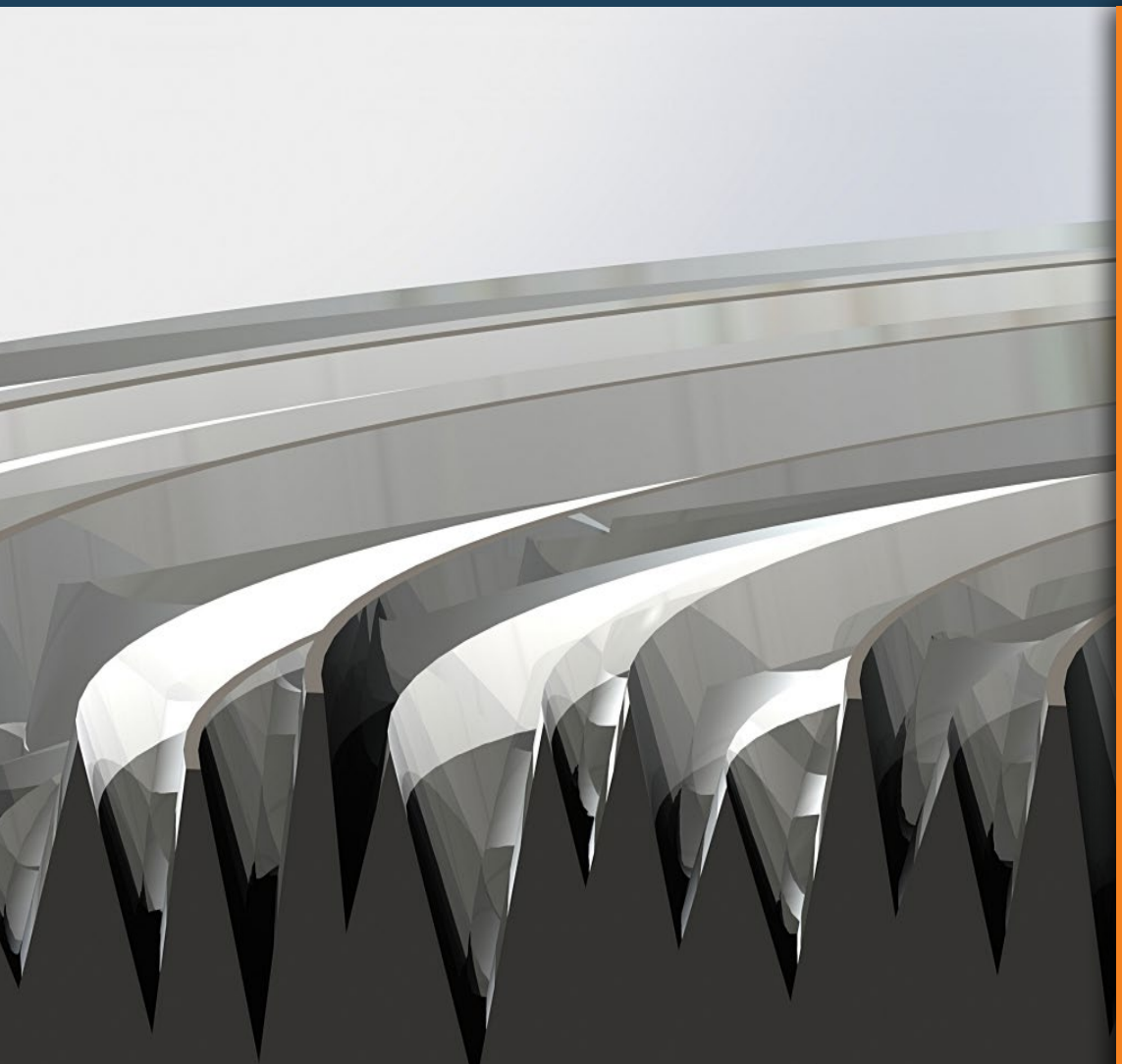
شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

ISSN 2538-3450

سال نهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٠ ■ شماره پیاپی ٣٦



مقایسه میکروسکوپ نیروی اتمی با برخی از روش‌های رایج در اندازه‌گیری زبری سطح

باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی و تسهیل توسعه پژوهش در کشور

باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی و تسهیل توسعه پژوهش در کشور

استانداردها، آزمون‌های ارزیابی کیفیت انواع ماسک مورد استفاده در شیوع ویروس کرونا و ...

