

# گزارشی از شیوع بیماری در کرم ابریشم‌های استان گیلان پلی‌هدروز در کرم ابریشم‌های استان گیلان

● بهروز قابوسی ● محمد خدانشناس ● ایرج امیرجلیوند، اعضا هیأت علمی مؤسسه تحقیقات رازی

## چکیده

در پی بروز یک بیماری در کرم ابریشم‌های استان گیلان با تلفات شدید و پس از نمونه‌برداری و مطالعه با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی و انجام آزمایشات تکمیلی پلی‌هدروز هسته‌ای و سیتوپلاسمی در لاروهای کرم ابریشم مشخص گردید. نوع هسته‌ای این ویروس که شکل میله‌ای دارد به مراتب فراوان‌تر از نوع سیتوپلاسمیک است که به شکل کره‌ای دیده می‌شود. ویروس پلی‌هدروز هسته در بافت پوششی، جربی، خون و نای لارو رشد نموده و پلی‌هدراهای ۱۲ و جهی ایجاد می‌نماید. مناسبانه هیچ نوع درمان خاصی برای این بیماری وجود ندارد و فقط ضد عفونی کردن بستر کرم‌های ابریشم تا حدودی از شدت بیماری می‌کاهد.

گردید. بخش روئی که بقایای پیکرهای لارو می‌باشد، را خارج نموده و رسوب حاصله در کف ارلن مایر با دور کم سانتریفوژ و از رسوب حاصله گسترش تهیه و پس از رنگ‌آمیزی به روش تریپان بلو و گیمسا با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. تعدادی گسترش نیز به طور مستقیم از مایع جاری شده از لاشه لاروها تهیه و رنگ‌آمیزی گردید.

## بررسی با میکروسکوپ الکترونی

جهت حل نمودن پروتئین‌های پلی‌هدر از محلول قلیائی کربنات سدیم استفاده شد. کربنات سدیم در رقت ۳٪ همراه با کلرورسدیم ۵ m<sup>o</sup> تهیه و به میزان یک میلی‌لیتر به ۵ میلی‌گرم پلی‌هدرا اضافه گردید و جهت حل شدن پلی‌هدراها به مدت ۲ ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت پس از این مدت حالت شیری رنگ محلول از بین رفته و به رنگ سفید مایل به آبی درآمد. مایع حاصله RPM ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جهت جدا نمودن ناخالصی‌ها سانتریفوژ شد و سپس در دور RPM ۱۵۰۰۰ و به مدت یک ساعت اولتراسانتریفوژ گردید، پس از خارج نمودن مایع رو لوله که پروتئین‌های حل شده پلی‌هدر می‌باشد، رسوب حاصله در ته لوله جهت بررسی شکل ویروس برداشت گردید. رسوب حاصله پس از رقیق شدن و تهیه گریدهای لازم با فسفوتنگستیک اسید ۳٪ رنگ‌آمیزی منفی گردیده و سپس با میکروسکوپ الکترونی فیلیپس ۴۰۰ در ولتاژ ۱۰۰ کیلوولت مورد مطالعه قرار گرفت.

## نتایج

در بررسی از گسترش‌های مستقیم و غیر مستقیم تهیه شده از لاروهای کرم ابریشم با میکروسکوپ نوری و درشت نمائی ۱۲۰۰ تعداد زیادی پلی‌هدرا به اشکال ۶ و جهی<sup>۹</sup> و کره‌ای مشاهده گردید. شکل پلی‌هدراها در حشرات از نظر شکل و اندازه متفاوت است به طوری که این تفاوت مربوط به نوع حشره بوده ولی در هر حشره

همانطور که از نام آن پیداست در داخل هسته سلول میزبان تکثیر پیدا نموده در حالیکه نوع سیتوپلاسمی این ویروس در داخل سیتوپلاسم سلول تکثیر می‌نماید. شکل ظاهری این دو دسته نیز تفاوت دارد به طوری که نوع هسته‌ای آن میله‌ای شکل بوده ولی نوع سیتوپلاسمی کره‌ای شکل می‌باشد.

هر دو نوع این ویروسها در کرم ابریشم<sup>۸</sup> بیماری شدید و کشنده ایجاد می‌نماید که برای اولین بار ویروسهای فوق در مناطق شمال کشور تشخیص داده شده است.

