# بررسی تغییر فاکتورهای ایمنی هموسیت کل (Total Hemocyte Count) و پروتئین پلاسما کل (Total Protein Plasma) در میگوی پاسفید غربی آلوده به مونودون باکولوویروس(MBV)

محمد افشارنسب[۱]*، زهره شجاعی[۲]، عقیل دشتیان نسب[۳]

* mafsharnasab@yahoo.com

۱- مو سسه تحقیقات علوم شیلا تی کشور

۲-دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم و تحقیقات اهواز

۳-پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر، ایران

**تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۲** **تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲**

## چکیده

به منظور بررسی تغییرات فاکتورهای ایمنی هموسیت کل (THC) و پروتئین پلاسما کل (TPP) در میگوی پاسفید غربی *(Litopenaeus vannamei)* آلوده به بیماری مونودون باکولوویروس (*Monodon baculovirus*)(MBV)، تعداد ۳۶۰میگو جوان پاسفید غربی با میانگین وزنی ۷ تا ۱۲ گرم از استخرهای پرورشی پژوهشکده میگوی کشور تهیه و به مدت دو روز درمحل آزمایشگاه به منظور رفع استرس های محیطی وآداپته شدن بامحیط نگه داری شدند.این میگوها از لحاظ عفونت ویروسی قبل از انجام مطالعه به صورت تصادفی مورد آزمایش قرار گرفته و عدم ابتلا آنها به بیماریهای شایع از قبیل WSSV,TSV,IHHNV,MBV,HPV,NHP در مراکز تکثیر و پرورش به وسیله تست PCR مورد تائید قرار گرفت. یک گروه ۶۰ تایی میگو به عنوان تیمار برای مواجهه با ویروس از طریق غذا با سه تکرار و گروه دیگر به عنوان کنترل با سه تکرار در نظر گرفته شد.پس از مواجهه سازی نمونه گیری جهت آزمایشات مختلف و در ساعات ۰،۱۲،۲۴،۴۸،۹۶ ساعت صورت گرفت.آزمایش PCR با استفاده از کیت IQ2000 وجود ویروس را در گروه تیمار تایید نمود در حالیکه گروه کنترل عاری از آلودگی بود. تهیه همولنف از میگوها و ارزیابی THC و TPP در ساعات مورد نظر صورت گرفت و نتایج حاصل نشان داد که تفاوت معنی داری در بین گروه های کنترل و تیمار وجود داشت($P<0.05$). نتایج حاصل از این تحقیق میتواند در کنترل و پیشگیری از بیماری MBV مورد استفاده قرار گیرد.

**لغات کلیدی:** مونودون باکولوویروس،میگوی پاسفید غربی، هموسیت کل،پروتئین پلاسمای کل.

*نویسنده مسئول



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

## مقدمه

صنعت تکثیر و پرورش میگو در ایران دارای سابقه کوتاهی بوده و در این مدت از رشد چشمگیری برخوردار شده است ، به طوریکه انتظار می رود براساس سند چشم انداز برنامه بیست ساله در پایان سال ۱۴۰۰ هجری شمسی حدود یکصد هزار هکتار از اراضی مستعد به این امر اختصاص یابد ( افشار نسب، ۱۳۸۶ a) .

به دنبال رشد و توسعه صنعت تکثیر و پرورش میگو در دنیا ، صنعت مذکور با بیماریهای زیادی مواجه شده که اغلب از ویروس ها ناشی می شود و این بیماریهای ویروسی به عنوان یک مسئله مهم در صنعت تکثیر و پرورش میگو مطرح هستند. تاکنون بیش از ۲۰ بیماری ویروسی گزارش گردیده است که می تواند در میگوهای پرورشی و وحشی مشکل ساز باشد که در این میان مونودون با کولوویروس (MBV) از لحاظ اقتصادی یک بیماری مهم می باشد و یکی از بیماریهایی است که جهت ارزیابی لاروهای میگو مورد بررسی قرار می گیرد (افشار نسب، ۱۳۸۶ b ;Lightner & Redman,1998).

بیماری باکولوویروس مونودون در همه جای دنیا وجود دارد و تمام سخت پوستان و میگو به این بیماری حساس می باشند . این بیماری یکی از بیماری های خطرناک ویروسی در مراکز هچری و سالن های تکثیر میگو بوده که اپیدمی های وسیعی در بسیاری نقاط جهان از جمله تایلند ، فیلیپین و جنوب ایران ( بوشهر ، هرمزگان و چابهار ) گزارش شده است ( افشار نسب، ۱۳۸۶ b) .

