

ردیابی ویروس لکه سفید

White spot syndrome viruse(WSSV)

در میگوهای پرورشی استان بوشهر

Litopenaeus vannamei (در سال ۱۳۸۵

امراه قاجاری *

آذر صیدی

حسین یآوری

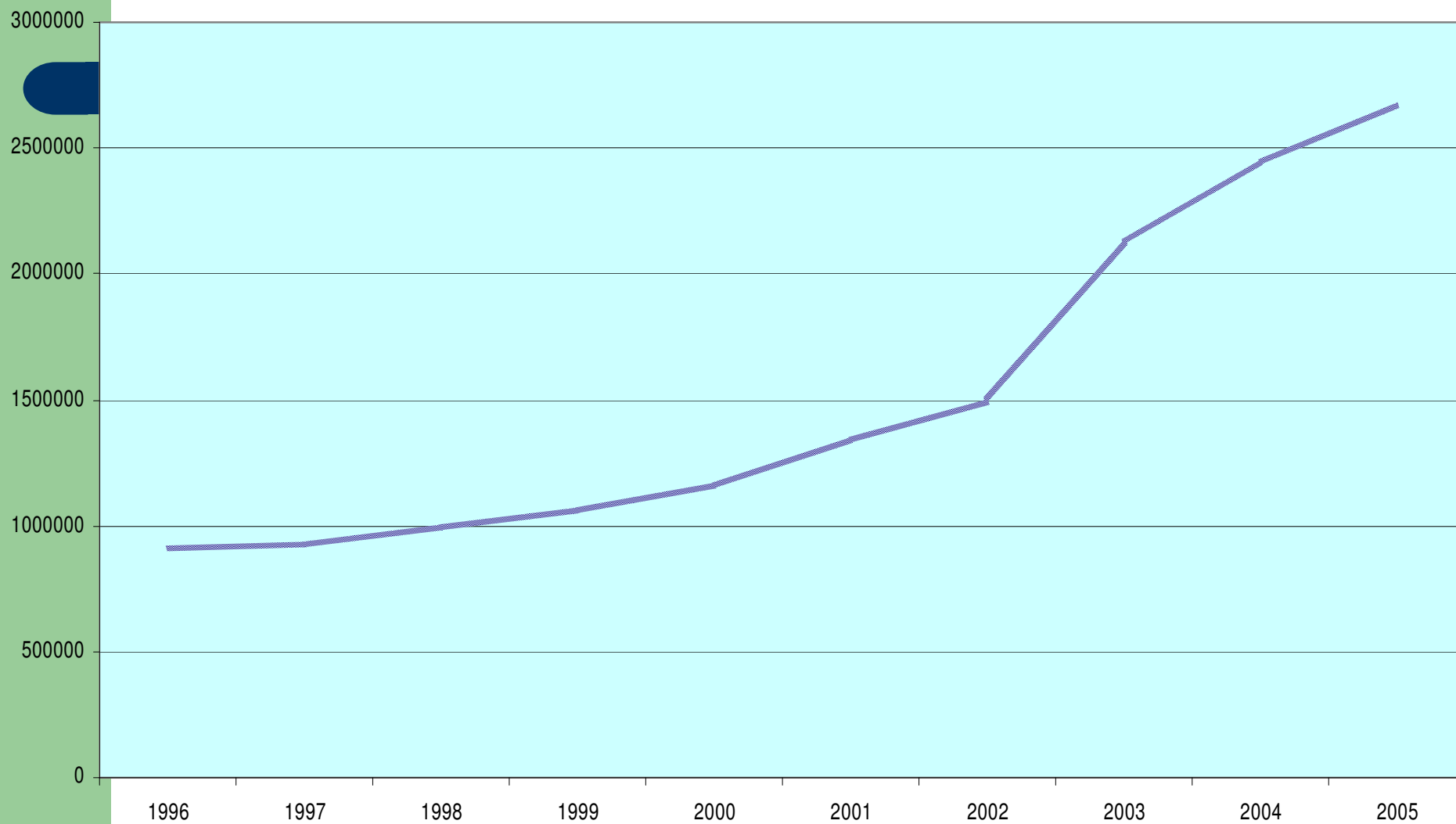
مجید کوثری

کامران آبسالان

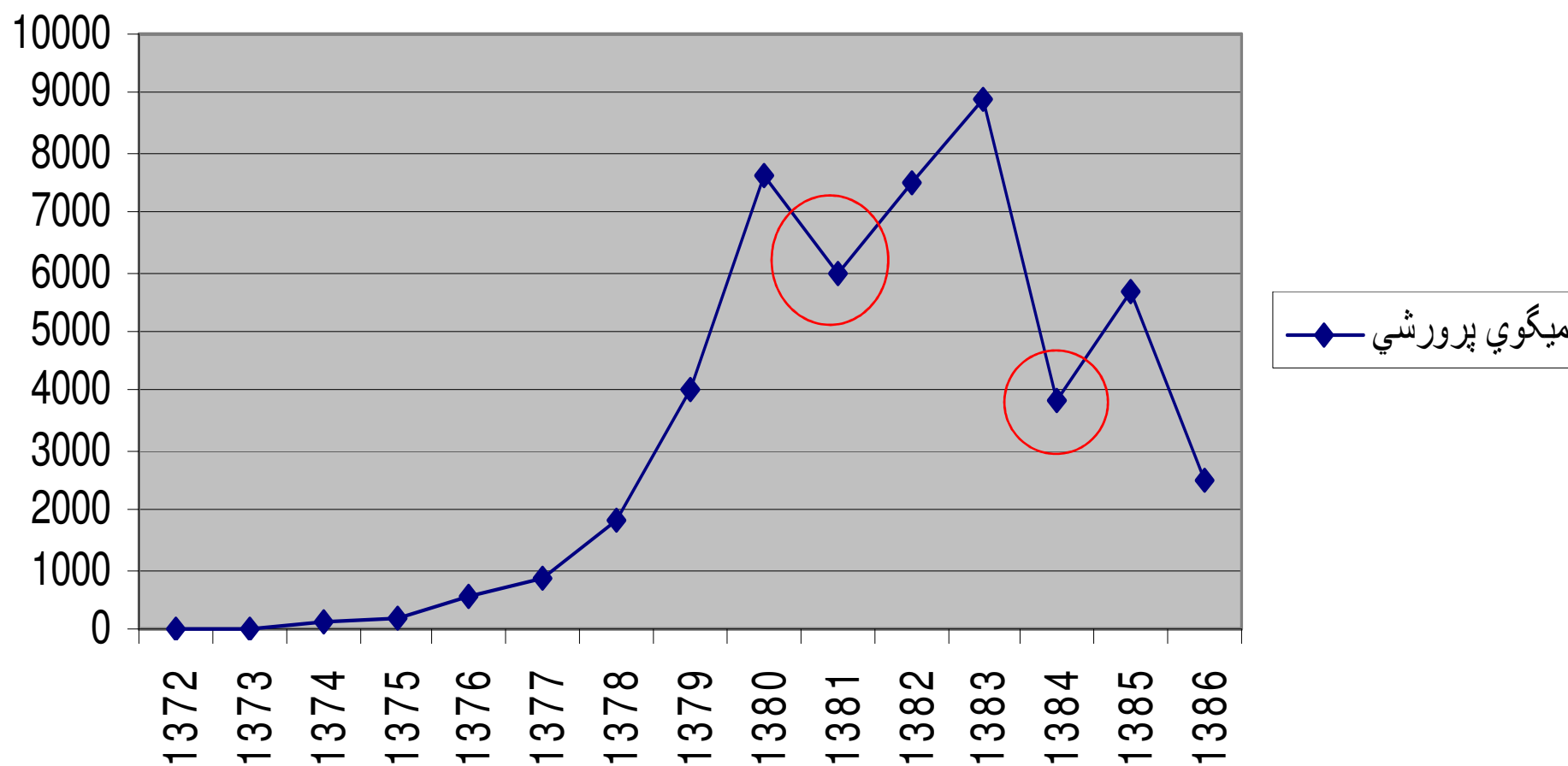
مقدمه - میگوپروری

- گسترش سریع میگوپروری در طی ۳۰ سال اخیر
- میانگین رشد ۱۵-۲۰٪ سالانه
- تولید بیش از ۲۵۰۰۰۰۰ تن میگو در سال ۲۰۰۵
- تولید بیش از ۷۵٪ میگوی دنیا در کشورهای آسیایی
- گونه غالب در سال ۲۰۰۵ میلادی : لیتوپنئوس وانامی (۵۹٪)
- تولید ۵۷۰۰ تن میگوی پرورشی در ایران در سال ۱۳۸۵

