مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۴، ۲۰۲ - ۱۹۹

تعیین عوامل تلفات کرم ابریشم در روستای دوغ آباد

فخری ایرانمنش[1]* صدیقه نبیان[2] علیرضا خسروی[3] تقی زهرایی صالحی[4] مصطفی مرادی[5]

۱)بخش مبارزه با بیماری های طیور، زنبورعسل و کرم ابریشم سازمان دامپزشکی ایران، تهران - ایران.
۲) گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۵) بخش ویروس شناسی حشرات موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی.

(دریافت مقاله: ۱۸ اسفندماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ماه ۱۳۸۵)

چکیده

به منظور مطالعه عوامل تلفات کرم ابریشم نمونه‌های لاروبیمار در مراحل مختلف رشد از نظر عوامل انگلی، ویروسی، قارچی و باکتریایی مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌ها شامل لاروهای مرده و مواد بستر شامل تخم، برگ، و مدفوع بود که با روش‌های متداول تشخیصی مورد آزمایش قرار گرفتند. همچنین به منظور تایید تشخیص، آزمایش های تکمیلی نیز انجام پذیرفت. با بهره‌گیری از میکروسکوپ نوری و با تهیه لام مرطوب از دیواره روده و انجام آزمایش‌های تأیید تشخیص تک یاخته‌ها میکروسپوریدیا مورد شناسایی قرار گرفته و عدم وجود میکروسپوریدیای عامل بیماری پیرین اثبات شد. تعدادی مخمر نیز رویت شد که قارچ ساکرومایسیس تعیین هویت شد. درگسترش مستقیم از همولنف با میکروسکوپ اجسام چند وجهی (پلی هدرا) وجود داشت که در رنگ آمیزی بلودو متیلن، ویزوس پلی هدروزیس هسته‌ای تشخیص داده شد و در تلقیح این عامل به لاروهای سالم مجدداً پلی هدرا از همولنف لاروها جداسازی گردید. از نمونه‌های ارسالی پس از کشن در محیط‌های باکتری شناسی، باکتری‌های استرپتوکوک الفاهمولیتیک از عوامل بیماری‌های گوارشی، استافیلوکوک طلایی از عوامل سپتی سمی، سراتیا مارسسن عامل بیماری سپتی سمی سرخ و باسیلوس تورینژینسیس عامل بیماری توکسیک سوتو جداشد. بطورکلی تلفات ایجاد شده حاکی ازشرایط پرورشی و بهداشتی نامناسب، از جمله عدم ضد عفونی و تغذیه نامناسب، وجود رطوبت و حرارت نامتعادل در نوغانداری دارد. بهبود روش‌های ضد عفونی، تداوم بهداشت در طول دوره پرورش کاربرد فضا ولوازم مناسب پرورش، ارتقاء تکنیک وکیفیت پرورش، انتخاب گونه‌های کرم ابریشم مقاوم به بیماری و انتخاب تخم کرم ابریشم مقاوم به بیماری‌ها و انتخاب تخم کرم ابریشم تضمین شده می تواند تولید موفقی را به همراه داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: کرم ابریشم، همولنف، پیرین، پلی هدروزیس هسته‌ای، بیماری سوتو.

مقدمه

در حال حاضرتولید تخم نوغان در شرکت سهامی کرم ابریشم ایران انجام می‌شود. هزاران کارگاه نوغانداری و تولید پیله در استان‌های گیلان، مازندران، گلستان، خراسان و به میزان کمتر در اصفهان، فارس، کرمان وهمچنین سه کارخانه تولید ابریشم و بیش ازهزار کارگاه ابریشم کشی نیز وجود دارد. این فعالیت‌ها می‌تواند مواد اولیه برخی صنایع، از جمله قالی بافی و نساجی را فراهم کند.

کرم ابریشم بوسیله تعدادی از عوامل باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی دچار بیماری و در نتیجه موجب خسارات جدی در صنعت نوغان داری می‌شود. این بیماری‌ها به راحتی می‌توانند بوسیله عدم رعایت بهداشت و تغذیه نا مناسب و همچنین دوری از استرس‌های حرارتی و رطوبتی ایجاد شوند، پس می‌توان آن‌ها را پیشگیری و کنترل کرد. پیشگیری از آلودگی و ورود آن می‌تواند به اندازه دفع آلودگی اولیه در مبارزه با بیماری نقش داشته باشد. همچنین باید دقت شود که کرم ابریشم در معرض شرایط استرس زا مانند حرارت ورطوبت نامناسب، تهویه بدو تغذیه ناکافی، که براحتی می‌تواند موجب بیماری شود، قرارداده نشوند. هدف از این بررسی تعیین عوامل بیماریزا کرم ابریشم در نمونه‌های ارسالی از نوغان داری‌های روستای دوغ آباد شهرستان تربت حیدریه بوده است.

