تشـخیص آزمایشـگاهی عفونت های کرم ابریشم نوغان داری های استان گیلان

نبیان، ص.[۱*]، ایرانمنش، ف.[۲] ، خسروی، ع.[۳] ،زهرایی صالحی، ت.[۳]، مرادی، م.[۴]

دریافت: ۱۳۸۸/۵/۶ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۲۴

خلاصه:

تا کنون گزارشات جامعی از بیماری های کرم ابریشم در استان های مختلف کشور ارائه نشده است. نظر به اینکه استان گیلان بزرگترین مرکزصنعت نوغان داری در ایران است، بررسی و تشخیص آزمایشگاهی بیماری های کرم ابریشم در این استان جهت اعمال اقدامات پیشگیری کننده ضروری می باشد.

در این بررسی با روش نمونه گیری تصادفی و از نود و دو نوغان داری استان گیلان نوزادهای بیمار و مرده جمع آوری شدند . نمونه ها با روش های متداول تشخیص انگلی، ویروسی، کشت باکتریایی و قارچی و آزمایش های تکمیلی بیوشیمیایی، آزمایش یک قطره اسید و رنگ آمیزی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. و عوامل مختلف بیماری زا جدا سازی گردید .

در هیچ یک از نوغان داری ها بیماری پیرین مشـاهده نشـد،اگر چه از هشت در صد از نوغان داری ها آلودگی به اسپور میکروسپوریدیایی غیر پیرین جدا شد. آلودگی های ویروسی از نوع گراسری یا پلی هدروزیس هسته ای در بیست و نه نوغان داری (۵ /۱ ۳٪) تشخیص داده شد. آلودگی با عوامل باکتریایی بیش از سایر اجرام بود و هشـتاد وهشت نوغان داری (۵/۶ ۹٪)مبتلا به استافیلوکوک طلایی و سفید که ازعوامل سپتی سمی کرم ابریشم محسوب می شوند ،بودند. همچنین در بیست وشش نوغان داری (۲/ ۲۸ ٪) آلوده به عفونت های قارچی بودند،که از آن میان، (۱۱/۵٪) مربوط به قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس و ۳/۸٪ مربوط به قارچ بیوریا بزیانا یا موسکاردین قرمز از عوامل اختصاصی عفونت های قارچی کرم ابریشم بود.

واژه های کلیدی: عفونت، کرم ابریشم، گیلان.

۱–گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۲–سازمان دامپزشکی کشور
۳– گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۴– بخش ویروس شناسی حشرات موسسه تحقیقات واکسن وسرمسازی رازی
*نویسنده مسئول:nabian@ut.ac.ir

مقدمه :

در ایران تا کنون مطالعه جامع و گسترده ای در باره بیماری های کرم ابریشم در استان های مختلف انجام نشده است. قابوسی و همکاران (۱۳۷۵) شیوع بیماری نوکلئوپلاسمیک (پلی هدروزیس) کرم ابریشم را در استان گیلان گزارش نمودند. اخیرا" نتیجه بررسی بیماری های کرم ابریشم در منطقه دوغ آباد استان خراسان توسط ایرانمنش و نبیان (۱۳۸۷) منتشر گردید. کرم ابریشم در معرض ابتلا با انواع عفونت های انگلی، باکتریایی، ویروسی و قارچی است. سموم مترشحه از برخی باکتری ها، سبب مرگ و میر بالایی در کرم ابریشم می شود (Lee، ۲۰۰۱ Institut Nationale des Recherches Agronomique ، ۱۹۹۳).

نظر به اینکه استان گیلان بزرگترین مرکز صنعت نوغان داری ایران است و پرورش کرم ابریشم در این استان جایگاه ویژه ای دارد، بررسی حاضر جهت تشخیص بیماری های عفونی کرم های ابریشم نوغان داری های این استان صورت گرفت تا سبب ترویج بهداشت در نوغان داری ها، کاهش خسارات وارده به آن ها و در نتیجه ایجاد اشتغال بیشتر در این رشته گردد.

