وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

امکان سنجی تولید واکسن بیماری لکه سفید با استفاده از اشعه گاما

مجری :
محمد افشار نسب

شماره ثبت
٤٥٨٠٦

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان طرح : امکان سنجی تولید واکسن بیماری لکه سفید با استفاده ازاشعه گاما
شماره مصوب طرح : ۹۱۵۸-۱۲-۱۲-۰۱٤
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) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد افشار نسب
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عباسعلی مطلبی – مصطفی شریف روحانی – محمد خلیلی پذیر-بابک قائدنیا- شاپور کاکولکی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۹۱/۱۰/۱
مدت اجرا : ۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹٤
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 مسئول / مجری»

طرح : امکان سنجی تولید واکسن بیماری لکه سفید با استفاده ازاشعه گاما

کد مصوب : ۹۱۵۸-۱۲-۱۲-۰۱٤

شماره ثبت (فروست) : ٤٥٨٠٦ تاریخ : ۹۳/٦/۲۵

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد افشار نسب دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

طرح توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تـاریخ ۹۳/۵/۱۹ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز□ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱-اهداف اصلی پروژه ۶
۱-۲-آشنائی با بیماری لکه سفید ۶
۱-۳-سوابق تحقیق ۱۰
۱-۴-آسیب شناسی ۱۱
۱-۵-مطالعات میکروسکوپ الکترونی ۱۲
۱-۶-مطالعات بیماری با استفاده از روش (PCR) ۱۲
۱-۷-سیستم ایمنی سخت پوستان ۱۳
۱-۸-هموسیتها ۱۴
۱-۹-ورود ویروسهای پوشش‌دار به سلول (Enveloped virus entry) ۲۶
۱-۱۰-دفاع ضدویروسی (Antiviral defense) ۲۸
۱-۱۱-مکانیسم های گریز ویروسها از سیستم دفاعی میزبان ۳۰
۱-۱۲-واکسنها ۳۱
۱-۱۳-کاربرد روش‌های هسته‌ای در تهیه واکسن‌های غیرفعال شده ۳۳
۱-۱۴-غیرفعالسازی ویروس ۳۴
۱-۱۵-اثر پرتوهای یونساز بر روی میکروارگانیسم ها ۳۵
۱-۱۶-رادیو واکسن‌ها و پروتئینهای نوترکیب ۳۸
۲-مواد و روشها ۴۰
۲-۱-مراحل تهیه رادیوواکسن بیماری ویروسی لکه سفید در میگو ۴۰
۲-۲-آماده سازی سالن نگهداری میگو ۴۴
۲-۳-تهیه پست لارو میگو، انتقال به آزمایشگاه و تقسیم کردن آنها به تانکهای پرورش ۴۵
۲-۴-آزمون بیومتری ۴۹
۲-۵-آسپیراسیون همولمف و تعیین شاخص های سلامتی (THC و TPP) ۴۹
۲-۶-مراحل آزمایش ۵۱
۲-۷-تعیین فعالیت فاگوسیتی هموسیت ها ۵۱
۲-۸-آزمایش هیستوپاتولوژی ۵۲

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۹-۲-تعیین درصد بقاء نسبی میگوهای ایمن سازی شده پس از مواجهه با ویروس زنده.....۵۵
۱۰-۲-آنالیزهای آماری ۵۶
۳-نتایج ۵۷
۱-۳-نتیجه تایید آلودگی نمونه های میگو به ویروس لکه سفید ۵۷
۲-۳-نتیجه تایید آزمون Nested PCR بافت و همولنف خرچنگ های عفونی شده با استوک ویروس ۵۷
۳-۳-نتیجه تیتراسیون ویروس ۵۸
۴-۳-نتیجه تعیین تیتر نمونههای ویروس پرتوتابی شده ۵۹
۵-۳-نتیجه آزمون بی ضرری ۶۰
۶-۳-فرمولاسیون واکسن ۶۰
۷-۳-نتایج آزمون بیومتری ۶۱
۸-۳-تعیین مقادیر مربوط به شاخص های رشد در تیمارهای مختلف ۶۴
۹-۳-مقایسه میانگین وزن و طول پست لاروهای واکسینه و غیر واکسینه تیمارهای مختلف.....۶۹
۱۰-۳-نتایج میزان بقا.....۷۵
۱۱-۳-نتایج بررسی سلولهای ایمنی همولنف میگوها (THC, DHC , TPP) ۷۹
۱۲-۳-نتایج آزمون PCR.....۸۸
۴-بحث.....۸۹
منابع ۹۵
چکیده انگلیسی.....۹۹

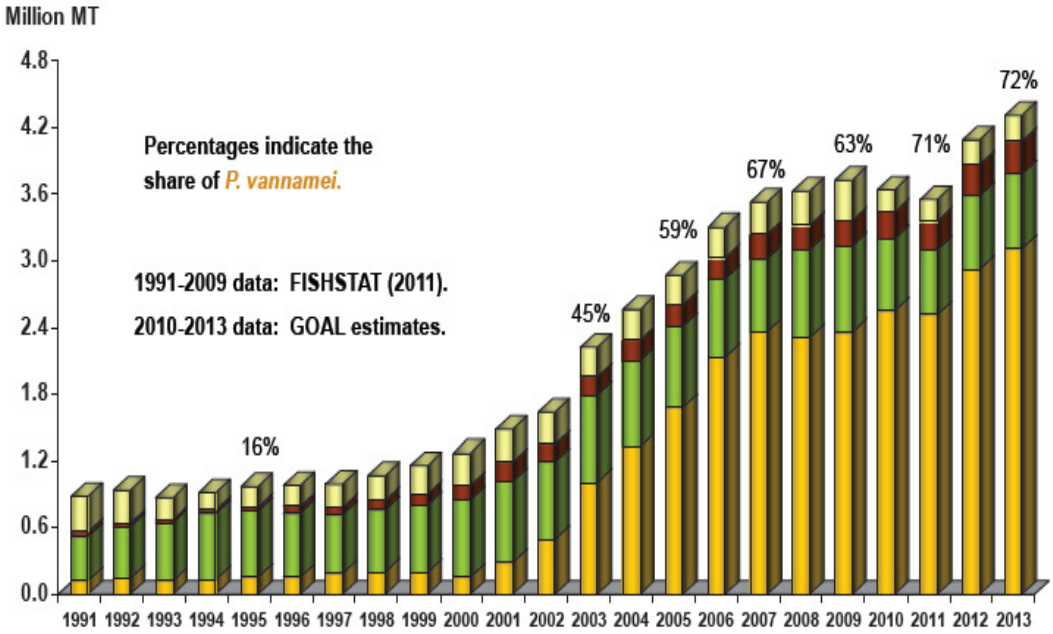
چکیده

به منظور بررسی تاثیر واکسن ویروس بیماری لکه سفید تولیدی تخفیف حدت یافته با استفاده از اشعه گاما بر روی میگوی پاسفید غربی(*Litopenaeus vannamei*) ۱۴۰۰۰ عدد پست لارو ۳روزه از مرکز تکثیر بندر کلاهی واقع در استان هرمزگان تهیه گردید و در ۱۴گروه ۱۰۰۰ تائی در آزمایشگاه پژوهشکده میگوی کشور ذخیره سازی گردید. بعد از آداپتاسیون آنها را به سالن مواجهه که از قبل آماده شده بود، منتقل نموده و به سه گروه پست لاروهای واکسینه ۵ و ۱۵روزه و پست لاروهای ۱۲ و ۲۶ روزه با ویروس و بدون مواجهه با ویروس و یک گروه نیز بدون واکسن و بدون ویروس تقسیم و با دو روش غوطه وری و تزریقی با واکسن و ویروس مواجهه نمودیم. با توجه به نتایج محاسبه میزان بقا و تلفات در گروه های پست لارو میگو واکسینه شده و نشده نشان می دهد که استفاده از این رادیوواکسن به روش غوطه وری در پست لاروهای میگوی ۵ تا ۱۵ روزه در دو نوبت واکسیناسیون به فاصله ۱۰ تا ۱۴ روز به طور معنی داری باعث ۲۴ و ۳۹ درصد کاهش تلفات در میگوهای واکسینه شده بر ضد ویروس لکه سفید نسبت به گروه شاهد به ترتیب در زمان های ۳۵ و ۴۵ روز پس از آخرین واکسیناسیون می گردد. همچنین درصد بقا نسبی در طی دوره ایمنی ۱۵ روز شروع به افزایش یافته تا زمان ۳۵ روز به حداکثر می رسد و مجدداً کاهش می یابد و با توجه به اینکه در این تحقیق تا زمان ۴۵ روز پس از آخرین زمان واکسیناسیون بررسی ها ادامه یافت نشان داد که درصد بقا نسبی در زمان ۳۵ روز ۷۶٪ بوده در زمان ۴۵ روز به ۶۱٪ کاهش یافته است. با توجه به مقایسه میانگین ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه با آزمون LSD گروه کنترل مثبت با دو گروه واکسینه شده به روشهای غوطه وری و تزریقی که مواجهه با ویروس هم شده اند اختلاف معنی داری در تعداد هموسیت کل نشان نداده ($P>0.05$)ولی در پروتئین پلاسمای کل اختلاف معنی دار نشان میدهند($P<0.05$). در حالیکه کنترل مثبت با گروه کنترل منفی و گروه واکسینه شده بدون مواجهه با ویروس زنده اختلاف معنی داری هم در تعداد پروتئین پلاسمای کل و هم هموسیت کل اختلاف معنی دار نشان میدهند($P<0.05$). نتایج حاصله تغییرات آسیب شناسی مشخص ناشی از تاثیر ویروس در میگوهای واکسنه با غیر واکسینه مواجهه شده با ویروس و عدم مواجهه با ویروس را نشان داد. تغییرات ناشی از ویروس بیماری لکه سفید که با مشاهده کنجیدگیهای Cowdry type A مشخص می‌شود در گروههای واکسینه کمتر از گروههای مواجهه با ویروس و بدون واکسن می‌باشد.

کلمات کلیدی: میگوی پاسفید غربی، واکسن بیماری لکه سفید، ویروس بیماری لکه سفید، میزان بقا

۱-مقدمه

پرورش میگو در دنیا دارای سابقه نسبتا" طولانی است و پرورش تجاری آن به سالهای نخست دهه ۱۹۷۰ میلادی و به کشور ژاپن برمی‌گردد. تکثیر مصنوعی میگو برای نخستین بار توسط Hudinage انجام گرفت. او در سال ۱۹۴۲ میلادی توانست لارو میگوی پنئوس ژاپونیکوس را پرورش داده و به مرحله پست لاروی برساند(صدیق مروستی،۱۳۷۰). هم اکنون پرورش میگو در دنیا رشد افزاینده‌ایی یافته و پیش بینی می‌شود که در سال ۲۰۱۳ تولید میگو به رقم ۴/۲ میلیون تن برسد (نمودار ۱). دراین میان سهم میگوی وانامی به حدود ۷۲٪ می‌رسد (Valderrama & Anderson, 2011).



نمودار ۱: تولید میگوی پرورشی تاسال ۲۰۱۲ و پیش بینی تا سال ۲۰۱۳ دردنیا

در این میان تولید میگودر ایران تا سال ۲۰۱۱میلادی یا ۱۳۹۱ خورشیدی بالغ بر ۱۲ هزارتن بوده و پیش بینی میشود در سال ۲۰۱۳ میلادی مطابق با ۱۳۹۲ خورشیدی به رقم ۱۲ هزارتن برسد (نمودار ۱). براساس گزارش ارائه شده توسط Valderrama و Anderson (۲۰۱۱) از مهمترین چالش‌های پرورش میگو موضوع بیماریها بوده و سالیانه از ناحیه بیماریهای میگو بالغ بر ۲۲٪ از میگوی تولیدی در دنیا از بین رفته که رقمی معادل ۶ میلیارد دلار سالیانه به این صنعت خسارت وارد می‌شود.

از زمان شروع صنعت تکثیر و پرورش میگو از سال ۱۹۷۰تا کنون،بیش از پنجاه کشور به توسعه این صنعت مبادرت ورزیده اند، به‌طوریکه حجم بالائی از تولیدات آبزیان این کشورها به میگوی پرورشی به‌ویژه میگوهای اقتصادی خانواده پنائیده اختصاص یافته است که دارای ارزشی بیش از ده میلیون دلار در سال می‌باشند(Van Hulten et al., 2000). با وجود گونه‌های میگو که مناسب تکثیر و پرورش می‌باشند، صنعت آبزی پروری در این

بخش به سرعت توسعه یافت به گونه‌ای که در سال ۲۰۱۱ میلادی تولید میگوی پرورشی در جهان به رقمی بالغ بر ۴ میلیون تن رسید (Johnsona et al., 2008; FAO, 2013)

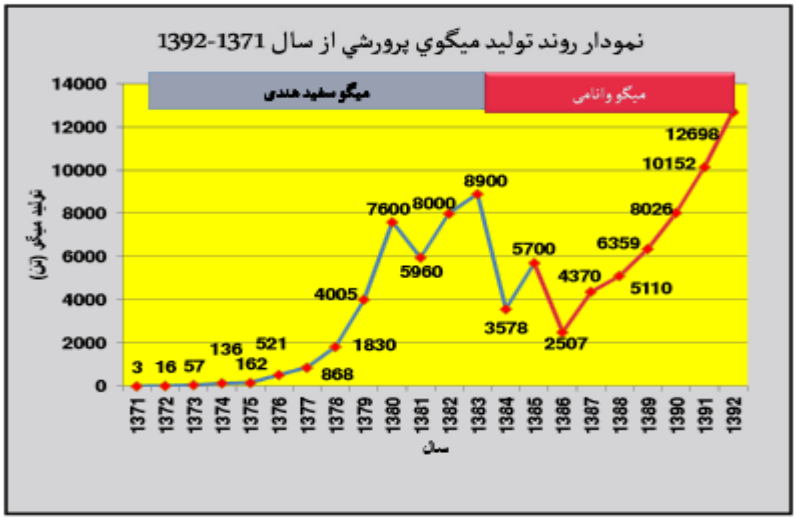
شکی نیست که بیماری، مشکل درجه یک تأثیر گذار بر حیات اقتصادی وپایداری دراز مدت صنعت پرورش میگو است. این صنعت دراین زمینه با دیگر فعالیت‌های کشاورزی هیچ تفاوتی ندارد. از دید مدیریتی،همواره پیشگیری از بیماریها بهتر از تلاش برای مبارزه ودرمان آنها بعد از وقوع است. یکی از چالشهای اصلی صنعت آبزی پروری مساله بهداشت و بیماریهای آبزیان است به‌طوری‌که بیماریهای آبزیان سالیانه میلیون‌ها دلار به پرورش‌دهندگان ماهی و میگو خسارت وارد می‌سازند.به همین دلیل بهداشت و بیماری‌های آبزیان از موضوعات مهم در توسعه آبزی‌پروری محسوب می‌شود. با توجه به گسترش فعالیت‌های آبزی پروری در سطح ملی، منطقه-ای و بین المللی، تعداد بیماریهای نوظهور (Emerge) در حال افزایش بوده و روز به‌روز بر تعداد آنها افزوده می-شود. در خانواده سخت پوستان به‌خصوص میگو تاکنون۲۰ 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 شده‌اند(Lightner, 1996; Muhammad Meezanur Rahman, 2007) بیماری‌های ویروسی همانند بیماری ویروسی لکه سفید(White spot syndrome virus)، بیماری ویروسی کله زرد((Yellow head virus)،بیماری ویروسی سندروم تورآ(Tura syndrome virus)، بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم (Infection Hypodermal and hematopoietic necrosis virus)، بیماری باکیولوویروس مونودن(Monodon baculovirus)، بیماری نکروز عفونی عضلات(Infection myonecrosis virus) همواره به عنوان عوامل بیماریزای ویروسی این صنعت را مورد تهدید قرار داده اند (افشار نسب، ۱۳۸۶). از این میان بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهمترین بیماریهای ویروسی شایع در مزارع پرورشی میگو و سایر سخت پوستان می باشد (Lightner, 1996).

در میان بیماری‌های ویروسی میگو، بیماری لکه سفید در کلیه گونه‌ها گزارش شده وبا مرگ و میر ۱۰۰ درصدی در مدت ۳ الی ۱۰ روز، 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 این صنعت شده است و از مهمترین بیماری‌های میگوهای خانواده پناییده بالاخص *L.vannamei* و *L.stylirostns* میباشد(Flegel, 2006).

بروز بیماری لکه سفید در صنعت تکثیر و پرورش میگو از سال ۱۹۹۲ برای اولین بار در تایوان مشاهده شد 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، پرورش دهندگان آسیایی مایل به استفاده از گونه وانامی شدندزیرا به نظر می‌رسد گونه وانامی در مقابل بیماری‌های میگو به‌خصوص بیماری لکه سفید مقاومت بیشتری دارد(Briggs et al., 2004) باورود گونه وانامی به صنعت تکثیر و پرورش میگو، تکثیر و تولید آن به شدت

توسعه یافت و جای گونه ببری سیاه (*Penaeus monodon*) را گرفت، به‌طوریکه امروزه بیش از ۹۰٪ تولیدات میگوی پرورشی جهان به گونه وانامی اختصاص یافته است (FAO, 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 وارد آمدن خسارت سنگینی به صنعت پرورش میگو گردید. با توجه به بروز این بیماری از سال ۱۳۸۳ مؤسسه تحقیقات شیلات ایران اقدام به واردات میگوی گونه وانامی از هاوائی آمریکا نمود که 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 نگردید. نمودار ۲ میزان تولید در کشور را از سال ۱۳۷۳ تا سال ۱۳۹۲ نشان می دهد(مجموعه مقالات سندرم مرگ زود رس، ۱۳۹۳).



نمودار ۲: میزان تولید میگو در کشور را از سال ۱۳۷۳ تا سال ۱۳۹۲

براساس گزارش فائو سالانه بالغ بر سه میلیارد دلار از طریق بیماریهای میگو بالاخص بیماری لکه سفید به صنعت تکثیر و پرورش میگو خسارت وارد شده و کاهش ۴۰٪ را در تولید میگو ایجاد می‌کند. ویروس این بیماری متعلق به خانواده جدیدی ار ویروسها به‌نام Nimavirideaو جنس Wispovirusاست،که نه تنها در میگو بلکه در کلیه سخت پوستان موجب بیماری شده و تعداد زیادی ازآبزیان و سخت پوستان ناقل این ویروس می‌باشند) در میگو و سایر سخت‌پوستان 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 ندارد. همچنین استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و سایر مواد شیمیائی نیز به‌طور وسیعی در کنترل و پیشگیری از بیماری‌های

مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی به‌دلیل 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 آنتی‌بیوتیکها 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 به‌دلیل ضعف سیستم ایمنی نمی-تواند به مثابه موجودات عالی به واکسنها پاسخ دهد ولی از مواد تقویت‌کننده سسیتم ایمنی برای افزایش مقاومت این موجودات در مقابل ویروسها استفاده وسیعی می‌شود. به عنوان مثال از لیپوپلی ساکاریدها در میگوی ژاپنی(*P. Japonicas*) ، گلوکان درمیگوی ببری سیاه *(P. monodon)* وجلبک‌های دریائی سارگاسوم و پادینا در میگوی ببری سبز استفاده شده و تاثیرات موثری در کنترل بیماری دراین گونه از میگوها داشته است (افشارنسب ، 1386) .

با این وجود یک سیستم شبه ایمنی علیه ویروس لکه سفید در میگو تشخیص داده شده است (Choi *et al*., 2011) به گونه‌ای که میگوهایی که پس از شیوع بیماری ویروسی لکه سفید زنده مانده‌اند، در مواجه مجدد با این ویروس بعد از گذشت ۴ ماه، درصد بقاء نسبی ۹۴٪ را نشان دادند که این حالت در میگوهایی که یکبار آلوده شده‌اند می‌تواند تأییدی بر تقویت سیستم شبه ایمنی باشد. مطالعه دیگری مشاهده نوعی از مقاومت پیشرفته در میگوهای بازمانده از آلودگی ویروسی لکه سفید عنوان شد که این حالت ممکن است ناشی از یک فاکتور خنثی کننده ناشناخته در پلاسمای میگوها باشد (Motamedi Sedeh *et al*., 2008)

همچنین Van Hulten و همکاران (۲۰۰۰) عنوان نمودند که میزان بقاء میگوهای بازمانده از شیوع بیماری ویروسی لکه سفید پس از مواجهه مجدد با این ویروس در مقایسه با میگوهای که تاکنون آلوده نشده‌اند، بیشتر می باشد. از سوی دیگر عنوان شد که در پلاسمای میگوهای آلوده شده به ویروس یک فعالیت خنثی‌کنندگی شکل می‌گیرد که تا حدودی می تواند موجب جلوگیری از فعالیت ویروس و افزایش بقاء میگوها شود. لذا مطالعات صورت گرفته مشخص کرد که یک پاسخ شبه ایمنی سه هفته پس از عفونت اولیه شروع شده و تا هفته چهارم پیشرفت کرده و تا انتهای ماه دوم پایدار باقی خواهد ماند (Jiravanichpaisal *et al*., 2001).

همچنین طی سالهای اخیر از واکسن‌ها یا ترکیبات شبه واکسنی مثل واکسنهای غیر فعال شده WSSV، و واکسنهای نوترکیب(Recombinant) علیه بیماری لکه سفید استفاده شده و نتایج قابل قبولی به‌همراه داشته است. تکنولوژیهای جدید از جمله واکسنهای نوترکیب و DNA واکسنها از روشهای مهمی هستند که در آینده می-توانند برای پیشگیری و کنترل بیماری لکه سفید مورد توجه قرار گیرند(افشارنسب و همکاران، ۱۳۹۰). در این

طرح با توجه به نتایج حاصل از فاز اول طرح مبنی بر استفاده از سه روش اشعه گاما، بیم الکترون و فرمالین مشخص گردید که اشعه گاما تاثیر بالاتری در غیر فعال سازی ویروس لکه سفید دارد. در فاز دوم طرح، واکسن تخفیف حدت یافته با اشعه گاما را در پست لاروهای میگوی پاسفید غربی با دو روش غوطه‌وری و تزریقی مورد مطالعه قرار داده و میزان بقا و افزایش سطوح ایمنی را مورد بررسی قرار میدهیم.

۱-۱-اهداف اصلی پروژه

- تعیین دوز مناسب واکسن تولیدی در پیشگیری از بیماری
- تعیین بهترین روش استفاده از واکسن در میگو
- تاثیر واکسن در بازماندگی میگوهای آلوده
- ارائه روشی برای پیشگیری از بیماری لکه سفید
- افزایش تولید در واحدهای تکثیر و پرورش میگو
- تلاش در جهت افزایش اشتغال در واحدهای تولیدی با پیشگیری از بیماری لکه سفید

۲-۱-آشنائی با بیماری لکه سفید

۱-۲-۱-عامل بیماری

عامل ایجاد کننده بیماری لکه سفید(WSSV) یکی از بزرگترین ویروسهای جداشده از میگو می‌باشد. ویروس بیماری به شکل تخم مرغی تا میله‌ای شکل متغیر بوده و دارای یک زائده دم مانند (دلیل نامگذاری این خانواده، به دلیل وجود زائده دم مانند می‌باشد زیرا نیمابه معنی نخ و زائده است)می‌باشد. ویریون‌ها شامل یک مولکول دی ان آی دورشته‌ای بزرگ هستند که در یک نوکلئوکپسید میله‌ای شکل همراه با غشاء پیچیده شده است. نوکلئوکپسیدها دارای ظاهر مخطط هستند. ژنوم ویروس در حدود ۱۸۰ رمزگردان (بسته به واریته ویروس) را رمز گذاری می‌کند (Yang et al., 2001; Van Hulten et al., 2001) در اندازه ژنوم ویروس اختلاف نظر وجود دارد، محدوده‌ای از ۲۹۲۹۶۷ جفت باز مربوط به جدایه تایلند با شماره دسترسی AF369029 در بانک ژن (Van Hulten et al., 2001) ۳۰۵۱۰۷ جفت باز مربوط به جدایه چین با شماره دسترسی AF332093 در بانک ژن (Yang et al., 2001) تا ۳۰۷۲۸۷ جفت باز مربوط به جدایه تایوان با شماره دسترسی AF440570 در بانک ژن. با این حال توالی‌های به اشتراک گذاشته شده توسط این ژنوم‌ها تقریباً یکسان بوده و همسانی نوکلئوتیدی، ۹۹/۳ درصد می‌باشد. اختلاف اندازه‌ها بیشتر ناشی از چندین حذف و اضافه کوچک در نواحی با تکرارپذیری دی ان آی تا تغییر پذیری ژنتیکی در یک ناحیه حدود ۷۵۰ جفت باز و یک حذف بزرگ با اندازه تقریبی ۱۳ کیلو جفت باز است (Marks et al., 2004) یک ویروس با ژنومی حدود ۵ کیلوجفت باز بزرگتر از آخرین جدایه تعیین توالی شده کشف شد. این جدایه ممکن است نیای مشترک بالقوه جدایه‌های ویروس تا سال ۲۰۰۵ محسوب شود

(Marks et al., 2004). در مقایسه ویریون ها حداقل ۵۰ پروتئین ساختاری که در سه لایه مجزا از لحاظ ریخت شناسی مرتب شده اند وجود دارد (Li et al., 2006;) با تأکید بر موقعیت تاکسونومیک ویروس لکه سفید، بیشتر رمزگردان ها در صورت وجود، دارای سطح پائینی از شباهت اسیدآمینه‌ای در مقایسه با پروتئین هایی از دیگر ویروس ها یا موجودات دیگر هستند (Vlak et al., 2005; Lightner, 2003) تاکنون جدایه‌های ویروس اختلافات کوچک ژنتیکی و زیستی را در توالی و میزبانی نشان داده‌اند و حدس زده می‌شود که آن‌ها بسیار به هم مرتبط باشند و حتی از یک منبع نشأت می‌گیرند (Lightner, 2003)

بیش از ۵۰ پروتئین ساختاری و یک پروتئین غیر ساختاری VP9 در ویروس لکه سفید شناسایی شده است. این پروتئین‌ها را براساس وزن تخمینی آن‌ها در آزمایشات SDS-PAGE یا بر اساس تعداد اسید آمینه پروتئین‌ها نامگذاری کرده‌اند. پروتئین‌های غشاء عبارتند از:VP12، VP19، VP22، VP24، VP28، VP31، VP36B، VP38A، VP39، VP41، VP41A، VP41B، VP51B، VP52A، VP52B، VP53، VP53A، VP68، VP110، VP124، VP150، VP187، VP281، VP292، VP466(Li et al., 2006; Van Hulten et al., 2000; Wu et al., 2005; Yang & Xie, 2006; Yi et al., 2004; Zhang et al., 2002; Zhu et al., 2005)

پروتئین‌های نوکلئوکپسید شامل:VP15، VP35، VP51C، VP60B، VP388، VP664 (Leu et al., 2005; Van Hulten et al., 2002;Witteveldt et al., 2005;) و پروتئین‌های موجود در تگومنت(پوشش) عبارتند از: VP36A،VP39A و VP95(Tsai et al., 2006). موقعیت دیگر پروتئین‌ها ناشناخته بوده و عملکرد بیشتر این پروتئین‌ها به طور کامل روشن نشده است.به نظر می‌رسد VP15 یک پروتئین متصل شونده به دی ان ای است (Witteveldt *et al*., 2005) آزمایشات خنثی سازی نشان داده است که پروتئین‌های غشایی VP24، VP28، VP31، VP36B، VP68، VP76، VP281 و VP466 در مراحل اولیه تکثیر ویروس لکه سفید نقش دارند (Li et al., 2006; Li et al., 2005; Wu et al., 2005; Yang & Xie, 2006)

پروتئین VP28 در اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌ها (Yi et al., 2004) و ایجادعفونت عمومی دخالت دارد (Van Hulten et al., 2001; Wu et al., 2005) پرایمرهای طراحی شده برای ژن VP28 و آنتی بادی تولیدی بر علیه این پروتئین در تشخیص جدایه‌های متفاوت این ویروس مناسب بوده است(Poulos etal., 2001)

ویروس می تواند به مدت ۴- ۷روز در محیط آزاد زنده بماند و اگر میزبانی پیدا نکند، از بین می‌رود. تا مدت‌ها این ویروس رامتعلق به خانواده Baculoviridae می‌دانستند، ولی با مطالعات مولکولی انجام گرفته در سال ۲۰۰۱ ویروس رادر خانواده جدیدی به‌نام Nimaviridae و جنس Whispovirus قرار دادند.

ترجمه ژنهای WSSV مشخص کرده که ژنهای پروتئینهای ویروس، شامل$_{28}$ VP، $_{26}$ VP، $_{24}$ VP، $_{19}$ VP و$_{15}$ VP در هنگام ایجاد بیماری با تأخیر ظاهر شده درحالیکه آنزیم ریدکتاز (Riductase) ریبونکلئو اسیدها زودتر از این ژنها ظاهر می‌شوند. به‌دنبال 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

VP_{28} ،VP_{26} و VP_{24} ممکن است بوسیله تکرار ژنها رشد و تکثیر یابند. همه اینها توسط رمز گردانها (Open reading Frame) 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، 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 Witteveldt و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند که پروتئین VP_{15} دارای ساختاری مشابه با پروتئین‌های باند شده DNA باکولوویروسها می‌باشند. همچنین اظهار داشتند 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 دارند، 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 به‌داخل هسته سلولهای آلوده دارد.

مطالعات نشان داده‌اند که ویروس لکه‌سفید به حرارت ۵۰℃ در مدت ۲۰ دقیقه، یا ۶۰℃ در مدت یک دقیقه یا 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 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، پویدین آیوداین، اتیل‌الکل، اوزن، UV و pH این ویروس غیرفعال می‌شود. درجه حرارت یکی از مهمترین فاکتورهای محیطی است زیرا به‌طور مستقیم بر روی متابولیسم موجودات آبزی تأثیر می‌گذارد. درجه حرارت برروی مصرف اکسیژن و پوست‌اندازی تاثیر دارد و هنگامی‌که به‌طور غیرمستقیم با سایر فاکتورها ترکیب شود، با شوری و اکسیژن محلول ارتباط دارد. مطالعات کمی درخصوص تأثیرات درجه حرارت برروی ایمنی میگوها بالاخص در زمینه گسترش ویروس لکه‌سفیدانجام گرفته است که به تحقیقات بیشتری در آینده نیاز 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 گردید 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 شد، به‌طوری 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 فعالیت‌های پرورش میگو در این منطقه متوقف شد 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 شد 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 می‌شود.علائم بالینی بیماری عبارت است از:

۱. مشاهده لکه‌های سفید رنگ به اندازه۰/۵-۲ 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 می‌گیرد. 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 می‌شود، به‌طوری 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- ۷۰درصدی 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 به‌خود می‌گیرد. همچنین تعدادی نقاط ملانوزه قهوه‌ای رنگ در مرکز این لکه ها مشاهده می شود(افشارنسب،۱۳۸۶).۴-۲-۱-میزبانان ویروس لکه سفیدمیگو

میگوهای دریائی خانواده پنائیده شدیدا نسبت به ویروس لکه سفید حساس هستند (Rodriguez et al., 2003) هر چند که سایر سخت پوستان و خرچنگهای دریائی نیز مبتلا می شوند (Hameed et al., 2003) گزارشاتی دال بر آلوده شدن گونه های آب شیرین از جمله خرچنگ دراز آب شیرین*Pacifastacus leniusculus* و *Macrobrachium rosenbergii* (وجود دارد. ژنوم DNA ویروس لکه سفید می تواند به روش انتقال عمودی وارد سیست آرتمیا گردد، ولی در حین هچ از بین می رود(Jiravanichpaisal et al., 2001) .

