CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Aquatic Commons

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

عنوان:

بررسی شاخص های رشد و بازماندگی میگوهای سفید غربی واکسینه شده بر علیه ویروس بیماری لکه سفید

مجری :
محمدخلیل پذیر

شماره ثبت
٤٥٨١٥

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

عنوان پروژه : بررسی شاخص های رشد و بازماندگی میگوهای سفید غربی واکسینه شده برعلیه ویروس بیماری لکه سفید
شماره مصوب پروژه : ۹۱۰۰۱-۹۱۵۸-۱۲-۸۰-۱٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمدخلیل پذیر
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد خلیل پذیر
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد افشار نسب، شاپور کاکولکی، فرحناز معتمدی، خسرو آئین جمشید، بابک قائدنیا، احمد مال الهی، مصطفی شریف روحانی، محمد رضا مهرابی،عیسی شریف پور، عقیل دشتیان نسب، قاسم غریبی، رضا قربانی واقعی، اکبر پای گذار، مصطفی صبوحی، علیرضا اسدی، محمد علی نظاری
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»

پروژه : بررسی شاخص های رشد و بازماندگی میگوهای سفید غربی واکسینه شده برعلیه ویروس بیماری لکه سفید

کد مصوب : ۹۱۰۰۱-۹۱۵۸-۱۲-۸۰-۱٤

شماره ثبت (فروست) : ٤٥٨١٥ تاریخ : ۹۳/٦/۲۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد خلیل پذیر دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

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

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز□ ایستگاه □

با سمت کارشناس در پژوهشکده میگوی کشورمشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۲- مواد و روش کار ۶
۲-۱- تهیه رادیوواکسن بیماری ویروسی لکه سفید در میگو سفید غربی ۶
۲-۲- تائید آلوده بودن بافت و همولنف خرچنگ دراز از طریق آزمایشات مولکولیPCR ۷
۲-۳- تعیین تیتر ویروس لکه سفید در میگو ۷
۲-۴- غیرفعال سازی ویروس لکه سفید با استفاده از پرتو گاما ۸
۲-۵- تائید غیرفعال سازی ویروس لکه سفید(آزمون بی ضرری) ۹
۲-۶- خالص سازی رادیوواکسن ۹
۲-۷- آماده سازی سالن نگهداری میگو ۱۰
۲-۸- تهیه پست لارو میگو، انتقال به آزمایشگاه و تقسیم کردن آنها به تانکهای پرورش ۱۱
۲-۹- تیمار بندی میگو مطالعه ۱۲
۲-۱۰-تغدیه و نگهداری پست لاروهای تیمارهای مختلف مطالعه ۱۳
۲-۱۱- شکوفا نمودن سیست آرتمیا ۱۴
۲-۱۲- واکسیناسیون پست لاروهای میگو با رادیوواکسن به روش غوطه وری ۱۴
۲-۱۳- نمونه گیری از گروههای میگو جهت انجام آزمون های بیومتری ۱۵
۲-۱۴-تعیین درصد بقاء نسبی میگوهای ایمن سازی شده پس از مواجهه با ویروس زنده ۱۶
۲-۱۵- آنالیز آماری داده ها ۱۶
۳- نتایج ۱۷
۳-۱- تأئید آلودگی ذخائر ویروس لکه سفید ۱۷
۳-۲- تأیید آلودگی خرچنگهای آب شیرین ۱۷
۳-۳- تعیین تیتر ویروس ۱۸
۳-۴-تعیین رقت ویروس پرتوتابی شده ۱۸
۳-۵- نتیجه آزمون بی ضرری ۱۸
۳-۶- تعیین مقادیر مربوط به شاخص های رشد در تیمارهای مختلف ۱۹

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۳-۷- مقایسه میانگین وزن و طول پست لاروهای واکسینه و غیر واکسینه تیمارهای مختلف ۲۶
۳-۸- میزان درصد بازماندگی پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ ..... ۲۹
۴- بحث ۳۱
منابع ۳۵
چکیده انگلیسی ۳۸

چکیده

با توجه به اینکه بیماری ویروسی لکه سفید همواره به عنوان یک خطر جدی برای صنعت تکثر و پرورش میگوی کشور محسوب می شود، لیکن در این مطالعه سعی شد تا با بکارگیری شیوه های نوین همانند ایمن سازی میگوها از طریق ویروس های غیرفعال شده و پروتئین های نوترکیب مقاومت میگوها را نسبت به بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV) افزایش داده شود. از این رو هدف از این مطالعه تعیین میزان شاخص های رشد و بازماندگی پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده و غیر واکسینه میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی بود. از این رو این مطالعه از ۱۱ تیمار آزمایشی هر کدام با سه تکرار تشکیل شده بود که در هر تکرار ۱۰۰۰ قطعه پست لارو ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه بصورت مجزا در دو گروه واکسینه و غیرواکسینه ذخیره سازی شد. روش کار بدین صورت بود که بعد از واکسیناسیون پست لاروهای فوق در دو گروه مواجهه با ویروس و یک گروه بدون مواجهه با ویروس در سنین ۴۰، ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه داده شدند. در ادامه در طی روز های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پرورش از هر کدام از تیمارهای مطالعه ۱۰ قطعه میگو بصورت تصادفی انتخاب و بعد از سنجش طول و وزن مجدداً به تانک های مربوطبه خود بازگردانده شدند. همچنین روزانه تعداد تلفات در دونوبت صبح و عصر شمارش و ثبت شد، و در انتهای مطالعه با توجه به تعداد میگوهای بازمانده از تیمارهای مختلف میزان درصد بازماندگی، درصد تلفات نسبی و درصد بازماندگی نسبی محاسبه گردید. نتایج مطالعه حاکی از این مطلب بود که میزان رشد در پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده که در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند بطور معنی داری کمتر از پست لاروهای غیرواکسینه بود، لیکن این در حالی بود که میزان رشد در پست لاروهایی که تنها در سن ۶۰ روزگی با ویروس مواجه شده بودند بطور معنی داری افزایش یافته بود. از سوی دیگر در مقایسه با پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده مشاهده شد که میزان رشد در پست لاروهایی که در سن ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند نسبت به پست لاروهای ۲۶-۱۲ و ۱۵-۵ روزه که در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی با ویروس مواجهه شده بودند بطور معنی داری با افزایش همراه بود. با این وجود میزان رشد در هر دو گروه پست لارو واکسینه شده که با ویروس مواجهه نشده بودند بطور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. همچنین علیرغم اینکه میزان بازماندگی در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده که در سن ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند نسبت به پست لاروهای مواجهه شده با ویروس در سنین ۴۰ و ۶۰ بیشتر بود، لیکن هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد. گفتنی است که میزان درصد تلفات نسبی در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده در مقایسه با پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده که با ویروس مواجهه شده بودند بطور معنی داری کمتر بود.لذا با توجه به بهبود شاخص های رشد و بازماندگی در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه می توان عنوان نمود که مناسبترین سن برای واکسیناسیون میگوهای سفید غربی برعلیه ویروس بیماری لکه سفید سن ۲۶-۱۲ روز می باشد.

کلمات کلیدی:

ویروس لکه سفید ، میگوی سفید غربی، واکسیناسیون، رشد و بازماندگی

۱- مقدمه

از زمان شروع صنعت تکثیر و پرورش میگو از سال ۱۹۷۰، تا کنون بیش از پنجاه کشور به توسعه این صنعت مبادرت ورزیده اند وحجم بالائی از تولیدات آبزیان این کشورها به میگوی پرورشی اختصاص یافته است(Van Hulten *et al*., 2000). امروزه مشاهده می شود که میگوهای خانواده پنائیده از مهمترین گونه های پرورشی می باشند که میزان تولید آنها در سال ۲۰۱۱ میلادی در جهان به رقمی بالغ بر ۴ میلیون تن رسیده است (FAO, 2013). در این میان عوامل بیماریزای مختلفی از جمله باکتریایی، ویروسی، قارچی همواره این صنعت مورد تهدید قرار می داده اند.شایان ذکر است که در خانواده سخت پوستان بالاخص میگوهای خانواده پنائیده تاکنون حدود ۲۰ بیماری ویروسی، ۴ بیماری باکتریائی، ۳ بیماری قارچی و تعدادی انگل به عنوان عوامل بیماریزا شناسایی شده اند که موجب تحمیل خسارات جبران ناپذیری را به این صنعت شده اند(Tapay *et al*., 1999; Lightner, 2003). در این بین بیماریهای ویروسی همانند بیماری ویروسی لکه سفید[۱]، بیماری ویروسی کله زرد[۲]، بیماری ویروسی سندروم تورآ[۳]، بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم[۴]، بیماری باکیولوویروس مونودن[۵]، بیماری نکروز عفونی عضلات[۶]همواره به عنوان عوامل بیماریزای ویروسی این صنعت را مورد تهدید قرار داده اند (افشار نسب، ۱۳۸۶). که از این میان بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهمترین بیماریهای ویروسی شایع در مزراع پرورشی میگو و سایر سخت پوستان می باشدو معمولاً با مرگ و میر بالای ۱۰۰ درصد در مدت ۱۰ -۳ روز همراه بوده است (Lightner, 1996). گفتنی است که ویروس فوق جزء خانواده نیماویریده[۷]، جنس ویسپاویروس [۸] می باشد (Pruder *et al*., 1995). این ویروس بزرگ پوشش دار بصورت بیضوی تا باسیلی شکل با قطری در حدود ۱۵۰-۱۲۰ و طول ۳۰۰-۳۵۰ نانومتر می باشد که حاوی یک DNA دو رشته ای بوده و در انتهای ویروس یک زائده دم مانند قرار گرفته است (Morton *et al*., 1970).این ویروس از ۵ پروتئین بزرگ و ۱۳ پروتئین کوچک تشکیل شده که پروتئین های VP28، VP19 و نوکلئوکپسید VP15 جزء پروتئین های ساختاری در گیر در ایجاد آلودگی محسوب می شوند (افشار نسب،۱۳۸۶). این بیماری اولین بار در سال های ۱۹۹۳ – ۱۹۹۲ از استان های فوژان[۹] و کوانژو[۱۰] در کشور چین با ۸۰ درصد تلفات مزارع پرورشی میگو گزارش شد(Crander *et al*., 1997). وقوع این

۱White Spot Syndrome Virus (WSSV)
۲Yellow Head Virus (YHV)
۳Taura Syndrome Virus Disease (TSV)
۴Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)
۵MonodonBaculovirus (MBV)
۶Infection Myonecrosis Virus (IMNV)
۷Nimaviridea
۸Whispovirus
۹Fuzhan
۱۰Quangzhou

بیماری در ایران اولین بار در سال ۲۰۰۲ میلادی در استان خوزستان، سایت پرورش میگوی چوئبده آبادان گزارش شد که به فاصله سه سال بعد در سال ۲۰۰۵ میلادی، ۱۷۰۰ هکتار مزراع پرورش میگوی زیر کشت استان بوشهر را درگیر نمود، همچنین در سال های ۲۰۰۷ و ۲۰۱۲ میلادی این بیماری خسارات شدیدی را به صنعت پرورش میگوی کشور واقع در سایت پرورشی گواتر استان سیستان و بلوچستان وارد نمود،به گونه ای که در طی این سال ها علاوه بر کاهش میزان تولید میگو این صنعت با وقفه های اقتصادی سنگین روبرو شد.

