Archive of SID

شناسایی بیماری لکه سفید White Spot Syndrome Disease (WSSD) با روش Polymerase Chain Reaction (PCR) در میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) در ایران

محمد افشار نسب[۱]؛ فرا مرز لالویی[۲] و سهراب رضوانی[۳]

mafsharnasab@yahoo.com

۱ و ۳- موسسه تحقیقات شیلات ایران ، تهران، صندوق پستی: ٦١١٦ - ١٤١٥٥

۲ - بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای مازندران. ساری صندوق پستی: ٩٦١

تاریخ ورود : تیر ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش : تیر ۱۳۸۳

چکیده

در تابستان سال ۱۳۸۱ مرگ ومیر شدیدی در میگوهای پرورشی گونه سفید هندی (*Penaeus indicus*) در منطقه چوئیبده آبادان بوقوع پیوست. در میگوهای بیمار علائمی شامل وجود لکه‌های سفید به اندازه ۰/۵ تا ۲ میلیمتر بر روی کاراپاس، جدا شدن سریع کوتیکول از لایه اپیدرم، خالی بودن معده و روده، بزرگ، زرد و شکننده شدن هپاتوپانکراس و قرمز شدن اندامهای حرکتی مشاهده گردید. با توجه به مرگ و میر شدید میگوها و علائم کلینیکی مشاهده شده، نمونه‌ها مشکوک به بیماری لکه سفید یا White spot syndrome disease بودند. به منظور تشخیص قطعی بیماری علاوه بر مشاهده علائم کلینیکی، روش تشخیص PCR با استفاده از کیت شناسایی بیماری لکه سفید بنام Single.Tube Nested DNA Amplification Kit for Detection WSSD مورد استفاده قرار گرفت. نود نمونه از استخرهای پرورشی که مرگ و میر در آنها مشاهده شده بود از منطقه چوئیبده آبادان و یکصد و بیست نمونه از استانهای بوشهر، هرمزگان و منطقه گمیشان که میگوها سالم و مرگ و میر گزارش نشده بود جمع‌آوری و در الکل ۹۰ درصد تثبیت شدند. DNA نمونه‌ها به روش ارائه شده در کیت و روش فنل و کلروفرم استخراج شد. برای مشاهده کیفیت و کمیت DNA در ژل آگارز (۱درصد) الکتروفورز شدند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس WSSD موجود در کیت، PCR طبق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Corbet research) انجام پذیرفت. محصولات PCR نمونه‌ها با ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. در نمونه‌های چوئیبده آبادان باندهای DNA که در ژل ظاهر شدند دارای اندازه‌های ٣٥٦ bp و٤٠٣ bp بودند که مطابق دستورالعمل و پیش‌بینی شرکت سازنده کیت، موارد مثبت وجود بیماری لکه سفید را تایید می‌کند. در نمونه‌های سایر مناطق باندهای DNA که در ژل ظاهر شدند دارای اندازه‌های ٢٣٢bp بودند که از نظر وجود بیماری لکه سفید منفی گزارش می‌شود.

لغات کلیدی: میگوی سفید هندی، *Penaeus indicus*، White Spot Syndrome Disease (WSSD)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از سال ۱۹۹۲، یک سندرم ویروسی که معمولاً آنرا بنام بیماری لکه سفید یا White Spot Disease (WSD) یا سندرم لکه سفید White Spot Syndrome (WSS) می‌نامند، به دلیل تلفات وارده به مزارع پرورشی، کلیه مسائل مربوط به میگو را تحت‌الشعاع خود قرار داده و باعث خسارت سنگینی در مزارع گردید (Wang *et al.*, 1995 ; Takahashi *et al.*, 1994 ; Flegel *et al.*, 1996).

