وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

عنوان :

بررسی امکان تهیه واکسن غیر فعال جهت پیشگیری بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از روشهای هسته‌ای و غیرهسته‌ای در میگو سفید هندی

مجری مسئول:
محمد افشار نسب

شماره ثبت
۹۰/۳۱۲

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

عنوان پروژه مشترک: بررسی امکان تهیه واکسن غیر فعال جهت پیشگیری بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از روشهای هسته‌ای و غیرهسته‌ای در میگو سفید هندی
شماره مصوب : ۸۸۰۰۶-۱۲۵۲-۱۴-۳۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمد افشار نسب
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد): محمد افشار نسب
نام و نام خانوادگی مجریان : محمد افشار نسب(موسسه تحقیقات شیلات ایران) - فرحناز معتمدی سده(پژوهشکده کشاورزی،پزشکی و صنعتی پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای)
نام و نام خانوادگی همکاران : سید رضا مرتضائی – عقیل دشتیان نسب- الهام جرفی – وحید یگانه – محمدسعید گنجور-اله کرم محمدی– بهروز قره ی – خلیل پذیر – قاسم غریبی – آرمین عابدیان
نام و نام خانوادگی مشاوران : -
محل اجرا : استان تهران
تاریخ شروع : ۸۸/۱/۱
مدت اجرا : ۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات شیلات ایران
شمارگان (تیتراژ) : ۲۰ نسخه
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۰
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : بررسی امکان تهیه واکسن غیر فعال جهت پیشگیری بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از روشهای هسته‌ای و غیرهسته‌ای در میگو سفید هندی

کد مصوب :۸۸۰۰۶-۱۲۵۲-۱۴-۳۴

شماره ثبت(فروست): ۹۰/۳۱۲ تاریخ :۹۰/۳/۲۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد افشارنسب دارای مدرک تحصیلی دکترا تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۱۳۸۹/۱۲/۲۵ مورد ارزیابی و با نمره ۱۹ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت هیئت علمی مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۳
۱-۱- اهداف اصلی پروژه ۷
۱-۲- آشنائی با بیماری لکه سفید ۸
۱-۳- واکسن‌ها ۳۳
۱-۴- کاربرد روش‌های هسته‌ای در تهیه واکسن‌های غیرفعال شده ۳۷
۱-۵- اثر پرتوهای یونساز بر روی میکروارگانیسم ها ۴۰
۲- مواد و روش ها ۴۶
۲-۱- راه اندازی آزمایشگاه تحقیقات آبزیان در پژوهشکده کشاورزی, پزشکی و صنعتی کرج ۴۶
۲-۲- روش استفاده از کیت تجاری IQ2000 TM ۵۴
۲-۳- تهیه استوک ویروس لکه سفید از بافت میگوهای آلوده ۵۷
۲-۴- تهیه کرای فیش ۵۹
۲-۵- تائید غیرآلوده بودن خرچنگها با آزمون Nested –PCR ۶۰
۲-۶- آلوده سازی کرای فیش با استوک ویروسی تهیه شده ۶۰
۲-۷- استخراج DNA از همولنف خرچنگ ۶۱
۲-۸- تخلیص ویروس ۶۴
۲-۹- مشاهده ویروس با میکروسکوپ الکترونی ۶۶
۲-۱۰- .لیوفیلیزاسیون ویروس لکه سفید میگو ۶۷
۲-۱۱- تیتراسیون ویروس لکه سفید در میگو ۶۷
۲-۱۲- دزیمتری و پرتوتابی نمونه های ویروس سندرم لکه سفید ۶۹
۲-۱۳- پرتوتابی نمونه ها با دز مطلوب ۷۱
۲-۱۴- غیرفعال سازی ویروس با فرمالین ۷۱
۲-۱۵- تهیه و تائید باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ۷۱
۲-۱۶- لیوفیلیزلسیون باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ۷۲
۲-۱۷- تعیین Colony FormingUnit (CFU) باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ۷۳
۲-۱۸- پرتودهی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ۷۳

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۱۹-۲- تایید غیرفعال سازی ویروس لکه سفید ۷۴
۲۰-۲- محرکهای ایمنی ۷۶
۲۱-۲- واکسیناسیون گروههای میگو به روش تزریقی ۷۷
۲۲-۲- واکسیناسیون گروههای میگو به روش حمامی ۸۰
۲۳-۲- آزمون چلنج ۸۱
۳- نتایج ۸۳
۱-۳ نتیجه تعیین آلودگی نمونه های میگوهای به بیماری لکه سفید با روش Nested PCR: ۸۳
۲-۳- نتیجه تائید عدم آلودگی خرچنگها با آزمون PCR ۸۴
۳-۳- نتیجه آلوده سازی کرای فیش با استوک ویروسی تهیه شده ۸۵
۴-۳- نتیجه تخلیص ویروس سندرم لکه سفید ۸۸
۵-۳- نتیجه مشاهده ویروس با میکروسکوپ الکترونی ۹۰
۶-۳- نتیجه ویروس لیوفیلیزه شده ۹۱
۷-۳- نتیجه تعیین تیتر ویروس فعال پرتوتابی نشده ۹۲
۸-۳- نتیجه تعیین تیتر نمونه های ویروسی پرتوتابی شده با دزهای متفاوت پرتو گاما ۹۳
۹-۳- نتیجه تعیین دز بهینه پرتو گاما جهت غیرفعال سازی کامل ویروس سندرم لکه سفید ۹۸
۱۰-۳- نتیجه تعیین دز بهینه الکترون جهت غیرفعال سازی کامل ویروس سندرم لکه سفید ۹۹
۱۱-۳- پرتوتابی نمونه ها با دز بهینه ۱۰۰
۱۲-۳- نتیجه غیرفعال سازی ویروس با فرمالین ۱۰۰
۱۳-۳- نتیجه تائید سوش باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس و تعیین واحد تشکیل دهنده کلنی آن.....۱۰۱
۱۴-۳- نتیجه غیرفعال سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس ۱۰۲
۱۵-۳- نتیجه تائید غیرفعال سازی ویروس با پرتوهای گاما, الکترون و فرمالین ۱۰۳
۱۶-.۳- نتیجه آزمون مواجهه اول ۱۰۴
۱۷-۳- نتیجه آزمون مواجهه دوم.....۱۱۰
۱۸-۳- تعیین درصد تلفات و درصد نسبی بقا در گروههای میگو واکسینه شده به روش تزریقی ۱۱۵
۱۹-۳- تعیین درصد تلفات و درصد نسبی بقا در گروههای میگو واکسینه شده به روش حمامی ۱۱۶
۴- بحث و نتیجه گیری ۱۱۷
۱-۴- غیرفعال سازی باکتری ویبریو با استفاده از پرتو گاما.....۱۱۷

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۲-۴-تکثیر ویروس لکه سفید ۱۲۰

۳-۴- غیرفعال سازی ویروس لکه سفید با پرتو گاما ۱۲۱

۴ -۴- کارایی رادیوواکسن (گاما) بر ضد لکه سفید در میگو ۱۲۱

۵-۴- کارائی فرمالین بر ضد ویروس لکه سفید ۱۲۲

۵- نتیجه گیری ۱۲۴

پیشنهادها ۱۲۶

منابع ۱۲۸

پیوست ۱۳۱

چکیده انگلیسی ۱۴۰

چکیده

به منظور بررسی غیر فعال سازی ویروس بیماری لکه سفید با استفاده از پرتوهای یونساز گاماو بیم الکترون و همچنین ماده شیمیائی فرمالین با حفظ خاصیت آنتی ژنتیکی ویروس، ابتدا اقدام به تهیه منبع ویروس و خالص سازی آن گردید. سپس نسبت به تهیه ۱۰۰۰ عدد میگوی ۷تا ۱۲ گرمی از مرکز پرورش میگوی پژهشکده میگوی کشور واقع در حله نموده و آنها را به آزمایشگاه منتقل و آداپته نمودیم. سپس نسبت به غیر فعال سازی باکتری ویبریو پاراهمولیتکوس با استفاده از فرمالین و پرتوهای یونساز گاما و الکترون اقدام و به میگوهای مورد آزمایش تزریق تا موجب تحریک سیستم ایمنی میگوها گردد. منبع ویروس تهیه شده را با شناسائی ویروس بیماری لکه سفید از همه گیری که در سال ۱۳۸۶ در استان بوشهر اتفاق افتاده بود و با استفاده از روشهای مولکولی و آسیب شناسی و میکروسکوپ الکترونی اقدام و با تزریق به خرچنگ دراز آب شیرین نسبت به تهیه منبع ویروس اقدام گردید. سپس ویروس تهیه شده را لیوفلیزه نموده و تعیین تیتر نمودیم و تیتر ویروس را در دو حالت پرتوتابی شده و پرتوتابی نشده محاسبه گردید. ویروسهای پرتوتابی شده را تعیین د.ز نموده و سپس آنها را با استفاده از پرتوهای گاما، الکترون و فرمالین و با تعیین دوز مطلوب غیر فعال نمودیم. سیستم ایمنی میگوها را با استفاده از تزریق باکتری غیر فعال شده ویبریو پاراهمولیتیکوس که قبلا لیوفلیزه شده تحریک نموده و سپس میگوها را به ۶۰ گروه پانزده تائی تقسیم نمودیم. منابع ویروسی پرتوتابی شده را که به عنوان واکسن میباشند به صورتهای مختلف حمام و تزریقی در میگوها موردآزمایش قرار داده و اطلاعات لازم ثبت گردید. نتایج نشان داد ویروس بیماری سندرم لکه سفید میگو با تیتر $10^{5.4}$ LD_{50}/ml توسط پرتوگاما با دز ۱۵ کیلوگری در حالت انجماد کاملاً غیرفعال سازی می گردد. همچنین ویروس بیماری سندرم لکه سفید میگو با تیتر $10^{5.4}$ LD_{50}/ml توسط بیم الکترون با دز ۱۳,۵ کیلوگری در حالت انجماد کاملاً غیرفعال سازی می گردد. و با فرمالین ویروس بیماری سندرم لکه سفید میگو با تیتر $10^{5.4}$ LD_{50}/ml توسط فرمالین 0.5% v/v به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق کاملاً غیرفعال سازی می گردد. باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در حالت لیوفیلیزه با دز ۸ کیلوگری پرتو گاما غیرفعال سازی می شود. و با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما ، الکترون و فرمالین می توان نتیجه گرفت که هر سه نوع واکسن در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون در مقابل ویروس فعال با تیتر $10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl اثر حفاظتی خوبی دارند. ولی با توجه

نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون اثر حفاظتی این رادیو واکسن وقتی به غذای گروههای میگو ماده ایمیونوژن اضافه گردد و همچنین وقتی از باکتری ویبریو غیرفعال شده به عنوان یک محرک ایمنی همزمان با تزریق رادیو واکسن استفاده شده، بیشتر از وقتی است که رادیوواکسن بدون ایمیونوژن و بدون باکتری غیرفعال مورد استفاده قرار گیرد (در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون). همچنین با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون، می توان گفت که هر دو واکسن اثر حفاظتی خوبی از خود نشان داده اند ولی در مورد رادیوواکسن غیرفعال شده با پرتو گاما این اثر حفاظتی بیشتر از رادیوواکسن الکترون می باشد (در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون). با توجه به نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد واکسن غیرفعال شده با فرمالین، اثر حفاظتی این واکسن وقتی به غذای گروههای میگو ماده ایمیونوژن اضافه گردد و واکسن بدون ایمیونوژن تقریباً مشابه است (در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون). به طور کلی رادیوواکسن غیرفعال شده با گاما اثر حفاظتی بهتری از رادیوواکسن غیرفعال شده با الکترون و واکسن غیرفعال با فرمالین نشان داده است. ولی با این وجود رادیوواکسن الکترون و واکسن فرمالینه نیز اثر حفاظتی خوبی در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون نشان داده اند.

کلمات کلیدی: واکسن ، ویروس بیماری لکه سفید، پرتو گاما، پرتو الکترون، فرمالین ، میگو سفید هندی

۱- مقدمه

تولید جهانی آبزیان و عرضه فرآورده‌های دریایی در طی چندسال اخیر همواره روند روبه رشدی را داشته و پرورش آبزیان با تأمین ۱۵٪ از پروتئین حیوانی، نقش بسیار مهمی در امنیت غذایی مردم جهان ایفا می‌کند. تولید آبزیان در سال ۲۰۰۵ معادل ۱۴۲ میلیون تن اعلام شده است که از این میزان ۱۰۸ میلیون تن مستقیماً به مصرف انسانی رسیده و ۳۴ میلیون تن دیگر در تولید پودر ماهی و سایر موارد مصرف شده است. از این میزان سهم آبزی پروری ۶۲/۵ میلیون تن و مابقی از دریاها صید گردیده است(FAO,2006). در ایران در سال ۱۳۸۶ تولید آبزیان به رقمی معادل ۵۶۲ هزار تن افزایش یافته که سهم صید از دریاها معادل ۳۶۸ هزار تن و مابقی از تولیدات آبهای داخلی و تکثیر و پرورش به دست آمده که تولید ماهیان گرمابی معادل ۹۷ هزار تن ، سردابی ۵۶ هزار تن و میگو حدود ۵ هزار تن بوده است(سالنامه آماری شیلات ایران،۱۳۸۶).

یکی از چالشهای اصلی در تولید آبزیان بالاخص در آبزی پروری موضوع بهداشت و بیماریهای آبزیان بوده، بطوریکه سالیانه میلیونها دلار از بیماریهای آبزیان به پرورش دهندگان ماهی و میگو خسارت وارد شده و یکی از موضوعات مهم در توسعه آبزی‌پروری محسوب می‌شود. با توجه به گسترش فعالیتهای آبزی پروری در سطح ملی، منطقه‌ای و بین المللی، تعدا بیماریهای نوظهور (emerge) در حال افزایش بوده و روز بروز بر تعداد آنها افزایش می‌یابد. در خانواده سخت پوستان بالاخص میگو تاکنون حدود ۲۰ بیماری ویروسی، ۴ بیماری باکتریائی، ۳ بیماری قارچی و تعدادی انگل گزارش شده است که باعث ایجاد بیماری و خسارت به صنعت تکثیر و پرورش میگو می‌شوند(Lightner., 1996; Muhammad Meezanur Rahman,2007) .

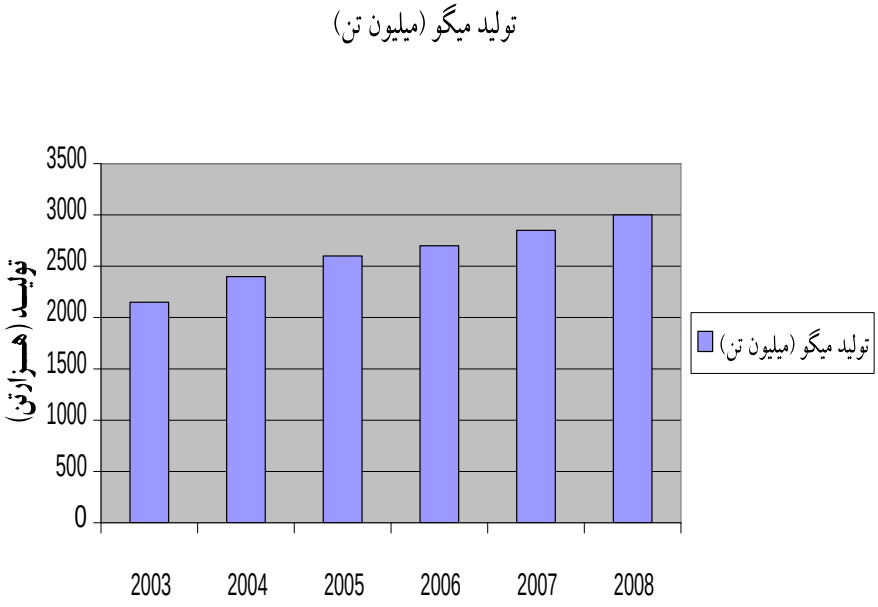
در میان بیماریهای ویروسی میگو، بیماری لکه سفید در کلیه گونه های میگو گزارش شده و امروز یکی از مهمترین تهدیدات صنعت تکثیر و پرورش میگو محسوب می‌شود. سندرم تورا نیز از بیماریهای مهم صنعت تکثیر و پرورش میگو بوده و باعث تلفات شدید در صنعت شده و از مهمترین بیماری میگوهای خانواده Litopenaeid بالاخص *L.vannamei* و *L.stylirostns* می باشد(Flegel, 2006) .

بروز بیماری لکه سفید در صنعت تکثیر و پرورش میگو از سال ۱۹۹۲ برای اولین بار در تایوان اتفاق افتاده و سپس به کلیه کشورهای آسیایی سرایت نمود. این بیماری در سال ۱۹۹۵ به دلیل انتقال میگوی منجمد و آلوده به ویروس لکه سفید در کشورهای آمریکایی مثل آمریکا، اکوادور، برزیل ، هندوراس و غیره نیز گزارش

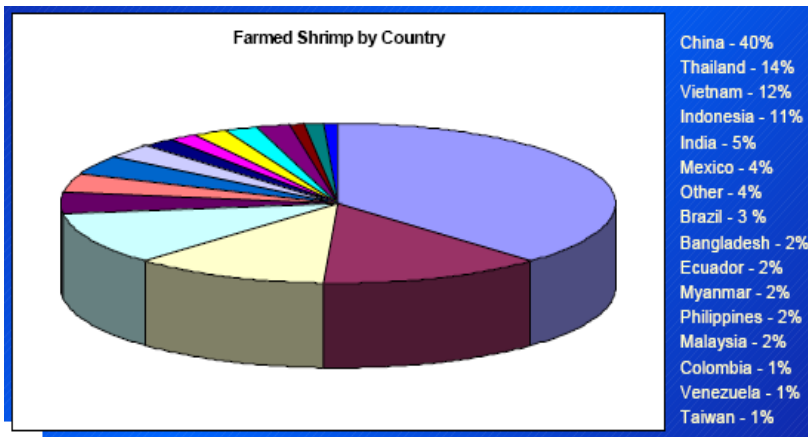
گردید(افشارنسب،۱۳۸۶). بعد از همه‌گیری این بیماری بود که پرورش دهندگان آسیایی تمایل به استفاده از گونه وانامی نمودند(Briggs etal.,2004). به نظر می‌رسد گونه وانامی در مقابل بیماریهای میگو بالاخص بیماری لکه سفید مقاومت بیشتری دارد. با ورود گونه وانامی به صنعت تکثیر و پرورش میگو این گونه به شدت توسعه یافته و جای گونه ببری سیاه (*Penaeus monodon*) را گرفت و امروزه بیش از ۹۰٪ تولیدات میگوی پرورشی جهان به گونه وانامی اختصاص یافته است. تولید میگوی پرورشی در سال ۲۰۰۸ در جهان معادل ۳ میلیون تن بوده است که از این میزان ۲/۸میلیون‌تن به گونه وانامی اختصاص داشته و مابقی به سایر گونه ها از جمله میگوی ببری سیاه اختصاص یافته است (نمودار ۱)(FAO Global Aquaculture.2008).

در بین کشورهای تولید کننده میگو، چین با رقم ۷۰۰ هزار تن در صدر تولیدکنندگان میگو بوده و ۴۰٪ تولید میگوی پرورشی را به خود اختصاص داده است. بعد از آن تایلند با ۱۴٪ در بین کشورهای تولیدکننده میگو مقاوم دوم و ویتنام با ۱۲٪ مقام سوم را دارند(نمودار ۲) (Patrick Bowe.2008).

در ایران در سال ۱۳۸۱و ۱۳۸۳ همه‌گیری ناشی از بیماری لکه سفید در سایت تکثیر و پرورش میگوی آبادان موجب رکود این صنعت در کشور گردید. این همه‌گیری سپس در سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر و در سال ۱۳۸۷ در استانهای سیستان و بلوچستان و خوزستان موجب خسارت سنگینی به صنعت پرورش میگو گردید.



نمودار ۱: تولید میگوی پرورشی تا سال ۲۰۰۸ در جهان



نمودار ۲: میزان تولید میگوی پرورشی در کشورهای مختلف در سال ۲۰۰۸

با توجه به بروز این بیماری از سال ۱۳۸۳ مؤسسه تحقیقات شیلات ایران اقدام به واردات میگوی گونه وانامی از هاوائی آمریکا نمود و مورد استقبال پرورش دهندگان در استانهای جنوبی کشور قرار گرفت. هر چند مشکلات ناشی از وضعیت قیمت میگوی پرورشی و بیماری لکه سفید دو تهدید عمده در توسعه این صنعت می باشد، با این وجود تولید میگو در کشور متوقف نشده و جدول ۱ میزان تولید در کشور را از سال ۱۳۷۳ تا سال ۱۳۸۶ نشان می دهد(سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۶).

جدول۱ : تولید میگو در ایران طی سالهای ۱۳۷۳ لغایت ۱۳۸٦ در استانهای مختلف

سال	سطح زیر کشت (هکتار)	میزان برداشت (تن)	میانگین برداشت (کیلوگرم در هکتار)
۱۳۷۳	۴۷	۵۴	۱۱۲۷
۱۳۷۴	۱۷۹	۱۳۵	۷۵۲
۱۳۷۵	۱۸۱	۱۵۹	۸۷۸
۱۳۷۶	۴۴۰	۵۱۹	۱۱۷۷
۱۳۷۷	۹۱۲	۸۶۶	۱۴۱۴
۱۳۷۸	۱۳۳۶	۱۸۲۷	۱۳۶۸
۱۳۷۹	۲۴۶۱	۴۰۰۵	۱۶۳۰
۱۳۸۰	۳۶۱۸	۷۶۰۶	۲۱۰۲
۱۳۸۱	۲۶۴۷	۵۹۶۰	۲۳۰۰
۱۳۸۲	۳۵۹۷/۴	۶۶۲۶	۱۸۴۲
۱۳۸۳	۴۲۶۱	۸۸۸۰	۲۱۶۰
۱۳۸۴	۳۶۵۲	۳۸۴۵	۱۰۵۲
۱۳۸۵	۲۶۲۵/۵	۵۷۰۰	۲۲۰۰
۱۳۸۶	۱۱۹۶	۲۴۸۴	۲۰۰۰

براساس گزار ش فائو سالیانه بالغ بر سه بیلیون دلار از طریق بیماریهای میگو به صنعت تکثیر و پرورش میگو خسارت وارد شده و کاهش ۴۰٪ در تولید میگو ایجاد می‌کند. مهمترین بیماری ویروسی که موجب خسارت در صنعت تکثیر و پرورش میگو شده است بیماری لکه سفید می‌باشد. این ویروس که متعلق به خانواده جدیدی ار ویروسها بنام Nimaviridea و جنس Wispovirus می‌باشد نه تنها در میگو بلکه در کلیه سخت پوستان موجب بیماری شده و تعداد زیادی آبزیان و سخت پوستان ناقل ویروس می‌باشند(Witteveldt etal.,2000). در میگو و سایر سخت پوستان از جمله خرچنگ دراز آب شیرین سیستم ایمنی در برابر عوامل بیماریزا بر سه پایه دفاع با استفاده از موانع فیزیکی و شیمیائی، دفاع سلولی ودفاع هومورال استوار می‌باشد. با این وجود سیستم ایمنی سخت پوستان در مقابل غالب بیماریها بالاخص بیماریهای ویروسی ضعیف بوده و توانائی دفاع را ندارند. همچنین استفاده از آنتی بیوتیکها و سایر مواد شیمیائی نیز بطور وسیعی در کنترل و پیشگیری از بیماریهای

مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی بدلیل بقا این مواد در بدن آبزیان و تاثیر در کیفیت آب استخرهای پرورشی و همچنین مقاومتهای آنتی بیوتیکی استفاده از آنها محدودیتهائی دارد. از طرفی در کنترل وپیشگیری از بیماریهای ویروسی بالاخص بیماری لکه سفید آنتی بیوتیکها و سایر مواد شیمیائی تاثیر چندانی ندارند. امروزه به منظور کنترل وپیشگیری از بیماریهای ویروسی استفاده گسترده از مواد تقویت کننده سیستم ایمنی (Immunostimulant) و واکسنها مورد توجه جدی قرار گرفته است. واکسیناسیون یا پیشگیری از طریق سیستم ایمنی (Immuno-prophylaxis) بر پایه واکنش سیستم ایمنی موجود زنده در برابر هجوم یک موجود زنده مثل ویروس یا سایر میکروارگانیسم ها بوده که موجب حذف و مقاومت در برابر آن می‌شود. اگر موجود زنده با ارگانیسم مواجهه داده شود، سیستم ایمنی برای مقابله باآن آماده می‌شود. میگو بدلیل ضعف سیستم ایمنی نمی تواند به مثابه موجودات عالی به واکسنها پاسخ دهد ولی از مواد تقویت کننده سسیتم ایمنی برای افزایش مقاومت این موجودات در مقابل ویروسها استفاده وسیع صورت می‌گیرد. به عنوان مثال استفاده از لیپوپلی ساکاریدها در میگوی ژاپنی(*Penaeus japonicas*) ، گلوکان درمیگوی ببری سیاه (*P. monodon*)وجلبکهای دریائی سارگاسوم و پادینا در میگوی ببری سبز استفاده و تاثیرات موثری در کنترل این بیماری داشته است. همچنین طی سالهای اخیر استفاده از واکسنها یا ترکیبات شبه واکسنی مثل واکسنهای غیر فعال شده WSSV، واکسنهای نوترکیب(Recombinant) علیه بیماری لکه سفید استفاده و نتایج قابل قبولی بهمراه داشته است. تکنولوژیهای جدید از جمله واکسنهای نوترکیب و DNA واکسنها از روشهای مهمی هستند که در آینده می‌توانند برای پیشگیری و کنترل بیماری لکه سفید مورد توجه قرار گیرند. با توجه به بروزاین بیماری در ایران و توجه به موضوع کنترل و پیشگیری از آن پروژه تحقیقاتی با عنوان " بررسی امکان تهیه واکسن غیرفعال جهت پیشگیری بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از روشهای هسته‌ای و غیر هسته‌ای در میگو سفید هندی " طراحی و با اهداف ذیل مورد تصویب قرار گرفت.

۱-۱- اهداف اصلی پروژه

۱. ایجاد ویروس غیرفعال عامل سندرم لکه سفید با استفاده از پرتوهای یونساز و فرمالین با حفظ خاصیت آنتی ژنیکی ویروس

۲. ایجاد باکتری ویبریو غیرفعال با استفاده از پرتو دهی بعنوان محرک سیستم ایمنی میگو در حفاظت علیه بیماری لکه سفیدی (یا استفاده از سایر محرکهای ایمنی)

۳. ایجاد مقاومت بر ضد بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از واکسن غیرفعال آن در میگو

۴. انتخاب بهترین روش تهیه واکسن غیرفعال بیماری لکه سفید در میگو

با توجه به اهداف فوق در این پروژه وضعیت روشهای مختلف برای کنترل و پیشگیری از بیماری مورد تحقیق قرار گرفت که ارائه می گردد.

۲-۱- آشنائی با بیماری لکه سفید

۱-۲-۱- عامل بیماری

عامل ایجاد کننده بیماری لکه سفید(White Spot Syndrome Virus) یکی از بزرگترین ویروسهای جداشده از میگو می‌باشد. ویروس بیماری به شکل تخم مرغی تا میله ای شکل متغیر بوده و دارای یک زائده دم مانند در یکی از انتهای خود می‌باشد. ویروس دارای یک پوشش سه لایه بوده و درون آن یک کپسول با یک DNA دو رشته ای (dsDNA) می‌باشد. بر اساس مطالعات صورت گرفته ویروس ایجاد کننده بیماری دارای شش پروتئین رمزدار بوده که دو پروتئین به نامهای VP19 و VP28 که در پوشش ویروس قرار دارند، در بیماریزائی ویروس نقش داشته و چهار پروتئین دیگر به نامهای VP15,VP24,VP26و VP664 که در نوکلئوکپسید ویروس قرار دارند، وظایف دیگری را عهده‌دار هستند.

ویروس می تواند به مدت ۴-۷روز در محیط آزاد زنده مانده و اگر میزبانی پیدا نکند از بین می‌رود. تا مدت ها این ویروس رامتعلق به خانواده Baculoviridae می‌دانستند ولی با مطالعات مولکولی انجام گرفته در سال ۲۰۰۱ ویروس رادر خانواده جدیدی به‌نام Nimaviridae و جنس Wispovirus قرار داده‌اند. ژنوم این ویروس از نظر اندازه در جداسازیهای مختلف، متفاوت گزارش شده است. بطوریکه ۳۰۵۱۰۷bp (A×۱۵۱۳۹۶)، ۲۹۲۹۶۷bp و ۳۰۷۲۸۷bp (AF۴۴۰۵۷۰) از قسمتهای مختلف چین، تایلند، تایوان به ترتیب گزارش شده است (Van Hulten etal.,2001). این اختلاف در اندازه ویروس لکه‌سفید ناشی از الحاق شدن تعداد زیادی از ژنهای کوچک با حذف یک تکه ژن بزرگ به وزن ۱۲kb می‌باشد. در مجموع در ژنوم این ویروس ۶۸۴ open reading frames یا

(ORF_S) که با کد ATG شروع می‌شوند و هرکدام دارای ۵۰ اسید آمینه یا بیشتر در دو رشته ویروس می‌باشند تشکیل شده است. از مجموع این ORF_S، ۱۸۴ ORF_S از ۵۱ تا ۶۰۷۷ اسید آمینه آنها با حداقل اصطکاک قابل پیش‌بینی می‌باشند. تعدادی از ORF ها شبیه ژنهای ویروسهای ساخته شده با سلولهای یوکاریوت می‌باشند. اما در تعداد زیادی از آنها پروتئین‌های رمزدار شناسائی شده که هیچ‌گونه مشابهتی در ژنهای شناسائی شده در ژن بانک ندارند.

این ویروس دارای نه ساختمان پروتئین بوده که تابحال شناسائی شده‌اند و براساس اندازه آنها بر روی SDS-PAGE تعیین گردیده‌اند. پروتئینهای ویروسی (Viral Protein) یا VP شامل VP_{19}، VP_{22}، VP_{28}، VP_{281} و VP_{466} در پوشش ویروس قرار دارند، درحالیکه VP_{15}، VP_{24}، VP_{26} و VP_{35}در نوکلئوکپسید ویروس قرار گرفته‌اند. ترجمه ژنهای WSSV مشخص نموده است که ژنهای پروتئینهای ویروس، شاملVP_{28}، VP_{26}، VP_{24}، VP_{19} وVP_{15} در هنگام ایجاد بیماری با تأخیر ظاهر شده درحالیکه آنزیم ریدکتاز (Riductase) ریبونکلئو اسیدها زودتر از این ژنها ظاهر می‌شوند. بدنبال آن سایر ژنها شبیه ریبونکلئوتید ریدکتاز(Ribonucletoid ridactase), – پروتئین های شبیه کلاژن (Collagen- like protein) و پروتئین کینازها (Protein kinase) شناسائی و مطالعه گردیده‌اند. پروتئینهای VP_{28}، VP_{26} و VP_{24} ممکن است بوسیله تکرار ژنها رشد و تکثیر یابند. همه اینها توسط ORF_Sرمزگذاری شده و بطور تقریبی اندازه آنها حدود ۲۰۶ اسید آمینه برآورد گردیده است، اما پروتئینهای آنها بطور مشخص دارای حرکات الکتروفورزی می‌باشند. مطالعات بعدی نشان داده است که VP_{28} که مهمترین پروتئین پوشش ویروس می‌باشند یک نقش کلیدی در عفونت سیستمی بیماری لکه‌سفید در میگو داشته و این موضوع از روش *In vivo* بصورت روش خنثی‌سازی مشخص گردیده است.

فعالیت پروتئین VP_{15} که یک پروتئین شدید بازی و مشابه هیستون است، عبارت از باند کردن پروتئین‌های DNA در نوکلئوکپسید ویروسها می‌باشد. همچنین اخیراً Witteveldt و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند که پروتئین VP_{15} دارای ساختاری مشابه با پروتئین‌های باند شده DNA باکولوویروسها می‌باشند. همچنین اظهار می‌دارند که پروتئین VP_{15} در بسته‌بندی ژنوم ویروس WSSV در نوکلئوکپسید نقش و تأثیر دارد. ویروسهای پوشش‌دار در مهره‌داران و بی‌مهرگان دارای گلیکوپروتئین در پوشش خود بوده که غالباً نقش مهمی در واکنشهای متقابل بین ویروس و میزبان داشته، شبیه چسبیدن به رسپتورها یا گیرنده‌ها ومشارکت کردن در دیواره غشاء همچنین

هیچکدام از پنج پروتئین مهم که در ساختمان ویروس WSSV مشارکت دارند، نقشی در اضافه شدن قندها به پروتئین و چربی یا گلیکوزیلیشن (glycosylated) نداشته و این خصوصیت یک خصوصیت غیرمعمول در ویروسهای پوشش‌دار موجودات می‌باشد. اخیراً مشاهده شده است که پروتئین VP_{28} در چسبیدن و نفوذ به سلولهای میگو نقش دارد. مشخص شده پروتئین VP_{35} که دارای یک علامت نشانه‌گذاری هسته یا Nuclear localization signal(NLS) بوده، نقش واسطه‌ای در انتقال DNA ویروس WSSV بداخل هسته سلولهای آلوده دارد.

مطالعات نشان داده‌اند که ویروس لکه‌سفید به حرارت $^{?C}$۵۰ در مدت ۲۰ دقیقه، یا $^{?C}$۶۰ در مدت یک دقیقه یا $^{?C}$۷۰ در مدت ۰/۲ دقیقه حساس بوده و غیرفعال می‌شود. این ویروس در بافت یخ‌زده میگو برای مدت طولانی زنده می‌ماند. ویروس لکه‌سفید در آب دریای استریل نگهداری شده در $^{?C}$۳۰ و در محیط تاریک بیماریزائی خود را تا بیش از ۳۰ روز حفظ نموده و زنده می‌ماند، اما اعتقاد بر این است که این ویروس در مدت ۳ روز در مزارع پرورشی در اثر اشعه UV یا حرارت غیرفعال می‌شود.

با استفاده از ترکیبات کلرین، فرمالین، پودین آیوداین، اتیل‌الکل، اوزن، UV و pH این ویروس غیرفعال می‌شود. درجه حرارت یکی از مهمترین فاکتورهای محیطی است زیرا بطور مستقیم بر روی متابولیسم موجودات آبزی تأثیر می‌گذارد. درجه حرارت برروی مصرف اکسیژن، پوست‌اندازی و بطور غیرمستقیم وقتی با سایر فاکتورها ترکیب شود شبیه شوری و اکسیژن محلول ارتباط دارد. مطالعات کمی درخصوص تأثیرات درجه حرارت برروی ایمنی میگوها انجام گرفته بالاخص در زمینه گسترش ویروس لکه‌سفید بر روی میگوها که نیاز به تحقیقاتی در آینده دارد (افشارنسب،۱۳۸۶).

۲-۲-۱- پراکندگی جغرافیائی

این بیماری در سال ۱۹۹۲ در کشور چین موجب خسارات فراوانی به پرورش دهندگان میگو شد. در چین به عامل ایجاد کننده بیماری پی نبردند تا اینکه بیماری در تایوان نیز خسارات فراوانی را به وجود آورد. با بررسی ضایعات ایجاد شده در میگو مشخص گردید که بیماری در بافت های هیپودرم و بافت های خونساز (Hematopoietic) ایجاد بیماری می‌کند و عامل ایجاد کننده بیماری را ویروس تشخیص دادند. این بیماری در

سال ۱۹۹۴ نیز موجب خسارت سنگینی در میگوهای کشور ژاپن گردیده و عامل ایجاد کننده آن را ویروسی به شکل گرد از خانواده Baculoviridae گزارش نمودند. در قاره آسیا، بیماری در اغلب کشورها از جمله چین، هند، مالزی، سنگاپور، تایلند، فیلیپین، سریلانکا و سایر کشورهای پرورش دهنده میگو گزارش شده است. بیماری لکه سفید از طریق انتقال پست لارو به قاره آمریکا سبب ایجاد خسارت در کشورهای آن منطقه شده بطوری که در سال ۱۹۹۹، کلیه کشورها آن منطقه این بیماری را گزارش نمودند. همچنین در سال۱۹۹۹ کمیته آبزیان سازمان OIE این بیماری را به عنوان بیماریهای قابل گزارش برای سخت پوستان اعلام نمود و مقرر گردید که کلیه کشورها در حمل و نقل سخت پوستان به این بیماری توجه داشته باشند. در ایران در تابستان سال ۱۳۸۱ در منطقه چوئیبده آبادان در استان خوزستان، این بیماری باعث تلفات فراوان گردید و کلیه فعالیت های پرورش میگو در این منطقه متوقف شده و خسارت سنگینی به پرورش دهندگان وارد گردید. همچنین در سالهای ۱۳۸۴ و۱۳۸۷ بیماری از استان های بوشهر، خوزستان و سیستان و بلوچستان نیز گزارش شده و موجب تلفات سنگینی در این مناطق گردید.

۳-۲-۱- علائم کلینیکی

این بیماری در کلیه میگوهای خانواده پنائیده در مرحله جوانی و بالغ دیده می شود. علائم بالینی بیماری عبارت است از:

۱. مشاهده لکه های سفید رنگ به اندازه ۰/۵-۲ میلی متر روی کاراپاس میگو که بعد از چند روز این لکه ها دربندهای پنجم و ششم بدن نیز مشاهده شده و در انتها کل بدن میگو را فرا می گیرد. این لکه ها در قسمت داخلی کاراپاس میگو ایجاد می گردند.

۲. با توجه به بروز لکه های سفید در قسمت داخلی کاراپاس میگو و درناحیه اپیدرم، قسمت کوتیکول میگو به آسانی از لایه اپیدرم جدا می شود، بطوری که در مقایسه با میگوی سالم عمل جدا شدن کوتیکول بسیار راحت انجام می گیرد.

۳. هپاتوپانکراس میگوهای آلوده تغییر رنگ داده و به صورت زرد مایل به سفید در می آیند. همچنین هپاتوپانکراس بسیار بزرگ و شکننده می شود.

۴. همولنف رقیق شده بطوریکه عمل انعقاد در مدت زمانی طولانی انجام شده یا هرگز انجام نمی گیرد.

۵. میگوها تمایلی به غذا خوردن نداشته و معده میگوهای آلوده خالی می باشد. همچنین به دلیل کندی حرکات میگو، ذرات و موادی روی آبشش میگو رسوب نموده و میگو بدلیل کندی حرکت قادر به پاک کردن این مواد از روی آبشش خود نمی باشد.

۶. میگوها در کنارهای استخر شنا نموده و در بعضی مواقع به آهستگی در سطح آب شنا می کنند تا زمانی که در کف استخر فرو روند.

۷. میگوهای بی حال تغییر رنگ داده و کلیه اندام های حرکتی و بدن میگوها قرمز می شود. همچنین تعدادی از آنتن های میگوهای آلوده نیز شکسته شده و کوتاه می گردند.

۸. مرگ و میر بسیار زیاد ۱۰۰- ۷۰درصد معمولاً طی ۷-۲ روز بعد از ظهور علائم کلینیکی در مزارع اتفاق می افتد. مشاهده میکروسکوپی لکه های سفید نشان می دهد که این لکه ها شامل یک حلقه های سفید دارای هسته قهوه ای رنگ می باشند و توسط حفره های کوچک به هم متصل بوده و در پاره ای موارد حالت دانه های تسبیح بخود می گیرد. همچنین تعدادی نقاط ملانوزه قهوه ای رنگ در مرکز این لکه ها مشاهده می شود.

٤-۲-۱- آسیب شناسی

در رنگ آمیزی اندامهای مختلف میگوهای بیمار با رنگ هماتوکسیلین ائوزین و فلوکسین (H&E/Ph) مشخص می گردد که کلیه بافت ها و اندام های دارای اکتودرم و مزودرم، آلوده به این ویروس می باشند. این اندام ها شامل آبشش، دستگاه لنفاوی، بافت پیوندی، اپیدرم کوتیکول، روده، معده، قلب، عضلات مخطط، بیضه و تخمدان، هموسیت ها، بافت عصبی و غدد آنتنی می باشند. با این حال ویروس سلول های هپاتوپانکراس و سلول های اپیتلیال روده میانی را آلوده نمی کند. همچنین در سلول های هپاتوپانکراس نیز هیچ علائمی از گنجید-گیهای درون سلولی مشاهده نمی شود ولی هموسیت ها به شدت آلوده بوده که توسط مایع همولنف در بین فضاهای سلول های مختلف و سینوس های لنفی گنجیدگی ها و آثار آلودگی ویروسی مشاهده می شود. سلول های هپاتوپانکراس به شدت واکوئله شده و موجب کم شدن و از بین رفتن مجاری بین سلولی می شود. افزایش سلول های واکوئله هپاتوپانکراس ناشی از فعالیت بالای این اندام در مقابل ویروس بوده وتلاش می نماید تا

ایمنی سلول را افزایش دهد. این موضوع ممکن است دلیلـــی باشد برای اینکه چرا هپاتوپانکراس بسیـــار بزرگ و شکننده می شود. همچنین واکوئل های ایجاد شده در سلول های B هپاتوپانکراس بندرت دیده می شوند ولی واکوئلهای کوچک در بافت هپاتوپانکراس بشدت افزایش می یابند.

در مطالعات سلولی اندام های آلوده در مراحل اولیه آلودگی، هسته سلول های آلوده بزرگ و هستک ها متلاشی شده، کروماتین ها مهاجرت کرده و مرکز سلول بسیار رقیق و حالت قرمز رنگ پیدا می کند. به دنبال آن گنجیدگی بین سلولی قرمز رنگ به نام Cowdry Type A-inclusion body(CAIs) در سلولها مشاهده شده و سپس در حالت پیشرفته رنگ آبی به خود گرفته و گنجیدگی ها متراکم تر می شود. همچنان که آلودگی ویروسی توسعه می یابد، چندین منطقه نکروز با اندازه متغیر در سلول دیده می شود و در نهایت سلول حالت غیر طبیعی پیدا می کند.

۵-۲-۱- مطالعات میکروسکوپ الکترونی

مشاهده با میکروسکوپ الکترونیکی (TEM) از بافت های اپی‌درمیس کـوتیکول، اپیتلیال معده، اپیتلیال هپاتوپانکـــراس، هموسیتها و آبشش نشـــان دهنده وجود گنجیدگی ویروسی می باشند. با مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، چگونگی تکثیر، تشکیل و توزیع این ویروس درون هسته را می‌توان مشاهده نمود. پوشش این ویروس در برش طولی بیضی متمایل به گرد بوده در صورتیکه در برش عرضی گرد می باشد. پوشش این ویروس به صورت سه لایه ای بوده که شامل دو لایه تاریک در اطراف و در میان آنها یک لایه شفاف می باشد. پوشش ویروس به اندازه ۳۰±۳۰۵ نانومتردر طول و ۱۱±۱۲۷ نانومتردر عرض می باشد، در صورتی که اندازه کپسول ۲۵±۲۷۱ نانومتردر طول و ۹±۸۴ نانومتردر عرض می باشد.

٦-۲-۱- مطالعات بیماری با استفاده از روش (PCR)

این روش در تشخیص بیماری های میگو کاربرد وسیعی یافته است و برای تشخیص بیماری در میگو با این روش وجود حداقل ۱۰ سلول آلوده کافی است که بتوان مثبت بودن بیماری را گزارش نمود. از این روش در تشخیص اغلب بیماری های میگو از جمله بیماری های MBV,HPV,WSD,IHHNV,BP و غیره در آزمایشگاه ودر

مزارع تکثیر و پرورش استفاده می شود. امروزه برای انجام آزمایش PCR می توان از کیت مخصوص بیماری لکه سفید استفاده نمود که بصورت تجارتی تولید می شود. در ایران نیز از کیتهای تشخیص سریع برای شناسائی این ویروس استفاده می‌شود.

۷-۲-۱- سیستم ایمنی سخت پوستان

سیستم ایمنی معمولاً به دو شاخه مهم تقسیم می‌شود. سیستم ایمنی اکتسابی و سیستم ایمنی مادرزادی، سخت پوستان نظیر میگو فاقد سیستم اکتسابی بوده و سیستم ایمنی آنها مبتنی بر سیستم دفاع مادرزادی (Innate) می‌باشد [۱۲].

آبزیان سخت پوست (میگو، خرچنگ، خرچنگ دراز آب شیرین) به طور مشخص در محیط طبیعی و سیستم‌های پرورشی با باکتریها و ویروسها در تماس می‌باشند. تعدادی از این عوامل، بیماریزا بوده ولی تعدادی از آنها غیربیماریزا و فرصت طلب هستند. موجودات زنده در شرایط طبیعی توسط سیستم دفاع ایمنی بدن علیه عوامل بیماریزا فعالیت می کنند.

