

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان دامپزشکی کشور
دفتر بهداشت و مبارزه با بیماری های آبزیان

طرح بررسی و مراقبت از بیماریهای اخطار کردنی (Notifiable) در مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو

دفتر بهداشت و مبارزه با
بیماری های آبزیان سازمان دامپزشکی کشور

تابستان ۱۳۹۱

ویرایش نهایی

مقدمه :

دراستای اجرای بند الف و ب ماده ۳ و ماده ۵ قانون سازمان دامپزشکی کشور و اجرای بند ج و تبصره ۱ ماده ۱۴۹ قانون برنامه پنج ساله پنجم توسعه جمهوری اسلامی ایران (۱۳۹۴-۱۳۹۰) و به منظور صیانت از میگوهای پرورشی کشور در برابر بیماریهای خطرناک لیست شده سازمان بهداشت جهانی دام (OIE) برنامه مراقبت از بیماریهای میگو در سطح مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو کشور بازنگری و از تاریخ ابلاغ لازم الاجرا می باشد .

تعاریف :

۱- بررسی بیماری : مجموعه اقداماتی که در ارتباط با یک بیماری و یا عامل آن بطور اعم صورت می پذیرد که شامل (تشخیص نوع بیماری، تعیین درصد شیوع بیماری یا بیماریها ، شناسایی جغرافیائی کانونهای بیماری ، وقوع و ...) می باشد .

۲- بروز (Incidence) : وقوع تعداد جدید رخداد بیماری در خلال دوره مشخصی از زمان ، در یک جمعیت آبی معین .

۳- شیوع (Prevalance) : تعداد کل آبی آلوده شده نسبت به تعداد کل آبیان یک جمعیت هدف ، در یک زمان مشخص .

۴- مراقبت (Surveillance) : یک سری بررسیهای مداوم و سیستماتیک بر روی یک جمعیت آبی هدف به منظور ردیابی وقوع بیماری با اهداف کنترلی ، که ممکن است نیازمند نمونه برداریهایی برای آزمایش کردن نیز باشد . در این برنامه داده ها را تجزیه تحلیل کرده و سپس برای آنها تصمیم می گیریم .

۵- مانیتورینگ (Monitoring) : برنامه های مداوم و سیستماتیک بر روی جمعیت آبی مشخص (هدف)، به منظور ردیابی تغییرات شیوع یک بیماری موجود و یا تغییرات در توزیع جغرافیائی بیماری موجود است ، که ممکن است نیازمند نمونه برداری هائی برای آزمایش کردن نیز باشد (جمع آوری و تجزیه و تحلیل اطلاعات به منظور ردیابی تغییرات درجه شیوع و شدت عفونت ضروری است) .

۶ - مراقبت عام (Passive یا غیر فعال) :

نظارتی پیوسته بر روی بیماری آندمیک (بومی) در یک جمعیت را اعمال می نماید ، به نحوی که تغییرات غیر منتظره و یا غیر پیش بینی بتواند مورد شناسایی قرار گیرد که شامل تمام اقدامات و فعالیت های تحقیقی و بررسی بیماری است که ممکن است در کشور اعمال گردد . این نوع از مراقبت با عنوان مراقبت اجمالی نیز خوانده می شود .

۷ - مراقبت هدفمند (Targeted) یا (فعال) : عبارت است از جمع آوری اطلاعات در باره یک بیماری خاص (اگزوتیک) به نحوی که سطح آن در جمعیت مشخص (هدف) بتواند اندازه گیری شود (به منظور اقدامات کنترلی) و یا عدم حضور بیماری خاص مورد نظر بطور قابل اعتمادی ثابت شود .

۸ - امنیت زیستی (Biosecurity) : به سلسله اقدامات مدیریتی که در جهت جلوگیری از ورود عامل بیماریزا به جمعیت هدف (میگو) و جلوگیری از گسترش بیماری در استخرهای مزارع آلوده به استخرها و مزارع همجوار اتخاذ گردد .

۹ - بهر (Lot) : گروهی از آبزیان در یک مرکز آبی پروری که از یک گونه یکسان بوده واز یک جمعیت مولد پدید آمده و دارای منبع آبی مشترک باشند (در مراکز تکثیر هرتانک یک بهر و در مزارع پرورش هر مزرعه یک بهر در نظر گرفته شده است).

بیماری های تحت پوشش مراقبت در کشور:

در این طرح بیماری های میگو که با توجه به اعلام سازمان بین المللی OIE اخطار کردنی (Notifiable)

و اولویت دار می باشند با اجرای یک برنامه مدون تحت بررسی و مراقبت قرار می گیرند تا در صورت بروز

نشانه هایی از بیماری های مذکور اقدامات لازم جهت کنترل آنها صورت پذیرد.

۱- در استانها و مناطقی که میگوی مولد پرورشی تولید می نمایند لازم است کلیه بیماری های اخطار کردنی

میگو برا ساس دستور العمل تولید مولد پرورشی در مورد مولدین تست شوند.بیماری های مذکور شامل:-

TSD-WSD-YHD-IHHNV-IMNV-MBV-BP-HPV-NHP می باشند.

۲- در استانها و مناطق میگو پروری که میگوی وانامی پرورش میدهند صرفاً سیستم مراقبت در مورد بیماری

های WSD و TSD به اجرا در می آید و استانهایی که میگوی ایندیکوس پرورش میدهند سیستم

مراقبت در مورد بیماری های WSD و TSD و YHD به اجرا در می آید.

۳- بقیه بیماری های IMNV و IHHNV و Spherical Baculovirus (MBV) و

و Tetrahedral Baculovirus (BP) و HPV و NHP نیز بصورت موردی و در صورت بروز

علائم بیماری مورد بررسی و آزمون قرار میگیرند .

