ردیابی ویروس نکروز عفونی پانکراس (IPNV) در شاه میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) دریاچه شورابیل (حوزه آبریز خزر) به روش RT–PCR

علی نکوئی فرد *[۱]، مهری جعفر زاده [۲]، داریوش آزادی خواه [۳]

a.nekoueifard@areeo.ac.ir

۱- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه ، گروه میکروبیولوژی، ارومیه، ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، گروه پاتوبیولوژی، ارومیه، ایران.

چکیده

نکروز عفونی لوزالمعده (IPN) یک بیماری حاد ویروسی در آبزیان می باشد که تلفات شدیدی را در پی دارد. شاه میگوی آب شیرین یکی از حاملین اصلی این ویروس بوده و بدون اینکه خود مبتلا به این بیماری شود به عنوان مخزن و حامل ویروس عمل کرده و آن را به منابع آبی و سایر آبزیان انتقال می دهد. هدف از این تحقیق مطالعه مقطعی ردیابی ویروس IPN در شاه میگوی آب شیرین دریاچه شورابیل شهرستان اردبیل از حوزه آبریز خزر بود. این مطالعه با در نظر گرفتن تعداد نمونه جهت رسیدن به درجه اطمینان ۹۸ درصد انجام شد. بدین منظور در بازه زمانی زمستان ۱۳۹۲ لغایت زمستان ۱۳۹۳ از ۵ ایستگاه صید مشخص شده در دریاچه تعداد ۳۰۰ عدد شاه میگوی آب شیرین شامل ۱۵۰ عدد جنس نر و ۱۵۰ عدد جنس ماده به ترتیب با میانگین طولی ۵/۱۹±۳۹/۴۱ و ۳/۰۵±۳۴/۱۱ سانتی مترو میانگین وزنی ۵/۴±۱۰۵/۹۸ و ۴/۲±۱۰۳/۷۱ گرم صید و به روش Reverse Transcriptase-PCR مورد ارزیابی ویروس شناسی قرارگرفت. نتایج حاصل در این مطالعه مقطعی نشان دهنده احتمال عدم وجود آلودگی شاه میگوی آب شیرین دریاچه شورابیل به ویروس IPN بود.

واژگان کلیدی: ویروس، شاه میگوی آب شیرین، شورابیل، مولکولار، نکروز عفونی پانکراس

مقدمه

ارزش بالای تجاری شاه میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) در اروپا، باعث شده که به عنوان یک تولید مهم اقتصادی مطرح باشد. به همین خاطر علاقه ی زیادی برای پرورش گونه های مختلف شاه میگو حتی در کشورهایی که مصرف کم دارند و یا حتی فاقد بازار مصرف آن هستند وجود دارد (Nekuie Fard et al ., 2010). مهم ترین کشورهای تولید کننده *A.leptodactylus* روسیه و ترکیه هستند که تقریباً توانایی تامین همه نیازهای کشورهای اروپای غربی و اسکاندیناوی را دارند. مصرف کنند گان اروپایی ترجیح می دهند *A.astacus* را که یک گونه اروپایی با ارزش تر نسبت به *A.leptodactylus* است را مصرف کنند. اما *A.leptodactylus* همیشه یک نقش مهم را در تولید کل شاه میگو آب شیرین اروپا بازی کرده است (Fard et al ., 2011). آمارها نشان می دهد که سود تجاری *A.leptodactylus* با کاهش جمعیت های *A.astacus* به علت بیماری ها و آب های آلوده به طور محسوس افزایش یافته است. (Nekuie Fard et al ., 2010).

عمده پراکنش گونه اقتصادی شاه میگوی آب شیرین در دریاچه سد مخزنی ارس و تالاب انزلی می باشد، همچنین دو گونه و یا زیر گونه آن نیز در سواحل و رودخانه های واقع در بخش غربی دریای خزر یافت می شود. صادرات این سخت پوست از ایران به اروپا از سال ۱۳۶۴ به

عمده پراکنش گونه اقتصادی شاه میگوی آب شیرین در دریاچه سد مخزنی ارس و تالاب انزلی می باشد.

