

The effect of some imported foods from shrimp breeding centers on positive real-time PCR tests for white spot virus and their ability to infect post-larvae

Kakoolaki S.^{1*}; Ghaednia B.^{1*}; Bahari Meymandi S.A.M.²; Sepahdari A.¹; Sharifpour I.¹,
Ahangarzadeh M.³; Hemati A.¹; Pazir M.K.⁴

*bsh443@gmail.com; babak.ghaednia@gmail.com

1-National Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

2-Iranian Veterinary Organization, Hormozgan General Directorate, Hormozgan, Iran

3-Southern Aquaculture Research Institute, National Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran

4-National Shrimp Research Institute, National Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bushehr, Iran

Received: September 2024

Accepted: January 2025

Published: July 2025



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

The growing global population and increasing demand for healthy protein have made aquaculture, particularly shrimp farming, a crucial solution. However, rapid industry expansion has led to disease outbreaks like White Spot Syndrome Virus (WSSV), causing \$20 billion in Asian losses over two decades (Davies, 2016). Global farmed shrimp production surged from 50,000 tons (1975) to 4.5 million tons (2018) (FAO, 2018), with Iran's production reaching 60,000 tons in 2022 and targeting 150,000 tons. Intensive farming practices (up to 1.5 million PLs/0.8 ha) and excessive feeding (20-25% unused protein) exacerbate disease risks. WSSV already affects 10-14% of Iranian farms (Madani, 2021), causing annual losses of 5,000 tons (~\$17 million) - potentially doubling by 2023. This study evaluates WSSV transmission through contaminated imported feed using real-time PCR, comparing results with nested PCR, histopathology, and control groups to address this critical biosecurity gap.

Methodology

This experimental study evaluated the potential transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) through imported shrimp feeds using four test groups: one control group fed WSSV-free feed (RT-PCR negative) and three treatment groups fed RT-PCR positive commercial feeds (MPZ, MEF, and Flak). Each group consisted of 90 PL5 shrimp (30 per replicate, 3 replicates) maintained in 150×30×50 cm glass aquariums containing 60% sterilized coastal water with continuous aeration. The trial lasted 20 days with

four daily feedings, alternate-day siphoning, and 20% water exchange. Survival rates were calculated and compared statistically. For molecular analysis, samples from moribund shrimp underwent DNA extraction using commercial kits, followed by TaqMan RT-qPCR with specific WSSV primers (50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C/15 sec and 60°C/1 min) and nested-PCR using the IQ2000 WSV kit. Histopathological examination involved fixing six PLs per group in Davidson's solution, followed by standard ethanol-xylene processing, paraffin embedding, 4µm sectioning, and H&E staining. Data were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($\alpha=0.05$).

Results

The experimental feeds for groups 2-4 tested positive for WSSV by RT-PCR at an accredited veterinary laboratory, with Ct values consistently above 30, indicating low viral genome loads (Figures 2-4). Survival rates after 20 days showed no significant differences ($p>0.05$) between groups: control (95.55%), MPZ (95.55%), MEF (97.77%), and Flak (94.44%) (Figure 5). Although the Flak group had slightly lower survival, statistical analysis revealed no significant differences among groups. All shrimp samples tested negative for WSSV infection through both RT-PCR (Table 2) and nested-PCR confirmation (Figure 6) using the IQ2000 kit. Histopathological examination of hepatopancreas, intestine, muscle and gill tissues showed no viral inclusion bodies in any experimental group (Figures 7-10). The study results clearly demonstrate that while traces of WSSV genetic material were detected in the imported shrimp feeds, these findings do not indicate any actual disease risk. The high Ct values (above 30) from PCR testing show the viral material present was minimal and likely non-infectious fragments rather than live virus. Most importantly, after 20 days of feeding, comprehensive testing revealed no evidence of WSSV infection in any shrimp across all experimental groups. All shrimp samples tested negative through both molecular methods (real-time PCR and nested PCR) and histological examination, with no viral inclusion bodies found in any tissues. The survival rates across all groups remained consistently high (94.44-97.77%) with no statistically significant differences, confirming that the PCR-positive feeds performed just as well as the control feed. This strongly suggests that the presence of viral genetic material in these imported feeds does not translate to actual disease transmission or negative impacts on shrimp health and survival. The consistent negative results across all diagnostic methods provide robust evidence that these feeds do not pose a WSSV transmission risk under normal aquaculture conditions. These findings have important implications for the shrimp farming industry, indicating that proper PCR testing can effectively distinguish between non-infectious viral fragments and genuine disease threats in imported feeds. The findings conclusively show that the presence of WSSV genetic material in imported feeds did not lead to actual infection or affect shrimp survival under these experimental conditions.

Discussion and conclusion

This study aimed to assess the potential pathogenicity of shrimp hatchery feed that tested positive in real-time PCR for white spot syndrome virus (WSSV). The results confirmed trace amounts of WSSV genetic material in imported larval-stage feed (Figures 2-4), though high Ct values indicated low viral genome levels, suggesting contamination rather than active infection. The detected genetic material likely

originated from natural shrimp-based pigments or antioxidants added during feed production. While some researchers claim WSSV is inactivated by heat or freezing, inconsistent global measures (sometimes conflicting with OIE standards) have perpetuated uncertainty (Durand *et al.*, 2000). Deadly viruses can spread via:

1. Transport of infected live stocks (Schnurrenberger *et al.*, 1987),
2. Bird vectors (Garza *et al.*, 1997),
3. Import/reprocessing of frozen food (Humphrey, 1995).

Durand *et al.* (2000) found WSSV survives freezing/cold storage, prompting this study to evaluate processing methods beyond freezing. WSSV has been detected in post-larvae (PL) of various *Penaeus* species across different regions (Withyachumnarnkul *et al.*, 2003), with multiple potential transmission routes proposed. Vertical transmission was confirmed by Mohan *et al.* (1997), who observed WSSV inclusions in reproductive organs and eggs of *P. monodon*. Momoyama *et al.* (1998) reported WSSV survival after freezing, while Durand *et al.* (2000) suggested that block freezing could degrade WSSV DNA, attributing viral inactivation to ice crystal damage or repeated freeze-thaw cycles during processing.

Contradictory findings exist: Hasson *et al.* (2006) and Sritunyalucksana *et al.* (2010) noted WSSV viability in frozen shrimp. However, Aranguren Caro *et al.* (2020) demonstrated that boiling WSSV-infected shrimp for 1–30 minutes eliminated infectivity, despite qPCR detecting viral DNA (with no significant Ct differences). Nested PCR and histopathology confirmed the loss of infectious WSSV in boiled samples, with no pathological lesions observed—aligning with this study's results (Figures 7–10), which suggest heat-treated feed poses no infection risk to broodstock. Experimental WSSV infection via feeding contaminated shrimp tissue has been demonstrated (Chou *et al.*, 1998; Hameed *et al.*, 2002; Momoyama *et al.*, 1998). However, wild shrimp/crabs of unknown WSSV status *are* still used as feed in some systems (Corsin *et al.*, 2001). Few studies evaluate feeding practices' impact on WSD outbreaks. While MPEDA/NACA found no link (Corsin *et al.*, 2005), Vietnam associated higher feed amounts with WSD incidence—possibly due to water quality or stocking density (Corsin *et al.*, 2001). Contrary to this study's conclusion (no transmission via feed), Maeda *et al.* (1998) suggested commercial feed could influence WSSV positivity. Similarly, Corsin *et al.* (2001) linked specific feed brands to WSSV presence in harvested shrimp, though without disease correlation. In India, 43% of ponds used WSSV-positive feed, with some brands showing higher contamination—likely due to raw materials or milder processing (Corsin *et al.*, 2002). However, no direct feed-WSD relationship was found, implying low-quality feed may weaken immunity, exacerbating natural infections. Pongmaneerat *et al.* (2001) observed no WSSV in hemolymph after feeding WSSV-positive feed, despite oral transmission being highly effective (Soto and Lotz, 2001). This study concludes that hatchery feed cannot transmit WSSV to post-larvae; real-time PCR likely detects non-infective viral fragments from raw materials.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

مقاله علمی - پژوهشی:

تأثیر برخی غذاهای وارداتی مراکز تکثیر میگو با آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real time PCR) مثبت ویروس لکه سفید و توانایی آنها در آلودگی پست‌لاروها

شاپور کاکولکی^{۱*}، بابک قائدنیا^{۱*}، سیدامیر مختار بهاری میمندی^۲، ابوالفضل سپهداری^۱، عیسی شریف‌پور^۱، مینا آهنگرزاده^۳، عاطفه همتی^۱، محمدخلیل پذیر^۴

*bsh443@gmail.com; babak.ghaednia@gmail.com

۱- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲- سازمان دامپزشکی ایران، اداره کل هرمزگان، هرمزگان، ایران

۳- پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

۴- پژوهشکده میگوی کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران

تاریخ چاپ: تیر ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

پرورش میگو به عنوان یکی از ارکان آبی‌پروری به دلیل ارزش غذایی بالا، مورد استقبال آبی‌پروران، تجار و مردم قرار گرفته است. طی سال‌های اخیر توسعه صنعت میگو در ایران، به دلیل عدم دسترسی کافی نهاده‌های اولیه تولید غذا از خارج از کشور، با مشکل جدی مواجه شده است. بررسی‌های اخیر نشان داده است که عمده غذاهای تکثیر میگو وارداتی است. در بررسی‌های اولیه کارشناسان که مبتنی بر آزمایش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (Real time PCR) بوده، مشخص گردیده است که برخی از غذاهای وارداتی مراکز تکثیر میگو آلوده به ویروس لکه سفید میگو هستند. برخی دیگر از کارشناسان معتقدند که وجود قطعاتی از ژنوم ویروس موجب می‌گردد تا آزمایش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوطه مثبت گردد. بنابراین، بر اساس همین ابهام که آیا مثبت بودن آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز غذا، می‌تواند دال بر وجود ویروس فعال باشد و این که این غذا کانونی برای ایجاد و انتقال ویروس گردد، تحقیقی تدوین گردید که مشتمل بر ۴ گروه تحقیقاتی شامل یک گروه کنترل و ۳ گروه تیمار در ۳ تکرار با ۹۰ قطعه میگو در هر گروه (۳۰ قطعه در هر تکرار) در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۵۰×۳۰×۱۵۰ بوده است. گروه شاهد با غذای عاری از ویروس لکه سفید (Real time منفی) و گروه‌های بعدی با نتایج Real time مثبت به ترتیب گروه‌های ۲، ۳ و ۴ با غذاهای تجاری MEF، MPZ و Flak تغذیه شدند. پس از گذشت ۲۰ روز از غذادهی، ردیابی ویروس لکه سفید در نمونه میگوها در آزمون‌های Real time، Nested-PCR (آشیا‌نه‌ای) و در نهایت از نظر هیستوپاتولوژی منفی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد، انتقال عفونت لکه سفید میگو از طریق غذاهای پلت وارداتی مراکز تکثیر میگو، محتمل نیست.

لغات کلیدی: پست لارو میگو، غذای لاروی، بیماری لکه سفید میگو، مراکز تکثیر میگو، تشخیص

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

افزایش جمعیت، بالا رفتن تقاضا برای پروتئین سالم و محدود بودن ذخایر دریایی موجب گردیده است تا آبی‌پروری به عنوان مهم‌ترین راه تأمین پروتئین مورد نیاز جمعیت روبه رشد جهان با هدف کاهش فشار تلاش صیادی از دریاها و افزایش درآمد ساحل‌نشینان به‌ویژه در کشورهای کم‌درآمد، مورد توجه قرار گیرد. گسترش و توسعه سریع آبی‌پروری و رشد تقاضای داخلی و بین‌المللی برای تولید میگو، شرایطی را برای تشدید پرورش میگو با افزایش توان تولید و تراکم ذخیره ایجاد کرده است. بنابراین، شیوع خطر بیماری‌ها از جمله بیماری لکه سفید میگو و گسترش آنها درون مرزها و خارج از جغرافیای کشورها توسعه پیدا کرده است. بیماری لکه سفید میگو سهم بزرگی از ضرر اقتصادی ۲۰ میلیارد دلاری بوده که صنعت پرورش میگو طی دو دهه اخیر در آسیا متحمل شده است (Davies, 2016). ۹۰ درصد تولید آبی‌پروری جهانی در آسیا قرار دارد و چین، هند، اندونزی، ویتنام و بنگلادش مهم‌ترین تولیدکنندگان آن هستند. پرورش میگو در جهان به‌ویژه در شرق و جنوب شرق آسیا و در سال‌های بعد در کشورهای آمریکای لاتین توسعه زیادی یافته به‌طوری‌که میزان تولید جهانی میگوی پرورشی از ۵۰۰۰ تن در سال ۱۹۷۵ به بیش از ۴/۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۸ رسیده است (FAO, 2018). یکی از چالش‌های اصلی در آبی‌پروری، بیماری‌های آبزیان است که سالانه موجب وارد آمدن میلیون‌ها دلار خسارت مالی به پرورش‌دهندگان شده و یکی از موضوعات مهم در توسعه آبی‌پروری است. یکی از زمینه‌های توسعه آبزیان در جهان و قاره آسیا پرورش میگو هست که بیش از سه دهه سابقه در ایران، موجب شکوفایی صنعت آبزیان کشور گردیده است. میزان تولید میگو در کشور در سال ۱۴۰۱ قریب به ۶۰ هزار تن بوده است که روند رو به رشدی تا ۱۵۰ هزار تن در برنامه هفتم را نوید می‌دهد. این افزایش تولید صرفاً یک افزایش افقی و ناشی از افزایش سطح نبوده و نقش افزایش تراکم در سال‌های اخیر چشمگیر بوده است به‌طوری‌که گزارش‌های غیر رسمی ذخیره‌سازی پست‌لارو میگو در استخرهای پرورشی را گاهی تا ۱/۵ میلیون پست‌لارو در ۰/۸ هکتار ذکر نموده‌اند. از آن‌جائی‌که قریب به ۲۵-۲۰ درصد

ماده پروتئینی موجود در غذای میگو مصرف نمی‌شود، پس هر چه میزان غذادهی در یک استخر افزایش یابد، باعث غذادهی بیشتر در استخر گردیده بر میزان ماده پروتئینی مصرف نشده و مدفوع در استخر، افزوده می‌گردد (Iber and Kasan, 2021). این افزایش میزان ذخیره سازی، منجر به بروز بیماری‌های مهلکی خواهد شد که بیماری لکه سفید میگو که تأثیر منفی بر تجارت و اقتصاد ملی کشورها به‌خصوص در اکوادور و سایر کشورها در شرق آسیا گذاشته است. در کشور بیش از ۳۵ واحد مرکز تکثیر لارو در استان‌های بوشهر و هرمزگان فعال هستند و دو مرکز نیز در استان سیستان و بلوچستان و در شهرستان چابهار فعالیت می‌کنند. استان‌های خوزستان و گلستان نیز در سال ۱۳۹۹ واحد تکثیر فعال نداشتند. گزارش‌ها حاکی از آن است که میزان درگیری مزارع با بیماری لکه سفید میگو در حدود ۱۴-۱۰ درصد کل مزارع کشور بوده است (Madani, 2021). با این احتساب حدود ۵ هزار تن از تولیدات میگوی کشور سالانه عمدتاً به دلیل بیماری از مدار تولید کشور خارج می‌شود که معادل ۵۰۰ میلیارد تومان است. این آمار مربوط به سال پرورشی ۱۴۰۰ است و مقدار خسارت وارده به صنعت پرورش میگوی ایران در سال ۱۴۰۲ بیش از دو برابر این مقدار برآورد می‌گردد (گزارش‌های منتشر نشده). هدف از انجام این تحقیق، تعیین امکان بروز عفونت در میگوهای تغذیه شده با غذاهای آلوده به ویروس لکه سفید میگو، شناسایی شده با روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی و مقایسه نتایج با یافته‌های حاصله در گروه کنترل و مقایسه با نتایج حاصل از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای (Nested-PCR) و آزمایش‌های آسیب‌شناسی بافتی^۱ بوده است.

مواد و روش کار

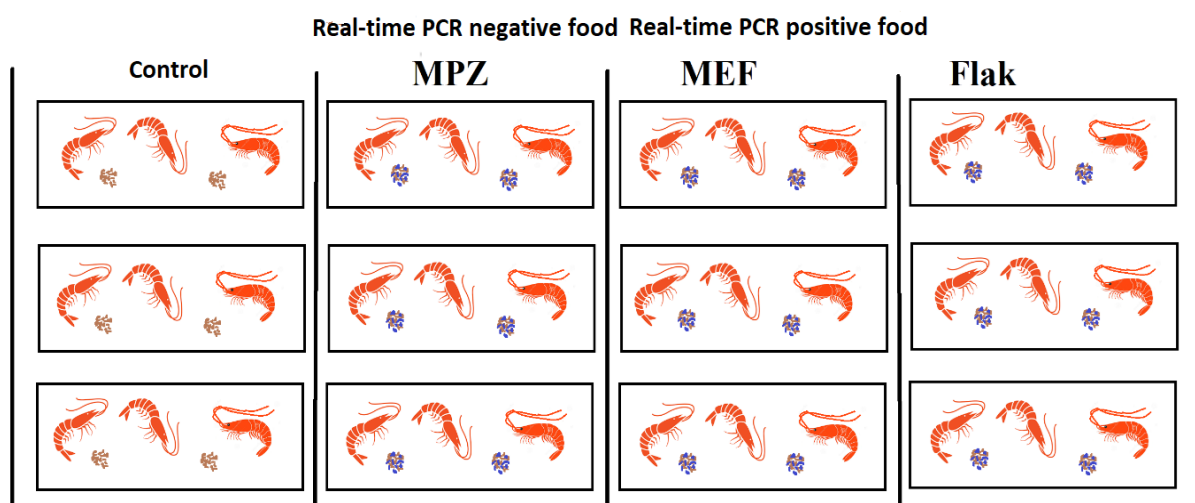
طراحی تحقیق

تحقیق حاضر، مشتمل بر چهار گروه تحقیقاتی شامل یک گروه کنترل و ۳ گروه تیمار هر کدام با ۳ تکرار است که در هر گروه تعداد ۹۰ قطعه پست لارو میگوی ۵ (۳۰ قطعه در هر تکرار) در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۱۵۰*۳۰*۵۰

¹ Histopathology

نمودند. این سه نوع غذا، سه نوع غذای وارداتی میگوهای مرحله لاروی هستند که عمدتاً به صورت قاچاق طی سال‌های پرورشی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ وارد کشور شدند و به مصرف مرحله لاروی میگوها رسیدند. این غذاها پیش از انجام آزمایش مورد آزمون قرار گرفتند. طراحی تحقیق به صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است.

ذخیره‌سازی گردیدند. گروه کنترل با غذای عاری از ویروس لکه سفید (Real time منفی) و گروه‌های بعدی به ترتیب گروه ۲ با غذای تجاری مثبت (Real time مثبت)، گروه ۳ با غذای تجاری MEF مثبت (Real time مثبت) و گروه ۴ با غذای تجاری Flak مثبت (Real time مثبت) تغذیه می‌شوند. میگوها به مدت ۲۰ روز از غذاهای تعریف شده و بر مبنای راهنمای درج شده بر جعبه غذا تغذیه



شکل ۱: طراحی تحقیق برای گروه‌های تیمار و شاهد

Figure 1: Research design for treatment and control groups

آسیب‌شناسی بافتی تهیه گردید. بدیهی است نمونه‌ها از بین میگوهای بدحال‌تر یا کم‌فعال نمونه‌برداری شدند. پای‌شنای میگوها و یک طرف آبشش آنها به منظور انجام آزمایش‌های مولکولی در لوله‌های کدگذاری شده حاوی ۹۵٪ اتانول قرار داده شد و برای انجام آزمایش‌های آسیب‌شناسی بافتی از محلول دیویدسون استفاده گردید.

آزمایش مولکولی

برای تأیید علت تلفات اقدام به آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real time-PCR)، از نمونه میگوهای تلف‌شده یا کم‌فعال‌تر گردید. برای انجام این کار، نمونه‌برداری با قرار دادن میگوی کامل در الکل ۷۰٪ در دستور کار قرار داشت. قبل از نمونه‌گیری نسبت به ضد عفونی پست‌لاروها با الکل ۹۰٪ اقدام شد. ردیابی ویروس بیماری لکه سفید در میگوهای تیمار به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real

حدود ۶۰ درصد ظرفیت مخازن نگهداری پست‌لاروها با آب ساحلی ضد عفونی شده پر گردیده و هوادهی کامل انجام شد. روزانه ۴ بار میگوها مورد تغذیه قرار گرفتند و یک روز در میان برای خروج غذاهای باقی‌مانده و مدفوع کف، آکواریوم‌ها سیفون شدند و حدود ۲۰٪ آب تعویض شد. در طول دوره تحقیق و بر اساس برنامه تنظیم شده، تلفات میگوها ثبت گردید. پس از ۲۰ روز تلفات میگوها بر اساس فرمول ذیل مورد محاسبه قرار گرفت:

$$SR\% = \frac{S}{T} \times 100$$

SR = درصد زنده‌مانی، S = تعداد میگوهای زنده مانده در طول دوره تحقیق، T = تعداد اولیه میگوها
پس از بیست روز، بخشی از نمونه‌ها از هر گروه برای انجام آزمایش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real time-PCR) اختصاص یافت و گروه بعدی برای انجام آزمایش

time-PCR) انجام شد. برای استخراج ماده ژنتیکی DNA ویروس، استفاده از کیت‌های ستونی تجاری موجود در بازار صورت گرفت (Durand et al., 2000). استخراج DNA طبق پروتکل PCR سازمان OIE و با استفاده از کیت تجاری و بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام گردید (IQ200). برای سنجش به روش

TaqMan Real-Time PCR و بر اساس پروتکل مربوطه استفاده از TaqMan Universal PCR Master Mix و اجزاء بافر بهینه‌شده، انجام شد. در جدول ۱ قطعه پرایمر ویروس لکه سفید مورد استفاده در سنجش Real-Time PCR ارائه شده است.

جدول ۱: قطعه پرایمر مورد استفاده در سنجش TaqMan Real-Time PCR
Table 1: The primer fragment used in TaqMan Real-Time PCR assay

Virus	Upstream primers	Downstream primers	TaqMan probes
	5'-	5'-	5'-AGCCATGAA-
WSSV	TGGTCCCGTCCTCATCTCAG-3'WSS1011F	GCTGCCTTGCCGGAATTA-3'WSS1079R	GAATGCCGTCTATCACACA-3'

آزمایش آسیب‌شناسی بافتی

برای تهیه لام‌های آسیب‌شناسی از هر گروه، ۶ پست‌لارو کامل برای تهیه مقطع بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین استفاده گردید (Lightner, 1996). پست‌لاروها به طور مستقیم در محلول فیکس‌کننده به مدت ۲۴-۱۲ ساعت نگهداری شده و سپس آنها را به الکل ۷۰-۵۰ درصد منتقل شده و در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند. عمل آگیری از بافت‌ها به آرامی با گذاشتن آنها در الکل با غلظت‌های پائین و سپس رسیدن به غلظت ۱۰۰ درصد انجام شد. بعد از آگیری بافت را با یک ماده حل‌کننده الکل مثل زایلین شستشو داده تا الکل از بافت‌ها خارج شود و عمل نفوذ پارافین در بافت به طور کامل انجام شود. سپس به طور کامل بافت‌ها به صورت قالب‌های پارافینی در آورده شدند. عملیات برش از این بافت‌ها به ضخامت ۴ میکرون صورت گرفت و رنگ‌آمیزی به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین انجام گردید (Lightner, 1996; Kakoolaki et al., 2011).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور تحلیل داده‌های زنده‌مانی مشاهده شده، از روش تحلیل واریانس یکطرفه و روش تعقیبی توکی نسبت به مقایسه میانگین درصد‌های زنده‌مانی هر یک از گروه‌ها اقدام گردید. اختلاف کمی، بین گروه‌ها در سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

به همین منظور یک نمونه ۵۰-۱۰ نانوگرم DNA اضافه شد تا مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی ۰/۳ میکرومولار از هر پرایمر و ۰/۱۵ میکرومولار پروب TaqMan تشکیل گردید. پروفایل PCR یک سیکل ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG) و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای فعال‌سازی AmpliTaq، به دنبال آن ۴۰ سیکل با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برنامه‌ریزی شد (Jang et al., 2009). برای تعیین تعداد کپی WSSV از نمونه‌های DNA استخراجی، نمونه‌ها در کنار استاندارد DNA پلاسمید رقیق‌شده تحت واکنش PCR قرار گرفت. پس از واکنش، نرم‌افزار همراه با سیستم PCR به طور خودکار مقدار Ct را برای هر نمونه تعیین نمود.

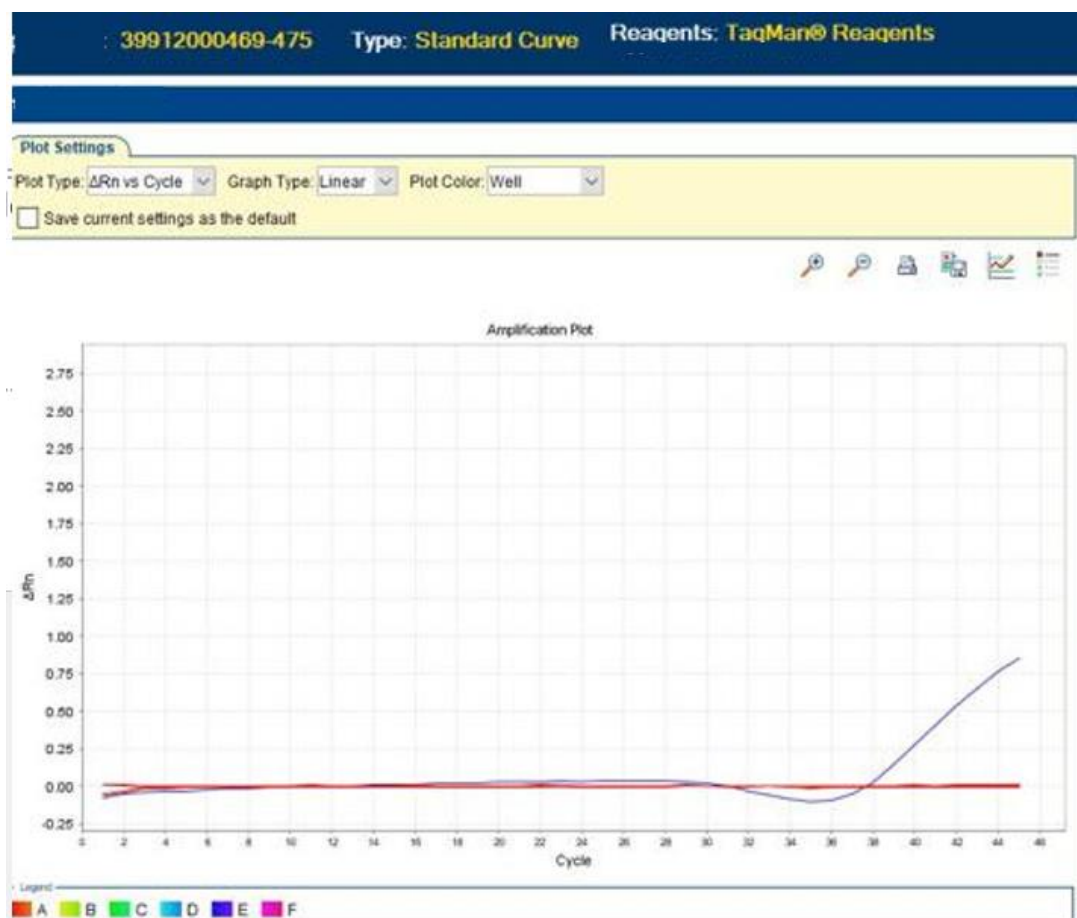
روش Nested-PCR نیز در تبع برای سنجش میگوهای گروه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. ۵-۳ پست‌لارو میگو از هر گروه جدا شده و برای سنجش Nested-PCR در میکرولوله‌های اپندورف حاوی اتانول ۷۰ درصد به آزمایشگاه مولکولی منتقل گردیدند و با استفاده از کیت تجاری IQ2000 WSV استخراج DNA انجام شده و بر اساس پروتکل کیت تجاری IQ2000 آزمایش مولکولی انجام گردید (Kakoolaki et al., 2011).

نتایج

نتایج آزمون غذاها

همان‌طوری که در تصاویر شماره ۲ الی ۴ نشان داده شده است، غذاهای مورد آزمایش گروه‌های تحقیق با کدهای ۲ الی ۴ با آزمایش Real time- PCR نزد آزمایشگاه معتمد

دامپزشکی مثبت گزارش شدند. مقدار CT گزارش شده در این آزمون‌ها عمدتاً بالای ۳۰ بوده که نشان از مقدار کم ژنوم در نمونه‌های غذای مورد گزارش بوده است. نتایج میانگین درصد زنده‌مانی میگوها در گروه‌های مختلف تحت تاثیر غذاهای مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است.



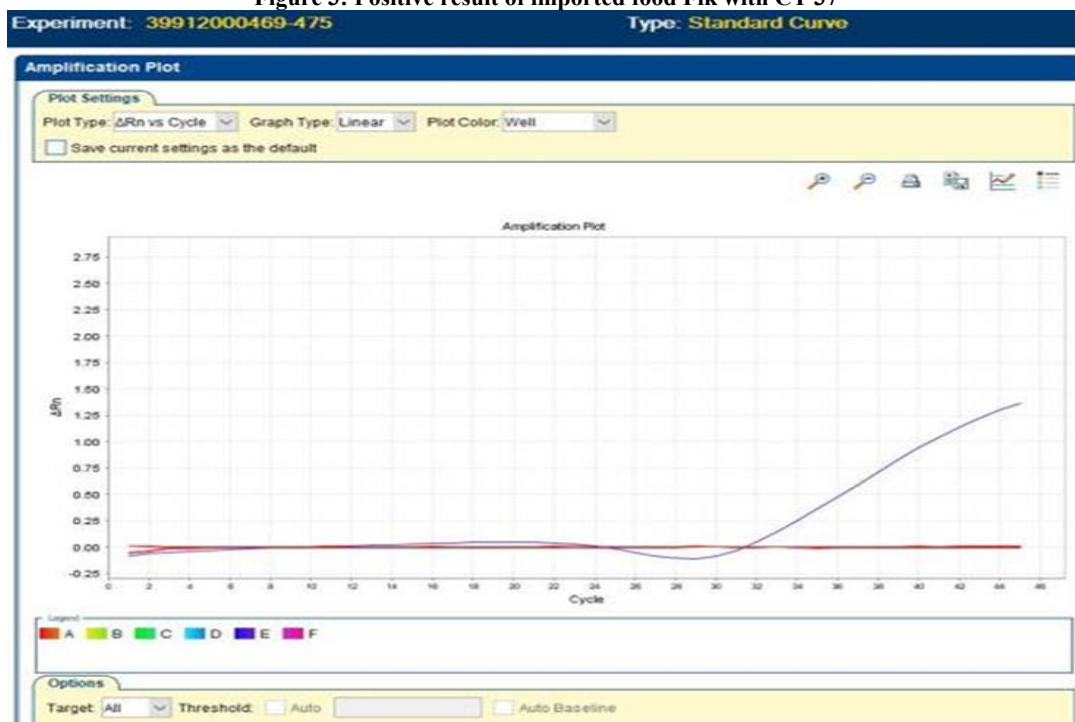
شکل ۲: نتیجه مثبت غذای وارداتی MZ.F با CT 35

Figure 2: Positive result of imported food MZ.F with CT 35



شکل ۳: نتیجه مثبت غذای وارداتی Flk با CT 37

Figure 3: Positive result of imported food Flk with CT 37

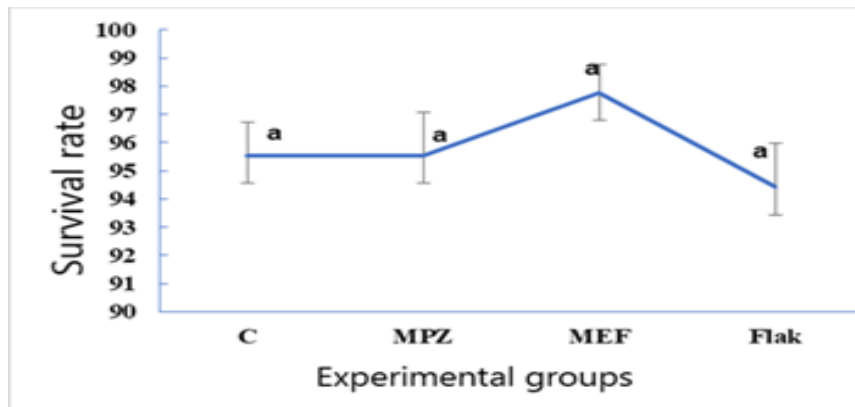


شکل ۴: نتیجه مثبت غذای وارداتی MEF

Figure 4: Positive result of imported food MEF

ندارد ($p>0.05$). این نتایج حاکی از آن است که مقدار درصد زنده‌مانی در همه گروه‌ها با مقدار گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد ($p>0.05$). صرف‌نظر از این‌که غذاهای مورد نظر حاوی ویروس Wispovirus هستند یا نه، این یافته می‌تواند حکایت از آن داشته باشد که غذاهای وارداتی تأثیری بر میزان تلفات میگوها در طول تحقیق نداشته‌اند.

بر اساس نتایج ارائه شده در شکل ۵، مقدار زنده‌مانی در گروه‌های کنترل، MPZ، MEF و Flak بدون هر گونه اختلاف معنی‌دار ($p>0.05$) به ترتیب ۹۵/۵۵، ۹۵/۵۵، ۹۷/۷۷ و ۹۴/۴۴ گزارش و ثبت گردیده است. نتایج نشان می‌دهد، مقدار زنده‌مانی در گروه Flak از همه کمتر است، ولی از نظر آماری هیچ اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها



شکل ۵: درصد زنده‌مانی میگوها در گروه‌های مختلف پس از ۲۰ روز تحقیق

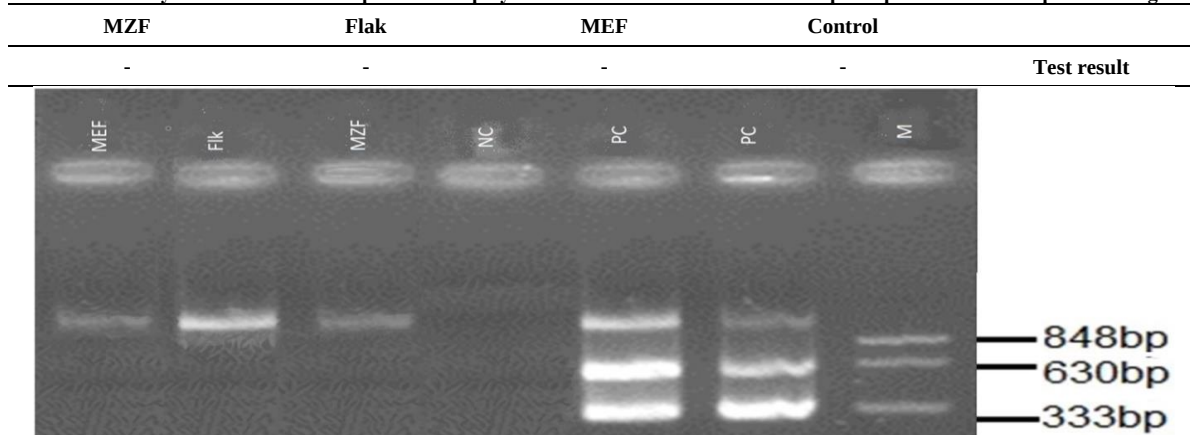
Figure 5: Percentage of shrimp survival in different groups after 20 days of research

آلودگی به ویروس لکه سفید میگو دارد. این یافته نیز با آزمون Nested-PCR مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۶).

خلاصه نتایج آزمون Real time- PCR نمونه‌های میگوی تحقیق در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌طوری که از نتایج آزمایشگاه مشخص است، نتایج Real time حکایت از عدم

جدول ۲: خلاصه نتیجه آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی نمونه میگوهای هر یک از گروه‌های آزمایشی

Table 2: Summary of the results of the quantitative polymerase chain reaction test of shrimp samples from each experimental group.

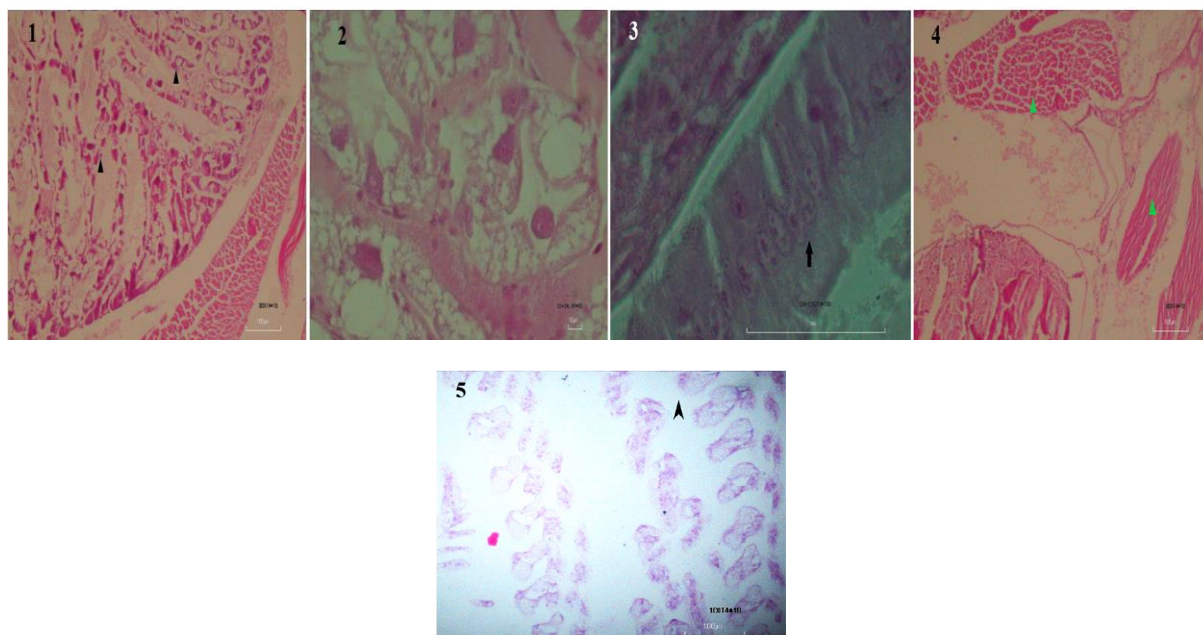


شکل ۶: میگوهای پاسبید (*Litopenaeus vannamei*) در هر ۳ گروه MEF، Flak و MZF (۱، ۲ و ۳) پس از ۲۰ روز تحقیق که نشان از عدم آلودگی نمونه‌های مورد نظر دارد. NC: نمونه آب مقطر، PC: نمونه کنترل مثبت، M: مارکر (کیت IQ2000)

Figure 5: Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in all 3 groups MEF, Flak and MZF (1, 2 and 3) after 20 days of research indicating the absence of contamination of the samples. NC: Distilled water sample; PC: 2 positive control samples; M: Marker (IQ2000 kit).

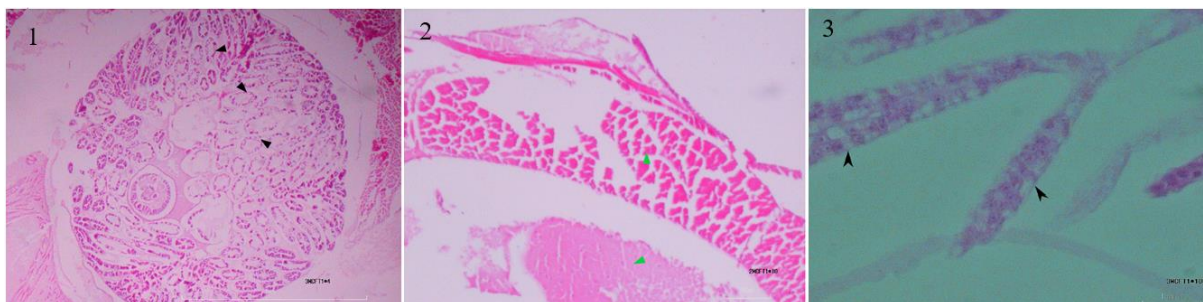
نمونه میگوهای وانمی در هر ۳ گروه MEF، Flak و MZF به ترتیب در چاهک‌های ۱، ۲ و ۳ آمده که نتیجه این آزمون عدم آلودگی به ویروس لکه سفید پس از ۲۰ روز تحقیق بوده است. چاهک چهارم نیز نمونه آب مقطر استریل را نشان می‌دهد که در قالب شاهد منفی آورده شده است. چاهک‌های پنجم و ششم نیز کنترل مثبت کیت مورد استفاده بوده و چاهک هفتم مؤید مارکر بوده است. این نتایج حکایت از عدم آلودگی نمونه‌های مورد نظر دارد (کیت IQ2000).

نتایج آزمون بافت شناسی مرضی بافت‌های مختلف میگوهای مورد مطالعه در شکل‌های ۷ الی ۱۰ نشان داده شده است. نتایج بافت‌شناسی گروه کنترل در کبد، روده، عضله و آبشش هیچ‌گونه اثری از گنجیدگی‌های ویروس لکه سفید نشان نمی‌دهد (شکل ۷). این موضوع برای گروه MEF نیز حکایت از فقدان گنجیدگی در بافت‌های کبد، عضله و آبشش دارد (شکل ۸). در گروه فلاک نیز بافت‌های کبد، روده و عضله نشان داده شده است که نشانی از گنجیدگی‌های ویروسی در این بافت‌ها مشاهده نمی‌شود (شکل ۹). در گروه MZF نیز فقدان گنجیدگی در کبد و عضله نمایان است (شکل ۱۰).



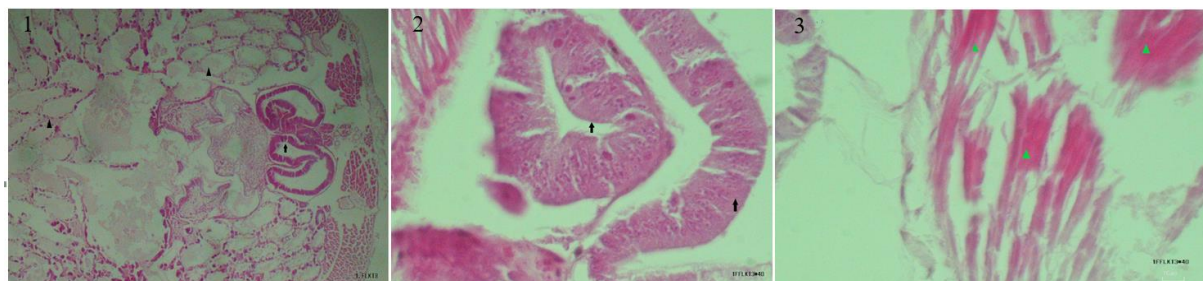
شکل ۷: نتایج بافت شناسی گروه کنترل بدون مواجهه با غذای وارداتی. کلیه بافت‌ها عدم گنجیدگی سلولی را نشان می‌دهند. تصاویر ۱ و ۲: به ترتیب بافت های هیاتوپانکراس و بخش بینابینی هیاتوپانکراس (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین با بزرگنمایی به ترتیب ۱۰ و ۴۰)، تصاویر ۳، ۴ و ۵: به ترتیب بافت‌های روده، عضله و آبشش (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین با بزرگنمایی به ترتیب ۱۰۰، ۱۰ و ۱۰)

Figure 7: Histological results of the control group without exposure to imported food. All tissues show lack of cellular aggregation. Photographs 1 and 2: Hepatopancreas and hepatopancreas interstitial tissues, respectively (hematoxylin-eosin staining at magnifications of 10 and 40, respectively); Photographs 3, 4 and 5: Intestinal, muscle and gill tissues, respectively (hematoxylin-eosin staining at magnifications of 100, 10 and 10, respectively)



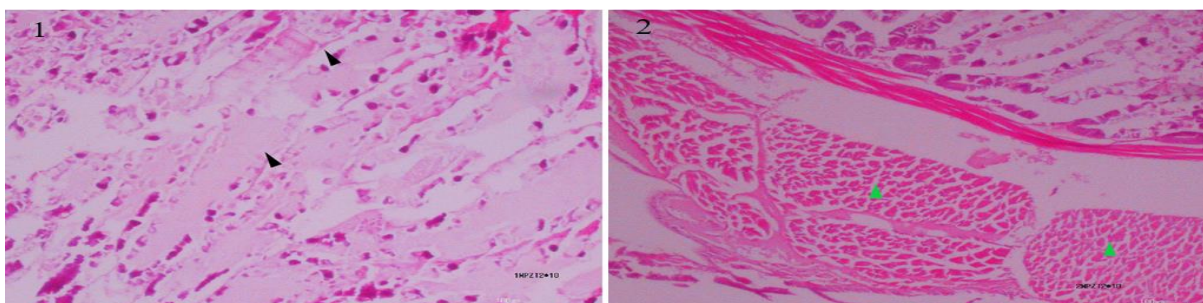
شکل ۸: نتایج بافت شناسی میگوهای تغذیه شده با غذای وارداتی MEF. کلیه بافت‌ها عدم گنچیدگی سلولی را نشان می‌دهند. تصاویر ۱ و ۲: به ترتیب بافت‌های هپاتوپانکراس و عضله (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین با بزرگنمایی به ترتیب ۴ و ۱۰)، تصویر ۳: آبشش (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین با بزرگنمایی ۱۰۰)

Figure 8: Histological results of shrimp fed with imported MEF diet. All tissues show lack of cellular aggregation. Photos 1 and 2: Hepatopancreas and muscle tissues, respectively (hematoxylin-eosin staining at magnifications of 4 and 10, respectively); Photo 3: Gills (hematoxylin-eosin staining at magnification of 100).



شکل ۹: نتایج بافت شناسی میگوهای تغذیه شده با غذای وارداتی FLK. کلیه بافت‌ها عدم گنچیدگی سلولی را نشان می‌دهند. تصاویر ۱ و ۲: به ترتیب بافت‌های هپاتوپانکراس و روده (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین با بزرگنمایی به ترتیب ۱۰ و ۴۰)؛ تصویر ۳: عضله (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین با بزرگنمایی ۴۰)

Figure 9: Histological results of shrimp fed with imported Flk. food. All tissues show lack of cellular aggregation. Photos 1 and 2: Hepatopancreatic and intestinal tissues, respectively (hematoxylin-eosin staining at 10 and 40 magnifications, respectively); Photo 3: Muscle (hematoxylin-eosin staining at 40 magnification)



شکل ۱۰: نتایج بافت شناسی میگوهای تغذیه شده با غذای وارداتی MZF. بافت‌ها عدم گنچیدگی سلولی را نشان می‌دهند. تصاویر ۱ و ۲: به ترتیب بافت‌های هپاتوپانکراس و عضله (بخش بالایی عکس هپاتوپانکراس را نشان می‌دهد). (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین با بزرگنمایی به ترتیب ۱۰ و ۱۰)

Figure 10: Histological results of shrimp fed imported MZF food. The tissues show lack of cellular compaction. Photographs 1 and 2: Hepatopancreas and muscle tissues, respectively (the upper part of the photograph shows the hepatopancreas) (hematoxylin-eosin staining at magnifications of 10 and 10, respectively)

بحث

هدف از انجام این تحقیق، بررسی احتمال قابلیت بیماری‌زایی غذاهای مراکز تکثیر میگوی بوده که در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real time- PCR)، مثبت تلقی گردیده بودند. در نمونه‌های آزمایش شده این تحقیق، رد پای حداقل ژنوم‌های ویروس لکه‌سفید در غذای وارداتی مراحل لاروی تأیید گردید، هر چند که مقدار CT آزمون Real time- PCR غذاها، عدد بالایی را نشان می‌دهد که حاکی از مقدار کم ژنوم در تکثیر آزمایش است. با توجه به نتایج حاصله از آزمایش‌ها، آلودگی اولیه مشاهده شده در غذای میگوها احتمالاً مرتبط با حضور بخشی از ژنوم ویروس بوده است و آلودگی تلقی نمی‌گردد. معمولاً کارخانجات غذای آب‌زیان برای بالابردن میزان آنتی‌اکسیدان‌ها یا رنگدانه‌ها در غذا، از رنگ طبیعی که در میگوهاست، استفاده می‌کنند.

در هر حال این که آیا ویروس طی فرآیند حرارتی یا انجماد از بین می‌رود از سوی محققین مختلف بیان گردیده، ولی نکته مهم آن است که اقدامات پراکنده در سرتاسر دنیا که گاهی با چارچوب‌های سازمان OIE نیز همخوانی ندارد، موجب گردیده است که به ابهامات این موضوع دامن زده شود (Durand et al., 2000).

مکانیسم‌های مختلفی وجود دارد که از طریق آن، ویروس‌های مهلک می‌توانند به مناطق جغرافیایی جدید مهاجرت کنند. پیچیده‌ترین این مکانیسم‌ها شامل حمل و نقل ذخایر زنده آلوده (Schnurrenberger et al., 1987)، به‌وسیله پرندگانی به عنوان ناقل (Garza et al., 1997) یا با واردات و فرآوری مجدد محصولات غذایی منجمد (Humphrey, 1995) هستند. در اکتبر ۲۰۰۷ یک محموله میگوی تازه یا منجمد صادراتی که برای مصرف انسانی به استرالیا وارد شده بود، با استفاده از فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای ویروس‌های عمده میگو [ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) و ویروس کله زرد (YHV)] در سطح شیوع ۵ درصد تحت آزمایش اجباری قرار گرفت. مجموعه‌ای از آزمایش‌های انجام شده Durand و همکاران (۲۰۰۰) با این نتیجه روبرو شد که ویروس WSSV هنوز در فرآیند انجماد و فرآیند سرد، زنده می‌ماند. از آنجایی که تا

آن زمان هیچ گزارشی در مورد تأثیر تیمارهای فرآوری به‌جز انجماد و نگهداری سرد بر DNA ویروس WSSV در میگو وجود نداشت، مطالعه حاضر انجام شد.

وجود WSSV در پست‌لاروها (PL) از گونه‌های مختلف پنایید و مناطق جغرافیایی گزارش شده است (Withyachumnarnkul et al., 2003) و تعدادی از مسیرهای احتمالی آلودگی یا عفونت فرض گردید. Mohan و همکاران (۱۹۹۷) انتقال عمودی ویروس و بررسی کامل عفونت WSSV را در اندام‌های تولیدمثلی مولدین *P. monodon* به همراه حضور گنجیدگی‌های ویروسی در اندام‌های تولیدمثل و تخم‌ها نشان دادند. همچنین Momoyama و همکاران (۱۹۹۸) دریافتند که ویروس می‌تواند در فرآیند انجماد زنده بماند. با این حال، Durand و همکاران (۲۰۰۰) گزارش دادند که DNA ویروس WSSV می‌تواند با فرآیند انجماد به روش بلوک از بین برود و پیشنهاد کردند که ویروس ممکن است به دلیل تشکیل کریستال یخ و آسیب ناشی از آن به پوشش یا نوکلئوکسپیدها در طول فراوری و ذخیره‌سازی یا تکرار ذوب شدن و انجماد مکرر در طول بازاریابی، عفونت خود را به میگوهای هدف از دست بدهد. تعداد کمی از کارگران مشاهده کردند که ویروس‌های میگو به‌ویژه WSSV ممکن است در میگوهای منجمد، زنده بمانند (Hasson et al., 2006). آزمایش‌های تجربی Sritunyalucksana و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که ویروس‌های موجود در میگوی منجمد ممکن است، زنده باشند.

در تحقیق Aranguren Caro و همکاران (۲۰۲۰) ثابت شد که میگوهای آلوده به WSSV که در معرض دمای جوش آب برای مدت زمانی ۳۰-۱ دقیقه قرار گرفته بودند، عفونی تشخیص داده نشدند. به عبارتی، میگو قابلیت بیماری‌زایی خود را از دست داده بود. داده‌های PCR کمی (q(quantitative)-PCR)، حضور DNA ویروس WSSV را در تمام نمونه‌هایی که در زمان‌های جوش مختلف در معرض قرار گرفته‌اند، تأیید می‌کند و تفاوت معنی‌داری در مقادیر Ct در بین زمان‌های مختلف جوش یافت نکردند. آنها در ادامه از آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای (Nested-PCR) برای تأیید نتایج مثبت PCR کمی

دریافتند که خوراک تجاری می‌تواند در مثبت شدن نتیجه برای بیماری لکه سفید تاثیرگذار باشد. مشابه با تحقیق حاضر، صرف مثبت شدن غذای پلت تجاری، نمی‌تواند در بروز بیماری لکه سفید میگو موثر باشد، در ویتنام، Corsin و همکاران (۲۰۰۵) به اهمیت بین تغذیه یک برند تجاری خاص از خوراک و حضور WSSV در میگوهای برداشت شده، پی بردند (Corsin et al., 2001).

در مطالعه‌ای در هند، مشخص شد که ۴۳ درصد از استخرهای پرورشی با یک برند خوراک تجاری WSSV مثبت تغذیه می‌شوند. آنها دریافتند، برخی از برندهای خوراک نسبت به سایر خوراک های تجاری، به طور قابل توجهی نمونه‌های WSSV مثبت داشتند که نشان می‌دهد در تولید غذا بیشتر از سایر کارخانجات از ترکیبات آلوده به WSSV استفاده می‌کردند یا از روش‌های تولید خوراک کمتر-تهاجمی بهره می‌بردند که شانس زنده ماندن DNA ویروسی در خوراک را افزایش می‌داد. با این حال، هیچ ارتباط معنی‌داری بین وضعیت WSSV خوراک و وقوع WSD در این تحقیق مشاهده نشد (Corsin et al., 2002). احتمال بروز بیماری از یک برند تجاری می‌تواند ناشی از کیفیت پائین غذا و به تبع پائین نگه داشتن سطح ایمنی میگوهای باشد که به صورت طبیعی با ویروس لکه سفید مواجه یافته‌اند.

علاوه‌براین، Pongmaneerat و همکاران (۲۰۰۱) یک کارآزمایی تجربی عفونت لکه سفید میگو را انجام دادند که نشان داد، تغذیه با غذای میگوی WSSV مثبت منجر به تشخیص WSSV در همولنف میگو نمی‌شود (Pongmaneerat et al., 2001). با توجه به این که راه خوراکی موثرترین روش انتقال WSSV است (Soto and Lotz, 2001)، منطقی است که از حضور DNA ویروس WSSV در خوراک تجاری اجتناب و تولید خوراک بدون WSSV توصیه گردد.

آنچه که از یافته‌های این تحقیق حاصل می‌گردد، این است که امکان انتقال ویروس لکه سفید میگو از غذای مراکز تکثیر میگو (غذای پست‌لاروی)، به پست لاروها وجود ندارد و احتمالاً آنچه در سنجش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR-Real time) خودنمایی می‌کند، قطعات ژنوم ویروس است

استفاده نمودند که در هیچ یک از نمونه‌ها هیچ گونه تشخیص موفقیت آمیزی از WSSV ارائه نکردند. تجزیه و تحلیل Nested-PCR و PCR کمی بر نمونه‌های *L.vannamei* آلوده به WSSV که منجمد نگهداری می‌شدند، انجام شد درحالی که WSSV در تمام نمونه‌ها با استفاده از روش qPCR شناسایی شد، هیچ نشانه‌ای از حضور WSSV با PCR دو مرحله‌ای به دست نیامد (Aranguren Caro et al., 2020).