مواد و روش کار

در بهار سال ۸۳ تعدادی از نوغانداری‌های روستای دوغ آباد از شهرستان تربت حیدریه در استان خراسان، دچار حدود ۷۰ درصد تلفات شدند. کرم‌های بیمار متورم، قهوه‌ای و در بعضی موارد زرد رنگ و همچنین در اندازه‌های مختلف رشد بودند. به منظور بررسی علت تلفات نمونه‌های ارسالی که شامل تخم، لارو، پیله، بستر، مدفوع و برگ توت بودند، از نظر آلودگی انگلی، ویروسی، قارچی و باکتریایی آزمایش شدند.

۱- جداسازی عوامل تک یاخته ای

تهیه لام مرطوب: از جدار روده لاروبیمار، مستقیماً برداشت کرده و به آن یک قطره آب یا پتاس افزودیم و پس از قرار دادن یک لامل بر روی آن، با استفاده از عدسی ۴۰ مورد بررسی قرار دادیم.

در صورت مثبت بودن آزمایش یعنی مشاهده اسپورهای تخم مرغی شکل به اندازه تقریبی ۵ / ۲ - ۵ / ۱×۴-۳ میکرون(۶) به وسیله میکروسکوپ، آزمایش‌های تکمیلی زیر نیز جهت تشخیص قطعی پیرین از سایر بیماری‌های تک یاخته ای مشابه در کرم ابریشم انجام شد.

الف- روش اسید: در این روش یک قطره اسید کلریدریک ۳۷ درصد بر روی گسترش مستقیم از روده ریختیم. با این آزمایش در صورتی که تک یاخته

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱ ، ۳۰۶۷۷۴۷-۰۹۱۲ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:iranmaneshsilk@yahoo.com

میکروسپوریدیایی از نوع نوزما بومبیسیس باشد در برابر اسید از بین نمی رود اما اگر از انواع دیگر یعنی پلیوستوفورا یا تلوهانیا باشد، در برابر اسید از بین رفته و براحتی محو می‌شود.

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

۲- جداسازی عوامل باکتریایی

از ناحیه شکمی نمونه‌های کرم ابریشم آلوده، با سوزاندن سطح شکمی پوست، توسط پی پت پاستور در محیط آگار خون دار، آبگوشت برین‌هارت، EMB و مک کانکی کشت داده شد و سپس باکتری‌های جدا شده تحت آزمایش‌های بیوشیمیایی تکمیلی همانند تخمیر قندها، تولید سولفید هیدروژن و IMVIC ژلاتیناز، کمپ، حرکت و لسیتیناز بسته به نوع باکتری جدا شده قرار گرفتند (۳،۱۲).

۳- جداسازی و کشت قارچ

۳-۱- تهیه گسترش: به این منظور از سطح پوست، روده و همولنف کرم‌های ابریشم بر روی لام گسترش مرطوب تهیه نموده و با عدسی ۴۰ میکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفتند.

۳-۲- رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو

۳-۳- کشت قارچ: از ناحیه شکمی نمونه‌های کرم ابریشم آلوده، به وسیله پی پت پاستور، برداشت نموده و در محیط سابورود کستروز آگار به کشت قارچ داده شد (۲).

۴- جداسازی عوامل ویروسی

پس از تهیه گسترش از همولنف و تثبیت آن، نمونه‌ها با یکی از محلولهای زیر رنگ آمیزی گردیدند:

۱- **بلودومتیلن:** به مدت یک دقیقه رنگ بلودومتیلن (۲/۵ گرم پودر بلودومتیلن، ۱۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۹۵ درصد) بر روی گسترش اثر داده شد. در این روش در صورت حضور پلی هدرای سیتوپلاسمی، آنها به رنگ آبی در می‌آیند و پلی هدرا هسته‌ای بدون رنگ در زمینه آبی دیده می‌شود.