مواد و روش کار:

این بررسی در فصل بهار با همکاری سازمان دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و موسسه رازی و اداره کل دامپزشکی استان گیلان و مرکز تحقیقات کرم ابریشم ایران انجام گرفت. از تعداد نودو دو نوغان داری استان گیلان نود و دو نوزاد بیمار و یا مرده کرم ابریشم جمع آوری گردید. با استفاده از روش های رایج تشخیص آزمایشگاهی و همچنین آزمایشات تکمیلی بیوشیمیایی، آزمایش قطره اسید و رنگ آمیزی اختصاصی عوامل انگلی، ویروسی، باکتریایی و قارچی بافت های مختلف به شرح زیر تشخیص داده شدند.

۱-اجرام تک یاخته ای:

تهیه لام مرطوب:

با استفاده از یک سوآپ از جدار داخلی رودهٔ لاروها نمو نه گیری شد پس از اضافه کردن قطره ای آب یا پتاس به آن و گذاردن لامل با بزرگنمایی ۴۰ آزمایش شد. در صورت مثبت بودن آزمایش از نظر تک یاخته های میکروسپوریدیایی یعنی مشاهده اسپورهای تخم مرغی شکل به اندازه ۵ / ۲- ۵ / ۱× ۴-۳ میکرون، آزمایشات تکمیلی زیر طبق توصیه (Poinar، ۱۹۹۸) جهت تشخیص تفریقی بیماری پبرین از سایر بیماری های تک یاخته ای مشابه کرم ابریشم انجام شد.

الف- روش اسید: در این روش یک قطره اسید کلریدریک ۳۷٪ بر روی گسترش مستقیم تهیه شده از روده ریخته شد. در این آزمایش اگر تک یاخته میکروسپوریدیایی از نوع نوزما بومبیسیس باشد در برابر اسید از بین نمی رود ولی سایر گو نه ها یعنی پلیوستوفورا یا تلوهانیا در برابر اسید از بین رفته و براحتی محو می شود (Lee، ۱۹۹۸).

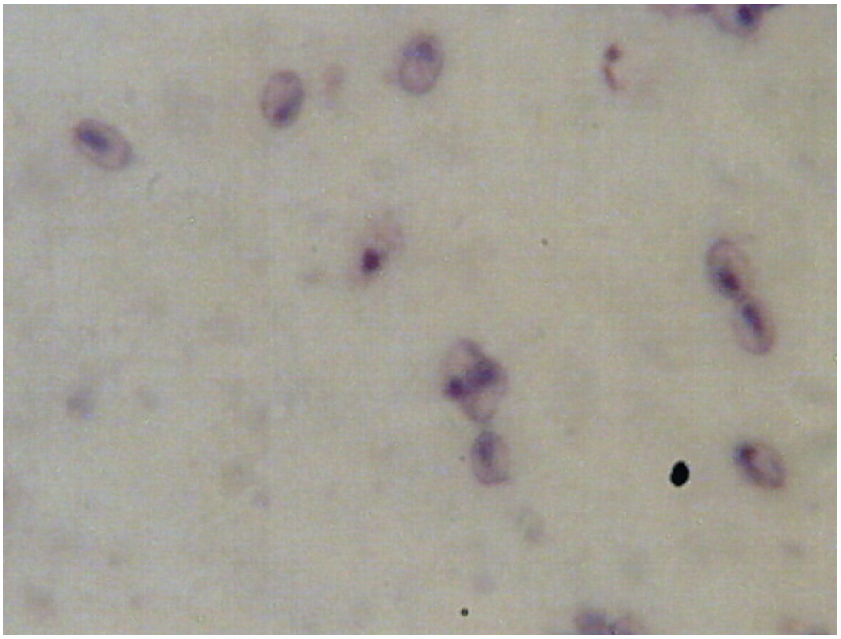
ب- روش رنگ آمیزی: گسترشی از محتویات روده بر روی لام تهیه و پس ازثابت کردن با متانول با گیمسا رنگ آمیزی شد. رنگ آمیزی گیمسا می تواند جزئیات درون میکروسپوریدیا یعنی پروتو پلاسم کمر بندی شکل اطراف اسپور وسه هسته آن را بخوبی نشان دهد.