منحنی تولید میگوی پرورشی در جهان (فانو 2005)



توليدات ميگوي پرورشي در ايران



مقدمه – بیماری های ویروسی

- بروز و گسترش بیماری های ویروسی میگو در طی يك دهه گذشته (از سال ۱۹۹۲ - ۱۹۹۳ میلادی)
- بیماری های ویروسی مهمترین عامل بازدارنده رشد صنعت – بالغ بر میلیاردها دلار خسارت اقتصادی
- مهمترین بیماری های ویروسی در نیمکره غربی شامل ویروس
TSV, IHHNV,
- مهمترین بیماری های ویروسی در نیمکره شرقی شامل ویروس
WSSD, YHD,

مقدمه - WSD

- ویروس لکه سفید یکی از مسری ترین ویروس های عفونی میگو های خانواده پنائیده می باشد.
- اولین رخداد بیماری لکه سفید wssd در سال ۱۹۹۲ در تایوان گزارش گردید (choue et al 1995)
- در سال ۱۹۹۳ در ژاپن در میگوهای وارداتی از چین گزارش گردید
- این بیماری در ژاپن به عنوان ویرمی حاد پنائیده (PAV) و ویروس عامل ایجاد کننده آن تحت عنوان ویروس میله ای شکل DNA دار پنائیده (PRDV) بر اساس شکل آن نامگذاری شد (Inouya et al 1996)

مقدمه

- در سال ۱۹۹۴ در تایلند – هند
- در سال ۱۹۹۵ اولین مورد بیماری در مزارع پرورش میگو در تگزاس آمریکا گزارش گردید
- در سال ۱۹۹۹ در فیلیپین – نیکاراگوئه – گواتمالا – هندوراس گزارش گردید
- هم اکنون ویروس بیماری در سراسر جهان گسترش یافته و اغلب کشورهای دارای میگوی پرورشی بیماری گزارش کرده اند

مقدمه – wsd در ایران

- اولین گزارش بیماری سال ۱۳۸۱ استان خوزستان
- دومین گزارش بیماری سال ۱۳۸۳ استان خوزستان
- سومین گزارش بیماری سال ۱۳۸۴ استان بوشهر
- درگیری ۶ مجتمع پرورشی با ۱۳۷ مزرعه و ۱۷۳۰ هکتار سطح زیر کشت
- معدوم و ضد عفونی ۱۵۸۰ استخر پرورش میگو
- از دستن رفتن بیش از ۵۰۰۰ تن میگوی پرورشی
- از دست رفتن بیش از ۳۰۰۰ شغل به طور مستقیم
- وارد شدن بیش از دهها میلیارد تومان خسارات اقتصادی

مقدمه – پیشگیری و کنترل بیماری WSD

- امنیت زیستی (Biosecurity):

تمامی اقداماتی که به منظور جلوگیری از ورود یک پاتوژن خاص به یک مزرعه و یا ممانعت از گسترش بیشتر بیماری درون یک مزرعه و یا یک منطقه آلوده اتخاذ می گردد. (howartz 2003)

- اقدامات مدیریتی خوب (Good management practice)

مقدمه – امنیت زیستی

- پایش بیماری (disease monitoring)
- پیشگیری از بیماری (disease prevention)
- اقدامات مدیریتی موثر در هنگام شیوع بیماری effectively (managing disease outbreaks)
- ضد عفونی و نظافت بین دوره های پرورش (cleaning and disinfection between production cycles)
- اقدامات عمومی حفاظتی (general security precautions)