این بیماری با ایجاد لکه‌های سفید در روی کاراپاس میگوهای پرورشی و مرگ و میر شدید که معمولاً طی ۲ تا ۷ روز به ۷۰ تا ۱۰۰ درصد می‌رسد مشخص می‌گردد (Chou *et al.*, 1995). علائم ظاهری این بیماری به راحتی در میگوهای جوان و بالغ قابل رویت می‌باشد. میگوهای آلوده خیلی سریع بی‌حال و کم اشتها شده و علائم بیماری را نشان می‌دهند. این بیماری در کلیه کشورهای آسیا از جمله چین، تایلند، مالزی، سنگاپور، ویتنام، تایوان، هند و کشورهای آمریکای لاتین مثل اکوادور، گواتمالا، نیکاراگوا، مکزیک و آمریکا گزارش گردیده است (Wang *et al.*, 2000). این بیماری در ایران در سال ۱۳۸۱در منطقه چوئیبده آبادان بیش از ده میلیون دلار خسارت به پرورش دهندگان وارد نمود (تخم افشان و تمجیدی، ۱۳۸۲).

از سال ۱۹۹۵ استفاده از روش PCR در شناخت بیماریهای میگو بدلیل حساسیت و دقتی که در شناسایی عامل بیماری دارد بسیار متداول شد (Lightner, 1996). Takahashi و همکاران (۱۹۹۶) با استفاده از این روش بیماری RV-PJ که یکی از سویه‌های ویروس لکه سفید بوده و در ژاپن باعث تلفات میگوی *P. japonicus* می‌شود را شناسایی نمودند. بیماری WSSV نیز که سویه دیگری از بیماری لکه سفید بوده و در تایوان ایجاد بیماری می‌کند با این روش مورد شناسایی قرار گرفت (Lee, 1997). امروزه با استفاده از روش PCR غالب بیماریهای ویروسی میگو مثل *Penaeus monodon* baculovirus (MBV), Tura syndrom virus (TV), Hepatpancreatc parolike virus (HPV) و Infction hypodermal and hematpoetic necrosis virus (IHHNV) و سایر بیماریها مثل WSSD, BP قابل شناسایی می‌باشند.

ویروس ایجاد کننده بیماری لکه سفید را ابتدا براساس مرفولوژی در خانواده Baculovirdae قرار داده (Kou *et al.*, 1998) ولی براساس مطالعات انجام گرفته توسط Van Hulten و همکاران در سال ۲۰۰۰ و تعیین ردیف بازهای ویروس ایجادکننده بیماری آن را در خانواده جدیدی بنام Whispoviridae نامگذاری نمودند. در سال ۱۹۹۸ توسط Kou و همکاران یک نشانگر اختصاصی برای شناسایی این ویروس طراحی و با روش dot blot hybridization مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه درمانی برای کنترل این بیماری شناسایی نشده است استفاده از روشهایی که با سرعت و دقت بتواند ویروس بیماری را شناسایی کند بسیار ضروری می‌باشد. در این مقاله نتیجه بررسی‌های شناخت بیماری با روش PCR که هم از دقت بالایی برخوردار بوده و هم با سرعت می‌تواند عامل بیماری را

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی کرد برای اولین بار در ایران در میگوی سفید هندی مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی امکان استفاده از روش PCR برای اثبات بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی منطقه چوئیبده آبادان و تایید مرگ ومیر ناشی از آن بوده است.

مواد و روش کار

در تیر ماه سال ۱۳۸۱ گزارشی مبنی بر تلفات میگوهای منطقه چوئیبده آبادان واصل گردید. در زمان بازدید ۳۷ مزرعه از مجموع ۵۰ مزرعه موجود در منطقه کار ذخیره‌سازی لارو را انجام داده و بالغ بر ۶۵,۰۰۰,۰۰۰ پست لارو در استخرها ذخیره گردیده بود. میگوها در زمانهای مختلف ذخیره‌سازی گردیده بودند که میانگین عمر آنها ۲۵ تا ۳۵ روز بود و میزان تلفات در استخرهای مختلف متفاوت گزارش گردیده است. تعداد ۹۰ نمونه میگو از استخرهای مورد نظر صید و در الکل اتیلیک مطلق تثبیت و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور بررسی وضعیت بیماری در استانهای بوشهر، هرمزگان و منطقه گمیشان نیز ۱۲۰ نمونه میگو مشابه استان خوزستان صید و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه در شرایط استریل، نمونه‌هایی از قسمتهای آبشش، چشم و پانکراس میگو برداشته شده و در داخل هاون کوچک چینی بخوبی هموژنیزه گردید. سپس مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه هموژنیزه شده درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌گرم ریخته شد. قابل ذکر است در مواقعی که میگوها در مرحله پست لاروی قرار داشتند تعداد ۲۰ تا ۳۰ پست لارو با هم مخلوط و از مخلوط حاصل نمونه تهیه گردید.