لیکن به دلیل فعالیت های شدید آبزی پروری و دامنه وسیع میزبانان ویروس، این موجودات همواره در معرض درگیری با عوامل بیماریزای ویروسی از جمله ویروس لکه سفید بوده اند (Kimbrell&Beutler, 2001). از این رو تا کنون راهکارهای متعددی از جمله بهبود شرایط محیطی، ذخیره سازی پست لاروهای عاری از عوامل بیماربزا[۱۱]و مقاوم[۱۲] به عوامل بیماریزا، استفاده از محرک های سیستم ایمنی و استفاده از واکسن جهت مصون سازی میگوها بمنظور کنترل و پیشگیری از بیماری لکه سفید ارائه شده است (Namikoshi*et al.,* 2004).

شایان ذکر است که در رابطه با سیستم ایمنی سخت پوستان تاکنون تحقیقات زیادی انجام شده که همگی بیان می نمایند که اکثر بی مهرگان فاقد سیستم ایمنی اکتسابی بوده و دفاع آنها ناشی از سیستم ایمنی ذاتی است که هم به صورت سلولار و هم هومورال می باشد (Kurtz & Franz, 2003; Kurtz, 2005). با این وجود یک سیستم شبه ایمنی علیه ویروس لکه سفید در میگو تشخیص داده شده است (Choi *et al*., 2011). تاکنون واکنس های زیادی در آبزیان تولیدشده است که به طور کلی این واکسن ها را می توان به سه دسته واکسن های زنده تخفیف حدت یافته، واکسن های نوترکیب و واکسن های کشته تقسیم نمود (Morton *et al*., 1970; Witteveldt, 2006).

امروزه برای غیرفعال نمودن عوامل بیماریزا از روش های مختلفی استفاده می شود. از جمله این مواد فرمالدئید می باشد که از آن سال های متمادی برای غیرفعال سازی ویروسها استفاده می شد (Barteling & Woortmeyer, 1984; Lombardo & Smolko, 1990; Söderhäll & Thornqvist, 1997;Gudding *et al*., 1999; Salehi, 2010; Escobedo-Bonilla *et al*., 2005;).لیکن گزارشاتی مبنی بر عدم غیرفعال سازی کامل ویروس و باقی ماندن خاصیت عفونت زایی آن موجود می باشد (Bahnemann, 1990; Kyvsgaard *et al*., 1996). از دیگر مواد مورد استفاده در این رابطه آزریدینها[۱۳] می باشند که اولین بار از آنها بمنظور غیرفعال سازی میکروارگانیسم ها در سال ۱۹۵۵ استفاده شد. از آنجائیکه آرزیریدینها شدیداً سمی و سرطان زا هستند، بسیاری از کارخانه های تولید واکسن تمایلی به استفاده از این نوع ماده شیمیایی از خود نشان نمی دهند(Salehi, 2010).

از دیگرروش های غیرفعال سازی عوامل بیماریزا روش غیرفعال سازی با استفاده از پرتوهای یونساز می باشد. گفتنی است که این پرتوها با انرژی بالا، قدرت زیاد و اثرات کشندگی شدید، از نوعپرتوهای الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه و قدرت نفوذ بالا می باشند. ازجمله پرتوهای یونساز می توان به پرتوهای گاما و الکترون اشاره

۱۱.Specific Pathogenic Free (SPF)

۱۲.Specific Pathogenic Resistance (SPR)

۱۳.Aziridines

نمود. امروزه برای ایجاد پرتو گاما از ایزوتوپ های رادیو اکتیو کبالت ۶۰ یا سزیم ۱۳۷ استفاده می شود (Lorenzen *et al*., 1993; Campbell *et al*., 1985).

مرگ میکروارگانیسم‌ها نتیجه عمل یونسازی پرتو با انرژی بالا می‌باشد. این پرتوها، انرژی خود را به مولکول‌ها منتقل می نماید و موجب پدیده یونیزاسیون در میکروارگانیسم شده که در نتیجه با تغییرات شیمیائی در مواد بیولوژیکی همراه می گردد. شایان ذکر است که اثر یونیزاسیون اشعه به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم رخ خواهد داد، در شکل مستقیم با ایجاد رادیکال های آزاد از مولکول‌های آب موجود در سلولها اثرات کشندگی خود را برجا می گذارند. از این رو از مهمترین نقاطی که به عنوان هدف پرتو مطرح می‌باشد، هسته سلول و DNA موجود در آن می‌باشد. به گونه ای که علاوه بر ایجاد ضایعات کشنده در هسته سلول تغییراتی در DNAآنها به وجود خواهد آورد که در ادامه از تقسیم سلولی هم در باکتری‌ها و هم در سلول‌های پستانداران ممانعت بعمل خواهد آورد. این تغییرات بیشتر روی بازهای آلی رخ می‌دهد (Rajesh Kumar *et al*., 2008).

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. 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; Rajesh Kumar *et al*., 2008). حساسترین خاصیت ویروس‌ها، عفونت‌زایی آنهاست. چونکه 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. (Adams & Pollard, 1952; Witteveldt *et al*., 2005).

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 پروتئین های نوترکیب بمنظور محافظت و جلوگیری از مرگ و میر

میگوها باز می گردد. در این مطالعات مشاهده شد که یک پاسخ شبه ایمنی[۱۴] در میگوهای مقاوم به ویروس های بیماریزای همانند ویروس بیماری لکه سفید ایجاد شده بود که به دلیل وجود فاکتورهای خنثی کننده[۱۵] در همولنف میگوهای واکسینه شده، در مواجهه بعدی میگوها با ویروس به دلیل فعالیت سیستم شبه ایمنی، مقاومت میگوها در برابر بیماری افزایش یافتکه در نتیجه آن مرگ و میر میگوها با کاهش همراه شد (Johnsona*et al.*, 2008). امروزه از پروتئین های نوترکیب همانند پروتئین های نوترکیبی که برای بعضی از ویروس های ماهیان ساخته می شود استفاده می گردد (Leong & Fryer, 1993; Lorenzen&Olesen, 1997; Húsgard*et al.*, 2001). 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 (Powell *et al.*, 2011). 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 بکارگیری شیوه های نوین همانند ایمن سازی میگوها از طریق ویروس های غیرفعال شده و پروتئین های نوترکیب مقاومت میگوها را نسبت به بیماری لکه سفید افزایش داد که در پی آن میزان رشد و بازماندگی میگوها بهبود یابد. هدف از این مطالعهتعیین میزان شاخص های رشد و بازماندگی میگوهای سفید غربی واکسینه شده و غیر واکسینه در برابر مواجهه با ویروس بیماری لکه سفید در سنین مختلف بود.

۱۴Quasi-Immune Response

۱۵Neutralizing

۲-مواد و روش کار

۱-۲-تهیه واکسن بیماری ویروسی لکه سفید در میگو سفید غربی

جداسازی و تکثیر ویروس لکه سفید میگو

با توجه به عدم وجود محیط کشت سلولی مناسب در خصوص کشت و تکثیر ویروس بیماری لکه سفید در این مطالعه بمنظور تکثیر ویروس با تزریق ویروس خالص شده لکه سفید به بدن خرچنگ دراز آب شیرین (*AstacusLeptodactylus*) بعنوان میزبان واسط ویروس از همولنف آنها بعنوان محلی برای کشت و تکثیر ویروس لکه سفید استفاده شد (Shi *et al*., 2000; Jiravanichpaisal *et al*., 2001). روش کار بدین صورت بود که در ابتدا اقدام به تهیه خرچنگ های دراز آب شیرین با میانگین وزنی ۲۰ -۱۵ گرم از دریاچه پشت سد ارس و نگهداری آنها در استخر تحقیقاتی پژوهشکده انرژی اتمی کرج نموده شد (شکل ۱). در ادامه بمنظور تهیه استوک ویروس براساس روش Van Hulten و همکاران (۲۰۰۰)چند قطعه میگوی آلوده به ویروس لکه سفید پس از تائید آلودگی میگوها براساس علائم بالینی (وجود لکه های سفید بر روی میگوها) و آزمایش مولکولیPCR، همراه با بافر تریس حاوی کلریدسدیم[۱۶] با نسبت ۱:۵ پس از آسیاب و هموژن نمودن توسط دستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور g×۱۷۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید (شکل ۲). سپس با فیلتر نمودن مایع روئی در مجاورت یخ خشک توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ با چشمه ۰/۴۵ میکرون، در نهایت سوسپانسیون بافتی حاوی ویروس لکه سفید جهت تجویز به خرچنگ دراز آب شیرین عاری از بیماری به منظور تکثیر تهیه گردید. در این مطالعه ۰/۳ میلی لیتر از سوسپانسیون بافتی حاوی ویروس از طریق روش عضلانی در فواصل بندهای سوم و چهارم سینه ای کلیه خرچنگ های دراز آب شیرین تزریق گردید و بصورت روزانه از لحاظ وضعیت سلامت مورد بررسی قرار گرفتند.

بمنظور تأئید ایجاد بیماری در خرچنگ های دراز آب شیرین و تکثیر یا عدم تکثیر ویروس لکه سفید پس از گذشت سه روز از زمان تزریق ویروس از همولنف خرچنگ های مشکوک نمونه گیری به عمل آمد. گفتنی است که بمنظور جلوگیری از انعقاد همولنف از ماده ضدانعقاد Alsever استفاده شد که پس از سانتریفوژ نمودن توسط دستگاه سانتریفوژ اپندورف در مدت زمان ۱۰ دقیقه در دور g×۱۷۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد و حذف سلول های هموسیت پلاسمای جدا شده بمنظور استفاده در مراحل بعدی مطالعه در درجه حرارت ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (پذیر و همکاران، ۱۳۸۹؛ Acharya *et al*., 2004).