مقدمه - پایش بیماری

- بازدید دوره ای
- ثبت وقایع و مستند سازی
- نمونه برداری
- آزمایش

اقدامات صورت گرفته جهت کنترل بیماری WSSD در استان بوشهر

- معدوم سازی و ضد عفونی استخرهای آلوده
- ارتقاء شرایط بهداشتی و امنیت زیستی در مزارع تکثیر و پرورش
- واردات مولدین میگوی SPF / SPR گونه لیتوپنئوس و انامی
- طراحی و استقرار سیستم مراقبت از بیماری
- پروژه ردیابی ویروس متعاقبت اقدامات صورت گرفته















26 9:11AM

هدف پروژه:

- به دست آوردن میزان آلودگی میگوهای پرورشی استان بوشهر
متعاقب اقدامات انجام شده جهت کنترل بیماری

روش کار

- واردات تعداد ۵۷۵ جفت میگوی پا سفید غربی مولد (لیتوپنئوس وانامی) از مبدا هاوایی کشور آمریکا توسط یکی از شرکت های تکثیر میگوی استان بوشهر در اواخر سال ۱۳۸۴
- طی مراحل قرنطینه ای به مدت ۲۰ روز
- مولدین فوق الذکر همگی بر اساس گواهی رسمی دامپزشکی کشور مبدا نسبت به چهار بیماری اصلی میگو (IHHND – TSD – YHD – WSSD) عاری از پاتوژن (SPF) بوده و در مراحل قرنطینه ای نیز آزمایشات لازم جهت ردیابی ویروس بیماریهای فوق الذکر توسط تکنیک PCR دو مرحله ای صورت پذیرفت که همه نتایج منفی بوده و هیچ آثاری از وجود ویروس گزارش نگردید.

روش کار - نمونه برداری از پست لاروها

- جمعیت هدف : تمامی پست لاروهای تولیدی در هر تانک مراکز تکثیر استان بوشهر
- اندازه نمونه : ۱۵۰ قطعه پست لارو به صورت random sampling از میگوهای موجود در هرتانک
- درصد شیوع فرضی : ۲٪
- استفاده از جدول نمونه برداری Ossiander & wedmayer
- درصد اطمینان : ۹۵٪

روش کار

- پس از تولید پست لارو های ۵ روزه عملیات ردیابی جهت وجود بیماری لکه سفید میگو و ارسال نمونه ها به مرکز تشخیص و انجام آزمایش PCR بر روی نمونه ها در اسرع وقت انجام گردید .
- بدین ترتیب از ۵ نقطه از هر تانک تعداد ۱۰۰۰ قطعه پست لارو نمونه برداری و در یک تشت ریخته و خوب بهم زده می شود سپس از وسط تشت تعداد ۱۵۰ قطعه پست لارو برداشته می شود.
- سن پست لاروها اکثرا با سن ۵ تا ۱۰ روزگی و با میانگین سن ۷ روزه بودند .



روش کار - نمونه برداري از ميگوهائي در حال رشد

- جمعيت هدف : تمامي استخرهاي ميگوهائي پرورشي در مزارع پرورش ميگو در استان بوشهر (۴۷۳ استخر)
- اندازه نمونه : ۲۶۸ استخر به صورت Random sampling
- فرض شيوع : ۱%
- درصد اطمینان ۹۵%
- استفاده از جدول نمونه برداری Ossiander & wedmayer

روش کار

- نمونه های اخذ شده در ظرف پلاستیکی تازه و درب دار با رعایت مراقبت کافی جهت کاهش آلودگی جانبی و در محیط نگهدارنده اتانول ۷۰ درصد یا به صورت تازه در آب و در مجاورت یخ به آزمایشگاه مرکز تشخیص میگو ارسال می شد .
- در مرکز تشخیص بیماریهای میگو نمونه ها دریافت و پس از ثبت اطلاعات در دفتر مربوطه به بخش PCR ارسال می شد .
- به منظور افزایش دقت ردیابی در مورد پست لا روها نمونه های ارسال شده که شامل ۱۵۰ قطعه پست لارو ۵ روزه یا بزرگتر از تانک های قبل از فروش بود به ۳-۴ نمونه حاوی ۴۰-۵۰ قطعه پست لارو تقسیم می شد .
- در مزارع پرورش نیز با توجه به تعداد استخرهای ذخیره سازی شده عملیات نمونه برداری از استخرهای انتخاب شده به صورت کاملاً راندوم صورت گرفت و نمونه ها به روش فوق به آزمایشگاه ارسال و مورد آزمایش قرار گرفتند .