بیماری‌های شایع میگوهای پرورشی و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی

مطالعات ژنتیک در کاوش‌های باستانی (ژئوآرکئولوژی)

ارزیابی منابع عدم قطعیت در تعیین دمای نرمی ویکات پلاستیک‌های گرمانرم

پیش‌بینی مقاومت فشاری تک‌محوره سنگ‌های آهکی با استفاده از شبکه عصبی و سیستم انطباقی منطق فازی

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

نویسندگان
فاطمه صادقی[۱و۳*]
محمدامین مظفری پور[۲و۳]
*f.sadeghi2775@gmail.com

بیماری‌های شایع میگوهای پرورشی و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی

چکیده

در حال حاضر بیماری‌های نوظهور، در کشورهای پرورش دهنده میگو بر تولید در مزارع پرورش میگو تاثیر می‌گذارند. فعالیت پرخطر نظیر حمل و نقل مولدین، لاروها و غذا از مناطق آلوده و بر هم زدن تعادل محیط‌زیست با فشار بیش از حد بر آن از علل بروز و گسترش بیماری‌های نوظهور عنوان شده‌است. داشتن برنامه‌های مراقبت و مقابله با بیماری‌ها در کشورهای پاک در جلوگیری از بروز این عوامل بیماری‌زا و همچنین تشخیص بهنگام درصورت بروز اولین مورد بیماری و برخورد مناسب و جلوگیری از گسترش آن بسیار ضروری است. روش‌های مختلفی برای تشخیص بیماری‌ها گزارش شده که شامل روش‌های مولکولی، روش هیبریداسیون درجا[۴]، هیبریداسیون نقطه‌ای[۵]، روش الیزا[۶] و روش پاتوبیولوژی است.

واژه‌های کلیدی

میگوی پرورشی، بیماری نوظهور، پیشگیری و تشخیص.

مقدمه

از دهه ۱۹۹۰ که صنعت آبزی پروری در بخش تکثیر و پرورش میگو به دوران شکوفایی خود رسید، تا کنون بروز بیماری‌های ویروسی با ایجاد خسارات هنگفت موجب به چالش کشیدن آن شده‌است که هر ساله خسارت‌های زیادی به این صنعت وارد می‌شود. با توجه به گسترش فعالیت‌های آبزی پروری، سالیانه بر تعداد بیماری‌های جدید نیز افزوده شده بطوری که در حال حاضر در میگوهای پرورشی، بیش از ۲۰ بیماری ویروسی، ۴ بیماری باکتریایی، ۳ بیماری قارچی و تعدادی نیز بیماری‌های انگلی گزارش شده‌اند که می‌توانند آسیب‌های جدی بر تولید میگو وارد کنند. از مهمترین بیماری ویروسی میگو می‌توان به لکه سفید میگو، بیماری باکتریایی مرگ زودرس میگو، بیماری مرگ پنهان، بیماری ویروسی تورآ و میکروسپوریا هپاتوپانکراس[۷] اشاره کرد. یکی از راه‌های مهم در کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها، تشخیص سریع و به موقع بیماری است. انتخاب روش تشخیص بیماری به هدف بررسی بستگی دارد. به‌عنوان مثال، برای آزمایش مولدین و ناپلی‌ها در هچری‌ها روش‌های تشخیص متفاوتی در مقایسه با روش‌های تحقیقاتی روی بیماری‌زایی ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد.

چندین روش شامل علایم بالینی، مشاهده با میکروسکوپ نوری، سنجش زیستی، روش‌های سرم‌شناسی، روش‌های مولکولی و هیستوپاتولوژیک برای تشخیص بیماری‌ها توسعه یافته‌اند. روش‌های هیستوپاتولوژیک، سرم‌شناسی و مولکولی از جمله روش‌های مرسومی هستند که در زمینه تشخیص بیماری در میگو بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

انواع بیماری میگو

لکه سفید میگو

بیماری لکه سفید از جمله بیماری‌های ویروسی است که باعث تلفات شدید در استخرهای پرورش میگو می‌شود. علیرغم اقدامات گسترده صورت گرفته به‌منظور کنترل آن، این بیماری هنوز اصلی‌ترین مشکل بهداشتی مزارع پرورش میگو در ایران است. این ویروس، پلاک‌های سفید رنگی را در قسمت کاراپاس میگو از خود بجای می‌گذارد و به همین دلیل بیماری را به علت رسوب و عدم جذب کلسیم، لکه سفید[8] می‌نامند [۱].

- عامل بیماری:

بیماری لکه سفید میگو بیماری ویروسی است و ویروس ایجاد کننده بیماری در کشورهای مختلف به نام‌های متفاوت شناسائی شده‌است ولی همگان معتقدند که عامل ایجاد کننده، ویروسی مشابه است [۴].

در حال حاضر بیماری لکه سفید جدی‌ترین و سخت‌ترین بیماری ویروسی تاثیرگذار در انواع گونه‌های میگو بوده و عامل بیماری، باکولوویروس معرفی شده‌است که یکی از بزرگترین ویروس‌های جدا شده از میگو است، این ویروس، عریض شده، بزرگ، پوشش‌دار، میله‌ای شکل و تا حدودی به فرم بیضی و دارای DNA بصورت دو رشته بهم تنیده بوده و از طریق افقی و عمودی قابل انتقال است. امروزه معتقدند که ویروس عامل بیماری لکه سفید هیچگونه ارتباطی با کلوویروس ندارد و مقرر شد در خانواده جدیدی بنام نیما ویریده یا ویسپوویریده قرار داده شود. عرض ویروس ۹+۱۲۱ نانومتر و طول آن ۲۶+۲۷۶ نانومتر بوده و دارای تعدادی فیلامان ضمیمه‌ای که بیشتر در قسمت نزدیک به انتهائی است دیده می‌شود [۱].

