

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

عنوان:

**بررسی فاکتورهای ایمنی میگوی مواجهه شده  
با واکسن در مقایسه با میگوهای غیر واکسینه  
و میگوهای مواجهه شده با ویروس لکه سفید**

مجری:

شاپور کاکولکی

شماره ثبت

۵۰۵۳۴

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده تحقیقات آبی پروری جنوب کشور

---

عنوان پروژه : بررسی فاکتورهای ایمنی میگوی مواجهه شده با واکسن در مقایسه با میگوهای غیر واکسینه و میگوهای مواجهه شده با ویروس لکه سفید  
شماره مصوب پروژه : ۹۴۰۰۴-۹۴۵۱-۱۲-۷۴-۱۴  
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : شاپور کاکولکی  
نام و نام خانوادگی مجری مسئول ( اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد ) :  
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : شاپور کاکولکی  
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد افشارنسب، مینا آهنگرزاده، حسین هوشمند، سید رضا سید مرتضائی، مهرداد محمدی دوست، بابک قائد نیا، مرتضی سوری، لفته محسنی نژاد، رضا بنادرخشان  
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -  
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -  
محل اجرا: استان خوزستان  
تاریخ شروع : ۹۴/۱/۱  
مدت اجرا: ۱ سال و ۴ ماه  
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور  
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵  
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 فاکتورهای ایمنی میگوی مواجهه شده با واکسن در مقایسه با میگوهای غیر واکسینه و میگوهای مواجهه شده با ویروس لکه سفید

کد مصوب : ۹۴۰۰۴-۹۴۵۱-۱۲-۷۴-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۵۳۴ تاریخ : ۹۵/۸/۵

با مسئولیت اجرایی جناب آقای شاپور کاکولکی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در

تاریخ ۹۵/۷/۱۰ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

مشغول بوده است.

صفحه	« فهرست مندرجات »	عنوان
۱	.....	چکیده
۲	.....	۱- مقدمه
۲	.....	۱-۱ تولید و ارزش تجاری میگو
۸	.....	۱-۲ بروز و همه گیری بیماری لکه سفید در جهان
۹	.....	۱-۳ بومی شدن بیماری لکه سفید در کشور
۱۱	.....	۱-۴ ویروس عامل بیماری
۱۲	.....	۱-۵ ارزیابی انتشار بیماری
۱۳	.....	۱-۶ انتقال ویروس
۱۴	.....	۱-۷ آسیب شناسی بافتی بیماری لکه سفید میگو
۱۶	.....	۱-۸ اهمیت تغذیه و کاربرد محرک های سیستم ایمنی
۱۹	.....	۱-۹ فاکتورهای ایمنی
۲۱	.....	۱-۱۰ اهداف پروژه
۲۲	.....	۱-۱۱ سئوالات تحقیق
۲۳	.....	۲- مواد و روش کار
۲۳	.....	۲-۱ میگو
۲۳	.....	۲-۲ تیمار بندی
۲۴	.....	۲-۳ آماده سازی محلولهای مورد نیاز
۲۵	.....	۲-۴ گرفتن همولف
۲۵	.....	۲-۵ پروتئین کل پلاسما
۲۶	.....	۲-۶ روش استفاده از کیت ها
۲۸	.....	۲-۷ تجزیه و تحلیل آماری
۲۸	.....	۲-۸ عصاره گیری از جلبک
۳۰	.....	۳- نتایج
۳۰	.....	۳-۱ هموسیت کل
۳۱	.....	۳-۲ شاخص پروتئین کل پلاسما

عنوان	فهرست مندرجات	صفحه
۳-۳- شاخص فعالیت آنزیم پرواکسیداز.....		۳۳
۳-۴- شاخص فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز.....		۳۵
۳-۵- شاخص فعالیت آنزیم فنول اکسیداز.....		۳۷
۴- بحث.....		۳۹
منابع.....		۴۳
چکیده انگلیسی.....		۴۶

## چکیده

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثربخشی واکسن ویروس لکه سفید تولید شده با اشعه گاما در مواجهه با میگو سفید وانامی و مقایسه آن با میگوهای غیر واکسینه که در این تحقیق گروه شاهد و گروه تغذیه شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا و مخمر ساکارومایسیس سروزیا بوده است. هفت صد و بیست میگو سالم جوان وانامی با وزن متوسط  $1.02 \pm 1.0$  گرم جمع آوری شده و به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول (T1) گروه شاهد با تغذیه جیره پایه، گروه دوم (T2) ابتدا به میزان یک گرم در کیلوگرم غذا از مخمر ساکارومایسیس سروزیا *Saccharomyces cerevisiae* تغذیه شدند. گروه سوم (T3) ابتدا جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا *Gracilaria corticata* خشک شده و به میزان ۱۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم به غذای میگوها افزوده شد و، در نهایت، گروه چهارم (T4) گروه واکسینه که با واکسن بیماری لکه سفید مواجهه شدند. کلیه تغذیه های فوق الاشاره به مدت ۱۰ روز صورت گرفت. سپس کلیه میگوهای ۴ گروه با ویروس لکه سفید میگو مواجهه داده شدند و به مدت ۲۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. علاوه بر این، پارامترهای ایمنی مانند تعداد کل THC، پروتئین کل پلاسما (TPP)، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فعالیت پراکسیداز (POD) و فعالیت پروفنل اکسیداز Pro-Phenoloxidas تعیین شد. نتایج نشان داد که میزان بازماندگی برای گروه های T1، T2، T3، T4 به ترتیب  $57.05 \pm 3.52$ ،  $22.5 \pm 0.5$  و  $15 \pm 1.05$  و  $0.0 \pm 0.0$  می باشد. نتایج نشان داد که میزان داده های خونی گروه اول برای فاکتورهای یاد شده از بقیه بالاتر است. از نتایج این نتیجه گیری نهایی بعمل می آید که تاثیر واکسن لکه سفید میگو از دو ماده موثره دیگر در تاثیر گذاری ایمنی در میگوی پافسید آمریکایی بالاتر است.

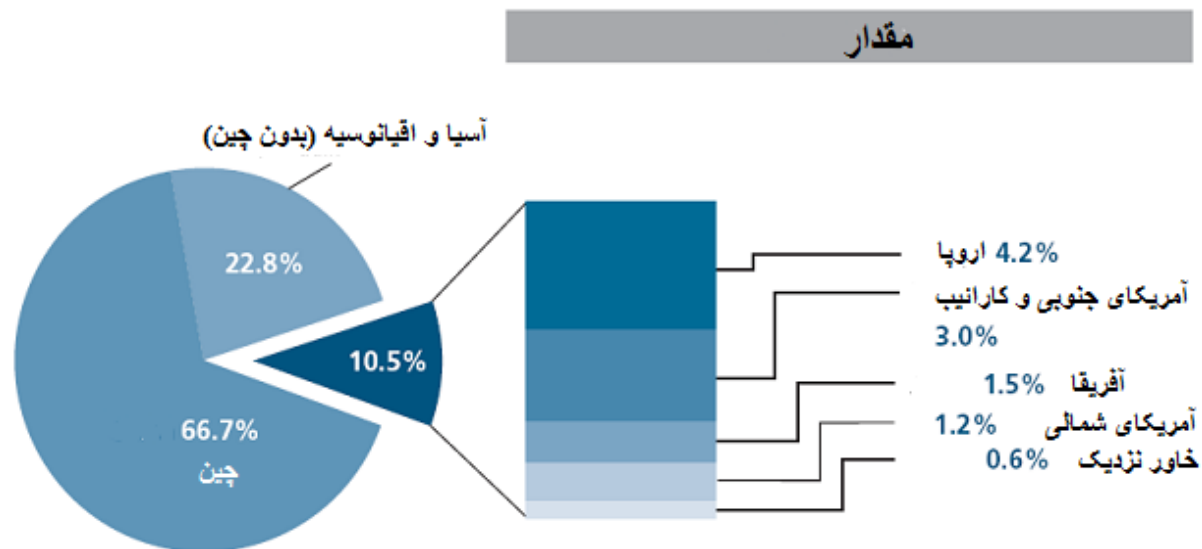
## ۱- مقدمه

یک از چالش‌های اصلی در تولید میگوی پرورشی بروز بیماری‌های ویروسی بالخصوص بیماری لکه سفید می باشد. بر اساس گزارش فائو سالیانه بالغ بر ۳۰٪ میگوهای پرورشی بر اثر بیماری لکه سفید از بین رفته و تولید کنندگان متحمل خسارات بالایی می شوند، بطوریکه با بروز این بیماری در مزارع آبادان در سال ۱۳۸۱ هزینه ای بالغ بر ۱۰۰ میلیون تومان برای ضد عفونی استخرها صرف گردیده است. بعلاوه برآورد خسارات ناشی از این بیماری ها طی سالهای ۲۰۰۴ الی ۲۰۰۸ میلادی تنها در دو استان خوزستان و بوشهر بالغ بر ۵۰ میلیارد تومان بوده است که با احتساب خسارت ناشی از اپیزوتوتیک سال ۲۰۰۸ در منطقه چاه بهار این خسارت به ۱۰۰ میلیارد تومان می رسد (Soltani et al, 2009) از اینرو امروزه ویروس بیماری لکه سفید یکی از مهمترین ویروسهای بیماری زا در مزارع میگوهای پرورشی و سایر سخت پوستان محسوب می شود که معمولاً با مرگ و میر ۱۰۰ درصدی در مدت ۱۰-۳ روز همراه خواهد بود (Lightner, 1996). شکی نیست که این بیماری مشکل درجه یک تاثیر گذار بر حیات اقتصادی و پایداری دراز مدت صنعت پرورش میگو است. از سوی دیگر تولید و پرورش جهانی میگو تا سال ۲۰۱۰ بالغ بر سه میلیون و یکصد هزار تن بوده است که از این مقدار ۲/۶ میلیون تن (۸۴٪) در کشورهای آسیایی چین، تایلند، ویتنام، هند و اندونزی تولید شده است که از این میزان تولید بالغ بر ۸۲٪ آن گونه میگوی سفید غربی *Litopenaeus Vannamei* می باشد (FAO, 2010). این گونه میگو در مدت ۳ ماه به رشدی حدود ۲۰-۱۵ گرم می رسد درحالی که میگوی سفید هندی در طی ۴ ماه به وزن ۱۶-۱۲ گرم خواهد رسید (کاکولکی، ۲۰۱۲). این نکته اهمیت گونه میگوی وانامی را در میان سایر میگوهای پرورشی مشخص می نماید. هم چنین این گونه نسبت به میگوی سفید هندی مقاومت بیشتری نسبت به ویروس بیماری لکه سفید دارد لیکن نتوانسته است مشکلات پرورش دهندگان را به صورت قطعی از پیش رو بردارد و کماکان بیماری در مناطق آلوده مشاهده می گردد. لذا نیاز به تدابیر مکمل در کنار معرفی گونه پا سفید غربی جهت احیای فعالیت پرورشی در مزارع میگو احساس می گردد.

## ۱-۱- تولید و ارزش تجاری میگو

کاهش ذخایر و صید آبزبان دریایی باعث رشد و گسترش صنعت پرورش ماهی و میگو در سراسر جهان شده است (Food and Agriculture Organization, 1999 cited in Naylor et al., 2000). در سال ۲۰۰۴ میلادی در حالیکه پرورش آبزبان دریایی ۴۳٪ تولید دریایی جهان را به خود اختصاص داده بود تولید میگو ۱۷٪ ارزش تجاری آبزبان را شامل شد (Ruiz-Velazco et al., 2010). میزان تولیدات آبری پروری در سال ۱۹۷۰ نسبت به سال ۲۰۰۶ از ۳/۹٪ کل به ۳۶٪ کل تولیدات شیلاتی رسیده است که در همین سال چین با ۶۷٪ رتبه اول تامین آبزبان پرورشی دنیا را کسب کرده است (شکل ۱). این بدان معنا است که رشد آبری پروری نسبت به سایر دام ها بسیار فوق العاده بوده است. ارزش محصولات آبری پروری دنیا با ۵۱/۷ میلیون تن به ۷۱/۸ در سال ۲۰۰۶ رسیده است.

رشد سالانه و ارزش محصولات آبی پروری از سال ۲۰۰۴ تا سال ۲۰۰۶ به ترتیب ۶/۱٪ و ۱۱٪ بوده است. شایان ذکر است کلیه این ارقام بدون در نظر گرفتن سهم گیاهان آبی منظور شده است. بدیهی است در سال ۲۰۰۶، میزان سهم آسیا و اقیانوسیه از آبی پروری از نظر تولید ۸۹٪ و از نظر ارزش ۷۷٪ بوده است (شکل ۱). در همین سال بیش از نیمی از تولیدات آبی پروری به تولید ماهیان آب شیرین اختصاص داشت (جدول ۱). این در حالی است که در مدت مشابه یعنی از سال ۱۹۷۹ تا ۲۰۰۶ مصرف سرانه جهانی از محل تولیدات آبی پروری از ۰/۷ به ۷/۸ کیلوگرم رسیده است (FAO, 2010). علیرغم اینکه چین رکورد بالاترین میزان تولید را در سال ۲۰۰۶ در اختیار دارد ولیکن آهنگ رشد تولید این کشور از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ آهسته تر (جدول ۲) از برخی کشورها بوده است (FAO, 2010). براساس همین منبع رتبه بندی قاره های مختلف در تولید سخت پوستان پرورشی در هر ۳ اکوسیستم شور، لب شور و شیرین به ترتیب متعلق به آسیا، آمریکا، اقیانوسیه و اروپا می باشد (جدول ۱) و رتبه تولید میگو نیز همین وضعیت را با بیشترین میزان تولید در آسیا، حفظ نموده است (شکل ۲).



Source: FAO, 2010

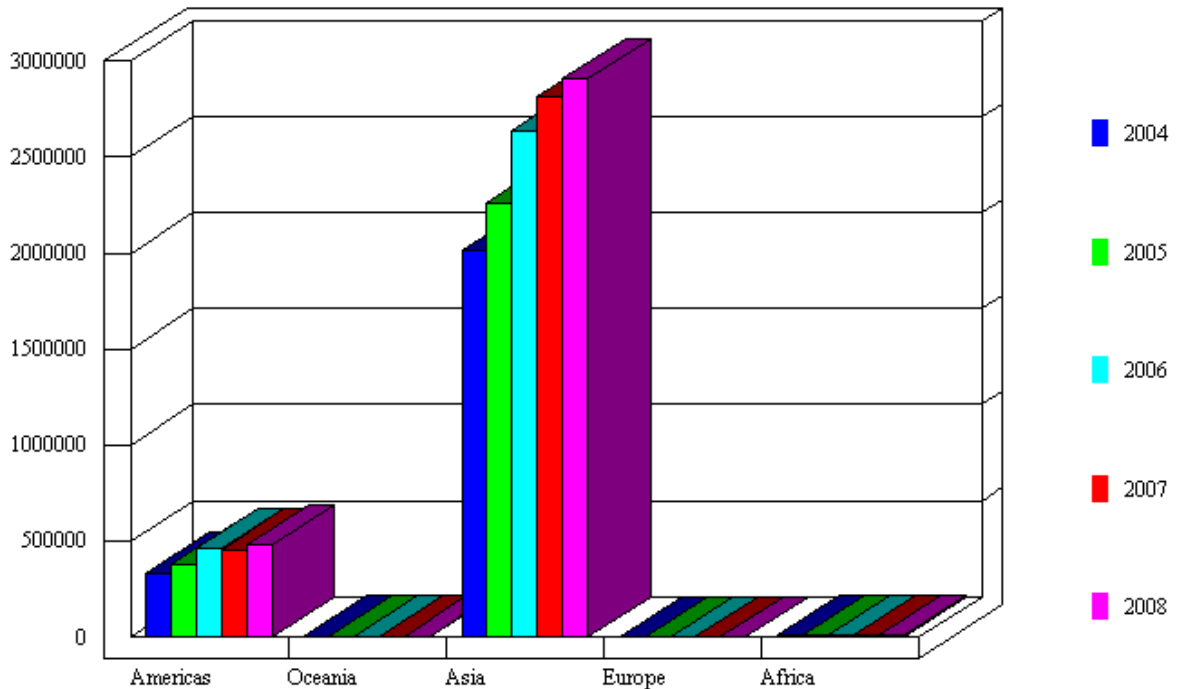
شکل ۱: میزان سهم قاره ها از تولید آبی پروری در سال ۲۰۰۹

جدول ۱: میزان تولید سخت پوستان در هر ۳ محیط شور، لب شور و شیرین، ۲۰۰۸-۲۰۰۰ (تن)

2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	C*
7,792	9,615	10,485	11,931	7,889	8,565	8,428	5,844	5,402	A
532,750	508,108	499,755	417,135	366,159	338,622	270,840	205,485	165,068	A
4,463,78	4,261,17	3,754,48	3,336,99	3,007,94	2,648,34	1,929,31	1,759,55	1,514,58	M
0	7	1	3	1	5	7	4	5	As
207	232	321	268	234	228	227	215	204	Eu
5,464	5,547	6,190	6,079	6,294	5,702	5,993	5,217	5,183	O

C\* =Continent, A=AFRICA, Am=Americas, As=Asia, EU=Europe, O=Ocean





شکل ۲: مقایسه تولید میگو در قاره‌های مختلف طی سالهای ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۸

جدول ۲: ده کشور برتر تولید کننده در صنعت آبی پروری، مقدار و رشد در ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۴

	10 تولید کننده برتر از نظر ارزش			10 تولید کننده برتر از نظر تولید			
	2004 (Tonnes)	2006 (Tonnes)	ضریب رشد %	2004 (Tonnes)	2006 (Tonnes)	ضریب رشد %	
China	30 614 968	34 429 122	6.05	Uganda	5 539	32 392	141.83
India	2 794 636	3 123 135	5.71	Guatemala	4 908	16 293	82.20
Viet Nam	1 198 617	1 657 727	17.60	Mozambique	446	1 174	62.24
Thailand	1 259 983	1 385 801	4.87	Malawi	733	1 500	43.05
Indonesia	1 045 051	1 292 899	11.23	Togo	1 525	3 020	40.72
Bangladesh	914 752	892 049	-1.25	Nigeria	43 950	84 578	38.72
Chile	665 421	802 410	9.81	Cambodia	20 675	34 200	28.61
Japan	776 421	733 891	-2.78	Pakistan	76 653	121 825	26.07
Norway	636 802	708 780	5.50	Singapore	5 406	8 573	25.93
Philippines	512 220	623 369	10.32	Mexico	104 354	158 642	23.30

میگوی وانمی با تجارت نزدیک به ۱۱.۳ میلیارد دلار (حدود ۱۵٪ کل تجارت تمامی محصولات وابسته به اکوسیستم های آبی در مقایسه نزدیک با آزاد ماهیان و قزل آلا با حدود ۱۴٪ تجارت) در سال ۲۰۱۰ بیشترین تجارت را در میان گونه های آبی به خود اختصاص داده است. در سال ۲۰۰۴ تولید میگوی استحصالی حدود ۳ ۸۵۶ ۳۰۷ و در سال ۲۰۱۰، ۳۱۲۹۲۵۰ تن بوده که این استحصال با کاهش روبرو بوده است که نشان از استفاده حداکثری از دریا و عدم افزایش آن دارد. در سال ۲۰۱۱ میزان تولید سخت پوستان پرورشی حدود ۵.۹ میلیون تن گزارش گردیده است (FAO, 2012). در سال ۲۰۱۱ آبی پروری تایلند و ژاپن از صنایع طبیعی به شدت

آسیب دیدند بطوریکه به ترتیب ۲۲٪ و ۲۳٪ در کشور های فوق با کاهش تولید آبزیان روبرو بودیم (FAO, 2013). در سال ۲۰۰۴ میلادی در حالیکه پرورش آبزیان دریائی ۴۳٪ تولیدات دریائی جهان را به خود اختصاص داده بود تولید میگو ۱۷٪ ارزش تجاری آبزیان را شامل شد (Ruiz-Velazco et al., 2010). میزان تولیدات آبی پروری در سال ۱۹۷۰ نسبت به سال ۱۹۹۵ از ۳/۹٪ به ۳۶٪ کل تولیدات شیلاتی رسیده است که در همین سال چین با ۶۷٪ رتبه اول تامین آبزیان پرورشی دنیا را کسب کرده است. این بدان معنی است که رشد آبی پروری نسبت به سایر دام ها بسیار فوق العاده بوده است. ارزش محصولات آبی پروری دنیا با ۵۱/۷ میلیون تن به ۷۱/۸ میلیارد دلار در سال ۲۰۰۶ رسیده است (FAO, 2010). رشد سالانه و ارزش محصولات آبی پروری از سال ۲۰۰۴ تا سال ۲۰۰۶ به ترتیب ۶/۱٪ و ۱۱٪ بوده است (FAO, 2010). شایان ذکر است کلیه این ارقام بدون در نظر گرفتن سهم گیاهان آبی منظور شده است. بدیهی است در سال ۲۰۰۶، میزان سهم آسیا و اقیانوسیه از آبی پروری از نظر تولید ۸۹٪ و از نظر ارزش ۷۷٪ بوده است (FAO, 2010). در همین سال بیش از نیمی از تولیدات آبی پروری به تولید ماهیان آب شیرین اختصاص داشت. این در حالی است که در مدت مشابه یعنی از ۱۹۷۹ تا ۲۰۰۶ مصرف سرانه جهانی از محل تولیدات آبی پروری از ۷/۸ کیلوگرم رسیده است (FAO, 2010). علیرغم اینکه چین رکورد بالاترین میزان تولید را در سال ۲۰۰۶ به خود اختصاص داده است ولیکن آهنگ رشد تولید این کشور از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ آهسته تر از برخی کشورها بوده است (FAO, 2010).