از علائم مشخص این بیماری سفید شدن قسمت روده میانی می باشد که اغلب در مراحل زوآ ، مایسیس و ابتدای دوره پست لارویاتفاق می افتد ( افشار نسب ، ۱۳۸۶ b ; Lightner & Redman , 1981) .

با توجه به مشکلاتی که برای میگوی سفید هندی پیش آمد ( بیماری لکه سفید در سال ۱۳۸۱) و ضررهای اقتصادی فراوانی به همراه داشت ایران مبادرت به وارد کردن گونه میگوی پا سفید غربی نمود که به دنبال آن کلیه پرورش دهندگان در مناطق جنوبی اقدام به پرورش این گونه کردند. با توجه به اهمیت این مسئله و همچنین عدم مطالعه بیماریزایی این ویروس بر روی گونه پا سفید غربی انجام مطالعات جامع بر روی گونه مذکور به عنوان گونه غیر بومی ضروری به نظر می رسد.

در ایران پرورش دهندگان و تکثیر کنندگان میگو در سالهای اخیر فقط به بیماری لکه سفید (WSSV) توجه نموده اند و کمتر به سایر بیماریها توجه می نمایند، در صورتیکه برخی از ویروس ها از جمله با کولو ویروس ها موجب خسارت سنگین در مراکز هچری و سالن های تکثیر می‌شوند. انجام مطالعه جهت شناسایی ویروس و روشن تر شدن وضعیت ایمنی و مقابله با ویروس در گونه پا سفیدغربی می تواند در ارائه راهکاری هایی برای پیشگیری و کنترل بیماری سودمند واقع شود.

ارائه راهکارهای نوین با استفاده از مطالعات ایمونولوژیک بمنظورجلوگیری از ایجاد بیماری ضروری است. بر اساس گزارش Jiang و همکاران (۲۰۰۴) یکی از راههای تشخیص سلامتی میگوها اندازه گیری میزان THCو TPP می‌باشد.

از این رو هدف از انجام این مطالعه بررسی تغییرات و همچنین اندازه گیری فاکتورهای ایمنی میگوهای آلوده به MBV با تاکید بر اندازه گیری THC و TPP در میگوی پاسفیدغربی و مقایسه این فاکتورهای ایمونولوژیک در میگوهای سالم و بیمار می‌باشد.

## مواد و روش ها

ویروس مونودون با کولوویروس مورد استفاده در آزمایش از میگوهای ببری سبز آلوده به بیماری MBV که در هچریهای استان بوشهر بروز نموده و با PCR و مطالعات آسیب شناسی شناسایی و تایید گردیده و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیده بود ، در آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه های میگوی پا سفید غربی به وزن ۷ تا ۱۲ گرمی از استخر های پرورشی پژوهشکده میگوی کشور واقع در حله بوشهر تهیه و در آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا میگوها برای دو روز در محل آزمایشگاه پژوهشکده میگو قرار داده تا استرس های محیطی میگوها رفع و با محیط آداپته شوند. این میگوها از لحاظ عفونت ویروسی و باکتریائی قبل از انجام



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

مطالعه به صورت تصادفی مورد آزمایش قرار گرفت و عدم ابتلا آن ها به بیماری از جمله بیماری های TSV,IHHNV,HPV,MBV,WSSV,NHP که از بیماری های شایع در مراکز تکثیر و پرورش می باشند به وسیله تست PCR مورد تائید قرار گرفت. بنابراین میگوها باید عاری از هرگونه بیماری بوده و همچنین برای کنترل آلودگی های سطحی از قبیل قارچ ها و باکتریها، قبل از انجام آزمایش ضمن شستشوی این میگوها ، آنها را با میزان ppm ۲۰ آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین شستشو داده تا احیاناً اگر دارای آلودگی باشند، آلودگی در آنها از بین برود.

