

مطالعه آسیب‌شناسی و مولکولی سندروم ویروس تورا (Taura Syndrome)

Virus در میگوی پاسبفید (*Litopenaeus vannamei*) در ایران

محمد افشارنسب^{۱*}، سیدعباس عارف‌زاده^۲، سیدرضا مرتضایی^۳، عقیل دشتیان‌نسب^۴، الهام جرفی^۳

چکیده

بدلیل بروز سندرم تورا تلفات انبوهی در میگوی پاسبفید پرورشی در جنوب تایوان اتفاق افتاد. تصور می‌شود که سندرم تورا توسط پست لاروها و مولدهای میگوهای پاسبفید آلوده به تایوان انتقال یافته است. این اولین گزارش سندرم تورا در آسیا می‌باشد (۱۹، ۴). در ادامه میگوی پاسبفید به کشورهای زیادی از جمله فیلیپین (۱۹۹۷)، تایلند (۱۹۹۸)، اندونزی و ویتنام (۲۰۰۰)، مالزی و هند (۲۰۰۱) و میانمار و بنگلادش معرفی شد، که در برخی موارد مجوز رسمی وجود نداشت (۲۰، ۱۷، ۵). دلیل اصلی واردات میگوی پاسبفید به آسیا بازده ضعیف، رشد کم و حساس بودن گونه‌های میگوی پرورشی اصلی و بومی به بیماری بیان شده است (۲). با واردات میگوی پاسبفید به مناطق جدید، تعدادی بیماری ویروسی مثل سندرم تورا به این کشورها وارد شد. پس از گزارش سندرم تورا در تایوان، گزارش‌هایی از تایلند، مالزی و اندونزی نیز از این بیماری در میگوهای وارداتی واصل گردید (۱۳، ۱۶). این بیماری اغلب تلفات ۸۰ تا ۸۵ درصدی را در میان جمعیت استخر آلوده میگوی پاسبفید پرورشی باعث می‌شود (۸). سندرم تورا در دو مرحله و با نشانه‌های ظاهری مشخص، رخ می‌دهد. اولین مرحله حاد که بوسیله قرمز شدن دم و نکروز بافت اپیتلیوم که از نشانه‌های ظاهری بیماری بوده مشخص می‌شود و در آسیب‌شناسی آن گنجیدگی‌های ائوزینوفیلی تا بازوفیلی را می‌توان ملاحظه نمود. اگر میگو زنده بماند وارد مرحله مزمن شده که بوسیله آثار تیره

در سال ۱۳۸۶ تلفات زیادی در میگوهای جوان گونه پاسبفید در بسیاری از مزارع پرورش میگوی سایت دلوار در استان بوشهر واقع در جنوب ایران اتفاق افتاد. نشانه ظاهری میگوهای بیمار و در حال مرگ قرمزی سطح بدن، دم و زواید حرکتی بود. روده میگوها خالی و نواحی نکروزه در دم و زواید حرکتی مشاهده گردید. تعداد ۲۰۰ نمونه از میگوهای بیمار جمع‌آوری و در فیکساتور دیویدسون جهت بررسی آسیب‌شناسی قرار داده شد. همچنین بخشی از اندام حرکتی میگوها در الکل ۹۵٪ برای مطالعات مولکولی نگهداری گردید. نتایج حاصل از مطالعات آسیب‌شناسی شامل نکروز چند کانونی در اپیتلیوم کوتیکول و اکثر بافتهای پیوندی زیر کوتیکول و گاهی ماهیچه‌های منحطه اصلی بوده و گنجیدگی‌های کروی و متعدد در نواحی تحت تاثیر قرار گرفته بافت کوتیکول پراکنده شده بودند. این اجسام گنجیدگی کروی در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین/فلوکسین (H&E/Ph) رنگ ائوزینوفیلی تا بازوفیلی نشان دادند. این گنجیدگی‌ها در روده انتهایی و معده نیز مشاهده گردید. این علائم نشان دهنده فرم حاد سندرم تورا در نمونه‌ها بود. همچنین نمونه‌ها با کیت IQ2000™ WIT Multivir System for TSV, IHNV and WSSV و کیت IQ2000™ Detection and Prevention for TSV با استخراج RNA مربوطه جهت ردیابی سندرم تورا بررسی شدند. نتایج PCR مثبت بودن ویروس سندرم تورا را در نمونه‌ها نشان داد. بر اساس نتایج بدست آمده وجود سندرم تورا در نمونه‌ها اثبات گردید.