روش کار

- DNA نمونه های مذکور با استفاده از کیت IQ2000 ساخت شرکت Farming IntelliGene Tech.corp. کشور تایوان با استفاده از روش استخراج DTAB-CTAB یا روش Lysis buffer استخراج شده و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد آزمایش Nested PCR جهت ردیابی ویروس لکه سفید میگو قرار می گرفتند .

روش کار

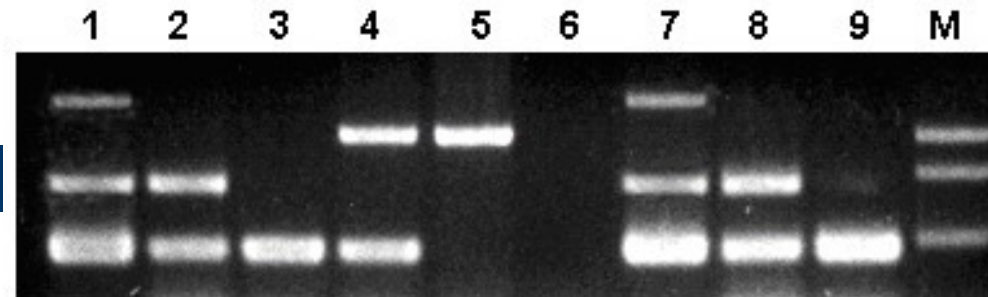
جدول شماره ۱: تعداد نمونه های اخذ شده از مراکز تکثیر ومجتمع های پرورشی

نام مرکز تکثیر یا مجتمع پرورشی	نوع نمونه	تعداد نمونه
زادآوری مند میگو	پست لارو	۱۱۵
میگوی ارغوانی	پست لارو	۵۲
لاروپروران جنوب	پست لارو	۳۳
مند	میگو پرورشی	۹۸
دلوار ۱۸	میگو پرورشی	۹۱
حله	میگوپرورشی	۱۵
شیف	میگوپرورشی	۶۴
جمع کل		۴۶۸

