

بررسی هیستوپاتولوژیک آبشش و تغییرات سلولی همولف در ویبریوز تجربی میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*) با باکتری ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*)

*امین بهی^۱، رحیم پیغان^۲، عقیل دشتیان نسب^۳، بابک قائدینیا^۳ و وحید یگانه^۳

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات اهواز، آگروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان،
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه چمران اهواز،^۲ پژوهشکده میگوی ایران، بوشهر

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک آبشش و تغییرات هموسیت کل میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*) در ویبریوزیس تجربی بوسیله باکتری *Vibrio harveyi* انجام گرفت. بدین منظور یک گروه ۳۰ تایی پست لارو ۷۵ روزه مورد آزمایش قرار گرفت. میگوها بوسیله روش غوطه‌وری ۳۰ دقیقه‌ای با غلظت ۱۰^۹ سلول باکتری در میلی‌لیتر مورد مواجهه قرار گرفتند. نتایج هیستوپاتولوژی آبشش در میگوهای در حال مرگ نکروز، چسبندگی لاملاها، ادم، نفوذ هموسیت در فیلامنت‌های آبششی و تجمعات گره‌ای هموسیت‌ها با کانون ملانینی شده را نشان دادند. نتایج حاصل از شمارش کل هموسیت‌ها در میگوهای در حال مرگ کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آبشش، بوشهر، میگوی پاسفید، ویبریو هاروی، همولف، هیستوپاتولوژیک

مقدمه

زیاد است، وجود دارند. یون‌های سدیم موجب تحریک رشد همه گونه‌ها شده و برای رشد بسیاری از گونه‌ها ضروری است. ویبریوها میکروفلور طبیعی بدن میگو محسوب می‌گردند و از عدم توانایی دفاعی میگوها که به دلیل استرس‌های تحمیلی اتفاق می‌افتد، استفاده کرده و به صورت عوامل بیماری‌زای فرصت طلب نمایان می‌شوند (۷).

توانایی باکتری‌های جنس ویبریو در آسیب رساندن به میگوها متغیر است و همواره به دلیل اثرات پاتولوژیک متفاوت و حضور عوامل بیماری‌زای فرصت طلب گوناگون نظیر باکتری‌های گرم منفی و اکسیداز مثبت *Aeromonas sp.*، *Pseudomonas sp.* و *Flavobacterium sp.* در عفونت‌های سیستمیک ویبریوزیس تعیین گونه‌های آسیب رسان ویبریو، کاری بسیار مشکل است (۹). برخی گونه‌های ویبریو مانند *Vibrio penaeicida* در منطقه نیوکالدونیا بسیار مهاجم هستند و در شرایطی که حداقل استرس وجود دارد باعث ایجاد بیماری در میگوهای پرورشی پاسفید

تا قبل از سال ۱۹۸۰ رشد و توسعه مزارع پرورش میگو به صورت سیستم‌های پرورش سنتی و گسترده بود و بعد از دهه ۸۰ رشد سریعی در این بخش رخ داد که به سوی صنعتی شدن پیش می‌رفت. این روند رشد بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۳ همزمان با بروز عوامل بیماری‌زا و گسترش بیماری‌ها کندتر شده و پس از بازسازی مجدد با بهره‌گیری از تمهیدات و استفاده از تکنولوژی‌های نو و حرکت به سوی توسعه پایدار بر رشد این صنعت افزوده شد (۱۷). در این میان عوامل عفونی باکتریایی به‌ویژه عوامل مولد بیماری‌های ویبریوزیس در میگوهای پنائیده در مراحل لاروی، پست لاروی، جوانی و بلوغ دیده می‌شود (۱۳). عامل مولد بیماری‌های ویبریوزیس در میگو، باکتری‌های میله‌ای گرم^۱ منفی، اکسیداز مثبت، نمک دوست، کموارگانوتروف^۲ و بی‌هوازی اختیاری هستند که به شکل باسیل‌های کمی خمیده و یا مستقیم دیده می‌شوند (۹). اکثر گونه‌ها به‌خوبی در محیط‌های آبی، به‌ویژه در محیط‌های دریایی و مصب‌ها که میزان آلی

* مسئول مکاتبه: am.behi@gmail.com

(Litopenaeus vannamei) و میگوهای آبی
(Litopenaeus stylirostris) می‌شوند (۸).