واژگان کلیدی: ویروس سندروم تورا، میگوی پاسبفید، آسیب‌شناسی، مطالعات مولکولی، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۳

مقدمه

اولین محموله مولدین میگوی پاسبفید از آمریکا به آسیا در سال ۱۹۹۶ و از هاوایی به کشور تایوان وارد گردید (۲۰).

*-موسسه تحقیقات شیلات، تهران، ایران (mafsharnasab@yahoo.com)

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، اهواز، ایران

۳- مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش آبزیان جنوب کشور، اهواز، ایران

۴- پژوهشگاه میگوی کشور، بوشهر، ایران

به نام‌های IQ2000™ WIT Multivir System for TSV, IHHNV and WSSV و کیت IQ2000™ Detection and Prevention System for TSV (Farming شرکت از IntelliGene Tech. Corp., Taiwan) استفاده گردید. بر اساس دستورالعمل کیت‌ها که اختصاصاً برای میگوی پاسفید ساخته شده است ابتدا RNA نمونه‌ها را استخراج و بر اساس دستورالعمل کیت IQ2000™ WIT Multivir نسبت به اجرای روش RT-PCR و سپس هیبریداسیون و رنگ‌آمیزی اقدام شد و برای کیت IQ2000™ Detection and Prevention System for TSV نسبت به اجرای روش Nested-PCR اقدام گردید.

نتایج

نشانه‌های ظاهری سندرم تورا

میگوهای آلوده به سندرم تورا پوست نرم و رنگی متمایل به قرمز داشتند. رنگ قرمز در کوتیکول همچنین در دم و زواید حرکتی مشاهده گردید، و در این مناطق نواحی نکروز قابل رویت بودند (نگاره ۱). تعدادی از میگوهای بیمار لکه‌های ملانوزه نیز در سطح بدن داشتند که نشان دهنده حالت مزمن بیماری بود (نگاره ۲).



نگاره ۱- دم پروانه میگوی پاسفید پرورشی که بوسیله سندرم تورا آلوده شده است. پیکان‌ها نقاطی که رنگ قرمز و نکروز دارند را نشان می‌دهد.

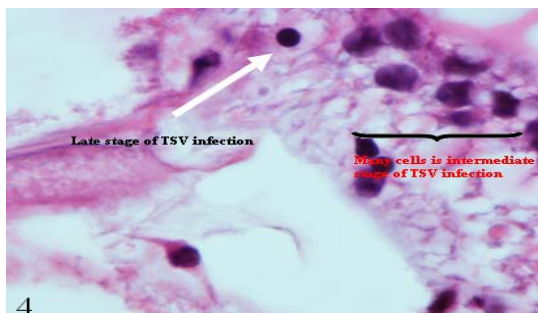
کوتیکولی (ملانوزه) در جائیکه نکروز در مرحله حاد رخ داده است مشخص می‌شود (۶).

اولین محموله میگوی پاسفید در اواخر سال ۱۳۸۳ به منظور تحقیق و ایجاد تنوع گونه ای توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران وارد و در مدت دو سال پژوهش (۱۳۸۳ و ۱۳۸۴)، پتانسیل پرورش آن مورد بررسی قرار گرفت و پرورش دهندگان این گونه را بجای گونه سفید هندی از سال ۱۳۸۵ در چرخه پرورش وارد نمودند. این مطالعه به منظور بررسی مرگ و میر ناشی از سندرم تورا در مزارع پرورشی میگوی پاسفید در سال ۱۳۸۶ در استان بوشهر انجام گردیده است.

