سازمان دامپزشکی کشور
معاونت بهداشتی و پیشگیری
دفتر بهداشت و مبارزه با بیماری های آبزیان

Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia

By:
T. W. Flegel

تشخیص ویروس های مهم میگوهای پنائیده در آسیا

ترجمه و گردآوری: دکتر امراله قاجاری

مهرماه ۱۳۸۷

خلاصه :

قاره آسیا صنعت پرورش میگوی دنیا را با داشتن صدها میلیون دلار درآمدهای صادراتی در سال رهبری می کند. در کنار این موفقیت ، تولید سالانه میگو در اواخردهه ۹۰ میلادی به دلیل اپیدمی های گسترده ناشی از پاتوژن های ویروسی نوپدید کاهش یافت اگر چه این ویروس ها از لحاظ بهداشت عمومی اهمیت خاصی نداشتند ولی از لحاظ اقتصادی باعث فلجی پرورش دهندگان میگو در آسیا شدند. روند توسعه میگوپروری در تایلند نمای کاملی از این صنعت در بقیه قاره آسیا می باشد با این تفاوت که سرعت بازگشت به تولید پس از اپیدمی های ویروسی تا حدی نسبت به سایر کشورهای همسایه بهتر بوده است در این کشور در ابتدا گونه پنئوس مونودون اصلی ترین گونه پرورشی بود اما از سال ۲۰۰۲ به بعد یعنی هنگامی که گونه پنئوس وانامی (تحت عنوان لیتوپنئوس وانامی هم گفته می شود) در بسیاری از کشور های آسیائی کشت داده شد نوع گونه پرورشی به سرعت تغییر کرد. در حال حاضر تحقیقات در تایلند برروی خصوصیات ویروس های میگو و ایجاد روش های تشخیص سریع متمرکز شده است .

عمده ترین ویروس های مورد مطالعه (بر اساس خسارات اقتصادی وارده به تایلند) شامل : ویروس سندرم لکه سفید (WSSV)، ویروس کله زرد (YHD)، پاروویروس هپاتوپانکراس (HPV) و مونودون باکلوویروس (MBV) می باشد در عین حال با ورود میگوی *L.Vannamei* ویروس سندرم تورا (TSV) و ویروس عفونت بافت هیپودرم و بافت های خون ساز (IHHNV) نیز امروزه دارای اهمیت ویژه ای شده اند . هم اینک با استفاده از تکنولوژی واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) آزمایشات سریع و حساسی با صرف زمانی حدود ۳ ساعت برای ردیابی این ویروس ها مورد استفاده قرار می گیرد بعلاوه آزمایشات کروماتوگرافی جانبی جریان دار (Lateral flow chromatographic) بر اساس مونوکلونال آنتی بادی نشان دار شده با نانو ذرات طلا جدیدا مورد استفاده قرار می گیرد. اگر چه این روش نسبت به روش PCR دارای حساسیت کمتری است لیکن به شدت اختصاصی عمل کرده و برای استفاده کنندگان بسیار ارزان و آسان می باشد به طوری که این روش می تواند در مزرعه توسط مزرعه داران جهت تشخیص بیماری ها مورد استفاده قرارگیرد. در این مرور ویروس های اصلی میگو در آسیا که در حال حاضر آزمایشات PCR و آزمایشات آنتی بادی برای آنها در دسترس می باشد بررسی شده و بر روی اقداماتی که در تایلند صورت گرفته تاکید می گردد.

مقدمه :

آسیا تولید میگوی پرورشی را به ارزش میلیاردها دلار در سال رهبری می کند. تایلند به تنهائی بزرگترین تولیدکننده میگوی پرورشی از سال ۱۹۹۲ تاکنون بوده است و ارزش صادرات میگوی آن کشور به تنهائی بالغ بر یک میلیارد دلار در سال می باشد در همین حال در تایلند در سال ۱۹۹۵ عمدتا به دلیل اوج شیوع ویروس کله زرد (YHV) تولید در حدود ۵۰۰۰ تن (تقریبا برابر با ٤٠ میلیون دلار امریکا خسارت به صادرات میگو) کاهش یافت در سال های ۱۹۹٦ و ۱۹۹۷ عمده خسارات بوسیله ویروس دیگری به نام ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) که فوق العاده خطرناک بود وارد شد. خسارات وارده به درآمد صادراتی تقریبا برابر یک میلیارد دلار برآورد می شود بعد از سال ۱۹۹۷ تولید میگو در تایلند بهبود پیدا کرد وبه بالاترین سطح نسبت به تولید قبل که ۲۵۰۰۰۰ تن بود (سال ۱۹۹۹) دست پیدا کرد و تاکنون با اندکی افزایش یا کاهش در همان سطح باقی مانده است. این در حالی است که بقیه کشورهای تولیدکننده میگو در آسیا نتوانستند به این خوبی و سرعت از مشکل عبور نمایند. برای مثال شیوع WSSV در چین که از سال ۱۹۹۳ شروع شد باعث کاهش تولید میگوی صادرات چین از رقم ۱۱۵۰۰۰ تن به ۳۵۰۰۰ تن شد ولی روند بهبودی به آهستگی بود به طوری که در سال ۱۹۹۹ تولید به رقم ۷۰۰۰۰ تن رسید.

متعاقب ورود و استفاده گسترده از مولدین بومی شده و عاری از پاتوژن (SPF) گونه لیتوپنئوس وانامی، تولید میگوی پرورشی به نحو بی نظیری افزایش یافت . مثال های فوق نشان می دهد که بیماری های تا چه اندازه می توانند به صنعت آبزی پروری خسارت وارد کنند. وضعیت بحرانی پرورش دهندگان و صنعت پرورش میگو را می توان به طور عمده ای با بکارگیری استراتژی های مناسبی بهبود داد. این استراتژی ها شامل توسعه همکاری های پروش دهندگان با همدیگر و تغییرات تکنولوژیکی می باشد .همان طوری که موفقیت های به دست آمده در استفاده از میگوی وانامی بومی شده نشان داده است، استفاده گسترده تر از این مولدین که از لحاظ ژنتیکی نیز انتخاب شده هستند ، یک اصل ضروری در این تغییرات است.این استراتژی ها صنعت پرورش میگو را می تواند به طرف یک وضیعت با ثبات و پایدار با حداقل تاثیرات منفی بر روی محیط زیست اطراف هدایت کند. در راه رسیدن به این اهداف تحقیقات بیوتکنولوژیک می تواند نقش اساسی داشته باشد اما دولت و صنعت بایستی حمایت های مداومی را جهت فراهم نمودن زیر ساخت های لازم و آموزش های مورد نیاز برای ایجاد شرایط مناسب به کار گیرند.

این نوشتار به طور عمده مراحل ایجاد و توسعه روش های تشخیصی مولکولی را برای پاتوژن های میگوو همچنین به طور جزئی در مورد آزمایشات lateral flow chromatographic با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی (MAb) بحث می کند. تاکید اصلی این نوشته بر کارهای صورت گرفته در تایلند بوده لیکن تا جائیکه امکان پذیر بوده است به سایر کارهای مشابه در خارج از تایلند هم اشاره شده است. در هنگام مطالعه این متن باید توجه داشت که این مطالب تنها نقش کوچکی را در استراتژی کامل کنترل بیماری های میگو ایفا می کنند. این مطالب جوابی در درون خودشان ندارند بلکه بایستی به نحو مطلوبی در برنامه کلی بهداشت میگو مورد استفاده قرار بگیرند برنامه بهداشتی میگو شامل موضوعاتی نظیر سلامتی محیط، تغذیه و ژنتیک نیز می باشد.

این نوشته ایجاد روش های تشخیصی مبتنی بر DNA را برای ویروس های میگوبه نحوی کـه در تایلنـد مورد مطالعه قرارگرفته اند بیان می کند:

- Monodon baculovirus (MBV)
- Yellow Head Virus (YHV)
- White Spot syndrome virus (WSSV)
- hepatopancreatic parvovirus (HPV)
- infectious hypodermal and hematopetic virus (IHHNV)
- Taura syndrome virus (TSV)

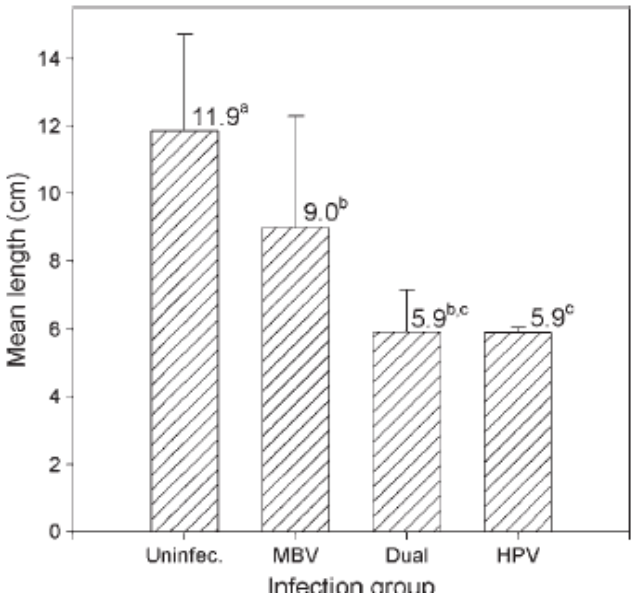
به هـر حـال از لحـاظ خـسارات وارده بـه میگـوی مونـودون در پـرورش میگـو در آسـیا بیمـاری هـای WSSV,YHV,HPV اهمیت بیشتری دارند و خسارات وارده ناشی از ویروس های MBV و IHHNV کمتر آشکار است. در عین حال با توجه به کـشت گـسترده میگـوی *P.Vannamai* نیـاز اسـت خـسارات حاصـل از بیماری های IHHNV و TSV خیلی جدی تر در نظر گرفته شود.

۱- Monodon baculovirus (MBV) :

کلیات:

در تایلند در سال ۱۹۹۰ وقتی برای اولین بار ویروس را مشاهده کردیم با توجه به نقش این ویروس در ورشکستگی صنعت میگو تایوان در نیمه های دهه ۸۰ میلادی اطلاعات کاملی در این زمینه وجود داشت.

در همان اوایل مشخص شد که MBV نمی تواند باعث مرگ و میر میگوها در شرایط خوب پرورشی گردد این موضوع در کنار این واقعیت بود که بعضی از لارو های مبتلا دارای تعداد قابل ملاحظه و فراوانی گنجیدگی های ویروسی هستند به عبارتی این لاروها سطح بالائی از تکثیر و تزاید ویروس را در خود داشتند بدون اینکه اثرات بیماری و پاسخ ایمنی مشهودی در آنها یافت گردد این ایده که ویروس MBV نمی تواند باعث مرگ و میر در میگوها شود بعداً در تایوان به خوبی اثبات شد. علیرغم این ایده که MBV یک پاتوژن جدی برای میگوی ببری سیاه نیست لیکن این ویروس بایستی از سیستم پرورشی حذف گردد زیرا غیرمنطقی به نظر می رسد که میگوها بتوانند چنین بار سنگین ویروسی را بدون هیچ گونه زیانی تحمل کنند در حقیقت یک سری مطالعاتی نشان داده است که میانگین طول بدن میگوهای آلوده به MBV به طور قابل ملاحظه ای کوتاه تر از میگوهای غیر آلوده در همان استخر است این تفاوت به جز در انتهای دوره پرورش به آسانی قابل تشخیص نیست این نتایج یافته های یک سری مطالعات را در فیلیپین تقویت می کند که نشان دادند عفونت MBV می تواند باعث کاهش رشد در سیستم های پرورش های متراکم و ضرورتاً طولانی تر شدن دوره پرورش جهت تولید میگوهای با اندازه درشت می شود. همچنین گمان می رود که شرایط پرورشی ضعیف می تواند باعث افزایش شدید تکثیر ویروس و متعاقباً عفونت های ثانویه باکتریائی و نتیجتاً مرگ و میر میگوها شود. به منظور حذف ویروس از سیستم های پرورشی می توان از روش شستشوی تخم ها و یا در مراحل ابتدائی ناپلی با آب تمیز دریا و به دنبال آن پرورش جداگانه لاروهای به دست آمده در هر بار تخم کشی و حذف محموله های آلوده لاروها و پست لاروها استفاده کرد.



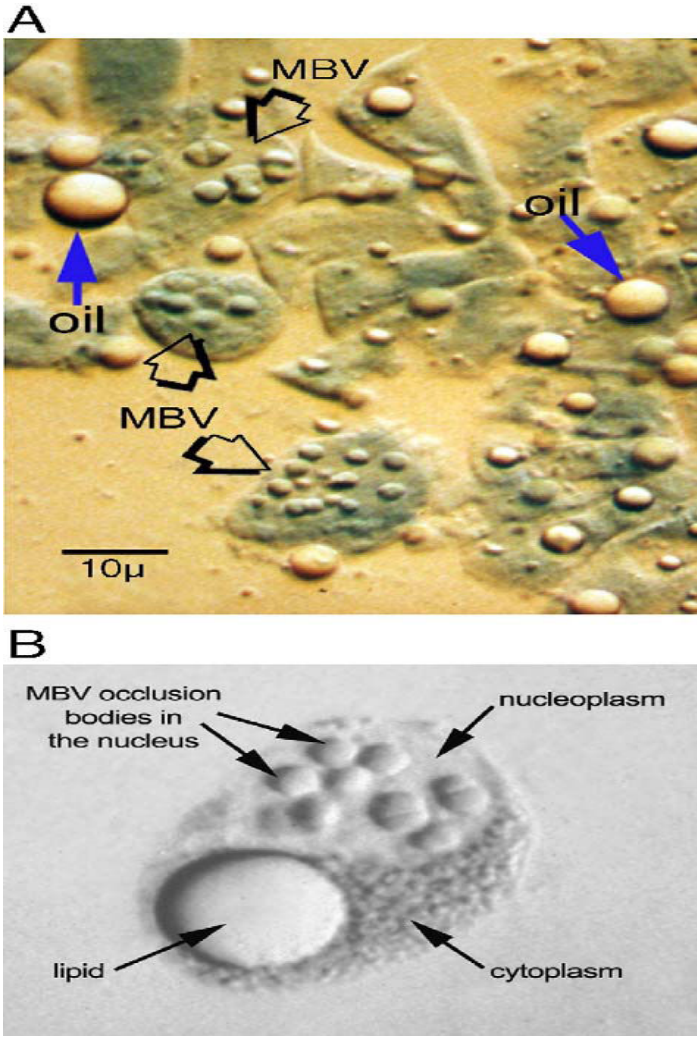
تصویر ٦- مقایسه طول میگوها با سطح عفونت به ویروس های MBV,HPV یا عفونت توام MBV و HPV (عفونت همزمان) کوتاه ترین طول میگوها مربوط به میگوهای دارای عفونت HPV و یا میگوهای دارای عفونت توام MBV و HPV می باشد و طولانی ترین آنها مربوط به میگوهائی است که فاقد عفونت می باشند.ستون هائی که با حروف متفاوت نشان داده شده اند بیانگراین است که این ستون ها دارای تفاوت معنی داری با بقیه می باشد.

روش های تشخیص:

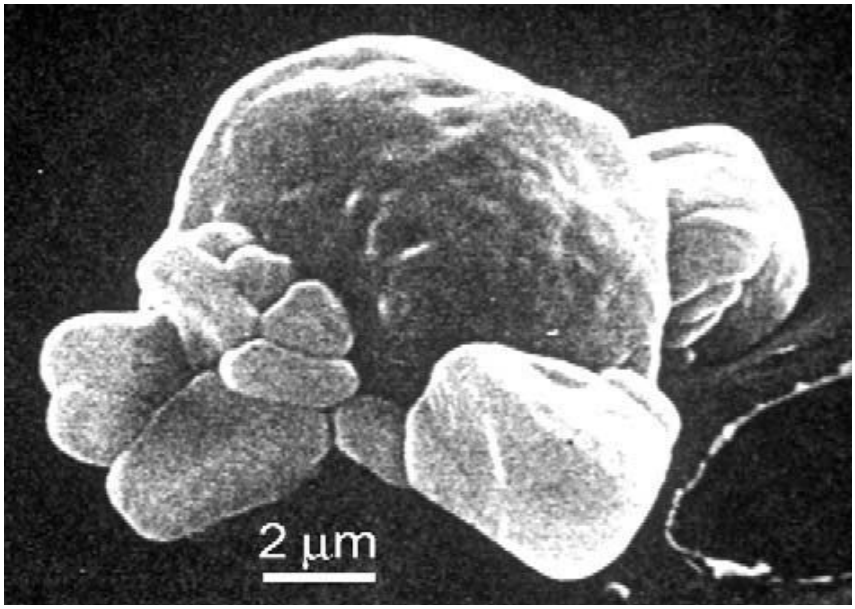
هیستوپاتولوژی

این بیماری به آسانی از طریق تهیه لام مرطوب از بافت هپاتوپانکراس پست لاروها و با استفاده از رنگ آمیزی مالاشیت گرین قابل تشخیص است. در این روش گنجیدگی های چندوجهی در درون هسته های هیپرتروفی شده به رنگ سبز در می آیند. در مقایسه قطرات مدور چربی، رنگی به خود نمی گیرند. گنجیدگی ها شامل یک ماتریکس پروتئینی به نام پلی هیدرین بوده که ذرات ویروسی به آن می چسبند. به این دلیل که این ذرات پروتئینی نزدیک و چسبیده به ذرات ویروسی بوده وبه عنوان محافظ آنها عمل می کنند گاها به آنها اجسام اکلوژن (occlusion body) می گویند. این ذرات ویروسی از طریق مدفوع میگو در محیط آزاد شده و بوسیله سایر لاروها بلعیده می شود به طوری که عفونت از طریق انتقال افقی به راحتی گسترش می یابد این ذرات ویروسی را می توان از طریق سانتریفیوژ جداسازی کرده و در تصویر میکروسکوپ الکترونی به صورت ذرات جامد چند وجهی مشاهده کرد. از این روش می توان برای خالص سازی ویروس و استخراج اسید نوکلئویک استفاده کرد.

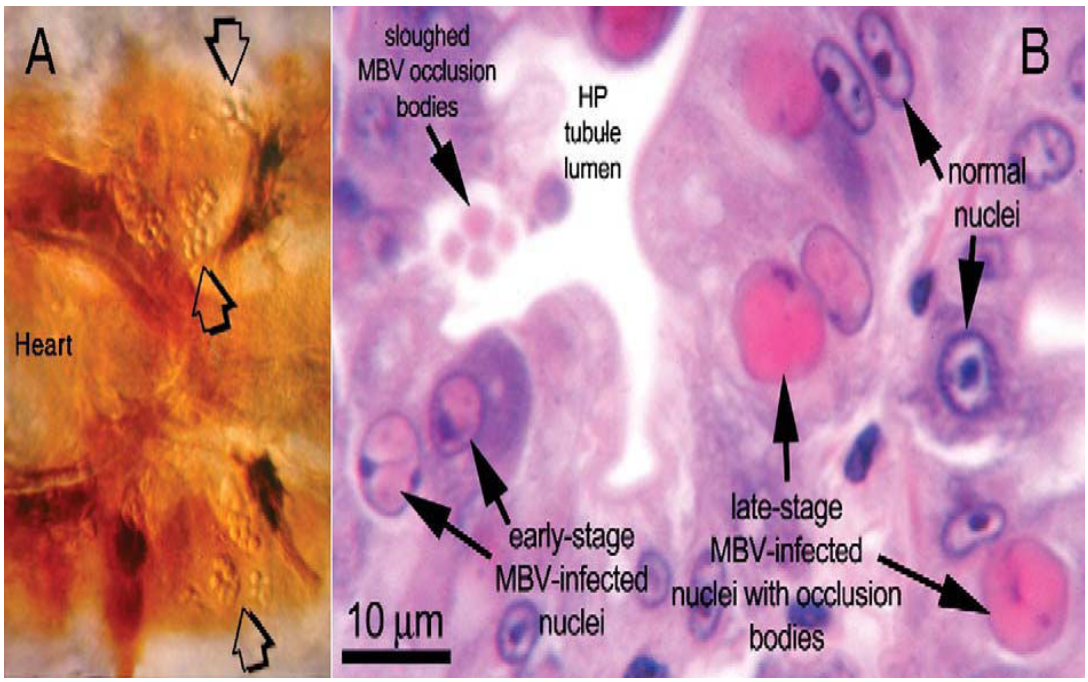
گنجیدگی های ویروس را می توان بطور مستقیم با استفاده از میکروسکوپ نوری از ورای کوتیکول پست لارو های با سن پائین و با بزرگنمائی ٤٠× مشاهده کرد. در مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با هماتوکسلین و ائوزین (H&E) هسته سلول ها در مراحل اولیه عفونت متورم شده و دارای یک مرکز اسیدوفیلیک (قرمز رنگ) با هستک های بازوفیلی (آبی رنگ) و کروماتین متمرکز در اطراف غشای هسته هستند. در مراحل انتهائی عفونت هسته ها کاملا متورم شده و دارای گنجیدگی های پروتئینی پاراکریستالین اسیدوفیلیک (قرمز رنگ) می شود (این گنجیدگی ها اکلوژن بادی نیز خوانده می شود) متعاقباً وقتی که سلول های عفونی شده پاره می شوند این گنجیدگی ها به داخل فضاهای لوله ای هپاتوپانکراس ریخته و وارد مدفوع شده تا به عنوان یک عامل بالقوه برای انتقال افقی عفونت عمل کنند.