برای مواجهه میگوها با ویروس از روش Afsharnasab و همکاران ( ۲۰۰۶) و Overstreet (1990) Leblanc and استفاده شد. برای این منظور ۳۶۰ قطعه میگوی جوان پا سفید غربی با وزن متوسط ۷ تا ۱۲ گرم ( سن یکسان ) و در مرحله بین پوست اندازی پس از دو روز نگهداری در محیط آزمایشگاه به گروههای ۶۰ تایی تیمار برای مواجهه با ویروس از طریق غذا با سه تکرار تقسیم شدند و یک گروه کنترل نیز با سه تکرار در نظر گرفته شد. میگوهای مورد آزمایش تیمار را ابتدا به مدت ۱۲ ساعت با بافت آلوده به ویروس MBV تغذیه نموده و سپس آنها را شستشو داده و در گروههای ۶۰ تائی تقسیم و به مدت ۱۰ روز از آنها نمونه برداری و وضعیت ظاهری آنها ثبت گردید. در میگوهای کنترل بجای بافت آلوده میگو از غذای پلت ۴۰۳ استفاده گردید.در کلیه آکواریمها دما، شوری، pH ثابت بود. دمای آب بین ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتیگراد، شوری ppt ۴۰-۳۰ و pH برای کلیه مراحل آزمایش ۸-۷/۵ انتخاب گردید. میگوها با غذای پلت شماره ۴۰۳ روزانه در سه نوبت غذادهی شدند. همچنین روزانه دوبار آب تانکها تعویض گردید تا آلودگی ثانویه ایجاد نشود.

روزانه تعداد مرگ و میر میگوها ثبت شد و نمونه گیری برای انجام PCR و همچنین تهیه نمونه از همولنف جهت انجام آزمایشات ایمونولوژیک در ساعات ۰ ، ۱۲ ، ۲۴، ۴۸ ،۹۶ ساعت بعد از مواجهه با ویروس از گروههای تیمار و کنترل انجام شد.

به منظور نمونه برداری از همولنف میگوهای مورد آزمایش مواجهه شده با ویروس و بدون مواجهه، با کمک سوزن شماره ۲۵ و سرنگ ۱ml پر شده با ۰/۴ml محلول خنک الزویر اصلاح شده (۳۳۶ mM Na citrate، ۲۷ Mm NaCl، ۱۱۵ Mm glucose، ۹ mM EDTA و ۴.۶pH) به عنوان آنتی کوآگولانت (ماده ضد انعقاد) از بند دوم شکمی میگوها و بخش شکمی همولنف خارج و جمع آوری گردید(Jiang etal.,2004). پس از نمونه برداری محتویات سرنگ به اپندورف استریل مخصوص سانتریفیوژ که از قبل حاوی ۰/۴ml آنتی کوآگولانت استریل بود، انتقال یافت و برای شمارش همولنف و اندازه گیری پروئین پلاسما مورد استفاده قرار گرفت. نمونه برداری از همولنف طی ساعات ۰، ۱۲، ۲۴،۴۸،۹۶ ساعت بعد از مواجهه انجام گردید.

۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون همولنف و آنتی کواگولانت بر روی لام هموسیتومتر قرار گرفته و با بزرگنمایی۴۰X تعداد هموسیتها شمارش گردید (Jiang *etal*., 2004). از باقیمانده این مخلوط در آزمایش های ارزیابی پروتئین استفاده شد

تعداد سلولهای همولنف مطابق معادله ی زیر با میکروسکوپ نوری شمارش شدند:

THC(Cells/ml)= میانگین شمارش ۵ سلول ×۵ $\times 10^{4}\times$ L/mix

باقیمانده همولنف را با دور ۵۰۰×g در $4^{0C}$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.همولنف فاقد سلول(پلاسما) به منظور تحقیقات پروتئین پلاسما، جمع آوری گردید.پروتئین پلاسمای کل(TPP) براساس روش اصلاحی Lowry و و توسط آلبومین سرم بووین(BSA) به عنوان استاندارد،اندازه گیری گردید.

مقایسه هر تیمار با THC و TPP و ارتباط آنها با استفاده از ریگرسیون، مقایسه وبررسی هر تیمار با یکدیگر باone-wayANOVA وتجزیه و تحلیل آماری بین تیمارها و TPP و THC با two -way ANOVA و با در نظر گرفتن $P < ۰/۰۵$ توسط نرم افزار SPSS انجام گرفت.

