ردیابی بیماری Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مراکز تکثیر و پرورش استان بوشهر

طلا قایدی[1]*؛ محمد افشار نسب[2]؛ عبدالمجید کوثری نژاد[3] و غلامحسین محمدی[4]

tghaedi@gmail.com

١- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات استان خوزستان، اهواز صندوق پستی: ١٦٣-٦١٥٥٥

٢-موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١١٦-١٤١٥٥

٣-اداره کل دامپزشکی استان بوشهر، بوشهر صندوق پستی:٧٥١٥٦١٥٧٣٣

٤- مرکز تحقیقات آبزی پروری جنوب کشور، اهواز صندوق پستی: ٨٦٦-٦١٦٤٥

تاریخ دریافت: تیر ١٣٨٩ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٨٩

چکیده

به منظور بررسی آلودگی میگوهای پاسفید غربی *Litopenaeus vannamei* به بیماری شبه پاروو ویروس هپاتوپانکراس Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) در استان بوشهر از ۶ مرکز تکثیر میگو در تیر ماه و ۶ مزرعه پرورش میگو در آبان ماه ۱۳۸۷ نمونه‌برداری بعمل آمد. از هر مرکز تکثیر ۱۰۰ عدد پست لارو ۵ تا ۱۵ روزه و از هر سایت پرورش ۲۰ تا ۳۰ عدد میگو با میانگین سنی ۱۰۵ تا ۱۲۰ روزه جمع‌آوری و به پژوهشکده میگوی کشور در بوشهر منتقل گردید. تعدادی از میگوهای جمع‌آوری شده برای مطالعات ظاهری و تهیه لام مرطوب با رنگ‌آمیزی گیمسا، تعدادی در محلول دیویدسون تثبیت و برای بررسی آسیب‌شناسی و تعدادی نیز در الکل ۹۵ درصد نگهداری و برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی ظاهری میگوهای پرورشی، ۳۰ تا ۴۰ درصد از میگوها اندازه کوچکتری از بقیه داشتند و نمونه‌های کوچکتر معمولاً دارای آبشش آلوده به ذرات گل و لای و حالت ملانیزه بودند. در لام مرطوب تهیه شده از هپاتوپانکراس میگوهای کوچک و رنگ‌آمیزی آن با گیمسا گنجیدگی‌های آبی رنگ در سلولهای اپی‌تلیال مجاری هپاتوپانکراس قابل رؤیت بود. در مقاطع آسیب‌شناسی و رنگ‌آمیزی H&E/Pheloxin گنجیدگی‌های آبی رنگ که از مشخصه‌های بیماری HPV می‌باشد در بافت هپاتوپانکراس کاملاً نمایان بود. در بررسی با PCR نتیجه منفی بود که احتمالاً ناشی از تفاوت سویه ویروس ایران با پرایمر طراحی شده کیت IQ2000 بود. میانگین درصد آلودگی به ویروس عامل بیماری HPV در میگوهای وانامی نمونه برداری شده از مراکزتکثیر ۱/۱ درصد و مزارع پرورش ۳۲ درصد تعیین گردید.