۳-۱-سوابق تحقیق

در ایران اولین گزار ش مرتبط با تولید واکسن برای بیماری لکه سفید به گزار ش نهائی پروژه "بررسی امکان تهیه واکسن غیر فعال جهت پیشگیری از بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از روشهای هسته ائی و غیر هسته ائی در میگوی سفید هندی" برمی‌گردد که توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران و پژوهشکده تحقیقات کشاورزی،پزشکی و صنعتی سازمان انرژی هسته ائی به انجام رسید (افشارنسب و همکاران، ۱۳۹۰). در این پروژه مشخص گردید که ویروس لکه سفید پرتو داده شده با سه روش اشعه گاما، بیم الکترون و فرمالین دارای اثرات متفاوت بوده و بهترین تاثیر واکسن تهیه شده را میتوان در پرتوهای تابیده به روش گاما مشاهده نمود. در ویروسهای غیر فعال شده به روش گاما با تیتر $۱۰^{۵.۴}$LD50/ml توسط پرتو گاما با دوز ۱۵ کیلو گری در حالت انجماد کاملا غیر فعال می‌گردد. همچنین ویروس پرتو داده شده با تیتر $۱۰^{۵.۴}$LD50/ml توسط بیم الکترون با دوز ۱۳۵ کیلو گری در حالت انجماد کاملا غیر فعال میشود و این ویروس با فرمالین با تیتر $۱۰^{۵.۴}$LD50/ml غیر

فعال میگردد. در نهایت نتیجه گیری شد که اثر حفاظتی واکسن تولیدی با اشعه گاما اثر بهتری نسبت بـه واکسـن های حاصل از فرمالین و بیم الکترون دارد(افشارنسب و همکاران، ۱۳۹۰).

در سال ۲۰۰۴، Witteveldt و همکاران با استفاده از پروتئین های VP28و VP 19 نسبت به محافظت از میگو درمقابل بیماری اقدام نمودندو نشان دادند با توجه به اینکه امکان استفاده از روش تزریقی امکان پذیر نمیباشد بهتر است از روش حمام استفاده گردد. در یک بررسی در محیط طبیعی از طریق روش خنثی سازی، واکسیناسیون میگوی ببری سیاه با استفاده از پروتئین VP28از نوکلئو کپسید میگو انجام گردید و این پروتئین توانست نقش حفاظتی خوبی در برابر ویروس لکه سفید در میگو داشته باشد (Van Hullten et al., 2001; Witteveldt et al., 2004) همچنین با استفاده از پروتئین VP19 فقط از طریق تزریقی موجب تحریک سیستم ایمنی شده و باعث تقویت میگو در برابر ویروس لکه سفید گردید (Witteveldt et al., 2004) بررسی صورت گرفته توسط Yu Mi Haو همکاران (۲۰۰۸) بر اساس خنثی سازی نسبت به تولید واکسن نو ترکیب با استفاده از VP19علیه ویروس لکه سفید ساخته شده است. برای این منظور یک قطعه از پروتئین VP19به صورت Sf21 در سلول حشرات توسط سیستم باکیلوویروس و توسط پروتئین های متصل کننده با هیستون 6His-tag باند گردید. سپس پلی کولونال آنتی سرم بر علیه rVP19 در خرگوش تولید گردید. مقدار ثابتی از ویروس لکه سفید رقیق شده در غلظتهای مختلف انکوبه شده و سپس به میگوی چینی تزریق گردید. بعد از ۹ روز از تزریق نمونه های شاهد، ۱۰۰٪ تلفات در میگوها گزارش گردید. میگوهای که با سرمهای انکوبه تزریق شده بودند بعد از ۱۵ روز به میزان ۸۵٪ تلفات در آنها مشاهده شد. میگوهائی که به ترتیب با دوزهای ۱میکرولیتر، ۵میکرولیتر، و ۱۰میکرولیتر تزریق شده بودند به ترتیب ۶۶/۶ ٪، ۴۰٪ و ۲۶/۶٪ بعد از ۱۵ روز تلفات دادند. این نتایج بیان میکند که افزایش میزان آنتی سرم موجب کاهش مرگ ومیر در میگوها می‌شود.

٤-۱-آسیب شناسی

در رنگ آمیزی اندامهای مختلف میگوهای بیمار با رنگ هماتوکسیلین ائوزین و فلوکسین (H&E/Ph) مشخص می‌گردد که کلیه بافت ها و اندام های دارای اکتودرم و مزودرم، آلوده به این ویروس می باشند. این اندام‌ها 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 نمی‌کند. همچنین در سلول های هپاتوپانکراس نیز هیچ علائمی از گنجیدگیهای درون سلولی مشاهده نمی شود ولی هموسیت ها به شدت آلوده بوده که توسط مایع همولنف در بیـن فضاهای سلول هـای مختلف و سینـوس‌های لنفی گنجیدگی ها و آثار آلودگی ویروسی مشاهده می‌شود. سلول‌های هپاتوپانکراس به شدت واکوئله شده و موجب کم شدن و از بین رفتن مجاری بین سلولی می شود. افزایش سلول‌های 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 می‌شود. همچنین واکوئل های ایجاد شده در سلول های B هپاتوپانکراس بندرت دیده می شوند ولی واکوئلهای کوچک در بافت هپاتوپانکراس بشدت افزایش می یابند(افشارنسب،۱۳۸۶).

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(افشارنسب،۱۳۸۶).

۱-۵-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(افشارنسب،۱۳۸۶).

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

این روش در تشخیص بیماریهای 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 حضور عامل بیماری را گزارش نمود. از این روش در تشخیص اغلب بیماری های میگواز 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.

۷-۱-سیستم ایمنی سخت پوستان

در طی روند تکامل، دو مکانیسم دفاعی درونی جهت مقابله با عوامل عفونت زا شکل گرفته است که عبارتند از ایمنی ذاتی(طبیعی) و ایمنی اکتسابی (سازگار). سیستم ایمنی ذاتی را در تمامی جانوران پرسلولی می توان یافت. این سیستم شامل عوامل سلولی (Cellular) و هومورال (Humoral) می باشد. مهمترین مکانیسم های ایمنی سلولی در مواجهه با میکروارگانیسم های مهاجم عبارتند از فاگوسیتوز، کپسوله شدن، سایتوتوکسیسیتی سلولی (Cell-Mediated Cytotoxicity) و لخته شدن همچنین فاکتورهای ایمنی هومورال مانند پروتئین های لخته شونده، آگلوتینین ها (مثل لکتین ها)، آنزیم های هیدرولیتیک و پپتیدهای ضد میکروبی بوده که، اغلب به همراه ایمنی سلولی تولید شده و فعالیت می نمایند. از نظر فیلوژنی، ایمنی اکتسابی جوانتر بوده و فقط در مهره داران یافت می شود و به‌واسطه سلولهای لمفوسیتی عمل می کند(Bachere, 2000).

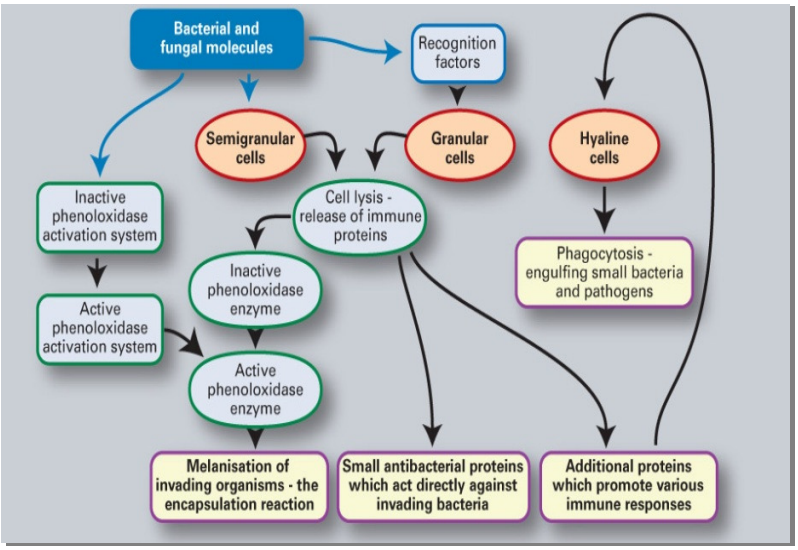
سیستم ایمنی معمولاً به دو شاخه مهم تقسیم می‌شود. سیستم ایمنی اکتسابی و سیستم ایمنی مادرزادی، سخت پوستان نظیر میگو فاقد سیستم اکتسابی بوده و سیستم ایمنی آنها مبتنی بر سیستم دفاع مادرزادی (Innate) می‌باشد. آبزیان سخت پوست (میگو، خرچنگ، خرچنگ دراز آب شیرین) به طور مشخص در محیط طبیعی و سیستم‌های پرورشی با 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 می‌کنند.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 می‌گردد. کوتیکول یا پوسته (Shell) از سه قسمت اپیکوتیکول،اگزوکوتیکول واندوکوتیکول تشکیل شده‌اند که لایه اپی‌کوتیکول 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 بیماریزای 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

۸-۱-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.

در طی روند تکامل، دو مکانیسم دفاعی درونی جهت مقابله با عوامل عفونت زا شکل گرفته است که عبارتند از ایمنی ذاتی(طبیعی) و ایمنی اکتسابی (سازگار). سیستم ایمنی ذاتی را در تمامی جانوران پرسلولی می توان یافت این سیستم شامل عوامل سلولی (Cellular) و هومورال (Humoral) می باشد. مهمترین مکانیسم های ایمنی سلولی در مواجهه با میکروارگانیسم های مهاجم عبارتند از فاگوسیتوز، کپسوله شدن، سایتوتوکسیسیتی سلولی (Cell-Mediated Cytotoxicity) و لخته شدن.فاکتورهای ایمنی هومورال مانند پروتئین‌های لخته شونده، آگلوتینین ها (مثل لکتین ها)، آنزیم های هیدرولیتیک و پپتیدهای ضد میکروبی، اغلب به همراه ایمنی سلولی تولید شده و فعالیت می نمایند. از نظر فیلوژنی، ایمنی اکتسابی جوانتر بوده و فقط در مهره داران یافت می شود و بواسطه سلولهای لمفوسیتی عمل می کند(Bachere, 2000).

اگر چه در توصیف سیستم ایمنی بی مهرگان اغلب ذکر می شود که آنها واجد سیستم ایمنی ساده تری نسبت به مهره داران می باشند ولی سیستم ایمنی آنها بسیار کارآمد و پیچیده است. بی مهرگان تقریباً در تمامی زیستگاههای موجود در کره زمین زندگی می کنند و این بدآن معناست که آنها قادرند از عهده مبارزه و مقابله با طیف وسیعی از پاتوژنها برآیند. بقاء و تکامل بی مهره گان در طی میلیون ها سال دلیلی بر کارآیی سیستم دفاعی آنها می باشد (Millar & Ratcliffe, 1994).

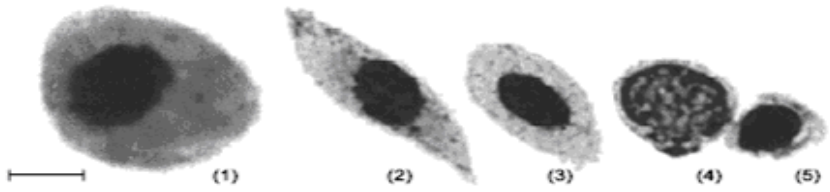
مطالعات وسیعی بر روی سیستم ایمنی سخت‌پوستان صورت گرفته است که منجر به شناسایی انواع سلولهای خونی و طبقه بندی آنها بر اساس کارآیی‌های ایمونولوژیک یا معیارهای مرفولوژیک شده است (Johnston et al,1999) جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی پروتئین‌های دفاعی، بسیاری از عملکردهای سیستم ایمنی را روشن ساخته است. تنوع بسیار زیاد بی‌مهرگان و دانش اندک ما از هموسیت‌های آنها موجب شده است که دسته‌بندی هموسیت‌ها بر اساس مرفولوژی آنها انجام شود. افزون بر این، هموسیت‌ها سلولهای بسیار فعالی بوده و پس از خارج شدن از haemocoal تغییرات قابل ملاحظه ای در آنها رخ می‌دهد، لذا مطالعه و شناسایی این سلولها بسیار مشکل تر از بررسی عملکرد سلولهای خونی مهره داران می‌باشد. فعال شدن هموسیت‌ها موجب لخته شدن سریع، دگرانوله شدن سلولی آنها، فعال شدن سیستم proPo و به دنبال آن تولید مولکولهای چسبنده می‌گردد. ناپایدار بودن و اندک بودن، بسیاری از پروتیئن های دفاعی بی‌مهرگان، کار جداسازی یک پروتیئن خاص از سیستم دفاعی را بسیار مشکل می‌نماید (Soderhal etal, 1990).

هموسیت‌ها نقش بسیار مهم و کلیدی در دفاع درون بافتی ایفا می‌کنند. اگر چه سه گروه مختلف سلولی به طور کلی توصیف شده است ولی تا کنون طبقه بندی جامعی برای هموسیت های میگوهای پنائیده در دسترس نمیباشد. براساسیافته‌هاومشاهدات صورت گرفته به کمک میکروسکوپ الکترونی،هموسیت‌های موجود در جریان همولمف میگوهای پنائیده را می‌توان به ترتیب فراوانی به سه گروه شامل اگرانولوسیت یا فاقدانه (agranulocgte) (AG)، گرانولوسیت متراکم (dense granuloyte)(DG) وگرانولوسیت نیمه متراکم (Semi-)(SG) دense granuloyteطبقه‌بندی کرد (Lu et al., 2008; Laxmilatha & Laxminarayana, 2004))

آگرانولوسیت ها (AG) کوچکترین سلولهای یافت شده درهمولمف میگوهای پنائیده می باشند. میانگین اندازه آنها ۳,۳۵ در ۴,۷۶ میکرو میلیمتر تعیین شده است. شکل این سلولها بیضوی تاکروی بوده ودارای یک هسته غیرمتراکم میباشند. هسته بزرگ بوده وبخش اعظم سلول رادربرگرفته ومعمولابیضی شکل است. دراین سلولها نسبت هسته به سیتوپلاسم اغلب زیاداست. پوشش هسته دراین سلولهاصاف وگنجیدگیهای سیتوپلاسم بسیار اندک بوده و یا سیتوپلاسم کلاً فاقدگنجیدگی می‌باشد. برخی اوقات میتوان شبکه اندوپلاسمی صاف یا خشن (دانه‌دار) را در این نوع هموسیتها مشاهده کرد و بر این اساس می‌توان بیان کردکه سلولها ی آگرانولوسیت نشانه‌هایی از تمایز را نشان میدهند.

گرانولوسیت متراکم (DG) بطورکامل تمایزیافته ودارای گرانولهای متراکم فراوانی هستند. این سلولها اغلب بیضی شکل بوده و از سایر هموسیتها بزرگتر میباشد ومیانگین اندازه آنها ۵/۸۵ × ۴/۷۲µmتعیین شده وهسته دراین سلولها بخش اعظ م سیتوپلاسم را در برنگرفته وهتروکروماتین متراکمی درمجاورت غشاءهسته قابل روئیت است. هسته ممکن است واجد اشکال متنوعی باشد. مهمترین خصوصیت متمایزکننده این دسته ازسلولها، داشتن گرانولهای حجیم یامتراکم میباشد. اندازه این گرانولها بین۰/۱µm تا ۰/۵۶ µm متغیراست. دربرخی موارد ۲ نوع گرانول، یکی گرانول‌ها ی بسیارمتراکم (G) و دیگری گرانولهای با تراکم اندک (LG)دردرون سیتوپلاسم جلب توجه مینماید. گرانولها توسط یک غشاء احاطه شده اند و معمولاواجد محتوای یکنواخت و متراکم الکترونی هستند.

البته درمواردی هم این محتوای،تراکم الکترونی اندکی دانست ودرتصویرالکترونی،مناطق روشن در بین این گرانول‌ها مشاهده می‌شود. تعداد اندکی واکوئل نیز قابل مشاهده است. توسعه وشکل رفتن ضمائم شبیه به پای کاذب نیز مشاهده می شود.



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(٤)، هموسیت با کاهش نسبت سیتوپلاسم به هسته که حالت هیالین دارند(۵).

گرانولوسیت نیمه متراکم (SG) رامیتوان حدواسط دونوع سلول دیگر دانست. این دسته ازسلول‌ها بیضی شکل،دوکی شکل،گاهی فاقد شکل معین هستند و میانگین اندازه آنها16/4 × 18/7 µm تعیین شده است.وجه تمایز این دسته از سلولها از سایر گروه‌ها، حضور تعداد بسیارفراوان گرانولهای سیتوپلاسمی درمقایسه

باسلول‌های گرانولوسیت می‌باشد. این گنجیدگیهای سیتوپلاسمی اغلب در مواردمشابه دیده شده درسلولهای گرانولوست متراکم،کوچکتر هستند و اندازه آنها اغلب در حدود µm ۰/۰۴۳ می‌باشد. هسته دراین دسته ازسلولها،اغلب دارای شکل‌های گوناگونی است.ولی تمامی بخشهای سیتوپلاسم را اشغال نکرده است. در این سلول‌ها،مناطقی از هسته که دارای تراکم بیشتری ازهتروکروماتین هستند، بیشتراست واغلب دراطراف جدار داخلی هسته دیده می‌شوند. در برخی موارد هسته بسیار کوچک شده وشبکه اندوپلاسمی دانه‌دار بیشتر به‌صورت تیغه‌های نازک و کشیده توسعه یافته است. میزان شبکه اندوپلاسمی دراین دسته از سلولها از سلولهای گرانولوسیت متراکم، بیشتراست. در این سلول‌ها وزیکولهای ترشحی واجد ترکیباتی با تراکم الکترونی بالاو همچنین حضور میتوکندری‌ها جلب توجه می‌کنند.

سیانوسیت‌ها (Cyanocyte) علاوه بر سه گروه هموسیت بیان شده یک گروه سلول کاملاً متفاوت به‌نام سیانوسیت‌ها نیز مشاهده می‌شود. این سلول ها دارای یک گرانول مرکزی بزرگ، شبکه اندوپلاسمی فراوان و وسیع، میتوکندری‌ها و دستگاه گلژی می‌باشند. شاید این سلولها صرفاً در بافت خونساز یافت شوند و درجریان همولنف مشاهده نشوند.

علاوه بر این موارد در میگوهای ماده پنائیده که دارای تخمدان توسعه یافته‌ای هستند، یک نوع هموسیت کاملاً متفاوت نیز مشاهده شده است. این سلولها حداقل سه برابر بزرگتر ازسایر هموسیتها بوده و درتمامی مراحل بلوغ حتی در مرحله تخمریزی نیز مشاهده می‌شوند.این سلول‌ها واجد گرانول‌های گلیکوژن فراوانی درسیتوپلاسم خود هستند. گرانول‌های با ماهیت هموژنوس وهتروژنوس دیده می‌شوند. تعداد میتوکندریها در این دسته ازسلولها بسیارفراوان بوده وتعداد زیادی واکوئل نیز قابل مشاهده است. اعتقاد بر این است که سلولهای سیانوسیت وظیفه تولیدکردن هموسیانین وهمچنین کریستالین و ذخیره نمودن آنها را درگرانولهای سیتوپلاسمی دارند. احتمال داردکه سلول‌های ویژه مشاهده شده در میگوهای ماده از گرانولوسیت‌ها منشاء گرفته باشد.

داشتن یک پوشش کوتیکولی سخت، که گاهی حاوی ترکیبات ضدمیکروبی نیز می‌باشد،سد فیزیکی مناسبی محسوب می‌گرددکه می‌توان آن را به عنوان دفاع خارجی درسخت پوستان در نظر گرفت. این پوسته مانع از چسبیدن عوامل بیماریزا و نفوذ آنها در بدن می‌باشد.

کوتیکول یا پوسته ازسه قسمت اپی‌کوتیکول،اگزوکوتیکول واندوکوتیکول تشکیل شده‌اند که لایه اپیکوتیکول و اگزوکوتیکول از فسفات و کربنات کلسیم تشکیل شده و لایه اندوکوتیکول یک لایه کیتنی غیرکلسیمی می-باشد. 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(Millar & Ratcliffe, 1994).

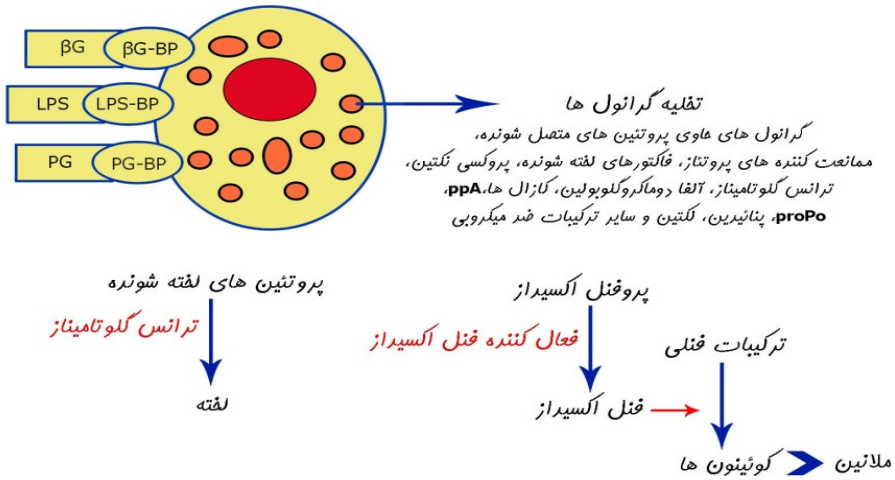
اولین و ضروری ترین فرآیند دفاع درونی ،شناسائی میکروارگانیسم‌های مهاجم می‌باشدکه توسط هموسیت‌ها وپروتئین‌های پلاسما انجام می‌شود (Albores & Plascencia, 2000).فرض بر این است که سیستم ایمنی بی‌مهرگان،

الگوهای مولکولی ثابت متعلق به طیف وسیعی از پاتوژنها را شناسائی می‌کند. چندین نوع ازپروتئین‌های شناسائی،تعریف شده‌اندکه به نام پروتئین‌های شناسائی الگو (Patern recognized protein)(PRPs) نامیده می‌شوند. پروتئین‌های PRP قادرند بخش‌های کوچکی از هیدراتهای کربن موجود در ترکیبات دیواره سلولی میکروارگانیسم را مانند لیپو پلی ساکاریدها (LPS) یا پپتیدوگلیکانهای (PG) باکتریایی یا β ۱و۳ گلوکان قارچی را شناسایی نمایند (Soderhall et al., 1996; Albores et al., 1997) برخی از PRP ها جزء لکتین‌ها محسوب می‌شوند و می‌توانند مستقیماً به عنوان آگلوتنین اپسونین عمل نمایند. پس از اتصال PRP به ترکیبات میکروبی، جایگاه ثانویه‌ای جهت اتصال سلولی فعال می‌شود. فعال شدن هموسیت‌ها پس از مرحله اتصال ثانویه،اتفاق می‌افتد (Albores & Plascencia, 2000).

پروتئینهای دفاعی که تاکنون از میگوهای خانواده پنائیده جدا سازی و شناسایی شده‌اند عبارتنداز: پروتئین متصل شونده به1-β و۳ گلوکان، پروکسی‌نکتین، بازدارنده کازال، ترانس‌گلوتامیناز، پروتئین لخته شونده و پروفنل اکسیداز.

پس از شناسائی مواد بیگانه، به واسطه فرآیند کیموتاکتیک، هموسیتها به محلی که تهاجم اتفاق افتاده است مهاجرت می‌کنند که این امر باعث بروز التهاب میگردد و شبیه به فرآیندی است که در مهره‌داران دیده میشود. باز بودن سیستم چرخش خون،سیستم دفاعی سریع و کارآمدی را طلب مینماید که واکنش‌های زنجیرهای فاگوسیتی نقش مهمی را در این زمینه ایفا می‌کنند. هموسیتها مسئول سنتز، ذخیره سازی و ترشح (به محض فعال شدن) مواداولیه و پیش سازهای آنزیمی جهت لخته شدن و واکنشهای زنجیره‌ای proPo میباشند (Srilunyalucksana & Soderhall, 2000).

فرآیند لخته شدن، ترکیبات بیگانه را به دام انداخته و از سر درگمی هموسیتها جلوگیری مینماید. واکنش لخته شدن وابسته به ترانس گلوتامیناز در سخت پوستان، درخرچنگ آب شیرین شناسائی شده است. هنگامی که ترانس گلوتامیناز (T Gase) ازهموسیت‌ها یا بافتها رهاسازی می‌شود، واکنش لخته شدن تحریک می‌گردد. باحضور یون کلسیم (Ca2+) وعمل کاتالیزوری TGase ،پلی‌مریزاسیون پروتئین لخته شونده درپلاسما شکل گرفته وترکیبی ژل مانند تشکیل می‌شود (Kopacek et al., 1993; Yeh et al., 1998)



شکل ۳:تصویر شماتیک از عملکردهای شناخته شدهٔ هموسیت‌های میگوهای خانواده پنائیده

سیستم فعال کننده proPO نیز به طور گسترده‌ای در سخت پوستان مورد بررسی قرارگرفته است. پروتئینهای سیستم proPO نقش بسیار برجسته‌ای در شناسائی غیر خودی،ارتباط بین هموسیت‌ها و تولید ملانین ایفاء می‌نمایند. به محض فعال شدن و دگرانوله شدن هموسیت‌ها،proPO غیر فعال تحت تأثیر آنزیم فعال کننده پروفنل اکسیداز (PPA) فعال شده وآنزیم PO موجب کاتالیز شدن اکسیداسیون گام به گام فنل وتبدیل آن به کوئینون‌ها می‌گردد. ادامه یافتن واکنش و طی شدن مراحل واسطه، منجر به تولید ملانین می‌گردد (Soderhall et al., 1996).

در خلال این فرآیندها، فاکتورهای ضد میکروبی نیز تشکیل می‌شوند. ملانین رنگدانه‌ای به رنگ قهوه‌ای تیره می‌باشد که با محاصره کردن عوامل بیماریزا از تماس آنها با میزبان جلوگیری می‌نماید. مکانهای ملانیزه را می‌توان اغلب بر روی سطح یا در زیر کوتیکول آرتروپودها مشاهده کرد. فاکتور مهم دیگری که در سیستم Po شرکت می‌کند، پروکسی‌نکتین می‌باشد. این ترکیب دو عملکرد متفاوت شامل اتصال سلولی وفعالیت پراکسیدازی دارد. پروکسی‌نکتین مربوط به سخت پوستان در هموسیت‌ها سنتز می‌شود و در شرایطی که هموسیت‌ها به صورت غیرفعال می باشند در گرانولها ذخیره می‌گردد. درصورت تحریک شدن هموسیت‌ها، پروکسی‌نکتین آزادشده و در خارج سلول فعال می‌گردد. گیرنده‌های غشائی موجود بر روی هموسیت‌ها نقش بسیار مهمی را در عملکرد اتصال سلولی پروکسین کتین بازی مینماید. اتصال سلولی موجب اتصال، گسترش، فاگوسیتوز،کپسوله‌شدن،تشکیل ندول وآگلوتیناسیون می‌گردد و در کنار خاصیت راکسیدازی، موجب کشتن میکرو ارگانیسم مهاجم می‌گردد (Johnston, 1999).

فاگوسیتوز عبارت است از بلعیده شدن ذرات بیگانه کوچک توسط سلولهای خاص. در هموسیتهای میگو نیز مانند سلولهای خونی مهره داران،هموسیتها پس ازبلعیدن ذرات بیگانه، با استفاده از رادیکالهای اکسیژن که خاصیت سایتوتوکسیک دارند، موجب مرگ ذرات بیگانه میشوند. اگر مقادیر فراوانی از ذرات بیگانه وارد بدن

میگو شوند و یا اینکه ذرات بیگانه وارد شده به اندازه‌ای بزرگ باشند که یک هموسیت نتواند آنرا ببلعد، چندین همتوسیت با یکدیگر همکاری کرده و پاتوژن یا پاتوژن‌ها را محاصره می‌کنندکه به این دو پدیده به ترتیب تشکیل ندول و کپسول گفته می‌شود (Soderhall et al., 1996).

۱-۸-۱-پاسخ شبه ایمنی

تحقیقات زیادی در مورد سیستم ایمنی سخت پوستان انجام شده، همگی بیان می نمایند که اکثر بی مهرگان فاقد سیستم ایمنی اکتسابی می باشند و دفاع آنها ناشی از سیستم ایمنی ذاتی است که هم به صورت سلولار و هم هومورال می باشد. ولی وجود یک سیستم شبه ایمنی علیه ویروس لکه سفیدWSSV در میگو تشخیص داده شده است. میگوهایی که پس از شیوع بیماریWSSV زنده مانده اند در مواجهه مجدد با این ویروس بعد از ۴ ماه، درصد بقاء نسبی ۹۴٪ نشان داده اند، این مقاومت میگوهایی که قبلاً یک بار عفونی شده‌اند تاییدی بر تقویت سیستم شبه‌ایمنی می باشد(Sanchez Martinez et al., 2007) در یک مطالعه در سال ۱۹۹۷ در ژاپن نشان داده شد که میگوهای بازمانده از شیوع ویروس WSSV پس از مواجهه مجدد با این ویروس میزان بقاء خیلی بیشتری نسبت به میگوهای آلوده نشده دارند (Smolko & Lombardo, 2005) همچنین یک مورد مشابه در میگوهای بازمانده از عفونت WSSV نشان داده که اگر یک ماه بعد از عفونت به صورت تزریق عضلانی مواجهه با ویروس زنده شوند، مقاومت می‌کنند. این تجربیات مشخص کرد که یک پاسخ شبه ایمنی سه هفته پس از عفونت اولیه شروع شده و تا هفته چهارم پیشرفت کرده و تا انتهای ماه دوم پایدار است. مستنداتی هم در مورد فعالیت خنثی کنندگی ویروس در پلاسمای گرفته شده از همولنف میگوهای بازمانده از طریق تجویز ویروس تیمار شده با پلاسما در میگوهای سالم بدست آمد. از طریق کروماتوگرافی تبادل کاتیونی ماده ای در پلاسما میگوهای بازمانده تشخیص داده شده که ممکن است مرتبط با این فعالیت خنثی کنندگی باشد (Wu et al., 2002).

۱-۸-۲-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)PPRs 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. 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 (Arg-Gly-Asp)(RGD) 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 Prophenol oxidase activiting enzyme(proPO) 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 (افشارنسب،۱۳۸۶)

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(افشارنسب b،۱۳۸۶).

۳-۸-۱-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 محلول (Soluble protein) و کواگولان به مواد انعقادی غیرقابل حل (Insoluble coagulin) می‌شود.