۴- در مناطقی که میگوی Semisulcatus یا هر گونه دیگری به عنوان ذخیره سازی منابع آبی پرورش

داده میشوند لازم است از نظر کلیه بیماری های اخطار کردنی مورد تست و آزمون قرار گیرند.

اهداف طرح:

۱ - شناسایی مولدین حامل بیماری و حذف آنها از چرخه تولید و تکثیر میگو و جایگزین با گونه های سالم و غیر حامل عامل پاتوژن با همکاری ارگانهای ذیربط .

۲ - تعیین وضعیت بیماری های مورد نظر طرح در مراکز تکثیر میگو

۳ - تعیین وضعیت بیماریهای مورد نظر طرح در مزارع پرورش میگو .

۴ - انجام اقدامات فوری برای جلوگیری از انتشار و گسترش یک بیماری واگیر اعم از آندمیک یا اگزوتیک

۵ - پیش بینی وقوع بیماری در مناطق مختلف .

۶ - تخمین وضعیت آینده بیماری .

۷ - تعیین درصد شیوع بیماری .

۸ - ارزیابی برنامه های جاری پیشگیری ، مبارزه و ریشه کنی و ارائه راهکارهای مناسب .

دامنه طرح (حجم و وسعت عملیات):

۱ - تحت پوشش قرار گرفتن کلیه پست لاروهای تولیدی مراکز تکثیر (۱۰۰٪ تانکها) ، با در نظر گرفتن شیوع فرضی

۲٪ برای رسیدن به درجه اطمینان (Confidence) ۹۵٪ .

۲ - تحت پوشش قرار گرفتن استخر های پرورش میگو در مزارع پرورشی بر اساس برنامه طرح.

۳ - تحت پوشش قرار گرفتن مولدین پرورشی ، وحشی و وارداتی و نمونه برداری از آنها.

۴ - عملیات فوق در استانهای میگو پرور ساحلی کشور (سیستان و بلوچستان ، هرمزگان ، بوشهر ، خوزستان و

گلستان) به اجرا در خواهد آمد .

روش آزمایشگاهی در تشخیص بیماری :

۱- روش آزمایشگاهی مورد استفاده در این طرح جهت ردیابی ویروسها، روش Nested - PCR بوده که با استفاده از کیت‌های مورد تأیید سازمان دامپزشکی در آزمایشگاه‌های استان‌های تحت پوشش طرح انجام میشود .

۲- آزمایشات تأییدی به شرط وجود PCR مثبت (مرکز تشخیص بیماری‌های میگو در بوشهر به عنوان آزمایشگاه رفرانس در این طرح می باشد)

۳- نمونه‌های اخذ شده برای آزمایشات مولکولی را می توان با هم مخلوط کرد و بعنوان یک نمونه در نظر گرفت ولی بیشتر از پنج نمونه نبایستی با هم ترکیب شود

۴- بیماری‌هایی که تاکنون در کشور گزارش نشده است بایستی به تأیید آزمایشگاه معتبر جهانی برسد سپس گزارش شود

روش اجرای طرح :

- از آنجا که مراکز تکثیر از راه‌های انتشار بیماری‌های میگو به شمار می آیند . لذا عملیات اجرایی طرح بر روی مراقبت از مولدین و پست لاروها متمرکز بوده و نهایتاً بصورت محدودتری در مزارع پرورشی اجرا خواهد شد.
- بازدید منظم هر هفته یکبار از مجتمع پرورش میگو به منظور اجرای سیستم مراقبت و در صورت لزوم نمونه برداری از استخرها (در هر بازدید حداقل ۵ مزرعه بایستی مورد بررسی و بازدید قرار گیرد).
- نمونه‌های برداشتی از مولدین پرورشی و وحشی براساس جدول Wedemeyer & Osslander و فرض شیوع ۲٪ و ۹۵٪ Confidence صورت گرفته.

در مورد مولدین وارداتی اساس داشتن گواهی بهداشتی معتبر بین المللی می باشد و پس از کنترل مستندات نسبت به معاینه ظاهر میگوها اقدام و از میگوهای بی حال و در حال مرگ تا ۳٪ جمعیت نمونه برداری خواهد شد . بدیهی است نمونه ها باید بلافاصله پس از بازشدن بسته های حاوی مولد میگو اخذ و به منظور آزمایشات مورد نظر به آزمایشگاه ارسال گردد.

- کلیه نمونه برداریها براساس جدول Wedemeyer Osslander ، OIE صورت می پذیرد(جدول صفحه ۹)

الف - مراکز تکثیر میگو:

در صورتی که تعداد تقریبی مراکز تکثیر فعال در استانهای میگو پرور متوسط ۲۰ واحد در نظر بگیریم و با فرض انجام ۳ دوره تخم ریزی و تعداد تقریبی ۱۰ تانک در هر مراکز تکثیر باشد. با فرض انجام ۳ ماه فعالیت در طول دوره تکثیر میزان کل نمونه برداری از مراکز تکثیر در استانهای میگو پرور حدود ۴۰۰۰ نمونه می باشد. که بر حسب تعداد مراکز تکثیر فعال در هر استان میزان نمونه برداری در هر استان متفاوت می باشد.

توجه ۱ - نمونه برداری می بایستی از هر تانک صورت پذیرد.

توجه ۲ - در طول دوره تکثیر همه تانک ها فعال نیستند و ۳ دوره تخم ریزی هم یک عدد فرضی است که احتمال دارد کمتر باشد. لذا کل نمونه برداری تقریبی بوده و در شرایط عادی نمونه برداری کمتر خواهد بود.