---

۱۶ . TN

شکل ۱: حوضچه نگهداری خرچنگ های دراز آب شیرین در پژوهشکده کرج

شکل ۲: میگوهای آلوده به بیماری ویروسی لکه سفید

۲-۲-تائید آلوده بودن بافت و همولنف خرچنگ دراز از طریق آزمایشات مولکولیPCR

بمنظور تائید آلودگی خرچنگ ها و تکثیر ویروس لکه سفید نمونه های همولنف اخذ شده از خرچنگ های دراز آب شیرین با استفاده از کیت تشخیص (IQ 2000) بیماری لکه سفید مورد تأئید قرار گرفت. روش کار بدین صورت بود که بعد از استخراج ماده ژنتیکی DNA براساس دستورالعمل الحاقی کیت و تکثیر ماده ژنتیکی ویروس لکه سفید توسط آغازگرهای اختصاصی ویروس بر اساس روش مولکولی Nested PCR و انتقال محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید مورد تأئید قرار گرفت (پذیر و همکاران، ۱۳۸۹؛ Vaseeharan *et al*., 2003).

۲-۳-تعیین تیتر ویروس لکه سفید در میگو

برای تعیین تیتر ویروس از روش تعیین LD50[۱۷]با رقت های ۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ سوسپانسیون ویروسی تهیه شده از همولنف خرچنگ های آلوده به ویروسلکهسفید در بافر استریل تریس حاوی کلریدسدیمدر ۵ گروه

۱۷Lethal Dose 50

پست لارو میگو با میانگین وزنی ۱ تا ۲ گرم استفاده شد (Choi *et al*., 2011). روش کار بدین صورت بود که با استفاده از سرنگ انسولینی گیج ۲۹ به هر میگو ۱۰ میکرولیتر از رقت های فوق تزریق شد (شکل ۳).
روزانه در زمان های صبح و شب کلیه میگوهای تیمار از لحاظ تعداد تلفات مورد بررسی قرار می گرفتند. لازم به ذکر است که تلفات ابتدایی در گروه های مختلف بیشتر ناشی از استرس تزریق بود که در نتیجه جزء محاسبات تیتر ویروسی قرار نگرفت. در ادامه تلفات تا ۸ روز پس از تزریق ثبت و در آخر نیز تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر به شرح زیر محاسبه گردید (Trujillo & Dugan, 1972).

در آخر نیز تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه شود.

Karber Formula:

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

X^a: شاخص رقت پایانی برای تمامی نمونه های آلوده کشت داده شده

D: لگاریتم فاکتور رقت (Log 10=1)

P: نسبت رقت ویروس کشت های آلوده

Sp: مجموع نسبت رقت ویروس کشت های آلوده (P) ما بین رقت پایانی برای تمامی نمونه های آلوده کشت داده شده (P=1) و رقت ابتدایی کلیه نمونه های غیر آلوده کشت داده شده (P=0)

شکل ۳: تزریق سوسپانسیون ویروس به پست لاروهای یک گرمی

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

بمنظور غیرفعال سازی ویروس های لکه سفید، همولنف های جمع آوری شده از خرچنگهای آلودهبه ویروس پس از تائید وجود ویروس لکه سفید در آنها به روش مولکولیPCRو تعیین تیتر ویروسی به روش LD50 ، در حالت منجمد در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد با دز اپتیمم ۱۵ کیلوگری توسط پرتو گاماپرتو دهی شدند (Lombardo & Smolko, 1990; Grieb *et al*., 2002). در ادامه همولنف های پرتودهی شده جهت انجام مراحل بعدی تحقیق به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقلشدند(Shafaee *et al*., 2004) (شکل ۴).

شکل ٤: سیستم پرتو دهنده گاما

۲-۵-تائید غیرفعال سازی ویروس لکه سفید(آزمون بی ضرری[۱۸])

در این مرحله از گروههای ۱۰ تایی پست لاروی میگو ۱ تا ۲ گرمی استفاده شد. در این مرحله ۵ گروه ۱۰ تایی پست لارو میگو انتخاب شدند که پس از تهیه رقت های۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، و ۱/۱۰۰۰از ویروس های غیرفعال شده با پرتو گاما همراه با ایمونوژن (GI)، پرتو گاما بدون ایمونوژن (GWI) و پرتو گاما همراه با باکتری ویبریو غیرفعال (GB) به هر میگو ۱۰ میکرولیتر از رقتهای مذکور به صورت داخل عضلانی تزریق شد. همزمان نیز در گروه کنترل ویروس زنده پرتوتابی نشده به همان روش تزریق گردید (Smolko & Lombardo, 2005).

در ادامه به مدت چهارده روز، روزانه در ساعات ۸ و ۲۲ تعداد تلفات گروه های مختلف تا ۱۴ روز پس از تلقیح بررسی و ثبت گردید.از سوی دیگر بمنظور اطمینان از عدم تکثیر ویروس غیرفعال شده در سوسپانسیون های پرتو تابی شده، تلقیح ویروس تا سه پاساژ متوالی صورت پذیرفت. لیکن در انتها با استفاده از فرمول کربر رقت های مختلف از ویروس محاسبه شد.همزمان با نمونه گیری از تیمارهای مختلفو انجام آزمایشات مولکولی Nested PCRحضور ویروس در میگوهای تلقیح شده با ویروس لکه سفید غیرفعال مورد ردیابی قرار گرفت (Vaseeharan *et al*., 2003).

۲-٦-خالص سازی رادیو واکسن

پس از غیرفعال سازی ویروس موجود در همولنف خرچنگ و تایید غیرفعال سازی کامل ویروس در پست لاروهای میگو تا سه پاساژ متوالی، پس از خنثی نمودن pH، سوسپانسیون های حاوی ویروس با افزودن بافر TN و گذراندن آن از فیلتر ۰/۴۵ میکرون در ویال های شیشه ای درب دار استریل به میزان $۱۰^{-۳}$میلی لیتر برای هر قطعه میگو ذخیره سازی شدند (Mavichak *et al*., 2011).

[۱۸] Safety Test

۷-۲-آماده سازی سالن نگهداری میگو

فاز عملیاتی این مطالعه در سالن سرپوشیده مرکز آموزش جهاد کشاورزی بوشهر واقع در مجاورت پژوهشکده میگوی کشور صورت پذیرفت. در ابتدا با استفاده از ۱۰۰ قسمت در میلیون هیپوکلرید سدیم کف و دیواره های سالن آزمایشگاه بطور کامل ضدعفونی گردید. شایان ذکر است که در این مطالعه از تانک های ۳۰۰ لیتری جهت ذخیره سازی میگوهای تیمار و دو عدد تانک ۲۰۰۰ لیتری بمنظور ذخیره سازی آب مورد در مدت زمان مطالعه استفاده شد. همچنین برای هر تانک بطور مجزا از دو عدد سنگ هواده متصل به یک پمپ هواده قوی (Heila) با سیستم هواده داخلی استفاده گردید (شکل ۵).

شکل ۵ : تانک های ۲۰۰۰ لیتری ذخیره آب دریا

بمنظور تهیه آب مورد نیاز جهت پرورش میگوهای تیمار پس از فیلتراسیون آب توسط فیلترهای ماسه ای حوضچه فیلتراسیون ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه و گذراندن از فیلترهای پنج میکرون با استفاده از آب شیرین از طریق معادله زیر شوری آن بر روی ۳۵ قسمت در هزار تنظیم گردید (معادله ۱) (پذیر و همکاران، ۱۳۸۶).

$$S_1V_1=S_2V_2$$

معادله ۱: تنظیم درجه شوری آب :

بمنظور از بین بردن کلیه میکروارگانیسم های موجود در آب، ۲۰ قسمت در میلیون هیپوکلرید سدیم به مدت ۱۲ ساعت به آب افزوده شد. در ادامهبا هوادهی شدید آب به مدت ۲۴ ساعت خنثی سازی آب از گاز کلر صورت پذیرفت. که بعد از گذشت این مدت زمان با استفاده از کیت کلر سنج شیمی دارو مقادیر گاز هیپوکلرید سدیم موجود در آب سنجیده شدۀ که در صورت عدم وجود این گاز و پس از حصول اطمینان از وجود هر گونه آلودگی توسط یک تانک ۱۰۰۰ لیتری با استفاده از خودرو به سالن مواجهه واقع در مرکز آموزش جهاد کشاورزی منتقل و در تانک های ۲۰۰۰ لیتری ذخیره سازی شدند (شکل ۶).

شکل ٦: انتقال آب فیلتر و کلر زده بوده به سالن مواجهه

در ادامه آب گیری تانک های ۳۰۰ لیتری به میزان ۲۰۰ لیتر صورت پذیرفت. همانگونه که عنوان شد در این مطالعه برای هر ۲ عدد سنگ تعبیه شد. از سوی دیگر کلیه وسایل اعم از ساچوک، ظروف غذادهی و شلنگ های مخصوص سیفون آب برای هر تانک بصورت جداگانه در نظر گرفته شد.

۸-۲-تهیه پست لارو میگو، انتقال به آزمایشگاه و تقسیم کردن آنها به تانکهای پرورش

در این مطالعه از ۱۴۰۰۰ قطعه پست لارو یک روزهمیگوی سفید غربی (*Litopenaeusvannamei*) تهیه شده از از مرکز تکثیر بندر کلاهی واقع در استان هرمزگان استفاده شد. بمنظور ذخیره سازی پست لاروها در تانک های ۳۰۰ لیتری بدلیل اختلاف شرایط فیزیکوشیمیایی آب موجود در پلاستیکهای پکینگ با آب موجود در تانکهای ۳۰۰ لیتری و بمنظور جلوگیری از استرس ناشی از انتقال در ابتدا آداپتاسیون دما و شوری صورت گرفت. روش کار بدین صورت بود که در ابتدا بمنظور سازش دمایی پلاستیک های پکینگ به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در بر روی سطح آب در داخل تشت های ۲۰ لیتری بصورت شناور قرار داده شدند در ادامه پس از هم دما شدن، درب کیسه های پکینگ حاوی پست لارو را باز نموده و مقداری از آب تانک های ۳۰۰ لیتری داخل سالن را بمنظور یکنواخت نمودن درجه شوری و جلوگیری از ایجاد استرس افزوده شد. پس از حصول اطمینان از سالم بودن پست لاروها و عدم مشاهده استرس ذخیره سازی آنها در تانک های ۳۰۰ لیتری مربوط به هر تیمار صورت پذیرفت(شکل ۷).