میزان کم آغاز شد. هرچند صید و صادرات شاه میگوی تالاب انزلی شروع گردیده است، ولی در حال حاضر از منابع مهم صید و صادرات آن سد مخزنی ارس می باشدکه از سال ۱۳۷۶ صادرات آن به برخی از کشورهای اروپایی توسط شرکت های خصوصی صورت می گیرد. حضور *A.leptodactylus* در سایر منابع آبی می تواند بدلیل انتقال این موجود از سد ارس به برخی از منابع آبی و دریاچه های پشت سد (براساس اطلاعات غیر رسمی) در ۱۳ استان کشور شامل استان های آذربایجان غربی، شرقی، اردبیل، زنجان، لرستان، فارس، کهگیلویه و بویر احمد، استان مرکزی، اصفهان، ایلام، خراسان، گلستان و کرمان باشد (پورزارع و همکاران، ۱۳۹۵).

معرفی بیماری قارچی(طاعون شاه میگو) در اروپا در اواسط قرن ۱۸ میلادی (Alderman et al., 1988) منجر به تمرکز تحقیقات اولیه بر روی بیماری های شاه میگو آب شیرین شد. اولین گزارش از حضور ویروس در شاه میگو دراز آب شیرین در اوایل دهه ۱۹۹۰ بود (Anderson et al., 1992). مقالات مروری مهم متعددی از جمله (Smith et al., 1986) بیماری های شاه میگوی آب شیرین را مورد بررسی قرارداده اند. از جمله ویروس جداشده از شاه میگوی آب شیرین که دارای اهمیت آبزی پروری می باشد IPNV است (Svoboda et al., 2013). بیماری ویروسی نکروز عفونی پانکراس تقریباً تنها بیماری ویروسی کشنده در ماهیان است که بیشترین مطالعات و در نتیجه بیشترین اطلاعات در مورد پاتوبیولوژی آن موجود است (Bain et al., 2008). عامل بیماری بیرنا ویروس RNA دار دو رشته ای به اندازه ی حدود ۶۰ نانومتر و حاوی دو ناحیه ی ژنومی A و B بوده و متعلق به گروه آکوا بیرنا ویروس است (Roberts and Pearson, 2005). جدایه های این ویروس از گونه های مختلف ماهی های آب شیرین، آب دریا، آزاد ماهیان، غیر آزاد ماهیان، نرمتنان و سخت پوستان در سرتاسر دنیا گزارش شده است. در برخی از مناطق جغرافیایی نیز با افزایش فعالیت های پرورش ماهی، حتی در آب دریا، خسارات اقتصادی به دلیل بیماری های ویروسی همانند IPN رو به فزونی یافته است. (Joh et al., 2000). دریاچه شورابیل در استان اردبیل از جمله مکان های مهم حضور شاه میگوی دراز آب شیرین (*A. leptodactylus*) می باشد. در این دریاچه سالیانه مقادیر قابل توجهی شاه میگوی آب شیرین توسط شرکت صیادی، صید می شود. از طرفی مقادیر زیادی از مولدین صید شده نیز برای رهاسازی در سایر منابع آبی کشور و بعضا پرورش در استخرهای خاکی به سایر استان های کشور بدون هیچ گونه اطلاعاتی در خصوص احتمال آلودگی به عوامل ویروسی بیماری IPN انتقال می گردند (Nekuie Fard et al ., 2010). از آنجائیکه این موجود به عنوان یک حامل و مخزن ویروس یادشده عمل کرده و تظاهرات بالینی خاصی را از خود بروز نمی نماید بنابراین در راستای کمک به توسعه آبزی پروری و جلوگیری از همه گیری عوامل بیماریزای غیربومی به سایر منابع آبی کشور، شناسایی این ویروس در شاه میگوی دراز آب شیرین برای ایجاد شرایط مناسب و مستمر صید اقتصادی و مهم تر از آن دست یابی به اطلاعات متناسب با شرایط بهداشتی مورد درخواست مبادی کشورهای وارد کننده از مهم ترین مواردی است که زمینه تحقیق را در این موجود الزام می دارد.