لغات کلیدی: میگوی پا سفید غربی، ویروس HPV، آسیب‌شناسی

*نویسندهٔ مسئول

مقدمه

افزایش تقاضا برای آبزیان و محدود بودن ذخایر دریایی موجب گردیده تا تولید آبزیان از طریق آبزی‌پروری بعنوان مهمترین راه تامین پروتئین مورد نیاز جمعیت رو به رشد جهان مورد توجه قرار گیرد (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۸). در سال ۲۰۰۷ میگوی پاسفید غربی (*L. vannamei*) با تولید ۲۲۹۶۶۳۰ تن (۷۰/۱ درصد) و ببری سیاه (*Penaeus monodon*) با ۵۸۹۸۸۸ تن (۱۸ درصد) سهم عمده‌ای در تولید جهانی دارا بوده‌اند (صالحی، ۱۳۸۸) .میزان میگوی تولید شده در جهان در سال ۲۰۰۸ بالغ بر ۳۲۸۱۲۵۳ تن گزارش شده که سهم میگوی وانامی از این مقدار ۹۰ درصد بود (Shatz, 2008). میزان تولید میگوی پرورشی در ایران از ۵۴ تن در سال ۱۳۷۳ به حدود ۹۰۰۰ تن در سال ۱۳۸۳ رسیده و در سال ۱۳۸۶ نیز ۲۴۰۰ تن بود. علت کاهش تولید، شیوع بیماری لکه سفید در استانهای بوشهر و خوزستان بوده است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۸). به‌رغم بکارگیری روشها و اقدامات پیشگیری کننده در آبزی‌پروری، بیماریها همواره وجود داشته‌اند و خسارات سنگینی بخصوص در اثر ابتلا به بیماری‌های ویروسی به پرورش‌دهندگان وارد آمده است (شاهسونی و پیغان، ۱۳۸۲). عوامل بیماری‌زای میگو بویژه ویروسها، بدنبال گسترش پرورش میگو انتشار پیدا کرده‌اند (Lightner, 1999a). Couch (۱۹۷۴) اولین بار ویروس باکلو ویروس پنایید را در میگوی صورتی از خلیج مکزیک گزارش نمود. بالغ بر بیست ویروس بیماری‌زا در میگوهای خانواده پناییده تاکنون شناسایی شده است (Lightner, 1999b). یکی از مهمترین بیماری‌هایی که در مراحل پست لاروی و جوانی میگوها را مبتلا می‌کند بیماری شبه پاروو ویروسی هپاتوپانکراس می‌باشد که توسط ویروسی از خانواده پاروو ویروسها ایجاد می‌شود (Lightner, 1996a). این بیماری اولین بار در میگوهای پرورشی سنگاپور گزارش گردید (Chong & Loh, 1984). این بیماری در سال ۱۹۸۷ در زمان انتقال میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) از کشورهای آسیایی به جنوب آمریکا منتقل گردید . از آن پس هر ساله این بیماری در میگوهای وحشی و پرورشی *L. styliorstris* و *L. vannamei* طول سواحل اقیانوس آرام (غرب مکزیک) و در *L. vannamei* وحشی السالوادور دیده شده است (Lightner, 1996a). بیماری از طریق مولدین، مدفوع، بافت آلوده و ذرات معلق در آب منتقل می‌شود. گزارشهای مختلفی بعد از سال ۱۹۸۷ از این بیماری و سویه‌های مختلف آن از آسیا، آفریقا، استرالیا و جنوب اروپا گزارش شده است. این بیماری همچنین از کشورهای چین، تایوان، کویت، ایران، عمان، فیلیپین، مالزی، سنگاپور، اسرائیل و ایتالیا نیز گزارش گردیده است (افشارنسب، ۱۳۸۶الف) بیماری مذکور در میگوهای جوان و بالغ گونه‌های *P. monodon*، *P. semisulcatus*، *P. indicus*، *P. esculantus* و *L. vannamei* گزارش گردیده است. این بیماری باعث بی‌اشتهایی، کندی رشد و کاهش اندازهٔ میگوهای مبتلا می‌گردد (افشارنسب، ۱۳۸۶الف). مهمترین اهمیت اقتصادی بیماری HPV کاهش وزنی است که در اثر این بیماری در میگوها اتفاق می‌افتد. اگر چه تصور بر این است که عفونت حاصل از ویروس HPV در استخرهای پرورشی مرگ و میر شدیدی را بدنبال نخواهد داشت اما مسایلی از قبیل کاهش رشد و کاهش تولید را به همراه خواهد داشت. مطالعات نشان می‌دهد که این ویروس برای پست لارو میگوها در خلال اولین ماه بعد از ذخیره‌سازی کشنده است (Flegel *et al.*, 1995) اما نتایج جدیدتر یک ارتباط منطقی قوی بین عفونت HPV و اندازه کوچک میگوها را نشان داده است (Flegel *et al.*, 2004). میگوهای به شدت آلوده شده با HPV به کندی رشد کرده و رشد آنها در طول تقریبی ۶ سانتیمتر متوقف می‌شود همچنین مشخص گردیده که میگوهای آلوده شده به HPV شامل گروههایی با کوچکترین اندازه هستند (Flegel, 2006). کاهش رشد میگوی آلوده به HPV ممکن است موجب کاهش برداشت ۳۰ تا ۴۰ درصد در مزارع پرورشی شده و خسارات اقتصادی سنگینی را به پرورش‌دهندگان وارد نماید. کاهش رشد میگو هم اندازه نمی‌باشد و ممکن است برخی از میگوها در استخر رشد کاملی داشته و برخی بدلیل مواجه با ویروس بیماری کاهش رشد نشان دهند. این پدیده مرتبط با وضعیت ایمنی میگو های مبتلا می‌باشد. برخی از میگو ها بدلیل برخورداری از سیستم ایمنی مطلوبتر، از وضعیت رشد بهتری برخوردار و برخی که ایمنی بالایی نداشته باشند، ویروس براحتی می‌تواند بر آنها اثر گذاشته و موجب کاهش رشد میگوها شود. استان بوشهر با دارا بودن ۶۳۵ کیلومتر مرز آبی از مهمترین مناطق تکثیر و پرورش میگو در کشور بوده و سالیانه بیش از ۵۰ درصد میگوی پرورشی در این استان تولید می‌شود. مهمترین شهرستان‌هایی که مراکز تکثیر و پرورش در آن مستقرند عبارت از: دیلم، گناوه، بندر ریگ، بوشهر، دلوار و دشتی

می‌باشد. با توجه به ورود گونه پاسفید غربی به کشور و پرورش آن در استانهای خوزستان و بوشهر در سطح وسیع، ضروری است درخصوص میزان شیوع این بیماری و میزان پراکندگی آن در سالنهای تکثیر و در مزارع پرورشی در استان بوشهر تحقیق جامعی صورت گرفته تا با شناخت مکانهای بروز بیماری بتوان با اعمال مدیریت لازم از مرگ و میر میگوها و خسارت‌های اقتصادی جلوگیری نمود. با توجه به اهمیت و جایگاه بیماری HPV در بیماریهای ویروسی میگو، این تحقیق طی سال ١٣٨٧ در استان بوشهر برای ردیابی بیماری HPV در مراکز تکثیر و مزارع پرورشی استان بوشهر با روش لام مرطوب، آسیب شناسی و PCR و نیز تعیین شیوع آن و در نهایت ارائه برنامه کنترل و پیشگیری از بیماری HPV انجام گردیده است.

مواد و روش کار

طی سال ١٣٨٧ در استان بوشهر ۶ مرکز فعال تکثیر میگوی وانامی وجود داشت، لذا نمونه‌گیری از تاریخ ۴ تیر ماه ١٣٨٧ تا ١۶ تیر ماه ١٣٨٧ از این مراکز انجام گرفت (جدول ١). نمونه‌گیری از ۵٠ درصد تانکها در هر مرکز انجام گرفت. نمونه‌های تهیه شده از هر تانک از وسط و چهارگوشه تانک بود.

همچنین ۵٠ درصد استخرها از ۶ سایت فعال پرورش میگوی وانامی در استان بوشهر مورد بررسی قرار گرفتند که تاریخ نمونه‌گیری آنها از ١٢ آبان ماه تا ١۵ آبان ماه ١٣٨٧ انجام گرفت. صید میگوها با استفاده از تور پرتابی و از کنارهای استخرها انجام گرفت و آنهایی که دارای ظاهر غیرطبیعی بودند برای نمونه‌برداری انتخاب شدند. وزن و سن میگوها، تراکم ذخیره‌سازی و شوری استخرها ثبت شد و هر دسته از نمونه‌ها در روز جمع‌آوری بصورت زنده یا پس از تثبیت کردن در محل به آزمایشگاه بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان پژوهشکده میگوی کشور منتقل شدند. اطلاعات مربوط به نمونه‌گیری از سایت‌های فعال پرورش میگوی وانامی در استان بوشهر در سال ١٣٨٧ در جدول ٢ ذکر شده است.