شکل ۷:آداپتاسیون پست لاروهای میگوی سفید غربی

در این مطالعه از ۱۴ عدد تانک ۳۰۰ لیتری جهت ذخیره سازی و تیمار بندی میگوهای آزمایش استفاده شد ودر هر تانک ۳۰۰ لیتری ۱۰۰۰ قطعه پست لارو ۱۲ روزه میگوی سفید غربی ذخیره سازی گردید که پس از ذخیره سازی بمنظور جلوگیری از ایجاد استرس، پست لاروها به مدت ۸ ساعت پرهیز غذایی شدند (شکل ۸).

شکل ۸: تانک های ۳۰۰ لیتری جهت ذخیره سازی پست لاروهای تیمار های مختلف

۹-۲-تیمار بندی میگو مطالعه

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
		PL ۴۰-۶۰	B	تیمار آزمایشی
		PL۶۰	C	تیمار آزمایشی
	۱۲ -۲۶	بدون مواجهه	D	تیمار آزمایشی
		PL ۴۰-۶۰	E	تیمار آزمایشی
		PL۶۰	F	تیمار آزمایشی
غیر واکسینه	۵ -۱۵	بدون مواجهه	G	کنترل منفی
		PL ۴۰-۶۰	H	کنترل مثبت
		PL۶۰	I	کنترل مثبت
	۱۲ -۲۶	PL ۴۰-۶۰	J	کنترل مثبت
		PL۶۰	K	کنترل مثبت

۱۰-۲-تغذیه و نگهداری پست لاروهای تیمارهای مختلف مطالعه

در این مطالعه تغذیه پست لاروهادر ماه اول در سه وعده غذای در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴ صورت گرفت. بدین صورت که در ساعات ۸ و ۲۴ از غذای کنسانتره شماره ۴۰۰۱ غذای میگو شرکت هوووررراش به میزان ۱ گرم به ازای هر ۱۰۰۰ قطعه پست لارو و در ساعت ۱۶ از ناپلی آرتمیای تازه هچ شده جهت تغذیه پست لاروها استفاده شد. شایان ذکر است که در هنگام غذادهی بمنظور سهولت در دسترسی پست لاروها به غذا، هوادهی تانک ها به مدت تنها ۳۰ دقیقه قطع شد.

همچنین در هر وعده باقیمانده غذایی و فضولات موجود در کف تانک های پرورش بصورت یک روز در میان با استفاده از شلنگ های جداگانه سیفون و از تانک ها خارج می گردید. برای این کار ابتدا با ایجاد یک جریان دورانی ملایم در آب تانک، پس از جمع نمودنباقیمانده غذا و فضولات پست لارو ها در وسط تانک و سیفون نمودن آنها توسط شلنگ آکواریوم به درون تشت، پس از حصول اطمینان از عدم وجود پست لارو، آب سیفون شده موجود در تشت با رعایت موارد ایمنی زیستی حذف گردید. بمنظور تعویض آب تانک های ۳۰۰ لیتری پرورش پست لاروها روش کار بدین صورت بود که در ماه اول پرورش هر پنج روز یکبار تعویض آب تانک ها به میزان یک سوم حجم آب موجود در تانک صورت می گرفت. بمنظور تخلیه آب بااستفاده از یک شلنگ یک اینچ که ورودی آن توسط یک تور با چشمه ۵۰۰ میکرون بسته شده بود، حداکثر یک سوم آب تانک تخلیه و سپس با استفاده از یک پمپ کف کش یک اینچ آب ذخیره سازی شده در تانک های ۲۰۰۰ لیتری به آرامی به تانک های ۳۰۰ لیتری افزوده شد.

در ادامهٔ دورهٔ پرورش همزمان با رشد و بزرگتر شدن پست لاروه، اندازه، حجم و تعداد دفعات غذادهی افزایش یافت. به گونه ای که در ماههای دوم و سوم دفعات غذادهی از سه وعده به چهار وعده تغییر یافت. بدین صورت که در ساعت ۶، ۱۸ و ۲۴ از غذای کنسانتره ۴۰۰۲ شرکت هوورراش و در ساعت ۱۲ ناپلی آرتمیا تازه شکوفا شده استفاده شد. گفتنی است که میزان غذای کنسانتره ی استفاده شده در روز در هر تانک از یک گرم در ماه اول به دو گرم در ماه دوم و سه گرم در ماه سوم افزایش یافت. از سوی دیگر در ماه های دوم و سوم بدلیل افزایش میزان غذادهی، سیفون کردن بصورت روزانه و تعویض آب نیز هر سه روز یک بار صورت پذیرفت. ضمناً 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 با رعایت اصول ایمنی زیستی بصورت جداگانه در نظر گرفته شده بود.

۱۱-۲-شکوفا نمودن سیست آرتمیا

در این مطالعه از سیست آرتمیا فرانسیکانا استفاده شد لذا با توجه به اینکه در طول دوره مطالعه روزانه حداقل از یک وعده ناپلی آرتمیا جهت تغذیه پست لاروها استفاده می 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 سیست های آرتیما با قطع هواده و پوشاندن سطح ظروف ۲ لیتریهمزمان با شناور شدن پوسته های سیست آرتمیا با استفاده از جذب نوری، ناپلی های تازه شکوفا شده آرتمیا با استفاده از شلنگ آکواریومی صید و مورد تغذیه پست لاروها قرار می گرفت (پذیر و همکاران، ۱۳۸۸؛ Edwards, 2000).

۱۲-۲- واکسیناسیون پست لاروهای میگو با رادیوواکسن به روش غوطه وری

در این مطالعه به منظور واکسیناسیون پست لاروها به روش غوطه وری توسط محلول رادیوواکسن از پست لاروهای میگو ۵ تا ۲۶ روزه استفاده شد. واکسیناسیون در دو دز با فاصله ۱۰ الی ۱۴ روز صورت پذیرفت (شکل ۹). بمنظور تجویز واکسن در ابتدا حجم آب تانک ها را تا حداقل ممکن کاهش داده سپس ۴۰ تا ۵۰ میلی لیتر از رادیو واکسن تهیه شده جهت واکسناسیون ۱۰۰۰ قطعه پست لارو مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱۰). 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 $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر بود (Choi *et al*., 2011).

از این رو براساس جدول مربوط به تیمار های مطالعه واکسیناسیون پست لاروها براساس روش فوق در در زمانهای مشخص انجام شد، همچنین مواجهه با ویروس زنده نیز طبق همان برنامه در زمانهای مشخص انجام گردید. ضمناً تعداد تلفات روزانه دوبار شمارش و جمع آوری می شد (Witteveldt *et al*., 2002a).

شکل ۹: دوز های مختلف واکس ویروس لکه سفید غیر فعال شده

شکل ۱۰: واکسیناسیون پست لاروها بصورت غوطه وری

۱۳-۲- نمونه گیری از گروههای میگو جهت انجام آزمون های بیومتری

جهت آزمون های بیومتری در طول دوره آزمایش سه بار از پست لاروهای ۱۵-۵ و پست لاروهای ۲۴-۱۲ روزه واکسینه و غیر واکسینه در سنین ۴۰، ۶۰ و ۸۰ روزگی از هر تیمار و تکرارهای مربوط به آن تعداد ۱۰ قطعه میگو بصورت تصادفی انتخاب و بعد از سنجش وزن و طول مجدداً به تانک های مربوط به خود بازگردانده شدند (Witteveldt *et al*., 2002b).

شکل ۱۱: سنجش وزن و طول پست لاروهای تیمارهای مختلف

۱۴-۲- تعیین درصد بقاء نسبی میگوهای ایمن سازی شده پس از مواجهه با ویروس زنده

در این مطالعه بعد از واکسیناسیون تیمارهای مختلف در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی به پست لاروهای مربوط به تیمارهای مواجهه ۱۰۰ میلی لیتر ویروس زنده افزوده شد که بعد از ثبت روزانه تعداد پست لاروهای تلف شده در طول دوره ایمنی،مقادیر مربوط به درصد بازماندگی، درصد تلفات نسبی و درصد بازماندگی نسبی محاسبه گردید (معادلات ۲، ۳ و ۴).

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

معادله ۲: تعیین درصد بازماندگی پست لاروهای تیمارهای مختلف

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

معادله ۳: تعیین تلفات نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف

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

معادله ۴: تعیین درصد بازماندگی نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف

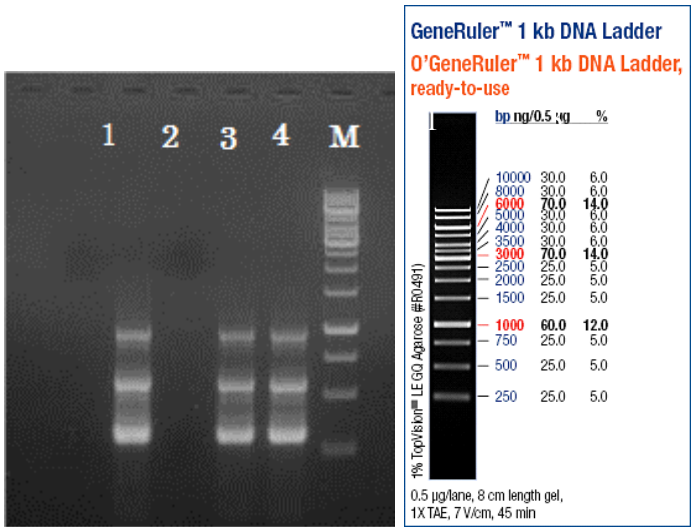
۱۵-۲- آنالیز آماری داده ها

در پایان داده های حاصل از میانگین وزن و طول، درصد بازماندگی، درصدتلفات نسبی و درصد بازماندگی نسبی با استفاده از نرم افزار EXCEL 2007 و نرم افزار آماری SPSS از طریق آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA آزمون Tukey`sو آنالیز آماری T-Testبا سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

۳- نتایج

۳-۱-تأیید آلودگی ذخائر ویروس لکه سفید

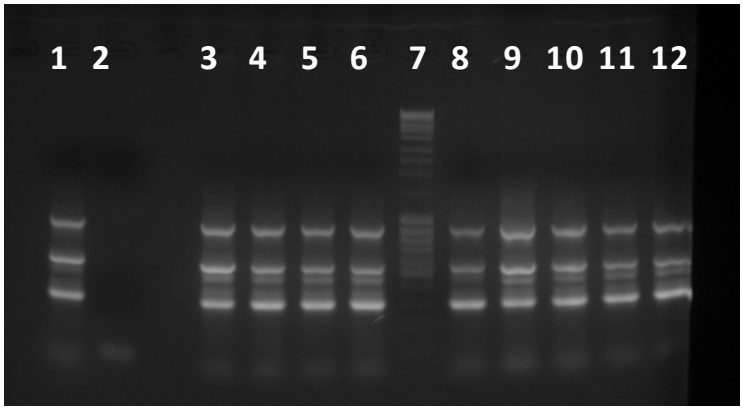
نتایج حاصل از آزمون Nested PCR نشان داد که میگوهایی که به عنوان ذخائر ویروس لکه سفید جهت ایجاد آلودگی تجربی در خرچنگ های دراز آب شیرین در نظر گرفته شده بودند از آلودگی شدیدی برخوردار بودند (شکل ۱۲).