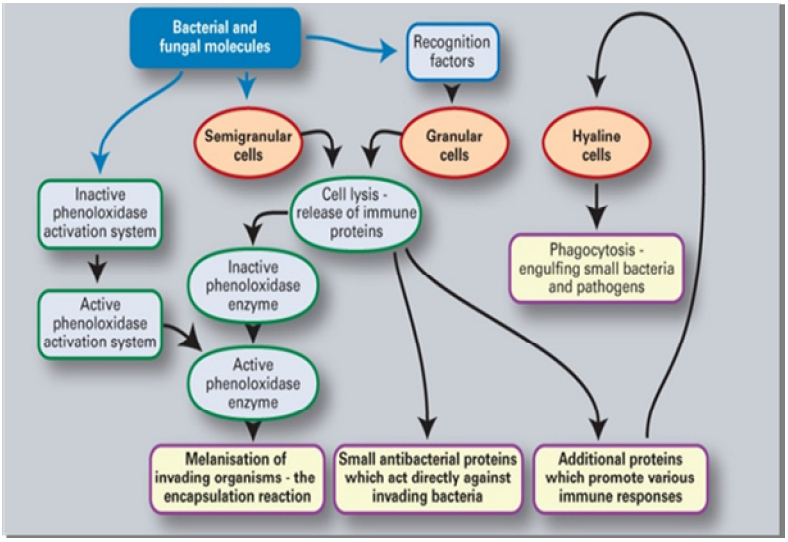
اولین سد دفاعی بدن سخت پوستان، کوتیکول آنها می‌باشد. کوتیکول که بیرونی‌ترین قسمت بدن سخت‌پوستان می‌باشد تأمین‌کننده شرایط فیزیکی و شیمیایی می‌باشد که مانع از چسبیدن عوامل بیماریزا و نفوذ آنها در بدن می‌باشد. کوتیکول یا پوسته (Shell) از سه قسمت اپی کوتیکول،اگزوکوتیکول واندوکوتیکول تشکیل شده‌اند که لایه اپی کوتیکول و اگزوکوتیکول از فسفات و کربنات کلسیم تشکیل شده و لایه اندوکوتیکول یک لایه کیتنی غیرکلسیمی می‌باشد. روی سطح اپی کوتیکول یک سری مواد مومی یا واکسی توسط غدد ترشحی که در پوست وجود دارد ترشح می‌شود. این مواد به خاطر قوام و خاصیت مومی که دارند یک عامل فیزیکی و شیمیایی در مقابل عوامل بیماریزا هستند.

پوست (Skin)نیزکه درزیرکوتیکول قرار دارد از لایه اپیدرم با سلولهای استوانه‌ای ساده و هیپودرم با بافت همبند تشکیل شده‌اند که با داشتن غدد و سلولهای کروماتوفوردار سد دفاعی محکمی در برابر عوامل بیماریزامی‌باشند.

دستگاه گوارشی نیز از مهمترین قسمتهائی است که ممکن است توسط عوامل بیماریزا مورد هجوم قرار گیرد، اما با پوشیده‌شدن یک لایه غشاء کیتینی در طول دستگاه گوارشی و داشتن مواد اسیدی و آنزیمی قادر به غیرفعال کردن و از بین بردن تعداد زیادی از ویروسها و باکتریها می‌باشد.

در پاره‌ای اوقات سیستم دفاع کوتیکولی برای مقابله با برخی از عوامل بیماریزا کافی می‌باشد و توانائی دفاع از بدن سخت‌پوست در مقابل این عوامل بیماریزا را دارد، ولی در برخی موارد که کوتیکول یا پوست آنها بطور فیزیکی آسیب دیده باشد، ممکن است عوامل بیماریزا وارد بدن آنها شده و وارد هموسلهای میزبان شوند. در این موقع عامل بیماری وارد شده به بدن با مجموعه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی مواجه شده که شامل پاسخ‌های هومورال و سلولی می‌باشد. در این ارتباط ابتدا سیستم پروفنل اکسیداز فعال‌شده (proPO) و باعث ملانوزه شدن و بوجود آمدن فاکتورهائی شبیه Peroxinectin می‌شوند که در پاسخ‌های ایمنی مؤثر می‌باشد. در مرحله بعد سیستم ایمنی سلولی که دارای انواع مختلفی هموسیت می‌باشد، در شناسائی عامل بیماری و مواجه با آن دخالت می‌نماید. سیستم ایمنی سلولی مقابله با عامل بیماری وارد شده به بدن میگو را از طریق فاگوستیوزکردن میکروارگانیسم‌ها، یا با به دام انداختن آنها توسط هموسیتها و تغییر آنها به شکل یک توده، یا از طریق کپسوله نمودن (Encapsulation) عوامل بیماریزای بزرگ و یا واکنش مسمومیت سلولی (Cytotoxic) انجام می‌دهد. توده شدن یا کپسول شدن عوامل بیماریزا معمولاً از طریق سسیتم فنل‌اکسیداز به صورت ملانوزه ظاهر می‌شود. در صورتیکه عفونت عمومی (سیستمیک) پیش آید، یک مجموعه وسیعی از مولکولهای مؤثر شبیه پپتیدهای ضدمیکروبی (Antimicrobial peptides) یا AMPS که فاکتور تأمین‌کننده Opsonization می‌باشد تولید می‌شود.

مهمترین ترکیبات و اجزاء تشکیل‌دهنده سیستم ایمنی میگو و سایر سخت‌پوستان که در شکل شماره ۱ نمایش داده شده است، به شرح ذیل می‌باشد.

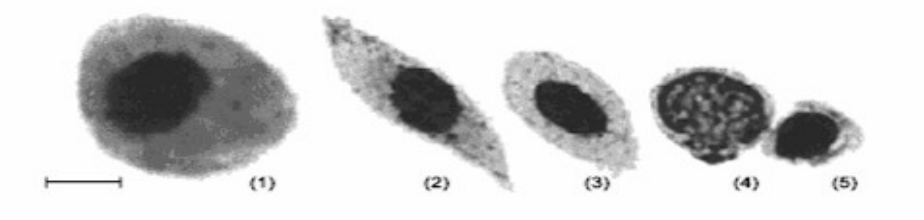


شکل ۱: تصویر کلی سلولهای درگیر در سیستم ایمنی میگو

۱-۷-۲-۱- هموسیتها

در پستانداران سلولهای مختلف خونی دارای فعالیتهای اختصاصی بوده که در حیات وبقاء آنها نقش اساسی داشته و هرکدام وظایف خاصی را بعهده دارند، شبیه انتقال اکسیژن یا دفاع در برابر عوامل عفونی، درحالیکه در سخت‌پوستان (میگو) مهمترین نقش سلولهای خونی و هموسیتها دفاع از جاندار در مقابل ارگانیسم‌های مهاجم می‌باشد.

بندپایان سخت‌پوست دارای سه نوع هموسیت می‌باشند که عبارتند از سلولهای هیالین یا H(Hyaline) ، سلولهای گرانولار یا G(Granular) و سلولهای سمی گرانولار یا SG (Semigranular) که هرکدام از آنها دارای ظاهر مشخصی می‌باشند. این تقسیم‌بندی هموسیتهای سخت‌پوستان براساس شکل آنها صورت گرفته است (شکل ۲). سلولهای هیالین کوچکترین سلولهای لنفاوی می‌باشند که نسبت هسته به سیتوپلاسم آنها بیشتر از بقیه سلولها می-باشد و دارای تعداد کمی گرانول بوده یا فاقد آن می‌باشند. سلولهای گرانولار بزرگترین سلولهای خونی (همو لنف) می‌باشند که نسبت هسته به سیتوپلاسم آنها کمتر از سلولهای هیالین بوده و دارای رنگدانه های گرانول می‌باشند. سلولهای سمی گرانولار، سلولهای بینابینی سلولهای هیالین و سلولهای گرانولار بوده و دارای میزان کمتری گرانول می‌باشند.



شکل ۲: هموسیتها با سیتوپلاسم ائوزینی که حالت گرانولار دارند (۱)، هموسیت دوکی شکل با سیتوپلاسم ائوزینی روشن که حالت گرانولار دارند(۲)، هموسیت تخم مرغی شکل با سیتوپلاسم ائوزینی روشن که حالت سمی گرانولار دارند(۳)، هموسیت با گلبولهای ائوزینی که حالت سمی گرانولار دارند(۴)، هموسیت با کاهش نسبت سیتوپلاسم به هسته که حالت هیالین دارند(۵).

یکی از راههای بررسی خصوصیات هرکدام از این سلولها جداسازی آنها می‌باشد. در خرچنگ دراز آب شیرین(Crayfish)، سلولهای خونی کوچک، گرد و فاقد گرانول یا دارای مقدار کمی گرانول می‌باشد و نقش اصلی آن در عمل فاگوسیتوز می‌باشد.

سلولهای سمی گرانول (SGC) دارای تعداد زیادی گرانولهای کوچک ائوزینوفیلی بوده که دارای سیستم پروفنل اکسیداز (proPO) می‌باشند.این سلولها مسئول کپسوله شدن و همچنین به میزان کمی در عمل فاگوسیتوز دخالت دارند. این سلولها از بافتهای تولید کننده همولنف Hematopoietic Tissue (HPT) که در اندامهای مختلف از جمله غدد آنتنی، غده لنفاوی و بافت پیوندی فیبروزه اطراف شکم وجود دارند منشا می گیرند. سلولهای گرانولار (GC) از مقدار زیادی گرانولهای ائوزینوفیلی ترشحی بزرگ پرشده‌اند و مهمترین سلولهای ذخیره‌ای برای سیستم proPO می‌باشند این سلولها نقشی در عمل فاگوسیتوز ندارند.

در سخت پوستان به نظر میرسد که مکانیسم تولید سلولهای هموسیت از دو مسیر صورت می‌گیرد. در یک مسیر ابتدا بافتهای تولید کننده سلولهای لنفاوی افزایش و تکثیر یافته و سلولهای لنفاوی را به صورت سلولهای هیالین تولید نموده و سلولهای هیالین در مسیر تغییرات ایجاد شده و تکامل، سلولهای گرانولار و سمی گرانولار را تولید می‌کند. سلولهای گرانولار نابالغ بزرگ وارد بافت پیوندی شده و در این بافتها بالغ شده و پر از گرانول می‌شوند که دارای سلولهای مختلف بوده و توانائی بالائی در مقابل عوامل بیماریزا را دارند. تعدادی از سلولهای گرانولار نابالغ کوچک وارد دستگاه لنفاوی شده و در آنجا بالغ شده و وارد همولنف می‌شوند و به نظر میرسد این سلولها در عمل فاگوسیتوز نقش داشته باشند. مشابه چنین مسیری توسط سلولهای تشکیل دهنده دستگاه

لنفاوی طی شده و منجر به تولید سلولهای هیالین، گرانولار و سمی گرانولار از سلولهای تشکیل دهنده بافت لنفاوی میگردد.

سلولهای گرانولار و سمی گرانولار توسط برخی مولکولهای خارجی نظیر لیپوپلی‌ساکلرید (LPS) و بتا ۱ و ۳ گلوگان تجزیه می‌شوند. سلولهای سمی گرانولار اولین دسته از سلولهای هموسیتی هستند که در بدن جاندار نسبت به مولکولها و ذرات خارجی با تجزیه کردن آنها واکنش نشان می‌دهند. با تجزیه این سلولها سیستم پروفنل اکسیداز که شامل فاکتورهای تجزیه‌کننده و سلولهای چسبندگی (Adhision) مثل peroxinection می‌باشد از گرانولهای آنها وارد پلاسما می‌شود. در کرای فیش سلولهای سمی گرانول و گرانول علاوه بر آن دارای خاصیت مسمومیت سلولی (cytotoxic) و تجزیه‌کننده سلولهای یوکاریوت نیز می‌باشند.

تعداد هموسیتها در اثر عوامل فاکتورهای متعددی تغییر می‌کند. در سخت‌پوستان تعداد هموسیتها درصورت عفونت با میکرو ارگانیسم‌ها کاهش یافته و بعد از چند ساعت تعداد آنها به حالت طبیعی برمی‌گردد. در عفونت ناشی از بیماری لکه‌سفید ویروسی این سلولها کاهش نمی‌یابند. تزریق آب نمک نیز باعث افزایش شدید سلولهای هموسیت می‌شود، در حالیکه تزریق بتا ۱ و ۳ گلوکان شدیداً سلولهای هموسیت را در بدن سخت‌پوستان بالاخص کرای‌فیش کاهش می‌دهد و بعد از ۶-۴ ساعت مجدداً به حالت طبیعی برمی‌گرداند. کاهش سلولهای هموسیت بعد از تزریق بتا ۱ و ۳ گلوکان احتمالاً ناشی از تجمع سلولها به همدیگر بوده که تعیین‌کننده نقش مهم هموسیتها در دفاع از بدن می‌باشد.

کاهش شدید و چشمگیر سلولهای هموسیت در یک بررسی که بر روی کرای‌فیش گونه *P.leniusculus* انجام شد، مطالعه گردیده است. این‌گونه حامل یک نوع قارچ عامل طاعون Plaque بر روی کوتیکول این آبزی بنام *Aphanomycos astaci* می‌باشد. این قارچ بطور طبیعی در سطح کوتیکول کرای‌فیش وجود داشته و مرگ‌ومیری ایجاد نمی‌کند. بعد از تزریق بتا ۱ و ۳ گلوکان و کاهش سلولهای هموسیت در کرای‌فیش، تعداد قارچها شدیداً در سطح بدن آن زیاد شده و بعد از چند روز موجب مرگ کرای‌فیش می‌شود. این نتیجه شاید بدلیل کاهش شدید هموسیتها و کاهش ظرفیت دفاعی کرای‌فیش در مقابل این قارچ باشد.

۲-۷-۲-۱- سیستم پروفنل اکسیداز (proPO system):

سیستم proPO یا پروفنل اکسیداز یک پاسخ دفاعی قوی مادرزادی در مقابل اجرام غیرخودی در بدن می‌باشد. این سیستم با شناسائی لیپوپلی ساکاریدها یا پپتیدوگلیکانها در دیواره باکتریها یا بتاگلوکان ۱ و ۳ در دیواره قارچها در کمتر از چند دقیقه فعال می‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که این سیستم در مقابل حضور عوامل بیماریزا فعال می‌شود. سیستم پروفنل اکسیداز شامل الگوهای شناسائی پروتئین یا (Pattern-recognition proteins)PPR_S و تعداد زیادی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین (Zymogenic proteins) و فنل اکسیداز می‌باشد.

از زمانیکه اولین شکل سیستم پروفنل اکسیداز از خرچنگ آب شیرین *P.leniusulus* شناسائی گردید، تاکنون در ۲۰ گونه از سایر سخت‌پوستان چنین سیستمی گزارش شده است. در خرچنگ دراز آب شیرین این سیستم در هموسیتها ساخته و در گرانولها ساکن می‌شود. همانگونه که در شکل ۱ نشان داده شده است وقتی که پروتئینهای باندکننده بتاگلوکان (BGBP) به بتا ۱ و ۳ گلوکان باند می‌شوند، این سیستم فعال شده و به طور اختصاصی به پروتئینهای پیوندی سطح سلول (Cell-Surfaces associated protein) که سوپراکسید غیرمتغیر می‌باشد (Super oxide dismutas) (SOD) یا به یک سلول B integrin در سطح سلولهای هموسیت از طریق فاکتور (RGD)(Arg-Gly-Asp) باند می‌شوند. این شناسائی موجب تحریک سلولهای سمی گرانولار شده و باعث تجزیه آنها می‌شود. در میان پروتئینهای رها شده از این سلولها، آنزیم پروفنل اکسیداز فعال‌کننده یا (proPO) Prophenol oxidase activiting enzyme نیز آزاد شده و موجب فعال شدن PPA در حضور الگوهای مولکولی وابسته به عامل بیماریزا (pathogen associated molecular patterns)(PAMPS) می‌شود. PPAهای فعال‌شده موجب تجزیه proPO (سیستم پروفنل اکسیداز) به فنل اکسیداز یا PO می‌شود. (PO شامل منوفنل، دی هیدروکسی فنیل آلانین و آنزیم اکسیدو ردوکتاز Oxidoredactase می‌باشد).

PO یک آنزیم با ترکیبات مس و عمل دوگانه‌ای می‌باشد که هم نقش آنزیم تیروزیناز را داشته و همچنین موجب تسریع در واکنش ملانوزه شدن می‌شود. ماده فنل در حضور اکسیژن، اکسید شده و به کوئینون (Quinons) تبدیل شده و این ماده باعث ایجاد ملانین می‌شود و این مواد خاصیت ضدمیکروبی و از بین بردن ذرات عامل بیماری را دارند.

در زمان فعال شدن سیستم پروفنل اکسیداز، سایر پروتئینهای موجود در سیستم نیز باید فعال شوند. یکی از مهمترین آنها پروتئین ۷۶کیلو دالتونی Peroxinectin است و بنام پروتئین‌های چسبنده معروف می‌باشند. این ماده پروتئینی در خرچنگ دراز آب شیرین *P.leniuselus* و میگوشناسائی، خالص سازی و کپی‌برداری شده است. ماده Peroxinectin دارای فعالیت چندگانه بوده که توسط عمل Exocytosis از هموسیتها تولید می‌شود. این ماده دو عمل متفاوت داشته که هم خاصیت آنزیم پراکسیداز داشته (peroxides) و همچنین موجب چسبندگی سلولها می‌شود. مواد تولید شده ضدباکتریائی که توسط فعالیت پراکسیداز ایجاد می‌شود باید در کشتن میکروارگانیسم‌های مهاجم به موجود نقش داشته، درحالیکه فعالیت چسبندگی به سلول موجب هدایت و راهنمائی سلولهای فاگوسیتوزی، تجزیه‌کردن (degranulation) و کپسوله کردن سلولهای مهاجم می‌شود.

۳-۷-۲-۱- سیستم انعقادی (The coagulation system)

یکی از اختلافات اساسی مابین مهره‌داران و سخت‌پوستان در مواد مایع بدن (Body fluid) می‌باشد که در مهره‌داران اساساً در عروق خونی و عروق لنفاوی محصور می‌باشند(گردش خون بسته) درحالیکه سخت‌پوستان دارای سیستم گردش خون‌باز می‌باشند. از اینرو وقتی سخت‌پوستان آسیب می‌بینند باید سریعاً یک شبکه‌ای از مواد ایجاد نمایند تا از خروج همولنف و همچنین از ورود مواد و ارگانیسم‌های خارجی از طریق هموسلها به داخل بدن جلوگیری شود.

انعقاد همولنف یک بخش مهمی از سیستم ایمنی مادرزادی سخت‌پوستان می‌باشد که توسط میکروبهای وارد شده به بدن تنظیم و فعال می‌شود. در خرچنگ نعل اسبی، همولنف به شدت به مقدار کمی از لیپوپلی‌ساکارید دیواره باکتریها حساس بوده و موجب انعقاد و تبدیل پروتئینهای حلال (Soluble protein) و کواگولان به مواد انعقادی غیرقابل حل (Insoluble coagulin) می‌شود.

بیشترین حساسیت سیسیتم انعقاد آبشاری (Clotting cascade) برای لیپوپلی ساکاریدها بررسی گردیده و اندوتوکسین‌های باکتریائی یا LPS جداسازی و شناسائی شده است. تعداد زیادی از ترکیبات سیستم انعقادی در انواع مختلفی از گرانولهای هموسیتها ذخیره و در زمان فعال شدن سیستم آزاد می‌شوند. این ترکیبات پروتئینی شامل فاکتورهای پروتئینازسرین زایموژن (Serine proteinase zymogen factor)آنزیم پیش‌لخته‌ای (B,G.proclotting

enzyme)B,G و همچنین پروتئین‌های انعقادی پیش‌لخته‌ای (proclottable protein coagulation) می‌باشد. فاکتور C و G به شدت به LPS و بتاگلوکان حساس می‌باشند. همچنین ارتباطات متقاطع و عرضی در لخته‌شدن ممکن است به هموسیانین‌ها نیز بستگی داشته باشد، چون می‌توانند سیستم پروفنل را از طریق واکنش متقابل با فاکتورهای انعقادی دریافت نمایند.

همانگونه که مشاهده می شود بعد از ورود باکتری به بدن LPS آن موجب فعال شدن سیستم انعقادی شده وبا پروتئازنوع C باند می‌شود. این اتصال موجب فعال شدن پروتئینازسرینی شده و بدنبال آن پروتئاز نوع B نیز فعال شده و درنتیجه آنزیمهای پیش لخته‌ائی ترشح وایجاد لخته‌های نامحلول می‌شود که موجب به دام انداختن ذرات خارجی یا جلوگیری ازخروج همولنف و یا مسدود کردن زخم می‌شود.

در سخت‌پوستان عمل لخته‌شدن علاوه بر انعقاداز طریق لخته شدن همولنف، از طریق پلیمریزاسیون پروتئینهای انعقادی پلاسما نیز انجام گرفته و این عمل توسط یونهای کلسیم آنزیم ترانس گلوتامیناز که از هموسیتها و سایر بافتها ترشح می‌شود تسریع می گردد.

پروتئینهای انعقادی برای اولین بار در خرچنگ دراز آب شیرین کپی‌برداری و بطور کامل شناسائی گردیده است. ساختمان اولیه پروتئینهای انعقادی نشان می‌دهد که در میگو و خرچنگ دراز آب شیرین این پروتئینها از لیپوپروتئین ساخته شده و متعلق به غشاء سطحی کیسه زرده می‌باشد.

٤-۷-۲-۱- مهارکننده پروتئیناز (Proteinase inhibitors)

سیستم آبشاری آنزیم‌های پروتئیناز، شبیه سیستم انعقاد آبشاری و سیستم پروفنل اکسیداز نیازمند تنظیم دقیق بوده تا از فعالیت اضافی و درونی خودداری شده و آسیبی به بافتهای بدن جاندار نرسد. مهارکننده آنزیم‌های پروتئیناز در تعداد زیادی از بی‌مهرگان مشخص گردیده و نسبت به خالص سازی آنها اقدام و ساختمان اولیه آنها در حال شناسائی است. تعداد زیادی از این مهارکننده‌ها شبیه kasal، Kunitz، Serpins آلفاماکروگلوبولین (α-macro globulins) و مهارکننده متالوپروتئیناز (Metaloproteinase) بخوبی شناسائی شده‌اند.

مهارکننده آنزیم‌های پروتئیناز دارای یک نقش کلیدی در کنترل و تنظیم سیستم پروفنل اکسیداز بوده تا از تأثیرات زیانبار ترکیبات این سیستم بالاخص فنل‌اکسیداز که می‌تواند ترکیبات واسطه‌ای بسیار سمی تولید کند

جلوگیری نمایند. تعداد زیادی از مهارکننده‌های پروتئیناز به منظور جلوگیری از افزایش فعالیت آنزیم پروفنل اکسیداز و همچنین مهارکننده آنزیم فنل‌اکسیداز که مستقیماً می‌توانند فعالیت فنل‌اکسیداز را مهار کنند از بندپایان متعددی گزارش گردیده است. از مهمترین مهارکننده های آنزیم پروفنل‌اکسیداز در خرچنگ آب شیرین، پاسیفاستین (pasifastin) می‌باشد که این ماده یک پروتئین با وزن kda ۱۵۵ و چند وجهی و دارای ساختمان واحدی است. این پروتئین دارای یک زنجیره سبک با نه واحد مهارکننده پروتئیناز و یک زنجیره سنگین با سه بخش ترانسفرین می‌باشد. این مجموعه پروتئینی بوسیله یک پیوند پپتیدی در کنار هم قرار گرفته و یک نوع جدید از مهارکننده پروتئیناز بنام Pacifastin-like serine proteinas inhibitor را بوجود می‌آورند که می‌تواند مهارکننده و تنظیم‌کننده سیستم پروفنل‌اکسیداز در تعداد زیادی از حشرات باشد.

۵-۷-۲-۱- سیستم شناسائی غیرخودی (The non-self recognition system)

ایده الگوی شناسائی غیر خودی توسط جانوی (janeway) در سال ۱۹۸۹ ارائه گردیده و بیان می‌دارد که در میکروبهای بیماریزا الگوهای مولکولی وابسته به عامل بیماری Pathogen-associated molecular patterns(PAMPs) وجود دارد. بدلیل عدم حضور این مولکولها در بدن میزبان، عوامل بیماریزا می‌توانند بین سلولهای میزبان و سلولهای خودی تمایز قائل شوند. گیرنده‌هائی که در سلولهای میزبان این مولکولها را شناسائی کرده و با آنها پیوند برقرار می‌کنند بنام الگوی شناسائی گیرنده‌ها (Pattern recognition receptors) یا (PRRs) و یا الگوی شناسائی پروتئینی (Pattern recognition proteins) یا(PRPs)می‌نامند. از مهمترین مولکولهای PAMP که به عنوان تحریک‌کننده سیستم ایمنی نیز می‌باشد می‌توان به مولکولهای لیپوپلی‌ساکارید (LPS) یا پپتیدوگلیکان در دیواره سلول باکتریها، بتا ۱ و ۳ گلوکان در دیواره سلولی قارچها و ریبونوکلئیک اسید دو رشته‌ای (ds RNA) در ویروسها اشاره نمود.

این مولکولها دارای الگوهای تکراری بوده و بین گروه بزرگی از باکتریها مشترک می‌باشند. مولکولهای PAMPs برای زنده ماندن میکربها بسیار ضروری می‌باشد و مطمئناً این میکروبها قادر نیستند سیستم ایمنی مادرزادی موجود زنده را تخریب نمایند. سیستم ایمنی مادرزادی ازیک سری PRPs برای شناسائی PAMPs استفاده می‌کند.

مولکولهای PRPs می‌توانند در سطح سلول قرار گرفته و یا در همولنف ترشح شوند و وقتی یک میکروب وارد بدن می‌شوند از طریق پیامهائی حضور میکروبها را در سلول متوجه می‌شوند. این خصوصیت سلولهای باکتریائی باعث می‌شود که سیستم ایمنی مادرزادی شبیه سیستم ایمنی اکتسابی، سلولهای خودی را از غیرخودی تشخیص دهد. تعداد زیادی PRPs جداسازی و تشخیص داده شده است شبیه LPS یا بتا ۱و۳ گلوکان پروتئینهای باندشونده (B,1,3Galcan binding protein) شبیه LBP، BGBP یا LGBP پروتئینهای شناسائی کننده پپتید و گلیکان (PGRP)، لکتین (Lectins) و همولین (Hemolin) در تعداد زیادی از بی‌مهرگان شناسائی شده‌اند. این مولکولها بعد از باند شدن با میکروبها دارای فعالیت بیولوژیکی متفاوتی می‌باشند.

لکتین‌ها یا انعقادکننده‌ها (Agglutinins) از واحدهای گلیکو پروتئین ساخته شده‌اند که فاقد فعالیتهای کاتالیزوری می‌باشند. این مولکولها در اغلب موجودات زنده وجود داشته و توانائی پیوستن اختصاصی با کربوهیدراتها را دارند. اینها می‌توانند با سلولها پیوند برقرار کرده و عمل لخته‌شدن را انجام دهند. تداخل بین لکتین و کربوهیدراتها در تعداد زیادی از فعالیتهای بیولوژیکی دخالت دارد، از جمله در حمل‌ونقل سلولی و بافتی مولکولهای کربوهیدرات و گلیکو پروتئینها، عمل چسبیدن سلولها، عمل opsonization و ایجاد ندولهای سلولی.

به طور اختصاصی، لکتین تیپ C که آن را لکتین وابسته به کلسیم گویند (calcunim dependent) گزارش شده است که در ایمنی مادرزادی بی‌مهرگان از جمله میگو دخالت دارد. همچنین بیان گردیده است که این ماده دارای خصوصیت باند شدن با LPS بوده و این خصوصیت در کرم ابریشم (*Bombyx mori*) و همچنین سوسک آمریکائی (*Periplaneta Americana*) گزارش گردیده است. از ویژگیهای این دسته از پروتئینهای باند شونده LPS، شناسائی باکتریها و فعالیتهای اپسونیک (Opsonic) می‌باشد.

تا به حال BGBPs در خرچنگ نعل‌اسبی، خرچنگ دراز آب شیرین، میگوی گونه‌کالیفورنیانسیس(*P.Californiansis*) و دو حشره (*Blaberus carniifer* و *Bimori*) شناسایی شده است از دیگر پروتئین‌های شناسائی‌کننده می‌توان به LGBPs و BGBPs اشاره داشت که هر دو از واحدهای مشابه گلوکوناز باکتریائی درست شده‌اند ولی فاقد فعالیتهای گلوکوناز بوده ودر عوض باعث افزایش فعالیت سیستم پروفنل‌اکسیداز می‌شوند. BGBP در خرچنگ دراز آب شیرین در پلاسما وجود داشته و با بتا ۱و۳ گلوکان واکنش متقابل داشته و موجب افزایش ایمنی سیستم

پروفنل اکسیداز شده و بالاخص در افزایش خصوصیت اپسونیزاسیون که موجب افزایش فعالیت فاگوسیتوزی می‌شود دخالت دارد.

پروتئین‌های BGBP و کمپلکس گلوکان می‌توانند به سطح سلولهای گرانولار منتقل شده و این اتصال از طریق ترکیب RGD (Arg-Gly-Asp) صورت گرفته که می‌توانند تعیین‌کننده اتصال این مولکولها به پروتئینهای integrin-like بوده و موجب گسترش و تجزیه سلولهای گرانولار شود. همچنین مولکول LGBP در خرچنگ دراز آب شیرین از همولنف این‌گونه جداسازی، تکثیر و شناسائی گردیده و موجب ایجاد اتصالات فعالیت‌زا با بتا ۱ و ۳ گلوکان و LPS شده ولی با پپتیدوگلیکان باند نمی‌شود. ساختمان اولیه و مطالعات شبیه‌سازی آن نشان داده است که LGBP به طور مشخص دارای ساختمان مشابه با پروتئینهای باندشده با باکتریهای گرم منفی و آنزیم‌های کلوکوناز باکتریها می‌باشد. عمل $LGBP_S$ اتصال به LPS یا بتا۱و۳ گلوکان و سپس فعال کردن سیستم پروفنل اکسیداز می‌باشد.

به طور دقیق مشخص گردیده است که پروتئینهای masquerade-like(mas-like protein) در سلولهای هموسیت به عنوان PRP (الگوهای پروتئین شناسایی‌کننده) شناخته شده‌اند.

این سلولها می‌توانند با LPS و بتا ۱و۳ گلوکان باکتریهای گرم منفی و مخمر متصل شوند. بعد از فعال شدن، این پروتئینها در اپسونیزه شدن، بالاخص در فعالیت چسبندگی سلول نقش دارند. بنابراین پروتئینهای mas-like پروتئینهای چندکاره بوده و ردیفهای اسیدآمینه این پروتئینها نشان دهنده ساختمان مشابه با آنزیم‌های پروتئینی سرین بوده که فقط فاقد خصوصیت کاتالیزوری این آنزیم‌ها می‌باشد. تعداد زیادی از آنزیم‌های پروتئینی سرین که دارای ساختمان مشابه هستند از تعداد زیادی از بی‌مهرگان شناسائی شده‌اند که فعالیت اغلب آنها چسبندگی سلولی، فعالیت ضدمیکروبی فعالیت باند شدن با LPS و همچنین یک ترکیب برای سیستم پروفنل‌اکسیداز می‌باشد با داشتن این خصوصیات بیولوژیکی آنزیم‌های پروتئینی سرین پیشنهاد شده است که در پاسخ‌های ایمنی بی‌مهرگان نقش دارند.

همولین یکی دیگر از این پروتئینها می‌باشد که متعلق به خانواده ایمنوگلوبولین‌ها بوده و در محدود ایمنوگلوبولین g (Ig) قرار گرفته و به قسمت لیپید A مجموعه LPS و باکتریهای گرم منفی متصل می‌شود. این

مولکول یکی از مهمترین پروتئینهای تحریک‌کننده سیستم ایمنی در همولنف بوده که می‌تواند تنظیم کننده هیجده دسته از فعالیتهای ایمنی *Hyalophora cecropia pupae* باشد.

٦-٧-٢-١- پپتیدهای ضدمیکروبی (Antimicrobial peptides)(AMPS)

ژنهای رمزدار شده پپتیدها یا پلی‌پپتیدهای ضدمیکروبی (AMP_S) به طور گسترده در بین موجودات زنده اعم از میکروارگانیسم و گیاهان و جانوران عالی مشخص گردیده است.

یکی از بخشهای اصلی سیستم ایمنی مادرزادی تولید مواد ضدمیکروبی می‌باشد که شامل پپتیدها می‌باشد. بطور طبیعی AMP_S شامل ۲۰۰-۱۵۰ اسید آمینه یا کمتر از آن می‌باشد که بوسیله انواع مختلفی از سلولها تشکیل شده است. براساس توزیع بافتی مولکولهای AMP_S می‌تواند بصورت عمومی یا منطقه‌ای علیه عوامل بیماریزای مهاجم به بافتها محافظت بعمل آورند. تعداد زیادی از AMP_S در حشرات و عنکبوتیان مشخص شده است ولی تعداد کمی از آنها در سخت‌پوستان شناسائی گردیده‌اند. در ده سال گذشته چندین مولکول AMP_S در میگو، خرچنگ و خرچنگ دراز آب شیرین شناسائی شده است. یک مولکول پپتید با وزن ۶/۵ kDa و ۳/۷ kDa بنام کالینکتین (Callinectine) بطور بخشی از هموسیتهای خرچنگ‌گونه (*Carcinus maenus*) و (*Callinectus sapidus*) شناسائی شده است. از خانواده مولکولهای AMP_S یک مولکول در همولنف میگوی وانامی (*L.vannamei*) پیدا شده است که هم نقش ضدقارچی و هم فعالیت ضدباکتریائی داشته و بنام پنائیدین (Penaeidians) شناخته شده است. اخیراً ماده هیستون H2A(Histone H2A) که یک مولکول AMP_S می‌باشد از میگوی وانامی کپی و شناسائی شده و این پایانه نیتروژنی یا (N-terminus) مشخص گردیده است که می‌تواند سازنده پپتیدهای ضدباکتریائی هیستون شبیه بوفارین I(Bufarin I) ، Parasin و Hipposin باشد.

فاکتورهای ضدپلی‌ساکاریدی (AntiLipopolysacharide Factors) (ALFs) برای اولین بار از همولنف خرچنگ نعل‌اسبی جدا گردیده و اخیراً نیز از همولنف میگوی مونودن (*P.monodon*) به روشهای ژنتیکی جدا گردیده است. ترکیبات جدید ALF دارای یک خصوصیات گسترده ضدقارچی و ضدباکتریائی علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی می‌باشند. دو مولکول دیگر AMP شامل کرستین(Crustin) و هموسیانین (Hemocyanin) که دارای پپتید ضدمیکروبی می‌باشند درمیگو و خرچنگ آب شیرین شناسائی گردیده‌اند. ماده کرستین با وزن

مولکولی kDa ۱۱/۵ یک ماده ضدباکتریائی است که در خرچنگ (*C.maenus*) نیز وجود دارد. پایانه کربنی هموسیانین (C-terminal hemocyanin) علیه قارچها بسیار فعال بوده اما اینکه مکانیسم عمل آن بوسیله کدام یک از هموسیانین‌ها فعال می‌شود هنوز در میگوها مشخص نگردیده است.

دو بیتید ضدباکتریائی با تجمع پائینی از مولکولها که بنام آستاسیدین ۱و۲ (Astacidin 1,2) نامگذاری شده‌اند از همولنف خرچنگ دراز آب شیرین (*P.leniuscus*) شناسائی گردیده‌اند. آستاسیدین ۱ با داشتن ۱۶ اسید آمینه بوسیله ویژگی تقسیم پروتئولیتیکی هموسیانین تولید می‌شود، درحالیکه آستاسیدین ۲ با ۱۴ اسیدآمینه به مقدار بسیار زیادی شبیه Proline rich peptide، metalinkowin 1 خالص شده از همی‌پتران (Hemipteran) حشره *Palemona prasing* می‌باشد.

۸-۲-۱- ورود ویروسهای پوشش‌دار به سلول (Enveloped virus entry)

راههای ورود ویروسها به داخل سلولها برپایه ساختمان آنها مورد مطالعه قرار گرفته است. براساس ساختار ساختمانی ویروسها، آنها به دو دسته مهم پوشش‌دار و بدون پوشش تقسیم می‌شوند. ویروسهای پوشش‌دار دارای ژنوم ویروسی و پروتئینهای هسته مرکزی می‌باشند که درون یک یا دو غشاء پیچیده شده‌اند. این غشاءها از سلولهای میزبان در زمان ساخته‌شدن و تکثیر آنها بدست آمده‌اند. برای ایجاد عفونت و بیماریزائی، ویروس ابتدا باید خود را به تعدادی سلولهای میزبان چسبانده و نوکلئیک اسید خود را به درون سلولهای میزبان رها نماید. تعداد زیادی از ویروسهای DNA می‌توانند وارد هسته سلولها شوند، درحالیکه ویروسهای RNA با تعدادی استثناء در ماده سیتوپلاسمی یا سیتوزول (Cytosol) تکثیر می‌یابند. مولکولهایی که ویروسها به آنها می‌چسبند شامل یک مجموعه‌ای مختلف از سلولهای پروتئین، کربوهیدرات یا چربی می‌باشد. تعدادی از این سلولها فقط نقش گیرنده ویروس در سطح سلول را دارند. اما بقیه آنها ممکن است علاوه بر این وظیفه که موجب اتصال ویروسها می‌شوند، مسئول هدایت ویروسهای متصل شده به داخل سلولها و انتقال پیامهائی بداخل سیتوپلاسم نیز باشد. همچنین گیرنده‌ها می‌توانند به عنوان پشتیبان، ویروسها را راهنمائی نموده تا موجب تأئید تغییرات سلولی و اجازه‌دادن به سلولها به منظور چسبیدن ویروسها و نفوذ در آنها باشد. شناسائی و توزیع فاکتورهای گیرنده در سطح سلولها به نوع سلولها، بافتها و نوع ارگانیزمهائی که می‌توانند موجب ایجاد عفونت نمایند بستگی دارد.

تعدادی از ویروسها از فاکتورهای چندگانه چسبیدن به سلولها و گیرنده‌ها بطور موازی استفاده می‌نمایند. واکنش‌های بین کربوهیدراتها و پروتئین‌ها نقش اساسی و مهمی در تهاجم ویروسها به سلولها بازی می‌کنند. تعدادی از ویروسها به طور اختصاصی به گروه اسیدهای سیالیک (Sialic- containing group) می‌چسبند، درحالیکه برخی دیگر به گلوکز آمینوگلایسیس یا گلیکولیپیدها متصل می‌شوند. در تعدادی از سیستم‌ها لکتین‌ها در سطح سلول قرار گرفته و رشته‌های کربوهیدراتی در سطح ویروس قرار دارند. ویروسهای پوشش‌دار شبیه *Myxovirus* ها یا *Paramyxovirus* می‌توانند به سیالیک اسید که دارای گلیکوپروتئین با فعالیت neuramidinase می‌باشند متصل شوند. این پروتئینها معمولاً دارای فعالیت چندگانه بوده که می‌توانند فعالیتهای دیگری از قبیل فاکتورهای اتصالی به غشاء یا آنزیم‌های تخریب‌کننده گیرنده‌ها را نیز پشتیبانی کنند. برخلاف ویروسهای پوشش‌دار، ویروسهای بدون پوشش شبیه *rotavirus*ها فاقد غشاء می‌باشند و این دسته از ویروسها به روشهائی غیراز اتصال به سلول و ورود به آن تکیه کرده و از روشهائی شبیه تجزیه کردن غشاء یا ایجاد یک سوراخ در غشاء استفاده نمایند. تعداد زیادی از ویروسها به روش endocytic قادر به نفوذ در سلولها و ایجاد عفونت می‌باشند.

ویروسهائی که از روش endocytosis استفاده می کنند از طریق روشهای مختلف از جمله وزیکولهای clathrin-coated، فاگوسیتوز، ماکروپینوسیتوزیس (macropinocytosis) و ایجاد حفره (caveolae) برای ورود به سلول استفاده می کنند. در این روش ویروسها بداخل سیتوپلاسم سلولهای میزبان وارد می‌شوند. براساس نوع ویروس، ذرات ویروسی را می‌توان در قسمتهای مختلف سلول میزبان اعم از اندامهای داخلی، لیزوزمها، شبکه آندوپلاسمیک و در پاره‌ای مواقع در دستگاه گلژی مشاهده نمود. وجود pH ملایم در اندامهای داخلی سلول تأمین‌کننده شرایط خوبی است که ویروس به داخل سلول وارد شده و سپس تکثیر شود. برای مثال ورود ویروس آنفولانزای تیپ A که یک ویروس RNA دارای پوشش می‌باشد به این شکل است که هم آگلوتیناسیون ویروسی با سیالیک اسید حاوی گلیکوپروتئین یا گلیکولیپد پیوند برقرار می‌کند. ویروس از طریق وزیکولهای Cathrin-coated به داخل سلول حمل شده و به ذرات و اجزاءداخل سلولی وارد می‌شود. pH پائین موجب فعال‌شدن مجاری پروتئینی M_2 در سطح ویروس شده و اجازه می‌دهد که کپسول داخلی ویروس به دلیل شرایط اسیدی حل شود. مواد حد واسط هم‌آگلوتیناسیون ویروسی باعث اتصال پوشش ویروس به اندامهای داخلی سلول می‌شود.

نوکلئوپروتئین‌های ویروس از همدیگر جداشده و به حامل B (importin B) متصل شده و از طریق کمپلکس سوراخ هسته (Nuclear Pore Complex) یا NPC وارد هسته سلول میزبان می‌شود. بعد از نفوذ نوکلئوپروتئین ویروس به داخل هسته سلول، سایر نوکلئوپروتئین‌های ویروسی نیز یا وارد هسته سلول یا سیتوزولهای اختصاصی می‌شوند.

جهت حرکت در گوشه‌های مختلف سلول، ویروسهای وارد شده اغلب از پروتئین‌های سلولی یا حفره‌های داخلی سلولی بهره می‌برند. هسته سلولهای میزبان موجب فراهم شدن عملیات بسیار عالی برای تکثیر ویروسها شد و اندازه آن بسته به نوع DNA یا RNA به واحدهای کوچک RNA توسط آنزیم تغییردهنده تبدیل می‌شود. بهرحال ورود به هسته سلولهای میزبان برای ویروسها بسیار مشکل است و زنده ماندن نیز در هسته سلولها به همین ترتیب مشکل می‌باشد و ویروسها باید از مکانیسم سلول میزبان پیروی نمایند.

همانگونه که ذکر شد ورود ویروس و کپسول ویروسی از طریق NPC صورت می‌گیرد. برای هدف قراردادن سلولها، ویروسها دارای رسپتورها با گیرنده‌های سیتوزولیک (Cytosolic) بوده یا از پیامهای ساکن شدن روی هسته استفاده می‌کنند. به عنوان مثال ویروس HIV-1 و آرنوویروسها به حمل‌کننده 7(importine 7) وصل می‌شوند درحالیکه ویروس هپاتیت B و آنفولانزا به حمل‌کننده αو B (importinα,B) می‌چسبند. حداکثر اندازه جهت انتقال ویروسها از طریق NPC حدود **۳۹** نانومتر می‌باشد. ویروسهای کوچکتر از این اندازه بدون تغییرشکل وارد هسته سلول میزبان می‌شوند درحالیکه ویروسهای بزرگتر از این میزان باید تغییرشکل داد تا ژنوم آنها اجازه ورود از طریق NPC را پیدا کند. تداخل بین ویروس و حاملین B یا 7 یاهیستون HI(histone HI) موجب ایجاد تغییرات در شکل ویروس و کپسول آن می‌شود. در نهایت DNA ویروسها به داخل نکئوپلاسم سلول میزبان وارد می‌شوند. باستثنای *Lentivirus* ها، ویروسهای *retovirus* نیز نمی‌توانند از NPC جهت وارد شدن به داخل هسته استفاده نمایند. در زمان تقسیم سلولی از طریق میتوز کمپلکس یکنواختی وارد هسته سلول شده و این در زمانی است که پوشش ویروس وجود نداشته و همین موضوع باعث عفونت در سلولهای تقسیم شده می‌شود. درخصوص ورود ویروسهای بی‌مهرگان و نفوذ آنها به داخل سلولها هنوز اطلاعاتی کاملتر نیاز است.

۹-۲-۱- دفاع ضدویروسی (Antiviral defence)

در دهه‌های گذشته، تعداد زیادی از پروتئین‌های درگیر در سیستم ایمنی مادرزادی سخت‌پوستان شامل پروتئین‌ها و مولکول‌های مختلف از قبیل سیستم پروفنل‌اکسیداز، پپتیدهای ضدمیکروبی و لکتین‌ها شناسائی شده‌اند. اما این فاکتورها غالباً در مقابله با قارچها، باکتریها و انگل‌ها درگیر بوده ولی درخصوص ویروسها به نسبت خیلی کم این فاکتور دخالت دارند. اخیراً اطلاعات بیشتری درخصوص دفاع ضدویروسی مادرزادی بین ویروس و میزبان در سخت‌پوستان شناسائی شده است.