## نتایج

پس از انجام عملیات مواجهه سازی ویروس با میگوهای پا سفید غربی بالغ، علائم بالینی که در طی انجام مطالعه در میگوهای تیمار مشاهده گردید شامل بی اشتهایی ، بی حالی ، تحریک پذیری در میگوها وهمچنین نوار سفید رنگ پشت بدن



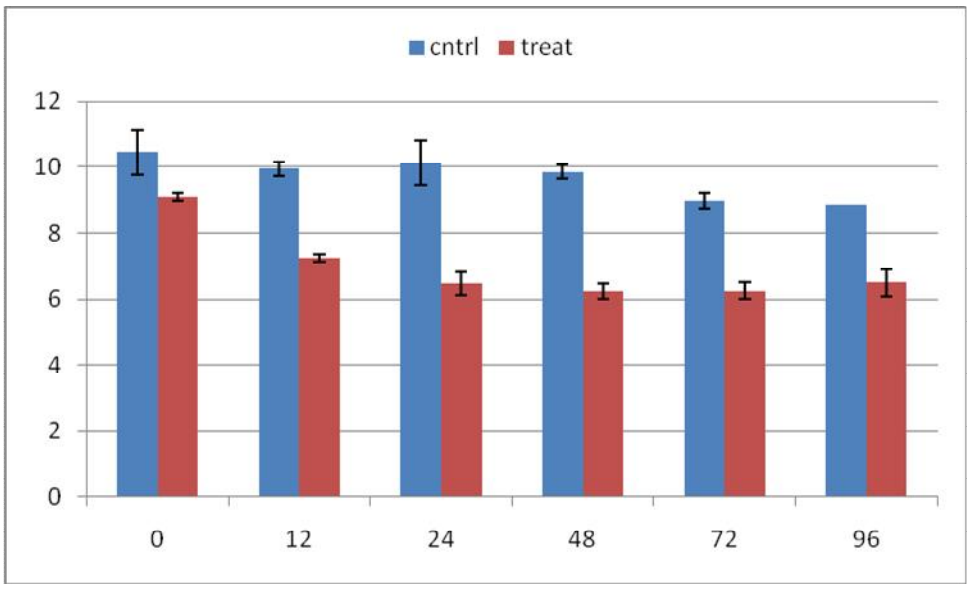
[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

میگوهای بیمار که از علائم مشخص بیماری MBV در میگوها میباشد مشاهده گردید. لازم به ذکر است در میگوهای گروه کنترل هیچ گونه علائمی از بیماری مشاهده نشد . در گروههای تیمار و کنترل تلفاتی مشاهده نگردید. نتایج حاصل از آزمایشات مولکولی PCR نمونه های اخذ شده از میگوهای مواجهه داده شده با ویروس حاکی از وجود ویروس در این نمونه ها بود و وجود بیماری را تایید کرد.

جدول ۱ آزمون ANOVA یک طرفه و چند مقایسه ای را برای مقایسه THC وTPP مربوط به تیمارها را پس از مواجهه در هر تیمار نشان میدهد.طبق نتایج این جدول، تفاوت معنی دار در بین مقدار متوسط THC± خطای استاندارد در تیمارها($P<0.05$) وجود داشت. مقادیر TPP برحسب متوسط ($\mu g.\mu L^{-1}$)±خطای استاندارد در گروه آزمایش و کنترل در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. براساس جدول ۱ و نمودار۱ میزان THCدر میگوهای آلوده به MBVدر مقایسه با گروههای کنترل در ابتدای مواجهه سازی نزدیک بهم بوده و اختلاف مهنی داری را نشان نمیدهد($P<0.05$) ولی با پیشرفت زمان اختلاف در گروههای تیمار و شاهد دارای اختلاف معنی دار شده ($P<0.05$) و نشان دهنده کاهش تعداد هموسسیت در میگوهای مواجهه شده با ویروس می‌باشد.

**جدول ۱: تغییرات میزان THC در میگوهای آلوده در مقایسه با میگوهای کنترل در زمانهای مورد آزمایش**

| ردیف | ۰ | ۱۲ | ۲۴ | ۴۸ | ۹۶ | ۱۲۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| میگوهای آلوده به MBV | ۹.۱۲±۰.۱۲ | ۷.۲۴±۰.۱۱ | ۶.۴۸±۰.۳۵ | ۶.۲۳±۰.۲۳ | ۶.۹±۰.۴ | ۸.۴±۰.۱۴ |
| میگوهای کنترل | ۱۰.۴۵±۰.۳۴ | ۹.۹۵ ±۰.۶۷ | ۱۰.۱۲±۰.۲۲ | ۹.۸۹±۰.۶۸ | ۸.۹۹±۰.۲۱ | ۹.۲۰±۰.۶۴ |




**نمودار ۱: تغییرات تعداد هموسیت کل ($THC\times10^{6}$) در گروههای شاهد و تیمار طی ساعات مختلف پس از مواجهه ویروس در گروه تیمار**