بعضی از تحقیقات انجام شده در این زمینه شامل بررسی هیستوپاتولوژیک و بیوریوزیس در میگوی موندون توسط Tesaprateep (۱۶) مطالعه Lightner بروی آثار هیستوپاتولوژیک آبشش، قلب و ارگان لمفونیدی در بیماری‌های سیستمیک و بیوریوزیس میگوهای پنائیده در آمریکای جنوبی (۹) و بررسی هیستوپاتولوژیک اندام‌های مختلف و تغییرات سلولی همولنف در ویریوز تجربی میگوی موندون (۱۵) بررسی هیستوپاتولوژیک آبشش و تغییرات سلولی همولنف در ویریوز تجربی میگوی موندون با یک سویه بیماریزای باکتری ویریو-آلجینولیتیکوس می‌باشد (۱۶).

باکترهای دخیل در ویریوزیس در تمامی نقاط جهان با توجه به تنوع گونه‌ای ویریوها در شرایط اقلیمی متفاوت و تنوع گونه‌ای در میگوهای پرورشی متفاوت به نظر می‌رسد. بطور کلی نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که از بین گونه‌های ویریو گونه‌های *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* و *Vibrio splendidus* در ایجاد تلفات در ویریوزیس مؤثر می‌باشند (۶). با توجه به این که بافت آبشش و سلول‌های خونی میگو در طیف وسیعی از بیماری‌ها از خود واکنش نشان می‌دهند، هدف و مسئله مورد نظر در این تحقیق بررسی آسیب‌شناسی آلودگی‌های تجربی ناشی از یک سویه بیماریزای باکتری *V.harveyi* در اندام آبشش و تأثیر بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری بر روی تعداد سلول‌های ایمنی غیر اختصاصی (هموسیت‌های) میگوی پاسبید می‌باشد.

مواد و روش کار

تأمین میگو و نگهداری آن: در این تحقیق از میگوهای پاسبید (*Litopenaeus vannamei*) پرورش یافته در پژوهشکده میگوی کشور که توسط آزمایشات PCR دو مرحله‌ای، عدم آلودگی جمعیتی آنها به ویروس‌ها تأیید شده بود، استفاده شد. وزن میگوهای مورد استفاده در این

آزمایشات $9/8 \pm 0/3$ گرم و سن آنها ۷۵ روز بود. میگوها در ابتدا از لحاظ علائم ظاهری و سالم بودن اندام‌های ضمیمه بررسی شدند. عمل ذخیره‌سازی میگوها در آکواریوم‌های ۱۵۰ لیتری و با حجم آبگیری ۶۰ لیتر انجام شد. دما و شوری مورد استفاده به ترتیب 28 ± 1 درجه سلسیوس و ppt ۳۵ (دما و شوری ایده آل میگوی *L.vannamei*) و میزان اکسیژن با هوادهی مداوم در حد ۷ ppm نگه داشته شد. به منظور رفع استرس ناشی از حمل و نقل و دستکاری، میگوها به مدت یک هفته در این آکواریوم‌ها نگهداری و غذادهی شدند. غذادهی در ساعات ۹ صبح و ۵ بعد از ظهر توسط غذای فرموله شده میگوی وانامی شماره ۴۰۰۵ هووراش، و عملیات سیفون کردن آب هر دو روز یکبار انجام گرفت.

تأمین باکتری‌ها و خصوصیات بیوشیمیایی آنها: باکتری مورد استفاده در این تحقیق در تیر ماه ۱۳۸۶ از میگوهای با ظاهر بیمار وانامی در منطقه دلوار توسط بخش میکروبیولوژی پژوهشکده میگو طبق روش‌های David و همکاران (۲۰۰۱) و Lightner (۱۹۹۶) جداسازی شد. تهیه سوسپانسیون و شمارش باکتری: برای تهیه سوسپانسیون باکتری، باکتری‌های جدا شده از محیط کشت در آب دریای استریل فیلتر شده با شوری ppt ۳۵ حل گردید و تراکم آن اندازه‌گیری شد (۱).