پس از قراردادن نمونه در میکروتیوب، مقدار ۱۰۰۰µl محلول استخراج DNA (۱۰ Tris-Hcl میلی مولار با pH = ۸ , ۱۵۰ Nacl میلی مولار و ۲ EDTA میلی مولار همراه با ۱ SDS درصد) اضافه و مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه Shaker تکان داده و سپس بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، توسط میکروپیپت لایه رویی جداسازی و بداخل یک میکروتیوب دیگر منتقل گردید (رسوب باقیمانده دور ریخته شد).

مقدار ۵۰۰µl اتانول ۱۰۰ درصد به محلول اضافه و بخوبی با هم مخلوط شده و دوباره بمدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. در این مرحله لایه الکل رویی را دور ریخته شد و مقدار µl ۱۰۰۰ اتانول ۷۰ درصد به رسوب ته لوله اضافه و پس از چند بار تکان دادن، بمدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ لایه رویی الکل دور ریخته و به رسوب باقیمانده، مقدار µl ۱۰۰ آب مقطر استریل اضافه و لوله بمدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا DNA در آب حل گردد (Lightner,1996). جهت کنترل کیفیت DNA مقدار µl ۱۰ از DNA با استفاده از ژل آگارز ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید الکتروفورز و با ترانس لومیناتور uv باند مورد نظر مشاهده گردید. جهت انجام PCR مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

برای انجام PCR از کیت مخصوص بیماری لکه سفید بنام
(Single-Tube Nested DNA Amplification kit for Detection white spot syndrome virus)
از کمپانی Genensis Biotechnology Sdn.Bhd استفاده شده است.

محلول واکنش در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌گرم بشرح ذیل آماده‌سازی گردید. قابل ذکر است که تمامی مقادیر مورد استفاده براساس دستورالعمل کیت مورد استفاده بوده است

PCR Reaction Mix	23.2µL
PCR Nucleotide Mix (dNTP)	0.5µL
Taq DNA Polymerase	0.3µL
Target DNA	1-2µL

همزمان با نمونه‌های مورد بررسی از دو نمونه بعنوان شاهد مثبت و منفی استفاده گردید. (نمونه‌های شاهد مثبت همراه کیت می‌باشد)

برنامه PCR:

۹۴ درجه سانتی‌گراد در سه دقیقه	Pre-denaturation
۹۴ درجه سانتی‌گراد در سی ثانیه	۵ cycle
۶۰ درجه سانتی‌گراد در سی ثانیه	
۷۲ درجه سانتی‌گراد در سی ثانیه	
۹۴ درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	۱۵ cycle
۶۰ درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی‌گراد در سی ثانیه	
۹۴ درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	۶ cycle
۵۰ درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	
۹۴ درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	۲۵ cycle
۴۹درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی‌گراد در بیست و پنج ثانیه	
۷۲ درجه سانتی‌گراد در سه دقیقه	final extension

پس از انجام PCR نمونه ها همراه با ۱۰۰bp DNA marker بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و باندهای ایجاد شده با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم برماید و ترانس لومیناتور uv مشاهده گردیدند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

نتایج بدست آمده از PCR نمونه‌های استانهای مختلف در جدول ۱ ارائه گردیده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود نمونه‌های استان خوزستان (منطقه چوئیبده آبادان) بعد از الکتروفورز دارای باندهای مختلف می‌باشند. در کلیه نمونه‌ها یک باند حدود ۲۳۲ bp مشاهده می‌شود که متعلق به میگو بوده و میگوهای استان خوزستان نیز باند مزبور را نشان می‌دهند (شکل ۱). نمونه‌های استان خوزستان علاوه بر باند فوق باندهایی در حدود ۳۵۶ bp و ۴۰۳ bp نیز ایجاد می‌کنند که در کنار Marker استفاده شده کاملاً قابل تشخیص بوده، در حالیکه این باندها در شرایط PCR مشابه در نمونه‌های سایر مناطق مشاهده نشدند. نتایج بدست آمده از PCR نمونه‌های آبادان نشان می‌دهد که DNA ویروس WSSD در نمونه‌های منطقه چوئیبده آبادان وجود داشته و در سیستم PCR بکار گرفته شده، ازدیاد یافته است. براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، معلوم می‌شود که با مشاهده باندهای ایجاد شده در ژل الکتروفورز در صورتیکه یک باند حدود ۲۳۲ جفت باز ایجاد شود نمونه‌ها از نظر hite spot منفی هستند. در صورتیکه یک باند ۲۳۰ جفت باز و باند حدود ۳۵۶ جفت باز ایجاد شود نمونه‌ها از نظر White spot مثبت می‌باشند و در صورتیکه نمونه‌ها علاوه بر باندهای ۲۳۰ و ۳۵۶ جفت باز دارای باند ۴۰۳ جفت باز نیز باشند نمونه‌ها دارای ویروس White spot از نوع کشنده و قوی می‌باشند (شکل ۱ نمونه‌های شماره ۳،۴ و ۷).