بیشترین حساسیت سیستم 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 فاکتور 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 Cباند 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 می‌گردد.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.

٤-٨-١-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.

۵-۸-۱-سیستم شناسائی غیرخودی (The non-self recognition system)

ایده الگوی شناسائی غیر خودی 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 گونه کالیفورنیانسیس (*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 دارد و با بتا ۱و۳ گلوکان واکنش متقابل نشان میدهد و موجب افزایش ایمنی سیستم پروفنل اکسیداز میشود و 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 مولکولLGBP 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 LGBPs 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 محدوده 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 *pupaeHyalophora cecropia* باشد.

٦-٨-١-سیستم شناسائی غیرخودی (The non-self recognition system)

ژنهای رمزدار شده پپتیدها یا پلی‌پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) 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 AMPs شامل ۲۰۰-۱۵۰ اسید آمینه یا کمتر از آن می‌باشد که بوسیله انواع مختلفی از سلولها تولید شده است. براساس توزیع بافتی مولکولهای AMPs می‌توانند بصورت عمومی یا منطقه‌ای علیه عوامل بیماریزای مهاجم از بافتها محافظت بعمل آورند. تعداد زیادی از AMPs در حشرات و عنکبوتیان مشخص شده است ولی تعداد کمی از آنها در سخت‌پوستان شناسائی گردیده‌اند. در ده سال گذشته چندین مولکول AMPs 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 (*Callinectussapidus*) شناسائی شده است. از خانواده مولکولهای AMPs 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 AMPs 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 پپتید 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.

۹-۱-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 مولکول های پروتئین، کربوهیدرات یا چربی می‌باشد. تعدادی از این مولکول ها 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 باشند. 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 می 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_2در 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 شده 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(7 importine) 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.

۱۰-۱-دفاع ضدویروسی (Antiviral defense)

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 CpGمی‌باشند TLR_2(CpG DNA) 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 imidazoquinolines(Imiquimod) و R-848 می‌توانند موجب فعال کردن سیستم ایمنی از طریق TLR_7MyD88 که وابسته به سیستم سیگنالی است شوند.

بهرحال فاکتورهای TLRs موجب شناسائی ترکیبات اختصاصی ایجاد شده توسط عوامل بیماریزا می‌شوند. براساس این فعالیت TLRs 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 Immune deficiency(Imd) 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 IFNs 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 dsRNAتوسط 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 α۲(eukaryotic translation initiation factor 2)α (elf 2)α 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.

۱۱-۱-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 compatibility complex (MHC)AntigenMajor histo 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 Sahtoutو 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.

۱۲-۱-واکسن‌ها

با وجودی که سخت پوستان دارای پاسخ ایمنی هومورال از طریق تولید ایمونوگلوبولین نمی‌باشند، ولی پاسخ نیمه ایمنی با تولید مواد شبه ایمنوگلوبولینی بر ضد بیماری ویروسی در میگو از طریق سلولهای ایمنی موجود در همولنف از جمله سلولهای هیالونوسیت، سمی‌گرانولار و گرانولار ثابت گردیده است. مکانیسمهای پاسخهای ایمنی در میگو شامل: فاگوسیتوز، ایجاد ندول، سایتوتوکسیسیتی(مسمومیت سلولی)، کپسول دار نمودن و سیستم

پروفنل اکسیداز می باشد. با توجه به موارد ذکر شده در بالا هنگام تجویز عوامل پاتوژن غیر فعال محققین شاهد افزایش ایمنی در برابر آن بیماری خاص بودند که همین امر آنها را بر آن داشت که محصولی را تحت عنوان واکسن تهیه کنند (Bachere, 2000). از طرفی به علت توسعه فعالیت‌های آبزی پروری و دامنه وسیع میزبانان ویروس، این موجودات همواره در معرض درگیری با عوامل بیماریزای ویروسی از جمله ویروس لکه سفید بوده‌اند.از این رو تا کنون راهکارهای متعددی از جمله بهبود شرایط محیطی، ذخیره‌سازی پست لاروهای عاری از عوامل بیماریزاو مقاوم به عوامل بیماریزا، استفاده از محرک های سیستم ایمنی و استفاده از واکسن جهت مصون سازی میگوها به‌منظور کنترل و پیشگیری از بیماری لکه سفید ارائه شده است (Namikoshi et al., 2004).

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 می‌گیرند. استفاده از واکسن‌ها موجب تحریک سیستم ایمنی بدن پس از مواجهه با بیماری ناشی از باکتری یا ویروس خاص 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).

۱-۱۲-۱-ویژگی های یک واکسن خوب

یک واکسن خوب باید دارای چنین خصوصیاتی باشد:

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

۲-۱۲-۱-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 می‌تواندایجاد 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 یا ضعیف شده ممنوع است.

۱۳-۱-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 یا واکسن‌های نوترکیب(Toxoids sub unit)

توضیحات مختصری در مورد هر یک به شرح زیر می‌باشند :

۱-۱۳-۱-واکسن‌های زنده یا تخفیف حدّت یافته (Live or Attenuation Vaccines)

واکسن‌های زنده باعث ایجاد یک عفونت بدون علائم و خود محدود کننده می‌شوند. بنابراین سیستم ایمنی میزبان را مشابه با عفونتهای 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 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 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 یا نور تخریب می‌شوند.

۲-۱۳-۱-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.

۳-۱۳-۱-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.

۱٤-۱-غیرفعال‌سازی ویروس

غیرفعال‌سازی می‌تواند توسط روش‌های حرارتی، مواد شیمیایی و پرتوها انجام شود).مواد شیمیایی که برای غیرفعال‌سازی به کار می روند شامل :

۱-۱٤-۱-غیرفعال‌سازی با فرمالدئید (formaldehyde)

اخیراً اکثر روش‌های اروپایی، فرمالدئید را برای غیرفعال‌سازی ویروس‌ها استفاده می‌کنند که عمدتاً به آن روش Waldmann گویند(Barteling & Woortmeyer, 1984; Lombardo & Smolko, 1990; Gudding et al., 1999; Salehi, 2010; Escobedo-Bonilla et al., 2005;). اما سلامت این نوع واکسن‌ها مورد شک و تردید است، زیرا 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.

۲-۱۴-۱-غیرفعال‌سازی با آزیریدینها

روش‌های غیرفعال‌سازی با آزیریدین‌ها مثل استیل اتیلن امین، اتیلن امین ، پروپیلن امین ، 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 آمین 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.

۳-۱۴-۱-غیرفعال‌سازی توسط پرتوها

پرتوهای یونساز دارای انرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشندگی شدید می‌باشند. اشعه گاما و الکترون پرتوهایی با شدت خیلی زیاد، قدرت نفوذ بالا و طول موج کوتاه هستندکه ضمن واپاشی ایزوتوپهای رادیواکتیو تولید می‌شوند. مهمترین ایزوتوپی که به طور وسیع استفاده می‌شود، کبالت ۶۰ یا سزیوم ۱۳۷ 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) (Lorenzen et al., 1993;)

۱۵-۱-اثر پرتوهای یونساز بر روی میکروارگانیسم ها

مرگ میکروارگانیسم‌ها نتیجه عمل یونسازی پرتو با انرژی بالا می‌باشد. این پرتو انرژی خود را به مولکول‌ها انتقال داده که این مسئله وابسته به عدد اتمی اتم‌های تشکیل دهنده مولکول می‌باشد و 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. 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().

رادیوبیولوژیست‌ها در سال ۱۹۵۵ از پرتوهای یونساز جهت از بین بردن ویروس ها استفاده نمودند. گفتنی است که ویروس‌ها دارای ساختارهای بسیار متنوع 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 می باشند. لذا

پیچیدگی ساختمان بعضی ویروس‌ها باعث می شود که بتوانند برخی از آسیب های ناشی از پرتودهی را ترمیم نمایند.

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 و دومی اثر کوتاه مدت که شامل انواع متنوعی از رادیکال‌های فعال همانند رادیکال‌های هیدروژن و هیدروکسیل ناشی از آب و الکترون‌هامی باشد (Kim et al., 2004) حساسترین خاصیت ویروس‌ها، عفونت‌زایی آنهاست زیرا عفونت‌زایی معمولاً همهٔ خواص یک ویروس را برای تکمیل یک سیکل عفونت نیاز دارد. برای ویروس‌ها با ساختمان ساده اثر غیرفعال‌سازی خاصیت عفونت‌زایی در عمده موارد شامل یک آسیب به اسید نوکلیئک 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 DNAکه برای ویروس بحرانی است مثلاً قطعهٔ که به DNA پلیمراز اختصاصی ترجمه می‌شود. از سوی دیگر حرارت و پرتودهی هر دو می توانند در تخریب ویروس و استریلاسیون ویروس نقش مهمی داشته باشند. به گونه ای که تلفیق دما و پرتودهی اثر بیشتری در از بین بردن خاصیت عفونت‌زایی ویروس خواهد داشت. (Witteveldt et al., 2005).

۱-۱۵-۱-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 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 باقیمانده (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 & Smolko, 1990).

D_{10}-value–۱-۱۵-۲

از روی منحنی‌های دز / پایندگی می‌توان احتمال وجود میکروارگانیسم‌های زنده باقیمانده را محاسبه نمود. D_{10}-value به‌عنوان 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 دهدکه 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.

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

۳-۱۵-۱-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 DNAکه 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 Adamas و Pollard در سال ۱۹۵۱ کشف شد و این اثر تلفیقی برای ویروس‌های پیچیده‌تر دیده شد و برای تک رشته‌ای‌ها دیده نشده است).

۱۶-۱-رادیو واکسن‌ها و پروتئین‌های نوترکیب

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 بیماریVenezuelan 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 Bombeyدر هند همچنین در انرژی اتمی ایران با همکاری مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ایران.

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(معتمدی سده و همکاران،۱۳۸۵).

در مقایسه با مطالعات صورت گرفته بر روی محرک های سیستم ایمنی میگوها اطلاعات محدودی در رابطه با ایمن سازی میگوها وجود دارد. گفتنی است که سابقه تمامی این مطالعات به واکسیناسیون میگوها (سخت پوستان) توسط ویروس های غیرفعال و یا پروتئین‌های نوترکیب به‌منظور محافظت و جلوگیری از مرگ و میر میگوها باز می‌گردد. در این مطالعات مشاهده شد که یک پاسخ شبه ایمنی در میگوهای مقاوم به ویروس‌های بیماریزا همانند ویروس بیماری لکه سفید ایجاد شده بود که به دلیل وجود فاکتورهای خنثی کننده‌در همولنف میگوهای واکسینه شده، در مواجهه بعدی میگوها با ویروس به دلیل فعالیت سیستم شبه ایمنی، مقاومت میگوها در برابر بیماری افزایش یافت که در نتیجه آن مرگ و میر میگوها با کاهش همراه شد (Johnsona et al., 2008).

امروزه از پروتئین‌های نوترکیب همانند پروتئین‌های نوترکیبی که برای بعضی از ویروس‌های ماهیان ساخته می-شود، استفاده می‌گردد. حسن این ترکیبات این است که می توان موجودات را با مقادیر بالایی از آنتی ژن های اختصاصی واکسینه کرد که در پی آن میزان رشد و بازماندگی های آنها نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد .لذا با توجه به اینکه بیماری ویروسی لکه سفید همواره به عنوان یک خطر جدی برای صنعت پرورش میگوی کشور محسوب می گردد سعی خواهد شد تا با به‌کارگیری شیوه های نوین همانند ایمن سازی میگوها از طریق ویروس‌های غیرفعال شده و پروتئین‌های نوترکیب مقاومت میگوها را نسبت به بیماری لکه سفید افزایش داد که در پی آن میزان رشد و بازماندگی میگوها بهبود یابد.

۲-مواد و روشها

۱-۲-مراحل تهیه رادیوواکسن بیماری ویروسی لکه سفید در میگو

۱-۱-۲-جداسازی و تکثیر ویروس لکه سفید میگو

با توجه به اینکه در خصوص تکثیر ویروس بیماری لکه سفید میگو تاکنون سیستم کشت سلول مناسبی که بتواند برای تکثیر ویروس با تیتر خوب استفاده شود، شناخته نشده است، لذا بهترین روش برای تکثیر این ویروس استفاده از میزبان واسط آن می باشد. از آنجائیکه همولنف سخت پوستانی مثل خرچنگ و میگو محل مناسبی برای تکثیر این ویروس است بنابراین در این تحقیق از خرپنگ دراز آب شیرین جهت تکثیر ویروس استفاده شده است. خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus Leptodactylus*) با متوسط وزن ۱۵-۲۰ گرم از دریاچه پشت سد ارس با همکاری مرکز تحقیقات آرتمیا – ارومیه تهیه و به استخر تحقیقاتی در پژوهشکده کرج منتقل گردید. به منظور تهیه استوک ویروسی براساس روش ارائه شده توسط Van Hulten و همکاران (۲۰۰۰) چند عدد میگوی آلوده به ویروس لکه سفید پس از تائید آلودگی میگوها براساس آزمایش PCR و علائم بالینی (وجود لکه های سفید بر روی میگوها) (شکل ۴) را آسیاب و در بافر تریس حاوی کلریدسدیم با نسبت ۱:۵ هموژن نموده و با دور g × ۱۷۰۰ به مدت ۱۰دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. پس از آن مایع رویی جمع آوری و در چندین مرحله فیلتراسیون با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ در نهایت با فیلتر ۰/۴۵ میکرون در کنار یخ، از سوسپانسیون بافتی نهایی مورد نظر (حاوی ویروس لکه سفید) برای تجویز به خرچنگ دراز آب شیرین عاری از بیماری (به منظور تکثیر) استفاده گردید. سپس براساس روش ارائه شده توسط Van Hulten و همکاران (۲۰۰۰) سوسپانسیون ویروسی به میزان ۰/۳ میلی لیتر به روش داخل عضلانی در بند سوم و چهارم سینه ای خرچنگ ها تزریق و تمامی خرچنگ ها به صورت روزانه مورد بررسی و بازدید قرار گرفتند. عمل نمونه برداری از بافت و همولنف خرچنگها با توجه به فصل تابستان که دمای آزمایش به ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد می رسید، تا ۳ روز پس از تزریق آنتی ژن ویروسی به منظور بررسی تکثیر و یا عدم تکثیر ویروس در خرچنگ ها با آزمون PCR انجام گرفت. همولنف خرچنگ ها در روز سوم پس از تزریق آنتی ژن ویروسی جمع آوری و به همراه ماده ضد انعقاد Alsever (Robalino et al. 2004) و پس از سانتریفوژ شدن نمونه ها با دور g × ۱۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

شکل ٤: میگوهای آلوده به بیماری ویروسی لکه سفید

شکل ٥: استخر نگهداری خرچنگ ها در پژوهشکده کرج

۲-۱-۲-تائید آلوده بودن بافت و همولنف خرچنگ دراز با آزمون PCR

بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات Jiravanichpaisal و همکاران (۲۰۰۱) همولنف خرچنگ دراز آب شیرین، محل اصلی تکثیر و تجمع ویروس لکه سفید می باشد. به منظور تائید آلودگی خرچنگ ها در مراحل ابتدایی تحقیق بررسی همولنف آنها ضروری بود. لذا نمونه های بافت و همولنف خرچنگ های تزریق شده با سوسپانسیون ویروسی در مرحله قبل با استفاده از آزمون Nested PCR از نظر وجود ویروس لکه سفید مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-۱-۲-تعیین تیتر ویروس لکه سفید در میگو

برای تعیین تیتر ویروس از روش تعیین LD50 (Lethal Dose 50) و ۵ گروه پست لارو میگوی ۱ تا ۲ گرمی استفاده گردید. در این مرحله از رقت های ۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ از سوسپانسیون ویروسی (همولنف خرچنگ حاوی ویروس لکه سفید در بافر استریل تریس حاوی کلریدسدیم) به هر میگو مقدار ۱۰ میکرولیتر با سرنگ انسولینی G ۲۹ تزریق گردیده و تمام تیمارها روزانه دو بار (صبح و شب) از نظر تعداد تلفات بررسی شدند. لازم به ذکر است که تعداد تلفات ابتدایی در گروه های مختلف بر اثر استرس تزریق می باشند که جزء محاسبات تیتر ویروسی قرار نمی گیرند. تلفات تا ۸ روز پس از تزریق ثبت و در آخر نیز تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر به شرح زیر محاسبه گردید.

Karber Formula:
$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\,(Sp - 0.5)$
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 ٦: تزریق سوسپانسیون ویروسی با سرنگ انسولینی G ۲۹ به پست لاروهای یک گرمی

٤-۱-۲-غیرفعال سازی ویروس لکه سفید با استفاده از پرتو گاما

همولنف های جمع آوری شده از خرچنگ‌های تزریق شده با ویروس پس از تائید وجود ویروس لکه سفید در آنها به روش PCR و تعیین تیتر ویروسی به روش LD50 ، در حالت منجمد در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد با دز اپتیمم ۱۵ کیلوگری پرتو گاما که در فاز یک این پروژه بدست آمده بود پرتودهی شدند(شکل ۷). همولنف های پرتودهی شده مجدداً جهت انجام مراحل بعدی تحقیق به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد انتقال داده شدند.

شکل ۷: سیستم پرتو دهنده گاما

۵-۱-۲-تائید غیرفعال سازی ویروس لکه سفید (آزمون بی ضرری)

به منظور انجام این مرحله گروه های ۱۰ تایی پست لاروی میگو ۱ تا ۲ گرمی استفاده شد. در این مرحله ۵ گروه ۱۰ تایی پست لارو میگو انتخاب شده و پس از تهیه سریال رقت از ویروس پرتوتابی شده (۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، و ۱/۱۰۰۰) به هر میگو ۱۰ میکرولیتر از رقتهای مذکور به صورت داخل عضلانی تزریق شد. به یگ گروه هم ویروس زنده پرتوتابی نشده به همان روش تزریق گردید. تعداد تلفات در گروه های مختلف روزانه (دو بار صبح و شب) تا ۱۰ روز پس از تلقیح بررسی و ثبت شدند. در آخر نیز تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه گردید.

با توجه به عدم وجود تلفات در گروههای پست لارو تزریق شده با ویروس پرتوتابی شده، از سوسپانسیون حاصل از لاشه های این میگوها برای تزریق به گروه بعدی پست لاروها استفاده شد. این کار تا سه پاساژ متوالی از جهت اطمینان از عدم تکثیر ویروس زنده در سوسپانسیون پرتوتابی شده انجام گردید. بر روی کلیه ی میگو آزمون Nested PCR جهت تشخیص ویروس لکه سفید انجام گردید.

۶-۱-۲-فرمولاسیون رادیوواکسن

پس از غیرفعال سازی ویروس موجود در همولنف خرچنگ و تایید غیرفعال سازی کامل ویروس در پست لاروهای میگو تا سه پاساژ متوالی، اکنون سوسپانسیون ویروسی تهیه شده از همولنف خرچنگ های آلوده به ویروس جهت فرمولاسیون واکسن استفاده شد. تنظیم pH ، افزودن بافر TN استریل به میزان لازم بسته به غلظت اولیه آنتی ژن و تایید استریل بودن واکسن برای فرمولاسیون انجام شد.

۲-۲-آماده سازی سالن نگهداری میگو

برای پرورش میگوها، از سالنی در مرکز آموزش علمی-کاربردی جهاد بوشهر (خلیج فارس) در نزدیکی ساختمان شماره-۲ پژوهشکده میگوی کشور استفاده گردید. پس از بیرون بردن وسایل اضافه و شستشوی کف و دیوارهای سالن، به منظور ضد عفونی کردن سالن به مدت ۲۴ ساعت کف سالن آب کلر غلیظ ریخته شد. پس از آن ۱۴ عدد تانک ۳۰۰ لیتری به همراه پایه و دو عدد هم تانک ۲۰۰۰ لیتری به سالن آورده شدند و پس از شستن و ضد عفونی کردن با آب کلر، در دو طرف سالن چیده شدند. سپس با توجه به تعداد تانکهای پیش بینی شده و ابعاد سالن، سیستم هوادهی طراحی شد. برای سالن دو عدد سیستم هوادهی مجزا تعبیه گردید که هر سیستم توانایی فراهم کردن اکسیژن کافی برای ۱۰ عدد تانک پرورش میگو را داشت. بطور کلی هر سیستم هوادهی دارای یک پمپ هواده قوی (Heila) بود که خروجی آن از طریق شلنگ به لوله‌های نصب شده در کنار تانکها وصل می شد و از لوله‌ها برای هر تانک بوسیله شلنگ آکواریوم دو عدد خروجی تعبیه گردید. پس از نصب کردن سیستم هوادهی و قرار دادن پمپها در جای خود، به منظور تامین برق پمپ‌ها و بخاری‌های آکواریومی که بعداً می بایستی در تانکها قرار داده می شدند، برای سالن کابل کشی جدیدی طراحی و اجرا شد. به منظور تامین برق پمپ‌ها در مواقع قطعی برق، نیز یک ژنراتور برق با توان یک کیلو وات در بیرون سالن و دو عدد دستگاه UPS در داخل سالن قرار داده شد، تا در زمان‌های قطعی برق پمپ‌ها به آنها وصل شوند. به دلیل سابقه دار بودن قطعی برق به مدت طولانی، علاوه بر نصب سیستم برق اضطراری دو عدد کپسول اکسیژن نیز در بیرون سالن قرار داده شد و با شلنگ به لوله‌های هوادهی وصل شدند، تا در مواقع قطعی برق به مدت طولانی که احتمال کاهش شدید اکسیژن بود، اکسیژن خالص وارد مدار شود.

پس از راه اندازی سیستم هوادهی، برق کشی سالن و شستن و ضدعفونی کردن تانکهای پرورش و قرار دادن آنها در جای خود، تانکها با آب دریا پر شدند. آبی که برای پرورش میگوها استفاده می‌گردید، ابتدا در ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه به منظور از بین بردن عوامل احتمالی بیماری‌زا بوسیله فیلتر پنج میکرون، فیلتر شده و سپس کلرزنی می‌شد و به مدت ۴۸ ساعت برای از بین بردن کلر هوادهی می‌شد. پس از اطمینان از تمیز و عاری بودن آب از هر گونه آلودگی، بوسیله تانک ۲۰۰۰ لیتری به سالن منتقل می‌شد و در آنجا بوسیله پمپ کف‌کش آب وارد تانکهای پرورش می‌شد.

پس از آبگیری تمامی تانک‌ها و وصل کردن سنگهای هوا و روشن کردن سیستم هوادهی، به مدت ۲۴ ساعت سیستم کار کرد تا مشکلات احتمالی در مورد هوادهی مشخص شود و ایرادهای موجود مرتفع گردد و سالن برای پرورش میگو کاملا مهیا گردد (شکل ۸).

شکل ۸: مراحل آماده سازی سالن

۳-۲-تهیه پست لارو میگو، انتقال به آزمایشگاه و تقسیم کردن آنها به تانکهای پرورش

برای انجام این آزمایش، ۱۴۰۰۰ عدد پست لارو میگوی وانامی (*L. Vannamei*) از مرکز تکثیر بندر کلاهی واقع در استان هرمزگان تهیه گردید و به سالن که از قبل آماده شده بود، منتقل شدند. برای انتقال ابتدا پست لاروها به گروه‌هایی تقسیم شده و بوسیله پلاستیک‌های مخصوص حمل میگو به سالن آماده شده منتقل شدند. بدین منظور یک سوم هر پلاستیک آب ریخته شد و دو سوم دیگر بوسیله اکسیژن خالص پر شد تا در طول مسیر طولانی حمل و نقل میگوها دچار کمبود اکسیژن نشوند. برای جلوگیری از نوسان دمایی در طول مسیر حمل و نقل، پلاستیک‌ها در ظروف عایق در بسته گذاشته شدند و در شب که هوا خنک تر بوده و میزان مصرف اکسیژن نیز کمتر می باشد، پست لاروهای میگو منتقل شدند.

به‌منظور ذخیره سازی پست لاروها، پس از انتقال پست‌لاروها به سالن پرورش، به‌دلیل اختلاف شرایط فیزیکوشیمیایی آب موجود در پلاستیک‌ها با آب موجود در تانک‌ها می بایستی به منظور جلوگیری از هرگونه استرس و شوک مضاعف به پست‌لاروها، آنها کم کم با شرایط جدید آداپته می شدند. بدین منظور پس از شستن لایه بیرونی پلاستیک‌ها با آب شیرین ابتدا تمامی پلاستیک‌ها بدون اینکه باز شوند در درون آب تانک ذخیره به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند تا دمای آب درون پلاستیک‌ها با آب تانک، یکی شود (شکل ۹). سپس هر پلاستیک که حاوی ۱۰۰۰ عدد پست لارو بود به یک تانک ۳۰۰ لیتری منتقل شد و در آن باز شده و بدون اینکه آب موجود در آن خالی شود، هر چند دقیقه یکبار مقداری از آب تانک به آب موجود در پلاستیک اضافه می‌شد تا پست لاروها کم کم به آب جدید عادت کردند، سپس تمامی محتویات پلاستیک وارد آب تانک گردید و پس از تنظیم هوادهی، به منظور جلوگیری از استرس بیشتر، به مدت ۸ ساعت سالن ترک گردید و از غذا دهی به پست لاروها خودداری شد تا کاملا آرام شدند.در این مطالعه از ۱۴ عدد تانک ۳۰۰ لیتری جهت ذخیره سازی و تیمار بندی میگوهای آزمایش استفاده شد.

شکل۹: آماده سازی گروه های میگو، تغدیه و نگهداری آنها

پس از انتقال میگوها به تانک‌ها و انجام عملیات سازگاری، تانک‌ها بر اساس تیمارهای مختلف آزمایشی که در جدول۱ به نمایش در آمده است، شماره گذاری شدند.پس از انتقال میگوها به تانک های ۳۰۰ لیتری و انجام عملیات سازگاری، تیمار بندی پست لاروها صورت پذیرفت. شایان ذکر است که این مطالعه از ۱۱ تیمار هر کدام با سه تکرار تشکیل شده بود (جدول ۱).

جدول ۱: تیمار بندی پست لاروهای واکسینه شده و غیر واکسینه مطالعه

واکسیناسیون	سن پست لارو	تیمار	کد تیمار	توضیحات
واکسینه	۵ -۱۵	بدون مواجهه	A	تیمار آزمایشی
		PL۴۰-۶۰	B	تیمار آزمایشی
		PL۶۰	C	تیمار آزمایشی
	۱۲ -۲۶	بدون مواجهه	D	تیمار آزمایشی
		PL۴۰-۶۰	E	تیمار آزمایشی
		PL۶۰	F	تیمار آزمایشی
غیر واکسینه	۵ -۱۵	بدون مواجهه	G	کنترل منفی
		PL۴۰-۶۰	H	کنترل مثبت
		PL۶۰	I	کنترل مثبت
	۱۲ -۲۶	PL۴۰-۶۰	J	کنترل مثبت
		PL۶۰	K	کنترل مثبت

۱-۳-۲-تغذیه و نگهداری پست لاروهای تیمارهای مختلف مطالعه

پست لاروها ابتدا به مدت یک ماه روزانه سه وعده در ساعت‌های ۸، ۱۶ و ۲۴ غذادهی می‌شدند. در ساعت ۱۶ به میگوها ناپلی آرتمیای تازه هچ شده داده می‌شد و در سایر وعده‌ها غذای کنسانتره مخصوص دوران پست-لاروی داده می شد. بر حسب دستورالعمل ثبت شده در کاتالوگ غذا، روزانه یک گرم غذای کنسانتره به ازای هر ۱۰۰۰ عدد پست لارو میگو داده که این میزان غذا در دو وعده صبح و شب داده می شد ولی در وعده ظهر ناپلی آرتمیا داده می شد. در هنگام غذادهی، هوادهی به مدت ۳۰ دقیقه قطع می شد تا غذا بهتر در دسترس میگوها قرار بگیرد.

باقیمانده غذایی و فضولات موجود در تانک‌های پرورش، یک روز در میان بوسیله سیفون کردن از تانک‌ها خارج می شد. برای این کار ابتدا جریان دورانی ملایمی به آب درون تانک داده می شد تا مواد آلی اضافه موجود در وسط تانک جمع شوند، سپس بوسیله شلنگ آکواریوم مواد جمع شده از تانک به درون تشت دیگری ریخته شده و پس از اینکه از عدم وجود پست لارو میگو در آب فیلتر شده اطمینان حاصل می شد، دور ریخته می شد. تعویض آب به میزان یک سوم حجم آب موجود در تانک، در ماه اول پرورش هر پنج روز یکبار صورت می گرفت. برای این کار ابتدا بوسیله شلنگی که یک طرف آن بوسیله توری بسته شده بود، یک سوم آب تانک خالی شده و آب جدید از تانک ذخیره آب توسط پمپ به آرامی اضافه می شد.

در ادامه‌ی دوره‌ی پرورش با بزرگتر شدن میگوها، اندازه، حجم و تعداد دفعات غذادهی نیز افزایش یافت. در ماههای دوم و سوم دفعات غذادهی از سه وعده به چهار وعده افزایش یافت که در ساعت ۶، ۱۸ و ۲۴ غذای کنسانتره ۴۰۰۲ شرکت هوورراش و در ساعت ۱۲ ناپلی آرتمیا داده می شد. همچنین میزان غذای کنسانتره‌ی روزانه هر تانک از یک گرم در ماه اول به دو گرم در ماه دوم و سه گرم در ماه سوم افزایش یافت. در ماه دوم و سوم بدلیل افزایش میزان غذادهی، سیفون کردن بصورت روزانه و تعویض آب نیز هر سه روز یک بار صورت پذیرفت. لازم به ذکر می باشد برای جلوگیری از انتقال آلودگی احتمالی در طول دوره آزمایش، تمامی وسایل مربوط به سیفون کردن و تعویض آب و همچنین ساچوک برای گرفتن میگوها، برای هر تانک جدا تعبیه شده بود.

۲-۳-۲-آماده سازی آرتمیا

در این مطالعه برای تغذیه پست لاروها روزانه حداقل از یک وعده ناپلی آرتمیا فرانسیکانا استفاده شد. لیکن روزانه ۲۴ ساعت قبل از شروع تغذیه هر وعده، با شکوفا نمودن سه گرم سیست آرتیما در ظروف ۲ لیتری تغذیه پست لاروها صورت می پذیرفت. از این رو با تأمین دوره نوری ۲۴ ساعت روشنائی و شدت تابش ۲۵۰۰ – ۲۰۰۰ لوکس، درجه شوری ۳۵ قسمت در هزار همراه با هوادهی شدید شرایط مناسب جهت شکوفا شدن سیست آرتمیا فراهم شد. از این رو پس از اطمینان از شکوفا شدن سیست‌های آرتیما با قطع هواده و پوشاندن سطح ظروف ۲ لیتری همزمان با شناور شدن پوسته‌های سیست آرتمیا با استفاده از جذب نوری، ناپلی‌های تازه شکوفا

شده آرتمیا بوسیله شلنگ آکواریوم ناپلی‌ها سیفون شده و در ظرف جدید ریخته شده و بوسیله پیمانه به ۱۴ قسمت مساوی تقسیم شده و در تانکها ریخته می شد.