مواد و روش کار

در این بررسی، ۲۰۰ نمونه از میگوهای بیمار مزارع پرورشی میگوی پاسفید سایت دلوار استان بوشهر جمع آوری گردید. نمونه‌های جمع آوری شده از نظر نشانه‌های ظاهری بررسی و علائم ظاهری آنها ثبت گردید و سپس در ماده فیکساتور دیویدسون به منظور بررسی آسیب‌شناسی فیکس شدند. فیکساتور با یک سرنگ یکبار مصرف در مناطق مختلف بدن همانند هپاتوپانکراس، سرسینه و ناحیه شکمی تزریق شد. پس از تزریق فیکساتور، توسط قیچی در سطح کوتیکول از ششمین بند شکمی تا پایه روستروم شکاف داده شد و نمونه‌ها در محلول فیکساتور قرار داده شدند. میگوها در فیکساتور در دمای اتاق بمدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس آنها به اتیل الکل ۷۰-۵۰ درصد منتقل و برای مطالعه آسیب‌شناسی بر اساس روش Bell و Lightner (۱۹۸۸) و رنگ‌آمیزی H&E/Ph آماده شدند.

بخش کوچکی از اندام حرکتی میگوهای بیمار جمع آوری شده نیز در اتیل الکل ۹۵ درصد به منظور بررسی مطالعات مولکولی نگهداری شدند. به منظور مطالعه آلودگی نمونه‌ها به ویروس سندرم تورا توسط مطالعات مولکولی، از دو کیت تجاری PCR



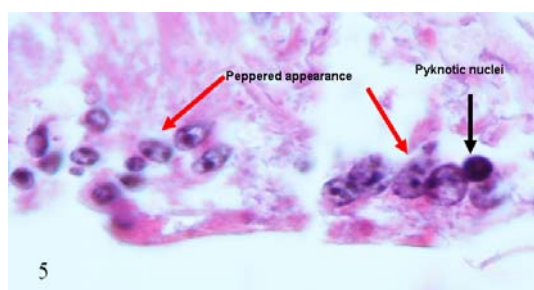
نگاره ۴- یک گنجیدگی آبی رنگ متراکم (پیکان) در اپیتلیوم دیده می‌شود، در حالی که سایر سلول‌ها در مرحله میانی آلودگی سندرم تورا می‌باشند (H&E, X1600).



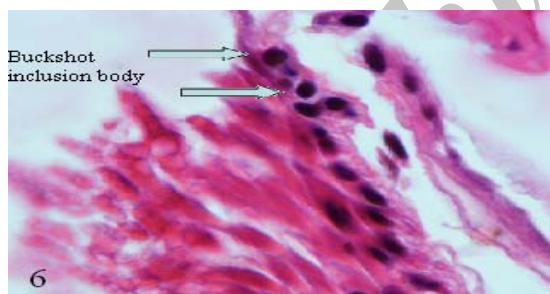
نگاره ۲- لکه‌های تیره رنگ روی بدن میگو (پیکان‌ها) حاکی از مرحله مزمن بیماری در میگوی پاسفید است (پیکان).

آسیب‌شناسی

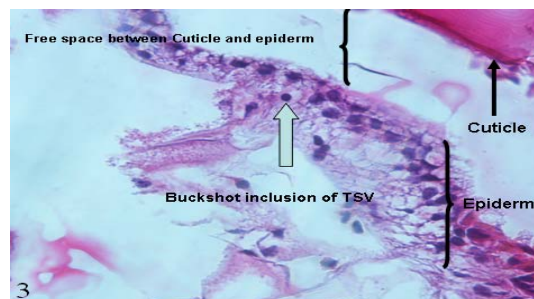
مطالعه مقاطع میکروسکوپی تهیه شده نشان داد که آلودگی سندرم تورا باعث جدا شدن اپیتلیوم بافت‌های کوتیکول در سطح پوست و معده شده و فضای آزادی بین کوتیکول و اپیتلیوم ایجاد گردیده است (نگاره ۳). سلول‌های اپیتلیوم متورم و هیپرتروفی شده و گنجیدگی‌های کروی زیادی به قطر $15\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$ از ائوزینوفیلی تا بازوفیلی دیده شدند (نگاره ۳ و ۴). سلول‌های آلوده در جراحات به شکل گرد و ساچمه‌ای دیده شده و بافت اصلی که اجسام گنجیدگی را نشان داد، اپیتلیوم کوتیکول و معده و زواید حرکتی بود که پیکنوز هسته سلول‌ها در آن مشخص شد (نگاره ۵). در نقاط آسیب دیده، اجسام کروی بازوفیلی دیده شده که این اجسام کروی گنجیدگی‌های سیتوپلاسمی سلول‌های نکروز شده می‌باشند و در آنها هسته‌های پیکنوزه و کاریورکسی شده نیز دیده شده که در پاره‌ای مواقع به بافت عضلانی نیز کشیده شده بود (نگاره ۶).