شکل ۱۲: 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 ٥)

۳-۲-تأیید آلودگی خرچنگ های آب شیرین

نتایج حاصل از آزمون Nested PCR تأئید کننده آلودگی نمونه های همولنف و بافت خرچنگ های دراز آب شیرین آلوده شده با ذخیره ویروس لکه سفید بود (شکل ۱۳).



شکل ۱۳: نتیجه Nested PCR مربوط به بافت و همولنف خرچنگهای آلوده شده با ذخیره ویروسی کنترل مثبت (۱)، کنترل منفی (۲)، بافت خرچنگهای آلوده شده با ذخیره ویروسی (۳، ٤، ٥ و ٦)، مارکر DNA(۷)، همولنف خرچنگهای آلوده شده با ذخیره ویروسی (۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲)

۳-۳- تعیین تیتر ویروس

برای تعیین تیتر ویروس از روش تعیین Lethal Dose$_{50}$ (LD_{50}) طبق پروتکل Van Hulten (2001b) استفاده گردید. در این مطالعه با استفاده از فرمول کربر،تیتر ویروسی محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۲: تلفات پست لاروهای مواجهه شده با ویروس پرتوتابی نشده در رقت های مختلف(دز صفر)

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

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده شد که در هر میلی لیتر $۱۰^{۵/۴}$ ویروس وجود دارد.

٤-۳- تعیین رقت ویروس پرتوتابی شده

با توجه به رقت ها ۱، $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$حاصل از سوسپانسیون ویروس (همولنف حاوی ویروس لکه سفید) پرتوتابی شده در دز اپتیمم ۱۵ کیلوگری و با توجه به عدم وجود تلفات در تمامی رقت های فوق براساس فرمول کربر مشاهده شد که مناسبترین دز پرتو جهت غیرفعال نمودن ویروس لکه سفد دز ۱۵ کیلوگری می باشد (جدول ۳).

جدول ۳: تلفات پست لاروهای مواجهه شده با ویروس پرتوتابی شده در رقت های مختلف (دز ۲۰ کیلوگری گاما)

Proportion (P)	تعدادکل/تلفات	تلفات	تعداد کل	رقت
۰	۰/۱۲	۰	۱۲	۱
۰	۰/۱۲	۰	۱۲	۱۰-۱
۰	۰/۱۲	۰	۱۲	۱۰-۲
۰	۰/۱۲	۰	۱۲	۱۰-۳

۵-۳- نتیجه آزمون بی ضرری

به دنبال تلقیح ویروس غیرفعال شده توسط پرتو گاما همراه با ایمونوژن (GI)، پرتو گاما بدون ایمونوژن (GWI) و پرتو گاما همراه با باکتری ویبریو غیرفعال (GB) به میگوهای گروه کنترل هیچگونه تلفاتی در طی ۱۴ روز مطالعه مشاهده نشد، ضمناً یاد آور می شود که نتایج حاصل از آزمون Nested PCR کلیه نمونه ها منفی بود (جدول ۴).

جدول ٤: تلفات پست لاروهای واکسینه 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 ایمونوژن

GWI: واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما بدون ایمونوژن

GB: واکسن غیرفعال شده با پرتو گاما همراه با باکتری ویبریو غیرفعال

٦-۳- تعیین مقادیر مربوط به شاخص های رشد در تیمارهای مختلف

میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵–۵ روزه واکسینه شده در روز ۴۰ 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 Aبود، 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 Aبود ($P<0.05$). 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 ۵).

میانگین وزن و طول پست لاروهای ۲۶ – ۱۲ روزه واکسینه شده در روز ۴۰ 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 ۵).

جدول ۵: 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 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)	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}

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 ۶).

میانگین وزن و طول پست لاروهای ٢٦ – ۱۲ روزه غیر واکسینه شده در روز ٤٠ پرورش

نتایج نشان داد که میانگین وزنی و طولی میگوهای تیمار J بطور معنی داری بیشتر از میگوهای تیمار K می باشد ($P<0.05$) (جدول ۶).

جدول ٦: 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 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}

میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵ – ۵ 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 ($P>0.05$) (جدول ۷).

میانگین وزن و طول پست لاروهای ٢٦ – ۱۲ روزه واکسینه شده در روز ٦٠ پرورش

نتایج نشان داد که علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول میگوهای تیمار D نسبت به میگوهای تیمار E و F هیچگونه تفاوت معنی داری میان میگوهای تیمار وجود نداشت ($P>0.05$) (جدول ۷).

جدول ۷: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای واکسینه شده با ویروس غیرفعال شده لکه سفید تیمارهای مختلف مواجهه 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 آزمایشی	واکسینه					
سن پست لارو	۵ -۱۵			۱۲ -۲۶		
تیمار	بدون مواجهه(A)	(B) PL ۴۰-۶۰	(C) PL۶۰	بدون مواجهه (D)	۴۰ -۶۰ (E)PL	(F) PL۶۰
وزن (گرم)	۱/۳۸±۰/۱۹^{b}	۱/۸۳±۰/۱۴^{a}	۱/۳۶±۰/۰۹^{b}	۱/۶۹±۰/۱۱^{a}	۱/۳۶±۰/۰۶^{a}	۱/۴۲±۰/۱۱^{a}
طول (میلیمتر)	۲۴/۶۵±۱/۲۸^{a}	۲۹/۳۰±۲/۳۲^{a}	۲۷/۲۰±۱/۲۳^{a}	۲۸/۵۰±۱/۳۰^{a}	۲۷/۱۰±۱/۱۸^{a}	۲۷/۹۰±۱/۲۹^{a}

میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵ – ۵ روزه غیر واکسینه شده در روز ٦۰ 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 ۸).

میانگین وزن و طول پست لاروهای ۲٦ – ۱۲ روزه غیر واکسینه شده در روز ٦۰ پرورش

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 ۸).

جدول ۸: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای غیر واکسینه شده در روز ٦۰ 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	۱۵ – ۵		۲۶ – ۱۲		
تیمار	بدون مواجهه(G)	(H) PL۴۰ –۶۰	(I) PL۶۰	(J) PL۴۰ –۶۰	(K) PL۶۰
وزن (گرم)	۱/۴۱±۰/۰۹[a]	۱/۴۸±۰/۰۹[a]	۱/۵۲±۰/۰۸[a]	۱/۶۱±۰/۰۸[b]	۲/۲۴±۰/۱۱[a]
طول (میلیمتر)	۲۶/۹۵±۱/۰۳[a]	۲۷/۸۰±۱/۸۷[a]	۲۷/۸۰±۲/۱۷[a]	۲۹/۰۰±۱/۵۵[b]	۳۱/۶۰±۱/۷۵[a]

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

نتایج حاکی 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 تیمار 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 مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۹).

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 ۹).

جدول ۹: 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)	۴۰ -۶۰ (E)PL	(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}

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 I می 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 Hنسبت میگوهای تیمار G و I هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$)(جدول ۱۰).

میانگین وزن و طول پست لاروهای ۲۶ – 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 ۱۰).

جدول ۱۰: 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}	

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 ($P<0.05$) (جدول ۱۱).

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 زوز 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 ($P<0.05$).
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 ۱۱).

جدول ۱۱: 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
۴۰-۶۰ PL	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}

میانگین وزن و طول پست لاروهای واکسینه شده در روزهای مختلف پرورش

نتایج حاکی از این مطلب بود که در روز ۴۰ پرورش هیچگونه اختلاف معنی داری میان میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P>0.05$)،از سوی دیگر در روز ۶۰ پرورش تنها در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه میگوهای تیمار مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سن ۶۰ روزگی مقادیر میانگین وزنی بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه بود ($P<0.05$). در ادامه مشاهده شد که در انتهای مطالعه در روز ۸۰ پرورش تنها مقادیر مربوط به میانگین وزن پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه میگوهای تیمار مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روزگی بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه می باشد ($P<0.05$). این در حالی بود که علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزنی و طولی پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه سایر میگوهای تیمار در مقایسه با پست لاروهای ۱۵-۵ روزه هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۱۲).

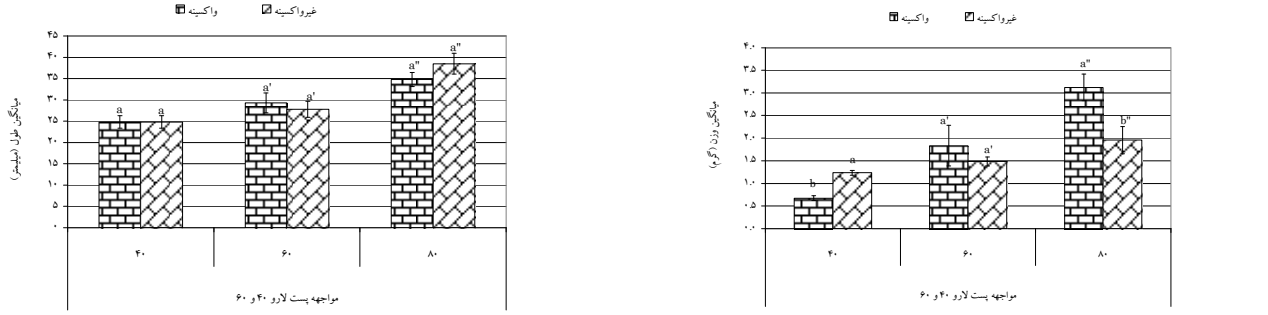
جدول ۱۲: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه غیر واکسینه تیمارهای مختلف مواجهه در روزهای مختلف پرورش (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

