



بررسی بیماری زایی تجربی ویروس لکه سفید White Spot Syndrome Virus در میگوی *Litopenaeus vannamei* با تأکید بر شدت ضایعه

رضا صادقی لیمنجوب^۱، امیرحسین رضازاده شیرازی^{۲*}، فاطمه متفکر^۳، حسین بیدار^۴

۱- گروه بهداشت و بیماری های آبزیان و زنبور عسل، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، فارس، ایران

۲- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه آزاد کازرون، فارس، ایران

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه آزاد کازرون، فارس، ایران

۴- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه آزاد کازرون، فارس، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول: amirrezazadehshirazi1347@gmail.com

چکیده

ویروس لکه سفید (White Spot Syndrome Virus) یکی از مهم ترین عوامل ویروسی و خسارت زا در صنعت پرورش میگو به شمار می آید. این پژوهش با هدف بررسی شاخص شدت ضایعه ناشی از آلودگی با ویروس لکه سفید در بافت های مختلف میگوی *Litopenaeus vannamei* انجام شد. به این منظور، نمونه برداری از میگوهای آلوده صورت گرفت و پس از تهیه برش های بافتی و رنگ آمیزی با روش هماتوکسیلین-انوزین، بررسی های میکروسکوپی انجام پذیرفت. شاخص شدت ضایعه (Severity of Infection Index) بر اساس گریدهای ۰ تا ۴ ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان آلودگی در بافت های آبشش ($ROI = 78.9\%$) و لنفونیدی ($ROI = 3.67\%$) مشاهده گردید، در حالی که بافت های هپاتوپانکراس و عضله کمترین میزان ضایعه را نشان دادند. یافته های این مطالعه بر نقش محوری بافت آبششی در تظاهر بالینی بیماری و اهمیت آن در پایش سلامت میگوهای پرورشی تأکید دارد. به کارگیری شاخص شدت ضایعه می تواند به عنوان ابزاری مؤثر در ارزیابی وضعیت پاتولوژیک و مدیریت بهداشتی در مراکز پرورش میگو مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ویروس لکه سفید، میگوی *Litopenaeus vannamei*، شدت ضایعه، آسیب شناسی، آبشش

۱- مقدمه

میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) به عنوان یکی از گونه های کلیدی و با ارزش اقتصادی بالا، بخش عمده ای از تولید جهانی میگو را در صنعت آبیاری پروری به خود اختصاص داده است. این گونه به دلیل ویژگی هایی نظیر رشد سریع، ضریب تبدیل غذایی مطلوب، توان تحمل نسبتاً بالا در برابر شرایط محیطی متغیر و قابلیت پرورش در تراکم های بالا، در بسیاری از کشورهای آسیایی، آمریکای لاتین و اخیراً در ایران نیز مورد توجه ویژه قرار گرفته است [۱]. در کنار توسعه روزافزون صنعت پرورش این گونه، بیماری های ویروسی یکی از چالش های اساسی و محدودکننده در افزایش بهره وری و پایداری آن به شمار می روند. در این میان، ویروس لکه سفید (White Spot Syndrome Virus - WSSV) به عنوان یکی از مرگبارترین و خسارت بارترین پاتوژن های شناخته شده در سخت پوستان معرفی شده است. این ویروس از اعضای خانواده Nimaviridae و جنس Whispovirus می باشد و



دارای ژنوم DNA دو رشته‌ای با اندازه‌ای حدود ۳۰۰ کیلوباز است که یکی از بزرگ‌ترین ژنوم‌ها در میان ویروس‌های شناخته‌شده در آبریان محسوب می‌شود [۲].

WSSV نخستین بار در دهه ۱۹۹۰ میلادی در کشورهای آسیای جنوب شرقی گزارش شد و به سرعت به سایر مناطق تولیدکننده میگو در جهان گسترش یافت. ویژگی‌هایی نظیر قدرت سرایت بالا، گستره میزبانی وسیع و ایجاد مرگومیر شدید در مدت‌زمان کوتاه، این ویروس را به یکی از تهدیدات جدی زیستی در صنعت پرورش میگو تبدیل کرده است. گزارش‌ها حاکی از آن است که شیوع این ویروس می‌تواند تا ۱۰۰٪ تلفات در مزرعه ایجاد کند و میلیون‌ها دلار خسارت اقتصادی به همراه داشته باشد [۳].