- نشانه‌های بیماری لکه سفید میگو:

علائم ظاهری این بیماری به راحتی در میگوهای جوان و بالغ قابل دیدن است. لکه‌های سفید ابتدا در قسمت کاراپاس میگو و بندهای ۵ تا ۶ بدن ظاهر شده و در مرحله پیشرفت، کل بدن را لکه‌های سفید با ضخامت ۰/۵ تا چند میلی‌متر می‌پوشاند. پوست میگو یا کوتیکول به راحتی از لایه درمیس جدا می‌شود. هپاتوپانکراس بصورت زرد مایل به سفید، بزرگ و شکننده تغییر شکل پیدا می‌کند. همولنف میگو رقیق و انعقاد آن یا به کندی صورت می‌گیرد و یا اصلاً صورت نمی‌گیرد. میگوها بی‌حال و اشتهای خود را از دست می‌دهند و میگوهای آلوده تمایل دارند که در کناره‌های استخر بایستند و به آهستگی در سطح آب شنا کنند و در نهایت در کف استخر ته‌نشین می‌شوند. با نمایان شدن علائم کلینیکی بعد از ۲ تا ۷ روز مرگ و میر بسیار شدید بین ۷۰ تا ۱۰۰ درصد در مزارع پرورشی اتفاق می‌افتد [۱۱ و ۱۸].

بیماری لکه سفید در تمام سنین میگوها از پست لارو ۱۵ تا وزن ۴۵ گرم در مزارع متراکم و غیر متراکم گزارش شده‌است. در بعضی مواقع لکه‌های سفید با تغییر رنگ به قرمز همراه است و باید توجه داشت که تغییر رنگ به قرمز بواسطه همراه شدن باکتری‌های خانواده ویبریو با این عفونت است.

از لحاظ آسیب شناسی بافتی نیز این ویروس باعث تغییرات پاتولوژیک از قبیل دژنرسانس سلولی در سطح وسیع، هیپرتروفی شدید هسته‌ای و اجسام گنجیدگی درون هسته‌ای، حاشیه‌نشینی کروماتین در بافت‌های اکتودرمی و مزودرمی بویژه در بافت پوششی پوستی زیر کوتیکول، بافت آبشش، بافت پوششی معده، بافت پیوندی، عصبی و غدد آنتنی است [۲ و ۳].

سندروم تورا

سندروم تورا که برای اولین بار در اکوادور در سال ۱۹۹۲ شناخته شد یکی از مهمترین بیماری‌هایی است که باعث خسارت در مزارع میگوی پاسفید می‌شود. در آغاز تصور می‌شد که یک عامل سمی موجب بروز بیماری می‌شود، اما سرانجام نشان داده شد که این بیماری ناشی از یک عامل ویروسی است که آن را سندروم ویروس تورا نامیدند. این ویروس در ابتدا در خانواده پیکورناویریده طبقه‌بندی شد اما بعدها در خانواده دیسترووویریده قرار گرفت. این ویروس در برابر حرارت و شوری بالا حساس‌تر بوده و خود را نشان می‌دهد و می‌تواند ۲۸-۳۰ روز در آب زنده بماند [۶].

- نشانه‌های ظاهری

سندرم تورا به بیماری دم قرمز معروف است. شناخته‌ترین بیماری دوره نوزادگاهی وانامی است که ۱۴ تا ۴۰ روز پس از ذخیره‌سازی در استخرهای پرورش و یا حوضچه‌ها شیوع پیدا می‌کند. بنابراین، میگوهای بیمار را بیشتر نوجوان‌های کوچک به وزن ۰/۵ تا کمتر از ۵ گرم در بر می‌گیرد [۷].

مرحله حاد: نشانه‌های عمده میگوهای مبتلا به مرحله حاد تورا عبارتند از:

۱) توسعه رنگدانه‌های قرمز که به میگوهای آلوده، رنگ متمایل به قرمز کم‌رنگ عمومی می‌دهد؛

۲) یوروپد و پاهای شنا، رنگ قرمز واضح می‌گیرند (علت نامگذاری بیماری دم قرمز)؛

۳) میگوهای با آلودگی حاد در خلال پوست اندازی می میرند.

میگوهایی که دارای نشانه‌های حاد هستند دارای پوسته نرم، لوله گوارش خالی و بیشتر در آخر مراحل پوست اندازی هستند [۶].

مرحله مزمن: تعدادکم تا متوسط میگوها در استخرهای آلوده، ضایعات سیاه رنگ روی پوست بیرونی شبیه به بیماری پوسته باکتریایی را بروز می‌دهند. این میگوها می‌توانند از پوسته نرم و گسترش رنگدانه‌های قرمز برخوردار باشند و یا ممکن است ظاهر، رفتار و تغذیه عادی داشته باشند [۱۶].