مواد و روشها

۱- صید و جمع آوری

برای این منظور از زمستان ۱۳۹۳ لغایت زمستان ۱۳۹۴ پس از اخذ مجوزهای لازم از سازمان آب و مدیریت شیلات و آبزیان استان اردبیل با تله گذاری ۳۰۰ عدد تله مخصوص صید شاه میگو آب شیرین در ۵ ایستگاه در دریاچه شورابیل انجام شد (شکل ۱ و جدول ۱). در هر ایستگاه شصت (۶۰) عدد از تور تله ای که مشخصات آن در شکل ۲ آمده است به هم متصل در کف دریاچه در هر ایستگاه رها سازی شدند (Harlioğlu et al., 2009).

زمان تله گذاری ساعت ۶-۵ صبح و جمع آوری آن ها همان روز ۲ ساعت قبل از غروب آفتاب بود. پس از جمع آوری تورها شاه میگو های صید شده به صورت زنده توسط جعبه های یونولیتی به آزمایشگاه بهداشت و بیماری های آبزیان مرکز تحقیقات آرتمیای کشور انتقال و در تانک های پلی اتیلنی ۲۰۰ لیتری منتقل شدند. آب موجود در تانک ها ۴۸ ساعت قبل از انتقال نمونه به آن ها از آب چاه که از لحاظ هر گونه آلودگی

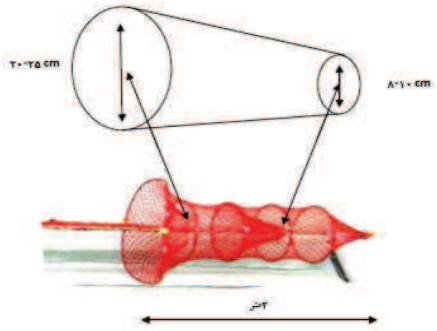
معرفی بیماری قارچی (طاعون شاه میگو) در اروپا در اواسط قرن ۱۸ میلادی منجر به تمرکز تحقیقات اولیه بر روی بیماری های شاه میگو آب شیرین شد. اولین گزارش از حضور ویروس در شاه میگو دراز آب شیرین در اوایل دهه ۱۹۹۰ بود.

عاری بود پر شده و توسط ایربلوئر[1] از کف هوادهی شدند. قبل از بررسی ویروس شناسی مشخصات زیست سنجی نمونه ها اندازه گیری و ثبت شد. جهت انجام آزمایشات مولکولی ابتدا همولنف شاه میگو ها از طریق قطع شاخک جمع آوری شده و سپس به روش جدا کردن سر کشته شده و پس از برداشتن کاراپاس با استفاده از قیچی و پنس استریل به طور مجزا از تیغه های آبششی، هپاتوپانکراس نمونه برداری صورت گرفت. در داخل الکل اتیلیک ۹۹٪ جهت آزمایش شناسایی مولکولی نگهداری شدند (Calleja et al., 2012).

شکل ۱- موقعیت مکانی ایستگاههای صیادی و جمع آوری شاه میگوی آب شیرین در تحقیق.

جدول ۱- مشخصات مکانی ایستگاههای نمونه برداری شاه میگوی آب شیرین در دریاچه شورابیل

صیدگاه	مختصات جغرافیایی
۱	۳۸,۲۱۲۷۷۷ ، ۴۸,۲۸۰۷۷۱
۲	۳۸,۲۱۷۶۲۴ ، ۴۸,۲۸۵۳۶۳
۳	۳۸,۲۰۹۰۹۳ ، ۴۸,۲۸۲۰۱۵
۴	۳۸,۲۰۹۷۰۰ ، ۴۸,۲۷۴۸۹۱
۵	۳۸,۲۱۴۷۵۸ ، ۴۸,۲۸۹۸۶۹



شکل ۲- تور دامی مدل ترکیه ای مخصوص صید شاه میگوی آب شیرین استفاده شده در این تحقیق

۲- جداسازی و شناسایی ویروس به روش مولکولی

به منظور ردیابی ویروسی ابتدا باید RNA استخراج شده، سپس تبدیل به cDNA شود سپس cDNA تولیدی به عنوان DNA الگو PCR بررسی شود. پرایمرهای مورد نظر برای بررسی ویروس IPN طبق رفرانس مطابق با توالی های زیر سفارش داده شدند (جدول ۲) (Blake et al., 1995).

جدول ۲ - توالی، اندازه و باند ژن هدف پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق (Williams et al.,1999).

ویروس	اندازه باند (جفت باز)	توالی پرایمر	ژن هدف
IPN	۲۰۶	WB1: CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC WB2: CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG	VP2

۲-۱- استخراج RNA ویروس IPN

برای استخراج نمونه ها کیت استخراج از شرکت سینا کلون تهیه شد و طبق پروتکل مربوطه مراحل استخراج انجام گرفت. این کیت شامل (Wash buffer 1,Wash buffer 2, precipitation buffer, elution buffer RNASE free) بود.

به منظور ردیابی ویروسی ابتدا باید RNA استخراج شده، سپس تبدیل به cDNA شود سپس cDNA تولیدی به عنوان DNA الگو PCR بررسی شود.

1. Cheliped

۱-۱-۲- مراحل استخراج RNA ویروس IPN

نمونه های بافتی اخذ شده در هاون مخلوط و هموژن شده سپس ۲۰ میلی گرم به میکروتیوب ها وارد شدند. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر بافر درون میکروتیوب ها ریخته شد و به مدت ۵ ثانیه ورتکس گردید. در مرحله بعد محلول درون میکروتیوب ها به درون میکروتیوب های فیلتردار انتقال شده و میکروتیوب ها به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریوفیوژ شدند. ستون های فیلتردار را درون تیوب های جدید قرار داده و۴۰۰ میکرولیتر Wash buffer 1 درون آن ریخته و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریوفیوژ گردید ،مایع درون میکروتیوب های جمع کننده دور ریخته شد. مجددا ۴۰۰ میکرولیتر Wash buffer2 درون میکروتیوب ها وارد شده و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه دوباره مایع جمع شده درون میکروتیوب تخلیه گردید (این مرحله ۲ بار انجام گرفت).بار دیگر تیوب های فیلتردار را درون میکروتیوب های دیگر قرار داده و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد.با دقت زیاد میکروتیوب های فیلتردار را درون میکروتیوب های جدید قرار داده و مقدار ۵۰ میکرولیتر Elution buffer که به مدت ۱۰- دقیقه در ۵۵ درجه حرارت دیده درست در مرکز فیلتر می ریزیم. سپس ۳ تا ۵ دقیقه درحرارت ۵۵ درجه قرار می گیرد. در مرحله آخر به مدت یک دقیقه برای خروج ژنوم از تیوب فیلتردار با ریختن درون میکروتیوب جدید با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ انجام گرفت. RNA استخراج شده درون میکروتیوب پس از کدگذاری درون فریزر قرار داده شد.برای سنتز cDNA ازکیت cDNA سنتتاز شرکت سیناژن استفاده شد، این کیت دو مرحله ای مخصوص سنتز cDNA با تمام طول بوده و دارای کاربری مناسب برای استفاده از cDNA در PCR می باشد. برای این واکنش پس از آماده سازی مخلوط شامل (توتال RNA، پرایمر راندوم هگزامر ، dNTP و RNA، Nuclease free water) و پرایمر آن را در میکروتیوب های ۲۰۰ میکرولیتری ریخته وبه مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس به مدت پنج دقیقه روی یخ قرار گرفت.۱۰ میکرولیتر از cDNA های سنتز شده درون مخلوط RNA-Primer ریخته شد و به طور مختصر تکان داده و سپس ۱ دقیقه به آرامی سانتریفیوژ انجام گرفت. در مرحله بعد چون از پرایمر راندوم هگزامر استفاده شده بود برای ممانعت از جای گیری اشتباه پرایمر به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوبه گردید. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.در نهایت بار دیگر نمونه ها را به مدت ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتیگراد انکوبه کرده و پس از پایان این مرحله cDNA به عنوان DNA الگو برای PCR قابل استفاده می باشد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppndorf ساخت آلمان) به ترتیب شامل :

سیکل آغازین دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، سیکل دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، سیکل آغازی ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، سیکل گسترش رشته (بسط) در ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه، سیکل نهایی در ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه. قابل ذکر است مراحل ۲ تا ۴ در ۳۵ سیکل تکرار شد.