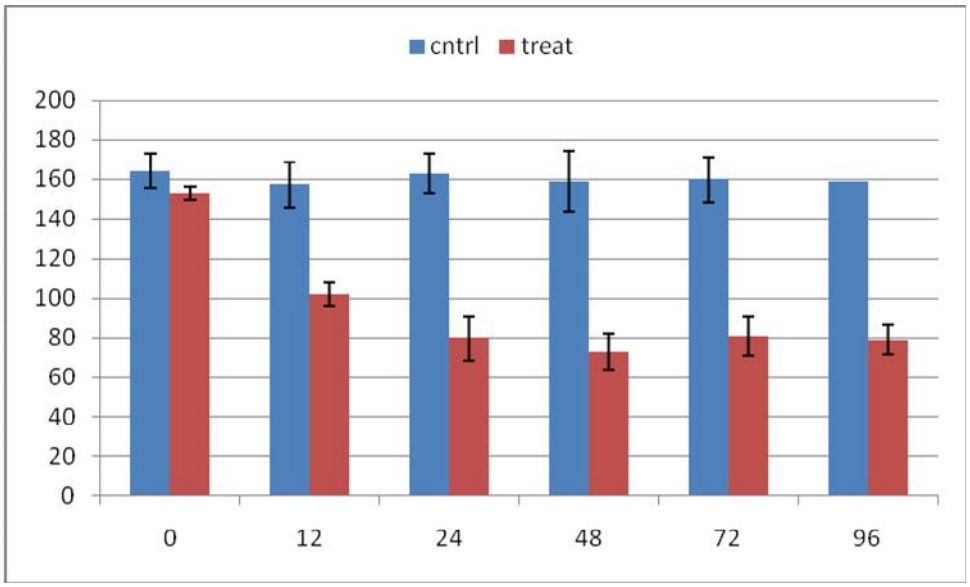


[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

بر اساس مشاهدات جدول ۲ و نمودار ۲ میزان پروتئین پلاسما (TPP) در میگوهای کنترل و تیمار در ساعات اولیه اختلاف معنی داری نشان نمیدهند ($P>0.05$) ولی از ساعات ۱۲ به بعد از مواجهه سازی میزان TPPدر میگوهای مواجهه شده به شدت کاهش نشان داده و این میزان کاهش تا پایان دوره آمایش ثابت مانده و اختلاف معنی داری با گروه های کنترل نشان می دهند ($P<0.05$).

**جدول ۲: تغییرات TPP در میگوهای آلوده به MBVدر مقایسه با میگوهای کنترل**

| ردیف | ۰ | ۱۲ | ۲۴ | ۴۸ | ۹۶ | ۱۲۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| میگوهای آلوده به MBV | ۱۵۳.۳۳±۳.۴۵ | ۱۰۲.۴۷±۵.۵۶ | ۸۰.۷۸±۱۱.۲۹ | ۷۳.۷۸±۹.۲۳ | ۱۰۵.۳۴±۹.۹۳ | ۱۳۵.۷۶±۷.۶۵ |
| میگوهای کنترل | ۱۶۴.۳۲±۲۱.۲۳ | ۱۵۷.۴۵±۸.۵۶ | ۱۶۳.۵۷±۱۱.۲۴ | ۱۵۹.۲۳±۹.۹۸ | ۱۶۰.۳۴±۱۵.۳۲ | ۱۵۹.۴۵±۱۱.۲۳ |




**نمودار ۲: میزان($\mu g.\mu L^{-1}$) TPPدر میگوهای آلوده به MBV در مقایسه با میگوهای کنترل طی ساعات مختلف پس از مواجهه با ویروس در گروه تیمار**

## بحث

براساس نتایج حاصل از این پژوهش بیماری مونودون باکولوویروس در میگوهای جوان ،بیماری وخیمی ایجاد نمی کند،این در حالی است که بسیاری از مطالعات نشان می دهد که بیماری مونودون باکولوویروس به صنعت تکثیر و پرورش میگو خسارات جدی و مهمی وارد می کند. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعات Lightner و Brock (۱۹۹۰) مغایرت دارد زیرا براساس مطالعات آن ها، باکولوویروس های نوع (MBV) تلفات شدیدی را در مراحل انتهایی پست لاروی و ابتدای نوجوانی گونه های میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) بوجود می آورد. مطالعات Chen و همکاران(۱۹۸۹) نیز بیماری MBV را مسئول تلفات وخیم در بسیاری از مزارع تایوان که میگوی ببری سیاه درآنجا پرورش می دادند اعلام نموده است. همچنین مطالعات Fegan و همکاران (۱۹۹۱) MBV را مسئول ورشکستگی صنعت میگو در اواسط دهه ۱۹۸۰ در تایوان می داند. مطالعات صورت