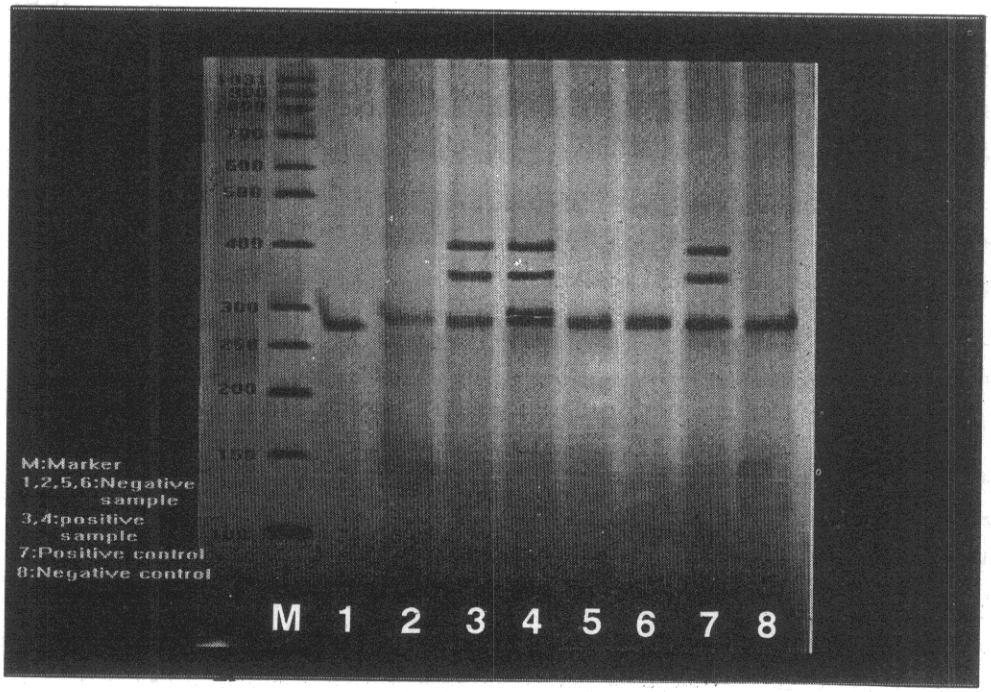
از تعداد ۲۰۰ نمونه میگویی که از استانهای جنوبی (بوشهر، خوزستان و هرمزگان) و گمیشان از استان گلستان به آزمایشگاه منتقل شده و مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. خوشبختانه نمونه‌های تمام استانها از نظر این بیماری دارای نتیجه منفی بودند و تنها نمونه‌های جمع‌آوری شده از چوئیبده آبادان دارای نتیجه مثبت بوده و ۱۰۰ درصد آلودگی را نشان دادند.