نگاره ۵- سلول‌های ائوزینوفیلی روشن تا بازوفیلی متراکم در اپیتلیوم که مرحله مزمن بیماری سندرم تورا را نشان می‌دهد. یک سلول پیکنوز با رنگ بازوفیلی غلیظ نیز مشاهده می‌شود (H&E, X1600).

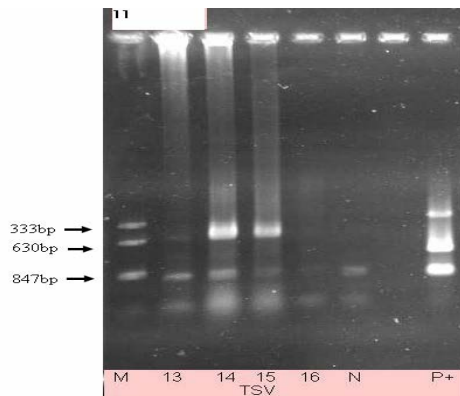


نگاره ۶- سلول‌های ماهیچه زیر اپیتلیوم دارای تعداد زیادی گنجیدگی‌های گرد مربوط به سندرم تورا می‌باشند (H&E, X1600): Polymerase Chain Reaction



نگاره ۳- در اپیتلیوم زیر کوتیکول معده میگوی پاسفید آلوده شده به مرحله حاد سندرم تورا، کوتیکول از اپیدرم جدا شده و برخی سلول‌ها گنجیدگی بازوفیلی گرد (پیکان سفید) را نشان می‌دهند (H&E, X400).

بر طبق دستورالعمل IQ 2000™ WIT Multivir System هنگامیکه هیبریداسیون و کنترل رنگ (coloration control) و کنترل داخلی (internal control) (یا هر دو) مثبت بوده و علامت بر روی موقعیت سندرم تورا باشد، نمونه‌ها نسبت به سندرم تورا مثبت هستند (نگاره ۷ و ۸). نمونه‌های میگوی



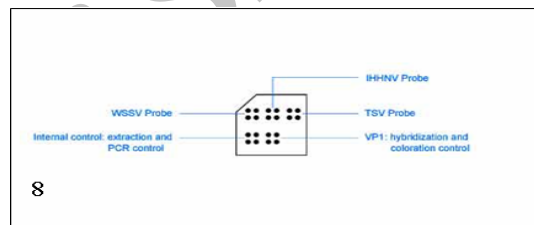
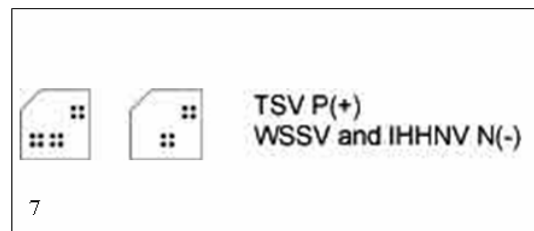
نگاره ۱۱- نتایج حاصل از Nested PCR IQ 2000TM مثبت بودن بیماری را در نمونه‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ میگوی پاسبید پرورشی نشان می‌دهد.