تمامی نمونه‌ها را به سه دسته تقسیم نموده یکدسته برای مطالعات ظاهری، تهیه لام مرطوب و رنگ‌آمیزی با گیمسا بصورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند (Lightner, 1996a). برای تهیه لام مرطوب از بافت هپاتوپانکراس استفاده شد. دسته دوم د به منظور مطالعات آسیب‌شناسی ر محلول تثبیت کننده دیویدسون براساس روش (Bell & Lightner, 1998) و دسته دیگر در الکل اتیلیک ۹۵ درصد برای انجام آزمایشهای مولکولی PCR قرار داده شد (افشارنسب، ١٣٨۶ب). به منظور مطالعات آسیب‌شناسی از قسمت سفالوتراکس و بافت هپاتوپانکراس و برای انجام آزمایشهای مولکولی PCR تمام بافتهای بدن میگو مورد استفاده قرار گرفت. شدت عفونت بافتی بیماری HPV بطور خلاصه در جدول ٣ بصورت درجات صفر تا ۴ تقسیم‌بندی شده است. مطالعات آماری در این تحقیق براساس ارتباط بروز بیماری HPV با سن میگوها و همچنین با مناطق جغرافیایی مختلف در استان بوشهر انجام گردید.

جدول ١: اطلاعات مربوط به نمونه‌برداری از مراکز تکثیر میگوی وانامی در استان بوشهر در سال ١٣٨٧

نام مراکز تکثیر	تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده	سن نمونه‌ها
مرکز شماره ١ (شهرستان تنگستان)	١٠٠ عدد پست لارو	PL8
مرکز شماره ٢ (شهرستان تنگستان)	١٠٠ عدد پست لارو	PL15
مرکز شماره ٣ (شهرستان تنگستان)	١٠٠ عدد پست لارو	PL5-PL6
مرکز شماره٤ (شهرستان تنگستان)	١٠٠ عدد پست لارو	PL5-PL6
مرکز شماره ٥ (شهرستان تنگستان)	١٠٠ عدد پست لارو	PL6
مرکز شماره ٦ (شهرستان تنگستان)	١٠٠ عدد پست لارو	PL5

جدول ۲: اطلاعات مربوط به نمونه‌برداری از مزارع پرورشی میگوی وانامی در استان بوشهر در سال ۱۳۸۷

نام سایت پرورشی	تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۵۰ درصد استخرها و مزارع مورد بررسی	سن نمونه‌های جمع‌آوری شده	میانگین وزن نمونه‌های جمع‌آوری شده	میانگین شوری در هر سایت	تراکم ذخیره‌سازی در هکتار
بندر ریگ	۲۲ نمونه	۱۱۰ روزه	۳±۱۵ گرم	۳±۴۹ppt	۲۵۰ هزار عدد
رودشور	۲۰ نمونه	۱۲۰ روزه	۳±۱۵ گرم	۳±۴۹ ppt	۲۵۰ هزار عدد
رود حله	۲۰ نمونه	۱۱۲روزه	۳±۱۶ گرم	۳±۴۳ ppt	۲۰۰ هزار عدد
شیف	۲۰ نمونه	۱۱۰ روزه	۳±۱۷ گرم	۳±۴۳ppt	۲۰۰ هزار عدد
دلوار	۳۰ نمونه	۱۰۵ روزه	۳±۱۶ گرم	۳±۴۳ppt	۲۰۰ هزار عدد
مند	۲۵ نمونه	۱۰۵ روزه	۳±۱۸ گرم	۳±۴۳ppt	۲۰۰ هزار عدد

جدول ۳: بررسی شدت عفونت بیماری HPV (Lightner, 1996a)

پیش‌بینی یا نتیجه بیماری	* تعداد تقریبی گنجیدگی‌ها (با عدسی ۴۰ میکروسکوپ)	شدت عفونت بافتی
عدم وجود عفونت	عدم وجود	صفر
متغیر	۱-۵/۲۰۰	۱
متغیر	۱-۲/۲۰	۲
حاد	۱-۵/۲	۳
کشنده	بیشتر از ۱۰عدد در زمینه میکروسکوپ	۴

*تعداد تقریبی گنجیدگی‌ها در فیلد ۴۰ از میکروسکوپ

برای تشخیص بیماری به روش لام مرطوب، سر میگوها از بند اول بدن جدا و هپاتوپانکراس آنها خارج گردید. از بافت برش داده شده گسترش تهیه شد و در متانول به مدت ۶ دقیقه ثابت و سپس در معرض هوا خشک گردید. نمونه‌های مشکوک به بیماری از مراکز تکثیر و مزارع پرورشی جمع‌آوری و در محلول دیویدسون تثبیت شدند. نمونه‌های پست لارو مستقیماً در محلول تثبیت کننده به مدت ۲۴-۱۲ ساعت نگهداری شدند. نمونه‌های بزرگتر از ۱۰ سانتیمتر، ابتدا ماده تثبیت کننده در هپاتوپانکراس و سپس در بندهای سوم و ششم آنها تزریق شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲-۲۴ ساعت براساس اندازه میگوها در محلول تثبیت کننده قرار گرفته و سپس به الکل ۷۰-۵۰ درصد منتقل شدند. پس از ثابت کردن نمونه‌ها، از دستگاه خودکار آماده‌سازی بافتی برای عمل‌آوری آنها استفاده گردید. سپس مقاطع ۶-۳ میکرونی از بافت‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار تهیه شد و با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین/فلوکسین رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند (Bell & Lightner, 1998).