جدول ۱: وضعیت نمونه های آزمایش شده با PCR در مناطق مختلف

نام منطقه	نوع نمونه	تعداد نمونه	نتایج PCR	وضعیت WSSD
خوزستان	میگوی سفید هندی	۹۰ عدد	۲۳۲ bp و ۳۵۶ و ۴۰۳	مثبت
بوشهر	میگوی سفیدهندی	۴۰ عدد	۲۳۲ bp	منفی
هرمزگان	میگوی سفیدهندی	۴۰ عدد	۲۳۲ bp	منفی
گمیشان	میگوی سفیدهندی	۴۰ عدد	۲۳۲ bp	منفی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: مشاهده محصول PCR نمونه‌های استانهای بوشهر (۱و۲)، هرمزگان (۵) و جوئیبده آبادان (۳و٤) و گمیشان (٦). M مارکر یا نشانه می‌باشد. همانگونه که مشاهده می‌شود نمونه‌های چوئیبده تشکیل باند قوی داده و نشان می‌دهد که از نظر white spot مثبت می‌باشد. نمونه‌های شماره (۷) و (۸) به منظور کنترل در کیت موجود می‌باشد.

بحث

براساس گزارش سازمان خواربار جهانی (FAO) در سال ۲۰۰۱ تولید میگوی پرورشی در دنیا معادل ۱،۶۰۰،۰۰۰ تن گزارش شده است که از این میزان حدود ۳۰۰،۰۰۰ تن بر اثر بیماری لکه سفید از بین رفته و خسارتی سنگینی را به پرورش‌دهندگان میگو وارد نموده است (Rosenberry, 2001).

بیماری لکه سفید برای نخستین بار از کشور چین در سال ۱۹۹۲ گزارش گردید. این بیماری که آن را بیماری china disease نیز گویند علائمی از قبیل ایجاد پلاکهای سفید در روی کاراپاس و بدن میگو، بزرگ شدن هپاتوپانکراس، قرمز شدن بدن میگو، خالی بودن معده و کم اشتهایی را به دنبال دارد. همچنین داشتن گنجیدگیهای درون سلولی ویژه‌ایی بنام Cowdery type-A از علائم دیگر بیماری است که در مشاهده با میکروسکوپ نوری قابل رویت بوده و با تخریب سلول در مراحل انتهایی

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری ویـــروس ایجاد کننـده بیماری با میکروسکوپ الکترونی بخوبی قابل رویت است (Wang et al., 2000 ; Chou et al., 1995).

روشهای مختلفی برای تشخیص بیماری لکه سفید مورد استفاده قرار گرفته است. روش شناسایی این بیماری با استفاده از علائم ظاهری اگر چه روشی سریع می‌باشد ولی تشخیص از روی علائم ظاهری بدلیل مشابهت این بیماری به بیماریهای دیگر میگو از جمله بیماری Vibriosis و IHHNV و همچنین افزایش pH آب تشخیص بیماری مشکل است. زیرا کلیه بیماریهای اشاره شده دارای علائم ظاهری شبیه به هم می‌باشند و ایجاد پلاک سفید رنگ در روی بدن میگو می‌نمایند. تشخیص این بیماری با استفاده از روش آسیب‌شناسی بافتی که توسط Lightner و Bell در سال ۱۹۸۸ و Lightner در سال ۱۹۶۶ ارائه گردیده است گرچه دقیق می‌باشد ولی با توجه به اینکه در این روش نیز بسیاری از علائم ایجاد شده با بعضی از بیماریهای دیگر میگو مثل بیماری IHHNV شبیه است، تشخیص قطعی مشکل می‌باشد. همچنین این روش با توجه به اینکه وقت زیادی نیاز دارد معمولا نمی‌تواند بعنوان یک روش سریع در مزارع میگو مورد استفاده قرار گیرد. مهمترین علائم ایجاد شده بیماری لکه سفید در روش آسیب شناسی بافتی ایجاد گنجیدگیهای Cowdry type-A می‌باشد (Wang et al.,1999; Thakahashi et al., 1994) که شبیه علائم ایجاد شده در بیماری IHHNV است (Bonamei & Lightner, 1991).

روش تشخیص با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روشی بسیار دقیق بوده که با ا ستفاده از این روش میتوان عامل ایجاد کننده بیماری را شناسایی کرده و به تشخیص قطعی دست یافت (Hayat, 1986 ; Lightner, 1966). این روش برغم دقت و اهمیتی که در تشخیص بیماریهای ویروسی از جمله بیماری لکه سفید دارد ولی هزینه زیادی نیاز دارد و تجهیزات پیچیده‌ای در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین وقت زیادی برای تشخیص با این روش مورد نیاز است. بنابراین تنها به منظور تشخیص عامل بیماری و بررسی بیماریزایی در آزمایشگاه کاربرد دارد و نمی‌تواند در مزارع پرورشی میگو مورد استفاده قرار گیرد.