۲- **سودان III:** این روش برای جداسازی ویروس پلی هدرای هسته‌ای از سلول‌های چربی بکار می‌رود. شکل پلی هدرای ویروس هسته‌ای تقریباً شبیه سلول‌های چربی است. در ابتدا از چربی‌های زیر جلد گسترش تهیه شد و پس از خشک شدن به مدت ۱۵ دقیقه با رنگ مذکور (رنگ سودان تری اشباع شده در ایزوپروپانول nvwn۹۹) رنگ آمیزی شد و پس از خشک شدن در جریان هوا، با روغن ایمرسیون و عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ مشاهده شد. در نمونه مثبت، ویروس پلی هدرای هسته ای (NPV)، رنگ نگرفته و سلول‌های چربی برنگ قرمز، در زمینه قرمز مشاهده شد (۹)

۳- **گیمسا:** یک قطره گیمسای غلیظ به مدت ۵ دقیقه روی گسترش‌ها قرار داده و ۳۰ ثانیه به آرامی حرارت داده شدند، پس از شستشو و خشک شدن، گسترشها، با روغن ایمرسیون و عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. با این روش ویروس پلی هدرای سیتوپلاسمی رنگ می‌گیرد اما پلی هدرای هسته‌ای رنگ نگرفته باقی می‌ماند.

ب: تلقیح عامل بیماری به لاروسالم: در این روش مقداری مایع همولنف را از لاروهای آلوده به NPV جمع آوری و در محلول SDS ۰/۰۱ درصد قرار داده و آنها را با پارچه گاز فیلتر کرده و مایع خارج شده از فیلتر را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ نمودیم. رسوب بعضاً شامل پلی هدرا ی ویروس هسته‌ای خالص است. آن را مجدداً در محلول SDS ۰/۰۱ درصد قرار دادیم. در ادامه آنرا به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۲۴۰۰ سانتریفوژ کرده، به این صورت پلی هدرای هسته‌ای جدا گردید که آن را با آب مقطر رقیق نموده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ کردیم. سپس رسوب بدست آمده را مجدداً با آب مقطر رقیق نموده و توسط هموسیتومتر شمارش نمودیم و برگهای توت را با میزان ۷۱۰ عدد پلی هدرا در میلی لیتر آغشته نمودیم و در هوای آزاد خشک کرده و در دسترس لاروهای سالم قرار دادیم (۷،۸).

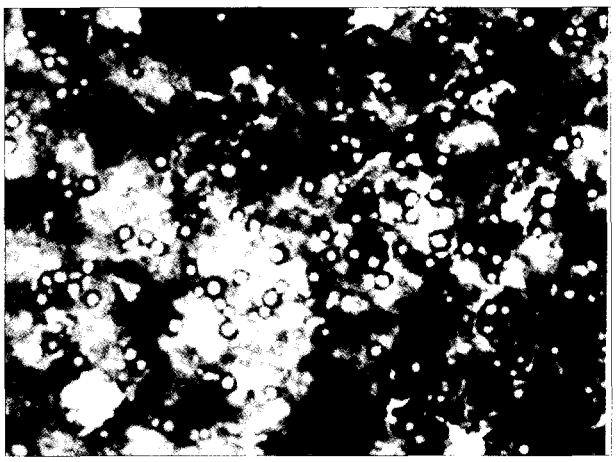
نتایج

تک یاخته‌های جدا شده: در آزمایش لام مرطوب از روده لاروهای تلف شده به میزان فراوان عوامل میکروسپوریدیایی (بغیر از نوزما بومبیسیس ناژلی) جدا شد که با انجام آزمایش‌های تکمیلی عدم حضور تک یاخته نوزما بومبیسیس به اثبات رسید. در آزمایش از تخم، برگ توت و مدفوع لاروهای بیمار هیچگونه میکروسپوریدیا مشاهده نشد. در ادامه این کار DNA میکروسپوریدیاها جدا و تخلیص شده و در آینده با استفاده از روش PCR اقدام به تعیین دقیق جنس تک یاخته‌های مذکور در ایران خواهد شد (تصویر ۱).