گیرنده‌های Toll-like (Toll-like receptors) نقشی اساسی در واکنشهای ایمنی مادرزادی دارا می‌باشند. این گیرنده‌ها (TLR_S) از نظر ساختمانی شبیه رسپتورها و گیرنده‌های انترلوکین – ۱ بوده و عمل آنها شبیه فعال‌کننده پیام‌های داخل سلولی (Activator of intracelluar signalling) در مقابل آسیب‌ها یا عفونتها می‌باشد. تاکنون ده نوع از این گیرنده ها در پستانداران شناسائی شده است. برای مثال TLR4,5 & 9 برای شناسایی LPS بسیار ضروری می‌باشند. تاژک باکتریها و DNA آنها دارای ترکیب اصلی غیرمتیله CpG می‌باشند (C_PG DNA). TLR_2 در شناسائی پپتیدوگلیکان و لیپوپپتیدها دخالت دارند. TLR_6 می‌تواند با TLR_2 همکاری نماید و موجب شناسائی پپتیدوگلیکان و لیپوپپتیدهای مایکوپلاسماها شوند. TLR_3 موجب فعال شدن ایمنی سلولی در پاسخ به dsRNA ناشی از ویروسها می‌شود. اخیراً نیز ترکیبات بسیار کوچک ضدویروسی که بنام Imiquimod)imidazoquinolines) و R-848 می‌توانند موجب فعال کردن سیستم ایمنی از طریق TLR_7MyD88 که وابسته به سیستم سیگنالی است شوند.

بهرحال فاکتورهای TLR_S موجب شناسائی ترکیبات اختصاصی ایجاد شده توسط عوامل بیماریزا می‌شوند. براساس این فعالیت TLR_S شامل یک سری از مولکولهای وفق دهنده داخل سلولی بوده که موجب راهنمائی و تنظیم سیگنالهای ایجاد شده ناشی عوامل بیماریزا می‌باشد. درحشرات شناسائی باکتریها و قارچهای که موجب تحریک سیستم ایمنی می‌شوند از طریق TLRها و راههای کاهش ایمنی یا Imd)Immune deficiency) انجام می‌شود. بهرحال در بی‌مهرگان سیستم TLR در فعالیتهای ضدقارچی و ضدباکتریائی دخالت داشته ولی درخصوص فعالیت آنها در عفونتهای ناشی از ویروسها هنوز به خوبی شناسائی نشده است. در مهره‌داران از مدتها پیش نقش اینترفرونهای α و β ناشی از عمل سیتوکیناز در مقابل عفونتهای ویروسی مشخص گردیده است. این سلولها دارای توانائی تحریک راههای مختلف ضد ویروسی می‌باشند. این سلولها موجب ایجاد

سیگنالهایی از طریق Janus kinase/signal شده و هزاران ژن تولید می‌کند. از مواردی که مطالعه زیادی روی آنها صورت گرفته و موجب ایجاد ژن تیپ ۱ اینترفرون بود که شامل سرین/ تیرونین پروتئین کیناز d_sRNA فعال شده (PKR)، پروتئین‌های مقاوم به میکسوویروسها (Mx)(*myxovirus*-resistance protein، RNase L، Oligodenylate synthetase، RNA-Specific adenosine deaminase(ADAR) و خود IFN_S ها می‌باشند.

یکی از مهمترین ایجادکننده اینترفرونها مولکول dsRNA می‌باشد. این مولکول در هنگام عفونت ویروسی در نتیجه تکرار ژنوم ویروسی و RNA ویروسها به یک ساختمان ثانویه تبدیل می‌شود. در پستانداران dsRNA توسط TLR_3 شناسائی می‌شوند که موجب فعال‌شدن فاکتور ۸۸ تمایز میلوئید(Myeloid differentiation factor 88) می‌شود که یک مولکول وابسته است همچنین dsRNA موجب فعال شدن فعالیت ضدویروسی داخل سلولی نیز شده که این عمل بوسیله تأثیر مستقیم PKRها می‌باشد. این فعالیت موجب هدایت مهارکنندگی سنتز سلولی پروتئینی از طریق فسفریلاسیون فاکتور ۲α(eukaryotic translation initiation factor 2α) (elf 2α) می‌شود. این سیستم در بی‌مهرگان مثل سخت‌پوستان وجود ندارد.

براساس مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که سخت‌پوستان مثل میگوی وانامی می‌توانند ایجادکننده دفاع ضدویروسی dsRNA باشند. مشخص گردیده است که میگوهائی که با ویروسهای WSSV و TSV بصورت تجربی آلوده و سپس با ds RNA درمان شده‌اند مقاومت آنها افزایش یافته است. ایجاد این سیستم دفاعی dsRNA مستقل بوده و ارتباطی با ردیف بازهای RNA نداشته وبه صورت یک مولکول ثابت به صورت میانجی در پدیده اینترفرون دخالت دارد. این پدیده نشان می‌دهد که ممکن است واکنشهای عمومی ضدویروسی در بی‌مهرگان وجود داشته باشد. همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که ترکیباتی میکروبی مثل LPS یا بتاگلوکانها ممکن است موجب افزایش ایمنی میگوها در مقابل ویروسها شوند. بطور تجربی نشان داده شده است که ژن LGBP موجب افزایش ایمنی و تعدیل عفونت WSSV در مراحل اولیه عفونت شده و همچنین با پیشرفت بیماری موجب کاهش نظم در سیستم پروفنل‌اکسیداز می‌شود. یک ژن جدید بنام PmAV در مقاومت ویروسی میگوی مونودن شناسائی و کپی‌برداری شده است. این ژن با ۱۷۰ اسیدآمینه و با C-type lectin- like domaine (CTLC) ساخته شده است. پروتئینهای حامل PmAV دارای یک فعالیت ضدویروسی قوی بوده که این موضوع از طریق آزمایشگاهی و مهار تأثیرات سلولی در محیط کشت مشاهده گردیده است.مطالعات ایمنولوژیکی نشان می‌دهد که این ژن در

سیتوپلاسم سلولهای میگو بوده ولی به ویروس WSSV متصل نمی‌شود. چنین حدس زده می‌شود که مکانیسم PmAV شامل جلوگیری از چسبیدن ویروس به سلول میزبان نمی‌باشد و مکانیسم‌های دیگری در عمل ضدویروسی این مولکول نقش دارند که هنوز شناخته نشده است. تعدادی از مواد ضدویروسی از بافتهای موجودات بی‌مهره از جمله میگوی Setiferus، خرچنگ آبی (blue crab)، خرچنگ آب شیرین که می‌تواند با گروههای مختلفی از ویروسهای RNA یا DNA مثل Sindbis virus، vesicular stomatatis virus، vacceina virus، mengo virus، Banzi virus و poliomyetitis virus متصل شوند،جداسازی و شناسائی گردیده است. فعالیت مهارکننده‌گی این مواد هنوز شناسائی نشده است. اخیراً هموسیانین با وزن مولکولی ۷۳ تا ۷۵ کیلو دالتون از میگوی مونودون جداشده و دارای خصوصیات ضدویروسی غیراختصاصی بوده ولی فاقد تأثیرات مسمومیت سلولی cytotoxicity علیه سلولهای میزبان می‌باشد.

۱۰-۲-۱- مکانیسم های گریز ویروسها از سیستم دفاعی میزبان

بعد از ورود ویروس به داخل بدن، سلولهای میزبان معمولاً اجرام خارجی وارد شده به بدن را شناسائی و موجب تحریک سیستم ایمنی مؤثر به منظور جلوگیری از ورود ویروس به داخل سلولها می‌شوند و در نهایت مانع تکثیر و گسترش ویروس می‌گردند. اولین فاز سیستم دفاعی در بدن مهره‌داران شناسائی ترکیبات تشکیل‌دهنده ویروسها، بالاخص پپتیدها می‌باشند. این پپتیدها به عنوان اجسام خارجی و به مثابه یک آنتی‌ژن به عنوان Antigen-Presenting cell درسطح سلولهای ایجادکننده آنتی‌ژن Major histo compatibility complex (MHC)Antigen می‌باشند.

وقتی که شناسائی صورت گرفت، سیستم دفاع ایمنی آبشاری سلولی و هومورال به منظور شناسائی قطعی ویروس آغاز می‌شود. به عنوان مثال آنتی‌بادیها می‌توانند موجب خنثی نمودن ویروسهای درحال گردش در سلولها شده و همچنین سلولهائی که دارای ویروس می‌باشند را تخریب نمایند. پاسخ سلولی همچنین موجب تجزیه‌نمودن سلولهای حاوی ویروس شده و کمک به شروع تولید آنتی‌بادی در بدن می‌نماید. فاکتورهای قابل حل از قبیل فاکتور نکروزکننده تومور Tumor Necrosis factor(TNFs) اینترلوکین‌ها (ILs) و اینترفرونها (IFNs) تداخل با لمفوسیتها نموده و موجب توقف یا گسترش پاسخ ایمنی می‌شود. تداخل بین ویروس و سیستم ایمنی در شناسائی

ویروس توسط سلولهای میزبان همچنین در بهبود و نجات میزبان بسیار مهم و حیاتی می‌باشد. تعداد زیادی از مسائل مرتبط با تداخل ویروس- سیستم ایمنی در دهه اخیر روشن شده است. بهرحال این موضوع هنوز بی‌پاسخ مانده است که چگونه ویروس خود را از پاسخ سیستم ایمنی دور نگه داشته و باعث ایجاد عفونت در بدن میزبان می‌شود.

ویروس از روشهای مختلفی جهت جلوگیری از اثر سیستم ایمنی میزبان برخود استفاده می‌کند که شامل جلوگیری از ایمنی هومورال، دخالت در اینترفرونها، مهار و تغییر سیتوکیناز و کیموکینازها (chemokines)، مهار آپاپتوزیس (apoptosis) و فرار کردن از CTLs و NKs و همچنین تعدیل کردن فعالیت MHC می‌باشد.

آپاپتوزیس به عنوان یک عامل ایمنی مادرزادی می‌تواند در محدود کردن تکثیر ویروسها مؤثر باشد در این روش مرگ سریع سلولها موجب محدود شدن تکثیر و تولید ویروسها و کاهش یا حذف پراکنده‌شدن ویروسها در سلولهای میزبان می‌شود. اغلب ویروسها دارای مکانیسمی هستند که یا از آپاپتویس فرار کرده و یا در ایجاد آن تأخیر می‌اندازند و در نتیجه اجازه می‌یابند که میزان زیادی ویروس را تولید و تکثیر نمایند. تعداد زیادی از ویروسها دارای ژنهای رمزداری هستند که بطور مؤثر باعث توقف یا تأخیر در ایجاد آپاپتوز شده و فرصت کافی برای ازدیاد ویروس در حد مناسب برای ایجاد بیماری پیدا می‌شود. به عنوان مثال باکولوویروسها دارای P33 و IAP پروتئین بوده که می‌تواند موجب مهار چندگانه آنزیم پروتئاز یا (Caspase) شود. بعلاوه تعداد زیادی از ویروسها در حال رشد به منظور ایجاد فعالیت آپاپتوزیس در مراحل آخر عفونت ویروسی لازم است. این موضوع یک مرحله مهم و نهائی در گسترش ویروس به سلولهای همجوار سلولهای آلوده بوده که می‌تواند موجب فرار سلولها از پاسخ‌های ایمنی التهابی شده و همچنین باعث محافظت ویروس‌های ایجاد شده از آنزیم‌ها وآنتی‌بادیها باشد.

مطالعات اخیر در میگو نشان داده است که آپاپتوزیس مسئول حذف سلولهای آلوده به ویروس در سلولهای عفونی می‌باشد. هر چند WU و Moroga در سال ۲۰۰۴ پیش‌بینی می‌کنند که این روش یعنی آپاپتوزیس نمی‌تواند موجب مهار ویروس لکه‌سفید در میگوی *P. kuruma* باشد.گزارش ارائه شده توسط sahtout و همکاران (۲۰۰۱) نشان داده است که میگوهای با علائم ظاهری WSSV دارای ۴۰٪ سلولهای آپایتوز شده بوده و چنین حدس زده می‌شود که این موضوع دلالت بر مرگ میگوها می‌باشد. همچنین دربروز بیماری سر زرد (YHD) در میگوی

مونودون گسترش و ظهور آپاپتوزیس در سلولهای میگو از مهمترین دلایل عدم کارائی و مرگ سلولهای میگوی میزبان ویروس می‌باشد. بهرحال درجه آپاپتوزیس در بافتهای مختلف میگو با بیماری لکه‌سفید نشان می‌دهد که این پدیده بعد از بروز بیماری در میگو بوجود آمده، اما اینکه به چه میزان در مرگ‌ومیر میگوها دخالت دارد نیازمند تحقیقات بیشتر است.

۳-۱- واکسن‌ها

واکسن‌ها فرآورده‌های دارویی هستند که جهت پیشگیری از بیماری‌ها تولید و مورد استفاده قرار گرفته و دارای حداقل عوارض جانبی می‌باشند.علی‌رغم تمامی کوشش‌های انجام شده جهت ارائه واکسن‌های مؤثر و ایمن، گاهی اوقات این اهداف میسر نبوده و هزینه‌های پرداخت شده توسط آزمایشگاه‌ها جهت آزمون واکسن‌ها برروی حیوانات آزمایشگاهی بسیار زیاد می‌باشد. تخمین زده می‌شود که حدود ۲۰-۱۰٪ حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده در آزمایشگاه‌های مختلف در جهان در جهت انجام کنترل کیفی واکسن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از واکسن‌ها موجب تحریک سیستم ایمنی بدن پس از مواجه با بیماری ناشی از باکتری یا ویروس شده، پس از نابودی عوامل بیماریزا موجب پیدایش ایمنی موقت یا پایدار در مقابل این عوامل بیماریزا می‌شود (کارگاه آموزشی بیوتکنولوژی، جنبه های کنترل کیفی واکسن‌ها، ۱۳۸۵، Stefan etal.,2004). برخی از مهمترین آزمایشهای حیوانی که بر روی واکسن‌ها انجام می‌گیرد عبارتند از :

الف – انجام آزمون پوتنسی بر روی حیوانات

واکسن‌های زنده نظیر واکسن خوراکی فلج اطفال، سرخک، سرخجه و اُریون برای انجام آزمون پوتنسی نیازی به حیوان ندارند ولی برای تعیین پوتنسی واکسن‌های کشته شده از حیوانات آلوده به ویروس عامل بیماری استفاده می‌شوند. برخی از این حیوانات از قبل بر علیه عامل بیماری‌زا ایمن شده‌اند ولی برخی دیگر که به عنوان گروه کنترل کننده استفاده می‌شوند، معمولا بر علیه بیماری حفاظت نشده و بیماری در آنان مشاهده می‌شود و در این حیوانات بروز بیماری و یا مرگ غیر قابل اجتناب می‌باشد. برای مثال می‌توان به آزمایش پوتنسی واکسن ضد هاری اشاره کرد که در این آزمایش ویروس هاری مستقیماً به مغز موش تزریق می‌گردد و این موش‌ها برای

۱۴ روز تحت نظر قرار گرفته و موارد مرگ و میر و بیماری در آنها ثبت می‌شود. این آزمایش موجب اذیت و آزار حیوانات به میزان بسیار زیادی می‌گردد و تخمین زده شده است که برای انجام این آزمایش در اروپا سالیانه حدود ۲۳۷۰۰-۱۶۰۰۰ موش مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این وجود میزان نتایج در آزمایشگاه‌های مختلف یکسان نبوده است. ارتباط میان نتایج حاصل از آزمون‌های آزمایشگاهی و اثر بخشی این واکسن در انسان هنوز ثابت نشده است. تعیین پوتنسی واکسن‌های دیفتری، سیاه سرفه و کزاز نیز با استفاده از حیواناتی نظیر خوکچه هندی و موش انجام می‌گیرد. تخمین زده می‌شود که برای تعیین پوتنسی واکسن کزاز در اروپا سالانه حدود ۵۰۰۰۰ راس حیوان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تمامی این موارد حیوان مورد اذیت و آزار قرار گرفته و در بسیاری از موارد منجر به مرگ و میر در حیوانات می‌شود و این مسئله موجب ایجاد نارضایتی در برخی گروه‌های اجتماعی شده است. به ویژه اینکه در پاره‌ای از موارد ارتباط میان نتایج حاصل از مطالعات حیوانی با مطالعات انسانی کامل نبوده است (کارگاه آموزشی بیوتکنولوژی، جنبه های کنترل کیفی واکسن‌ها، ۱۳۸۵، Stefan *etal.*,2004).

ب – انجام آزمون ایمنی مصرف بر روی حیوانات

آزمایش‌های تعیین سمیت غیرمعمول واکسن‌ها معمولا با استفاده از حیوانات انجام می‌گیرد. تا قبل از سال ۱۹۹۷ انجام این آزمون برای کلیه واکسن‌ها الزامی بود ولی با مطالعات انجام شده مشخص گردید که این آزمون ارزش کمی داشته و انجام آن در کشورهای اروپایی لغو گردید. تخمین زده شده است که با لغو این آزمایشها در اروپا در هر سال در حدود ۲۵۰۰۰ حیوان از مرگ نجات پیدا کرده‌اند ولی با این وجود سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization) انجام این آزمون را در کشورهای تولید کننده واکسن غیر اروپایی الزامی می‌داند که این مسئله بدون در نظر گرفتن کیفیت استاندارد کارخانه‌های تولید واکسن اعمال می‌شود.

یکی از آزمایش‌هایی که بر روی واکسن خوراکی فلج اطفال انجام می‌گیرد آزمون تهاجم عصبی (Neurovirulace) می‌باشد که برای تعیین وحشی شدن گونه ویروس مورد استفاده برای تولید واکسن بر روی میمون انجام می‌گیرد. این آزمایش موجب اذیت و آزار حیوان برای مدت طولانی می‌شود و در هر سری آزمایش حداقل ۸۰ میمون استفاده می‌شود. در این آزمایش‌ها واکسن به درون طناب نخاعی حیوان تزریق

می‌شود که روش بسیار دردناکی می‌باشد و در طی سه هفته حیوانات را تحت نظر قرار می‌دهند که در طی این مدت ممکن است برخی از حیوانات علایمی نظیر انقباضهای عضلانی و فلج را نشان دهند که از علایم عفونت با واکسن فلج اطفال می‌باشد. اغلب حیوانات مورد استفاده در این آزمایش دچار زخم‌های ناحیه نخاع (Spinal Lesion) می‌شوند. نتایج حاصل از این آزمایش‌ها با نتایج مشابه از دسته های تولیدی که ایمنی آنها به اثبات رسیده است مقایسه شده و اگر اختلاف معنی دار در بین نتایج دیده نشود آن دسته برای مصرف انسان مناسب تشخیص داده می‌شود. این آزمون در طی هر پروسه تولید واکسن تکرار می‌شود و اغلب این آزمایش‌ها در کشورهایی که این واکسن را وارد می‌کنند مجدداً تکرار می‌شود که نشانگر تعداد زیاد حیوان مورد استفاده و میزان اذیت و آزار حیوان در کنار هزینه‌های کلان مورد نیاز برای انجام آنها می‌باشد (کارگاه آموزشی بیوتکنولوژی، جنبه های کنترل کیفی واکسن‌ها، ۱۳۸۵، Stefan etal.,2004).

ج – انجام آزمون خلوص بر روی حیوانات

این آزمون عموماً برای اطمینان از عدم وجود آلودگی‌های ویروسی در واکسن‌های تولیدی نظیر واکسن سرخک،اوریون،سرخجه، آبله مرغان، فلج اطفال و تب زرد استفاده می‌شود. در این آزمایش‌ها موش‌های بالغ و نوزاد از طریق تزریقات داخل شکمی و داخل مغزی نمونه‌های ویروسی که برای تولید واکسن مورد استفاده قرار گرفته‌اند مورد آزمایش قرار می‌گیرند و سپس برای مدت دو هفته از نظر بروز علایم بیماری ناشی از آلودگی ویروسی تحت نظر قرار می‌گیرند. امروزه مؤثر بودن این روش‌ها در تعیین ایمنی واکسن‌ها مورد سؤال قرار گرفته است.

۱-۳-۱- آزمایش‌ها بر روی گونه‌های غیر حیوانی

یکی از روش‌های جایگزینی برای آزمایش‌ها حیوانی استفاده از استانداردهای بسیار بالا در پروسه‌های تولید واکسن می‌باشد که این روش به نام Ultimate Alternative در مورد تولید برخی از واکسن‌ها استفاده می‌شود و استفاده از این روش‌ها روبه توسعه می‌باشد. امروزه چندین روش آزمایش ایمنی، پوتنسی و خلوص بدون استفاده حیوانات در دست بررسی می‌باشد. برای مثال در برخی از مراکز تولید واکسن با استفاده از تکنولوژی DNA

micro array که در آن تغییرات فعالیت ژن‌ها بررسی می‌شود برای مطالعه ایمنی واکسن سیاه سرفه در آزمایشگاه استفاده می‌شود. اگر این روش با موفقیت کامل همراه باشد از آن آزمون ایمنی سایر واکسن‌ها مثل کزاز نیز قابل استفاده خواهد بود. کمپانی داروسازی Merck برای انجام آزمون تعیین پوتنسی واکسن هپاتیت B از یک روش آنزیمی استفاده می‌کند در صورتیکه تا قبل از آن برای انجام آزمون از موش استفاده می‌شد. مثال دیگر استفاده از میمون برای آزمون ایمنی فلج اطفال تزریقی تا پیش از سال ۱۹۸۰ می‌باشد که در آن سال سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization) این روش را با روش استفاده از کشت سلولی جایگزین نمود و با این عمل جان هزاران میمون از مرگ حفظ گردید. امروزه برای انجام آزمون ایمنی فلج اطفال خوراکی هنوز از میمون استفاده می‌شود و کوشش زیادی در جایگزین کردن روش‌های آزمایشگاهی مثل استفاده از Mass Spectrometry به جای آزمایش‌ها حیوانی در حال انجام می‌باشد. استفاده از روش‌های جایگزین به جای حیوانات آزمایشگاهی بایستی به عنوان یک اولویت در نظر گرفته شود تا ضمن اطمینان از کیفیت واکسن‌های مورد استفاده موجب حفظ جان هزاران حیوان و صرفه جویی در مبالغ گزافی شود که در این راه به هزینه گرفته می‌شود (کارگاه کنترل کیفی واکسنها) (کارگاه آموزشی بیوتکنولوژی، جنبه های کنترل کیفی واکسن‌ها، ۱۳۸۵، Stefan *etal.*,2004).

۲-۳-۱- ویژگی های یک واکسن خوب

- ایجاد پاسخ ایمنی مناسب
- محافظت طولانی مدت
- سلامتی (Safety)
- پایداری (Stability)
- قابل تهیه بودن (Affordable)

۳-۳-۱- عوامل مؤثر در ایجاد پاسخ مناسب به ایمن سازی

- میزان ایمنی زایی آنتی‌ژن – هر چه میزان ایمنی‌زایی واکسن بیشتر و مدت زمان ایمن بودن فرد طولانی‌تر باشد، بهتر خواهد بود.

- دز مصرفی (خصوصاً در مورد واکسن‌های کشته شده) که هر چه دز مصرفی کمتر باشد میزان تحمل واکسن بهتر و عوارض جانبی واکسن کمتر خواهد بود.
- راه و محل تزریق: واکسن‌های زنده ضعیف شده به روش زیرجلدی تزریق می‌شوند (SC) چون تزریق عمیق آن می‌تواند به اعصاب آسیب برساند.
- واکسن‌های غیر زنده به روش عمیق تزریق می‌شوند، چون به علت وجود آلومینیوم در تزریق سطحی می‌تواند آبسه کند.
- واکسن‌های دارای آلومینیوم در بافت چربی نیز می‌تواند ایجاد آبسه کند.
- سن دریافت کننده
- وضعیت ایمنی و وضعیت جسمی فرد – مصرف واکسن‌های ضعیف شده در افراد با نقص ایمنی ضعیف شده ممنوع است.

٤-١- کاربرد روش‌های هسته‌ای در تهیه واکسن‌های غیرفعال شده

برای حفظ سلامت حیوانات و اجرای برنامه‌های سلامت،کاربرد واقعی واکسن‌های مؤثر، کارآمد، سالم و خالص ضروری می‌باشد. ایمن سازی حیوانات با واکسن‌های با کیفیت خوب هدف اولیهٔ کنترل بسیاری از بیماری‌های حیوانات است، لذا واکسن‌ها برای کنترل بیماری‌ها یا برنامه‌های ریشه‌کنی به کار می روند.

به طور کلی واکسن‌ها را می‌توان به سه نوع تقسیم نمود :

- واکسن‌های زنده یا تخفیف حدّت یافته
- واکسن‌های کشته یا غیرفعال شده
- واکسن‌های زیر واحدی و توکسوئید (Toxoids sub unit)

توضیحات مختصری در مورد هر یک به شرح زیر می‌باشند :

۱-٤-۱- واکسن‌های زنده یا تخفیف حدّت یافته (Live or a Haunted Vaccines):

واکسن‌های زنده باعث ایجاد یک عفونت بدون علائم و خود محدود کننده می‌شوند. بنابراین سیتم ایمنی میزبان را مشابه با عفونیهای طبیعی تحریک می‌کنند. یکی از خواص اینها که با خواص ایده‌آل واکسن‌ها مطابقت دارد، حفاظت طولانی مدت با کمترین میزان تجویز واکسن در یک دز یا تعداد دزهای کم که در میزبان ایجاد می‌کنند، می‌باشند. تخفیف حدّت میکروارگانیسم‌ها باعث حذف توانایی ایجاد بیماری در آنها می‌گردد که می‌تواند توسط روش‌های بیولوژیکی مثل: پاساژ عامل بیماری‌زا در میزبانهای غیر معمول، رشد آنها در شرایط زیر حد مطلوب، موتاژن‌های شیمیایی و... ایجاد شوند.

در گذشته تخفیف حدّت دادن توسط تکنیک های تجربی ایجاد می‌شد. در حالیکه با توسعه دانش امروزی در زمینه پاتوژن‌های میکروبی و تکنولوژی DNA نوترکیب به ما اجازه داده می‌شود که هدف‌های مولکولی برای تخفیف حدّت واکسن‌ها را شناسایی نموده و ترکیب معقول و درستی از سوش‌های واکسن که شامل ژن‌های حذفی شناخته شده‌اند، ایجاد نماییم. در سوش‌های ایجاد شده از طریق تکنولوژی DNA نوترکیب، تخفیف حدّت عوامل بیماری‌زا باید به گونه ای باشد که پاتوژنیستی را بدون خطر برگشت فنوتیپ نوع وحشی محدود نماید و نباید توسط رژیم غذایی و یا تغییرات ایجاد شده در میزبان که ناشی از رژیم غذایی هستند. مثل فلور میکروبی میزبان، قابل بازگشت باشد. ضمناً ضروری است که تخفیف حدّت یک حالت پایدار در واکسن‌ها باشد، و این نوع واکسن‌ها دارای ثبات کمتری هستند به آسانی توسط حرارت با نور تخریب می‌شوند.

۲-٤-۱- واکسن‌های زیر واحدی و توکسوئید (Toxoid & subunit)

یک واکسن زیر واحدی ایده‌آل شامل آنتی‌ژن‌های ضروری برای پاتوژن‌های میکروبی است که در القاء پاسخ‌های ایمنی حفاظتی مؤثرند، نخستین واکسن‌های زیر واحدی، توکسین‌های باکتریایی بودند که سم زدایی (detoxified) شده بودند. واکسن‌های زیر واحدی بیشتر آنتی‌ژن‌های خالص شده، پروتئین‌های نوترکیب و پروتئین‌های طبیعی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند [۱۵].

۳-٤-۱- واکسن‌های کشته یا غیرفعال شده (Inactivated or Killed Vaccines):

بسیاری از واکسن‌ها علیه بیماری‌های عفونی انسان و حیوان شامل کل ارگانیسم غیرفعال شده که ایمونوژنیستی آن حفظ گردیده است، می‌باشند. بحرانی‌ترین مراحل در تولید این نوع واکسن‌ها، غیرفعال‌سازی و آزمونهای تائید سلامت (Safety Test) هستند.

غیرفعال‌سازی می‌تواند توسط روش‌های حرارتی، مواد شیمیایی و پرتوها انجام شود (کارگاه روش تحقیق کاربرد روشهای هسته ای در علوم کشاورزی، ۱۳۸۵).

مواد شیمیایی که برای غیرفعال‌سازی به کار می روند شامل :

۹- غیرفعال‌سازی با فرمالدئید (formaldehyde):

اخیراً اکثر روش‌های اروپایی، فرمالدئید را برای غیرفعال‌سازی ویروس‌ها استفاده می‌کنند که عمدتاً به آن روش Waldmann گویند. اما سلامت این نوع واکسن‌ها مورد شک و تردید است، چونکه ویروس باید به ژل $AL(OH)_3$ جذب شود و این ژل برای سلول‌ها سمی است. همچنین فرمالدئید می‌تواند باعث اتصال متقاطع مولکول‌های پروتئینی گردد و بعضی اوقات خاصیت آنتی‌ژنیستی را تخریب نماید. ضمناً بعضی اوقات غیرفعال‌سازی توسط فرمالدئید به طور کامل انجام نمی‌شود.

۱۰- غیرفعال‌سازی با آزیریدینها

روش‌های غیرفعال‌سازی با آزیریدین‌ها مثل استیل اتیلن ایمین، اتیلن ایمین، پروپیلن ایمین، کمتر از روش فرمالدئید بحرانی هستند. ولی از آنجائیکه آزیریدین‌ها شدیداً سمی هستند، بسیاری از کارخانه‌های تولید واکسن مایل به استفاده از این عوامل نمی‌باشند.خوشبختانه در بین اینها بروموا‌تیل آمین هیدروبروماید (BEA) کمتر مضر است و در pH بالای ۸ به اتیلن ایمن فعال تبدیل می‌شود. بنابراین طی دو روش می‌توان آن را استفاده کرد یا قبل از استفاده pH آن را بالا برد یا به محیط حاوی ویروس با pH=8.4 آن را افزود.

در انتهای غیرفعال‌سازی باید آزمونهای تائیدیهٔ غیرفعال‌سازی انجام شود که در مورد ویروس‌ها باید بر روی سلول‌های میزبان مناسب کشت انجام گیرد.

۱۱- غیرفعال‌سازی توسط پرتوها

پرتوهای یونساز دارای انرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشندگی شدید می‌باشند. اشعه گاما پرتویی است با شدت خیلی زیاد، قدرت نفوذ بالا که ضمن واپاشی ایزوتوپهای رادیواکتیو تولید می‌شود. مهمترین ایزوتوپ که به طور وسیع استفاده می‌شود، کبالت ۶۰ می‌باشد. میزان انرژی جذب شده از پرتوها در سلول‌ها را دز جذبی پرتو گویند که واحد آن راد می‌باشد. در سیستم SI به جای واحد راد از گری (Gray) استفاده می‌شود. (1Gray = 100 rads)

۵-۱- اثر پرتوهای یونساز بر روی میکروارگانیسم ها

مرگ میکروارگانیسم‌ها نتیجه عمل یونسازی پرتو با انرژی بالا می‌باشد. این پرتو انرژیش را به مولکول‌ها انتقال داده که این مسئله وابسته به عدد اتمی اتم‌های تشکیل دهنده مولکول می‌باشد و این هیچ ربطی به شکل مولکول ندارد و موجب پدیده یونیزاسیون شده که منتج به تغییرات شیمیائی در مواد بیولوژیکی به صورت کم و بیش اتفاقی خواهد شد. اثر یونیزاسیون اشعه به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم رخ خواهد داد و در شکل اول به طور مستقیم در مولکول‌های آب رخ داده که به صورت طبیعی در سلول حضور دارد و ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌نماید. در هر دو صورت تغیرات شیمیایی در سلول رخ خواهد داد. یکی از نقاطی که به عنوان هدف پرتو مطرح می‌باشد، هسته سلول و DNA موجود در آن می‌باشد. پرتو ایجاد ضایعات کشنده در هسته نموده و تغییراتی در DNA به وجود می آورد که موجب ممانعت از تقسیم سلول هم در باکتری‌ها و هم در سلول‌های پستانداران می‌شود. این تغییرات بیشتر روی بازهای آلی رخ می‌دهد(کارگاه روش تحقیق کاربرد روشهای هسته ای در علوم کشاورزی، ۱۳۸۵).

۱-۵-۱- اثر پرتوهای یونساز بر روی باکتری ها

پرتودهی توسط اشعه گاما یا الکترون‌های سریع مثل سایر روش‌ها از جمله : روش‌های حرارتی، خشک کردن، سرما، مواد شیمیایی و... به عنوان یک روش برای کنترل باکتری‌ها شناخته شده است. پرتودهی برای غیرفعال‌سازی باکتری‌ها با بعضی خواص بی نظیر مثل: توانائی نفوذ، اثرات کشنده برای غیرقابل دسترس ترین

سلول‌های آلوده کننده، از جاذبه‌های ویژه‌ای برخوددار است. کاربرد این روش در استرلیزاسیون وسایل پزشکی، دارویی و بافت‌های بیولوژیکی همچنین در فرآیند حفاظت مواد غذائی و کنترل پاتوژن‌های غذایی و افزایش زمان نگهداری مواد غذایی و تهیهٔ واکسن‌های کشته شده دارای اهمیت است. با تغذیه طولانی مدت حیوانات با این نوع غذاهای پرتودهی شده ثابت گردید که در غذاهای پرتودهی شده اثرات سمی وجود ندارد. همچنین ارتباط بین کاهش تعداد جمعیت باکتری‌ها با افزایش دز پرتودهی نیز ثابت گردیده است. میزان مرگ سلول‌های باکتریایی و یا غیرفعال‌سازی باکتری‌ها که توسط پرتودهی القاء شده است. از طریق عدم توانایی در تشکیل کلنی باکتری‌ها بر روی محیط کشت مغذی اندازه‌گیری می‌شود و اثرات تیمارهای ویژه پرتودهی توسط تعداد باکتری‌های زنده مانده از کل جمعیت اولیه مشخص می‌گردد.

بنابراین با تیمار تعداد مشخصی از جمعیت اولیه باکتری‌ها با دزهای متفاوت پرتودهی و شمارش تعداد باکتری‌های زنده باقیماند (این تعداد به صورت کسری از تعدد اولیه بیان می‌شود و کسر بقا گفته می‌شود.) می‌توان منحنی به نام منحنی دز/پایندگی (Dose / Survival) ترسیم نمود که ارتباط بین تعداد ارگانیسم‌های زنده و دز پرتودهی را بیان می‌کند .(Lombardo, J. H and E. E. Smolko, 1990).

D_{10}-value –۱–۵–۲

از روی منحنی‌های دز / پایندگی می‌توان احتمال وجود میکروارگانیسم‌های زنده باقیمانده را محاسبه نمود.

D_{10}-value به عنوان دز کاهش ده تایی برای کاهش یک کسر از میکروارگانیسم‌های زنده در طی یک سیکل لگاریتمی بیان می‌شود. یا بعبارتی دزی از پرتو گاما بر حسب کیلوگری که بتواند جمعیت میکروبی را یک سیکل لگاریتمی کاهش دهد. که توسط فرمول ریاضی زیر قابل محاسبه است:

$$\log_{10} \frac{N}{NO} = -KD$$

در اینجا N تعداد سلول‌های زنده باقیمانده بعد از تیمار جمعیت اولیه با دز D می‌باشد.

N_0 تعداد اولیهٔ سلول‌های زنده

K ثابت معادله برای شیب منحنی است این شیب $\frac{1}{D_{10}}$ می‌باشد.

تعداد سیکل لگاریتمی یا توانی از ۱۰ که جمعیت اولیهٔ میکروارگانیسم‌ها را توسط پرتودهی با دز مشخصی کاهش می‌دهد به سادگی از طریق تقسیم دز تیمار بر $D_{10}V$ به دست می‌آید و اگر این خارج قسمت X در نظر گرفته شود پس 10^x به عنوان فاکتور غیرفعال‌سازی بیان می‌شود.

$$\frac{D}{D_{10}value} = X \Rightarrow \text{فاکتور غیرفعال‌سازی} = 10^x$$

۳-۵-۱- اثر پرتوهای یونساز بر روی ویروس‌ها

رادیوبیولوژیست‌ها در سال ۱۹۵۵ متوجه شده بودند که ارتباطی بین عمل پرتوهای یونساز و از بین رفتن خاصیت عفونت‌زایی ویروس‌ها وجود دارد. ویروس‌ها دارای ساختار بسیار متنوعی هستند از ویروسهای بسیار ساده که شامل یک نوکلئیک اسید کوتاه تک رشته‌ای و دو یا سه پروتئین تا ویروس‌های بزرگتر که شامل پروتئین‌های متنوع و بعضی لیپیدها هستند. پیچیدگی ساختمان بعضی ویروس‌ها باعث ایجاد یک فاکتور ثانویه می‌شود که آنها را قادر به تعمیر بعضی آسیب های پرتودهی می‌نماید.

پرتودهی ویروس‌ها در محیط‌های آبی با ایجاد دو نوع اثر می‌تواند ویروس‌ها را غیرفعال نماید، یکی اثر Long – Lived که ناشی از عمل هیدروژن پراکسید یا یک پراکسید آلی است. دومی اثر کوتاه مدت که شامل انواع متنوعی از رادیکال‌های فعال است، مثل رادیکال‌های هیدروژن و هیدروکسیل ناشی از آب و الکترون‌ها. مثلاً در محلولهای فسفات بافر، رادیکال‌های فعال فسفات می‌تواند تشکیل شود. این عوامل فعال معمولاً بر روی پروتئین‌های لیپیدی ویروس‌ها عمل می‌کنند و باعث غیرفعال‌سازی می‌شوند. در محیط‌های خشک دزهای بالاتری برای اثر بر عفونت‌زایی ویروس‌ها لازم است. در حالت خشک یونسازی در یک ناحیهٔ بحرانی DNA احتمالاً برای حذف عفونت‌زایی لازم است.

حساسترین خاصیت ویروس‌ها، عفونت‌زایی آنهاست. چونکه عفونت‌زایی معمولاً همهٔ خواص یک ویروس را برای تکمیل یک سیکل عفونت نیاز دارد. برای ویروس‌های با ساختمانهای بسیار ساده (دارای یک لیپید احاطه کننده یک RNA یا DNA تک رشته‌ای کوتاه) اثر غیرفعال‌سازی خاصیت عفونت‌زایی در عمده موارد یک آسیب به نوکلیئک اسید است. برای غیرفعال‌سازی ویروس‌هایی که دارای اسید نوکلئیک دو رشته‌ای هستند یا

باید آسیب به هر دو رشته وارد شود و یا به یک قطعه‌ای از DNA که برای ویروس بحرانی است مثلاً قطعهٔ که به DNA پلیمراز اختصاصی ترجمه می‌شود.

حرارت و پرتودهی هر دو ممکن است در تخریب ویروس و استریلاسیون ویروس نقش مهمی داشته باشند. همانطوری که ویروس‌های دارای اسید نوکلئیک دو رشته‌ای و وزن مولکولی بالا، مدارکی وجود دارد که تلفیق دما و پرتودهی اثر بیشتری در از بین رفتن خاصیت عفونت‌زایی دارد. این موضوع توسط Adams & Pollard در سال ۱۹۵۱ کشف شد و این اثر تلفیقی برای ویروس‌های پیچیده‌تر دیده شد و برای تک رشته‌ای‌ها دیده نشده است (کارگاه روش تحقیق کاربرد روشهای هسته ای در علوم کشاورزی، ۱۳۸۵).

٤-٥-١- اثر پرتو های یونساز بر روی قارچ‌ها

غیرفعال‌سازی قارچ‌ها با روش پرتودهی معمولاً مشابه اثرات پرتوها بر روی باکتری‌هاست. تفاوت در اثر پرتوها بر روی قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها در رفتار رشدی، پیچیدگی سیتولوژی، مرفولوژی و چرخهٔ زندگی قارچ‌هاست. اکثر مطالعات غیرفعال‌سازی قارچ‌ها توسط پرتودهی بیشتر بر روی اسپورهای غیرجنسی متمرکز است. اسپورهایی که هنوز شروع به ژرمیناسیون نکرده‌اند، پرتودهی می‌شوند و پس از پرتودهی میزان بقا آنها از طریق کشت بر روی محیط‌های کشت آگار معدنی به دست می‌آید. وقتی که جمعیتی از اسپورهای خوابیده، پرتودهی شده، بر روی محیط آگار مغذی با دمای مناسب برای رشد قرار می‌گیرند، نخست تعدادی از اسپورها دچار شکست درعمل ژرمیناسیون می‌شوند و این تعداد با افزایش دز پرتودهی، افزایش می‌یابد. ثانیاً در آنهایی که فرم رویشی تبدیل می‌شوند ممکن است لوله‌های ژرم غیرمعمول ظاهر گردد، اغلب لوله‌های ژرم باد می‌کنند و تغییر شکل می‌دهند، مثلاً دیوارهٔ عرضی خود را از دست می‌دهند و تخلیه می‌شوند که به زودی رشد را متوقف می‌سازند و منجر به مرگ بدون تشکیل حتی یک کلنی می‌شوند. با وجودی که خسارات به توانائی ژرمیناسیون توسط پرتودهی وابسته به دز پرتو می‌باشد، ولی مکانیسم ژرمیناسیون مقاومت پرتوی بیشتری از تشکیل کلنی دارد. منحنی‌های دز – پایندگی برای اسپور قارچ‌ها معمولاً یک شانه‌ای در ابتدای سیکل لگاریتمی دارند و به دنبال آن به صورت خط مستقیم در می آیند. که گاهی این شانه ممکن است بارزتر شود یا وجود نداشته باشد که بسته به مقاومت و حساسیت نسبی دارد. مقاومت کاذب یا شانه کاذب وقتی ایجاد می‌شود که در

سوسپانسیون اسپورقارچی دارای Clump های باشیم مثلاً تجمعی از ۲ تا ۶ یا بیشتر اسپور با هم به صورت یک Clump باشد.

بعضی اسپورهای قارچی که چند سلولی هستند، مقاومت پرتوی بیشتری دارند، چونکه اگر حتی یک سلول در اسپورهای قارچی بتواند زنده بماند و رشد کند اسپور بقا خود را حفظ می‌کند. شرایط چند سلول اسپورها پهنای شانه منحنی دز / پایندگی قارچ‌ها را افزایش می‌دهد. مثلاً در یک آزمایش دیده شده که کونیدی‌های (Conidia) تک سلولی قارچ Fusarium Solani پس از پرتودهی با دز ۷۵ کیلو راد به میزان ۵۰ ٪ از ژرمیناسیون ممانعت می‌شوند در حالیکه دز ۵۰۰ کیلو راد ۳۰٪ ماکروکونیدیهای چند سلولی را از عمل ژرمیناسیون ممانعت می‌کند. Later jet& Ephurssi در سال ۱۹۴۹ نشان دادند که سلول‌های مخمری هاپلوئید مقامت پرتوی کمتری از سلول‌های دیپلوئید دارند. ظاهراً مقاومت پرتوی سلول‌های دیپلوئید ناشی از حضور رشتهٔ دوم کروموزوم می‌باشد. اسپور اکثر قارچ‌ها هاپلوئید است، هرچند که دیپلوئید شدن گه گاهی می‌تواند توسط پرتودهی القاء شود ولی سوش‌های دیپلوئید ثابت در طبیعت بندرت یافت می‌شوند. از آنجائیکه سلول‌های مخمر و باکتری‌ها تغییرات قابل توجهی در مقاومت نسبت به پرتو در طی مراحل معین تقسیم نشان می‌دهند، معمولاً معتقدند که اسپور قارچ‌ها نیز حساسیت بیشتری نسبت به پرتو در طی مرحلهٔ ژرمیناسیون دارند. Buckley و همکارانش در سال ۱۹۶۹ کاهش مقاومت اسپورانژیوسپورهای (Sporangiospores) قارچ Zhizopus. stolonifer را بعد از انکو باسیون در شرایط ژرمیناسیون ثابت کردند.

وقتی که اسپورها در یک محیط کشت مایع و بر روی شیکر در دمای°C ۲۵ قرار می‌گیرند بسیاری از اسپورها لوله‌های ژرم خود را ۶ ساعت بعد از انکوباسیون نشان می‌دهند. برای اسپورهایی که در شرایط مناسب ژرمیناسیون قرار دارند پرتودهی با دز Mrad ۰/۲۵ می‌تواند جمعیت سلول‌های زنده باقیمانده را تا ۰/۱٪ کاهش دهد. در حالیکه برای رسیدن به این اثر مشابه در مورد اسپورهایی که در شرایط مناسب ژرمیناسیون انکوبه نشده‌اند دز Mrad ۰/۴ لازم است(کارگاه روش تحقیق کاربرد روشهای هسته ای در علوم کشاورزی، ۱۳۸۵).