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال نهم ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٠ ■ شماره پیاپی ۳۶

سندروم مرگ زودرس

در سال‌های اخیر، یک بیماری جدید با عنوان بیماری سندروم مرگ زود رس یا زود هنگام[9] در میگوها شناخته شد که به آن سندروم نکروز حاد هپاتوپانکراس[10] یا به اختصار AHPNS نیز گفته می‌شود. این بیماری، یک بیماری باکتریایی است و سیستم گوارشی میگوها را درگیر می‌کند. بروز و شیوع این بیماری در چند سال اخیر سبب مرگ و میر شدید و خسارت در میگوهای پرورشی کشورهای چین (۲۰۰۹)، ویتنام (۲۰۱۰)، مالزی (۲۰۱۱) و در سال ۲۰۱۲ از خلیج شرقی تایلند گزارش شده‌است که این بیماری در سال‌های اخیر فعالیت پرورش میگو در جنوب شرق آسیا و مکزیک را دچار مشکل نموده است. همچنین در کشورهایی از آفریقا که پرورش میگو در آنها در حال توسعه است مانند ماداگاسکار – مصر – موزامبیک – تانزانیا این بیماری مشکلاتی را ایجاد کرده است. بیماری در گونه‌های پنئوس مونودون و لیتوپنئوس وانامی سبب مرگ و میر شدید (۳۰ تا ۴۰ درصد) و گاهی تا ۱۰۰ درصد نیز گزارش شده‌است. به‌طور معمول این بیماری در ۲۰ تا ۳۰ روز ابتدایی پرورش و گاهی تا ۷۰ روزگی بروز می‌کند [۲۱].

• نشانه‌ها

علایم بالینی شامل بی حالی، کم اشتهایی، رشد کم، شنای کج، نرم شدن پوسته، لکه سیاه و رنگ پریدگی است. میگوهای بیمار دارای هپاتوپانکراس غیر نرمال (متورم، رنگ پریده یا سفید و با رگه‌های سیاه) هستند. عضلات میگو به خصوص در ناحیه شکمی، به رنگ سفید یا کدر است. میگوهای درگیر دارای روده و معده خالی و مدفوع میگو گاهی سفید رنگ است. مرگ و میر میگوها در حین و یا پس از پوست اندازی صورت می‌گیرد [۵].

بیشترین تاثیر این بیماری بر دستگاه گوارش میگو است. محققین کشف کردند که سندرم مرگ زودرس توسط عاملی باکتریائی پدید می‌آید که از طریق خوراک به میزبان منتقل شده و در دستگاه گوارش میگو تشکیل کلنی می‌دهد. این کلنی باکتریایی، سمّی از خود ترشح می‌کند که موجب تخریب بافتی و بروز اختلال در هپاتوپانکرآس میگوی آلوده می‌شود [۵].

بیماری مرگ پنهان میگو:

یکی از بیماری‌های نوپدید در صنعت پرورش میگو، بیماری ویروسی مرگ پنهان است. عامل ایجاد کننده بیماری یک ویروس RNA دار تک رشته‌ای کروی بدون پوشش با قطر تقریبی ۱/۸± ۲۴/۹ نانومتر از جنس نوداویروس است. این بیماری اولین بار در سال ۲۰۰۹ در مزارع پرورش میگوی چین گزارش شد [۱۹]. این بیماری به‌طور عمده در طول ۶۰ تا ۸۰ روز پس از ذخیره‌سازی بروز پیدا می‌کند که به‌طور معمول با تلفات بالای ۸۰ درصد همراه است [۲۰]. این بیماری تاکنون با ضرر و زیان اقتصادی فراوانی به ویژه در مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو همراه بوده است. بیماری مرگ پنهان به این دلیل پنهان نامیده می‌شود که برخلاف بسیاری از بیماری‌های ویروسی همچون بیماری ویروسی لکه سفید که تلفات در سطح آب و یا در کناره استخر جمع می‌شوند، پرورش دهندگان هیچ اطلاعی از مرگ و میر روی داده شده در استخر ندارند [۱۹ و ۲۰].

• علایم بالینی

در استخرهای پرورشی، میگوهای مبتلا به بیماری ویروسی مرگ پنهان، تلفات آرام پیش رونده تا مرگ دسته جمعی مشاهده می‌شود به‌گونه‌ای که میزان تلفات ممکن است به ۸۰ تا ۹۰ درصد برسد. از مهمترین علایم بالینی می‌توان به نکروز، سفید شدن و رنگ پریدگی عضلات مخطط شکمی، نکروز و آتروفی شدن (کوچک شدن) هپاتوپانکراس، خالی بودن روده و معده، نرم شدن پوسته و کندی رشد اشاره نمود [۱۰].