در آزمایش آسیب شناسی بافتی انجام شده بر نمونه‌های مواجهه داده شده با کنترل مثبت که حرارتی ندیده بودند (بافت چرخ شده دارای ویروس زنده)، گنجیدگی‌های ویروسی WSSV فقط در اپیتلیوم کوتیکولی و بافت‌های همبند یافت شد. در مقابل، بافت شناسی میگوهای مواجهه شده با بافت WSSV مثبت، ولی جوشانده شده در ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه هیچ ضایعات بافتی پاتوگنومونیک عفونت WSSV را نشان ندادند. این یافته با نتایج تحقیق جاری کاملاً مشابهت داشت که نشان داد، غذای حرارت دیده وقتی به تغذیه میگوهای مولد می‌رسد، احتمالاً به دلیل مراحل پخت، قادر به بیماری‌زا نمودن میگوهای تغذیه شده نیستند (شکل های ۷ الی ۱۰).

چندین گروه تحقیقاتی عفونت تجربی از طریق تغذیه بافت میگوهای آلوده را به WSSV نشان دادند (Chou et al., 1998; Momoyama et al., 1998; Hameed et al., 2002). با وجود این، در برخی از سیستم‌های پرورشی، میگوهای وحشی و خرچنگ‌هایی با وضعیت ناشناخته WSSV هنوز به عنوان خوراک استفاده می‌شوند. مطالعات کمی وجود دارد که تأثیر شیوه‌های تغذیه بر وقوع WSD را ارزیابی کرده باشد. در پروژه MPEDA/NACA هیچ تأثیری از مدیریت تغذیه بر خطر بروز بیماری مشاهده نشد. با این حال، در ویتنام مشخص شد که مقادیر بالاتر خوراک با وقوع WSD مرتبط است (Corsin et al., 2001). اگرچه احتمال بالاتری از ورود WSSV به استخر و تأثیر میزان تغذیه بالا بر کیفیت آب یا به عنوان معیاری برای تراکم ذخیره سازی را نمی‌توان رد کرد.

بر خلاف نتایج این تحقیق که نشان داد امکان انتقال عفونت از طریق غذا وجود ندارد، Maeda و همکاران (۱۹۹۸)

- Davies, R., 2016.** Disease has cost asia shrimp sector over \$20bn. In: Undercurrent News. Available at: <https://www.undercurrentnews.com/2016/09/09/diseasehas-cost-asia-shrimp-sector-over-20bn/> accessed on 9.11.2021.
- Durand, S., Tang, K. and Lightner, D., 2000.** Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(2):128-135. DOI:10.1577/1548-8667(2000)012<0128:FCSAPF>2.0.CO;2
- FAO, 2018.** The state of world fisheries and aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals.
- Garza, J., Hasson, K., Poulos, B., Redman, R., White, B. and Lightner, D., 1997.** Demonstration of infectious Taura syndrome virus in the feces of seagulls collected during an epizootic in Texas. *Journal of Aquatic Animal Health*, 9(2):156-159. DOI:10.1577/1548-8667(1997)009<0156:DOITSV>2.3.CO;2
- Hameed, A.S., Murthi, B., Rasheed, M., Sathish, S., Yoganandhan, K., Murugan, V. and Jayaraman, K., 2002.** An investigation of Artemia as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 204(1-2):1-10. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00640-9
- Hasson, K., Fan, Y., Reisinger, T., Venuti, J. and Varner, P., 2006.** White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71(2): 91-100.
- که حاصل مواد خام اولیه آلوده به ویروس بوده که پس از مخلوط کردن با سایر مواد غذایی و تولید غذای نهایی میگو در سنجش Real time مشخص گردیده است.
- منابع**
- Aranguren Caro, L.F., Mai, H.N., Nunan, L., Lin, J., Noble, B. and Dhar, A.K., 2020.** Assessment of transmission risk in WSSV-infected shrimp *Litopenaeus vannamei* upon cooking. *Journal of Fish Diseases*, 43(4):403-411. DOI: 10.1111/jfd.13134
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Lo, C.F. and Kou, G.H., 1998.** Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P.japonicus* via water borne contact and oral ingestion. *Aquaculture*, 164:263-276. DOI:10.1016/S0044-8486(98)00192-8
- Corsin, F., Turnbull, J., Hao, N., Mohan, C., Phi, T., Phuoc, L., Tinh, N. and Morgan, K., 2001.** Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47(1):1-12. DOI:10.3354/dao047001
- Corsin, F., Thakur, P., Padiyar, P., Madhusudhan, M., Turnbull, J., Mohan, C., Hao, N. and Morgan, K., 2002.** Feeding farmed shrimp with shrimp waste—the lessons for aquaculture from BSE. *Research in Veterinary Science*, 72(8). DOI:10.1053/rvsc.2001.0531
- Corsin, F., Turnbull, J., Mohan, C., Hao, N. and Morgan, K., 2005.** Pond-level risk factors for white spot disease outbreaks. *Diseases in Asian aquaculture V*, 75-92.

- Humphrey, J., 1995.** Quarantine policies and practices for aquatic animals and their products: A review for the Australian quarantine and inspection service. *Bureau of Resource Sciences, Canberra.*
- Iber, B.T. and Kasan, N.A., 2021.** Recent advances in shrimp aquaculture wastewater management. *Heliyon*, 7(11). DOI:10.1016/j.heliyon.2021.e08283
- Jang, I.K., Meng, X.H., Seo, H.C., Cho, Y.R., Kim, B.R., Ayyaru, G. and Kim, J.S., 2009.** A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 287(1-2):40-45.
- Kakoolaki, S., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Sharifpour, I., Mirzargar, S., Afsharnasab, M. and Motalebi, A., 2011.** The effect of different salinities on mortality and histopathological changes of SPF imported *Litopenaeus vannamei*, experimentally exposed to white spot virus and a new differential hemocyte staining method. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(3): 447-460.
- Lightner, D. 1996.** A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp (1 ed.). LA, Baton Rouge: World Aquaculture Society.
- Madani, V., 2021.** Fourty-nine thousands of shrimp was produced in Iran. Bushehr Fishery Office Report, [in Persian].
- Maeda, M., Kasornchandra, J., Itami, T., Suzuki, N., Hennig, O., Kondo, M., Albaladejo, J.D. and Takahashi, Y., 1998.** Effect of various treatments on white spot syndrome virus (WSSV) from *Penaeus japonicus* (Japan) and *P. monodon* (Thailand). *Fish Pathology*, 33(4):381-387.
- Mohan, C.V., Sudha, P.M., Shankar, K.M. and Hegde, A., 1997.** Vertical transmission of white spot baculovirus in shrimps: a possibility?. *Current Science*, 73:109-110.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Nakano, H. and Sameshima, M., 1998.** Cryopreservation of penaeid rodshaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathology*, 33(2):95-96.
- Pongmaneerat, J., Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S. and Boonyaratpalin, M., 2001.** Effect of dietary shrimp head meal contaminated with white spot syndrome virus (WSSV) on detection of WSSV in black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*). *Aquaculture Research*, 32:383-387.
- Schnurrenberger, P.R., Sharman, R. S. and Wise, G.H., 1987.** Attacking animal diseases. Concepts and strategies for control and eradication. Iowa State University Press.
- Soto, M.A. and Lotz, J.M., 2001.** Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(1):9-15. DOI:10.1006/jipa.2001.5031
- Sritunyalucksana, K., Srisala, J., Wangnai, W. and Flegel, T.W., 2010.** Yellow head virus (YHV) transmission risk from commodity shrimp is reduced to negligible levels by normal processing. *Aquaculture*, 300(1-4):32-36.
- Withyachumnarnkul, B., Boonsaeng, V., Chomsoong, R., Flegel, T. W., Muangsins, S. and Nash, G. L., 2003.** Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53:167-171.