توجه ۳- بطور متوسط هر هفته یک بار از هر مرکز بایستی باز دید صورت پذیرد.

ب: مزارع پرورش میگو:

در صورتی که تعداد تقریبی مزارع پرورش میگوی فعال را در کشور حدود ۲۲۲ مزرعه و تعداد تقریبی ۱۴ استخر برای هر مزرعه در نظر بگیریم، با توجه به ۱۵ مجتمع پرورش میگو در کشور ۸ مجتمع بوشهر، ۴ مجتمع هرمزگان، ۱ مجتمع خوزستان، ۱ مجتمع سیستان و بلوچستان، ۱ مجتمع گلستان (تعداد کل استخرها حدود ۳۱۰۰ استخر) در نظر گرفته خواهند شد. و نحوه انجام مراقبت به شرح ذیل صورت میگیرد:

۲۰ روز پس از ذخیره سازی بازدید از مزارع آغاز میگردد و با فرض بازدید هر هفته یکبار از مجتمع ها و مزارع پرورشی در صورتی که در هر بازدید حداقل ۵ مزرعه مورد بازدید قرار گیرد. (بازدید $5 \times 15 = 75$) عملاً از ۷۵ مزرعه در هر هفته بازدید صورت می گیرد و چون ۱۲ مرتبه در طول ۳ ماه بازدید انجام می شود، تعداد ۹۰۰ مرتبه مشاهده و بازدید در طول ۳ ماه از مزارع انجام خواهد شد که عنداللزوم در طی بازدید ممکن است نمونه برداری صورت پذیرد (بدنبال بروز بیماری و یا هر علامت غیر طبیعی در میگو و یا هر علت دیگر از جمله وجود تلفات، کاهش رشد، کاهش مصرف غذا، وجود علائم کلینیکی، و).

مشاهده و بازدید در صورت لزوم نمونه برداری $12 \times 75 = 900 \rightarrow 3 = 12$ ماه $4 \times 3 = 12$ (مرتبه در ماه بازدید)

ج- مولدین :

نمونه برداری از مولدین پرورشی ، وحشی و وارداتی مورد استفاده در مراکز تکثیر کشور صورت می پذیرد و نمونه برداری از هر کدام از این مولدین متفاوت می باشد.

الف - در صورتی که از مولدین وارداتی استفاده شود ضمن الزام برداشتن گواهی بهداشتی بین المللی (Health Certificate) و کنترل مستندات مربوطه توسط دامپزشکی مقصد ، نسبت به معاینه ظاهری میگوها اقدام و از میگوهای بی حال و در حال مرگ تا ۳٪ جمعیت نمونه بردای خواهد شد . بدیهی است نمونه ها بایستی بلافاصله پس از باز شدن بسته های حاوی مولد ، میگو ازد اخل بسته ها اخذ و به منظور انجام آزمایشات مورد نظر به آزمایشگاه منتقل شوند . پیش بینی می شود تعداد نمونه برداری در این مولدین با توجه به حجم واردات (میانگین ۵۰۰۰ مولد) حد ۱۵۰ نمونه باشد .

ب- در صورتی که از مولدین پرورشی استفاده شود چون سابقه مشخصی داشته و بطور متناوب تحت بررسی و مراقبت می باشند. نمونه برداری در طی دوره براساس دستورالعمل تولید مولدین پرورشی به شماره ۲۵۰۷۹/ ۴۴ - ۸۸/۰۵/۱۳

صورت پذیرفته و پیش بینی می شود حجم نمونه برداری در این مولدین در صورتی که در هر استان یک استخر گلخانه ای پرورش مولد وجود داشته باشد و در هر استخر حدود ۴ هزار مولد ، براساس جدول OIE از هر ۴ هزار مولد به بالا ۱۵۰ نمونه اخذ می شود و لذا حدود ۶۰۰ نمونه اخذ خواهد شد .

ج - در صورتی که از مولدین وحشی استفاده شود چون عمدتاً بطور مستقیم به منظور تخم ریزی (Spawning) به مرکز تکثیر منتقل می شوند لازم است به لحاظ وضعیت سلامتی نامعلومی که دارند در صورتی که از یک صید گاه مشخص صید شده باشند . براساس جدول OIE نمونه برداری صورت پذیرد .

زمان و نحوه نمونه برداری از مولدین:

لازم است کلیه مراکز تکثیر میگو ، تاریخ و تعداد مولدین وارد شده به مرکز را کتباً به شبکه دامپزشکی منطقه جهت بررسی های لازم اعلام نمایند . هرگونه عواقب و عدم اطلاع رسانی به موقع در این خصوص متوجه صاحب مرکز تکثیر خواهد شد .

با توجه به اینکه استرس تخم ریزی در عرض چند ساعت مقادیر ویروس را به سطح بالایی می‌رساند، که به آسانی می‌توان با تکنیک PCR تشخیص داده شود، بهتر است از مولدین پس از تخم ریزی نمونه برداری شده و در صورت مثبت بودن از نظر بیماری مورد نظر ضمن رعایت اصول بهداشتی - قرنطینه ای معدوم گردند.