۵-۵-۱- رادیو واکسن‌ها

همانطوری که قبلاً توضیح داده شد، پرتوهای یونساز می‌توانند در تهیهٔ واکسن‌های غیرفعال بسیار مؤثر باشند.از جمله واکسن‌های غیرفعال توسط پرتوهای یونساز که در مراکز علمی– تحقیقاتی مختلف تهیه شده‌اند می‌توان موارد زیر را نام برد:

- واکسن‌هاری (rabies vaccine) که در مکزیک تهیه شد توسط مؤسسه بهداشت ملی آمریکا تائید گردید.

- واکسن بیماری Bluetongue در گاو که توسط پرتو گاما غیرفعال شده و در اروپا تهیه گردیده است (Barber & Campbell 1984).

- واکسن غیرفعال بیماری تب برفکی در دام توسط پرتو گاما که در انرژی اتمی آرژانتین تهیه شده است(Lombardo &Smolko, 1990).

- واکسن پرتودهی شده بیماری دیکیتوکالوس ویوا پاروس (Dictyocaulus. viviparous) توسط پرتو X در آمریکا

- واکسن غیرفعال شده بیماری(Venezuelan. Equine. Encephalitis (V.E.E تهیه شده در آزمایشگاه علوم پزشکی Fort Detrick، در Feredrick , Maryland (Graber,1971).

- واکسن کشتهٔ سالمونلا توسط پرتو گاما در انرژی اتمی Bombey در هند همچنین در انرژی اتمی ایران با همکاری مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ایران(Shaface etal.,2004).

همچنین از جمله این نوع واکسن‌ها که در بخش کشاورزی هسته‌ای این پژوهشکده با همکاری مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردیده و یا در دردست تهیه می‌باشند، می‌توان واکسن کشته سالمونلا، واکسن غیرفعال بیماری تب برفکی تایپ A و واکسن غیرفعال لپتوسپیرا را نام برد(فرحناز معتمدی سده و همکاران،۱۳۸۵).

۲- مواد و روش کار

۲-۱- راه اندازی آزمایشگاه تحقیقات آبزیان در پژوهشکده کشاورزی, پزشکی و صنعتی کرج

۲-۱-۱- لوله کشی آب

لوله کشی آب بدون کلر به سمت استخر در زمستان ۱۳۸۷ تا نزدیکی استخر انجام شده ولی بدلیل نبودن تانک ۳۰۰۰ لیتری که می بایست در مسیر لوله آب به سمت استخر نصب شود لوله کشی ناقص باقی ماند. پس از خرید تانک مورد نظر یک سکو به ارتفاع ۲۰ سانتیمتر جهت قرار گرفتن تانک آب در کنار استخر در نیمه دوم خرداد ۱۳۸۸ ساخته شد و ادامه مراحل لوله‌کشی و نصب پمپ انجام گردید.

مقدار لوله بکار رفته، از موتور خانه موجود در سوله کشاورزی تا کنار استخر حدود ۵۰ متر بوده است ، این لوله کشی طوری طراحی شده که از یک مسیر آب مستقیم وارد استخر می‌گردد، و از مسیر دیگر آب ابتدا وارد تانک ۳۰۰۰ لیتری شده و پس از پر شدن تانک، در صورت نیاز به استفاده از آب ذخیره، از مسیر دیگر آب داخل تانک وارد استخر می‌شود. یک دستگاه الکتروپمپ متصل به یک مخزن ۲۴ لیتری نیز بر سر راه ورود آب از تانک ۳۰۰۰ لیتری به استخر برای تقویت ورود آب نصب گردید. در مسیر خروج آب از استخر نیز یک شیر فلکه جهت تنظیم خروجی نصب شد. داخل استخر نیز لوله‌کشی جهت نصب سیستم آب پاش و سیستم هوادهی انجام شد.

همچنین لوله کشی آب به سمت یک اتاق مجزا در کنار استخر انجام گردید که این اتاق بعنوان اتاق ایزوله برای آلوده سازی خرچنگها با ویروس، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شکل۳: قسمتی از لوله کشی آب به سمت تانک (چپ) و لوله کشی آب به سمت اتاقک ایزوله (راست)

۲-۱-۲- ساخت داربست فلزی

پس از بازدید واحد آهنگری و اجرائی برای اندازه گیری‌های لازم از محل استخر، منطقه‌ای به ابعاد ۱۶× ۶×۳ متر انتخاب گردید و یک اسکلت آهنی به ابعاد ۶ در ۱۶ متر به ارتفاع ۳ متر توسط واحد آهنگری در مرداد ماه ۱۳۸۸ در اطراف استخر در سوله کشاورزی ساخته شد. وسایل لازم برای ساخت داربست فلزی: پیچ و واشر ۳۰۰ عدد، قوطی آهنی ۴۰×۴۰ میلی‌متر به تعداد ۳۰ شاخه و قوطی آهنی ۱۰۰×۱۰۰ میلی‌متر به تعداد ۳۰ شاخه

شکل ٤: داربست فلزی اطراف استخر

۲-۱-۳- محصور نمودن آزمایشگاه آبزیان با نصب ایرانیت

شهریور ۱۳۸۸ محوطه اطراف استخر با ایرانیت جداسازی گردید و یک اتاقک ایزوله برای آلوده سازی خرچنگها با ویروس لکه سفید در کنار استخر نیز ساخته شد.

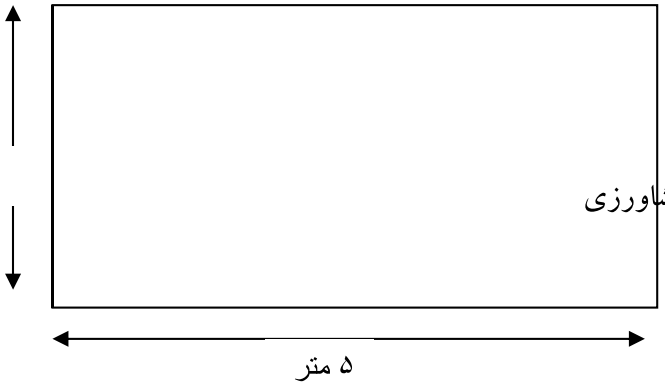
وسایل لازم: ایرانیت فایبر گلاس درجه یک ۲۱۱ متر مربع

شکل ٥: منطقه محصور شده در اطراف استخر و اتاق ایزوله کنار آن بعنوان آزمایشگاه تحقیقات آبزیان نام گذاری گردید.

٤-١-٢- سیم کشی برق

یک تابلو برق جهت تامین برق پمپ‌های هوادهی و روشنائی محوطه اطراف استخر در کنار استخر نصب گردید. دور تادور استخر و محوطه داخل آزمایشگاه و همچنین اتاق ایزوله سیم کشی شده و پریزهای برق نصب گردید. تعداد ۱۰ لامپ جهت روشنائی آزمایشگاه نیز نصب گردید.

شکل ٦: تابلو برق



شکل ۷: ابعاد استخر: متر ۵×۳×۰/۷

حجم استخر: ۱۰ متر مربع معادل ۱۰۰۰۰ لیتر

منبع تهیه آب: چاه موجود در نزدیکی سوله کشاورزی

محل ذخیره سازی آب: تانک ۳۰۰۰ لیتری

دبی آب: ۶ مترمکعب بر ساعت

شکل ۸: استخر

شکل ۹: سکوی سیمانی جهت قرار گرفتن تانک ۳۰۰۰ لیتری

شکل ۱۰: محصور نمودن اطراف استخر با ایرانیت

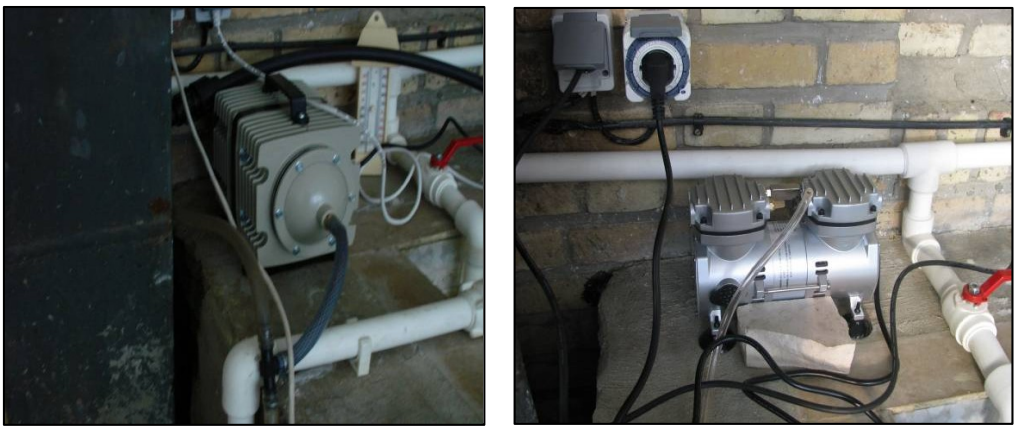
۵-۱-۲- نصب سیستم آب پاش

سیستم آب پاش بصورت سه فواره در استخر نصب گردید.

شکل ۱۱: سیستم آب پاش

٦-۱-۲- نصب سیستم هوادهی

پمپهای هوادهی به صورت دو پمپ در دو طرف استخر نصب گردید و انتقال هوا به درون استخر توسط شلنگ و سنگهای هوا دهی انجام گردید. همچنین دوپمپ جهت هوادهی ۷ تانک ۳۰۰ لیتری در اتاق ایزوله نیز نصب گردید.



شکل ۱۲: پمپهای هوادهی

۷-۱-۲- اتاق ایزوله ویروس

یک اتاق ایزوله در کنار استخر که کاملاً به کمک ایرانیت و داریست فلزی از بقیه فضای اطراف جداسازی شده است جهت آلوده سازی خرچنگها با ویروس طراحی و تهیه گردید، که آن اتاق ظرفیت قرار دادن ۱۰ عدد تانک ۳۰۰ لیتری دارد و آب مصرفی این تانکها پس از تیمار با مواد ضدعفونی دور ریخته می‌شود. در این اتاق دو عددپمپ هوادهی نصب شده و لوله کشیهای لازم جهت جاری نمودن آب به داخل تانکهای ۳۰۰ لیتری و هوادهی آنها انجام شده‌است.

شکل ۱۳: تانکهای ۳۰۰ لیتری در اتاق ایزوله

شکل ١٤: انتقال خرچنگها از ارومیه به استخر موجود در آزمایشگاه آبزیان

۲-۲- تهیه نمونه های میگو آلوده به ویروس لکه سفید

از آنجائیکه شیوع بیماری لکه سفید میگو در شهریور ۱۳۸۷ شهرستان چابهار از طرف موسسه تحقیقات شیلات اعلام گردید، لذا نمونه های میگو مشکوک به بیماری لکه سفید از مزارع پرورش میگو چابهار تهیه و در حالت انجماد به همراه تانک ازت و از طریق هوائی به کرج منتقل شدند. نمونه های میگو آلوده در دو گروه

۱(نمونه‌برداری شده توسط خانم دکتر حیدریه) و گروه ۲ (تهیه شده توسط همکاران شیلات) جمع آوری شدند. متاسفانه بدلیل موجود نبودن فریزر ۸۰ °C- در این پژوهشکده مجبور گردیدم طی درخواست از همکاران موسسه واکسن و سرم سازی رازی برای ۵ ماه نمونه‌ها را در فریزر ۸۰ °C- آن موسسه نگهداری نمائیم ولی در بهمن ۱۳۸۷ بدلیل خرابی فریزر ۸۰ °C- آن موسسه مجدداً ناچار به انتقال نمونه‌ها به پژوهشکده کرج و نگهداری آنها در دمای۲۰°C- شدیم. از آنجائیکه ویروس در دمای ۲۰ °C- حداکثر ۶ ماه قابل نگهداری است لذا از آنجائیکه هنوز فریزر ۸۰ °C- مورد نیاز پروژه خریداری نشده نمی توان پیش‌بینی نمود که نمونه های ویروسی تا چه زمانی قابل استفاده برای تهیه استوک ویروسی مورد نیاز هستند. لذا نیاز به نمونه گیری مجدد بود.

شکل ۱۵: علائم میگوهای مشکوک به آلودگی با ویروس لکه سفید

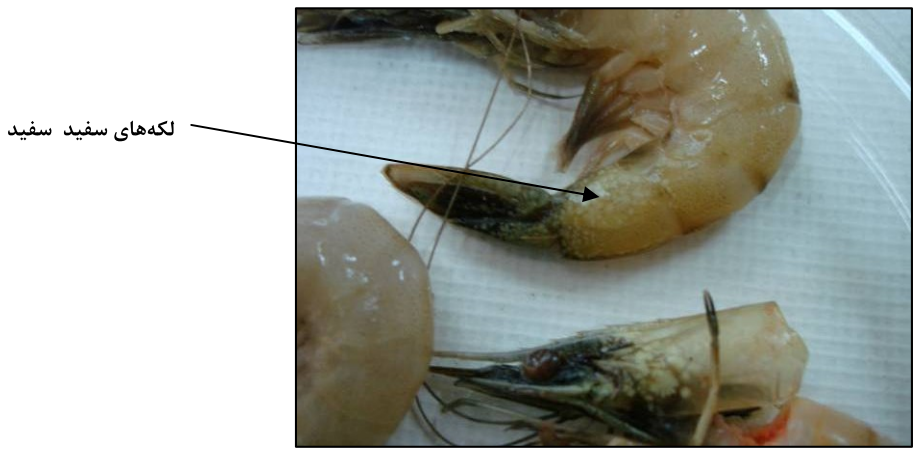
در میگوهای آلوده، لکه های سفید رنگ روی کاراپاس میگو و بندهای پنجم و ششم بدن ظاهر می شود. سپس لکه‌های سفید توسعه یافته و کل بدن را فرا می گیرد. اندازه لکه های سفید متغیر بین ۰/۵ تا ۲ میلی متر می باشد. سایر علائم شامل:) کوتیکول براحتی از لایه اپی درم جدا می شود. ۲) هپاتوپانکراس میگوهای آلوده بسیار بزرگ، زرد و شکننده می شود. ۳) همولنف میگو رقیق و عمل انعقاد همولنف با تاخیر انجام می گیرد یا انجام نمی گیرد. ۴) میگو بی اشتها شده و تمایلی به غذا خوردن ندارد و فعالیتهای حرکتی میگو کاهش می یابد. ۵) میگوهای بی حال رنگ بدنشان قرمز شده و در کنار های استخر قرار می‌گیرد. ۶) مرگ و میر بسیار زیاد بین ۷۰ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد.

نمونه‌های میگو جمع آوری شده از چابهار هم توسط همکاران پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج و هم توسط همکاران شیلات ایران مورد آزمون PCR (مطابق روش کیت IQ2000) قرار گرفتند. نتایج طبق شکل یک مثبت گزارش گردید.

متاسفانه پس از تهیه استوک ویروسی از میگوهای آلوده تهیه شده از چابهار و تلقیح به خرچنگ دراز (Crayfish) موفق به تکثیر خوب ویروس در خرچنگ نگردیدیم که احتمالاً بعلت تیتر پایین ویروس در میگوهای چابهار بوده‌است (شاید بعلت نگهداری در دمای ^{o}C ۲۰- تیتر ویروس افت نموده است، چون فریزر ^{o}C ۷۰- با تاخیر خریداری گردید).

لذا مجبور به تهیه مجدد میگوی آلوده از بوشهر گردیدیم که به کمک آقای دکتر سلطانی و آقای دکتر یاوری از بوشهر نمونه‌های میگو آلوده به این پژوهشکده ارسال گردیده و حضور ویروس لکه سفید در این نمونه ها نیز با استفاده از کیت Nested PCR- IQ200 مورد تائید قرار گرفت.

با توجه به مثبت بودن نمونه های تهیه شده از بوشهر و تکثیر خوب ویروس حاصل از فیلتراسیون این میگوها در کرای فیش این نمونه ها در بسته های سه الی چهار میگو تقسیم شده و در فریزر ۷۰ – درجه سانتیگراد نگهداری شدند، لذا برای تهیه استوک ویروسی هر بار یک بسته از این میگوها استفاده خواهد شد.



شکل ۱۶: میگوهای آلوده به ویروس لکه سفید تهیه شده از بوشهر

میگوهای تهیه شده از بوشهر طبق دستورالعمل کیت تجاری IQ2000 TM برای تشخیص ویروس بیماری لکه سفیدی میگو –WSSV مورد آزمون قرار گرفتند.

۲-۲- روش استفاده از کیت تجاری IQ2000 TM

مواد :

۱- بافر لیز (Lysis Buffer)

۲- کیت تکثیر توالی اختصاصی بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV specific sequence amplification) kit) :

دمای نگهداری ?C ۲۰-

- First PCR PreMix شامل: reaction buffer, dNTPs, WSSV specific primers
- Nested PCR PreMix شامل: reaction buffer, dNTPs, WSSV specific primers
- استاندارد مثبت (P+ standard) : $۱۰^{۴}$ کپی در میکرولیتر
- استاندارد منفی (Yeast tRNA 40 ng/µl)
- DNA polymerase (2U/µl)
- 6X Loading dye
- DNA molecular Weight marker (848 bp, 630 bp & 333 bp)

روش کار:

۱-۲-۲- استخراج DNA

۱۲- نمونه میگو یا کرای فیش را آسیاب نموده و ۲۰ میلی گرم از نمونه را با ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخلوط نموده و کاملاً هموژن می گردد.

۱۳- انکوباسیون در دمای ?C ۹۵ برای ۱۰ دقیقه، سپس سانتریفوژ در g ۱۲۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه

۱۴- انتقال µl ۲۰۰ از مایع رویی به یک لوله ۱,۵ میلی‌لیتری جدید ، افزودن µl ۴۰۰ اتانل ۹۵٪

۱۵- ورتکس محلول فوق، سانتریفوژ در g ۱۲۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه، جداسازی اتانل و خشک کردن رسوب DNA

۱۶- حل نمودن ر سوب DNA در آب مقطر دوبار تقطیر استریل

۱۷- غلظت DNA استخراج شده را با اندازه گیری اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۶۰ نانومتر و فرمول زیر محاسبه می نمائیم.

$(OD_{260} \times 50 \times \text{reciprocal of dilution factor}) / 1000$

در این مرحله ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۱۹۹۸ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شده و اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد و غلظت DNA به صورت زیر محاسبه گردید.

$\text{Concentration of DNA} = (0.06 \times 50 \times 1000)/ 1000 = 3\ \mu g/\mu l$

نکته: روش استخراج DNA که در دستورالعمل این کیت ذکر شده منجر به استخراج می گردد ولی در نتیجه ژل الکتروفورز اسمیر پروتئینی دیده می‌شود ولی اگر در مرحله اول مقدار ۵-۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K نیز اضافه گردد اسمیر پروتئینی از بین می‌رود. در کلیه نمونه‌های بافت مورد آزمون جهت استخراج DNA در این تحقیق از پروتئیناز K نیز استفاده شد.

۲-۲-۲- روش تکثیر DNA (Amplification protocol) :

از لوله های ۰,۲ میلی لیتری استفاده می شود.

مراحل First PCR:

- ۷,۵ µl از محلول First PCR PreMix بعلاوه ۰,۵ µl آنزیم DNA polymerase به هر لوله ۰,۲ میلی‌لیتری افزوده شد.
- ۲ µl از DNA استخراج شده به لوله فوق ا فزوده ، همچنین ۲ µl از کنترل مثبت و کنترل منفی نیز به دو لوله دیگر حاوی محلولهای فوق افزوده گردیدند.
- برنامه ماشین ترموسایکل :

۴۲ ?C بمدت ۳۰ دقیقه، ۹۴ ?C مدت ۲ دقیقه

۹۴ ?C مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ ?C ۲۰ ثانیه، ۷۲ ?C ۳۰ ثانیه، تکرار بمیزان ۱۵ سیکل

۷۲ ?C ۳۰ ثانیه، ۲۰ ?C ۳۰ ثانیه (سیکل نهایی)

مراحل Nested PCR :

- ۱۴ µL از محلول Nested PCR PreMix بعلاوه ۱ µL **آنزیم** DNA polymerase
- ۱۵ µL محلول فوق را به هر لوله محصول First PCR افزوده

- برنامه ماشین ترموسایکلر:

?C ۹۴ مدت ۲۰ ثانیه، ?C ۶۲ ۲۰ ثانیه، ?C ۷۲ ۳۰ ثانیه، تکرار بمیزان ۳۰ سیکل

?C ۷۲ ۳۰ ثانیه، ?C ۲۰ ۳۰ ثانیه (سیکل نهایی)

مرحله رنگ آمیزی: µL ۵ از محلول 6X Loading dye کیت به هر لوله محصول Nested PCR افزوده و مخلوط گردیده ، اکنون نمونه آماده انجام الکتروفورز است.

۳-۲-۲ مرحله الکتروفورز

تهیه بافر TBE 10X : تریس ۰٫۸۹ مولار ، بوریک اسید ۰٫۸۹ مولار، EDTA ۰٫۰۲ مولار

رقیق سازی بافر فوق تا 1X به میزان مورد نیاز، این بافر هم برای تهیه ژل و هم برای تانک الکتروفورز مورد نیاز است.

تهیه ژل آگارز ۲٪ : با توجه به حجم تانک الکتروفورز موجود در گروه کشاورزی ۴۰ سی سی کفایت میکند.

(۰٫۸ گرم آگارز در ۴۰ سی سی بافر TBE 1X حرارت داده تا دمای جوش)

ژل را تا دمای ۵۰ درجه سرد نموده و به آن در ظرف مخصوص آن ریخته ، شانه مخصوص را در ژل قرار داده ، پس از بستن ژل شانه را خارج نموده و ژل را در تانک قرار داده نمونه‌های همراه Loading dye را در چاهکها به آرامی قرار می‌دهیم. در یک چاهک هم مارکر وزن مولکولی کیت را قرار میدهیم.

تانک را یه دستگاه Power supply با قدرت ۱۰۰ ولت بمدت ۴۵-۶۰ دقیقه متصل نموده بطوری که جریان از قطب منفی به سمت قطب مثبت برقرار شود.

سپس ژل را رنگ آمیزی نموده : تهیه استوک اتیدیوم بروماید ۱۰ mg/ml

µl ۵ از استوک فوق را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در یک ظرف پلاستیکی درب دار قرار ی‌دهیم، ژل را مدت ۱۰ دقیقه در محلول رنگ آمیزی شیک می‌کنیم، سپس به یک ظرف دیگر حاوی آب مقطر برای شستشو انتقال می‌دهیم. اکنون ژل آماده مشاهده و عکسبرداری با UV transilluminator است.

۳-۲- تهیه استوک ویروس لکه سفید از بافت میگوهای آلوده

میگوهای منجمد که از چابهار و بوشهر نمونه برداری شده و از نظر وجود ویروس لکه سفید نیز تائید شده بودند جهت تهیه استوک ویروس طبق روش زیر مورد استفاده قرار گرفتند:

۱. آسیاب نمودن ۲ عدد میگو منجمد آلوده به ویروس با استفاده از آسیاب برقی (وزن تقریبی هر میگو ۱۰ گرم)
۲. هموژن نمودن میگوهای آسیاب شده در بافر TN (Tris-HCl 20 mM, NaCl 400 mM, pH 7.4) ، نسبت رقیق سازی میگوهای آسیاب شده در بافر TN ۱ به ۵ می باشد (در لوله های ۱۵ میلی لیتری Nunc 15 ml Conical) Tube- .
۳. سانتریفوژ g ×۱۷۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ?C ۴ ، سپس مایع رویی را جداسازی نموده (مرحله سانتریفوژ را باید سه بار تکرار کرد.)
۴. مایع روی را از فیلترهای واتمن در طی چندین مرحله عبور داده و محلولهای فیلتر شده در فریزر °C ۲۰- نگهداری گردیدند. (بهتر است همان موقع بلافاصله از فیلتر میلی پور ۰,۴۵ میکرون نیز عبور داده شوند در همان روز به کرای فیش تزریق گردد.)
۵. محلول فیلتر شده مرحله قبل را از فیلترهای میلی‌پور ۰,۴۵ میکرونی عبور داده بطوری که کلیه ذرات بزرگتر از ۰,۴۵ میکرون حذف می‌گردید و ذرات کوچکتر از ۰,۴۵ میکرون که حاوی ویروسها می‌باشند در سوسپانسیون نهایی باقی ماند. اکنون این سوسپانسیون استوک حاوی ویروس آماده تزریق به کرای فیش برای تکثیر ویروس می باشد، که تا زمان استفاده باید در فریزر °C ۷۰- ذخیره سازی گردد ولی متاسفانه بعلت موجود نبودن فریزر فوق در پژوهشکده کرج از زمان تهیه تامرداد ۱۳۸۸ در فریزر °C ۲۰- نگهداری گردید (بمدت ۹ ماه) و از شهریور ماه که فریزر °C ۷۰- خریداری شد به آن منتقل گردید. عدم وجود فریزر °C ۷۰- به موقع, باعث کاهش تیتر ویروس و موجب تکثیر ضعیف ویروس در کرای فیش گردید. لذا نکات زیر برای تکثیر بهتر ویروس در کرای فیش الزامی می باشند:

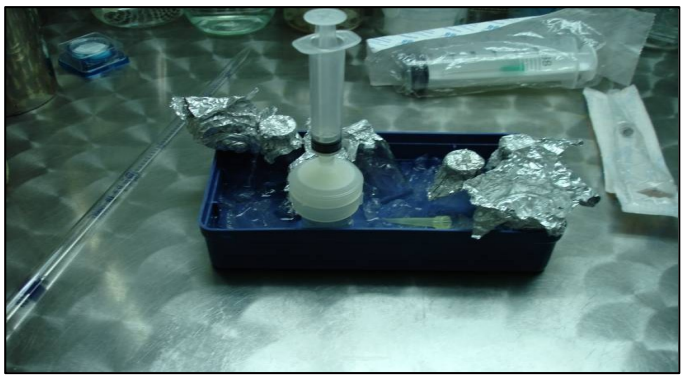
۱- بهتر است محلول میگو فیلتر شده همان روز بلافاصله به کرای فیش تزریق گردد تا ویروس بهتر در بدن کرای فیش تکثیر یابد.

۲- اگر بعد از تهیه میگو فیلتر شده کرای فیش آماده برای تکثیر ویروس نبود می بایست این محلول را در فریزر ۷۰ °C- نگهداری نمود.

توجه: استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی بعلت سایز ذرات ویروسی لکه سفید می باشد. اندازه این ویروینها ، قطر ۶۵-۷۰ نانومتر و طول ۳۰۰-۳۵۰ نانومتر می باشد، لذا این ذرات از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور نموده و به فیلتر نمی چسبند و لی اگر فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استفاده شود تعداد زیادی از ویرویونها ممکن است به فیلتیر بچسبند.

متاسفانه پس از تهیه استوک ویروسی از میگوهای آلوده تهیه شده از چابهار و تلقیح به خرچنگ دراز (Crayfish) موفق به تکثیر خوب ویروس در خرچنگ نگردیدیم که احتمالاً بعلت تیتر پایین ویروس در میگوهای چابهار بوده‌است (شاید بعلت نگهداری در دمای ^{o}C ۲۰- تیتر ویروس افت نموده است، چون فریزر ^{o}C ۷۰- با تاخیر خریداری گردید). لذا مجدداً میگوی آلوده از بوشهر تهیه شد. با توجه به نکات ذکر شده فوق لازم شد که مجدداً از میگوهای تهیه شده از بوشهر که توسط آقای دکتر سلطانی و آقای دکتر یاوری در اختیار پژوهشکده کرج قرار گرفتند (شهریور ۱۳۸۸) , استوک ویروسی آماده گردد و خوشبختانه از آنجائیکه در مدت کوتاهی پس از تهیه میگوهای آلوده از بوشهر استخر برای نگهداری کرای فیش آماده سازی شده بود و کرای فیش نیز از سد ارس تهیه شد, لذا استوک ویروسی مطابق دستورالعمل بالا مجدد تهیه شده و بلافاصله به کرای فیشها تزریق گردید.

با توجه به تجربیات بدست آمده در این مرحله نتیجه شد که برای تکثیر بهتر ویروس در کرای فیش, استوک ویروسی از میگوهای آلوده به ویروس که در فریزر ۷۰ °C- نگهداری می شوند، بطور تازه تهیه شود. در طول انجام پروژه مراحل تهیه استوک ویروسی همچنان و به روش ذکر شده در این گزارش ادامه یافت.



شکل ۱۷: مراحل فیلتراسیون جهت تهیه استوک ویروسی

٤-۲- تهیه کرای فیش

خرچنگ دراز آب شیرین یا کرای فیش گونه *Astacus Leptodactylus* از سخت پوستانی است که می تواند میزبان خوبی برای این ویروس باشد. محل زندگی این خرچنگها در ایران رودخانه ارس می باشد. لذا این خرچنگها با کمک موسسه تحقیقات آرتمیا در شهر ارومیه از ناحیه پشت سد ارس صید شده و در فلاسکهای یونولیتی به همراه پودر یخ در حالت زنده به پژوهشکده کرج انتقال داده شدند. مرحله تهیه خرچنگ در طول مدت ۲ سال پروژه سه بار انجام شد و در هر بار تعداد ۲۰۰ تا ۳۰۰ عدد خرچنگ خریداری می شد که حدود ۳۰ درصد در بین راه تلف می شدند و ۱۰ الی ۲۰ درصد نیز بعد رسیدن به کرج تلف می شدند, بنابراین در هر بار انتقال خرچنگها فقط نیمی از آنها زنده می ماندند.

۲-۵- تائید غیرآلوده بودن خرچنگها با آزمون Nested –PCR:

چند نمونه از خرچنگهای زنده و تلف شده با استفاده از دستورالعمل کیت تجاری IQ 2000 مربوط به آزمون Nested –PCR (که بطور کامل در قسمت تهیه میگوی آلوده و تائید آلودگی ویروس لکه سفیدی ذکر شده است.) جهت تشخیص آلودگی به ویروس لکه سفید آماده سازی و مورد آزمایش قرار گرفتند، و از غیر آلوده بودن آنها اطمینان حاصل گردید.

جهت نگهداری این خرچنگها و جهت جلوگیری از ایجاد آلودگی قارچی ناشی از خرچنگهای تلف شده لازم بود هر چند وقت یکبار تمام آب استخر با مالاشیت گرین ضد عفونی گردد که این کار چندین بار تکرار گردیده و در آینده نیز تکرار خواهد گردید. همچنین با تجویز دامپزشک چند دز آنتی‌بیوتیک (آمفی تریپسین B) به آب استخر اضافه گردید.

۲-۶- آلوده سازی کرای فیش با استوک ویروسی تهیه شده

ابتدا چهار عدد تانک ۳۰۰ لیتری خریداری شده قبلی توسط واحد تاسیسات آماده سازی گردیدند. بطوری که کف آنها سوراخ گردیده و کف هر تانک یک مسیر خروج آب تعبیه شد و این مسیر خروج آب در بیرون تانک به یک لوله U شکل متصل شده تا نتوان خروج آب از تانک را کنترل نموده و زیر هریک از خروجیهای تانکها یک لگن مربع پلاستیکی قرار داده شد تا آب خروجی توسط مواد ضدعفونی کننده اول ضدعفونی گردد و بعد به فاضلاب هدایت گردد. در زیر هر تانک نیز یک چهار پایه فلزی که توسط واحد آهنگری پژوهشکده ساخته شده بود قرار داده شد. در هر تانک تعداد ۵ خرچنگ ۴-۵ روز قبل از تزریق ویروس به آنها منتقل گردیدند تا در طول این ۴-۵ روز از بروز هرگونه استرس ناشی از جابجای جلوگیری شود سپس ویروسها به آنها تزریق گردیدند.

پس از تهیه استوک ویروسی طیق دستورالعمل ذکر شده در "گزارش مربوط به تهیه استوک ویروسی" نمونه‌های ویروس در همان روز بصورت داخل عضلانی به میزان ۰,۳ میلی لیتر در بند سوم یا چهارم سینه ای خرچنگ تزریق گردید. جهت رشد بهتر ویروس در بدن این خرچنگها با توجه به فصل سرما لازم بود با کمک تعدادی بخاری آکواریومی دمای آب تانکها حدود ۱۵ درجه سانتیگراد حفظ شود.

متاسفانه پس از تهیه استوک ویروسی از میگوهای آلوده تهیه شده از چابهار و تلقیح به خرچنگ دراز (Crayfish) موفق به تکثیر خوب ویروس در خرچنگ نگردیدیم که احتمالاً بعلت تیتر پایین ویروس در میگوهای چابهار بوده‌است (شاید بعلت نگهداری در دمای ^{o}C ۲۰- تیتر ویروس افت نموده است، چون فریزر ^{o}C ۷۰- با تاخیر خریداری گردید).

لذا مجبور به تهیه مجدد میگوی آلوده از بوشهر گردیدیم که به کمک آقای دکتر سلطانی و آقای دکتر یاوری از بوشهر نمونه‌های میگو آلوده به این پژوهشکده ارسال گردید.

بنابراین پس از تزریق استوک ویروسی به خرچنگها، آنها را بمدت ۱۰ روز بطور روزانه کنترل نموده و در روزهای سوم و پنجم و دهم نمونه‌هایی از بافت و همولنف خرچنگها جمع آوری گردیده و از نظر وجود ویروس لکه سفید مورد آزمون Nested-PCR قرار گرفتند.

در مورد نمونه های بافت خرچنگ طبق دستورالعمل کیت تجاری (IQ2000) Nested-PCR عمل گردید و استخراج DNA بخوبی انجام شده و آزمون انجام گردید. ولی در مورد همولنف خرچنگها طبق دستورالعمل کیت تجاری موفق به استخراج DNA نگردیدیم. لازم به ذکر است که همولنف خرچنگ محل اصلی تکثیر و تجمع ویروس در بدن آن است و تشخیص وجود ویروس لکه سفید درون همولنف خرچنگ از لحاظ اهداف این پروژه بسیار مهم بود. لذا بدنبال یافتن راهی برای استخراج DNA از همولنف از چندین مقاله که در "گزارش فاز مطالعاتی" ذکر شده است استفاده نمودیم و در نهایت بهترین نتیجه را با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA مربوط به شرکت Roche گرفتیم.

۷-۲- استخراج DNA از همولنف خرچنگ

۱-۷-۲- استخراج DNA از همولنف خرچنگ بر اساس دستورالعمل OIE :

OIE, Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals-2003, Nested polymerase chain reaction of tissues and haemolymph.

۱- تهیه بافر لیز:

100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8, 25 mM EDTA, 2% SDS and 0.5 mg/ml Proteinase K

۲- ۱۰۰ میکرولیتر همولنف را با ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده فوق مخلوط نموده و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۶۵ °C انکوبه گردید.

۳- به مخلوط فوق 5 M NaCl افزوده شد به طوری که غلظت سدیم کلراید در مخلوط به ۰,۷ مولار برسد. سپس به آهستگی ۱/۱۰ حجم مخلوط محلول ۱۰٪ CTAB در سدیم کلراید ۰,۷ مولار اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۶۵ °C قرار داده شد.

۴- مخلوط کلروفورم/ ایزوامیل الکل به نسبت ۲۴/۱ هم حجم مخلوط فوق به آن اضافه شد. سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ ×g مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C انجام شد.

۵- فاز مایع بالای به یک میکروتیوپ ۱,۵ تمیز منتقل شد و هم حجم آن فنل اضافه گردید. مجدداً سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ ×g مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C انجام شد.

۶- مایع بالای جداسازی شده و مرحله استخراج با فنل مجدداً یک تا دوبار تکرار شد. فاز بالای به یک میکروتیوپ جدید منتقل می‌شود و به دو حجم از مخلوط فنل/ ایزوامیل الکل (۲۴/۱) مخلوط شده و سانتریفوژ می‌شود..

۷- فاز بالای به یک میکروتیوپ جدید منتقل شده، جهت رسوب DNA دو حجم الکل مطلق افزوده، مدت ۳۰ دقیقه در °C ۲۰- قرار داده ، سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ ×g مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C انجام شد.

۸- شستشو رسوب DNA با اتانل ۷۰٪ ، خشک کردن رسوب و حل نمودن آن در ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، یک الی دو میکرولیتر از این محلول به عنوان الگو در آزمون PCR استفاده شد.

۲-۷-۲- استخراج DNA از همولنف خرچنگ بر اساس دستورالعمل مقاله Marielle و همکارانش(۲۰۰۰).

۱- ۱۰۰ میکرولیتر همولنف با 0.2 mg/ml proteinase K و ۱٪ سارکوزیل مخلوط شده و در بن ماری ۴۵ °C دت ۳ ساعت قرار داده شد.

۲- هم حجم نمونه مخلوط فنل/ کلروفورم (۱/۱) افزوده سپس سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ ×g مدت ۸ دقیقه در دمای ۴°C انجام شد، فاز بالای جداسازی شده و مطابق قبل مخلوط فنل/ کلروفورم افزوده و سانتریفوژگردید.

۳- فاز بالای جداسازی شده و دو برابر حجم اتانل مطلق و ۰,۱ حجم سدیم استات ۳ مولار اضافه شده و یک شب در دمای ۲۰ °C- قرارداده شد.

۴- رسوب DNA با اتانل ۷۰٪ شستشو داده و رسوب در حجم مناسب آب مقطر حل گردید. این محلول به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد.

۳-۷-۲- استخراج DNA از هممولنف خرچنگ بر اساس دستورالعمل کیت تجاری زیر

High pure PCR Template Preparation Kit –Roche, Cat. No: 11 796 828 001

دستورالعمل کیت فوق برای استخراج DNA از هممولنف:

۱. ۲۰۰ میکرولیتر نمونه هممولنف را به یک میکروتیوپ ۱,۵ میلی لیتری افزوده ، سپس ۲۰۰ میکرولیتر binding buffer افزوده و بعد ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز کا اضافه میگردد. سپس در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه انکوبه نموده.

۲. سپس ۱۰۰ میکرولیتر پروپانل یا ایزواکتان افزوده و بخوبی مخلوط میگردد.

۳. محلول فوق را روی فیلتر در collection tube وارد نموده و سانتریفوژ می گردد.

(8000 ×g , 1 min, room temperature)

۴. سپس یک ستون حاوی فیلتر که در حال حاضر DNA به آن چسبیده است را به یک collection tube جدید منتقل نموده و collection tube قبلی همراه با محلول آن را دور ریختیم.

۵. ۵۵۰۰ میکرولیتر inhibitor removal buffer به آن افزوده و سانتریفوژ گردید.

(8000 ×g , 1 min, room temperature)

۶. collection tube و محلول آنرا دور ریخته و فیلتر تیوپ را به یک collection tube جدید منتقل نموده و ۵۰۰ میکرولیتر wash buffer افزوده و سانتریفوژ نموده مطابق قبل و محلول جمع آوری شده در collection tube را دور می‌ریزیم.

۷. سپس یکبار مجدد بمدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ می گردد. این کار برای حذف بافر شستشو اضافی می‌باشد.

۸. سپس فیلتر تیوپ را به یک میکروتیوپ ۱,۵ میلی‌لیتری nuclease free جدید منتقل نموده و ۲۰۰ میکرولیتر prewarmed elution buffer افزوده سانتریفوژ می گردد. (8000 ×g , 1 min, room temperature)

۹. اکنون میکروتیوپ حاوی DNA استخراج شده می‌باشد که می‌توان آنرا تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

غلظت DNA استخراج شده را با اندازه گیری اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۶۰ نانومتر و فرمول زیر محاسبه می نمائیم.

$(OD_{260} \times 50 \times \text{reciprocal of dilution factor}) / 1000$

در این مرحله ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۱۹۹۸ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شده و اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد و غلظت DNA به صورت زیر محاسبه گردید.

$\text{Concentration of DNA} = (0.05 \times 50 \times 1000)/ 1000 = 2.5\ \mu g/\mu l$

پس از استخراج DNA از همولنف با کمک کیت تجاری Nested-PCR (IQ2000) مراحل First and Nested-PCR را انجام داده و نتیجه گرفتیم که همولنف خرچنگها پس از ۱۰ روز از تزریق ویروس، بخوبی وجود ویروس تکثیر یافته را نشان می دهد ولی در مورد نمونه های روزهای سوم و پنجم نتایج مثبت نبود.

۸-۲- تخلیص ویروس

همولنف خرچنگهای آلوده به ویروس که قبلاً جمع آوری شده بودند و در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شدند، برای تخلیص ویروس بکار میروند. ابتدا حدود ۳۰ میلی‌لیتر همولنف را از فریزر خارج نموده و چندین بار آنها را سرد و گرم نموده بطوری که با این عمل جدار سلولهای حاوی ذرات ویروسی پاره شده و اجازه خروج ویروس از سلول داده می‌شود. سپس همولنف را به نسبت ۱:۳ با بافر TN هموژن نموده (TN Buffer شامل : Tris-HCl 20 mM and NaCl 400 mM , pH= 7.4) و سانتریفوژ با سرعت پائین می‌نمائیم (500Xg , 10 min, 4 °C)، سوپرناتانت روی را جمع آوری و برای انجام اولتراسانتریفوژ به موسسه واکسن و سرم سازی رازی منتقل نمودیم. سپس این محلول حاوی ویروس در ۶ لوله مخصوص اولتراسانتریفوژ به حجم ۱۰ میلی لیتر تقسیم

گردید و توسط دستگاه اولتراسانتریفوژ Beckman مدلL2-6s B با دور 112400xg, 1 h, 4 °C سانتریفوژ گردید. رسوب هر لوله در حداقل حجم بافر TN حل شده و در یخچال برای مرحله بعد نگهداری گردید.

در چهار لوله شفاف مخصوص اولتراسانتریفوژ گرادیان ناپیوسته ای از سوکروز با غلظتهای ۱۵ تا ۴۵٪ تهیه گردید، بطوری که غلیظترین محلول ۴۵٪ در ته لوله قرار گیرد و رقیقترین آن در سطح لوله باشد. غلظتهای سوکروز بکار رفته شامل: ۱۵-۲۰- ۲۵- ۳۰ -۳۵- ۴۰ و ۴۵ ٪ بوده، ا ز هر غلظت ۱,۳ میلی لیتر استفاده شد (با توجه به حجم نهای لوله که ۱۱ میلی‌لیتر بود و حجم نمونه ویروسی که میبایست روی این گرادیان نیز قرارگیرد حدود یک میلی‌لیتر بود). سپس لوله‌های گرادیان تهیه شده به آرامی به سرد خانه با دمای ۴ °C منتقل شدند و به مدت یک شب در سرد خانه ماندند در طی این مدت گرادیان ناپیوسته به آرامی تبدیل به گرادیان پیوسته‌ای از شیب غلظت از ۱۵٪ تا ۴۵٪ سوکروز میگردد. روز بعد رسوب ویروسی حاصل از اولین مرحله اولتراسانتریفوژ بر روی این لوله های گرادیان به آرامی لایر گردید و با دستگاه اولتراسانتریفوژ Beckman (روتورSW40) 153200xg, 2 h at 4 °C سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ باند ویروسی مشاهده گردید و حاصل سانتریفوژ بصورت فراکشنهای یک میلی لیتری از ابتدای لوله‌ها در میکروتیوپها جمع آوری گردیدند. سپس اپتیکال دانسیته آنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شده و پیک اپتیکال دانسیته بعنوان باند ویروسی جداسازی گردید. با توجه به نتایج زیر فراکشنهای ۴ و ۵ و ۶ با هم مخلوط شده و بعنوان باند ویروسی جداسازی گردیدند. این مخلوط در کیسه دیالیز به صورت غوطه ور در بافر TN دیالیز گردیده به طوری که سوکرز ازمحیط خارج می گردد و بافر جای آن را می‌گیرد. لذا در نهایت ویروس در بافر TN نگهداری می شود.

اندازه گیری اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۶۰ نانومتر در این مرحله مورد نیاز نبود (۲۶۰ برای اندازه گیری DNA می باشد)، ولی در اینجا هدف تعیین پیک ویروسی بوده لذا پروتئینهای ویروسی مهم می باشند که حجم زیادی از ذره ویروسی را تشکیل می دهند و پروتئین را نیز در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری می کنند. بنابراین نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ لازم نمی باشد.

علت بالا بودن اپتیکال دانسیته در فراکشن ۸ می تواند رسوب برخی خرده های سلولی باشد که هنوز در محیط باقی مانده اند.

همانطور که در بالا توضیح داده شد در این مرحله از گرادیان ناپیوسته سوکروز استفاده شد. هر چند که یک شب در دمای یخچال قرار داده شد تا بتواند تا حدودی به گرادیان پیوسته تبدیل گردد، ولی نمی توان گفت که صددرصد گرادیان پیوسته تشکیل شده است. لذا ایجاد حالتی مثل فراکشنهای ۵ تا ۷ می تواند پیش بیاید، اگر بخواهیم که این حالت ایجاد نشود می بایست از دستگاه گرادیان ساز و با استفاده از کمترین و بیشترین غلظت سوکروز، گرادیان پیوسته سوکروز را ساخت و ویروس را روی آن بارگذاری نموده، سپس اولتراسانتریفوژ نمود. البته چون هدف ما از این کار بدست آوردن مقداری بچ ویروس لکه سفید نسبتاً خالص شده از همولنف خرچنگ می باشد که بتوانیم بعنوان دسته ویروسی برای سالها در فریزر و در تانک ازت مایع نگهداری کنیم، لذا ضرورتی ندارد که حتماً دستگاه گرادیان ساز استفاده شود. از آنجا که برای اولتراسانتریفوژ از دستگاه موجود در بخش تب برفکی موسسه رازی استفاده گردید که متاسفانه بسیار قدیمی بوده لذا از چهار لوله استفاده شده دو مورد دچار از بین رفته و غیر قابل استفاده شدند. بنابراین فقط نتایج دو لوله قابل استفاده بود.