ابتدا در بهار سال جاری نگارندگان مقاله به استان گیلان عزیمت و از سنن اول و دوم لاروهای پرورشی نمونه‌برداری انجام داده و روی آنها بررسی انجام دادند و در اواخر بهار نیز به علت تلفات شدید بین کرم ابریشم‌ها از سنن چهارم و پنجم نیز نمونه برداری و مطالعات بیشتری انجام گردید.

## مواد و روشها

### علائم بالینی بیماری

لاروهای بیمار نسبت به سن خود دارای رشد کمتری بودند که به علت تغذیه کمتر و عدم اشتها می‌باشد. پوست بدن لاروها در سنن چهارم و پنجم متورم، بندبند و آپکی بوده و رنگ زرد جلب توجه می‌نمایند که در اثر کوچکترین تماس به سادگی پاره شده و مایع کدر شیری رنگی از آن‌ها خارج می‌گردد. در اثر تلف شدن لارو به سرعت رنگ لاشه به سیاهی متمایل می‌گردد و از لاشه متلاشی شده مایع سیاه رنگ و چسبنده‌ای خارج می‌گردد.

### بررسی با میکروسکوپ نوری

تعدادی از لاروهای تلف شده به قطعات کوچک تقسیم گردیده و در آب مقطر دوبار تقطیر شده و در داخل ارلن مایر قرار گرفتند و به مدت دو روز در حرارت آزمایشگاه نگهداری شدند و پلی‌هدراها به صورت لایه سفید رنگی در کف ارلن مایر به شکل رسوب مشاهده

## مقدمه

قبل از اینکه شرحی در مورد ویروس‌های حشرات و بیماری زائی آنها داده شود، لازم است نکاتی چند در این باره ذکر گردد. بیماری‌های ویروسی حشرات معمولاً در مرحله لاروی کشنده‌تر است، البته این نکته بدین معنی نیست که حشره بالغ به بیماری‌های ویروسی مبتلا نشده و سالم می‌ماند، بلکه حشرات بالغ به علت مقاومت طبیعی کمتر به بیماری‌های ویروسی مبتلا و تلف می‌گردند.

نشانه‌های بیماری‌های ویروسی معمولاً در مراحل آخر لاروی دیده می‌شود. این مسئله بخصوص در مورد بیماری پلی‌هدروز ویس حشرات کاملاً صدق می‌نماید. البته بایستی توجه داشت که بین آلودگی فعال<sup>۱</sup> و مخفی<sup>۲</sup> تفاوت زیادی وجود دارد، بدین معنی که در شکل مخفی علائم بیماری در لاروهای جوان مشاهده نشده و امکان انتقال ویروس از طریق تخم<sup>۳</sup> حشرات به نسل‌های بعد نیز وجود دارد، در حالیکه در شکل فعال ویروس به صورت افقی انتقال پیدا نموده و سبب بیماری می‌گردد.

به طور کلی ویروسهای حشرات بر خلاف مهره‌داران در یک پوشش پروتئینی منفرد قرار گرفته و هزاران ویروس در داخل توده‌ای پروتئینی قرار می‌گیرند که به آن پلی‌هدرا<sup>۴</sup> اطلاق می‌گردد.

با توجه به این نکته ویروسهای حشرات به دو دسته تقسیم می‌شوند. آنهایی که ایجاد گنجیدگی نموده و آنهایی که گنجیدگی تولید نمی‌نمایند که غالب ویروسهای حشرات در گروه اول قرار می‌گیرند.

آن دسته از ویروسها که گنجیدگی ایجاد می‌نمایند خود به دو دسته پلی‌هدراها و گرانولوزها<sup>۵</sup> تقسیم می‌شوند. اکثر ویروسهای حشرات در دسته پلی‌هدراها قرار دارند که در آنها تعداد زیادی ویروس در یک توده پروتئینی خاص قرار می‌گیرند در حالیکه در گرانولوزها یک یا به ندرت دو ویروس میله‌ای شکل در پوشش پروتئینی که گرانول نامیده می‌شود قرار دارند.