محصول PCR با استفاده از ژل آگارز۲ درصد الکتروفورز و باند حاصله با استفاده از مستند ساز ژل ترانس ایلومیناتور مدل XR–plus محصول BIORAD عکس برداری شد. از لدر bp50 بعنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل بعنوان کنترل منفی استفاده شدند. از هر ۱۰ نمونه بررسی شده در قالب یک نمونه به آزمایشگاه مرجع بیماریهای ویروسی سخت پوستان سازمان دامپزشکی کشور واقع در استان بوشهر برای تایید تشخیص قطعی به روش Real-time PCR ارسال شد.

نتایج

اطلاعات مربوط به مشخصات زیست شناختی شاه میگو های بررسی شده در جدول های ۳ تا ۵ نگارش شده است. نتایج مطالعه RT-PCR روی ۳۰۰ عدد (۱۵۰ عدد نر و۱۵۰ عدد ماده)

نتایج مطالعه RT–PCR روی ۳۰۰ عدد (۱۵۰ عدد نر و ۱۵۰ عدد ماده) شاه میگوی آب شیرین مطالعات مورد آزمایش نشان دهنده عدم وجود ویروس در نمونه های مورد بررسی بود.

شاه میگوی آب شیرین مطالعات مورد آزمایش نشان دهنده عدم وجود ویروس در نمونه های مورد بررسی بود.

جدول ۳- حوزه آبریز محل تحقیق و تلاش صیادی انجام شده در طول تحقیق

موقعیت جغرافیایی	نام سد	حوضه آبریز	تلاش صیادی (تله - روز)	نمونه های صید شده (عدد)
اردبیل	شورابیل	دریای خزر	۱۷۵۰	۳۰۰

جدول ۴- اطلاعات زیست شناختی نمونه های بررسی شده

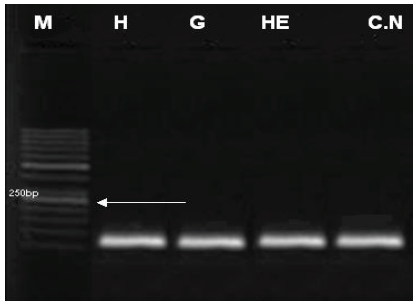
صیدگاه	تعداد (عدد)		میانگین وزن±انحراف معیار (گرم)		میانگین طول±انحراف معیار (میلی متر)	
	نر	ماده	نر	ماده	نر	ماده
شورابیل	۱۵۰	۱۵۰	۳۹/۴۱±۵/۱۹	۳۴/۱۱±۳/۰۵	۱۰۵/۹۸±۵/۴	۱۰۳/۷۱±۴/۲

جدول ۵- اطلاعات ویروس شناسی نمونه های بررسی شده به تفکیک بافت شاه میگوی آب شیرین

صیدگاه	IPNV					
	نر			ماده		
	G	HP	HE	G	HP	HE
شورابیل	ND	ND	ND	ND	ND	ND

جدانشد=ND/آبشش=G، هپاتوپانکراس=HP، همولنف=HE=

قطعه ژنی مورد نظر IPNV باید در صورت وجود ویروس باید در پهنای باند ۲۰۶ تشکیل می شد، ولی آزمایشات انجام شده نشان دهنده عدم وجود ویروس در نمونه های مربوطه بوده و گویای عاری بودن نمونه ها از لحاظ ویروسی می باشد.



شکل ۳ - ژل آگارز ۲٪ مربوط به آشکار سازی PCR حاصل از RNA ویروس IPN شاه میگوی آب شیرین دریاچه شورابیل. M=مارکر 50 bp، H=هپاتوپانکراس، HE=همولنف، G=آبشش، C.N=کنترل منفی.