۹-۲- مشاهده ویروس با میکروسکوپ الکترونی

برای مشاهده ویروس با میکروسکوپ الکترونی از رسوب ویروسی حاصل از اولین مرحله اولتراسانتریفوژ استفاده گردید، رسوب مذکور بدون رقیق سازی برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. این مرحله با استفاده از میکروسکوپ الکترونی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (ZEISS – EM-900 با قدرت 80 KV) با همکاری سرکار خانم دکتر سلیمانجاهی به انجام رسید. ابتدا یک قطره از سوسپانسیون ویروسی را روی یک گرید مسی دارای پوششی از فیلم Formvar قرار داده و اضافی آن قطره را به آرامی توسط گوشه یک کاغذ صافی جذب نموده سپس در هوای اتاق قرار داده تا کاملاً خشک شود. بعد یک قطره محلول رنگ آمیزی منفی که شامل۲٪ فسفوتنگستیک اسید محلول در اسید هیپو کلریک (pH 7.4) است به آن افزوده وصبر می کنیم تا کاملاً خشک شود. اکنون نمونه آماده مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی است، در این روش رنگ آمیزی که به Negative Staining معروف است زمینه نمونه تیره شده و ذرات ویروسی شفاف می‌گردند. سپس عکسهای گرفته شده با فیلم سیاه و سفید در لابراتوار سیمرغ به چاپ و ظهور رسید، و اندازه هر عکس در

پائین آن مشخص گردید. این مرحله سه بار تکرار گردید و چندین عکس از مقاطع طولی و عرضی ذرات ویروسی تهیه شد.

۲-۱۰- لیوفیلیزاسیون ویروس لکه سفید میگو

بیست میلی لیتر از همولنف خرچنگهای آلوده به ویروس لکه سفید که از طریق آزمون Nested PCR مورد تایید قرار گرفته بودند پس از سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و جداسازی سوسپانسیون ویروسی (مرحله سانتریفوژ سه بار تکرار شود.) جهت تهیه ویروس لیوفیلیزه بکار رفت. محلول ۱۰٪ پودر شیر خشک بدون چربی (10% Skimmilk) به میزان ۱به ۵ به سوسپانسیون ویروسی اضافه شده و در آمپولهای مخصوص دستگاه لیوفیلیزه تقسیم گردیده و بصورت پودر خشک منجمد شده تحت خلاء (لیوفیلیزه شده) تبدیل شد.

۲-۱۱- تیتراسیون ویروس لکه سفید در میگو

۲-۱۱-۱- تعیین تیتر ویروس پرتوتابی نشده

برای تعیین تیتر ویروس از روش تعیین Lethal Dose$_{50}$ (LD_{50}) طبق پروتکل Van Hulten (2001b) استفاده گردید. به این ترتیب که ۵ گروه پست لارو میگوی ۱ تا ۲ گرمی گونه ببری سبز، هر گروه شامل ۱۴ عدد میگو انتخاب گردید. سریال رقتی از ۱ ، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ از سوسپانسیون ویروسی (همولنف حاوی ویروس WSSV) در بافر استریل TN تهیه گردید. سپس به هر میگو مقدار ۱۰ میکرولیتر از رقتهای فوق با سرنگ g ۲۹ در ناحیه بند سوم یا چهارم به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. روزانه دو بار از نظر تعداد تلفات شمارش صورت گرفت. لازم به ذکر است تعداد میگوهای که در روز اول پس از تزریق تلف شدند در شمارش تلفات برای محاسبه تیتر قرار نگرفتند. تلفات تا ۸ روز بعد از تزریق شمارش گردید. تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه گردید.

لازم به ذکر است که تعیین تیتر ویروسی در مورد ویروس پرتوتابی نشده دو بار در دو زمان متفاوت ولی با شرایط یکسان انجام گردید.

Karber Formula:

-Log LD_{50} = X^a – D (Sp -0.5)
X^a is the last dilution index for which all n cultures are infected (p=1)
D is the log of the dilution factor (log 10 = 1)
P is virus dilution proportion of infected cultures
Sp is the summation of p between the last dilution for which all cultures are infected (p=1) and the first dilution for which all n cultures are unaffected (p=0).

۲-۱۱-۲- تعیین تیتر ویروس در نمونه های پرتوتابی شده:

در مورد هر یک از دزهای متفاوت ویروس لکه سفید پرتوتابی شده نیز تیتر ویروس به روش قبل در گروههای پست لارو میگو تعیین شد و بر اساس فرمول کربر محاسبه گردید. ویروسهای پرتوتابی شده در دزهای ۱, ۳, ۵, ۱۰, ۱۵, ۲۰, ۲۵ و ۳۰ کیلوگری جهت تعیین تیتر ویروس بعد از پرتوتابی مورد استفاده قرار گرفتند.

برای تعیین تیتر ویروس از روش تعیین Lethal $Dose_{50}$ (LD_{50}) طبق پروتکل Van Hulten (2001b) استفاده گردید. به این ترتیب که ۵ گروه پست لارو میگوی ۱ تا ۲ گرمی گونه ببری سبز ، هر گروه شامل ۱۴ عدد میگو انتخاب گردید. سریال رقتی از ۱ ، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ از سوسپانسیون ویروسی (همولنف حاوی ویروس WSSV) در بافر استریل TN تهیه گردید. سپس به هر میگو مقدار ۱۰ میکرولیتر از رقتهای فوق با سرنگ ۲۹ g در ناحیه بند سوم یا چهارم به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. روزانه دو بار از نظر تعداد تلفات شمارش صورت گرفت. لازم به ذکر است تعداد میگوهای که در روز اول پس از تزریق تلف شدند در شمارش تلفات برای محاسبه تیتر قرار نگرفتند. تلفات تا ۸ روز بعد از تزریق شمارش گردید. تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه گردید.

Karber Formula:
-Log LD_{50} = X^a – D (Sp -0.5)
X^a is the last dilution index for which all n cultures are infected (p=1)
D is the log of the dilution factor (log 10 = 1)
P is virus dilution proportion of infected cultures
Sp is the summation of p between the last dilution for which all cultures are infected (p=1) and the first dilution for which all n cultures are unaffected (p=0).

شکل ۱۸: تزریق ویروس WSSV به پست لارو میگو

شکل ۱۹: گروههای پست لارو میگو که به آنها رقتهای ویروسی تزریق شده است.

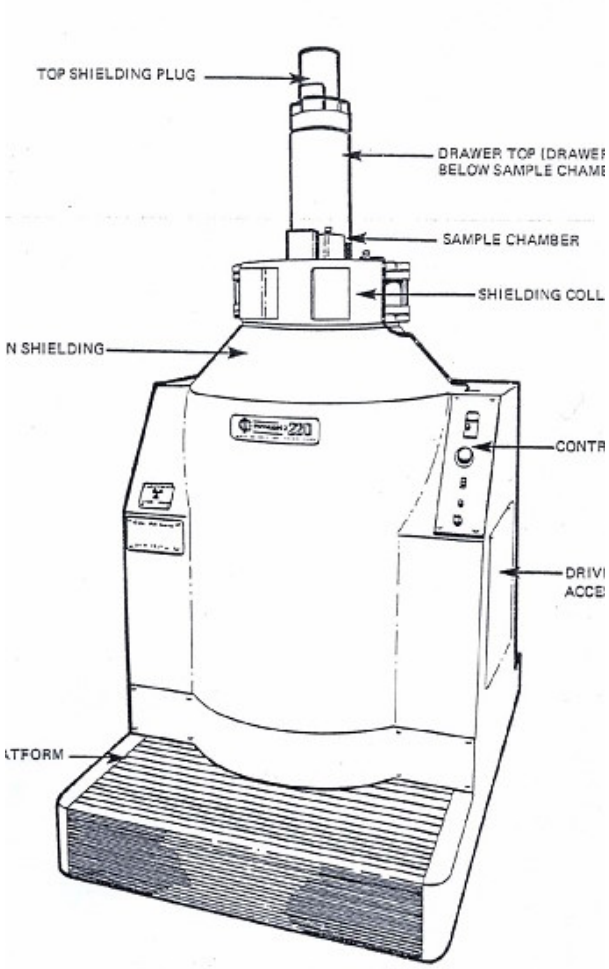
۱۲-۲- دزیمتری و پرتوتابی نمونه های ویروس سندرم لکه سفید

۱-۱۲-۲- پرتوتابی گاما

سیستم پرتو دهنده گاما مورد استفاده در این پروژه مربوط به پژوهشکده کاربرد پرتوها و شرکت MDS Nordion از کشور کانادا می‌باشد، نرخ دز این سیستم و اکتیویته آن به ترتیب 4.8 Gy/sec و 20469 Ci می‌باشد. دزیمتری با روش فریک طبق استاندارد زیر انجام گردید.

Standard Practice for Using the Fricke Reference-Standard Dosimetry System, E 1026 – 04**e**1

همولنف خرچنگهای آلوده به ویروس با سرعت پائین سانتریفوژ گردیده (500Xg , 10 min, 4 °C) و در فریزر C ° ۷۰- نگهداری شدند. این همولنف ها در حالت منجمد در دمای °C ۲۰- با دزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۵۰ کیلوگری پرتودهی شده و مجدداً جهت تائید غیر فعال سازی بر روی میگو و تعیین LD_{50} به فریزر C ° ۷۰- منتقل گردیدند. نمونه های پرتوتابی شده در شرایط منجمد از طریق بارنامه هوائی به پژوهشکده میگو بوشهر ارسال گردیدند و ادامه آزمایشات جهت تعیین تیتر ویروس در مورد هر یک از دزهای ویروس پرتوتابی شده در بوشهر توسط همکاران پژوهشکده کرج انجام شد.



شکل ۲۰: سیستم گاما سل

۲-۱۲-۲- پرتوتابی ویروس با بیم الکترون

برای پرتوتابی الکترون در این پروژه از سیستم پرتو دهنده الکترون در پژوهشکده کاربرد پرتوها در یزد استفاده شد, این سیستم یک شنابدهنده الکترون ساخت شرکتIBA مدل Rodotron TT200 با انرژی 10-Mev و جریان ۲ میلی آمپر می باشد. همولنف خرچنگهای آلوده به ویروس با سرعت پائین سانتریفوژ گردیده (500Xg , 10 min, 4 °C) و در فریزر C ° ۷۰- نگهداری شدند. این همولنف ها در حالت منجمد به یزد ارسال گردید و در دمای °C ۲۰- با دزهای ۰, ۱, ۳, ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ کیلوگری پرتودهی شده و مجدداً جهت تائید غیر فعال سازی بر روی میگو و تعیین LD_{50} به فریزر C ° ۷۰- منتقل گردیدند.

نمونه های پرتوتابی شده جهت تعیین تیتر ویروس و بررسی روند کاهش تیتر با افزایش دز پرتوتابی به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شدند.

۲-۱۳- پرتوتابی نمونه ها با دز مطلوب

به منظور پرتوتابی نمونه ها با دز مطلوب لازم بود ابتدا حداقل ۱۰۰ خرچنگ سالم طبق دستورالعملهای قبلی با استوک ویروسی تلقیح گردند و پس از تکثیر ویروس در بدن خرچنگ همولنف آنها جمع آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این همولنفها در ویالهای به حجم ۱۰ میلی لیتر تقسیم گردیدند و برای پرتوتابی گاما و الکترون ارسال شدند.

پرتوتابی گاما برای ۱۰ ویال حاوی ویروس لکه سفید که قبلاً تیتر آن تعیین شده بود (در گزارش تیتراسیون) در دز ۱۵ کیلوگری در حالت انجماد توسط همکاران پژوهشکده کاربرد پرتوها انجام گردید.

پرتوتابی الکترون نیز در دز ۱۳ کیلوگری در مرکز یزد به حالت منجمد نیز بر روی ۱۰ ویال ویروسی انجام شد.

ویروسهای پرتوتابی شده جهت تعیین غیر فعال سازی کامل ویروس به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شده و در آنجا بر روی گروههای میگو مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲-۱٤- غیرفعال سازی ویروس با فرمالین

برای غیر فعال سازی ویروس با فرمالین، به میزان 0.5 V/V% فرمالین به سوسپانسیون ویروسی (همولنف حاوی ویروس) افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵°C قرار داده، سپس با کمک سانتریفوژ ۳۰۰۰۰ rpm بمدت ۱ ساعت در دمای ۴ °C ، فرمالین را از محلول جداسازی نموده و رسوب را در PBS استریل حل نموده و برای تلقیح به میگو استفاده گردید. تیتر ویروس غیرفعال شده با فرمالین نیز در پست لاروهای میگو تعیین گردید.

سپس از ویروس فرمالینه رقتهای ۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰ در بافر TN تهیه نموده و به گروههای ۱۴ تایی پست لارو میگو تزریق گردید و روزانه دو بار از نظر تعداد تلفات شمارش صورت گرفت.

۲-۱۵- تهیه و تائید باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

سوش خالص باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس با شناسه ۱۷۸۰۲ از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در اختیار پروژه قرار گرفت. از آنجائیکه بیشتر باکتریهای نمک دوست خانواده ویبریو در اکثر آبزیان قدرت رشد مثبت دارند به عنوان محرک سیستم ایمنی در مورد سخت پوستان استفاده می شوند، در این پروژه نیز از باکتری نمک

دوست ویبریو پاراهمولیتیکوس به عنوان یک نوع محرک ایمنی جهت کمک به فعال سازی سیستم ایمنی میگو در مقابله با رادیوواکسن استفاده گردید.

با توجه به اینکه سوش ویبریو پاراهمولیتیکوس استفاده شده دارای شناسه ۱۷۸۰۲ بوده لذا کاملاً تائید شده می باشد و نیازی به روش مولکولی نمی باشد. ولی با این وجود جهت تائید اینکه در حین کار در آزمایشگاه آلوده به سایر باکتریها بویژه باسیلها نشده باشد کلیه تستهای بیوشیمیایی لازم جهت تشخص آن طبق استاندارد ملی ایران شماره ۳۳۰۶ (روش شناسایی ویبریو پاراهمولیتیکوس) انجام گردید که در زیر امده است (Namikoshi etal.,2004)

سوش خالص باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در اختیار پروژه قرار گرفت، و برای تائید سوش مذکور پس از پاساژ آن و غنی سازی در محیط آبگوشت تریپتون سوی برات کلیه تستهای اختصاصی تشخیص این سوش انجام گردید که نتایج آن به شرح زیر می باشد:

سوکروز –، اکسیداز +، حرکت +، گلوکز +، تشکیل گاز از گلوکز –، لاکتوز –، هیدروژن سولفید –، لیزین دکربوکسیلاز +، اندول +، بتاگالاکتوزیداز +

سپس باکتری مذکور در محیط TCBS (Tiosulfat Citrate Bile Salt) کشت سطحی داده شد که کلنیهای ریز ۲-۳ میلی متری به رنگ سبز و محدب رشد نمود(Akhondzadeh Basti etal.,2007).

۱۶-۲- لیوفیلیزلسیون باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

سوش خالص باکتری روی سطح محیط مورب ۲۰ لوله حاوی نوترینت آگار بعلاوه ۳٪ کلرید سدیم کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تمام کلنیهای رشد یافته به کمک یک رابر پلاستیکی یا شیشه ای استریل جمع آوری نموده و در ۴۰ سی سی محلول استریل حاوی ۱۰٪ Skim Milk با pH= 7.4 کاملاً هموژن گردید. سپس این مخلوط در آمپولهای کوچک مخصوص دستگاه لیوفیلیزه به حجم ۳ سی سی تقسیم گردید و ۵ سی سی آن برای تعیین Colony Forming Unit (CFU) باکتری خالص استفاده شد.

۲-۱۷- تعیین Colony Forming Unit (CFU) باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

رقتهای از سوش باکتری خالص هموژن شده در محلول استریل حاوی ۱۰٪ Skim Milk ، در پپتون واتر ۹ در هزار تهیه گردید (رقتهای 10^{-1} تا 10^{-9}). سپس از هر رقت روی سطح سه پتری دیش حاوی محیط نوترینت آگار بعلاوه ۳٪ سدیم کلراید کشت سطحی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پتری دیشها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از نظر تعداد کلنیهای رشد یافته شمارش گردیدند و نتایج گزارش گردید (Nash etal., 1992;Soltani *etal.*,2000).

۲-۱۸- پرتودهی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

۲-۱۸-۱- پرتوتابی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در حالت منجمد

پس از کشت مجدد یک ویال باکتری لیوفیلیزه شده در ۱۰ سی سی محیط آبگوشت TSB (Tryptose Soy Broth) بمدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، آن را به یک ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط TSB تلقیح نموده و مجدد ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده شد. سپس ۵۰۰ میلی لیتر باکتری رشد یافته با دور ۷۰۰ ×g در دمای $4\ ^{o}C$ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده و رسوب آن در ۵۰ سی سی بافر PBS (pH= 7.4) استریل حل گردید و به قسمتهای ۵ سی سی ۵ سی سی در ویالهای شیشه ای تقسیم شد. ویالهای حاوی ۵ سی سی باکتری با دزهای ۰,۵ ، ۱، ۱,۵، ۲، ۲,۵، ۳ ، ۳,۵ و ۴ کیلوگری توسط گاما سل پرتوتابی شدند. سپس از هر دز رقتهای ۱- ۱۰ تا ۸- ۱۰ در بافر PBS (pH= 7.4) تهیه شد و از هر رقت سه پتری دیش نوترینت اگار بعلاوه ۳٪ سدیم کلراید کشت سطحی داده شد. کشتها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در $37\ ^{o}C$ شمارش گردیدند.

۲-۱۸-۲- پرتوتابی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس لیوفیلیزه شده

ویالهای حاوی باکتری لیوفیلیزه نیز با پرتو گاما در دزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ کیلوگری پرتوتابی شدند. از هر دز رقتهای 10^{-1} تا 10^{-8} در بافر PBS (pH= 7.4) تهیه شد و از هر رقت سه پتری دیش نوترینت آگار بعلاوه

۳٪ سدیم کلراید کشت سطحی داده شد. کشتها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در ^{o}C ۳۷ از نظر رشد باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس بررسی گردیدند.

۱۹-۲- تایید غیرفعال سازی ویروس لکه سفید

۱-۱۹-۲- بررسی غیر فعال سازی ویروس و تعیین تیتر ویروسهای پرتوتابی شده با پرتو گاما

برای تعیین تیتر ویروس از روش تعیین Lethal Dose50 (LD50) استفاده گردید. به این ترتیب که ۳۵ گروه پست لارو میگوی ۱ تا ۲ گرمی، هر گروه شامل ۱۴ عدد میگو انتخاب گردید. سریال رقتی از ۱ ، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ از سوسپانسیون ویروسی (هملونف حاوی ویروس WSSV) پرتوتابی شده در دزهای متفاوت پرتو گاما (دزهای ۰, ۱, ۳, ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۵۰ کیلوگری) در بافر استریل TN تهیه گردید. سپس به هر میگو مقدار ۱۰ میکرولیتر از رقتهای فوق با سرنگ g ۲۹ در ناحیه بند سوم یا چهارم به صورت داخل عضلانی تزریق گردید و روزانه دو بار از نظر تعداد تلفات شمارش صورت گرفت. همچنین سه گروه شاهد نیز در نظر گرفته شد که فقط بافر به آنها تزریق شد. لازم به ذکر است تعداد میگوهای که در روز اول پس از تزریق تلف شدند در شمارش تلفات برای محاسبه تیتر قرار نگرفتند. تلفات تا ۸ روز بعد از تزریق شمارش گردید. تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه گردید. برای بررسی غیر فعال سازی ویروس با روش پرتوتابی از روند کاهش تیتر با افزایش دز پرتو استفاده می گردد و با استفاده از منحنی دز/ پایندگی دز اپتیمم برای غیرفعال سازی محاسبه میگردد.

منحنی دز /پایندگی به صورت نیمه لگاریتمی بر اساس تیتر ویروسی نسبت به دز پرتوتابی با استفاده از نرم افزار Origin ترسیم می گردد و پس از تطبیق نمودن خط مناسب بر این نمودار با استفاده از معادله خط فاکتور D_{10} value را محاسبه گردید.

۲-۱۹-۲- بررسی غیر فعال سازی ویروس و تعیین تیتر ویروسهای پرتوتابی شده با بیم الکترون

برای پرتوتابی الکترون در این پروژه از سیستم پرتو دهنده الکترون در پژوهشکده کاربرد پرتوها در یزد استفاده شد. هملونف خرچنگهای آلوده به ویروس با سرعت پائین سانتریفوژ گردیده (500Xg , 10 min, 4 °C) و در

فریزر C ° ۷۰- نگهداری شدند. این همولنف ها در حالت منجمد به یزد ارسال گردید و در دمای C° ۲۰- با دزهای ۰, ۱, ۳, ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ کیلوگری پرتودهی شده و مجدداً جهت تائید غیر فعال سازی بر روی میگو و تعیین LD_{50} به فریزر C ° ۷۰- منتقل گردیدند.

نمونه های پرتوتابی شده جهت تعیین تیتر ویروس و بررسی روند کاهش تیتر با افزایش دز پرتوتابی به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شدند. تعداد ۴۰ گروه پست لارو میگو ۲-۳ گرمی , هر گروه شامل ۱۲ پست لارو انتخاب گردید, هر نمونه ویروس پرتوتابی شده و نشده در بافر TNاستریل رقت سازی شد, سریال رقت ۱, 10^{-1} , 10^{-2}, 10^{-3} و 10^{-4} تهیه شده و به هر گروه ۱۰ میکرولیتر ویروس رقیق شده به صورت داخل عضلانی در بند سوم و چهارم تزریق گردید. یک گروه نیز بعنوان شاهد بدون تزریق و یک گروه نیز به عنوان شاهد ولی با تزریق فقط بافر TN اعمال گردید. نتایج تلفات پست لاروهای میگو در گروههای مختلف به شرح زیر می باشد(Witteveldt etal., 2004a; Witteveldt etal.,2004b).

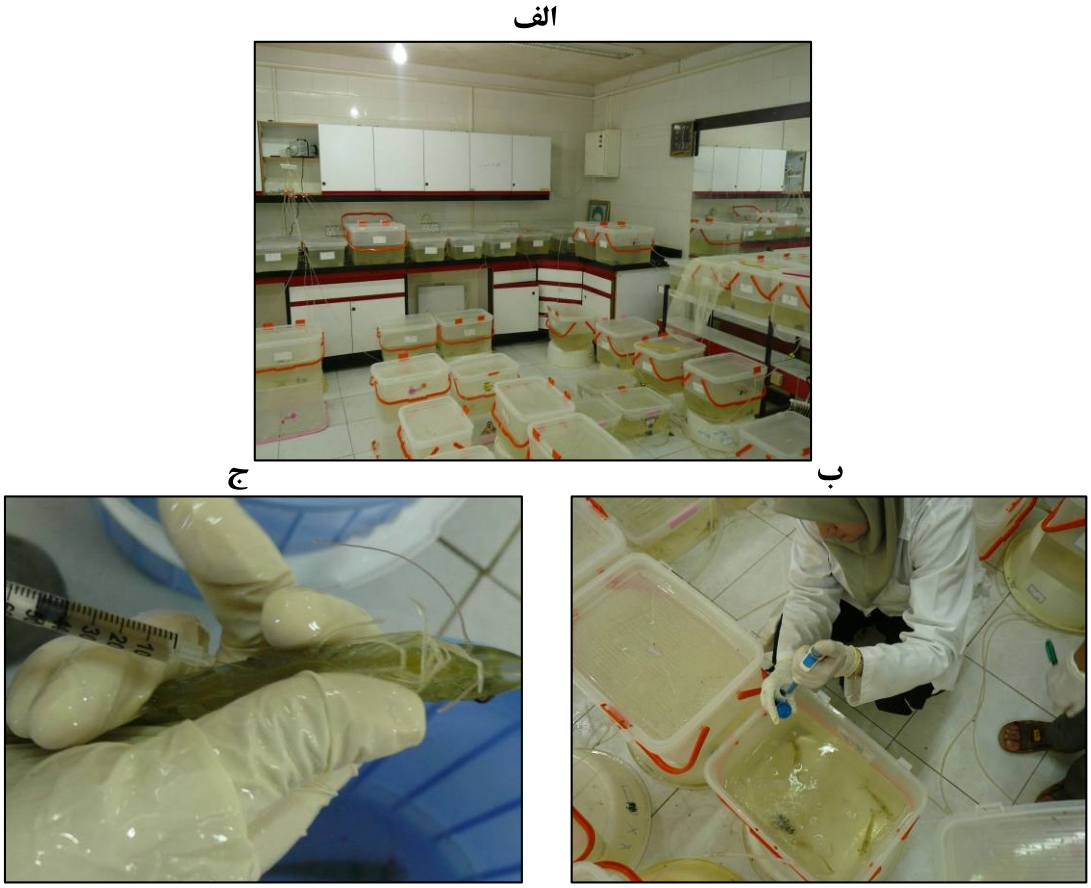
۳-۱۹-۲- تایید غیرفعال سازی ویروس لکه سفید با پرتوهای گاما, الکترون و فرمالین

پس از غیرفعال سازی ویروس با پرتوتابی گاما, الکترون و فرمالین , واکسنهای غیرفعال شده در حالت منجمد به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شده و به گروههای میگو تلقیح گردیدند. میزان تزریق هر واکسن به هر میگو ۶۰ میکرولیتر بوده, و میزان ایمیونوژن (B 1-3 Glucan) اضافه شده به غذای گروههای میگو که واکسینه شده با ایمیونوژن بودند نیز ۱/۵٪ بود.

باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس نیز که با پرتوتابی گاما غیرفعال شده بود به عنوان یک محرک ایمنی مورد استفاده قرار گرفت. باکتری اولیه با تیتر 10^{9} CFU/ml که به صورت لیوفیلیزه در آمده و با استفاده از روش پرتوتابی گاما غیرفعال شده بود در ۱۰۰ سی سی بافر فسفات استریل حل شده و به نسبت ۱:۱ با سوسپانسیون واکسن ویروسی غیرفعال شده مخلوط گردیده و به هر میگو به میزان ۶۰ میکرولیتر از این مخلوط تزریق شد, لذا به هر میگو میزان باکتری غیرفعال تزریق شده ۳×۱۰^{۶} /ml می باشد.

گروههای میگو که با واکسنهای غیرفعال با پرتوتابی گاما, الکترون و فرمالین تزریق شده بودند به مدت دو هفته نگهداری شده و تلفات شمارش و جمع آوری گردید.

همچنین مطابق با گروههای بالا نیز میگوها تحت تیمار با همین واکسنها ولی به روش حمامی قرار گرفتن میزان تلقیح واکسن به روش حمامی ۴ میلی لیتر واکسن در هر ۴۰ لیتر آب بود. گروهها در طی مدت ۴۰ روز مورد بازرسی قرار گرفتند و هیچ تلفاتی در هیچ کدام از گروههای حمامی دیده نشد. لذا غیرفعال سازی ویروس مجدداً نیز مورد تایید قرار گرفت.



شکل ۲۱: الف) گروههای میگو برای بررسی غیر فعال سازی ویروس لکه سفید ب) روش تلقیح ویروس غیرفعال شده به طریق حمامی ج) روش تلقیح ویروس غیرفعال شده به طریق تزریقی

۲۰-۲- محرکهای ایمنی

باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس غیرفعال شده با پرتوتابی گاما به روش لیوفیلیزه به عنوان محرک ایمنی مورد استفاده قرار گرفت. باکتری اولیه با تیتر 10^{9} CFU/ml که به صورت لیوفیلیزه در آمده و با استفاده از روش

پرتوتابی گاما غیرفعال شده بود در ۱۰۰ سی سی بافر فسفات استریل حل شده و به نسبت ۱:۱ با سوسپانسیون واکسن غیرفعال شده مخلوط گردیده و به هر میگو به میزان ۶۰ میکرولیتر از مخلوط فوق تزریق شد.

۱-۲۰-۱- ماده ایمیونوژن تجاری ساخت International Commerce Corporation USA نیز به میزان ۱,۵ گرم در کیلوگرم مواد غذائی میگو استفاده گردید. ترکیبات ماده ایمیونوژن شامل:

GLYCOSAL COMPOSITION
β-Glucan(1,3-1,6)……. % 30.0±3
Mannanoligosacharides % 18.0±3

BROMATOLOGICAL ANALYSIS
Moisture……..... Max. % 8.0
Crude Protein……... % 32.0
Ash……... Max. % 8.0
pH…… Min. 5.0
MINERALS:
Calcium…….. % 0.8
Phosphorus……. % 3.0
Potassium…… % 1.1
Magnesium……. % 0.2
Sodium…… % 2.0

VITAMINS:
Thiamine (B1)……. ppm 71.1
Riboflavin (B2)…… ppm 30.7
Pyridoxine (B6)…… ppm 8.3
Cobalamin (B12)……. ppm 0.6
Folic Acid…… ppm 11.2
Biotin…….. ppm 40.9
Choline…… ppm 45.2

۲۱-۲- واکسیناسیون گروههای میگو به روش تزریقی

جهت واکسیناسیون گروههای میگو سه نوع واکسن در این تحقیق ساخته شده است، شامل موارد زیر:

۱- واکسن غیرفعال بیماری لکه سفید میگو به روش پرتوتابی گاما

۲- واکسن غیرفعال بیماری لکه سفید میگو به روش پرتوتابی الکترون

۳- واکسن غیرفعال بیماری لکه سفید میگو به روش فرمالینه

همچنین در این تحقیق دو نوع محرک ایمنی ذکر شده در قسمت ۱۸ ، به همراه واکسنها مورد استفاده قرار گرفتند [۳۳].

واکسیناسیون به روشهای توضیح داده شده در زیر ولی در دو دز به فاصله دو هفته انجام شد.

۱-۲۱-۲- واکسیناسیون با واکسن گاما

بیست و چهار گروه ۶ تائی میگو جهت بررسی واکسن غیرفعال بیماری لکه سفید میگو به روش پرتوتابی گامادر ۲۴ آکواریوم پلاستیکی ۵۰ لیتری حاوی ۲۰ لیتر آب دریا با درجه شوری ppt ۳۵ در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد و متوسط pH خنثی استفاده شدند. واکسن غیرفعال با پرتو گاما را در بافر PBS استریل رقیق سازی نموده, رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸ تهیه شد. سپس هر رقت به دو گروه میگو تزریق گردید. برای ۸ گروه اول چهار رقت واکسن و به هر میگو میزان ۶۰ میکرولیتر در بند سوم یا چهارم تزریق گردید غذای این ۸ گروه معمولی و بدون ماده افزودنی بود. برای ۸ گروه دوم نیز مطابق ۸ گروه اول ۴ رقت واکسن و به همان میزان تزریق شد ولی به غذای اینها ماده ایمیونوژن تجاری (بند ۱۸,۲) به میزان ۱,۵ گرم در کیلوگرم وزن غذا اضافه گردید. برای هشت گروه سوم هم از ۴ رقت واکسن استفاده شد، ولی سوسپانسیون باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس غیرفعال شده با پرتو گاما نیز به عنوان یک محرک ایمنی به نسبت ۱:۱ با رقتهای واکسن مخلوط شده و به میزان ۶۰ میکرولیتراز مخلوط به هر میگو تزریق گردید. گروههای واکسینه شده به مدت دو هفته در شرایط مناسب از نظر آب, دما و pH نگهداری شدند. با توجه به تیتر اولیه ویروس که LD_{50}/ml $10^{5,4}$ بود لذا میزان ویروس غیرفعال در ۶۰ میکرولیتر سوسپانسیون تزریق شده $6\times 10^{3,4}$ می باشد.

۲-۲۱-۲- واکسیناسیون با واکسن الکترون

بیست و چهار گروه ۶ تائی میگو جهت بررسی واکسن غیرفعال بیماری لکه سفید میگو به روش پرتوتابی الکترون در ۲۴ آکواریوم پلاستیکی ۵۰ لیتری حاوی ۲۰ لیتر آب دریا با درجه شوری ppt ۳۵ در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد و متوسط pH خنثی استفاده شدند. واکسن غیرفعال با پرتو الکترون را در بافر PBS استریل رقیق سازی نموده, رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸ تهیه شد. سپس هر رقت به دو گروه میگو تزریق گردید. برای هشت گروه اول چهار رقت واکسن و به هر میگو میزان ۶۰ میکرولیتر در بند سوم یا چهارم تزریق گردید غذای این ۸ گروه معمولی و بدون ماده افزودنی بود. برای ۸ گروه دوم نیز مطابق ۸ گروه اول ۴ رقت واکسن و به همان میزان تزریق شد ولی به غذای اینها ماده ایمیونوژن تجاری (بند ۱۸,۲) به میزان ۱,۵ گرم در کیلوگرم وزن غذا اضافه گردید. برای ۸ گروه سوم هم از ۴ رقت واکسن استفاده شد، ولی سوسپانسیون باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

غیرفعال شده با پرتو گاما نیز به عنوان یک محرک ایمنی به نسبت ۱:۱ با رقتهای واکسن مخلوط شده و به میزان ۶۰ میکرولیتر نیز به هر میگو تزریق گردید. گروههای واکسینه شده به مدت دو هفته در شرایط مناسب از نظر آب, دما و pH نگهداری شدند. با توجه به تیتر اولیه ویروس که LD_{50}/ml $10^{5,4}$ بود لذا میزان ویروس غیرفعال در ۶۰ میکرولیتر سوسپانسیون تزریق شده $10^{3,4} \times 6$ می باشد.

۳-۲۱-۲- واکسیناسیون با واکسن فرمالینه

شانزده گروه ۶ تائی میگو جهت بررسی واکسن غیرفعال بیماری لکه سفید میگو به روش فرمالینه در ۱۶ آکواریوم پلاستیکی ۵۰ لیتری حاوی ۲۰ لیتر آب دریا با درجه شوری ppt ۳۵ در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد و متوسط pH خنثی استفاده شدند. واکسن غیرفعال با فرمالین را در بافر PBS استریل رقیق سازی نموده, رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸ تهیه شد. سپس هر رقت به دو گروه میگو تزریق گردید. برای۸ گروه اول چهار رقت واکسن و به هر میگو میزان ۶۰ میکرولیتر در بند سوم یا چهارم تزریق گردید غذای این ۸ گروه معمولی و بدون ماده افزودنی بود. برای ۸ گروه دوم نیز مطابق ۸ گروه اول ۴ رقت واکسن و به همان میزان تزریق شد ولی به غذای اینها ماده ایمیونوژن تجاری (بند ۱۸,۲) به میزان ۱,۵ گرم در کیلوگرم وزن غذا اضافه گردید. گروههای واکسینه شده به مدت دو هفته در شرایط مناسب از نظر آب, دما و pH نگهداری شدند. با توجه به تیتر اولیه ویروس که LD_{50}/ml $10^{5,4}$ بودلذا میزان ویروس غیرفعال در ۶۰ میکرولیتر سوسپانسیون تزریق شده $10^{3,4} \times 6$ می باشد.

٤-۲۱-۲- گروههای کنترل واکسن

گروههای میگو که به عنوان گروههای کنترل استفاده شدند هر کدام حاوی ۶ عدد میگو بودند.

دو گروه کنترل ویروس که تحت تیمار با واکسن قرار نگرفتند و فقط در آزمون چلنج ویروس فعال به آنها تزریق شد.

دو گروه کنترل باکتری که فقط باکتری غیرفعال شده به میزان $10^{6} \times 3$ /ml به آنها در دو نوبت به فاصله دو هفته تزریق گردید ودو هفته پس از تزریق دوم در آزمون چلنج به آنها ویروس فعال تزریق شد.

دو گروه ایمیونوژن خوراکی که به آنها تزریقی انجام نشد و در طی چهار هفته قبل از آزمون چلنج تحت تیمار با غذای که به آن ایمیونوژن به صورت خوراکی اضافه شده بود قرار گرفتند.

یک گروه کنترل بافر که به آنها فقط بافر استریل در دو دز به فاصله دو هفته تزریق شد و دو هفته پس از تزریق دوم در آزمون چلنج به آنها ویروس فعال تزریق شد.

یک گروه کنترل ویروس به روش حمامی که تحت تیمار با واکسن قرار نگرفتند و فقط در آزمون چلنج، ویروس فعال به روش حمامی به آنها تلقیح شد.

۲۲-۲- واکسیناسیون گروههای میگو به روش حمامی

هفت گروه میگو ۱۰ تائی (هر کدام حدود ۱۰ گرم وزن دارند) در ۷ آکواریوم پلاستیکی ۵۰ لیتری حاوی ۲۰ لیتر آب دریا با درجه شوری ppt ۳۵ در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد و متوسط pH خنثی استفاده گردیدند.

۱-۲۲-۲- تیمار به روش حمامی با واکسن گاما

سه گروه تحت تیمار با واکسن غیرفعال با پرتو گاما به میزان ۵ میلی لیتر (نسبت ۱/۲۰ وزنی میگو/ حجم واکسن) قرار گرفتند. گروه اول تحت تغذیه با غذای معمولی قرار گرفته, گروه دوم تحت تغذیه با غذای حاوی ایمیونوژن به میزان ذکر شده در قسمت ۱۸,۲ و به گروه سوم نیز غذای معمولی خورانده شده ولی تحت تیمار با باکتری غیرفعال شده با پرتو گاما به عنوان یک محرک ایمنی به میزان ۴ میلی لیتر قرار گرفت. واکسیناسیون در دو دز به فاصله دو هفته انجام شد.

۲-۲۲-۲- تیمار به روش حمامی با واکسن الکترون

سه گروه تحت تیمار با واکسن غیرفعال با الکترون به میزان ۴ میلی لیتر (نسبت ۱/۲۰ وزنی میگو/ حجم واکسن) قرار گرفتند. گروه اول تحت تغذیه با غذای معمولی قرار گرفته, گروه دوم تحت تغذیه با غذای حاوی ایمیونوژن به میزان ذکر شده در قسمت ۱۸,۲ و به گروه سوم نیز غذای معمولی خورانده شده ولی تحت تیمار با

باکتری غیرفعال شده با پرتو گاما به عنوان یک محرک ایمنی به میزان ۴ میلی لیتر قرار گرفت. واکسیناسیون در دو دز به فاصله دو هفته انجام شد.

۳-۲۲-۲-گروه کنترل حمامی

یک گروه میگو ۶ تائی (هر کدام حدود ۱۰ گرم وزن دارند) در یک آکواریوم پلاستیکی ۵۰ لیتری حاوی ۲۰ لیتر آب دریا با درجه شوری ppt ۳۵ در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد و متوسط pH خنثی استفاده گردیدند. به این گروه ویروس فعال با تیتر LD_{50} ۱۰۰ به میزان ۴ میلی لیتر به صورت حمامی در زمان انجام آزمون چلنج تلقیح شده و به مدت ۵۰ روز تحت نظارت قرار گرفتند.

۲۳-۲- آزمون مواجهه

در این آزمون ویروس فعال سندرم لکه سفید میگو با تیتر مشخص $10^{5.4}$ LD_{50}/ml استفاده گردید و چلنج در دو فاز مجزا با میزان متفاوت ویروس و در دو زمان پس از واکسیناسیون انجام شد.

۱-۲۳-۲- مواجهه اول

دو هفته بعد از آخرین دز واکسیناسیون چلنج انجام گردید. ویروس فعال با رقت ۱/۲۰ که حدود $10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl می شود در بافر TN استریل به صورت داخل عضلانی به هر میگو میزان ۵۰ میکرولیتر تزریق گردید. گروه کنترل ویروس اول نیز به همین روش تیمار شد. گروه کنترل ویروس حمامی نیز با همین رقت ویروس ولی به میزان ۴ میلی لیتر به صورت حمامی تحت تیمار قرار گرفت. تمام گروههای چلنج شده به مدت دو هفته از نظر تلفات بررسی و جمع آوری شدند.

۲-۲۳-۲- مواجهه دوم

چهار هفته بعد از آخرین دز واکسیناسیون چلنج انجام گردید. ویروس فعال خالص با تیتر حدود $10^{5.4}$ LD_{50}/ml به صورت داخل عضلانی به هر میگو میزان ۵۰ میکرولیتر تزریق گردید. یعنی به هر میگو µl /^{4} ۱۰ ویروس فعال

تزریق شد. گروه کنترل ویروس دوم نیز به همین روش تیمار شد. گروه کنترل ویروس حمامی نیز با همین تیتر ویروس ولی به میزان ۴ میلی لیتر به صورت حمامی تحت تیمار قرار گرفت. تمام گروههای چلنج شده به مدت دو هفته از نظر تلفات بررسی و جمع آوری شدند.

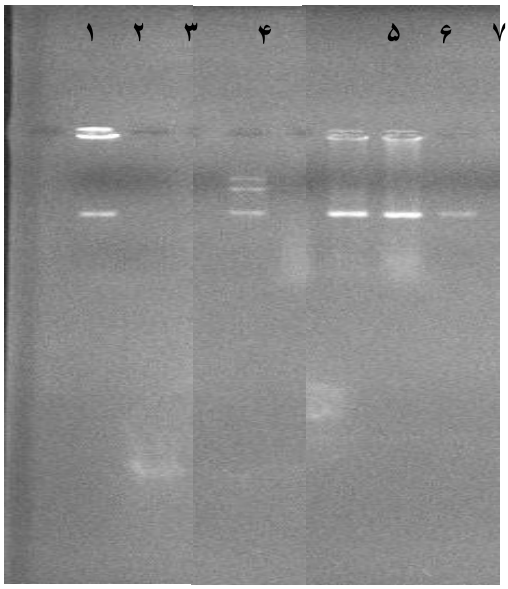
۲-۲۳-۲- مواجهه گروههای واکسینه شده به روش حمامی

دو هفته بعد از آخرین دز واکسیناسیون چلنج انجام گردید.گروههای واکسینه شده به روش حمامی با واکسنهای غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون دو هفته پس از دز دوم واکسن هر گروه با میزان ۵ میلی لیتر ویروس فعال تحت تیمار قرارگرفتند و تلفات چهل الی پنجاه روز بعد از چلنج بررسی شدند و درصد بقا در هر گروه محاسبه گردید.

۳- نتایج

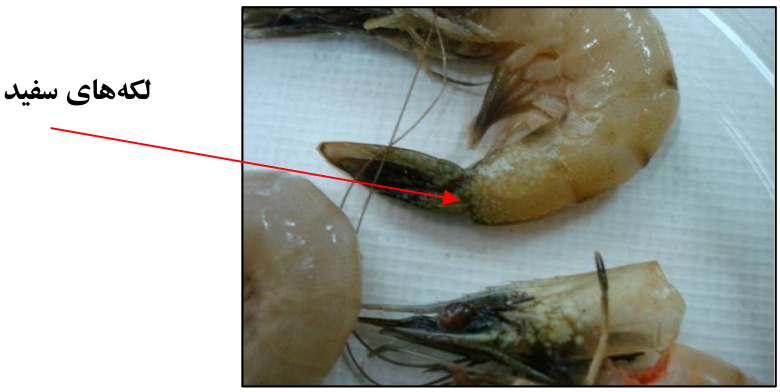
۳-۱- نتیجه تعیین آلودگی نمونه های میگوهای به بیماری لکه سفید با روش NESTED PCR

آلودگی نمونه های میگوهای مشکوک به بیماری لکه سفید که از چابهار و بوشهر تهیه شده بودند با استفاده از آزمون Nested PCR کیت تجاری IQ-2000 مورد آزمایش قرار گرفتن که در شکل زیر آمده است.