زمان و نحوه نمونه برداری از (PL):

از پست لاروها قبل از ذخیره سازی دراستخرهای پرورش نمونه برداری صورت می‌گیرد و با آزمایشات Nested - PCR غربالگری می‌شوند. بمنظور نمونه برداری از پست لاروهای موجود در تانکهای هجری یا نرسری که دارای ۱۰۰/۰۰۰ یا بیشتر بچه میگو باشند، تقریباً ۱۰۰۰ پست لارو از هر پنج نقطه مختلف مجموعاً ۵۰۰۰ بچه میگو بایستی برداشت گردد و نمونه ها داخل یک تشت کوچک ریخته شود سپس به آرامی آب داخل تشت را به چرخش درآورده و از بچه میگو های زنده موجود در وسط تشت که توانایی خروج از مسیر چرخش آب و چسبیدن به دیواره تشت را ندارند اقدام به نمونه برداری گردد. ملاک تعیین حجم نمونه برداشتی در این مرحله، درجه شیوع فرضی ۲٪ و ضریب اطمینان ۹۵٪ براساس جدول Wedemeyer & Osslander است. نمونه برداری از pL5 به بعد آغاز می‌شود. جهت pL های ۱۱ به بالاتر بایستی چشم های میگوهای مورد آزمایش را از پایه قطع و خارج کرد زیرا بررسی ها حاکی است چشم های میگو بعد از pL11 دارای مواد جلوگیری کننده PCR می‌باشد. جهت pL10 به پایین تر می‌توان از نمونه کامل استفاده کرد.

لازم به ذکر است که عدم جداسازی عامل بیماری زا از نمونه های اخذ شده از یک جمعیت آماری دلیل قطعی فقدان آن عامل بیماری زا در جمعیت یادشده نمی‌تواند باشد. به هر حال در صورتی که مراکز تکثیر و مزارع پرورش به طور مرتب مورد بازدید و مطالعه قرار گرفته شوند احتمال اینکه عامل بیماری زا از نظر دور بماند به حداقل خود می‌رسد.

هیچ مرکز تکثیر بدون اخذ نتیجه آزمایش PCR برای پست لاروهای هر تانک اجازه فروش ندارد و دستورالعمل فوق الذکر بایستی برای تک تک تانک های در آستانه فروش محصول به دقت اجرا گردد.

Wedemeyer & Ossiander Table

تعداد نمونه برداری با احتمال شیوع حاملین			تعداد جمعیت
%۱۰	%۵	%۲	
۲۰	۳۵	۵۰	۵۰
۲۳	۴۵	۷۵	۱۰۰
۲۵	۵۰	۱۱۰	۲۵۰
۲۶	۵۵	۱۳۰	۵۰۰
۲۷	۵۵	۱۴۰	۱۰۰۰
۲۷	۵۵	۱۴۰	۱۵۰۰
۲۷	۶۰	۱۴۵	۲۰۰۰
۲۷	۶۰	۱۴۵	۴۰۰۰
۲۷	۶۰	۱۴۵	۱۰۰۰۰
۳۰	۶۰	۱۵۰	۱۰۰۰۰ یا بیشتر

* در مورد تعداد جمعیت بینایی از تعداد نمونه های داده شده برای تعداد جمعیت بعدی (بزرگتر) استفاده شود .

لازم است در صورت بروز هر نوع تلفات غیر عادی ظرف مدت ۲۴ ساعت موارد به شبکه دامپزشکی شهرستان گزارش گردد تا اقدامات بعدی در این خصوص صورت پذیرد.

زمان و نحوه نمونه برداری از مزارع پرورشی :

جهت مراقبت از بیماری ها در مزارع پرورشی در صورتی که مشکل بیماری وجود نداشته باشد ، بازدید منظم هر هفته یک بار در طول دوره پرورش از کل مجتمع به منظور مشاهده وجود یا عدم وجود علائم بیماری و یا هر نوع تلفات مشکوک به بیماری الزامی است.

در مزارع پرورشی جهت اجرای سیستم مراقبت موارد ذیل انجام میشود:

۱ - مشاهده (توسط کارشناس مسئول آبیان و یا پرورش دهنده)

۲ - نمونه برداری و آزمایش PCR در صورت مشاهده تلفات و موارد مشکوک .

مبنای مشاهده ، وجود هر نوع علائم غیر طبیعی در استخرها اعم از مرگ و میر ، تغییرات ناگهانی در مصرف غذا ، تغییرات رنگ و جمع شدن میگوها در حاشیه استخر و ...

الف - باز دید:

در راستای اجرای طرح بر اساس برنامه زمانبندی شده از مزارع بازدید بعمل آمده و فرمهای مربوطه تکمیل میگردد بدیهیست در صورت مشاهده هر نوع مشکل بر اساس بند ب اقدام خواهد شد.

لازم به ذکر است طرح مراقبت و مانیتورینگ جهت نشان دادن حضور یا عدم حضور عامل پاتوژن و تغییرات در Prevalence بیمار می باشد و جهت پیشگیری از بیماری نیاز به اجرای برنامه های Biosecurity (امنیت زیستی) از جمله افزایش اقدامات مدیریتی مناسب جهت کاهش عوامل استرس زا در استخر ، اقدامات بهداشتی - قرنطینه ای و ... می باشد..

ب - نمونه برداری:

از روز ۲۰ پس از ذخیره سازی (Stocking) می توان بطور تصادفی به نمونه برداری از مزارع در هر مجتمع پرورش میگو اقدام و به از مایشگاه ارسال نمود . هر مزرعه بعنوان یک Lot در نظر گرفته می شود (حدوداً از هر استخر ۱۰ میگو نمونه برداری می شود) نمونه های برداشتی نبایستی از سینی های غذادهی استخر جمع آوری شود بلکه بایستی توسط تور پرتابی (Cast net) از استخر برداشت شود .