۲-اجرام باکتریایی:

باسوزاندن سطح شکمی کرم ابریشم های آلوده با پی پت پاستور از این ناحیه نمونه گیری ودر محیط آگار خون دار، EMB و مک کانکی آگارکشت داده شد، سپس روی باکتری های جدا شده آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی همانند کاتالاز، کواگولاز، تخمیر قندها، تولید سولفید هیدروژن و IMVIC ژلاتیناز، کمپ حرکت و لسیتیناز بسته به نوع باکتری جدا شده طبق توصیه Baron و همکاران (۱۹۹۰) و Quinn و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد.

۳-اجرام قارچی:

از سطح پوست، روده و همولنف لاروها گسترش مرطوب تهیه و با بزر گنمایی ۴۰ آزمایش می شد. . برخی از این گسترش ها با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو رنگ آمیزی شدند. همچنین نمو نه برداشت شده از ناحیه شکمی کرم ابریشم در محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شد (Anaissie و همکاران، ۲۰۰۳) .



تصویر ۱. اسپورهای پلیوستوفورا (عامل پبرین غیر بیماری زا)

۴-اجرام ویروسی:

گسترشی از همولنف لاروها بر روی لام تهیه نموده و به مدت یک دقیقه با رنگ بلودومتیلن (۲/۵ گرم پودر بلودومتیلن، ۱۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪) بر اساس روش های مشروحه توسط Lee ۱۹۹۸ و Kenneth ۱۹۶۴ رنگ شد. در این روش در صورت حضور پلی هدرای سیتوپلاسمی، آنها به رنگ آبی در می آیند و پلی هدرای هسته ای بدون رنگ در زمینه آبی دیده می شود.

نتایج:

تک یاخته های جدا شده: هشت نمونه، آلوده به اسپورهای میکروسپوریدیایی غیر بیماری زای پبرین بودند (تصویر ۱). ولی در نود و دو نمونه موردی از حضور عامل بیماری زای پبرین وجود نداشت.

باکتری های جدا شده:

بیشترین میزان آلودگی باکتریایی مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدر میدیس بود در هشتاد وهشت نوغان داری (۵/۶ ۹ ٪) این باکتر ی ها از عوامل اصلی بیماری سپتی سمی کرم ابریشم بودند.

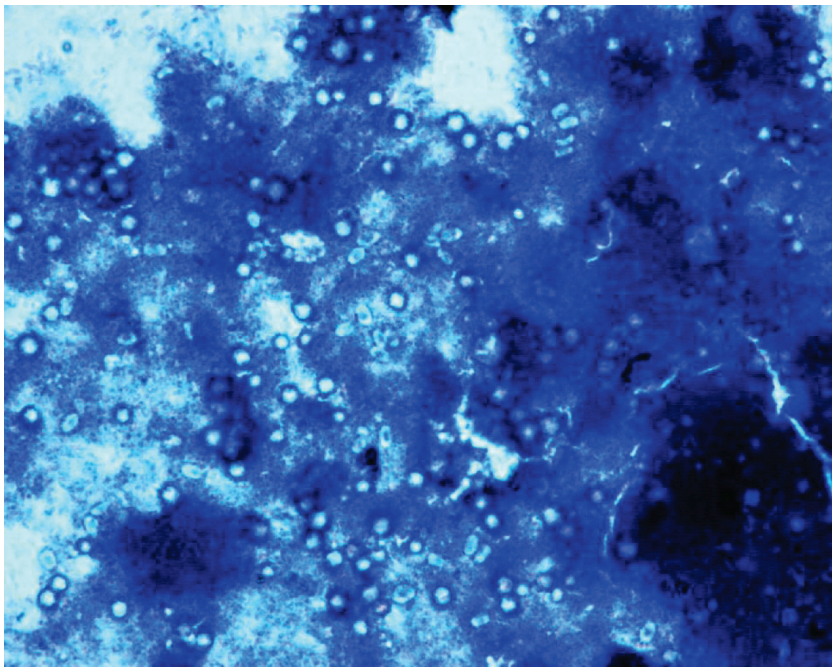
قارچ های جدا شده:

آلودگی به قارچ ها در بیست وشش نمونه (۲/ ۲۸٪) مشاهده شد، از چهار نوغان داری، آسپرژیلوس فومیگاتوس(۱۱/۵٪) و از دو نوغان داری قارچ رنگی بیوریا بزیانا (۲/۰۲) عامل بیماری موسکاردین قرمز(هر دو گونه اختصاصی کرم ابریشم هستند) جدا شد .