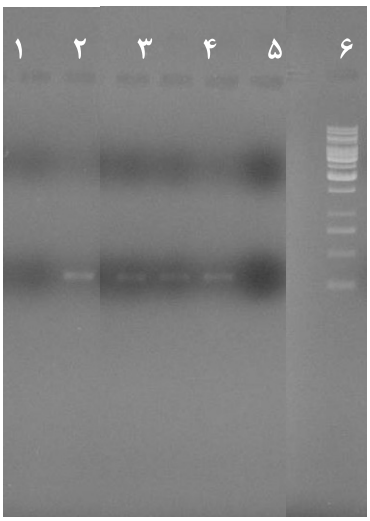


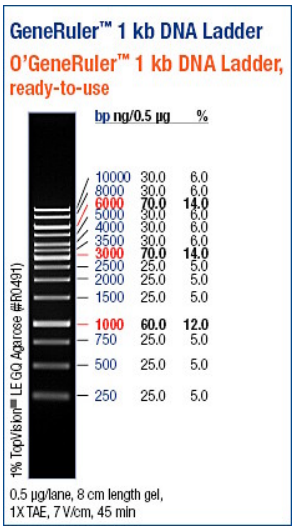
شکل ۲۲: نتایج Nested PCR نمونه های بافت میگو (گروه ۱ و ۲) تهیه شده از چابهار و بافت کرای فیش آلوده شده با ویروس حاصل از فیلتراسیون این میگوها، به ترتیب از سمت چپ شامل کنترل مثبت (333 bp)، کنترل منفی، DNA Ladeer (333, 630 and 848 bp) ، بافت میگوی گروه ۱ (333 bp)، بافت میگوی گروه ۲ (333 bp)، بافت کرای فیش گروه ۱ (333 bp)، بافت کرای فیش گروه ۲ (333 bp)

شکل ۲۳: علائم میگوهای مشکوک به آلودگی با ویروس لکه سفید



شکل۲٤: میگوهای آلوده تهیه شده از بوشهر

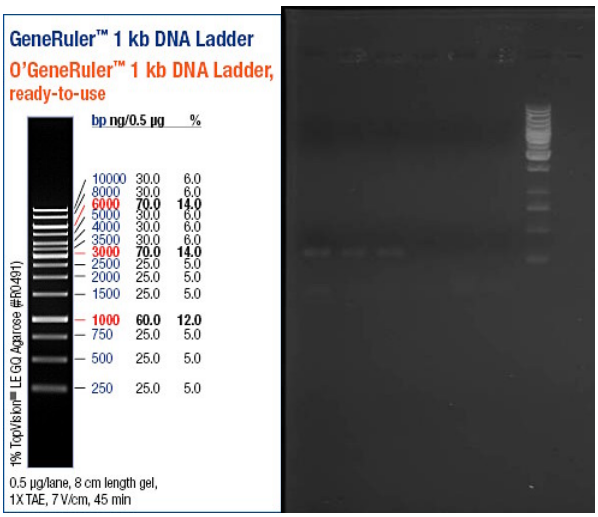




شکل۲۵: نتایج Nested PCR نمونه‌های بافت میگو تهیه شده از بوشهر، به ترتیب از سمت چپ شامل : بافت میگو بوشهر که از نظر ویروس لکه سفید مثبت است (باند 333 bp)، کنترل مثبت ۱، کنترل مثبت ۲، کنترل مثبت ۳، کنترل منفی، DNA Ladder (10000 – 250 bp)

۲-۳- نتیجه تائید عدم آلودگی خرچنگها با آزمون PCR

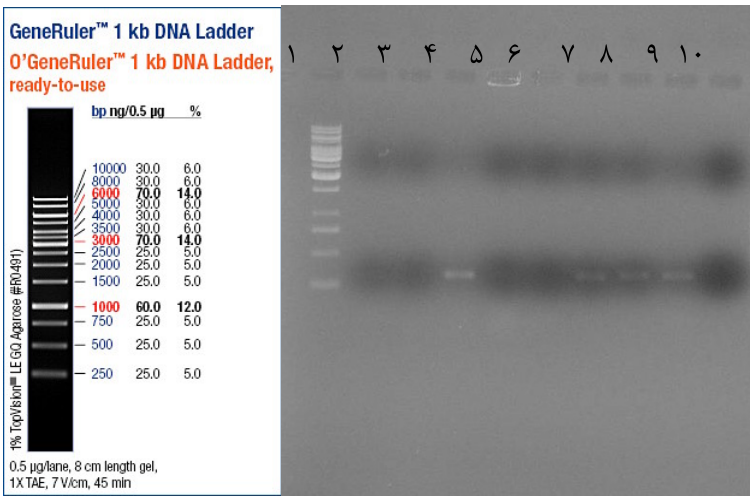
چند نمونه از خرچنگهای زنده و تلف شده با استفاده از دستورالعمل کیت تجاری IQ 2000 مربوط به آزمون Nested –PCR جهت تشخیص آلودگی به ویروس لکه سفید آماده سازی و مورد آزمایش قرار گرفتند، و از غیر آلوده بودن آنها اطمینان حاصل گردید.



شکل ۲۶: عکس ژل الکتروفورز مربوط به عدم آلودگی خرچنگها به ویروس لکه سفید به ترتیب از سمت چپ شامل: کنترل مثبت ۱ (باند 333 bp)، کنترل مثبت ۲ (باند 333 bp)، کنترل مثبت ۳ (باند 333 bp)، کنترل منفی، بافت خرچنگ تلف شده در مسیر انتقال به کرج، بافت خرچنگ زنده، DNA Ladder (10000-250 bp)

۳-۳- نتیجه آلوده سازی کرای فیش با استوک ویروسی تهیه شده

پس از آلوده سازی خرچنگها با استوک ویروسی تهیه شده همولنف خرچنگها در زمانهای متفاوت جمع آوری شده و DNA آنها به استفاده از کیت تجاری استخراج گردید و آزمون Nested-PCR انجام شد.



شکل ۲۷: نتایج آزمون PCR بافت و همولنف خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی در روزهای سوم، پنجم و دهم بعد از تزریق ویروس به ترتیب از سمت چپ شامل: DNA Ladder (10000-250 bp) ، همولنف کرای

فیش روز سوم، همولنف کرای فیش روز پنجم، هملنف کرای فیش روز دهم (باند 333 bp)، بافت خرچنگ روز سوم، بافت خرچنگ روز پنجم، بافت خرچنگ روز دهم (باند 333 bp)، کنترل مثبت ۱ (باند 333 bp)، کنترل مثبت ۲ (باند 333 bp)، کنترل منفی

نکته مهم۱ : از آنجائیکه تکثیر ویروس در بدن میزبان (کرای فیش) به صورت in vivo انجام می شود و در کشت سلول in vitro نمیباشد، لذا سرعت رشد ویروس در بدن خرچنگ به شرایط محیط زندگی و فصل رشد جانور بستگی دارد. همانطور که در نتایج قبلی دیده شد در فصل زمستان که فعالیتهای حیاتی خرچنگ کمتر می باشد سرعت رشد ویروس نیز در بدن این حیوان با توجه به دمای مورد استفاده دراین تجربه که حدود ۱۲– ۱۵ درجه سانتیگراد بود به مدت ۱۰ روز به طول انجامید، ولی در فصل تابستان که جانور دارای فعالیتهای زیستی سریعتر می‌باشد و دمای محیط آن نیز حدود ۳۵ درجه سانتیگراد بود در طول سه روز ویروس در بدن خرچنگ رشد لازم را داشته است.

نکته مهم ۲: با توجه به میزان استوک ویروسی که در سری اولیه آلوده سازی خرچنگها استفاده شده بود (۳۰۰ میکرولیتر) و از آنجائیکه دمای نگهداری خرچنگها ۱۲–۱۵ درجه سانتیگراد بود (فصل زمستان) لذا همانطور که ذکر شده سرعت رشد ویروس در بدن میزبان خود کمتر بوده و بعد از ۱۰ روز رشد ویروس مناسب گردید چون نمونه های روز سوم و پنجم از نظر وجود ویروس در آزمون PCR منفی بودند ولی روز دهم مثبت گردیدند.

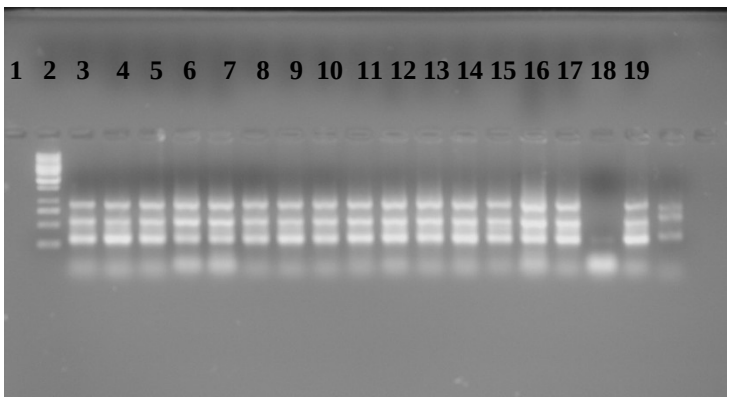
اما در مورد خرچنگهای که سری دوم که با استوک ویروسی آلوده شده بودند با توجه به اینکه دمای نگهداری بالاتر رفته بود حدود ۳۰–۳۵ درجه سانتیگراد (فصل تابستان), همچنین مقدار متفاوتی استوک ویروسی به هر خرچنگ تزریق شد. همانطور که ذکر گردید پس از تزریق ۵۰۰ میکرولیتر استوک ویروسی به هر خرچنگ قبل اقدام به تهیه همولنف خرچنگهای آلوده شده آنها تلف شدند. لذا در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر استوک ویروسی تزریق شد اینها نیز در روز چهارم تلف شدند لذا مقدار استوک ویروسی را کمتر نموده و ۱۰۰ میکرولیتر تزریق نمودیم که قبل از تلف شدن خرچنگها در روز سوم همولنفها از نظر وجود ویروس مثبت شدند.

نتیجه گیری: در دمای نگهداری پائین ۱۲–۱۵ درجه سانتیگراد می بایست به هر خرچنگ میزان ۳۰۰ میکرولیتر استوک ویروسی تزریق نمود و از روز ششم به بعد آنها را هر روز تحت نظارت قرار داده و در نهایت می توان تا

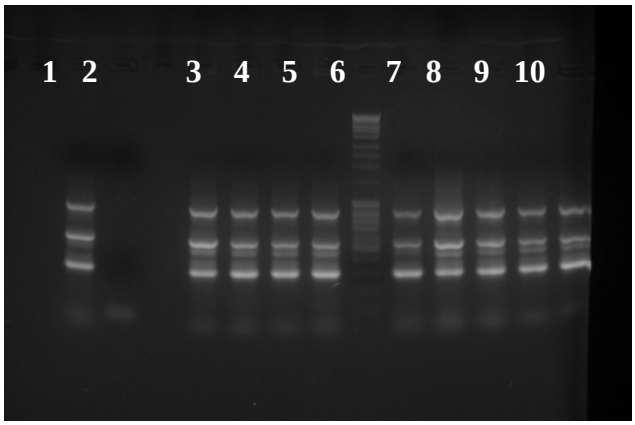
روز دهم صبر نمود و همولنفهای مثبت از نظر وجود ویروس لکه سفید را قبل از تلف شدن خرچنگ جمع آوری نمود.

در دمای نگهداری بالا ۳۰ -۳۵ درجه سانتیگراد می بایست به هر خرچنگ میزان ۱۰۰ میکرولیتر استوک ویروسی تزریق نمود و از روز دوم به بعد آنها را هر روز تحت نظارت قرار داده و در نهایت می توان تا روز سوم صبر نمود و همولنفهای مثبت از نظر وجود ویروس لکه سفید را قبل از تلف شدن خرچنگ جمع آوری نمود.

شکل ۲۸: جداسازی همولنف از خرچنگ آلوده شده با ویروس لکه سفید



شکل ۲۹: نتیجه آزمون بافت و همولنف خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی در آزمایش سری دوم لاین۱ مارکر وزن مولکولی DNA (10000-250 bp)، لاینهای ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ شامل بافت خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی در روز سوم می باشد. لاینهای ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ همولنف همان خرچنگهای که بافت انها در لاینهای قبلی مثبت بودند. لاین ۱۷ کنترل منفی و لاین ۱۸ کنترل مثبت و لاین ۱۹ مارکر وزن مولکولی موجود در کیت IQ2000 (333- 630- 848 bp)



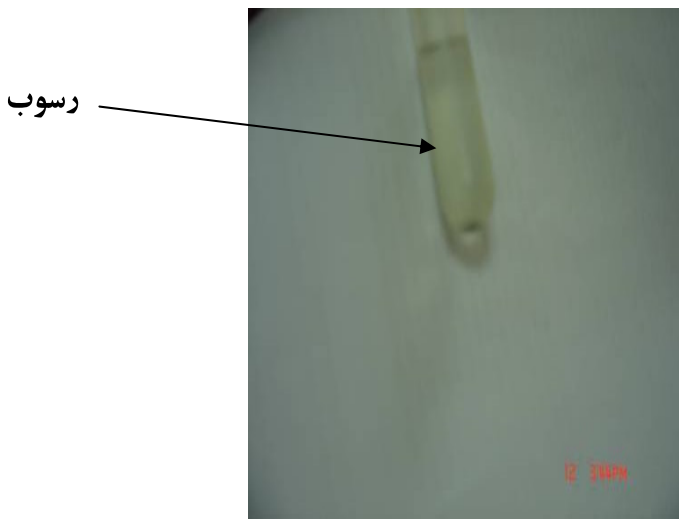
شکل ۳۰: نتیجه آزمون بافت و همولنف خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی در آزمایش سری سوم

لاین ۱ : کنترل مثبت, لاین ۲: کنترل منفی, لاینهای ۳, ۴, ۵, ۶ بافت خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی,

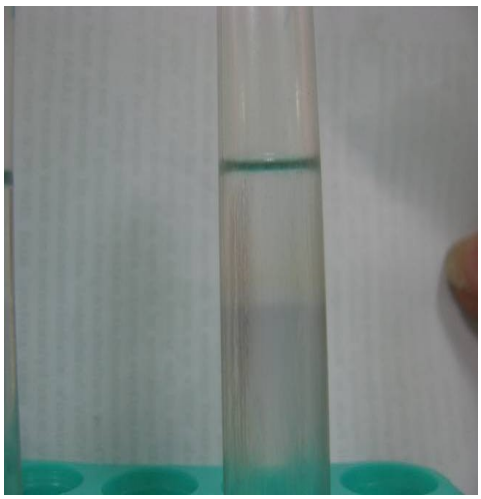
لاین ۷: مارکر DNA, لاینهای ۸, ۹, ۱۰, ۱۱ و ۱۲ همولنف خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی

٤-۳- نتیجه تخلیص ویروس سندرم لکه سفید

پس از سانتریفوژ همولنفهای آلوده به ویروس لکه سفید با استفاده از اولتراسانتریفوژ در مرحله اول یک رسوب ویروسی تشکیل شده که جهت استفاده در مرحله بعدی برای بدست آوردن باندهای ویروسی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۳۱: رسوب ویروسی حاصل از اولین مرحله اولتراسانتریفوژ



شکل ۳۲: باند ویروسی حاصل از اولتراسانتریفوژ گرادیان سوکروز و رسوب ویروسی فوق

جدول ٤: اپتیکال دانسیته فراکشنهای ویروسی حاصل از گرادیان سوکروز (سری اول)

شماره فراکشن	اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۸۰ nm تکرار ۱	نتیجه تکرار ۱	اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۸۰ nm تکرار ۲	نتیجه تکرار ۲
۱	۳		۰	
۲	۸		۱۰	
۳	۱۱		۱۰	
۴	۲۱	پیک	۲۴	پیک
۵	۱۴	پیک	۱۴	پیک
۶	۳۹	پیک	۲۰	پیک
۷	۷		۹	
۸	۳۱		۹	
۹	۰		۰	
۱۰	۰		۰	

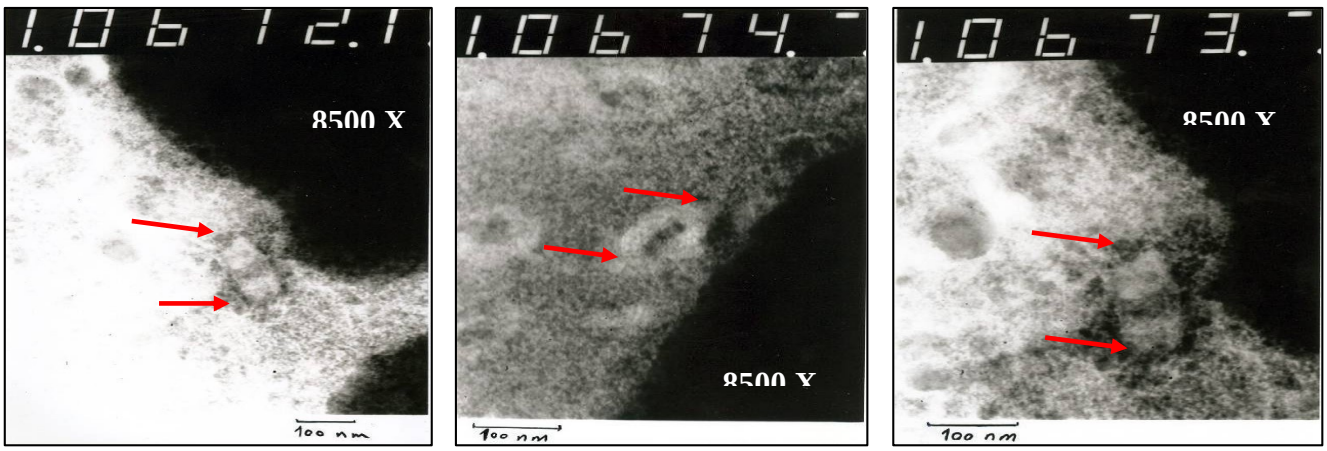
مراحل تخلیص ویروس یکبار دیگر دقیقاً به همان روش قبل تکرار گردید و در نهایت نیز رسوب ویروسی حاصل از اولتراسانتریفوژ اول بر روی دو لوله حاوی گرادیان سوکروز (مطابق روش قبلی توضیح داده شده) بار گذاری شده و پس از اولتراسانتریفوژ فراکشنها جمع اوری شده و اپتیکال دانسیته فراکشنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر در جدول زیر آمده است. با توجه به نتایج زیر فراکشنهای ۴ و ۵ و ۶ با هم مخلوط شده و بعنوان باند ویروسی جداسازی و پس از افزودن ۱۰٪ DMSO یک شب در فریزر -20 °C یک شب در -70 °C و سپس به تانک ازت مایع منتقل و نگهداری شدند.

جدول ۵: اپتیکال دانسیته فراکشنهای ویروسی حاصل از گرادیان سوکروز (سری دوم)

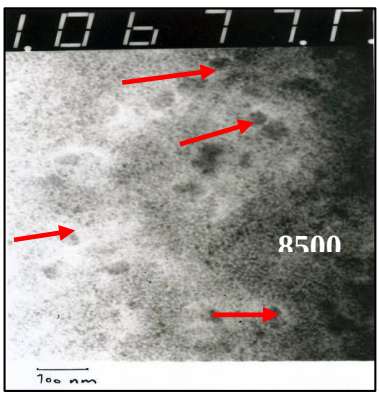
شماره فراکشن	اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۸۰ nm تکرار ۱	نتیجه تکرار ۱	اپتیکال دانسیته در طول موج ۲۸۰ nm تکرار ۲	نتیجه تکرار ۲
۱	۴		۰	
۲	۷		۸	
۳	۱۰		۱۰	
۴	۱۹	پیک	۲۵	پیک
۵	۱۶	پیک	۱۶	پیک
۶	۳۰	پیک	۲۰	پیک
۷	۸		۱۰	
۸	۲۰		۹	
۹	۰		۰	
۱۰	۰		۰	

۵-۳- نتیجه مشاهده ویروس با میکروسکوپ الکترونی

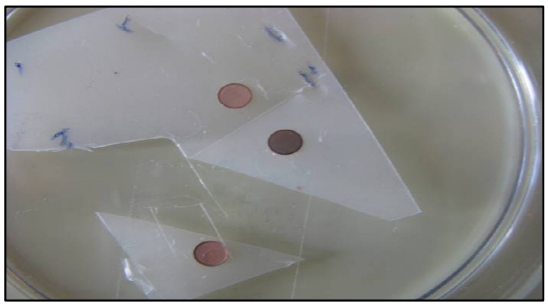
عکسهای ویروس لکه سفید که با میکروسکوپ الکترونی از مقاطع عرضی و طولی تهیه شده اند در زیر مشاهده می گردند.



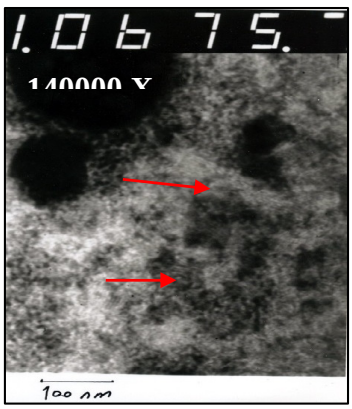
شکل۳۳: عکسهای میکروسکوپ الکترونی ویروس لکه سفید میگو – مقطع طولی ویروس



شکل۲: عکس میکروسکوپ الکترونی ویروس لکه سفید میگو- مقطع عرضی ویروس



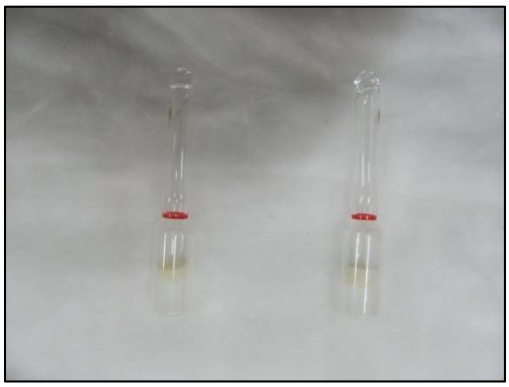
شکل ٣٤: گریدهای مسی پوشیده از فیلم فورموار (نمونه ویروسی روی این گریدها قرار داده می شود و رنگ آمیزی منفی می گردد)



شکل٣٥: عکس ویروس لکه سفید میگو مقطع طولی با بزرگنمائی × ١٤٠٠٠٠

٦-٣- نتیجه ویروس لیوفیلیزه شده

مقداری از سوسپانسیون ویروسی تهیه شده با تیتر مشخص را به صورت پودر لیوفیلیزه در آورده و بری مدت چند سال قابل نگهداری در یخچال می باشد.



شکل ٣٦ : ویروس لکه سفید لیوفیلیزه شده

۷-۳- نتیجه تعیین تیتر ویروس فعال پرتوتابی نشده

برای تعیین تیتر ویروس از روش تعیین Lethal Dose$_{50}$ (LD_{50}) طبق پروتکل Van Hulten (2001b) استفاده گردید.

تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه گردید.

Karber Formula:
-Log LD_{50} = X^a – D (Sp -0.5)
X^a is the last dilution index for which all n cultures are infected (p=1)
D is the log of the dilution factor (log 10 = 1)
P is virus dilution proportion of infected cultures
Sp is the summation of p between the last dilution for which all cultures are infected (p=1) and the first dilution for which all n cultures are unaffected (p=0).

لازم به ذکر است که تعیین تیتر ویروسی در مورد ویروس پرتوتابی نشده دو بار در دو زمان متفاوت ولی با شرایط یکسان انجام گردید و نتایج در جداول ۱ و ۲ آمده است. جداول مربوط به میزان تلفات در هر گروه به صورت زیر می باشد.

جدول ٦: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی نشده (دز صفر) - تکراراول

رقت	تعداد کل	تلفات	تعداد کل/تلفات	Proportion (P)
۱	۱۴	۱۴	۱۴/۱۴	۱
$۱۰^{-۱}$	۱۴	۱۴	۱۴/۱۴	۱
$۱۰^{-۲}$	۱۴	۱۴	۱۴/۱۴	۱
$۱۰^{-۳}$	۱۴	۹	۹/۱۴	۰,۶۴
$۱۰^{-۴}$	۱۴	۳	۳/۱۴	۰,۲۱

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول ۱ به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:
-Log LD_{50} = X^a – D (Sp -0.5) = -2-1 (1.85-0.5) = -3.35
LD_{50} = $10^{3.35}$/ 0.01 ml = $10^{5.35}$ / ml

جدول ۷: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی نشده (دز صفر) - تکراردوم

رقت	تعداد کل	تلفات	تعداد کل/تلفات	Proportion (P)
۱	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
$۱۰^{-۱}$	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
$۱۰^{-۲}$	۱۲	۱۰	۱۰/۱۲	۰,۸۳
$۱۰^{-۳}$	۱۲	۱۱	۱۱/۱۲	۰,۹۱۶
$۱۰^{-۴}$	۱۲	۲	۲/۱۲	۰,۱۶
$۱۰^{-۵}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = -1-1\ (2.906-0.5) = -3.406$

$LD_{50} = 10^{3.4}$/ 0.01 ml = $10^{5.4}$ / ml

با توجه به میزان LD_{50}بدست آمده از دو جدول فوق برای ویروس فعال تیتر ویروس $10^{5.4}$ / ml گزارش گردید. ویروس سندرم لکه سفید ایزوله ایران که در این تحقیق تکثیر داده شد با کد WSSV/IRN/1/2010 گزارش گردید.

۸-۳- نتیجه تعیین تیتر نمونه های ویروسی پرتوتابی شده با دزهای متفاوت پرتو گاما

سریال رقتی از ۱ ، $۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۲}$ ، $۱۰^{-۳}$ ، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ ، $۱۰^{-۶}$ از سوسپانسیون ویروسی (همولنف حاوی ویروس WSSV) پرتوتابی شده در دزهای متفاوت توسط سیستم پرتو دهنده گاما MDS Nordion (دزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۵۰ کیلوگری) در بافر استریل TN تهیه و جهت تعیین تیتر ویروسی هر کدام مورد آزمایش روی گروههای میگو قرار گرفتند. نتایج تیتر ویروسهای پرتوتابی شده در جداول زیر آمده اند.

جدول۸: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی شده (دز ۱ کیلوگری گاما)

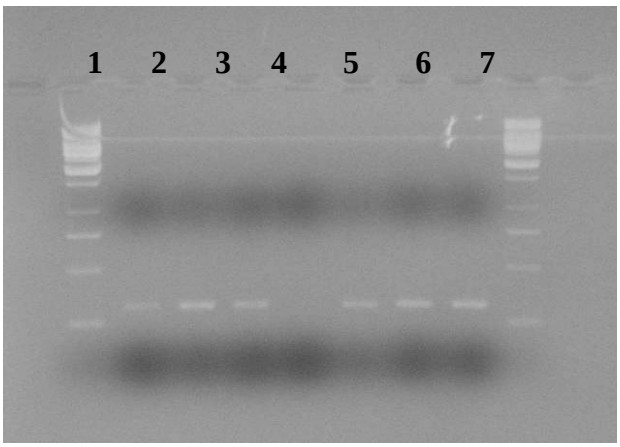
Proportion (P)	تعداد کل/تلفات	تلفات	تعداد کل	رقت
۱	۱۲/۱۲	۱۲	۱۲	۱
۱	۱۲/۱۲	۱۲	۱۲	$۱۰^{-۱}$
1	۱۲/۱۲	12	۱۲	$۱۰^{-۲}$
۰,۷۵	۹/۱۲	۹	۱۲	$۱۰^{-۳}$
۰,۰۸۳	۱/۱۲	۱	۱۲	$۱۰^{-۴}$
	۰/۱۲	۰	۱۲	$۱۰^{-۵}$

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = -2-1\ (1.833-0.5) = -3.33$

$LD_{50} = 10^{3.33}$/ 0.01 ml = $10^{5.33}$ / ml



شکل ۳۷: نتایج عکس ژل الکتروفورز آزمون PCR نمونه های تلفات میگو در دز یک کیلوگری پرتو گاما

لاینهای ۱ و ۹ DNA Ladder می باشند. لاین ۲ تلفات رقت $۱۰^{-۴}$, لاین ۳ رقت $۱۰^{-۳}$, لاین۴ رقت $۱۰^{-۲}$, لاین ۵ کنترل منفی, لاین ۶ رقت $۱۰^{-۱}$, لاین ۷ رقت ۱ و لاین ۸ کنترل مثبت می باشند.

جدول۹: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی شده (دز ۳ کیلوگری گاما)

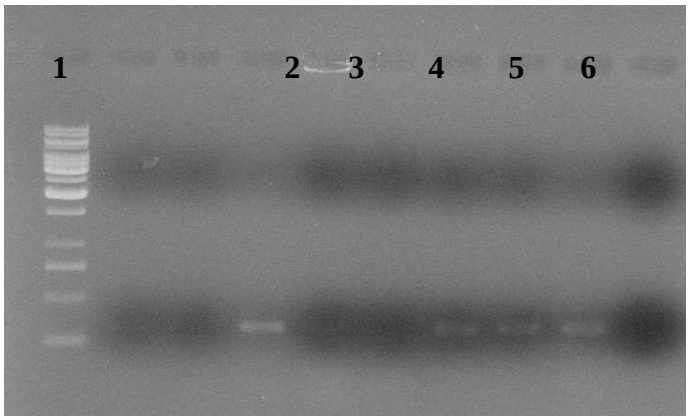
رقت	تعداد کل	تلفات	تعداد کل /تلفات	Proportion (P)
۱	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
$۱۰^{-۱}$	۱۲	۵	۵/۱۲	۰,۴۱۶
$۱۰^{-۲}$	۱۲	۸	۸/۱۲	۰,۶۶
$۱۰^{-۳}$	۱۲	۱	۱/۱۲	۰,۰۸۳

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp - 0.5) = 0\text{-}1\ (2.159\text{-}0.5) = -1.659$

$LD_{50} = 10^{1.66} / 0.01\ ml = 10^{3.66} / ml$



شکل ۳۸: نتایج عکس ژل الکتروفورز آزمون PCR نمونه های تلفات میگو در دز سه کیلوگری پرتو گاما

لاین ۱ DNA Ladder می باشند. لاین ۲ تلفات رقت ۱ , لاین ۳ کنترل منفی , لاین۴ رقت $۱۰^{-۴}$, لاین ۵ رقت $۱۰^{-۳}$, لاین ۶ رقت $۱۰^{-۲}$, لاین ۷ رقت $۱۰^{-۱}$ می باشند.

جدول۱۰: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی شده (دز ۵ کیلوگری گاما)

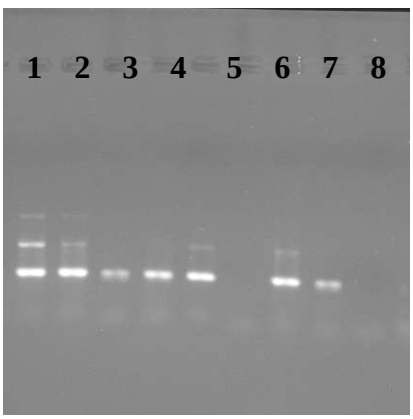
رقت	تعداد کل	تلفات	تعداد کل/تلفات	Proportion (P)
۱	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
$۱۰^{-۱}$	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
$۱۰^{-۲}$	۱۲	۱۱	۱۱/۱۲	۰,۹۱۶
$۱۰^{-۳}$	۱۲	۹	۹/۱۲	۰,۷۵
$۱۰^{-۴}$	۱۲	۱	۱/۱۲	۰,۰۸۳
$۱۰^{-۵}$	۱۲	۰	۰/۱۲	

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = 0\text{-}1(0.915\text{-}0.5) = -0.415$

$LD_{50} = 10^{0.415}$ / 0.01 ml = $10^{2.415}$ / ml



شکل ۳۹: نتایج عکس ژل الکتروفورز آزمون PCR نمونه های تلفات میگو در دز پنج کیلوگری پرتو گاما

لاین ۱کنترل سه مثبت, لاین ۲ تلفات رقت ۱ , لاین ۳ و ۸ رقت $۱۰^{-۴}$, لاین ۴ رقت $۱۰^{-۳}$, لاین ۵ رقت $۱۰^{-۲}$, لاین۶ کنترل منفی, لاین ۷ رقت $۱۰^{-۱}$ می باشند.

جدول۱۱: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی شده (دز ۱۰ کیلوگری گاما)

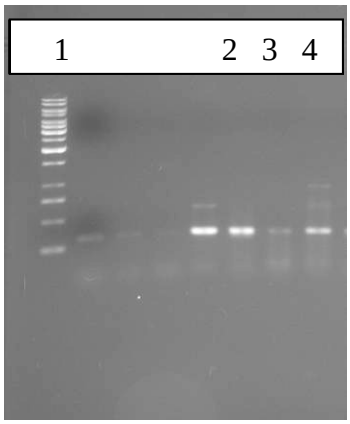
رقت	تعداد کل	تلفات	تعدادکل/تلفات	Proportion (P)
۱	۱۱	۱	۱/۱۱	۰,۰۹۰
$۱۰^{-۱}$	۱۱	۱	۱/۱۱	۰,۰۹۰
$۱۰^{-۲}$	۱۱	۱	۱/۱۱	۰,۰۹۰
$۱۰^{-۳}$	۱۱	۰	۰/۱۱	

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = -0\text{-}1\ (0.27\text{-}0.5) = 0.23$

$LD_{50} = 10^{-0.23} / 0.01\ ml = 10^{1.77} / ml$



شکل ٤٠: نتایج عکس ژل الکتروفورز آزمون PCR نمونه های تلفات میگو در دز ده کیلوگری پرتو گاما

لاین ۱ DNA Ladder, لاین ۲ تلفات رقت ۱ , لاین ۳ رقت $۱۰^{-۱}$, لاین ۴ رقت $۱۰^{-۲}$, لاین ۵ کنترل مثبت می باشند.

جدول۱۲: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی شده (دز ۲۰ کیلوگری گاما)

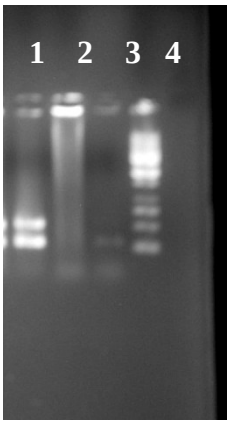
رقت	تعداد کل	تلفات	تعداد کل/تلفات	Proportion (P)
۱	۱۲	۱	۱/۱۲	۰,۰۸۳
$۱۰^{-۱}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰
$۱۰^{-۲}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰
$۱۰^{-۳}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = -0\text{-}1\ (0.083\text{-}0.5) = 0.417$

$LD_{50} = 10^{-0.417}$/ 0.01 ml = $10^{1.58}$ / ml



شکل ٤١: نتایج عکس ژل الکتروفورز آزمون PCR نمونه های تلفات میگو در دز بیست کیلوگری پرتو گاما

لاین ۱ کنترل مثبت, لاین ۲ کنترل منفی, لاین ۳ رقت ۱, لاین ۴ DNA Ladder

جدول۱۳: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی شده (دز ۲۵ ، ۳۰، ۳۵، ٤٠ و ٥٠کیلوگری گاما)

رقت	تعداد کل	تلفات	تعداد کل/تلفات	Proportion (P)
۱	۱۲	۱	۱/۱۲	۰,۰۸۳
$۱۰^{-۱}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰
$۱۰^{-۲}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰
$۱۰^{-۳}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = -0\text{-}1\ (0.083\text{-}0.5) = 0.417$

$LD_{50} = 10^{-0.417}$/ 0.01 ml = $10^{1.58}$ / ml

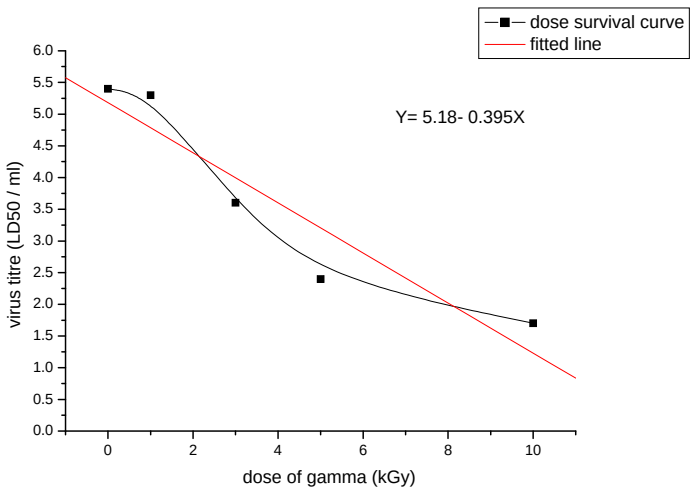
جدول ١٤: تیتر ویروس در دزهای مختلف پرتوتابی گاما

دز پرتوتابی گاما (kGy)	۰	۱	۳	۵	۱۰	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۵۰
تیتر ویروس (LD_{50} /ml)	$10^{5,4}$	$10^{5,3}$	$10^{3,6}$	$10^{2,4}$	$10^{1,7}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$

۹-۳- نتیجه تعیین دز بهینه پرتو گاما جهت غیرفعال سازی کامل ویروس سندرم لکه سفید

پس از تعیین تیتر ویروس های پرتوتابی شده در دزهای متفاوت پرتوگاما, منحنی دز/ پایندگی با استفاده از نرم افزار Origin ترسیم گردید و با توجه به معادله بهترین خط فیت شده بر نمودار فاکتور D_{10} Value محاسبه می شود (شکل ۴۵).

تعریف فاکتور D_{10} Value : دزی از پرتو یونساز (گاما یا الکترون) که بتواند جمعیت ویروسی را یک سیکل لگاریتمی کاهش دهد.



شکل٤٥: منحنی دز/پایندگی مربوط به کاهش تیتر ویروس با افزایش دز پرتوتابی گاما

منحنی دز /پایندگی به صورت نیمه لگاریتمی بر اساس تیتر ویروسی نسبت به دز پرتوتابی با استفاده از نرم افزار Origin ترسیم می گردد و پس از فیت نمودن خط مناسب بر این نمودار با استفاده از معادله خط فاکتور D_{10} value را محاسبه گردید.

Y= 5.18- 0.39X
5= 5.18- 0.39X , X= 0.46 kGy
2= 5.18- 0.39 x , X= 8.15
8.15- 0.46= 7.69 , 7.69÷3= **2.563 kGy D_{10} value**

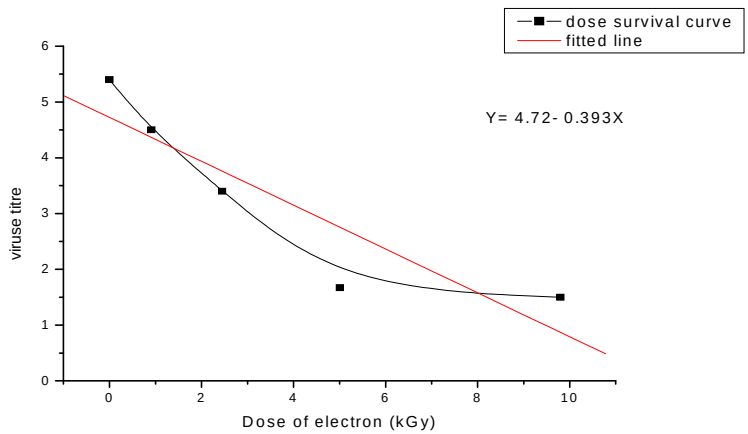
2.563 × 5.4 =**13.84 kGy optimum Dose**

با توجه به دز اپتیمم بدست آمده , بهتر می باشد دز ۱۴– ۱۵ کیلوگری را برای پرتوتابی گاما به منظور غیر فعال سازی کامل ویروس در نظر گرفت.

۱۰-۳- نتیجه تعیین دز بهینه الکترون جهت غیرفعال سازی کامل ویروس سندرم لکه سفید

پس از تعیین تیتر ویروس های پرتوتابی شده در دزهای متفاوت الکترون, منحنی دز/ پایندگی با استفاده از نرم افزار Origin ترسیم گردید و با توجه به معادله بهترین خط فیت شده بر نمودار فاکتور D_{10} Value محاسبه می شود (شکل ۴۶).

تعریف فاکتور D_{10} Value : دزی از پرتو یونساز (گاما یا الکترون) که بتواند جمعیت ویروسی را یک سیکل لگاریتمی کاهش دهد.



شکل٤٦: منحنی دز/پایندگی مربوط به کاهش تیتر ویروس با افزایش دز پرتوتابی الکترون

Y= 4.72- 0.393 X

5= 4.72- 0.393 X , X= 0.71
2= 4.72- 0.393 X , X= 6.92
6.92- 0.71=6.21 ÷**3=2.07 kGy D_{10} value**
2.07 × 5.4 = **11.18 kGy , Optimum dose**

با توجه به دز اپتیمم بدست آمده , بهتر می باشد دز۱۳– ۱۲ کیلوگری را برای پرتوتابی الکترون به منظور غیر فعال سازی کامل ویروس در نظر گرفت.

۱۱-۳- پرتوتابی نمونه ها با دز بهینه

به منظور پرتوتابی نمونه ها با دز مطلوب لازم بود ابتدا حداقل ۱۰۰ خرچنگ سالم طبق دستورالعملهای قبلی با استوک ویروسی تلقیح گردند و پس از تکثیر ویروس در بدن خرچنگ همولنف آنها جمع اوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این همولنفها در ویالهای به حجم ۱۰ میلی لیتر تقسیم گردیدند و برای پرتوتابی گاما و الکترون ارسال شدند.

پرتوتابی گاما برای ۱۰ ویال حاوی ویروس لکه سفید که قبلاً تیتر آن تعیین شده بود (در گزارش تیتراسیون) در دز ۱۵ کیلوگری در حالت انجماد توسط همکاران پژوهشکده کاربرد پرتوها انجام گردید.

پرتوتابی الکترون نیز در دز ۱۳ کیلوگری در مرکز یزد به حالت منجمد نیز بر روی ۱۰ ویال ویروسی انجام شد.

ویروسهای پرتوتابی شده جهت تعیین غیر فعال سازی کامل ویروس به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شده و در آنجا بر روی گروههای میگو مورد آزمایش قرار گرفتند.

۱۲-۳- نتیجه غیرفعال سازی ویروس با فرمالین

سوسپانسیون ویروسی (همولنف حاوی ویروس) با استفاده از فرمالین به میزان 0.5 V/V% غیرفعال سازی شده و رقتهای ۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰ در بافر TN تهیه و به گروههای ۱۴ تایی پست لارو میگو تزریق گردید و روزانه دو بار از نظر تعداد تلفات شمارش صورت گرفت.

جدول ۲۱: تلفات گروههای ویروس غیرفعال شده با فرمالین

رقت	تعداد کل	تلفات	تعداد کل/تلفات	Proportion (P)
۱	۱۲	۰	۰/۱۲	۰
$۱۰^{-۱}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰
$۱۰^{-۲}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰
$۱۰^{-۳}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰

با توجه به نتایج جدول تلفات فوق از انجائیکه در هیچ کدام از رقتهای ویروس فرمالینه تلفات دیده نشد لذا ویروس تیمارشده با فرمالین کاملاً غیرفعال سازی شده است.

با توجه به نتایج جدول تلفات فوق ویروس تیمارشده با فرمالین کاملاً غیرفعال سازی شده است.

Karber Formula:

$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = -\ 0\text{-}1(0.0\text{-}0.5) = -0.5$

$\mathbf{LD_{50} = 10^{-0.5} / 0.01\ ml = 10^{1.5} / ml}$

۱۳-۳- نتیجه تائید سوش باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس و تعیین واحد تشکیل دهنده کلنی آن

سوش باکتری دریافت شده از دانشگاه تهران توسط برخی تستهای بیوشیمیایی تائید گردی که شامل:

سوکروز –، اکسیداز +، حرکت +، گلوکز +، تشکیل گاز از گلوکز –،لاکتوز –،هیدروژن سولفید –، لیزین دکربوکسیلاز +، اندول +، بتاگالاکتوزیداز +

سپس باکتری مذکور روی محیط TCBS (Tiosulfat Citrate Bile Salt) کشت سطحی داده شد که کلنیهای ریز ۲-۳ میلی متری به رنگ سبز و محدب رشد نمود.

برای تعیین واحد تشکیل دهنده کلنی باکتری رقتهای متفاوت باکتری کشت داده شده که نتایج در جدول زیر آمده است.

جدول ۲۲: شمارش تعداد باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس در رقتهای متفاوت و میانگین آنها

رقت / باکتری / تکرار	$۱۰^{-۱}$	$۱۰^{-۲}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-٤}$	$۱۰^{-٥}$	$۱۰^{-٦}$	$۱۰^{-۷}$	$۱۰^{-۸}$	$۱۰^{-۹}$
۱	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	۷۰۰	۲۰	۳۲	۱
۲	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	۱۰۵	۶	۱
۳	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	۷۰۰	۱۸۰	۳۰	۱۲
میانگین تعداد باکتری ویبریو در هر میلی لیتر	-	-	-	-	-	۷×۱۰^{۸}	$۱۰,۲\times ۱۰^{۸}$	$۲,۳\times ۱۰^{۹}$	$۴,۶\times ۱۰^{۹}$

برای محاسبه میانگین در مورد هر یک از رقتهای جدول ۱ تعداد شمارش شده در سه تکرار آزمایش با همدیگر جمع شده و بر ۳ تقسیم گردیده و در عکس ضریب رقت مربوطه ضرب می‌گردند. مثلاً در مورد رقت $۱۰^{-۸}$:

$\mathbf{32+6+30=68\ ,\ 68/3= 22.6 \times 10^8 = 2.26 \times 10^8 = 2.3 \times 10^8}$

برای محاسبه CFU میانگینهای محاسبه شده در مورد هر رقت را با هم جمع نموده و بر تعدادشان تقسیم می نماییم.

$۷\times ۱۰^{۸} + ۱۰,۲\times ۱۰^{۸} + ۲,۳\times ۱۰^{۹} + ۴,۶\times ۱۰^{۹} = ۸,۶۲\times ۱۰^{۹}$

$(8.62 \times 10^{9}) \div 4 = 2.155 \times 10^{9}$

در نتیجه Colony Forming Unit (CFU) باکتری فوق $۲,۱۵۵\times ۱۰^{۹}$ بدست آمد.