٤-٣-٢-واکسیناسیون پست لاروهای میگو با رادیوواکسن به روش غوطه وری

به منظور استفاده از این رادیوواکسن در واحدهای تکثیر میگو می توان از پست لاروهای میگو ۵ تا ۲۶ روزه استفاده نمود. روش واکسیناسیون این بچه میگوها، غوطه‌وری می‌باشد. واکسیناسیون در دو دز با فاصله ۱۰ الی ۱۴ روز انجام گردید (شکل ۱۰). ابتدا حجم آب تانک را تا حداقل ممکن کاهش داده سپس واکسن را به میزان ۴۰ تا ۵۰ میلی لیتر به ازا ی هر ۱۰۰۰ پست لارو میگو به آب آنها افزوده و پس از حدود یک ساعت حجم آب تانک را مجدد به میزان اولیه می رسانیم.در ادامه پس از گذشت حدود یک ساعت آبگیری تانک ها صورت پذیرفت و حجم آب آنها مجدداً به میزان اولیه رسانده شد.شایان ذکر است که با توجه به نتایج حاصل از فاز یک پروژه میزان غلظت مناسب رادیوواکسن در نظر گرفته شده برای هر میگو ۳-۱۰ میلی لیتر بود.

به این ترتیب طبق برنامه واکسیناسیون در زمانهای مشخص انجام گردید. همچنین مواجهه با ویروس زنده نیز طبق همان برنامه در زمانهای مشخص انجام و تعداد تلفات روزانه دوبار شمارش و جمع آوری می شد.

شکل ۱۰: الف) رادیوواکسن بیماری لکه سفید میگو – ب) گروه بندی پست لارو های میگو جهت واکسیناسیون– ج) کاهش حجم آب تانکها تا میزان یک سوم به منظور انجام واکسیناسیون به روش غوطه وری – د) انجام واکسیناسیون به روش غوطه وری

۵-۳-۲-نمونه گیری از گروههای میگو جهت انجام آزمون های بیومتری، PCR و بررسی سلول های ایمنی

جهت آزمون‌های بیومتری و بررسی سلول‌های ایمنی در طول دوره آزمایش سه بار از پست لاروهای ۱۵-۵ و پست لاروهای ۲۴-۱۲ روزه (در مراحل PL40 قبل از مواجهه با ویروس زنده، PL60 قبل از مواجهه با ویروس زنده و PL70 بعد از مواجهه با ویروس زنده) موجود در تانک‌ها به‌طور تصادفی نمونه‌گیری به‌عمل آمد. در هر بار نمونه برداری، از هر تانک بطور تصادفی ۱۰ عدد میگو برداشته می شد، که هر ۱۰ عدد آنها مورد بررسی طول و وزن قرار می گرفتند و بعد از سنجش وزن و طول مجدداً به تانک های مربوط به خود بازگردانده شدند. جهت انجام آزمون PCR از این ده عدد دو عدد هم به طور تصادفی انتخاب می شدند.

٤-۲-آزمون بیومتری

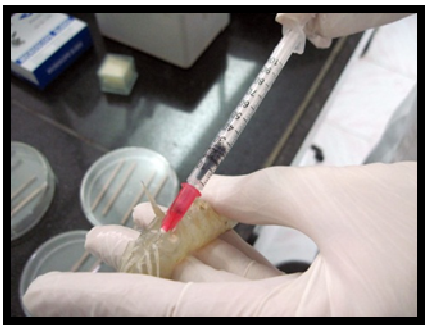
ده عدد میگو انتخاب شده از هر نوع تیمار برای انجام آزمون بیومتری از نظر طول اندازه گیری و ثبت شدند همچنین وزن کل ۱۰ عدد میگو با هم نیز اندازه گیری و ثبت شد(شکل ۱۱).

شکل ۱۱: آزمون بیومتری، اندازه گیری قد و وزن میگوها

۵-۲-آسپیراسیون همولمف و تعیین شاخص های سلامتی (THC و TPP)

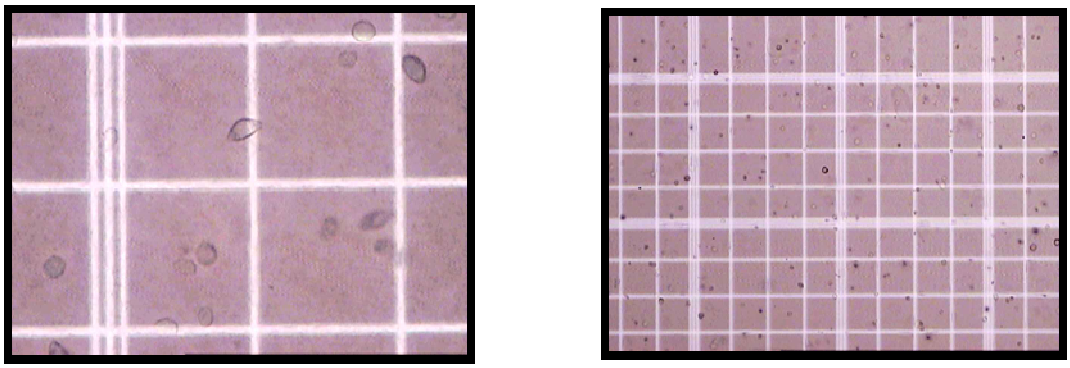
برای تعیین تعداد هموسیت کل(THC) و پروتئین پلاسمای کل،همولمف،ازسطح شکمی و از زیر آخرین پای شناآسپیره شد(شکل ۱۲). برای این منظورازسرنگ یک میلی‌لیتر که حاوی ۰,۴ml آنتی کوآگولانت (محلولAlsever) بادمای ۴ درجه سانتیگرادو۷/۲pH می‌باشد، استفاده گردید(شکل ۱۳).پس ازنمونه‌گیری،محتویات سرنگ به لوله‌های اپندورف استریل مخصوص سانتریفیوژکه ازقبل حاوی ۰/۴ml آنتی‌کوآگولانت می‌باشد انتقال یافت وبرای هرمیگو دو اسمیر از هر نمونه همولمف آسپیره شده تهیه شد و در مجاورت هواخشک گردید. همولمف باقیمانده در اپندورفها تا ۱ ساعت پس ازنمونه‌برداری دریخ قابل نگهداری می‌باشد. برای اندازه‌گیری TPP نیز از روش لوری استفاده شد. این روش براساس

تبدیل+Cu2بهCu+درشرایط قلیایی و واکنش مسقل یایی با پروتئین‌ها و احیای فسفومولیبدات (معرف فولین) توسط تیروزین وتریپتوفان پروتئین‌ها استوار می‌باشد. دراثر ایجادکمپلکس پروتئین‌ها با معرف فولین (ترکیبات آن عبارتنداز: تنگستات سدیم و مولیبدات سدیم در اسیدفسفریک و اسیدکلریدریک)رنگ آبی ایجاد می‌شودکه شدت رنگ حاصله به مقدار اسیدآمینه‌های حلقوی فوق بستگی دارد. سپس با استفاده ازاسپکتروفوتومتر، میزان جذب نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری و با منحنی استاندارد مقایسه شده و میزان پروتئین محلول نمونه تعیین گردید.



شکل ۱۲:آسپیراسیون همولمف از سینوس شکمی به کمک سرنگ ۱ میلی لیتری حاوی محلول آنتی کواگولانت

شکل ۱۳:محلول ها و معرف های مورد استفاده برای تهیه آنتی گواگولانت و رنگ آمیزی اسلایدهای همولمف



شکل ١٤: نمای قابل مشاهده از هموسیت‌های میگوی سفید هندی بر روی لام هموسیتومتر توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ×١٠ (سمت راست) و ×٤٠ (سمت چپ).

محلول های مورد نیاز:

محلول شماره ۱: محلول ۱٪ سولفات مس ($CuSO_4. 5H_2O$)

محلول شماره ۲: محلول ۲٪ سدیم پتاسیم تارتارات (Na2 Tartrate. 2H2O)

محلول شماره ۳: محلول ۰/۲ مولار سدیم هیدروکساید (NaOH)

محلول شماره ۴: محلول ۴٪ سدیم کربنات ($Na2CO_3$)

معرف فولین (Folin-ciocalteaa)

کلیه محلول ها با آب دیونیزه تهیه شد. رقت های استاندارد از آلبومین سرم گاوی (Bovin SerumAlbumin fraction v) شامل رقت های: ۰,۰۰ mg/ml، ۰,۰۲mg/ml، ۰,۰۴ mg/ml، ۰,۰۶ mg/ml، ۰,۰۸ mg/ml و ۰,۱mg/ml و همچنین رقت های۰,۲ mg/ml، ۰,۴ mg/ml، ۰,۶ mg/ml، ۰,۸ mg/ml و ۱,۰ mg/ml.نمونه شاهد شامل ۱ ml – ۰,۵ آب دیونیزه و آزمونه شامل همولمف آسپیره شده می‌باشد.

۲-۶-مراحل آزمایش

به ۵۰ ml از محلول ۳، ۵۰ ml محلول ۴ اضافه کرده سپس ۱ ml از محلول ۱ و ۱ ml از محلول ۲ به آن اضافه شد و نام آن محلول A گذاشته شد (این محلول باید قبل از هر آزمون به صورت تازه آماده شود). سپس به ۱ ml – ۰,۵ از نمونه مورد آزمایش (که ممکن است رقت‌های استاندارد BSA یا نمونه های حاصل از دیالیز و یا هر آزمونه دیگری باشد) ۲ ml از محلول A را اضافه کرده و خوب مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. در این فاصله زمانی، به ۱۰ ml از محلول فولین، ۱۰ ml آب دیونیزه اضافه کرده تا محلول ۱ نرمال فولین تهیه شده و نام آن محلول B گذاشته شد. پس از طی شدن مدت زمان ذکر شده، به نمونه مورد آزمایش ۰,۲۵ ml از محلول B افزوده و خوب مخلوط گردید و میزان جذب نوری نمونه ها پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه و تاریکی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Jenway 6800 UV/VIS، برنامه اندازه‌گیری پروتئین توسط تست لوری خوانده شد و با قرار دادن عدد مربوطه در منحنی استاندارد، میزان پروتئین نمونه‌ها برحسب mg/ml تعیین گردید. برای هر نمونه سه تکرار درنظر گرفته شد.

۲-۷-تعیین فعالیت فاگوسیتی هموسیت ها

به‌منظور اندازه گیری فعالیت فاگوسیتوزی ۲۵ میکرولیتر از همولنف آماده سازی شده در اپندروف را بر روی اسلاید شیشه‌ای تمیز انتقال داده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌گردد. سپس ۲۵ میکرولیتر باکتری *Vibrio sp.* به غلظت ۱×۱۰^{۸} سلول در میلی لیتر را به اسلاید اضافه می‌شود و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌گردد. سپس اسلایدها را با آنتی کواگولانت شستشو داده و با گلوتارآلدئید ۴٪ در محلول آنتی کواگولانت به مدت ۱ دقیقه

فیکس می‌شود. در مرحله بعد اسلایدها را ۱ دقیقه با آب مقطر شستشو داده و با اتانل به مدت ۱ دقیقه فیکس می‌شود. اسلایدها را در مجاورت هوا خشک کرده و سپس با تولوئیدن بلو به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی کرده و رنگ اضاف با آب جاری حذف می‌شود. پس از این مراحل اسلاید ها با کمک میکروسکوپ نوری و با بزرگ نمایی ×۱۰۰۰ مورد مطالعه قرارگرفته و ۲۰۰ هموسیت شمارش کرده و تعداد هموسیت‌هایی که باکتری را هضم کرده‌اند، ثبت می گردد(Jiang et al., 2004)

درصد فاگوسیتوز=(تعداد هموسیت هایی که باکتریها را هضم کرده اند / تعداد کل هموسیهای مشاهده شده) × ۱۰۰

۸-۲-آزمایش هیستوپاتولوژی

تعداد ۳ میگو به ازای هر تیمار و تکرار انتخاب شده و تحت آزمایشات هیستوپاتولوژی قرار گرفت. با توجه به اینکه اولین مرحله واکسیناسیون در مرحله پست لارو ۵ و سپس در پست لارو ۱۲ و دومین گروه میگوها در پست لارو ۲۶ بود. سپس میگوها در پست لارو ۴۰ و ۷۰ با ویروس لکه سفید مواجهه شدند. تعداد نمونه های مورد نیاز ۴۸ عدد خواهد بود. بدیهی است پس از ۵ تا ۱۰ روز نسبت به نمونه برداری هیستوپاتولوژی اقدام گردید.

نمونه‌ها را بلافاصله پس از خارج شدن از آب ثابت نموده ویا آنها را پس از خارج شدن از آب و نگهداری در یخ ، و در یک سطل یا ظروف با مقدار کافی آب اکسیژن‌دار قرار داده، سپس به آزمایشگاه منتقل و برای ثابت کردن آماده می کنیم.حداکثر دقت صورت گرفت که هر یک از نمونه‌ها قبل از ثابت شدن در حداقل استرس جابه‌جایی قرار گیرند. در واقع نمونه‌های جمع‌آوری شده اگر به موقع فیکس نشوند تغییرات بعد از مرگ اتفاق می‌افتد که شامل گرد و لایه‌لایه شدند سلول‌ها به خصوص سلولهای هپاتوپانکراس می‌باشد هر چه زمان فیکس شدن نمونه‌ها بعد از مرگ طولانی‌تر باشد تغییرات سلولها بیشتر خواهد بود. برای ثابت نمودن بافتها از محلول دیویدسون فیکساتور که بهترین ثابت‌کنندهٔ عمومی برای میگوهای پنائیده میباشد استفاده گردید. اسید استیک موجود در این محلول می تواند کلسیم را از پوستهٔ خارجی میگو جدا نموده و به عمل برش دادن بافتها کمک کند.برای ساختن یک لیتر محلول دیویدسون فیکساتور از ترکیبات ذیل استفاده شد:

۱ـ ۳۳۰ ml الک اتیلیک ۹۵ درصد

۲- ۲۲۰ ml فرمالین ۱۰۰ درصد (محلول آبی اشباع شده از گاز فرمالدئید، محلول ۳۷ تا ۳۹ درصد)

۳- ۱۱۵ ml اسید استیک خالص

۴- ۳۳۵ ml آب مقطر

این فیکساتور را میتوان در دمای آزمایشگاه به مدت طولانی نگهداری نموده و باید دقت شود که به دلیل سمی بودن، هنگام کار با آن حتماً از دستکش استفاده شود و از عمل استنشاق مستقیم آن جلوگیری شود.باید احتیاط کرد که پوست و چشم با این ثابت‌کننده، تماس حاصل نکند.

۱-۸-۲-روش‌های ثابت‌کردن با فتها با محلول دیویدسون فیکساتور

لاروها و پست‌لاروهای اولیه:

لاروها و پست‌لاروها به طور مستقیم در محلول فیکس‌کننده به مدت ۲۴ـ۱۲ ساعت نگهداری شدند و سپس آنها را به الکل ۷۰ـ۵۰ درصد منتقل و در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند.

پست لاروهای بزرگ، نوجوانها و بالغ‌ها:

در پست لاروهای بزرگ نوجوانها و بالغ‌ها ابتدا فیکساتور را در هپاتوپانکراس و سپس در قسمتهای واقع در دو طرف بند سوم و بند ششم تزریق نمودیم و بعد به وسیله یک قیچی از عرض بند ششم بدن تا وسط قسمت سرسینه و در نهایت تا انتهای سر و نزدیک روستروم و پشت پایک چشمی برش داده شد. برای نمونه‌های خیلی بزرگ یک شکاف عمیق در حد فاصل بدن و سر، در محل اتصال آنها و به صورت عرضی ایجاد شد این برشها سبب می‌شود که ماده فیکساتور به خوبی در سلول‌ها نفوذ نمایند.

بعد از ایجاد برشها میگو را در ماده فیکساتور قرار دادیم. برای حصول نتیجه بهتر از سرنگهای ۱۰-۲۰ سی سی و بدون ایجاد شکاف در کوتیکول اقدام نمودیم. حجم فیکساتوری که نمونه‌ها را در آن قرار دادیم به نسبت ۱۰ برابر حجم میگوها یا بافتی از میگو بود که باید فیکس می شد و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر حسب اندازه میگوها در محلول فیکساتور قرار دادیم. نمونه‌ها را سپس به الکل ۷۰-۵۰ درصد منتقل نموده و در درجه حرارت آزمایشگاه نگهداری نمودیم.

۲-۸-۲-آماده‌سازی و برش بافتها

بعد از فیکس کردن، بافتها را برش دادیم. برای اینکه بافتها دچار صدمه یا خراشی نشوند، از قیچی یا تیغی تیز استفاده نمودیم. چنانچه اندام یا بافت مشخصی را برای قالب‌گیری آماده می‌کنیم باید دقت شود که بافتهای آن اندام را از یک طرف برش داده و از انجام برش سه بعدی جلوگیری کنیم. اگر اندازه میگوها کمتر از ۳ سانتیمتر بود، آنها را به صورت طولی و از قسمت بیرونی به طرف میانی برش دادیم. برشهای کوچک را در بلوک‌های بوجود آمده انجام دادیم تا آبشش ظاهر شود. همچنین برشهای بزرگ‌تر جهت مشاهده اندام‌های دیگر انجام داده شدند. اگر میگوها بزرگتر از ۳ سانتیمتر باشند، برشها در جاهای مختلف انجام شد.

۳-۸-۲-آماده کردن بافتها (Processing) و آبگیری

قرار دادن بافتها (embedding) در پارافین موجب می‌شود که برشهای مناسب برای مطالعه بافتها ایجاد شود. با این وجود هنگامی که آب در بافتها وجود دارد، پارافین وارد بافت نمی‌شود. عمل آبگیری از بافتها به آرامی با گذاشتن آنها در الکل با غلظت‌های پائین و سپس رسیدن به غلظت ۱۰۰ درصد انجام شد. اگر یکباره بافت را در

الکل ۱۰۰ درصد قرار دهیم، موجب تخریب بافتها می‌شود. الکل به طور مشخص با پارافین مخلوط شده، بنابراین بعد از آبگیری بافت را با یک ماده حل کننده الکل مثل زایلین (xylene) شستشو داده تا الکل از بافتها خارج شد و عمل نفوذ پارافین در بافت به طور کامل انجام گیرد.

عملیات آبگیری به شرح ذیل صورت پذیرفت:

۱- الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)

۲- الکل ۸۰ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)

۳- الکل ۹۵ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)

۴- الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)

۵- زایلین یا سایر مواد پاک‌کننده به مدت ۱ ساعت (۲ بار)

۶- پارافین به مدت ۲ ساعت (۲ بار)

٤-٨-٢-جاگذاری بافتها در پارافین یا تهیه بلوک از بافتها با پارافین (embedding)

بعد از اینکه آماده کردن بافتها شامل عملیات آبگیری، نفوذ پارافین و عمل تخلیه هوا، در دستگاه عمل‌آوری بافت (Tissue Processor) به طور کامل انجام گردید بافتها را به صورت قالب‌های پارافینی در آوردیم. برای این منظور بافتها را در یک قالب فلزی قرار داده و با پارافین مایع پر نمودیم. قبل از قالب‌گیری بافتها، آنها را با دستگاه پمپ خلع به مدت ۲۰ دقیقه از هوا تخلیه نموده و سپس عمل قالب‌گیری را انجام دادیم. عملیات قالب‌گیری نیز در دستگاه پلیت سرد و گرم (Hot Plate and Cold Plate) که دارای سینی سرد و سینی گرم است انجام شد. باید اطمینان حاصل شود که بافت را به صورتی در قالب گذاشته که می‌خواهیم برش دهیم. قالب‌ها را سپس سرد نموده تا پارافین جامد به همراه بافت به صورت قالب ایجاد گردد.

اگر عملیات فیکس کردن، آبگیری، نفوذ پارافین در بافت و قالب‌گیری به طور کامل انجام گیرد، عملیات برش بافتها و رنگ‌آمیزی به خوبی انجام می‌شود. بلوک‌های پارافینی ایجاد شده در یک جای سرد نگهداری شدند. عملیات برش از این بافتها باید به ضخامت ۶-۳ میکرون باشد.

٥-٨-٢-عملیات رنگ‌آمیزی (Staining)

برای کلیه روش‌های رنگ‌آمیزی سلولی، برش‌های ایجاد شده از قالب‌های پارافینی ابتدا باید از پارافین پاک شده و سپس آب‌گیری شود. این نکته بسیار حائز اهمیت است که بافت‌ها باید از پارافین پاک شوند تا رنگ‌ها جذب بافت گردند. به منظور جداسازی پارافین از برش‌های تهیه شده، لام های مقاطع تهیه شده را روی یک حوله کاغذی در یک آون یا کوره با حرارت ۵۰تا۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم. در این حالت پارافین آب شده و جذب حوله کاغذی گردیده و مقاطع جهت آبگیری آماده شدند. بعضی از مقاطع تهیه

شده شبیه گسترش تهیه شده از همولنف یا لام مرطوب با پارافین قالب‌گیری نمی‌شوند، لذا باید این گسترش‌ها را در هوا خشک نموده و دیگر نیازی به آبگیری ندارند. به منظور ساختن لام‌های دائمی، ضروری است بعد از رنگ‌آمیزی نیز عملیات آبگیری انجام شده و لام‌ها را با مواد ضد آب پوشاند. برای مطالعه بافت‌های میگو در آسیب‌شناسی، بهترین رنگ مورد استفاده رنگ هماتوکسیلین و ائوزین/ فلوکسین می‌باشد که بافتها تهیه شده را که روی لام ثابت نموده، آبگیری و با هماتوکسیلین و ائوزین/ فلوکسین رنگ‌آمیزی نمودیم.

٦-٨-٢-روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین

۱- زایلین و یا ماده پاک کننده به مدت ۵ دقیقه (۲ بار)
۲- الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)
۳- الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)
۴- الکل ۸۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)
۵- الکل ۵۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۱ بار)
۶- شستن با آب مقطر ۶ بار در ظروف جداگانه
۷- هماتوکسیلین ۶-۴ دقیقه
۸- شستن در آب جاری ۶-۴ دقیقه
۹- فلوکسین/ ائوزین ۲ دقیقه
۱۰- الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)
۱۱- الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۲ بار)
۱۲- زایلین به مدت ۱۰ بار غوطه‌ور کردن (dips) (۴ بار)
۱۳- پوشش دادن با مواد چسبنده و گذاشتن لامل
۱۴- مشاهده زیر میکروسکوپ

عمل مشاهده با میکروسکوپ باید حداقل بعد از ۲۴ ساعت انجام گیرد تا لامل کاملاً روی لام چسبیده و مواد چسبنده خشک شود.

۹-۲-تعیین درصد بقاء نسبی میگوهای ایمن سازی شده پس از مواجهه با ویروس زنده

در روش واکسیناسیون غوطه وری ۱۴ روز پس از واکسیناسیون دز یادآور، میزان 100 LD50/ml ویروس زنده به هر تانک افزوده شد. میگوها در گروه های مختلف از نظر تلفات در طول دوره های ایمنی مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تائید وجود ویروس در میگوهای تلف شده از روش Nested-PCR استفاده شد. تعیین درصد بازماندگی و تلفات نسبی تیمارهای مختلف بر اساس فرمول ذیل محاسبه گردید.

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد میگوهای بازمانده}}{\text{تعداد میگوهای ذخیره سازی شده}} \times ۱۰۰$$

: تعیین درصد بازماندگی پست لاروهای تیمارهای مختلف1معادله

$$\text{درصد تلفات نسبی} = \frac{\text{تلفات هر گروه}}{\text{تلفات گروه کنترل}} \times ۱۰۰$$

: تعیین تلفات نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف2معادله

$$\text{درصد بازماندگی نسبی} = ۱۰۰ - \text{درصد تلفات نسبی}$$

: تعیین درصد بازماندگی نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف3معادله

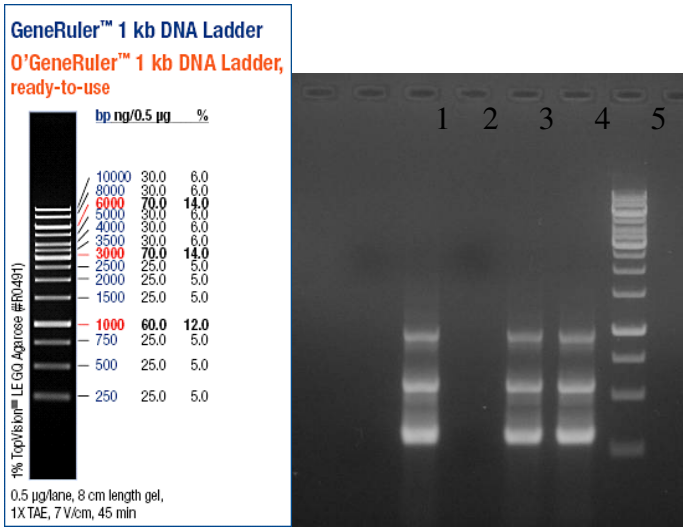
۱۰-۲-آنالیزهای آماری

کلیه نتایج اعم از بررسی میزان رشد وزنی و قدی، شمارش کلی هموسیت‌ها، میزان پروتئین کل پلاسما و درصد بقا نسبی در تمام گروهای میگو به روش مقایسه میانگین ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و نرم افزار SPSS16 انجام شد.اما برای داده‌های پارامتریک، تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون چند مقایسه‌ای Bonferroni برای مشخص کردن درصد هموسیت‌های متفاوت در میان کل گروه‌ها استفاده گردید. برای نشان دادن تفاوت درصد بقا در گروههای متفاوت از روشهای غیر پارامتری آزمونKruskal- wallis و آزمون Mann-Whitney استفاده شده است.

۳-نتایج

۳-۱-نتیجه تایید آلودگی نمونه های میگو به ویروس لکه سفید

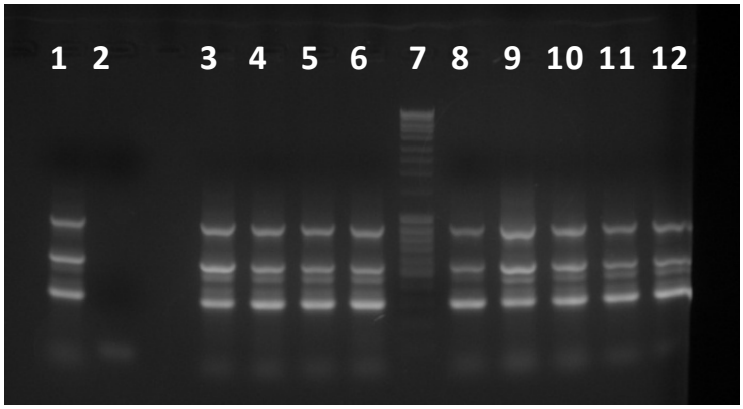
در شکل ۳-۱ نتایج آزمون Nested PCR نمونه‌های بافت میگو آلوده اولیه به ویروس لکه سفید مشاهده می-گردد، با توجه به مثبت بودن این نمونه‌ها، از آنها برای تهیه استوک ویروسی به منظور عفونی نمودن خرچنگ استفاده گردید.



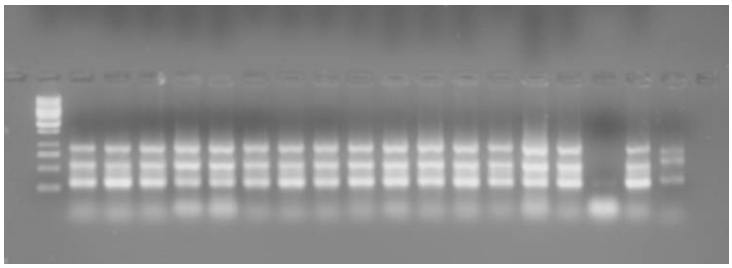
شکل ۱۵: نتایج Nested PCR نمونه‌های بافت میگو آلوده به ویروس لکه سفید، به ترتیب از سمت چپ شامل : کنترل مثبت (ردیف ۱)، کنترل منفی (ردیف ۲)، بافت میگو (ردیفهای ۳ و ٤)، مارکر – DNA Ladder (10000 bp) (ردیف ۵)

۳-۲-نتیجه تایید آزمون Nested PCR بافت و همولنف خرچنگ های عفونی شده با استوک ویروس

پس از عفونی نمودن خرچنگ ها با ویروس لکه سفید بافت و همولنف آنها از نظر حضور ویروس با آزمون Nested PCR مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در شکل‌های۱۶ و ۱۷ مشاهده می گردد.



شکل ١٦: نتیجه آزمون بافت و همولنف خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی لاین ۱: کنترل مثبت، لاین ۲: کنترل منفی، لاینهای ۳، ٤، ٥ و ٦: بافت خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی، لاین ۷: مارکر DNA و لاینهای ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ همولنف خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی



شکل۱۷: نتیجه آزمون بافت و همولنف خرچنگهای آلوده شده با استوک ویروسی

همچنین تیتر ویروس لکه سفید تکثیر یافته با استفاده از روش کربر محاسبه گردید که $10^{5,4}$ در هر میلی لیتر بدست آورده شد. پس از آماده سازی رادیوواکسن غیرفعال شده با پرتو گاما گروههای میگو که در فصل دوم توضیح داده شد به روش غوطه وری واکسینه شده و نتایج تلفات روزانه در هر گروه در جدول ۲ آورده شده است.

۳-۳-نتیجه تیتراسیون ویروس

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

جدول ۲: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی نشده (دز صفر) – تکراردوم

رقت	تعداد کل	تلفات	تعدادکل/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:
$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp\ -0.5) = -1-1\ (2.906-0.5) = -3.406$
$LD_{50} = 10^{3.4} / 0.01\ ml = 10^{5.4} / ml$

٤-۳-نتیجه تعیین تیتر نمونه‌های ویروس پرتوتابی شده

رقتهای ۱ ، $۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۲}$ ، $۱۰^{-۳}$ از سوسپانسیون ویروسی (همولنف حاوی ویروس WSSV) پرتوتابی شده در دز اپتی مم (۱۵ کیلوگری) که در فاز یک پروژه بدست آمد توسط سیستم پرتو دهنده گاما MDS Nordion در بافر استریل TN تهیه و جهت تعیین تیتر ویروسی مورد آزمایش روی گروههای میگو قرار گرفتند. نتایج تیتر ویروسهای پرتوتابی شده در جدول زیر آمده اند.

جدول ۳: تلفات گروههای ویروس پرتوتابی شده (دز ۲۰ کیلوگری گاما)

رقت	تعداد کل	تلفات	تعدادکل/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

محاسبه تیتر ویروس با استفاده از فرمول کربر و داده های جدول به شرح زیر می باشد. با توجه به عدم وجود تلفات در تمام رقتهای فوق و با توجه به حساسیت فرمول کربر از $\mathbf{10^{1.5} / ml}$ کمتر نمی باشد لذا دز ۱۵ کیلوگری برای غیرفعال سازی کامل ویروس مناسب است.

Karber Formula:
$-\text{Log } LD50 = Xa - D\ (Sp\ -0.5) = -0-1\ (0-0.5) = 0.5$
$LD_{50} = 10^{-0.5} / 0.01\ ml = 10^{1.5} / ml$

٥-٣-نتیجه آزمون بی ضرری

پس از غیرفعال سازی ویروس با پرتوتابی گاما واکسنهای غیرفعال شده در حالت منجمد به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شده و به گروههای میگو تلقیح گردیدند. نتایج تلفات در روزهای متوالی ثبت گردید که در جدول زیر مشاهده می گردد. تمام نمونه ها در آزمون Nested PCR از نظر ویروس لکه سفید منفی بودند.