بر اساس آمارهای شیلات، در ایران در سال ۱۳۸۶ تولید آبزیان به رقمی معادل ۵۶۲ هزار تن افزایش یافته که سهم صید از دریاها معادل ۳۶۸ هزار تن و مابقی از تولیدات آبهای داخلی و تکثیر و پرورش به دست آمده که تولید ماهیان گرمابی معادل ۹۷ هزار تن، سردابی ۵۶ هزار تن و میگو حدود ۵ هزار تن بوده است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۶). صنعت پرورش میگو ایران در طی سال های اخیر با کمی تجربه بیشتر و داشتن برنامه مقابله با بیماری لکه سفید میگو توانسته رشد بیشتری داشته باشد طوریکه میزان تولید میگوی ایران در سال های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ به ترتیب برابر با ۱۲۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ تن گردیده است. یکی از چالشهای اصلی در تولید آبزیان بالاخص در آبی پروری موضوع بهداشت و بیماریهای آبزیان بوده، بطوریکه سالیانه میلیونها دلار به دلیل بیماریهای آبزیان به پرورش دهندگان ماهی و میگو خسارت وارد شده است. بیماری ها، یکی از موضوعات مهم در توسعه آبی پروری محسوب می شود. با توجه به گسترش فعالیتهای آبی پروری در سطح ملی، منطقه ای و بین المللی، تعداد بیماریهای نوظهور (emerge) در حال افزایش بوده و روز بروز بر تعداد آنها افزوده می شود. در خانواده سخت پوستان بالاخص میگو تاکنون حدود ۲۰ بیماری ویروسی، ۴ بیماری باکتریائی، ۳ بیماری قارچی و تعدادی انگل گزارش شده است که باعث ایجاد بیماری و خسارت به صنعت تکثیر و پرورش میگو می شوند (Muhammad et al., 2012; Lightner, 1996).

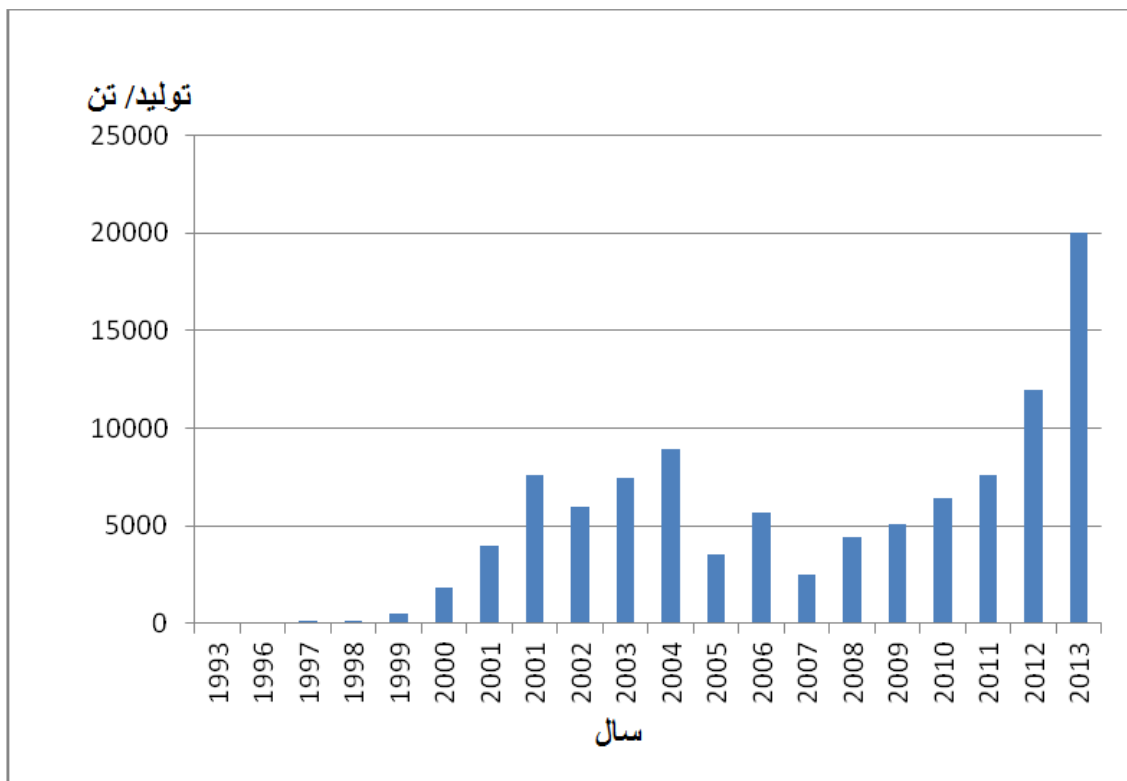
طی سالهای اخیر بنا به دلایل متعدد رکود شدیدی دامنگیر صنعت میگو شد تا جایی که از کل اراضی واگذار شده به بخش خصوصی، تنها ۷۵۰۰ هکتار از آنها به بهره برداری رسیده و از این مقدار نیز طی ۲ الی ۳ سال اخیر

عملاً کمتر از ۴۰ درصد آن به زیر کشت رفته است. بروز مسایلی مانند افت قیمت میگوی پرورشی در بازارهای جهانی، رقابت شدید در بازار جهانی میگو، بالا بودن نرخ تورم و ثبات نرخ ارز، بالا بودن نرخ سود و کارمزد تسهیلات بانکی، عدم تکمیل زیر ساختهای مورد نیاز، پایین بودن راندمان تولید در مراکز تکثیر، عدم دسترسی به منابع مولد مناسب، پایین بودن راندمان تولید در مزارع پرورش، پائین بودن نسبی سطح مدیریت و فن آوری در حلقه‌های مختلف تولید و بروز بیماریهایی مانند لکه سفید در استان‌های خوزستان و بوشهر و وقوع طوفان گنو در استان سیستان تولید میگو را به حد اقل رسانده و باعث شده تا این صنعت با تنگناهای بسیاری روبرو شود. در ایران در سال ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ همه‌گیری ناشی از بیماری لکه سفید در سایت تکثیر و پرورش میگوی چوئیده آبادان موجب رکود این صنعت در کشور گردید. این همه‌گیری سپس در سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر و در سال ۱۳۸۷ در استانهای سیستان و بلوچستان و خوزستان موجب خسارت سنگینی به صنعت پرورش میگو گردید (Afsharnasab, 2012).

پس از وقوع بیماری در سال ۱۳۸۱ در سایت پرورش میگوی چوئیده آبادان از سال ۱۳۸۳، موسسه تحقیقات شیلات ایران، در پژوهشکده میگوی کشور، کار تحقیق روی میگوی وانامی را شروع کرد و سرانجام در سال ۱۳۸۴ که متقارن با شیوع بیماری لکه سفید در استان بوشهر بود، به تکنیک تکثیر و پرورش میگوی وانامی دست یافت. یکی از مشکلات عمده صنعت میگو در کشور توان تولید پائین در مزارع پرورشی است که دسترسی به میانگین تولید بالاتر نیازمند گذر از پرورش نیمه متراکم به متراکم، بهبود مدیریت و تکمیل و توسعه زیر ساخت های مورد نیاز صنعت است. یکی از الزامات سیستم متراکم استفاده از هواده‌های پر قدرت است که با سیستم سوخت دیزلی کنونی مزارع پرورشی کشور مان مشکل و یا ناممکن است و نیازمند برق دار کردن مزارع پرورشی است. میانگین تولید میگوی سفید هندی در سال‌های اخیر حدود ۲ تن در هکتار بوده است.

توجه به تنوع گونه‌ای میگو با دید منطقه‌ای، تکثیر و پرورش گونه‌های با توان تولید بالا، و مقاوم در برابر شرایط متنوع اکولوژیکی، مقاوم در برابر بیماری، سریع‌الرشد بودن و همچنین کاهش هزینه‌های تولید، افزایش تولید در واحد سطح و افزایش سطح زیر کشت میگو از راهکارهای دستیابی به اهداف کیفی و کمی شیلات ایران و مؤسسه تحقیقات شیلات در برنامه‌های توسعه‌ای کشور است. انجام تحقیقات پیرامون موارد فوق، بهداشت و بیماری‌های میگو، تغذیه، ژنتیک و اصلاح نژاد میگو، و در نهایت فراوری میگو، تقویت بنیادین ساختار تحقیقات پژوهشکده میگوی کشور را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید.

تولید میگوی پرورشی ایران پس از فراز و نشیب‌های فراوان، در سال‌های اخیر بالاخره شروع به رشد نموده است (شکل شماره ۳).



شکل ۳: وضعیت تولید میگوی پرورشی ایران

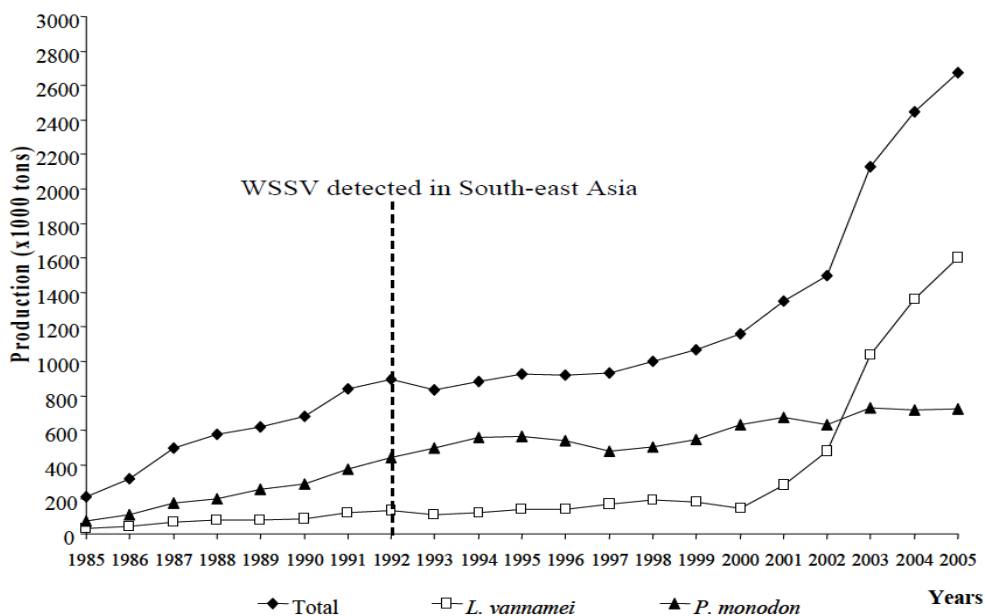
برای اولین بار بروز بیماری لکه سفید در صنعت تکثیر و پرورش میگو در سال ۱۹۹۲ در تایوان اتفاق افتاده و سپس به کلیه کشورهای آسیایی سرایت نمود. این بیماری در سال ۱۹۹۵ به دلیل انتقال میگوی منجمد و آلوده به ویروس لکه سفید در کشورهای آمریکایی مثل آمریکا، اکوادور، برزیل، هندوراس و غیره نیز گزارش گردید (Afsharnasab and Akbari, 2005). بعد از همه گیری این بیماری بود که پرورش دهندگان آسیایی تمایل به استفاده از گونه وانامی پیدا نمودند (Cavalli et al., 2010). به نظر می رسد گونه وانامی در مقابل بیماریهای میگو بالاخص بیماری های تک یاخته ای نوظهور و بازپدید (Kakoolaki et al., 2011b) مقاومت بیشتری دارد. با ورود گونه وانامی به صنعت تکثیر و پرورش میگو این گونه به شدت توسعه یافته و جای گونه ببری سیاه (*Penaeus monodon*) و میگوی سفید هندی را گرفت و امروزه بیش از ۹۰٪ تولیدات میگوی پرورشی جهان به گونه وانامی اختصاص یافته است. تولید میگوی پرورشی در سال ۲۰۰۸ در جهان معادل ۳ میلیون تن بوده است که از این میزان ۲/۸ میلیون تن به گونه وانامی اختصاص داشته و مابقی به سایر گونه ها از جمله میگوی ببری سیاه اختصاص یافته است (FAO, 2013).

در میگو و سایر سخت پوستان از جمله خرچنگ دراز آب شیرین سیستم ایمنی در برابر عوامل بیماریزا بر سه پایه دفاع با استفاده از موانع فیزیکی و شیمیایی، دفاع سلولی و دفاع هومورال استوار می باشد. با این وجود سیستم ایمنی سخت پوستان در مقابل بیماریها ضعیف بوده و توانائی دفاع را ندارند. استفاده از آنتی بیوتیکها و

سایر مواد شیمیائی نیز بطور وسیعی در کنترل و پیشگیری از بیماریهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی بدلیل بقا این مواد در بدن آبزیان و تاثیر در کیفیت آب استخرهای پرورشی و همچنین مقاومت‌های آنتی بیوتیکی استفاده از آنها با محدودیتهائی روبرو است. از طرفی در کنترل و پیشگیری از اغلب بیماریهای مهلک آنتی بیوتیکها و سایر مواد شیمیائی تاثیر چندانی ندارند.

## ۲-۱- بروز و همه‌گیری بیماری لکه سفید در جهان

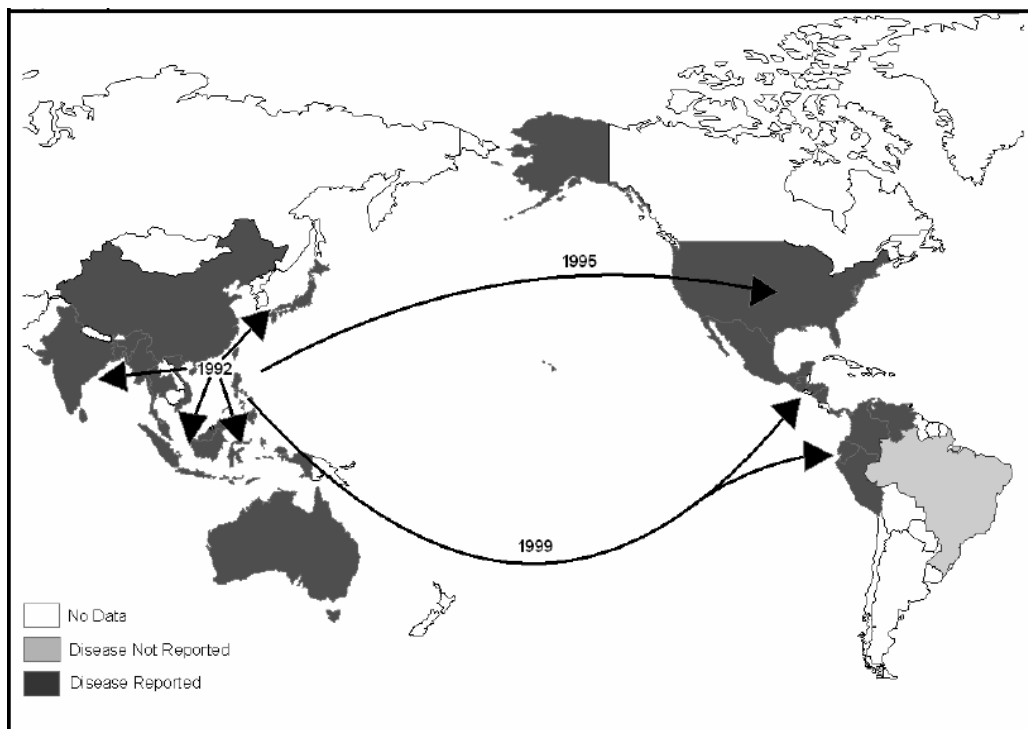
اهمیت صنعت پرورش میگو به میزان تولید و جایگاه اقتصاد جهانی آن و میلیون‌ها نفری که بطور مستقیم و غیرمستقیم با آن صنعت در ارتباط هستند مربوط می‌باشد. بیماری لکه سفید<sup>۱</sup> که بوسیله ویروس WSSV ایجاد می‌شود شاید مهمترین بیماری آبزیان پرورشی از لحاظ اقتصادی در آبهای گرم باشد (Oidtmann & Stentiford, 2010). خسارت ناشی از آن در سال ۱۹۹۲ در آسیا ۴ تا ۶ میلیارد و در سال ۱۹۹۹ در امریکا یک میلیارد دلار تخمین زده می‌شود. بیماری لکه سفید به عنوان یک فاکتور محدود کننده در توسعه بعضی از کشورها محسوب می‌گردد. این بیماری در تولید میگوهای پرورشی *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. monodon* و *F. indicus*, *F. merguensis* و *L. setiferus* در جهان تاثیر گذاشته است. لکه سفید یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های میگو و در ردیف بیماری‌های اخطار کردنی به سازمان جهانی بیماری‌های همه‌گیر دامی (OIE) تلقی می‌شود (Flegel, 2006).



شکل ۴: تولید جهانی انواع میگوی پرورشی طی سال‌های ۱۹۸۵ الی ۲۰۰۵ و اثر بروز همه‌گیری لکه سفید در سال ۱۹۹۲ (FAO, 2007)

<sup>1</sup>.white spot disease

در سال ۱۹۹۰ میلادی، این بیماری در آسیا بطور گسترده‌ای پخش شد و در سال ۱۹۹۹ به آمریکا رسید و اثرات مهم اقتصادی روی صنعت پرورش میگو داشته است. وجود بیماری لکه سفید در آغاز در شرق، جنوب شرق و جنوب آسیا گزارش شده است. گزارش‌های متفاوتی از اولین محل وقوع بیماری، ابتدا در تایوان، چین و ژاپن در سال ۱۹۹۲ ذکر شده است. در سالین بعد منابع مختلف آلودگی بیماری لکه سفید در نقاط مختلف دنیا گزارش گردید. از تایوان در سال (۱۹۹۳)، ژاپن (۱۹۹۴) و در چین در سال (۱۹۹۷) بیماری گزارش شده است. پس از آن بیماری از کشورهای آسیایی بنگلادش (۱۹۹۵)، هند (۱۹۹۷)، اندونزی (۱۹۹۴)، کره جنوبی (۱۹۹۸)، مالزی (۱۹۹۸)، سریلانکا (۱۹۹۹)، تایلند (۱۹۹۵)، ویتنام (۱۹۹۶) مجمع الجزایر فیلیپین و عربستان سعودی (۱۹۹۹) گزارش شد. گزارش‌ها در نیمکره غربی شامل ایالات متحده آمریکا (۱۹۹۶)، پاناما (۱۹۹۹)، مکزیک (۱۹۹۹) نیکاراگوا، گواتمالا و هندوراس (۱۹۹۹) می‌باشد. (Escobedo-Bonilla et al., 2008, Oidtmann and Stentiford., ) (2011)



شکل ۵: انتشار بیماری لکه سفید در جهان (Mcclennen, 2004)

### ۳-۱- بومی شدن بیماری در کشور

در سالین اخیر بیماری‌های ویروسی پرورش میگو در ایران و جهان پرورش‌دهندگان را با مشکلات زیادی مواجه نموده است. استان هرمزگان در بین استان‌های جنوبی کشور تنها استانی است که تا سال ۱۳۹۴ مشکل بیماری لکه سفید میگو را تجربه نکرده است. این بیماری اولین بار در سال ۸۱ در سایت چوئیده آبادان در

استان خوزستان مشاهده و پس از آن در سال‌های ۸۳، ۸۵، ۸۷ و ۸۹ مجدداً در این سایت گزارش شد. ضمن اینکه بروز بیماری برای اولین بار در سال ۸۴ از استان بوشهر و در سال ۸۷ از سایت گواتر چابهار در استان سیستان و بلوچستان هم گزارش گردید (Pazir et al., 2011). این بیماری خسارات بسیاری را به صنعت پرورش میگو در کشور وارد کرد. میزان تولید میگو در استان بوشهر از ۵۶۰۰ تن در سال ۱۳۸۳ به ۴۷۶ تن در سال ۱۳۸۴، در استان خوزستان از ۲۰۵۴ تن در سال ۱۳۸۰ به صفر در سال ۱۳۸۱ و در استان سیستان و بلوچستان از ۲۵۰۰ تن در سال ۱۳۸۵ به ۱۶۴ تن در سال ۱۳۸۷ رسیده است. اگر چه ورود میگوی پاسبید به استان‌های درگیر با بیماری باعث افزایش تولید در سال‌های ابتدایی پس از تغییر گونه میگوی پرورشی شده است لیکن درگیر شدن میگوهای پاسبید با بیماری سبب افت مجدد تولید در این استان‌ها گردیده است (جدول ۳ و ۴). استراتژی‌های مختلفی بسته به شرایط و ملاحظات اقتصادی در مواجهه با بیماری در کشور اتخاذ شده است؛ از جمله معدوم‌سازی در موارد بروز بیماری، ورود میگوی پاسبید به مناطق آلوده و نیز تولید میگو در کنار بیماری. کشت میگوی پاسبید که مقاومت بیشتری نسبت به سفید هندی در مقابل بیماری لکه سفید دارد نتوانسته است مشکلات پرورش را به صورت قطعی از پیش رو بردارد و کماکان بیماری در مناطق آلوده مشاهده می‌گردد. لذا نیاز به تدابیر مکمل در کنار معرفی گونه پاسبید جهت احیای فعالیت پرورشی در مزارع میگو احساس می‌گردد.