تصویر۱ – Aاسلاید مرطوب از بافت هپاتوپانکراس (HP) تهیه شده از پست لارو میگوهای P. monodon که اجسام گنجیدگی چندوجهی (پیکان های بزرگ) را درهسته های بزرگ شده نشان می دهد این گنجیدگی ها را می توان با قطرات چربی دایره ای بدون رنگ (پیکان های کوچک) مقایسه کرد . B یک سلول هپاتوپانکراس با تعدادفراوانی اجسام اکلوژن در داخل هسته و یک قطره درشت تکی چربی



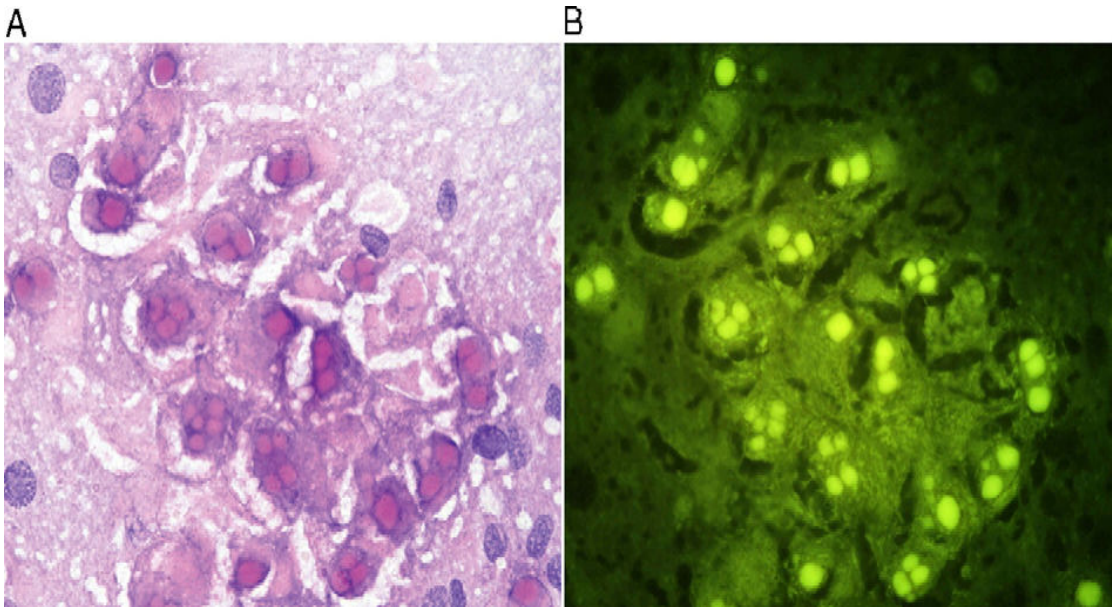
تصویر ۲ – عکس میکروسکوپ الکترونی از اجسام گنجیدگی مونودون باکلو ویروس



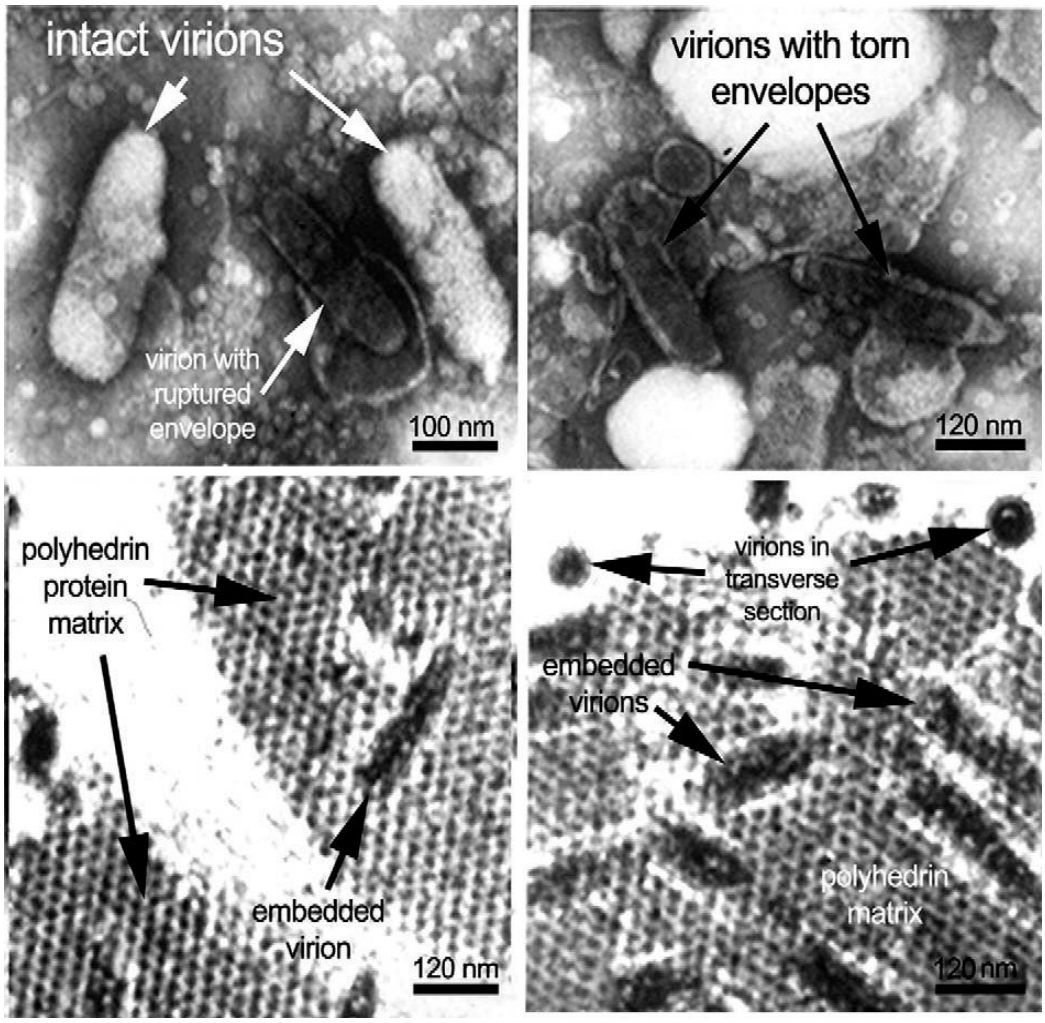
تصویر ۳- فتومیکروگراف از ویروس (A) گنجیدگی های ویروسی را می توان به آسانی مستقیما از ورای کوتیکول نمونه های پست لارو با سن پائین با استفاده از میکروسکوپ نوری و با درشت نمائی ٤٠ مشاهده کرد (B) فتومیکروگراف از یک اسلاید بافتی رنگ آمیزی شده با (H&E) در این اسلاید مراحل مختلف عفونت را از مراحل ابتدائی تا انتهائی نشان می دهد .به چهار اکلوژن بادی رها شده در مجرای لوله هپاتوپانکراس دقت شود.

از طریق رنگ آمیزی H&E همچنین به آسانی می توان ذرات اکلوژن را در اسمیرهای بافتی تهیه شده از هپاتوپانکراس میگوهای پرورشی داخل استخرها تشخیص داد.اسمیرها را می توان به روش ذیل تهیه کرد :

یک قطره از محلول نمک طعام ۲/۸ ٪ حاوی ۱۰٪ فرمالین را روی یک اسلاید میکروسکوپی قرار می دهیم سپس یک قطعه از بافت هپاتوپانکراس را داخل آن له کرده و گسترش تهیه می کنیم بعداز اینکه گسترش ها خشک شدند اسمیرها را به روش متداول H&E رنگ آمیزی می نمائیم از طریق میکروسکوپ نوری معمولی اکلوژن های ائوزینوفیلیک MBV به وضوح قابل مشاهده هستند همچنین این ذرات به آسانی از طریق میکروسکوپ فلورسنت هم قابل مشاهده هستند .



تصویر ٤- فتومیکروگراف اکلوژن بادی های *MBV* در یک اسمیر تهیه شده از بافت هپاتوپانکراس یک میگوی جوان بوسیله میکروسکوپ نوری (*A*) و میکروسکوپ فلورسانس (*B*)



تصویر ٥- عکس میکروسکوپ الکترونی از *MBV* تصویر سمت بالا چپ ویرون های کامل را نشان می دهد – بالا سمت راست ویرون پاره شده و نوکلئوکپسید درون آن اشکار شده است . تصاویر سمت چپ و راشت پائین مقاطع نازک بافتی را نشان می دهد که ویریون های میله ای شکل درون یک ماتریکس پروتئنی از جنس پلی هیدرین قرار گرفته اند.

روش های مولکولی:

اولین گزارش تشخیص ویروس MBV به روش PCR از استرالیا بود توالی پرایمر مورد استفاده در این آزمایش شبیه پرایمر گزارش شده از تایوان نبود. هر دو پرایمر براساس مناطق حفاظت شده ژن تولید کننده پروتئین پلی هیدرین طراحی شده بودند .پرایمر تولید شده در تایوان باعث ایجاد قطعه DNA به وزن ٦٠٠ bp از ویروس MBV می شود به علاوه این پرایمرها برای تولید قطعاتی از DNA به وزن٦٠٠ bp به عنوان یک پروب DNA برای آزمایشات Dot blot hybridization و In situ hybridization مورد استفاده قرار می گیرند به هر حال تجارب نشان داده است که پرایمرهای تایوانی با ویروس های MBV جدا شده از استرالیا و تایلند واکنشی نشان نمی دهند. یک روش بسیار حساس Nested PCR که برای جداسازی ویروس MBV در تایلند و استرالیا کاربرد دارد در استرالیا طراحی شده است پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش از یک قطعه DNA کلون شده به دست آمده از ویروس MBV خالص سازی شده است. دو محصول PCR به دست آمده یکی۵۳۳ bp و دیگری361 bp بودند و حساسیت تست بسیار بالا بود به نحوی که می تواند۰,۰۱ fg DNA ویروس MBV را در یک مخلوط که حاوی DNA پست لاروها باشد ردیابی کند توالی پرایمر مورد استفاده شامل :

1st round sense: 5′-CGA TTC CAT ATC GGC CGA ATA-3′

1st round antisense: 5′-TTG GCA TGC ACT CCC TGA GAT-3′

2nd round sense: 5′-TCC AAT CGC GTC TGC GAT ACT-3′

2nd round antisense: 5′-CGC TAA TGG GGC ACA AGT CTC-3′

در تایلند کار بر روی MBV در حد کمی ادامه پیدا کرد. پروب Belcherو Young برای جداسازی موفقیت آمیز ویروس در مدفوع با استفاده از تکنیک Dot-blot DNA hybridization و PCR مورد استفاده قرار گرفت با استفاده از این تکنیک ها نیازی به از بین بردن و یا آسیب رساندن به مولدین ویا میگوهای پرورشی درون استخرها نمی باشد.

مطالعاتی بیشتری لازم است که بر روی ژنوم MBV بالاخص در زمینه آنالیز مقایسه ای بین آن و NPV حشرات (در حال حاضر اطلاعات بیشتری در خصوص آن وجود دارد) صورت بگیرد. با این مطالعات فهم بهتری از ارتباط بین ژنوم ویروس MBV و ژنوم میزبان یعنی میگو به دست می آید

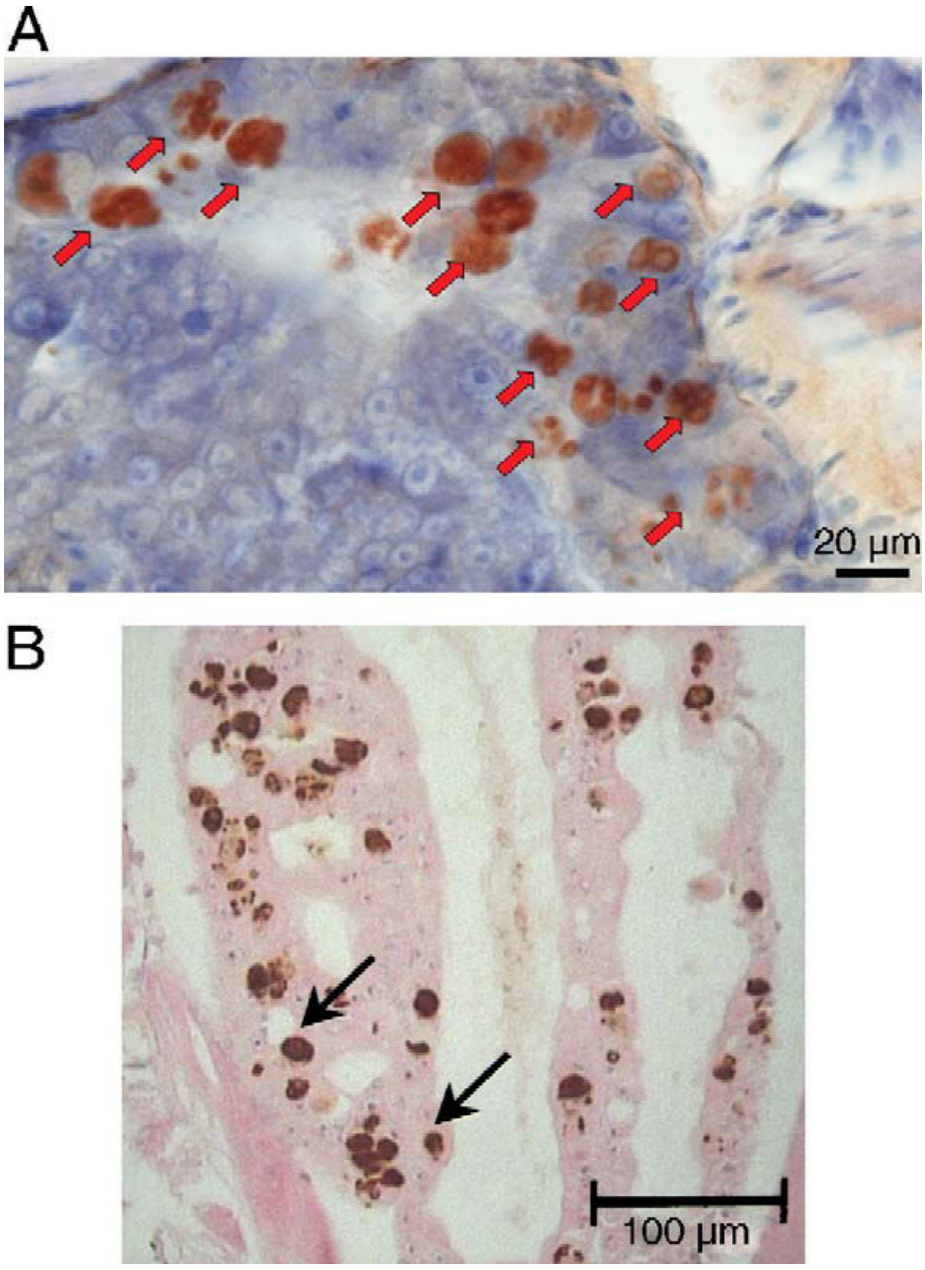
روش های مبتنی بر آنتی بادی:

در تایلند اخیرا پروتئین پلی هیدرین را از ویروس MBV خالص سازی و توالی آمینواسیدهای آن را از سرنیتروژنی به دست آورده اند.

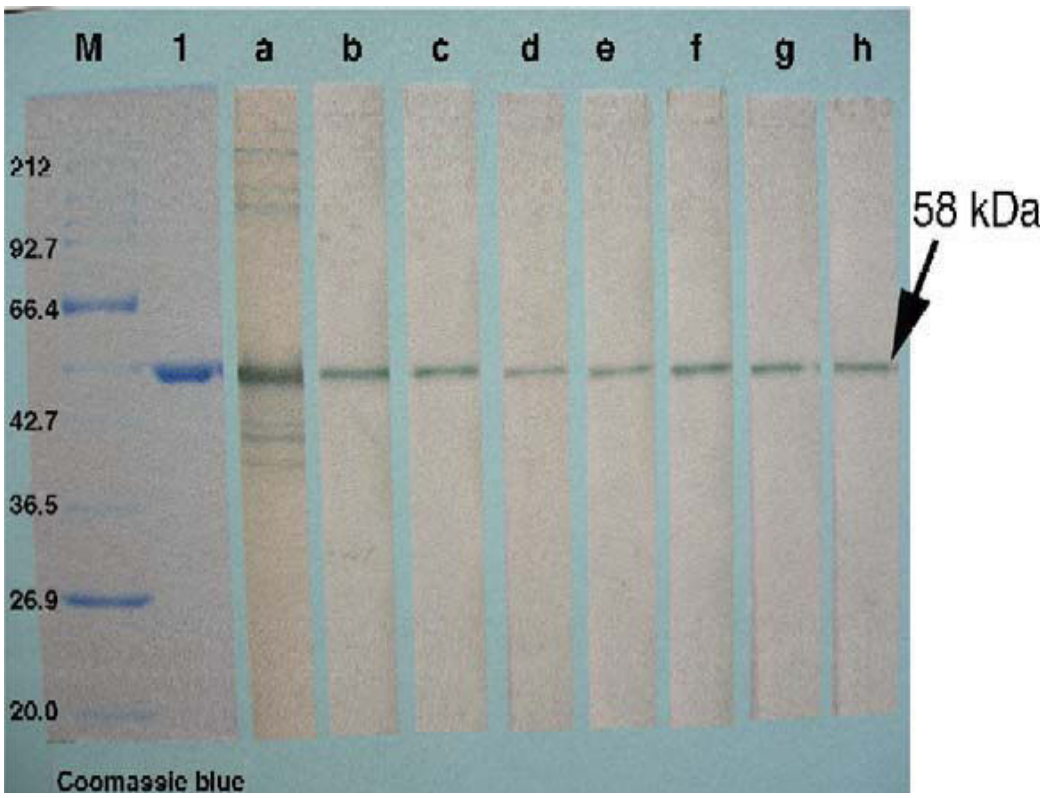
این توالی شامل :

M F D D S M M M E N M D D L S G D Q K M V L T L A

این توالی با توالی اسیدآمینه های پروتئین MBV گزارش شده از تایوان متفاوت بود اما یک پپتید سنتزی از این توالی به طور موفقیت آمیزی برای تولید آنتی بادی مونوکلونال که برای تشخیص پلی هیدرین MBV در آزمایشات ایمینوهیستو شیمی اختصاصی عمل می کند، مورد استفاده قرارگرفت. با استفاده از همان نوع پلی هیدرین خالص سازی شده هم اینک ۷ نوع مونوکلونال آنتی بادی تولید شده که به خوبی با پلی هیدرین موجود در مقاطع بافتی اتصال برقرار می کنند.



تصویر ۷ – ردیابی ویروس MBV با استفاده از تکنیک ایمینوهیستوشیمی در بافت های هپاتوپانکراس با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال (A) و یک آنتی بادی مونوکلونال (B) برعلیه پروتئین پلی هیدرین



تصویر ۸ – وسترن بلوت اختصاصیت ۷ مونوکلونال آنتی بادی (MAB) را بر علیه پلی هیدرین MBV نشان می دهد ستون M: نشان گر مولکولی (KDa)- ستون ۱ : پلی هیدرین نیمه خالص به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرارگرفته است – ستون a:وسترن بلوت با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال بر علیه آنتی ژن – ستون های b تا h: مونوکلونال آنتی بادی های اختصاصی بر علیه پلی هیدرین MBV (Boonsanongchokying, 2005)

آنتی بادیها علاوه بـر روش هـای ایمینوهیـستوشیمی ، در آزمایـشات Immuno dot-blot و Western blot برای تشخیص پلی هیدرین MBV نیز کاربرد دارند . جای امیدواری است که ایـن آنتـی بـادی هـا در تهیـه نوارهای آزمایش Lateral flow chromatographic بـرای تـشخیص MBV بـه صـورت فـوری و در کنـار استخرها نیز مورد استفاده قرار بگیرند.

از آنجائی که MBV مثل ویروس سندرم لکه سفید WSSV و HPV یـک ویـروس دارای DNA مـی باشد می توان توصیه کرد که یک روش PCR چندتائی که قادر به تشخیص هر ترکیبی از این ویـروس هـا در DNA استخراج شده از پست لارو ها باشد مورد استفاده قرارگیرد .

با توجه به اینکه پست لاروها در تایلند به طـور مـنظم جهـت ردیـابی ویـروس WSSV بوسـیله PCR آزمایش می شوند به نظر می رسد ردیابی این سه ویروس در یک آزمایش PCR می تواند یک کار ارزنـده باشـد. در واقع هم اینک به صورت تجاری کیت هـای چندگانـه بـرای ویـروس هـای مختلـف میگـو در شـرکت هـای DiagXotics (Wilton, CT, USA) و Farming Intelligene, Taipei, Taiwan و Shrimp Biotechnology Business Unit (SBBU), National Science Park ,Pathumthani, Thailand در دسترس می باشد .

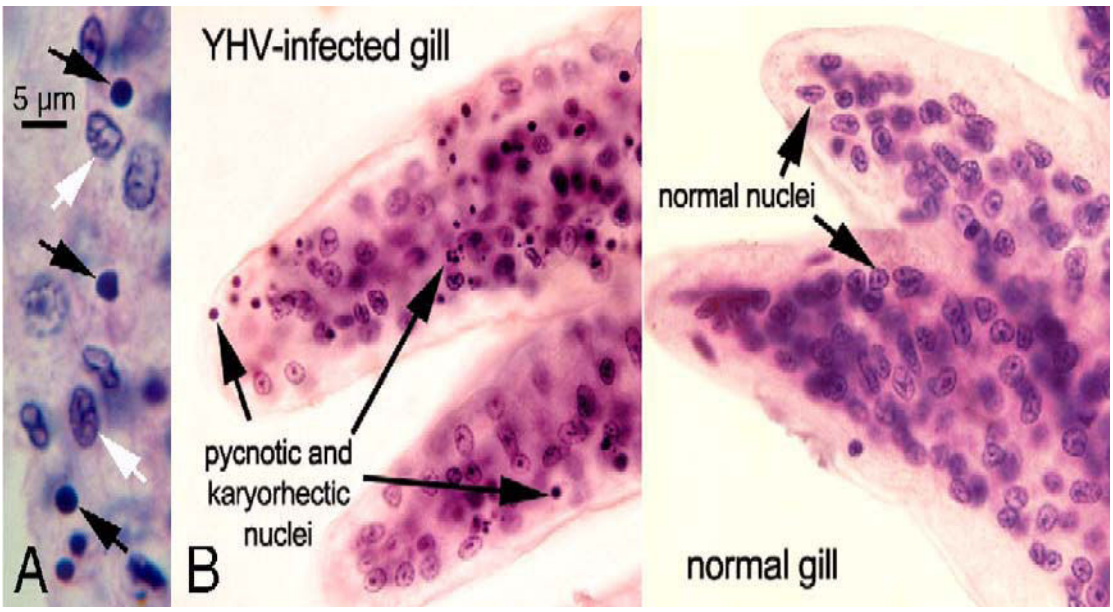
۳- Yellow – head virus (YHV)

کلیات:

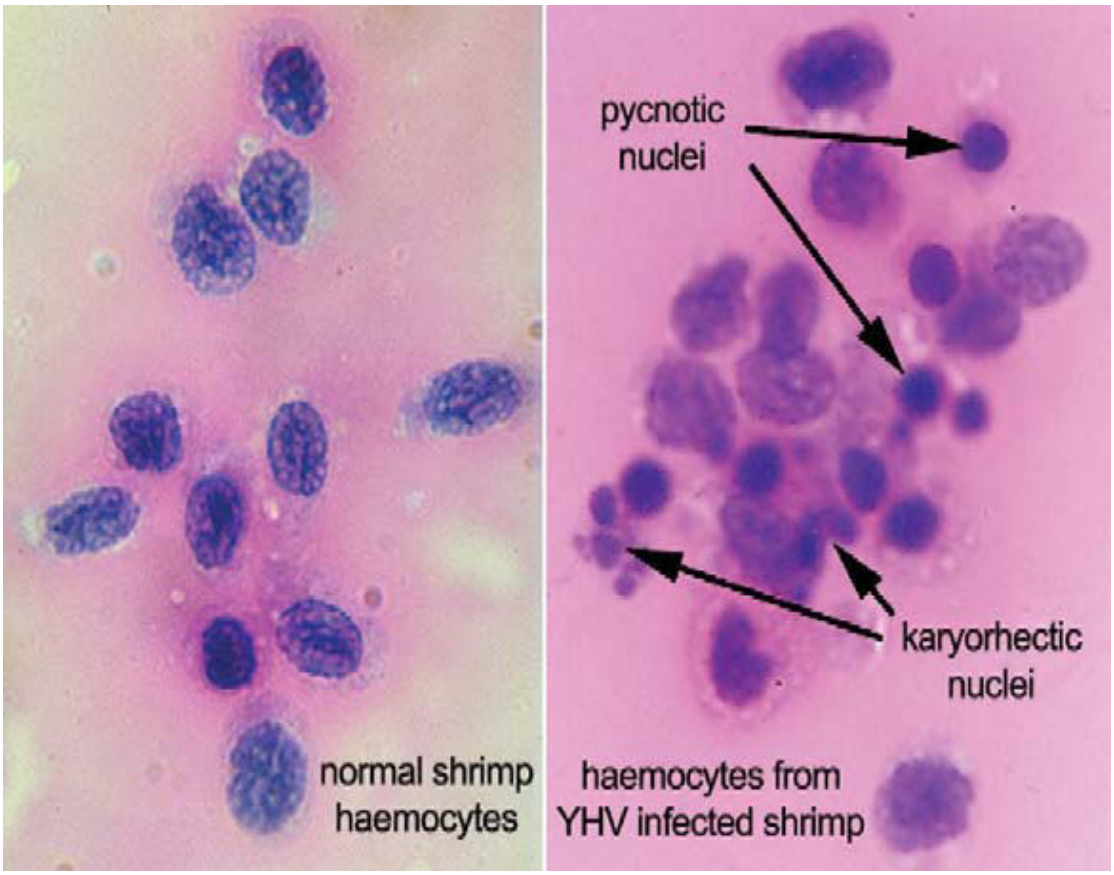
کار بر روی MBV با حضور اولین پاتوژن جدی ویروسی میگو در تایلند در سال ۱۹۹۲ قطع گردید. در مطالعات گذشته نگر مشخص شد که ویروس کله زرد (YHV) در سال ۱۹۹۰ در تایلند باعث مشکلاتی شده بود ولی تا سال ۱۹۹۲ به عنوان یک پاتوژن جدید شناخته نشده بود. این ویروس بر اساس علائم کلینیکی بیماری که شامل سفالوتوراکس زرد و بی رنگی سراسری بدن میگوهای مبتلا و در حال مرگ می باشد نامگذاری گردید.