ویروسهای پلی‌هدروز خود به دو دسته هسته‌ای<sup>۶</sup> و سیتوپلاسمی<sup>۷</sup> تقسیم می‌گردند. نوع هسته‌ای ویروس



مشاهده گردیده است ولی فراوانی نوع هسته‌ای آن به مراتب بیشتر از سیتوپلاسمیک می‌باشد. به طوریکه در میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید نمونه‌هایی که از لاروهای تلف شده و به طور مستقیم و بدون سانتریفوژ تهیه گردیده‌اند حاکی از عیار خیلی بالای ویروس در لاشه کرمهای ابریشم تلف شده می‌باشد.

در لاروهای آلوده شده با ویروس نوع هسته‌ای پوست<sup>۱۲</sup>، سلولهای خون، چربیهای بدن و نای مورد تهاجم قرار گرفته در حالیکه غده مولد ابریشم کمتر به ویروس آلوده می‌شوند. دوره کمون بیماری از ۴ روز الی ۳ هفته تغییر می‌کند و لاروهای سن ۱ و ۲ بیماری در پوست مشاهده می‌شود، ظاهر پوست روغنی بوده و لکه‌های زرد رنگی در آن وجود می‌آید و به همین علت به این بیماری زردی<sup>۱۳</sup> هم گفته می‌شود و پوست لارو شکننده شده و به سادگی پاره می‌گردد و در پی آن مایعی که حاوی میلیونها پلی هدر است آزاد می‌شود. این حالت بیشتر در پلی هدر روز هسته‌ای مشاهده می‌شود. مشخصه دیگر این بیماری حرکت لاروها به بالاترین نقطه ممکن بوده که در آنجا تجمع یافته و به صورت واژگون آویزان می‌گردند. همانطور قبلاً نیز ذکر گردید محل تکثیر ویروس پلی هدر روز نوع هسته‌ای سلولهای میزبان است و پلی هدرها در هسته تکثیر یافته و در اثر رشد سبب پاره شدن هسته سلول میزبان گردیده و در پی آن ویروسها آزاد شده و وارد هموسل می‌گردند.

در روز پنجم آلودگی گنجیدگیهای کوچکی در سلولهای چربی، پوست، اپتیلیوم و نای مشاهده می‌گردند که احتمالاً این گنجیدگیها در آینده پلی هدرها را بوجود خواهند آورد.

در مواردی به علت حل نشدن غلاف پروتئینی ویروس به شکل دوکی مشاهده می‌گردد که مربوط به غلاف انفرادی ویروس است. به طوریکه در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌گردد زوائد خاص ویروس در این تصویر کاملاً مشهود می‌باشد.

در بررسیهای انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نوع دیگری از ویروس مشاهده گردید که پلی هدر روز سیتوپلاسمی می‌باشد که شبیه به ویروسهای مهره‌داران بوده و کروی شکل است.

ویروسهای پلی هدر روز سیتوپلاسمی معمولاً در سیتوپلاسم سلولهای دستگاه گوارش<sup>۱۱</sup> لارو رشد نموده و در اثر تخریب سلولهای دستگاه گوارش سبب ایجاد اختلاف در اعمال گوارشی لارو می‌گردند که در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌گردد.

شکل پلی هدرهای سیتوپلاسمیک در کرم ابریشم معمولاً کروی بوده و اندازه آن متفاوت می‌باشد و بستگی به زمان آغاز و ظهور علائم بالینی دارد به عبارت دیگر هر چه زمان آلودگی لارو به این ویروس پیش برود پلی هدرها در سیتوپلاسم سلولهای دستگاه گوارش بزرگتر شد و در مراحل نهایی بیماری حداکثر اندازه را پیدا می‌نمایند.

### بحث

بررسیهای انجام شده روی ویروسهای نوکلئو و سیتوپلاسمیک پلی هدر روز پس برای اولین بار وجود بیماری را در کرم ابریشمهای ایران تائید می‌نماید، در این بررسی هر دو نوع ویروس مولد بیماری پلی هدر روز

تقریباً ثابت می‌باشد. در کرم ابریشم متداولترین شکل پلی هدرها ۱۲ وجهی<sup>۱۰</sup> می‌باشد، در حالیکه در حشرات دیگر ممکن است ۳ یا ۴ وجهی بوده و در بعضی از موارد نیز اشکال هلالی شکل و یا نامنظم گزارش گردیده است. در بیماری پلی هدر روز هسته‌ای حشرات، معمولاً شکل پلی هدرها بسیار کمک کننده بوده و معرف ویروس مربوطه می‌باشد.