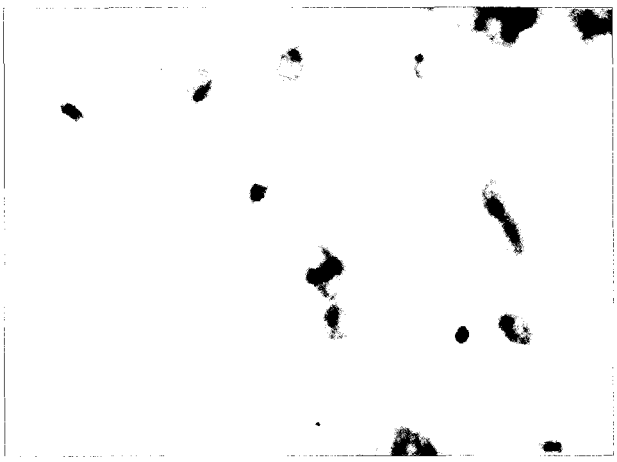
باکتری‌های جدا شده: از نمونه‌های کرم ابریشم کشت داده شده باکتری‌های استرپتوکوک آلفا همولیتیک، استافیلوکوک طلایی، سراتیا مارسسن و باسیلوس تورینژینسیس جدا شد. استرپتوکوک جدا شده دارای همولیز آلفا بود و قند گلوکز و لاکتوز را تخمیر نموده اما اثری بر مانیتول نداشت. آزمایش کمپ این گونه استرپتوکوک مثبت بود و محیط شیر تورنسل دار را اسیدی و لخته نمود. این باکتری قادر به هضم ژلاتین نبود. باسیلوس تورنژنسیس جدا شده از لاروهای کرم ابریشم، متحرک، دارای همولیز کامل، لسیتیناز و ژلاتینوز مثبت و مقاوم به پنی سیلین بود.

قارچ‌های جدا شده: در گسترش مستقیم از روده لاروهای بیمار علاوه بر میکروسپوریدیا، تعدادی مخمر نیز دیده شد که بعضاً در حال جوانه زدن بودند و بر اثر اسید کلریدریک ۳۷ درصد که برای تفریق تشخیصی عامل پبرین از سایر عوامل میکروسپوریدیایی بکار برده شد نیز از بین نرفتند. مخمرهای مذکور پس از کشت در محیط سابورود کستروز آگار ساکارومایسس سرویسیه تشخیص داده شدند.

ویروس‌های جدا شده: در آزمایش‌های ویروسی از تلفات ارسالی، در گسترش مستقیم از لنف با میکروسکوپ نوری، اجسام پلی هدرای چند وجهی درخشان و شناور در بین محتویات لنف وجود داشت. با گسترش از بافت چربی و رنگ آمیزی سودان III نیز پلی هیدرای هسته ای چند وجهی بی‌رنگ و سلول‌های چربی به رنگ قرمز، در زمینه قرمز دیده شد. در رنگ آمیزی



تصویر۱- میکروسپوریدیا جداشده از کرم‌های ابریشم تلف شده.



تصویر۲- (N.P.V) پلی هیدرا ویروس هسته‌ای.

بلود ومتیلن ویروس پلی هدرای هسته‌ای چند وجهی بدون رنگ در زمینه آبی مشاهده شد (تصویر۲).

لازم به ذکر است در ادامه کار اقدام به ایجاد آلودگی تجربی به پلی هدرا ویروس بر اساس روش مشروحه شد و پس از مدت لازم عامل پلی هدروزیس هسته‌ای مجدداً از لاروها جدا شد. بنابراین حضور این ویروس در بیماری‌زایی مورد تایید کامل قرار گرفت (۷،۸،۹).