بحث

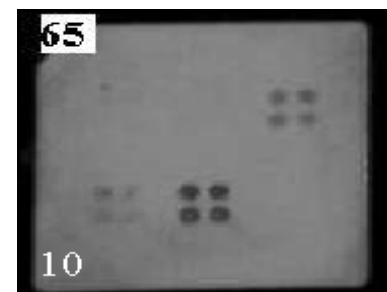
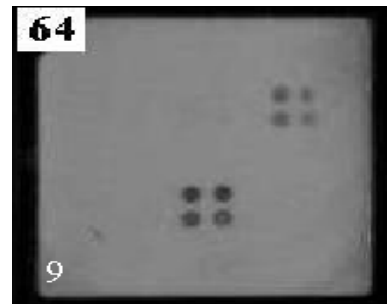
سندروم تورا که برای اولین بار در اکوادور در سال ۱۹۹۲ شناخته شد (۹) یکی از مهمترین بیماری‌هایی است که باعث خسارت در مزارع میگوی پاسبید می‌شود. در آغاز تصور می‌شد که یک عامل سمی موجب بروز بیماری می‌شود، اما سرانجام نشان داده شد بیماری ناشی از یک عامل ویروسی می‌باشد، که آن را سندروم ویروس تورا (سندرم تورا) نامیدند (۸) این ویروس در ابتدا در خانواده پیکورناویریده طبقه بندی شد (۳، ۸) اما بعدها در خانواده دسیستروویریده قرار گرفت (۱۲).

در سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ پرورش میگو در ایران با سندروم ویروسی لکه سفید روبرو شد (۱۸) و تلفات سنگینی در مزارع پرورش میگوی ایران روی داد و موسسه شیلات ایران اقدام به واردات گونه پاسبید نمود. بطور کلی گفته شده که میگوی پاسبید در برابر بیماریها مقاوم تر از دیگر میگوها می‌باشد. در حال حاضر آشکار شده که معرفی، ایجاد و گسترش پاتوژن جانوران آبی در نواحی جدید جغرافیایی به میزان زیادی به دلیل نقل و انتقالات و جابجایی‌های میگو و جانوران آبی می‌باشد (۲) گمان می‌رود که بی‌دقتی در واردات میگوی پاسبید مثل ورود از منابع غیر معتبر و فاقد

پاسبید همانگونه که در نگاره ۹ و ۱۰ دیده می‌شود دارای چنین حالتی بوده و در این بررسی مثبت بوده و حاوی ویروس هستند. نتایج حاصل از کیت IQ2000TMDetection Nested-PCR and Prevention System for TSV به روش نیز برای این نمونه‌ها مثبت بوده و وجود ویروس در آنها تایید می‌گردد (نگاره ۱۱).



نگاره‌های ۷ و ۸- یک Multivir biochip که مثبت بودن سندرم تورا را در triple virus نشان می‌دهد.



نگاره‌های ۹ و ۱۰- نتایج بدست آمده از کیت IQ 2000TM WIT Multivir System بر روی میگوی پاسبید که مثبت بودن بیماری را به روش RT-PCR در نمونه‌ها نشان می‌دهند.

میگوها از مرحله حاد نجات یابند وارد مرحله مزمن شده که در این مرحله علیرغم اینکه میگوها مرگ و میری نداشته و یا اینکه بروز مرگ و میر در آنها بسیار کم است، اما ناقل و بروس بوده و چنانچه به مزارع پرورشی دیگری منتقل شوند ممکن است در اثر بروز استرس موجب گسترش ویروس در سطح مزارع شده و باعث بروز بیماری گردند. لذا توصیه می‌شود در مزارعی که فرم مزمن سندرم تورا مشاهده گردیده از نقل و انتقال میگوها خودداری نموده و همچنین آب خروجی چنین مزارعی وارد سایر استخرها نگردد.

در میان روش‌های شناسایی سندرم تورا، در گزارش بیماری جانوران آبی (*Quarterly Aquatic Animal Disease Report, 2007*) و *WIT Multivir System IQ2000™* در گزارش نشست انجمن استاندارد سلامت جانوران آبی در سال ۲۰۰۷ (*Report of the meeting of the OIE, ۲۰۰۷*) در سال ۲۰۰۷ (*Report of the meeting of the OIE, ۲۰۰۷*)، روش *IQ 2000™ Kit* برای شناسایی ویروسها در مزارع میگو مورد تایید قرار گرفت. نتیجه بدست آمده از کیت PCR نیز نشانه‌های ظاهری و هیستوپاتولوژی بدست آمده از آلودگی بیماری سندرم تورا در ایران را تایید می‌کند، بنابراین توصیه می‌شود قبل از واردات گونه پاسبید به کشور با استفاده از کیت‌های PCR نسبت به عدم حضور ویروس مطمئن شده و سپس به واردات آن اقدام گردد.