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

گرفته توسط Ramasamy و همکاران (۱۹۹۵) نشان داد که اوج آلودگی های MBV در مرحله ی پست لاروی با تلفات ۹۰٪ بوده و میگوهای نوجوان آغازی و میگوهای بالغ مسن در رده‌ی بعدی قرار داشتند. اختلاف درنتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه سایر محققین میتواند ناشی اختلاف در بیماری و نوع میگوهای آلوده به بیماری باشد. براساس گزارش Wittevedlt و همکاران (۲۰۰۴) میگوی پاسفید غربی مورد آزمایش در مواجهه با بیماری لکه سفید دارای فاکتور ضد ویروسی انترفرون بوده که با رشد میگو این فاکتور نیز در بدن افزایش میابد اما تاکنون این فاکتور ضد ویروسی در میگوی ببری سیاه که موجب تلفات سنگین در تایوان با بیماری MBV شده گزارش نگردیده است.

Baticados و همکاران (۱۹۹۱) متوجه شدند که در سال ۱۹۸۹،در اوج فعالیت های پرورش میگو در فیلیپین از ۳۰ مورد بیماری موجود در میگوی پرورشی ببری سیاه در استخر، ۲۲ مورد آن مربوط به آلودگی ناشی از MBV بود. Lightner وRedman (۱۹۸۳) ، نیز گزارش کردند که MBV در لاروها،پست لاروها و نوجوان های ابتدایی میگوی ببری بیماری جدی ایجاد می کند. ولی در میگوی پاسفید غربی هنوز گزارشی از این بیمار ی که منجر به تلفات شود گزارش نگردیده است.

بسیاری از پژوهش ها نشان می دهند که متوسط طول میگوهای آلوده به MBV به طور معنی داری کوچکتر از میگوهای غیرآلوده ی برخی از استخرهاست.این نتایج مطابق با پژوهش های صورت گرفته توسط Flegel و همکاران(۲۰۰۴) است.همچنین یافته های آن ها حاکی از این هستند که آلودگی های ناشی از MBV می تواند باعث رشد کند و بطئی در سیستم های پرورشی شده و ضرورتا به زمان بیشتری برای رسیدن به اندازه ی میگوی بزرگ احتیاج هست.طبق نتایج حاصل از مطالعات Fegan و همکاران(۱۹۹۱) و Flegel(۲۰۰۶)آلودگی ناشی از MBV را می بایست از سیستم پرورشی حذف کرد زیرا آلودگی ناشی از آن بخصوص در سیستم های پرورشی متراکم باعث کاهش رشد شده و در نتیجه از میزان تولیدات می کاهد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که میگوهای بیمار دچار بی حالی و بی اشتهایی و تحریک پذیری شده و گاها لکه های سفید رنگی در پوسته های برخی از آن ها مشاهده شد؛این نتایج با گفته های Lightner و همکاران(۱۹۸۳) مطابقت دارد زیرا طبق گفته های آن ها بیشتر میگوها از لحاظ بالینی سالم بودند ولی تعداد کمی از میگوها خستگی ،بی اشتهایی،لکه های سفید موقتی و لکه های پروتوزوآ را بر روی پوسته ها نشان می دادند.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق میزان THC در میگوهای مواجهه شده با MBV در مقایسه با میگوهای کنترل در همولنف کاهش میابد. بر اساس گزارش Burge و همکاران (۲۰۰۷) تعداد هموسیت کل (THC) بعد از مواجهه با پاتوژنها در همولنف کاهش یافته و این کاهش همولنف بدلیل مهاجرت سلولهای لنفاوی به بافتهائی است که ویروس به آنجا هجوم برده است تا بتواند از بافت در مقابل ویروس محافظت نماید.