میکروسپوریا هپاتوپانکراس EHP

اخیرا گزارش‌های بسیاری از مزارع پرورش میگوی پا سفید در آسیا و مناطق دیگر در اثر بروز انگل از گروه میکروسپوریدیا[11] و گونه Enterocytozoon hepatopenaei منتشر شده که باعث کاهش چشمگیری در رشد و تولید بوده است [۱۲]. این انگل اولین بار در سال ۲۰۰۴ در مزارع پرورش میگوی ببری سیاه در تایلند گزارش شد. در ابتدا بسیاری از محققین این انگل را عامل سندرم مدفوع سفید[12] در میگوی پا سفید می‌دانستند اما مطالعات تکمیلی نشان داد که این انگل عامل بروز این سندرم در میگوها نیست [۱۴]. گونه‌های زیادی از گروه میکروسپوریدیا در خانواده میگوهای پنائیده گزارش شده‌است و ارتباط بسیار نزدیکی به قارچ‌های مخمر مانند دارند [۱۲]. آنها فاقد تاژک‌های حرکتی هستند و قادرند تا مدت‌های زیادی در اسپورهای مقاومی که تولید می‌کنند، زنده بمانند [۱۴]. اسپورهای تولید شده به شکل بیضی هستند و تقریبا ۱/۷ تا ۱ میکرومتر قطر دارند [۸]. آنها در محیط‌های شور تا شیرین زندگی می‌کنند و بیش از ۱۹۰ جنس از آنها شناسایی شده‌است که تقریبا ۲۰ جنس از آنها ماهی‌ها، ۵۰ جنس پاروپایان و ۲۱ جنس از بی‌مهرگان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این بیماری، بیشتر میگوهای پرورشی خانواده پنائیده بخصوص میگوی ببری سیاه و میگوی پا سفید را درگیر می‌کند [۱۵].

• انتقال و پراکنش

مولدین و لاروها می‌توانند عامل پراکنش بیماری باشند و به‌صورت افقی از طریق غذایی و همجنس خواری به راحتی انتقال پیدا کنند و نیاز به هیچ میزبان واسطی ندارند. انتقال بیماری به شکل افقی از طریق ناقلینی نظیر کرم پلی‌کت و آرتمیا یا تغذیه مستقیم از هاگ عامل بیماری صورت می‌گیرد.

انتقال عمودی آن از طریق ارتباط گنادها در برخی از گونه‌ها نیز تایید شده‌است [۱۳].گزارش‌هایی مبنی بر انتقال از مولدین به لارو در میگوی پاسفید وجود دارد.

راه‌های پیشگیری از بیماری

- انتخاب مولدین بدون بیماری: انتقال بیماری می‌تواند از طریق مولدین به نوزادان از طریق تخم‌های آلوده اتفاق بیفتد؛ بنابراین، باید تخم‌ها و پست لاروها را با تست ریل تایم PCR غربال کرد.
- جلوگیری از واردات مولدین و لارو: بیماری ممکن است از طریق وارد کردن مولدین و پست لاروها به مزارع و هچری‌ها اتفاق افتد [۲ و ۳].
- نگهداری مولدین مناطق مختلف در تانک‌های جداگانه به‌منظور جلوگیری از آلودگی بین میگوهای منابع مختلف؛
- خارج کردن ناقلین ویروس و انجام اقدامات ضد عفونی: موجودات آبزی شامل خرچنگ‌ها،کوپه پودا، میگوهای وحشی و سایر سخت پوستان از ناقلین ویروس لکه سفید هستند؛
- کنترل میگوهای سالم با استفاده از آزمایش PCR در طی دوره پرورش؛
- استفاده از پروبیوتیک‌ها[۱۳] و آب با کیفیت مطلوب به‌منظور افزایش تعداد باکتری‌های سودمند در استخر؛
- متعادل کردن تراکم استخرها از طریق کم کردن تراکم لاروها در استخرها برای کاهش استرس؛
- ضد عفونی کردن آب خروجی هچری و ضد عفونی کردن آب خروجی استخرهای پرورشی [۲ و ۳].

روش‌های تشخیص بیماری‌های میگو

روش‌های سرمشناسی

سرمشناسی یا سرولوژی روشی است که به بررسی سرم خون و سایر مایعات بدن می‌پردازد. آزمایش‌های سرمشناسی اغلب بر این اساس استوارند که به‌جای یافتن یک آنتی‌ژن یا عامل بیماری‌زا در بدن، آسان‌تر است که پاسخ اختصاصی بدن به آن آنتی‌ژن (پادتن (آنتی‌بادی)) را جستجو کرد. اصول کلی این روش‌ها استفاده از آنتی‌بادی‌های مخصوص برای تعیین آنتی‌ژن‌های خاصی است که به‌طور معمول از اجزای ساختاری عوامل بیماری‌زا و یا پروتئین‌های تولید شده توسط عامل بیماری‌زا هستند. در روش‌های سرمشناسی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و یا پلی‌کلونال تولید شده در برابر آنتی‌ژن ویروس یا آنتی‌ژن‌های نوترکیب ویروس برای ردیابی آنتی‌ژن در مایعات خونی و لنفی موجود زنده استفاده می‌شود. این روش‌ها برای تایید تشخیص عفونت و مشاهده سلول‌های آلوده و یا اندازه‌گیری کمی آنتی‌ژن‌های ویروسی بوده که بالقوه سریع، حساس و قابل اجرا است [۹].