نمونه برداری در صورت بروز بیماری (Disease Diagnosis):

در بیماری هایی که با علائم بالینی همراه باشد ، میگوهای را که دارای ضایعات و جراحات شاخص هستند بایستی به دقت از بین میگوهای زنده یا درحال مرگ به عنوان نمونه برداشت نمود . از میگوهای بایستی نمونه

برداری شود که نمایانگر ضایعات بیماری یا علائم آن در سطح جمعیت مورد نظر باشد . حداقل تعداد لازم نمونه برای مراحل لاروی ۱۰۰ ، برای مراحل پست لاروی ۵۰ و برای مرحله جوانی و یا بلوغ ۱۰ قطعه می باشد . در صورتی که در مولدین تلفاتی مشاهده شود . لازم است از تعداد حداقل ۱۰ قطعه مولد زنده در حال مرگ نمونه برداری و تک تک آزمایش شود .

نحوه برخورد با بیماری در مزارع پرورش و مراکز تکثیر میگو :

با توجه به اینکه بسیاری از بیماریهای میگو ویروسی و اختارکردنی می باشند (Notifiable) و دلیل اختار کردنی شدن بیماری به لحاظ :

۱- واگیری بالا

۲- سرعت انتشار بالای بیماری

۳- میزان تلفات و خسارت بالای آنها .

۴- عدم امکان درمان آنها در اغلب موارد .

لذا با عنایت به شرایط بروز بیماری در کشور ، سیاست سازمان دامپزشکی فرق می نماید .نحوه تصمیم گیری و برخورد با این بیماریها در مزارع پرورش و مراکز تکثیر میگو براساس دستورالعمل های ابلاغی بایستی صورت پذیرد.

نگهداری نمونه ها برای آزمایشات مبتنی بر آنتی بادی یا

آزمایشات زنجیره ای پلی مرز PCR

برای انجام تست های تشخیصی رایج از طریق PCR , RT-PCR و برای آزمایشات Dot-blot ، با قطعات DNA ، نمونه ها بایستی به نحوی آماده سازی و نگهداری شوند که ژنوم به خوبی محافظت شود . به همین صورت نمونه هایی که برای آزمایشات مبتنی بر آنتی بادی ارسال می گردد می بایست به نحوی آماده سازی و نگهداری شود که محل های آنتی ژنیک برای اتصال آنتی بادی ها سالم باقی بماند .

نوع نمونه :

نمونه های انتخاب شده برای آزمایشات تشخیصی مبتنی بر اسید نوکلئیک یا متنی بر آنتی بادی بایستی با نهایت دقت دستکاری و بسته بندی شود (در کیسه ها یا بطری های پلاستیکی نو مخصوص حمل نمونه) تا احتمال خطر انتقال آلودگی متقاطع در بین نمونه ها که از مولدین متفاوت (وحشی یا پرورشی) ، از تانک ها استخرها یا مزارع مختلف اخذ شده است به حداقل برسد حتماً ظروف یا پلاستیک های حمل نمونه بایستی نو باشد . یک برچسب مقاوم به آب که حاوی اطلاعات کافی و نوشته شده بوسیله مداد شماره ۲ می باشد می باید بر روی بسته یا جعبه که حاوی یک سری نمونه مشابه می باشد چسبانده شود .

تعدادی از روش های مناسب برای نگهداری و انتقال نمونه ها جهت آزمایش مولکولی یا آزمایشات وابسته به آنتی بادی به شرح ذیل است :

۱ – نمونه موجود زنده :

این نمونه ها ممکن است در مزرعه مورد ارزیابی قرار گیرند و یا به آزمایشگاه تشخیصی انتقال داده شوند :
به منظور جلوگیری از مرگ و میر احتمالی در زمان حمل و نقل ، نمونه ها بایستی بلافاصله پس از جمع آوری در کوتاهترین زمان ممکن به آزمایشگاه ارسال شوند این نکته بخصوص برای میگوهای بی حال و در حال مرگ اهمیت ویژه ای دارد تا آن جایی که امکان پذیر است نمونه ها با حداقل دستکاری و به صورت دست نخورده به آزمایشگاه

ارسال شود. قبل از ارسال نمونه های زنده می بایست با آزمایشگاه تماس گرفته و زمان ارسال نمونه و زمان تقریبی دریافت نمونه ها را اعلام نمایند در این فاصله زمانی آزمایشگاه باید مواد و تکنیک های لازم را جهت انجام آزمایشات بر روی نمونه های زنده آماده نماید .

میگوها می بایست در پلاستیک های دولایه حاوی آب دریا به نحوی بسته بندی شوند که فضای لازم جهت اکسیژن مورد نیاز وجود داشته باشد . درب پلاستیک ها بوسیله نوارهای پلاستیکی یا حلقه های پلاستیکی محکم شود . پلاستیک های حاوی نمونه های میگو داخل یک یونولیت قرار می گیرند . تعداد کمی یخ را می توان برای خنک کردن آب در کنار پلاستیک ها قرار داد . این موضوع بخصوص وقتی زمان حمل و نقل طولانی است اهمیت دارد . سپس درب یونولیت ها به نحو دقیق بسته شده و یونولیت ها را می توان درون یک کارتن مقوایی قرار داد.