Hsu و Chen (۲۰۰۷) گزارش کرده اند میزان THC میگوی وانامی بعداز تزریق باکتری ویبریو آلجینولتیکوس بعد از ۱۲ ساعت بطور چشمگیری کاهش یافته است. همچنین بر اساس گزارش Song و همکاران (۲۰۰۳)کاهش مشخص THC در آلودگی میگو به بیماری تورا (TSV) نیز گزارش گردیده است. این کاهش THC ناشی از کاهش در سلولهای گرانولار و سمی گراولار بوده که بر اساس گزارش Sahhoo و همکاران (۲۰۰۷) بدلیل گرانوله شدن سلولهای گرانولار و سمی گرانولار بوده که توسط لیزوزمها در فعالیتهای دفاعی میگو مورداستفاده قرار میگیرند. همولنف حاصل از میگوهای آلوده و همولنف حاصل از میگوهای کنترل شده تفاوتی از نظر رنگ با یکدیگر نداشتند ولی همولنف میگوهای آلوده، انعقاد ضعیفی را نشان می دادند.طبق نتایج حاصل، در کلیه ی آزمایش ها میزان پروتئین پلاسمای کل (TPP) در همولنف میگوهای تیمار نسبت به گروه های کنترل کمتر بود.مشاهدات حاصله نیز این یافته ها را اثبات می کردند زیرا در زمان جمع آوری همولنف، حجم پلاسمای میگوهای تیمار در مقایسه با میگوهای سالم افزایش معنی داری داشت.پژوهشگران دیگری مثل Jiang و همکاران(۲۰۰۴)نیز متوجه کاهش TPP و همین طور THC



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

پس از مواجهه سازی شدند.ولی مطالعات Liu و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که میزان THC در ساعات اولیه مواجهه کاهش یافته، پس از آن بیشتر شده و به مقدار اولیه ی خود قبل از مواجهه می رسد ولی برخلاف مطالعه ی قبل نتایج حاصل از مطالعات ما نشان دادند که THC پس ازمواجهه در میگوهای در حال مرگ کاهش می یابد.

طبق نتایج بدست آمده تفاوت های معنی داری در بین تیمارها($P>0.05$) از نظر THC و TPP وجود نداشت.طبق برخی از پژوهش های بررسی شده، اگر سایر شرایط پرورشی بهینه و در حد مطلوب باشد، میگو می تواند به خوبی مقاومت کند؛ این یافته با نتایج حاصل از Fegan و همکاران(۱۹۹۱) مطابقت دارد.طبق یافته های Paynter و همکاران(۱۹۹۲) هم اکنون آلودگی های باکولوویروسی به ندرت باعث تلفات شدید در میگوهای پست لاروی می شوند که احتمالا دلیل آن مهارت پرسنل هچری مذکور در زمینه ی حفظ کیفیت آب، بهبود تغذیه و بهداشت در سال های اخیر است.

براساس میانگین THC (میزان هموسیت کل) و TPP(پروتئین کل پلاسما) در این مطالعه، تفاوت معنی داری در بین گروه ها (تیمارها و/ یا کنترلی) در زمان اولیه (۰ و ۱۲ ساعت) پس از پایان زمان مواجهه سازی وجود نداشت. ولی بعد از ۱۲ ساعت اختلاف معنی داری بین گروههای تیمار و کنترل مشاهد گردید. با این یافته ها چنین نتیجه گیری می‌شود که ویروس MBV موجب کاهش تعداد THCو همجنین کاهش میزان TPPشده و اندازه گیری این دو فاکتور می‌تواند شاخصی مهم برای تعیین سلامتی میگوهای بیمار و میگوهای آلوده باشد.

## منابع

**افشار نسب، م. a ۱۳۸۶.** روش های تشخیص بیماری های میگو. وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۷۵ صفحه .

**افشار نسب،م b ۱۳۸۶.** بیماری های ویروسی میگو . وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۰ صفحه.

**Afsharnasab, m., Akbari, s ., Shariff, M., Yousef F., and Hassan D., 2006.** Effect of different pH and salinity levels on the viability of *Monodon baculovirus* (MBV ) in *penaeus semisulcatus* . Iranian journal of Fisheries science. 6(1): 1-18.

**Baticados, M. C. L., Pitogo, C. R., Paner, M. G., de La pena L. D., and Tendencia E. A., 1991.** Occurrence and pathology of *penaeus monodon baculovirus* infection in hatcheries and pond in the Philippines . lsr , J. Aquac . Bamidgeh. 43, 35-41 .

**Brock J. A. and Lightner D. V.,1990**. Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganism .PP.245-349.In: Diseases of Marine Animals, Vol.III, Kinne O.,ed.Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.

**Burge, E. J., Madigan, D. J., Burnett L. E., and Burnett K. G., 2007.** Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with Vibrio. Fish & Shellfish Immunology. 22, 327 -339.

**Chen, S. N., Chang P. S. and Kou G. H., 1989.** Observation on pathogenisity and epizootiology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in cultured shrimp in Taiwan. Fish Pathol, 24, 189-195.

**Fegan, D. F., Flegel, T. W., Sriurairatana S. and Waiyakruttha M., 1991**. The occnrrence development and histo pathology of *monodon baculovirus* in *penaeus monodon* in Southern Thailand . Aquaculture. 96, 205 -217 .



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

shrimp in the Americas. Fish pathol. 33, 165-180.

**Liu, B.,Yu, Z., Song, X., Guan, Y., Jian X. and He J., 2006**. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 253(1-4): 163-170.

**Paynter, J. L., vikers, J. E., Lester, R. J. G. 1992**. Experimental transmission of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV ). Dis . Asian Aquac. pp. 97-110 .

**Ramasamy, P., Brennan G. P. J. and ayakumar R., 1995.** A record and prevalence of *Monodon baculovirus* from post-larval *Penaeus monodon* in Madras, India. Aquaculture,130,129-135.

**Sahoo, P. K., Pillai, B. R., Mohanty, J., Kumari, J., Mohanty S. and Mishra B.K., 2007**. In vivo humoral and cellular reactions,and fate of injected bacteria *Aeromonas hydrophila* in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shel lfish Immunol. 23(2): 327 –340.

**Song, Y. S., Yu, C. I., Lien, T. W., Huang C. C. and Lin M. N., 2003**. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology, 14, 317–331.

**Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M. and Van Hulten. M. C. W. 2004**. "Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination." J. Virol. 78, 2057-2061.

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

**Flegel, T. w., 2006**. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia , a historical perspective with emphasis on Thailand . Aquaculture, 258, 1-33.

**Hsu S. W. and Chen J. C., 2007**. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. Aquaculture, 271, 61 – 69.

**LeBlanc B. D., and Overstreet R. M. 1990.** Prevalence of *Baculovirus Penaeiin* experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age. Aquaculture. 87, 237-242.

**Jiang, G.,Yu R., and Zhou M., 2004**. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicas* to virulence of white spot syndrome virus. Aquaculture, 241, 61-75.

**Lightner D. V., and Redman R. M., 1981**. A baculovirus caused disease of the penaeid shrimp (*penaeus monodon*). J. Invertber. Pathol. 38 , 299-302.

**Lightner, D. V., Redman, R. M. and Bel, T. A. 1983**. Observation on the geographic distribution pathogenesis and morphology of the *baculovirus* from *penaeus monodon*. Aquaculture, 32, 209 -233.

**Lightner, D. V. and Redman, R. M., 1998**. Strategies for the control of viral diseases of



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]

# The study of Total Hemocyte Count and Total Protein Plasma in Shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with *Monodon baculovirus*

Afsharnasb, M. [(1)*]; Shojaei, Z. [(2)]; Dashtyannasab, A. [(3)]

* mafsharnasab@yahoo.com

1- Iranian Fisheries Research Organization, Theran,Iran
2- Azad University, Science and Research Branch. Ahvaz, Iran.
3-Iran Shrimp Research Institute, Bousher, Iran

**Key words**: *Monodon baculovirus*, *Litopenaeus vannamei*, Total Hemocyte Count, Total Protein plasma.

## Abstract

The investigation of Total Hemocyte Count (THC) and Total Protein Plasma (TPP) in shrimp juvenile *Litopenaeus vannamei* that exposed with Monodon *Baculovirus* (MBV) was carried out. Three hundred and sixty shrimps with average weight 7 to 12 g were selected from Heleh site in Bousher province and transported to Iran Shrimp Research Institute. The shrimp was acclimated during two days for stress reduction and adaptation. The shrimps were cheeked by PCR for WSSV, MBV, HPV, TSV, IHHNV and NHP and the result showed they are free of these diseases. The experiment was designed with selected 60 shrimps in triplicate as treatment and exposed with MBV during 12 hours and control group with triplicate without exposing with MBV. The hemolymph was withdrawn from abdominal segments of samples for measuring THC and TPC evaluation at designed hours (0, 12, 24, 48, 72 and 96). The PCR test confirmed the MBV in treatment and the control were free of viruses. The results showed that the difference of THC and TPP value between treatment and control group during the experiment was significant ($P < 0.05$). This finding can be used for assessing the health of shrimp culture and prevention of MBV.

*Corresponding author



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-05-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.1.1.7 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110157 ]