بنابر عقیده محققان مربوط به ویروسهای حشرات سلول میزبان نقش کنترل کننده شکل پلی هدرها را نداشته در حالیکه خود ویروس از این نظر نقش اساسی را به عهده دارد، به طوریکه با مشاهده شکل ظاهری پلی هدرها می‌توان به نوع ویروس مولد بیماری پی برد.

در بررسی از گسترشهای تهیه و رنگ آمیزی شده لاروهای کرم ابریشم به طور ظاهری ۶ وجهی مشاهده گردید ولی شکل اکثر پلی هدرها به صورت کروی بود علت این پدیده آن است که با میکروسکوپ نوری شکل ۱۲ وجهی پلی هدرهای هسته‌ای را به سختی می‌توان مشاهده نمود و در عمل شش گوش یا کروی شکل مشاهده می‌گردد که مربوط به طرز قرار گرفتن پلی هدرها روی لام پس از رنگ آمیزی می‌باشد.

پس از حل نمودن پروتئینهای ساختمانی پلی هدرها با مواد قلیائی و انجام سانتریفوژهای لازم شکل ظاهری ویروس مولد بیماری نیز بررسی گردید، در میکروسکپ الکترونی مقدار بسیار زیادی ویروسهای میله‌ای شکل مشاهده شد که در دو طرف آن برجستگی‌های خاصی مشاهده شود که با شکل کلاسیک ویروس پلی هدر روز پس هسته‌ای کاملاً مطابقت دارد.



مولد بیماری باکتری و یا ویروس یا میکروارگانیسم‌های دیگر باشد، ایجاد بیماری در میزبان حساس و به طور تجربی یا تزریق و یا خوردن مواد مشکوک حائز اهمیت است، چه فقط با رویت و یا جدا نمودن عامل مولد یک بیماری از یک میزبان نمی‌توان روی مثبت بودن آن تاکید نمود. بدین منظور مقدار قابل توجهی از لاروهای مرحله پنجم که در اثر این بیماری تلف شده‌اند در فریزر ۲۰- درجه نگهداری می‌شود تا در آینده مایعات موجود در بدن این لاروها به تعدادی لارو سالم خورانده و یا تزریق شود، چنانچه در صورت انتقال بیماری از طریق تجربی مثبت گردد در این صورت می‌توان نظریه قطعی در مورد بیماری را ابراز نمود.

از نظر مبارزه با بیماری ویروسی حشرات بایستی توجه نمود که اصولاً تاکنون داروی مناسبی جهت مبارزه و از بین بردن ویروس‌های حشرات در دسترس نمی‌باشد، بنابراین فقط می‌توان با ضد عفونی کردن بستر کرم‌های ابریشم تا حدودی از شدت بیماری کاست.

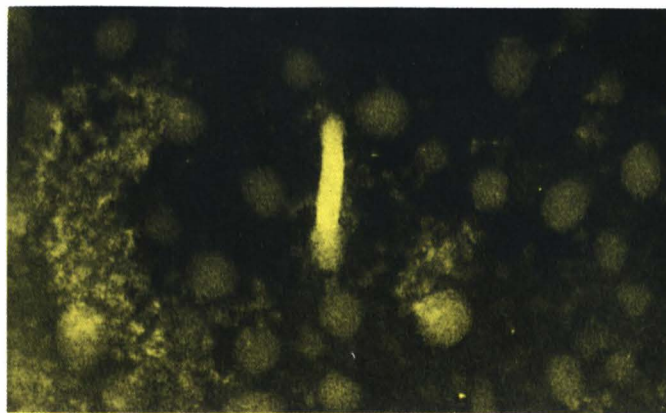
به منظور پیشگیری بیماری و تهیه واکسن با توجه به ناقص بودن سیستم ایمنی در حشرات اینکار در حال حاضر امکان پذیر نمی‌باشد لذا بایستی با انتخاب و پرورش نژادهای مقاوم در برابر ویروس از بروز بیماری جلوگیری نمود کمالات این عمل در حیوانات تکامل یافته‌تر انجام شده‌است.