بحث و نتیجه‌گیری

در ایران تاکنون هیچگونه گزارش جامعی از بیماری‌های کرم ابریشم وجود نداشته است. در بررسی فوق که با همکاری سازمان دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی و موسسه رازی انجام پذیرفت، عوامل مختلف بیماری زا از تلفات ولاروهای آلوده و بیمار کرم ابریشم جدا سازی شد. در مورد نمونه‌های آلوده ارسالی از نوغان داری دوغ آباد علائم ماکروسکوپی مشاهده شده شامل تورم لاروها، حضور رنگ زرد متمایل به قهوه ای و عدم هماهنگی آنها در اندازه بود و همچنین بر روی برخی ازآ نها لکه‌های تیره مشاهده می‌شد. بر اساس گزارش‌های مختلف (۵)علائم مذکور کم و بیش در بیماری پبرین ایجاد شده توسط نوزما بومبیسیس ناژلی نیز مشاهده می‌شود. ازجمله بیماری‌های مهم انگلی کرم ابریشم، بیماری پبرین می‌باشد که عامل آن نوزما بومبیسیس ناژلی از شاخه میکروسپوریدیا بوده و تخم گذر است. نامگذاری پبرین بدلیل ظهور لکه‌های سیاه فلفلی بر روی بدن کرم ابریشم است. این بیماری برای اولین بار بوسیله لویی پاستور، تشخیص داده شد که در مدت صد سال گذشته خسارات فراوانی در صنعت نوغان بر جا گذاشته است. به دلیل آلوده کردن تخم و انتقال آلودگی به نسل بعدی، به هنگام تولید تخم و یا واردات و صادرات آن باید از نظر انجام آزمایش‌های لازم و کنترل بیماری دقت کرد. علاوه بر نوزما هفت نوع میکروسپوریدیای دیگر از خانواده نوزماتیده در آلودگی کرم ابریشم دخالت دارند. ازجمله آنها پلیوستوفورا و تلوهانیا می باشد که در شکل اسپور با نوزما بومبیسیس ناژلی متفاوت هستند و می‌توانند موجب آلودگی تخم نیز شوند(۵،۸). اما از نظر ریخت شناسی در زیر میکروسکوپ نوری مشابه نوزما بومبیسیس ناژلی می‌باشند. خوشبختانه در این نمونه‌ها با انجام آزمایش‌های تکمیلی مشخص شد که میکروسپوریدیاهای مشاهده شده از نوع نوزما بومبیسی‌س نبوده‌اند. پبرین می‌تواند در همه مراحل زندگی کرم ابریشم (۹) تخم، لاروی، پیله و بالغ بیماریزایی داشته باشد. با توجه به مشابهت بیماری‌زایی ایجاد شده توسط نوزما بومبیسیس با آلودگی ایجاد شده توسط سایر عوامل میکروسپوریدیایی و به منظور پیشگیری از بیماری‌های تک یاخته‌ای خصوصاًدر زمان تولید تخم و پروانه مادر، تشخیص آزمایشگاهی بیماری و انجام آزمایش‌های تکمیلی ضروری می‌باشد و از نظر حضور تک یاخته‌ها باید پیوسته کنترل شوند.

در بررسی‌های ویروس شناسی لاروهای تلف شده برخی از علائم ظاهری مشاهده شده، مربوط به بیماری پلی هیدروزیس هسته‌ای یا گراسری بوده که با توجه به سابقه بیماری وآزمایش‌های انجام شده، این بیماری کاملاًتا ییدشد. در بررسی‌های میکروسکوپیک در گسترش‌های تهیه شده از همولنف لاروهای تلف شده در رنگ آمیزی گیمسا، اجسامی چند وجهی (بخصوص شش وجهی) بدون رنگ در زمینه آبی لام مشاهده شدو با توجه به شکل و نحوه رنگ آمیزی، از نوع اجسام پلی هیدرا هسته ای تشخیص داده شدند (۱۰) نمونه‌های مثبت جهت مشاهده وعکس برداری با میکروسکوپ الکترونی به بخش ویروس شناسی حشرات موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارسال شده است.

بر اساس نظر آندرآدیس احتمال انتقال ویروس پلی هیدروزیس هسته‌ای از طریق تخم در حشرات وجود دارد(۱) و این نکته بر اهمیت توجه خاص به این بیماری بخصوص به هنگام تولید، واردات و صادرات تخم کرم ابریشم می افزاید. حضور این عامل در نوغانداریهای استان گیلان توسط جلیلوند و همکاران در سال۱۳۷۵ گزارش گردیده است(۴). باکتری‌های جدا شده پس از انجام آزمایش‌های تکمیلی و بیوشیمیایی، عبارت از استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوک همولیزα، سراتیا مارسسن و باسیلوس تورنژنسیس بودند. خانواده استرپتوکوک و باسیلوس‌ها در بیماری‌های گوارشی و استا فیلوکوک و باسیلوس‌ها خصوصاً سراتیا مارسسن(سپتی سمی سرخ) در بیماری‌های سپتی سمی کرم ابریشم دخالت می‌کنند. بیماری خطرناک سوتو بوسیله

باسیلوس تورینژینسیس ایجاد می‌شود که توکسین دلتای آن با اثر گذاری بر سیستم عصبی کرم ابریشم موجبات مرگ را فراهم می‌کند(۱۲،۱۰،۳). در گسترش مستقیم از روده لاروهای بیمار مخمر ساکارومایسس سرویسیه جدا شد که این قارچ در شرائط نامساعد می‌تواند ایجاد بیماری کند (۲).