هیستوپاتولوژی در عفونت کله زرد را می توان به راحتی بوسیله حضور گنجیدگی های به شدت بازوفیلیک بالاخص در رنگ آمیزی H&E مقاطع آبشش و یا در آبشش کامل به سرعت رنگ آمیزی شده و یا بوسیله رنگ امیزی اسمیرهای همولنف تشخیص داد. اسمیرها در مراحل ابتدائی عفونت مفید هستند و در ادامه بیماری به دلیل تخلیه جمعیت هموسیت ها بوسیله ویروس فاقد ارزش می شوند. با توجه به شباهت پراکندگی هسته های هموسیت ها در بیماری کله زرد و بعضی از بیماری های باکتریائی بایستی قبل از تائید تشخیص YHV مطمئن شویم که هیچ باکتری در اسمیرها وجود ندارد .

تصویر ۹ – علائم کلینیکی عفونت کله زرد در سه میگوی سمت راست نشان داده شده است .این میگوها به طور معمول رنگ پریده شده و ناحیه سفالوتوراکس (سر) به رنگ زرد تغییر رنگ یافته است اینها با میگوهای سالم در سمت چپ که دارای یک ظاهر سالم هستند مقایسه شوند(Chantanachookin et al., 1993)



تصویر ۱۰ – آبشش ها ی آلوده به ویروس YHV رنگ آمیزی شده با H&E در مقاطع تهیه شده معمولی در پارافین (A) و در مقاطع سریع ثابت و رنگ شده (۳ ساعت) بافت له شده (B)گنجیدگی های ارغوانی متراکم (بازوفیلیک) که به طور واضحی از هسته های معمولی که بزرگ تر بوده و کروماتین به طور یکسان رنگ گرفته اند قابل تفکیک هستند.



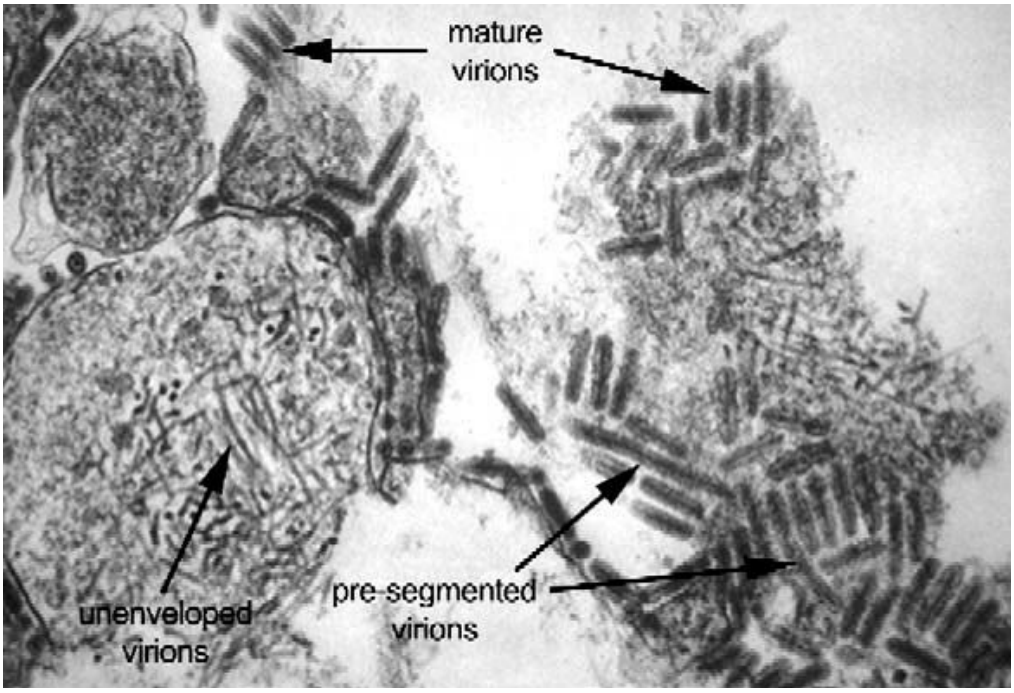
تصویر ۱۱– اسمیر تهیه شده از همولنف میگوهای سالم و میگوهای آلوده به ویروس YHV – تجزیه و تخریب هسته سلول های آلوده به ویروس YHV مشخص می باشد

میکروسکوپ الکترونی :

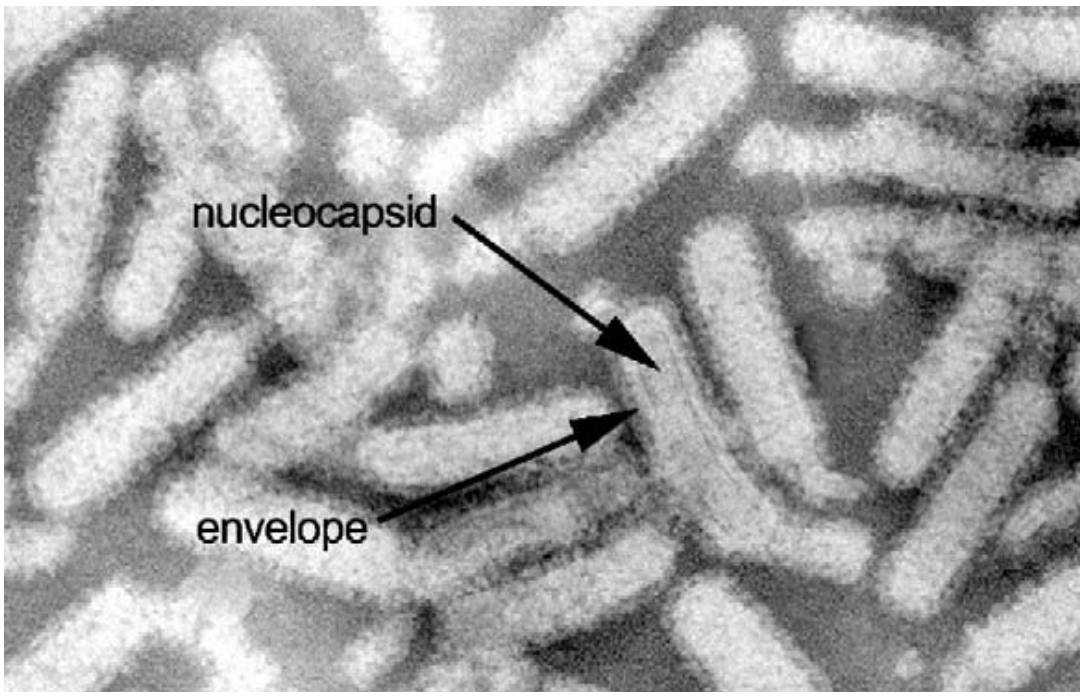
در ابتدا ویروس کله زرد را به عنوان یک باکلوویروس می شناختند ولی بلافاصله با توجه به خالص سازی ویروس و براساس خصوصیات مورفولوژیکی، به عنوان یک ویروس جداگانه شناسائی شد. در مطالعات میکروسکوپ الکترونی مقاطع نازک بافتی، حضور نوکلئوکپسید رشته ای غیر معمول و ویریون های پوشش دار، میله شکل، بالغ و بسیار کوتاه یافت می شود. از طریق رنگ آمیزی منفی ذرات ویروس به صورت پوشش دار همراه با یک هاله انتهائی که مشخصه تعدادی از ویروس های RNA دار می باشد خود را نشان می دهند.

روش های مولکولی:

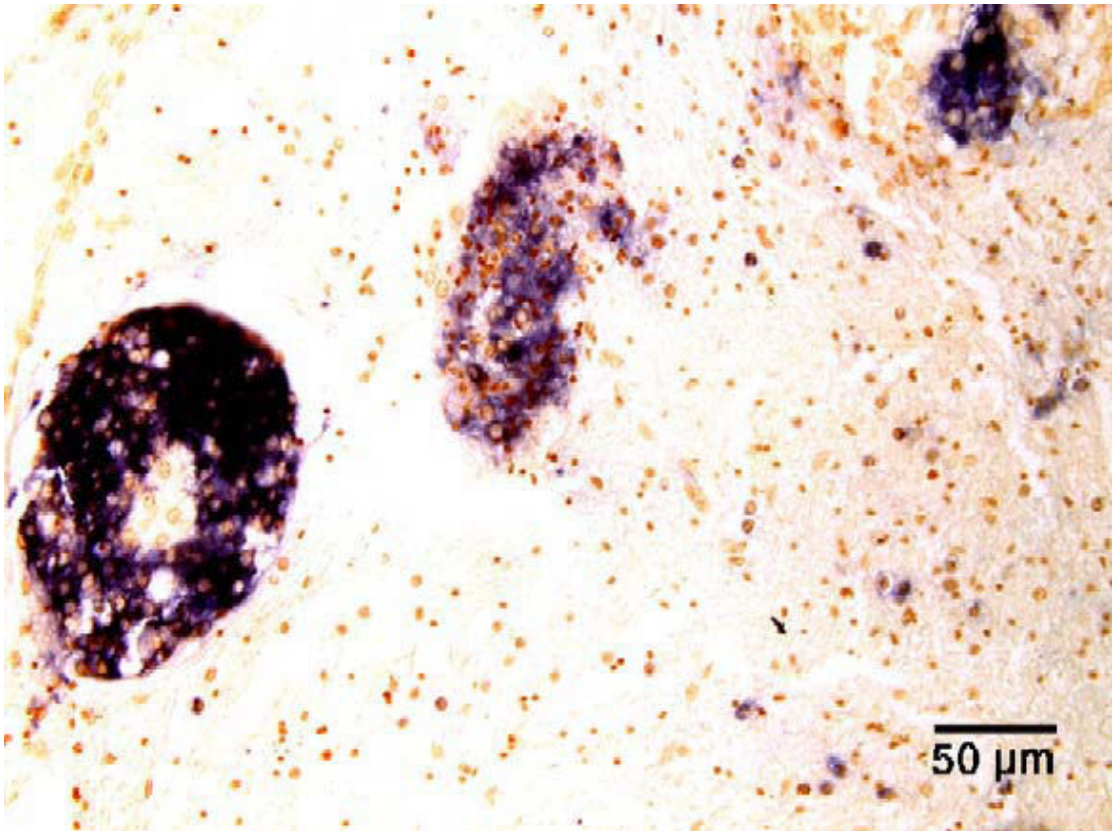
ژنوم ویروس شامل یک رشته RNA تکی (single – stranded RNA) با سنس مثبت می باشد تشخیص ویروس با استفاده از روش RT-PCR بهتر از روش In situ hybridization است که احتمالا به دلیل ناپایدار بودن RNA ویروسی می باشد حتی در صورت استفاده از روش های RT- PCR نمونه ها بایستی به سرعت آماده سازی شوند زیرا نگهداری نمونه ها در ۸۰- درجه سانتی گراد نیز نمی تواند تخریب RNA را متوقف کند.



تصویر ۱۲- عکس میکروسکوپ الکترونی از یک بافت آلوده به ویروس YHV نشان دهنده نوکلئوکپسیدهای غیر معمول رشته ای (در سمت چپ) و ویریون های بالغ میله ای شکل پوشینه دار(در سمت راست) می باشد.



تصویر ۱۳- عکس میکروسکوپ الکترونی از ویریون های خالص YHV با رنگ آمیزی منفی



تصویر ۱٤- ردیابی ویروس حاد YHV در یک جسم کروی اکتوپیک در بافت پیوندی نزدیک پریوپود در میگوی پنئوس مونودون با استفاده از تکنیک In situ hybridization .

سکانس امپلی کون (amplicon) اولیه PCR و پرایمرهای مشخص شده بـرای جداسـازی ویـروس YHV در عفونت های میگو از طریق روش RT- PCR به شرح ذیل است :

CCG CTA ATT TCA AAA ACT ACG ACA GAA ACA CCG GCA TGT CCT GTT CTC TCA CTG AAT TCC AGC TCT CTC TCT CTC ACA TCC TCT ACC GTT CTG AAG CAC AGC GTA CTC CTG ACG ACT TCC TCG ACA TAA CAC CTT

این قطعه ژنوم را می توان بعد از نشاندار کردن برای تکنیک های Dot blot و یا In situ hybridization مورد استفاده قرار داد .مشکلات موجود با این دو تکنیک این است که RNA ویروسی بـسیار ناپایـدار بـوده ودر خلال تهیه مقاطع بافتی می بایست از آن محافظت کرد. برای تکنیک In situ hybridization این نکتـه مهـم را باید به یاد داشت که ماده ثابت کننده دیودیسون (Dividson) را نبایستی برای مدت طولانی ویا به صورت کامـل مورد استفاده قرار داد. این ماده فقط بایستی یک شبانه مورد استفاده قرار گیرد (نمونه ها فقط یک شب در این مـاده نگهداری شوند) و پس از نمونه ها بلافاصله آبگیری و قالب گذاری شوند. جایگزین دیویدسـون یـک مـاده ثابـت کننده دیگری است که دوستدار RNA بوده و قبلا ترکیب آن گزارش شده است. در این ماده اسید استیک موجـود در ماده ثابت کننده دیودسون با مقادیر بیشتری از فرمالین جایگزین می شود. این ماده برای بافت هائی از میگو کـه کوتیکول روی آنها برداشته شده است کاربرد دارد نمونه ها یک شب بعد از فیکس کردن بلافاصله در پارافین قالب بندی شده و بعد از این مرحله تا قبل از انجام هیبریداسیون در تست In situ hybridization می تـوان آنهـا را برای مدت طولانی نگهداری کرد لیکن بعد از آبگیری از مقاطع بافتی نمونه ها به حمله آنـزیم RNase بـه شـدت حساس شده و باید احتیاطات لازم جهت محافظت آنها به عمل آید .در یـک روش مـا درمحلـول دیویدسـون بـه جای اسید استیک از آب مقطر به عنوان جایگزین استفاده کردیم و به نظر می رسید جواب مناسبی می دهد.

پروب ساخته شده توسط Tangو Lightner به وزن bp ۱۰۵۱ است که با ماده digoxygenin نـشان گذاری شده است این پروب از یک کلون cDNA به وزنkb ۱۰۶۱ مشتق شده که بـا اسـتفاده از PCR از روی این کلون الگو برداری شده است. پرایمرهای مورد استفاده برای این کار شامل :

Sense: 5′-ACA TCT GTC CAG AAG GCG TC-3′

Antisense: 5′-GGG GGT GTA GAG GGA GAG AG-3′

آنها همچنین با استفاده از همین رشـته cDNA پرایمرهـائی را بـه دسـت آوردنـد کـه بـرای تولیـد یـک آمپلیکون اختصاصی YHVبه وزنkb ۲۷۳ برای آزمایشات RT-PCR کاربرد دارد.

Sense: 5′-CAA GAT CTC ACG GCA ACT CA-3′

Antisense: 5′-CGA CGA GAG TGT TAG GAG G-3′

پروب دیگری نیز برای آزمایشات In situ hybridization مورد استفاده قرار گرفت که نتایج خوبی را هم برای جداسازی GAVو هم برای فرم های حدت دار و هم بدون حدت YHV به دست آورد. این پروب شامل یک قطعه DNA به وزنbp ۷۹٤ نشان دارشده که از طریق RT-PCR و با استفاده از سویه های حدت دار YHV از تایلند به عنوان الگو و با نشان دار کردن ناحیه ORF به وزنb ۱ از ژنوم ویروس تولید شده است.پرایمرهای مورد استفاده شامل :

Sense: 5′-GAC ATC ACT CCA GA-3′

Antisense: 5′-GTG AAG TCC ATG TGT GTG AGA-3′

علاوه بر این مواد Cowley و همکاران در سال ۲۰۰۰ سکانس پرایمری را منتشر کردند که می توانست هم برای جداسازی YHV و هم ویروس ارگان های لنفاوی (LOV) جدا شده از استرالیا و هم ویروس Gill Associated Virus (GAV) مورد استفاده قرار گیرد این پرایمرها از یک کلون cDNA به وزن bp ۷۸۱ به دست آمده و در واکنش RT-PCR تولید یک محصول به وزنbp ٦۱۸ می نمایند این پرایمرها به شرح ذیل هستند:

Sense: 5′-AAC TTT GCC ATC CTC GTC AC-3′

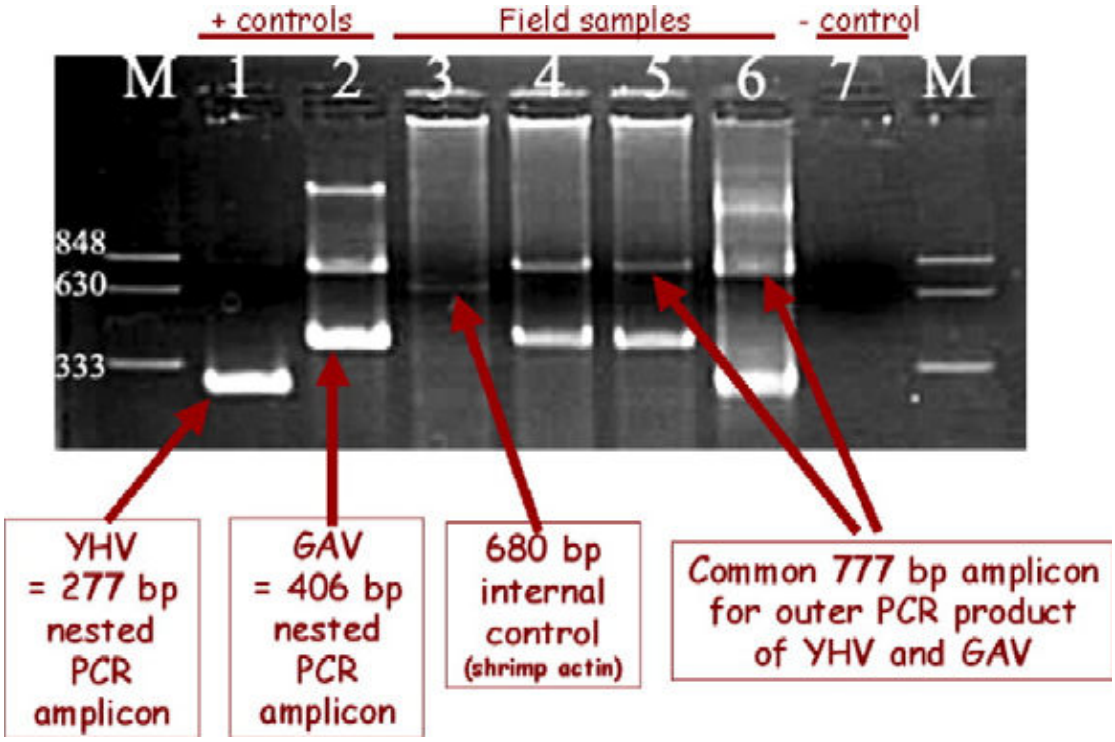
Antisense: 5′-TGG ATG TTG TGT GTT CTC AAC-3′

مطالعات صورت گرفته در تایلند با همکاری دکتر پیتر واکر از CSIRO استرالیا براساس سکانس و مقایسه قطعاتbp ٦۱۸ به دست آمده در آزمایش RT-PCR با استفاده از این پرایمرها برروی ویروسهای YHV ، GAV ، LOV نشان داده است که همه ویروس ها دارای ژنوم RNA تک رشته ای با sense مثبت بوده و بسیار به هم نزدیک هستند و امروزه در یک جنس جدید تحت عنوان Okavirus و در یک خانواده جدید تحت عنوان Ronivirdae و راسته Nidovirales قرار دارند. LOV و GAV دارای تقریبا ۹۵٪ شباهت سکانس DNA و ۱۰۰٪ شباهت سکانس آمینواسیدها می باشند. براساس تشابهات آمینواسیدها مشخص گردید که این دو یک نوع ویروس هستنددر حالی که GAV و YHV تقریبا دارای ۸۵٪ شباهت سکانس DNA و ۹٦٪ شباهت سکانس آمینواسیدها می باشند این موضوع نشان می دهد که این دو از هم متفاوت هستند.

یک کیت تجاری RT-PCR بر اساس مطالعات صورت گرفته در تایلند و استرالیا در شرکت Farming Intelligene در کشور تایوان در دسترس می باشد این کیت RT- PCR جداسازی تفریقی و درجه بندی شده ای را برای ویروس های GAV و YHV به دست می آورد

مطالعات مشترک صورت گرفته در استرالیا و تایلند اخیرا چندین سویه YHV به ظاهر غیر پاتوژن را در ویتنام، تایلند، هند و بعضی جاهای دیگر تشخیص داده است. با استفاده از کیت تشخیصیPCR شرکت Farming Intelligene یکی از این سویه های غیر پاتوژن جدا شده از ویتنام و تایلند باندهای رسوبی مشابه ای

با باندهای ویروس GAV استرالیائی داد بنابراین این سویه دارای سکانس های مشابه ای با ویروس GAV می باشد این در حالی است که سویه غیربیماری زای دیگری در تایلند نتایج متفاوتی را در استفاده با این کیت به دست داد بنابراین با استفاده از این کیت و در یک روش تعریف شده می توان تفاوت بین انواع سویه های YHV را در مناطق جغرافی مختلف تشخیص داد. متاسفانه این کیت برای تشخیص ویروس های YHV جدا شده در هند مناسب نمی باشد. همچنین این پروب های RT-PCR برای آزمایش حاملین احتمالی ویروس YHV که قادر به انتقال ویروس به سایر میگوهای پرورشی هستند مناسب می باشد نتیجه چنین اقداماتی اثر عمده ای را بر روی برنامه کنترلی بیماری های میگوهای پرورشی خواهد داشت.