جدول ٤: تلفات گروههای میگو تزریق شده با واکسن غیرفعال سازی شده با پرتو گاما و گروههای کنترل بافر و کنترل منفی در مدت دو هفته پس از تزریق دز اول واکسن

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

GI: واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما همراه با ایمونوژنGWI: واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما بدون ایمونوژنGB: واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما همراه با باکتری ویبریو غیرفعال

٦-٣-فرمولاسیون واکسن

جهت فرمولاسیون واکسن pH آن را در رنج خنثی تنظیم نموده و جهت استریل نمودن آن، از فیلتر ۰,۴۵ میکرون عبور داده شده و در ویال های شیشه ای درب دار استریل توزیع گردید. غلظت مناسب رادیوواکسن نیز با استفاده از تجربیات فاز اول پروژه به میزان حدود 10^3/ml برای هر میگو تنظیم گردید.با توجه به عدم وجود تلفات در گروههای میگو و در پاساژهای متوالی میگوهای تیمار شده با ویروس غیر فعال و همچنین تایید استریلیتی، بی‌ضرری و سلامت این محصول تایید گردید.

۷-۳-نتایج آزمون بیومتری

در آزمون بیومتری نمونه های میگو از گروههای مختلف واکسینه و غیرواکسینه در زمان های متفاوت (در سه زمان)، تهیه و از نظر طول و وزن با هم مقایسه شدند.

جدول ۵: آنالیز نتایج آزمونهای بیومتری در گروههای واکسیناسیون در زمانهای PL5,15 و PL12, 26 در مقایسه با گروههای بدون واکسن، در سن PL40

	واکسینه ۵،۱۵				غیرواکسینه						واکسینه۲۶،۱۲			
ردیف	تانک۱	تانک۲	تانک۱۳	تانک۱۴	تانک۵	تانک۶	تانک۷	تانک۸	تانک۹	تانک۱۰	تانک۱۱	تانک۱۲	تانک۳	تانک۴
۱	۲۲	۱۹	۲۵	۱۴	۲۳	۳۰	۲۳	۳۳	۲۹	۲۰	۳۱	۳۰	۲۰	۲۱
۲	۳۰	۱۸	۲۲	۲۰	۲۴	۲۴	۲۱	۳۲	۲۳	۲۵	۳۰	۲۷	۲۸	۲۳
۳	۲۱	۲۴	۲۳	۲۰	۲۹	۲۰	۲۵	۲۱	۲۱	۲۵	۲۰	۲۵	۲۰	۲۱
۴	۲۱	۱۵	۲۷	۲۰	۲۵	۲۷	۲۱	۲۶	۲۵	۲۱	۳۵	۲۶	۲۵	۲۱
۵	۲۲	۲۷	۲۰	۱۶	۱۳	۲۷	۲۴	۱۹	۲۲	۲۶	۲۳	۲۰	۲۰	۲۲
۶	۲۰	۱۵	۲۲	۲۱	۲۰	۲۲	۲۶	۲۴	۱۹	۲۰	۲۳	۱۸	۲۲	۲۱
۷	۱۵	۱۳	۲۲	۱۶	۲۹	۳۰	۲۵	۲۵	۲۵	۱۵	۳۶	۳۰	۱۸	۱۶
۸	۱۶	۱۵	۱۸	۲۲	۱۷	۲۶	۱۹	۲۵	۳۱	۱۷	۲۹	۲۱	۱۲	۱۶
۹	۱۴	۱۱	۱۴	۱۳	۱۱	۲۴	۱۶	۲۳	۳۱	۱۵	۱۹	۲۹	۲۷	۱۲
۱۰	۱۵	۱۳	۱۶	۱۴	۱۱	۲۶	۱۵	۲۰	۲۰	۱۷	۲۰	۱۵	۱۸	۱۰
میانگین طول	۱۹/۶	۱۷	۲۰/۹	۱۷/۶	۲۰/۲	۲۷/۶	۲۱/۵	۲۴/۸	۲۴/۶	۲۰/۱	۲۶/۴	۲۴/۱	۲۱	۱۸/۳
طول	Vaccination PL5,15 18.77±1.80				Without vaccination 23.52±3.33						Vaccination PL12, 26 22.45±3.54			
وزن کل (گرم)	۰/۶۲	۰/۴۵	۰/۶۶	۰/۶۸	۰/۷۳	۱/۲۴	۰/۷۱	۱/۲۴	۱/۰۹	۰/۷۴	۱/۳۷	۱/۰۱	۰/۶۷	۰/۶۱

ز نظر طول در سن چهل روزگی:

گروههای واکسیناسیون ۱۲ و۲۶ با گروههای ۵ و۱۵ اختلاف معنی داری ندارد(P>0.05)

گروههای بدون واکسیناسیون با گروههای ۵و ۱۵ اختلاف معنی دار دارند (P<0.05)

گروههای بدون واکسیناسیون با گروههای ۱۲و ۲۶ اختلاف معنی دار ندارند(P>0.05)

از نظر وزن در سن چهل روزگی:

گروههای واکسیناسیون ۵و ۱۵ با گروههای واکسیناسیون ۱۲و ۲۶ اختلاف معنی داری ندارند(P>0.05)

گروههای بدون واکسیناسیون با گروههای واکسیناسیون ۵و ۱۵ اختلاف معنی دار دارند(P<0.05)

گروههای بدون واکسیناسیون با گروههای واکسیناسیون ۱۲و ۲۶ اختلاف معنی دار ندارند(P>0.05)

نتیجه گیری در سن چهل روزگی:

با توجه به نتایج فوق و با در نظر گرفتن میانگینهای طول و وزن در هر سه گروه، می توان واکسیناسیون ۱۲و ۲۶ را بهترین زمان واکسیناسیون در نظر گرفت.

جدول ٦:نتایج آزمونهای بیومتری(طول و وزن) در گروههای واکسیناسیون در زمانهای PL5,15 و PL12, 26 در مقایسه با گروههای بدون واکسن در سن PL60 قبل از مواجهه با ویروس زنده

ردیف	واکسینه ۱۵,۱۵				غیرواکسینه					واکسینه۲۶,۱۲			
	تانک۱	تانک۴۲	تانک۱۳	تانک۱۴	تانک۵	تانک۶	تانک۷	تانک۸	تانک۹	تانک۱۰	تانک۱۱	تانک۱۲	تانک۳	تانک۴
۱	۲۷	۳۲	۳۰	۳۱	۳۲	۳۶	۳۹	۳۰	۲۷	۳۰	۳۰	۲۶	۳۲	۳۲
۲	۱۷	۲۷	۲۲	۴۰	۳۱	۲۲	۳۳	۲۰	۳۰	۳۰	۳۱	۳۵	۲۷	۲۹
۳	۱۶	۲۳	۳۰	۳۵	۳۲	۳۶	۳۲	۳۹	۲۴	۳۱	۳۶	۲۷	۲۳	۳۵
۴	۳۵	۲۹	۲۹	۲۱	۳۰	۲۴	۳۱	۳۵	۲۴	۳۲	۳۲	۳۰	۲۹	۲۸
۵	۲۹	۳۲	۲۸	۲۳	۳۹	۳۱	۲۸	۲۹	۳۰	۳۴	۲۴	۳۰	۳۲	۲۵
۶	۲۴	۲۰	۲۱	۲۰	۳۶	۲۵	۳۱	۲۷	۱۹	۲۶	۳۵	۲۶	۲۰	۳۰
۷	۲۱	۲۹	۳۱	۳۶	۳۵	۳۲	۲۰	۲۷	۳۵	۲۷	۴۰	۲۳	۲۹	۲۸
۸	۱۸	۲۵	۳۲	۳۶	۲۴	۲۵	۲۶	۲۰	۲۵	۲۰	۳۲	۳۱	۲۵	۲۶
۹	۱۵	۲۷	۲۵	۲۹	۳۶	۳۰	۱۶	۲۶	۲۷	۲۰	۲۱	۱۹	۲۷	۲۶
۱۰	۲۰	۲۷	۲۴	۲۲	۲۱	۲۹	۲۲	۲۵	۲۱	۲۷	۱۹	۲۳	۲۷	۲۰
میانگین طول	۲۵/۶	۲۷/۱۱	۲۷/۲	۲۹/۳	۳۱/۶	۲۹	۲۶/۸	۲۷/۸	۲۶/۲	۲۷/۷	۳۰	۲۷	۲۷/۲	۲۷/۹
طول	Vaccination PL5,15 27.30±1.52				Without vaccination 28.18±1.92						Vaccination PL12, 26 28.02±1.37			
کل وزن (گرم)	۱/۵۱	۱/۲۱	۱/۳۶	۱/۸	۲/۲۵	۱/۶۱	۱/۵	۱/۴۹	۱/۱۸	۱/۶۶	۲/۰۴	۱/۳۴	۱/۳۶	۱/۴۳
وزن (گرم)	۱/۴۷±۰/۲۵				۱/۶۱±۰/۳۵						۱/۵۴±۰/۳۳			

جدول ۷:نتایج آزمونهای بیومتری در گروههای واکسیناسیون در زمانهای PL5,15 و PL12, 26 در مقایسه با گروههای بدون واکسن در سن PL80 پس از مواجهه با ویروس زنده

ردیف	واکسینه ۱۵,۱۵				غیرواکسینه						واکسینه ۲۶,۱۲			
	تانک ۱	تانک ۴۲	تانک ۱۳	تانک ۱۴	تانک ۵	تانک ۶	تانک ۷	تانک ۸	تانک ۹	تانک ۱۰	تانک ۱۱	تانک ۱۲	تانک ۳	تانک ۴
۱	۲۶	۳۴	۳۰	۴۰	۳۷	۴۲	۳۶	۴۲	۴۵	۴۵	۳۵	۲۸	۳۴	۲۹
۲	۳۰	۳۵	۳۱	۴۶	۳۶	۲۶	۳۳	۴۱	۴۰	۳۹	۴۱	۳۷	۴۱	۳۵
۳	۳۰	۲۹	۳۹	۳۶	۳۹	۴۱	۳۵	۴۱	۳۰	۳۹	۵۰	۳۹	۳۱	۴۰
۴	۲۹	۴۰	۳۷	۳۲	۳۵	۲۶	۴۱	۳۶	۳۸	۴۰	۳۸	۳۰	۳۳	۳۵
۵	۲۴	۴۰	۴۹	۳۴	۳۰	۵۱	۳۲	۵۱	۴۰	۳۲	۳۵	۳۵	۲۶	۳۰
۶	۲۹	۲۵	۴۵	۳۶	۲۹	۴۵	۳۳	۴۵	۳۲	۳۷	۳۳	۳۷	۳۱	۴۱
۷	۳۴	۳۲	۲۷	۳۵	۳۶	۴۰	۳۵	۳۷	۳۱	۳۱	۳۲	۴۲	۲۷	۲۷
۸	۳۳	۳۱	۲۸	۳۱	۲۹	۳۵	۳۲	۳۷	۳۰	۳۱	۴۱	۳۲	۳۳	۳۰
۹	۳۰	۳۴	۳۱	۲۹	۳۶	۳۳	۳۰	۳۳	۲۸	۴۱	۲۵	۳۳	۲۷	۳۶
۱۰	۲۹	۲۹	۳۱	۲۹	۲۱	۲۸	۲۵	۲۲	۲۷	۲۷	۳۵	۲۱	۲۲	۳۰
میانگین طول ±SD	±۲/۵۴ ۳۰/۴	±۵/۰۴ ۳۲/۹	/۸±۷/۴ ۳۴	±۵/۲۲ ۳۴/۸	±۵/۴۵ ۳۲/۸	±۸/۵۱ ۳۶/۷	±۴/۱۵ ۳۳/۲	±۷/۷۲ ۳۸/۵	±۶/۱۳ ۳۴/۱	±۵/۶۵ ۳۶/۲	±۶/۶۳ ۳۶/۵	±۶/۰۵ ۳۳/۴	۵±۴/۸ ۳۰/	±۵/۲۹ ۳۳/۳
طول	Vaccination PL5,15 challenge		Vaccination PL5,15 No challenge		Positive control		Positive control		Negative control		Vaccination PL12, 26 No challenge		Vaccination PL12, 26 challenge	
کل وزن (گرم)	۲/۶	۱/۹	۳/۵	۳/۱	۲/۸	۳/۹	۲/۶	۱/۹	۲/۸۳	۲/۹۸	۳/۶	۲/۸۴	۲/۱۶	۲/۸۲
	۲/۲۵±۰/۴۹		۳/۳۵±۰/۲۸		۳/۳۵±۰/۷۷		۲/۲۵±۰/۴۹		۲/۹±۰/۱		۳/۲۲±۰/۵۴		۲/۴۹±۰/۴۶	

با توجه به نتایج مقایسه میانگینها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم افزار SPSS16 اختلاف معنی داری از نظر طول و وزن در سن هشتاد روزگی بین گروه های مختلف دیده نمی شود(P>0.05)

نمودار ۳:

۸-۳-تعیین مقادیر مربوط به شاخص های رشد در تیمارهای مختلف

۱-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده در روز ٤٠ پرورش

نتایج حاصل از مطالعه حاکی از این مطلب بود که حداکثر و حداقل وزن در پست لاروهای ۵ تا ۱۵ روزه واکسینه شده به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۲۰ گرم،مربوط به تیمار B و A بود، این در حالی بود که هیچگونه تفاوت معنی دار آماری میان داده های حاصل از میانگین وزنی تیمارهای مختلف پست لاروهای واکسینه شده در سن ۱۵ –۵ روز مشاهده نشد ($P>0.05$) و در رابطه با میانگین طول مشاهده شد که حداکثر و حداقل میزان طول به ترتیب با ۳۳ و ۱۱ میلیمتر مربوط به تیمارهای B و A می باشد. لذا مشاهده شد که مقادیر مربوط به میانگین طولی در میگوهای تیمار B بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار A بود ($P<0.05$). با این وجود علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به تیمار B نسبت به تیمار C هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$).(جدول ۸).

۲-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای ۲٦ – ۱۲ روزه واکسینه شده در روز ٤٠ پرورش

در این رابطه مشاهده شد که مقادیر مربوط به میانیگن وزنی میگوهای تیمار D بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار E و F می باشد ($P<0.05$). همچنین مقادیر مربوط به میگوهای تیمار E نیز بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار F بود ($P<0.05$) (جدول ۸).

جدول ۸:میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای واکسینه شده با ویروس غیرفعال شده لکه سفید تیمارهای مختلف مواجهه در روز ٤٠ پرورش (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشان دهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

تیمار آزمایشی	واکسینه					
سن پست لارو	۱۵-۵			۲٦-۱۲		
تیمار	بدون مواجهه (A)	PL ۴۰-۶۰ (B)	(C) PL۶۰	بدون مواجهه (D)	(E) PL۴۰ -۶۰	(F) PL۶۰
وزن (گرم)	۰/۵۳±۰/۰۳^{a}	۰/۶۷±۰/۵۵^{a}	۰/۵۵±۰/۰۸^{a}	۱/۳۶±۰/۱۱^{a}	۰/۶۷±۰/۰۳^{b}	۰/۶۰±۰/۰۴^{c}
طول (میلیمتر)	۱۸/۳۰±۱/۱۲^{b}	۲۴/۸۰±۱/۴۷^{a}	۲۱/۵۰±۳/۸۳^{ab}	۲۵/۳۵±۱/۳۰^{a}	۲۱/۰۰±۱/۵۰^{ab}	۱۸/۳۰±۱/۴۳^{b}

۳-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵ – ۵ روزه غیر واکسینه شده در روز ٤٠ پرورش

نتایج حاکی از این بود که میانگین وزنی میگوهای تیمار H بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار G و I می باشد ($P<0.05$). از سوی دیگر مشاهده شد که میانگین وزنی میگوهای تیمار G بطور معنی داری بیشتر از میانگین وزنی میگوهای تیمار I می باشد ($P<0.05$).این در حالی بود که علیرغم بیشتر بودن مقادیر میانگین طولی

میگوهای تیمار H نسبت به میگوهای تیمار I و G هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P<0.05$).(جدول ۹).

٤-٨-٣-میانگین وزن و طول پست لاروهای ٢٦ – ١٢ روزه غیر واکسینه شده در روز ٤٠ پرورش

نتایج نشان داد که میانگین وزنی و طولی میگوهای تیمار به‌طور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار K می باشد ($P<0.05$).(جدول ۹).

جدول ۹: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای غیر واکسینه تیمارهای مختلف مواجهه در روز ٤٠ پرورش (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشان دهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

تیمار شاهد	غیر واکسینه				
	کنترل منفی	کنترل مثبت			
سن پست لارو	۱۵ – ۵		٢٦ – ١٢		
تیمار	بدون مواجهه(G)	(H) PL۴۰ -۶۰	(I) PL۶۰	(J) PL۴۰ -۶۰	(K) PL۶۰
وزن (گرم)	۰/۹۱±۰/۰۶^{ab}	۱/۲۳±۰/۰۵^{a}	۰/۷۰±۰/۰۴^{b}	۱/۲۴±۰/۰۸^{a}	۰/۷۲±۰/۰۹^{b}
طول (میلیمتر)	۲۲/۳۵±۱/۰۶^{a}	۲۴/۸۰±۱/۴۷^{a}	۲۱/۵۰±۱/۲۱^{a}	۲۵/۶۰±۱/۰۱^{a}	۲۰/۲۰±۲/۱۸^{b}

٥-٨-٣-میانگین وزن و طول پست لاروهای ١٥ – ٥ روزه واکسینه شده در روز ٦٠ پرورش

نتایج حاکی از این مطلب بود که میانگین وزنی میگوهای تیمار B بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار A و C می باشد ($P<0.05$). از سوی دیگر علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزنی میگوهای تیمار A نسبت به میگوهای تیمار C هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین در رابطه با مقادیر مربوط به میانگین طولی مشاهده شد که علیرغم اختلاف موجود میان میگوهای تیمارA، B و C هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$)

٦-٨-٣-میانگین وزن و طول پست لاروهای ٢٦ – ١٢ روزه واکسینه شده در روز ٦٠ پرورش

نتایج نشان داد که علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول میگوهای تیما

٧-٨-٣-میانگین وزن و طول پست لاروهای ١٥ – ٥ روزه غیر واکسینه شده در روز ٦٠ پرورش

در این رابطه مشاهده شد که با وجود بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول میگوهای تیمار H نسبت به میگوهای تیمار G و I هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۱۰).

نتایج دال بر این مطلب بود که مقادیر مربوط به میانگین وزنی و طولی میگوهای تیمار K بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار J می باشد (P<0.05)(جدول ۱۰).

جدول ۱۰: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای غیر واکسینه شده در روز ٦٠ پرورش (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

تیمار شاهد	غیر واکسینه				
	کنترل منفی	کنترل مثبت			
سن پست لارو	۵ -۱۵		۱۲ -۲۶		
تیمار	بدون مواجهه(G)	(H) PL۴۰ -۶۰	(I) PL۶۰	(J) PL۴۰ -۶۰	(K) PL۶۰
وزن (گرم)	۰/۹۱±۰/۰۶^{ab}	۱/۲۳±۰/۰۵^{a}	۰/۷۰±۰/۰۴^{b}	۱/۲۴±۰/۰۸^{a}	۰/۷۲±۰/۰۹^{b}
طول (میلیمتر)	۲۲/۳۵±۱/۰۶^{a}	۲۴/۸۰±۱/۴۷^{a}	۲۱/۵۰±۱/۲۱^{a}	۲۵/۶۰±۱/۰۱^{a}	۲۰/۲۰±۲/۱۸^{b}

۸-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵ – ۵ روزه واکسینه شده در روز ۸۰ پرورش

نتایج نشان داد که مقادیر مربوط به میانگین وزنی میگوهای تیمار C بطور معنی داری بیشتر از مقادیر وزنی میگوهای تیمار A و B می باشد (*P<0.05*). لذاعلیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزنی میگوهای تیمار B در مقایسه با میگوهای تیمار A هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد (*P>0.05*). همچنین در رابطه با مقادیر مربوط به میانگین طولی میگوهای تیمارها مشاهده شد که با وجود بیشتر بودن مقادیر مربوط به میگوهای تیمار B و C در مقایسه با میگوهای تیمار A هیچگونه تفاوت معنی داری وجود نداشت (*P>0.05*) (جدول ۱۱).

۹-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای ۲٦ – ۱۲ روزه واکسینه شده در روز ۸۰ پرورش

نتایج نشان داد که مقادیر مربوط به میانگین وزنی میگوهای تیمار D بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار E و F می باشد (P<0.05)، از سوی دیگر مقادیر مربوط به میانگین وزنی میگوهای تیمار E بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار F بود (P<0.05). لیکن با وجود بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین طولی میگوهای تیمار D نسبت به میگوهای تیمار هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد (P>0.05).(جدول ۱۱).

جدول ۱۱:میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای واکسینه شده با ویروس غیرفعال شده لکه سفید تیمارهای مختلف مواجهه در روز ۸۰ پرورش (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

تیمار آزمایشی	واکسینه					
سن پست لارو	۵ -۱۵			۱۲ -۲۶		
تیمار	بدون مواجهه(A)	(B) PL ۴۰-۶۰	(C) PL۶۰	بدون مواجهه (D)	(E) PL۴۰ -۶۰	(F) PL۶۰
وزن (گرم)	۲/۲۹±۰/۱۲^{b}	۳/۱۲±۰/۲۹^{ab}	۳/۵۲±۰/۱۱^{a}	۳/۲۲±۰/۱۵^{a}	۲/۱۶±۰/۱۸^{c}	۲/۸۱±۰/۳۱^{b}
طول (میلیمتر)	۳۱/۱۵±۰/۹۴^{a}	۳۴/۸۰±۱/۶۵^{a}	۳۴/۸۰±۲/۳۶^{a}	۳۴/۹۵±۱/۴۲^{a}	۳۰/۵۰±۱/۶۷^{a}	۳۳/۳۰±۱/۵۲^{a}

۱۰-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵ – ۵ روزه غیر واکسینه شده در روز ۸۰ پرورش

نتایج نشان داد که مقادیر مربوط به میانگین وزنی میگوهای تیمار G بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار Iمی باشد ($P<0.05$)، در حالیکه با وجود کمتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزنی میگوهای تیمار G نسبت به میگوهای تیمار H هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$). از سوی دیگر با وجود بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین طولی میگوهای تیمار H نسبت میگوهای تیمار Gو I هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$).

۱۱-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای ۲٦ – ۱۲ روزه غیر واکسینه شده روز ۸۰ پرورش

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده شد که مقادیر مربوط به میانگین وزنی و طولی میگوهای تیمار I بطور معنی داری کمتر از میگوهای تیمار J می باشد ($P<0.05$).

جدول ۱۲: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای غیر واکسینه تیمارهای مختلف مواجهه در روز ۸۰ پرورش (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

تیمار شاهد	غیر واکسینه				
	کنترل منفی	کنترل مثبت			
سن پست لارو	۵ -۱۵			۱۲ -۲۶	
تیمار	بدون مواجهه(G)	(H) PL۴۰ -۶۰	(I) PL۶۰	(J) PL۴۰ -۶۰	(K) PL۶۰
وزن (گرم)	۲/۹۰±۰/۱۴^{a}	۱/۹۵±۰/۳۰^{ab}	۱/۵۹±۰/۱۱^{b}	۳/۹۳±۰/۱۰^{a}	۲/۷۹±۰/۱۷^{b}
طول (میلیمتر)	۳۵/۱۵±۱/۳۰^{a}	۳۸/۵۰±۲/۴۴^{a}	۳۳/۲۰±۱/۳۱^{a}	۳۶/۷۰±۲/۶۹^{a}	۳۲/۸۰±۱/۷۲^{b}

۱۲-۸-۳-میانگین وزن و طول پست لاروهای واکسینه شده در روزهای مختلف پرورش

نتایج حاکی از این مطلب بود که در روز ۴۰ پرورش در تیمارهای بجز تیمار بدون مواجهه هیچگونه تفاوت معنی دار آماری میان میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه مشاهده نشد ($P>0.05$). این در حالی بود که در میگوهای تیمار بدون مواجهه میانگین وزنی و طولی پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده بود ($P<0.05$) (جدول۱۳).

در ادامه مشاهده شد که در روز ۶۰ پرورش مقادیر مربوط به میانگین وزن پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده در روز ۴۰ پرورش با ویروس مواجهه شده بودند بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه می باشد ($P<0.05$).این در حالی بود که علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزنی پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده که در روز ۶۰ پرورش با ویروس مواجهه شده بودند هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین مشاهده شد که مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول پست لاروهای واکسینه شده ۲۶-۱۲ روزه تیمار بدون مواجهه بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه می باشد ($P<0.05$) (جدول ۱۳).

از سوی دیگر مشاهده شد که در روز ۸۰ پرورش مقادیر مربوط به میانگین وزن پست لاروهای ۱۵-۵ روزه در تیمار های مواجهه با ویروس در روز ۴۰ و ۶۰ پرورش بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده بود ($P<0.05$). این در حالی بود که در تیمار بدون مواجهه در روز ۸۰ پرورش میانگین وزن و طول پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه بود ($P<0.05$) (جدول ۱۳).

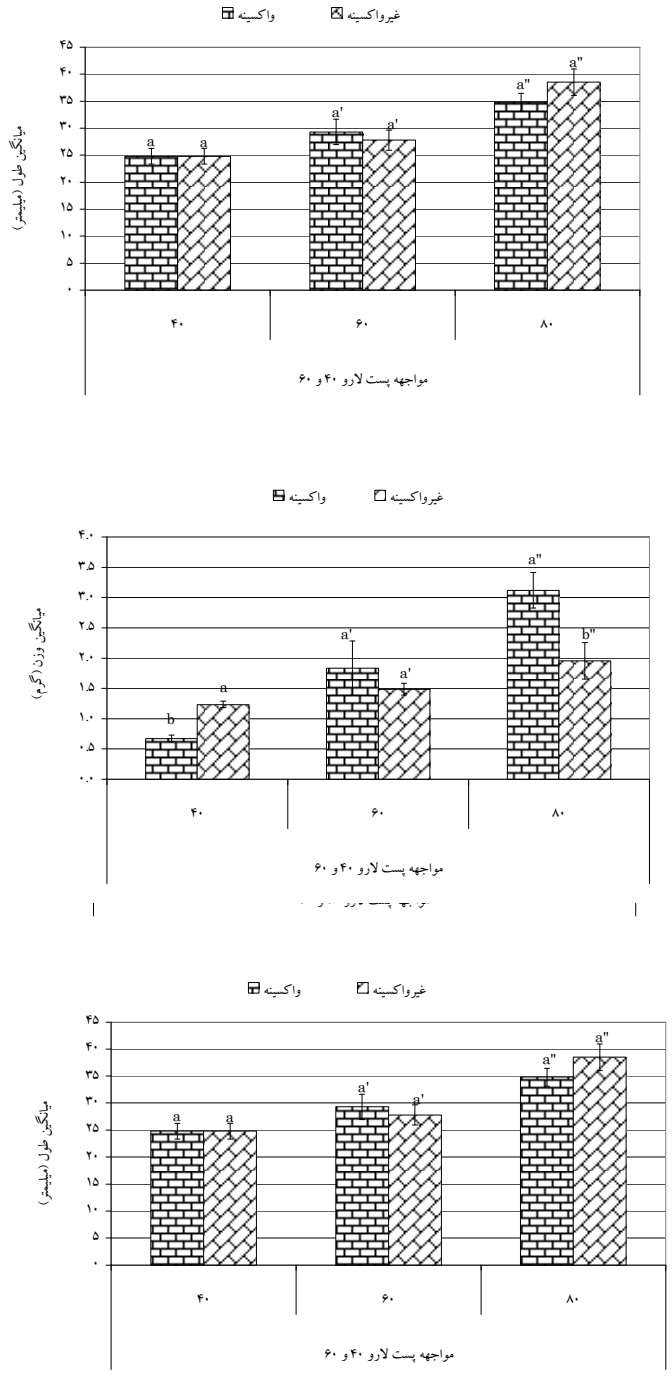
جدول ۱۳:میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده با ویروس غیرفعال شده لکه سفید تیمارهای مختلف مواجهه در روزهای مختلف پرورش (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

واکسینه							
تیمار	روز پرورش	۴۰		۶۰		۸۰	
	سن پست لارو	۱۵ - ۵	۲۶-۱۲	۱۵ – ۵	۲۶-۱۲	۱۵ - ۵	۲۶-۱۲
PL۴۰-۶۰	وزن (گرم)	۰/۶۷±۰/۰۵^{a}	۰/۶۷±۰/۰۳^{a}	۱/۸۳±۰/۱۴^{a}	۱/۳۶±۰/۰۶^{b}	۳/۱۲±۰/۲۹^{a}	۲/۱۶±۰/۱۸^{b}
	طول (میلیمتر)	۲۴/۸۰±۱/۴۷^{a}	۲۱/۰۰±۱/۵۰^{a}	۲۹/۳۰±۲/۳۲^{a}	۲۷/۱۰±۱/۱۸^{a}	۳۴/۸۰±۱/۶۵^{a}	۳۰/۵۰±۱/۶۷^{a}
PL۶۰	وزن (گرم)	۰/۵۵±۰/۰۸^{a}	۰/۶۰±۰/۰۴^{a}	۱/۳۶±۰/۰۹^{a}	۱/۴۲±۰/۱۱^{a}	۳/۵۲±۰/۱۱^{a}	۲/۸۱±۰/۳۱^{b}
	طول (میلیمتر)	۲۱/۵۰±۱/۲۱^{a}	۱۸/۳۰±۱/۴۳^{a}	۲۷/۲۰±۱/۲۳^{a}	۲۷/۹۰±۱/۲۹^{a}	۳۴/۸۰±۲/۳۶^{a}	۳۳/۳۰±۱/۵۲^{a}
بدون مواجهه	وزن (گرم)	۰/۵۳±۰/۰۳^{b}	۱/۳۶±۰/۱۱^{a}	۱/۳۶±۰/۰۹^{b}	۱/۶۹±۰/۱۱^{a}	۲/۲۹±۰/۱۲^{b}	۳/۲۲±۰/۱۵^{a}
	طول (میلیمتر)	۱۸/۳۰±۱/۱۲^{b}	۲۵/۳۵±۱/۳۰^{a}	۲۴/۶۵±۱/۲۸^{b}	۲۸/۵۰±۱/۳۰^{a}	۳۱/۱۵±۰/۹۴^{b}	۳۴/۹۵±۱/۴۲^{a}

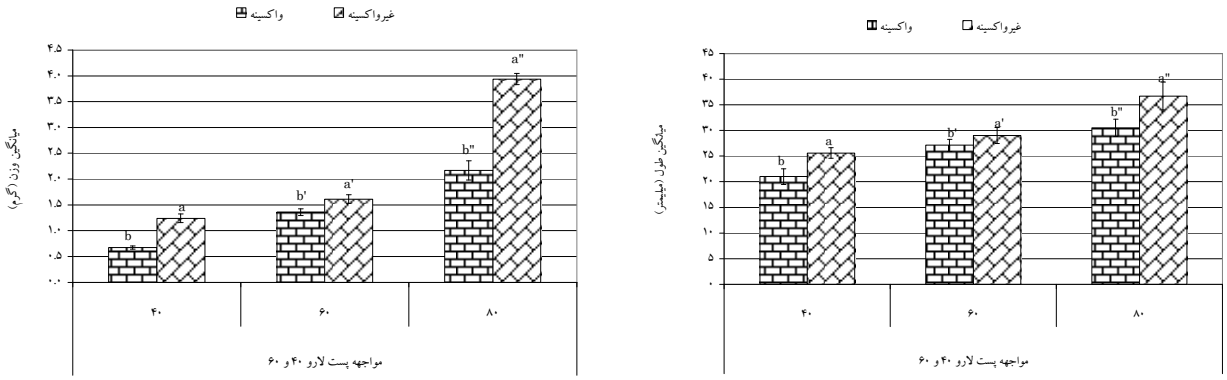
۹-۳-مقایسه میانگین وزن و طول پست لاروهای واکسینه و غیر واکسینه تیمارهای مختلف

۱-۹-۳-پست لاروهای تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روز (٦٠-٤٠PL)

نتایج مطالعه نشان داد که در پست لاروهای ۱۵-۵ روزه و ۲۶-۱۲ روزه میگوهای تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روز مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول میگوهای غیرواکسینه بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای واکسینه شده بود ($P<0.05$). این در حالی بود که در روز ۶۰ پرورش هیچگونه تفاوت معنی داری میان مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه مشاهده نشد ($P>0.05$). در ادامه نتایج حاکی از این مطلب بود که در پست لاروهای ۱۵-۵ مقادیر مربوط به میانگین وزنی روزه واکسینه شده بطور معنی داری بیشتر از میگوهای غیرواکسینه است در حالیکه در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه این مقادیر در میگوهای غیر واکسینه بطور معنی داری بیشتر بود ($P<0.05$) (نمودار ۴ و ۵).