آلوده‌سازی تجربی: برای آلوده‌سازی از ظرف‌هایی با حجم سوسپانسیون ۲ لیتر برای هر گروه استفاده شد که شرایط هوادهی مناسب در زمان غوطه‌وری با سنگ هوای استریل به خوبی برقرار شده بود. غلظت‌های مورد استفاده 10^8 و 10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر و مدت زمان حمام ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. برای ارزیابی بیماریزایی دوزهای به کار رفته، از گروه‌های ۲۱ تایی میگو با سه تکرار برای هر دوز استفاده گردید و مرگ و میر میگوها در زمان ۱۴ روز پس از آلوده‌سازی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تأیید بیماری همولنف، میگوهای در حال مرگ بر روی محیط TCBS کشت داده شد. برای انجام مطالعات آسیب‌شناسی و بررسی تغییرات پارامترهای سلولی همولنف در آزمایش نهایی از غلظت 10^9

V.harveyi (اولین غلظت بیماریزا) بر روی یک گروه ۳۰ تایی و در قالب ۳ تکرار استفاده شد (۵).

شمارش هموسیت کل: برای همولف‌گیری از ماده ضد انعقادی *Alsever* با دمای ۵ درجه سلسیوس و سرنگ انسولین استفاده شد. برای شمارش هموسیت کل از بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری استفاده گردید (۱۰).
آسیب‌شناسی بافتی: برای تثبیت بافت‌های میگو و تهیه مقاطع بافت‌شناسی از روش *Lightner* استفاده شد (۹).
آنالیز آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از شمارش هموسیت کل و مقایسه میانگین‌ها با آزمون *T-test* (ت غیر جفتی) انجام شد و از نرم‌افزار *SPSS* برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید.

نتایج

بیماریزایی: باکتری *V.harveyi* در غلظت 10^9 سلول در

میلی لیتر، ۶۱/۹ درصد تلفات را در جمعیت میگوهای مورد مطالعه و در شرایط بدون استرس ایجاد کرده است. نتایج آزمایشات بیماریزایی توسط باکتری *V.harveyi* بروی میگوهای پرورشی *L.vannamei* در جدول ۱ آورده شده است.

آسیب‌شناسی آبشش: در میگوهای بیمار آلوده شده به باکتری *V.harveyi* ضایعاتی در این بافت مشاهده گردید که شامل نفوذ فراوان هموسیت‌ها در فضای لاکونا، در بعضی موارد ایجاد تشکیلات گره‌ای هموسیت‌ها با کانون ملانینی شده، بلند شدن لایه اپیتلیوم لاملاها، تورم آبشش، چسبندگی لاملاهای منشعب و غیر منشعب و در نهایت نکروز لاملاها بوده است. شکل‌های ۱ تا ۶ نشان‌دهنده نوع آسیب‌های بافتی می‌باشند.

شمارش هموسیت کل: نتایج حاصل از شمارش هموسیت کل در گروه‌های سالم و بیمار در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱- درصد مرگ و میر و جداسازی باکتری از همولف میگوهای تلف شده در گروه‌های مورد مطالعه پس از آلوده‌سازی با غلظت‌های مختلف باکتری در روزهای بعد از آلوده‌سازی.

زمان پس از آلودگی (روز)	گروه	کنترل بدون باکتری	آلوده با 10^8 <i>V.harveyi</i> cell/ml	آلوده با 10^9 <i>V.harveyi</i> cell/ml
۱	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۴/۷	۰
۳	۰	۰	۴/۷	۰
۴	۰	۰	۴/۷	۰
۵	۰	۰	۴/۷	۹/۵
۶	۰	۰	۴/۷	۳۳/۳
۷	۰	۰	۴/۷	۳۸
۸	۴/۷	۴/۷	۴/۷	۳۸
۹	۴/۷	۴/۷	۹/۵	۴۷/۶
۱۰	۴/۷	۴/۷	۹/۵	۵۷/۱
۱۱	۴/۷	۴/۷	۹/۵	۶۱/۹
۱۲	۴/۷	۴/۷	۹/۵	۶۱/۹
۱۳	۴/۷	۴/۷	۱۴/۲	۶۱/۹
۱۴	۴/۷	۴/۷	۱۴/۲	۶۱/۹
	درصد تلفات تجمعی	۴/۷	۱۴/۲	۶۱/۹
	درصد جداسازی باکتری از همولف	۰	۰	۷۶/۹