بر روی کارتن ها برچسب ذیل نصب گردد :

« حاوی میگوی زنده – در دمای بین ۱۵ - ۴ درجه نگهداری شود . »

در صورت حمل با هواپیما عبارت :

« در فرودگاه نگهداری شده و با شماره تماس ۰۲۱-۸۸۹۶۳۳۰۳ جهت بردن بسته تماس گرفته شود . »

- به نحو مناسب و واضحی اسم و تلفن فرد مسئول دریافت نمونه ها ذکر شود .
- تا جایی که امکان پذیر است حمل نمونه های زنده در روزهای اول هفته صورت گیرد چون ممکن است به تعطیلات آخر هفته برخورد نماید .
- بلافاصله پس از ارسال نمونه ها فرد مسئول دریافت نمونه ها در مقصد را از زمان ارسال نمونه مطلع نماید . ضمناً نام و مشخصات وسیله حمل کننده (شما پرواز و شماره بارنامه شماره خودروی حمل کننده و یا شماره قطار) را حتماً اطلاع رسانی کنید .
- از آن جایی که بعضی از خطوط پروازی دارای مقررات سخت گیرانه ای جهت حمل آب دریا یا نمونه های مرضی می باشند لازم است قبل از ارسال نمونه قوانین و دستورالعمل های خطوط پروازی را مطالعه و هماهنگی های لازم را بعمل آورید . (در ایران حتماً بایستی با حراست فرودگاه هماهنگی شود .)

۲- نمونه همولنف :

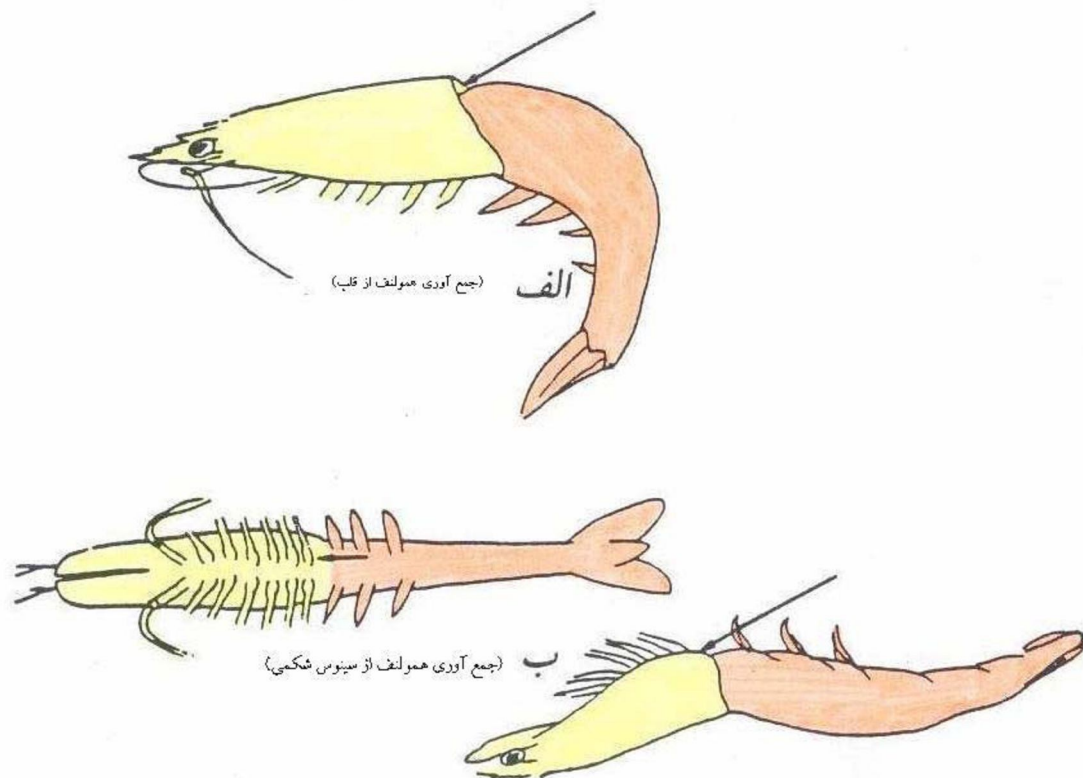
نمونه همولنف برای انجام آزمایشات مولکولی و روش های تشخیص مبتنی بر آنتی بادی مناسب می باشد .
نمونه ها بوسیله نیدل و سرنگ از قلب ، از هموسل (سینوس شکمی در پنائیده) و یا از طریق قطع کردن زوائد
انتہایی بدن بدست می آید .

از ۳ طریق برای گرفتن همولنف به روش (Non-destructive) بدون کشتن میگو می توان استفاده کرد .

۱- روش اول : شاخک بلند (Antennae) میگو را به کمک الکل ضدعفونی کرده و قسمت کوچکی از آن را
جدا می کنیم . با پدیدار شدن قطره ای از همولنف بر نوک شاخک بریده شده می توان از آن نمونه برداری کرد .

۲- روش دوم : به کمک یک سرنگ و سوزن مناسب (ترجیحاً سرنگ انسولین) استریل پس از ضدعفونی سطح
مورد نظر با الکل از سینوس شکمی و بالای پاهای حرکتی (شکل زیر) نمونه همولنف می توان گرفت . باید دقت
شود که میزان همولنف برداشتی نبایستی به اندازه ای باشد که سلامت میگو به مخاطره بیفتد .

۳- روش سوم : به کمک یک سرنگ و سوزن مناسب (ترجیحاً سرنگ انسولین) استریل پس از ضدعفونی سطح
مورد نظر با الکل از قلب (شکل زیر) نمونه همولنف می توان گرفت . باید دقت شود که میزان همولنف برداشتی
نبایستی به اندازه ای باشد که سلامت میگو را به مخاطره بیفتد . نسبت به ۲ روش قبلی ، این روش توصیه نمی
شود . اقدامات فوق می تواند در آزمایشگاه های مجاز یا با استفاده از امکانات اداره کل دامپزشکی جهت مراکز



۳- نمونه های سرد شده و کنار یخ :

این روش جهت ارسال نمونه ها به آزمایشگاه و انجام آزمایشات در کمتر از ۲۴ ساعت مناسب است . نمونه ها پس از قرار گرفتن در کیسه های پلاستیکی بسته بندی شده و در داخل یونولیت قرار گرفته و دور آنها مقدار مناسبی یخ مرطوب قرارداده و به آزمایشگاه حمل می شوند .