برای تشخیص بیماری به روش آزمایشات مولکولی PCR، پس از اخذ نمونه‌ها DNA آنها با روش DTAB و CTAB استخراج گردید و مورد آزمایش PCR تک مرحله‌ای براساس

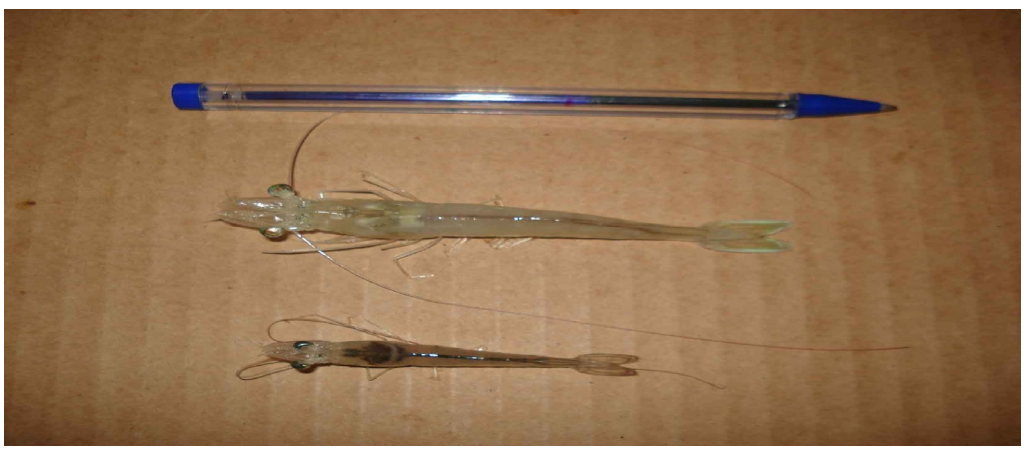
کیت IQ2000 ™ Single قرار گرفت. در نهایت نتایج نمونه‌ها با کنترل‌های مثبت مقایسه گردید.

نتایج

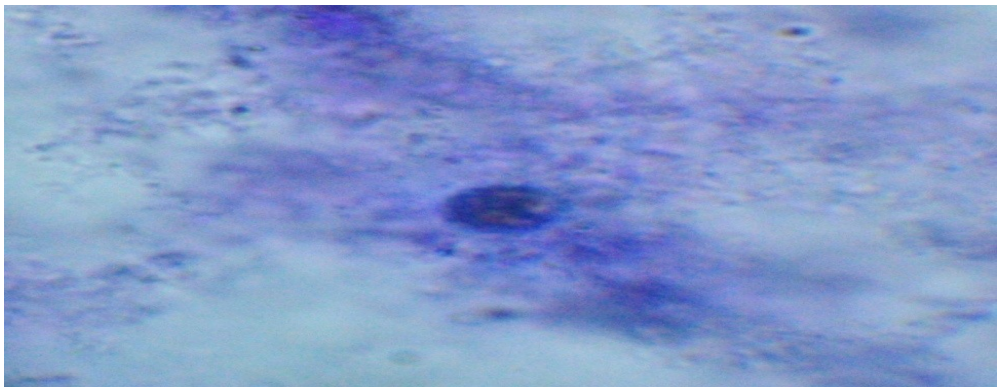
یافته‌های آسیب‌شناسی با میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد اندامی که مورد هجوم ویروس قرار گرفته هپاتوپانکراس می‌باشد. در ابتدای بیماری، سلولهای آسیب دیده دارای هیپرتروفی هسته بوده و هستک‌ها در هسته جابجا شده و به نزدیکی غشاء هسته مهاجرت نموده‌اند. همچنین مهاجرت کروماتین و ایجاد گنجیدگیهای بازوفیلیک داخل هسته در سلولهای هپاتوپانکراس بخصوص E-cellها مشاهده شد.

تمامی نمونه‌های صید شده مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. در بررسی ظاهری میگوهای پرورشی، ۳۰ تا ۴۰ درصد از میگوها اندازه کوچکتری از بقیه داشتند و نمونه‌های کوچکتر معمولاً دارای آبشش آلوده به ذرات گل و لای و حالت ملانیزه داشتند. در مشاهده میگوهای مورد آزمایش در مراکز مورد نظر علائم ظاهری بیشتر شامل کاهش رشد، بی‌اشتهایی و کاهش تمایل به غذا بود و همچنین هپاتوپانکراس میگوها کوچک شده و رنگ آنها به روشن تا قهوه‌ای قرمز تغییر یافته بود. (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی نمونه میگوهای صید شده از مراکز تکثیرو مزارع پرورشی نشان داد که پس از رنگ‌آمیزی گیمسا و سپس مشاهده با میکروسکوپ نوری، گنجیدگیهای سلولی بصورت متراکم و آبی رنگ در سلولهای اپی‌تلیال مجاری هپاتوپانکراس قابل رؤیت بود (شکل ۲).

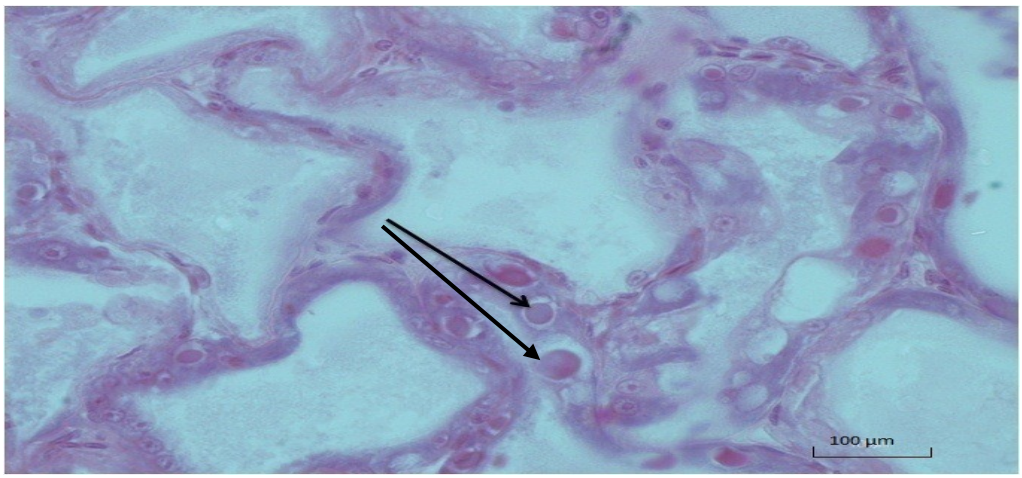
یافته‌های آسیب‌شناسی با میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد اندامی که مورد هجوم ویروس قرار گرفته هپاتوپانکراس می‌باشد. در ابتدای بیماری، سلولهای آسیب دیده دارای هیپرتروفی هسته بوده و هستک‌ها در هسته جابجا شده و به نزدیکی غشاء هسته مهاجرت نموده‌اند. همچنین مهاجرت کروماتین و ایجاد گنجیدگی‌های بازوفیلیک داخل هسته در سلولهای هپاتوپانکراس بخصوص E-cellها مشاهده شد. گنجیدگی‌ها از ابعاد بسیار کوچک قرمز رنگ که به دیواره غشاء هسته چسبیده‌اند تا خیلی بزرگ و گرد و آبی رنگ که تمام فضای داخلی هسته را اشغال کرده‌اند قابل مشاهده بودند. گاهی مواقع اطراف گنجیدگی‌ها هاله روشن و شفافی مشاهده می‌شد. همچنین در پاره‌ای از سلولها هستکها به گوشه‌ای از سلول فشرده شده و حالت ستیغ پیدا نموده است (اشکال ۳ و ۴).