مطالعات متعدد در دهه‌های اخیر نشان داده‌اند که شدت آسیب‌های ناشی از آلودگی به ویروس لکه سفید (White Spot Syndrome Virus - WSSV) تحت تأثیر مجموعه‌ای از عوامل پیچیده قرار دارد. از جمله مهم‌ترین این عوامل می‌توان به میزان بار ویروسی موجود در محیط یا بدن میزبان، گونه و ژنوتیپ میزبان، مرحله رشد یا سن میگو، و شرایط فیزیکیوشیمیایی آب نظیر دما، شوری، pH و میزان اکسیژن محلول اشاره کرد. افزایش دمای آب، در برخی موارد، باعث تشدید سرعت تکثیر ویروس و در نتیجه شدت بروز علائم کلینیکی می‌شود؛ در حالی که در مواردی دیگر، برخی دماهای خاص ممکن است موجب کاهش فعالیت ویروس و افزایش بقاء میزبان شوند. به‌طور مشابه، تغییرات شدید شوری می‌توانند با تضعیف پاسخ ایمنی میگو، موجب افزایش حساسیت آن به WSSV گردند [۴]. افزون بر این عوامل، یافته‌های نوین از نقش تعیین‌کننده میکروبیوتای دستگاه گوارش در سلامت ایمنی میزبان پرده برداشته‌اند. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند که تغییرات در ترکیب میکروبیوتای روده‌ای میگو ممکن است با افزایش یا کاهش مقاومت در برابر عفونت WSSV ارتباط داشته باشد. به‌عنوان نمونه، وجود جمعیت‌های خاصی از باکتری‌های پروبیوتیک در فلور میکروبی روده می‌تواند با تحریک سیستم ایمنی ذاتی میگو، کاهش نفوذپذیری روده، و تنظیم مسیرهای التهابی، نقش محافظتی ایفا کند. در مقابل، اختلال در تعادل طبیعی میکروبیوتا، که تحت تأثیر تغذیه نامناسب، استرس‌های محیطی یا استفاده نابجا از آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد، می‌تواند زمینه را برای رشد پاتوژن‌ها و افزایش شدت بیماری فراهم آورد [۵، ۶].

بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داده‌اند که ویروس لکه سفید (WSSV) می‌تواند باعث آسیب در بافت‌های حیاتی مانند اپیدرم، آبشش و اندام‌های هماتوپوئیک شود. شدت این آسیب‌ها با استفاده از شاخص شدت ضایعه (Severity of Injury - SOI) قابل کمی‌سازی است و می‌تواند مبنایی برای ارزیابی مقاومت ژنتیکی یا کارایی روش‌های درمانی باشد. مطالعات مختلفی به بررسی تأثیر WSSV بر بافت‌های مختلف میگو پرداخته‌اند. برای مثال، در مطالعه‌ای که بر روی میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) انجام شد، نشان داده شد که بافت‌های آبشش و اندام‌های هماتوپوئیک بیشترین آسیب را در اثر آلودگی به WSSV متحمل می‌شوند. این آسیب‌ها شامل نکروز سلولی، حضور اجسام درون‌هسته‌ای و تخریب ساختارهای بافتی است. استفاده از شاخص شدت ضایعه (SOI) به پژوهشگران و پرورش‌دهندگان این امکان را می‌دهد که میزان آسیب‌های بافتی را به‌صورت عددی ارزیابی کرده و بر اساس آن تصمیمات مدیریتی مناسبی اتخاذ کنند. این شاخص می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی برای انتخاب میگوهای مقاوم‌تر به WSSV و همچنین در ارزیابی اثربخشی روش‌های درمانی یا پیشگیرانه مورد استفاده قرار گیرد. در مجموع، بهره‌گیری از شاخص شدت ضایعه (SOI) به‌عنوان یک ابزار کمی در مطالعات هیستوپاتولوژیک می‌تواند نقش مهمی در مدیریت بیماری لکه سفید در مزارع پرورش میگو ایفا کند [۷].