۴- نمونه های فریز شده :

نمونه ها به صورت زنده برداشت شده و بلافاصله با استفاده از یخ خشک یا فریزرهای ۲۰- منجمد شده و دمای آنها به ۲۰ C- و یا پایین تر رسانده می شوند سپس در داخل ظرف حمل نمونه ها قرار گرفته و برچسب زده می شود و سپس این ظروف حاوی نمونه در کنار مقدار مناسبی یخ خشک در درون یونولیت قرار داده شده و پس از بسته بندی به آزمایشگاه ارسال می شود .

۵ - نمونه های نگهداری شده در الکل (جهت آزمایش PCR) :

در مناطقی که نگهداری و انتقال نمونه های فریز شده دارای مشکلات است الکل ۹۵-۹۰٪ ممکن است جهت نگهداری و انتقال بعضی از نمونه های خاص مورد استفاده قرار گیرد . میگوهای کامل ، (در هر مرحله ای از زندگی مشروط به اینکه هر قطعه بیشتر از ۳-۲ gI نباشد). اندام ها، تیغه های آبششی، معده ، هیاتو پانکراس، زوائد بدن (نظیر پاهای شنا) ، کوتیکول قسمت تنه برای نمونه برداری از عضله از میگوهای بزرگ را می توان در الکل ۹۵-۹۰٪ نگهداری و سپس برای حمل و آزمایش PCR بسته بندی و به آزمایشگاه ارسال کرد .

۶- روش ثابت کردن نمونه ها (فیکس کردن با ماده فیکساتیو " دیویدسون ") به منظور

آزمایشات هیستوپاتولوژی:

الف: فیکس نمودن نمونه های میگو در مرحله لاروی و پست لاروی:

- ثابت کردن نمونه ها بایستی با توجه به سن میگو صورت پذیرد .
- نمونه های میگو در سنین لاروی و پست لاروی، بطور مستقیم در ماده فیکس کننده وارد می شود .
- برای فیکس کردن نمونه ها نسبت حجمی نمونه ها با ماده فیکس کننده می بایستی یک به ده (به مدت ۲۴-۱۲ ساعت) باشد. پس از این مدت نمونه ها به منظور نگهداری و یا حمل به ظروف شیشه ای و یا پلاستیکی محتوی الکل ۵۰٪ منتقل میشوند.

ب: فیکس کردن نمونه های میگو بعد از مرحله پست لاروی (پست لاروهای بزرگ- نوجوان-

میگوی بالغ) .

می بایستی معادل ۵ تا ۱۰ درصد حجم بدن میگو ، ماده ثابت کننده (محلول دیویدسون) ، با سرنگ دارای سوزن مناسب (گیج ۲۷) در داخل محوطه داخلی میگوی زنده تزریق شود .

محل تزریق ماده فیکس کننده می باید در قسمت بالائی - کناری خط میانی ناحیه سرسینه میگو (بین بند های ۴-۲ شکمی) به طریقی صورت پذیرد که محلول وارد هیاتوپانکراس - معده و ناحیه روده میگو گردد . در ناحیه تنه تزریقات می باید در قسمت قدامی کناری و خلفی کناری میگو با تقسیم کردن مناسب ماده ثابت کننده صورت پذیرد . پس از عمل تزریق می باید کلیه علائم حیاتی متوقف و در بافت های محل تزریق تغییر رنگ بوجود آید . بلافاصله پس از تزریق محلول ثابت کننده (دیویدسون) ، بایستی بوسیله قیچی شکافی در ناحیه بالایی کناری

خط میانی ناحیه سر سینه از قسمت عقبی تا ناحیه روستروم ایجاد کرد . در ناحیه تنه این شکافها را باید در دو طرف این ناحیه ایجاد کرد . باید توجه داشت که شکاف فقط در قسمت پوسته کوتیکول وارد شود و به بافت‌های زیرین آسیبی وارد نگردد . در میگوهای بزرگتر از ۱۲ گرم می باید پس از ایجاد شکاف در ناحیه کوتیکول ، بوسیله تیغ تیز یا اسکالپل ناحیه سر سینه از تنه جدا گردیده و هر کدام از قطعات مجدداً نصف شوند . بعد از عمل تزریق ، ایجاد شکاف و قطعه قطعه کردن ، می باید نمونه ها حداقل ۲۴ ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت (با توجه به اندازه میگو) در ماده ثابت کننده (محلول دیویدسون) نگهداری شوند . پس از این مدت میزان ماده فیکس کننده (محلول دیویدسون) را می توان تا میزان ۲ برابر حجم نمونه ها (نسبت یک به دو) کاهش داد .

طرز تهیه محلول فیکساتیو (دیویدسون):

230 ml	95% Ethyl alcohol-
220 ml	37% Formaldehyde (technical grade)-
115 ml	Glacial acetic acid-
335 ml	Tap water-

توجه:

به منظور تهیه محلون دیویدسون به هیچ وجه از فرمالین ۱۰٪ و یا اسیدهای دیگر استفاده نشود.

۷- نگهداری RNA و DNA در بافت ها با استفاده از RNA Later :

بافت ها به قطعاتی کمتر از ۰/۵cm قطر بریده شده و در ۵ برابر حجم محلول RNA later غوطه ور می شوند . (مثلاً یک نمونه ۰/۵gr نیاز به ۲/۵ml RNA later دارد) بافت های کوچک نظیر کلیه ها ، جگر و طحال را می توان به صورت کامل در این محلول نگهداری کرد. نمونه هارا در این محلول می توان برای یک ماه در ۴ C ، یک هفته در ۲۵ C و طولانی مدت در ۲۰ C - نگهداری کرد . محلول RNA later بایستی در ۲۰ C - نگهداری شود .