امروزه استفاده از روشهای مولکولی برای تشخیص بیماری میگو بطور وسیع کاربرد دارد. این روشها علاوه بر اینکه می‌تواند عامل بیماری را در بافتهای میگو مورد شناسایی قرار دهند، در تشخیص این عوامل در مواد غذایی مصرفی و همچنین در محیط پرورش نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. از خصوصیات ویژه روشهای مولکولی سرعت و دقت است که به منظور پیشگیری از بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد. علائم کلینیکی و آسیب‌شناسی بافتی این بیماری و همچنین شناسایی این بیماری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی توسط تخم‌افشان و تمجیدی (۱۳۸۲) مورد بررسی قرار گرفته و گزارش گردیده است.

در میان روشهای مولکولی، روش PCR با توجه به سرعت و دقتی که دارد از سایر روشهای مولکولی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در این روش کمتر از ۱۰ مولکول DNA از عامل بیماری برای

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص کافی است در صورتیکه در دیگر روشهای مولکولی به بیشتر از ۱۰۰ مولکول نیاز است (Kou *et al.*, 1998). با توجه به شدت مرگ و میر ناشی از بیماری لکه سفید و با توجه به اینکه این بیماری غالبا در میگوها بصورت نهفته می‌باشد این موضوع حائز اهمیت بوده و با استفاده از این روش می‌توان عامل بیماری را در پایین‌ترین سطح نیز شناسایی نموده و از بروز بیماری جلوگیری کرد.

در سال ۱۹۹۶ Takahashi و همکاران با استفاده از روش PCR توانستند ویروس ایجادکننده بیماری را شناسایی نمایند و اعلام داشتند که ویروس RP-JV نام دیگر ویروس لکه سفید در کشور ژاپن است و همچنین ویروس SEMBV که ایجاد کننده بیماری در کشور تایلند می‌باشد ایجاد باندی به اندازه ۶۴۳ bp می‌نمایند.

Lightner در سال ۱۹۹۶ با توجه به تعدد سویه‌های ایجادکننده بیماری لکه سفید در کشورهای مختلف توانست پرایمر اختصاصی برای سویه‌های این بیماری از کشور ژاپن، تایلند، هند و تایوان طراحی نموده و توصیه نمود با توجه به ایجاد خسارت سنگین ناشی از این بیماری و همچنین با توجه به اینکه در بعضی مواقع ممکن است ایجاد نتیجه منفی کاذب نمایند بهتر است از پرایمر اختصاصی برای گونه‌های مختلف استفاده شود.

Kou و همکاران در سال ۱۹۹۸ با توجه به اهمیت بیماری و ایجاد نتیجه منفی کاذب پیشنهاد نمودند بهتر است برای شناسایی بیماری لکه سفید بجای استفاده از PCR یک مرحله‌ایی از روش PCR دو مرحله‌ایی یا Nested - PCR استفاده گردد. زیرا Nested-PCR حدود ۱۰۰۰ مرتبه حساسیت بیشتری از PCR یک مرحله‌ایی داشته و تعداد کپی ایجاد شده از DNA ۱۰ تا ۵۰ مرتبه بیشتر می‌باشد و به همین دلیل امکان ایجاد نمونه‌های منفی کاذب به حداقل می‌رسد. Lee در سال ۱۹۹۷ با توجه به اهمیت Nested - PCR توانستند کیت مخصوص بیماری لکه سفید را با این روش تولید نموده که هم اکنون به صورت تجارتی عرضه می‌گردد. همچنین Alday در سال ۱۹۹۹ بمنظور اینکه نمونه‌های جمع‌آوری شده برای انجام آزمایش PCR یکنواخت بوده و بیانگر کل جمعیت میگوهای یک استخر باشد جدول آماری خاصی را پیشنهاد نموده‌اند که مطابق این جدول و به منظور تعیین دقت نمونه‌برداری تعداد نمونه‌ها در استخرهای مختلف برحسب درصد نمونه‌برداری متفاوت می‌باشد. توصیه می‌گردد در ایران نیز بمنظور کاهش نتایج کاذب از این جدول استفاده گردد.