غیر واکسینه							
	روز پرورش	۴۰		۶۰		۸۰	
تیمار	سن پست لارو	۱۵ – ۵	۲۶ –۱۲	۱۵ – ۵	۲۶ –۱۲	۱۵ – ۵	۲۶ –۱۲
۶۰-۴۰ PL	وزن (گرم)	۱/۲۳±۰/۰۵^{a}	۱/۲۴±۰/۰۸^{a}	۱/۴۸±۰/۰۹^{a}	۱/۶۱±۰/۰۸^{a}	۲/۹۵±۰/۳۰^{b}	۳/۹۳±۰/۱۰^{a}
	طول (میلیمتر)	۲۴/۸۰±۱/۴۷^{a}	۲۵/۶۰±۱/۰۱^{a}	۲۷/۸۰±۱/۸۷^{a}	۲۹/۰۰±۱/۵۵^{a}	۳۴/۷۰±۲/۶۹^{a}	۳۸/۵۰±۲/۴۴^{a}
PL۶۰	وزن (گرم)	۰/۷۰±۰/۴۲^{a}	۰/۷۲±۰/۰۹^{a}	۱/۵۲±۰/۰۸^{b}	۲/۲۴±۰/۱۱^{a}	۱/۵۹±۰/۱۱^{a}	۲/۷۹±۰/۱۷^{a}
	طول (میلیمتر)	۲۱/۵۰±۱/۲۱^{a}	۲۰/۲۰±۲/۱۸^{a}	۲۷/۸۰±۲/۱۷^{a}	۳۱/۶۰±۱/۷۵^{a}	۳۲/۸۰±۱/۷۲^{a}	۳۳/۲۰±۱/۳۱^{a}

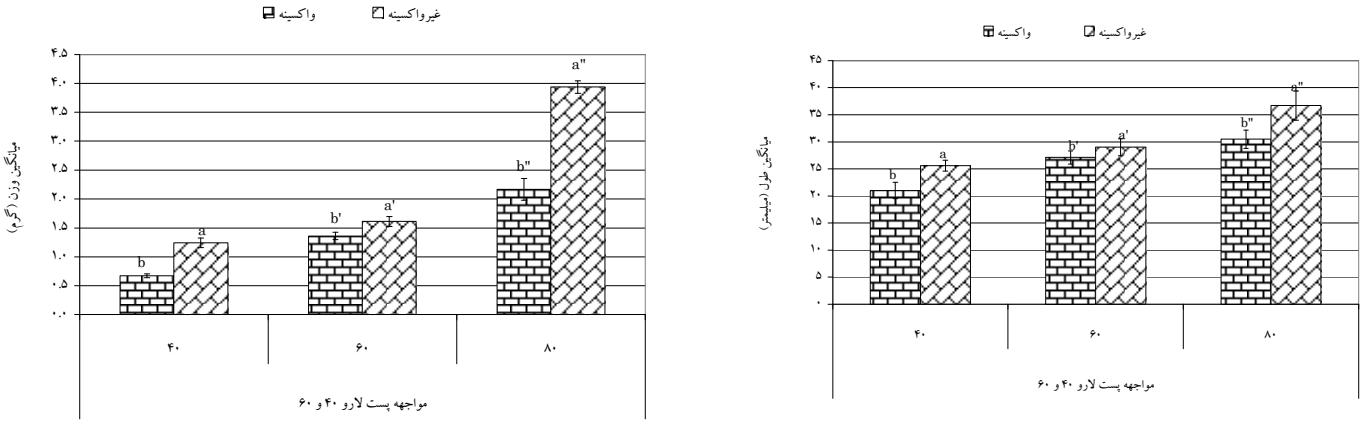
۷-۳- مقایسه میانگین وزن و طول پست لاروهای واکسینه و غیر واکسینه تیمارهای مختلف

پست لاروهای تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روز (PL۴۰-۶۰)

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 ۱ و۲).



نمودار ۱: 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 دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

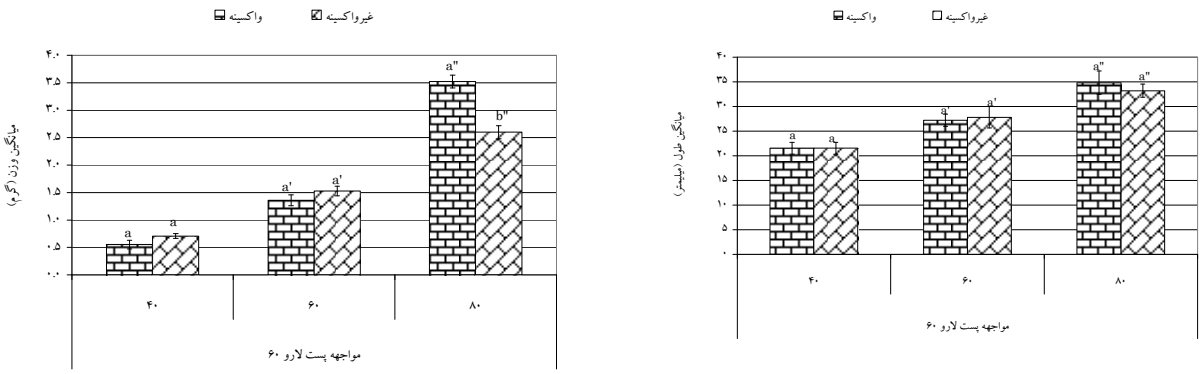


نمودار ۲: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ٢٦-١٢ روزه واکسینه و غیرواکسینه مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

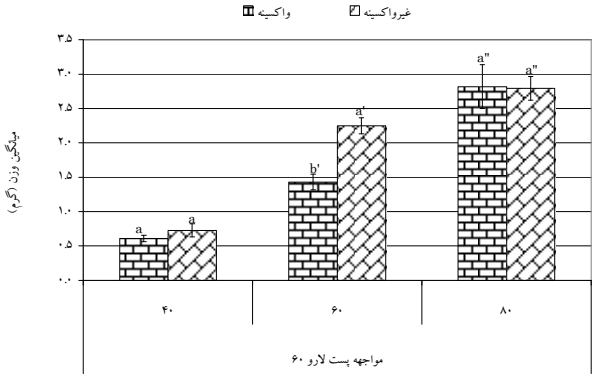
پست لاروهای تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سن ٦٠ روز (PL٦٠)

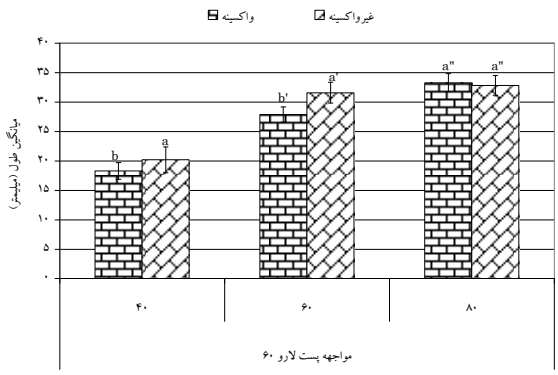
نتایج حاکی از این مطلب بود که علیرغم بیشتر بودن مقادیر مربوط به میانگین وزن و طول پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه میگوهای غیر واکسینه نسبت به میگوهای واکسینه در روز ۴۰ پرورش هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P<0.05$). در ادامه مشاهده شد که در روز ۶۰ پرورش تنها در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه میانگین 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 ($P>0.05$) (نمودار ۳ و ۴).



نمودار ۳: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه و غیرواکسینه مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سن ٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

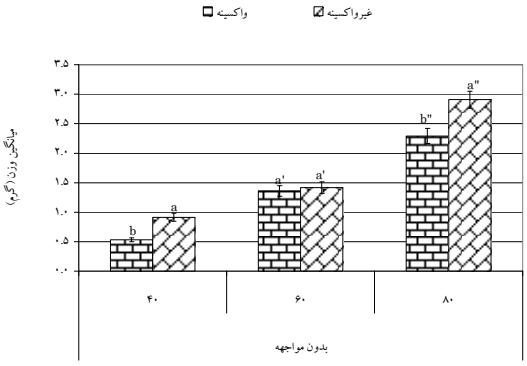


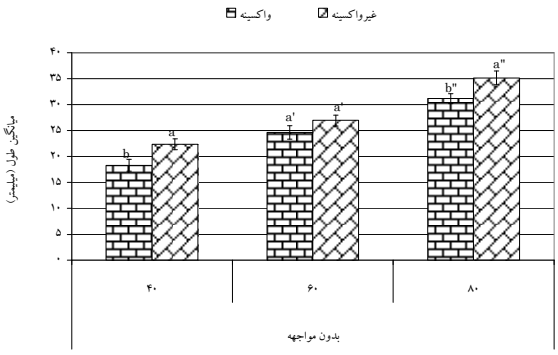


نمودار ٤: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ٢٦-١٢ روزه واکسینه و غیرواکسینه مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سن٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

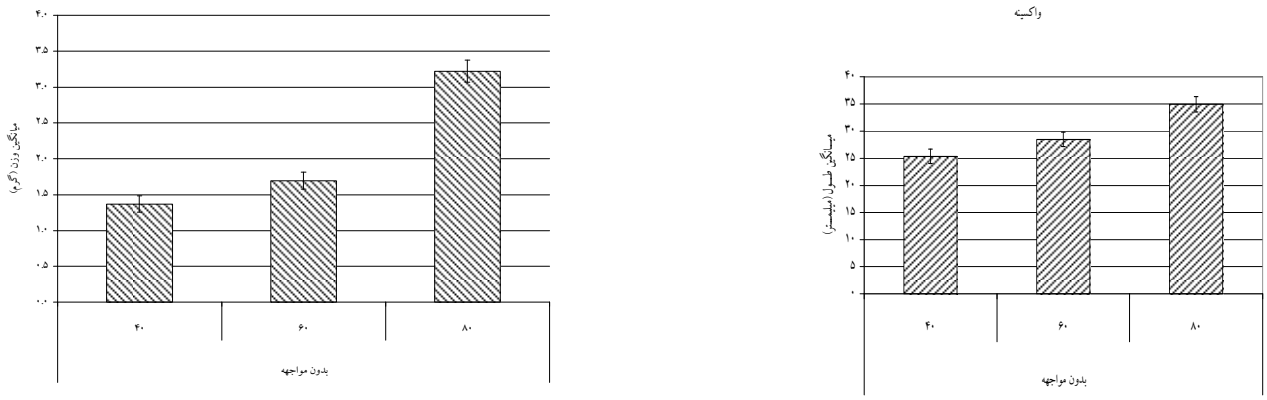
پست لاروهای تیمار بدون مواجهه با ویروس لکه سفید

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 ($P<0.05$) (جدول ۵ و ۶).





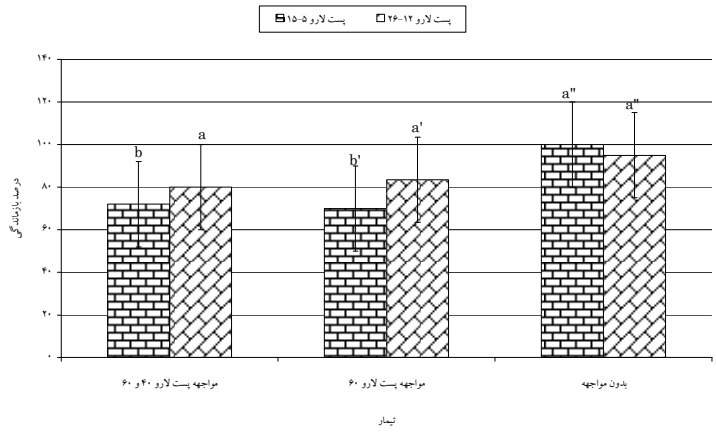
نمودار ٥: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ١٥-٥ بدون مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است).



نمودار ٦: میانگین وزن و طول (میانگین±میانگین انحراف معیار) پست لاروهای ٢٦-١٢ بدون مواجهه شده با ویروس لکه سفید در سن ٦٠ روزگی روزهای مختلف پرورش (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

۸-۳- میزان درصد بازماندگی پست لاروهای ۱۵-۵ و ٢٦-١٢

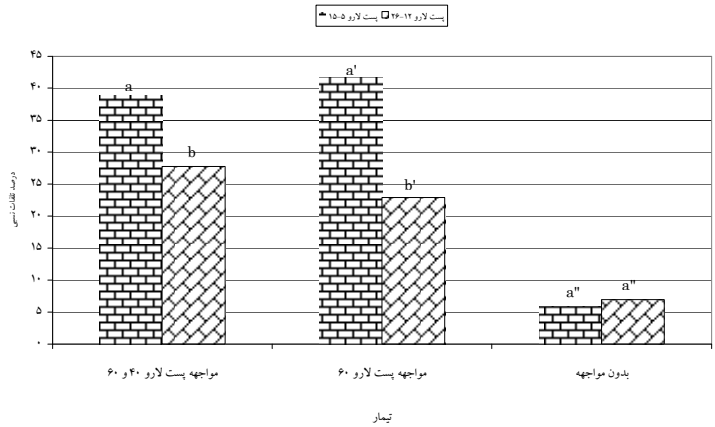
نتایج نشان داد که درصد بازماندگی در پست لاروهای ۲۶-۱۲ روزه در هر تیمارهای مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ روز و سن ۶۰روزگی بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای ۱۵-۵ روزه واکسینه شده بود ($P<0.05$). این در حالی بود که علارغم بیشتر بودن درصد بازماندگی در پست لاروهای ۱۵-۵ روزه تیمار بدون مواجهه هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۷).



نمودار ۷: درصد بازماندگی پست لاروهای تیمارهای مختلف مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی و سن ٦٠ و بدون مواجهه (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

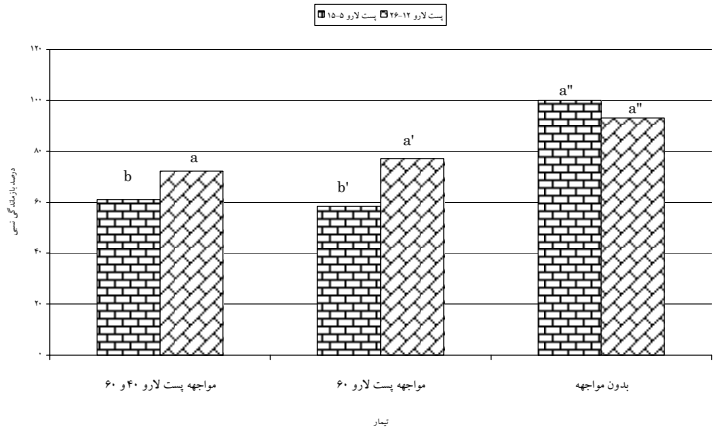
همچنین در رابطه با درصد تلفات نسبی مشاهده شد که درصد تلفات نسبی بطور معنی داری در پست لاروهای ۱۵-۵ میگوهای تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ۴۰ و ۶۰ و سن ۶۰ روز بیشتر از پست لاروهای ۲۶-

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 ($P>0.05$) (نمودار ۸).



نمودار ۸: درصد تلفات نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی و سن ٦٠ و بدون مواجهه (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد 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 ($P>0.05$) (نمودار ۹).



نمودار ۹: درصد بازماندگی نسبی پست لاروهای تیمارهای مختلف مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین ٤٠ و ٦٠ روزگی و سن ٦٠ و بدون مواجهه

٤-بحث

امروزه بی مهرگان بیش از ۹۵ درصد گونه های جانوری را تشکیل می دهند، لذا سیستم دفاع ایمنی آنها فاقد ایمنی اکتسابی بوده و سیستم ایمنی آنها 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 کهبا 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. چونکه در مهره داران با تولید پروتئینی به نام آنتی بادی باعث ایجاد ایمنی خاطره در خود می شودند، در صورتی که در بی مهرگانتعدادی ازپروتئین ها همانند پروتئین های ساختاری برخی از ویروس ها قادرندایمنی خاطره ای ایجاد کنند (Kurtz & Franz, 2003; Kurtz, 2005).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 بمنظور مقابله با این بیماری غیر ممکن نیست (Lundin, 1996). از جمله این راهکارها واکسیناسیون میگوها بر علیه عوامل بیماریزای ویروسی بمنظور کنترل این عوامل می باشد (Witteveldt *et al*., 2005). لیکن امروزه برای تهیه واکسن های مورد استفاده در آبزیان از روش های مختلفی از جمله روش های شیمیایی و فیزیکی استفاده می شود (Alabi *et al*., 1999; Witteveldt *et al*., 2004). لیکن با این فرض که سیستم ایمنی میگوها قادرند پروتئین های ساختاری عوامل بیماریزای ویروسی را شناساییمود و در برابر آنها واکنش نشان دهند (Sloan *et al*., 1975; Shih *et al*., 2001)، از واکنسن های حاوی ویروس های غیرفعال شده در این مطالعه استفاده شد. لذا مشاهده شد که 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 بطور معنی داریکاهشیافت. 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 بطور 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 لاروهای 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 خونیهدایت 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 لاورهای 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 معنی داری 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 Venegasو همکاران (۲۰۰۰) و Wuو 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 سن۶۰ روزگی خواهند شد. همچنین نتایج نشان داد که میزان رشد و بازماندگی پست لاروهای ۱۵-۵ و ۲۶-۱۲ روزه واکسینه شده کهتنها در سن ۶۰ روزگی با ویروس لکه سفید مواجهه شده بودند نسبت به پست لاروهای غیرواکسینه بیشتر بود.از این رو می توان اینچنین 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 لاروهای۱۵-۵ روزه واکسینه شده که با ویروس مواجهه نشده بودند بطور معنی داری بیشتر از پست لاروهای غیرواکسینه بود.لیکن اینچنین می توان عنوان نمود که واکسیناسیون میگوها باویروس غیر فعال شده لکه سفید علاوه بر اینکه می تواند موجب افزایش مقاومت و بازماندگی در میگوها گرددقادر 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 Choiو همکاران (۲۰۱۱)،با واکسیناسیون میگوهای سفید غربی با استفاده از پروتئین هایrVP28 وrVP19ویروس لکه سفید کهبصورت خوراکی در رقت $۱۰^{۲} \times ۲$ تجویز شده بودعنوان 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 پروتئینrVP19بیشتر 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 (Sanchez, 2010; 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; Ha *et al*., 2008).

Witteveldtو همکاران (۲۰۰۲a) عنوان نمودند که به دنبال واکسیناسیون میگوها توسط پروتئین های نوترکیبMBP-VP19و HIS-VP28علاوه بر تأخیر در ابتلا میگوها به بیماری یک کاهش محسوسدر 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 روبا توجه به اینکه از یک سودر پست لاروهای واکسینه شده ۲۶-۱۲ روزه تیمار مواجهه با ویروس لکه سفید در سنین۴۰ 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.

منابع

۱ افشار نسب ، م. ۱۳۸۶. بیماریهای ویروسی میگوهای خانواده پنائیده. وزارت جهاد سازندگی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۰ صفحه

۲ پذیر، م. خ. افشار نسب، م. جلالی جعفری، ب. مطلبی، ع. و شریف پور، ع. ۱۳۸۹. شناسایی بیماریهای ویروسی میگوی سفید غربی در ایران با تأکید بر پیشگیری از بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از عصاره جلبکهای دریایی. پایان نامه دوره دکتری تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. صفحات ۶۴ تا ۶۸ .

۳ پذیر، م.خ. و زرشناس، غ. ۱۳۸۶. معرفی و انتقال میگوی سفید غربی و میگوی آبی به آسیا و اقیانوسیه. موسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحات ۲۹ تا ۱۱۵ .

۴ پذیر، م.خ.، مهرابی، م. ر.، فقیه، غ.، زنده بودی، ع.، دلیرپور، غ.، غریبی، ق. ۱۳۸۸.بررسی تأثیر آرتیمای غنی شده با اسید های چرب غیر اشباع بر شاخص تولید مثل و مقایسه آن با روش مرسوم (استفاده از کرم دریایی) در میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). گزارش نهائی پروژه، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۱ص.

5 Adams, W.R., and Pollard, E., 1952. Combined thermal and primary ionization effects on a bacterial virus. *Arch. Biochem. Biophys*. 36: 311-22.

6 Alabi, A. O., Jones, D. A. and Latchford, J. W. 1999. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicuslarvae* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 178, 1-11.

7 Acharya, S., Mohanty, J. and Sahoo, P. K. 2004. `Humoral defence factors in Indian river prawn, Macrobrachium malcolmsonii '. Fish & Shellsh Immunology. 17, 137{147.

8 Bahnemann, H.G., 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*. 8: 299-303

9 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.

10 Burton, D. R., Williamson, R. A., and Parren, P. W. H. I. 2000. Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology*. 270, 1-3.

11 Campbell, C.H., Barber, T.L., Knudsen, R.C. and Swaney, L.M., 1985. Immune response of mice and sheep to bluetongue virus inactivated by gamma irradiation. *Prog Clin Biol Res.* 1985;178:639-47.

12 Choi, M. R. Kim, Y. J., Jang, J. S. and Kim, S. K. 2011.Transcriptional Analysis for Oral Vaccination of Recombinant Viral Proteins against White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei. J. Microbiol. Biotechnol*. 21(2), 170–175.

13 Crander, R., Rajmane, B.V. and Thomas, P., 1997. Control of *Salmonella in poultry by Radiovaccine*. *Journal of Food Safety*, 17(4): 215–294.

14 Edwards, P. 2000. Aquaculture, poverty and livelihoods. Natural Resource Perspectives, Overseas development institute. 56.

15 Escobedo-Bonilla,C.M., Wille, M., Alday Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B. and Nauwynck, H.J., 2005. In vivo titration of white spot syndrome virus (*WSSV*) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66: 163-170.

16 FAO. 2013. Fishery and Aquaculture Statistics. Global capture production 1950-2011 (FishstatJ).*In*: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online or CD-ROM]. Rome. Updated 2013. http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en

17 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.

18 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.

19 Gudding R., Lillehaug, A. and Evensen, O., 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72: 203-212.
20 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
21 Húsgard, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B.K., Rødseth, O.M. and Biering, E., 2001. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot Scophthalmus maximus and Atlantic halibut Hippoglossus hippoglossus, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Org*. 45, 33– 44.
22 Jiravanichpaisal, P., Bangyeekhun, E., Soderholl, K., Soderholl, I., 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47: 151-157.
23 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.
24 Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, S.O., Yang, S.Y., Kim, J.W., 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from *WSSV*. *Aquaculture*, 237: 21-30.
25 Kimbrell, D.A. & Beutler, B., 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*; 2, 256–67.
26 Kurtz, J. and Franz, K.2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*. 425, 37-38.
27 Kurtz, J. 2005. Specific memorywithin innate immune systems. *Trends Immuno.* l26,186-192
28 Kyvsgaard, N.C., Lind, P., Preuss, T., Kamstrup, S., Lei J.C., Bogh, H.O., and Nansen, P. 1996. Activity of antibody against Salmonella Dublin, Toxoplasma gondii, or Actinobacillus pleuropneumoniae in Sera after treatment with electron beam irradiation or binary ethylenimine. Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology p. 628-634.
29 Leong, J.C. and Fryer, J.L., 1993. Viral vaccines for aquaculture. *Annu.* Rev. Fish Dis. 3, 225– 240.
30 Lightner, D.V. 2003. Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program 1-116 in C.-S. Lee and P.J. O'Bryen, editors. Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1-116.
31 Lightner, D. V., 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. *World Aquaculture Society*, Press, Baton Rouge. Section 3.11.
32 Lombardo, J.H. and Smolko, E.E. 1990. Biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 Ci. *Radiat Phys Chem*. 35(4–6):585–589.
33 Lorenzen, N. and Olesen, N.J., 1997. Immunization with viral antigens: viral haemorrhagic septicaemia. *In*: Gudding, R., Lillehanug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F. (Eds.), *Fish Vaccinology. Karger, Basel*, pp. 201–209.
34 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.
35 Lundin, G. G. 1996. Global attempts to address shrimp disease. Marine/Environmental paper No. 4 Lard, water and Natural habitats Division. Environment Department. The World Bank Report, pp. 45.
36 Mavichak, R., Kondo, H., Hirono, I. and Aoki, T. 2011. The utilization of VP28 gene to protect penaeid shrimps from white spot syndrome virus disease a review, pp. 157-170. *In* BondadReantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. and Aoki, T. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 385 pp.
37 Morton, R., TRIBBLE, H.R. and LEONARD G., 1970. Gamma- Irradiated Venezuelan Equine Encephalitis Vaccines. Applied Microbiol: 19(5): 763-767.
38 Motamedi Sedeh, F., Khorasani, A., Shafaee, K., Fatolahi, H. and Arbabi K., 2008. Preparation of FMD type A87/IRN inactivated Vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig. *Indian J Microbio*:48: 51-60.
39 Namikoshi, A. Wu, J.L. Yamashita, T. Nishizawa, T. Nishioka, T. Arimoto M. and Muroka K. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 229:25-35
40 Powell, A., Pope, E.C., Eddy, F.E., Roberts, E.C., Shields, R.J., Francis, M.J., Smith, P., Topps, S., Reid, J. and Rowley, A.F., 2011. Enhanced immune defences in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, 95–99.

41 Pruder, G.D., Brown, C.L., Sweeney, J.N., Carr, W.H., 1995. High health shrimp systems: seed supply-theory and practice. *In*: Swimming Through Troubled WatersC.L. Browdy and J.S. Hopkins, Editors, Proceedings of the special session on shrimp farming, 1-4 February, San Diego, CA, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 40-52.
42 Rajesh, Kumar S., Ishaq Ahamed, V.P., Sarathi, M., Nazeer Basha, A. and Sahul Hameed, A.S., 2008. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (*WSSV*). *Fish & Shellfish Immunology*, 24: 467-478
43 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.
44 Salehi h., 2010. The economic impacts of *WSSV* on shrimp farming production and export in Iran. *Aquatic animal health* 15, 29-31.
45 Sanchez, P. A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res*. 41:43.
46 Shafaee, S.K., Aram, A.J. and Motamedi, Sedeh F., 2004. preparation of salmonella typhimurium killed vaccine by gamma irradiation. The fourth international Iran and Russia Conference. Agriculture and natural Resources. Shahrekord Uiversity, Iran.
47 Shi, Z., Huang, C., Zhang, J., Chen, D. and Bonami, J. R. 2000). White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, Cherax quadricarinatus. *J Fish Diseases*. 23, 285-288
48 Shih, H. H., Wang, C. S., Tan, L. F. and Chen, S.N. 2001. Characterization and application of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus. *J Fish Dis*. 24, 143-150
49 Sloan, B., Yocum, C., and Clem, L. W. 1975. Recognition of self from non-self in crustaceans. Nature. 258: 521-523.
50 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 Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 236: 249-253.
51 Söderhäll, K. and Thornqvist, P.O. 1997. Crustacean immunity A short review. *In*: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ and Brown F (eds.), *Fish Vaccinology*, Karger, Basel, pp. 45–51.
52 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.
53 Tapay, L.M., Nadala , J.r, E.C.B. and Loh, P.C., 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. *Journal of Virological Methods*, 82: 39-43.
54 Trujillo R. and Dugan, V.L., 1972. Synergistic inactivation of viruses by heat and ionizing radiation. *Biophysical Journal*, 12: 92-113.
55 Van Hulten, M.C.W., Tsai, M.-F., Schipper, C.A., Lo, C-F., Kou, G-H., Vlak, J.M., 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. J*ournal of General Virology*, 81.
56 Vaseeharan, B, Jayakumar, R and Ramasamy, P. 2003. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Lett Appl Microbiol*.37, 443-447.
57 Venegas, C. A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T. and Muroga, K. 2000. Quasi-immune response of Penaeus japonicus to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). Dis Aquat Org 42,83-89.
58 Witteveldt J. 2006. On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus. Thesis Wageningen University ñ with references ñ with summary in Dutch ISBN: 90-8504-331-X
59 Witteveldt, J., Vermeesch, A.M.G., Langenhof, M., deLang, A., Vlak, J.M. and Van Hulten, M.C.W., 2005.Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. *Archives of Virology*, 150: 1121-1133.
60 Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M. and Van Hulten, M. C. W. 2004. Protection of *Penaeus monodonagainst* white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol*. 78: 2057-61.
61 Witteveldt, J., Jolink, M., Espita Cifuentes, C., M. Vlak, J. and Van Hulten M. C. W. 2002a. Vaccination Of *Penaeus Monodonby* Injection Of Wssvstructural Virion Proteins. Proceedings of the 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Brisbane, Australia, Nov. 24-28.
62 Witteveldt, J., M. Vlak, J. and van Hulten, M. C.W. 2002b. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish and Shellfish Immunology 16:571-579.
63 Wu, J. L., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T and Muroga, K. 2002. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicas* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*.13, 391-403.

Abstract

Nowadays, white spot virus disease is serious threat for breeding and culture industry of shrimp. In this study was increasing resistance of shrimp against white spot virus by using modern methods such as shrimp vaccination with inactivated viruses and recombinant proteins. The aim of this study were determine the growth and survival rates vaccinated and non-vaccinated of *Litopenaeus vannamei* (5 to 15 and 12 to 26 day), that were challenged with white spot virus in 40 and 60 day rearing. This study consisted two separate groups were vaccinated and non-vaccinated with 11 treatments experimental and each of replicate was stocked 1000 pieces by post larva of 5 to15 and 12 to 26 day. After vaccination, two groups of post larvae exposed to the white spot virus at 40 and 60 day, one groups no exposure to the virus. Samplings were randomly of shrimp in 40, 60 and 80 days 10 pieces each of treatment experimental and measured mean of weight and length. Also, number of deaths was recorded at morning and evening daily and calculated survival rate at the end of study. The results showed growth rate of post larvae vaccinated (5 to15 day) which exposed to white spot virus at 40 and 60 was significantly lower than non-vaccinated of post larval, while the growth rate of post larval exposed to virus in 60 day was significantly increased. On the other hand, growth rate of post larval vaccination (12 to 26 day) exposed to virus in 60 day compared with post larval vaccination (5 to 15 and 12 to 26) exposed to virus in 40 and 60 days was significantly increased. Hence, growth rate was significantly increased in post larval vaccinated (5 to 15 and 12 to 26) which non-exposed to virus. Although the survival rate was post larval vaccinated (12 to 26 days) exposed to virus Post larvae in 60 day higher than post larval were exposed to virus in 40 and 60, but no significant differences were observed. However, relative mortality of post larval vaccination in 12 to 26 day compared with post larval vaccination in 5 to 15 days exposed to virus were significantly lower. Considering growth and survival index was improved of post larval vaccination can be concluded that the optimum age for vaccination against white spot virus of *L.vannamei* was 12 to 26 day.

Key word: white spot virus, *Litopenaeus vannamei*, vaccination, growth and survival rate

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

---

Project Title : Evaluation growths and survival indexes of vaccinated *Litopenaeus vannamei* against white spot virus syndrome
Approved Number: 14-80-12-9158-91001
Author: Mohammad Khalilpazir
Project Researcher : Mohammad Khalilpazir
Collaborator(s) : Aeinjamshid,K; Ghaednia,B.; Malolahi,A.; Shariferohani,M.; Mehrabi,M.; Sharifpour,I.; Afsharnasab,M.; Kakolaki,S.; Motamedi,F.; Dashtiannasab,A., Gh.Garibi,Reza Ghorbani vaghei,Akbar Pay gozar,Mostafa Sabohi,Alireza Asadi,Mohmmad ali Nazari
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 - Shrimp Researsh Center

Project Title :

Evaluation growths and survival indexes of vaccinated *Litopenaeus vannamei* against white spot virus syndrome

Project Researcher :
Mohammad Khalilpazir

Register NO.
45815