۱٤-۳- نتیجه غیرفعال سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس

نتیجه غیرفعال سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس به روش محلول

جدول ۲۳: نتایج میانگین های شمارش باکتریهای پرتوتابی شده با دزهای مختلف در حالت محلول

دز پرتوتابی kGy / تکرار میانگینها	۰,۵	۱	۱,۵	۲	۲,۵	۳	۳,۵	٤
۱	$۳,۳\times ۱۰^{۱۰}$	$۱,۸\times ۱۰^{۹}$	$۱,۲۳\times ۱۰^{۸}$	۷×۱۰^{۶}	$۲,۷۳\times ۱۰^{۴}$	$۲,۵\times ۱۰^{۳}$	۰×۱۰^{۱}	۰×۱۰^{۱}
۲	$۲,۳\times ۱۰^{۱۰}$	$۰,۸\times ۱۰^{۹}$	$۱,۱۳\times ۱۰^{۸}$	۹×۱۰^{۶}	$۲,۴۸\times ۱۰^{۴}$	$۳,۱\times ۱۰^{۳}$	۰×۱۰^{۱}	۰×۱۰^{۱}
۳	$۲,۵\times ۱۰^{۱۰}$	$۰,۷\times ۱۰^{۹}$	$۰,۷۳\times ۱۰^{۸}$	$۹,۵\times ۱۰^{۶}$	$۲,۳۸\times ۱۰^{۴}$	$۲,۸\times ۱۰^{۳}$	۰×۱۰^{۱}	۰×۱۰^{۱}
میانگین میانگینها	$۲,۷\times ۱۰^{۱۰}$	$۱,۱\times ۱۰^{۹}$	$۱,۰۳\times ۱۰^{۸}$	$۸,۵\times ۱۰^{۶}$	$۲,۵۳\times ۱۰^{۴}$	$۲,۸\times ۱۰^{۳}$	۰×۱۰^{۱}	۰×۱۰

در نتیجه دز غیرفعال سازی باکتری در حالت محلول با پرتو گاما ۳,۵ کیلوگری می باشد.

نتیجه غیرفعال سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس به روش لیوفیلیزه:

جدول ۲٤: نتایج رشد باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده با دزهای مختلف در حالت لیوفیلیزه

دز پرتوتابی kGy / تکرار میانگینها	۰	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
۱	+۴	+۴	+۳	+۳	+۳	+۲	+۱	+۱	-
۲	+۴	+۴	+۳	+۳	+۳	+۲	+۱	+۱	-
۳	+۴	+۴	+۳	+۳	+۳	+۲	+۱	+۱	-

با توجه به نتایج جدول فوق بهترین دز غیرفعال سازی کامل باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس در حالت لیوفیلیزه ۸ کیلوگری بدست آمد.

۱۵-۳- نتیجه تائید غیرفعال سازی ویروس با پرتوهای گاما, الکترون و فرمالین

پس از غیرفعال سازی ویروس با پرتوتابی گاما, الکترون و فرمالین , واکسنهای غیرفعال شده در حالت منجمد به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شده و به گروههای میگو تلقیح گردیدند. میزان تزریق هر واکسن به هر میگو ۳۰ میکرولیتر بود. و میزان ایمیونوژن (B 1-3 Glucan) اضافه شده به غذای گروههای میگو که واکسینه شده با ایمیونوژن بودند نیز ۱/۵٪ بود.

باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس نیز که با پرتوتابی گاما غیرفعال شده بود به عنوان یک محرک ایمنی مورد استفاده قرار گرفت. باکتری اولیه با تیتر 10^{9} CFU/ml که به صورت لیوفیلیزه در آمده و با استفاده از روش پرتوتابی گاما غیرفعال شده بود در ۱۰۰ سی سی بافر فسفات استریل حل شده و به نسبت ۱:۱ با سوسپانسیون واکسن غیرفعال شده مخلوط گردیده و به هر میگو به میزان ۶۰ میکرولیتر تزریق شد.

جدول۲۵ : تلفات گروههای میگو تزریق شده با واکسنهای غیرفعال سازی شده با پرتو گاما و الکترون و فرمالین, و گروههای کنترل بافر و کنترل منفی در مدت دو هفته پس از تزریق دز اول واکسنها

گروههای واکسن / روزهای پس از تزریق	کنترل منفی	کنترل بافر	FWI	FI	EB	EWI	EI	GB	GWI	GI
روز اول	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز دوم	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز سوم	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز چهارم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز پنجم	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰
روز ششم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز هفتم	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز هشتم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰
روز نهم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز دهم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز یازدهم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز دوازدهم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز سیزدهم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
روز چهاردهم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

GI: Gamma-Immunogen, GWI: Gamma- without Immunogen, GB: Gamma-Bacteria, EI: Electron-Immunogen, EWI: Electron- without Immunogen, EB: Electron- Bacteria, FI: Formalin- Immunogen, FWI: Formalin- without Immunogen

با توجه به نتایج فوق و از آنجائیکه تلفات ثبت شده در جدول ۱۵ از نظر وجود ویروس لکه سفید در آزمون PCR منفی بودند لذا نتیجه گیری می شود که غیرفعال سازی واکسنها با پرتوهای گاما و الکترون وفرمالین کاملاً

تائید می گردد. ولی همانطور که مشاهده می شود در گروهای واکسن فرمالینه بعلت اثر ات سمی فرمالین میزان تلفات بیشتر بوده است.

همچنین مطابق با گروههای جدول بالا گروههای میگو تحت تیمار با همین واکسنها ولی به روش حمامی قرار گرفتند که در طی مدت ۴۰ روز مورد بازرسی قرار گرفت و هیچ تلفاتی در هیچ کدام از گروههای حمامی دیده نشد. لذا غیرفعال سازی ویروس مجدداً نیز مورد تایید قرار گرفت.

الف

ب **ج**

شکل ٤٧: الف) گروههای میگو برای بررسی غیر فعال سازی ویروس لکه سفید, ب) روش تلقیح ویروس غیرفعال شده به طریق حمامی ج) روش تلقیح ویروس غیرفعال شده به طریق تزریقی

١٦-٣- نتیجه آزمون مواجهه اول

نتیجه مواجهه گروههای میگو واکسینه شده با واکسن غیرفعال گاما به روش تزریقی

همانطور که ذکر گردید واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما در بافر TN استریل رقیق شده (رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸) و به گروههای میگو تزریق شده و دو هفته پس از تزریق آخرین دز واکسن مواجهه با ا $10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl ویروس فعال انجام گردید. که نتایج آن در جدول زیر مشاهده شده است.

جدول ۲۶ : نتایج تلفات بعد از مواجهه با $10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl ویروس فعال در گروههای میگو واکسینه شده با رقتهای واکسن غیرفعال شده با گاما

رقتهای واکسن / روزهای پس از مواجهه	واکسن گاما بدون ایمیونوژن				واکسن گاما با ایمیونوژن				واکسن گاما با باکتری غیرفعال شده			
	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸
روز اول												
روز دوم												
روز سوم												
روز چهارم												
روز پنجم												
روز ششم												
روز هفتم								+۱				
روز هشتم			+۱	+۱				+۱				
روز نهم			+۱	+۱								+۱
روز دهم				+۱							+۱	+۱
روز یازدهم												
روز دوازدهم												
روز سیزدهم												
روز چهاردهم												

با توجه به نتایج جدول فوق دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) برای واکسن غیرفعال شده با پرتوگاما بدون ایمیونوژن، با ایمیونوژن و با باکتری غیرفعال شده به روش Reed and Muench method به ترتیب ۵,۶۱ ، ۸,۸۷ و ۸,۰۵ محاسبه گردید(Reed & Muench, 1938)).

Table 27 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Gamma-irradiation without Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	15	0
1/2	0	5	0	10	0
1/4	2	3	2	5	28.5
1/8	3	2	5	2	71.4

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-28.5)/ (71.4-28.5) =21.5/43.2= 0.497
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.6+ (0.497 × 0.3) = 0.749
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.7495=5.61

Table 28 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Gamma-irradiation with Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	18	0
1/2	0	5	0	13	0
1/4	0	5	0	8	0
1/8	2	3	2	3	40
1/16	5	0	7	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-40)/ (100-40) = 10/60= 0.16
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.9+ (0.16 × 0.3) = 0.948
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.948= 8.87

Table 29 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Gamma-irradiation with inactivated Vibrio

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	19	0
1/2	0	5	0	14	0
1/4	0	5	0	9	0
1/8	1	4	1	4	20
1/16	5	0	6	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-20)/ (100-20) = 40/80= 0.2
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.9+ (0.2 × 0.3) = 0.906
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.948= 8.05

۱-۱۶-۳- نتیجه مواجهه گروههای میگو واکسینه شده با واکسن غیرفعال با الکترون به روش تزریقی

همانطور که ذکر گردید واکسن غیرفعال شده با الکترون در بافر TN استریل رقیق شده (رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸) و به گروههای میگو تزریق شده که نتایج آن در جدول زیر مشاهده شده است.

جدول۳۰ : نتایج تلفات بعد از مواجهه با $10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl ویروس فعال در گروههای میگو واکسینه شده با رقتهای واکسن غیرفعال شده با الکترون

رقتهای واکسن / روزهای پس از واکسیناسیون	واکسن الکترون بدون ایمیونوژن				واکسن الکترون با ایمیونوژن				واکسن الکترون با باکتری غیرفعال شده			
	۱	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱	۱/۲	۱/۴	۱/۸
روز اول												
روز دوم												
روز سوم												
روز چهارم												
روز پنجم												
روز ششم											+۱	+۱
روز هفتم											+۱	+۱
روز هشتم												+۱
روز نهم			+۱	+۱								
روز دهم			+۱	+۱			+۱					
روز یازدهم				+۱				+۱				
روز دوازدهم								+۱				
روز سیزدهم												
روز چهاردهم												

با توجه به نتایج جدول فوق و جداول زیر دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) برای واکسن غیرفعال شده با الکترون بدون ایمیونوژن، با ایمیونوژن و با باکتری غیرفعال شده به روش **Reed and Muench method** به ترتیب 5.62 ، 6.02 و 6.30 محاسبه گردید.

Table 31 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Electron without Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	۱۵	0
1/2	0	5	0	۱۰	0
1/4	2	3	2	5	28.57
1/8	3	2	۵	2	71.42

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)

Pd= (50-۲۸,۵۷)/ (۷۱,۴۲-28.57) = 21.43/42.85= 0.5

(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.6+ (0.5 × 0.3) = 0.75
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.75=5.62

Table 32: Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Electron with Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	18	0
1/2	0	5	0	13	0
1/4	1	4	1	8	12.5
1/8	2	3	3	4	75
1/16	4	1	7	1	87.5

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-12.5)/ (75-12.5) = 37.5/62.5= o.6
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.6+ (0.6 × 0.3) = 0.78
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.78=6.02

Table 33 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Electron with inactivated Vibrio

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	16	0
1/2	0	5	0	11	0
1/4	1	4	1	6	14.28
1/8	3	2	4	2	66.66

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-14.28/ (66.66- 14.28) = 35.72/52.38= 0.682
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.6+ (0.682 × 0.3) = 0.8
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.8= 6.30

۲-۱۶-۳- نتیجه مواجهه گروههای میگو واکسینه شده با واکسن فرمالینه به روش تزریقی

همانطور که ذکر گردید واکسن غیرفعال شده با فرمالین در بافر TN استریل رقیق شده (رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸) و به گروههای میگو شش تائی تزریق شده که نتایج آن در جدول زیر مشاهده شده است.

جدول ۳٤ : نتایج تلفات بعد از چلنج با $10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl ویروس فعال در گروههای میگو واکسینه شده با رقتهای واکسن غیرفعال شده با فرمالین

رقتهای واکسن / روزهای پس از واکسیناسیون	واکسن فرمالینه بدون ایمیونوژن				واکسن فرمالینه با ایمیونوژن			
	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸
روز اول								
روز دوم								
روز سوم								
روز چهارم								
روز پنجم								
روز ششم								
روز هفتم								
روز هشتم			+۱					
روز نهم				+۱				+۱
روز دهم							+۱	
روز یازدهم				+۱				
روز دوازدهم				+۱				+۱
روز سیزدهم								
روز چهاردهم								

با توجه به نتایج جدول فوق دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) برای واکسن غیرفعال شده با فرمالین بدون ایمیونوژن، با ایمیونوژن و با باکتری غیرفعال شده به روش **Reed and Muench method** به ترتیب ۶,۳۰ و ۶,۰۲ محاسبه گردید.

Table 35: Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by formalin without Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	16	0
1/2	0	5	0	11	0
1/4	1	4	1	6	16.66
1/8	3	2	4	2	66.66

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-16.66)/ (66.66-16.66) =33.34/ 50= 0.6668
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.6+ (0.6668 × 0.3) = 0.8000
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.8000=6.30

Table 36 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by formalin with Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	0	5	0	18	0
1/2	0	5	0	13	0
1/4	1	4	1	8	12.5
1/8	2	3	3	4	75
1/16	4	1	7	1	87.5

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-12.5)/ (۷۵-12.5) = 37.5/۶۲,۵= 0.۶

(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.6+ (0. ۶× 0.3) = 0.۷۸

PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.۷۸=۶,۰۲

۳-۱۶-۳- نتیجه گیری از دز حفاظتی ۵۰٪ حاصل از آزمون مواجهه اول

- با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما ، الکترون و فرمالین می توان نتیجه گرفت که هر سه نوع واکسن در مقابل ویروس فعال تیتر / 102.4 LD50 50 µl اثر حفاظتی خوبی دارند.
- با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون اثر حفاظتی این رادیو واکسن وقتی به غذای گروههای میگو ماده ایمیونوژن اضافه گردد و همچنین وقتی از باکتری ویبریو غیرفعال شده به عنوان یک محرک ایمنی همزمان با تزریق رادیو واکسن استفاده شده، بیشتر از وقتی است که رادیوواکسن بدون ایمیونوژن و بدون باکتری غیرفعال مورد استفاده قرار گیرد.

- با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون، می توان گفت که هر دو واکسن اثر حفاظتی خوبی از خود نشان داده اند ولی در مورد رادیوواکسن غیرفعال شده با پرتو گاما این اثر حفاظتی بیشتر از رادیوواکسن الکترون می باشد.
- با توجه به نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد واکسن غیرفعال شده با فرمالین، اثر حفاظتی این واکسن وقتی به غذای گروههای میگو ماده ایمیونوژن اضافه گردد و واکسن بدون ایمیونوژن تقریباً مشابه است.
- به طور کلی رادیوواکسن غیرفعال شده با گاما اثر حفاظتی بهتری از رادیوواکسن غیرفعال شده با الکترون و واکسن غیرفعال با فرمالین نشان داده است. ولی با این وجود رادیوواکسن الکترون و واکسن فرمالینه نیز اثر حفاظتی خوبی نشان داده اند.

۱۷-۳- نتیجه آزمون مواجهه دوم

۱-۱۷-۳- نتیجه مواجهه گروههای میگو واکسینه شده با واکسن غیرفعال گاما به روش تزریقی

همانطور که ذکر گردید واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما در بافر TN استریل رقیق شده (رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸) و به گروههای میگو تزریق شد، و چهار هفته پس از آخرین دز واکسن چلنج با 10^4 $LD_{50}/\mu l$ ویروس فعال انجام گردید.که نتایج آن در جدول زیر مشاهده شده است.

جدول ۳۷: نتایج تلفات بعد از مواجهه با $10^{5.4}$ LD_{50}/ml ویروس فعال در گروههای میگو واکسینه شده با رقتهای واکسن غیرفعال شده با گاما

رقتهای واکسن / روزهای پس از واکسیناسیون	واکسن گاما بدون ایمیونوژن				واکسن گاما با ایمیونوژن				واکسن گاما با باکتری غیرفعال شده			
	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸
روز اول												
روز دوم												
روز سوم		1										
روز چهارم		1	1		1		1		1			
روز پنجم	1		1	1			1	1	1	1	1	
روز ششم				1		1	1			1	1	1
روز هفتم		1		1				1		1	1	1
روز هشتم			1	1			1	1			1	1
روز نهم			1	1			1	1	1			
روز دهم			1					1	1	1	1	
روز یازدهم												
روز دوازدهم												1
روز سیزدهم												1
روز چهاردهم												

با توجه به نتایج جدول فوق دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) برای واکسن غیرفعال شده با پرتوگاما بدون ایمیونوژن، با ایمیونوژن و با باکتری غیرفعال شده به روش **Reed and Muench method** به ترتیب **۱,۶** ، **۲,۳۷** و **۱,۱۲** محاسبه گردید.

Table38 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Gamma-irradiation without Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	1	4	1	6	14.28
1/2	3	2	4	2	66.66
1/4	5	0	9	0	100
1/8	5	0	14	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-14.28)/ (66.66-14.28) =35.72/52.38= 0.68
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0+ (0.68 × 0.3) = 0.204
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.204= 1.6

Table 39: Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Gamma-irradiation with Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	1	4	1	8	5.26
1/2	1	4	2	4	33.33
1/4	5	0	7	0	100
1/8	5	0	12	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-33.33)/ (100-33.33) = 16.67/66.67= 0.250

(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0.3+ (0.25 × 0.3) = 0.375
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.375= 2.37

Table40 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Gamma-irradiation with inactivated Vibrio

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	2	3	2	3	40
1/2	5	0	7	0	100
1/4	5	0	12	0	100
1/8	5	0	17	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-40)/ (100-40) = 10/60= 0.16
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0+ (0.16 × 0.3) = 0.05
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.05= 1.12

۲-۱۷-۳- نتیجه مواجهه گروههای میگو واکسینه شده با واکسن غیرفعال الکترون به روش تزریقی

همانطور که ذکر گردید واکسن غیرفعال شده با الکترون در بافر TN استریل رقیق شده (رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸) و به گروههای میگو شش تائی تزریق شده که نتایج آن در جدول زیر مشاهده شده است.

جدول ٤١: نتایج تلفات بعد از مواجهه با $10^{5.4}$ LD_{50}/ml ویروس فعال در گروههای میگو واکسینه شده با رقتهای واکسن غیرفعال شده با الکترون

رقتهای واکسن / روزهای پس از واکسیناسیون	واکسن الکترون بدون ایمیونوژن				واکسن الکترون با ایمیونوژن				واکسن الکترون با باکتری غیرفعال شده			
	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸
روز اول												
روز دوم												
روز سوم												
روز چهارم												
روز پنجم					۱							
روز ششم	۱	۲	۱			۱						
روز هفتم	۲	۲	۲	۱		۱	۱	۱		۱	۲	۱
روز هشتم		۱	۱	۱	۱	۲	۲	۱				۲
روز نهم			۱	۲			۲	۲	۱	۲	۱	۲
روز دهم								۱		۱	۲	
روز یازدهم				۱	۱							
روز دوازدهم						۱						
روز سیزدهم												
روز چهاردهم												

با توجه به نتایج جدول فوق، دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) برای واکسن غیرفعال شده با الکترون بدون ایمیونوژن، با ایمیونوژن و با باکتری غیرفعال شده به ترتیب ۱,۷۷، ۱,۲۴ و ۱,۳۴ محاسبه شد.

Table 42 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Electron without Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	3	2	3	2	60
1/2	5	0	8	0	100
1/4	5	0	13	0	100
1/8	5	0	18	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-0)/ (60 -0) = 0.833
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0+ (0.833 × 0.3) = 0.249=0.25
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.25= 1.77

Table 43: Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Electron with Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	2	3	2	4	33.33
1/2	4	1	6	1	85.71
1/4	5	0	11	0	100
1/8	5	0	16	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-33.33)/ (85.71- 33.33) = 16.67/ 52.38= 0.318
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0+ (0.318 × 0.3) = 0.095
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.095= 1.244

Table 44 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by Electron with inactivated Vibrio

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	1	4	1	4	25
1/2	4	1	5	1	83.33
1/4	5	0	10	0	100
1/8	5	0	15	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-25)/ (83.33-25) = 25/ 58.33= 0.428
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0 + (0.428× 0.3) = 0.128
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.128= 1.34

۲-۱۷-۳- نتیجه مواجهه گروههای میگو واکسینه شده با واکسن فرمالینه به روش تزریقی

همانطور که ذکر گردید واکسن غیرفعال شده با فرمالین در بافر TN استریل رقیق شده (رقتهای ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸) و به گروههای میگو شش تائی تزریق شده که نتایج آن در جدول زیر مشاهده شده است.

جدول٤٥ : نتایج تلفات بعد از چلنج با $10^{5.4}$ LD_{50}/ml ویروس فعال در گروههای میگو واکسینه شده با رقتهای واکسن غیرفعال شده با فرمالین

رقتهای واکسن / روزهای پس از واکسیناسیون	واکسن فرمالینه بدون ایمیونوژن				واکسن فرمالینه با ایمیونوژن			
	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸
روز اول								
روز دوم								
روز سوم								
روز چهارم			۱					
روز پنجم		۱						
روز ششم	۱	۲	۲					۱
روز هفتم				۲		۱	۱	
روز هشتم		۱	۲	۱	۱	۲		۲
روز نهم				۲		۲	۱	۲
روز دهم							۲	
روز یازدهم							۱	
روز دوازدهم								
روز سیزدهم								
روز چهاردهم								

با توجه به نتایج جدول فوق دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) برای واکسن غیرفعال شده با فرمالین بدون ایمیونوژن و با ایمیونوژن به ترتیب ۱,۴۱ و ۱,۵۹ گزارش گردید.

Table 46: Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by formalin without Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	1	4	1	5	16.66
1/2	4	1	5	1	83.33
1/4	5	0	10	0	100
1/8	5	0	15	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-16.66)/ (83.33-16.66) =33.34/ 66.67= 0.50
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0 + (0.50 × 0.3) = 0.15
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.15 = 1.41

Table 47 : Calculation of PD50% by Reed and Muench method for the inactivated WSSV-Vaccine by formalin with Immunogen.

Dilution	Dead	Alive	Cumulative No		% mortality
			Dead	Alive	
1/1	1	4	1	6	14.28
1/2	3	2	4	2	66.66
1/4	5	0	9	0	100
1/8	5	0	14	0	100

Proportion distance = (%50-%more dilution next below) / (%more dilution next abo-%more next below)
Pd= (50-14.28)/ (66.66- 14.28) = 35.72/ 52.38= 0.682
(Log dilution below 50%) + (Pd × log dilution factor) =0 + (0.682 × 0.3) = 0.204
PD50% for Radio-Vaccine=antilog 0.204= 1.59

٤-١٧-٣- نتیجه گیری از آزمون مواجهه دوم:

با توجه به نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ بدست آمده از آزمون مواجهه دوم می توان گفت که واکسنهای غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون و فرمالین در مقابل ویروس فعال با تیتر 10^4 $LD_{50}/\mu l$ اثر حفاظتی خوبی ندارند.

۱۸-۳- تعیین درصد تلفات و درصد نسبی بقا در گروههای میگو واکسینه شده به روش تزریقی

با توجه به درصد تلفات بعد از آزمون مواجهه اول در هر گروه میگو واکسینه شده می توان درصد بقا نسبی را در هر گروه تعیین کرد.

درصد بقا نسبی (Relative Perecent Survival) = (درصد تلفات هر گروه × ۱۰۰) ÷ درصد تلفات گروه کنترل

جدول : مقاومت علیه عفونت WSSV در میگو با استفاده از رادیوواکسن گاما، الکترون و واکسن فرمالینه، بدون ایمیونوژن، با ایمیونوژن و باباکتری ویبریو غیرفعال شده بعد از آزمون چلنج اول

گروههای واکسینه		Dead/Tested	Mortality %	RPS%	P- Value
رادیوواکسن گاما	گاما- بدون ایمیونوژن	5/24	20.83	72.22	<0.05
	گاما- ایمیونوژن	2/24	8.33	85.72	<0.05
	گاما- باکتری	3/24	12.5	78.57	<0.05
رادیوواکسن الکترون	الکترون- بدون ایمیونوژن	5/24	20.83	72.22	<0.05
	الکترون- ایمیونوژن	3/24	12.5	78.57	<0.05
	الکترون-باکتری	5/24	20.83	64.29	<0.05
واکسن فرمالینه	فرمالین- بدون ایمیونوژن	4/24	16.66	78.57	<0.05
	فرمالین- ایمیونوژن	3/24	12.5	71.43	<0.05
کنترل ویروس		9/12	75		
کنترل باکتری		7/12	58.33		
کنترل ایمیونوژن		7/12	58.33		

۱۹-۳- تعیین درصد تلفات و درصد نسبی بقا در گروههای میگو واکسینه شده به روش حمامی

جدول : مقاومت علیه عفونت WSSV در میگو با استفاده از رادیوواکسن گاما و الکترون بدون ایمیونوژن، با ایمیونوژن و با باکتری ویبریو غیرفعال شده بعد از آزمون مواجهه

گروههای واکسینه		Dead/Tested	Mortality %	RPS%	P- Value
رادیوواکسن گاما	گاما- بدون ایمیونوژن	3/10	30	62.5	<0.05
	گاما- ایمیونوژن	2/10	20	66.66	<0.05
	گاما- باکتری	1/10	10	85.71	<0.05
رادیوواکسن الکترون	الکترون- بدون ایمیونوژن	2/10	20	75	<0.05
	الکترون- ایمیونوژن	1/10	10	83.33	<0.05
	الکترون-باکتری	1/10	10	85.71	<0.05
کنترل ویروس –به روش حمامی		8/10	80		
کنترل باکتری - به روش حمامی		7/10	70		
کنترل ایمیونوژن –به روش خوراکی		6/10	60		

٤- بحث و نتیجه گیری

از سال ۱۹۹۳ صنعت پرورش میگو در آسیا در اثر این بیماری دچار خسارات فراوانی گردید است همچنین در طی سالهای ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۹ نیز در آمریکا بیماری ویروسی لکه سفیدی میگو شیوع یافته است. در ایران نیز در استان خوزستان در سال ۱۳۸۱ در اثر این بیماری ۳۷ مزرعه پرورش میگو از ۵۰ مزرعه بیست هکتاری واقع در سایت چوئبده آبادان که در سالهای قبل فعال بودند ، بهمراه ۶۵ میلیون پست لارو (post larvae) نابود گردیدند. در استان بوشهر نیز در سال ۱۳۸۴، ۱۷۰۰ هکتار زیر کشت میگو رفت که همه بجز ۱۰۰ هکتار در اثر این بیماری نابود شدند. این در حالی بود که در سال قبل از آن ۵۰۰۰ تن میگو برداشت شده بود . ولی در سال ۱۳۸۴ فقط ۴۰۰ تن میگو برداشت شد، همچنین حدود ۱۴ هزار نفر بیکار شدند.

همچنین طبق گزارشات موسسه شیلات ایران میزان صادرات میگو از سال ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۴ از ۳۲۸۴۳ هزار دلار به ۷۲۵۴ هزار دلار کاهش یافت که عمدتا بعلت این بیماری بوده است و چیزی بیش از ۴/۵ برابر کاهش می باشد.

در سال ۱۹۹۳ میلادی نیز در چین یک میلیارد دلار خسارت اقتصادی ناشی از این بیماری ایجاد شد. در سال ۱۹۹۴ در تایلند ۵۰۰ میلیون دلار خسارت وارد شد. در سال ۱۹۹۹ هفت کشور آمریکای لاتین شامل هندوراس- نیکاراگونه- اکوادور – پاناما – آمریکا – کلمبیا و گواتمالا آسیب جدّی دیدند. لذا امروزه کنترل بیماری لکه سفیدی میگو از مهمترین اولویتهای صنعت پرورش میگو در جهان می‌باشد. با توجه به اینکه نتیجه این طرح تهیه واکسن غیر فعال بیماری مذکور می باشد لذا می‌تواند در پیشگیری از بیماری فوق بسیار موثر باشد.

اصلی‌ترین راه کنترل این بیماری رعایت امنیت زیستی و استفاده از محرکهای ایمنی می باشد و همچنین یکی دیگر از راههای کنترل آن نیز واکسیناسیون مزارع بوده و از آنجائیکه تاکنون در خصوص تهیه این واکسن در داخل کشور اقدامی صورت نگرفته لذا تهیه این واکسن می تواند برای بهبود صنعت پرورش میگو بسیار حائز اهمیت باشد.

۱-٤- غیرفعال سازی باکتری ویبریو با استفاده از پرتو گاما

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که به ترتیب دزهای ۴ و ۱۰ کیلوگری پرتو گاما به عنوان حداقل دز مطلوب برای غیرفعال سازی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس با رقت ۱۰۱۰ × ۱/۵ به صورت کشت تازه و

لیوفیلیزه و در نهایت تولید آنتی ژن های سلول کامل غیرفعال شده (رادیوآنتی ژن) مناسب شناخته شده است. در این زمینه مطالعات محدودی موجود می باشد. از جمله این مطالعات می توان به مطالعه انجام شده توسط Abdallah و همکاران (۲۰۰۹) اشاره نمود که از پرتوی گاما با دز ۰/۵ کیلوگری به منظور غیرفعال سازی ویبریو پاراهمولیتیکوس و ویبریو آلجینولیتیکوس به منظور استریل نمودن مواد غذایی استفاده شده است. همچنین آنها متوجه شدند که پرتو گاما موجب ایجاد تغییر در پروتئین های دیواره خارجی باکتری های پرتودیده می گردد (Abdallah et al., 2009). Song و همکاران (۲۰۰۹) نیز به مقایسه اثر پرتوی گاما و بیم الکترون برای استرلیزه کردن نوعی صدف دوکفه ای در سه حالت نمک شور، تخمیری و همراه ادویه پرداخته و متوجه کاهش رشد لیستریا منوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس و ویبریو پاراهمولیتیکوس با گذراندن دوره ۴ هفته ای در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دز ۵ کیلوگری گردیدند و براساس میزان محاسبه شده D10Value متوجه نافذتر بودن اثر پرتوی گاما نسبت به بیم الکترون گردیدند (Song et al., 2009).

در مطالعه انجام شده توسط معتمدی سده و همکاران (۲۰۰۸) نیز دز مطلوب پرتو گاما جهت کاهش آلودگی های میکروبی میگو خام و به ویژه از بین بردن ویبریو پاراهمولیتیکوس در میگو پرتودهی شده پس از طی یکسال زمان نگهداری در دمای انجماد پس از پرتودهی ۲ کیلوگری گزارش گردید (Motamedi Sedeh et al., 2008). علل متعددی برای تفسیر نتیجه بدست آمده قابل تصور است که از آن جمله می توان به تاثیر فاکتورهایی مانند وجود و یا عدم وجود اکسیژن، خشک و یا مرطوب بودن نمونه و غلظت باکتری مورد پرتودهی قرار گرفته اشاره نمود (Smolko & Lombardo; 2005; Pruss *et al.*, 2002; Hernigou *et al.*, 2000;). اگر چه روش لیوفیلیزه نمودن یک روش مناسب برای نگهداری میکروارگانیسم ها با استفاده از انجماد و خشک کردن در خلاء می باشد، اما در این روش به علت وجود شرایط خشکی و عدم وجود اکسیژن مقاومت باکتری در برابر پرتودهی افزایش می یابد. این مسئله با گزارش های موجود برخی از محققین هم خوانی دارد. به طوری که در مطالعه انجام شده توسط Nedugova و همکاران (۱۹۸۴) نشان دادند که انتروتوکسین باکتری ویبریو کلرا در حالت مایع با دز ۵۰-۷۰ کیلوگری و در حالت خشک با دز ۱۵۰-۲۰۰ کیلوگری پرتو گاما کاملاً غیرفعال می گردد. نتیجه مطالعه مذکور بیانگر این موضوع می باشد که انتروتوکسین باکتری در حالت خشک (لیوفیلیزه) نسبت به حالت مایع از مقاومت بالاتری برخوردار می باشد (Nedugova et al., 1984). در مطالعه حاضر نیز میتوان یکی از علت

های افزایش دز پرتودهی برای غیرفعال سازی باکتری ویبریو را خشک بودن باکتری در حالت لیوفیلیزه نسبت به کشت تازه ذکر نمود. در بررسی انجام شده توسط Vassilia و همکاران (۲۰۰۹) بر روی نمونه گوشت خوک آلوده شده با رقت های ۱۰۳ و ۱۰۶ cfu/ g باکتری سالمونلا اینتریتیدیس در بسته بندی با شرایط خلاء به ترتیب دزهای ۲/۵ و ۴/۷ کیلوگری به عنوان حداقل دز غیرفعال سازی پس از یک ماه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد بدون ایجاد هیچ گونه تغییر ارگانولپتیکی و بیوشیمیایی در گوشت شناخته شد (Vassilia et al., 2009). در حالیکه Gumus و همکاران (۲۰۰۸) اثر پرتو گاما را بر گوشت گوساله فرآوری و آلوده شده به سه سوش باکتری استافیلوکوکوس آرئوس، سالمونلا تیفوموریوم و اشرشیاکلای با رقت ۱۰۶ cfu/g بررسی و گزارش نمودند که دز ۴/۵ کیلوگری بدون نگهداری گوشت در دمای ۴±۱ درجه سانتیگراد سه سوش مذکور را کاملاً از بین می برد (Gumus et al., 2008). بنابراین برخی از فاکتورهای دیگر مانند رقت باکتری نیز در تعیین حداقل دز غیرفعال سازی تاثیر بسزایی دارد.

قابل توجه است که کاربرد مواد شیمیایی مختلف به منظور غیرفعال سازی باکتری ها بسیار متداول است (Kyvsgaard *et al.*, 1996; Mahanty *et al.*, 1999; Pruss *et al.*, 1997; Bahnemann, 1990). اما از آنجایی که در استفاده از این مواد به جا ماندن باقیمانده در محصول نهایی و بعضاً مقاومت برخی پاتوژن ها در برابر ماده غیرفعال کننده وجود دارد و همچنین سمی بودن برخی از آنها موجب شد که محققین به دنبال روش های مطمئن تری باشند (Sharifi-Yazdi & Darghahi, 2006; Bahnemann, 1990). لذا امروزه توجه به کاربرد روش های هسته ای (پرتوهای یونساز) برای غیرفعال سازی ارگانیسم ها (Grieb *et al.*, 2002; Mahanty *et al.*, 1999; Dertinger & Jung, 1970; Polly, 1961Kyvsgaard *et al.*, 1996; Pruss *et al.*, 2002; latarjet, 1972; Johnson, 1965; Massa, 1966;; Smolko tnick & Bachrach, 1968; Danes *et al.*, 1966; Thomas & Lombardo, 2005;Collier, 1955; Traub *et al.*, 1951; Pola *et al.*, 1981; Pollard, 1953 & 1956; Lombardo & Smolko, 1990; Smolko *et al.*, 1992; Smolko & Lombardo, 2005) و در نهایت تولید رادیوواکسن های باکتریایی به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Polard, 1956). پرتوهای یونساز دارای انرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشندگی شدید می باشند (Mahanty *et al.*, 1999; Thomas et al., 1981) اما در هیچ شرایطی در محصول نهایی باقیمانده ای به جا نمی گذارند. همچنین امکان فرار ارگانیسمها نیز در استفاده از این روش منفی می باشد (Sharifi-Yazdi & Darghahi, 2006). تنها اشکال استفاده از

این روش اثر پرتوهای یون ساز از جمله پرتو گاما بر مولکول های آب موجود در محیط نگهدارنده ارگانیسم می باشد. اثر پرتو بر مولکول های آب موجب تولید رادیکال های آزاد می گردد که دارای اثرات مخربی بر آنتی ژن های واکسن دارد (Moreira *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 1981). بنابراین بهتر آن است که برای حفظ خاصیت آنتی ژنسیتی ارگانیسم را به صورت پودر لیوفیلیزه و یا منجمد به کار برد (Moreira *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 1981; Thomas *et al.*, 1981; Elliot *et al.*, 1982; Kyvsgaard *et al.*, 1996). که با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه می توان بیان داشت که دز غیرفعال سازی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در حالت لیوفیلیزه نسبت به کشت تازه باکتری افزایش یافته و حداقل دز غیرفعال سازی باکتری با غلظت ۱۰۱۰ ×۱/۵ عدد باکتری در میلی لیتر با پرتو گاما در حالت لیوفیلیزه ۱۰ و به صورت کشت تازه ۴ کیلوگری می باشد. که با توجه به موارد فوق الذکر علیرغم مدت طولانی تر غیرفعال سازی باکتری، روش لیوفیلیزه بهتر از روش کشت تازه به منظور تهیه رادیوآنتی ژن باکتری می باشد. مطالعات آتی نیز به منظور ارزیابی مقایسه ای تاثیر این رادیوآنتی ژن ها و مقایسه آنها با آنتی ژن های غیرفعال شده به کمک روش های شیمیایی در حال انجام می باشد.

۲-٤- تکثیر ویروس لکه سفید

پژوهش های پیشین نشان داده اند که ویروس لکه سفید توانایی تکثیر در میگو و خرچنگ های دراز آب شیرین را دارا می باشد (Jiravanichpaisal, 2005; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006 & 2001). همچنین براساس مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف می توان بیان کرد که تغییرات دمایی به طور مستقیم بر روی میزان متابولیسم (Allan *et al.*, 2006)، رشد و بقا (Wyban *et al.*, 1995; Ponce-Palafox *et al.*, 1997)، میزان پوست اندازی در سخت پوستان (Vijayan & Diwan, 1995)، میزان اکسیژن مورد نیاز موجود زنده (Tian *et al.*, 2004) و از همه موارد مهم تر پاسخ های سیستم ایمنی سخت پوست در برابر عوامل خارجی (Cheng *et al.*, 2005) موثر می باشد. با توجه به نتایج مطالعات Scholtissek و Rott (۱۹۶۹)، Fegan و Clifford (۲۰۰۱) و Rodrigez و همکاران (۲۰۰۳) می توان بیان نمود که تکثیر ویروس به شرایط محیطی و به خصوص تغییرات دما آب وابسته می باشد (Rott & Scholtissek, 1969; Fegan & Clifford, 2001; Rodrigez *et al.*, 2003).

نتایج حاصله از بررسی حاضر نیز نشان دهنده تاثیر تغییرات دمایی آب بر روی تکثیر ویروس پس از تلقیح در خرچنگ دراز آب شیرین می باشند. به طوری که ویروس روز سوم پس از تلقیح در دمای متوسط ۲۷-۲۵ و ده روز پس از تلقیح در دمای متوسط ۱۶ – ۱۵ درجه سانتیگراد به خوبی تکثیر یافت.

۳-٤- غیرفعال سازی ویروس لکه سفید با پرتو گاما

به منظور تهیه واکسن های کشته محققین از روش های مختلف شیمیایی و فیزیکی استفاده می کنند.

با توجه به مطالب مذکور در فصل کلیات می توان بیان نمود که بهترین روش برای غیرفعال سازی خاصیت عفونت زایی ویروس ها و سایر ارگانیسم ها به دلیل ایجاد آسیب کمتر به خاصیت آنتی ژنتیکی آنها پرتودهی مستقیم می باشد (Kaplan, 1960; Grieb *et al.*, 2002; Osborne *et al.*, 1698; Thomas *et al.*, 1981; Elliot *et al.*, 1982; Kyvsgaard *et al.*, 1996; Jordan & Kempe, 1956) که در این صورت می توان به یقین بیان کرد خاصیت حفاظتی واکسن غیرفعال ویروسی نیز افزایش می یابد.

در مطالعه حاضر نیز دز مطلوب غیرفعال سازی با پرتو گاما برای ویروس لکه سفید با تیتر ۵/۴ ۱۰ تهیه شده از میگوهای آلوده در مزارع پرورشی میگو در ایران در حالت منجمد (۲۰- درجه سانتیگراد) و در نهایت تولید آنتی ژن های سلول کامل غیرفعال شده (رادیوآنتی ژن) ۱۴- ۱۵ کیلوگری تعیین گردید. که به منظور تهیه رادیوواکسن این ویروس انجام تست های تائید سلامت خاصیت آنتی ژنتیکی ویروس و غیرفعال سازی کامل خاصیت عفونت زایی لازم و ضروری می باشند. پس از این مرحله به منظور تعیین میزان ایمنی القاء شده به میگوها پس از انجام واکسیناسیون ضد بیماری ویروسی لکه سفید با انجام آزمون مواجه تعیین گردد.

٤-٤- کارایی رادیوواکسن (گاما) بر ضد ویروس لکه سفید در میگو

در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شد که تزریق رادیوواکسن منجر به القای ایمنی بر ضد ویروس لکه سفید در میگو می شود. بررسی نتایج نشان داد که استفاده از این واکسن به طور معنی داری منجر به کاهش تلفات در میگوهای واکسینه شده بر ضد ویروس لکه سفید نسبت به گروه شاهد پس از طی ۴۹ روز دوره ایمن سازی می شود. تاکنون پژوهش های اندکی به منظور بررسی نقش ادجوانتی باکتری ویبریو غیرفعال شده به همراه

رادیوواکسن لکه سفید انجام پذیرفته است (Heidarieh et al, 2010; Namikoshi et al., 2004; Deachamag et al., 2006). در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که ویبریو غیرفعال به عنوان ادجوانت، منجر به افزایش کارایی رادیوواکسن در القای ایمنی بر ضد ویروس لکه سفید در میگوها می گردد. به طوری که کاهش معنی داری در تلفات پس از مواجه با ویروس میان کاربرد ویبریو غیرفعال به عنوان ادجوانت در مقایسه با کاربرد واکسن به تنهایی در میگوهای واکسینه شده مشاهده گردید. قابل توجه است که درصد بقاء نسبی (RPS%) و رادیوواکسن در میگوهای واکسینه شده به روش تزریقی پس از مواجه با دزهای مختلف ویروس لکه سفید و بعد از گذشت ۳۵ روز به ترتیب با دز مواجه ۱۰۰ = LD50/ml در گروه واکسینه شده به همراه ادجوانت ۱۰۰ درصد و در گروه بدون ادجوانت ۹۵ درصد که اختلاف بین این دو گروه از لحاظ آماری (P < ۰/۰۵) کاملاً معنی دار بود، دز ۵۰۰۰ = LD50/ml در گروه واکسینه شده بعد از گذشت ۴۲ روز به همراه ادجوانت و بدون ادجوانت ۹۵ درصد و در دز ۵/۴۱ ۱۰ = LD50/ml در هر دو گروه واکسینه شده (با ادجوانت و بدون ادجوانت) پس از طی دوره ۴۹ روز ایمن سازی ۸۶ درصد گزارش گردید.

با بررسی نتایج بدست آمده در این مطالعه می توان بیان داشت که بهترین پاسخ ایمنی رادیوواکسن لکه سفید میگو به همراه استفاده از ادجوانت باکتری ویبریو غیرفعال پس از گذشت ۴۲ روز واکسیناسیون و مواجه با تیتر ۱۰۰ = LD50/ml و ۵۰۰۰ = LD50/ml ایجاد خواهد شد. در نهایت با توجه به نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات قبلی دیگران، می توان ادعا نمود سیستم ایمنی میگو نسبت به واکسیناسیون بر علیه بیماری لکه سفید پاسخ می دهد. لذا استفاده از این رادیوواکسن به همراه ادجوانت باکتریایی و یا سایر مواد محرک سیستم ایمنی به منظور واکسیناسیون گسترده مزارع پرورش میگو مورد آزمایش و بررسی قرار گیرد. به هر حال مباحث اقتصادی و هزینه های تمام شده این واکسن ها در سبد هزینه های مزرعه داران نیازمند مطالعات خاصی می باشد.

۵-٤- کارایی فرمالین بر ضد ویروس لکه سفید در میگو

دکتر Atsushi Namikoshi و همکارانش از آزمایشگاه بیماریهای آبزیان در دانشگاه هیروشیما ژاپن در سال ۲۰۰۳ بر روی غیرفعال سازی WSSV با استفاده از فرمالین به همراه ایجاد مقاومت علیه بیماری WSSV در میگو *Penaeus Japonicus* مطالعاتی انجام داده است. آنها متوجه شدند ایمنی زائی ضد عفونت WSSV با ویروس غیرفعال شده

با فرمالین باعث ایجاد مقاومت در این گونه میگو می شود ولی این مقاومت برای ۲۰ روز باقی نماند. ایشان توانست با استفاده از این واکسن و محرکهای ایمنی مثل B 1-3 Glucan و باکتری ویبریو غیرفعال شده و طی سه دوز واکسیناسیون باعث ایجاد ۶۰٪ بقا در مزارع میگو گردد(Motamedi Sedeh etal.,2008).

همچنین در دانشکده علوم دانشگاه Songkla در تایلند دکتر wilaiwan chotigeat و سایر همکارانش پس از تحقیق بر روی واکسیناسیون میگو با استفاده از ویروس WSSV غیرفعال شده با فرمالین و همچنین باکتری ویبریو هاروئی غیر فعال شده توانستند تا حداکثر ۸۰٪ بقا نسبت به این بیماری در میگو *P. monodon* ایجاد نمایند (Deachamag, 2009).