ویروس های جدا شده: اجسام چند وجهی مشا هده شده با میکروسکوپ معمولی مربوط به ویروس هایی از نوع گراسری یا پلی هدروزیس هسته ای بودند که در بیست و نه نوغان داری (۱/۵ ۳٪) مشاهده شد (تصویر ۲).

بحث :

تا کنون مطالعات اندکی پیرامون بیماری های کرم ابریشم در ایران انجام شده است با توجه به این موضوع و اهمیت اطلاع رسانی به متخصصین و دست اندر کاران پرورش کرم ابریشم، بررسی حاضر انجام شد. نود و دو نوغان داری مطالعه شده، عاری از تک یاخته عامل بیماری زای پبرین بودند. ولی در هشت مورد آلودگی میکروسپوریدیایی پلیوستوفورا مشاهده شد. گذشته از پبرین که تخم گذر است، بر اساس نظر Iwano (۱۹۸۴) آلودگی های میکروسپوریدیایی از جمله پلیستو فورا



تصویر ۲. پلی هدروزیس هسته ای (NPV)

مـی توانند باعـث آلودگی تخم نیز شـوندکه در زمـان تولید، صـادرات و واردات تخم باید پیوسـته آلودگی به این تک یاخته با آزمایشات تشخیص تکمیلی در مراحل مختلف لاروی کنترل شـوند. آلودگی های ویروسـی از نوع گراسری یا پلی هدروزیس هسـته ای در بیسـت و نه مورد دیده شد که ویروس عامل آن بنـا به اظهـار Andreadis (۱۹۸۷) می تواند علاوه بر راه افقی از طریق عمودی نیز به حشـرات انتقال یابد. بنا براین همزمان با کنترل میکروسـپوریدیا باید این بیماری نیز کنترل شـود. در بررسی سیتولوژیک مایع همولنف و روده و رنگ آمیزی به روش گیمسـا، حضور توام دو عامل، ویـروس پلی هدروزیس و تک یاخته میکروسـپورا رویت شـد. علت تولید کم یکی از نوغان داری های آسـتانه اشـرفیه (از هر جعبه نه کیلو محصول) را بیماری با علائم پلی هدروزیس هسته ای می دانند. کیست های انگلی رویت شـده به عنوان تک یاخته میکروسـپوریدیایی غیر پبرین (Nosema bombycis Nageli)، از جنس پلیستو فورا (pleistophora) مورد تایید قرار گرفت. بیشترین میزان آلودگی، باکتریایی و مربوط به باکتری استافیلوکوک، عامل بیماری سپتی سـمی کرم ابریشم بود که از هشتاد وهشت نوغان داری (۵/۶ ۹ ٪) جدا شد. آلودگی های قارچی در بیست وشش نمونه (۲/ ۲۸ ٪) مشـاهده گردید و از چهار نوغان داری، قارچ آسپرژیلوس و از دو نوغـان داری قـارچ رنگی یا بیووریـا بزیانا عامل بیماری موسکاردین قرمز (اختصاصی کرم ابریشم) جدا شد .

.علت وجود بیماری های یاد شـده، شـرایط پرورشی وبهداشتی نامناسـب، از جمله عدم ضد عفونی مناسـب، رطوبت و حرارت نامتعادل در نوغان داری خصوصاً نوغان داری های سنتی موجود که بیشـتر آن ها در مکان هـای نگهداری دام قـرار دارند می باشـد. به منظور غنا بخشـیدن به صنعت نوغان داری و دست یابی به بهره وری و سـود دهی هر چه بیشتر برای نوغان داران، توجه به بهبود روش های ضد عفونی و تداوم بهداشت در طول دوره پرورش ،کاربرد فضا و لوازم مناسـب پـرورش ضروری می باشد همچنین اتخاذ تدابیر موثر به منظور ارتقاء تکنیک جهت دستیابی به اسـتاندارد جهانی پرورش، انتخاب گونه های کرم ابریشـم مقاوم به بیماری هاو انتخاب تخم کرم ابریشم تضمین شـده و تحویل تخم تفریخ شده به نوغان داران به منظور تولید پیله، با اندازه و کیفیت اسـتاندارد جهان، ترویج بهداشت نوغان داری و ارتقـا فرهنگ بهداشـتی نوغانـدان داران، برنامه ریزی اصولی نیز باید مورد توجه قرار گیرد تا به توان این صنعت را در آینده ای نه چندان دور به یک صنعت ارز آور تبدیل کرد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 1 (2009) 39-45