Van Hulten و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند ردیف بازهای ویروس ایجادکننده بیماری لکه سفید در میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) از کشور تایلند را شناسایی نموده و اعلام داشتند که ویروس ایجادکننده بیماری بصورت دو رشته‌ای بوده و دارای ۲۹۲،۹۶۷ نوکلئوتید می‌باشد و براساس مطالعات فیلوژنی اعلام داشتند ویروس ایجادکننده بیماری که قبلا جزء خانواده Baculoviridea بوده در خانواده جدیدی بنام Wispoviridea قرار گیرد و همچنین پیشنهاد نمودند که این اقدام برای کلیه سویه‌های این ویروس از مناطق مختلف انجام گرفته تا وضعیت ویروس مشخص شود.

www.SID.ir

Archive of SID

در مقایسه با مطالعات انجام گرفته و مطالعه کنونی این ویروس با روش PCR ایجاد باندهای ۳۵۶ bp و ۴۰۳bp نموده و با توجه به گزارش Lee در سال ۱۹۹۷ این ویروس ایجاد باندهایی شبیه ویروس لکه سفید گزارش شده در مالزی و تایلند نموده و از نظر وجود بیماری لکه سفید در نمونه‌های آزمایش شده از منطقه آبادان مثبت می‌باشد. با توجه به اهمیت این بیماری در میگوهای پرورشی و با توجه به گستردگی این صنعت در کشور و سرمایه‌گذاری‌های انجام گرفته و امکان ورود این بیماری از طریق واردات داروها و سایر موادی که در صنعت تکثیر و پرورش استفاده می‌گردد موارد زیر پیشنهاد می‌شود:

- هر چه سریعتر استفاده از روش PCR در کشور آموزش داده شده و امکانات لازم بمنظور استفاده از آن فراهم شود.
- کلیه تکثیرکنندگان و پرورش‌دهندگان میگو ملزم شوند مولدین و لاروهای خود را قبل از وارد کردن به هچری و مزارع پرورشی به بیماری لکه سفید آزمایش نموده وسپس اقدام به معرفی در هچری و مزارع نمایند.
- هر چه سریعتر کیت مخصوص این بیماری در کشور طراحی و ساخته شود تا هم از نظر صرفه‌جوئی اقتصادی و هم از نظر استفاده از سویه ایجادکننده بیماری در کشور اطمینان حاصل شود.
- نسبت به انجام پروژه‌های مرتبط با این بیماری مثل روشهای کنترل و شناسایی دقیق و ویروس بیماری با روشهای مولکولی و تعیین فیلوژنی ویروس اقدام گردد.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم مرکز تحقیقات شیلاتی استان خوزستان دکتر مرمضی و ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریای مازندران دکتر رستمی، همچنین دکتر تمجیدی، آقای کر، و دکتر دشتیان نسب که نهایت همکاری را در جمع‌آوری نمونه‌ها و انجام آزمایشات بعمل آورده‌اند تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

تخم‌افشان، م. ، تمجیدی، ب. ، ۱۳۸۲. علائم ظاهری و آسیب‌شناسی بافتی بیماری لکه سفید White spot syndrome disease در میگوی پرورشی سفید هندی (*Penaeus indicus*) در استان خوزستان. مجله علمی شیلات ایران. سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۲، صفحات ۱۵تا ۲۸.

Alday. V. , 1999. Current shrimp pathology issues. ADVOCATE , Volume 2, Issue 4/5.

Bell, T.A. and Lightner, D.V. , 1988. A handbook of normal Penaeid shrimp histology. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.

www.SID.ir

Archive of SID

Bonami, J.R. and Lightner D.V. , 1991. Unclassified viruses of crustacean. *In:* J.R. Adams and J.R.Bonami (eds.). Atlas of Invertebrate Viruses. Boca Raton: CRC Press inc., pp.597-622.

Chou, H.Y. ; Huang, C.Y. ; Wang, C.H. ; Chang, H.C. and Lo, C.F. , 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured Penaeid shrimp in Taiwan. Dis.Aquat.Org. Vol. 23, pp.165-173.

Flegel, T.W. ; Boonyaratplain, S. and Withyachumnamkul, B. , 1996. Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thiland. *In:* LeRoy Creaawell R (ed) Book of abstracts. World Aquaculture 96 held in Bangkok, Thiland, and Jen26-Feb 2, 1996. World Aquaculture Society. Harbor Branch Oceanographic Institute, Ft Pierce, FL, pp.126-127.