نتایج

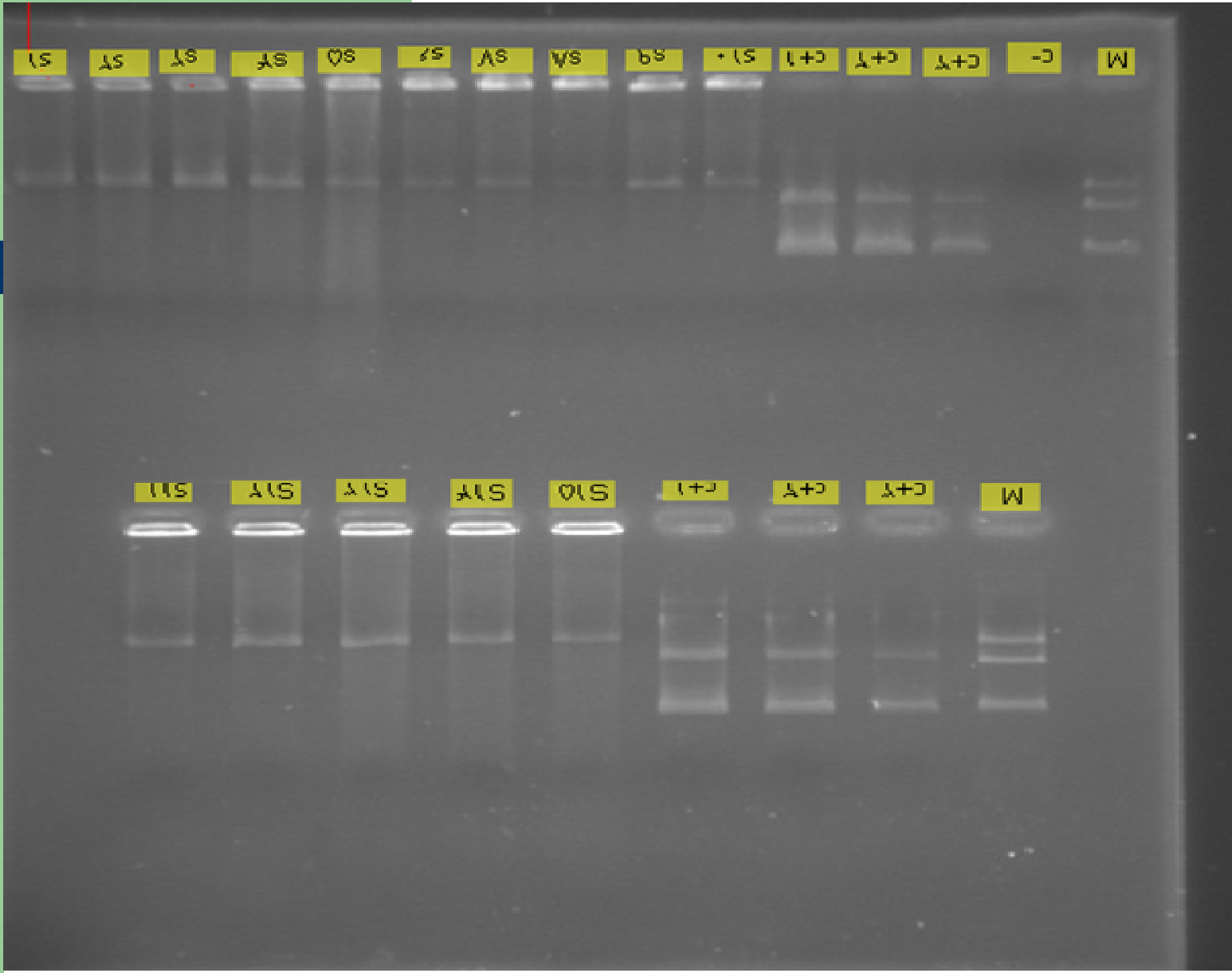
- از آنجایی که این کیت آلودگی نمونه را در چهار سطح خیلی خفیف - خفیف - متوسط و شدید نشان می دهد و حداقل سطح ردیابی ۱۰ کپی ژنوم ویروس بازای هر واکنش است وجود یک ویروس درون ۴۰۰۰ سلول میگو با این کیت قابل ردیابی است . مشاهده باندهای رسوبی بدین ترتیب است که در نمونه های منفی فقط باند رسوبی ۸۴۸ bp مشاهده می گردد و نمونه های مثبت باندهای رسوبی در ۲۹۶ bp و یا ۵۵۰ bp شکل می گیرد بر این اساس در نمونه های آزمایش شده هیچ گونه باند رسوبی در ۲۹۶ bp و ۵۵۰ bp مشاهده نگردید .و فقط باند رسوبی در ۸۴۸ bp مشاهده گردید.

نتائج



Typical diagnostic results generated by IQ2000™ WSSV Detection and Prevention System.

- Lane 1: Sample of severe WSSV infection
- Lane 2: Sample of moderate WSSV infection
- Lane 3: Sample of light WSSV infection
- Lane 4: Sample of very light WSSV infection
- Lane 5: WSSV negative sample
- Lane 6: Negative control (yeast tRNA or ddH₂O)
- Lane 7: WSSV P(+) standard, 2000 copies/reaction
- Lane 8: WSSV P(+) standard, 200 copies/reaction
- Lane 9: WSSV P(+) standard, 20 copies/reaction
- Lane M: Molecular weight marker, 848 bp, 630 bp, 333 bp



نتایج

جدول شماره ۲: تعداد نمونه های ارسال شده و تعداد آزمایشات انجام شده به تفکیک مراکز

مرکز تکثیر	تعداد نمونه های ارسال شده	تعداد آزمایشات PCR انجام شده	نتیجه آزمایش
زادآوری مند میگو	۱۱۵	۴۴۵	منفی
میگوی ارغوانی	۵۲	۱۶۲	منفی
لاروپروران جنوب	۳۳	۴۹	منفی
جمع کل	۲۰۰	۶۵۶	منفی