Laboratory diagnosis of silkworm infections in Guilan province

Nabian, S.[1*],Iranmanesh, F.[2], Khosravi, A.[3], Zahraei-Salehi, T.[3], Moradi, M.[4]

Received: 28.07.2009: Accepted: 15.11.2009

Abstract

There is a lack of survey of silkworm diseases in Iran. Guilan province is the largest industry center for sericulture in Iran. It seemed that study of sericultuers diseases in this province is necessary for preventing various diseases and decreasing the related economic loss.

Specimens including sick and dead larvaes were collected from 92 sericultuers randomly, in spring 1385. Samples were tested for parasitic, viral, bacterial and fungal agents, using complementary tests including biochemical tests and specific staining.

1-Iran Veterinary Organization
2-Department of parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran
3-Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran
4-Razi Vaccine and Serum Research Institute, Tehran- Iran
*Corresponding author: nabian@ut.ac.ir

Using direct microscopic examination, in wet mount prepared from intestine wall, protozoa spores belong to Microsporidia phylum were observed in eight sericultures which was not Nosema bombysis. Many polyhedra forms in hemolymph ,were diagnosed as the agent of Polyhedrosis or Grasserie disease(NPV) in %31/5 of sericltuers. The most important prevalent infection was bacterial agents including, Staphylococcus aureus, and S. epidermidis as septicemia diseases in %95/6 of sericultuers. Fungal agents were diagnosed in 26 of sericultuers (%28/2) containing: Aspergillus fumigatous (%11/5) and Beauveria bassiana or Red Muscardin (%3/8).

Key words: Infection, Silkworm, Guilan.

منابـع:

قابوسی، ب; خداشناس، م; امیر–جلیلوند، ای. ۱۳۷۵. گزارشی از شیوع بیماری نوکلئوسیستو پلاسمیک پلی هدروز در کرم های ابریشم استان گیلان . پژوهش و سازندگی. ۳ (۳۲)، ۸۲–۸۴.

ایرانمنش، ف; نبیان، ص; خسروی، ع; زهرائی –صالحی، ت; مرادی، م. ۱۳۸۸. مطالعه عوامل مرگ ومیر کرم های ابریشم در منطقه دوغ آباد . مجله تحقیقات دامپزشکی. ۴، ۱۹۹–۲۰۲.

Anaissie, E., Mc Ginis, MR., Pfaller .A . 2003. Clinical Mycology. Churchill Livingstone Philadelphia, USA, 267-268

Andreadis TGTransmission , In: Epizootiology of insect Diseases, (Eds.J.R.Fuxa, Y. Tanoda). 1987. John Wiley and Sons, New York, USA. 60, 159- 176.

Baron, E.J. Fnegold, S.M. 1990. Diagnostic Microbiology, 3rd ed. Mosby Company, London, UK. 333-351, 323-332, 363-375, 451-456.

Institute National de Recherch Agronomitue (INRA). 1993. Diseases of Mulberry Silkworm and their control. 45-84.

Iwano, H., Ishihara, R. 1984. A microsporidian, Pleistophora sp. Isolated from the lawn grass cutworm, Spodoptera deprava Butler (Lepidoptera: Noctuidae). Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine Nihon University. 41, 25-33.

Kenneth, N.S. 1964. Insect VirologyAcademic Press. 122-134.

Lee, Y.K. 1998. The Practices of Egg Production, silkworm rearing and diseases control department of sericulture and entomology. Dijean, Korea. 45-75.

Lee, Y.K. 2001. Silkworm Disease and Control . Silkworm disease and pests. Dijean, Korea. 3- 25.

Poinar, J.r. 1998. Parasite and pathogens of mites. Department of Entomology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, Annual Review of Entomology. 43, 449-469.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donelly, W.G., Leonard, F.C. 2002. Veterinary Microbiology, Microbial Disease. Blackwell Publishing. Oxford, UK. 44-54, 80-83, 121.