### جدول ۳: گزارش وقوع بیماری لکه سفید به تفکیک استان‌های ساحلی و گونه میگوی پرورشی

(Pazir et al., 2010)

گونه میگوی پرورشی		استان
<i>F. indicus</i>	<i>L. vannamei</i>	
۱۳۸۵ و ۱۳۸۳ و ۱۳۸۱ در مزارع	۱۳۸۷ در مزارع	خوزستان
۱۳۸۴ مزارع	۱۳۸۹ در مرکز تکثیر	بوشهر
۱۳۸۷ مزارع	۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ مزارع	سیستان و بلوچستان
گزارش نشده	گزارش نشده	هرمزگان

### جدول ۴: تولید میگوی پرورشی به تفکیک استان طی سال‌های ۱۳۷۹ الی ۱۳۹۰

(آمار تولید بر گرفته از سالنامه آماری شیلات ایران) (ارقام به تن).

استان / سال	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷	۱۳۸۸	۱۳۸۹	۱۳۹۰
بوشهر	۱۹۵۵	۳۳۳۴	۳۷۸۸	۳۵۸۵	۵۶۰۰	۴۷۶۶	§۱۶۲۳	۸۷۶	۲۲۰۰	۳۰۰۰	۳۱۹۷	۵۱۵۱
خوزستان	۸۵۰	۲۰۵۴	۰	۲۶	۲۱	۰	§ ۱۷	۷۰	۳۷۷	۰	۲۱۵	۲۴۷
س و بلوچستان	۳۵۵	۱۰۲۳	۱۳۰۰	۲۱۱۴	۱۲۷۸	۱۸۰۰	۲۵۰۰	۱۶	۰	§۱۰۷۱	۱۱۰۰	۰
گلستان	۰	۰	۰	۰	۰	۱۶	۰	۱۴	۰	۰	§ ۲۲	۱۳۰
هرمزگان	۸۵۰	۱۲۱۳	۸۷۲	۱۷۳۷	۲۰۰۴	۱۲۸۵	۱۵۶۰	۱۵۲۳	۱۶۳۱	§ ۹۸۹	۱۸۲۴	۲۲۹۷
جمع	۴۰۱۰	۷۶۲۴	۵۶۹۰	۷۴۶۲	۸۹۰۳	۳۵۷۷	۵۷۰۰	۲۵۰۹	۴۳۷۲	۵۱۲۸	۶۳۵۸	۸۰۲۵

آميزان توليد ميگوي پرورشي پس از درگيري با بيماري لکه سفید

§ ميزان توليد ميگوي پرورشي در آغاز ورود ميگوي ليتوپنائوس وانامي به مزارع استان

#### ۴-۱- ویروس عامل بیماری

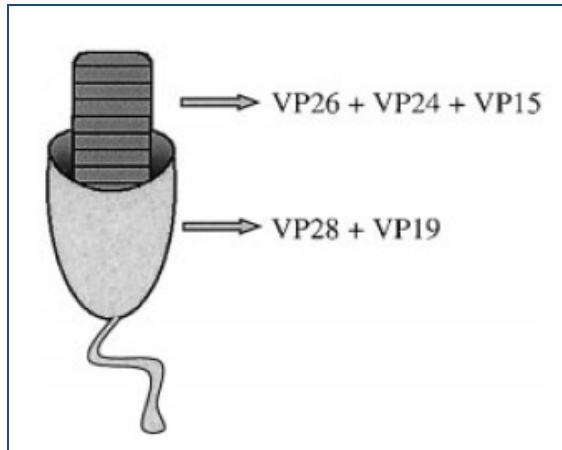
قریب به ۲۰ گونه ویروس مهاجم در گونه‌های مختلف میگو شناسایی شده است. سه ویروس به نام‌های ویروس لکه سفید میگو، ویروس سندرم تورا (Taura syndrome virus) و ویروس (Infection Hepodermal and Hematopoietic Necrosis, IHHN) به عنوان ویروس‌های مهاجم میگوی پای سفید (Litopenaeus Vannamei) شناخته شده‌اند (Lightner and redman, 1998). ویروس لکه سفید میگو یکی از حادترین ویروس‌های خانواده پنائیده است که جزء خانواده Nimaviridae و از جنس Whispovirus می‌باشد. (Mayao, 2002 b, a).

این ویروس میله‌ای تا بیضوی، dsDNA، پاکت سه لایه، حاوی ذراتی به پهنای ۸۰ - ۲۰ نانومتر و طولی معادل ۳۸۰ - ۲۵۰ نانومتر با یک زائده دم مانند در یک انتها مشخص می‌باشد. (Wang, G. H. et al., 1995 b, Lightner, 2004). این ویروس در بین ده پایان از تنوع میزبانی وسیعی برخوردار است و برای میگوهای خانواده پنائیده یک پتانسیل کشنده محسوب می‌شود. (Lo et al., 1997; Fligel and Alday - sanz, 1998).

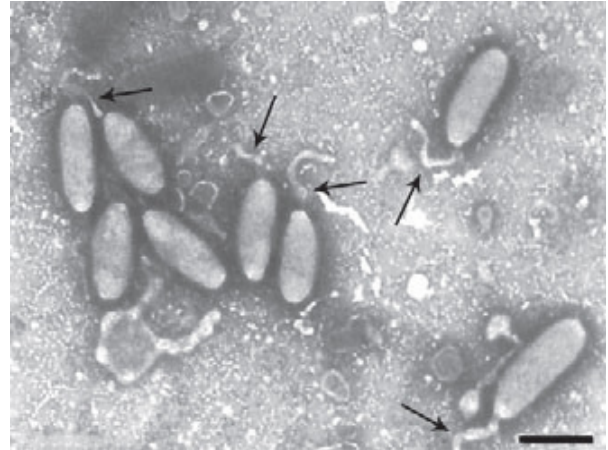
اندازه ژنوم ویروس در گزارش‌های مختلف، متغیر گزارش شده است به طوری که در گزارشی از کشور چین 305/107 bp (GenBank Accession No. AF332093)، در گزارشی دیگری از کشور تایلند 292/967 bp (GenBank Accession No. AF369029) و در گزارشی از کشور تایوان 307/287 bp (GenBank Accession No. AF440570) اعلام شده است (Lightner, 2004). ویروس در دمای 50° c کمتر از ۱۲۰ دقیقه و در دمای 60° c کمتر از یک دقیقه دوام خواهد داشت و این مدت در استخر پرورشی حدود ۴-۳ روز گزارش گردیده است. (OIE, 2006). این ویروس در کشورهای گوناگون با نام‌های مختلفی توصیف شده است. در چین به عنوان 6 (HHNBV)، در ژاپن و کره، 7 (RV-PJ)، در تایلند و بنگلادش، 8 (SEMBV)، در اندونزی، ویتنام، مالزی، هند، کارولینای جنوبی و تگزاس 9 (WSBV) و در تایوان 10 (PmNoB) خوانده شده است (Lightner, 1996).



هم چنین از دسته ویروس‌های پوشش دار بوده و دارای پروتئین‌های پوششی مهم از جمله VP19 و VP28 و دارای پروتئین‌های ویروسی هستند که بر روی نوکلئوکپسید جا گرفته اند که عبارتند از vp15 و vp26 و vp24 . (افشار نسب، 1386 a) .



شکل ۷: پروتئین‌های پوششی و نوکلئوکپسید در نمای ساده شده (Marielle, 2000) WSSV



شکل ۶: ویروس‌های WSSV توسط میکروسکوپ الکترونی (Durand et al., 1996) (bar = 250 nm)

### ۵-۱- ارزیابی انتشار بیماری

ارزیابی انتشار بیماری شامل انتشار جغرافیایی بیماری، محدوده میزبانان، میزان شیوع بیماری در میگوهای وحشی و پرورشی می‌باشد. ویروس بیماری لکه سفید دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و تاکنون تمام گونه‌های میگو در شرایط آزمایشگاهی به بیماری مبتلا شده و همگی از حساسیت بالایی نسبت به ویروس عامل بیماری برخوردار بوده‌اند. تاکنون مشخص شده که بیماری به راحتی در بیش از ۳۰ گونه میگوی پرورشی و وحشی قادر به ایجاد تلفات بالایی است. میگوهای سفید هندی، ببری سبز و میگوهای موزی نیز از آن جمله هستند. دامنه میزبانی عامل بیماری لکه سفید، سایر سخت پوستان دریایی و آب شیرین را نیز در بر می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به انواعی از گونه‌های خرچنگ دراز آب شیرین اشاره نمود (Flegel, 2007).

دامنه میزبانی وسیع به ویژه در خرچنگ‌ها بدون بروز علائم بالینی بیماری و سایر سخت پوستان در نزدیکی مزارع میگو، امر ریشه کنی بیماری را با سختی مواجه می‌کند. خرچنگ‌ها مخزن عمده‌ای برای ویروس عامل بیماری محسوب می‌شوند. از آنجایی که میگوهای مولد به عنوان حاملین بدون علامت ویروس عمل می‌کنند به نظر می‌رسد که ویروس را در جمعیت‌های وحشی برای مدت طولانی حفظ می‌نمایند. به علاوه شواهد نشان می‌دهد که بیماری به صورت عمودی (از طریق تخم) نیز قابل انتقال است که این موضوع خود ریشه کنی بیماری را مشکل‌تر می‌سازد، ضمن این که مطالعات نشان می‌دهد که ویروس عامل بیماری قادر به ادامه حیات برای مدت ۲-۳ روز در خارج از بدن میزبان در ستون آب می‌باشد که خود به انتقال بیماری از طریق آب کمک زیادی می‌نماید (Baldock, 1998).

قره وی و مورد بررسیان در تحقیقی بمنظور ردیابی ویروس لکه سفید در سه منطقه از آبهای استان هرمزگان شامل اطراف جزیره قشم، جزیره هنگام و آبهای ساحلی بندر جاسک بصورت فصلی به مدت یکسال و نیم از زمستان ۱۳۸۵ تا بهار ۱۳۸۷ از میگوی سفید هندی، میگوی موزی، میگوی ببری سبز میگوی سفید خنجری و خرچنگ‌های دریایی نمونه برداری نمودند. در طول دوره نمونه برداری مجموعاً ۴۳۲۰ قطعه میگو و ۱۰۸۰ قطعه خرچنگ جمع آوری شد. در تمام نمونه های جمع آوری شده نتایج آزمایشات PCR دو مرحله ای (nested PCR) منفی بودند و تا زمان اتمام پروژه شواهدی از وجود ویروس لکه سفید مشاهده نشد. افشارنسب و مورد بررسیان به دنبال وقوع مرگ و میر شدید در میگوهای پرورشی منطقه چوئیده آبادان پروژه ای را در سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۸۵ به منظور بررسی بیماری و تعیین منبع بیماری در میگوهای پرورشی منطقه آبادان انجام داده اند. نمونه های جمع آوری شده شامل انواع میگوها، خرچنگ و ماهی از رودخانه های بهمنشیر و کانال های ورودی سایت پرورشی بوده است. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش های PCR نمونه های جمع آوری شده در این پروژه، میگوهای خنجری *Parapenaeus stylifera* و میگوی سفید *Metapenaeus affinis* صید شده از رودخانه بهمنشیر نسبت به ویروس لکه سفید مثبت بوده‌اند و در سایر نمونه های جمع آوری شده علائمی از وجود ویروس لکه سفید مشاهده نشد.

اطلاعاتی در خصوص شیوع لکه سفید در گونه‌های وحشی وجود دارد که نشان میدهد که ابتلا به لکه سفید در میگوهای وحشی، وقتی مزارع در کشورهای مختلف به بیماری مبتلا شدند امری متداول است. ویروس لکه سفید میگوها را در هر سنی آلوده می‌کند. همه‌گیری‌ها از پست لارو تا میگوی ۴۰ گرمی مشاهده شده است. همه‌گیری‌ها در تراکم های مختلف پرورش از کم ۵ عدد در هر متر مربع در سیستم های پرورش سنتی تا بیش از ۳۰ عدد در هر متر مربع رخ داده است (Chanratchakool and Limsuwan, 1998).

## ۶-۱- انتقال ویروس

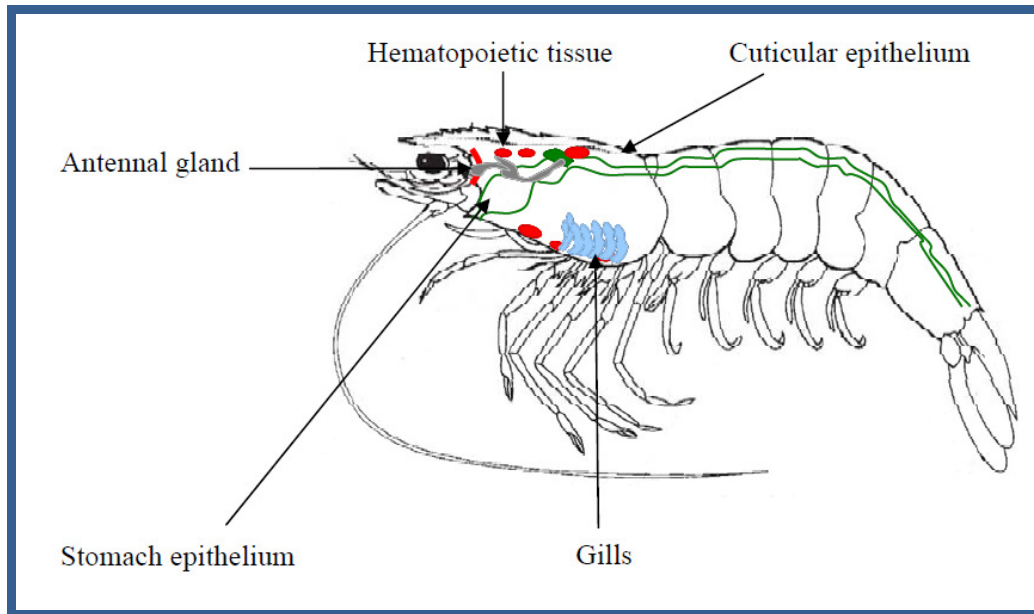
گزارشاتی دال بر انتقال عمودی در مولدین آلوده وجود دارد. (Kou et al., 1997; Lo et al., 1997; Mohan et al., 1997). البته گزارشاتی دال بر حذف تخم توسط ویروس و عدم تکامل آن وجود دارد (Lo et al., 1997). ژنوم DNA ویروس لکه سفید می‌تواند به روش انتقال عمودی وارد سیستم آرتیمیا گردد ولی در حین هیچ از بین نمی‌رود. (Li et al., 2003).

عوامل ذیل در انتقال بیماری از جانوری به جانور دیگر دخالت دارند (Baldock, 1998)

- قدرت بیماری زایی و حدت ویروس
- اندازه دوز آلوده ساز
- استعداد به ابتلا در گونه در معرض آلودگی
- درجه استرس در معرض آلودگی

## ۷-۱- آسیب شناسی بافتی بیماری لکه سفیدمیگو

بافت های با منشا اکتودرم و مزودرم مورد تهاجم ویروس قرار میگیرد بدین جهت برای نمونه گیری مناسب هستند و بالعکس بافت های با منشا اندودرم در گیر نشده و برای تشخیص لکه سفید مناسب نمی باشند. نمونه گیری از آبشش ها، معده، ماهیچه های شکمی، پاهای شنا و همولف توصیه شده است. هیاتوپانکراس و روده و چشم میگو برای تشخیص لکه سفید مناسب نمی باشند. ارگانهای هدف برای این ویروس اپیتلیوم کوتیکول و بافت همبند زیر کوتیکول، بافت هماتوپویتیک و غدد آنتنی محل های اصلی ویروس هستند.



شکل ۸: بافت های اصلی هدف برای تکثیر ویروس لکه سفید (Rahman, 2007)

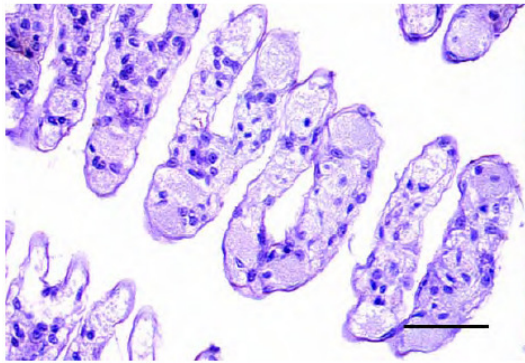
توصیه سازمان بین المللی بیماری های واگیر OIE برای پایش و جستجوی لکه سفید از طریق نمونه برداری و PCR از میگوهای بالغ و جوان می باشد (پروتکل پیشنهادی بوسیله Lo و مورد بررسی سال های ۱۹۹۶ و ۱۹۹۷). بدست آمدن نتیجه مثبت در اولین مرحله پروتکل استاندارد دلالت بر آلودگی پیشرفته و نتیجه فقط در دومین مرحله فزون سازی ۲ بر نهفته بودن آلودگی اشاره دارد. با توجه به اینکه در مراحل پروتکل PCR ماده وراثتی تشخیص داده می شود جهت اطمینان از وجود ویروس، روشهای بافت شناسی، میکروسکوپ الکترونی TEM (Reynold, 1963)، پیوندزنی با نشانگر DNA در محل<sup>۳</sup> (Nanan & Lightner, 1967) و PCR با تعیین توالی<sup>۴</sup> (Lo et al., 1997) و ایمونوهیستوشیمی<sup>۵</sup> (Poulos et al., 2001) توصیه شده است. شرح روش های حصول اطمینان از وجود لکه سفید در دستورالعمل Aquatic سال ۲۰۰۹ مربوط به OIE درج شده است.

<sup>2</sup>. amplification

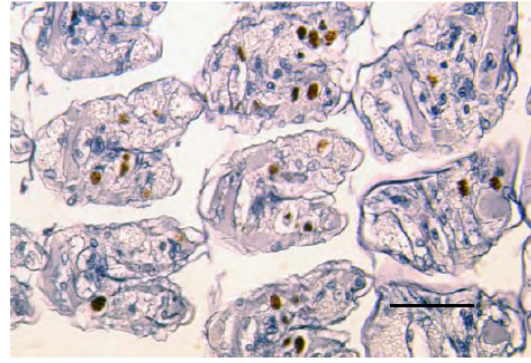
<sup>3</sup>. in situ hybridization with DNA probes

<sup>4</sup>. sequencing

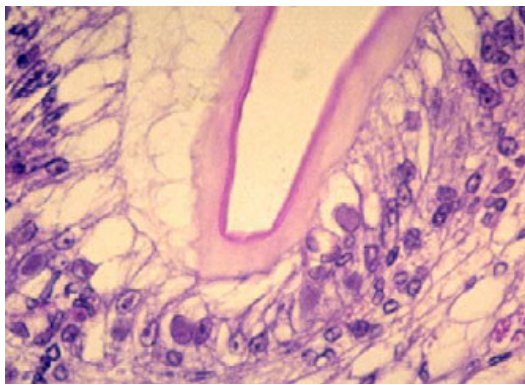
<sup>5</sup>. immunohistochemistry



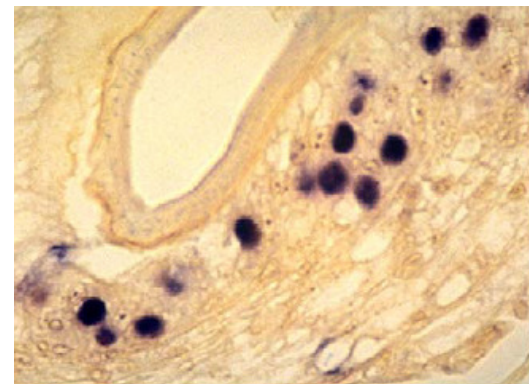
شکل ۱۰: رنگ آمیزی H&E مربوط به بافت سالم آبشش (Rahman et al., 2006)



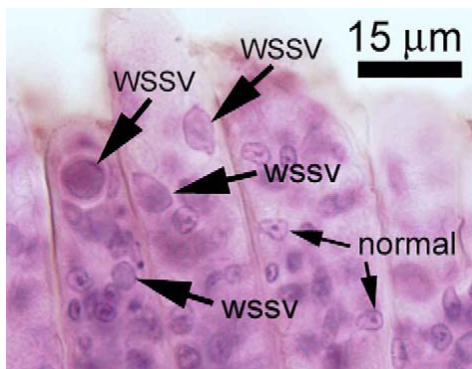
شکل ۹: سلول های آبشش wssv مثبت در آزمایش IHC (Rahman et al., 2006). (bar = 250  $\mu$ m)



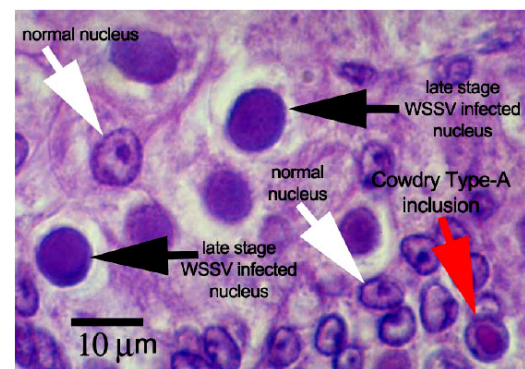
شکل ۱۲: رنگ آمیزی H&E از سری برش بافتی آلوده مربوط به شکل سمت راست (Wongteerasupaya et al., 1996).



شکل ۱۱: پیوندزنی با نشانگر DNA در محل، در سلولهای آلوده به WSSV (Wongteerasupaya et al., 1996).