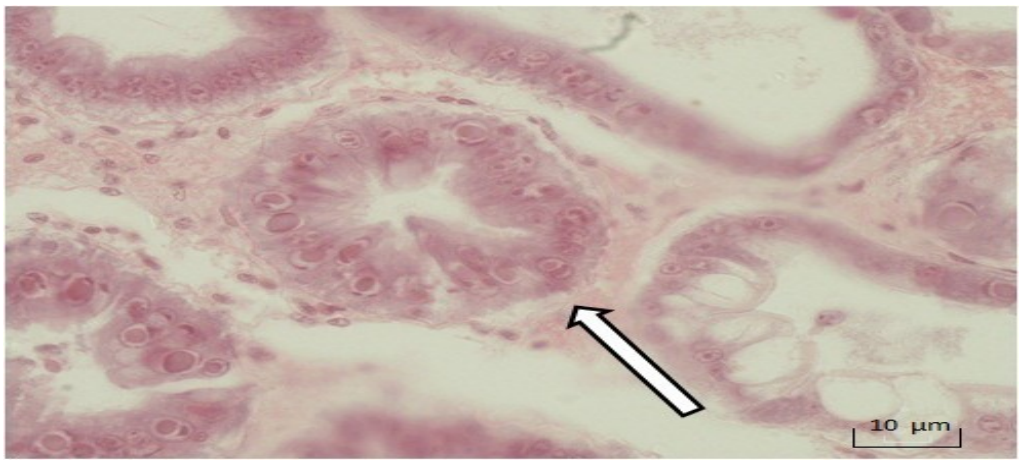
شکل ۱: میگوهای آلوده به HPV که از نظر ظاهری دارای اندازه‌های مختلف می‌باشد.



شکل ۲: وجود گنجیدگی‌های سلولی در بافت هپاتوپانکراس میگوی وانامی در لام مرطوب (Giemsa, X٤٠٠)



شکل ۳: گنجیدگی‌های بازوفیلیک HPV در سلولهای هپاتوپانکراس میگوی وانامی پیکانها (H&E/Pheloxine, Bar: 100µm)

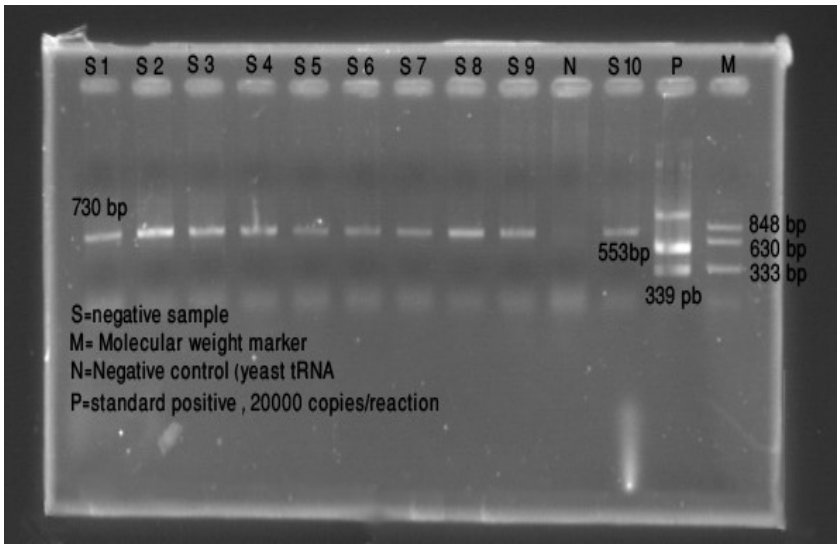


شکل ٤ : مشاهده یک لوب بافت هپاتوپانکراس آلوده به بیماری HPV در میگوی وانامی(پیکان) که گنجیدگی‌های بازوفیلیک بیشتر سلولها را از حالت طبیعی خارج نموده است. حالت طبیعی سلولها حالتی است که سلول فاقد گنجیدگی و هسته، هستک و سیتوپلاسم کاملاً مشخص باشند (H & E/Pheloxine, Bar: 10µm).

در آزمایش میگوهای مشکوک به بیماری HPV با روش PCR و با استفاده از کیت تشخیصی به نام IQ2000 ™ Single مشخص گردید که میگوهای آلوده به بیماری HPV با این کیت قابل شناسایی نمی‌باشند چون روش کار PCR کاملاً اختصاصی است و پرایمر موجود در این کیت، با ویروس HPV ایجاد کننده بیماری در ایران همخوانی نداشت (شکل ۵). از آنجایی که تمام نمونه‌های مورد آزمایش باندهایی با وزن ۷۳۰bp را تشکیل دادند که به ظاهر نشانهٔ منفی یا عاری بودن از ویروس بود. در صورتیکه اگر نمونه‌ها باندهایی را هم‌ردیف با کنترل مثبت (p) یعنی در ۳۳۹bp تشکیل می‌دادند، نشان‌دهندهٔ وجود ویروس در میگو بود.

