Tucson, USA, 20p.

21- Manivannan, S., Otta, S. K. and Karunansagar I., 2002. Multiple viral infection in *P. monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. Diseases of aquatic organisms. Vol. 48, pp: 233-236.

22- Mishra, S. S. and M. S., Shekhar, 2005. White spot syndrome virus isolates of tiger shrimp *Penaeus monodon* in India are similar to exotic isolates as revealed by polymerase chain reaction and electron microscopy. Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 43,No. 7, pp: 654–661.

23- Mohan, C. V., Corsin., F., Thakur, P. C., Padiyar, P. A., madhusudan, M., Turnbull, J. F., Hao, N. V., and Morgan, K. L., 2002. Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV) and chronic bacterial infection. Diseases of aquatic organisms, Vol. 50, No.1, pp: 1–8.

24- Noriega – orozco, L., Acedo – Felix, E., Higuera – Ciapara, I., Jimenez – Flores, R. and Cano, R., 2007. Pathogenic and non pathogenic vibrio species in aquaculture shrimp ponds. Microbiologia,Vol: 49, pp: 60–67.

25- 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. Aquacultare, Vol.160, pp:19-30.

26- Otta, S. K. and Karunasagar I., 2003. Detection of MBV and WSSV in apparently healthy *P. monodon* from India by PCR. Aquaculture, Vol. 220, pp:56-69.

27- Otta, S. K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) hatcheries in India. Applied Ichthyology, Vol:17, pp: 59–63.

28- Phuoc, L. H., Corteel, M., Cong Thanh, N., Nauwynck, H., Pensaert, M., Alday–Sanz, V., Vanden Broeck, W., Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2009. Effect of dose and challenge routes of vibrio spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. Aquaculture, Vol. 290, pp: 61–68.

29- Phuoc, L. H., Corteel, M., Nauwynck, H. j., Pensaert, M. B., Alday–Sanz, V., Vanden Broeck, W., Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2008. Increased susceptibility of white spot syndrome virus–infected Litopenaeus vannamei to *Vibrio campbellii*. Environmental Microbiology, Vol. 10, pp: 2718–2727.

30 - Reantaso, M. G. B., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan Z. and Shariff, M., 2005. Disease and health management in Asian Aquaculture.Veterinary parasitology, Article In press pp:25-47.

31- Sarathi, M., Ishaq Ahmed, V. P., Venkatesan, C., Balasubramanian, G., Prabavathy, J. and Sahul Hameed, A. S., 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Aquaculture, Vol. 271, pp: 8–20.

32- Selvin, J. and Lipton, A. P., 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white Spot disease of *Penaeus monodon*. Diseases of aquatic organisms, 57: 147 – 150

33- Sung, H. H., Hsu, S. F., Chen, C. K., Thng, Y. Y. and Chao, W., 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of vibrio communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. Aquaculture, Vol.192, pp: 101–110.

34- Tu, c., Huang, H. T., Chuang, S. H., Hsu, Y. P., Kuo, S. T., Li, N. Y., Hus, T. L., Li, M. C. and Lin, S.Y., 1999. Taura syndrome in pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. Diseases of aquatic organisms, Vol. 38., pp:159-161.

35- Umesha, R.K., Uma, A., Otta, S.K. and Karunasagar, I., 2003. Detection by PCR of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in hatchery reared *Penaeus monodon* postlarvae. Diseases of aquatic organisms, Vol. 57, pp:141-145.

36- Wyban, J., 2003. *Penaeus vannamei* seedstock production: recent developments in Asia. Global Aquaculture Advocate, pp: 78-79.