تصویر ۱۵- نتایج به دست آمده از کیت Farming Intelligene *برای ردیابی YHV و GAV ، باند کنترل داخلی به جز در موارد آلودگی بسیار خفیف میگوها یا در نمونه های میگوهای سالم به ندرت دیده می شود. یک ویروس بدون حدت جدا شده از تایلند و یک ویروس بدون حدت جدا شده از ویتنام دارای باندهای یکسانی مشابه ویروس GAV هستند (در ستون های ۲و۴و۵ نشان داده شده است). یک نوع ویروس حدت دار متفاوت دیگر در تایلند فقط یک باند bp۷۷۷ با واکنش pcr اولیه ایجاد کرده و فاقد محصول در Nested PCR است .*

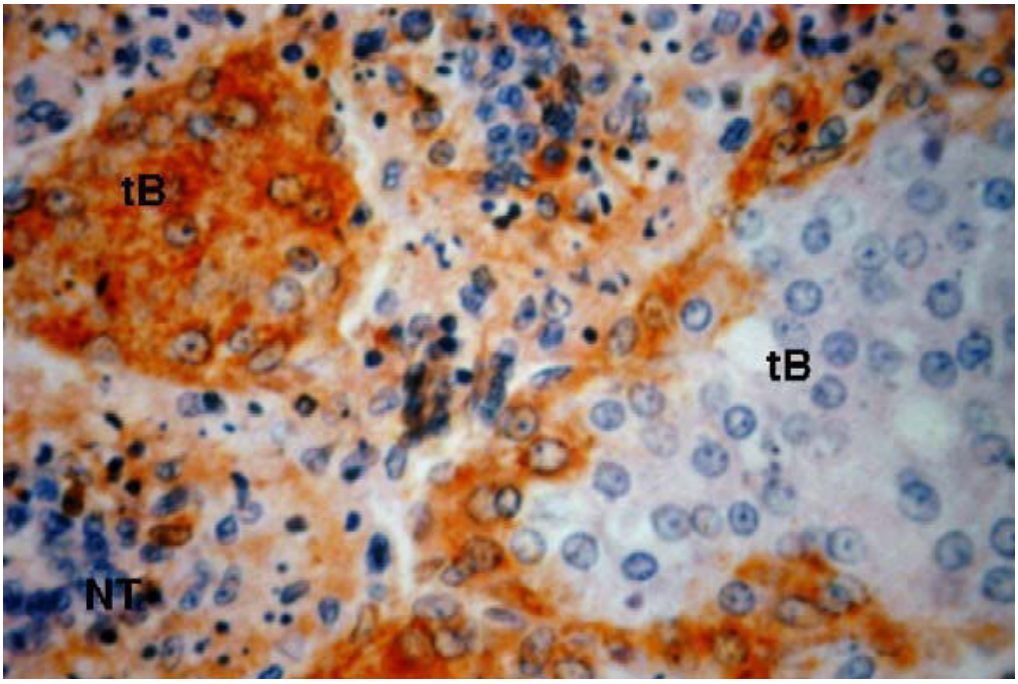
گروه دکتر واکر یک محلول عالی نگهدارنده را برای نگهداری نمونه های فیلد تولید کردند این محلول شامل ۸۰٪ اتانول ، ۲۰٪ گلیسرول و ۰۲۵/٪ مرکاپتواتانول است (این محلول از طریق مخلوط کردن ۸۰ میلی لیتر اتانول مطلق، ۲۰ میلی لیتر گلیسرول خالص و ۲۵/میلی لیتر مرکاپتواتانول به دست می آید). نمونه های خرد و یا هموژنیزه شده در این محلول به نسبت ۱ قسمت نمونه به ۱۰ قسمت محلول نگهدارنده می تواند برای یک مدت

منطقی در دمای اتاق نگهداری شود. قسمت روئی این محلول به روش های معمول قبل از مرحله استخراج DNA یا RNA از بافت جداسازی می شود.

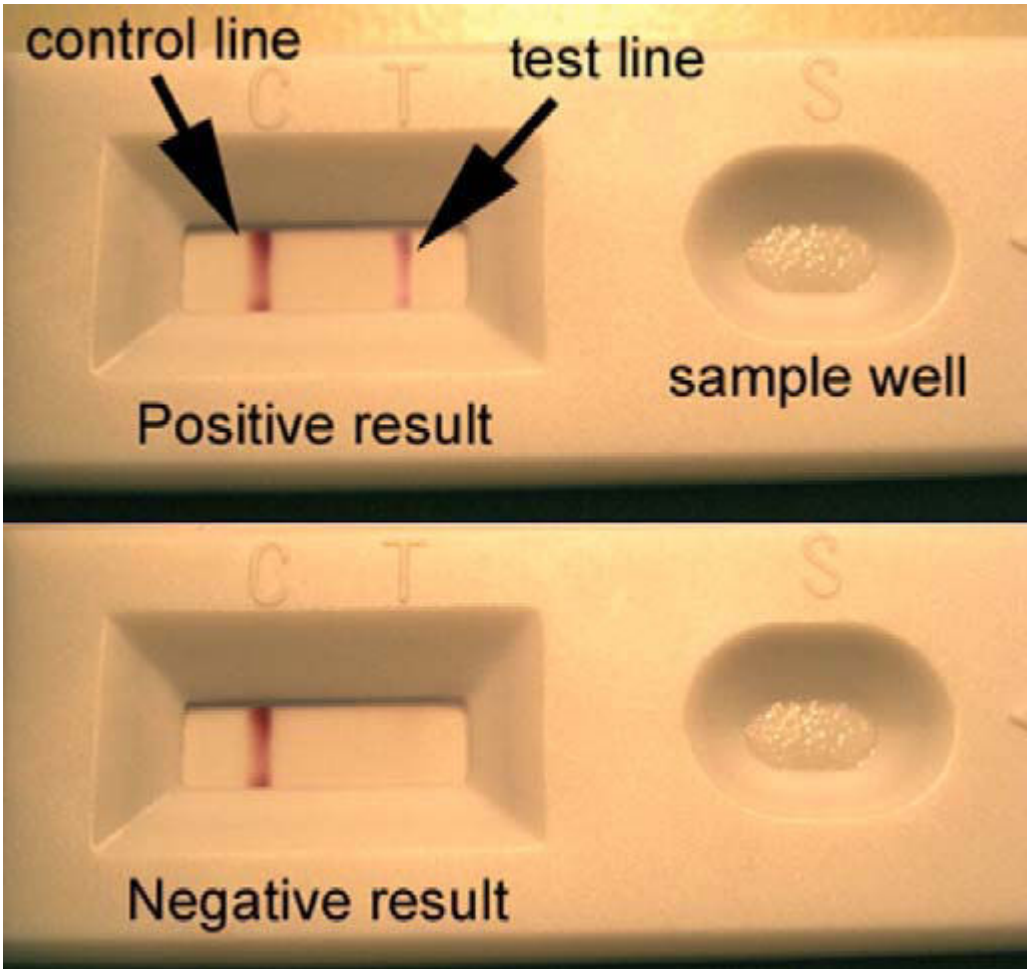
روش های مبتنی بر آنتی بادی:

علاوه بر آزمایشات وابسته به اسید نوکلوئیک روش های مونوکلونال آنتی بادی نیز برای تشخیص ویروس از طریق آزمایشات Immunohistochemistry و Dot blot assay و lateral flow chromatographic assay برای ویروس های گروه YHV ایجاد شده است روش آخری بسیار جالب است زیرا ارزان بوده و در کنار استخر از طریق پرورش دهندگان میگو قابل انجام می باشد.

نوارهای lateral flow از یک مونوکلونال آنتی بادی هیبریدومای موش که بر علیه پوشش پروتئینی gp116 ویروس YHV اختصاصی است، استفاده می کند. آنتی بادی نشان دار شده بر روی یک صفحه جاذب پوشیده شده با رشته های پلاستیکی و حد فاصل حفرات نمونه و خطوط آزمایش قرار داده می شوند. وقتی یک نمونه حاوی ویروس YHV در درون حفرات قرار می گیرد مایع به صورت جانبی در مسیر غشاء کروماتوگرافیک به طرف خط آزمایش جریان پیدا می کند و ویروس به آنتی بادی نشان دار شده می چسبد. وقتی کمپلکس ویروس – آنتی بادی به خط آزمایش می رسند اینها بوسیله یک خط ثابت شده ای از آنتی بادی های پلی کلونال در مقابل ویروس YHV به دام می افتند ودر آنجا تجمع یافته ویک خط قرمز تشکیل می دهند از طرفی مونوکلونال آنتی بادی های نشان دار شده با طلای اضافی و متصل نشده به طرف خط کنترل حرکت کرده و در آنجا بوسیله آنتی بادی های ضدآنتی بادی های موش به دام می افتند نتایج منفی زمانی به دست می آید که ویروس YHV در نمونه وجود نداشته باشد و همه مونوکلونال آنتی بادی ها در خط کنترل بوسیله آنتی بادی های ضد آنتی بادی موش به دام بیفتند.



تصویر ۱۶- بافت ارگان لنفوئیدی میگوی پنئوس مونودون آلوده شده به ویروس YHV و آزمایش شده جهت باند شدن ویروس با مونوکلونال آنتی بادی اختصادی ویروس YHV با استفاده از تکنیک ایمیونوهیستوشیمی . رنگ های قهوه ای نشان دهنده یک واکنش مثبت با آنتی بادی های anti-YHV MAb *نشان دار شده با* horseradish peroxidase *می باشد.*



تصویر ۱۷ – نوار کروماتوگرافی Lateral flow تهیه شده با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی اختصاصی نشان دار شده با طلا بر علیه فرم حدت دار ویروس YHV در تایلند

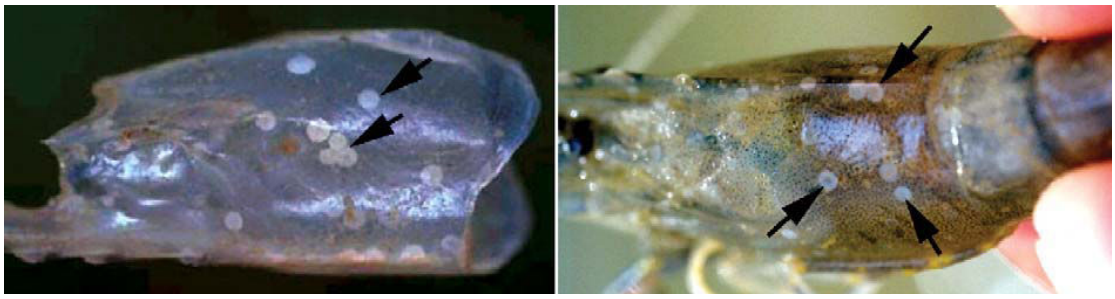
مونوکلونال آنتی بادی های علاوه بر استفاده های تشخیصی ممکن است برای جداسازی و تفریق بین انواع YHV نیز مفید باشند. برای مثال یک مونوکلونال آنتی بادی بر علیه پروتئین پوششی gp116. YHV با پروتئین های YHV جدا شده از تایلند باند می شود ولی به پروتئین gp116 ویروس GAV جدا شده از استرالیا واکنش نشان نمی دهد بنابراین با انتخاب MAb از انواع مختلف YHV در مناطق مختلف جغرافیائی می توان نوارهای تشخیصی متفاوتی را طراحی کرد.

٤- White-spot syndrome virus (WSSV)

کلیات:

از لحاظ تاریخچه این ویروس دومین ویروس جدی بود که صنعت پرورش میگوی تایلند را تحت تاثیر قرار داد در این جا مطالعات و روش های کنترل ویروس لکه سفید مورد بررسی قرارگرفته است. عفونت WSSV معمولاً علائم ظاهری واضحی که شامل لکه های سفید با اندازه های متنوع و چسبیده به کوتیکول می باشد را در انتهای عفونت ویروسی نشان می دهد این علائم ظاهری در ابتدا از شیوع یک بیماری ناشناخته در میگوهای

P. japonicus در ژاپن در سال ۱۹۹۳گزارش گردید عامل ایجادکننده این بیماری یک ویروس میله ای شکل جدید بود. در همان زمان عفونت ویروسی با علائم مشابه در میگوهای P.japonicus, P.monodon, P.pencillatus در تایوان و چین گزارش گردید. در تایلند بیماری برای اولین بار در میگوهای P.monodon پرورشی در آزمایشگاه گزارش گردید. امروزه ویروس بیماری تحت عنوان White Spot Syndrome Virus (WSSV) نامیده می شود.بیماری فوق تا اواخر سال ۱۹۹٤ در تایلند گزارش نگردیدو در این سال بیماری با تلفات گسترده همراه با علائم کلینیکی مشخص عفونت WSSV بروز کرد



تصویر ۱۸- علائم کلینیکی عفونت WSSV ، اجسام سفید رنگ درون کوتیکول (پیکان) میگوهای در حال مرگ با ناخن کنده نمی شوند

ویروس WSSV در ابتدای شناسائی بر اساس شکل میله ای آن تحت عنوان باکلوویروس نامگذاری شد و براساس ضایعات هیستوپاتولوژی شبیه باکلوویروس های Non- occluded بود به همین دلیل در تایلند اسم آن را Penaeus monodon Non- occluded baculovirus (Pm NoB И) گذاشتند.

امروز مشخص شده است که WSSV یک ویروس دارای DNA دو رشته ای و میله ای شکل و دارای یک زائده انتهائی می باشد ژنوم ویروس بسیار بزرگ و حلقوی و حدوداً ۳۰۰Kbp وزن دارد. سه سکانس کامل (AF3669029 از تایلند،AF440570 از تایوان، AF332093 از چین) از ویروس در بانک ژنی در دسترس می باشد. از آنجائی که براساس مطالعات صورت گرفته بر روی ژنوم ویروس همولوژی مشخصی با سایر ویروس های شناخته شده نداشت یک خانواده جدید ویروسی (Nimaviridae) و جنس (Whispovirus) برای آن پیشنهاد شده است.

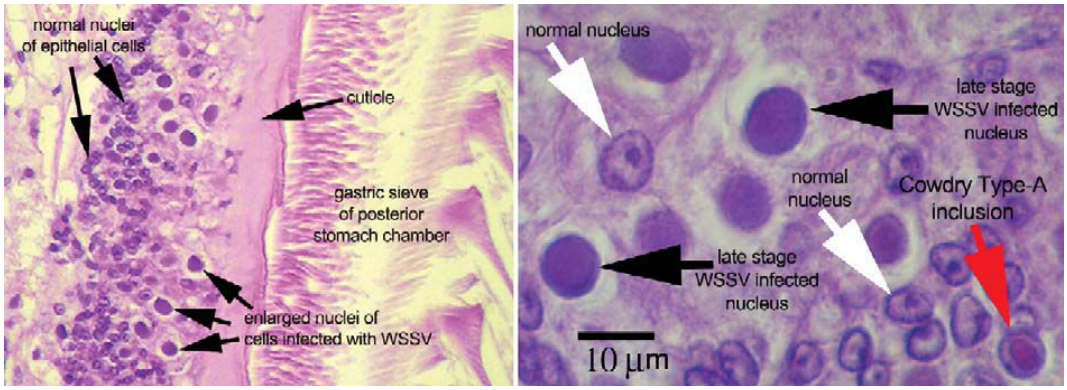
بر اساس علائم کلینیکی بیماری، هیستوپاتولوژی با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی و مشخصات DNA مشخص گردید که این عفونت ها توسط یک نوع ویروس ویا گروهی از ویروس های مرتبط بسیار نزدیک به هم ایجاد می شود این نظریه بعدها توسط آزمایشات In situ DNA hybridization بر روی گونه های مختلف میگوهای پرورشی از کشورهای آسیائی مختلف که علائم کلینیکی سندرم لکه سفید را نشان می دادند اثبات شد .

یک نکته فوق العاده مهم این است که بـدانیم تـشخیص عفونـت WSSV نمـی توانـد صـرفا بـر اسـاس مشاهده علائم کلینیکی لکه های سفید بر روی کوتیکول صورت گیرد یک گـزارش نـشان مـی دهـد کـه عفونـت باکتریال کوتیکول نیز می تواند با شکل گیری لکه های سفید همراه باشد .

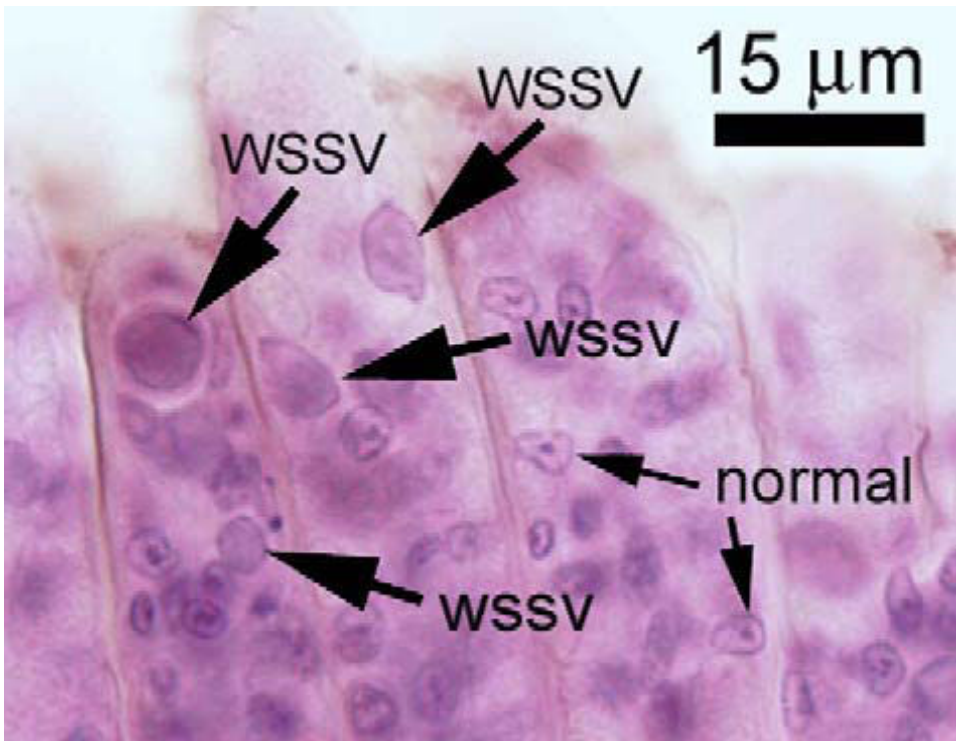
لکه های سفید ایجاد شـده بسیار شبیه لکه هـای سـفید ویروسـی WSSV هـستند براسـاس مـشاهدات میکروسکوپ الکترونی این لکه های حاوی باکتری های میله ای شکل هستند. بنابراین وجود لکـه هـای سـفید بـر روی کوتیکول برای تشخیص WSSV کافی نمی باشد. از آن جایی که مـدیریت عفونـت باکتریـایی و ویروسـی بطور اساسی با هم تفاوت دارد همیشه لازم است نشان دهیم که آیا میگوی دارای علائم ظاهری لکه سـفید علائـم هیستولوژی وجود WSSV را هم نشان می دهد یا خیر؟ این کار را می توان از طریـق مـشاهده تکـه هـای کامـل آبشش که به صورت سریع فیکس و رنگ آمیزی شده است در یک روش آسان و ارزان همانطور کـه بـالا تـشریح شده انجام داد.

هیستوپاتولوژی:

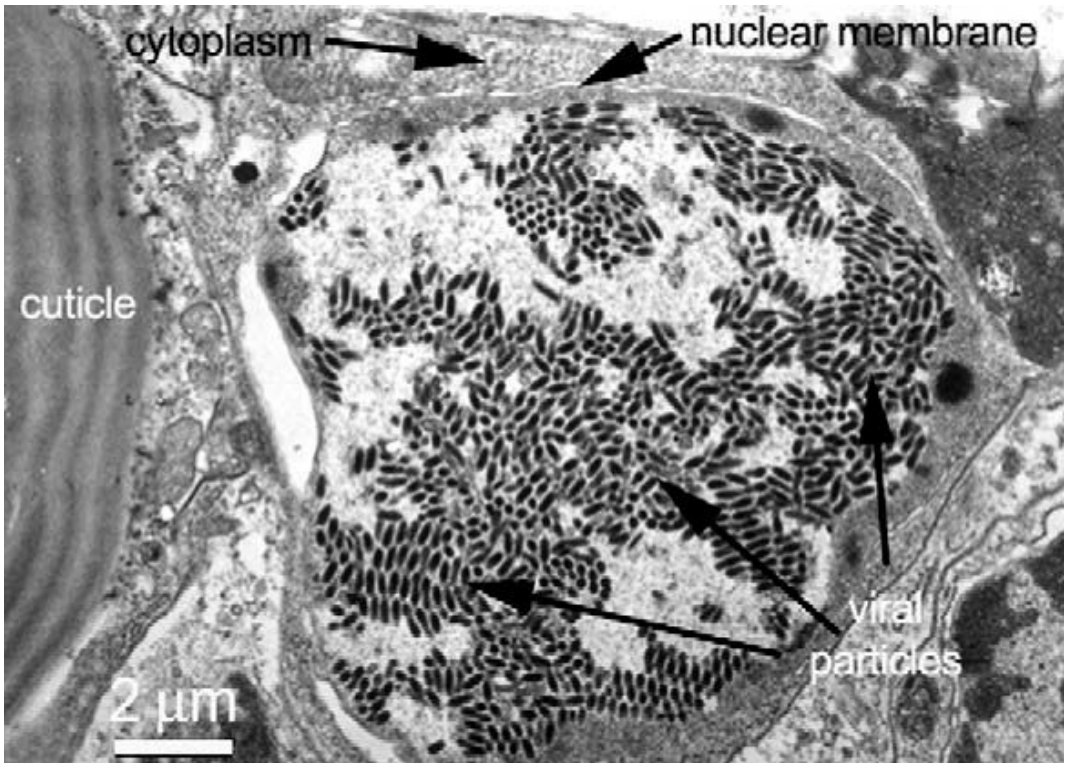
علائم هیستولوژیک عفونت WSSV شامل هسته های سلولی بزرگ شده در بافت های با منشاء اکتـودرم و مزودرم می باشد. مناسب ترین بافت برای تشخیص بیماری بافت اپیتلیوم زیـر کوتیکـولی مـی باشـد. در مقـاطع بافتی، اپیتلیوم زیر کوتیکولی معده معمولا عالی ترین حالت را که نشان دهنده هسته های بزرگ شده پاتوگونومیـک و گنجیدگی های بازوفیلیک که از اطراف به وسیله فضای سیتوپلاسمی احاطه شده اسـت را نـشان مـی دهنـد. در مراحل ابتدائی عفونت، کروماتین موجود در هسته به حاشیه رانده شده و از طریق حلقه نوکلئوپلاسـم بـی رنـگ از گنجیدگی قرمزرنگ متمایز می شود این گنجیدگی ها تحت عنوان گنجیدگی های Cowdry A نامیده می شوند. علاوه بر تهیه مقاطع بافتی، می توان اسلایدهای تازه ای از بافت آبشش تهیه و به روش رنگ آمیزی سریع همانطور که برای YHV گفته شد رنگ آمیزی کرد. در این روش نیز همان نوع هسته های بزرگ شده مشابه مقـاطع بـافتی دیده می شود. این روش بسیار آسان و سریعتر از مقاطع بافتی آماده سازی می شود از تکنیک سـریع مـی تـوان بـه طور مناسبی برای بافت های اپیتلیوم زیر کوتیکولی برای مشاهده ضایعات WSSV استفاده کرد.