براساس علایم ظاهری، مشاهده لامهای مرطوب و آسیب‌شناسی، نتیجه این بررسی نشان می‌دهد که تنها در دو مرکز تکثیر واقع در شهرستان تنگستان (شماره‌های ۱ و ۲)، بیماری در مراحل لاروی وجود داشت. در مزارع پرورشی سطح استان که شامل مناطق بندرریگ، رود شور، رود حله، شیف، دلوار و مند بود طبق بررسی‌های انجام شده این بیماری مشاهده گردید. نتیجه بررسی مراکز تکثیر و درصد آلودگی و شدت بیماری ویروسی HPV در جدول ۴ آمده است. نتیجه بررسی مزارع پرورشی و درصد آلودگی و شدت بیماری ویروسی HPV در جدول ۵ آمده است: در این مطالعه مشخص شد که درصد آلودگی به بیماری HPV در میگوهای نمونه‌برداری شده در منطقه رود شور نسبت به مناطق دیگر بیشتر است و منطقه دلوار کمترین درصد آلودگی را داشت.

بطور کلی بررسی شدت بیماری (severity of infection) یا (SOI) نیز بیانگر این موضوع است که میگوهای منطقه بندر ریگ و رود شور از شدت بیماری بیشتری (درجه ۳) نسبت به سایر مناطق برخوردارند و میگوهای سایر مناطق از لحاظ شدت بیماری مشابه بودند (درجه ۲).



شکل ۵: تصویری از ژل که نمونه‌های مورد آزمایش باندهای ۷۳۰bp را تشکیل داده‌اند. کنترل مثبت، کنترل منفی و مارکر در تصویر نشان داده شده است.

جدول ٤: درصد آلودگی و شدت بیماری HPV در میگوی وانامی در مراکز تکثیر استان بوشهر در سال ۱۳۸۷

ردیف	نام مرکز	تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده	تعداد نمونه‌های مثبت	درصد آلودگی	شدت بیماری	ملاحظات
۱	مرکز شماره ۱	۱۰۰	۳	۳	درجه۳	_
۲	مرکز شماره ۲	۱۰۰	٤	٤	درجه۲	_
۳	مرکز شماره ۳	۱۰۰	_	_	_	بیماری مشاهده نشد
٤	مرکز شماره ٤	۱۰۰	_	_	_	بیماری مشاهده نشد
٥	مرکز شماره ٥	۱۰۰	_	_	_	بیماری مشاهده نشد
٦	مرکز شماره ٦	۱۰۰	_	_	_	بیماری مشاهده نشد

جدول ٥: درصد آلودگی و شدت بیماری HPV در میگوی وانامی در مزارع پرورشی استان بوشهر در سال ۱۳۸۷

ردیف	نام سایت	تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده	تعداد نمونه‌های مثبت	درصد آلودگی	شدت بیماری
۱	بندر ریگ	۲۲	۱۲	٥٤	درجه۳
۲	رود شور	۲۰	۱۲	٦۰	درجه۳
۳	رود حله	۲۰	۷	۳٥	درجه۲
٤	شیف	۲۰	۷	۳٥	درجه۲
٥	دلوار	۳۰	۳	۱۰	درجه۲
٦	مند	۲٥	۳	۱۲	درجه۲

جدول ٦: میانگین درصد آلودگی به بیماری HPV در میگوهای وانامی نمونه‌برداری شده از مراکز تکثیر و مزارع پرورش استان بوشهر در سال ١٣٨٧

مراکز نمونه‌برداری شده	میانگین درصد آلودگی به بیماری HPV در میگوهای نمونه برداری شده از استان بوشهر
مراکز تکثیر استان بوشهر	١/١ درصد
مزارع پرورشی استان بوشهر	٣٢ درصد

بحث

براساس نتایج حاصل از بررسی‌های ظاهری، مطالعه لام‌های مرطوب رنگ‌آمیزی شده با گیمسا و آسیب‌شناسی، حضور ویروس عامل بیماری HPV در میگوهای وانامی پرورشی در مراکز تکثیر و پرورش استان بوشهر تائید گردید. درصد آلودگی میگوها به این بیماری در مزارع پرورشی (٣٢ درصد) و در مراکز تکثیر (١/١ درصد) بود. این موضوع بیان کننده آن است که وجود بیماری در مراکز تکثیر کمتر بوده یا اینکه ویروس در پست لاروها بصورت مخفی بوده و با روشهای مرسوم قابل تشخیص نمی‌باشد. Lightner (١٩٩٦) این ویروس را در میگوهای دریایی منطقه کویت نیز گزارش نموده است. همچنین این ویروس در میگوهای منطقه استرالیا، آسیا، آفریقا و آمریکای شمالی نیز گزارش شده است (Lightner, 1996a) همانگونه که Chang و همکاران (١٩٩٦) اعلام داشته‌اند بمنظور تشخیص HPV در مراکز تکثیر و بخصوص در مولدین لازم است که تکنیکهای اختصاصی (پرایمر اختصاصی، آنتی ژنهای خاص یا real time PCR) جهت تشخیص این ویروس طراحی شود. براساس گزارش Lightner (١٩٩٦a) و Flegel (٢٠٠٦) و نتایج حاصل از این تحقیق، عامل ایجاد کننده بیماری روی سلولهای اندوتلیال هپاتوپانکراس بخصوص E-cell تاثیر می‌گذارد و با توجه به اینکه این سلولها منشاء تولید آنزیمهای ترشحی سیستم گوارشی می‌باشند، یکی از دلایل کاهش رشد در میگوها احتمالاً بدلیل مشکلات ناشی از اختلال در سیستم گوارشی می‌باشد که موجب کاهش رشد در آنها می‌شود. طبق مطالعه انجام شده در این تحقیق کاهش وزن میگوها در سایت‌های رود شور (١٥±٣ گرم) و بندر ریگ (١٥±٣ گرم) نسبت به دیگر سایتهای پرورشی مشخص می‌باشد. کاهش وزن ایجاد شده کاهش تولید کل را در پی‌داشته و از لحاظ اقتصادی ضرر هنگفتی برای پرورش‌دهندگان خواهد داشت. در نتیجه این مطالعه مشخص شد که یک ارتباط معنی‌داری بین مکان جغرافیایی سایت‌های پرورشی استان بوشهر و درصد آلودگی و شدت بیماری HPV وجود دارد و میگوهای مشکوک به بیماری HPV در مزارع پرورشی منطقه رود شور و بندر ریگ نسبت به مناطق دیگر دارای درصد آلودگی بالاتری بودند، از لحاظ وزنی دارای وزن کمتری بود (١٥±٣ گرم) و کاهش وزن در آنها مشاهده شده است. همچنین در این مناطق بیماری از شدت بالاتری برخوردار می‌باشد که این دو مورد شاید بی‌ارتباط با همدیگر نباشند. این نکته حائز اهمیت است که سایت‌های رود شور و بندر ریگ از بین سایت‌های فعال پرورش میگوی استان از نظر موقعیت جغرافیایی در غربی‌ترین نقطه استان قرار گرفته‌اند. سایت‌های پرورشی دلوار و مند دارای پایین‌ترین درصد آلودگی و شدت بیماری بوده و از لحاظ موقعیت جغرافیایی جزء شرقی‌ترین سایت‌های پرورش میگو در استان بوشهر می‌باشند. اغلب بیماری‌های میگو در اثر افزایش تراکم در مزارع پرورشی بروز می‌کند (Lightner, 1996b). شدت بیماری HPV با افزایش تراکم و ایجاد استرس، افزایش پیدا می‌کند (مجیدی‌نسب، ١٣٧٧). در مزارع پرورشی منطقه بندر ریگ و رود شور در سال ١٣٨٧ طبق اطلاعات دریافت شده از اداره شیلات استان بوشهر، دارای تراکم بالای ذخیره‌سازی در مزارع پرورشی نسبت به دیگر سایت‌های پرورشی بودند که این امر می‌تواند یکی از دلایل درصد آلودگی و شدت بالاتر بیماری نسبت به مناطق دیگر باشد. تراکم ذخیره‌سازی در این مناطق ٢٥٠ هزار عدد در هکتار و در مناطق دیگر ٢٠٠ هزار عدد بود. یکی از نکات دیگر که می‌تواند دلیل آلودگی بالای بیماری در این منطقه باشد، درصد شوری بالاتر آب نسبت به مناطق دیگر است. زیرا شوری بالا خود عاملی جهت ایجاد استرس بیشتر در میگوها می‌باشد. طبق اطلاعات دریافت شده از مراکز مذکور میانگین شوری حدود ٤٩ppt بوده در حالیکه شوری در مناطق دیگر بطور میانگین ٤٣ppt بوده است. در مطالعات صورت گرفته بمنظور تشخیص دقیق بیماری با روش PCR وجود ویروس