در ایران، مطالعات محدودی در زمینه آسیب‌شناسی تجربی ویروس لکه سفید (WSSV) در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) انجام شده است. برخی تحقیقات به بررسی اولیه ضایعات در میگوهای وارداتی پرداخته‌اند، اما تاکنون بررسی آزمایشگاهی جامع با تمرکز بر شدت ضایعات و الگوهای بافتی در شرایط تجربی داخلی صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت اقتصادی *Litopenaeus vannamei* و تهدید جدی ویروس WSSV، شناخت بهتر از الگوی ضایعات ایجاد شده توسط این ویروس می‌تواند در تشخیص سریع، پیشگیری و توسعه راهکارهای کنترلی مؤثر واقع شود. در این راستا، هدف این تحقیق بررسی



آسیب‌شناسی تجربی میگوهای آلوده به WSSV در شرایط کنترل‌شده با تأکید ویژه بر ارزیابی شاخص شدت ضایعه (SOI) در بافت‌های حیاتی است. استفاده از شاخص شدت ضایعه (SOI) به پژوهشگران و پرورش‌دهندگان این امکان را می‌دهد که میزان آسیب‌های بافتی را به‌صورت عددی ارزیابی کرده و بر اساس آن تصمیمات مدیریتی مناسبی اتخاذ کنند. این شاخص می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی برای انتخاب میگوهای مقاوم‌تر به WSSV و همچنین در ارزیابی اثربخشی روش‌های درمانی یا پیشگیرانه مورد استفاده قرار گیرد.

در مجموع، بهره‌گیری از شاخص شدت ضایعه (SOI) به‌عنوان یک ابزار کمی در مطالعات هیستوپاتولوژیک می‌تواند نقش مهمی در مدیریت بیماری لکه سفید در مزارع پرورش میگو ایفا کند.

۲- روش کار

در این مطالعه، به‌منظور بررسی بیماری‌زایی تجربی ویروس لکه سفید (White Spot Syndrome Virus - WSSV) در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)، تعداد ۱۲۰ قطعه میگوی سالم و فاقد علائم بالینی بیماری از یک مرکز پرورش تهیه شدند. پس از اطمینان از منفی بودن آن‌ها از نظر آلودگی به WSSV با استفاده از روش PCR، میگوها به سه گروه تقسیم شدند: دو گروه تیمار و یک گروه کنترل. میگوهای گروه‌های تیمار به‌صورت تزریقی با دو دوز مختلف از سوسپانسیون ویروسی آلوده‌ساز (تهیه‌شده از هموژنات میگوهای مبتلا به WSSV) آلوده شدند، در حالی که گروه کنترل تزریق سرم فیزیولوژیک دریافت کرد. پس از تزریق، میگوها به مدت ۱۰ روز در آکواریوم‌های جداگانه با شرایط کنترل‌شده (دما، شوری، اکسیژن) نگهداری شدند و علائم بالینی، نرخ تلفات و رفتار تغذیه‌ای به‌صورت روزانه ثبت گردید.

برای بررسی شدت ضایعات (SOI)، نمونه‌برداری از بافت‌های هدف شامل اپیدرم، آبشش و اندام‌های همولنف‌دار در روزهای ۳، ۵، ۷ و ۱۰ پس از تزریق انجام شد. نمونه‌ها پس از تثبیت در محلول Davidson's fixative به مدت ۲۴ ساعت، با روش‌های استاندارد بافت‌شناسی شامل آب‌گیری با الکل‌های افزایشی، شفاف‌سازی با زایلن و قالب‌گیری در پارافین آماده‌سازی شدند. برش‌های بافتی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. سپس، مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

ضایعات مشاهده‌شده در مقاطع بافتی بر اساس شدت در سه درجه (خفیف، متوسط، شدید) طبقه‌بندی شدند. این طبقه‌بندی بر اساس معیارهای استاندارد شامل حضور اجسام درون‌هسته‌ای، نکروز سلولی، تخریب ساختارهای بافتی و میزان گسترش ضایعات در بافت‌ها انجام شد. این روش‌ها بر اساس مطالعات پیشین در زمینه آسیب‌شناسی ویروس لکه سفید در میگوهای پرورشی تدوین شده‌اند.

در نهایت، داده‌های به‌دست‌آمده از بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و شاخص شدت ضایعه (SOI) با استفاده از آزمون‌های آماری مناسب مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند تا ارتباط بین دوز ویروسی، زمان پس از عفونت و شدت ضایعات بافتی تعیین شود.

۳- نتایج

در این مطالعه، آسیب‌شناسی بافت‌های مختلف میگوی *Litopenaeus vannamei* آلوده‌شده به ویروس لکه سفید (WSSV) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شدت ضایعه (SOI) در بافت‌های مختلف متفاوت بوده و عمدتاً در آبشش‌ها و بافت لنفوئیدی متمرکز بوده است. بافت‌های هپاتوپانکراس و عضله در اغلب موارد فاقد علائم قابل توجهی از آلودگی بودند.