در این تحقیق از لدر 50bp استفاده شد . همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، قطعه ژنی نمونه های بررسی شده از لحاظ IPNV در صورت وجود ویروس در bp ۲۰۶ باید باند تشکیل می داد ولی هیچ گونه نمونه مثبتی مشاهده نشد. در مواردی بعضا در انتهای ژل و زیر لدر اتصالات ضعیفی دیده می شد که به دلیل تشکیل پرایمر دایمر بود.

بحث

Blake و همکارانش ویروس IPN را به روش RT-PCR آشکار سازی کردند. آنها پس از توسعه ی روش RT-PCR نواحی خاص ژنومی از این ویروس را برای طراحی پرایمر در نظر گرفته و پرایمر مورد نظر را طراحی کردند و ویروس را بر اساس آن ناحیه شناسایی کردند، نتایج آنها نشان داد سه ناحیه ی که برای طراحی پرایمر در نظر گرفته بودند بسیار حفاظت شده می-باشند که می توانند برای شناسایی این ویروس ها استفاده کنند .نتایج این تحقیق نشان داد RT-PCR می تواند روشی سریع و قابل اطمینان باشد که به جای کشت سلول بتوان از آن استفاده کرد.

تحقیقات گسترده ای در خصوص تاثیر ویروس IPN بر شاه میگوی آب شیرین انجام شده است، این مطالعات نشان می دهد این سخت پوست به عنوان یک حامل برای این ویروس عمل می کند. اهمیت نقش این آبزی به عنوان انتقال دهنده ویروس در محیط های آبزی بوده و گاها تلفات بالایی در سایر آبزیان از جمله سالمون ها و قزل آلاها به وجود می آورد و باعث خسارات اقتصادی بالایی می شود به همین دلیل بیشتر تحقیقات در زمینه تلفات وارده به ماهیان انجام شده است که مرگ و میر بالایی را به همراه دارد (Mortensen, 1993; Plumb, 1992).

در یکسری تحقیقات انجام شده با وجود جداسازی ویروس در شاه میگو هیچ اثر پاتولوژی و سیتولوژی که نشان دهنده اثر ویروس در شاه میگو باشد یافت نشد و در این راستا تحقیقات مولکولی گسترده ای انجام شده است (Owens et al., 2000). تحقیقات بسیاری از محققان نشان داد که ویروس IPN درون ارگان های شاه میگوی آب شیرین از جمله آبشش ها ، هپاتوپانکراس و همولنف یافت می شود و نحوه آلوده شدن به ویروس از طریق آب و غذای آلوه به این ویروس بوده و می تواند آن را به طرق مختلف از خود خارج کند و به عنوان عامل بیماری نکروز عفونی هپاتوپانکراس در آزاد ماهیان از جمله قزل آلای رنگین کمان که تلفات بالایی را همراه دارد محسوب شود (Bootland et al.,; Halder et al., 1988 1988).

نتایج این تحقیق نیز که به منظور ردیابی ویروس در شاه میگو های دریاچه شورابیل انجام شد نشان دهنده ی احتمال عدم آلودگی در این مطالعه مقطعی بود. همان گونه که ذکر شد این آبزی یکی از اصلی ترین حامل های این ویروس به شمار می-آید و آگاهی از وضعیت وجود این ویروس در دریک منطقه می تواند در زمینه پایش بهداشتی این سایر آبزیان آن کمک شایانی به سازمان های ذی ربط در توسعه آبزی پروری کند. همچنین با آگاهی از وضعیت بهداشتی شاه میگو ها از نظر پایش ویروسی می توان سیستم های پرورشی ماهیان و قفس های شناور را نیز مطابق این دستاورد کنترل و توسعه داد. لذا پیشنهاد می شود :۱- هر ساله جهت دستیابی به وضعیت پایدار بهداشتی، شاه میگوی آب شیرین بعنوان یک نشانگر زیستی ارزیابی انجام شود.۲- برای برنامه ریزی جهت تولید قزل آلای رنگین کمان در شورابیل غربالگری شاه میگو آب شیرین و سایر آبزیان که می توانند بعنوان مخازن ویروس های بیماریزای قزل آلای رنگین کمان محسوب شوند در برنامه کاری دستگاه های مرتبط قرار گیرد.