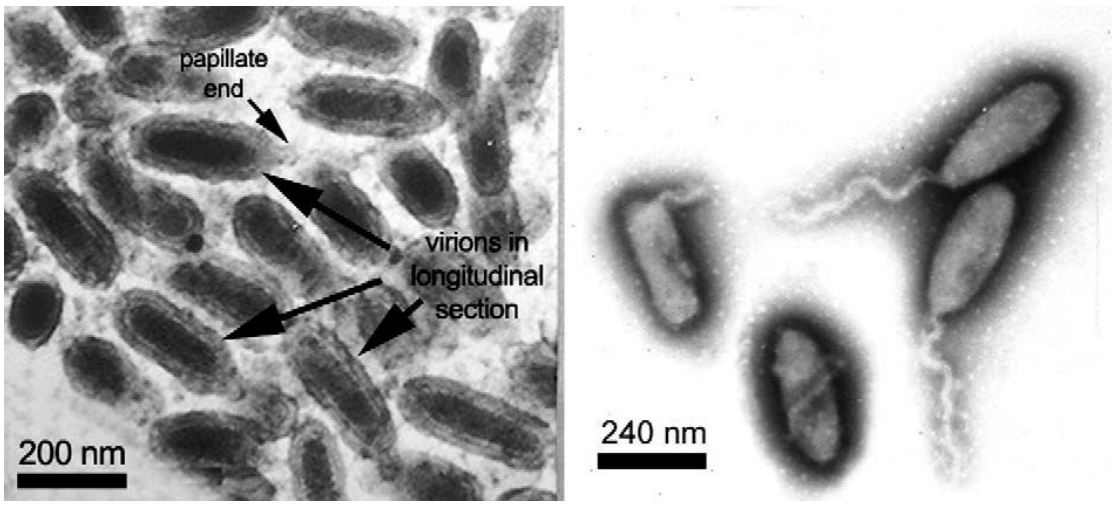
تصویر ۱۹- هیستوپاتولوژی WSSV ، سمت چپ : بزرگنمائی کم نشان دهنده تعداد زیادی گنجیدگی های اختصاصی WSSV در اپیتلیوم زیر کوتیکول روده می باشد. سمت راست : بزرگنمائی بالا نشان دهنده یک هسته با گنجیدگی Cowdry A-type *در گوشه سمت راست می باشد.*



تصویر ۲۰- در قطعه ای از آبشش سریع رنگ آمیزی شده هسته های سالم وهسته های آلوده شده به ویروس مشاهده می گردند.



تصویر ۲۱ – عکس میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمائی کم بافت آبشش میگوی آلوده به ویروس WSSV نشان دهنده تعداد زیادی از ویریون های میله ای شکل در هسته های سلول های اپیتلیوم زیر کوتیکولی می باشد.



تصویر ۲۲- عکس میکروسکوپ الکترونی (TEM) با بزرگنمائی بالا از ویروس WSSV، (A) مقطع نازک از ویروس WSSV در یک هسته سلول (B) رنگ آمیزی منفی از یک ویریون خالص که نشان دهنده یک زائده دم مانند منحصربه فرد در یک سر آن می باشد.

روش مولکولی:

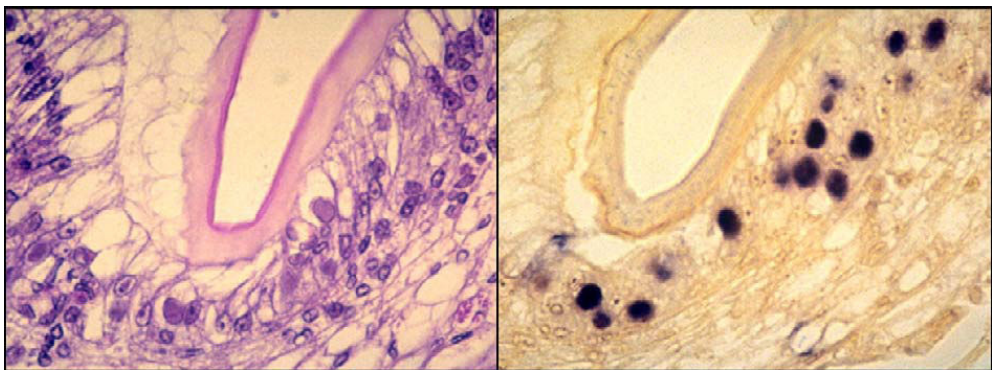
روش های PCR زیادی برای تشخیص WSSV هم به صورت مجزا و هم در کنار سایر ویروس ها تاکنون تشریح شده است. روش توصیف شده بوسیله LO و همکاران در سال ۱۹۹٦ به عنوان یک روش استاندارد بوسیله OIE مورد پذیرش قرار گرفته است. در مقاله جدیدی نشان داده اند که تحت بعضی شرایط این آزمایش ممکن است دارای نتایج مثبت کاذب در آزمایش برروی Australian CrayFish (Cherax quadricarinatus) باشد همچنین روش هائی برای انجام آزمایشات Real – Time PCR و تکثیر تک دمایی DNA (Isothermal DNA amplification) توصیف شده است.

متعاقب تولید پروب های DNA hybridization برای WSSV در تایلند، پرایمرهائی نیز برای تشخیص WSSV از طریق PCR به سرعت تولید شد.

PCR تک مرحله ای به شرح ذیل است:

100 ng از الگوی DNA در1µl اضافه شده به 50 µl محلول واکنش که شامل 10mM Tris-Hclبا PH=8.3 ، 50mM Kcl و 1.5mM mgcl2 ، 0.5mM از هر پرایمر ، 200mM از هر کدام dGTP و dCTP و dATP و dTTp ، 2.5U آنزیم Taq دی ان پلی مراز

پرایمر (F 136198 و R ۱۳٦٤۲۹) و سکانس amplicon در شکل ۲٤ نشان داده شده است. واکنش PCR به صورت٤۰ سیکل (۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه ، ٦۰ درجه برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۳۰ ثانیه) و نهایتاً یک مرحله گسترش زنجیره Extension Step در ۷۳ درجه برای ۷ دقیقه انجام می شود .این روش به شکل کیت تجاری با نام Semtest Plus Single-Step PCR-Ready-To-Use-Kit بوسیله واحد تجاری بخش بیوتکنولوژی میگو مرکز ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تایلند واقع در بانکوک طراحی و عرضه شده است.



تصویر ۲۳: ردیابی ویروس WSSV با استفاده از تکنیک In situ hybridization *. عکس سمت چپ بافت آلوده شده به ویروس WSSV رنگ آمیزی شده با* H&E *و در سمت راست یک مقطع مشابه که با تکنیک* In situ hybridization *آزمایش شده است سلول های مشکی نشان دهنده واکنش هیبریداسیون و مثبت بودن واکنش می باشد.*

GTA CGG CAA TAC TGG AGG AGG TAC ATC CAC TGT TAC AAT GTC TTC CAT
CT CAT TAG GCT GGT CAC ATA CAT TGG GTA GTA AAC ACT GGG TAC AGA
TCA GGG AAC ATT TGC TAT CAC CAG TTT CTC CCT CCA CCA TCT TAA AGA
GTT TAA CGG GCG GTC TGA ATC TAT TAT CCA CCA CAG TAA ATT TTG AAT
CCT TGT CTA GTG CAA AGT C**CT TGT CCA TCT TAC ACA TCT CC**

تصویر ۲٤: سکانس قطعه ژنوم ۲۳۲ bp ویروس WSSV که بوسیله پرایمر F ۱۳٦۱۹۸ و R۱۳٦٤۲۹ ایجاد شده است . سکانس پرایمر به صورت حروف درشت تر و با خط کشی زیر آن مشخص شده است.

آزمایش PCR به طور گسترده در تایلند برای غربالگری مولدین و پست لاروها در تلاش جهت محدود کردن گسترش ویروس WSSV و برگرداندن تولید به سطح قبل از بیماری مورد استفاده قرار می گیرد. بکارگیری سریع این سیستم غربالگری با استفاده از PCR به همراه سایر روش های مدیریتی مناسب باعث نجات صنعت میگو تایلند از یک وضعیت بحرانی نظیر آن چه که در چین در سال ۱۹۹۳ اتفاق افتاده بود گردید . اقدامات پیشگیرانه تخمیناً باعث سالانه ۱ میلیارد دلار سود به درآمد صادراتی تایلند بین سال های ۲۰۰۲– ۱۹۹۷ میلادی قبل از اینکه *P. vannamei* به عنوان گونه غالب در تایلند مطرح شود می گردید .

استفاده دیگر آزمایش PCR تشخیص و ردیابی جابجایی ویروس WSSV از میزبان مخازن وحشی به میگوهای پرورشی می باشد. این مطالعات شمای بسیار جالب تنوع گسترده میزبانان بالقوه ویروس را نشان می دهد. WSSV نه تنها چندین نوع از میگوهای خانواده پنائیده حتی آنهایی که در نیمکره غربی هم پرورش می یابند را درگیر می کند بلکه ظاهراً دارای یک تنوع گسترده ای از سایر میزبانان شامل خرچنگ ها و سخت پوستان بسیار دورتر نظیر کوپه پودا و شاید حتی لارو حشرات دریایی را نیز شامل شود.

در اینجا یک جدول با لیست جزئیات گونه های سخت پوست گزارش شده که یا به ویروس آلوده شده یا گمان می رود که بوسیله WSSV آلوده شوند، ارائه شده است. این لیست تا سال ۲۰۰۱ به روز رسانی شده است. بنابراین گونه هایی که بعداً گزارش شده است در این لیست قرار ندارند. به هر حال این جدول، برای نشان

دادن اهمیت میزبانان بالقوه و حاملین ویروس و لیست بزرگ این میزبانان کفایت می کند. در جدول جدا سازی از منابع طبیعی(N) شامل آنهائی است که از استخرهای پرورشی گزارش شده اند و برای آنهایی که از طریق عفونت تجربی آلوده شده اند(E) نشان داده شده است. برای انتقال تجربی به *P.monodon* ستون های خالی نشانگر عدم وجود گزارش است. در حالی که + و – نشان می دهد انتقال تجربی (به ترتیب) صورت گرفته و یا نگرفته است.

برای گونه های لیست شده به عنوان WSSV مثبت بوسیله فقط ردیابی از طریق PCR این نکته مهم است که بدانیم در این موارد بیماری زایی ویروس یک سئوال حل نشده است به خاطر اینکه آزمایشات هیستولوژیکی ، ایمیونوهیستوشیمی یا In situ DNA hybridization هنوز بر روی آنها صورت نگرفته است. بسیاری از موارد نظیر لارو حشرات ممکن است به سادگی حاملین مکانیکی باشند.

جدول ۱- قسمتی از لیست گونه های سخت پوست گزارش شده یا مظنون به آلودگی با WSSV تا سال ۲۰۰۱

Table 1
Partial list of species of crustaceans reported or suspected to be infected by WSSV up to 2001

Viral hosts	Natural or experimental infection	Detection method				References
		H&E	TEM	In situ	PCR	
Penaeid shrimp						
P. aztecus	E	+				Lightner, 1996a,b
P. chinensis	N	+	+	+		Lightner, 1996a,b and others
P. duorarum	E	+				Lightner, 1996a,b
P. indicus	N	+				Lightner, 1996a,b and others
P. japonicus	N	+	+	+	+	Lightner, 1996a,b and others
P. merguiensis	N	+		+		Lightner, 1996a,b and others
P. monodon	N	+	+	+	+	Lightner, 1996a,b and others
P. penicillatus	N	+			+	Lo et al., 1996a,b
P. schmittii	E	+			+	Unpublished
P. semisulcatus	N	+			+	Lo et al., 1996a,b
P. setiferus	E	+				Lightner, 1996a,b
P. stylirostris	E	+				Lightner, 1996a,b
P. vannamei	N	+		+		Lightner, 1996a,b, and others
Other shrimp		H&E	TEM	In situ	PCR	
Acetes sp.	E	+	+	+		Supamattaya et al. (1998)
Exopalaemon orientalis	N	+		+	+	Wang et al., 1998 and others
Macrobrachium idella	E	+			+	
Macrobrachium lamerrae	E	+			+	
Macrobrach. rosenbergii	N	+/−		+	+	Peng et al. (1998)
Metapenaeus dobsoni	N				+	Hossain et al. (2001)
Metapenaeus ensis	N	+		+	+	Lo et al., 1996a,b and others
Palaemon adspersus	E					Corbel et al. (2001)
P. sirrifer	N				+	
P. styliferus	N	+		+		Unpublished
Parapenaeopsis stylifera	N				+	Hossain et al. (2001)
Scyllarus arctus	E					Corbel et al. (2001)
Solenocera indica	N				+	Hossain et al. (2001)
Squilla mantis	N				+	Hossain et al. (2001)
Trachypenaeus curvirostris	E				+	Wang et al. (1998)
Crabs		H&E	TEM	In situ	PCR	
Cancer pagurus	E					Corbel et al. (2001)
Calappa philarigus	N				+	Kou et al. (1998)
C. lophos	E				+	Wang et al. (1998)
Charybdis annulata	N				+	Hossain et al. (2001)
C. cruciata	N				+	Hossain et al. (2001)
C. feriatus	N	+		+	+	Kou et al. (1998)
C. granulata	E				+	Wang et al. (1998)
C. japonica	N				+	
C. lucifera	N				+	
C. natotor	N				+	Kou et al. (1998)
Gelasimus marionis nitidus	N				+	Hossain et al. (2001)
Helice tridens					+	Lo et al., 1996a,b
Helice sp.	N				+	
Hemigrapsus sanguineus	N				+	
Liocarcinus depurator	E					Corbel et al. (2001)
L. puber	E					Corbel et al., 2001
Macrophthalmus sulcatus	N				+	Hossain et al. (2001)
Mangrove crab	N	+		+	+	Unpublished
Mantura sp.	N				+	
Matula planipes	N				+	
Metopograpsus messor	N				+	Hossain et al. (2001)
Paratelpusa hydrodomous	E	+			+	Sahul Hameed et al. (2001)

Table 1 (*continued*)

Viral hosts	Natural or experimental infection	Detection method				References
		H&E	TEM	In situ	PCR	
Crabs						
P. pulvinata	E	+			+	Sahul Hameed et al. (2001)
Portunus pelagicus	N	+	+	+	+	Supamattaya et al. (1998)
P. sanguineolentus	N	+	+	+	+	Lo et al., 1996a,b
P. trituberculatus	N				+	
Scylla serrata	N	+	+	+	+	Supamattaya et al., 1998 and others
Sesarma oceana	N				+	
Sesarma sp.	N	+		+	+	Kanchanaphum et al. (1998)
Somannia thelpusa sp.	E					Unpublished
Thalamita sp.	N				+	Unpublished
Uca pugilator	E	+		+	+	Kanchanaphum et al. (1998)
Lobsters		H&E	TEM	In situ	PCR	
Panulirus longipes	E				+	Wang et al. (1998)
P. ornatus	E				+	Wang et al. (1998)
P. penicillatus	E				+	Wang et al. (1998)
P. versicolor	E				+	Wang et al. (1998)
Misc.		H&E	TEM	In situ	PCR	
Copepods	N				+	Lo et al., 1996a,b
Insect larva	N				+	Lo et al., 1996a,b
Artemia salina	N				+	Chang et al. (2002)
Astacus leptodactylus	E					Corbel et al. (2001)
Cherax quadricarinatus	E				+	Shi et al. (2000)
Cambarus clarkii	E	+	+			Huang et al. (2001)
Orconectes limosus	E					Corbel et al. (2001)
O. punctimanus	N				+	Lo et al., 1996a,b
Pacifastacus leniusculus	E	+			+	Jiravanichpaisal et al. (2001)
From Maeda et al., 1998						
Alpheus brevicristatus	N				+	Maeda et al. (1998)
Alpheus lobidens	N				+	Maeda et al. (1998)
Ocypode stimpsoni	N				+	Maeda et al. (1998)
Petrolisthes japonicus	N				+	Maeda et al. (1998)
Upogebia major	N				+	Maeda et al. (1998)

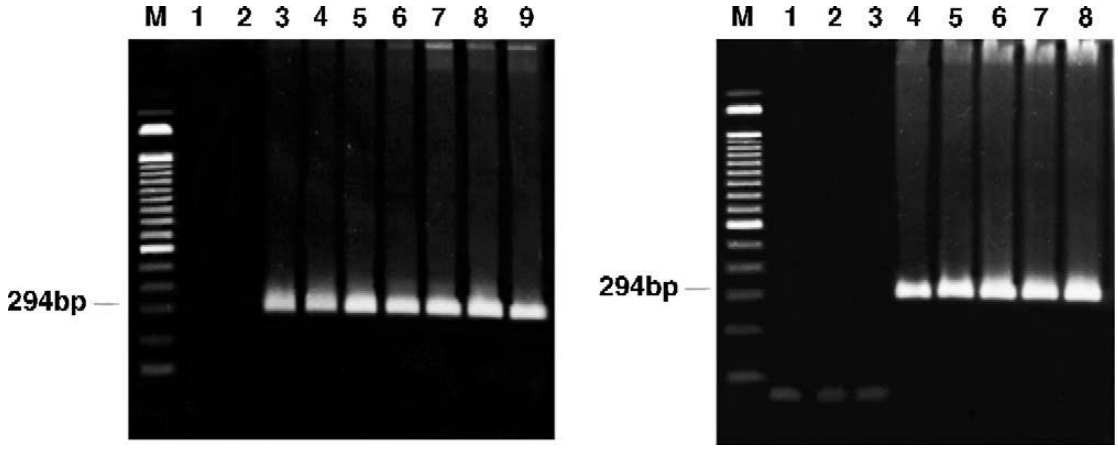
N = natural including rearing ponds.

N= عفونت طبیعی اتفاق افتاده دراستخرهای پرورشی

E= عفونت تجربی

برای پرورش دهندگان میگو این موضوع فوق العاده مهم است که در نظر داشته باشند که سخت پوستان غیر پرورشی یک مخزن بسیار عالی و قوی از ویروس هستند که می توانند آن را به میگوهای پرورشی انتقال دهند.

مطالعات در تایلند ثابت کرده است که خرچنگ های شناگر Portunis Pelagicus و خرچنگ لجنی (Mud Crab) Scylla Serrata می توانند از طریق تزریقی یا خوراکی به ویروس WSSV آلوده شده و از طریق آزمایشات Time-course PCR assay ، هیستوپاتولوژی، In Situ DNA hybridization نشان داده شده که هر دو نوع خرچنگ می توانند در درون یک روز یا از طریق آب در روش آکوآریمی جایی که خرچنگ ها از میگوهای سالم بوسیله یک توری جدا شده بودند، ویروس را به میگوها منتقل کنند. میگوها هر ۱۲ساعت بعد از اینکه به خرچنگ ها ویروس تزریق شده بودند پایش شده و نتایج مثبت بعد از ۳۶ ساعت به دست آمد.



تصویر ۲۵ : ژل های آگارز نشان دهنده پاسخ های آزمایشات PCR جهت ردیابی ویروس WSSV از نمونه های همولنف خرچنگ های آلوده شده به صورت تجربی و میگوهای همزیست با آنها در یک آزمایش انتقال تجربی ویروس .

سمت چپ : نمونه های خرچنگ های مانگرو sesarma تزریق شده یک باند آمپلیکون قوی WSSV (ردیف ۳) را ۲٤ ساعت پس از تزریق نشان می دهد

سمت راست : نمونه های میگوهای همزیست یک باند آمپلیکون قوی از ویروس WSSV را پس از ۳٦ ساعت نشان می دهند . ردیف M: نشانگر مولکولی ، ردیف های ۹-۱ : محصول PCR به دست آمده از همولنف در زمان ۰ (ردیف ۱) و هر ۱۲ ساعت به ترتیب

اخیراً یک مقایسه ای با استفاده از Real-time PCR به عنوان استاندارد طلایی ردیابی ویروس WSSV به روشنی نشان داد که نتایج آزمایشات Nested PCR به طور معمول به نتایج آزمایشات One-step PCR ارجحیت دارند به طوری که می توانند تقریباً 50-10 ویریون را در هر واکنش PCR ردیابی کنند. از سوی دیگر یک آزمایش زنجیره ای در میان ۱۲ آزمایشگاه تجاری که آزمایشات Nested PCR و non-Nested را انجام می دادند انجام گرفت. نتایج کار نشان دهنده پاسخ یکسان اغلب آزمایشات بود و فقط ۲ آزمون از دو آزمایشگاه مختلف نتیجه منفی کاذب رادر نمونه هائی با سطح آلودگی خفیف نشان دادند.این نتایج نشان می دهد که آزمایش PCR واقع گرا بوده و تفاوت در حساسیت آزمون های مختلف ممکن است در تصمیم گیری های فیلدی خیلی بحرانی نباشد.

نهایتاً بررسی ها در تایلند نشان داد که PCR یک مرحله ای برای ردیابی حضور WSSV در نمونه های کوچک از پست لاروهای خیلی ضعیف آلوده ممکن است اغلب نتایج منفی کاذب به دست بدهد. این موضوع بوسیله نتایج حاصله از یک مطالعه مقایسه ای انجام شده در هند نیز تأیید شد.

بنابراین امروزه توصیه می شود که غربالگری پست لاروها برای WSSV با استفاده از آزمایش Nested PCR با حساسیت کمتر از ۱۰۰ ویریون به ازای هر واکنش PCR و با استفاده از الگوی DNA به دست آمده از نمونه های ۳۰۰ قطعه پست لارو به میزان 150ngدر مجموع DNA درهر نوبت واکنش صورت گیرد (لازم به ذکر است که میزان DNA نبایستی بیش از 300ng در هر نوبت واکنش باشد).

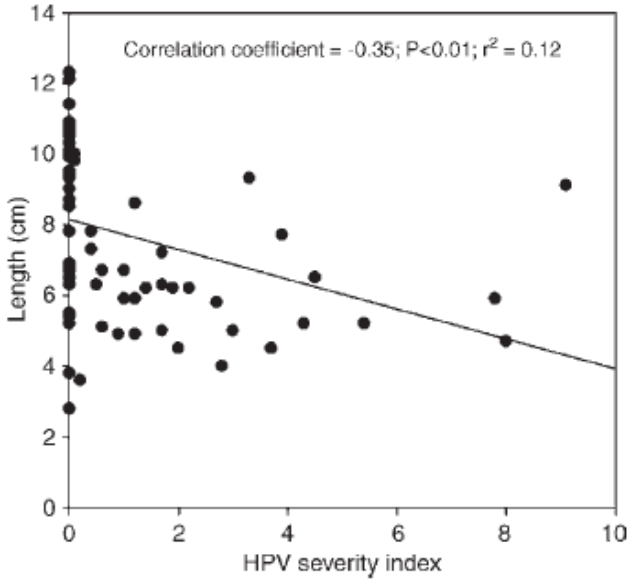
علاوه بر آزمایشات PCR ، آزمایشات ایمنولوژیکی و Lateral Flow Chromatographic امروزه در ژاپن و در تایلند در دسترس می باشد.

Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) :

کلیات :

سال های زیادی است که این ویروس در تایلند دیده شده اما اطلاعات کمی در خصوص شیوع آن وجود دارد اطلاعات اولیه نشان داد که این ویروس برای پست لارو میگوها در خلال اولین ماه بعد از ذخیره سازی کشنده است. اما نتایج جدیدتر یک ارتباط منطقی قوی ما بین عفونت HPV و اندازه کوچک میگوها را نشان داده است. میگوهای به شدت آلوده شده با HPV به کندی رشد کرده و رشد آنها در طول تقریبی ٦cm متوقف می شودهمچنین در صورت رجوع به عکس ٥ جایی که اندازه میگوها را مطابق با گروه عفونت نشان می دهد مشخص می گردد که میگوهای آلوده شده با HPV شامل گروههایی با کوچکترین اندازه ها هست و عفونت های مجزا یا عفونت های مشترک با MBV را نشان می دهند. وقتی بوسیله تور Cast net نمونه برداری می شود چنین میگوهای ریزی فرار کرده و معمولاً به عنوان میگوهای غیر زنده به حساب می آیند برای پرورش دهندگان این مساوی با مرگ است. زیرا میگوهای با طول فقط ٦cm حدوداً ٥gr وزن دارند(٢٠٠قطعه در هر Kg) و ضرورتاً ارزش اقتصادی ندارند.بنابراین این توصیه می شود که پرورش دهندگان محموله های پست لارو با شیوع آلودگی متوسط و بالای HPV را نپذیرند. توجه داشته باشید که به جز سایز میگوهای ریز آلوده شده با HPV، میگوها معمولا در سایر خصوصیات نظیر رنگ یا طول آنتن طبیعی هستند. از آنجایی که توقف رشد ممکن است ناشی از علل مختلف باشد. علایم کلینیکی برای تشخیص HPV کافی نیست و سایر آزمایشات نظیر آزمایشات هیستولوژیکی یا آزمایشات PCR نیاز می باشد.

تصویر ٢٦ : علائم بالینی عفونت HPV . در این تصویر میگوی کوچک آلوده به ویروس HPV بوده در حالی که میگوی بزرگتر عاری از ویروس است .



تصویر ۲۷ : مقایسه شدت آلودگی به ویروس HPV در مقابل طول میگوها در یک مزرعه پرورش میگو در تایلند را نشان می دهد.

HPV در ابتدا در میگوهای پرورشی دریایی در سنگاپور گزارش گردید. بعداً Lightner و Redman (1985) یک ویروس دیگری را که ایجاد کننده ضایعات هیستوپاتولوژیک مشابه بود توصیف کردند.

HPV یک ویروس بدون پوشینه با متوسط اندازه ۲۳nm-۲۲ قطر و حاوی DNA تک رشته ای خطی می باشد. این ویروس متعلق به خانواده Parvoviridae در گروه densovirus می باشد. بر اساس مطالعات مولکولی تاکنون دو نوع ویروس آسیایی مشخص شده است. یکی از آنها ازمیگوی p.chinesis درکره و دیگری در میگوی p.monodon از تایلند جدا شده است این دو نوع ویروس در طول کلی ژنوم با هم متفاوت هستند. (تقریباً 4 و 5kb به ترتیب)

HPV ممکن است که منشأ Indo-Pacific داشته باشد اما بعدها به میگوهای وحشی در قاره آمریکا از طریق واردات میگوهای زنده آسیایی با اهداف آبزی پروری سرایت کرده است . به هر دلیل، این ویروس امروزه ، گسترش جهانی دارد. اگر چه HPV می تواند باعث خسارات اقتصادی قابل ملاحظه ای برای پرورش دهندگان میگو به دلیل رشد تأخیری گردد ولی درعفونت های شدید آن پاسخ التهابی چشمگیری رخ نمی دهد.

در گذشته انجام مطالعات تجربی بر روی HPV به دلیل نبود یک مدل مناسب انتقالی تجربی صورت نگرفته است. ولی اخیراً عفونت های تجربی موفقیت آمیزی از طریق خوراکی در پست لاروهای میگوهای ببری سیاه Penaeus monodon گزارش شده است و این می بایست راه را برای آزمایشات تجزیه ای دقیق اثرات عفونت HPV در میگوها باز کند .

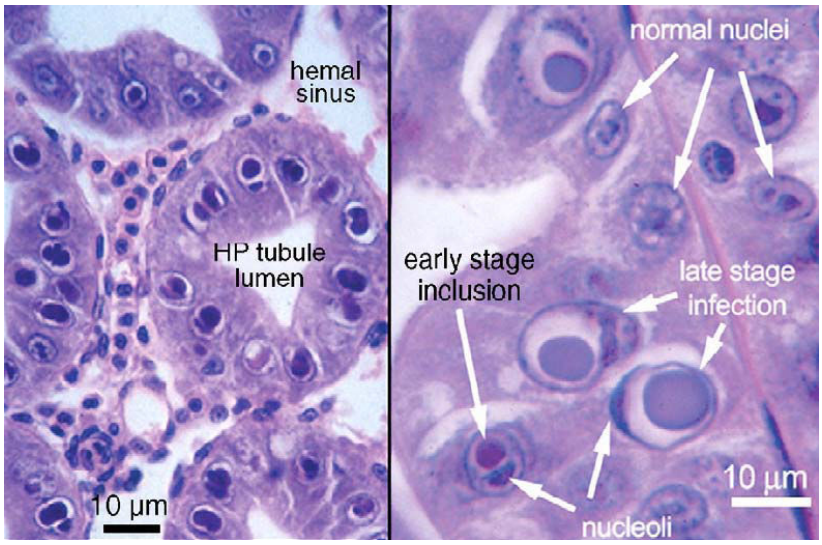
انتقال عمودی HPV از مولدین وقتی لایتنر در سال ۱۹۹۶ گزارش کرد که نسل F_1 میگوهای Penaeus chinesis (همچنین تحت عنوان Fenneropenaeus chinesis یا Penaeus Orientalis نیز نامیده می شود) عفونت HPV را دارند پیشنهاد شد. این موضوع بوسیله گزارشات اخیر عفونت HPV در

لاروهای هچری در هند مورد تأکید قرار گرفت. اما در تجربیات به دست آمده در تایلند مشخص شد که عفونت فقط از طریق پست لاروهای انتقال یافته به نرسری های بیرون گسترش یافته بود. در این مورد امکان انتقال افقی از یک حامل ناشناخته نیز وجود دارد. به هر حال موفقیت های اخیر ناشی از انتقال تجربی از طریق خوراکی نشان داد که انتقال افقی بوسیله کانی بالیسم ممکن است یک مشکل جدی برای پرورش دهندگان میگو در انتقال افقی این ویروس باشد.

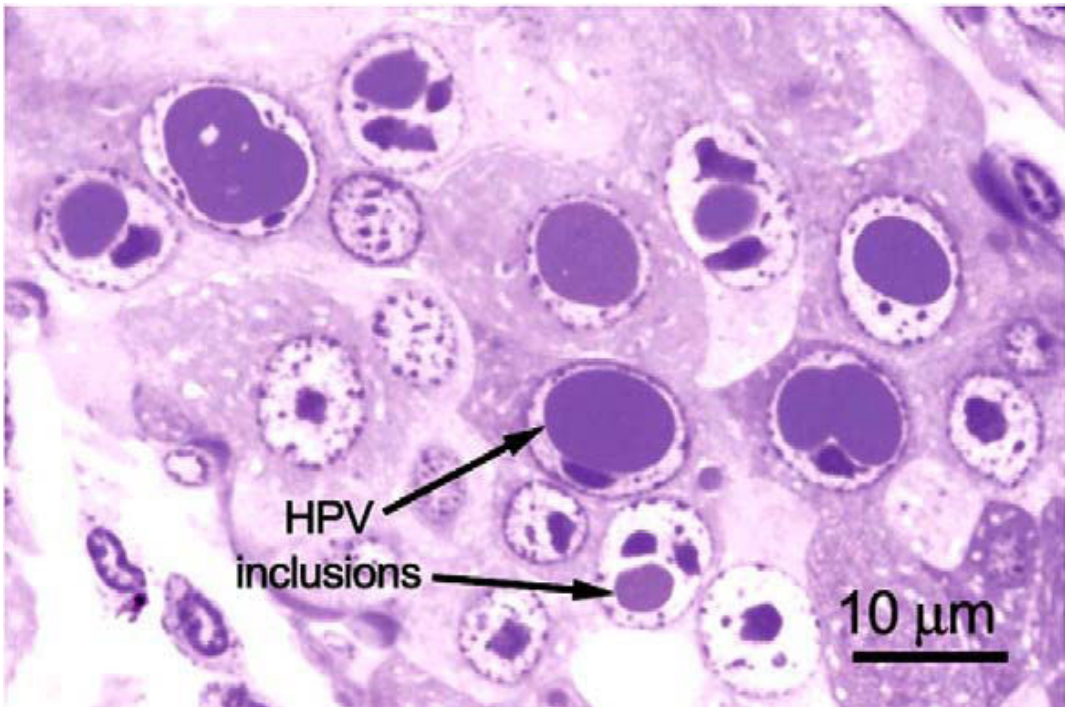
هیستوپاتولوژی :

از آنجایی که عفونت HPV هیچ گونه علایم کلینیکی شاخصی ندارد تشخیص موارد مثبت براساس حضور ضایعات در هپاتوپانکراس به صورت گنجیدگی های بازوفیلیک درون هسته های متورم شده سلولهای اپی تلیال توبول ها و در بعضی مواقع سلولهای روده میانی چسبیده به هپاتوپانکراس خود را نشان می دهد. بنابراین HPV محدود به سلولهای با منشأ اندودرم است.

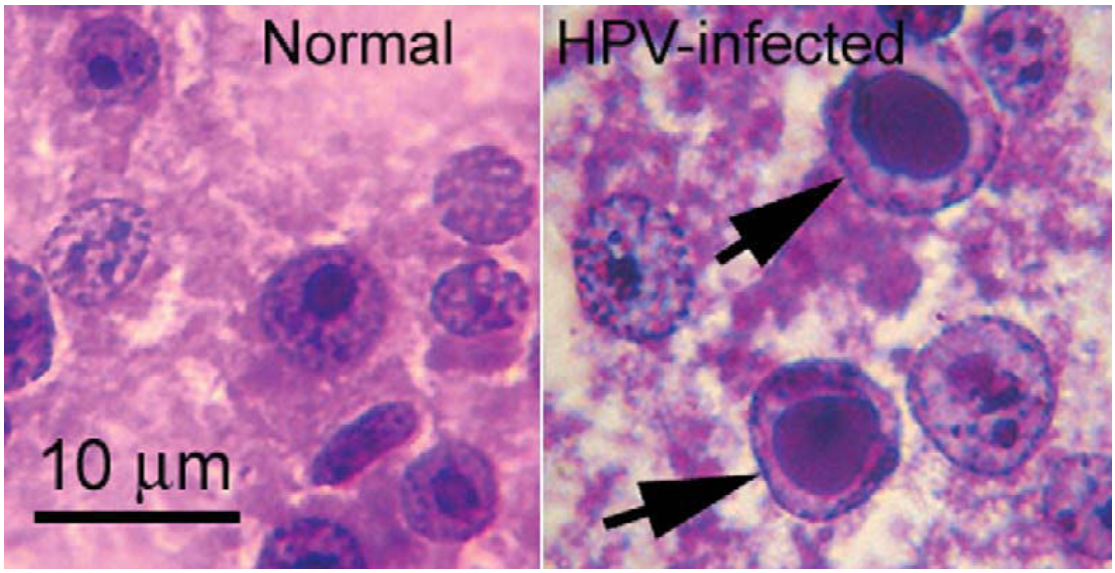
این ضایعات برای همه انواع ویروس های HPV گزارش شده از میگوها اختصاصی است. سلول های فعال تقسیم شونده (E-Cells) در انتهای لوله های هپاتوپانکراس گنجیدگی های های بیشتری را نشان می دهند. همچنین عفونت HPV را به آسانی می توان از طریق اسمیرهای تهیه شده از هپاتوپانکراس تشخیص داد روش کار بدین صورت است که یک قطره شامل فرمالین ۱۰٪ در یک محلول ۲/۸٪ نمک طعام NACL بر روی یک اسلاید میکروسکوپ تمیز قرار داده شده و اسمیر از بافت هپاتوپانکراس تهیه می شود بعد از خشک کردن اسلایدها و رنگ آمیزی معمولی H&E گنجید گی های اختصاصی HPV به آسانی قابل مشاهده هستند. از طریق میکروسکوپ الکترونی ذرات ویروسی بدون پوشینه بیست وجهی با قطر ۲۴-۲۲ نانومتر مشخص می شوند. براساس این خصوصیات مورفولوژیکی گزارش شده است که چندین گونه از میگوهای پنائیده و میگوهای رودخانه ای Macrobrachium rosenbergii به ویروس های شبیه HPV آلوده هستند.



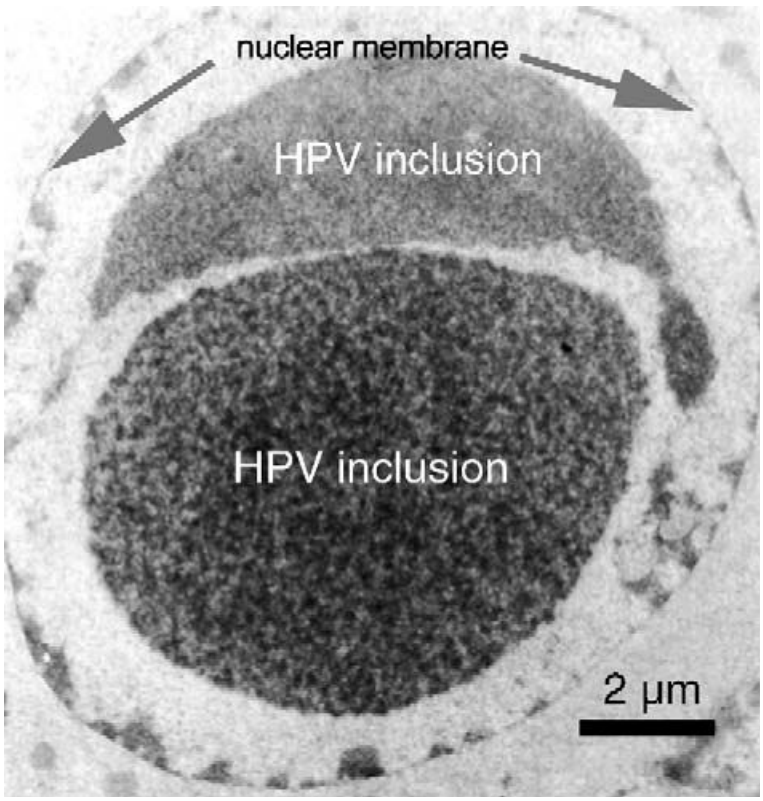
تصویر ۲۸: هیستوپاتولوژی ضایعات HPV در سلول های اپیتلیال یک لوله هپاتوپانکراس میگوی پنئوس مونودون در تایلند .به این نکته توجه شود که گنجیدگی ها در مراحل ابتدائی بیشتر ائوزینوفیلیک هستند تا بازوفیلیک



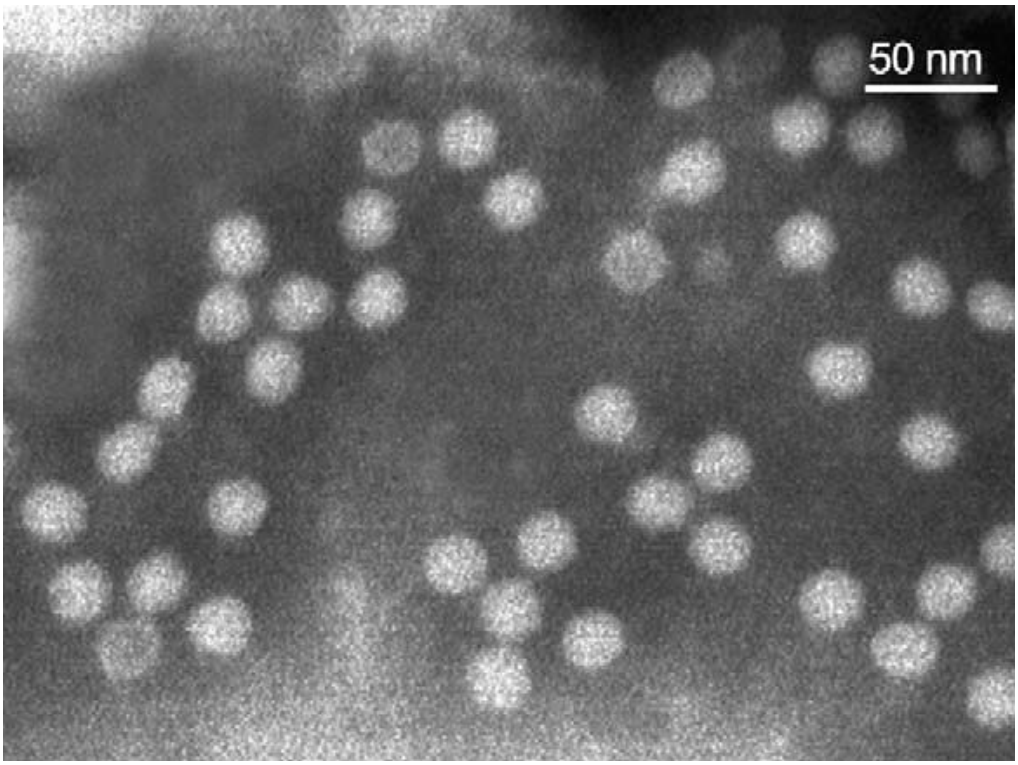
تصویر ۲۹ : مقاطع نازک بافت هپاتوپانکراس که ضایعات ویروس HPV را نشان می دهد توجه شود که بعضی از هسته ها دارای دو هستک بوده و یاچنانچه به نظر می رسد هسته ها دارای دو ویا بیشتر گنجیدگی هستند که به هم چسبیده اند



تصویر ۳۰ – عکس میکروسکوپی اسمیر تهیه شده از هپاتوپانکراس میگوی پئوس مونودون سالم و هپاتوپانکراس میگوی آلوده شده به ویروس HPV



تصویر ۳۱ – عکس میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمائی پائین از هسته یک سلول هپاتوپانکراس آلوده به ویروس HPV در میگوی پئوس مونودون که دو گنجیدگی را نشان می دهد . در مورد گنجیدگی کوچک تر در ابتدا فکر می شد که که یک هستک باشد ولی بررسی های ریزتر نشان داد که این هم یک گنجیدگی بوده لیکن نحوه قرارگرفتن ویریون در هسته به نحوی بوده است که در یک زاویه دیگری نسبت به گنجیدگی بزرگتر قرار گرفته بوده است.



تصویر ۳۲- بزرگنمائی بالا از ویریون های تقریبا خالص شده HPV از میگوی پئوس مونودون

روش های مولکولی :

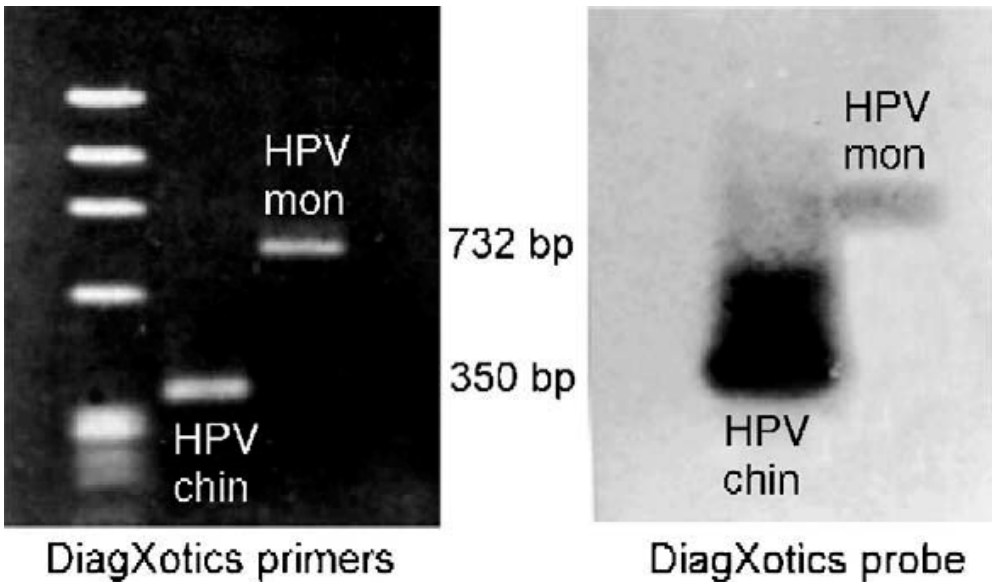
از آنجایی که روش های هیستوپاتولوژی ، تست های تشخیص سریع(Rapid methods) یا میکروسکوپ الکترون(TEM) روش های مخرب هستند(کشنده) ، تست PCR بر روی مولدین و میگوهای پرورشی استخرها با استفاده از نمونه های بی ضررشامل زائده های کوچک بدن یا مذفوع ابداع شد. روش های PCR نه فقط برای غربالگری میگوهای پرورشی بلکه برای غربالگری آسان و سریع تعداد زیادی از میزبانان بالقوه و مراحل مختلف زندگی آنها به عنوان حاملین بالقوه حتی اگر به صورت جزیی آلوده باشند کاربرد دارد.

آنالیز سکانس DNA نشان داده است که انواع جغرافیایی مختلفی از HPV وجود دارد. به عنوان مثال ژنومHPV از P.chinesis (HPV chin) در کره و HPV از P.monodon (HPV mon) در تایلند تقریباً ۱ Kb تفاوت دارند و سکانس های DNA آنها حدوداً ۳۰٪ تفاوت دارد . این تفاوت به وسیله آزمایش سکانس قسمت هائی از ژنوم برای HPV chin (AY 008257) و HPV mon (AF 4564۷٦) در بانک ژن در دسترس است. به هر حال این دو نوع ویروس و HPV به دست آمده از پنائیده های استرالیایی (P.esculentis و P.merquiensis) نتایج مثبتی را در واکنش های In situ hybridization که با استفاده از یک پروب DNA تجاری طراحی شده از HPV chin است نشان می دهند . بنابراین واکنش های مثبت In situ hybridization ممکن است در نتیجه گیری تشخیص یکسان بودن سکانس های ژنومی مفید نباشد. از طرف دیگر نتایج منفی در In situ hybridization به دست آمده با استفاده از پروب ویروس HPV chin در تشخیص ویروس های شبیه به HPV از میگوی M.rosenbergii نشان از یک اختلاف بزرگ ژنی می دهد. به دلیل اینکه HPV chin و HPV mon در سکانس هاس DNA تفاوتهای زیادی دارند توصیه می شود که پرایمرهای مختلفی برای تشخیص آنها در تستPCR استفاده شود.