Singh و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش نمودند که تجویز ویروس عامل بیماری لکه سفیدی غیر فعال شده با فرمالین بصورت خوراکی به میگو *Fenneropenaeus indicus* باعث مقاومت نسبت به آن بیماری می‌شود (Singh etal.,2005).

ضمنا تحقیقات متعدد دیگری نیز بر روی واکسن این بیماری چه بصورت واکسن غیرفعال و یا واکسنهای نوترکیب اعم ازDNA vaccine and subunit vaccine انجام گردیده است، که همگی باعث ایجاد مقاومت به این بیماری شده اند (Deachamag *etal.*,2009; Singh *etal.*, 2005;) Rosalind *etal.*, 2006; Witteveldt , (Du *etal.*, 2006; 2006;Namikoshi *etal.*,2004; Witteveldt *etal.*, 2004a; Witteveldt *etal.*, 2004b;

در خصوص کاربرد پرتوهای یونساز جهت غیرفعال سازی ویروسها برای تهیه واکسنهای غیر فعال نیز تحقیقات متعددی انجام شده است.(Smolko &Lombardo,2005; Preuss,1997)

نتیجه گیری

- با توجه به تحقیقات صورت گرفته در این پروژه نتایج نهائی به شرح زیر می باشند:
- ویروس بیماری سندرم لکه سفید میگو قابل تکثیر در بدن خرجنگ دراز (کرای فیش) می باشد.
- ویروس بیماری سندرم لکه سفید میگو با تیتر $10^{5.4}$ LD_{50}/ml توسط پرتوگاما با دز ۱۵ کیلوگری در حالت انجماد کاملاً غیرفعال سازی می گردد.
- ویروس بیماری سندرم لکه سفید میگو با تیتر $10^{5.4}$ LD_{50}/ml توسط بیم الکترون با دز ۱۳,۵ کیلوگری در حالت انجماد کاملاً غیرفعال سازی می گردد.
- ویروس بیماری سندرم لکه سفید میگو با تیتر $10^{5.4}$ LD_{50}/ml توسط فرمالین 0.5% v/v به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق کاملاً غیرفعال سازی می گردد.
- باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در حالت لیوفیلیزه با دز ۸ کیلوگری پرتو گاما غیرفعال سازی می شود.
- با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما ، الکترون و فرمالین می توان نتیجه گرفت که هر سه نوع واکسن در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون در مقابل ویروس فعال با تیتر $10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl اثر حفاظتی خوبی دارند.
- با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون اثر حفاظتی این رادیو واکسن وقتی به غذای گروههای میگو ماده ایمیونوژن اضافه گردد و همچنین وقتی از باکتری ویبریو غیرفعال شده به عنوان یک محرک ایمنی همزمان با تزریق رادیو واکسن استفاده شده، بیشتر از وقتی است که رادیوواکسن بدون ایمیونوژن و بدون باکتری غیرفعال مورد استفاده قرار گیرد (در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون).
- با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما و الکترون، می توان گفت که هر دو واکسن اثر حفاظتی خوبی از خود نشان داده اند ولی در مورد رادیوواکسن غیرفعال شده با پرتو گاما این اثر حفاظتی بیشتر از رادیوواکسن الکترون می باشد (در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون).

- با توجه به نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50%) بدست آمده در مورد واکسن غیرفعال شده با فرمالین، اثر حفاظتی این واکسن وقتی به غذای گروههای میگو ماده ایمیونوژن اضافه گردد و واکسن بدون ایمیونوژن تقریباً مشابه است (در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون).
- به طور کلی رادیوواکسن غیرفعال شده با گاما اثر حفاظتی بهتری از رادیوواکسن غیرفعال شده با الکترون و واکسن غیرفعال با فرمالین نشان داده است. ولی با این وجود رادیوواکسن الکترون و واکسن فرمالینه نیز اثر حفاظتی خوبی در زمان حداکثر ۲ هفته پس از واکسیناسیون نشان داده اند.

پیشنهادها

با توجه به نتایج گرفته شده از مراحل واکسیناسیون و چلنج بهتر است که در فاز دوم پروژه قسمتهای تکرار گردند ، این قسمتها شامل:

۱- از آنجائیکه دز واکسن تزریق شده به هر میگو حدود ۵۰ تا ۶۰ میکرولیتر بوده می توان یک دز کمتر و یک دز بیشتر هم مورد آزمایش قرار داد.

۲- دز واکسن تلقیح شده به روش حمامی هم به میزان ۵ میلی لیتر (نسبت ۱/۲۰ وزنی میگو/ حجم واکسن) به ازای ده میگو ۱۰ گرمی بکار رفت که می توان نسبت کمتر و بیشتر را هم مورد آزمایش قرار داد.

۳- در آزمون چلنج اول تیمار گروههای میگو واکسینه شده در زمان دو هفته بعد از دز دوم واکسیناسیون با ویروس فعال انجام گردید، که می توان در زمانهای یک و سه هفته نیز مورد بررسی قرار گیرند.

۴- در آزمون چلنج اول تیمار گروههای میگو واکسینه شده با میزان $10^{2.4}$ LD_{50}/ml ویروس فعال در زمان دو هفته بعد از دز دوم واکسیناسیون انجام گردید، که می توان با مقادیر کمتر و بیشتر ویروس فعال و در زمانهای یک و سه هفته نیز مورد بررسی قرار گیرند.

۵- در آزمون چلنج دوم تیمار گروههای میگو واکسینه شده در زمان چهار هفته بعد از دز دوم واکسیناسیون با ویروس فعال به میزان $10^{5.4}$ LD 50/ml انجام گردید، که می توان در زمانهای یک و دو هفته نیز با مقادیر ویروس کمتری مورد بررسی قرار گیرند.

۶- همچنین پیشنهاد می گردد از این واکسنها به روش حمامی و تزریقی در مراحل مختلف تکثیر و پرورش میگو استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می باشد از کلیه اساتید، همکاران و دوستانی که در راستای پیشرفت اهداف این پروژه ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را بعمل آوریم.

با سپاس فراوان از

آقای دکتر محمد قنادی ریاست محترم پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای

آقای دکتر عباس مجد آبادی ریاست محترم پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی

آقای دکتر مطلبی ریاست محترم موسسه تحقیقات شیلات ایران

آقای دکتر آیین جمشید ریاست محترم پژوهشکده میگوی بوشهر

آقای دکتر شریف پور مسئول محترم بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در موسسه تحقیقات شیلات ایران

آقای دکتر فرهود ضیائی معاونت محترم پژوهشی پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی

آقای دکتر شریف روحانی معاونت محترم موسسه تحقیقات شیلات ایران

آقای دکتر عقیل دشتیان نسب مسئول محترم بخش بیماریهای آبزیان پژوهشکده میگو

آقای مهندس منصوری معاونت محترم پشتیبانی پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی

آقای مهندس راستی معاونت محترم پشتیبانی پژوهشکده میگو

آقای دکتر همایون مهروانی مدیر محترم بخش تب برفکی موسسه رازی

آقای دکتر کاکلکی عضو هئیت علمی موسسه تحقیقات شیلات ایران

همکاران گروه کشاورزی هسته ای و کارشناسان امریه شاغل در آزمایشگاه علوم دامی بویژه خانمها: سارا سلطانی، معصومه رمضانی، نازنین پور محمد، آقایان: مهندس بهنام ناصریان، مهندس محمد طاهر حلاجیان، کریمی، حامد عسگری، میلاد اکبری، سید رضا عرب، محمد ترشیزی، رحمان رحمتی، نصرالله کیاحیرتی، مهدی شادلو, امیرحسین حامدی

همکاران واحد تاسیسات، آهنگری، برق، نقاشی، نقلیه و تمامی همکارانی که ما را یاری رساندند.

همکاران پژوهشکده میگو بوشهر از جمله بخش بیماریهای آبزیان، واحد پشتیبانی و کلیه همکارانی که ما را یاری رساندند.

منابع

۱- افشار نسب م.، ۱۳۸۶. بیماریهای ویروسی میگو، انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، مدیریت اطلاعات علمی، ۲۱۰ صفحه.

۲- افشار نسب محمد ، فرامرز لالویی و سهراب رضوانی: شناسایی بیماری لکه سفید White Spot Syndrome Disease با روش PCR در میگوی سفید هندی در ایران. مجله علمی شیلات ایران ، سال چهاردهم، شماره یک، بهار ۱۳۸۴.

۳- .استاندارد ملی ایران شماره ۳۳۰۶ (روش شناسایی ویبریو پاراهمولیتیکوس)

۴- سالنامه آماری شیلات ایران،۱۳۸۶. انتشارات سازمان شیلات ایران،دفتر طرح و برنامه، ۱۳۸۶

۵- کارگاه آموزشی بیوتکنولوژی، جنبه های کنترل کیفی واکسن‌ها، ۱۳۸۵، وزارت صنایع و معادن ایران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران، آزمایشگاه غذا و دارو، ایران.

۶- کارگاه روش تحقیق کاربرد روشهای هسته ای در علوم کشاورزی، ۱۳۸۵، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و سازمان انرژی اتمی، مرکز تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی

۷- فرحناز معتمدی سده، اکبر خراسانی، سید کمال الدین شفائی، مهدی صالحی زاده، هادی فتح الهی، کوروش اربابی و فرامرز مجد(۱۳۸۵): غیرفعال سازی ویروس عامل بیماری تب برفکی در دامها به وسیله پرتو گاما به منظور تهیه واکسن کشته شده، مجله علوم و فنون هسته ای، شماره(۲) ۳۷، ۲۱-۱۷.

8- Afsharnasab, M., A. Dashtyannasab. V. Yeganeh and M. Soltani .2007. Incidence of white spot disease (WSD) in Penaeus indicus farms in Bushehr Province, Iran. Fisheries Sciences, 7 (1): 15-26.

9- Akhondzadeh Basti, A., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Misaghi, A., Soltani,M., Esmaeili, H. 2007. The study of Vibrio SPP. In cultivated (Paeneus Indicus) and marine (Paeneus Semisulcatus) shrimp obtained from Boushehr a southern province of Iran. J.Vet.Res. 62:307-310.

10- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., Philips, M., 2004. Introductions and movement of Penaeus vannamei and Penaeus stylirostris in Asia and the pacific. FAO, Bangkok, 32 pp.

11- Barber T.L. & Campbell C.H .1984.Experimental Bluetongue vaccine inactivated by gamma irradiation. Proc. U.S.Anim. Health Assoc., 131- 142.

12- Deachamag, p., Intaraphad, U., Phongdara, A., Chotigeat, W., 2006. Expression of a phagocytosis activating protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. Aquaculture, 255, 165-172.

13- Du, H., Z. Xu, x. Wu, W. Li and W. Dai.2006. Increased resistance to white spot syndrome virus in Procambarus clarkii by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. Aquaculture, 260: 39-43.

14- Eduardo E. Smolko a,*, Jorge H. Lombardo.2005. Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 236 (2005) 249–253.

15- Escobedo-Bonilla1, C. M., Wille1, M., Alday Sanz, V., Sorgeloos1, P., Pensaer, M. B., Nauwynck, H. J., 2005. In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free Litopenaeus vannamei by intramuscular and oral routes. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS, 66, 163–170.

16- FAO fisheries department, fisheries information, data and statistics unit, 2006. Fishstat, universal software for fishery statistical time series. Version 2.3.

17- Flegel, T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258, 1-33.
18- FAO Global Aquaculture.2008.Outlook in the Next Decades2003-2005 FAO, 2006-2008: An Analysis of National Aquaculture Production Forecasts to 2030, industry sources.
19- Fegan DF and Clifford H.C. 2001. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable ShrimpCulture, Aquaculture 2001, Browdy CL and Jory DE (eds), World Aquaculture Society, Baton Rouge LA, 168–198.
20- Fethi Ben Abdallah,F.B., Kallel,H and.Enzymatic,A. 2009 outer membrane proteins and plasmid alterations of starved Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus cells in seawater.. ARCHIVE Microbiology 191,6
21- Graber,J .1971. Immunognicity of purified Venezuelan Equine Encephalitis virus inactivated by Ionizing Radiation. Infect, Immun; 3 (4), 574-579.
22- Hernigou P., Gras G., Marinello G. and Dormont D. 2000. Inactiva tion of HIV by application of heat and radiation. Implication in Sanze´n L. and Carlsson A° . 1997. Transmission of human T-cell bone banking with irradiated allograft bone. Acta Orthop Scand lymphotropic virus type 1 by a deep-frozen bone allograft. Acta.71: 508–512.
23- Huahua, D., Wei, D., Xinyan, H., Weifen, L., Yaxiang, X., and Zirong, X., 2008. Effect of low water temperature on viral replication of white spot syndrome virus in Procambarus clarkia. Aquaculture, 277(3-4), 149-151.
24- Jiravanichpaisal Pikul; S?derh?ll Kenneth; S?derh?ll Irene.2006.Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, Pacifastacus leniusculus.The Journal of general virology 2006;87(Pt 4):847-54.
25- Jiravanichpaisal P; Bangyeekhun E; S?derhall K; S?derhall I.2001.Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish Pacifastacus leniusculus.Diseases of aquatic organisms 2001;47(2):151-7.
26- Karber, 2002. Karber formula for calculation of virus/ antibody titers. OIE Manual.
27- Lightner, D.V., 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
28- Lombardo, J. H and E. E. Smolko.1990. A Biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 Ci. Radiat. Phys. Chem, 35 (4-6): 585-589.
29- Marielle C.W, Van Hulten, Meng-Feng T, Christel A. S, Chu-Fang L, Guang-Hisiung K and Just M.V .2000. Analysis of a genomic segment of spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. J of General Virology, 81: 307-316.
30- Motamedi Sedeh, F. and et al .2007. Immune response of Foot and Mouth Disease Virus type A87/IRN inactivated Vaccine by gamma irradiation on Guinea pig in Iran. Iranian Journal of Science & Technology.
31- Motamedi Sedeh, F., A. Khorasani, K. Shafaee, H. Fatolahi and K. Arbabi, 2008. Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig. Indian J Microbiol, 48 (3): 326- 330.
32- Muhammad Meezanur Rahman.2007.Thesis for obtaining the degree of Doctor in Veterinary Sciences (PhD),Laboratory of Virology,Department of Virology, Parasitology and Immunology ,Faculty of Veterinary Medicine,Ghent University, 2007
33- Nash G., Nithimathachoke C., Tungmadi C., Arkariamoran A., Prathanpipat P., Ruamthaveesub P., 1992. Vibrios and its control in pond reared Penaeus monodon. Diseases in Asian Aquaculture, Fish Health Section, 143–155.
34- Namikoshi, A., J. L. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T, Nishioka, M. Arimoto and K. Muroga.2004. Vaccination trials with Penaeus japonicus to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture, 229: 25- 35.
35- OIE, Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals-2003, Nested polymerase chain reaction of tissues and haemolymph.
36- Patrick Bowe.2008. UF Shrimp School Enabling Sustainable Shrimp Production Through Aquafeeds Nutrition.
37- Poulos, B. T., C. R. Pantoja, D. Bradley- Dunlop, J. Aguilar and D. V. Lightner, 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of White spot syndrome virus of Penaeid shrimp. Dis Aquat Org, 47: 13-23.
38- Preuss,T., Kamstrup,S., Kyvsgaard,N.C., Nansen, P., Miler.A and., Lei, J. C.1997. Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum. Clin Diagno Labo Immuno, 4(5): 504-508.
39- Prüss, A., Kay, D., Fewtrell, L., Bartram, J. 2002. Estimating the burden of disease from water,sanitation and hygiene at a global level. Environmental Health Perspectives 110(5), 537-542.
40- Reed, L. J., and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Hygiene, 27, 493.

41- Rodriguez et al., 2003 J. Rodriguez, B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday and J. Calderon, White spot syndrome virus infection in cultured Penaeus vannamei (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure, J. Fish Dis. **26** (2003), pp. 439–450. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (22).
42- Rosalind,G.M., Maharajan,A., Riji,J.K and Prince Jeraseelan,M.J .2006. Shrimp survive white spot syndrome virus challenge following treatment with Vibrio bacterin. Indian J EXP Biol, 44 (1):63-67.
43- Shaface,S.K and etal .2004. Preparation of salmonella typhimurium killed vaccine by gamma irradiation.The fourth international Iran and Russia confereuce "Agriculbure and Natural Resources". Shahrekerd, Iran.
44- Smolko,E.E and Lombardo,J.H.2005. Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 236, 249-253
45- Singh,I,S,B., Manjusha,M.,Pai,S,S and R.Philip. 2005. Fenneropenaeus indicus is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. Diseases of Aquatic Organisms, 66: 3, 265-270.
46- Stefan H. E., Kaufmann.2004. Novel Vaccination strategies; Wiley- VCH, Chapter 10, 2004.
47- Soltani, M., Koholaki, s.h., Kiasumi, M. 2000. Isolation and identification of dominant Vibrio species in farmed prawn of Iran. J. Vet.Res. 55:32-36.
48- Thomas,G.A.,. Capizzi*,M. DeRosa, F. Bhatt,N and . Rice.T.M.1981. Optical study of interacting donors in semiconductors Phys. Rev. B 23, 5472–5494 (1981).
49- Van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N and 5 others .2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology 286:7–22.
50- Van Hulten, MC. W., M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou and J. M. Valk.2000b. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. J. Gen. Virol, 81, 307-316.
51- Wang, Y. T., W. Liu, J. N. Seah, C. S. Lam, J. H. Xiang, V.Korzh, J. Kwang, 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the.
52- Vijayan and Diwan, 1995 K.K. Vijayan and A.D. Diwan, Influence of temperature, salinity, pH and light on moulting and growth in the Indian white prawn Penaeus indicus (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) under laboratory conditions, Asian Fish. Sci. **8** (1995), pp. 63–72.
53- Witteveldt,J. M.C. Van Hulten and J.M. Vlak , 2000. Identification and phylogeny of a non-specific endonuclease gene of white spot syndrome virus of shrimp. Virus Genes 23, pp. 331–337.
54- Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Valk, J. M., and Van Hulten, MC. W. 2004a. Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrome Virus by Oral Vaccination. Journal of Virology, 78(4), 2057-2061.
55- Witteveldt, J., Vlak, J.m., and Van Hulten, MC. W., 2004b. Protection of Penaeus monodon against white spot syndrome virus using a WSSV subunites vaccine. Fish and Shellfish Immunology, 16, 571-579.
56- Witteveldt,J.2006. On the vaccination of shrimp against whit spot syndrome virus. Thesis Wageningen university, ISBN: 90-8504-331-x.
57- Wyban,J.,Walsh.W.A and. Godin, D.M.1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (Penaeus vannamei), Aquaculture **138** (1995), pp. 267–279.

پیوست

مواد خریداری شده

فاز خرید تجهیزات

جدول ۲: فهرست فعالیت‌های ارائه شده بر اساس فاز خرید در شکست کار پروژه[1]

ردیف	کد WBS	شرح فعالیت	وضعیت خرید از نظر مجری (نهایی/ ناتمام)	وضعیت خرید از نظر کارفرما (ناتمام/تایید و نیاز به بازدید)
۱	۲,۱,۱	خرید فریزر ۸۵- درجه سانتیگراد	نهایی	
۲	۲,۱,۲	خرید تانک ۳۰۰۰ لیتری سه لایه و متعلقات	نهایی	
۳	۲,۱,۳	تانکهای ۳۰۰ لیتری (۱۰ عدد)و بجای ۱۵ عدد تانک دیگر, ۵۴ عدد آکواریوم پلاستیکی ۴۰ – ۵۰ لیتری خریداری شد.	نهایی	
۴	۲,۱,۴	پمپهای هوادهی (۱۰ عدد)- طبق نامه شماره... بجای ۱۵ عدد پمپ هوادهی یک دستگاهpH meter و ترمومتر خریداری شد.	نهائی	
۵	۲,۱,۵	مخزن ازت مایع و متعلقات آن	نهایی	
۶	۲,۱,۶	مخزن یخ	ناتمام	
۷	۲,۱,۷	یخچال	نهایی	
۸	۲,۱,۸	کامپیوتر laptop و متعلقات - کلیه پیش فاکتورهای لازم در اردیبهشت ۱۳۸۸ تهیه و کمیته کامپیوتر پژوهشکده نیز تائید نموده ولی متاسفانه ریاست محترم پژوهشکده هنوز مجوز خرید را به واحد کارپردازی نداده اند.	ناتمام(پرینتر و اسکنر خریداری شد)	
۹	۲,۱,۹	ایرانیت	نهایی	
۱۰	۲,۱,۱۰	سیستم تصفیه آب به روش UV	ناتمام	
۱۱	۲,۱,۱۱	سیستم آب پاش	نهایی	
۱۲	۲,۱,۱۲	سیستم تصفیه RO- طبق نامه شماره .... بجای این سیستم دو سری چهارتائی میکروپیپت خریداری شد.	نهایی	
	۲,۱,۱	خرید فریزر ۸۵- درجه سانتیگراد	نهایی	
	۲,۱,۲	خرید تانک ۳۰۰۰ لیتری سه لایه و متعلقات	نهایی	
	۲,۱,۳	تانکهای ۳۰۰ لیتری (۱۰ عدد)و بجای ۱۵ عدد تانک دیگر, ۵۴ عدد آکواریوم پلاستیکی ۴۰ – ۵۰ لیتری خریداری شد.	نهایی	
	۲,۱,۴	پمپهای هوادهی (۱۰ عدد)- طبق نامه شماره... بجای ۱۵ عدد پمپ هوادهی یک دستگاهpH meter و ترمومتر خریداری شد.	نهائی	
	۲,۱,۵	مخزن ازت مایع و متعلقات آن	نهایی	
	۲,۱,۶	مخزن یخ	ناتمام	
	۲,۱,۷	یخچال	نهایی	
	۲,۱,۸	کامپیوتر laptop و متعلقات - کلیه پیش فاکتورهای لازم در اردیبهشت ۱۳۸۸ تهیه و کمیته کامپیوتر پژوهشکده نیز تائید نموده ولی متاسفانه ریاست محترم پژوهشکده هنوز مجوز خرید را به واحد کارپردازی نداده اند.	ناتمام (پرینتر و اسکنر خریداری شد)	
	۲,۱,۹	ایرانیت	نهایی	
	۲,۱,۱۰	سیستم تصفیه آب به روش UV	ناتمام	
	۲,۱,۱۱	سیستم آب پاش	نهایی	
	۲,۱,۱۲	سیستم تصفیه RO- طبق نامه شماره .... بجای این سیستم دو سری چهارتائی میکروپیپت خریداری شد.	نهایی	

کد WBS	عنوان فعالیت در شکست کار	نام کالا	واحد	تعداد / مقدار	تاریخ خرید	تاریخ تحویل	محل نصب یا استقراره	شماره سریال**
۲,۱,۱	فریزر ۸۵- درجه سانتیگراد و استابلایزر برق	فریزر	دستگاه عدد	۱	۱۳۸۸,۶,۱۷	۱۳۸۸,۶,۱۷	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی، گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی	۰۲۰۹-۹۹۲۱-۱۰۰۴ و ۵۲۲۰۸۶۰۱۱
۲,۱,۲		تانک آب	عدد	۱	۱۳۸۸,۳,۶	۱۳۸۸,۳,۶		ندارد
۲,۱,۳		تانک و آکواریوم		۱۰ و ۶۰	۱۳۸۷,۵,۳۰	۱۳۸۷,۵,۳۰ و	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی،	
۲,۱,۴	تانک ۳۰۰۰ لیتری و متعلقات	پمپ هوا	دستگاه	۷ و ۱	آبان ۱۳۸۸	خرداد ۸۹	گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه آبزیان	L100646 –L100728— L100711-ACO500 (3 دستگاه(
۲,۱,۵	تانکهای ۳۰۰ لیتری و ۶۰ عدد آکواریوم	تانک ازت	دستگاه	۱	شهریور ۱۳۸۸	آبان ۱۳۸۸ و	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی،	
۲,۱,۷	پلاستیکی	یخچال	دستگاه	۲۱۱	۱۳۸۸,۹,۲۲	خرداد ۸۹	گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه آبزیان	ساخت QISهلند
۲,۱,۸	پمپهای هوادهی و دستگاه pH meter	پرینتر و اسکنر	دستگاه	۱ و ۱	۸۹/۶/۱۴	شهریور ۱۳۸۸	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی،	
۲,۱,۹	مخزن ازت مایع	ورق فایبرگلاس	مترمربع	۳	۱۳۸۸,۵,۱۳	۱۳۸۸	گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه آبزیان	2611B004[AB] ، L2696A-301
۲,۱,۱۱		آبنما و فواره	دستگاه		۱۳۸۸,۷,۱۹	۸۹/۶/۱۴	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی،	
۲,۱,۱۲	یخچال	میکروپیپت	سری	دو سری چهار تائی	اسفند ۱۳۸۸ و آذر ۱۳۸۹	۱۳۸۸,۹,۲۲	گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی	13483734- 13994729 131153415
	متعلقات کامپیوتر (پرینتر و اسکنر)					۱۳۸۸,۵,۱۳	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی،	
	ایرانیت و داربست فلزی					۱۳۸۸,۷,۱۹	گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی	ندارد
	سیستم آب پاش					اسفند ۱۳۸۸	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی،	
	سیستم تصفیه RO (میکروپیپت بجای آن خریداری شد)						گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه آبزیان	ندارد
							کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی، گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی	
							کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی، گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی	ندارد

مشخصات فنی :

در این قسمت یک نسخه کامل از اطلاعات فنی اقلام خریداری شده از قبیل : مارک، مدل، محدوده کاری و ... ارائه می‌شود.

- مارک New Brunswick ، جهت نگهداری نمونه‌های همولنف‌های خرچنگ آلوده به ویروس و میگوهای آلوده به ویروس ، قیمت تمام شده دستگاه ۱۴۰/۰۰۰/۰۰۰ ریال
- تانک ۳۰۰۰ لیتری : مدل سه جداره استوانه‌ای پلی‌اتیلنی ، مارک پلاستیک طبرستان ، جهت ذخیره آب برای تأمین آب استخر
- تانک ۳۰۰ لیتری : ۱۰ عدد، مدل گرد پلاستیکی ،مارک گروه تولیدی صنعتی آبرفت ، جهت نگهداری گروههای خرچنگ برای آلوده‌سازی آنها با ویروس
- آکواریوم پلاستیکی کوچک : ۶۰ عدد جهت نگهداری گروههای میگو در آزمون تأیید غیرفعال‌سازی ویروس
- پمپ هوادهی : چهار دستگاه مدل ACO-500 ، مارک HAILEA ،جهت تأمین هوای لازم برای نگهداری خرچنگها در استخر خریداری شد که یک دستگاه آن سوخت
- پمپ هوادهی : سه دستگاه مدل TC-2000 Vm ، مارک SPARMAX جهت تأمین هوای لازم برای نگهداری خرچنگها در تانکهای ۳۰۰ لیتری گرد یک دستگاه مدل pH/mV/?C Meter Kit مدل Senseline F410T ساخت کمپانی QIS هلند به جای ۱۵ عدد پمپ هوادهی خریداری شد.
- مخزن ازت مایع : مخزن ۴۷ لیتری برای نگهداری نمونه‌های ویروسی به مدت طولانی و مخزن ۷ لیتری برای حمل ازت جهت پر کردن مخزن ۴۷ لیتری
- یخچال : برای نگهداری مواد بیولوژیکی در دمای ۴ درجه سانتیگراد
- ایرانیت و داربست فلزی : جهت محصور نمودن منطقه اطراف استخر واقع در سوله کشاورزی ایجاد جریان آب و کمک به هوادهی در آب استخر که شامل دو فواره و یک آبنما می‌باشد.
- پرینتر مدل Canon 3010 و اسکنر مدل Hp 2710 مورد استفاده جهت تهیه پرینترهای گزارشها و سایر اسناد و مدارک پروژه و اسکن نمودن عکسهای میکروسکوپ الکترونی و غیره
- سیستم تصفیه RO : با توجه به تدابیری که مهندس تأسیسات پژوهشکده هنگام لوله‌کشی آب در استخر دیده بود از جمله اینکه ورود و خروج آب به گونه‌ای تنظیم گردید که از راکد ماندن آب در استخر جلوگیری می‌نماید ، لذا نیازی به خرید سیستم تصفیه فوق نبود ولی چون برای انجام کارهای آزمایشگاهی نیاز شدید به دو سری کامل میکروپی‌پت به جای سیستم تصفیه فوق خریداری گردد.

فاز خرید مواد

جدول ۳: فهرست فعالیت‌های ارائه شده بر اساس فاز خرید در شکست کار پروژه:

ردیف	کد WBS	شرح فعالیت	وضعیت خرید از نظر مجری (نهایی/ ناتمام)	وضعیت خرید از نظر کارفرما (ناتمام/تایید و نیاز به بازدید)
۱	۲,۲,۱	خریدکرای فیش	نهائی	
۲	۲,۲,۲	خرید کیت PCR	تمام	
۳	۲,۲,۳	خرید محرکهای ایمنی	تمام	
۴	۲,۲,۴	خرید مواد مصرفی جهت تهیه استوک، تخلیص و تیتراسیون ویروس	ناتمام	
۵	۲,۲,۵	خرید مواد لازم برای آماده سازی نمونه جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی	ناتمام	
۶	۲,۲,۶	خرید غذای میگو	تمام	
۷	۲,۲,۷	خرید موادضدعفونی کننده		
۷	۲,۲,۸	خرید ازت مایع	ناتمام	
۸	۲,۲,۹	ارائه اسناد و مدارک مربوط به خرید مواد	ناتمام	

جدول اطلاعات عمومی و فنی اقلام خریداری شده

کد WBS	عنوان فعالیت در شکست کار	نام کالا	واحد	تعداد / مقدار	تاریخ خرید	تاریخ تحویل	محل نصب یا استقرار*	شماره سریال*
۲,۲,۱	کرای فیش	کرای فیش	عدد یا کیلوگرم	۲۰۰ عدد و ۱۰۵ کیلوگرم	۸۸/۷/۱۳ و ۸۸/۸/۱۱ و۸۹,٤,۱۱ , ۸۹/۸/۲	۸۸/۷/۱۳ و ۸۸/۸/۱۱	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی، گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی و آزمایشگاه آبزیان	
۲,۲,۲	کیت PCR	کیت PCR باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس و ایمیونوژن	کیت یک پتریدیش باکتری	دو		۱۳۸۷/۱۲/۲۶, ۸۹/۸/۲		
۲,۲,۳	محرک ایمنی							
۲,۲,٤	مواد مصرفی جهت تهیه استوک، تخلیص و تیتراسیون ویروس	رک سر سمپلر، میکروتیوپ ۰,۲ ، رک میکروتیوپ، سرسمپلر زرد- آبی و کریستالی، میکروتیوپ ۱/۵، سرنگ ۱, ۲ و ۵ , نخ نایلونی،چسب نواری، پاکت فریزر، لوله فالکون، آگارز، بوریک اسید، EDTA، SDS، Proteinase K، اتیدیوم بروماید	سوش خالص، کیلوگرم عدد، بسته، عدد، بسته، بسته، عدد، متر، عدد، بسته، بسته، گرم، گرم، گرم، گرم، میلی‌لیتر، میلی‌لیتر، گرم، میلی‌لیتر، میلی‌لیتر، گرم، عدد، جفت، میلی‌لیتر، گرم، کیلوگرم، کیلوگرم، کیلوگرم، لیتر، لیتر، کیت، عدد، عدد، عدد، بسته، بسته، عدد، عدد، عدد، کیت	یک, ۷۵ ۱۰، ۲، ٤، هر رنگ سر سمپلر ۳ بسته، ۲، ۲۰۰، ۱۰، ۱، ٤، ۲، ۲۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۲، ۲، ۲، ۲۰۰، ۵۰، ۵۰۰، ۳، ۲، ۶۰۰، ۱۰۰، ۱، ۱، ۱، ۱، ۱، ۱، ۱، ۱، ۱، ۱، ۱۸۵، ۲، ٤٤، ٤، ۱۰، ٤، ۱	۱۳۸۷/۱۲/۲۶ و تیر ۸۱ ۸۹/۳ و ۸۹/٤ در طی یکسال اول پروژه	۸۹/۳ و ۸۹/٤ طی دو سال پروژه	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی، گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی و آزمایشگاه آبزیان	
۲,۲,۵		سا کارز، DMSO ، سدیم استات، تریس، مگنت ۳ سانت و مگنت گیر، دستکش نسوز ، الکل مطلق، استات پتاسیم، گلوکز، کلرایدسدیم، تری سدیم سیترات، ایزوامیل الکل، فرمالین ۳۷٪، کیت استخراج DNA، رک سر سمپلر فیلتردار، هولدر فیلتر ۲۵mm ، کشوی ۵ طبقه، سرنگ ۲ و ۵ سی‌سی، ماسک یکبار مصرف، سرنگ انسولین، دستکش لاتکس، آنتی بیوتیک، روبوش، کیت استخراج DNA، سرسمپلر آبی فیلتر ۰,۲۲، فیلتر ۰,٤۵، فیلم ۱۲۰ سیاه وسفید و ظهور		خرداد ۱۳۸۹ ۱۳۸۸,۷,۱۲ آبان لغایت اسفند ۱۳۸۸ و	کرج، پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی، گروه کشاورزی هسته‌ای، آزمایشگاه علوم دامی و آزمایشگاه آبزیان	
۲,۲,۶								
۲,۲,۷								
۲,۲,۸								
۲,۲,۹								

ردیف	نام مواد	شرکت تامین کننده/ سازنده	مارک	تعداد/مقدار	قیمت (ریال)
۱	کرای فیش (شاه میگوی زنده)	شرکت تعاونی بهار دشت نیم ور	شاه میگوی زنده	۲۰۰ عدد	۲۰۰۰۰۰۰
۲	کرای فیش (شاه میگوی زنده) و یونولیت برای حمل آنها	ماهی فروشی آرازبالیغی	شاه میگوی زنده	۱۰۵ کیلوگرم, ۱۵ عدد	۱۹۴۹۰۰۰
۳	کیت PCR برای تشخیص ویروس لکه سفیدی میگو	مهر آذر / IQ2000 TM	IQ2000	۲ کیت	۳۱،۰۰۰،۰۰۰
۴	میکروتیوپ ۰,۲ میلی‌لیتری	پاستور نو	سایتوتست	۱ بسته	۱۷۰۰۰۰
۵	رک سر سمپلر	پاستور نو	سایتوتست	۸ عدد	۷۰۶۰۰۰
۶	رک میکروتیوپ	پاستور نو	سایتوتست	۲ عدد	۱۱۰۰۰۰
۷	سرسمپلر زرد	پاستور نو	سایتوتست	۵ بسته	۴۰۰۰۰۰
۸	سرسمپلر کریستالی	پاستور نو	سایتوتست	۳ بسته	۷۰۰۰۰۰
۹	میکروتیوپ ۱/۵	پاستور نو و هیمیانوآزما	سایتوتست	۳ بسته	۳۸۵۰۰۰
۱۰	سرنگ ۱۰ ، ۵ و ۲سی سی	داروخانه	Soha	۳۰۰عدد	۳۰۰۰۰۰
۱۱	نخ نایلونی	-	-	۱۰ متر	۴۰۰۰
۱۲	جسب نواری	-	-	۱ عدد	۶۰۰۰
۱۳	پاکت فریزر	-	-	۲ بسته	۱۰۰۰۰
۱۴	*روپوش آزمایشگاهی	فروشگاه پزشکی عباسی	مخصوص آزمایشگاه	دو عدد	۲۸۰۰۰۰
۱۵	لوله فالکون	تکنوژن کا	greiner	۸ بسته	۸۰۰۰۰۰
۱۶	آگارز	هیمیانوآزما	CinnaGen	۱۵۰ گرم	۲۶۰۰۰۰۰
۱۷	بوریک اسید	هیمیانوآزما	CinnaGen	۵۰۰ گرم	۲۰۰۰۰۰
۱۸	EDTA	هیمیانوآزما	CinnaGen	۵۰ گرم	۷۶۰۰۰
۱۹	SDS	هیمیانوآزما	CinnaGen	۵۰ گرم	۸۰۰۰۰
۲۰	Proteinase K	هیمیانوآزما	Fermentas	۱ میلی لیتر	۴۰۲۴۰۰
۲۱	اتیدیوم بروماید	هیمیانوآزما و قائم	CinnaGen	۲ میلی‌لیتر	۱۷۶۰۰۰
۲۲	سدیم استات	هیمیانوآزما	CinnaGen	۵ میلی‌لیتر	۴۸۰۰۰
۲۳	DMSO	هیمیانوآزما	CinnaGen و قائم	۳۰ میلی‌لیتر	۱۸۷۰۰۰
۲۴	ساکارز	پاستورنو	مرک	۱ کیلوگرم	۴۴۰۰۰۰
۲۵	تریس	پاستورنو	مرک	۱ بسته	۵۹۰۰۰۰
۲۶	مگنت ۳ سانت و مگنت گیر	پاستورنو	-	۱ عدد	۷۵۰۰۰
۲۷	*نترینت آگار	پاستورنو	مرک	۱ بسته	۷۳۵۰۰۰
۲۸	*محیط کشت TCBS	پاستورنو	مرک	۱ بسته	۹۶۰۰۰۰
۲۹	*محیط کشت کازوبرات	پاستورنو	مرک	۱ بسته	۵۴۰۰۰۰
۳۰	دستکش نسوز	ایمن گاما شعبه ۲	BMW	دو جفت	۵۰۰۰۰
۳۱	الکل مطلق	هیمیانوآزما	جهان الکل طب	۶۰۰ سی‌سی	۵۰۰۰۰
۳۲	استات پتاسیم	شرکت فراطب گستر	مرک	۱۰۰ گرم	۳۸۰۰۰۰
۳۳	گلوکز	شرکت فراطب گستر	مرک	۱ کیلو	۳۴۰۰۰۰
۳۴	کلراید سدیم	شرکت فراطب گستر	مرک	۱ کیلو	۲۰۰۰۰۰
۳۵	تری سدیم سیترات	شرکت فراطب گستر و قائم	مرک	دو بسته	۶۲۰۰۰۰
۳۶	*گلیسرول	شرکت فراطب گستر	مرک	۱ لیتر	۴۸۰۰۰۰

۳۷	ایزوامیل الکل	شرکت فراطب گستر	مرک	۱ لیتر	۳۸۰۰۰۰
۳۸	سر سمپلر آبی	شرکت فراطب گستر	سایتوتست	۱ بسته	۵۰۰۰۰
۳۹	رک میکروتیوپ ۰,۲ میلی لیتری	شرکت فراطب گستر	سایتوتست	۱ عدد	۸۵۰۰۰
۴۰	فرمالین ۳۷٪	شرکت فراطب گستر	مرک	۱ لیتر	۲۰۰۰۰۰
۴۱	کیت استخراج DNA	شرکت فراطب گستر / شرکت Roche	Roche	دو کیت	۶۹۰۰۰۰۰
۴۲	رک سر سمپلر فیلتردار	شرکت فراطب گستر	سایتوتست	یک عدد	۱۸۰۰۰۰
۴۳	هولدر فیلتر ۲۵mm	شرکت فراطب گستر	S&s Watman	یک عدد	۳۸۰۰۰۰
۴۴	کشوی ۵ طبقه	فروشگاه پلاسکو مرکزی	پلاستیکی	یک عدد	۵۰۰۰۰
۴۵	دستکش لاتکس	داروخانه دکتر بیات		چهار بسته	۲۰۰۰۰۰
۴۶	ماسک یکبار مصرف	داروخانه دکتر بیات		دو بسته	۱۵۰۰۰۰
۴۷	سرنگ انسولین	داروخانه دکتر بیات		۳۴ بسته	۳۴۰۰۰۰
۴۸	سرنگ ۲ و ۵ سی‌سی	داروخانه دکتر ره‌روان		۱۹۰	۲۰۰۰۰۰
۴۹	آنتی بیوتیک (امفوتریپسین بی)	داروخانه دکتر میرخانی		۱۰ عدد	۷۵۰۰
۵۰	ایزواکتان	قائم	مرک	یک لیتر	۹۰۰۰۰۰
۵۱	مالشیت گرین	قائم	مرک	۲۵ گرم	۸۰۰۰۰۰
۵۲	فیلتر ۰/۴۵ میکرون	قائم	میلی پور	یک بسته	۵۰۰۰۰۰
۵۳	پیتون واتر	قائم	مرک	۱۰۰ گرم	۴۰۰۰۰۰
۵۴	کرم یا میگو منجمد	جهان آکواریوم		۱۷ بسته	۲۶۰۰۰۰
۵۵	فیلم ۱۲۰ سیاه وسفید و ظهور فیلم و چاپ عکس	لابراتور عکس سیمرغ	برای مشاهده ویروس با میکروسکوپ الکترونی	یک عدد	۱۱۶۰۰۰
۵۶	مواد ضد عفونی کننده (بنزالدئید)	داروخانه دامپزشکی تهران	برای ضدعفونی تانکها و استخر	۱۲ گالن	۷۰۰۰۰۰
۵۷	غذای میگو	ابزی گشت	غذا	۳۰۱ کیلوگرم	۶۴۳۰۰۰۰
۵۸	کاهو	سوپر میوه مهر	غذا	۲,۵ کیلوگرم	۱۴۰۰۰
۵۹	کرم یا میگو منجمد	جهان آکواریوم	غذا	۶۰ بسته	۷۰۰۰۰۰
۶۰	شارژ کارتریژ کامپیوتر	شرکت تکثیران	برای تهیه گزارشات	یک عدد	۱۰۰۰۰۰
۶۱	سبد پلاستیکی اکواریومی (بجای ۱۵ تانک ۳۰۰ لیتری)	فروشگاه نیک پن		۵۴ عدد	۳۲۱۶۰۰۰
۶۲	ازت مایع	پژوهشگاه	برای نگهداری ویروس	۳۰۰ لیتر	-

Abstract:
The inactivated of white spot syndrome virus (WSSV) by Gama and Electron radiation and chemical material such as Formalin with antigen property have been done during last year. At the first time the stock of virus prepared and purred it. Six hundred of shrimp *Fenneropenaus indicus* with average weight 7 to 12 gram collected from shrimp research station in Heleh area and transported to Shrimp Research Institute in Boushehr province. *Vibrio parahemolyticus* obtained from Veterinary University of Tehran and then lyophilized it. The bacterial *V. parahemolyticus* inactivated with Gamma, electron and formalin and then injected to shrimp for activated the immune system. The source of viruses was identified through PCR, TEM and histopathology methods from the shrimp infected in 2009 occurrence of boushehr province. The virus injected to crayfish and collected the hemlymph for prepared the stock of WSSV virus. The virus was lyophilized and then exposed to gamma and electron radiation and formalin with optimal dose for inactivated the virus. The shrimp divided to 25 groups and each group consist of six shrimp and the vaccine exposed to shrimp with injected and bathroom methods and the documented the result after 15 days. In vivo virus titration was performed in *Penaeus indicus*. Inactivation of WSSV was carried out by a gamma cell instrument Nordian, model 220 with dose rate: 4.8 Gy/sec and activity: 20469 Ci. The LD_{50} of live virus stock was calculated $10^{5.4}$ / ml and the optimum dose of gamma radiation beam to inactivate WSSV was obtained 14-15 kGy. The LD_{50} of live virus stock was calculated $10^{5.4}$ / ml and the optimum dose of electron beam to inactivate WSSV was obtained 12-13 kGy and and the virus inactivated by formalin 0.5% V/V during 10 minutes.The LD_{50} of live virus stock was calculated by Karber method $10^{3.29}$ /ml and $10^{5.35}$ /ml, respectively. The *V. parahemolyticus* was inactivated with 8 KG. The result showed all vaccine during 2 hours have a good effect to shrimp viruses with the$10^{2.4}$ LD_{50} / 50 µl titre. The result showed if the Gamma and electron vaccine increase to feed of shrimp the effect of vaccine is better than when used without feed. The end of experiment our study showed that the Gamma vaccine has the better effect to control WSSV during 2 hours with comparing the others.
Key words: Vaccine, White Spot Syndrome Virus, Gamma Radiation, Electron Radiation, Formalin, *Penaeus indicus*.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION

Title : Preparation of inactivated vaccine to induce resistance against White Spot Syndrome Virus by nuclear & non nuclear techniques
Apprpved Number:34-14-1252-88006
Author: Mohammad Afsharnasab
Executors : M. Afsharnasab,F.Moatamedisadeh
Collaborator *:* A. Dashtyannasab, S. R. Mortezaei, E. Gorfi, V.Yegane, M.Gangor, B.Gherevi, A. Abedyan, Kh. Pazir, Allakeram Mohamadi,Gh.Gharibi
Advisor(s):
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2009
Period of execution : *2 Years*
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : 20
Date of publishing : 2011
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION

Title:

Preparation of inactivated vaccine to induce resistance against White Spot Syndrome Virus by nuclear & non nuclear techniques

Executor :
Mohammad Afsharnasab

Registration Number
2011.312