تلفات مورد بحث تماما دلالت از شرایط پرورشی و بهداشتی نامناسب، از جمله عدم ضد عفونی مناسب، رطوبت و حرارت نامتعادل در نوغانداری دارد. بهبود روش‌های ضد عفونی، تداوم بهداشت در طول دوره پرورش کاربرد فضا و لوازم مناسب پرورش، ارتقاء تکنیک و کیفیت پرورش، انتخاب گونه‌های کرم ابریشم مقاوم به بیماری‌ها و انتخاب تخم کرم ابریشم تضمین شده می‌تواند تولید موفقی را به همراه داشته باشد. ضد عفونی به منظور از بین بردن عوامل بیماری زا که احتمالا" از دوره قبلی پرورش همراه لوازم و در محیط باقی مانده است، انجام می‌شود. بنابراین برای حفظ محصول نوغان و پیشگیری از بیماری‌ها و قبل از اقدام به پرورش، باید ضد عفونی انجام داد. برای ضد عفونی کردن وسایل نقلیه و کفش افراد، در محل درب ورودی پرورش می‌توان یک گودال، محتوی هیپوکلریت کلسیم قرار داد. افرادی که می‌خواهند مستقیماً با کرم ابریشم کار کنند، باید دست‌ها را تمیز و ضدعفونی کنند. بطور کلی ضدعفونی در زمانیکه لارو در حال پیله بافی، یا در تدارک پیله بافی می‌باشد، نباید انجام شود و می‌توان یک ساعت قبل از تغذیه و نیم ساعت بعد از هر پوست اندازی انجام داد. همچنین در مرحله مورچه گی ضد عفونی در پیشگیری بسیار موثر است. خارج کردن لاروهای بیمار و تلف شده از محیط پرورش و قرار دادن آن‌ها در یک ظرف حاوی مواد ضدعفونی یا انداختن آنها در آتش، در پیشگیری از بیماری می‌تواند بسیار مفید باشد. عبور بخار آب به میزان ۱۰۰ درجه سانتیگراد بیش از ۳۰ دقیقه و ایجاد حرارت ۱۱۰ درجه سانتیگراد بیش از ۳۰ دقیقه و یا شعله افکنی، در ضد عفونی سالن پرورش مفید خواهد بود. برای ضدعفونی تخم می‌توان آنها را در اسید هیدروکلریک گرم فرو برد یا در آب گرم قرار داد. ضد عفونی کننده‌های فیزیکی (حرارت و نور خورشید) نیز می‌توانند برای ضد عفونی سالن پرورش و وسایل بکار برده شود(۹، ۸، ۶). برای ضدعفونی برگ توت از هیدروکسیدکلسیم 2Ca (OH) استفاده می‌شود.. می‌توان از پودر آهک کشته ۹۶ درصد (بصورت دستی) برای محافظت بر علیه بیماری‌ها استفاده کرد. این پودر باید بر روی لارو و بستر درون یک پارچه نازک، ۳-۲ گرم برای ۰/۱ متر مکعب سطح در مراحل اولیه رشد لارو و ۵-۴ گرم برای ۰/۱ متر مربع سطح در مرحلهٔ چهارم و پنجم لاروی بکار برده شود. عمل پاشیدن آهک ترجیحا یک مرتبه بعد از هر پوست اندازی، نیم ساعت قبل از برنامهٔ تغذیه انجام شود. یک آهک پاشی تکمیلی نیز میتواند در چهارمین روز لاروی بعد از تمیز کردن بستر انجام شود. آهک پاشی نباید بهنگام پوست اندازی یا درست پیش از پوست اندازی انجام گیرد(۶).

References

1. Andreadis, T. G. (1987) Transmission. In: Epizootiology of insect Diseases, (Eds. J. R. Fuxa, Y. Tanoda). John Wiley and Sons, NewYourk,USA.159- 176.
2. Anaissie, E. J., Mc Ginis, M. R., Pfaller, M. A. (2003) Clinical Mycology. Churchill Livingstone Philadelphia, USA. pp. 267-268, 559-560.
3. Baron, E. J., Fnegold, S. M. (1990) Diagnostic Microbiology, (3rded.) .Mosby Company, London, UK. 363-375, 333-351, 323-332, 451-456.
4. Ghasemi, B., Khodashenas. M., Jalilvand, I.A. (1996) A report of prevalence of nucleoplasmic disease (polyhedrosis) in silk worms in Guilan province. Pajouhesh - Va- Sazandegi. 32: 82-84.
5. 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 Agricul. Vet. Med. Nihon Univ. 41:25-33.
6. Institute National de Recherch Agronomitue (INRA). (1993) Diseases of Mulberry Silkworm and their control. Blackwell, Lyon, France. pp. 45-84.
7. Kenneth, N. S. (1964) Insect Virology Academic Press 122-134
8. Lee, Y. K. (1998) The Practices of Egg Production, silkworm rearing and diseases control Department of sericulture and entomology. Dijean, Korea. 45-75.
9. Lee, Y. K. (2001) Silkworm Disease and Control. Silkworm disease and pests Dep. Dijean, Korea. pp.3- 25. Food and Agriculture Organization of the United Nations Ministry of Agriculture Islamic Republic of Iran.
10. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop,D. H. L., Ghabrial,S. A., Jarvis, A. W., Martelli,G. P., Mayo, M. A., Summers(eds).M. D. (1995) Viruses taxonomy classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the international Committee on taxon omy of viruses. WienSpringer - Verlag, New York.USA. pp.586.
11. National Institute of Agricultural Science and Technology Blackwell, Yokohama, (NIAST) (2001) Artificial culture of Cordyceps paecylomyces,Seoul, Korea. pp. 20-22.
12. Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donelly, W. G, Leonard, F. C. (2002) Veterinary Microbiology, Microbial Disease. Blackwell Publishing. Oxford, Uk. pp. 44-54, 80-83, 121.

J.Vet.Res. 63, 4:199-202, 2008

STUDY OF MORTALITY AGENTS OF SILK WORMS IN DOUGH ABAD

Iranmanesh, F.[1]*, Nabian, S.[2], Khosravi, A.[3], Zahraei Salehi, T.[4], Moradi, M.[5]

[1]*Iranian Veterinary Organization, Tehran, Tehran-Iran.*

[2]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[3]*Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[4]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[5]*Razi Vaccine and Serum Research Institute, Tehran- Iran*

(Received 8 March 2006 , Accepted 10 March 2007)

Abstract:

For investination of causes of silkworm mortality, the sick larva specimens in different levels of growth examined for parasite, viral,fungal and bacterial diseases. The samples included some dead larva and bed materials contained eggs, leaves and stool which were examined ordinary diagnostic methods. The complementary tests were also used for all cases. In wet smear prepared from intestine wall, a kind of protozoa spore of Microsporidia phylum was observed that was not the agent of pebrin disease, and some budding cells (yeasts) were seen as well, which identified as *Saccharomyces cerevisiae*. There were many polyhedra forms in smears of hemolynph that were stained with methylen blue dying and seen with ordinary microscope, diagnosed as Polyhedrosis or Grasserie disease (NPV). for the purpose of diagnostic reconfirmation, the polyhedra was injected to healthy larva. The bacterial agent including *Streptococcus* (δ)*Hemolytica* as digestive tracts disease agent, *staphylococcus aureus*, and *Serratia marcescen* as septicemia agents and *Bacillus turingensis* the agent of Sotto disease, were separated. In general the incidence of these diseases showed the unsuitable conditions in sericultures that can be depends on poor disinfection, lack of proper feeding and deficiency of temperature and humidity. Improvement in rearing techniques, using of appropriate rearing room and equipments, maintenance of hygienic conditions during rearing, improvement of disinfection methods, the quarantine of the silkworm seeds and using of resistant varieties of silkworm to diseases can decrease out-breaks.

Key words: Silkworm, hemolynph, pebrim, polyhedrosis,sotto disease.

***Corresponding author's email:iranmaneshsilk@yahoo.com, Tel: 021-61117045-09123067747, Fax: 021-66933222**

Tel :