پیوست ۲

پیش نیازهای اجرای طرح :

- ۱- گزارش رسانی (گزارش گیری و گزارش دهی)
- ۲- نیروی انسانی
- ۳- ابزار و امکانات
- ۴- آموزش
- ۵- قوانین و مقررات
- ۶- دستورالعمل ها و روشها .

۱- گزارش رسانی (گزارش گیری و گزارش دهی) :

وجود یک نظام کارا در گزارش رسانی بیماریها به عنوان جزء اساسی در سیستم مراقبت مورد توجه می باشد . اجرا این نظام در مورد بیماریهای میگو شامل زیر می باشد :

- گزارشات روزانه ، هفتگی یا ماهیانه بر حسب نوع بیماری .
- روش گزارش : که توسط نامه ، تلفن ، فاکس یا پست الکترونیکی اس .
- منابع اطلاعاتی : برای دریافت گزارش بیماریها می توان برحسب نوع سیستم مراقبت از تمامی دستگاههایی که به نحوی با آبیان در ارتباط می باشند کمک گرفت . از جمله آنها : ادارات کل دامپزشکی ، کلینیک های دامپزشکی (پرورش دهندگان ، کارشناسان شیلاتی ، تکثیر کنندگان ، کارشناسان بیمه ، دامپزشکان بخش خصوصی و ...)

۲- نیروی انسانی:

پرسنل سیستم مراقبت به دو گروه تقسیم می شوند :

الف) پرسنل مرکزی : شامل افراد شاغل در دفتر بهداشت و مبارزه با بیماریهای آبیان مستقر در سازمان دامپزشکی کشور .

ب) پرسنل استانی : شامل افراد شاغل در ادارات بهداشت و مبارزه با بیماریهای آبریان در ادات کل دامپزشکی استانها و شهرستانها).

۳- ابزار و امکانات :

- ابزار ارتباطی شامل فاکس ، تلفن و ...
- کامپیوتر
- فرمهای گزارش گیری و گزارش دهی و دفاتر ثبت بیماریها .
- خودرو ،لباس کار و وسایل نمونه برداری و ...
- کیت و لوازم آزمایشگاهی .

۴- آموزش :

به منظور ارتقاء سطح علمی و هماهنگی بین طرح مراقبت از بیماریهای میگو در استانها ، برنامه آموزشی به شرح ذیل پیش بینی می گردد . که هدف اصلی آن ارتباط بین افرادی است که در طرح مراقبت انجام وظیفه می نمایند و از نظر تشخیص بیماریها ، ارسال نمونه برخی تکمیل و ارسال فرمها و پی گیری بیماریها برای تعیین شاخص های اپیدمیولوژیک نقش اسامی در پیشرفت برنامه های مراقبت از بیماریهای میگو خواهد داشت .

گروههای موضوع آموزشی:

- ۱- دامپزشکان شاغل در دفتر بهداشت و مبارزه با بیماریهای آبریان سازمان دامپزشکی کشور ، استانها و شهرستانها .
- ۲- بازرسی نظارت بر بهداشت عمومی واحدهای تولیدی خوراک میگو و بسته بندی میگو .
- ۳- دامپزشکان بخش خصوصی که در رابطه با بیماریهای میگو کار می کنند . (کلینیک های خصوصی) .
- ۴- دامپزشکان مسئول فنی واحدهای تولید خوراک میگو و بسته بندی میگو .
- ۵- کاردان ها و تکنسین های دامپزشکی شاغل در واحد آبریان .
- ۶- پرورش دهندگان و دیگر دست اندرکاران پرورش ، تکثیر میگو و تولیدکنندگان خوراک میگو .

عناوین دوره های آموزشی :

نظر به اینکه بنای مراقبت ، دانش اپیدمیولوژی است. آموزش آن برای تمام افراد دست اندرکار و کارشناسان در اولویت خواهد بود .

۱- اپیدمیولوژی بیماریهای آبزیان .

۲- آشنائی با روشهای تشخیص بیماری یا روش های مولکولی .

۳- آشنائی با روش های تشخیص بیماریهای باکتریائی ، قارچی ، ویروسی (کشت باکتریائی ، کشف سلولی)

۴- روش های نمونه برداری و ارسال نمونه برای کارشناسان (این مرحله می تواند در سرفصل کلاسهای شماره ۲ و ۳ و ۴ ادغام شود).

۵- اهمیت نمونه برداری و درمان نمونه برای تکنسین ها و کاردان های دست اندرکار آبزیان .

۶- آشنائی با بیماریهای ویروسی میگو .

۷- آشنائی با بیماریهای قارچی و انگلی (تک یاخته ها ، انگل های خارجی ، انگل های داخلی و...)

۸- آشنائی با بیماریهای باکتریائی میگو .

۹- آشنائی با بیماریهای تغذیه ای و مسمومیت ها .

۱۰- بهداشت مزارع پرورش .

۱۱- بهداشت مراکز تکثیر .

۱۲- مقررات امنیت زیستی در مراکز تکثیر ومزارع پرورش .

تبصره : به منظور هر چه بهتر تحقق پیدا کردن عناوین دوره های آموزشی فوق، لازم است

دوره های آموزشی خارجی یا داخلی با توجه به سطوح فراگیران توسط اساتید مجرب به اجرا در آید .