ایجادکننده بیماری در منطقه با استفاده از کیت IQ2000 ™ Single تایید نشد. این نتیجه نمی‌تواند بیانگر عدم وجود ویروس در منطقه باشد زیرا ویروس HPV در مناطق مختلف دارای سویه‌های مختلفی می‌باشد و این احتمال وجود دارد که پرایمر مورد استفاده کیت مصرفی با روش PCR نتواند این سویه را تشخیص دهد و بعبارت دیگر پرایمر طراحی شده با سویه ایران همخوانی و قرابت نداشته باشد. گزارش تهیه شده توسط Felegel (۲۰۰۶) از آنالیز سکانس DNA ویروس بیان می‌کند که انواع جغرافیایی مختلفی از HPV وجود دارد.. بعنوان مثال ژنوم ویروس HPV از میگوی *P. chinesis* (HPV chin) در کره و ویروس HPV از میگوی P. monnodon (HPV mon) در تایلند تقریباً ۱ Kb تفاوت دارند (Sukhumsirichart *et al.*, 1999,2006) و سکانس‌های DNA آنها در حدود ۳۰ درصد تفاوت دارد. این تفاوت بوسیله آزمایش سکانس قسمتهایی از ژنوم برای HPV chin (AY 008257) و HPV mon (AF 456476) در بانک ژن در دسترس است. روشهای PCR منتشر شده برای تشخیص HPV در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد. بطوریکه جفت پرایمرهای تجاری برای HPV chin از شرکت Diag Xotics باعث تولید یک زنجیره تکثیر Amplicon ۳۵۰bp با HPV chin در حساسیت بالا و یک زنجیره تکثیر Amplicon ۷۳۲bp با حساسیت پایین از HPV mon می‌گردد (Phromjai *et al.*, 2002). یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده برای HPV mon باعث ایجاد یک Amplicon با وزن ۴۴۱bp در حساسیت بالا می‌شود (Phromjai *et al.*, 2002) و نشان داده شده است که با HPV جدا شده از *P. monodon* از هند موثر است. در مقایسه، یک جفت پرایمر جدید طراحی شده برای HPV chin

5´ GTA AC T ATC GCC GCC AAC-3´

5´ GGT GAT GTG GAG GAG AGA 3´

قادر نیست HPV موجود در هند را جدا سازی کند (Umesha *et al.*, 2003). بنابراین احتمالاً HPV Indian از لحاظ سکانس ژنی بسیار به HPV Thai در مقایسه با HPV Korean نزدیکتر است. براساس گزارش Lightner و همکاران (۱۹۹۴) بررسی سلولهای آلوده به HPV در *Penaeus chinensis* و *Machrobrachium rosenbergi* مالزی وسیله H&E و بررسی DNA، اختلاف ریخت‌شناسی ویروس HPV را در هر دو نشان داد. هسته سلول‌های آلوده به HPV چینی در سلول‌های میزبان تا اندازه‌ای هایپرتروفی بوده و با گنجیدگی‌های پیوسته بودند در حالی که در هسته سلول‌های آلوده به HPV مالزی، هسته‌ها هایپرتروفی نداشتند و یک اختلاف ریخت‌شناسی مشخص در قطعات هیستولوژی، از نظر اندازه وجود داشت که ۲۲ تا ۲۴ نانومتر برای ویروس‌های HPV چینی و ۲۹ نانومتر برای ویروس‌های HPV مالزی بود و بطور واضح نشان داد که ویروس‌های متفاوتی از خانواده Parvoviridae بودند. با توجه به اینکه تاکنون سویه‌های مختلفی برای این گونه در جهان شناسایی شده، لازم است که نوع سویه این بیماری در ایران نیز بررسی شود. .در این تحقیق با توجه به گستردگی سایت‌های پرورش میگو در استان بوشهر و همچنین مراکز متعدد تکثیر ضرورت دارد با شناخت مراکز آلوده از انتقال پست لارو بین مراکز و مناطق مختلف استان و همچنین استانهای مجاور جلوگیری نموده تا از گسترش بیماری پیشگیری شود. پیشنهاد می‌شود مطالعاتی درخصوص مقایسه آنزیمهای ترشحی گوارشی بین میگوهای آلوده به HPV و میگوهایی که سالم هستند صورت گرفته تا دلیل کاهش رشد دقیقاً مشخص شود. بمنظور پیشگیری از این بیماری پیشنهاد شده ۲ تا ۳ بار نسبت به شستشوی تخمها با بتادین ۵ppm اقدام و سپس از آنها برای تولید ناپلی استفاده گردد.