نمودار ٤: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه و غیرواکسینه مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

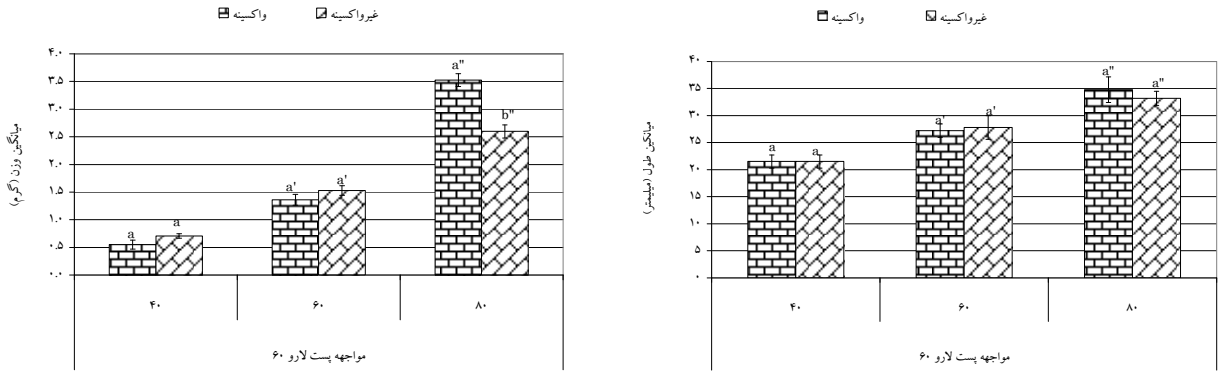


نمودار ۵: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه واکسینه و غیرواکسینه مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

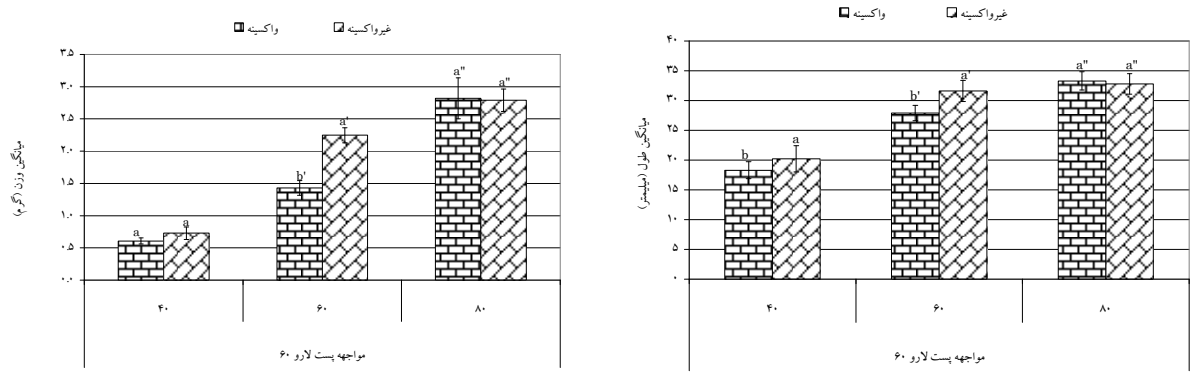
۲-۹-۳-پست لاروهای تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سن ۶۰ روز (PL۶۰)

نتایج حاکی از این مطلب بود که علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه میگوهای غیر واکسینه نسبت به میگوهای واکسینه در روز ۴۰ پرورش هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P<0.05$). در ادامه مشاهده شد که در روز ۶۰ پرورش تنها در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه میانگین وزنی میگوهای غیرواکسینه بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای واکسینه می باشد ($P<0.05$)، این در حالی بود که با وجود بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول میگوهای تیمار غیرواکسینه در پست لاروهای ۱۵-۵ روزه هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$).

لیکن در روز ۸۰ پرورش نتایج نشان داد که مقادیر مربوط به میانگین وزنی پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای غیرواکسینه می باشد ($P<0.05$). این در حالی بود که با وجود بیشتر بودن مقادیر میانگین وزنی و طولی در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه میگوهای واکسینه نسبت به میگوهای غیرواکسینه هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$)



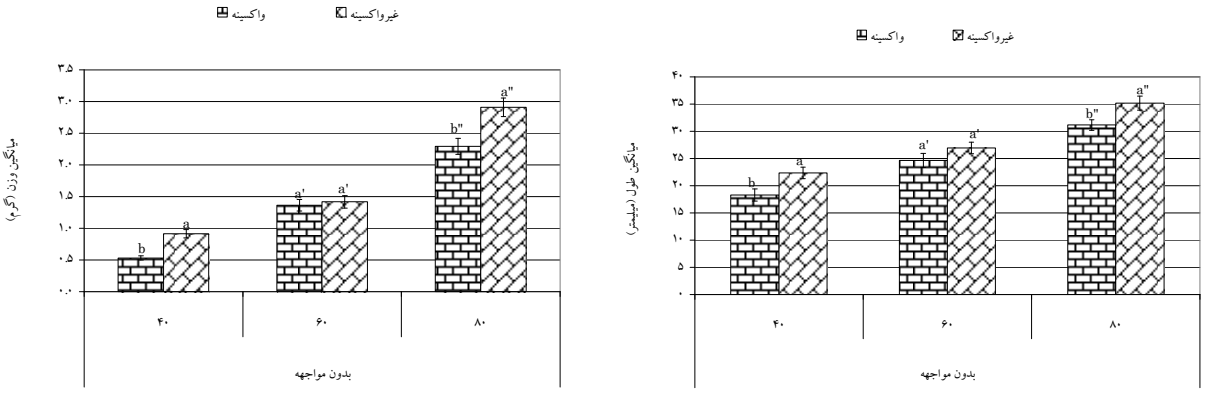
روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)



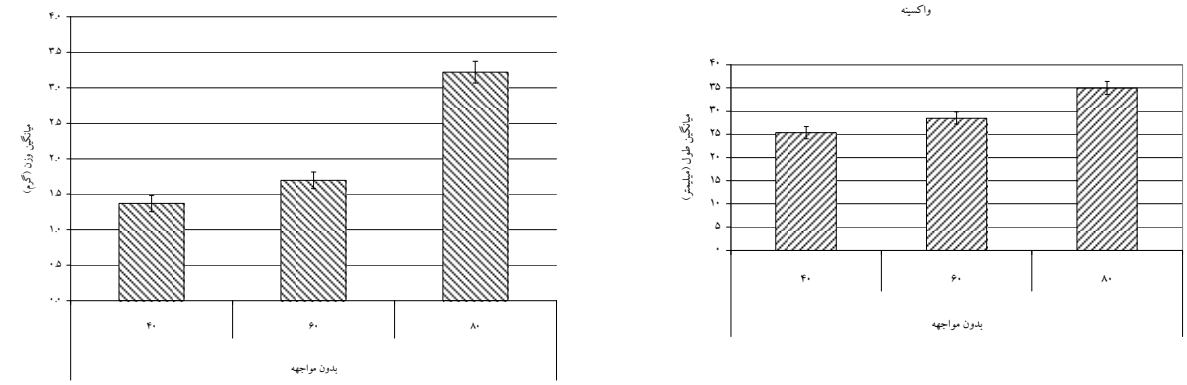
نمودار۷:میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه واکسینه و غیرواکسینه مواجه شده با ویروس لکه سفید در سن ۶۰ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

۳-۹-۳-پست لاروهای تیمار بدون مواجهه با ویروس لکه سفید

نتایج نشان داد که در روز ۴۰ پرورش در پست لاروهای ۱۵-۵ روزه میگوهای غیرواکسینه مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول بطور معنی داری بیشتر ازمیگوهای غیر واکسینه می باشد($P<0.05$). از سوی دیگر در روز ۶۰ پرورش هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$)، این در حالی بود که در روز ۸۰ مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول پست لاروهای غیرواکسینه بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای واکسینه بود ($P<0.05$).



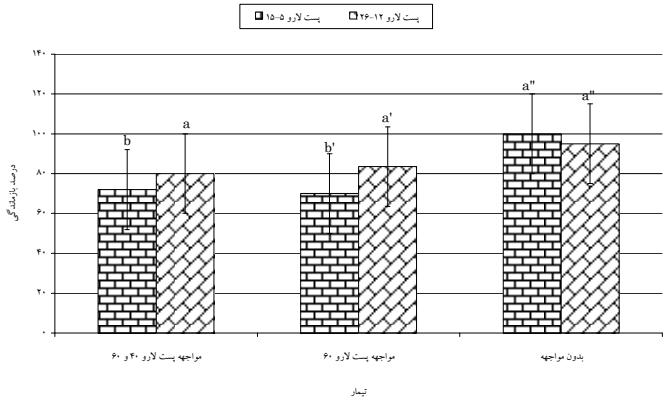
ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)



نمودار۹ : میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ٢٦-١٢ بدون مواجه شده با ویروس لکه سفید در سن ٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

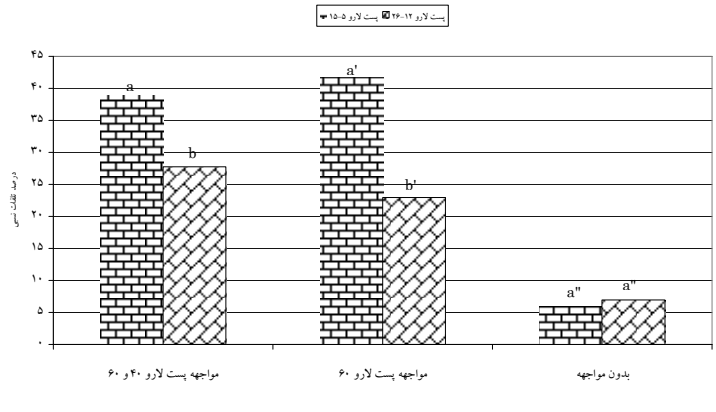
٤-۹-۳-میزان درصد بازماندگی پست لاروهای ۱۵-۵ و ٢٦-١٢

نتایج نشان داد که درصد بازماندگی در پست لاروهای ٢٦-١٢ روزه در هر تیمارهای مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روز و سن ۶۰روزگی بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده بود ($P<0.05$). این در حالی بود که علیرغم بیشتر بودن درصد بازماندگی در پست لاروهای ۱۵-۵ روزه تیمار بدون مواجهه هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$)(نمودار ۱۰).



نمودار۱۰:درصد بازماندگی پست لاروهای تیمارهای مختلف مواجه با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی و سن ٦٠ و بدون مواجهه (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

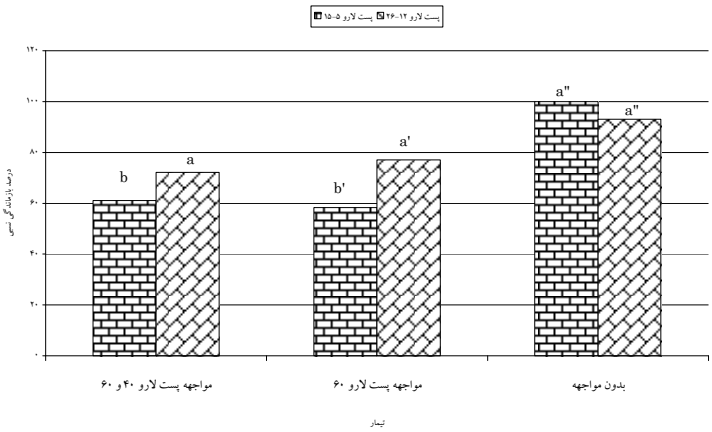
همچنین در رابطه با درصد تلفات نسبی مشاهده شد که درصد تلفات نسبی بطور معنی داری در پست لاروهای ۱۵-۵ میگوهای تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ و سن ۶۰ روز بیشتر از پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه است ($P<0.05$). از سوی دیگر هیچگونه تفاوت معنی دار آماری میان پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه در میگوهای واکسینه شده بدون مواجهه مشاهده نشد ($P>0.05$).(نمودار۱۱).



نمودار۱۱:درصد تلفات نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف مواجه با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی و سن ٦٠ و بدون مواجه (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

در انتها مشاهده شد که مقادیر مربوط به درصد بازماندگی نسبی در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه در تیمارهای مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روز و سن ۶۰ روز بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵

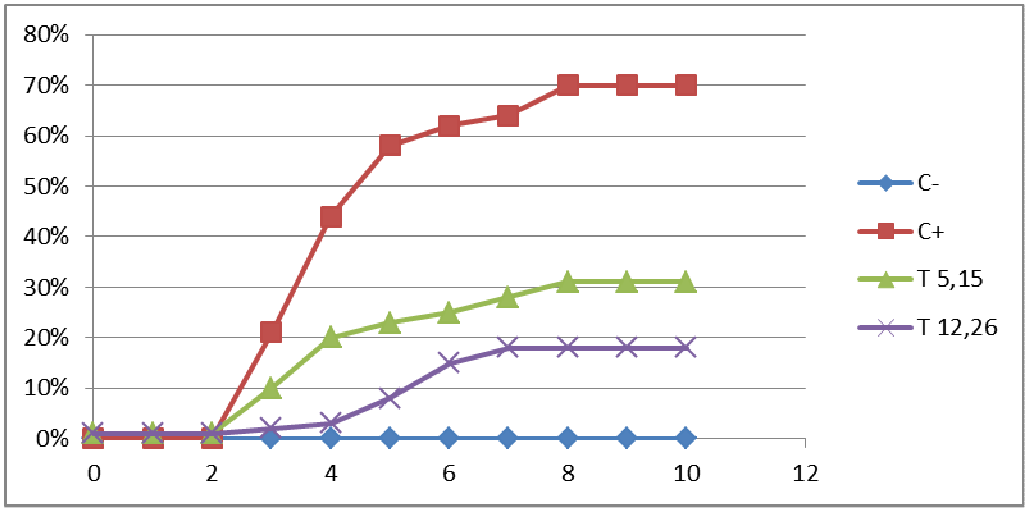
روزه می باشد ($P<0.05$). لیکن هیچگونه تفاوت معنی داری میان پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده بدون مواجهه مشاهده نشد ($P>0.05$) (نمودار۱۲).



نمودار۱۲:درصد بازماندگی نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف مواجه با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی و سن ٦٠ و بدون مواجه

۱۰-۳-نتایج میزان بقا

میزان تلفات در گروه های واکسینه شده و نشده بعد از آزمون مواجهه در نمودار۱۳و جدول زیر ملاحظه میگردد.



نمودار۱۳: میزان تلفات تجمعی گروههای واکسینه شده و واکسینه نشده پس از چالش با ویروس عامل بیماری لکه سفید طی ۱۰ روز

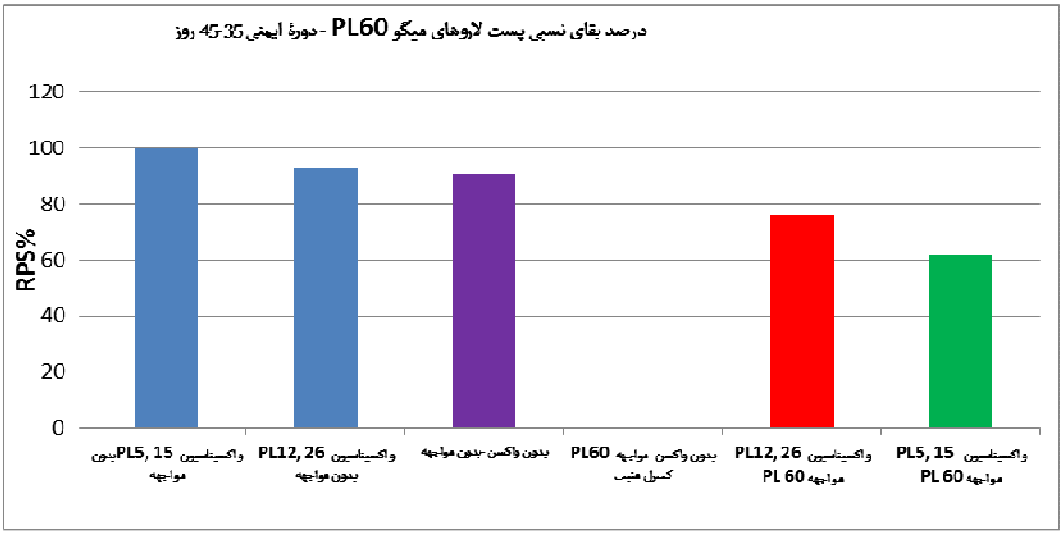
با توجه به نتایج به‌دست آمده، درصد بازماندگی، درصد تلفات و درصد بقا نسبی در جدول زیر محاسبه شده است.

جدول ۱۵: درصد بازماندگی، درصد تلفات و درصد بقا نسبی در دروه ایمنی ۳۵ و ٤٥ روز

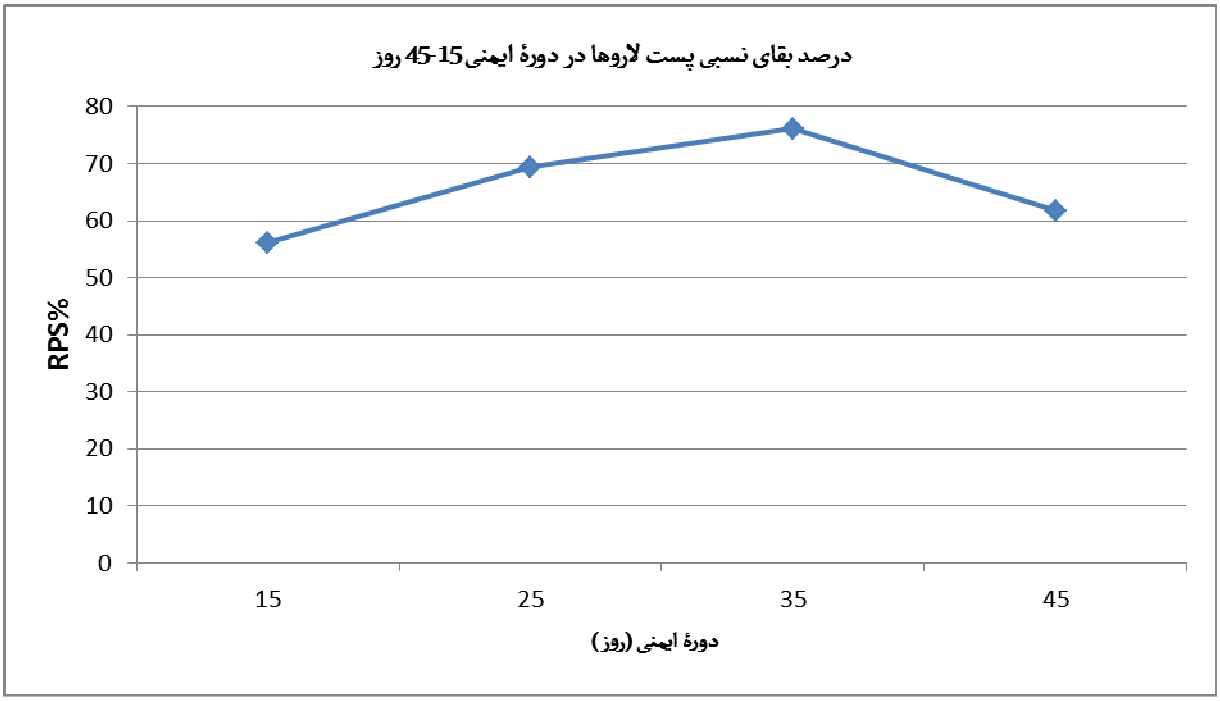
شماره تانک	تیمار	تعداد اولیه	درصد بقاء	RPS%	میانگین RPS%
۲	واکسیناسیون در PL5,15 بدون مواجهه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	
۳	واکسیناسیون در PL12,26 مواجهه در روز ۴۰ و ۶۰	۱۰۰	۸۰	۷۲,۹۷	۷۶,۱۲ ٪ دوره ایمنی ۳۵ روزه
۱-۴	واکسیناسیون در PL12,26 مواجهه در روز ۶۰	۱۰۰	۸۲	۷۵,۶۷	
۲-۴	واکسیناسیون در PL12,26 مواجهه در روز ۶۰	۱۰۰	۸۵	۷۹,۳۷	
۷	بدون واکسن مواجهه در روز ۶۰	۱۰۰	۳۶		
۸	بدون واکسن مواجهه در روز ۶۰	۱۰۰	۱۶		
۹	بدون واکسن-بدون مواجهه	۱۰۰	۹۳	۹۰,۵۴	
۱۱	واکسیناسیون در PL12,26 بدون مواجهه	۱۰۰	۹۵	۹۳,۲۴	
۱-۱۳	واکسیناسیون در PL5,15 مواجهه در روز ۶۰	۱۰۰	۶۹	۵۸,۱۰	۶۱,۷٪ دوره ایمنی ۴۵ روزه
۲-۱۳	واکسیناسیون در PL5,15 مواجهه در روز ۶۰	۱۰۰	۷۱	۶۰,۸۱	
۱۴	واکسیناسیون در PL5,15 مواجهه در روز ۴۰ و ۶۰	۱۰۰	۷۵	۶۶,۲۱	

جدول ۳-۱۲: بازماندگی، درصد تلفات و درصد بقا نسبی در دروه ایمنی ۱۵ و ۲۵ روز

شماره تانک	تیمار	تعداد اولیه	درصد بقاء	میانگین درصد RPS
۲	واکسیناسیون در PL5,15 بدون مواجهه	۹۵۰		
۳	واکسیناسیون در PL12,26 مواجهه در روز ۴۰	۹۰۰	۸۳,۳	٪۵۶,۱۳ دوره ایمنی ۱۵ روزه
۵	بدون واکسن مواجهه در روز ۴۰	۱۰۰۰	۶۴	
۶	کنترل مثبت	۱۰۰۰	۶۰	
۹	واکسیناسیون در PL12,26 بدون مواجهه	۶۱۰		
۱۱	واکسیناسیون در PL12,26 مواجهه در روز ۴۰	۵۳۰		٪۶۹,۴ دوره ایمنی ۲۵ روزه
۱۴	واکسیناسیون در PL5,15 مواجهه در روز ۴۰	۹۱۰	۸۸,۴	



نمودار ١٤: درصد بقا نسبی پست لاروهای میگو در دوره ایمنی ۳۵ و ٤٥ روز



نمودار ۱۵: درصد بقا نسبی پست لاروهای میگو در دوره ایمنی ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ٤٥ روزه

با توجه به نتایج محاسبه شده میزان بقا و تلفات در گروه های پست لارو میگو واکسینه شده و نشده نشان می دهد که استفاده از این رادیوواکسن به روش غوطه وری در پست لاروهای میگوی ۵ تا ۲۵ روزه در دو نوبت واکسیناسیون به فاصله ۱۰ تا ۱۴ روز به طور معنی داری باعث ۷۶ و ۶۱ درصد کاهش تلفات در میگوهای واکسینه شده بر ضد ویروس لکه سفید نسبت به گروه شاهد به ترتیب در زمان های ۳۵ و ۴۵ روز پس از آخرین واکسیناسیون می گردد. همچنین درصد بقا نسبی در طی دوره ایمنی ۱۵ روز شروع به افزایش یافته تا زمان ۳۵ روز به حداکثر می رسد و مجدداً کاهش می یابد و با توجه به اینکه در این تحقیق تا زمان ۴۵ روز پس از آخرین زمان واکسیناسیون بررسی ها ادامه یافت نشان داد که درصد بقا نسبی که در زمان ۳۵ روز ۷۶٪ بوده در زمان ۴۵ روز به ۶۱٪ کاهش یافته است.با توجه به مقایسه میانگین ها به روش آنالیز واریانس یکطرفه در بررسی میزان بقا نسبی مشخص گردید که:

گروه کنترل مثبت با همه گروهها دارای اختلاف معنی داری است.

گروه واکسیناسیون PL5,15 ومواجهه با ویروس زنده با همه گروهها دارای اختلاف معنی داری است.

گروه واکسیناسیون PL12,26 ومواجهه شده با ویروس زنده با همه گروهها دارای اختلاف معنی داری است.

گروه کنترل منفی با گروههای واکسینه شده بدون مواجهه با ویروس اختلاف معنی داری ندارد ولی با سایر گروهها دارای اختلاف معنی داری است .

۱۱-۳-نتایج بررسی سلول‌های ایمنی همولنف میگوها (THC, DHC , TPP)

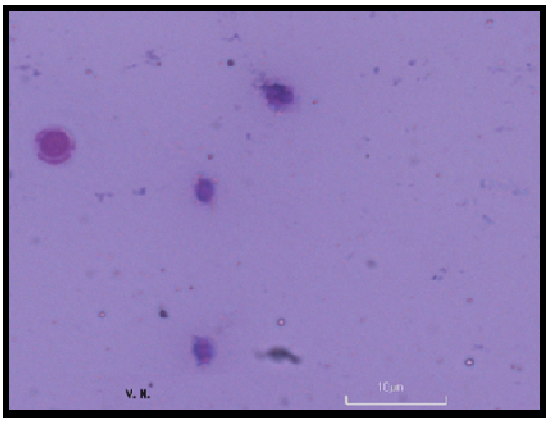
۱-۱۱-۳-نتایج شمارش افتراقی سلول های همولنف

در بررسی لام های تیمار واکسن زده –مواجهه شده (شکل ۱۸) چنین بنظر می رسد اکثرا گرانول های محتوی پروفنل اکسیداز رها شده اند که این موضوع می تواند ناشی از واکسیناسیون میگو ها و سپس مواجهه آنها با عامل ویروسی باشد. بررسی تفاوت درصد سلول های همولنف در تیمارهای مختلف در جدول ۱۷آورده شده است حجم زیادی از سلول های همولنف در این تیمار را گرانولو سیت ها تشکیل می دهند که می تواند حائز اهمیت ایمونولوژیک باشد. حدودا ۳۰- ۲۰ ٪ سلول ها آلوده به ویروس هستند که دال بر بیماری میگو نمی باشد. بازماندگی این گروه حدودا ۸۵٪ است که با توجه به بازماندگی حدودا ۹۰٪ تیمار واکسن زده–غیر مواجهه شده (شکل۱۹) و در مقایسه با بازماندگی زیر ۳۰٪ تیمار بدون واکسن مواجهه داده شده (شکل۲۰) از شرایط بسیار خوبی برخوردار است.

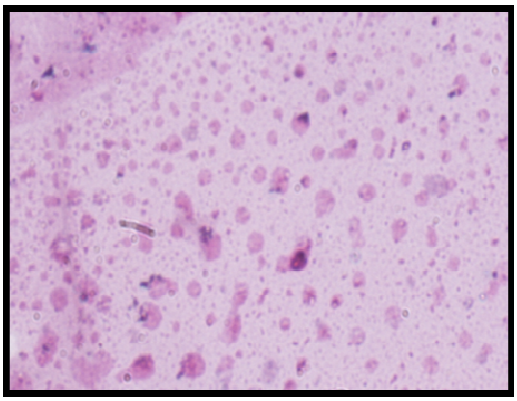
جدول ۱۷:وضعیت سلول های همولمف در تیمار های مختلف (نتایج آزمون DHC–شمارش افتراقی سلول های همولنف)

تیمار مورد آزمایش	غیر واکسینه–غیر مواجهه	غیر واکسینه- مواجهه	واکسینه –غیر مواجهه	واکسینه- مواجهه
سمی گرانولار٪	۸۵	۶۵	Apoptosis	۳۵
گرانولار٪	۱۰	۲۵	Apoptosis	۵۰
هیالن٪	۵	۱۰	Apoptosis	apoptosis+۱۵

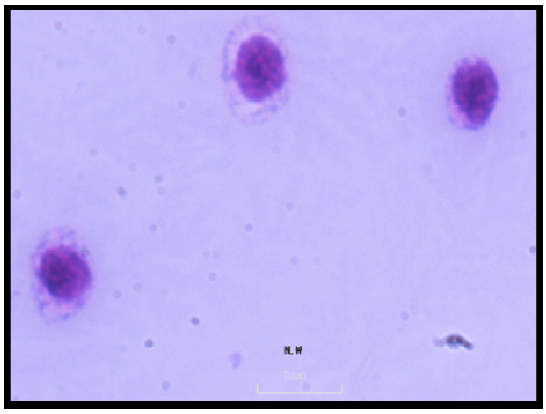
بر اساس جدول ۱۷ به نظر میرسد واکسن باعث افزایش سلول های گرانولار می شود و عدم واکسن سهم سمی گرانولار ها را افزایش می دهد. بدیهی است واکسیناسیون میگوها در صورت عدم مواجهه با پاتوژن باعث مقابله سلول ها از طریق سیستم ایمنی Apoptosis می گردد.



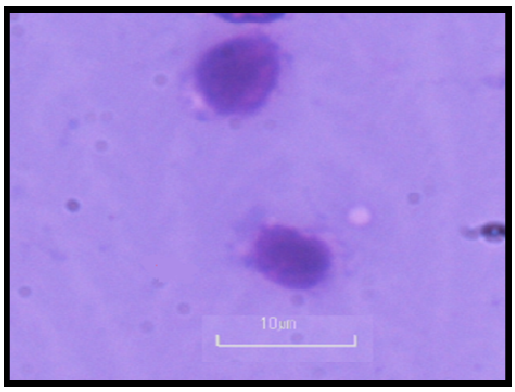
شکل ۱۸:وضعیت سلول ها در تیمار واکسن زده- مواجهه داده شده سمت چپ سلول آلوده مشخص است



شکل ۱۹: تیمار واکسن زده بدون مواجهه را نشان می دهد. آپوپتوزیس چشمگیر است.



شکل۲۰:تیمار کنترل مثبت یا واکسن زده نشده- مواجهه داده شده. سلول ها غالبا سمی گرانولار هستند.



شکل ۲۱: تیمار واکسن زده نشده- مواجهه داده نشده

۲-۱۱-۳-نتایج آزمون شمارش کلی هموسیت ها (THC)

جدول۱۸: شمارش کلی هموسیت ها(THC)(cell/ml)

ردیف	نوع تیمار	شمارش کلی هموسیت	میانگین شمارش کلی هموسیت
۱	کنترل منفی	۲۱,۵×۱۰^۶	۲۳,۷×۱۰^۶
۲	کنترل منفی	۱۶,۲×۱۰^۶	
۳	کنترل منفی	۳۲,۲×۱۰^۶	
۴	کنترل مثبت	۳۲,۷×۱۰^۶	۳۲,۴×۱۰^۶
۵	کنترل مثبت	۲۴,۵×۱۰^۶	
۶	کنترل مثبت	۴۰,۰×۱۰^۶	
۷	واکسن با مواجهه (غوطه وری)	۲۴,۰×۱۰^۶	۲۹,۴×۱۰^۶
۸	واکسن با مواجهه (غوطه وری)	۳۸,۰×۱۰^۶	
۹	واکسن با مواجهه (غوطه وری)	۲۶,۲×۱۰^۶	
۱۰	واکسن با مواجهه (تزریقی)	۳۷۲۵۰۰۰۰	۲۸,۴×۱۰^۶
۱۱	واکسن با مواجهه (تزریقی)	۱۸۰۰۰۰۰۰	
۱۲	واکسن با مواجهه (تزریقی)	۳۰۰۰۰۰۰۰	
۱۳	واکسن بدون مواجهه	۲۸۲۵۰۰۰۰	۳۳,۴×۱۰^۶
۱۴	واکسن بدون مواجهه	۳۵۲۵۰۰۰۰	
۱۵	واکسن بدون مواجهه	۳۶۷۵۰۰۰۰	

با توجه به مقایسه میانگینها به روش آنالیز واریانس یکطرفه اختلاف معنی‌داری بین گروهها از نظر شمارش کلی هموسیت ها مشاهده نگردید ($P>0.05$).

۳-۱۱-۳-نتایج آزمون سنجش میزان پروتئین کل پلاسما

جدول۱۹:میزان پروتئین کل پلاسما (mg/ml) در گروه های میگو

شماره نمونه	نوع تیمار	مقدار پروتئین کل پلاسما (میانگین± انحراف معیار)	میانگین پروتئین
۱	کنترل منفی	۷۰/۳۲±۱۸/۱	۷۱/۴۸
۲	کنترل منفی	۷۶/۵۲±۱۰/۲۷	
۳	کنترل منفی	۶۷/۶±۱۹/۸۶	
۴	کنترل مثبت	۴۸/۲۳±۱۱/۰۸	۵۰/۵۹
۵	کنترل مثبت	۵۲/۱۱±۲۴/۲۹	
۶	کنترل مثبت	۵۱/۴۳±۱۳/۷۲	
۷	غوطه وری با مواجهه	۴۲/۸۱±۱۱/۵۱	۴۴/۲۳
۸	غوطه وری با مواجهه	۳۹/۳±۴۲/۲۱	
۹	غوطه وری با مواجهه	۵۰/۶±۱۹/۸۶	
۱۰	تزریق با مواجهه	۷۱/۲۲±۳۲/۰۱	۵۸/۷۹
۱۱	تزریق با مواجهه	۴۴/۶۱±۲۱/۵۲	
۱۲	تزریق با مواجهه	۶۰/۵۵±۱۵/۷۳	
۱۳	تزریق بدون مواجهه	۸۸/۱۱±۵۸/۴۷	۸۸/۶
۱۴	تزریق بدون مواجهه	۹۱/۵±۶۳/۰۵	
۱۵	تزریق بدون مواجهه	۸۶/۱۹±۲۷/۸۱	

با توجه به مقایسه میانگین ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه با آزمون LSD گروه کنترل مثبت با دو گروه واکسینه شده به روشهای غوطه وری و تزریقی که مواجهه با ویروس هم شده اند اختلاف معنی داری ندارند ($P>0.05$). در حالیکه کنترل مثبت با گروه کنترل منفی و گروه واکسینه شده بدون مواجهه با ویروس زنده اختلاف معنی داری است ($P<0.05$).

٤-۱۱-۳-نتایج شمارش افتراقی سلول های همولنف

نتایج افتراقی سلول ها ی همولمف در جدول زیر آورده شده است. انواع متفاوتی از هموسایت‌ها با درصد مربوطه در جدول ۳-۱۹لیست شده است. درصد سلول دانه‌ای نشان می دهد که بیشترین مورد در گروه مربوط به "هیچ واکسن و بدون در معرض قرار گرفتن" 1.87±85.00 می‌باشد و کمترین درصد مربوط به گروه "واکسینه و

در معرض قرار دادن" 31.40±3.04 می‌باشد. بیشترین درصد برای سلول های دانه ای متعلق به "گروه واکسینه شده و در معرض قرار گرفته" 51.40±2.07 و کمترین درصد نشان داده شده درگروه " بدون واکسن و بدون در معرض قرار گرفتن" 9.20±1.92 است. اما درمورد hyalinocyte بیشترین درصد بدست آمده 17.60±2.07 در گروه "واکسینه و در معرض قرار گرفته" کمترین درصد مربوط به " بدون واکسینه و در معرض قرار گرفتن" 5.80±0.83 می باشد.

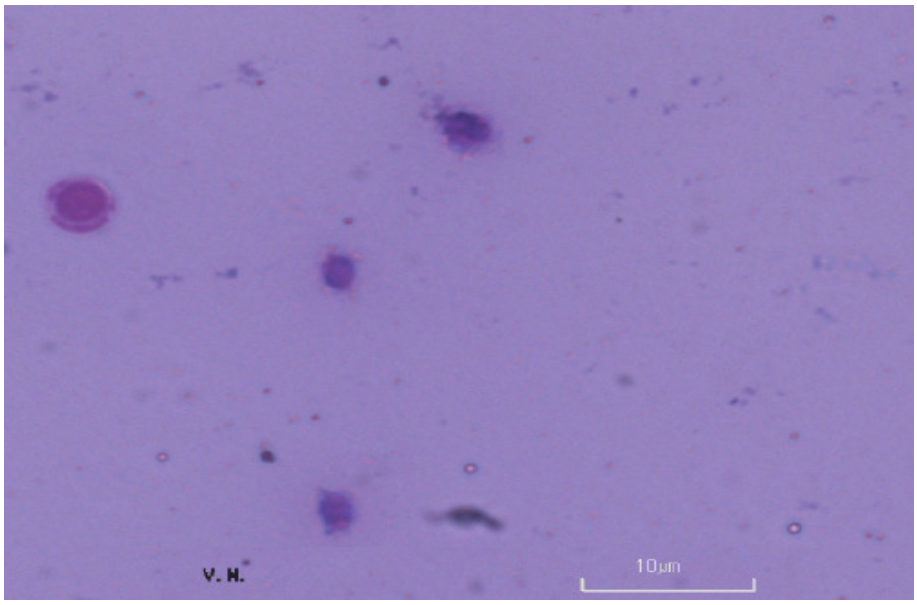
مطابق با نتایج هیچ آپاپتوزیس جدی وجود ندارد که در همولنف میگو گروه یک مشاهده شود. بر اساس آپاپتوزیس وسیعی در همولمف میگوهای مشاهده شده در گروه واکسینه شده، رخ داده است. این نوع آپاپتوزیس می تواند منجر به آشتفتگی همولمف شود و این بی کفایتی سیستم ایمنی در حالت های ناکارامد، میگو را مستعد WSSV یا بیماری های احتمالی دیگر نماید. تفاوت معنی داری (K=7.20, df=2, p=.027) بین مرتبه درصد بقا در گروه ها وجود دارد. درصد بقای گروه "بدون واکسن و در معرض قرار گرفته"کمترین ارزش را نشان می دهد و تفاوت بین درصد بقای این گروه و گروه واکسینه شده در معرض قرار گرفته حدود ۵۶ درصد می باشد. این درصد نشان می دهد که میگوی واکسینه شده برابر WSSV بسیار مقاومتر در می باشند.

در بررسی لام های تیمار واکسن زده مواجهه شده چنین بنظر می رسد اکثرا گرانول های محتوی پروفنل اکسیداز رها شده اند که این موضوع می تواند ناشی از واکسیناسیون میگو ها و سپس مواجهه آنها با عامل ویروسی باشد. حجم زیادی از سلول های همولنف در این تیمار را گرانولو سیت ها تشکیل می دهند که می تواند حائز اهمیت ایمونولوژیک باشد. حدودا ۳۰- ۲۰ ٪ سلول ها آلوده به ویروس هستند که دال بر بیماری میگو نمی باشد. بازماندگی این گروه حدودا ۸۵٪ است که با توجه به بازماندگی حدودا ۹۷٪ تیمار واکسن زده غیر مواجهه شده و در مقایسه با بازماندگی زیر ۲۶٪ تیمار بدون واکسن مواجهه داده شده، از شرایط بسیار خوبی برخوردار است.

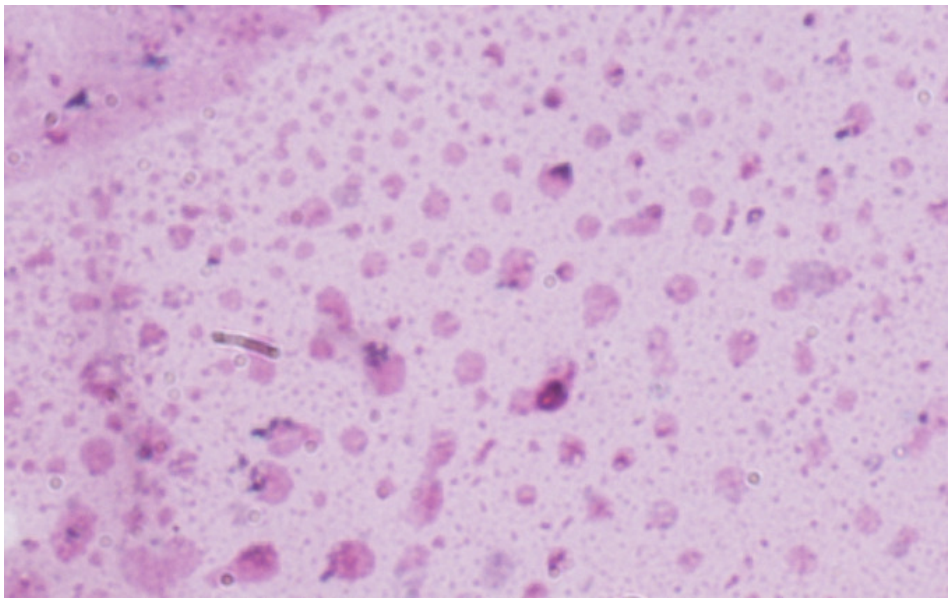
جدول شماره۲۰: وضعیت سلول های همولمف در تیمار های مختلف (نتایج آزمون DHC–شمارش افتراقی سلول های همولنف)

	غیر واکسینه–غیر مواجهه	غیر واکسینه– مواجهه	واکسینه –غیر مواجهه	واکسینه–مواجهه
سمی گرانولار٪	85.00±1.87	66.00±3.80	33.00±4.41[a]	31.40±3.04[a]
گرانولار٪	9.20±1.92	24.80±1.92	50.60±2.50[a]	51.40±2.07[a]
هیالن٪	5.80±0.83	9.20±2.58	16.40±2.19[a]	17.60±2.07[a]

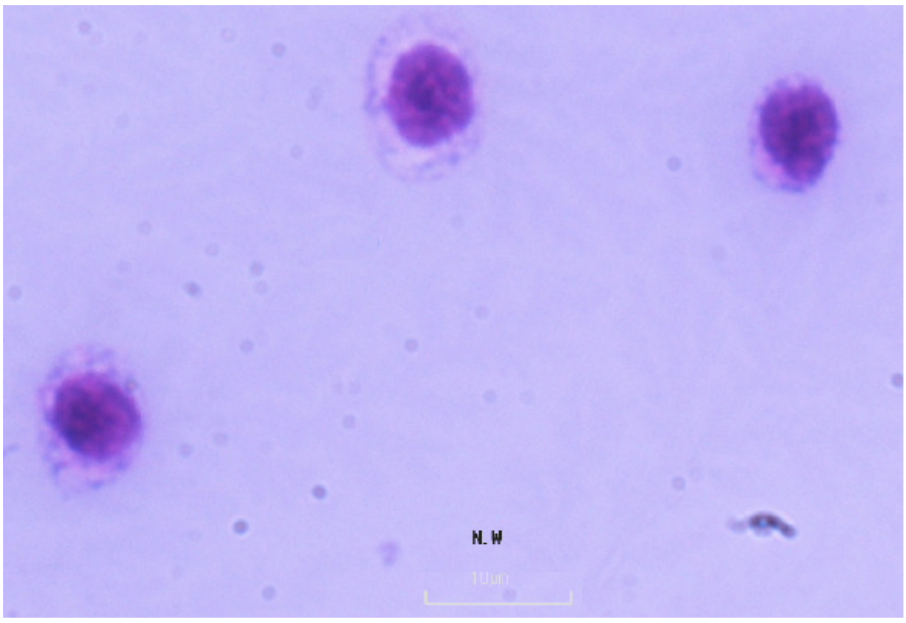
بر اساس جدول۲۰به نظر میرسد واکسن باعث افزایش سلول های گرانولار می شود و عدم واکسن سهم سمی گرانولار ها را افزایش می دهد. بدیهی است واکسیناسیون میگوها در صورت عدم مواجهه با پاتوژن باعث مقابله سلول ها از طریق سیستم ایمنی Apoptosis می گردد.



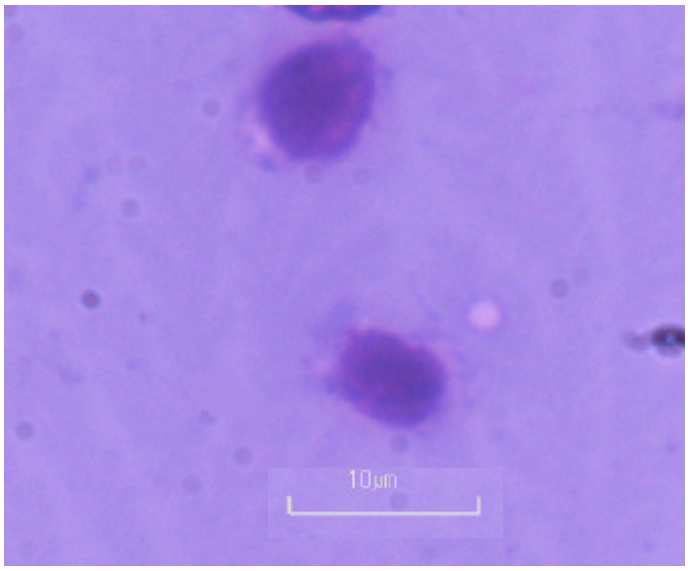
شکل شماره ۲۲: وضعیت سلول ها در تیمار واکسن زده- مواجهه داده شده سمت چپ سلول آلوده مشخص است



شکل شماره ۲۳: تیمار واکسن زده بدون مواجهه را نشان می دهد. آپوپتوزیس چشمگیر است.



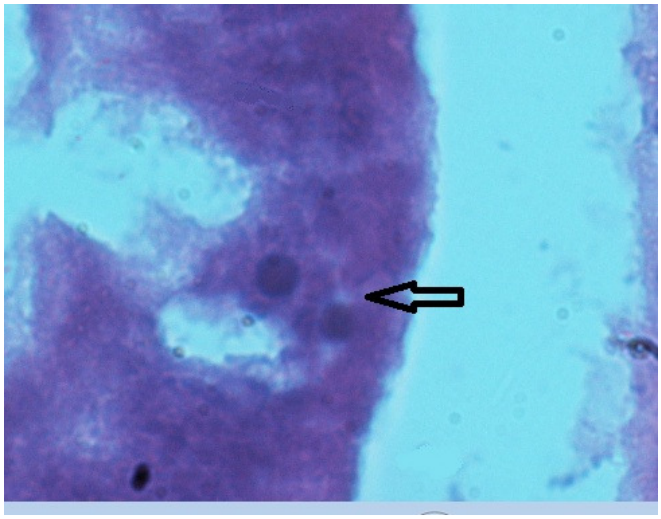
شکل شماره ۲٤: تیمار واکسن زده نشده- مواجهه داده شده (کنترل مثبت)، سلول ها غالبا سمی گرانولار هستند.



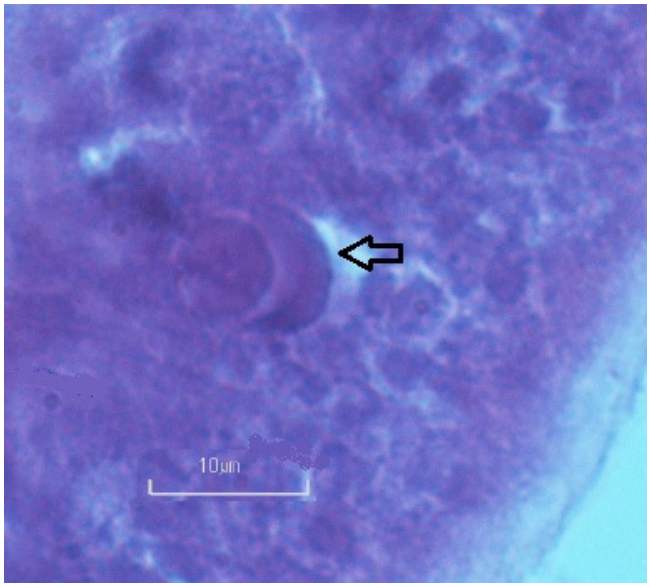
شکل شماره ۲۵: تیمار واکسن زده نشده- مواجهه داده نشده (کنترل منفی)

۵-۱۱-۳-هیستوپاتولوژی بافت‌های غیر از همولنف

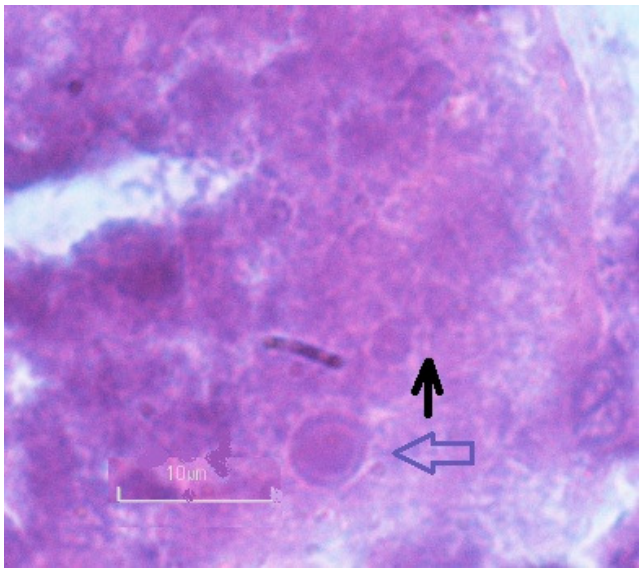
به جز همولنف در سایر بافت ها نیزآلودگی ناشی از ویروس لکه سفید میگو مشهود بود . از جمله این بافتها روده، بافت بینابینی هپاتوپانکراس و اپیدرم بافت اگزو اسکلتال (شکل های ۲۶ تا۲۹) بودند.



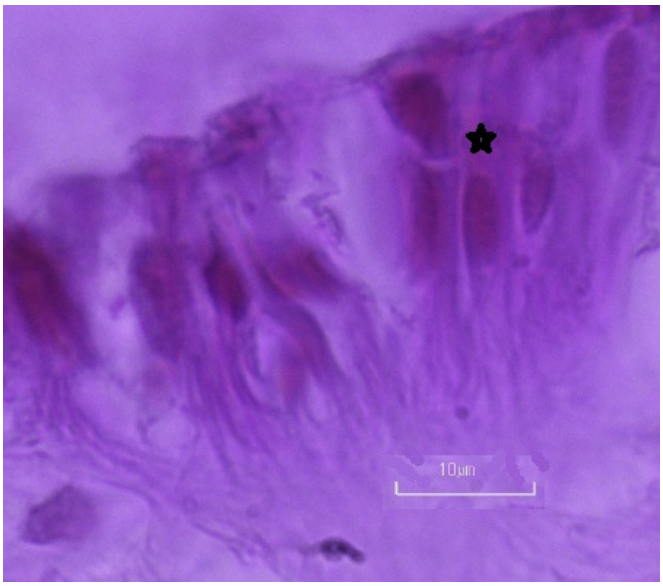
شکل شماره ۲٦: سلول هیپرتروفی شده ناشی از تشکیل گنجیدگی ویروسی در بافت روده میانی



شکل شماره۲۷: فرم Cowdry type A سلول هیپرتروفی شده ناشی از تشکیل گنجیدگی ویروسی در هموسیت مستقر در روده میانی



شکل شماره ۲۸: فرم سلول ها در فاز های متفاوت عفونت ویروسی لکه سفید در بافت بینابینی هپاتوپانکراس،پیکان پر:فاز اولیه عفونت؛ پیکان تو خالی: سلول هیپرتروفی شده درفاز انتهائی عفونت



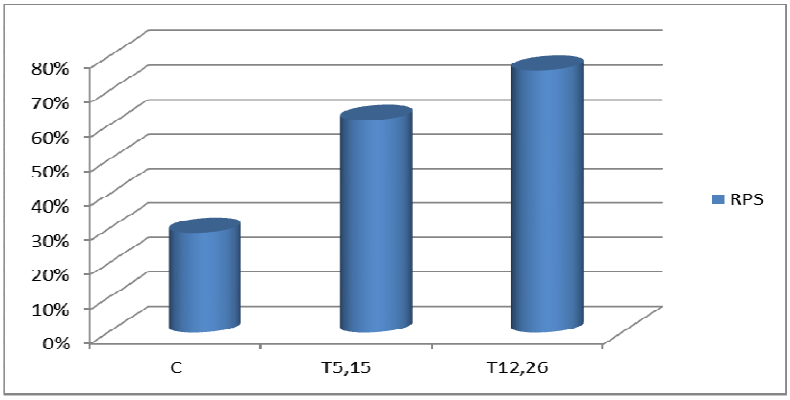
شکل شماره۲۹: سلول ها در فاز های متفاوت عفونت ویروسی لکه سفید در بافت پوششی اگزواسکلت

۱۲-۳-نتایج آزمون PCR

نمونه هایی از میگوهای هر گروه بطور تصادفی جهت انجام آزمون PCR انتخاب گردید و توسط کیت تجاری Nested PCR-WSSV IQ200 مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج در جدول ۲۱ آمده است.

جدول۲۱: نتایج آزمون PCR گروههای میگو از نظر آلودگی به ویروس لکه سفید

شماره تانک	نوع تیمار	زمان نمونه برداری	نتیجه آزمون PCR
۲	واکسیناسیون PL5, 15 بدون مواجهه	در سن چهل روز	منفی
		در سن شصت روز	منفی
۳	واکسیناسیون PL12, 26 مواجهه PL 40	در سن چهل روز، قبل از مواجهه	منفی
۳	واکسیناسیون PL12, 26 مواجهه PL 60	در سن شصت روز، قبل از مواجهه	منفی
		در سن هفتاد روز، بعد از مواجهه	منفی
۱-۴	واکسیناسیون PL12, 26 مواجهه PL 60	در سن شصت روز، قبل از مواجهه	منفی
۲-۴		در سن هفتاد روز، بعد از مواجهه	منفی
۷	بدون واکسن- مواجهه PL60 کنترل مثبت	در سن شصت روز، قبل از مواجهه	مثبت
۸		در سن هفتاد روز، بعد از مواجهه	مثبت
۹	بدون واکسن- بدون مواجهه	در سن شصت روز، قبل از مواجهه	منفی
		در سن هفتاد روز، بعد از مواجهه	منفی
۱۱	واکسیناسیون PL12, 26 بدون مواجهه	در سن شصت روز، قبل از مواجهه	منفی
		در سن هفتاد روز، بعد از مواجهه	منفی
۱-۱۳	واکسیناسیون PL5, 15 مواجهه PL60	در سن شصت روز، قبل از مواجهه	منفی
۲-۱۳		در سن هفتاد روز، بعد از مواجهه	منفی
۱۴			منفی



نمودار ۱۶:

٤-بحث

امروزه بی مهرگان بیش از ۹۵ درصد گونه های جانوری را تشکیل می دهند، لیکن سیستم دفاع ایمنی آنها فاقد ایمنی اکتسابی بوده و تنها بر ایمنی ذاتی سلولی (سلولی و هومورال) متکی می باشد. از این رو واکسیناسیون آنها بر علیه عوامل بیماریزای ویروسی امری غیر محتمل خواهد بود. از سوی دیگر برخی از گزارشات ارائه شده دلالت بر وجود یک پاسخ شبه ایمنی در سخت پوستان بازمانده از بیماری می نماید که با توجه به منابع مختلف موجود وجود ایمنی خاطره در بی مهرگان ثابت گردیده است (Venegas et al., 2000; Wu et al., 2002). اما نکته قابل توجه اینکه ایمنی خاطره مشابه ایمنی خاطره در مهره داران نمی باشد، زیرا در مهره داران با تولید پروتئینی به نام آنتی بادی باعث ایجاد ایمنی در خود می شوند، در صورتی که در بی مهرگان تعدادی از پروتئین ها همانند پروتئین‌های ساختاری برخی از ویروس ها قادرند ایمنی خاطره ای ایجاد کنند. امروزه مشاهده می شود که بیماری ویروسی لکه سفید به عنوان یکی از مهمترین بیماری های درگیر کننده صنعت تکثیر و پرورش میگو، سالانه خسارات جبران ناپذیری را به این صنعت تحمیل نموده است، لذا یافتن یک راهکار جدید به‌منظور مقابله با این بیماری حائز اهمیت می‌باشد.از جمله این راهکارها واکسیناسیون میگوها بر علیه عوامل بیماریزای ویروسی به‌منظور کنترل این عوامل می باشد (Witteveldt et al., 2005). بدین منظور امروزه برای تهیه واکسن‌های مورد استفاده در آبزیان از روش‌های مختلفی از جمله روش‌های شیمیایی و فیزیکی استفاده می‌شود(Witteveldt et al., 2004)

براساس مطالعه انجام شده در فاز اول این پروژه، دز مطلوب غیرفعال سازی با پرتو گاما برای ویروس لکه سفید تکثیر یافته با تیتر $10^{5/4}$/ml در حالت منجمد (۲۰- درجه سانتیگراد) و در نهایت تولید آنتی ژن های ویروسی کامل غیرفعال شده (رادیوآنتی ژن) ۱۵ کیلوگری تعیین گردید. 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 بود. سپس به منظور تعیین میزان ایمنی القاء شده به میگوها پس از انجام واکسیناسیون ضد بیماری ویروسی لکه سفید با انجام آزمون مواجهه با ویروس زنده میزان مقاومت میگوها به این بیماری تعیین گردید.

در فاز اول این پروژه برای اولین بار نشان داده شد که تزریق رادیوواکسن منجر به القای ایمنی بر ضد ویروس لکه سفید در میگوهای ۱۰ گرمی می شود. بررسی نتایج نشان داد که استفاده از این رادیوواکسن به صورت تزریقی در میگوهای بالغ در دو نوبت واکسیناسیون به فاصله ۱۰ الی ۱۴ روز به طور معنی داری باعث بیش از ۸۰ درصد کاهش تلفات در میگوهای واکسینه شده بر ضد ویروس لکه سفید نسبت به گروه شاهد، می گردد. همچنین در این فاز پروژه استفاده از این رادیوواکسن به روش غوطه وری در پست لاروهای میگوی ۵ تا ۲۵ روزه در دو نوبت واکسیناسیون به فاصله ۱۰ تا ۱۴ روز به طور معنی داری باعث ۷۶ و ۶۱ درصد کاهش تلفات در میگوهای واکسینه شده بر ضد ویروس لکه سفید نسبت به گروه شاهد به ترتیب در زمان های ۳۵ و ۴۵ روز پس از آخرین واکسیناسیون گردید.

تحقیقات زیادی که در مورد سیستم ایمنی سخت پوستان انجام شده، همگی بیان می نمایند اکثر بی مهرگان فاقد سیستم ایمنی اکتسابی می باشند و دفاع آنها ناشی از سیستم ایمنی ذاتی است که هم به صورت سلولی و هم هومورال می باشد. ولی وجود یک سیستم شبه ایمنی علیه ویروس لکه سفید WSSV در میگو تشخیص داده شده است. میگوهایی که پس از شیوع بیماری WSSV زنده مانده اند در مواجهه مجدد با این ویروس بعد از ۴ ماه، درصد بقاء نسبی ۹۴٪ نشان داده اند، این مقاومت میگوهایی که قبلاً یک بار عفونی شده‌اند تاییدی بر تقویت سیستم شبه ایمنی می باشد. در مطالعه دیگری نوعی مقاومت پیشرفته‌ای در میگوهای بازمانده از عفونت WSSV دیده شده که به علت یک فاکتور خنثی کننده ناشناخته موجود در پلاسمای میگو بوده است(Witteveldt et al., 2004) این تجربیات مشخص کرد که یک پاسخ شبه ایمنی سه هفته پس از عفونت اولیه شروع شده و تا هفته چهارم پیشرفت کرده و تا انتهای ماه دوم پایدار است. مستنداتی هم در مورد فعالیت خنثی کنندگی ویروس در پلاسمای گرفته شده از همولنف میگوهای بازمانده از طریق تجویز ویروس تیمار شده با پلاسما در میگوهای دست نخورده بدست آمد. از طریق کروماتوگرافی تبادل کاتیونی ماده ای در پلاسما میگوهای بازمانده تشخیص داده شده که ممکن است مرتبط با این فعالیت خنثی کنندگی باشد (Wu etal., 2002).

نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین روش برای غیرفعال سازی خاصیت عفونت زایی ویروسها و سایر ارگانیسمهای بیماریزا به دلیل رساندن آسیب کمتر به خاصیت آنتی ژنتیکی آنها، پرتودهی مستقیم می باشد. به گونه ای که با استفاده از این روش خاصیت حفاظتی واکسن ویروسی غیرفعال شده افزایش می‌یابد(Grieb et al., 2002) لیکن با این فرض، سیستم ایمنی میگوها قادرند پروتئین‌های ساختاری عوامل بیماریزای ویروسی را شناسایی نموده و در برابر آنها واکنش نشان دهند. در این مطالعه از واکسن‌های حاوی ویروس‌های غیرفعال استفاده شد. در پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده توسط ویروس غیرفعال شده لکه سفید که در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند، میزان رشد میگوها نسبت به پست لاروهای ۱۵-۵ روزه غیر واکسینه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این در حالی بود که میزان رشد در پست لاروهای واکسینه شده ۱۵-۵ روزه که تنها در سن ۶۰ روزگی با ویروس مواجه شده بودند، به‌طور معنی داری با افزایش همراه بود. از سوی دیگر علیرغم بیشتر بودن میزان بازماندگی پست لاروهای واکسینه شده ۱۵-۵ روزه مواجهه شده در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی نسبت به پست لاروهای مواجهه شده در سن ۶۰ روزگی هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد، از سوی دیگر با وجود پائین بودن میزان رشد در پست لاروهای واکسینه شده تیمار بدون مواجهه با ویروس، میزان بازماندگی آنها بطور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. لیکن این احتمال وجود دارد که بعد از واکسیناسیون پست لاروها توسط ویروس غیرفعال شده لکه سفید به دلیل فعال شدن و تحریک سیستم ایمنی سلولی میگوها به دنبال شناسایی پروتئین های ساختاری ویروس های غیرفعال شده، مقادیر زیادی انرژی به سمت مراکز خونساز جهت ساخت سلول های خونی نظیر هموسیت های خونی هدایت شده که در نتیجه به دلیل صرف انرژی بالا توسط این مراکز ممکن است رشد میگو با کاهش همراه شود (Venegas et al., 2000). از سوی

دیگر مشاهده شد که میزان رشد در پست لاروهای واکسینه شده ۲۶-۱۲ روزه که در سن ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند، نسبت به پست لاروهایی که در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی با ویروس مواجهه شده بودند بطور معنی‌داری بیشتر بود. این در حالی بود که علیرغم بیشتر بودن میزان بازماندگی در پست لاروهای واکسینه ۲۶-۱۲ روزه مواجهه شده با ویروس لکه سفیددر سن ۶۰ روزگی نسبت به پست لاروهای مواجهه شده با ویروس در سنین ۴۰ و ۶۰ هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد. از سوی دیگر در تیمارهای بدون مواجهه میزان رشد بطور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. لذا می توان عنوان نمود که واکسیناسیون پست لاروها با وکسن حاوی ویروس غیر فعال شده لکه سفید می تواند منجر به افزایش مقاومت و ایجاد یک پاسخ شبه ایمنی در میگوها گردد که در نهایت با اشغال گیرنده های ویروس لکه سفید بر روی سطح سلول توسط ویروس های غیر فعال شده مانع ازابتلا میگوها در مواجهه با ویروس زنده خواهند شد (Burton et al., 2000).

همچنین نتایج بیان کننده این مطلب بودند که میزان رشد در پست لاروهای غیرواکسینه ۲۶-۱۲ روزه که در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند بطور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. از این رو Venegas و همکاران (۲۰۰۰) و Wu و همکاران (۲۰۰۲) عنوان نمودند که میگوهایی که بطور اولیه در معرض ویروس لکه سفید قرار می گیرند میزان فعالیت ضد ویروسی در همولنف شان افزایش می یابد. لیکن این احتمال وجود دارد که در مواجهه اولیه پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه با ویروس در سن ۴۰ روزگی، در پی شناسایی عامل بیماریزا و ایجاد یک پاسخ شبه ایمنی، از یک سو با تحریک سیستم ایمنی و ایجاد یک مقاومت نسبی در میگوها مانع از ابتلا میگو به بیماری در مواجهه بعدی با ویروس زنده لکه سفید در سن ۶۰ روزگی خواهند شد. همچنین نتایج نشان داد که میزان رشد و بازماندگی پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده که تنها در سن ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند نسبت به پست لاروهای غیرواکسینه بیشتر بود. از این رو می توان این چنین عنوان نمود که به دنبال واکسیناسیون پست لاروها و فعال شدن سیستم ایمنی میگوها و مراکز خونساز در پست لاروهای واکسینه شده نسبت به پست لاروهای غیرواکسینه به دلیل افزایش تغذیه به دلیل صرف انرژی زیاد هم رشد و هم بازماندگی آنها افزایش پیدا خواهد کرد. از سوی دیگر مشاهده شد که میزان رشد پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده که با ویروس مواجهه نشده بودند بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای غیرواکسینه بود. لیکن این چنین می توان عنوان نمود که واکسیناسیون میگوها با ویروس غیر فعال شده لکه سفید علاوه بر اینکه می تواند موجب افزایش مقاومت و بازماندگی در میگوها گردد قادر است با افزایش اشتها و تغذیه موجب بهبود شاخص های رشد نیز گردد (Burton et al., 2000). از این رو در مطالعه صورت گرفته توسط Choi و همکاران (۲۰۱۱)، با واکسیناسیون میگوهای سفید غربی با استفاده از پروتئین های rVP28 وrVP19ویروس لکه سفید که بصورت خوراکی در رقت $۱۰^{۲} \times ۲$ تجویز شده بود عنوان نمودند که میزان بازماندگی میگوهای واکسینه طی ۲۱ روز مطالعه به ترتیب به ۶۶/۷ و ۴۱/۷ درصد می رسد. از سوی دیگر عنوان نمودند که اثرات محافظت کنندگی پروتئین rVP28بر علیه ویروس لکه سفید نسبت به پروتئینrVP19 بیشتر می

باشد. همچنین عنوان نمودند که در میگوهای واکسینه شده در مقایسه با میگوهای غیرواکسینه یک تأخیر ۴ تا ۱۰ روزه در نسخه برداری از ژنوم ویروس ایجاد می شود. لیکن واکسیناسیون میگوها توسط پروتئین های ترکیبی علاوه بر فعال نمودن سیستم ایمنی میگوها مانع از ورود ویروس لکه سفید به داخل سلول نیز خواهند شد (Ramsey et al., 1998; Tang et al., 2007)

شایان ذکر است که کمترین میزان رشد در پست لاروهای غیر واکسینه ۱۵-۵ روزه در میگوهای مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سن ۶۰ روزگی و بیشترین میزان در پست لاروهای مواجهه شده با ویروس در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی مشاهده شد، این در حالی بود که در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه بیشترین میزان رشد در تیمارهای مواجهه شده با ویروس در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی اتفاق افتاد. از این رو عنوان شده بود که درصد بازماندگی نسبی پست لاروهایی که پس از شیوع بیماری ویروسی لکه سفید زنده می مانند در مواجهه مجدد با ویروس بعد از چهار ماه تقریبا به ۹۴ درصد می رسد، لذا ایجاد مقاومت در پست لاروهایی که یکبار آلوده می شوند دلالت بر وجود یک سیستم شبه ایمنی در میگوها می کند (Furuya et al., 2010) در مطالعه دیگر مشاهده شد که نوعی مقاومت پیشرفته در میگوهای بازمانده از عفونت ویروسی لکه سفید وجود دارد که از آن به عنوان یک فاکتور خنثی کننده ناشناخته موجود در پلاسمای میگو نامبرده می شود (Witteveldt et al., 2004)

Witteveldt و همکاران (۲۰۰۴) عنوان نمودند که به دنبال واکسیناسیون میگوها توسط پروتئین های نوترکیب MBP-VP19 و HIS-VP28علاوه بر تأخیر در ابتلا میگوها به بیماری یک کاهش محسوس در میزان تلفات در مواجهه مجدد با ویروس مشاهده می شود، به گونه ای که این اثرات در واکسن ساخته شده توسط MBP-VP19 و یا مخلوط MBP-VP19 و HIS-VP28 بیشتر بود. لذا واکسیناسیون با پروتئین های پوشش دار لکه سفید و نوترکیب می تواند موجب افزایش بازماندگی میگوها گردد. لیکن نتایج مطالعات فوق تأئید کننده نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر می باشد. بطوریکه مشاهده شد که به دنبال واکسیناسیون پست لاروها با ویروس غیرفعال شده لکه سفید میزان بازماندگی پست لاروهای ۲۶-۱۲ روز بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه بود. از سوی دیگر در یک مطالعه دیگر عنوان شده بود که میزان بقاء میگوهای بازمانده از شیوع ویروس بیماری ویروسی لکه سفید پس از مواجهه مجدد با این ویروس نسبت به میگوهایی که مبتلا نشده بودند بطور معنی داری بیشتر می باشد (Wu et al., 2002). لذا مطالعات مذکور و نتایج حاصل از این مطالعه بر این موضوع دلالت دارد که سه هفته پس از عفونت اولیه یک پاسخ شبه ایمنی در میگوها شروع می شود که این ایمنی تا هفته چهارم پیشرفت نموده و در نهایت تا انتهای ماه دوم پایدار باقی خواهد ماند (Wu et al., 2004; Namikoshi et al., 2004)

از این رو با توجه به اینکه از یک سو در پست لاروهای واکسینه شده ۲۶-۱۲ روزه تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و۶۰ روزگی میزان رشد و از سوی دیگر در تیمار مواجهه با ویروس در سن ۶۰ میزان بازماندگی نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود، لیکن اینچنین می توان عنوان نمود که مناسبترین سن برای واکسیناسیون پست لاروها سن ۲۶-۱۲ روز می باشد، که در مقایسه با پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده

این حالت ممکن است ناشی از عدم تکمیل سیستم ایمنی در سنین ۱۵-۵ روزگی باشد. از این رو زمانیکه واکسیناسیون پست لاروها با ویروس غیرفعال شده صورت می گیرد به دلیل کامل نبودن سیستم ایمنی و در شناسایی عوامل پاتوژن با تأخیر صورت خواهد پذیرفت از این رو تحریک و فعال سازی سیستم ایمنی آنها در مدت زمان طولانی تری بطول خواهد انجامید در نتیجه به دلیل دیرتر فعال شدن سیستم ایمنی این احتمال وجود دارد که در صورت مواجهه با ویروس به دلیل ناکافی بودن پاسخ شبه ایمنی اولیه، پاسخ ایمنی مناسبی ایجاد نگردد (Ha et al., 2008). از سوی دیگر با توجه به اینکه میزان تلفات در هر دو تیمار پست لارو ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ واکسینه شده توسط ویروس غیرفعال شده لکه سفید نسبت به تیمار گروه کنترل کمتر بود می توان عنوان نمود که واکسیناسیون پست لاروها می توان با فعال نمودن سیستم ایمنی میگوها و ایجاد یک پاسخ شبه ایمنی مانع از ابتلاء آنها به بیماری ویروسی لکه سفید شود.

در خصوص کاربرد پرتوهای یونساز جهت غیرفعال سازی ویروسها برای تهیه واکسنهای غیر فعال نیز تحقیقات متعددی انجام شده است که آنها هم در ایمنی زایی موفق بوده اند.(Smolko & Lombardo,2005; Preuss,1997)

در سال ۲۰۰۰ گروه تحقیقی Muroga گزارش کرده بودند که میگوهای زنده مانده پس از شیوع بیماری لکه سفید در استخر، ۲ ماه بعد از شیوع بیماری توسط تزریق ویروس لکه سفید کشته نمی شوند، آنها دریافتند که فاکتوری در همولنف میگوها ایجاد می شود که مانع از تلفات آنها پس از تزریق ویروس می گردد (Vengas et al. 2000) آنها این موضوع را یک پاسخ شبه ایمنی نام نهادند. در آن مطالعه دیده شده بود که پاسخ شبه ایمنی هرچند باعث پیشگیری از بیماری می گردد ولی موجب پیشگیری از عفونت بعد از چالنج با ویروس نمی شود.

درحالیکه نتایج این تحقیق نشان داد میگوهای واکسینه شده پس از روبرویی با ویروس دچار عفونت نمی شوند و در تستهای مولکولی نیز منفی می‌شوند. بنابراین می‌توان با اطمینان خاطر در مراکز تکثیر از این واکسن به منظور افزایش سطح ایمنی زایی میگوها استفاده کرد.

گنجیدگی های سلولی عمدتا در بافت های اپیتلیال مشاهده شدند.این موضوع با نتیجه تحقیق تخم افشان و تمجیدی در سالهای ۱۳۸۱ که عنوان نمودند مهمترین اندامهایی که گنجیدگیهای درون سلولی ناشی از ویروس لکه سفید در آن مشاهده گردید آبشش، معده و روده بودند همخوانی دارد.

Durand و همکاران در سال ۱۹۹۶ نحوه بیماری زایی ویروس لکه سفید را از طریق تخریب بافتهای با منشاء اکتودرم و مزودرم همانند اپیتلیوم کوتیکولی، پوشش لوله گوارش ، آبشش ، قلب، ماهیچه، بافت عصبی و بافت همولمف که در آن هسته های سلولها بزرگ می شوند تا اینکه سرانجام به صورت یک تک هسته تمام سلول را پر کند عنوان نمودند.

در میگوهای آلوده توسعه رنگدانه ها مشاهده شد که باعث گردید میگوها کمی قرمز یا تیره تر از میگوهای سالم بنظر آیند . میگوهای آلوده یک کاهش تغذیه و افزایش بی حالی از خود نشان می دهند و ناگهان به کف استخر سقوط کرده و می میمیرند(Lightner, 1996) این نتیجه با یافته‌های مانیز در تطابق بود. ویروس لکه سفید

میگو می تواند سلولهای بافت های مزودرم و اکتودرم نظیرهموسیت ها، بافت پوششی معده ، بافت همبند ، بافت خونساز و بافت عضلانی قلب را آلوده کنند (Momoyama et al., 1995Lightner, 1996 ;) در میگوهای در حال مرگ تخریب بافتی همراه با گنجیدگی های بازوفیلیک کمرنگ تا زیاد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین) و هسته هیپرتروفی شده سلولهای بافت همبند و بافت پوششی کوتیکول مشاهده گردید. بر اساس یافته های ما در مراحل اولیه بیماری لکه سفید میگو White Spote Disease(WSD) گنجیدگیهای داخل هسته ای ویروسی، ائوزینوفیلیک بوده و یک هاله شفاف را در زیر غشا هسته تشکیل دادندکه آنرا Cowdry type A نام گذاری کرده اند(Lightner, 1996)و ممکن است با ویروس IHHNV(Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) اشتباه شود ولی در هر حال در میگوهای با بیماری توسعه یافته لکه سفید خبری از هاله شفاف نبوده و گنجیدگی به رنگ بازوفیلی کمرنگ تبدیل می شود(Lightner, 1996).

آپاپتوزیس می تواند فرایندی موثر درمقابل WSSV باشد (Wang et al., 2002) کاکولکی و همکاران (۲۰۱۲) در یافتند که تزریق ۱۰ میکرو لیتر از واکسن فوق دارای ویروسی با تیتر $LD50= 1\times10^{5.4}$ به میگوها می تواند بعد از بیست روز آپاپتوزیسی با تلفات خفیف را موجب شود در حالی که ۵۰ میکرو لیتر از آن موجب مرگ و میر جدی از ۳۶ ساعت بعد از تزریق در میگو وانامی می شود. آپاپتوزیس نقش دو لبه یک تیغه را بازی می کند ولذا اگر به صورت محدود رخ دهد می تواند ویروسها و باقیمانده مواد واکنش سلولی را محو نماید. اما اگر در حد وسیع رخ دهد برای سلول ها و بافت ها مضر خواهد بود و منجر به مرگ ومیر وسیع در میان گروهها می-گردد (Wang et al.,2008). نتایج آنگونه القا می‌کند که فرض کنیم نوع وسیع آپاپتوزیس برای سیستم ایمنی در مقابل WSSV مضر می باشد.در این مورد نتایج ما مطابق با یافته های دیگر محققان است که نشان می دهند اگر آپاپتوزیس در مراحل آخر از عفونت ویروسی رخ دهد باعث مرگ و میر و توزیع بیماری در میان بدن میزبان بدون شروع واکنشرهای آماسی می باشد (Best, 2008) بسیاری از مطالعات که در باره سیستم ایمنی میگو انجام شده نشان می دهد میگو دارای سیستم اکتسابی نبوده ولی از سیستم مادرزادی بهره مند است.

مطمئنا سیستم شبه ایمنی در میگو نشان می دهد که نجات یافتگان از آخرین اپیدمی WSSV، می توانند در مقابل شیوع بعدی هم مقاومت نمایند. بنابراین درصد بقاء به ۹۴ درصد می رسد (Venegas et al., 2000). این نتیجه به وجود سیستم شبه ایمنی در میگو اشاره دارد. برخی از نتایج پیشنهاد می کنند که وجود پاسخ ایمنی تطبیقی در بی مهرگان شبیه به آن چه در مهره داران مشاهده شده، می باشد اما به نظر می رسد که شواهد برای تایید وجود سیستم ایمنی تطبیقی در میگو کافی نباشد (Wu et al., 2002) در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که آپاپتوزیس می تواند فرایندی کمکی برای ایمنی میگو به‌خصوص در برابر بیماری WSSV باشد اما اگر این پدیده با شدت زیادی رخ دهد می تواند برای میگو مضر باشد و منجر به مرگ و میر بسیار زیاد در میگو ها شود.

منابع

- افشار نسب محمد.، ۱۳۸۶. بیماریهای ویروسی میگو، انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، مدیریت اطلاعات علمی، ۲۱۰ صفحه.
- 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.
- کارگاه روش تحقیق کاربرد روشهای هسته‌ای در علوم کشاورزی، ۱۳۸۵، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و سازمان انرژی اتمی، مرکز تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی
- معتمدی سده، فرحناز، 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.
- صدیق مروستی س. ع.، ۱۳۷۰. بیوتکنیک تکثیر و پرورش میگو و وضعیت آن در ایران، پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۰۶۸.
- مجموعه مقالات همایش ملی مرگ زودرس میگو، ۱۳۹۳. موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور، ویراستار محمد افشارنسب

- Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G, 2000, Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response, Aquaculture 191, 13-21
- Albores, F., Jimenez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G, 1997, Purification and comparison of 1, 3-glucan binding protein from white shrimp (Penaeusvannamei), Comparative Biochemistry and Physiology 116B, 453-458.
- Bachere, E, 2000, Shrimp immunity and disease control, Aquaculture 191, 3-11
- Barber T.L. and Campbell C.H, 1984, Experimental Bluetongue vaccine inactivated by gamma irradiation, Proc. U.S.Anim. Health Assoc., 131- 142.
- Barteling S.J., and Woortmeyer, R., 1984. Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus, Conditions for the preparation of safe vaccine, Arch. Virol. 80: 103–117.
- Best, S.M, 2008, Viral subversion of apoptotic enzymes, escape from death row, Annual Review of Microbiology, 62, 171-192.
- Briggs, M, Funge-Smith S., Subasinghe, R. and Phillips, M. 2004. Introductions and movement of Penaeus vannamei and Penaeus stylirostris in Asia and the Pacific. RAP publication 2004/10. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, 2004, 70 pp.
- Burton, D. R., Williamson, R. A., and Parren, P. W. H. I. 2000. Antibody and virus: binding and neutralization. Virology. 270, 1-3.
- Choi, Mi Ran, Yeong Jin Kim, Ji-Suk Jang, Sung-Koo Kim. 2011.Transcriptional analysis for oral vaccination of recombinant viral proteins against white spot syndrome virus (WSSV) Litopenaeus vannamei. J Microbiol Biotechnol; 21(2): 170-175.
- Durand, S. V. and D. V. Lightner .1996. "Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp." Journal of Fish Diseases 25(7): 381-389.
- Escobedo-Bonilla, C. M., L. Audoorn, M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M. B. Pensaert and H. J. Nauwynck. 2005. "Standardized white spot syndrome virus(WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes." Diseases of Aquatic Organisms 68: 181-188.

- FAO (2013) "The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA),2013." FAO fisheries department, fisheries information, data and statistics unit, 2006, Fishstat, universal software for fishery statistical time series, Version 2.3
- FAO Global Aquaculture, 2008, Outlook in the Next Decades 2003-2005 FAO, 2006-2008: An Analysis of National Aquaculture Production Forecasts to 2030, industry sources
- Flegel, T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand, Aquaculture 258, 1-33.
- Furuya, Y., Regner, M., Lobigs, M., Koskinen, A., Mullbacher, A. and Alsharifi, M., 2010. Effect of inactivation method on the crossprotective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. J General Virol: 91: 1450–1460.
- Grieb T., Forng R.-Y., Brown R., Owolabi T., Maddox E., McBain A., Drohan W.N., Mann D.M. and Burgess W.H., 2002, Effective use of Gamma Irradiation for Pathogen Inactivation of Monoclonal Antibody Preparations. Biological, 30: 207-216
- Graber, J, 1971, Immunognicity of purified Venezuelan Equine Encephalitis virus inactivated by Ionizing Radiation, Infect, Immun; 3 (4), 574-579
- Gudding R., Lillehaug, A., Evensen, Q, 1999, Recent developments in fish vaccinology, Veterinary Immunology and Immunopathology, 72, 203-212.
- Ha, Y. M., S. J. Gong, N. Thi-Hoai, C. H. Ra, K. H. Kim, Y. K. Nam, and S. K. Kim. 2008. Vaccination of shrimp (Penaeus chinensis) against white spot syndrome virus (WSSV). J. Microbiol. Biotechnol. 18: 964-967.
- Hameed, A. S. S., G. Balasubramanian, S. S. Musthaq and K. Yoganandhan .2003. "Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV)." Diseases of Aquatic Organisms 57: 157-161.
- Jiravanichpaisal P, Bangyeekhun E, Soderhall K, Soderhall I, 2001, Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish Pacifastacus leniusculus, Diseases of aquatic organisms, 47(2) 151-7
- Johnston M.A., Elder H.Y.and Davies P.S, 1999, Cytology of carcinus haemocytes and their function in carbohydrate metabolism. Comparative Biochemistry and Physiology Part a, Physiology, 46(3) 569-581.
- Johnsona, K. N., van Hultena, M.C.W. and Barnesa, A. C., 2008. "Vaccination" of shrimp against viral pathogens: Phenomenology and underlying mechanisms. Vaccine 26, 4885–4892.
- Kakoolaki, S., Selamoglu, T.Z., Sharifpour, I., Afsharnasab, M. & Mehrabi, M.R, 2012, Hemolymph cells Apoptosis in imported shrimp Litopenaeus vannamei from Hawaii to Iran, exposed to White Spot Virus. In: 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels (ed. by E. Anon). Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey
- Karber, 2002, Karber formula for calculation of virus/ antibody titers, OIE Manual
- Kim, D. K., I. K. Jang, H. C. Seo, S. O. Shin, S. Y. Yang and J. W. Kim .2004. "Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a runcated fusion protein derived from WSSV." Aquaculture 237(1–4): 21-30.
- Lightner, D.V., 1996, a Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

- Kopacek, P., Grubhoffer, L. and Sderhall, K, 1993, Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish Pacifastacusleniusculus, Developmental and Comparative Immunology 17, 407-418
- Laxmilatha P, Laxminarayana A, 2004, Fine structure of the haemocytes of the Indian white shrimp Fenneropenaeus indicus (H. Milne Edwards, 1837), Crustaceana, 77, 14.
- Li, H. X., X. L. Meng, J. P. Xu, W. Lu and J. Wang .2005. "Protection of crayfish, Cambarus clarkii, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein." Journal of Fish Diseases 28(5): 285-291.
- Li, Y., D. F. McCrory, J. M. Powell, H. Saam and D. Jackson-Smith .2006. "A survey of selected heavy metal concentrations in Wisconsin dairy feeds." J Dairy Sci 88(8): 2911-2922.
- 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
- Lorenzen, N., Olesen, N.J., Vesterghrd Jorgensen, P.E., Etzerodt, M., Holtet, T.L and Thogersen H.C, 1993, Molecular cloning and expression in Escherichia coli of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein Journal of General Virology, 74: 623-630

- Lu, Y., Liu, J., Jin, L., Li, X., Zhen, Y., Xue, H., You, J., Xu, Y., 2008, Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. Fish & Shellfish Immunology, 25, 604–610
- Marks, H., Goldbach, R. W., Vlak, J. M. and van Hulten, M. C. 2004. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. Arch Virol 149, 673-97.
- Millar, D, A and Ratcliffe, N, A, 1994, Invertebrates, In Turner, R. J. (editor), Immunology, a comparative approach, John Wiley & Sons Ltd, England, pp 29-68
- 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
- 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.
- Momoyama, K., M. Hiraoka, K. Inouye, T. Kimura and H. Nakano (1995). "Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, Penaeus japonicus." Fish Pathology **30**: 263-269.
- 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
- OIE, Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals, 2003, Nested polymerase chain reaction of tissues and haemolymph
- 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
- 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.
- Ramsey, I. K., Spibey, N., and Jarrett, O. 1998. The receptor binding site of feline leukemia virus surface glycoprotein is distinct from the site involved in virus neutralization. J. Virol.72, 3268-77.
- Robalino J, Bartlet T, Shepard E, Prior S, Jaramillo G, Scura E. 2004.Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp:convergence of RNA interference and innate immunity invertebrate antiviral response? J Virol 79: 13561-
- Rodriguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday and J. Calderon 2003. "White spot syndrome virus infection in cultured Penaeus vannamei (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure." Journal of Fish Diseases 26(8): 439-450.
- Salehi h., 2010, the economic impacts of WSSV on shrimp farming production and export in Iran.Aquatic animal health 15, 29-31.
- Sanchez-Martinez J.G., Aguirre-Guzman, G., Mejia-Ruiz, H., 2007, White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. Aquaculture Research 38, 1339 – 1354.
- Sahtout AH1, Hassan MD, Shariff M.2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp Penaeus monodon infected with white spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Organ. 9;44(2):155-9.
- 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.
- Soderhall, K., Aspan, A. and Duvic, B, 1990, the proPO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods, Research Immunology 141, 896-907
- Soderhall, K., Cerenius, L. and Johansson, M. W, 1996, the prophenoloxidase activating system in invertebrates, In: Sderholl, K., Iwanaga, S. and Vasta, G. R., New Directions in Invertebrate Immunology, SOSPublications, Fair Haven, pp. 229-253.
- Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K, 2000, the proPO and clotting system in crustaceans, Aquaculture 191, 53-69.
- Tang, X., J. Wu, J. Sivaraman, and C. L. Hew. 2007. Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. J. Virol. 81: 6709-6717.
- Van Hulten, MC. W., M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou and J. M. Valk, 2000, 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.
- 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

- van Hulten, M. C. W., Reijns, M., Vermeesch, A. M., Zandbergen, F. and Vlak, J. M. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. J Gen Virol 83: 257-65.
- Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T. & Muroga, K, 2000, Quasi-immune response of Penaeus japonicus to Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), Diseases of Aquatic Organisms, 42, 83-89
- Vlak, J.M., J.R. Bonami, T.W. Flegel, G.H. Kou, D.V. Lightner, C.F. Loh, P.C. Loh and Walker, P.W. 2005. Nimaviridae. In: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball,Eds.), 187-192. Elsevier/Academic Press, London.
- Valderama, D. & Anderson, J. L. 2011. Shrimp production review. GOAL 2011,Santiago, Chile, November2011, 9-6. 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.
- Wang, C. H., C. F. Lo, J. H. Leu, C. M. Chou, P. Y. Yeh, H. Y. Chou, V. C. Tung, F. Chang, M. S. Su and G. H. Kou 1995M. "Purification and genomic analysis of baculovirus associated with White Spot Syndrome (WSBV) of Penaeus monodon." Diseases of Aquatic Organisms 23: 239-242.

- Wang, L., Zhi, B., Wu, W. & Zhang, X, 2008, Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. Developmental & Comparative Immunology, 32, 706-715
- Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Valk, J. M., and Van Hulten, MC. W, 2004, Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrome Virus by Oral Vaccination. Journal of Virology, 78(4), 2057-2061.
- Witteveldt, J., Vermeesch, A.M., Langenhof, M., de Lang, A., Vlak, J.M., and van Hulten, M.C. 2005. Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. Arch. Virol. 150(6): 1121–1133. doi:10.1007/s00705-004- 0483-8. PMID:15703849.
- Wu J.L., Nishioka T., Mori K., Nishizawa T., Muroga K., 2002, A time-course study on the resistance of Penaeus japonicus induced by artificial infection with white spot syndrome virus, Fish Shellfish Immunol, 13, 391–403.
- Wu, J. L. and K. Muroga (2004). "Apoptosis does not play an important role in the resistance of 'immune'Penaeus japonicus against white spot syndrome virus." Journal of Fish Diseases 27(1): 15-21.
- Wu, W., L. Wang and X. Zhang (2005). "Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection." Virology 332(2): 578-583.
- Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X. and Xu, X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. J Virol 75:11811-20
- Yang. F and Xie, X. 2006. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. Virology 336, 93-99.
- Yeh, S. T., Y. C. Lin, C. L. Huang and J. C. Chen.1998.. "White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of Gracilaria tenuistipitata showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress." Fish Shellfish Immunol **28**(5-6): 887-894.
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J. and Hu, L. (2004) Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. J Biochem Mol Biol 37, 726-34.
- Yu Mi Ha, Yun Im Kim, Ki Hong Kim, Sung Koo Kim. Neutralization of white spot syndrome virus (WSSV) for Penaeus chinensis by antiserum raised against recombinant VP19. J Env Bio 2008; 29(4):
- Zhang, X., Huang, C., Xu, X. and Hew, C. L2002. Transcription and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus. J Gen Virol 83, 471-7.
- Zhu, Y., X. Xie and F. Yang .2005. "Transcription and identifcation of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus." Virus Research 113: 100-106.

Abstract:

The study of effect white spot syndrome virus(WSSV) attenuated vaccine that produced with gamma radiation on shrimp *Litopenaeus vannamei* carried out by imprinted 14000 PL from Kolahi hatchery in Hormozgan province. The shrimp divided to 3 groups as mentioned in table 2-1. The first group exposed to WSSV vaccine. The second group exposed to WSSV vaccine and then exposed to WSSV and the third did not exposed to vaccine and WSSV and named control positive. The experiment conducted 40 days and the shrimp cultured in standard trail. The result showed the shrimp exposed to vaccine and then exposed to WSSV has 76% and 61% higher survival rate after 35 days and 45 days respectively. The mortality rate also exhibited24% and 39% in both group respectively. The mean value of total hemocyte count and total protein plasma measuring with ANNOVA and LSD examination in group vaccinated and without vaccinate in exposing and injecting group showed no statistical differentiation ($P>0.05$) while the total heamocyte count and total protein plasma showed statistical differentiation ($P.<0.05$) between both groups. The result from histopathological examinations showed the cowdry type A inclusion bodies in all organ and tissue exhibited and the group vaccinated showed lower inclusion bodies with comparing without vaccinated.

Key words: *Litopenaus vannamei*, White spot syndrome virus vaccine, White spot syndrome virus, Survival rate.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE – Shrimp Researsh Center

---

Project Title : Fesibility study of white spot syndrome virus vaccine with gamma radiation
Approved Number: 014-12-12-9158
Author: Mohammad Afsharnasab
Project Researcher : Mohammad Afsharnasab
Collaborator(s) : A.A.Motalebi,M.Sharifpor,M.Kh.Pazir,B,Ghaednia,Sh.Kakolaki
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 2 Years
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2015
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 & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

Project Title :

Fesibility study of white spot syndrome virus vaccine with gamma radiation

Project Researcher :

Mohammad Afsharnasab

Register NO.
45806