فهرست منابع

۱. پورزارع، م. مناف فر، ر. نکوئی فرد ،ع. ۱۳۹۵. بررسی تنوع جمعیتی شاه میگو (*Astacus leptodactylus*) دریاچه مخزنی سد ارس با استفاده از صفات ریخت شناسی .فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال ۸، شماره ۴، صفحات ۲۱۱- ۲۱۷.

2. Alderman, D. J., Polglase, J. L., Holdich, D. M., & Lowery,

199211-.
16. Svoboda, J., Kozubíková, E., Kozák, P., Kouba, A., Bahadir Koca, S., Diler, Ö., ... & Petrusek, A. 2012. PCR detection of the crayfish plague pathogen in narrow-clawed crayfish inhabiting Lake Egirdir in Turkey. Diseases of aquatic organisms, 98(3), 255.
17. Unestam, T., & Söderhäll, K. 1977. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish.
18. wens, L., & McElnea, C. 2000. Natural infection of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* with presumptive spawner-isolated mortality virus. Diseases of aquatic organisms, 40, 219-223.
19. Williams, K., & Blake, S. 1999. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. Journal of clinical microbiology, 37(12), 4139-4141.

Euro-Mediterranean subregion. Acta zoologica bulgarica, 63, 105- 108.
9. Harlioğlu, A. G., & Harlioğlu, M. M. 2009. The status of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz) fisheries in Turkey. Reviews in Fisheries Science, 17(2), 187-189.
10. Joh, S.J.; Kim, D.W.; Kim, J-H. and Heo, G-J. 2000. Detection of marine birnavirus (MBV) from rockfish Sebastes schlegeli using reverse transcription and nested PCR. The Journal of Microbiology, 260- 264.
11. Mortensen, S. H. 1993. Passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) through invertebrates in an aquatic food chain.
12. Nekuie Fard, A., Motalebi, A. A., Jalali Jafari, B., Aghazadeh Meshgi, M., Azadikhah, D., & Afsharnasab, M. 2011. Survey on fungal, parasites and epibionts infestation on the *Astacus leptodactylus* (Eschcholtz, 1823), in Aras Reservoir West Azarbaijan, Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(2), 266-275.
13. Plumb, J. A. 1992. Viral diseases of marine fish. Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms, 2, 25.
14. Roberts, R.J. and Pearson, M. D. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Journal of Fish Diseases, 28: 383–390.
15. Smith, V. J., & Söderhäll, K. 1986. Crayfish pathology: an overview. Freshwater crayfish, 6,

R. S. 1988. Pathogens, parasites and commensals. Freshwater crayfish. Biology, management and exploitation., 167- 212.
3. Anderson, I. G., & Prior, H. C. 1992. Baculovirus infections in the mud crab, *Scylla serrata*, and a freshwater crayfish, Cherax quadricarinatus, from Australia. Journal of Invertebrate Pathology, 60(3), 265- 273.
4. Bain, N.; Gregory, A. and Raynard, R.S. 2008. Genetic analysis of infectious pancreatic.
5. Blake, S. L., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M.-K., Singer, J. T., & Nicholson, B. L. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. Journal of clinical microbiology, 33(4), 835- 839.
6. Bootland, L. M., Dobos, P., & Stevenson, R. M. 1991. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. Dis. Aquat. Org, 10, 13- 21.
7. Calleja, F., Godoy, M. G., Cárcamo, J. G., Bandín, I., Yánez, A. J., Dopazo, C. P & Avendano-Herrera, R. 2012. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with Universal Probe Library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. Journal of virological methods, 183(1), 80-85.
8. Fard, A. N., & Gelder, S. R. 2011. First report of Branchiobdella kozarovi Subchev, 1978 (Annelida: Clitellata) in Iran, and its distribution in the Eastern