نتایج

جدول شماره ۳ : تعداد نمونه ها و آزمایشات انجام شده مزارع پرورشی

نام سایت	نوع نمونه	تعداد نمونه	نتیجه آزمایش
مند	میگو پرورشی	۹۸	منفی
دلوار ۱۸	میگو پرورشی	۹۱	منفی
حله	میگو پرورشی	۱۵	منفی
شیف	میگو پرورشی	۶۴	منفی
جمع کل		۲۶۸	منفی

بحث – اقدامات صورت گرفته برای کنترل بیماری

- بیماری قابل کنترل و پیشگیری است
- عمده کشورهای صاحب صنعت بر بیماری غلبه کرده اند
- محور تمامی تلاش ها استقرار و ارتقاء الزامات امنیت زیستی می باشد
- پایش مستمر بیماری وردیابی حضور ویروس در جمعیت یکی از ابزار اصلی کنترل و پیشگیری از بیماری مطرح است.
- انجام اقدامات فوری و سریع و صحیح بایستی به عنوان اصلی ترین هدف پس از شیوع بیماری در نظر گرفته شود این پاسخ باعث جلوگیری از گسترش ویروس به سایر استخرها در یک مزرعه و یا به سایر مزارع در یک ناحیه و یا به محیط آبی سواحل می شود
- دسترسی به روش های تشخیصی مطمئن و آزمون های صحیح و واقعی برای برنامه پایش و ردیابی الزامی است.

بحث

- روش نمونه برداري بر اساس توصيه OIE با در نظر گرفتن فرض شيوع ۲% در پست لاروها و ۱% در استخرها صورت گرفت .
- درصد اطمینان روش نمونه برداري ۹۵% برآورد مي گردد
- تعداد نمونه لازم براي نمونه برداري به فاکتورهاي زیر بستگی دارد :
 ۱. حساسیت و اختصاصیت روش آزمایش
 ۲. طراحي شيوع
 ۳. سطح اطمینان
 ۴. اندازه جمعیت

بحث

- در سال ۱۹۹۶ و ۱۹۹۸ روش توصیه شده توسط lo et al برای ردیابی ویروس بیماری لکه سفید روش nested pcr بوده است
- دارای ۹۸/۶٪ حساسیت ۹۹٪ اختصاصیت می باشد
- کیت مورد استفاده به روش Nested PCR بوده و حداقل سطح ردیابی ۱۰ کپی ژنوم ویروس بازای هر واکنش است وجود یک ویروس درون ۴۰۰۰ سلول میگو با این کیت قابل ردیابی است .
- دارای Internal control بوده و پاسخ ها به آسانی قابل تفسیر می باشد.
- با توجه به اینکه در همه آزمون ها کنترل داخلی کیت پاسخ داده و باند رسوبی تشکیل شده بود نتیجتاً در همه نمونه ها DNA استخراج و تکثیر شده بود
- با توجه به اینکه در همه آزمون ها نمونه های کنترل مثبت که حاوی سه غلظت مختلف از DNA ویروسی بوده تکثیر شده و بر روی ژل باند رسوبی تشکیل داده بودند لذا روش آزمون صحیح می باشد
- با توجه به اینکه در هیچ کدام از نمونه ها باندهای رسوبی در ۲۹۶bp و یا ۵۵۰bp تشکیل نشده بود بر اساس دستورالعمل کیت نمونه ها منفی قلمداد و عاری از ویروس لکه سفید فرض می شوند

نتیجه گیری

- با توجه به روش نمونه برداری ، نوع آزمایش مورد استفاده ، دقت کیت مورد استفاده با اطمینان ۹۵٪ میگوهای پرورشی استان بوشهر در سال ۱۳۸۵ فاقد ویروس WSSV بودند.
- با توجه نتایج فوق می توان نتیجه گیری کرد روش های مورد استفاده جهت کنترل و پیشگیری از لکه سفید در استان بوشهر موثر ، قاطع ، مسئولانه بوده و قابل تعمیم به سایر مناطق می باشد.