Hayat, M.A. , 1986. Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy. California: Academic , Inc.

Kou, G.H. ; Peng, S.E. ; Chin, Y.L. and LO, C.F. , 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSD) in shrimp and crabs. In Flegel TW (ed) Advance in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotecnology, Bangkok.

Lee, K.L. , 1997. Development of automated nested PCR in the detection of white spot disease associated baculovirus (WSBV) using rapid cycle DNA amplification. Thesis of DVM, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Putra Malaysia, Serdang Selangor, Malaysia.

Lightner, D.V. , 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.

Rosenberry , B. , 2001. World Shrimp Farming 2001. California: An annual report published by Shrimp News International.

Takahashi, Y. ; Itami, T. ; Kondo, M. ; Maeda, M. ; Fujii, R. ; Tomonaga, S. ; Supamattya, K. and Boonyaratpalin, S. , 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp *(Penaeus japonicus).* Fish Pathol. Vol. 29, No. 2, pp.121-125.

www.SID.ir

Archive of SID

Takahashi, Y. ; Itami, T. ; Kondo, M. ; Maeda, M. ; Supamattya, K. ; Boonyaratpalin, S. ; Suzuki, N. ; Kasornchandra, J. ; Khongpradit, R. ; Kawai, K. ; Kusuda, R. ; Hirono, I. and Aoki, T. , 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bata and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricus. J. Fish. Dis. 19:pp.399-403

Van Hulten, M.C.W. ; Tsai, M.F. ; Schipper, C.A. ; Lo, C.F.C. ; Kou, G.H. and Valk, J.M. , 2000. Analaysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase and repeat regions. Journal of Virol. Vol. 81, pp.307-316.

Wang, C.H. ; Lo, C.H. ; Leu, J.H. ; Chou, C.M. ; Yeh, P.Y. ; Chou, H.Y. ; Tung, M.C. ; Chang, C.F. ; Su, M.S. and Kou, G.H. , 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) OF *Penaeus monodon.* Dis. Aquat. Org. Vol. 23, pp.239-242.

Wang, Y.G. ; Tan, O.L. ; Lee, K.L. ; Hassan, M.D. and Shariff, M. , 1999. Health management of shrimp during growout. INFOFISH International 4/99: 30-36.

Wang, Y.G. ; Lee, K.L. ; Najiah, M. ; Shriff, M. ; and Hassan. M.D. , 2000. A new baculovirus white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. Dis. Aquat. Org. Vol. 41, pp.9-18.

www.SID.ir

Archive of SID

Identification of White Spot Syndrome Disease (WSSD) in *Penaeus indicus* by Polymerase Chain Reaction (PCR) method in Iran

Afsharnasab M. [1] ; Laloei F.[2] and Rezvani S.[3]

mafsharnasab@yahoo.com

1,3- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box:14155-6116 Tehran, Iran

2- Caspian Sea Ecology Research Academy, P.O.Box: 961 Sari, Iran

Received: July 2003 Accepted: July 2004

Keywords: Shrimp, *Penaeus indicus*, White Spot Syndrome Disease, PCR.

Abstract

A high mortality of cultured shrimp *Penaeus indicus* was spotted in summer 2002 in Khouzestan province, southwestern Iran. White spots with a size of 0.5–2mm was one of the typical external signs of the infected shrimps. Our examination revealed that the cuticle of the shrimps could be easily separated from their epidermis, their hepatopancreas was swollen, their abdomen and intestine were empty and their body colour was reddish. Based on the symptoms, we suspected that White Spot Syndrome Disease (WSSD) might have caused the mortality. To ascertain our suspicion, we collected 90 infected specimens from the Khouzestan province and another 120 uninfected specimens from Bushehr and Hormozgan provinces in the south and Golestan province in the northeast Iran.

After fixing the samples in pure alcohol, we homogenized the samples and extracted their DNA content using phenol-chloroform methods. Using a WSSD kit, we conducted the PCR method which showed the specimens from Khouzestan province (Abadan area) were definitely infected with WSSD while results for samples from other provinces were negative.

www.SID.ir