شکل ۱۴: هسته های عادی و آلوده به ویروس لکه سفید در آبشش (Flegel, 2006)



شکل ۱۳: Cowdry type-A در آلودگی به لکه سفید (Flegel, 2006) (H&E)

بیماری لکه سفید میگو در میگوهای مبتلا، با تلفات سریع و علائم عمومی مشخص می‌شود که معمولاً پس از بروز اولین علائم، تلفات ۹۰-۱۰۰٪ میگوها شروع می‌شود. این بیماری عمدتاً در بین میگوهای ۱ تا ۵ گرم بروز می‌کند. علامت مشخص بیماری وجود رسوبات سفید کلسیم با قطر ۰/۵ تا ۲ میلی‌متر بر روی کاراپاس و سرسینه میگوهای آلوده می‌باشد. (Lightner, 1996 ; Wang, Y . G . et al ., 1999). لکه های سفید به راحتی و با نگاه کردن به کاراپاس در نور معمولی مشاهده می‌شوند. (Lightner, 1996) ولی در صورتیکه بیماری به صورت حاد اتفاق بیافتد لکه های مورد اشاره به خوبی توسعه نداشته و با چشم دیده نمی‌شوند و باید از استریو میکروسکوپ کمک گرفت (Kakoolaki et al., 2010 b; Kakoolaki et al ., 2011). برخی بیماریهای باکتریایی و آب با قابلیت بالا می‌توانند عامل بروز این لکه های مشابه نیز باشند (Wang Y . T . et al., 2002). در میگوهای آلوده توسعه رنگدانه‌ها مشاهده می‌شود که باعث می‌شود میگوها کمی قرمز یا تیره تر از میگوهای سالم بنظر آیند (Inouye et al., 1996). میگوهای آلوده کاهش تغذیه و افزایش بی‌حالی از خود نشان می‌دهند و ناگهانی به کف استخر سقوط کرده و می‌میرند (Lightner, 1996 ; Wang, Y . G. et al ., 1999). ویروس لکه سفید میگو می‌تواند سلولهای بافت های مزودرم و اکتودرم نظیر هموسیت ها، بافت پوششی معده، بافت همبند، بافت خونساز و بافت عضلانی قلب را آلوده کنند (Momoyama et al., 1995 ; Lightner, 1996). در میگوهای در حال مرگ تخریب بافتی همراه با گنجیدگی های بازوفیلیک کمرنگ تا زیاد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین) و هسته هیپرتروفی شده سلولهای بافت همبند و بافت پوششی کوتیکول مشاهده می‌شود. سلولهای بافت های دیگر مورد تهاجم همچون بافت پوششی غدد آنتنی و سلولهای فاگوسیت کننده مقیم در بافت قلبی می‌باشند. در مراحل اولیه بیماری لکه سفید میگو White Spote Disease (WSD) گنجیدگیهای داخل هسته ای ویروسی انوزینوفیلیک بوده و یک هاله شفاف را در زیر غشاء هسته تشکیل می‌دهد و این گنجیدگی را cowdry type A نام گذاری کرده اند که ممکن است با ویروس Infectious Hypodermal IHNV 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 می‌شود (Lightner, 1996). ممکن است لمفوئید ارگان متورم شود و نفوذ همولف به سینوس بزرگ شده خونی و فضاهای بینابینی باعث ایجاد هپاتوپانکراس زرد رنگ هیپرتروفی شده شود (Wang, C.H. et al., 1995 a). بعضی گزارشها حکایت از آن دارد که می‌توان گنجیدگی ها را با روش Squash بافت ابشش و یا بافت پوششی کوتیکول سریعاً در روش هماتوکسیلین انوزین رنگ آمیزی نمود.

#### ۸-۱- اهمیت تغذیه و کاربرد محرک‌های سیستم ایمنی در پرورش آبزیان

امروزه تلاش بسیاری از محققین در راستای تقویت میگوهای پرورشی در برابر بیماری، معطوف به تقویت و تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میگوهاست و یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر توانایی آبری برای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا وضعیت تغذیه است. بیماری‌ها معمولاً در مواقعی که آبری تحت تأثیر عوامل

استرس‌زای مختلف نظیر تغذیه نامناسب می‌باشد شیوع پیدا می‌کنند. از این رو برای بهبود وضعیت سلامتی و جلوگیری از شیوع بیماری‌ها در فعالیت‌های آبی پروری، جیره‌های غذایی مناسب مورد نیاز می‌باشند. لذا ویژگی‌های تغذیه‌ای و فیزیکی جیره‌های غذایی می‌توانند حساسیت آبی نسبت به عوامل بیماری‌زا را تعدیل کنند. بنابراین در پرورش آبزیان استفاده از جیره‌های غذایی که حاوی سطوح مغذی مناسب و ترکیبات باکیفیت هستند برای تأمین نیازهای تغذیه‌ای آبی ضروری است، همچنین استفاده از مکمل‌های افزودنی در جیره غذایی می‌تواند منجر به رشد مطلوب آبی و کاهش حساسیت نسبت به عوامل بیماری‌زا گردد (Lara-Flores et al., 2003). افزودنی‌های غذایی علاوه بر تقویت سیستم ایمنی با بهبود افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی، باعث افزایش میزان تولید و نهایتاً سوددهی بیشتر فعالیت آبی پروری می‌شوند. افزودنی‌های زیادی در جیره غذایی آبزیان استفاده می‌شوند که شامل ویتامین‌ها، هم‌بندها، آنتی‌اکسیدانت‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها و محرک‌های رشد هستند (De Silva and Anderson, 1995).

#### ۱-۸-۱- جلبک‌ها

جلبک‌ها منبعی از ترکیبات مفید و فعال زیستی هستند و تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت‌های اولیه و ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال مورد علاقه صنایع دارویی تبدیل شوند. استفاده از جلبک‌ها به عنوان ماده افزودنی در جیره غذایی آبزیان باعث بهبود شاخص‌های رشد، کیفیت بیوشیمیایی لاشه و پاسخ‌های فیزیولوژیک نسبت به استرس و بیماری می‌شود. اثرات مثبت تغذیه از جلبک‌ها به دلیل وجود فیبر، کاروتنوئیدها، جذب‌کننده‌های شیمیایی غذا، ویتامین‌ها، مواد معدنی، اثرات ترکیبی با ویتامین‌ها، جلوگیری از فرایند تجزیه شدن ویتامین‌ها و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Rodriguez-Bernaldo de Quiros et al., 2010).

**جلبک *Gracilaria corticata***

گونه جلبک قرمز گراسیلاریا با نام علمی *Gracilaria corticata* و از خانواده (*Gracilariaceae*) می‌باشد (شکل ۴-۱).

فرمانرو	Plantae
شاخه	Rhodophyta
زیرشاخه	Eurhodophytina
رده	Florideophyceae
زیررده	Rhodymeniophycidae
راسته	Gracilariales
خانواده	Gracilariaceae
جنس	Gracilaria
گونه	Corticata

**۲-۸-۱-مخمر**

مخمر موجود زنده تک‌سلولی از خانواده قارچ‌ها است که ضمن رشد و تولیدمثل، از طریق عمل تخمیر به زندگی خود ادامه می‌دهد (Tewary and Patra, 2011). یکی از راه‌های افزایش ایمنی، کاربرد تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی نظیر بتاگلوکان است که از ترکیبات سازنده دیواره سلولی باکتری‌ها و مخمر می‌باشد. تاکنون نیز تحقیقات فراوانی در این زمینه صورت گرفته و نتایج آن‌ها حاکی از افزایش بازماندگی و مقاومت میگوها در مقابل بیماری بوده است. ترکیب DV Aqua از جمله محصولات تجاری است که از متابولیت‌های حاصل از مخمر تولیدشده و اثر آن در آبزیان به صورت افزایش قدرت ایمنی در مقابل بیماری‌ها به تأیید رسیده است.



## مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*)

گونه مخمر با نام علمی *Saccharomyces cerevisiae* از خانواده *Saccharomycetaceae* می‌باشد (شکل ۱-۵).

Fungi	فرمانرو
Ascomycota	شاخه
Saccharomycotina	زیرشاخه
Saccharomycetes	رده
Saccharomycetales	راسته
Saccharomycetaceae	خانواده
Saccharomyce	جنس
Cervisiae	گونه

این مخمر، منبع مناسبی از پروتئین، اسیدهای آمینه ضروری و بسیاری از عناصر معدنی و غیر معدنی (سدیم، منیزیم، کلسیم، پتاسیم، آهن، روی، مس، کبالت، منگنز، گوگرد، فسفات، نیتروژن، ید) و نیز غنی از ویتامین‌های گروه B (بیوتین، کولین، نیاسین، اسید فولیک، اسید پانتونیک، پیریدوکسین، ریبوفلاوین و تیامین) است (Tewary and Patra, 2011). میزان انرژی قابل هضم مخمر بالاست و فسفر موجود در آن به میزان بالایی در دسترس آبیان است. مخمر، با تولید متابولیت‌های مختلف موجب افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی و بهبود هضم مواد غذایی، تحریک سیستم ایمنی، افزایش نرخ بقا و نهایتاً افزایش رشد را به دنبال دارد. تحریک تکامل دستگاه گوارش، تولید و ترشح ویتامین‌ها، مواد ضروری آنزیم‌های تجزیه‌کننده غذایی خصوصاً پروتئازها، افزایش کارایی پروتئین و کاهش ضریب تبدیل غذایی، ایجاد خواص ضد سمی در مقابل ترکیبات غذایی مضر، بهبود کلیه فاکتورهای رشد، بهبود شرایط زیستی و کاهش استرس، شرکت در تقسیم سلولی و تمایز آن‌ها، ساخت اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها مجموعه عملکردهای مخمر هستند که سبب افزایش نرخ رشد ویژه و کارایی پروتئین شده‌اند (Metwally and Elgellal, 2012).

## ۹-۱- فاکتورهای ایمنی

### ۹-۱-۱- هموسیت‌ها

هموسیت‌ها نقش بسیار مهم و کلیدی در دفاع درون بافتی ایفا می‌کنند. هموسیت‌های موجود در جریان همولنف میگوهای پناییده را می‌توان به ترتیب فراوانی به سه گروه شامل اگرانولوسیت یا فاقد دانه، گرانولوسیت متراکم و گرانولوسیت نیمه متراکم طبقه‌بندی کرد:



آگرانولوسیت (AG) کوچک‌ترین سلول‌های یافت شده در همولنف میگوهای پنائیده می‌باشند. میانگین اندازه آن‌ها ۳.۳۵ در ۴.۷۶ میکرو میلی‌متر تعیین شده است. شکل این سلول‌ها بیضوی تا کروی بوده و دارای یک هسته غیرمتراکم می‌باشند. هسته بزرگ بوده و بخش اعظم سلول را در بر گرفته و معمول بیضی شکل است. در این سلول‌ها نسبت هسته به سیتوپلاسم اغلب زیاد است. پوشش هسته در این سلول‌ها صاف و گنجیدگی‌های سیتوپلاسم بسیار اندک بوده و یا سیتوپلاسم کلاً فاقد گنجیدگی می‌باشد. برخی اوقات می‌توان شبکه آندوپلاسمی صاف یا خشن (دانه‌دار) را در این نوع هموسیت‌ها مشاهده کرد و بر این اساس می‌توان بیان کرد که سلول‌های آگرانولوسیت نشانه‌هایی از تمایز را نشان می‌دهند.

گرانولوسیت متراکم (DG) به‌طور کامل تمایز یافته و دارای گرانول‌های متراکم فراوانی هستند. این سلول‌ها اغلب بیضی شکل بوده و از سایر هموسیت‌ها بزرگ‌تر می‌باشند و میانگین اندازه آن‌ها  $5/85 \times 4/72 \mu\text{m}$  تعیین شده و هسته در این سلول‌ها بخش اعظم سیتوپلاسم را در بر گرفته و هتروکروماتین متراکمی در مجاورت غشاء هسته قابل رؤیت است. هسته ممکن است واجد اشکال متنوعی باشد. مهم‌ترین خصوصیت متمایزکننده این دسته از سلول‌ها، داشتن گرانول‌های حجیم یا متراکم می‌باشد. اندازه این گرانول‌ها بین  $0/1 \mu\text{m}$  تا  $0/56 \mu\text{m}$  متغیر است. در برخی موارد ۲ نوع گرانول، یکی گرانول‌های بسیار متراکم (G) و دیگری گرانول‌های با تراکم اندک (LG) در درون سیتوپلاسم جلب توجه می‌نماید.

گرانولوسیت نیمه متراکم (SG) را می‌توان حد واسط دو نوع سلول دیگر دانست. این دسته از سلول‌ها بیضی شکل، دوکی شکل، گاهی فاقد شکل معین هستند و میانگین اندازه آن‌ها  $7/18 \times 4/16 \mu\text{m}$  تعیین شده است. وجه تمایز این سلول‌ها از سایر گروه‌ها، حضور تعداد بسیار فراوان گرانول‌های سیتوپلاسمی در مقایسه با سلول‌های گرانولوسیت می‌باشد. این گنجیدگی‌های سیتوپلاسمی اغلب در موارد مشابه دیده شده در سلول‌های گرانولوسیت متراکم، کوچک‌تر هستند و اندازه آن‌ها اغلب در حدود  $0/43 \mu\text{m}$  می‌باشد (Lu et al., 2008).

## ۲-۹-۱- پروتئین‌های پلاسما

پروتئین‌های دفاعی که تاکنون از میگوهای خانواده پنائیده جداسازی و شناسایی شده‌اند عبارت‌اند از: پروتئین متصل شونده به  $\beta-1$  و ۳ گلوکان، پروکسی‌نکتین، بازدارنده کازال، ترانس‌گلوتامیناز، پروتئین لخته شونده و پروفنل اکسیداز.

پس از شناسایی مواد بیگانه، به‌واسطه 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.

### ۳-۹-۱- سیستم پروفنل اکسیداز (proPO system)

پروفنل اکسیداز یک پاسخ دفاعی قوی مادرزادی در مقابل اجرام غیرخودی در بدن می باشد. این سیستم در مقابل حضور عوامل بیماری زا فعال می شود. سیستم پروفنل اکسیداز شامل الگوهای شناسایی پروتئین یا (Pattern-recognition proteins) PPRS و تعداد زیادی آنزیم های تجزیه کننده پروتئین (Zymogenic proteins) و فنل اکسیداز می باشد.

### ۴-۹-۱- SOD

وقتی که پروتئین های باند کننده بتاگلوکان (BGBP) به بتا ۱ و ۳ گلوکان باند می شوند، این سیستم فعال شده و به طور اختصاصی به پروتئین های پیوندی سطح سلول (Cell-Surfaces associated protein) که سوپراکسید غیرمتغیر می باشند (SOD) (Super oxide dismutas) یا به یک سلول B integrin در سطح سلول های هموسیت از طریق فاکتور (Arg-Gly-Asp) (RGD) باند می شوند. این شناسایی موجب تحریک سلول های سمی گرانولار شده و باعث تجزیه آن ها می شود.

### ۵-۹-۱- PP0

در میان پروتئین های رها شده از این سلول ها، آنزیم پروفنل اکسیداز فعال کننده یا (proPO) Prophenol oxidase در میان پروتئین های آزاد شده و موجب فعال شدن PPA در حضور الگوهای مولکولی وابسته به عامل بیماری زا (pathogen associated molecular patterns) (PAMPS) می شود.

### ۶-۹-۱- PO

یک آنزیم با ترکیبات مس و عمل دوگانه ای می باشد که هم نقش آنزیم تیروزیناز را داشته و همچنین موجب تسریع در واکنش ملانیزه شدن می شود. ماده فنل در حضور اکسیژن، اکسید شده و به کوئینون (Quinons) تبدیل شده و این ماده باعث ایجاد ملانین می شود و این مواد خاصیت ضد میکروبی و از بین بردن ذرات عامل بیماری را دارند. در زمان فعال شدن سیستم پروفنل اکسیداز، سایر پروتئین های موجود در سیستم نیز باید فعال شوند (افشار نسب، ۱۳۸۶).

### ۱۰-۱- اهداف پروژه

- مقایسه شاخص های سلامت (تعداد سلول های هموسیت کل خون و پروتئین کل پلاسما) و آنزیم های شاخص در میگوهای پاسبید تغذیه شده با مخمر ساکارومایسس سروزیه و گروه شاهد
- مقایسه شاخص های سلامت (تعداد سلول های هموسیت کل خون و پروتئین کل پلاسما) و آنزیم های شاخص در میگوهای پاسبید تغذیه شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا و گروه شاهد

- مقایسه شاخص‌های سلامت (تعداد سلول‌های هموسیت کل خون و پروتئین کل پلاسما) و آنزیم‌های شاخص در میگوهای پاستوریزه شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا، مخمر ساکارومایسس سروزیه و واکسینه شده

#### ۱۱-۱- سوالات تحقیق

آیا تغییری در فاکتورهای ایمنی میگوهای واکسینه شده و تغذیه شده به وجود می‌آید؟

## ۲- مواد و روش کار

این مطالعه در قالب یک تحقیق تجربی در فضای کارگاهی کنترل شده ایستگاه بندر امام خمینی (ره) انجام شد. این آزمایش به منظور بررسی تأثیر واکسن بیماری لکه سفید، مخمر ساکارومایسیس سروزی و جلبک گراسیلاریا در ارتقا سیستم ایمنی میگوی پاسبید در برابر ویروس لکه سفید طراحی و اجرا گردید.

### ۲-۱- میگو

تعداد ۷۲۰ قطعه میگو با وزن متوسط  $1.0 \pm 0.2$  گرم از یک استخر پرورش میگو انتخاب و به ایستگاه بندر امام خمینی (ره) منتقل گردید. سپس میگوها به مدت ۳ تا ۵ روز در شرایط آزمایشگاهی آداپت شدند. بعد از مرحله آداپتاسیون، نسبت به غربالگری میگوها برای عدم وجود ویروس‌های ( WSSV, TSV, MBV, HPV, YHV, BP, ) (IHHNV, IMNV) و باکتری‌های ویبریو اعلامی OIE با استفاده کیت تجاری PCR IQ2000 TM اقدام شد. سپس میگوها عاری از پاتوژن‌های فوق به ۴ گروه آزمایشی تقسیم‌بندی شدند.

### ۲-۲- تیمار بندی

۱. گروه ۱ (T1): میگوهای این گروه به‌عنوان کنترل قرار داده شد که نه تیمار شدند و نه با ویروس مواجهه شدند. همزمان به یک گروه (کنترل مثبت)، واکسن داده شد ولی در معرض ویروس قرار نگرفت. در نهایت تغییرات فاکتورهای ایمنی مورد نظر در تیمار واکسینه شده مواجهه با ویروس و در تیمار کنترل مثبت (واکسینه شده) بدون مواجهه با ویروس ثبت و بررسی شد.
۲. گروه ۲ (T2): ابتدا به میزان یک گرم در کیلوگرم غذا از مخمر ساکارومایسیس سروزیه *Saccharomyces cerevisiae* برای تغذیه آماده گردید و میگوها به مدت ۱۸ تا ۲۰ روز، با آن تغذیه شدند. سپس تغییرات فاکتورهای ایمنی در تیمار مواجهه با ویروس و در تیمار بدون مواجهه ویروس بررسی گردید.
۳. گروه ۳ (T3): ابتدا جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا *Gracilaria corticata* خشک شده و به میزان ۱۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذای میگوها افزوده شد. میگوها به مدت ۱۸ تا ۲۰ روز، تغذیه شدند. سپس تغییرات فاکتورهای ایمنی را در تیمار مواجهه با ویروس و در تیمار بدون مواجهه ویروس بررسی گردید.
۴. گروه ۴ (T4): گروه واکسن، که میگوها در معرض واکسن قرار داده شدند. به ازاء هر ۱۵ تا ۲۰ گرم میگو، ۵۰ میکرولیتتر واکسن با غلظت  $LD50 = 1 \times 10^{5.4} ml^{-1}$  تلقیح شد. به منظور عمل واکسیناسیون ابتدا حجم آب تانک تا حداقل ممکن کاهش داده شد و سپس واکسن به آب اضافه گردید. بعد از ۱۰ روز، میگوهای واکسینه شده (T1) با ویروس مواجهه سازی شدند. نهایتاً در تمامی گروهها تا ۲۵ روز بعد از مواجهه سازی، علائم بالینی و مرگ و میر ثبت گردید.

علائم بالینی و تلفات از روز اول ثبت شد و تا ۲۵ روز کلیه پارامترهای آب ثبت و نسبت به نمونه گیری از همولنف و نمونه برداری برای بررسی فاکتورهای ذیل الذکر در روزهای ۱ و ۳ و ۵ و ۹ و ۱۵ و ۲۰ و ۲۵ طی دوره آزمایش اقدام شد: (Yongchun Huang et al., 2012)

- Total hemocyte count (THC)
- Total protein plasma (TPP)
- Phenoloxidase (PO) activity
- Superoxide dismutase (SOD) activity
- Peroxidase (POD) activity

### ۳-۲- آماده سازی محلولهای مورد نیاز

بافر فسفات (pH = ۶/۶):

شش حجم از 1/15 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> با چهار حجم از 1/15 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> مخلوط گردید.

محلول رنگ آمیزی May-Granwald Gimsa

۰/۲۵ گرم از پودر May-granwald را در ۱۰۰ میلی لیتر متانول خالص (Absolute Methanol) حل کرده و به مدت ۲۴ ساعت در ظرف دربسته در دمای اتاق قرار داده شد. محلول بدست آمده قبل از استفاده فیلتر گردید (Kakoolaki et al, 2013a, Kondo, 2003).

### محلول رنگ آمیزی (رنگ گیمسا):

یک میلی لیتر از محلول اصلی گیمسا (Merck) در ۱۸ میلی لیتر آب مقطر حل گردید، سپس به آن دو میلی لیتر بافر فسفات (pH= ۶/۶) اضافه شد. پس از آن ۶۶ میلی لیتر متانول خالص به محلول فوق اضافه گردید و بخوبی مخلوط شدند و محلول بدست آمده تا قبل از استفاده در دمای اتاق نگهداری شد و اندکی قبل از استفاده، فیلتر گردید (Kakoolaki et al, 2013a).