روش‌های مولکولی

- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱۴]:

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روشی است که در آن مقادیر کمی از DNA هدف، تکثیر می‌شود. این روش با به کار بردن پرایمرهای مخصوصی که برای ردیف و توالی خاصی از DNA طراحی شده‌است، انجام می‌گیرد. به‌منظور نتیجه‌گیری بهتر، غیر از PCR معمولی، روش‌های جدیدی از PCR در ذیل ارائه شده‌است:

- PCR تک مرحله‌ای:

عامل بیماری را در میگوهایی که دارای تراکم قابل توجهی از DNA ویروس هستند تشخیص می‌دهد که به‌طور معمول در این حالت ممکن است میگوها علایم بیماری را نشان ندهند [۱۷].

- نستد - پی‌سی‌آر[۱۵]:

در این روش به‌منظور افزایش حساسیت PCR از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود. ابتدا با یک جفت پرایمر اول در طول ۱۵ تا ۳۰ چرخه قطعات مشخصی از DNA هدف تکثیر می‌یابند، سپس محصول PCR به لوله دیگری منتقل شده و به‌عنوان الگو استفاده و با جفت پرایمرهای دوم، مرحله دوم PCR انجام می‌شود.

مجموعه اول پرایمرها برای ردیابی توالی‌های بالادست رشته هدف و مجموعه پرایمرهای دوم برای شناسایی توالی‌های پایین دست رشته هدف سنتز شده‌اند. در این حالت مجموعه دوم پرایمرها نسبت به مجموعه اول داخلی هستند؛ به همین دلیل است که به این روش نستد یا PCR تو در تو می‌گویند. مجموعه اول پرایمرها را «پرایمرهای خارجی» نیز می‌نامند. پرایمرهای خارجی بخش‌های بزرگی از ژن مورد نظر را تکثیر می‌کنند. بخش‌های کوچکی از ژن‌های تکثیر شده در دور اول با پرایمرهای خارجی، به‌عنوان الگو برای دور دوم PCR با استفاده از پرایمرهای مجموعه دوم یا پرایمرهای داخلی (پرایمرهای تو در تو) مورد استفاده قرار می‌گیرند.

این روش می‌تواند عفونت‌های خفیف را در مولدین، ناپلی، پست لارو و میگوهای جوان تشخیص دهد [۱۷].

- روش ریل تایم PCR:

روش ریل تایم PCR، تشخیص مورد قبول برای غربال نمودن میگو از نظر ویروس‌ها است. محصول PCR تجمع یافته در پایان هر چرخه، با استفاده از یک پروب اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی برای توالی هدف که با رنگ فلورسنت به‌عنوان رنگ گزارشگر نشانه‌گذاری و بین دو پرایمر در محدوده توالی DNA اندازه‌گیری می‌شود. در این روش کمتر از ۵ مولکول DNA از عامل بیماری برای تشخیص کافی است. در صورتی که

در دیگر روش‌های مولکولی به بیشتر از ۱۰۰ مولکول نیاز است. با توجه به شدت مرگ و میر ناشی از بیماری لکه سفید و با توجه به اینکه این بیماری غالباً در میگوها بصورت نهفته است 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.

روش هیبریداسیون درجا

روشی برای تعیین موقعیت و ردیابی توالی‌های خاص mRNA و DNA در مقاطع بافت‌های تثبیت شده از طریق هیبرید کردن رشته مکمل یک نوکلئوتید نشانگر به ترادف مورد نظر است. در این روش، DNA عامل بیماری در بافت میزبان با استفاده از هیبریداسیون با پروب DNA تشخیص داده می‌شود که برای تشخیص سلول‌های آلوده در بافت مفید است اما نسبت به PCR از حساسیت کمتری برخوردار است و نیاز به تجهیزات هیستوپاتولوژی دارد [۹].

روش هیبریداسیون نقطه‌ای

در این روش باید RNA یا DNA را جداسازی کرده و روی ژل تفکیک نمود، سپس روی غشای نیتروسلولز لکه‌گذاری شده و با ترادف مکمل آن پروب کردن صورت می‌گیرد. در واقع قطعه‌ای از DNA ویروس با استفاده از هیبریداسیون با پروب DNA تشخیص داده می‌شود. این روش هم در مقایسه با PCR از حساسیت کمتری برخوردار است.

روش بلاتینگ یا روش لکه‌گذاری در زیست‌شناسی مولکولی روشی است که برای شناسایی اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها به کار می‌رود و به‌طور کلی به‌منظور تشخیص اهداف زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ژنتیک مولکولی به انتقال مولکول‌های تفکیک شده در الکتروفورز از ژل به روی یک غشای ویژه، بلاتینگ یا بلات کردن گفته می‌شود. در روش لکه‌گذاری، مولکول مورد نظر را روی یک بستر که به‌صورت معمول یک غشای نیتروسلولزی است، تثبیت می‌کنند.