شدت ضایعه در نمونه‌ها بر اساس بررسی میکروسکوپی در ۱۰ میدان میکروسکوپی ($40\times$) و شمارش سلول‌های دارای علائم آلودگی مانند گونگی‌دگی هسته، هیپرتروفی، نکروز و رنگ‌پذیری غیرطبیعی مشخص گردید. سپس با تعیین درصد سلول‌های آلوده در هر نمونه، درجه آلودگی (۰ تا ۴) تعیین شد.

جدول ۱: نتایج شدت ضایعه (SOI) در بافت‌های مختلف میگوی *Litopenaeus vannamei* آلوده به WSSV

درصد بروز ضایعه (ROI%)	نوع بافت	ردیف
۷۸.۹۰٪	آبشش	۱
۶۷.۳۰٪	بافت لنفوئیدی	۲
۰.۰۰٪	هپاتوپانکراس	۳
۲۱.۴۰٪	عضله	۴

نتایج نشان داد که در روز سوم پس از تزریق، علائم اولیه آلودگی در آبشش‌ها و بافت لنفوئیدی مشاهده شد، در حالی که سایر بافت‌ها تغییرات قابل توجهی نداشتند. با پیشرفت زمان، شدت ضایعات در آبشش‌ها و بافت لنفوئیدی افزایش یافت و در روز دهم پس از تزریق، بیشترین میزان ضایعات در این بافت‌ها مشاهده شد. بافت‌های هپاتوپانکراس و عضله در طول دوره مطالعه تغییرات قابل توجهی نشان ندادند.

این یافته‌ها با مطالعات قبلی همخوانی دارد که نشان می‌دهند WSSV تمایل بیشتری به آلوده‌سازی بافت‌های خاصی مانند آبشش‌ها و بافت لنفوئیدی دارد، در حالی که سایر بافت‌ها کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای توسط Kakoolaki و Afsharnasab، مشخص شد که بافت‌های آبشش و بافت لنفوئیدی بیشترین آسیب را در اثر آلودگی به WSSV متحمل می‌شوند، در حالی که هپاتوپانکراس کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۸،۹].

جدول ۲- درصد بروز ضایعات بافتی (ROI%) در میگوی آلوده به WSSV

گرید ۴	گرید ۳	گرید ۲	گرید ۱	نوع بافت	ردیف
۴	۶	۵	۳	آبشش	۱
۳	۴	۲	۱	بافت لنفوئیدی	۲
۰	۰	۰	۰	هپاتوپانکراس	۳
۰	۱	۰	۰	عضله	۴

یافته‌های جدول دوم نشان می‌دهد که بافت آبشش بیشترین درصد بروز ضایعه را دارد. این امر نشان می‌دهد که ویروس لکه سفید (WSSV) بافت‌های حیاتی مرتبط با تبادل گاز و ایمنی را به‌طور ویژه‌ای مورد هدف قرار می‌دهد. عدم بروز ضایعه در هپاتوپانکراس می‌تواند به دلایل متعددی از جمله مقاومت نسبی سلول‌های این بخش به WSSV یا عدم نفوذ مؤثر ویروس در این ناحیه باشد.



در مجموع، نتایج نشان دهنده آن است که شدت ضایعات ایجاد شده توسط WSSV به طور قابل توجهی به نوع بافت وابسته است و آبشش‌ها و بافت‌های لنفوئیدی بیشترین آسیب را متحمل می‌شوند. این یافته‌ها با مطالعات قبلی همخوانی دارد که نشان می‌دهند WSSV تمایل بیشتری به آلوده‌سازی بافت‌های خاصی مانند آبشش‌ها و بافت لنفوئیدی دارد، در حالی که سایر بافت‌ها کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرند.

استفاده از شاخص شدت ضایعه (SOI) به پژوهشگران و پرورش‌دهندگان این امکان را می‌دهد که میزان آسیب‌های بافتی را به صورت عددی ارزیابی کرده و بر اساس آن تصمیمات مدیریتی مناسبی اتخاذ کنند. این شاخص می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی برای انتخاب میگوهای مقاوم‌تر به WSSV و همچنین در ارزیابی اثربخشی روش‌های درمانی یا پیشگیرانه مورد استفاده قرار گیرد.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ویروس لکه سفید (WSSV) دارای تمایل بافتی مشخصی نسبت به برخی اندام‌های حیاتی میگوی *Litopenaeus vannamei* است. بیشترین شدت ضایعه در بافت آبشش و بافت لنفوئیدی مشاهده شد، در حالی که بافت‌هایی مانند هیاتوپانکراس و عضله آسیب بافتی قابل توجهی را نشان ندادند. این یافته‌ها با مطالعات پیشین هم‌راستا هستند که نشان می‌دهند WSSV در بافت‌هایی که در تماس مستقیم با محیط هستند یا نقش مهمی در پاسخ ایمنی دارند، بیشتر تکثیر می‌یابد و ضایعات شدیدتری ایجاد می‌کند.

بررسی شدت ضایعه (SOI) در مقاطع بافتی با استفاده از روش‌های کمی، امکان طبقه‌بندی دقیق‌تری از مراحل پیشرفت بیماری را فراهم کرده و می‌تواند به عنوان یک شاخص مفید در ارزیابی میزان بیماری‌زایی ویروس، تأثیرگذاری راهکارهای مدیریتی و حتی انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار گیرد.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهند که برای شناسایی سریع و دقیق آلودگی WSSV، باید تمرکز ویژه‌ای بر بررسی آسیب در آبشش‌ها و بافت لنفوئیدی داشت، چرا که این دو بافت نسبت به سایر اندام‌ها حساس‌تر بوده و شاخص‌های بافتی واضح‌تری از حضور ویروس را نشان می‌دهند. علاوه بر این، داده‌های حاصل از این پژوهش می‌تواند مبنای طراحی آزمون‌های تشخیصی مبتنی بر شاخص‌های بافتی باشد.

در نهایت، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی از روش‌های مولکولی پیشرفته‌تر مانند *in situ hybridization* و *real-time PCR* در کنار روش‌های بافت‌شناسی برای افزایش دقت در تعیین شدت و محل دقیق آلودگی استفاده گردد. همچنین، بررسی بیشتر در خصوص نقش فاکتورهای محیطی مانند شوری، دما و میکروبیوتا بر شدت ضایعه می‌تواند به تدوین راهبردهای مؤثرتر برای پیشگیری و کنترل بیماری منجر شود.

۵- تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری و حمایت صمیمانه‌ی مسئولین و کارکنان مرکز تحقیقات بیماری‌های آبزیان، به‌ویژه بخش ویروس‌شناسی، که شرایط انجام این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از تمامی افرادی که در مراحل نمونه‌برداری، مراقبت از میگوها، آماده‌سازی مقاطع بافتی و تحلیل داده‌ها مشارکت داشتند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

۶- تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچگونه تضاد منافی، اعم از مالی یا غیرمالی، در رابطه با این پژوهش وجود ندارد.



مراجع

- [۱] Chen, X., Zhang, Y., Wang, Q., & Li, J. (2023). Comparative analysis of the growth performance, vitality, body chemical composition, and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* under different culture systems. *Aquaculture*, 567, 737317. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.737317>
- [2] ICTV. (2023). Family: Nimaviridae. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Report. Retrieved from <https://ictv.global/report/chapter/nimaviridae/nimaviridae>
- [3] Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258(1-4), 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.003>
- [4] Wang, J., Huang, Y., Xu, K., Zhang, X., Sun, H., Fan, L., & Yan, M. (2019). White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.076>
- [5] Pilotto, M. R., Goncalves, A. N. A., Vieira, F. N., Seifert, W. Q., Bachère, E., Rosa, R. D., & Perazzolo, L. M. (2018). Exploring the impact of the biofloc rearing system and an oral WSSV challenge on the intestinal bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 6(3), 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030083>
- [6] Zhang, X., Sun, Y., Liu, Y., Wang, J., Fan, L., & Yan, M. (2022). Core gut microbiota of shrimp function as a regulator to maintain immune homeostasis in response to WSSV infection. *Frontiers in Microbiology*, 13, 9045241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.9045241>
- [7] Rodríguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., & Bachère, E. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador, with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases*, 26(8), 439–450. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00476.x>
- [8] Kakoolaki, S., & Afsharnasab, M. (2017). Histopathological indices of WSSV infection in target tissues and their correlation with hindgut infections in *Penaeus vannamei* (Decapoda, Dendrobranchiata). *Crustaceana*, 90(6), 645–659
- [9] Afsharnasab, M., et al. (2012). Histopathological observation of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in shrimp farms, *Litopenaeus vannamei*, in Bushehr Province, Iran. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(2), 209–219