### محلول فیکساتیو برای گرفتن همولنف

هموسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی به سرعت یا تغییر شکل می دهند یا اینکه لیز می شوند. بنابراین برای جلوگیری از این اتفاق هنگام گرفتن همولنف نیاز به فیکساتیو بود. بدین منظور از فرمالین ۱۰ درصد در محلول 0.45 M NaCl استفاده گردید (Kakoolaki et al, 2013a).

### ساخت محلول ضد انعقاد (Anticoagulant)

محلول ضد انعقاد از مواد زیر تشکیل شده بود که پس از آماده سازی، pH آن با کمک سود نرمال به ۷ رسانده شد و در دمای ۴-۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Mohajeri et al. 2011).

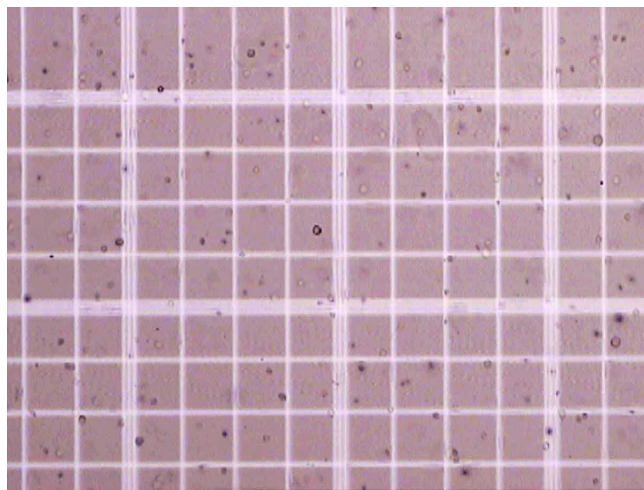
سدیم سیترات 19.3 mM، کلرید سدیم (NaCl) 239.8 mM، گلوکز 182.5 mM و ۶.۲ mM EDTA,2Na

#### ۴-۲- نمونه گیری از همولنف (Mohajeri et al, 2011; Kakoolaki et al, 2013a)

بمنظور شمارش تعداد کل هموسیت (THC) و تهیه پلاسما برای اندازه گیری پروتئین کل پلاسما (TPP) برای گرفتن همولنف از سرنگ‌های انسولین با سرسرنگ (Needle) جدا شونده، استفاده شد. برای جلوگیری از منعقد شدن همولنف به داخل هر سرنگ ۰/۸ میلی لیتر از محلول فیکساتیو آماده شده کشیده شد و سرنگ‌های آماده شده تا قبل از همولنف گیری در یخچال نگهداری شدند. همولنف از زیر اولین پای قدم زن از سینوس شکمی در اولین قطعه شکمی به میزان ۰/۲ میلی لیتر گرفته شد (شکل ۱۶) و به آرامی با محلول فیکساتور مخلوط گردید و بلافاصله به میکروتیوب شماره گذاری شده منتقل گردید و پس از کمی مخلوط کردن آرام، میکروتیوب بر روی یخ قرار داده شد تا بررسی های مربوطه متعاقباً انجام شود.

برای شمارش تعداد کل هموسیت‌ها پس از ۱۰ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر از همولنف بر روی لام هماسیتومتر قرار داده شد و پس از قرار دادن لامل بر روی لام، در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰، هموسیت‌های موجود در ۵ خانه بزرگ لام شمارش شد و میانگین آنها (A) ثبت گردیده، با توجه به میزان رقت همولنف از فرمول زیر تعداد سلول‌ها شمارش گردید.

$$X = A \times 5 \times 10^4 \times 1/\text{dilution.factor}$$



شکل شماره ۱۵: هموسیت‌های موجود در همولنف در لام نئوبار

#### ۴-۲-۵ پروتئین کل پلاسما TPP

برای اندازه گیری پروتئین کل پلاسما، نمونه‌های همولنف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۸۰۰g سانتریفوژ شدند، سپس پلاسما جدا شده و در ویالهای جدید ریخته شد و تا زمان اندازه گیری پروتئین کل در دمای ۷۰- نگهداری شدند. پروتئین کل پلاسما با استفاده از روش لوری (Lowry, 1951) اندازه گیری شد.

## ۶-۲- روش استفاده از کیت تجاری Peroxidase Activity Assay Kit و سایر آنزیم‌ها (Sigma-Alderich, USA, commercial kit)

محلول‌های کم‌حجم آزمایش سانتی‌فیوژ شده و تمام محلول‌ها به دمای اتاق رسانده شد. محلول‌های کم‌حجم می‌بایست بعد از سانتی‌فیوژ خوب مخلوط شوند.

### ۱-۶-۲- روش نورکلرومتریک

برای تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate، ۵ ml H<sub>2</sub>O و ۳۴۷ ml Assay Buffer مخلوط کرده و سپس ۱ ml Assay با کل محلول HRP positive control به خوبی در ظرف حاوی خود محلول HPR، مخلوط شد. سپس برای تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> استاندارد، ۱۲۴ میکرولیتر از محلول Assay Buffer را با ۱۰ میکرولیتر از H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate به خوبی مخلوط شد.

جهت انجام استاندارد، مقدار (a)۰، (b)۱۰، (c)۲۰، (d)۳۰، (e)۴۰، (f)۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را در چاهک‌های آزمایش ریخته و سپس با کمک محلول Assay Buffer حجم چاهک‌ها را به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. چاهک ۵۰ میکرولیتر نیاز به محلول ندارد ولی مابقی به ترتیب ۱۰ میکرولیتر برای صفر، ۴۰ برای ۱۰، ۳۰ برای ۲۰، ۲۰ برای ۳۰، ۱۰ برای ۴۰ و ۵۰ که نیاز به اضافه کردن محلول ندارد. خانه C (محلول ۲۰ میکرولیتر تکرار شده در خانه g). سپس طبق جدول ۱ کاتالوگ ۲ میکرولیتر از محلول Fluorescent Peroxidase Substrate و ۴۸ میکرو لیتر از محلول HPR P.C. به همه چاهک‌های تست استاندارد اضافه گردید. با اضافه کردن محلول‌های مذکور، تغییر رنگ محلول‌ها مشاهده شد و همگی صورتی شدند. پس از گذشت ۵ دقیقه، چاهک‌ها درون دستگاه قرار داده شد. بعد از این، ۲ میکرولیتر از محلول F.P.S. در تمام چاهک‌های آزمایش ریخته شد و سپس مقدار ۲ میکرو لیتر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate نیز به چاهک‌ها اضافه گردید و بعد از آن ۴۶ میکرولیتر از محلول Assay Buffer به چاهک‌ها اضافه شد. در مرحله بعدی، ۵۰ میکرولیتر از سرم (نمونه همولنف) را به هر چاهک اضافه گردید و بعد از ۳ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، درون دستگاه قرار داده شد. لازم به ذکر است که بعد از هر ۳ دقیقه تا ۱۲ دقیقه اقدام به قرائت گردید (Sigma-Alderich, USA, commercial kit)

Peroxidase: محلول‌ها از دمای ۲۰ درجه سانتی گراد خارج و در دمای اتاق، دور از نور و رطوبت قرار داده شد تا به دمای محیط برسد.

آب اکسیژنه ۰/۸۸ مولار به مقدار ۵ میکرولیتر را با ۳۴۷ میکرولیتر محلول بافر به خوبی مخلوط شده و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (قابلیت استفاده تا یک ماه).

HRP کنترل مثبت، در یک میلی‌لیتر از محلول بافر خیس‌انده و با پیت خوب مخلوط شد. سپس به دو قسمت مساوی تقسیم شده و در ۲۰- درجه سانتی گراد تا یک ماه نگهداری و مصرف شد.

\* نکته: تمام نمونه‌ها و استانداردها باید دو نمونه‌ای یا دوتایی انجام شود.

محلول استاندارد آب اکسیژنه (روش رنگ‌سنجی): ۱۰ میکرولیتر از آب اکسیژنه با ۱۲۴۰ میکرولیتر از محلول بافر مخلوط گردید تا محلول استاندارد ۰/۱ میلی مولار آماده شود. سپس مقادیر ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر

از محلول استاندارد در پلت ۹۶ چاهک دار قرار داده شد تا بلانک (Blank) ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ nmol/well ساخته شود. سپس هر یک، با بافر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.

محلول استاندارد H<sub>2</sub>O برای روش فلورومتريک: طبق روش ساخت محلول ۰/۱ میلی مول استاندارد در قسمت قبلی، آماده گردید. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از آن برداشته و با ۹۰۰ میکرو لیتر بافر مخلوط شد تا محلول ۰/۱ میلی مول ساخته شود. سپس مقادیر ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرو لیتر از محلول استاندارد ۰/۱ میلی مول در پلت ۹۶ چاهک دار قرار داده شد تا بلانک (Blank) ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ nmol/well ساخته شود. سپس هر یک، با بافر به حجم ۵۰ میکرو لیتر رسانده شد.

نمودار استاندارد: نمودار استاندارد واکنش مخلوط (Standard curve Reaction Mix) (۲ میکرو لیتر Fluorescent Peroxidase Substrate و ۴۸ میکرو لیتر HRP positive control) تهیه گردید. درون چاهک نمودار استاندارد مقدار ۵۰ میکرو لیتر محلول واکنشی استاندارد ریخته شد و در دمای محیط اتاق خوب مخلوط گردید. برای رنگ سنجی، میزان جذب با طول موج ۵۷۰ نانومتر و برای فلورومتريک میزان تراکم گردید.

آماده سازی نمونه: برای هر دو روش رنگ سنجی و Fluo نیاز به ۵۰ میکرو لیتر از نمونه می باشد که در هر چاهک واکنشی ریخته شد. سپس ۱۰ میلی گرم یا سلول (۱×۱۰<sup>۶</sup>)، به آرامی با ۱۰۰-۲۰۰ میکرو لیتر محلول بافر هموژنیزه مخلوط و با دور ۱۵۰۰ دور به ازای هر گرم، برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. (برای نمونه های ناشناس مقادیر متغیری از حجم نمونه باید آزمایش شود تا از استاندارد سازی آن مطمئن گردد).

حجم محلول نمونه ها با محلول بافر به ۵۰ میکرو لیتر رسانده شد (برای نمونه های سرم شکل (بدون مواد نامحلول) را می توان مستقیم به چاهک پلت اضافه نمود). مقدار ۱ تا ۵۰ میکرو لیتر از نمونه به چاهک پلت ۹۶ اضافه کرده و محلول نهایی محلول را در چاهک به ۵۰ میکرو لیتر رسانیده شد. برای نمونه کنترل مثبت (اختیاری است)، مقدار ۱ میکرو لیتر از محلول کنترل مثبت درون چاهک ریخته و حجم بافر به ۵۰ میکرو لیتر رسانده شد.

مقدار ۵۰ میکرو لیتر از محلول اصلی واکنشی (Master reaction mix) (۴۶ میکرو لیتر محلول بافر + ۲ میکرو لیتر Fluorescent Peroxidase + ۲ میکرو لیتر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12/5Mm) را در چاهک هر نمونه و کنترل مثبت ریخته شد و با کمک حرکت افقی و پیپت، به خوبی مخلوط شد. سپس پلت چاهک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از ۳ دقیقه اندازه گیری گردید. برای روش رنگ سنجی، میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد و برای روش فلورومتريک به شرح زیر عمل گردید:  $FLU_{initial} \lambda_{ex}=535/\lambda_{em}=585 \text{ nm}$  در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای اندازه گیری (A570 or FLU) با فاصله ۲ تا ۳ دقیقه قرار داده شد (در این حالت پلت باید دور از نور باشد). اندازه گیری ها ادامه یافت تا حجم نمونه فعال بیشتر از ارزش بالاترین استاندارد (رنگ سنجی ۵nmol در چاهک یا روش 500pmol/welfluo) شد (در این زمان بیشترین نمونه فعال نزدیک و یا معادل دامنه نمودار استاندارد می باشد). اندازه گیری نهایی برای محاسبه آنزیم فعال، در مرحله ماقبل آخر یا final (A570) or FULL final خوانده شد (Sigma-Aldrich, USA, commercial kit).



تذکر: ضروری است اندازه‌گیری نهایی در آخر دامنه نمودار خطی از نمودار استاندارد باشد. آماده‌سازی نمونه لMF: نمونه به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰ به ازای هر گرم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و پلاسما بدون ایجاد اختلاط در لایه‌های رسوب جداسازی شد و به تیوب جدید منتقل و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نمونه نگهداری شد. سپس لایه خشی از روی قسمت قرمز رنگ پلت برداشته شد و محلول هموسیت ها در ۵ حجم آب خیلی سرد دو بار تقطیر شده، محلول شد و به ازای هر گرم، ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، درون محفظه هموسیت-پلت سانتریفیوژ گردید. قسمت بالای محلول را در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای آنالیز آماده شود (پلاسما ممکن است ۳-۱۰ بار رقیق شود و سلول‌های قرمز لیز شده ممکن است تقریباً ۱۰ بار تا قبل از آزمایش و سنجش SOD رقیق گردد).

## ۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در ابتدا شرط نرمال بودن داده‌ها با آزمون آماری اسمیرنوف کولموگراف و همگنی واریانس‌ها به وسیله آزمون Leven تست شد. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA Two Way) استفاده شد، سپس وجود تفاوت معنی‌دار در داده‌های به دست آمده در سطح احتمال  $(p \leq 0/05)$  به کمک پس آزمون Dancan، بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

## ۲-۸- عصاره‌گیری از جلبک

برای این منظور مراحل زیر انجام شد:

۱- جلبک موردنظر در ظروف و کیسه‌های پلاستیکی تمیز جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس با آب جاری شسته شد و بر روی نایلون تمیزی که از قبل در آزمایشگاه پهن شده بود به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. لازم به ذکر است که با توجه به وجود ترکیبات سرب در روزنامه‌های موجود و امکان ایجاد خطا در آزمایش، جلبک‌های جمع‌آوری شده پس از شستشو، به‌منظور خشک شدن، بر روی نایلون قرار داده شدند.

در مرحله بعد از روش اسیدی به‌منظور استخراج عصاره جلبک استفاده شد. لذا در ابتدا با استفاده از آسیاب برقی جلبک‌های خشک شده آسیاب شدند. هدف از این کار بالا بردن تأثیر اسید کلریدریک (HCl) بر روی دیواره سلول‌های جلبکی بود. از این رو بعد از توزین نمودن ۲۰ گرم جلبک خشک شده ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به آن اضافه شد. سپس سوسپانسیون حاصل را به مدت ۱۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۹۵°C قرار داده شد. بعد از سپری شدن زمان مذکور با استفاده از فیلتر مکشی ۶ با چشمه ۵۰۰ - ۴۵۰ میکرون سوسپانسیون

فوق فیلتر شد. به منظور خنثی سازی حالت اسیدی از سود ۰/۵ مولار (NaOH) استفاده شد. در نهایت با استفاده از سانتریفوژ دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سوسپانسیون فوق سانتریفوژ شد که پس از جداسازی فاز رویی دو برابر حجم آن الکل اتانول اضافه شد. گفتمنی است که پس از اضافه نمودن اتانول مواد معلق موجود در سوسپانسیون در ته ظرف به صورت زنجیره ای رسوب نمودند (شکل ۳-۱) که در ادامه با جداسازی آنها و قرار دادن در جه حرارت ۴۰C - ۳۰ خشک و آسیاب شدند (Shiroma et al., 2008).

### ۳- نتایج

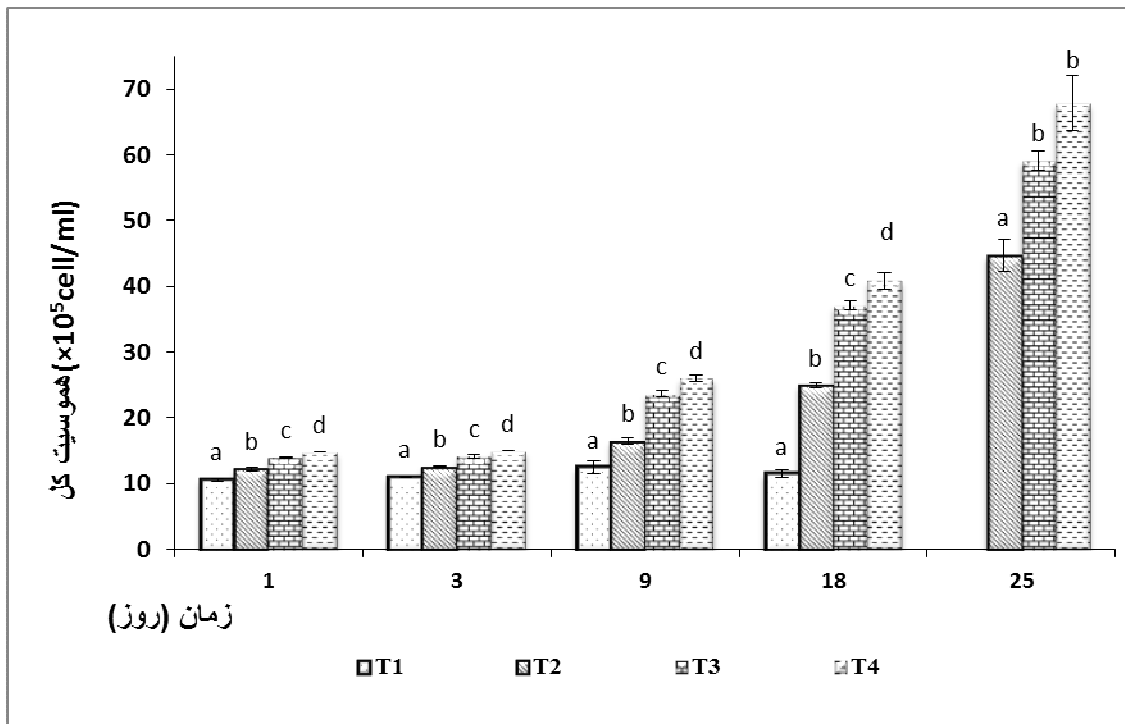
#### ۳-۱- هموسیت کل (Total hemocyte count (THC)

بر اساس نتایج بدست آمده (جدول ۳-۱)، تعداد سلول‌های هموسیت کل خون میگوهای پاسبید در طول دوره آزمایشی (شکل ۳-۱) و در تمام تیمارهای آزمایشی دارای روندی افزایشی معنی دار بود ( $P < 0/05$ ) و بیشترین در تیمار واکسینه شده با واکسن لکه سفید و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۳-۳). لازم به ذکر است که تعداد سلول‌های هموسیت کل خون در تیمار تغذیه شده با جلبک نسبت به تیمار تغذیه شده با مخمر افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۳-۲). بر اساس نتایج آزمایش، سلول‌های هموسیت کل خون در تیمارهای آزمایشی مختلف پس از مواجهه با ویروس روندی مشابه قبل از مواجهه با ویروس داشتند (شکل ۲) با این تفاوت که اگر چه تعداد هموسیت‌ها در تیمار تغذیه شده با جلبک از تیمار تغذیه شده با مخمر بیشتر بود ولی به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ).