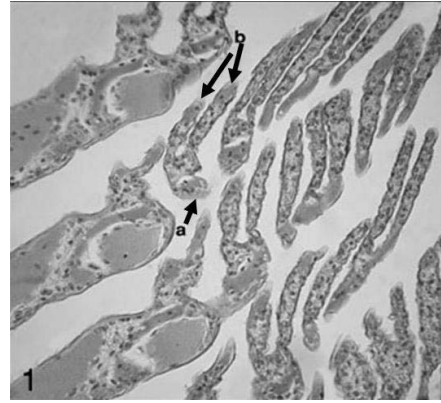
جدول ۲- جدول مقایسه میانگین تعداد هموسیت کل (THC) در گروه‌های کنترل و آلوده شده با *V.harveyi*

THC (سلول $\times 10^6$)	گروه آزمایشی
$212/88 \pm 20/97^a$	شاهد (بدون باکتری)
$74/25 \pm 10/78^b$	آلوده به <i>V.harveyi</i> *

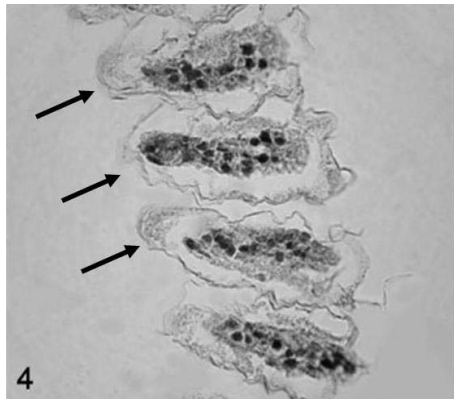
مقادیری که در هر ستون با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده اند دارای اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) هستند (انحراف معیار \pm میانگین). از هر گروه ۷ نمونه گرفته شده است. * میگوهای آلوده شده با 10^9 سلول باکتری در میلی لیتر که علائم ظاهری بیماری را نشان می‌دادند.



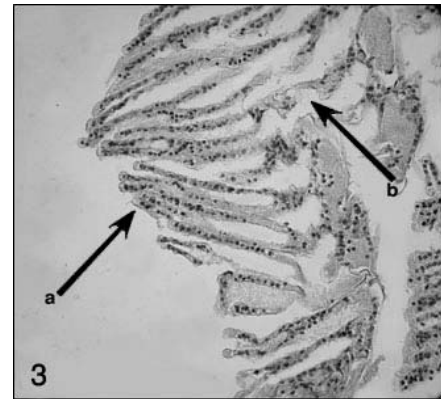
شکل ۲- برش طولی از بافت سالم آبشش. در این تصویر لایه اپیتلیال نازک رشته های آبششی نشان داده شده است (پیکان). بزرگنمایی ۱۰۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.



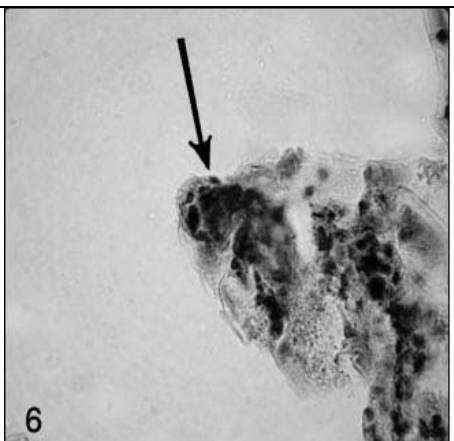
شکل ۱- برش طولی از بافت سالم آبشش. در این تصویر لاملاهای منشعب آبششی مشاهده می شود. در فضاهای هموسلی رشته های آبششی مقدار طبیعی هموسیتها مشخص شده است. در فضای لاکونا که در قسمت راسی فیلامنتها قرار دارد (b) و رگ آوران (a) مقدار هموسیتها در مقادیر طبیعی مشاهده می شود. بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.