ایران پیشینه کوتاهی در معرفی گونه‌های جدید در پرورش میگو دارد و کشورهای دیگر همانند تایلند، ایالات متحده، مالزی و دیگر کشورها برای مدیریت بهتر گونه‌های غیر بومی دارای قوانین و مقرراتی ویژه‌ای هستند. لذا پیشنهاد می‌شود که دست اندرکاران ایرانی برای گسترش پرورش گونه‌های غیر بومی در کشور ضمن به کارگیری این اطلاعات از تجربه این کشورها نیز بهره‌مند گردند. همچنین به منظور بررسی همه جانبه اثرات این گونه‌ها بر روی محیط طبیعی مناطق پرورش و همچنین گونه‌های بومی و تأثیری

مجوز و یا واردات میگوهای آلوده دلیل اصلی پیدایش سندرم تورا در پرورش میگوی ایران می‌باشد. مشابه چنین اتفاقی در تایلند در بین سالهای ۲۰۰۲-۲۰۰۱ روی داد که بر اثر میگوهای آلوده وارداتی پاسبید از تایوان و چین که به منظور آبی پروری صورت گرفته بود، سندرم تورا در این کشور موجب تلفات بالائی در میگوهای پرورشی گردید (۱۳، ۷).

نتایج بدست آمده در این تحقیق در خصوص بیماری سندرم تورا همانند گزارش‌های دیگر محققان بود. مطالعات پیشین نشان داد نشانه‌های ظاهری میگو در مرحله حاد سندرم تورا بوسیله بیحالی، شنای نامنظم، معده خالی، ساختمان عضلانی کدر، و به پهلو خوابیدن پیش از مرگ مشخص می‌شود. بیشتر میگوهای مرده و در حال مرگ پوسته نرم دارند که نشان می‌دهد که پوست اندازی صورت گرفته است (۶، ۱۱، ۸). این موضوع همان‌گونه که در نگاره ۳ آورده شده است، نشان دهنده جدا شدن کوتیکول از لایه اپیدرم می‌باشد. شاید یکی از مهمترین دلایل مرگ و میر میگوها در سندرم تورا در مرحله پوست اندازی ناشی از تائیراتی است که ویروس در سطح اپیتلیوم میگوها و در زیر کوتیکول ایجاد می‌نماید و مانع از ارتباط اپیتلیوم به کوتیکول شده و در نهایت تغییرات فشار اسمزی موجب مرگ میگوها می‌شود. همچنین با توجه به اینکه مهمترین بافت مورد هجوم ویروس بافت اپیتلیوم میباشد، و مشاهدات حاصل از این بیماری که میگوها در مرحله پوست اندازی تلف می‌شوند، نظریه فوق را تایید می‌کند.

سندرم تورا در دو مرحله با نشانه‌های ظاهری قابل رویت روی می‌دهد بطوریکه مرحله حاد این بیماری که در میان میگوهای نوجوان (۰/۱-۵g) میگوی پاسبید در ظرف مدت ۲-۴ هفته پس از ذخیره‌سازی در نرسری و یا استخرهای (یا تانک) پرورش روی می‌دهد (۱۰) در بروز مرحله حاد یا تحت حاد سندرم تورا، تلفات انبوهی در ظرف مدت ۵ تا ۷ روز پس از شروع بیماری اتفاق می‌افتد (۱۰، ۶). چنانچه