جفت پرایمرهای تجاری برای HPV chin

(5′ TGG AGG TGA GAC AGC AGG 3′ and 5′ CCA ACT GTC CTC GCT CTT 3′) از شرکت DiagXotics باعث تولید یک زنجیره تکثیر ۳۵۰bp Amplicon با HPV chin در حساسیت بالا و یک زنجیره تکثیر 732bp Amplicon با حساسیت پایین از HPV mon می گردد. یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده برای HPV mon باعث ایجاد یک Ampliconبا وزن ٤٤١bp در حساسیت بالا می شود و نشان داده شده است که با HPV جدا شده از P.monodon از هند مؤثر است. در مقایسه یک جفت پرایمر جدید طراحی شده برای HPV chin

(5′GGT GAT GTG GAG GAG AGA 3′ and 5′ GTA ACT ATC GCC GCC AAC 3′) قادر نیست HPV موجود در هند را جدا سازی کند. بنابراین احتمالا HPV هندی از لحاظ سکانس ژنی بسیاربه Thai HPV در مقایسه با Korean HPV نزدیک تر است. به طور واضحی، مقایسه سکانس های ژنی به منظور تخمین تنوع انواع HPV که ممکن است در مناطق جغرافیایی مختلف با گونه های مختلف میگو رخ دهد لازم است.



تصویر ۳۳ – آزمون PCR برای ردیابی ویروس HPV جدا شده از تایلند (HPV Thai) با استفاده از پرایمرهای ساخت شرکت DiagXotics – ژل سمت چپ محصول PCR کنترل را در محدوده ۳۵۰bp و محصول PCR به دست آمده از ویروس تایلندی را در ۷۳۲bp نشان می دهد . در تصویر سمت راست آزمون Southern blot membrane با استفاده از ژل سمت چپ را نشان می دهد در اینجا نشان داده شده که Thai HPV نمی تواند واکنش قوی را با پروب نشان گذاری شده شرکت DiagXotics مشابه آن چیزی که محصول DNA کنترل دارد نشان دهد.

روش اصلی PCR برای HPV mon باعث تولید یک قطعه DNA اختصاصی HPV بـه وزن 156bp می شود. این قطعه DNA در زیر همراه با سکانس های پرایمر که زیر آن خط کشیده شده است نـشان داده شـده است.

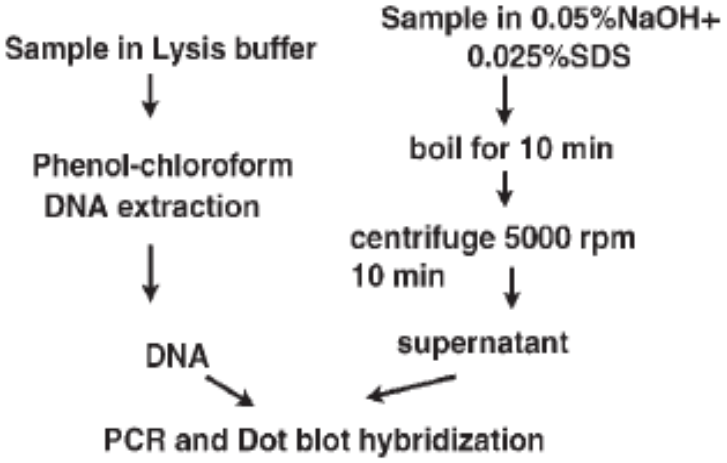
5′-GCA CTT ATC ACT GTC TCT ACC CAA GTC ATG AGC TGTCTGAAA GCC TTG TAT ATATGG CAA CCA GAC TTT GCT CAAGAAATC CTC CTT CAT GGT TAG CAT TTT CAC AGC TAT ACTAATCTT ATG ACA GAG CAA GGT ATT TAC AAA GTT CAC-3′

یک اشکال این پرایمرها این بود که آنها باعث تولید یک قطعه DNAبسیار کوچک در واکنش PCR می شـدند که می توانست به آسانی با زوج های Primer- dimer اشتباه شود. نتیجتاً یـک دسـته دومـی از پرایمرهـا بـرای HPV mon طراحی گردید که باعث تولید یک amplicon اختصاصی بـا وزنbp ٤٤١ از DNA اسـتخراج شده از پست لاروهای آلوده شده بهHPV و مدفوع میگو از طریق PCR و همچنین برای تولید یک پروب نـشان دار شده برای آزمایشات Dot blot hybridization استفاده می گردید .مواد مورد نیاز جهت این واکنش هـا در سایت www.shrimpbiotec.com در دسترس می باشد

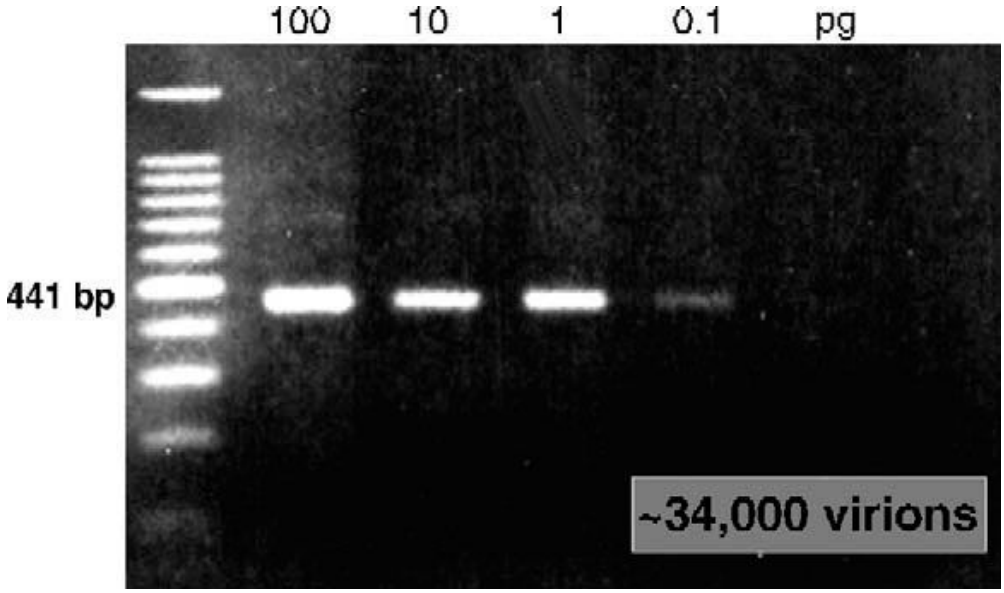
سکانس پرایمرها به شرح ذیل می باشد :

primer HPV441F: 5′ ACA CTC AGC CTC TAC CTT GT 3′

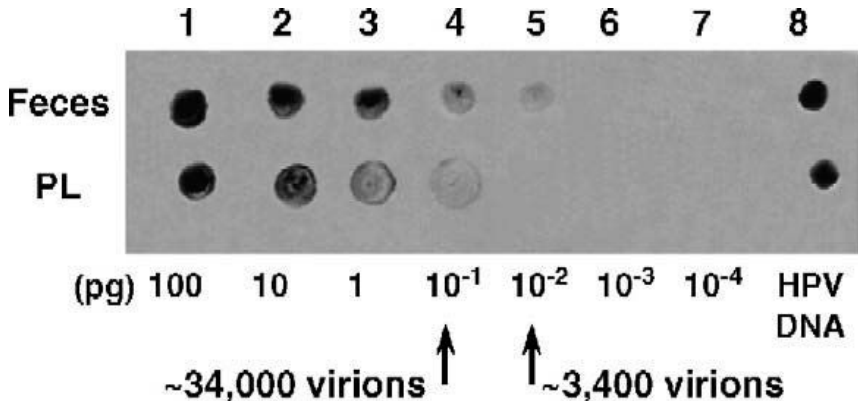
primer HPV441R: 5′ GCA TTA CAA GAG CCA AGC AG 3



تصویر ۳٤- روش استخراج DNA از پست لاروها و مدفوع برای ردیابی ویروس HPV و سایر DNA ویروس ها برای استفاده در PCR و Dot blot



تصویر ۳۵ – مثال هائی از نتایج آزمایشات PCR برای پست لاروهای جوشانده و رشته های مدفوعی با استفاده از DNA ویروس HPV در غلظت های متفاوت



تصویر ۳٦ – مثال هائی از یک آزمون Dot blot با استفاده از مدفوع تازه یا نمونه پست لاروهای جوشانده شده در هیدروکسید سدیم / محلول SDS

پروتکل PCR به شرح ذیل است :

۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه متعاقباً ٤٠ سیکل از ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه ، ٦٠ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۷ دقیقه در این حال زنجیره تکثیر مورد انتظار 441bp می باشد.

همچنین یک روش جدا سازیPCR-ELISA نیز وجود دارد. به علاوه سکانس کامل Thai HPV اکنون در بانک ژنی در موجود است.

برای تهیه سریع و ساده الگوها فقط با استفاده از بافت تازه میگوها یا مدفوع ، یک محلول لیز کننده حاوی NAOH ٪0.05 به اضافه SDA 0.025 برای هموژنزاسیون می تواند استفاده شود. (حجم نمونه به محلول۱:۱۰) – متعاقباً برای ۱۰ دقیقه جوشانده شود – سانتریفوژ گردد و ۲µl-۱برای PCR برداشته شود.

مزیت این روش این است که به مرحله استخراج Phenol-Chloroform نیازی ندارد. به هر حال به دلیل حلالیت پایین DNA در این روش و احتمال حضور مواد مهار کننده، حساسیت روش محدود به تقریباً ۳٤۰۰۰ ویریون در هر گرم نمونه بافت تازه می باشد. برای آنالیزهای حساس تر توصیه می شود که یک بافر لیز کننده دیگری استفاده شود (50mM Tris-Hcl PH9 ، 100mM EDTA ، 50mM NACL ، 2% SDS و 1 µg/ml Proteinase k بلافاصله قبل از استفاده اضافه شود) و متعاقباً از روش معمولی استخراج Phenol-Chloroform استفاده شود. با این بافر نمونه ها را می توان در دمای ۲۱ درجه برای سالیان متمادی بدون تخریب DNA استفاده کرد.

علاوه بر روش های PCR ، آنتی بادی های مونوکلونال نیز برای جدا سازی HPV اخیراً تولید شده است و این امیدواری وجود دارد که یک آزمایش Laterul Flow Chromatographic Test به زودی در دسترس قرار گیرد.

علاوه بر اطلاعات موجود در خصوص انتقال عمودی که در بالا توصیف شد، یک معمای بزرگ در تایلند هنوز حل نشده باقی مانده است و آن منشأ عفونت HPV بعد از خروج پست لاروها از هچری است. ما هرگز ویروس را در لاروهای موجود در هچری ها ندیده ایم و همچنین ویروس را در مولدین صید شده دریایی هم ردیابی نکرده ایم اگر چه در این خصوص حجم نمونه ها کم بوده و فقط آزمایشات هیستولوژی بر روی آنها انجام شده است به این دلیل که در آن زمان تکنیک PCR وجود نداشت. اولین محلی که ما مشکوک شدیم تانک های نرسری بود که پست لاروها بعد از خروج از هچری برای تطابق قبل از ذخیره سازی در استخرهای پرورشی، به آن جا انتقال داده می شدند. بود. این موضوع باعث این پیشنهاد شد که در این تانک ها ممکن است حاملین ناشناخته ای از ویروس وجود داشته باشد. پروب های DNA در مشخص نمودن این حاملین می تواند مفید باشد.

Infectious Hypodermal and HematoPoeitic Necrosis Vi rus (IHHNV) :

کلیات :

IHHNV بـرای اولـین بـار در میگوهـای آبـی Penaeus Stylirostris و میگـو سـفید P.vannamei (همچنین بـه نـام هـای Litopenaeus Stylirostris و Li.Vannamei) در آمریکـا در اوایـل دهـه ۱۹۸۰ میلادی گزارش شد. نهایتاً مشخص شد که ویروس از طریق مولدین میگوهای ببری سـیاه Penaeus monodon از آسیا وارد قاره آمریکا شده است(منشأ اولیه آسیا) .

IHHNV یک ویروس بدون پوشینه ۲۰ وجهی و با میانگین قطر ۲۲nm-۲۰ و حاوی یک DNA تـک رشـته ای خطـی بـه وزن 4.1kb مـی باشـد. بنـابراین شـبیه HPV ایـن ویـروس یـک densovirus از خـانواده Parvoviridea است.

اگر چه IHHNV به طور گسترده ای در چندین گونه از میگوهای پنائیـده وحـشی و پرورشـی رخ مـی دهد ، لیکن ویروس فقط باعث اپیدمی حاد و مرگ و میر فـراوان در میگوهـای جـوان و نابـالغ P.Stylirostris می شود. در میگوی وانامی این ویروس باعث کاهش رشد و رشـد نـامنظم و بـه شـکلی کوتیکـولی شـده کـه در مجمـوع بـه آن Runt-deformity syndrome (RDS) مـی گوینـد. علیـرغم نداشـتن مـرگ و میـر فـراوان خسارات اقتصادی ناشی شده بوسیله RDS می توانـد بـالا باشـد. تحقیقـا مـشخص شـده اسـت کـه میگوهـای P.Stylirostris که از اپیدمی های IHHNV زنده می مانند. می توانند ویروس را برای بقیه زندگی حمل کـرده و آن را به طریق افقی و عمودی منتقل کنند در حالی هیچگونه علایم کلینیکـی از بیمـاری را از خـود نـشان نمـی دهند. پست لاروی به دست آمده از این مولدین که به طریق عمودی آلوده شده اند متعاقباً مرگ و میـر شـدیدی را در مرحله جوانی تا تقریباً ۳۵ روزگی پرورش نشان می دهند. P.monodon بـه طـور نـسبی بوسـیله IHHNV مبتلا نمی شود در حالی که P.indicas و P.merguiengis به نظر مـی رسـند حـساسیتی نـسبت بـه عفونـت نداشته باشند.

تصویر ۳۷ – سندرم بدشکلی Runt deformity syndromeدر میگوی پنئوس وانامی . دو نمونه میگو رستروم بدشکل را نشان می دهند – یک مورد خم شده به سمت پائین و دیگری به سمت بالا و هردو رستروم نسبت به رستروم میگوی سالم کوتاه تر هستند.

تا امروز اطلاعات خیلی دقیقی از این ویروس در تایلند به دلیل اینکه این ویروس باعث مشکل قابل مشاهده ای در پرورش P.monodon نمی گردد، موجود نیست. به هر حال به دلیل وجود میگـوی P.Vannamei ایـن ویروس در حال حاضر به عنوان یک موضوع مهم درآمده و مطالعات دقیقی در این زمینه شروع شده است.

هیستوپاتولوژی :

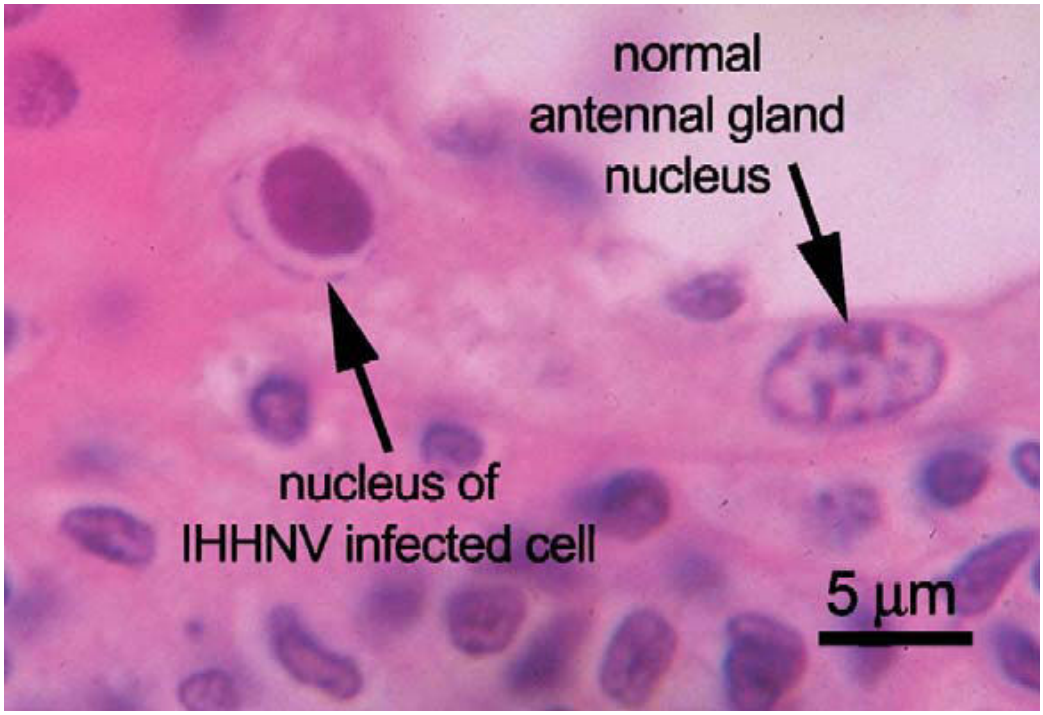
ضایعات IHHNV به طریق بافت شناسی از راه حضور گنجیدگی های داخل هسته ای ثابـت Cowdry typeA تـشخـیص داده می شـود . این گنجـیدگی به دلیل استفاده از محلول ثابت کننده Davidson`s بـه عــنوان یـک

خطای تشخیصی نیز حاصل می شود. از طریق رنگ آمیزی H&E این گنجیدگی ها در هسته های متورم شده به صورت ائوزنیوفیلیک بوده و اغلب گنجیدگی ها هاله ای شکل بوده و بوسیله کروماتین حاشیه ای محاصره می شوند. این گنجیدگی ها در بافت های اکتودرمال و مزودرمال رخ می دهد. در صورت استفاده از سایر ثابت کننده ها این گنجیدگی ها ممکن است مشاهده نشوند.

روش های مولکولی:

از آن جایی که گنجیدگی های Cowdry typeA به ندرت در میگوهای P.monodon دیده می شود روش های In situ hybridization با استفاده یک Probe اختصاصی IHHNV به منظوریک تشخیص قطعی لازم می باشد. این روش به خوبی حتی با میگوهای دارای آلودگی بسیار خفیف نیز جواب می دهد و می تواند در تشخیص عفونت های همزمان IHHNV و WSSV کمک کند. علاوه بر این آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در OIE Aquatic Animal Health Manual توصیف شده است. این PCR باعث تولید یک رشته DNA اختصاص IHHNV به وزن 356bp با استفاده از پرایمرهای
5′ TCG TAC TGG CTG TTC ATC 3′ و 5′-ATC GGT GCA CTA CTC GGA 3′ می شود.

سایر تکنیک های جدا سازی ویروس شامل دامنه گسترده ای از روش های مختلف که از روش های رنگی digital تا Real time-PCR به روش های تکی و یا دوتائی می باشد(Single or duplex assay)



تصویر ۳۸ – گنجیدگی Cowdry type A در هسته سلول های غدد آنتنی آلوده به ویروس IHHNV در میگوی P.monodon

با استفاده از پرایمرهای PCR:

(IHHNV3065F 5′ GAC GAC GAA GAA TGG ACA GA 3′ and IHHNV3065R 5′ TGC CTG GGT AGC TGG TAT GTA TA 3′)

به منظور تکثیر و سکانس کردن قطعه 3Kb (تقریباً ۷۵٪ از ژنوم ویروس) از نمونه های میگوهای آلوده به IHHNV در نقاط جغرافیایی مختلف جهان نشان داده شده است که ویروس IHHNV جدا شده از هاوایی کاملاً با ویروس جدا شده از فیلیپین یکسان بود بود اما با ویروس جدا شده از تایلند و تایوان تقریباً 4% و با ویروس جدا شده از تانزانیا و ماداگاسکار ۸٪ و ۱٤٪ تفاوت دارد. عصاره خالص ویروس از میگوهای مثبت IHHNV ماداگاسکار نتوانست باعث ایجاد عفونت به صورت تجربی در میگوهای P.Vannamie به صورت تزریقی شود در حالی که عصاره مشابهی از تایلند توانست باعث ایجاد عفونت تجربی شود. مطالعات اغلب بر روی یک نمونه از هر کشور صورت گرفته است. بنابراین، هنوز اطلاعات کمی در خصوص تفاوت های منطقه ای و جهانی ویروس داریم که بخواهیم آن را IHHNV Complex بنامیم.

به طور روشنی مشخص است که مطالعات هیستوپاتولوژیکی به تنهایی نمی تواند جایگاه ویروس را در IHHNV Complex تعیین کند به عنوان مثال میگوهای استرالیائی دارای ضایعات هیستوپاتولوژیکی شبیه ویروس IHHNV با پروب DNA به دست آمده از ویروس IHHNV جدا شده از هاوایی واکنشی نشان نداد. با توجه به این مطلب به نظر می رسد این دو نوع ویروس ممکن است۱۰٪ یا بیشتر در سکانس DNA با هم تفاوت داشته باشند. در حقیقت مطالعات نشان داده است انجام تغییراتی در پرایمر لازم است تا ویروسIHHNV استرالیایی را تشخیص دهد. این ویروس شباهت بسیار نزدیکی با نوع جدا شده از ماداگاسکار دارد.

نتایج خیلی جدیدتر نشان می دهد که بعضی از نمونه های میگوهای استرالیایی و افریقایی در واکنش PCR برای ردیابی ویروس IHHNV مثبت هستند در حالی که به ویروس آلوده نیستند بلکه تکه ای از DNA ویروسIHHNV را در ژنوم شان حمل می کنند – با توجه به حضور این قطعاتDNA پیشنهاد میشود که واریانت های مختلف ویروسی موجود ممکن است مربوط به مناطق مختلف جغرافیایی باشند – به طور واضحی تحقیقات بیشتری به منظور تخمین تنوع انواع ویروس های IHHNV و تأثیر بالقوه آنها بر روی صنعت میگو نیاز است.

یک مقاله ی جدید نشان می دهد که میگوهای آبی آمریکائی (P.Stylirostris) که به طور مداوم با IHHNV آلوده شده اند به طور واضحی از مرگ و میر ناشی از درگیری با ویروس لکه سفید محافظت می شوند. مشابهاً آزمایشات انجام شده بر روی میگوهای P.Vannamei های آلوده شده به IHHNV نتوانسته است ایمنی مشابهی ایجاد کند ازآنجائی که ویروس WSSV خطرناک ترین پاتوژن شناخته شده میگو تاکنون است درک مکانیسم این موضوع می تواند به روش جدیدی برای کنترل بیماری های ویروسی میگو ختم شود. در مقالات قبل تر پیشنهاد شده بود که میگوها و شاید همه بند پایان توانایی سازگاری با پاتوژن های ویروسی با یک روش تطبیقی را دارا باشند. تشاید به همین دلیل است که IHHNV می تواند اغلب به صورت آلودگی های

سنگین در میگوهای P.monodon با حداقل ضایعات و بدون پاسخ التهابی و تأثیرات منفی قابل ملاحظه ای رخ دهد.

: (TSV) Taura Syndnrne Virus

کلیات :

یک پاتوژن ویروسی جدید که به تازگی وارد قاره آسیا شده است TSV است. سندرم تو را برای اولین بار به عنوان یک بیماری جدید در قاره آمریکا در سال ۱۹۹۲ تشخیص داده شده است لیکن ویروس آن تا سال ۱۹۹٤ شناسائی نشد. عامل ایجاد کننده در ابتدا بر اساس حدس و گمان به عنوان یک عضو خانواده Picornaviridae طبقه بندی شد زیرا این ویروس بدون پوشینه با 32nm قطر، ۲۰ وجهی و حاوی یک ژنوم RNA تک رشته ای 10.2kb با سن مثبت بود. لیکن بعداً در خانواده Dicistroviridae نزدیک به جنس Cripavirus قرار داده شد

عفونت TSV علایم کلینیکی مشخصی را در P.Vannamei که می تواند برای تشخیص احتمالی بیماری استفاده شود نشان می دهد. این بیماری در دو فاز با علایم کلینیکی قابل مشاهده رخ می دهد.