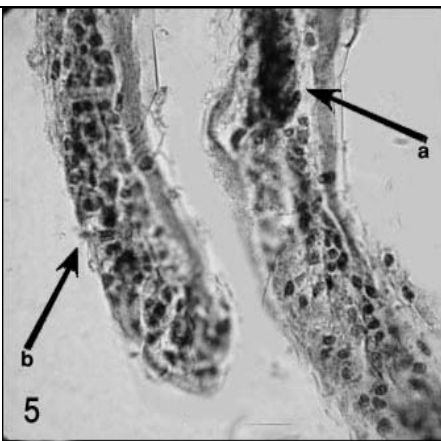
شکل ۳- برش طولی از بافت آلوده آبشش. در این ناحیه چسبندگی (fusion) رشته های فرعی و اصلی فیلامنت های منشعب آبششی به یکدیگر مشاهده می شود (a)، در این ناحیه نکروز (necrosis) و کنده شدن قسمت ابتدایی فیلامنت آبششی مشاهده می شود (b). بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.



شکل ۴- برش طولی از بافت آلوده آبشش. در این نواحی بلند شدن (lifting) لایه اپیتلیوم لاملاها و در مجموع تورم (edema) فیلامنت آبششی مشاهده می شود (پیکان). بزرگنمایی ۱۰۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.



شکل ۶- برش طولی از بافت آلوده آبشش. در این ناحیه فیلامنت آبششی نکروز شده با چندین کانون تجمع گره ای هموسیتها با مراکز ملانینی مشاهده می شود (پیکان). بزرگنمایی ۱۰۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.



شکل ۵- برش طولی از بافت آلوده آبشش. در این ناحیه تجمع گره ای هموسیتها (haemocytosis) باکانون تیره که احتمالاً حاکی از تشکیل رنگدانه های ملانین است مشاهده می شود (a)، در این ناحیه نفوذ فراوان هموسیتها به درون فضاهای هموسلی (homocoelic spaces) فیلامنت های آبششی مشاهده می شود (b). بزرگنمایی ۱۰۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.

بحث و نتیجه‌گیری

آسیب‌شناسی آبشش: Tesaprateep در پی آلودگی میگوهای *P.monodon* با یک سویه پاتوژن *V.alginolyticus* به بررسی تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش پرداخت که ضایعات مشاهده شده در این مطالعه شامل تجمع هموسیت‌ها در اطراف کانون‌های نکروز شده، نفوذ هموسیت‌های آزاد در فضای لاکونا و انکپسوله شدن هموسیت‌ها با کانون غیر ملانیزه بوده است (۱۶). Lightner در بررسی‌های آسیب‌شناسی بیماری‌های سیستمیک ایجاد شده در میگوهای پنائیده توسط باکتری *V.parahaemolyticus*، هموسیت‌های کپسوله شده با کانون‌های ملانینی را در فضای وریدی فیلامنت‌های آبششی، ارگان لمفوئیدی و قلب میگو مشاهده کرد که این ضایعه را خاص بیماری‌های سیستمیک و بی‌ریوزیس می‌داند. به نظر می‌رسد که تغییرات التهابی ایجاد شده در آبشش میگوهای آلوده شده به باکتری *V.harveyi* در این مطالعه پاسخی غیراختصاصی به ترشح اگزوتوکسین‌های باکتریایی باشد (۹). Ruangsri و همکاران در پی آلودگی تجربی میگوی *P.monodon* با باکتری‌های پاتوژن *V.harveyi* تغییرات دژنراسیون آبشش را در میگوهای بیمار مشاهده کردند (۱۵). تغییرات التهابی در آبشش میگو مانند تجمع هموسیت‌ها در فضای هموسلی، تورم، جوش خوردن فیلامنت‌ها و بلند شدن اپیتلیوم فیلامانی ممکن است که یک مکانیسم دفاعی ساده باشد که باعث کاهش سطح و وسعت منطقه آسیب‌پذیر آبششی می‌شود، که به موجب آن موجود اعمال تنظیم اسمزی را به‌خوبی انجام بدهد (۲).

ضایعات میکروسکوپی مشاهده شده در میگوهای وانامی آلوده شده به باکتری *V.harveyi* در بررسی حاضر شامل نفوذ فراوان هموسیت‌ها در فضای لاکونا، ایجاد تشکیلات گره‌ای هموسیت‌ها با کانون ملانینی شده، بلند شدن لایه اپیتلیوم لاملاها و تورم، چسبندگی لاملاها به یکدیگر و نکروز فیلامان‌های آبشش بوده است که تا حدودی با نتایج سایر محققین مطابقت دارد.

شمارش هموسیت کل: هموسیت‌ها در سیستم دفاعی سخت پوستان نقش اصلی و محوری را ایفا می‌کنند و

برآورد میزان پارامترهای سلولی همولنف میگو به‌عنوان یک پارامتر حساس در برابر عوامل سمی محیطی و استرس زا کاربرد دارد (۱۴). Chang و همکاران عنوان کردند که تعداد هموسیت کل در میگوهای پنائیده بر حسب وضعیت فیزیولوژیکی میگو به‌طور معمول از $200 \times 10^6 - 400 \times 10^6$ سلول در میلی‌لیتر متفاوت است و دامنه تغییرات زیادی بسته به وضعیت فیزیولوژیکی میگو در این فاکتور مشاهده می‌شود (۳).

Ruangsri و همکاران در پی آلودگی تجربی میگوی *P.monodon* با یک سویه پاتوژن باکتری *V.harveyi* در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق باکتری کاهش معنی‌دار ۳۶ درصدی را در تعداد هموسیت کل مشاهده کردند. همچنین این محقق نکروز جزئی بافت خونساز را در مراحل پیشرفته بیماری گزارش کرده است (۱۵).

لورنزون و همکاران عنوان می‌کنند که اندوتوکسین لیپوپلی ساکارید یک جز لاینفک غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد و مواجهه این ترکیب با همولنف سخت پوستان موجب دگرانولاسیون گسترده هموسیتها در شرایط *In vitro* شده و در شرایط *In vivo* باعث ایجاد پدیده هموسیتوپنیا می‌شود (۱۱).

Lorenzon و همکاران پس از تزریق لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی و سایر منابع لیپوپلی ساکاریدی در غلظت‌های تحت کشنده پدیده هموسیتوپنیا و افزایش گلوکز همولنف را در میگوی *Palaemon elegans* مشاهده کردند و عنوان کردند که بروز این پدیده ممکن است نقش آدپتاسیونی و دفاعی را در سپتی سمی‌های اتفاقی ایفا کند (۱۱). میانگین مقدار هموسیت کل اندازه‌گیری شده در مطالعه حاضر در میگوهای سالم گروه شاهد 212×10^6 سلول در میلی‌لیتر برآورد شده است، در حالی که میانگین هموسیت کل اندازه‌گیری شده در میگوهای بیمار آلوده شده به باکتری *V.harveyi* 74×10^6 سلول در میلی‌لیتر همولنف بوده است که کاهش ۶۵ درصدی را نسبت به میگوهای گروه شاهد نشان می‌دهد. این موضوع بیانگر هموسیتوپنای شدید در میگوهای بیمار آلوده شده به این باکتری می‌باشد.

در تشخیص پاتولوژیکی بیماری‌های ویروزیس در مزارع پرورش میگو مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر دشتیان‌نسب معاون پژوهشی پژوهشگاه میگو که در تأمین هزینه‌های مالی این تحقیق کمک فراوانی نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین از زحمات بی‌شائبه آقایان یگانه و قائدنیا که در تهیه مقاطع بافتی ما را یاری رساندند قدردانی به‌عمل می‌آید.

با توجه به مقایسه نتایج کار سایر محققان با بررسی حاضر به نظر می‌رسد که حضور باکتری در مراحل سیستمیک بیماری در جریان همولنف میگو و استرس ناشی از منابع لیپولی ساکاریدی باکتری *V.harveyi* نفوذ هموسیت‌ها در آبشش و آسیب احتمالی بافت خونساز باعث ایجاد هموسیتوپنیای شدید در مراحل سیستمیک میگوهای بیمار آلوده شده به این سویه باکتری *V.harveyi* باشد. نتایج حاصله از این مطالعه می‌تواند

منابع

1. Albores, F. and Latchford, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176, 271–283.
2. Bhavan, P.S. and Geraldine, P., 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology* 50, 331–339.
3. Chang, C.F., Su, M.S. and Chen, H.Y., 1999. A Rapid Method to Quantify Total Haemocyte Count of *Penaeus monodon* Using ATP Analysis. *Fish Pathology* 34, 211–212.
4. David, R.B., Richard, W.C. and George, M.G., 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
5. Guzman, G.A., Juárez, R.V., and Felipe Ascencio, F., 2002. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to Four *Vibrio* Species. *Journal of Invertebrate Pathology* 78 (4), 215–219.
6. Guzman, G.A., Labreuche, Y., Ansquer, D., Espiau, B., Levy, P., Ascencio, F. and Saulnier, D., 2003. Proteinaceous exotoxins of shrimp-pathogenic isolates of *Vibrio penaeicida* and *Vibrio nigrapulchritudo*. *Ciencias Marinas*, pp. 77–88.
7. Karunasagar, I., Karunasagar, I. and Umesha, R.K., 2002. *Microbial Diseases in Shrimp Aquaculture*. Department of Fishery Microbiology, University of Agricultural Sciences, College of Fisheries, Mangalore-575 002, India.
8. Le Groumellec, M., Goarant, C., Haffner, P., Berthe, F., Costa, R. and Mermoud, I., 1996. Syndrome 93 in New Caledonia: Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. *SICCPS book of abstracts, SEAFDEC, Iloilo City, Philippines*. P. 46.
9. Lightner, D.V. (ed.). 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
10. Lopez, N., Cuzon, G., Gaxiola, Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sanchez, A. and Rosas, C., 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224, 223–243.
11. Lorenzon, S., de Guarrini, S., Smith, V.J. and Ferrero, E.A., 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. *Fish & Shellfish Immunology*, 9 (1): 31–50.
12. Lorenzon, S., Pasqual, P. and Ferrero, E.A., 2002. Different bacterial lip polysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shellfish Immunol.* 13 (1), 27–45.
13. Nash, G.L., 1990. *Penaeus monodon* grow out disease (In Malaysia), Ed by New, M.B., Sarsam, H.D. and Singh, T. *Technical and economic aspects of shrimp farming*. Pp. 172–182.
14. Rodriguez, J. and Le Moullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191, 109–119.
15. Ruangsi, J., Wannades, M., Wanlem, S., Songnu, A., Arunrat, S., Tanmark, N., Pecharat, J. and Supamattaya, K., 2004. Pathogenesis and virulence of *Vibrio harveyi* from southern part of Thailand in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (1), 43–54.
16. Tesaprateep, T., 1990. Histopathology of *Vibrio alginolyticus* Infection in *Penaeus monodon*. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 20(4), 537–550.
17. Trichereau, J., 2006. Recent history of world aquaculture and shrimp culture. *Conakry (Guinea)*, 6–8 June 2006.

Effect of experimental vibriosis by *Vibrio harveyi* on gill histopathology and total haemocyte changes of haemolymph in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

***A. Behi¹, R. Peyghan², A. Dashtiannasab³, B. Ghaednia³ and V. Yeganeh³**

¹Fisheries MS Graduated, Islamic Azad University, Ahvaz Science and Research Branch,

²Dept. of Aquatic Animal Health, College of Veterinary Medicine, Chamran University, Ahvaz,

³Iran Shrimp Research Center, Boushehr, Iran

Abstract

This study was carried out to survey gill histopathology and total haemocyte changes in experimental vibriosis by *Vibrio harveyi* in white leg shrimp. For this order one group (30 post larvae) 75-day old were examined. Shrimps were challenged by 30-minute bath method and with 10⁹ cell/ml concentration of bacteria. Results from gill histopathology in diseased moribund shrimps showed necrosis, lamella fusion, edema, haemocyte infiltration in gill filaments and nodular haemocyte aggregations with melanized foci. Results from total haemocyte count in diseased moribund shrimps showed a significant decrease in this factor in comparison with control group.

Keywords: Gill; Bushehr; White leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*); *Vibrio harveyi*; Haemolymph; Histopathologic