- 6- Flegel, T.W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258:1-33
- 7- Flegel, T W, Nielsen, L, and Sang-oum, W.(2003). Outbreaks of Taura syndrome virus with exotic *Penaeus vannamei* cultivated in Thailand. In JSPS-NRCT international symposium on comprehensive disease control in aquaculture coping with food safety (Anon., ed) pp. 16-22, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Rayong, Thailand Flegel, T.W(2006) Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*.Vol 258: 1-33.
- 8- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Poulos, B.T., Redman, R.M., White, B.L., Brock, J.A. and Bonami. J.R. (1995). Taura Syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Dis Aquat Org* 23:115-126.
- 9- Jimenez, R. (1992). Sindrome de Taura (Resumen) *Aquaculturael Ecuador. Rev Especial Camara Nac. Acuacult*1, 1-16.
- 10- Lightner DV, Redman RM.(1994). Histopathology and ultrastructural studies of Taura syndrome, a putative toxicity syndrome of penaeid shrimp. In: Book of abstracts, World Aquaculture '94, January 14-18, New Orleans, LA. World Aquaculture Society, Louisiana State Univ, Baton Rouge, 227.
- 11- Lightner, D.V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- 12- Mayo, M.A. (2005). Changes to virus taxonomy, *Arch. Virol.* 150 (2005), 189-198.
- 13- Nielsen, L, Sang-oum, W, Cheevadhanarak, S, and Flegel, TW.(2005). Taura syndrome virus in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americans, *Dis. Aquat.Org* 63, 101-6.
- 14- Quarterly Aquatic Animal Disease Report (Asia and Pacific Region), 2007/4, October-December (2007). NACA: Bangkok, Thailand.

که ممکن است بر روی تنوع گونه‌ای داشته باشد پیشنهاد میشود تحقیقات جامعی در این زمینه ها صورت گرفته و سپس به توسعه آنها اقدام شود.

سپاسگزاری و تشکر

از جناب آقای دکتر عباسعلی مطلبی ریاست موسسه تحقیقات شیلات ایران، دکتر جاسم مرمضی رئیس مرکز تحقیقات آبی پروری جنوب کشور(اهواز)، دکتر خسرو آیین جمشید رئیس پژوهشکده میگوی کشور بدلیل حمایت مالی و راهنمایی‌های ارزنده در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از پرسنل بخش بهداشت و بیماری‌های آبیان مرکز تحقیقات آبی پروری جنوب کشور(اهواز) و پژوهشکده میگوی کشور تقدیر و تشکر می‌شود.

فهرست منابع

- 1- Bell, T.A. and D.V. Lightner. (1988). A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- 2- Briggs, M., Fung-Smith, S., Subasainghe, R, and Michael, P. (2004). Introduction and movement of *penaeus vannamei* and *penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific.FAO.RAP Publication 2004/10.
- 3- Bonami, J.R., Hasson, K.W., Mari, J., Poulos, B.T, and Lightner, D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: Characterization of the viral agent. *Journal of General Virology* 72:313-319.
- 4- Chien, T,H., Huang, T., Chang, S.H., Hsu, J.P., S.T. Kuo., N.J.Li., T.L. Hsu., m.c.Li and Lin., S.Y. (1999) S.Y.Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis.Aquatic. Org.* 38;159-161.
- 5- Fegan, D. (2002). Is vannamei fever sustainable in Asia? *Global Aquaculture Advocate*, December 2002,,: 15-16.

- 15- Report of the meeting of the OIE aquatic animal health standard commission .(2007). Parise 20-25 May 2007
- 16- Tang, K F J, and Lightner, D V.(2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants, *Virus Research* 112, 69-76.
- 17- Taw, N., Srisombat, S. and Chandaeng, S. (2002). *L. vannamei* trials in Indonesia. *Global Aquaculture Advocate*, December 2002, 20-22.
- 18- Tokhmafshan, M., Akbari., S., Tamjidi, B., Laloi. F. and Soltani, M. (2004) Occurrence of white spot syndrome virus disease in farmed *penaeus indicus* in Iran. *Applied Fisheries & Aquacultutr* Vol. IV(1) 200,442-47.
- 19- Tu, C., Huang, H.T., Chuang, S.H., Hsu, J.P., Kuo, S.T., Li, N.J., Hsu, T.L., Li, M.C. and Lin. S.Y. (1999). Taura Syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org* 38: 159-161.
- 20- Wyban, J. (2002). White shrimp boom continues. *Global Aquaculture Advocate*, December 2002, 18-19.