فاز اول (فاز حاد) بوسیله قرمزی دم و نکروز قابل مشاهده بافت های اپیتلیال آن ناحیه مشخص می شود. بسیاری از میگوها در خلال دوره حاد بیماری در زمان پوست اندازی تلف می شوند. آنهایی که زنده می مانند وارد فاز بهبودی (Recovery) شده که این فاز بوسیله ضایعات سیاه پوسته در نواحی که نکروز فاز حاد اتفاق افتاده بود مشخص می شود. میگوهای دارای این ضایعات سیاه در خلال پوست اندازی های بعدی در خطر مرگ هستند. اما چنانچه زنده باقی بمانند ضایعات از روی سطح کوتیکول محو شده و میگوها به ظاهر سالم به نظر می رسند. در کنار این ظاهر معمولی و سالم ، آنها به فرم مزمن آلوده به TSV بوده و قادر به انتقال ویروس به میگوهای سالم هستند.

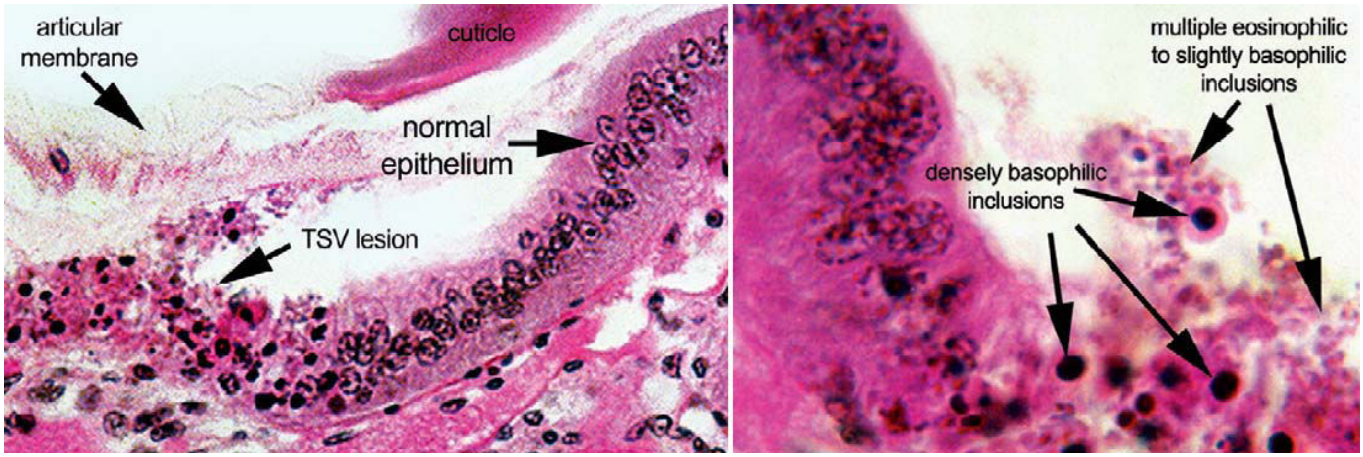
شیوع های TSV در آسیا برای اولین بار در تایوان گزارش گردید جایی که P.Vannamei به صورت بچه میگو ومیگوی مولد جهت استفاده در استخرهای آبزی پروری تجاری وارد شده بود. متعاقباً با استفاده از مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی حدس زده شد که TSV بوسیله ورود بدون دقت مولدین از مکزیک وارد تایوان شده است همچنین گمان می رود که ورود TSV به تایلند ناشی از ورود بدون دقت مولدین آلوده و یا پست لاروهای آلوده از قاره آمریکا، تایوان، چین یا هر دو این کشورها با هم باشد. همچنین مشخص شده است که TSV در تایلند تغییرات نسبتاً سریع و گسترده ژنتیکی را از یک پایه ژنتیکی محدود انجام داده است. یک مطالعه گسترده ژنتیکی مهم بر روی ژنتیک TSV انجام شده است.

تأثیرات TSV غیر بومی و واریانت های موتان یافته آن بر روی سخت پوستان بومی هنوز نامشخص است. به هر حال ا خیراً یک مطالعه عفونت نشان داده است که اثرات TSV بر روی P.monodon خیلی کمتر از اثرات آن بر روی P.Vannamei است

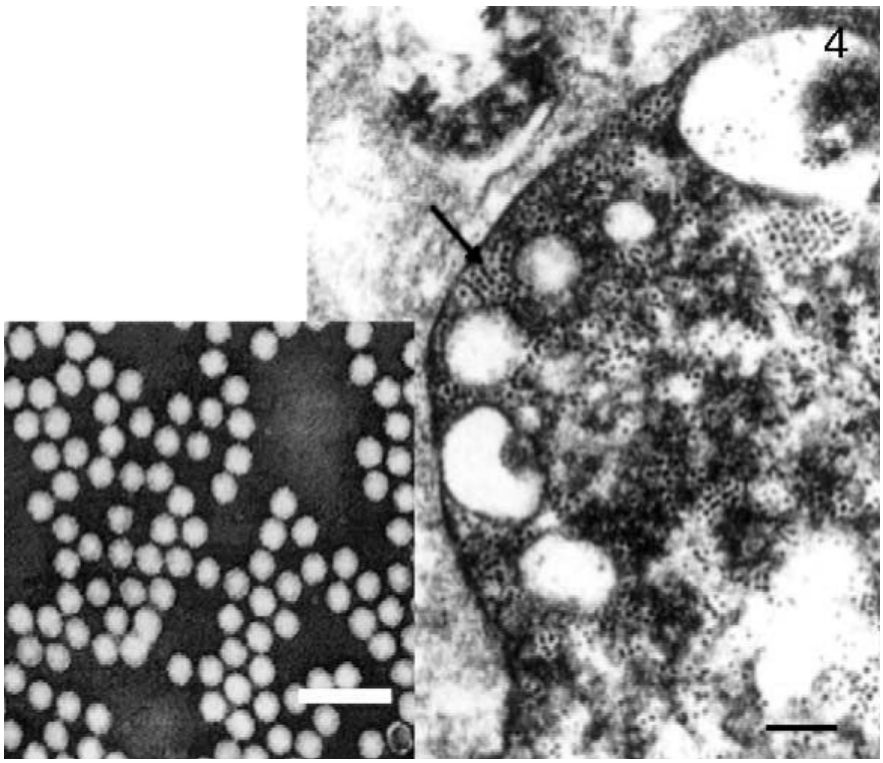
هیستوپاتولوژی :

از لحاظ بافت شناسی، تجمع کروی شکل از سلول ها را در ارگان های لنفاوی نشان می دهند(LO). به هر حال برای تشخیص TSV این یافته ها کفایت نمی کند چون سلول های کروی شکل می تواند بوسیله چندین عامل عفونی دیگر نیز ایجاد شود. در خلال فاز حاد آزمایشات هیستولوژی برای تشخیص بیماری لازم است ضایعات زیر کوتیکولی بوسیله حضور تعداد زیادی گنجیدگی های کروی اتوزینوفیلیک تا به شدت بازوفیلیک که از سلول های لیز شده آزاد شده اند مشخص می شود این حالت به بافت ظاهر ً buck Shot ً می دهد. به هر حال در خلال فاز بهبودی و مزمن ضایعات سلولی مشخص ناشی از TSV وجود ندارد و روش های مولکولی برای تشخیص عفونت نیاز است. بوسیله میکروسکوپ الکترونی می توان ویریون ها را می توان در سیتوپلاسم سلول های آلوده شده مشاهده کرد.

تصویر ۳۹ – علائم کلینیکی سندرم تورا . در سمت چپ باله های دمی میگوی پنئوس وانامی با مناطق قرمز نکروتیک (نوک پیکان) را نشان می دهد در عکس سمت راست ضایعات سیاه رنگ در پوسته را در مراحل بهبودی عفونت TSV نشان می دهد .



تصویر ٤٠- هیستوپاتولوژی ضایعات ایجاد شده در میگوی پنئوس وانامی آلوده به ویروس TSV در فاز حاد عفونت . توجه شود که گنجیدگی های کروی شکل سیتوپلاسمی در ابتدا به صورت ائوزینوفیلیک تا کمی بازوفیلیک بوده و در مراحل انتهائی به صورت کاملا بازوفیلیک در می آید



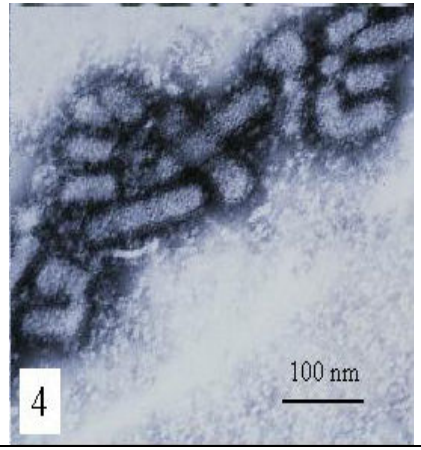
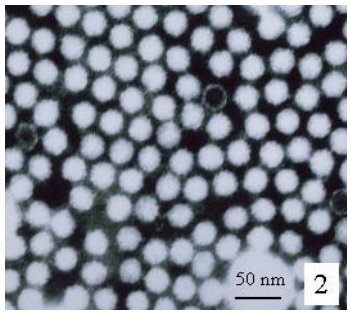
تصویر ٤١- ویروس TSVدر عکس میکروسکوپ الکترونی - در میکروگراف الکترونی فوق ویروس TSV در سیتوپلاسم با استفاده از مقاطع نازک بافتی از یک میگوی پنئوس وانامی آلوده نشان داده می شود عکسی که بر روی آن الحاق شده است ویریون های خالص TSV را با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی منفی نشان می دهد.

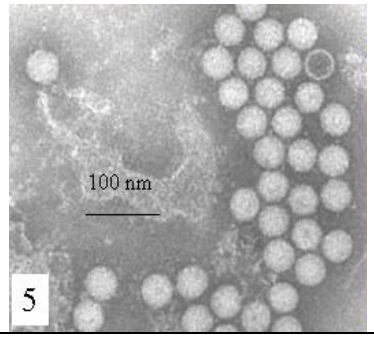
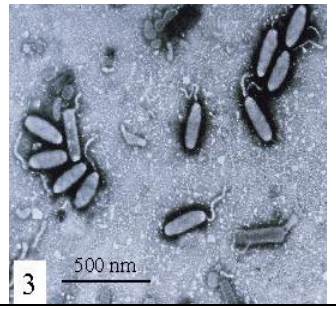
روش های مولکولی :

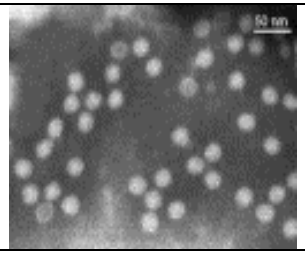
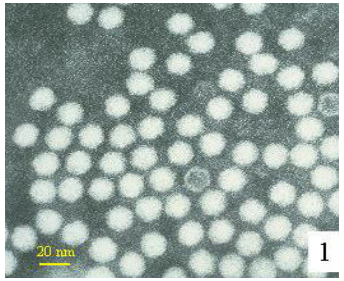
روش های مولکـولی بـرای جداسـازیTSV گـزارش شـده اسـت. پرایمرهـای مـورد اسـتفاده در روش RT-PCR باعث ایجاد یک قطعه DNA اختصاصی از ویروس TSV به وزن 231bp می گردند.

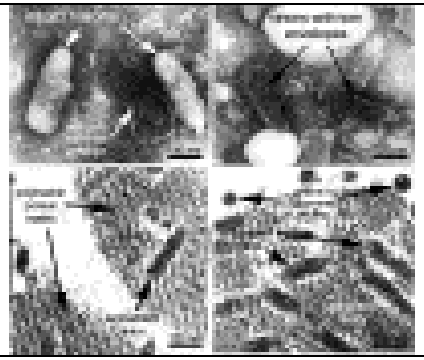
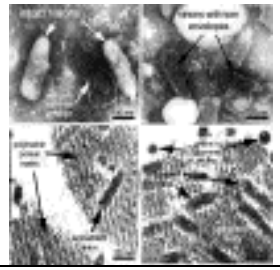
Sense: 5′ TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC 3′

Antisense: 5′ AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT 3´

نام ویروس	نام خانواده	خصوصیات و نوع ژنوم و شکل ویروس	علایم کلینیکی	علایم هیستوپاتولوژی
Yellow head virus	F: Ronaviridae G: Okavirus Order: Nidovirales YHV { %85 DNA seq. GAV { %96 a.a. identity LOV { %95DNA sequence GAV { %100 a.a. identity	ویریون های پوشینه دار، میله ای شکل، دارای یک زائده انتهایی نوع ژنوم : SSRNA (+) وزن ژنوم : ۲۲ kb قطر ویروس: ۱۷۳ × ٤٤ nm 	عمدتاً در میگوی P.monodon یافت می شود. در میگوهای آسیایی، ٤-۲ روز پس از توقف ناگهانی در مصرف غذا مرگ و میر شروع می شود و در عرض ۵-۳ روز به ۱۰۰٪ می تواند برسد. میگوهای مریض در اطراف استخر تجمع می کنند. هپاتوپانکراس به ظاهر زردرنگ تغییر پیدا می کند ظاهر کلی میگوها بصورت غیرمعمول بی رنگ می باشد. میگوهای زیر ۱۵ روز تقریباً به نظر مقاوم می رسند و میگوهای در سن ۲۵-۲۰ روز به بالا حساس تر می باشند.	محل های اختصاصی برای مشاهده ضایعات شامل: ارگان لنفوئید (Oka organ)، سلول های بینابینی هپاتوپانکراس، قلب، رودهٔ میانی و بافت پیوندی، بافت لایهٔ زیرکوتیکول معده و بافت آبششی می باشند. تعداد متوسط تا زیاد گنجیدگی های به شدت بازوفیلیک، کروی-داخل سیتوپلاسمی با قطر تقریبی ۲ mm نکروز سیستمیک آبشش و سلول های زیرکوتیکول معده، ضایعات موجود در ارگان های لنفاوی شبیه ضایعات GAV, TSV, LOVV, LOV, LPV, RPS می باشد.
(TSV) Tura Syndrome Virus	F: Dicistroviridae G: Cripavirus (criket paralysis virus)	نوع ژنوم : SSRNA (+) بدون پوشینه قطر ویروس:nm ۳۲ وزن ژنوم : ۱۰/۲ kb 	علایم کلینیکی واضحی دارد. دارای دو فاز می باشد: فاز حاد اولیه: مرگ و میر + قرمزی دم و نکروز ناحیهٔ دم. فاز recovery : پوسته سیاه در نواحی ضایعه دیده و مرگ و میر در اثر پوست اندازی. میگوهای نجات یافته به صورت مزمن ویروس را حمل کرده و قادر به انتقال ویروس به سایر میگوها هستند.	تجمع کروی شکل سلول ها در ارگان های لنفاوی (Lo) در فاز حاد آزمایشات هیستوپاتولوژی. لازم است انکلوژن های کروی ائوزینوفیلیک تا بشدت بازوفیلیک ظاهر "buck shot" در بافت زیرکوتیکول نشان می دهند در فاز بهبودی و مزمن ضایعات نداریم.

(IMNV) Infectious myonecrosis ویروس در سال ۲۰۰۲ در برزیل گزارش شد – در ۲۰۰۶ در اندونزی	F: totaviridae Totivirus	نوع ژنوم : d s RNA وزن ژنوم : 7560 bp قطر ویروس: ۴۰ nm 	مناطق نکروز کانونی تا گسترده سفید رنگ در عضلات مخطط (اسکلتی) بخصوص در بندهای انتهایی و بالهٔ دمی – علایمی کلینیکی ممکن است با یک شروع حاد متعاقب یک استرس (صید بوسیله تور پرتابی، تغییرات ناگهانی در جیره ، تغییرات ناگهانی در دما یا شوری)	عمدهٔ ضایعات در عضلات اسکلتی رخ می دهد. از دست رفتن مخطط معمولی عضلات (نکروز انعقادی) شکستگی فیبرهای عضلانی و ادم واضح در بین فیبرها. درا رگان های لنفاوی حضور و تجمع مشخص توده های کروی سلولی (LOS) در میان لوله های معمولی ارگان لنفاوی که باعث هیپرتروفی LO می شود یک یافته بسیار ثابت در فاز حاد یا مزمن عفونت IMNV می باشد.
(WSSV) White Spot Syndrome Virus ویروس در سال ۱۹۹۲ در چین و در ۱۹۹۳ در ژاپن	F: Nimarividae G: Whispovirus	نوع ژنوم : D s DNA حلقوی وزن ژنوم : ۳۰۰ kbp سه سکانس کامل AF 440570 تایوان AF332093 چین AF369029 تایلند 	لکه سفید بر روی سطح داخلی کوتیکول تلفات سریع و بالا بلافاصله بعد از شروع علایم کلینیکی، میگوهای مبتلا علایم کلینیکی بسیار واضحی دارند بی اشتهایی، ضعف، پوستهٔ شل، لکه های سفید، رنگ صورتی تا قرمز	هسته های بزرگ در بافت های با منشأ اکتودرم و مزودرم. اپی تلیوم زیر کوتیکول سفالوتوراکس و بافت آبشش هسته ای بزرگ با گنجیدگی های بازوفیلی در بافت اپی تلیوم زیر کوتیکول معده پاتوگونومیک است. (Cowdry type A)
(HPV) Hepato pancreatic virus	F: Parvoviridae Group: densovirus	نوع ژنوم : SS DNA قطر ویروس: ۲۳–۲۲ nm وزن ژنوم : ۵–۴ Kb بدون پوشینه ـ ۲۰ وجهی	تلفات در ماه اول ذخیره سازی اندازهٔ کوچک میگو طول نهایی ۶ cm	گنجیدگی های بازوفیلیک در هسته های متورم شده سلول های پوششی توبول های هپاتوپانکراس وروده میانی چسبیده به آن (سلول های با منشأ اندودرم) E.cell های

				هپاتوپانکراس ضایعات بیشتری را نشان می دهد.
IHHNV برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ در میگوهای آبی و سفید آمریکائی گزارش گردید	F: Parvoviridae Group: densovirus	نوع ژنوم : SS DNA قطر ویروس: ۲۳-۲۲ nm وزن ژنوم : ٤/١ Kb شکل ویروس: بدون پوشینه ـ ۲۰ وجهی  	در گونه های زیادی از میگوها گزارش شده است ولی فقط در میگوهای آبی آمریکایی باعث اپیدمی حاد می شود. در میگوی وانامی باعث کاهش و رشد نامنظم و به شکلی کوتیکول شده تحت عنوان RDS می شود در میگوی آبی آمریکایی باعث ایجاد حاملین زنده شده و میگوهای تولیدی از این مولدین تا ۳۵ روزگی دچار مرگ و میر شدید می شوند.	گنجیدگی های ائوزینوفیلیک داخل هسته ای ثابت(cow dry type A)در هسته های متورم شده در بافت های با منشأ اکتودرمال ومزودرمال
MBV **Penaeus monodon-type baculovirus** **PmSNPV** **P. monodons singly enreloped polyherosis virus** **P. monodon NPV** **(Pemo NPV)**	Baculoviridae DNA virus	نوع ژنوم : Circular DNA شکل ویروس : ویروس میله ای شکل بزرگ ـ ویریون ها درون یک ماتریکس granulin ویا پلی هیدرینی قرار دارد(NPV و یا GV) اندازه ژنوم : 80 × 180Kb Spherical baculovirus	ویروس بطور اولیه در میگوهای پرورشی P. monodon ایجاد بیماری می کند. سایر گونه ها ممکن است آلودگی به ویروس پیدا کنند ولی پاتولوژی شدیدی در آنها ایجاد نمی کند. مراحل لاروی بطور اختصاصی حساس تر هستند ولی آلودگی بالای ٤٥٪ ممکن است در جوان ها و بالغین بدون وجود علایم کلینیکی وجود داشته باشد. فقط تخم و ناپلی حساسیتی نسبت به عفونت ندارد. (اختصاصی پرتوزآها و سیازیس و مراحل ابتدایی pL) عفونت MBV در جوانترها و بالغین	از طریق رنگ آمیزی مالاشیت گرین اسمیرهای تهیه شده از بافت (Squash mounts) هپاتوپانکراس و دیدن گنجیدگی های کروی در هسته های بزرگ شده که در مقایسه با قطرات چربی به رنگ سبز در می آیند در رنگ آمیزی H&E هسته ها در مراحل ابتدایی عفونت هسته ها بزرگ شده و دارای مرکز اسیدوفیلیک هستند در مراحل انتهایی هسته های بزرگ شده حاوی گنجیدگی های اسیدوفیلیک می شود. (محل اختصاصی ضایعات سلول های توبولی هپاتوپانکراس و قسمت های جلویی

			باعث توقف سرعت رشد و کاهش بقاء و کاهش کارایی کل استخرها می شود. علایم کلینیکی شامل رنگ تیره خاکستری، آبی کم رنگ بدن، کاهش تغذیه و سرعت رشد، افزایش کثیفی آبشش ها Fouling ، خط سفید رودهٔ میانی.	رودهٔ میانی) آزمایش رشته های مدفوعی کمک کننده است.
BP Baculovirus Penaei	Baculoviridae DNA virus	نوع ژنوم : Circular DNA شکل ویروس : ویروس میله ای شکل بزرگ - ویریون ها درون یک ماتریکس granulin ویا پلی هیدرینی قرار دارد(NPV و یا GV) .اندازه ژنوم : $80 \times 180Kb$ Tetra hydral baculovirus	ارگان هدف ویروس سلول های لوله های اپی تلیال هپاتوپانکراس می باشد BP در میگوهای پنائیده قارهٔ آمریکا و هاوایی وجود دارد و از میگوهای پرورشی و وحشی در نیمکرهٔ شرقی گزارش نشده است. علایم کلینیکی شبیه MBV است.	شبیه MBV است ولی Oculsion body به صورت ذرات چندوجهی دیده شوند.
(BMNV) Baculoviral mid gut gland necrosis	Baculoviridae DNA virus	یک بایکلوویروس non-occluded آلوده کننده دستگاه گوارش است. **اندازه نوکلئوکپسید : ۳۶×۲۵۰ نانومتر** Circular DNA- ویروس میله ای شکل بزرگ - ویریون ها درون یک ماتریکس granulin و پلی هیدرینی قرار دارد. اندازه ژنوم : $80 \times 180Kb$ 	عمدتاً در میگوهای P. japanicus، P.monodon و P. plebejus یافت می شود. در میگوهای با سن لاروی و ابتدای پست لاروی باعث مرگ و میر می شود. ظاهر کدر هپاتوپانکراس مشخصهٔ بیماری است، مراحل انتهایی pL نسبت به بیماری مقاومت پیدا می کنند.	هسته سلول های اپی تلیال هپاتوپانکراس به شدت متورم شده است و نکروز می گردد، در هسته های آلوده کروماتین کوچک شده و به حاشیه رانده می شود. intranuclear inclusion bodies یک گنجیدگی اتوزینوفیلیک تا بازوفیلیک کم رنگ بدون شکل و نامنظم که هسته را به طور کامل پر می کند.