#### پاورقی‌ها

- 1- Active
- 2- Latent
- 3- Transovarial spread
- 4- Polyhedra
- 5- Granulose
- 6- Nuclear polyhedrosis virus (NPV)
- 7- Cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV)
- 8- *Bombyx mori*
- 9- Hexagonal
- 10- Dodecahedral
- 11- Midgut
- 12- Epidermis
- 13- Jaundice

#### منابع مورد استفاده

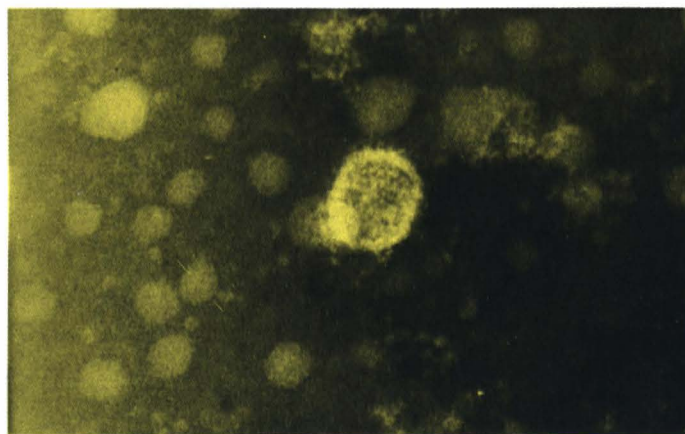
- 1- Kenneth, M. Smith, 1964. Insect Virology, Academic press.
- 2- Adams, J.R., Bonami, J.R., 1991. Atlas of Invertebrate viruses. CRC press.
- 3- Tanada, A. 1984. The cytopathology of baculovirus infections in insects (Insect ultrastructure) Vol. 3 plenum, New York.
- 4- Watanbe, H. 1974. Electron microscopic Investigation on dissolution of polyhedra in the gut juice of silkworm. J. Seric. Sci. JPN. 43, 29-34.
- 5- Watanabe, H. 1975. Variation in the number of nucleocapsid within the envelope of NPV multiplied in different tissues of the silkworm (*Bombyx mori*). J. Seric. Sci. Jan. 44, 497-498.



تصویر شماره ۱  
ویروس پلی‌هدروز  
هسته‌ای پس از  
رنگ آمیزی با P.T.A



تصویر شماره ۲  
شکل ویروس پلی‌هدروز  
هسته‌ای همراه با غلاف  
پروتئینی



تصویر شماره ۳  
شکل ویروس پلی‌هدروز  
سیتوپلاسمی در  
رنگ آمیزی منفی

دفع شده و محیط را آلوده می‌نمایند. در صورت باز نمودن لاروی که از پلی‌هدروزیس سیتوپلاسمیک تلف شده باشد در دستگاه گوارش آن به جای وجود محتویات سبز رنگ، رنگ زرد یا شیری مشاهده می‌گردد که علت آن تجمع بسیار زیاد پلی‌هدراها می‌باشند. در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک وجود پلی‌هدراهای فراوان در سیتوپلاسم سلولهای مخاط دستگاه گوارش مشاهده می‌گردند.

در پایان ذکر این نکته بسیار ضروری است که معمولاً برای تایید بیماری‌های عفونی اعم از اینکه عامل

وضعیت بیماری در اثر آلودگی کرم ابریشم با ویروس پلی‌هدروز سیتوپلاسمی تا حدودی متفاوت است، بطوریکه محل تکثیر این نوع ویروس در سلولهای دستگاه گوارش می‌باشد. در آغاز آلودگی با این ویروس در لارو علائم خاصی مشاهده نمی‌گردد ولی به علت عدم اشتها جنه لارو کوچکتر از حالت طبیعی است، سر لارو نسبت به تنه بزرگتر بوده و گاهی در مراحل مختلف بیماری تغییرات رنگی در روی پوست ظاهر گشته و لکه‌های سفید رنگی در ناحیه شکم نمایان می‌گردد. در مرحله نهانی بیماری پلی‌هدراها بوسیله مدفوع