روی ژل نمی‌توان به خوبی هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک و شناسایی پروتئین‌ها را انجام داد؛ زیرا ژل‌ها نفوذپذیری کمی دارند و شناساگرها (Probe) به راحتی از ژل خارج می‌شوند. به همین دلیل برای هیبریداسیون و تفکیک مولکول‌ها از غشا استفاده می‌شود.

روش هیستوپاتولوژی

اگرچه این روش به‌عنوان آزمایش طلایی در تشخیص بیماری ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد اما از حساسیت و اختصاصیت کمتری نسبت به روش مولکولی و سرشناسی برخوردار بوده و همچنین مدت زمان لازم برای ارائه پاسخ بیش از سایر روش‌های تشخیصی است. در این روش، به‌عنوان مثال در بیماری لکه سفید، سلول‌هایی با هسته‌های هیپرتروفی شده و گنجیدگی‌هایی داخل هسته‌ای از نوع Cowdry type A (که با کروماتین به حاشیه رانده و از نوکلئوپلاسم جدا شده‌است) شناخته می‌شود. این گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای به‌طور محسوسی مشخص بوده و بزرگتر از گنجیدگی‌های پدید آمده در بیماری نکروز بافت خون‌ساز هیپودرم عفونی هستند. هسته‌های آلوده بازوفیلی و متسع می‌شوند که مشخصه آن واکوئله شدن بافت است [۹].

نتیجه‌گیری

تاکنون درمان قطعی برای غلبه بر بیماری میگو گزارش نشده‌است. بنابراین، باید تلاش شود تا حد امکان، تلفات این بیماری را به حداقل کاهش دهیم. در طی دوره پرورش لازم است که وضعیت بیماری‌ها بطور مرتب کنترل شود. نمونه‌هایی باید از مزرعه هر دو هفته یکبار جمع آوری شده و به یک آزمایشگاه دارای امکانات PCR ارسال شود.

در بخش آزمایشگاه تشخیص مولکولی بیماری‌های مهم صنعت پرورش میگو اقدامات مناسب تشخیصی انجام می‌شود که کمک شایانی به احیای صنعت پرورش میگو کرده است. این اقدامات سبب تثبیت و تداوم تولید در استان هرمزگان به‌عنوان بزرگترین تولید کننده میگوی پرورشی در کشور شده‌است.

پی‌نوشت

۱. دکتری علوم باغبانی گرایش اصلاح و بیوتکنولوژی، مجتمع آزمایشگاهی کیفیت آزمای جنوب
۲. کارشناسی ارشد شیمی - فیزیک، مجتمع آزمایشگاهی کیفیت آزمای جنوب
۳. عضو کارگروه تخصصی زیست‌فناوری

4. In situ hybridization
5. DOT blot hybridization
6. ELISA
7. Enterocytozoon Hepatopenaei (EHP)
8. White Spot Syndrome Disease (WSSD)
9. early mortality syndrome (EMS)
10. Necrosis Hepatopancreatic Acute Syndrome (AHPNS)
11. Microsporidian
12. White Feces Disease (WFS)
13. Probiotics
14. Polymerase chain reaction (PCR)
15. Nested-PCR

مراجع

[۱] افشارنسب.م؛ دشتیان نسب.ع؛یگانه. و. (۱۳۸۶) بررسی بیماری‌زایی ویروس سندرم لکه سفید (syndrome spot White virus) در میگوی پاسفید (Litopenaeus vannamei) مجله علمی شیلات ایران، شماره۱، بهار ۱۳۸۶.

[۲] تخم افشان.م؛ تمجیدی.ب. (۱۳۸۲) علایم ظاهری و آسیب شناسی بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی سفید هندی (Penaeus indicus) در استان خوزستان. مجله علمی شیلات ایران، شماره۲، تابستان۱۳۸۲ صفحات ۱۵ تا ۲۸.

[۳] سلطانی. م. (۱۳۸۱) اثرات ملی و بین‌المللی ناشی از بیماری ویروسی لکه سفید در صنعت میگو. فصلنامه نظام دامپزشکی شماره۲، زمستان ۱۳۸۱، صفحات ۵۳ تا ۵۷.

[4] Chapman.R.W;Browdy.C.L;Savin.S;Prior.S;Wenner.E (2004) Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks.Dis Aquat org.Vol.59:179-158

[5] De Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming?. PLoS pathogens, 10(4), e1003919.

[6] Flegel, T,W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258:1-33

[7] Hasson, K.W., Lightner, D.V., Poulos, B.T., Redman, R.M., White, B.L., Brock, J.A. and Bonami. J.R. (1995). Taura Syndrome in Penaeus vannamei: Demonstration of a viral etiology. Dis Aquat Org 23:115-126.