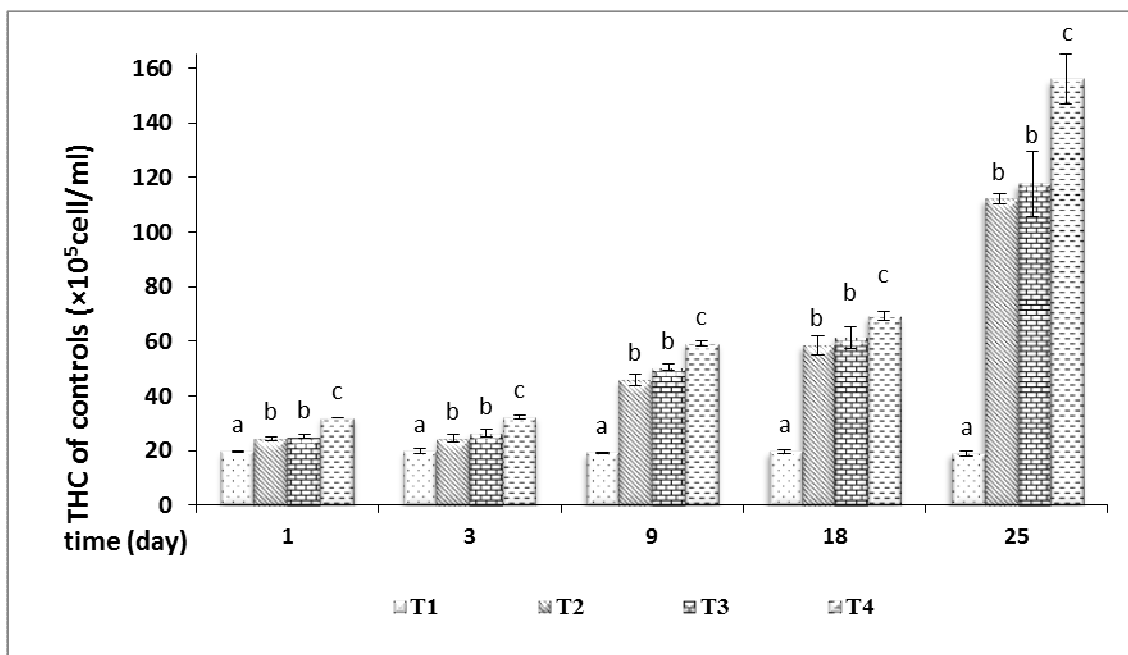
#### جدول ۳-۱: نتایج حاصل از بررسی تعداد سلول‌های هموسیت کل خون میگوهای پاسبید در تیمارهای آزمایشی مختلف در روزهای مختلف (قبل از مواجهه)

تیمار / روز	شاهد	تغذیه شده با مخمر	تغذیه شده با جلبک	واکسینه با واکسن لکه سفید
۱	۱۰۶۰۲۹۲±۱۹۳۶۹ <sup>a</sup>	۱۲۲۱۸۱۱±۳۴۰۰۱ <sup>b</sup>	۱۴۰۰۰۰۲±۷۰۰۰ <sup>c</sup>	۱۴۸۱۵۷۴±۵۲۵ <sup>d</sup>
۳	۱۱۰۰۵۵۰±۱۰۰۵ <sup>a</sup>	۱۲۵۵۷۷۴±۱۴۶۳۵ <sup>b</sup>	۱۴۲۰۱۸۹±۳۳۴۱۶ <sup>c</sup>	۱۴۹۸۴۵۱±۱۶۰۴ <sup>d</sup>
۹	۱۴۳۸۳۳۳±۴۷۹۸۷ <sup>a</sup>	۱۶۴۷۵۸۰±۵۱۳۷۶ <sup>b</sup>	۲۳۶۶۸۴۰±۵۲۰۵۸ <sup>c</sup>	۲۶۰۵۴۷۹±۵۴۳۱۶ <sup>d</sup>
۱۸	۲۰۱۶۶۶۷±۴۴۰۹۶ <sup>a</sup>	۲۴۹۷۷۷۸±۳۹۶۴۴ <sup>b</sup>	۳۷۰۸۳۳۳±۶۵۰۸۵ <sup>c</sup>	۴۰۹۰۳۴۳±۱۲۶۹۷۹ <sup>d</sup>
۲۵	۳۱۶۷۵۶۷±۴۸۸۶۵ <sup>a</sup>	۴۴۶۶۷۸۳±۲۴۱۱۴۷ <sup>b</sup>	۵۹۱۱۳۴۳±۱۴۴۶۵ <sup>c</sup>	۶۷۸۵۷۷۷±۴۱۶۸۲۱ <sup>d</sup>
<b>پس از مواجهه با ویروس</b>				
۱	۱۹۵۳۱۲۵±۱۳۱۰۶ <sup>a</sup>	۲۴۲۹۷۷۰±۶۱۰۱۰ <sup>b</sup>	۲۵۰۹۱۷۵±۶۸۸۳۵ <sup>b</sup>	۳۲۰۳۱۹۵±۷۱۶۲ <sup>c</sup>
۳	۱۹۷۲۹۰۶±۹۷۲۴۸ <sup>a</sup>	۲۴۵۸۸۸۹±۱۲۳۲۹۳ <sup>b</sup>	۲۶۳۸۱۶۷±۱۲۵۸۰۴ <sup>b</sup>	۳۲۴۱۸۰±۶۸۱۴۶ <sup>c</sup>
۹	۳۶۶۵۶۷۸±۱۳۴۲۲۰ <sup>a</sup>	۴۵۹۰۶۶۷±۲۰۷۷۷۱ <sup>b</sup>	۵۰۳۸۰۹۵±۱۲۱۵۹۲ <sup>b</sup>	۵۹۲۶۹۷۷±۱۰۴۷۸۱ <sup>c</sup>
۱۸	۵۰۲۷۱۶۷±۱۸۵۱۲۳ <sup>a</sup>	۵۸۶۳۳۳۳±۳۴۸۵۳۷ <sup>b</sup>	۶۱۵۴۱۶۷±۳۹۷۴۷ <sup>b</sup>	۶۹۳۰۳۰۰±۱۶۰۸۱۴ <sup>c</sup>
۲۵	۶۰۳۹۰۰۰±۲۳۹۵۵۲ <sup>a</sup>	۱۱۲۲۱۰۳۱±۱۹۶۹۴۹ <sup>b</sup>	۱۱۷۷۱۶۶۷±۱۱۹۷۰۳۲ <sup>b</sup>	۱۵۵۹۰۶۶۷±۸۹۸۵۲۴ <sup>c</sup>

(میانگین ± خطای استاندارد) با ۳ تکرار \*حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ( $P < 0/05$ ).



شکل ۱-۳ - هموسیت کل ( $\times 10^5$  cell/ml) پس از مواجهه با ویروس در غلظت های متفاوت



۳-۲ - هموسیت کل پس از مواجهه ( $10^5$  cell/ml). داده های با حروف متفاوت اختلاف معنی داری دارند

### ۳-۲- شاخص پروتئین کل پلاسما

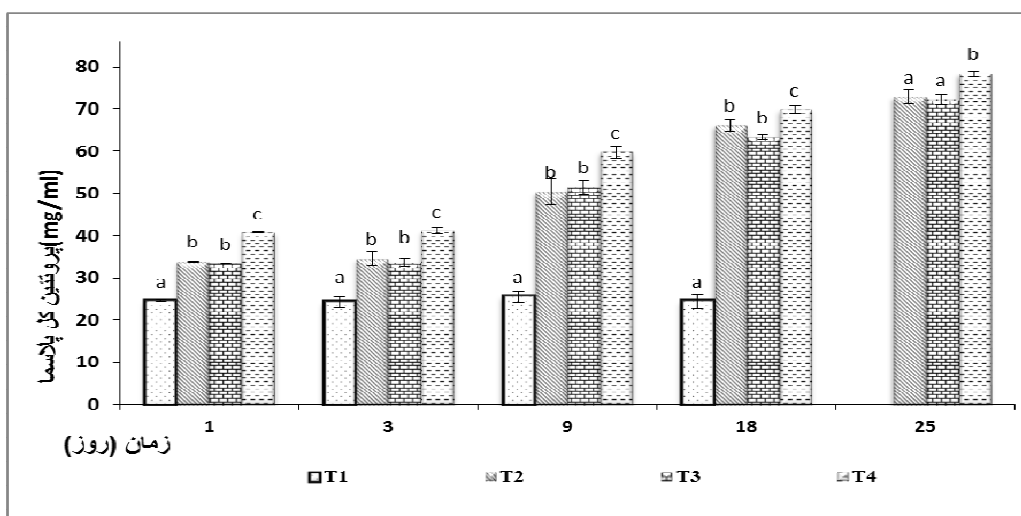
بر اساس نتایج بدست آمده، میزان پروتئین کل پلاسما خون میگوهای پاسفید در طول دوره آزمایشی و در تمام تیمارهای آزمایشی دارای روندی افزایشی معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) و بیشترین در تیمار واکسینه شده با واکسن لکه سفید و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۳-۳ و ۳-۴). لازم به ذکر است با این وجود که

پروتئین کل پلاسما در تیمار تغذیه شده با مخمر نسبت به تیمار تغذیه شده با جلبک بیشتر بود ولی به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید ( $P>0/05$ ). بر اساس نتایج آزمایش، پروتئین کل پلاسما خون در تیمارهای آزمایشی مختلف پس از مواجهه با ویروس روندی مشابه قبل از مواجهه با ویروس داشتند ( $P<0/05$ ) با این تفاوت که پروتئین کل پلاسما خون در تیمار تغذیه شده با جلبک از تیمار تغذیه شده با مخمر بیشتر بود ولی باز هم به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید ( $P>0/05$ ).

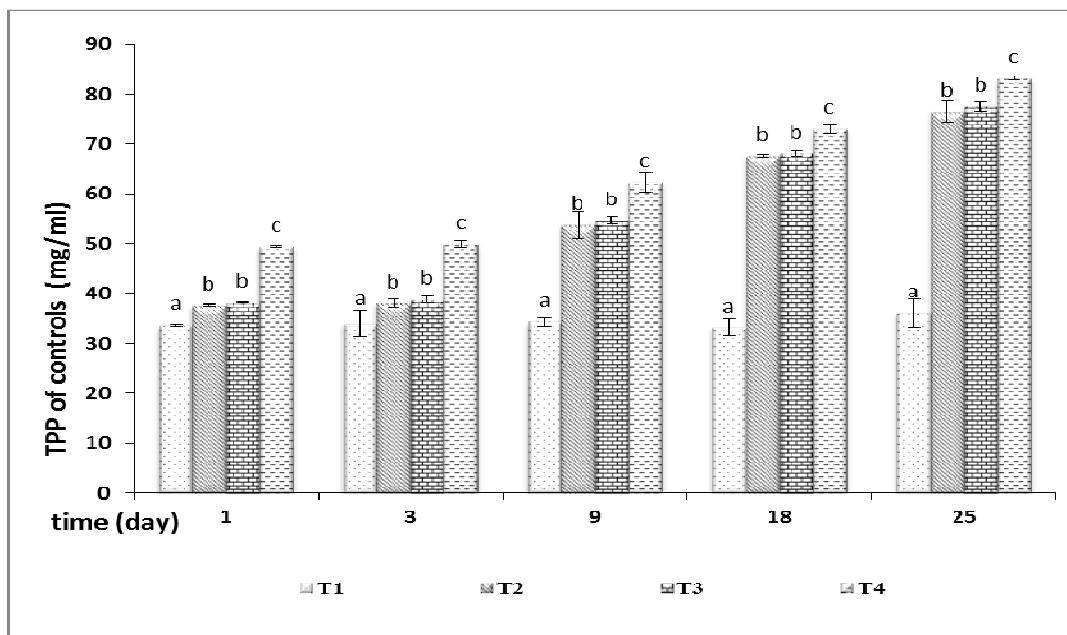
جدول ۳-۲: نتایج حاصل از بررسی میزان پروتئین کل پلاسمای خون میگوهای پاسفید در تیمارهای آزمایشی مختلف در روزهای مختلف پیش از مواجهه (mg/ml)

تیمار / روز	شاهد	تغذیه شده با جلبک	تغذیه شده با مخمر	واکسینه با واکسن لکه سفید
پس از مواجهه با ویروس	۱	۳.۳۴±۰.۰۱ <sup>b</sup>	۳.۳۹±۰.۰۲ <sup>b</sup>	۴.۰۷±۰.۰۱ <sup>c</sup>
	۳	۳.۳۶±۰.۱۰ <sup>b</sup>	۳.۴۶±۰.۱۶ <sup>b</sup>	۴.۱۱±۰.۰۷ <sup>c</sup>
	۹	۵.۱۵±۰.۱۵ <sup>b</sup>	۵.۰۴±۰.۳۱ <sup>b</sup>	۵.۹۸±۰.۱۶ <sup>c</sup>
	۱۸	۶.۳۳±۰.۰۵ <sup>b</sup>	۶.۶۱±۰.۱۴ <sup>b</sup>	۶.۹۹±۰.۰۹ <sup>c</sup>
	۲۵	۷.۲۲±۰.۱۴ <sup>b</sup>	۷.۲۸±۰.۱۸ <sup>b</sup>	۷.۸۳±۰.۰۶ <sup>c</sup>
قبل از مواجهه با ویروس	۱	۳.۸۲±۰.۰۲ <sup>b</sup>	۳.۷۷±۰.۰۱ <sup>b</sup>	۴.۹۵±۰.۰۲ <sup>c</sup>
	۳	۳.۸۸±۰.۰۷ <sup>b</sup>	۳.۸۱±۰.۰۸ <sup>b</sup>	۴.۹۹±۰.۰۶ <sup>c</sup>
	۹	۵.۴۶±۰.۰۸ <sup>b</sup>	۵.۴۸±۰.۲۷ <sup>b</sup>	۶.۲۳±۰.۲۰ <sup>c</sup>
	۱۸	۶.۸۰±۰.۰۷ <sup>b</sup>	۶.۷۶±۰.۰۳ <sup>b</sup>	۷.۳۰±۰.۰۹ <sup>c</sup>
	۲۵	۷.۷۵±۰.۰۹ <sup>b</sup>	۷.۶۵±۰.۲۱ <sup>b</sup>	۸.۳۲±۰.۰۴ <sup>c</sup>

(میانگین ± خطای استاندارد) با ۳ تکرار \*حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ( $P<0/05$ ).



۳-۳ - پروتئین کل پلاسما (mg/ml) قبل از مواجهه با ویروس در تیمارهای مختلف در طول مطالعه



۳-۴ پروتئین کل پلاسما پس از مواجهه با ویروس mg/ml. مطالعه.

داده های با حروف متفاوت اختلاف معنی داری دارند.

### ۳-۳ شاخص فعالیت آنزیم پرواکسیداز

بر اساس نتایج آزمایش، میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز در تیمارهای آزمایشی مختلف پس از مواجهه با ویروس روند افزایشی معنی داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳-۶). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز (۳-۵ و ۳-۶) در تیمار واکسینه شده با واکسن لکه سفید و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید. لازم به ذکر است که اگر چه میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز در تیمار تغذیه شده با جلبک از تیمار تغذیه شده با مخمر بیشتر بود ولی به لحاظ آماری اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ).

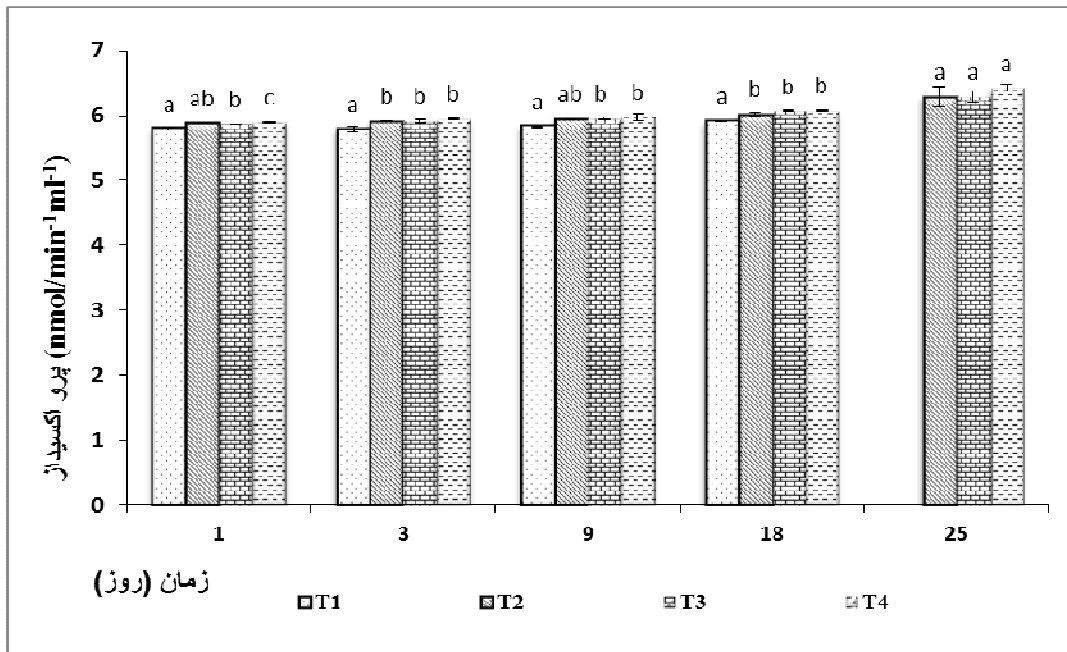
### جدول ۳-۳: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز میگوهای پاسفید

در تیمارهای آزمایشی مختلف در روزهای مختلف قبل از مواجهه

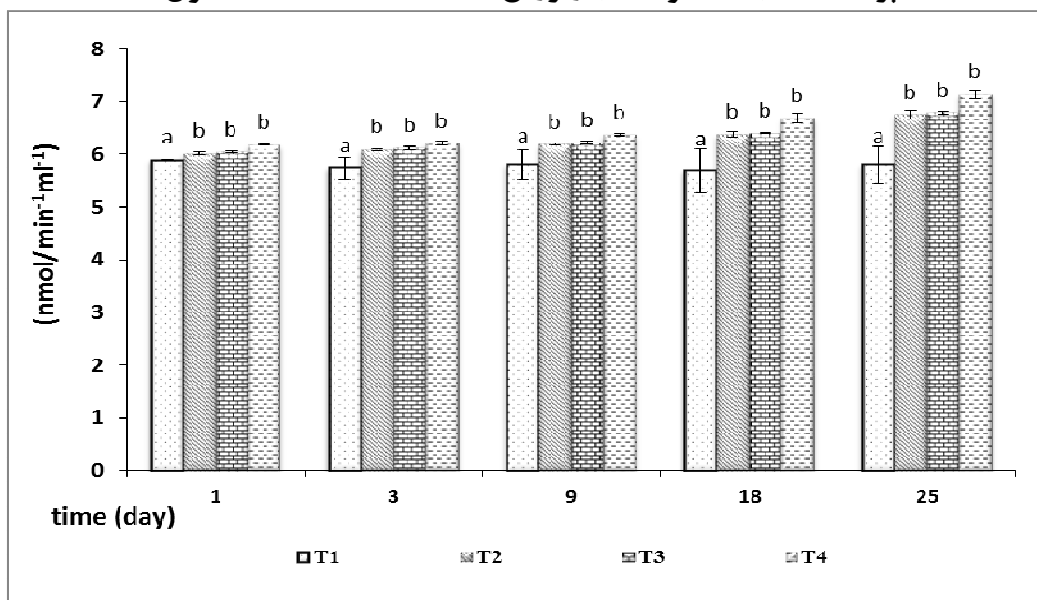
روز	تیمار	شاهد	تغذیه شده با مخمر	تغذیه شده با جلبک	واکسینه با واکسن لکه سفید
قبل از مواجهه	۱	۵.۸۰±۰.۰۱ <sup>a</sup>	۵.۸۹±۰.۰۰ <sup>b</sup>	۵.۸±۰.۰۰ <sup>b</sup>	۵.۹۰±۰.۰۱ <sup>b</sup>
	۳	۵.۸۲±۰.۰۱ <sup>a</sup>	۵.۹۲±۰.۰۱ <sup>b</sup>	۵.۹۱±۰.۰۳ <sup>b</sup>	۵.۹۵±۰.۰۱ <sup>b</sup>
	۹	۵.۸۴±۰.۰۱ <sup>a</sup>	۵.۹۴±۰.۰۰ <sup>b</sup>	۵.۹۵±۰.۰۲ <sup>b</sup>	۵.۹۸±۰.۰۶ <sup>b</sup>
	۱۸	۵.۹۴±۰.۰۱ <sup>a</sup>	۶.۰۲±۰.۰۳ <sup>b</sup>	۶.۰۶±۰.۰۱ <sup>b</sup>	۶.۰۷±۰.۰۲ <sup>b</sup>
	۲۵	۵.۹۷±۰.۰۲ <sup>a</sup>	۶.۲۸±۰.۱۵ <sup>b</sup>	۶.۲۹±۰.۰۸ <sup>b</sup>	۶.۴۲±۰.۰۵ <sup>b</sup>
پس از مواجهه با ویروس					
پس از مواجهه	۱	۵.۹۰±۰.۰۲ <sup>a</sup>	۶.۰۲±۰.۰۳ <sup>b</sup>	۶.۰۵±۰.۰۲ <sup>b</sup>	۶.۱۸±۰.۰۰ <sup>c</sup>
	۳	۵.۹۴±۰.۰۱ <sup>a</sup>	۶.۰۹±۰.۰۲ <sup>b</sup>	۶.۱۲±۰.۰۳ <sup>b</sup>	۶.۲۱±۰.۰۴ <sup>c</sup>

واکسینه با واکسن لکه سفید	تغذیه شده با جلبک	تغذیه شده با مخمر	شاهد	تیمار / روز
$6.37 \pm 0.02^c$	$6.22 \pm 0.02^b$	$6.19 \pm 0.02^b$	$6.05 \pm 0.03^a$	۹
$6.68 \pm 0.09^c$	$6.40 \pm 0.01^b$	$6.37 \pm 0.05^b$	$6.09 \pm 0.01^a$	۱۸
$7.14 \pm 0.08^c$	$6.79 \pm 0.04^b$	$6.75 \pm 0.09^b$	$6.15 \pm 0.01^a$	۲۵

(میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) با ۳ تکرار \*حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ( $P < 0.05$ ).



۳-۵- پر اکسیداز بعد از مواجهه با ویروس در تیمارهای مختلف در طول مطالعه



۳-۶- پر اکسیداز پس از مواجهه با ویروس (nmol/min<sup>-1</sup>. ml<sup>-1</sup>)

داده‌های با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری دارند

### ۴-۳- شاخص فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

بر اساس نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز میگوهای پاسفید در طول دوره آزمایش و در تمام تیمارهای آزمایشی دارای روند افزایشی معنی دار بود ( $P < 0/05$ ) و بیشترین در تیمار واکسینه شده با واکسن لکه سفید و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۳-۷ و ۳-۸) لازم به ذکر است با این وجود که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار تغذیه شده با جلبک نسبت به تیمار تغذیه شده با مخمر بیشتر بود ولی به لحاظ آماری اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ). بر اساس نتایج آزمایش، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای آزمایشی مختلف پس از مواجهه با ویروس روندی مشابه قبل از مواجهه با ویروس داشت ( $P < 0/05$ ) (شکل ۴-۱۸).

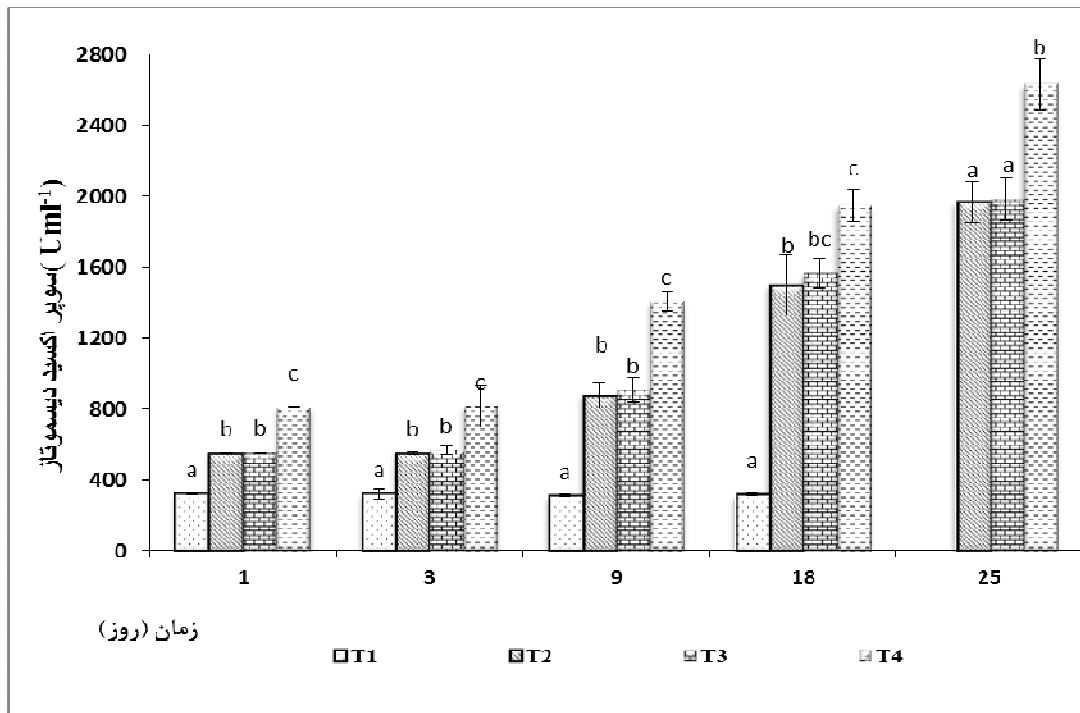
جدول ۴-۳: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز میگوهای پاسفید در تیمارهای

آزمایشی مختلف در روزهای مختلف قبل از مواجهه ( $uml^{-1}$ )

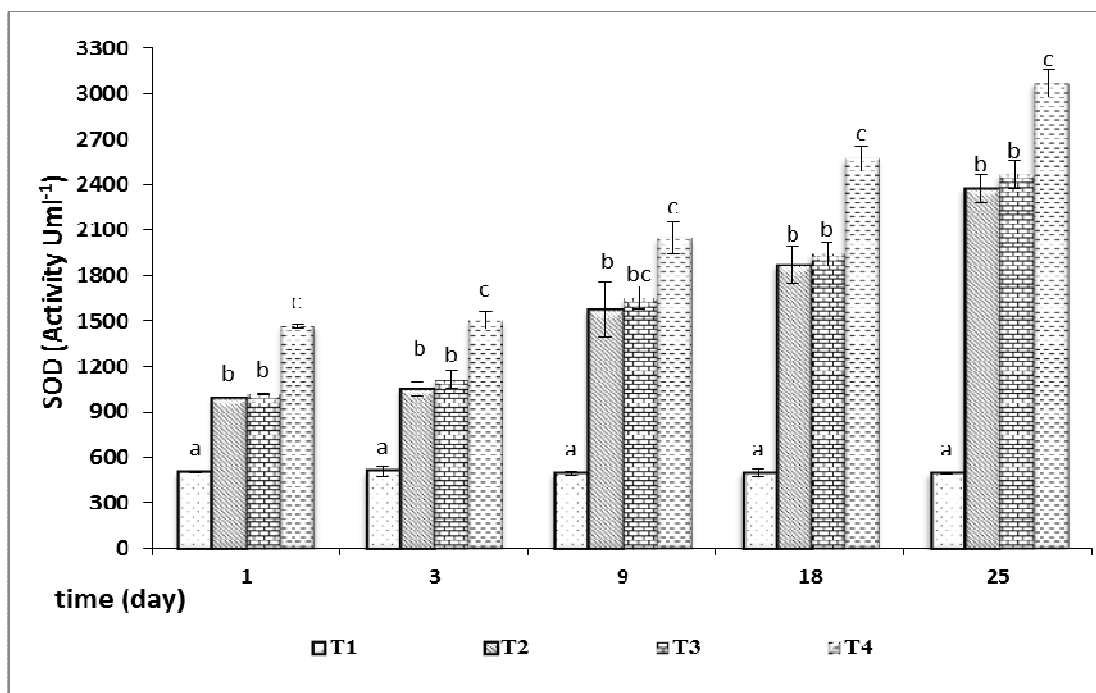
تیمار / روز	شاهد	تغذیه شده با مخمر	تغذیه شده با جلبک	واکسینه با واکسن لکه سفید
۱	۳۱۹.۵۴±۲۰.۹ <sup>a</sup>	۵۵۰.۸۲±۱۰.۶ <sup>b</sup>	۵۵۴.۶۱±۰.۵۳ <sup>b</sup>	۸۱۰.۸۳±۱.۵۱ <sup>c</sup>
۳	۳۲۳.۳۳±۲۸.۴۸ <sup>a</sup>	۵۵۳.۳۳±۸.۸۲ <sup>b</sup>	۵۷۰.۰۰±۲۰.۸۲ <sup>b</sup>	۸۱۶.۶۷±۱۱۶.۶۷ <sup>c</sup>
۹	۴۶۳.۳۳±۳۴.۸۰ <sup>a</sup>	۸۷۶.۶۷±۶۷.۴۱ <sup>b</sup>	۹۰۶.۶۷±۶۹.۸۴ <sup>b</sup>	۱۴۰۶.۶۷±۵۲.۰۷ <sup>c</sup>
۱۸	۷۴۶.۶۷±۴۹.۱۰ <sup>a</sup>	۱۵۰۰.۰۰±۱۷۳.۲۱ <sup>b</sup>	۱۵۶۶.۶۷±۸۸.۱۹ <sup>b</sup>	۱۹۵۰.۰۰±۸۶.۶۰ <sup>c</sup>
۲۵	۱۱۳۳.۳۳±۱۲۰.۱۹ <sup>a</sup>	۱۹۶۶.۶۷±۱۲۰.۱۹ <sup>b</sup>	۱۹۸۳.۳۳±۱۱۶.۶۷ <sup>b</sup>	۲۶۳۳.۳۳±۱۴۵.۳۰ <sup>c</sup>
<b>پس از مواجهه با ویروس</b>				
۱	۵۰۳.۹۷±۲۰.۹۱ <sup>a</sup>	۹۹۶.۵۵±۱۰.۶۹ <sup>b</sup>	۱۰۱۷.۴۵±۲۸.۰ <sup>b</sup>	۱۴۶۹.۰۸±۱۰.۳۷ <sup>c</sup>
۳	۵۱۰.۰۰±۳۲.۱۵ <sup>a</sup>	۱۰۵۳.۳۳±۵۰.۴۴ <sup>b</sup>	۱۱۱۶.۶۷±۶۰.۰۹ <sup>b</sup>	۱۵۰۶.۶۷±۵۸.۱۲ <sup>c</sup>
۹	۸۳۰.۰۰±۳۴.۶۴ <sup>a</sup>	۱۵۷۶.۶۷±۱۸۱.۱۴ <sup>b</sup>	۱۶۵۰.۰۰±۷۶.۳۸ <sup>b</sup>	۲۰۵۰.۰۰±۱۰۴.۰۸ <sup>c</sup>
۱۸	۱۲۳۳.۳۳±۸۸.۱۹ <sup>a</sup>	۱۸۶۶.۶۷±۱۲۰.۱۹ <sup>b</sup>	۱۹۴۳.۳۳±۸۰.۹۰ <sup>b</sup>	۲۵۷۳.۳۳±۸۱.۹۲ <sup>c</sup>
۲۵	۱۸۰۶.۶۷±۶۳.۶۰ <sup>a</sup>	۲۳۷۳.۳۳±۹۳.۳۳ <sup>b</sup>	۲۴۶۶.۶۷±۸۸.۱۹	۳۰۶۶.۶۷±۸۸.۱۹ <sup>c</sup>

(میانگین ± خطای استاندارد) با ۳ تکرار \* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است ( $P < 0/05$ ).





۳-۷- سوپر اکسید دیسموتاز (Uml<sup>-1</sup>) بعد از مواجهه با ویروس در تیمارهای مختلف در طول مطالعه



۳-۸- سوپر اکسید دیسموتاز تیمارهای مواجهه داده شده با ویروس .  
مطالعه داده های با حروف متفاوت اختلاف معنی داری دارند

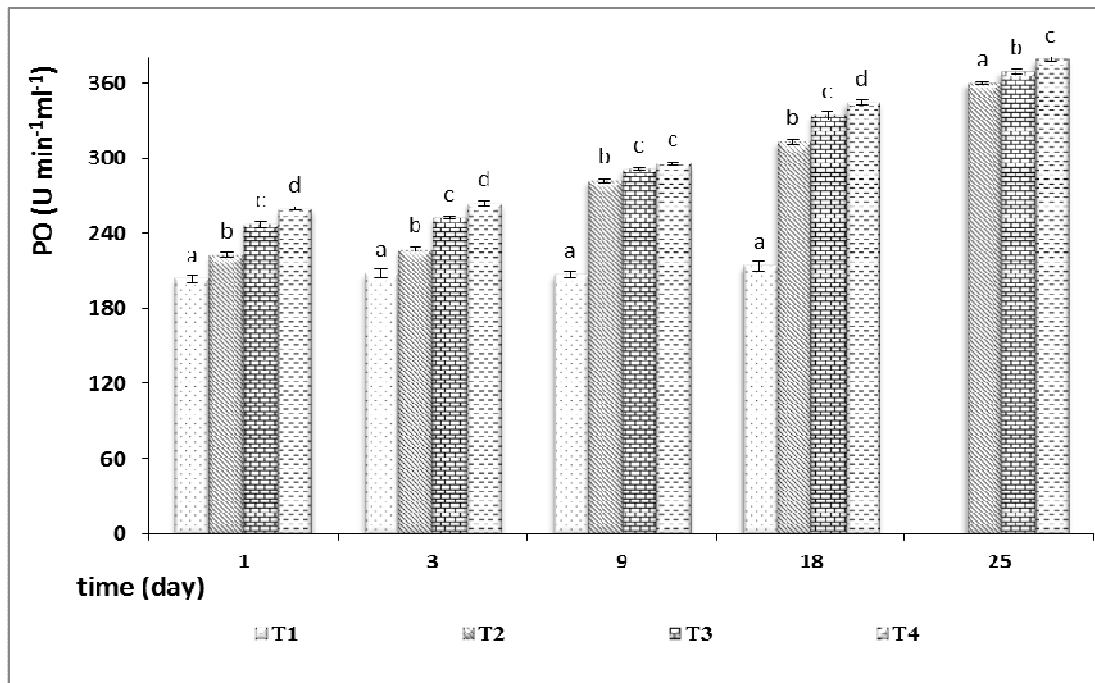
### ۵-۳- شاخص فعالیت آنزیم فنول اکسیداز

بر اساس نتایج بدست آمده، میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز میگوهای پاسفید در طول دوره آزمایشی و در تمام تیمارهای آزمایشی دارای روندی افزایشی بود ( $P < 0/05$ ) و تیمار شاهد اختلاف معنی داری را با دیگر تیمارهای آزمایشی نشان داد ( $P < 0/05$ ) و همچنین به لحاظ آماری اختلاف معنی داری بین دیگر تیمارهای آزمایشی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز در تیمار واکسینه شده با واکسن لکه سفید و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۳-۹ و ۳-۱۰). بر اساس نتایج آزمایش، میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز در تیمارهای آزمایشی مختلف پس از مواجهه با ویروس روند افزایشی معنی داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳-۱۰). بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز در تیمار واکسینه شده با واکسن لکه سفید و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ).

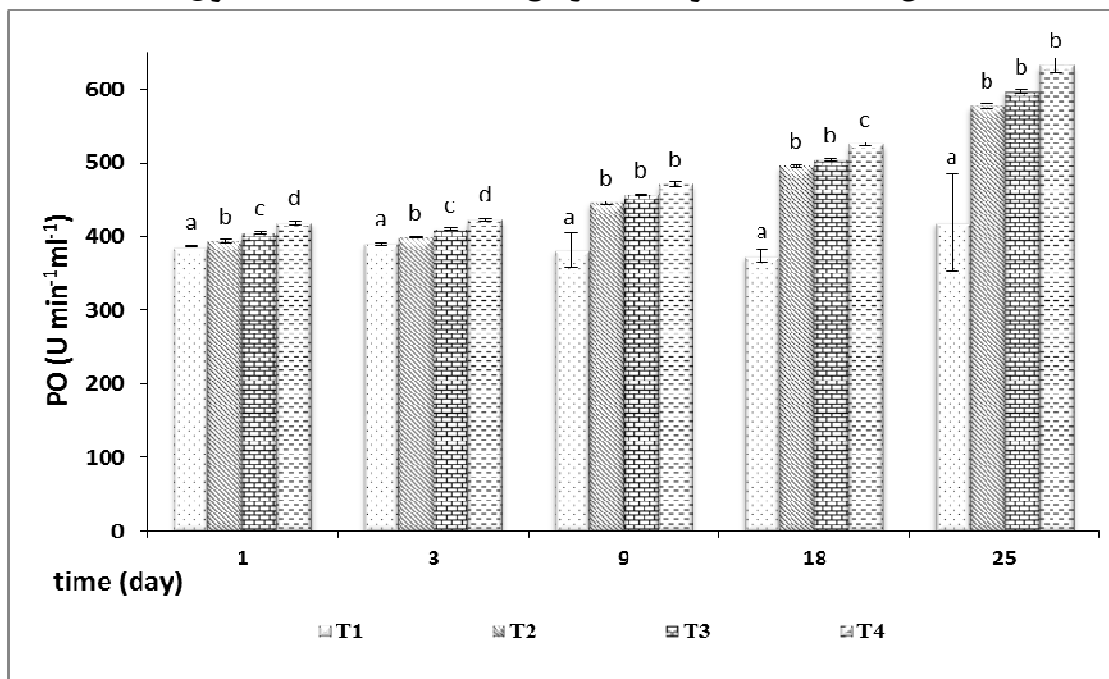
جدول ۳-۵: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز میگوهای پاسفید در تیمارهای آزمایشی مختلف در روزهای مختلف

تیمار / روز	شاهد	تغذیه شده با مخمر	تغذیه شده با جلبک	واکسینه با واکسن لکه سفید
۱	۲۰۳.۸۱±۲.۶۵ <sup>a</sup>	۲۲۲.۹۰±۱.۷۷ <sup>b</sup>	۲۴۷.۰۰±۲.۴۴ <sup>c</sup>	۲۵۹.۴۹±۱.۳۸ <sup>d</sup>
۳	۲۰۸.۰۰±۳.۷۹ <sup>a</sup>	۲۲۷.۳۳±۱.۷۶ <sup>b</sup>	۲۵۲.۳۳±۱.۴۵ <sup>c</sup>	۲۶۳.۶۷±۱.۸۶ <sup>d</sup>
۹	۲۷۲.۳۳±۱.۴۵ <sup>a</sup>	۲۸۲.۰۰±۱.۱۵ <sup>b</sup>	۲۹۱.۶۷±۰.۸۸ <sup>c</sup>	۲۹۵.۶۷±۱.۲۰ <sup>d</sup>
۱۸	۳۰۱.۰۰±۲.۵۲ <sup>a</sup>	۳۱۳.۰۰±۲.۰۸ <sup>b</sup>	۳۳۴.۰۰±۳.۰۶ <sup>c</sup>	۳۴۴.۶۷±۲.۰۳ <sup>d</sup>
۲۵	۳۵۰.۶۷±۱.۲۰ <sup>a</sup>	۳۶۰.۰۰±۱.۱۵ <sup>b</sup>	۳۶۹.۳۳±۱.۸۶ <sup>c</sup>	۳۷۹.۳۳±۱.۷۶ <sup>d</sup>
<b>پس از مواجهه با ویروس</b>				
۱	۳۸۶.۵۵±۰.۷۹ <sup>a</sup>	۳۹۳.۴۲±۲.۱۹ <sup>b</sup>	۴۰۵.۰۹±۱.۳۲ <sup>c</sup>	۴۱۸.۴۳±۲.۱۰ <sup>d</sup>
۳	۳۹۰.۰۰±۱.۷۳ <sup>a</sup>	۳۹۹.۰۰±۲.۰۸ <sup>b</sup>	۴۰۹.۶۷±۱.۷۶ <sup>c</sup>	۴۲۳.۰۰±۱.۵۳ <sup>d</sup>
۹	۴۳۱.۳۳±۱.۴۵ <sup>a</sup>	۴۴۶.۰۰±۲.۳۱ <sup>b</sup>	۴۵۶.۶۷±۰.۸۸ <sup>c</sup>	۴۷۱.۶۷±۲.۹۱ <sup>d</sup>
۱۸	۴۸۷.۳۳±۰.۸۸ <sup>a</sup>	۴۹۵.۶۷±۲.۰۳ <sup>b</sup>	۵۰۴.۳۳±۲.۰۳ <sup>c</sup>	۵۲۵.۳۳±۲.۶۰ <sup>d</sup>
۲۵	۵۴۶.۰۰±۲.۸۹ <sup>a</sup>	۵۷۷.۰۰±۳.۶۱ <sup>b</sup>	۵۹۷.۳۳±۲.۶۰ <sup>c</sup>	۶۳۲.۶۷±۱۰.۲۷ <sup>d</sup>

(میانگین ± خطای استاندارد) با ۳ تکرار \* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است ( $P < 0/05$ ).



۳-۹- فنل اکسیداز بعد از مواجهه با ویروس در تیمارهای مختلف در طول مطالعه



۳-۱۰- فنل اکسیداز کنترل های مثبت تیمارها در طول فاز ۲ مطالعه.

داده های با حروف متفاوت اختلاف معنی داری دارند.

## ۴- بحث

سندرم لکه سفید ویروس پاتوژن بیماری کشنده ای برای میگو است که با زیان های اقتصادی همراه است (Afsharnasab et al, 2009، Lightner et al. 2012). چندین روش آزمایش شده برای جلوگیری از بیماری WSSV در استخرهای پرورش میگو و سرکوب توانایی ویروس ها همسو با افزایش ایمنی در میگو، وجود دارد. تنها ایمنی موجود در میگو ایمنی ذاتی بدون حافظه است (Lee and Söderhäll, 2002). در میان این روش ها، واکنش مخمرها و عصاره جلبک دریایی در برابر WSSV متفاوت است .

به نظر می رسد اشعه گاما غیر فعال کننده پروتئین اصلی WSSV بوده و در غیر فعال کردن WSSV نقش مهمی به عنوان واکسن نو ترکیب در ارتقا پارامتر های ایمنی تولیدی همولنف میگو در مواجهه با ویروس لکه سفید میگو داشته است. در تایید این ادعا، اطلاعات به دست آمده از پارامتر های ایمنی همولنف حاکی از افزایش سطح آنزیم ها شامل THC، TPP، SOD، POD و PO، در گروه اشعه گاما یا T1 آزمایش داشته است. هر چند مطالعات بیشتر می تواند به شناسایی مکانیسم اثر اشعه گاما در حفاظت از میگو از عفونت WSSV کمک نماید.

پارامتر های ایمنی شامل THC، TPP، SOD، POD و PO بررسی شده در تیمارهای چهار گانه و نیز کنترل در شکل های ۳-۳ تا ۳-۹ نشان داده شده است. پارامتر های ایمنی مورد بررسی برای گروه کنترل و تیمارها اختلاف معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ) اما در همان حال، شاخصه هموسیت کل در گروه شاهد در مقایسه با گروه تیمار پایین تر بود. از آنجاییکه هموسیت و تعداد آن در میگو نقش مهمی در ایمنی ذاتی بازی کند مقدار گردش THC در میگو به عنوان یک شاخص برای ارزیابی وضعیت سلامت میگو استفاده می شود. هموسیت کل یک پارامتر مفید در بررسی اثر سیستم ایمنی در سخت پوستان، از جمله میگو قلمداد می شود (Wang, L. U. and Chen, 2005).

چنین بنظر می رسد که مخمر و جلبک گراسیلاریا و اشعه گاما در فعال سازی بافت خون ساز میگو، که منجر به تولید مقادیر بالایی از THC می شود. همانطور که توسط چان و همکاران ذکر شده است (Chan et al. 2014)، لیوپلی ساکارید، بتا گلوکان ( $\beta G$ ) و پپتیدو گلیکان (PG)، در مجموع از طریق شناختن پروتئین تشخیص الگو (PRP) یا گیرنده (PRR) به عنوان الگوهای مولکولی پاتوژن های همراه (PAMPs) شناخته شده اند.

اولین و ضروری ترین فرآیند دفاع درونی، شناسایی میکروارگانیسم های مهاجم می باشد که توسط هموسیت ها و پروتئین های پلازما انجام می شود (Albores & Plascencia, 2000). در اکثر مطالعات انجام شده بر روی تأثیر فاکتورهای مختلف بر شاخصهای ایمونولوژیک و فیزیولوژیک در سخت پوستان و به ویژه در میگوها، دو شاخص تعداد هموسیت کل و میزان پروتئین کل پلازما دارای بیشترین تغییرات بوده و آینه تمام نمایی از برهمکنش جانور با محیط پیرامون خود و نشان دهنده وضعیت فیزیولوژیک جانور در پاسخ به استرس های مختلف محیطی می باشند (Sanchez et al., 2001). از این رو محققین بجای بیان کیفی وضعیت سلامتی میگوها، از این دو شاخص کمی استفاده می نمایند. هموسیتها شامل سه دسته اند یک دسته دارای گرانولوسیت می باشند

گرانولوسیت‌ها دارای فعالیت فاگوسیتوزی بوده و محل ذخیره آنزیم پروفنول اکسیداز است (Aguirre- Guzman et al., 2009)

هموسیت‌ها پس از بلعیدن ذرات بیگانه، با استفاده از رادیکالهای اکسیژن که خاصیت سایتوتوکسیک دارند، موجب مرگ ذرات بیگانه می‌شوند (Song and Hsieh, 1994; Munoz et al., 2000). اگر مقادیر فراوانی از عوامل بیگانه وارد بدن میگو شوند و یا اینکه عوامل بیگانه وارد شده به اندازه‌ای بزرگ باشند که یک هموسیت نتواند آن را بلعد، چندین هموسیت با یکدیگر همکاری کرده و عوامل بیماریزا را محاصره می‌کنند که به این دو پدیده به ترتیب تشکیل ندول و کپسوله کردن گفته می‌شود (Söderhäll, 1996).

سلولهای سمی گرانولار سلول‌ها مسئول شناسایی عوامل مهاجم بوده و با یکدیگر تشکیل ندول پروتئینی می‌دهند و باعث فعال سازی سیستم پروفنول اکسیداز می‌شوند (Aguirre- Guzman et al., 2009).

پراکسیداز یک آنزیم درون سلولی است که توسط اندامک‌های درون سلولی پراکسی‌زوم تولید می‌شود، این اندامک درون سلولی با غشای دو لایه لیپیدی که در واقع به عنوان سیستم گوارش درون سلولی محسوب می‌شود، در هضم ساختارهای آسیب‌دیده سلولی، ذرات غذایی، عوامل پاتوژن و خنثی‌سازی رادیکالهای آزاد اکسیژنی نقش بسزایی دارد و هنگامیکه آبری در مواجهه با عفونت یا آلودگی قرار می‌گیرد، باعث افزایش تعداد پراکسی‌زوم سلولی می‌شود و بدین ترتیب رادیکالهای آزاد را بلوکه کرده و مانع اکسید شدن چربیها می‌شود. در دفاع آنتی‌اکسیدانی، سوپر اکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که به رادیکال‌های اکسیژن پاسخ می‌دهد. همچنین، این آنزیم بیشترین پاسخ را به تنش اکسیداتیو می‌دهد و یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها برای دفاع موثر علیه ROS<sup>۱</sup> است (Trenzado et al., 2008) سوپراکسید دیسموتاز تشکیل هیدروژن پراکسید (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) را با استفاده از رادیکال‌های سوپراکسید تسریع می‌کند (Tseng et al., 2009). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در سلول و محیط‌های خارج سلولی، برای جلوگیری از بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو، حیاتی است.

سیستم proPO یا پروفنل اکسیداز یک پاسخ دفاعی قوی مادرزادی در مقابل اجرام غیرخودی در بدن می‌باشد. این سیستم با شناسایی 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. این 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 تبدیل شده و این ماده باعث ایجاد ملانین می‌شود و این مواد خاصیت ضد میکروبی و از بین بردن ذرات عامل بیماری را دارند.

در مطالعه حاضر، به بررسی تاثیر مخمر ساکارومایسیس سروزیه و جلبک گراسیلاریا کورتاکا به عنوان محرکهای ایمنی‌زا در مواجهه با ویروس بیماری لکه سفید پرداخته شده است. در پایان دوره آزمایش، تعداد

<sup>1</sup>. Reactive oxygen species

سلول‌های هموسیت کل در تیمار مخمر ساکارومایسیس سرزیه، قبل از مواجهه با ویروس  $4466783 \pm 241147$  و در تیمار جلبک گراسیلاریا کورتا کا  $5911343 \pm 144650$  بود و اختلاف معنی‌داری را نسبت به هم نشان دادند ولی تعداد سلول‌های هموسیت کل در تیمار مخمر و جلبک بعد از مواجهه با ویروس به ترتیب  $11221031 \pm 196949$  و  $11771667 \pm 1197032$  بود که اختلاف معنی‌داری نشان نداد. پروتئین کل پلاسمای خون در تیمارهای تغذیه شده با مخمر و جلبک در قبل از مواجهه با ویروس به ترتیب  $7.22 \pm 0.14$  و  $7.28 \pm 0.18$  و بعد از مواجهه با ویروس  $7.65 \pm 0.21$  و  $7.75 \pm 0.09$  بود و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد.

میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز قبل از مواجهه با ویروس در تیمارهای حاوی جلبک و مخمر فقط با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد و فعالیت آن در تیمار جلبک  $6.29 \pm 0.08$  و تیمار مخمر  $6.28 \pm 0.15$  بود. پس از مواجهه با ویروس فعالیت این آنزیم در تیمارهای حاوی مخمر و جلبک اختلاف معنی‌داری نشد و میزان فعالیت آن به ترتیب  $6.75 \pm 0.09$  و  $6.79 \pm 0.04$  بود. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای تغذیه شده با جلبک و مخمر به ترتیب قبل از مواجهه با ویروس  $1983.33 \pm 116.67$  و  $1966.67 \pm 120.19$  و بعد از مواجهه،  $2466.67 \pm 88.19$  و  $2373.33 \pm 93.33$  بود و اختلاف معنی‌داری بین این تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید. فعالیت آنزیم فنول اکسیداز در تیمار حاوی جلبک قبل و بعد از مواجهه با ویروس  $369.33 \pm 18.6$  و  $597.33 \pm 2.60$  و در تیمار مخمر قبل و بعد از مواجهه با ویروس  $360.00 \pm 1.15$  و  $577.00 \pm 3.61$  بود که این تیمارها با هم و با دیگر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ صدم نشان دادند.

یکی از بهترین راهکارها در جهت کنترل عوامل بیماری‌زای ویروسی، واکسیناسیون میگوها می‌باشد (Witteveldt et al., 2005). تحقیقات زیادی در مورد سیستم ایمنی سخت‌پوستان انجام شده و همگی وجود یک سیستم شبه ایمنی علیه ویروس لکه‌سفید WSSV در میگو تشخیص داده‌اند. 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 می‌باشد (Sanchez, 2010)؛ لذا می‌توان عنوان نمود که واکسیناسیون پست لاروها با واکسن حاوی ویروس غیر فعال شده لکه سفید می‌تواند منجر به افزایش مقاومت و ایجاد یک پاسخ شبه ایمنی در میگوها گردد که در نهایت با اشغال گیرنده های ویروس لکه‌سفید بر روی سطح سلول توسط ویروس‌های غیرفعال شده مانع از ابتلا میگوها در مواجهه با ویروس خواهند شد (Burton et al., 2000)

در تایید این مبحث می‌توان به نتایج مطالعه حاضر اشاره کرد که در تیمار واکسینه با واکسن لکه سفید، در روزهای مختلف آزمایشی (روز ۳، ۹، ۱۸ و ۲۶)، تعداد سلول‌های هموسیت کل خون، پروتئین کل پلاسمای خون، فعالیت آنزیم‌های پرواکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنول اکسیداز در میگوهای پاستوریزه روند افزایشی داشت و بطور معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارهای آزمایشی بالاتر بود. در پایان دوره آزمایش و قبل از مواجهه با ویروس لکه‌سفید تعداد سلول‌های هموسیت به  $6785777 \pm 416821$  رسید و البته تعداد آنها بعد از مواجهه با

ویروس لکه سفید به میزان  $15590.667 \pm 898524$  افزایش یافت. همچنین پروتئین کل پلاسماي خون در این تیمار، به ترتیب در قبل و بعد از مواجهه با ویروس لکه سفید،  $7.83 \pm 0.06$  و  $8.32 \pm 0.04$  بود. میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز در تیمار واکسینه شده به طور معنی داری افزایش یافت و میزان آن قبل از مواجهه با ویروس  $6.42 \pm 0.05$  و بعد از مواجهه با ویروس لکه سفید به میزان  $7.14 \pm 0.08$  رسید. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در این تیمار قبل و بعد از مواجهه با ویروس در پان دروه آزمایشی به ترتیب به میزان  $2633.33 \pm 145.30$  و  $3066.67 \pm 88.19$  افزایش یافت. در نهایت فعالیت آنزیم فنول اکسیداز در تیمار واکسینه شده نیز با روندی افزایشی در طی دوره آزمایش به میزان  $379.33 \pm 1.76$  قبل از مواجهه با ویروس و  $632.67 \pm 10.27$  بعد از مواجهه با ویروس رسید.

بر اساس نتایج بدست آمده، میزان فعالیت آنزیم‌های پرواکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنول اکسیداز میگوهای پاسفید در طول دوره آزمایشی و در تمام تیمارهای آزمایشی، چه قبل و چه بعد از مواجهه با ویروس لکه سفید، دارای روند افزایشی بود ( $P < 0.05$ ) بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های پرواکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنول اکسیداز در تیمار واکسینه شده با واکسن لکه سفید و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید. همچنین میزان فعالیت آنزیم پرواکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در تیمار تغذیه شده با جلبک از تیمار تغذیه شده با مخمر بیشتر بود ولی به لحاظ آماری اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نگردید؛ اما در مورد میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز، اختلاف معنی دار مشاهده شد.

با توجه به افزایش تعداد هموسیتها در گروه واکسن که بصورت معنی داری نسبت به گروهی که واکسن استفاده نشده می توان چنین بیان کرد که هموسیتها برای افزایش فعالیت فاگوسیتوزی جهت مقابله با اجرام پاتوژن تعدادشان افزایش یافته است. همچنین افزایش فاگوسیتوز باعث افزایش رادیکالهای آزاد اکسیژن می گردد که اندازه گیری فنل اکسیداز این مسئله را نشان می دهد. و بصورت معنی داری با تیماری که واکسن استفاده نشده تفاوت دارد. همچنین به علت اینکه سوپر اکسیداز دیسموتاز اولین آنزیمی است که به رادیکالهای اکسیژن پاسخ می دهد بنا براین در گروهی که در معرض واکسن قرار دارند میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پرواکسیداز بصورت معنی داری افزایش داشته و این مسئله را تایید می کند. فعالیت پرواکسیداز پلاسما بسیار به تشکیل و حذف اکسیژن فعال (ROS) در طول فاگوسیتوزیس دارد. بطوریکه یکی از راههای موثر در حذف اجسام بیگانه همین ترکیب سوپراکسید دیسموتاز است. Tan et al., 2015, Le Moullac et al., 2000. اخیرا ثابت شده است SOD نقش فعال در سیستم ایمنی میگو و بخصوص در آسیب های اکسیژن پایه ایفا می کند ۸۴ اندامک های دارای SOD از پراسیداز دیسموتاز، کاتاز تشکیل شده که می تواند متابولیت های مضر از جمله آب اکسیژنه موجود در آبهای غیر سمی و یا اکسیژن تولیدی در پروسه اکسیداسیون را خنثی نماید (Wang et al., 2012). Yan et al., 2010. گزارش داده است پرواکسیداز دیسموتاز پس از عفونت در کبد، قلب و آبشش به ترتیب مشاهده شده است ولی مقدار آن در کبد و آبشش کاهش می یابد.

- Afsharnasab, M., 2012. Review of WSD in Iran (past, present, future) and the effect on shrimp production 17th Iranian Veterinary Congress, 28-30 April, 2012 Tehran, Iran. Iran Veterinary Association. p. 12.
- Afsharnasab, M. and Akbari, S., 2005. Identification Of White Spot Syndrome Disease (WSSD) By Electron Microscopy In *Penaeus Indicus*. *Pajouhesh-va-Sazandegi*, 17, 7-13.
- Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J. G., Campa-Cordova, A. I., Luna-Gonzalez, A. and Ascencio, F., 2009. Penaeid shrimp immune system. *Thai J. Vet. Med*, 39(3), 205-215.
- Baldock, C., 1998. The Spread of Infectious Diseases in Farmed Shrimp: a Population-based Perspective. ACIAR PROCEEDINGS, 1999. ACIAR; 1998, 84-91.
- Burton, D.R., Williamson, R.A., Parren, 2000. Antibody and virus: binding and neutralization
- Virology, 270., 1-3.
- Chanratchakool, P. and Limsuwan, C., 1998. Application of PCR and formalin treatment to prevent white spot disease in shrimp. *Advances in shrimp biotechnology*, 287-289.
- Cavalli, L. S., Nornberg, B. F. S., Netto, S. A., Poersch, L., Romano, L. A., Marins, L. F. and Abreu, P. C., 2010. White spot syndrome virus in wild penaeid shrimp caught in coastal and offshore waters in the southern Atlantic Ocean. *Journal of Fish Diseases*, 33(6), 533-536.
- Durand, S., Lightner, D. V., Nunan, L. M., Redman, R. M., Mari, J. and Bonami, J. R., 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27(1), 59-66.
- Escobedo-Bonilla, C. M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M. B. and FAO, 2013. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), Roma, Italy.
- Flegel, T. W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258(1-4), 1-33.
- Flegel, T. W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(3), 217-231.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol* 29:149-158
- Kakoolaki, S., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Sharifpour, I., Mirzargar, S., Afsharnasab, M. and Motalebi, A. A., 2011a. The effect of different salinities on mortality and histopathological changes of SPF imported *Litopenaeus vannamei*, experimentally exposed to White Spot Virus and a new differential hemocyte staining method. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(3), 447-460.
- Kakoolaki, S., Soltani, M., Mousavi, H. A., Mirzargar, S., Sharifpour, I. and Ahmadi, M., 2011b. Study on some environmental variables (temperature and salinity) on the pathogenesis of white spot disease (WSD) in juvenile shrimp, *Penaeus vannamei*. Ph.D., University of Tehran.
- Kondo, M., 2003. Experiments of body defence mechanisms in Crustacean. Shimonoseki, National Fisheries University, 16pp.
- Lara-Flores, M. and Olvera-Novoa, M. A., 2013. The use of lactic acid bacteria isolated from intestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as growth promoters in fish fed low protein diets/Usos de bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) como promotores de crecimiento en peces alimentados con dietas bajas en proteína. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(3), 490.
- Lee, S. and Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology* 12, 421-437.
- Lightner, D., 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. LA, Baton Rouge, 1, World Aquaculture Society.
- Lightner, D., 2005. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through Use of SPF Stock and Routine Surveillance. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(3), 229-248.
- Lightner, D., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Tang, K. F. J., Noble, B. L., Schofield, P., Mohny, L. L., Nunan, L. M. and Navarro, S. A., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 174-183.
- Lightner, D. V., 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106(1), 110-130.



- Lin, T., Xing, J., Jiang, J., Tang, X. and Zhan, W., 2011.  $\beta$ -glucan-stimulated activation of six enzymes in the haemocytes of the scallop *Chlamys farreri* at different water temperatures. *Aquaculture*, 315, 213-221.
- Lin, Y. C., Yeh, S. T., Li, C. C., Chen, L. L., Cheng, A.-C. and Chen, J. C., 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 26 582-588.
- Lin, Y. C., Yeh, S. T., Li, C. C., Chen, L. L., Cheng, A. C. and Chen, J. C., 2011. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 31, 1239-1246.
- Liu, B., Yu, Z. M., Song, X. X. and Guan, Y. Q., 2007. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(2), 87-92.
- Liu, Y., Jang, X. L., Lv, Q. and Guan, H. S., 2000. Effects of mannuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus chinensis* related with immune and hemolysis. *Journal of Fisheries of China*, 24(6), 549-553.
- Lowry, O., 1951. The Lowry protein assay. *Journal of Biology and Chemistry*, 193(1), 265-275.
- McClennen, C., 2004. White Spot Syndrome Virus. The economic, environmental and technical implications on the development of Latin American shrimp farming. Master of Arts in Law and Diplomacy Thesis, 106 pp.
- Mohankumar, K. and Ramasamy, P., 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Research*, 115, 69-75.
- Moore, M. A., 2012. Inactivation of enveloped and non-enveloped viruses on seeded human tissues by gamma irradiation. *Cell and Tissue Banking*, 13(3), 401-407.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W. P., Mialhe, E. and Bachère, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1), 89-107.
- Muhammad, F., Zhang, Z. F., Shao, M. Y., Shi, X. L. and Shafi, M., 2012. Genesis of Hematopoietic Tissue and Its Relation with Hemocytes of *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931)(Crustacea: Decapoda). *Pakistan Veterinary Journal* 33(1), 91-95.
- Nauwynck, H. J., 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 31(1), 1-18.
- Oidtmann, B. and Stentiford, G., 2011. White spot syndrome virus (WSSV) concentrations in crustacean tissues—a review of data relevant to assess the risk associated with commodity trade. *Transboundary and emerging diseases*, 58(6), 469-482.
- Pazir, M., Jamshid, K., Lak, F., Afsharnasab, M. and Maheyaneh, A., 2010. The effects of water quality on growth of the reared Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 18(4), 13-24.
- Pazir, M., Afsharnasab, M., Jalali Jafari, B., Sharifpour, I., Motalebi, A. and Dashtiannasab, A., 2011. Detection and identification of white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) of *Litopenaeus vannamei* from Bushehr and Sistan and Baloochestan provinces (Iran), during 2009-2010. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(4), 708-726.
- Rahman, M. M., Escobedo-Bonilla, C. M., Corteel, M., Dantas-Lima, J. J., Wille, M., Sanz, V. A., Pensaert, M. B., Sorgeloos, P. and Nauwynck, H. J., 2006. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 261(3), 842-849.
- Ruiz-Velazco, J. M. J.; Hernandez-Llamas, A.; Gomez-Munoz, V. M.; Magallon, F. J., 2010. Dynamics of intensive production of shrimp *Litopenaeus vannamei* affected by white spot disease. *Aquaculture* 2010, 300(1-4), 113-119.
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W. and Fitzpatrick, M. S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197(1-4), 3-24.
- Soltani, M.; Mousavi, H. A.; Mirzargar, S., 2009. Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran, 2009.
- Song, Y.-L. and Hsieh, Y.-T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental & Comparative Immunology*, 18(3), 201-209.
- Tan, S.Q., Zhang, K.Q., Chen, H.X., Ge, Y., Ji, R. and Shi, W.P. 2015. The mechanism for microsporidian parasite suppression of the hindgut bacteria of the migratory locust *Locusta migratoria manilensis*, in: *Biology*, China

- Trenzado, C.E., Morales, A.E. and de la Higuera, M., 2008. Physiological changes in rainbow trout held under crowded conditions and fed diets with different levels of vitamins E and C and highly unsaturated fatty acids (HUFA). *Aquaculture*, 277, 293–302.
- Tseng, D.-Y., Ho, P.-L., Huang, S.-Y., Cheng, S.-C., Shiu, Y.-L., Chiu, C.-S. and Liu, C.-H., 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(2), 339-344.
- Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G. L., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T., 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*, 143(1), 23-32.
- Yan, X., Jie, Y., JingQiu, S., YaDong, Y. and JunQiang, Y., 2010. Cytochemical location of superoxide dismutase and peroxidase in different tissues of *Litopenaeus vannamei*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 34(2), 402-409.

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the efficacy of white spot virus vaccine produced by gamma irradiation in the face of *Litopenaeus vannamei* in comparison with *Gracilaria corticata* and *Saccharomyces cerevisiae*. Seven hundred and twenty healthy shrimp SPF *L. vannamei* subadult with average weight of  $10 \pm 1.02$  g were collected and divided into 8 groups. The first group (T1) was fed with commercial pellet as control. The second group (T2) was fed with *S. cerevisiae* added to shrimp feed (1 g/Kg), the third group (T3) *G. corticata* so that algae *Gracilaria* were dried and added to shrimp feed at the rate of 1500 mg per kg and finally, the fourth group (T4) was vaccination group which the shrimp were exposed to the vaccine and injected intramuscularly gamma irradiant WSSV ( $1 \mu\text{l/gbw}$ ) for 10 days. The shrimps of all groups were then injected with WSSV and maintained for 25 days. Results indicated that the survival rates for groups T4, T3 T2 and T1 were  $57.05 \pm 3.52\%$ ,  $22.5 \pm 0.5\%$ ,  $15 \pm 1.05\%$  and  $00.0 \pm 0\%$ , respectively. Ultimately, at the end of the study the shrimp group T4 showed higher hematological data: THC, TPP, SOD, POD and PO. The study concluded that gamma irradiant WSSV is effective immunostimulants in shrimp *L. vannamei* and the immunity has better performances than those of the *G. corticata* and *S. cerevisiae*.



**Ministry of Jihad – e – Agriculture  
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION  
Iranian Fisheries Science Research Institute**

---

**Project Title : A study on immunological factors in White Spot Vaccinated shrimp,  
Litopenaeus vannamei in comparison to none vaccinated groups**

**Approved Number: 14-74-12-9451-94004**

**Author: Shapour Kakoolaki**

**Project Researcher : Shapour Kakoolaki**

**Collaborator(s) : M. Afsharnasab, H. Houshmand, M. Ahangarzadeh, S.R.S. Mortezaei,  
B. Ghaednia, M. Mohammadidust, L. Mohseninezhad, R. Banaderakhshan, M. Sori**

**Advisor(s): -**

**Supervisor: -**

**Location of execution :Khouzestan province**

**Date of Beginning : 2015**

**Period of execution : 1 Year & 4 Months**

***Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute***

***Date of publishing : 2016***

**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 :**

**A study on immunological factors in White Spot  
Vaccinated shrimp, *Litopenaeus vannamei* in comparison  
to none vaccinated groups**

**Project Researcher :**

***Shapour Kakoolaki***

**Register NO.**  
**50534**