منابع

افشارنسب، م.، ۱۳۸۶ الف. بیماریهای ویروسی میگو. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، چاپ اول. صفحات ۲۵ تا ۲۶.

افشارنسب، م.، ۱۳۸۶ب. روشهای تشخیص بیماریهای میگو. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، چاپ اول. صفحات ۳۴ تا ۳۸.

سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۸. تهیه و تدوین دفتر برنامه و بودجه، گروه آمار و مطالعات توسعه شیلات. ۲۱ صفحه.

شاهسونی، د. و پیغان، ر.، ۱۳۸۲. بیماریهای ویروسی ماهی و میگو (پرورشی، زینتی، وحشی). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، چاپ اول. ۵ صفحه.

صالحی،ح.، ۱۳۸۸. نشست تخصصی بررسی اقتصادی پرورش میگوی وانامی در استان بوشهر. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحات ۲۱ تا ۲۲.

مجیدی نسب، ا.، ۱۳۷۷. بیماریهای میگوهای پروررشی. انتشارات نور بخش، چاپ اول، تهران.۳۱ صفحه.

Bell T.D and Lightner D.V., 1998. A hand book of normal penaeid shrimp histology. Special Publication. No 1. World Aquaculture Society, Baton Rough LA. USA. pp.253-259.

Chang P.S., Lo C.F., Wang Y.C and Koh G.H., 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in-situhybridization. Diseases of Aquatic Organisms, 27:131-139.

Chong Y.C. and Loh H., 1984. Hepatopancreas chlamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore.Singap. Veterinary Journal, 9:51–56.

Couch J.A., 1974. Free and occluded virus similar to Baculovirus in hepatopancreas of pink shrimp. Nature, 247:229-231.

Flegel T.W., Fegan D.F. and Sriurairatana S., 1995. Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. *In*: (M. Shariff, R.P. Subasinghe and Arthur J.R. eds), Diseases in Asian Aquaculture, Vol. II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp.65-79.

Flegel T.W., Nielsen L., Thamavit V., Kongtim S. and Pasharawips T., 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. Aquaculture, 240:55-68.

Flegel T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia، Manila. pp.54-59.

Lightner D.V. and Redman R.M., Poulos B.T., Mari J.L., Bonami J.R. and Shariff M., 1994. Distinction of HPV-type virus in *Penaeus chinensis* and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe Asian. Fisheries Sciences, 7: 267-272.

Lightner D.V. (Ed.), 1996a. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 305P.

Lightner D.V., 1996b. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of Penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. 106P.

Lightner D.V., 1999a. The Penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV. Journal of Applied Aquaculture, 9 27-52.

Lightner D.V., 1999b. The Penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721. Journal of Applied Aquaculture, 9(2).

Phromjai J., Boonsaeng V., Withyachumnarnkul B. and Flegel T.W., 2002. Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. Diseases of Aquatic Organisms, 51:227-232.

Shatz Y., 2008. Fish stat plus version 2.32. Food and Agriculture Organization United Nations. Copyright 1997-2007.

Sukhumsirichart W., Wongteer Asupaya C., Boonsaeng V., Panyim S., Sriurairatana S., Withyachumnarnkul B. and Flegel T.W., 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. Diseases of Aquatic Organisms, 38, 1-10.

Sukhumsirichart W., Attasart P., Boonsaeng V. and Panyim S., 2006. Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancraetic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. Virology, 346: 266-277.

Umesha K.R., Uma A., Otta S.K., Karunasagar I. and Karunasagar I., 2003. Detection by polymerase chain reaction (PCR) of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in hatchery-reared postlarvae of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms, 57:141-146.

Tracking of Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) disease in *Litopenaeus vannamei* of the hatcheries in the Bushehr Province

Ghaedi T.[(1)]*; Afsharnasab M.[(2)]; Koosarinejad A.M.[(3)] and Mohammadi Gh.H.[(4)]

tghaedi@gmail.com

1-Islamic Azad University, Science and Research Branch of Khuzestan Province, P.O.Box: 61555-163 Ahwaz, Iran

2- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

3- Veterinary Main office of Bushehr Province, P.O.Box: 7515615733 Bushehr, Iran

4-South Aquaculture Research Center, P.O.Box: 61545-866 Ahwaz, Iran

Received: July 2010 Accepted: December 2010

Keywords: *Litopenaveus vannamei*, HPV, Gross Sign, Histopathology, PCR

Abstract

Presence of hepatopancreatic parvo-like vines (HPV) disease was assessed from June until October 2009 in *Litopenaeus vannamei* hatcheries and grow-out farms of the Bushehr province. Samples were collected from 6 hatcheries and 6 grow-out farms located in coasted areas. From each hatchery, 100 PL samples with average age PL5-PL8 and 20-30 samples from each grow-out farm with average age 105 to 120 days were collected. The samples were divided into three groups, one used for gross sign and wet mount with Gimsa, the second group was preserved in Davidson Fixative and used for histopathology and the third group was fixed in ethyl alcohol 95% and used for polymerase chain Reaction (PCR). In gross sign 30%-40% of the shrimp showed different sizes and some were smaller than the others. In the wet mount group with Gimsa staining of hepatopancrease, the inclusion body with basophilic color was seen. The histopathology indicated that the hepatopancreatic cell was infected and the basophilic inclusion body observed in many samples. The PCR examined with IQ 2000 Kit was negative. The rate of infection (ROI) was 1.1% for hatcheries and 32% for grow-out farms.

*Corresponding author