[8] Kummari, S., Haridas, D. V., Handique, S., Peter, S., Rakesh, C. G., Sneha, K. G., ... & Pillai, D. (2018). Incidence of hepatopancreatic microsporidiasis, by enterocytozoon hepatopenaei (EHP) in Penaeus vannamei culture in Nellore District, Andhra Pradesh, India and the role of management in its prevention and transmission. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 7(2), 2125-2134.

[9] Lightner, D.V., (1996). A Hand Book of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.

[10] Liu, S., Wang, X., Xu, T., Li, X., Du, L., & Zhang, Q. (2018). Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV) in shrimp ponds. Journal of invertebrate pathology, 154, 29-36.

[11] Madhavi.R;Janakiram.P;Jayasree.L;Murth.P.S.N.(2002) Occurrence infections with multiple viruses in Penaeus monodon from culture ponds of north coastal Andhra Pradesh.Current Science ,Vol 82.No 11. 10.

[12] Newman, S. G. (2015). Microsporidian Impacts Shrimp Production. Glob. Aquac., 33-35.

[13] Otta, S. K., Patil, P. K., Jithendran, K. P., Rajendran, K. V., Alavandi, S. V., & Vijayan, K. K. (2016). Managing Enterocytozoon hepatopenaei (EHP), microsporidial infections in vannamei shrimp farming: An Advisory.

[14] Singh, M., & Singh, P. (2018). Enterocytozoon hepatopenaei: A microsporidian in the midst of serious threat to shrimp aquaculture. J Entomol Zool Stud, 6, 936-939.

[15] Tangprasittipap, A., Srisala, J., Chouwdee, S., Somboon, M., Chuchird, N., Limsuwan, C., ... & Sritunyaluksana, K. (2013). The microsporidian Enterocytozoon hepatopenaei is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp Penaeus (Litopenaeus) vannamei. BMC veterinary research, 9(1), 1-10.

[16] Tu, C., Huang, H.T., Chuang, S.H., Hsu, J.P., Kuo, S.T., Li, N.J., Hsu, T.L., Li, M.C. and Lin. S.Y. (1999). Taura Syndrome in Pacific white shrimp Penaeus vannamei cultured in Taiwan. Dis. Aquat. Org 38: 159-161.

[17] Xie, Z., Pang, Y., Deng, X., Tang, X., Liu, J., Lu, Z., Khan, M.I., (2007). A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp. Diseases in Aquatic Organisms, 76, 77- 80.

[18] Yoganandhan.K;Thirupath;SahulHameed.A.S.(2003). Biochemical, physiological ; Hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp Penaeus indicus. Aquaculture, 221:1-11.

[19] Zhang, Q., Liu, Q., Liu, S., Yang, H., Liu, S., Zhu, L., & Huang, J. (2014). A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. Journal of General Virology, 95(12), 2700-2709.

[20] Zhang, Q., Xu, T., Wan, X., Liu, S., Wang, X., Li, X., & Huang, J. (2017). Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. Virus research, 233, 113-119.

[21] Zorriehzahra, M. J., & Banaederakhshan, R. (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. Adv. Anim. Vet. Sci, 3(2S), 64-72.

No.36 ■ Winter 2022 ■ Issue 4 ■ Volume 9
Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Authors

Fatemeh Sadeghi[1,3*]

Mohammad Amin Mozafaripour[2,3]

* f.sadeghi275@gmail.com

1. PhD in Horticulture Science, breeding and biotechnology, Laboratory of Keyfiat Azmaye Jounob
2. Master degree in chemistry and physics, Laboratory of Keyfiat Azmaye Jounob
3. Member of Biotechnology Working Group

Common diseases of farmed shrimp (Litopenaeus vannamei) and laboratory diagnostic methods

Abstract

Emerging Infectious Diseases Affecting Farmed Shrimp in farming countries. High-risk activities such as transporting broodstock, larvae and food from contaminated areas and upsetting the environment balance have been cited as causes of the emergence and spread of shrimp diseases. Having disease management programs in clean countries is very important in preventing the occurrence of these pathogens as well as timely diagnosis of the disease and proper treatment and prevention of its spread. Various methods have been reported for the diagnosis of diseases, including molecular methods, in situ hybridization method, dot blot hybridization, ELISA and pathobiology method.

Keywords

Farmed shrimp, emerging disease, prevention and diagnosis.

Iran Nanotechnology Laboratory Network

Iranian Journal of laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

Volume 9 ■ Issue 4 ■ Winter 2021 ■ No.36

Comparison of atomic force microscopy with some common methods in measuring surface roughness Abstract

Standardization, Quality tests, and Cleansing Methods to Reuse Face Masks Used in Coronavirus and Respiratory Diseases Outbreaks

Common diseases of farmed shrimp (Litopenaeus vannamei) and laboratory diagnostic methods

Genetic studies in ancient excavations (geoarchaeology)

Prediction of UCs Sterength of Limestone Using Neural Network and ANFIS (Case Study)

Determination of the Uncertainty Sources of Vicat Softening Temperature for Thermoplastic Material

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir