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

عنوان :

بررسی فاکتورهای ایمنی (THS,TPP,PO,SOD,POD) میگوهای تغذیه شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا در مقایسه با میگوهای تغذیه شده بدون جلبک و مواجهه شده با ویروس لکه سفید

مجری:
حسین هوشمند

شماره ثبت
۵۱۷۳۹

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

عنوان طرح /پروژه : بررسی فاکتورهای ایمنی (THS,TPP,PO,SOD,POD) میگوهای تغذیه شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا در مقایسه با میگوهای تغذیه شده بدون جلبک و مواجهه شده با ویروس لکه سفید
کد مصوب: ۹۴۰۰۱-۹۴۵۱-۱۲-۷۴-۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : حسین هوشمند
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : حسین هوشمند
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : مینا آهنگرزاده، سیدرضا سیدمرتضایی، محمد افشارنسب، لفته محسنی نژاد، مهرداد محمدی دوست، 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 ۱۳۹۶
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: بررسی فاکتورهای ایمنی (THS,TPP,PO,SOD,POD) میگوهای تغذیه شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا در مقایسه با میگوهای تغذیه شده بدون جلبک و مواجهه شده با ویروس لکه سفید

کد مصوب : ۹۴۰۰۱-۹۴۵۱-۱۲-۷۴-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۱۷۳۹ تاریخ : ۹۶/۳/۱۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای حسین هوشمند دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری های آبزیان در تاریخ ۹۶/۲/۶مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید. در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس بخش بهداشت و بیماری های آبزیان در پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشورمشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده.. ..... ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- بیماری لکه سفید ۳
۱-۲- مورفوژنز *Morphogenesis* ویروس لکه سفید ۳
۱-۳- علایم بالینی و آسیب شناسی بیماری لکه سفید ۴
۱-۴- بیماری‌زایی لکه سفید ۵
۱-۵- ورود ویروس به سلول ۶
۱-۶- دفاع ضدویروسی ۹
۱-۷- پاسخ شبه ایمنی ۱۱
۱-۸- مکانیسم‌های گریز ویروسها از سیستم دفاعی میزبان ۱۱
۱-۹- ایمنی ضدویروسی ۱۳
۱-۱۰- راهکارهای کنترل و کاهش تلفات ناشی از بیماری لکه سفید ۱۵
۱-۱۱- جلبک *Gracilaria corticata* ۱۷
۲- مواد و روشها ۲۱
۲-۱- مکان و زمان آزمایش ۲۱
۲-۲-تهیه میگوهای پاسفید غربی مورد نیاز آزمایش و مرحله سازگاری ۲۱
۲-۳- تهیه جیره غذایی حاوی عصاره جلبک ۲۱
۲-۴- بررسی و تغذیه میگوهای مورد آزمایش ۲۲
۲-۵- تهیه و تعیین عیار ویروس لکه سفید ۲۳
۲-۶- تیماربندی آزمایش مواجهه سازی ۲۵
۲-۷- روش و محلول‌های مورداستفاده در نمونه‌برداری ۲۵
۲-۸- شمارش هموسیت ها (THC) ۲۶
۲-۹- روش استفاده از کیت تجاری Peroxidase Activity Assay Kit ۲۶
۲-۱۰- اندازه‌گیری SOD ۲۹
۲-۱۱- اندازه گیری فنل اکسیداز PO ۲۹
۲-۱۲- اندازه گیری پروتئین پلاسمای کل TPP ۲۹

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

۱۳-۲- تجزیه و تحلیل آماری ۳۰
۳- نتایج ۳۱
۱-۳- نتایج PCR ۳۱
۲-۳- نتایج حاصل از تأثیر خوراکی جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا بر مقاومت میگوهای پاسفید ۳۱
۴- بحث و نتیجه گیری ۳۹
پیشنهادها ۴۵
منابع ۴۷
چکیده انگلیسی ۵۴

چکیده

بیماری لکه سفید یکی از مهلک‌ترین بیماری‌های ویروسی میگو است که موجب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می‌شود. اکثر بی‌مهرگان فاقد سیستم ایمنی اکتسابی می‌باشند و دفاع آن‌ها ناشی از سیستم ایمنی ذاتی است که به‌صورت سلولار و همورال می‌باشد ولی وجود یک سیستم شبه ایمنی علیه ویروس لکه سفید در میگو تشخیص داده‌شده است. در این تحقیق کنترل و پیشگیری از بیماری لکه‌سفید میگو با استفاده از جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا (*Gracilaria corticata*)، بررسی و مورد مطالعه قرارگرفت.

تعداد ۳۰۰ قطعه میگوی پیش مولد وانامی در ۴ تیمار با عصاره جلبک و بدون عصاره به مدت ۱۴ روز تغذیه شدند و درپایان روز چهاردهم نیمی از میگوها با ویروس لکه سفید مواجهه داده شدند. پس از روز چهاردهم طی روزهای ۰، ۳، ۹، ۱۸ و ۲۵ از همولنف میگوهای زنده مانده نمونه گیری و میزان بازماندگی و فاکتورهای ایمنی میگوها بررسی گردید.

بر اساس نتایج میگوهای تغذیه‌شده با عصاره جلبک در مواجهه با ویروس لکه سفید در مقایسه با میگوهای تغذیه‌شده با غذای تجاری بدون عصاره در مواجهه با ویروس به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از بقا بیشتری برخوردار بودند (۲۲/۵±۰/۵b). افزایش فاکتورهای ایمنی در روزهای آزمایش از روز اول تا روز ۲۵ مشاهده و بیشترین میزان فاکتورهای ایمنی THC، TPP، SOD، POD و PO در تیمار T1 در روز ۲۵ آزمایش مشاهده شد. این وضعیت برای تیمار T2 نیز صادق بوده ولی میزان آن به نسبت تیمار T1 کمتر و با هم اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). برای تیمارهای T3 و T4 نیز افزایش معنی‌دار فاکتورهای ایمنی در روزهای آزمایش دیده شده و اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) وجود داشت و بیشترین میزان در روز ۲۵ مشاهده می‌شود.

با توجه به سازوکار جلبک در تحریک سیستم ایمنی و یا محافظت میگو در برابر ویروس لکه سفید به نظر می رسد بایستی در طول دوره پرورش از مکمل جلبک در جیره غذایی استفاده نمود چرا که با توجه به مکانیسم پوشانندگی گیرنده ها توسط جلبک کم شدن ترکیبات جلبک خطر ورود ویروس به سلول‌های میگو وبروز بیماری را محتمل خواهد ساخت.

۱-مقدمه

بروز بیماری‌های میگو بالاخص بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده فعالیت‌های تکثیر و پرورش میگو در جهان می‌باشد. بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهلک‌ترین این بیماری‌ها است که موجب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده (Penaeidae) می‌شود.

اولین گزارش از وجود این بیماری و تلفات بسیار بالای آن در مزارع میگو در سال ۱۹۹۲ از استان‌های فوژان وگوانگجو چین به‌عمل آمده است (Witteveldt، ۲۰۰۶). پس از آن به‌تدریج بیماری در اکثر مناطق دنیا گسترش پیدا کرد. در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۳۸۱ در منطقه چوئبده آبادان و سپس در سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر در اغلب استخرها و مزارع مشاهده شد و باعث خسارت زیادی به پرورش دهندگان گردید. پس از آن نیز طی سال‌های بعد بیماری به‌طور پراکنده بروز کرد و باعث ضرر و زیان شدید به پرورش دهندگان گردید (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۵ و ۱۳۸۸؛ سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۷). در ابتدا تصور می شد که عوامل ویروسی مختلفی همزمان در نواحی متفاوت بروز کرده و به هر بیماری یک نام خاص دادند: باکیلوویروس نکروز دهنده بافت خونساز و زیرجلدی (Durand و همکاران، ۱۹۹۶)، سومین باکیلوویروس غیر محدود میگوی مونودون (Wang و همکاران، ۱۹۹۵ وKarunasa gar و همکاران، ۱۹۹۷)، ویروس میله ای شکل هسته میگوی ژاپنی (Inouye و همکاران ۱۹۹۴ و ۱۹۹۶)، DNA ویروس میله ای شکل پنائیده (Venegas و همکاران، ۲۰۰۰)، باکیلوویروس اکتودرمی و مزودرمی سیستماتیک (Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵؛Sahul-Hameed و همکاران، ۱۹۹۸) یا باکیلوویروس لکه سفید (Chou و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lightner، ۱۹۹۶).

بعداً مشخص شد که یک عامل ویروسی مسئول این گزارش هاست است و سرانجام بر اساس یک موافقت غیر رسمی ویروس با نام ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) نامگذاری شد. این عامل بیماری زا هم اکنون به عنوان یک عامل مهم بیماری زای میگو در سراسر جهان شناخته می شود. گزارشات مربوط به تلفات مزارع میگو در جدول آمده است.

جدول ۱- ۱- کشورها و تاریخ وقوع بیماری لکه سفید

Year first reported	Country	Reference
1992	Taiwan	Chou *et al.* 1995
1993	China, Japan, Korea	Zhan *et al.* 1998; Inouye *et al.* 1994; Park *et al.* 1998
1994	Thailand, India, Bangladesh	Lo *et al.* 1996a; Karunasagar *et al.* 1997; Mazid & Banu 2002
1995	USA	Lightner 1996; Wang *et al.* 1999a
1996	Indonesia, Malaysia, Sri Lanka	Durand *et al.* 1996; Kasornchandra *et al.* 1998; Rajan *et al.* 2000
1997	Vietnam	Bondad-Reantaso *et al.* 2001
1998	Peru	Rosenberry 2001
1999	Philippines, Ecuador, Colombia, Panamá, Honduras, Nicaragua, Guatemala, Belice	Magbanua *et al.* 2000; Bondad-Reantaso *et al.* 2001; Hossain *et al.* 2001; Wu *et al.* 2001
1999–2000	México	Bondad-Reantaso *et al.* 2001
2002	France, Iran	Dieu *et al.* 2004; Marks 2005
2005	Brazil	APHIS-USDA 2005

در چین خسارات تولید ۸۰٪ میگوی پرورشی مربوط به بیماری لکه سفید بود (Zhan و همکاران، ۱۹۹۸) و در اکوادور اثر ویروس لکه سفید بر مزارع پرورش میگو فاجعه آمیز بود (FAO، ۲۰۰۶). گسترش ویروس لکه سفید به دیگر کشورهای پرورش دهنده میگو توسعه آبزی پروری میگو را تهدید می کند (Claydon و همکاران، ۲۰۰۴). در ایران نیز طی سالهای ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ در استان خوزستان و سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر بعنوان قطب تولید میگوی کشور اغلب استخرها و مزارع آلوده و در حدود ۱۰ میلیارد تومان خسارت به پرورش دهندگان وارد گردید (افشارنسب و همکاران ،۱۳۸۵ ؛ آمار نامه شیلات ایران ۱۳۸۴) .

۱-۱-بیماری لکه سفید

ویروس لکه سفید عامل مسبب بیماری با انتشار جهانی همراه با تلفات بالا در میگوهای پرورشی است (Inouye و همکاران، ۱۹۹۳). این ویروس باعث تلفاتی تا ۱۰۰٪ در بین ۱۰ روز بروز بیماری در مزارع پرورش میگو شده و خسارات عظیمی را به صنعت پرورش میگو وارد کرد (Lightner، ۱۹۹۶). خسارات اقتصادی وارد شده در آسیا تقریباً ۶-۴ میلیارد دلار و بیش از یک میلیارد دلار در آمریکا طی سال‌های ۱۹۹۲ تا ۲۰۰۱ برآورد شد (Lightner، ۲۰۰۳) و در حال حاضر این بیماری گستردگی جهانی دارد (Rout و همکاران، ۲۰۰۷). راهبردهای مرسوم کنترل بیماری از قبیل بهبود شرایط محیطی، ذخیره‌سازی پست لاروهای عاری از بیماری و افزایش مقاومت به بیماری با استفاده از محرک‌های ایمنی خوراکی در عفونت های لکه سفید به کار گرفته شده است (Lightner، ۲۰۰۳؛ Citarasu و همکاران، ۲۰۰۶). اگرچه که واگیری خیلی بالای ویروس و محدوده گسترده میزبانی آن شامل بسیاری از سخت پوستان، کنترل انتقال و پیشگیری از بیماری را مشکل ساخته است (Lo و همکاران،۱۹۹۶b؛ Flegel، ۱۹۹۷؛ Chang و همکاران، ۱۹۹۸). با توجه به اهمیت اقتصادی و اجتماعی جهانی پرورش میگو، توسعه اقدامات کنترلی جدید در برابر وقوع بیماری لکه سفید به امری اجتناب ناپذیر بدل گشته است.

۲-۱- مورفوژنز Morphogenesis ویروس لکه سفید

مراحل مختلف Morphogenesis ویروس شناخته شده است و به طور مستقیم به توسعه ضایعات سلولی مرتبط است (Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Tsai و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۹).

مرحله۱: مرحله اولیه عفونت سلول. سلول‌های عفونی هسته‌هایی با علامت هیپرتروفی خفیف را نشان می‌دهند. نوکلئوزوم‌های ویروسی قبل از تشکیل ذرات ویروسی ظاهر می‌شوند. پروتئین‌های ویروسی ساخته شده و در قطعات فیبریلار(fibrillar) سازمان می‌یابند. در سیتوپلاسم شبکه اندوپلاسمی متسع شده و حاوی ریبوزوم‌های آزاد فراوانی است.

مرحله۲: در هسته مواد فیبریلار باعث تشکیل غشاهای حلقوی می‌شوند که به زودی با مواد هسته‌ای ویروس پر می‌شوند و این شروع مراحل مونتاژ و سرهم شدن ویروس است. در این مرحله گنجیدگی‌های نوع Cowdry-A

ظاهر می‌شوند که به صورت یک ناحیه مات بین بافت ویروس و کروماتین متراکم به حاشیه رانده شده دیده می‌شود. هسته سلول در این مرحله هیپرتروفیک(hypertrophic) و گرد می‌شود.

مرحله ۳: در هسته سلول آلوده، نوکلئوکپسیدها (nucleocapsid) ظاهرمی‌شوند و تراکم پایینی دارند و به تدریج از یک انتها به سمت دیگر رشد می‌کنند. گنجیدگی‌های درون سلولی مرکزی پدیدار شده کوچکتر از مرحله دوم هستند و به دلیل وجود ذرات ویروسی فراوان بسیار متراکم‌تر می‌باشند. زمانی که کرماتین به حاشیه رانده شده ناپدید شد، غشاء هسته سلول ترکیده و ناحیه شفاف با سیتوپلاسم با یکدیگر جوش می‌خورند. بیشتر اندامک‌های غیرطبیعی از هم پاشیده یا تشکیل ساختارهای غشایی را می‌دهند.

مرحله ۴: در هسته، نوکلئوکپسیدها کامل شده‌اند. هرنوکلئوکپسید یک انتهای گرد و یک انتهای مربع شکل دارد. نوکلئوکپسیدها به طور کامل با غشاء پوشانده می‌شوند.

مرحله ۵: ذرات ویروسی شکل بیضی به خود می‌گیرند و بیرون زدگی دم شکل حاصل از غشاء مشاهده می‌شود. مواد داخلی زائده دم مانند از نوکلئوکپسید مجزا هستند. سپس نوکلئوکپسیدها کوتاه‌تر، ضخیم‌تر و متراکم‌تر می‌شوند.

مرحله ۶: مرحله آخر Morphogenesis ویریون های بالغ بیضی شکل با غشاء صاف احاطه می‌شوند. برخی اوقات سرهم شدن نوکلئوکپسیدها به طور کامل جدای از غشاء صورت گرفته و درنهایت با غشاء پوشانده می‌شوند. در این مرحله سلول‌های آلوده شدیداً آسیب دیده و می‌ترکند. فضاهای خالی به دلیل سلول‌های متلاشی شده در بافت قابل مشاهده است.

۳-۱- علایم بالینی و آسیب شناسی لکه سفید

در شرایط پرورشی، بسیاری از میگوهای خانواده پنائیده آسیایی و آمریکایی آلوده به ویروس نقاط سفید واضحی با قطر ۰/۵ تا ۳ میلی‌متر را در اسکلت خارجی نشان می‌دهند (Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۶a؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۱). مکانیسم واقعی تشکیل لکه های سفید ناشناخته است. ممکن است که عفونت لکه سفید سبب نقص عملکردی تگومنت (Tegument)شود که در نتیجه تجمع نمک های کلسیم در کوتیکول رخ می‌دهد و لکه های سفید ظاهر می‌شوند (Wang و همکاران،۱۹۹۹a). علایم دیگر شامل قرمزی بدن و ضمائم به دلیل گسترش کروماتوفورها (Lightner و همکاران، ۱۹۹۸؛ Nadala و همکاران، ۱۹۹۸)، کاهش غذا خوردن (Durand و همکاران، ۱۹۹۶؛ Flegel، ۱۹۹۷)،کاهش تمیز کزدن آبشش ها و پاسخ به محرک‌ها (Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵)، کوتیکول نرم (Lo و همکاران، ۱۹۹۶b)، تورم زوائد برانشیواستگال(Branchiostegal) به دلیل تجمع مایع (Otta و همکاران، ۱۹۹۹)، تورم و بی‌رنگ شدن هپاتوپانکراس (Sahul-Hameed و همکاران، ۱۹۹۸) و همولنف رقیق و تأخیر در لخته شدن می‌باشد (Kiatpathomchai و همکاران، ۲۰۰۱؛).

در سطح مزارع، میگوهای بیمار کناره استخرها تجمع کرده و ۲-۱ روز قبل از تلفات علایم بیماری را نشان می دهند (Kou و همکاران، ۱۹۹۸). تلفات تجمعی ممکن است ظرف مدت ۱۰ روز به ۱۰۰ درصد برسد (Karunasagar و همکاران، ۱۹۹۷). در استخرهای پرورشی، میگوهای جوان در هر سن و اندازه‌ای به بیماری حساس هستند اما تلفات سنگین ۲-۱ ماه پس از ذخیره‌سازی بروز می‌کند (Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸). در هیستوپاتولوژی عفونت لکه سفید با سلول‌هایی با هسته های هیپرتروفی شده مشخص می‌شوند و گنجیدگی‌هایی داخل هسته‌ای و کروماتین به حاشیه رانده شده دیده می‌شود (Durand و همکاران،۱۹۹۷؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۰). این گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای به طور محسوسی مشخص بوده و بزگتر از گنجیدگی‌های پدید آمده در بیماری IHHNV هستند (Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). هسته‌های آلوده بازوفیلی و متسع می‌شوند (Durand و همکاران،۱۹۹۶ و ۱۹۹۷؛ Flegel، ۱۹۹۷؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۶b؛ Otta و همکاران، ۱۹۹۹). ممکن است در مراحل پایانی عفونت شکسته شدن هسته و پارگی سلول رخ بدهد که منجر به تشکیل نقاط نکروزه‌ای می‌شود که مشخصه ان واکوئله شدن بافت است (Wang و همکاران، ۱۹۹۹a).

۴-۱- بیماری‌زایی لکه سفید

روش‌های تجربی تلقیح ویروس لکه سفید که راه‌های طبیعی ورود ویروس را شبیه سازی می‌کند توسعه یافته است. روش‌های تلقیح شامل: انتقال از طریق آب، به واسطه غوطه‌وری میگوها در آب حاوی سوسپانسیون ویروسی (Chou و همکاران، ۱۹۹۸) و تغذیه با بافت‌های آلوده به ویروس برای یک مرتبه در روز به مدت تا ۷ روز می باشد (Chang و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lightner و همکاران، ۱۹۹۸؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۸b).

روش دوم بیشتر مورد توجه می‌باشد زیرا مهم‌ترین روش انتقال ویروس در شرایط طبیعی پرورش می‌باشد (Chou و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lotz و Soto، ۲۰۰۲؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۱).

راه‌های ورود ویروس لکه سفید به بدن میگو به طور مشخص شناسایی نشده است. بر اساس اطلاعات به دست آمده از آزمایشات خوراکی، مکان‌های اولیه تکثیر ویروس در میگوهای جوان ببری سیاه سلول های اپی‌تلیال زیر کوتیکولی معده و سلول های آبشش، تگومنت و بافت همبند هپاتوپانکراس می‌باشد (Chang و همکاران، ۱۹۹۶). در مطالعه دیگری در میگوی ژاپنی نشان داده شد که سلول‌های روده میانی ممکن است مکان انتقال ویروس‌های تکثیر شده باشد که از غشاء پایه عبور می‌کنند (Di Leonardo و همکاران، ۲۰۰۵). در میگوی ببری سیاه چالش با ویروس به روش غوطه وری نشان داد که مهاجرت هموسیت‌ها به سمت آبشش و روده میانی باعث منفی شدن این بافت‌ها از ویروس در مراحل پایانی عفونت می‌شود (۷۲-۴۸ ساعت پس از تلقیح ویروس). بسیاری از سلول‌های آبشش و تعداد کمی از سلول‌های اپی‌تلیوم روده میانی از لحاظ آلودگی به ویروس مثبت هستند. مطالعات با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در مراحل اولیه عفونت (۸ ساعت پس از تلقیح ویروس)

VP28 در سلول‌های اپی‌تلیال روده میانی مشاهده گردید که نشانه لیز(Lysis)شدن ذرات ویروسی می‌باشد. هسته‌های حاوی VP28 هرگز در اپی‌تلیال روده میانی مشاهده نمی‌شوند (Arts و همکاران،۲۰۰۷).

در یک مطالعه مواجهه سازی به روش خوراکی نشان داد که بافت‌های اولیه تکثیر ویروس سلول‌های اپی‌تلیال روده قدامی، سلول‌های آبشش‌ها و در میزان بالای ویروس (۱۰۰۰۰SID50)، سلول‌های غدد آنتنی نیز هستند (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷).

مکانیسم انتشار ویروس از بافت های اولیه به سایر بافت ها قابل بحث است. در بعضی پژوهش‌ها هموسیت‌های خرچنگ دراز آب شیرین به عنوان منتقل کننده ویروس در بدن شناخته شده‌اند (Di Leonardo و همکاران، ۲۰۰۵). در مطالعات دیگری هموسیت‌های در گردش در میگوی آب شیرین و میگو به عفونت لکه سفید مقاوم بودند ، بنابراین احتمالاً ویروس لکه سفید از طریق همولنف در گردش به صورت سلول‌های آزاد به اندام‌های هدف می‌رسد و ممکن است که این مکانیسم‌ها وابستگی میزبانی داشته باشند (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷).

سلول‌های اندام‌های هدف ویروس لکه سفید عبارتند از اندام‌های با منشاء اکتودرم و مزودرم که شامل: اپی‌درم، آبشش‌ها، روده قدامی، روده خلفی، غدد آنتنی، ارگان لنفوئیدی، عضلات، پایه چشم، قلب، گنادها، سلول‌های بافت خونساز و سلول‌های مرتبط با بافت عصبی می‌باشند (Chang و همکاران، ۱۹۹۶و۱۹۹۸؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۶؛ Kou و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۷؛ Wang و همکاران،۱۹۹۹b؛ Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). سلول‌های اپی‌تلیال اندام‌های آندودرومی از قبیل هپاتوپانکراس، سکوم قدامی و خلفی روده میانی و مجرای روده میانی به ویروس لکه سفید مقاوم هستند (Sahul-Hameed و همکاران، ۱۹۹۸). در مراحل پایانی عفونت سلول‌های اپی‌تلیوم معده،آبشش‌ها و پوسته به شدت آسیب می‌بینند که این حالت ممکن است به نقص عملکردی چندین اندام منجر شده و درنهایت سبب مرگ شود (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Wang و همکاران،۱۹۹۹a).

مولکول‌هایی با عملکرد مهم بیولوژیکی که در پاسخ به عفونت ویروس لکه سفید متغیرند عبارتند از آن‌هایی که در تولید انرژی، سنتز اسید نوکلئیک، هموستاز کلسیم و یا ارتباطات سلولی دخیل هستند. بسیاری از این قبیل مولکول‌ها ممکن است به عنوان نشانگرهای بیولوژیکی مفید باشند و احتمالاً برای تعیین اندام‌های هدف و کنترل تکثیر ویروس مناسب باشند (Wang و همکاران، ۲۰۰۷).

۵-۱- ورود ویروس به سلول

راه‌های ورود ویروس‌ها به داخل سلول‌ها بر پایه ساختمان آن‌ها مورد مطالعه قرارگرفته است. بر اساس ساختار ساختمانی ویروس‌ها، آن‌ها به دودسته مهم پوشش‌دار و بدون پوشش تقسیم می‌شوند. ویروس‌های پوشش‌دار دارای ژنوم ویروسی و پروتئین‌های هسته مرکزی می‌باشند که درون یک یا دو غشاء پیچیده شده‌اند. این غشاءها

از سلول‌های میزبان در زمان ساخته‌شدن و تکثیر آن‌ها به دست آمده‌اند. برای ایجاد عفونت و بیماری‌زایی، ویروس ابتدا باید خود را به تعدادی سلول‌های میزبان چسبانده و نوکلئیک اسید خود را به درون سلول‌های میزبان رها نماید. تعداد زیادی از ویروس‌های DNA می‌توانند وارد هسته سلول‌ها شوند، درحالی‌که ویروس‌های RNA با تعدادی استثناء در ماده سیتوپلاسمی یا سیتوزول تکثیر می‌یابند. مولکول‌هایی که ویروس‌ها به آن‌ها می‌چسبند شامل یک مجموعه‌ای مختلف از سلول‌های پروتئین، کربوهیدرات یا چربی می‌باشد. تعدادی از این سلول‌ها فقط نقش گیرنده ویروس در سطح سلول را دارند؛ اما بقیه آن‌ها ممکن است علاوه بر این وظیفه که موجب اتصال ویروس‌ها می‌شوند، مسئول هدایت ویروس‌های متصل شده به داخل سلول‌ها و انتقال پیام‌هایی به داخل سیتوپلاسم نیز باشد. همچنین گیرنده‌ها می‌توانند به‌عنوان پشتیبان، ویروس‌ها را راهنمایی نموده تا موجب تأیید تغییرات سلولی و اجازه دادن به سلول‌ها به‌منظور چسبیدن ویروس‌ها و نفوذ در آن‌ها باشد. شناسایی و توزیع فاکتورهای گیرنده در سطح سلول‌ها به نوع سلول‌ها، بافت‌ها و نوع ارگانیزم‌هایی که می‌توانند موجب ایجاد عفونت نمایند بستگی دارد.

تعدادی از ویروس‌ها از فاکتورهای چندگانه چسبیدن به سلول‌ها و گیرنده‌ها به‌طور موازی استفاده می‌نمایند. واکنش‌های بین کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها نقش اساسی و مهمی در تهاجم ویروس‌ها به سلول‌ها بازی می‌کنند. تعدادی از ویروس‌ها به‌طور اختصاصی به گروه اسیدهای سیالیک می‌چسبند، درحالی‌که برخی دیگر به گلوکز آمینوگلایسیس یا گلیکولیپیدها متصل می‌شوند. در تعدادی از سیستم‌ها لکتین‌ها در سطح سلول قرار گرفته و رشته‌های کربوهیدراتی در سطح ویروس قرار دارند. ویروس‌های پوشش‌دار شبیه *Myxovirus* ها یا *Paramyxovirus* می‌توانند به سیالیک اسید که دارای گلیکوپروتئین با فعالیت neuramidinase می‌باشند متصل شوند. این پروتئین‌ها معمولاً دارای فعالیت چندگانه بوده که می‌توانند فعالیت‌های دیگری از قبیل فاکتورهای اتصالی به غشاء یا آنزیم‌های تخریب‌کننده گیرنده‌ها را نیز پشتیبانی کنند.

برخلاف ویروس‌های پوشش‌دار، ویروس‌های بدون پوشش شبیه *rotavirus* ها فاقد غشاء می‌باشند و این دسته از ویروس‌ها به روش‌هایی غیر از اتصال به سلول و ورود به آن تکیه کرده و از روش‌هایی شبیه تجزیه کردن غشاء یا ایجاد یک سوراخ در غشاء استفاده نمایند. تعداد زیادی از ویروس‌ها به روش endocytic قادر به نفوذ در سلول‌ها و ایجاد عفونت می‌باشند. (Namikoshi و همکاران، ۲۰۰۴).

ویروس‌هایی که از روش اندوسیتوز استفاده می‌کنند از طریق روش‌های مختلف از جمله وزیکول‌های clathrin-coated، فاگوسیتوز، ماکروپینوسیتوزیس و ایجاد حفره برای ورود به سلول استفاده می‌کنند. در این روش ویروس‌ها به داخل سیتوپلاسم سلول‌های میزبان وارد می‌شوند. بر اساس نوع ویروس، ذرات ویروسی را می‌توان در قسمت‌های مختلف سلول میزبان اعم از اندام‌های داخلی، لیزوزم‌ها، شبکه آندوپلاسمیک و در پاره‌ای مواقع در دستگاه گلژی مشاهده نمود.

وجود pH ملایم در اندام‌های داخلی سلول تأمین‌کننده شرایط خوبی است که ویروس به داخل سلول وارد شده و سپس تکثیر شود. برای مثال ورود ویروس آنفولانزای تیپ A که یک ویروس RNA دارای پوشش می‌باشد به این شکل است که هم آگلوتیناسیون ویروسی با سیالیک اسید حاوی گلیکوپروتئین یا گلیکولیپید پیوند برقرار می‌کند. ویروس از طریق وزیکول‌های Cathrin-coated به داخل سلول حمل شده و به ذرات و اجزاء داخل سلولی وارد می‌شود. pH پائین موجب فعال‌شدن مجاری پروتئینی M_2 در سطح ویروس شده و اجازه می‌دهد که کپسول داخلی ویروس به دلیل شرایط اسیدی حل شود. مواد حد واسط هم‌آگلوتیناسیون ویروسی باعث اتصال پوشش ویروس به اندام‌های داخلی سلول می‌شود.

نوکلئوپروتئین‌های ویروس از همدیگر جداشده و به حامل B(importin B) متصل شده و از طریق کمپلکس سوراخ هسته (Nuclear Pore Complex) یا NPC وارد هسته سلول میزبان می‌شود. بعد از نفوذ نوکلئوپروتئین ویروس به داخل هسته سلول، سایر نوکلئوپروتئین‌های ویروسی نیز یا وارد هسته سلول یا سیتوزول‌های اختصاصی می‌شوند. (Witteveldtو همکاران، ۲۰۰۵)

جهت حرکت در گوشه‌های مختلف سلول، ویروس‌های واردشده اغلب از پروتئین‌های سلولی یا حفره‌های داخلی سلولی بهره می‌برند. هسته سلول‌های میزبان موجب فراهم شدن عملیات بسیار عالی برای تکثیر ویروس‌ها شد و اندازه آن بسته به نوع DNA یا RNA به واحدهای کوچک RNA توسط آنزیم تغییردهنده تبدیل می‌شود. به‌هرحال ورود به هسته سلول‌های میزبان برای ویروس‌ها بسیار مشکل است و زنده ماندن نیز در هسته سلول‌ها به همین ترتیب مشکل می‌باشد و ویروس‌ها باید از مکانیسم سلول میزبان پیروی نمایند (Witteveldtو همکاران، ۲۰۰۵). همان‌گونه که ذکر شد ورود ویروس و کپسول ویروسی از طریق NPC صورت می‌گیرد. برای هدف قرار دادن سلول‌ها، ویروس‌ها دارای رسپتورها با گیرنده‌های سیتوزولیک بوده یا از پیام‌های ساکن شدن روی هسته استفاده می‌کنند. به‌عنوان‌مثال ویروس HIV-1 و آرنوویروس‌ها به حمل‌کننده 7(importine7) وصل می‌شوند درحالی‌که ویروس هپاتیت B و آنفولانزا به حمل‌کننده α و B (importinα,B) می‌چسبند. حداکثر اندازه جهت انتقال ویروس‌ها از طریق NPC حدود ۳۹ نانومتر می‌باشد. ویروس‌های کوچک‌تر از این اندازه بدون تغییر شکل وارد هسته سلول میزبان می‌شوند درحالی‌که ویروس‌های بزرگ‌تر از این میزان باید تغییر شکل داد تا ژنوم آن‌ها اجازه ورود از طریق NPC را پیدا کند. تداخل بین ویروس و حاملین B یا 7 یا هیستون HI(histone HI) موجب ایجاد تغییرات در شکل ویروس و کپسول آن می‌شود. درنهایت DNA ویروس‌ها به داخل نکئوپلاسم سلول میزبان وارد می‌شوند. به‌استثنای *Lentivirus* ها، ویروس‌های *retovirus* نیز نمی‌توانند از NPC جهت وارد شدن به داخل هسته استفاده نمایند.

در زمان تقسیم سلولی از طریق میتوز کمپلکس یکنواختی وارد هسته سلول شده و این در زمانی است که پوشش ویروس وجود نداشته و همین موضوع باعث عفونت در سلول‌های تقسیم شده می‌شود. در خصوص ورود

ویروس‌های بی‌مهرگان و نفوذ آن‌ها به داخل سلول‌ها هنوز اطلاعاتی کامل‌تر نیاز است (Namikoshi و همکاران، ۲۰۰۴).

Escobedo-Bonilla و همکاران (۲۰۰۷) راه ورود ویروس لکه سفید به بدن و مکانیسم انتشار آن در میان بافت‌ها را مشخص نمودند. بر این اساس آبشش‌ها و اپی‌تلیوم روده قدامی در میگوی سفید غربی درگاه ورود ویروس لکه سفید پس از تلقیح خوراکی آن محسوب می‌شوند. پس از تکثیر اولیه در این بافت‌ها، ویروس از غشاء پایه عبور کرده و به سینوس‌های خونی مربوطه می‌رسد. از طریق جریان همولنف ویروس در اندام‌های داخلی منتشر می‌شود که موج جدیدی از عفونت را ایجاد می‌کند. شیوع طبیعی بیماری لکه سفید به اشکال فوق حاد، حاد تا تحت حاد ومزمن تقسیم بندی می‌شود که به ترتیب تلفات آن‌ها بین ۳-۲ روز، ۱۰-۷ روز و ۲۸-۱۵ روز بروز می‌کند (Sudha و همکاران، ۱۹۹۸).

۶-۱- دفاع ضدویروسی

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

گیرنده‌های (Toll-like receptors) Toll-like نقشی اساسی در واکنش‌های ایمنی مادرزادی دارا می‌باشند. این گیرنده‌ها (TLR_S) از نظر ساختمانی شبیه رسپتورها و گیرنده‌های انترلوکین – ۱ بوده و عمل آن‌ها شبیه فعال‌کننده پیام‌های داخل سلولی در مقابل آسیب‌ها یا عفونت‌ها می‌باشد. تاکنون ده نوع از این گیرنده‌ها در پستانداران شناسایی شده است. برای مثال TLR4,5 & 9 برای شناسایی LPS بسیار ضروری می‌باشند. تاژک باکتری‌ها و DNA آن‌ها دارای ترکیب اصلی غیرمتیله CpG می‌باشند TLR_2(CpG DNA) در شناسایی پپتیدوگلیکان و لیپوپپتیدها دخالت دارند. TLR_6 می‌تواند با TLR_2 همکاری نماید و موجب شناسایی پپتیدوگلیکان و لیپوپپتیدهای مایکوپلاسماها شوند. TLR_3 موجب فعال شدن ایمنی سلولی در پاسخ به dsRNA ناشی از ویروس‌ها می‌شود. اخیراً نیز ترکیبات بسیار کوچک ضدویروسی که بنام imidazoquinolines (Imiquimod) و R-848 می‌توانند موجب فعال کردن سیستم ایمنی از طریق TLR_7MyD88 که وابسته به سیستم سیگنالی است شوند. به‌هرحال فاکتورهای TLR_S موجب شناسایی ترکیبات اختصاصی ایجادشده توسط عوامل بیماری‌زا می‌شوند. بر اساس این فعالیت TLR_S شامل یک سری از مولکول‌های وفق دهنده داخل سلولی بوده که موجب راهنمایی و تنظیم سیگنال‌های ایجادشده ناشی عوامل بیماری‌زا می‌باشد. در حشرات شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌های که موجب تحریک سیستم ایمنی می‌شوند از طریق TLR ها انجام می‌شود. به‌هرحال در بی‌مهرگان سیستم TLR در فعالیت‌های ضدقارچی و

ضدباکتریایی دخالت داشته ولی در خصوص فعالیت آن‌ها در عفونت‌های ناشی از ویروس‌ها هنوز به‌خوبی شناسایی نشده است. در مهره‌داران از مدت‌ها پیش نقش اینترفرون‌های α و β ناشی از عمل سیتوکیناز در مقابل عفونت‌های ویروسی مشخص گردیده است. این سلول‌ها دارای توانائی تحریک راه‌های مختلف ضدویروسی می‌باشند. این سلول‌ها موجب ایجاد سیگنال‌هایی از طریق Janus kinase/signal شده و هزاران ژن تولید می‌کند.

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

یکی از مهم‌ترین ایجادکننده اینترفرون‌ها مولکول dsRNA می‌باشد. این مولکول در هنگام عفونت ویروسی درنتیجه تکرار ژنوم ویروسی و RNA ویروس‌ها به یک ساختمان ثانویه تبدیل می‌شود. در پستانداران dsRNA توسط TLR_3 شناسایی می‌شوند که موجب فعال‌شدن فاکتور ۸۸ تمایز میلوئید Myeloid differentiation factor 88 می‌شود که یک مولکول وابسته است همچنین dsRNA موجب فعال شدن فعالیت ضدویروسی داخل سلولی نیز شده که این عمل به‌وسیله تأثیر مستقیم PKRها می‌باشد. این فعالیت موجب هدایت مهارکنندگی سنتز سلولی پروتئینی از طریق فسفریلاسیون فاکتور α ۲ (elf 2α) (eukaryotic translation initiation factor 2α) می‌شود. این سیستم در بی‌مهرگان مثل سخت‌پوستان وجود ندارد (Flegel، ۲۰۰۷).

بر اساس مطالعات صورت گرفته مشخص‌شده است که سخت‌پوستان مثل میگوی وانامی می‌توانند ایجادکننده دفاع ضدویروسی dsRNA باشند. مشخص گردیده است که میگوهایی که با ویروس‌های WSSV و TSV به‌صورت تجربی آلوده و سپس با ds RNA درمان شده‌اند مقاومت آن‌ها افزایش یافته است. ایجاد این سیستم دفاعی dsRNA مستقل بوده و ارتباطی با ردیف بازهای RNA نداشته و به‌صورت یک مولکول ثابت به‌صورت میانجی در پدیده اینترفرون دخالت دارد. این پدیده نشان می‌دهد که ممکن است واکنش‌های عمومی ضدویروسی در بی‌مهرگان وجود داشته باشد. همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که ترکیباتی میکروبی مثل LPS یا بتاگلوکان‌ها ممکن است موجب افزایش ایمنی میگوها در مقابل ویروس‌ها شوند. به‌طور تجربی نشان داده‌شده است که ژن LGBP موجب افزایش ایمنی و تعدیل عفونت WSSV در مراحل اولیه عفونت شده و همچنین با پیشرفت بیماری موجب کاهش نظم در سیستم پروفنل‌اکسیداز می‌شود. یک ژن جدید بنام PmAV در مقاومت ویروسی میگوی مونودن شناسایی و کپی‌برداری شده است. این ژن با ۱۷۰ اسیدآمینه و با C-type lectin-like domaine(CTLC) ساخته شده است. پروتئین‌های حامل PmAV دارای یک فعالیت ضدویروسی قوی بوده که این موضوع از طریق آزمایشگاهی و مهار تأثیرات سلولی در محیط کشت مشاهده گردیده است. مطالعات ایمنولوژیکی نشان می‌دهد که این ژن در سیتوپلاسم سلول‌های میگو بوده ولی به ویروس WSSV متصل نمی‌شود. چنین حدس زده می‌شود که مکانیسم PmAV شامل جلوگیری از چسبیدن ویروس به سلول میزبان

می‌باشد و مکانیسم‌های دیگری در عمل ضدویروسی این مولکول نقش دارند که هنوز شناخته نشده است. تعدادی از مواد ضدویروسی از بافت‌های موجودات بی‌مهره ازجمله میگوی Setiferus، خرچنگ آبی، خرچنگ آب شیرین که می‌تواند با گروه‌های مختلفی از ویروس‌های RNA یا DNA مثل Sindbis virus، vesicular stomatatis virus، vacceina virus، mengo virus، Banzi virus و poliomyetitis virus متصل شوند، جداسازی و شناسایی گردیده است. فعالیت مهارکنندگی این مواد هنوز شناسایی نشده است. اخیراً هموسیانین با وزن مولکولی ۷۳ تا ۷۵ کیلو دالتون از میگوی مونودون جداشده و دارای خصوصیات ضدویروسی غیراختصاصی بوده ولی فاقد تأثیرات مسمومیت سلولی علیه سلول‌های میزبان می‌باشد (Laxmilatha و Laxminarayana ، ۲۰۰۴).

۷-۱-پاسخ شبه ایمنی

تحقیقات زیادی در مورد سیستم ایمنی سخت‌پوستان انجام‌شده، همگی بیان می‌نمایند که اکثر بی‌مهرگان فاقد سیستم ایمنی اکتسابی می‌باشند و دفاع آن‌ها ناشی از سیستم ایمنی ذاتی است که هم به‌صورت سلولار و هم هومورال می‌باشد. ولی وجود یک سیستم شبه ایمنی علیه ویروس لکه سفید WSSV در میگو تشخیص داده‌شده است. میگوهایی که پس از شیوع بیماری WSSV زنده مانده‌اند در مواجهه مجدد با این ویروس بعد از ۴ ماه، درصد بقاء نسبی ۹۴٪ نشان داده‌اند، این مقاومت میگوهایی که قبلاً یک‌بار عفونی‌شده‌اند تأییدی بر تقویت سیستم شبه‌ایمنی می‌باشد (Sanchez Martinez وهمکاران، ۲۰۰۷).

در یک مطالعه در سال ۱۹۹۷ در ژاپن نشان داده شد که میگوهای بازمانده از شیوع ویروس WSSV پس از مواجهه مجدد با این ویروس میزان بقاء خیلی بیشتری نسبت به میگوهای آلوده نشده دارند(Smolko و Lombardo، ۲۰۰۷) همچنین یک مورد مشابه در میگوهای بازمانده از عفونت WSSV نشان داده که اگر یک ماه بعد از عفونت به‌صورت تزریق عضلانی مواجهه با ویروس زنده شوند، مقاومت می‌کنند. این تجربیات مشخص کرد که یک پاسخ شبه ایمنی سه هفته پس از عفونت اولیه شروع‌شده و تا هفته چهارم پیشرفت کرده و تا انتهای ماه دوم پایدار است. مستنداتی هم در مورد فعالیت خنثی‌کنندگی ویروس در پلاسمای گرفته شده از همولنف میگوهای بازمانده از طریق تجویز ویروس تیمار شده با پلاسما در میگوهای سالم به دست آمد. از طریق کروماتوگرافی تبادل کاتیونی ماده‌ای در پلاسما میگوهای بازمانده تشخیص داده‌شده که ممکن است مرتبط با این فعالیت خنثی‌کنندگی باشد(Wu و همکاران، ۲۰۰۲).

۸-۱- مکانیسم‌های گریز ویروس‌ها از سیستم دفاعی میزبان

بعد از ورود ویروس به داخل بدن، سلول‌های میزبان معمولاً اجرام خارجی واردشده به بدن را شناسایی و موجب تحریک سیستم ایمنی مؤثر به‌منظور جلوگیری از ورود ویروس به داخل سلول‌ها می‌شوند و درنهایت مانع تکثیر و گسترش ویروس می‌گردند. اولین فاز سیستم دفاعی در بدن مهره‌داران شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده

ویروس‌ها، بالاخص پپتیدها می‌باشند. این پپتیدها به‌عنوان اجسام خارجی و به‌مثابه یک آنتی‌ژن به‌عنوان Antigen-Presenting cell آنتی‌ژن کننده ایجاد در سطح سلول‌های compatibility complex (MHC)AntigenMajor histo می‌باشند. وقتی‌که شناسایی صورت گرفت، سیستم دفاع ایمنی آبشاری سلولی و همورال به‌منظور شناسایی قطعی ویروس آغاز می‌شود. به‌عنوان‌مثال آنتی‌بادی‌ها می‌توانند موجب خنثی نمودن ویروس‌های درحال گردش در سلول‌ها شده و همچنین سلول‌هایی که دارای ویروس می‌باشند را تخریب نمایند. پاسخ سلولی همچنین موجب تجزیه نمودن سلول‌های حاوی ویروس شده و کمک به شروع تولید آنتی‌بادی در بدن می‌نماید. فاکتورهای قابل‌حل ازقبیل فاکتور نکروزکننده تومور (TNFs)، اینترلوکین‌ها (ILs) و اینترفرون‌ها (IFNs) تداخل با لنفوسیت‌ها نموده و موجب توقف یا گسترش پاسخ ایمنی می‌شود. تداخل بین ویروس و سیستم ایمنی در شناسایی ویروس توسط سلول‌های میزبان همچنین در بهبود و نجات میزبان بسیار مهم و حیاتی می‌باشد. تعداد زیادی از مسائل مرتبط با تداخل ویروس- سیستم ایمنی در دهه اخیر روشن‌شده است. به‌هرحال این موضوع هنوز بی‌پاسخ مانده است که چگونه ویروس خود را از پاسخ سیستم ایمنی دور نگه داشته و باعث ایجاد عفونت در بدن میزبان می‌شود (Luo و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۷).

ویروس از روش‌های مختلفی جهت جلوگیری از اثر سیستم ایمنی میزبان بر خود استفاده می‌کند که شامل جلوگیری از ایمنی هومورال، دخالت در اینترفرون‌ها، مهار و تغییر سیتوکیناز و کیموکینازها، مهار آپوپتوزیس و فرار کردن از CTLs و NKs و همچنین تعدیل کردن فعالیت MHC می‌باشد.

آپوپتوزیس به‌عنوان یک عامل ایمنی مادرزادی می‌تواند در محدود کردن تکثیر ویروس‌ها مؤثر باشد در این روش مرگ سریع سلول‌ها موجب محدود شدن تکثیر و تولید ویروس‌ها و کاهش یا حذف پراکنده شدن ویروس‌ها در سلول‌های میزبان می‌شود. اغلب ویروس‌ها دارای مکانیسمی هستند که یا از آپوپتوزیس فرار کرده و یا در ایجاد آن تأخیر می‌اندازند و درنتیجه اجازه می‌یابند که میزان زیادی ویروس را تولید و تکثیر نمایند. تعداد زیادی از ویروس‌ها دارای ژن‌های رمزداری هستند که به‌طور مؤثر باعث توقف یا تأخیر در ایجاد آپاپتوز شده و فرصت کافی برای ازدیاد ویروس در حد مناسب برای ایجاد بیماری پیدا می‌شود. به‌عنوان‌مثال باکولوویروس‌ها دارای P33 و IAP پروتئین بوده که می‌تواند موجب مهار چندگانه آنزیم پروتئاز یا (Caspase) شود. بعلاوه تعداد زیادی از ویروس‌ها در حال رشد به‌منظور ایجاد فعالیت آپوپتوزیس در مراحل آخر عفونت ویروسی لازم است. این موضوع یک مرحله مهم و نهائی در گسترش ویروس به سلول‌های هم‌جوار سلول‌های آلوده بوده که می‌تواند موجب فرار سلول‌ها از پاسخ‌های ایمنی التهابی شده و همچنین باعث محافظت ویروس‌های ایجادشده از آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها باشد (Xu و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kim و همکاران، ۲۰۰۷).

مطالعات اخیر در میگو نشان می‌دهد که آپوپتوزیس مسئول حذف سلول‌های آلوده به ویروس در سلول‌های عفونی می‌باشد. هرچند WU و Moroga در سال ۲۰۰۴ بیان کردند که روش آپوپتوزیس نمی‌تواند موجب مهار ویروس لکه‌سفید در میگو ژاپنی شود. گزارش Sahtout و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که میگوهای با علائم

ظاهری WSSV دارای ۴۰٪ سلول‌های آپاپتوز شده بوده و چنین حدس زده می‌شود که این موضوع دلالت بر مرگ میگوها می‌باشد.

همچنین در بروز بیماری سر زرد در میگوی مونودون گسترش و ظهور آپوپتوزیس در سلول‌های میگو از مهم‌ترین دلایل عدم کارایی و مرگ سلول‌های میگوی میزبان ویروس می‌باشد. به‌هرحال درجه آپوپتوزیس در بافت‌های مختلف میگو با بیماری لکه‌سفید نشان می‌دهد که این پدیده بعد از بروز بیماری در میگو به وجود آمده، اما اینکه به چه میزان در مرگ‌ومیر میگوها دخالت دارد نیازمند تحقیقات بیشتر است (افشار نسب ، ۱۳۸۶).

۹-۱- ایمنی ضدویروسی

در سخت پوستان فقط ایمنی ذاتی بدون حافظه سرم شناسی وجود دارد (Lee و Söderhäll، ۲۰۰۲). ایمنی ذاتی شامل سدهای فیزیکی، پاسخ سلولی و خونی است. کوتیکول سفت و مومی شکل در سخت پوستان به عنوان یک سد مکانیکی در برابر حمله عوامل بیماری‌زا عمل می کند (Lee و Söderhäll، ۲۰۰۲). فاکتورهای خونی به طور عمده از هموسیت ها منشاء می‌گیرند و در طی پاسخ ایمنی آزاد می‌شوند. موادی که در طی پاسخ ایمنی خونی (humoral) آزاد می‌شوند شامل: لکتین‌ها، آنزیم‌های دفاعی (فنل اکسیداز)، لیپوپروتئین‌ها، پپتیدهای ضدمیکروبی، پروتئین متصل شونده به بتا ۱،۳ گلوکان، پروتئین متصل شونده به لیپوپلی ساکارید (LPS)، پروتئین متصل شونده به پپتیدوگلیکان و میانجی‌های اکسیژن فعال هستند. هموسیت‌ها در ایجاد لخته، شناسایی ذرات خارجی، فاگوسیتوز، ملانیزه کردن، کپسوله کردن، کشندگی سلولی و ارتباطات سلول به سلول نقش دارند (Lee و Söderhäll، ۲۰۰۲). بیشترین پاسخ های سلولی و خونی مطالعه شده دربرابر عفونت های باکتریایی، قارچی وانگلی هستند. مطالعات اخیر شواهدی از ایمنی ضد ویروسی در میگوها را مشخص کرده است که مشتمل بر وجود گیرنده های شبه Toll (TLR)، تداخل RNA (RNA)، مواد ضدویروسی در بافت ها و ژن‌های ایمنی می‌باشد. TLR در پستانداران به عنوان فعال کننده سلول‌های ایمنی فعالیت می‌کند، همچنین علامت دهی داخل سلولی بر علیه عفونت، شناسایی لیپوپلی ساکارید، پپتیدوگلیکان و لیپوپروتئین ها را داشته و در ایمنی ضد ویروسی نیز دخیل می باشد (Barton ، ۲۰۰۷). TLR در میگوی سفید غربی و میگوی ببری غول پیکر (*P.monodon*) شناسایی شده است (Arts و همکاران، ۲۰۰۷).نقش TLR در میگوها در برابر عفونت ویروسی همچنان در حال بررسی است. ژن‌های کد کننده برای تداخل RNA(RNA) در میگوی سفید غربی یافت شده است . تزریق RNA دورشته‌ای (dsRNA) در میگوی سفید غربی ایمنی ضد ویروسی را القاء می‌کند (Robalino و همکاران، ۲۰۰۷).

همچنین در میگوی چینی(*P. chinesis*) RNAهای کوتاه تداخل کننده (SiRNA) مرتبط با پروتئین های ویروسیVP15 یا VP28 در کاهش تلفات در میگوی ببری سیاه و میگوی ژاپنی (*P.japonicus*) مؤثر بوده است (Kim و همکاران، ۲۰۰۷؛ Xu و همکاران، ۲۰۰۷).

Xu و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که به وسیله چندین تزریق از RNAی کوتاه تداخل کننده پروتئین ویروسی VP28 از رونوشت برداری و تکثیر ویروس لکه سفید جلوگیری می شود.ژن ضد ویروس PmAV از میگوی ببری سیاه آلوده به ویروس لکه سفید کلون شد. PmAV از روز دوم پس از آلودگی با میزان بالای ویروس در هپاتوپانکراس بیان می‌شود. این ژن در شرایط In vitro در برابر اثر سیتوپاتیک (CPE) ایریدوویروس هامور سنگاپور(SGIV) مؤثر بود (Luo و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۷).

یک ژن دیگر به نام فاکتور ضد پلی ساکارید (Antipolysaccharide factor) در خرچنگ دراز آب شیرین گونه *Pacifastacus leniusculus* پس از تزریق با ویروس غیر فعال شده با اشعه ماوراء بنفش مشاهده شد. این فاکتور سبب تکثیر کمتر ویروس و افزایش تلفات آهسته تر در مقایسه با آن هایی که فقط ویروس دریافت کرده بودند شد (.Liu, H و همکاران، ۲۰۰۶).

۲۲ ژن ضد ویروس که پروتئین هایی مثل پروتئین شبه اینترفرون (Interferon like protein) و پروتئین شبه اولیگوسنتتاز (oligo synthetase like protein) را کد می کنند در هموسیت میگوهای ژاپنی بازمانده از شیوع بیماری لکه سفید یافت شده است (He و همکاران، ۲۰۰۵). دو پروتئین از هموسیانین میگوی ببری سیاه آلوده به ویروس لکه سفید جداشد. این پروتئین ها در شرایط In vitro از تکثیر ویروس‌های ایریدوویروس هامور سنگاپور، ویروس قورباغه ۳ (FV3)، ویروس لنفوسیستیس (LDV)، رئوویروس تردفین (ThRV)، بیرناویروس ماهی آنجل (ABV) و ویروس نکروز عفونی پانکراس (IPN) جلوگیری کردند (Zhang و همکاران، ۲۰۰۴). مواد ضد ویروس در بافت‌های استخراج شده ازمیگوی سفید شمالی (*P. stiferus*) خرچنگ آبی آتلانتیک (*Callinectes sapiduss*) و خرچنگ قرمز مرداب (*Procambarus clarkii*) یافت شده است. این مواد در برابر ویروس واکسین (Vaccina virus)، ویروس فلج اطفال (*poliovirus*)، ویروس منگو (*mengovirus*)، ویروس *Sindbis*، ویروس Banzi و ویروس تورم دهان وزیکولی (vesicular stomatitis virus) در شرایط In vitro مؤثر بوده اند (Pan و همکاران، ۲۰۰۰).

سطوحی از دیگر فاکتورهای ایمنی از قبیل فنل اکسیداز، لیزوزیم، همولیزین و هماگلوتینین در میگوهای بازمانده از وقوع بیماری بالاتر بوده است (He و همکاران، ۲۰۰۵).

Roux و همکاران (۲۰۰۲) اعلام کردندکه در میگوهای سفید شمالی آلوده به ویروس لکه سفید ژن های مرتبط با پروتئین های متصل شونده به لیپوپلی‌ساکارید و بتا ۱،۳ گلوکان افزایش (upregulated) می یابند. این تحقیق پاسخ عمومی دفاعی سخت پوستان در برابر انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زا (ویروس، باکتری و قارچ) را نمایان ساخت.

۱۰-۱- راهکارهای کنترل و کاهش تلفات ناشی از بیماری لکه سفید

همه گیری‌های جهانی ایجاد شده توسط ویروس لکه سفید سبب زیان‌های جدی در تولید مزارع میگو در آسیا و آمریکا گردید. در پاسخ به این خسارات محققین چندین راهکار پیشگیری کننده و درمانی را مورد آزمایش قرار دادند:

۱-۱۰-۱- ایمنی زیستی

واژه ایمنی زیستی به معنای تلاش در جهت جلوگیری از وقوع، تماس، انتقال و انتشار عوامل بیماری‌زا در میگوها می‌باشد. این حالت شامل توسعه ذخایر میگوی عاری از عامل بیماری‌زا، ممانعت از ورود عوامل بیماری‌زا به مولدین در هچری‌ها و مزارع، عدم تعویض آب و ضدعفونی آب قبل از پرکردن استخرهای پرورشی، رعایت بهداشت کارگران و استفاده از غذای با کیفیت است (Lightner، ۲۰۰۵). در حال حاضر راهکارهای ایمنی زیستی به طور گسترده‌ای در مزارع پرورش میگو مورد استفاده قرار می‌گیرد، اگرچه که در شرایط مزرعه رعایت ایمنی زیستی به صورت مطلق امکان‌پذیر نیست (Schuur، ۲۰۰۳). به عنوان مثال موفقیت در جلوگیری از وقوع بیماری در میگوهای مزارع پرورشی فقط بستگی به آزمایش پست لاروها قبل از ذخیره سازی ندارد زیرا اشتباه در حین نمونه برداری و یا پاسخ‌های اشتباه ممکن است بروز نماید (Fegan و Clifford، ۲۰۰۱). در موردی که میگوی بیمار به مزرعه‌ای معرفی می‌شود قرنطینه ممکن است برای کاهش خطر انتقال بیماری مفید باشد. حذف میگوهای تلف شده از مزرعه، رژیم غذایی با کیفیت و مدیریت بهتر غذادهی نیز می‌توانند خطر وقوع بیماری را کاهش دهند.

۲-۱۰-۱- مواد ضد ویروس

ماده ضد ویروس ترکیبی است که توانایی تکثیر ویروس را در هر مرحله‌ای از رونوشت برداری (اتصال، ورود، پوشش برداری، رونویسی، ترجمه و مونتاژ) سرکوب نماید. اثر ضدویروسی پلی‌ساکاریدهای سولفاته استخراج شده از جلبک‌های دریایی در برابر ویروس‌های پستانداران در شرایط آزمایشگاهی به خوبی شناخته شده است (Witvrouw و De Clercq، ۱۹۹۷). جلبک‌های *اسپیرولینا پلانتیس* و *اسپیرولینا ماکسیما* دارای فعالیت ضدویروسی هستند (Hernández-Corona و همکاران، ۲۰۰۲).فوکان‌های سولفاته (فوکوئیدان) (Sulfated fucans fucoidan))می‌تواند از ۴۳ گونه جلبک قهوه‌ای استخراج شود. فوکوئیدان‌های جلبک قهوه‌ای از لحاظ ساختاری بسیار پیچیده و هتروژن هستند (Berteau و Mulloy، ۲۰۰۳). در یک پژوهش فوکوئیدان استخراج شده از جلبک دریایی *سارگاسوم پلی‌سیستوم* (Sargassum polycystum) در جیره غذایی استفاده شد. این غذا به میگوهای جوان ببری سیاه به مدت ۴ روز قبل و بعد از چالش با ویروس لکه سفید خورانده شد. میگوهایی که بیشترین میزان فوکوئیدان در جیره غذایی (۱۰۰ ، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن میگو) را دریافت کرده بودند

درصد بازماندگی بالایی را نشان دادند (Chotigeat و همکاران، ۲۰۰۴). عصاره اتانولی بیس (۲-متیل هپتیل)فتالات (bis(2-methylheptyl)phthalate)برگ‌های گیاه راش هندی نیز در یک جیره غذایی استفاده شد و اثرات ضدویروسی آن در میگوی ببری سیاه در برابر ویروس لکه سفید ارزیابی شد. میگوها برای مدت ۴ روز قبل و ۱۵ روز پس از چالش با ویروس لکه سفید با این جیره تغذیه شدند (روزانه ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم به ازای هرگرم وزن میگو). افزایش باز ماندگی (۸۰٪-۴۰٪) در تیمار حاوی بالاترین میزان عصاره مشاهده شد (Ramesthangam و Ramasamy، ۲۰۰۷). سازوکار فعالیت ضدویروسی عصاره این گیاهان در برابر ویروس لکه سفید مشخص نیست. ادعا شده است که یک پپتید بیان شده توسط فاژ در شرایط In vivo در خرچنگ درازآب شیرین و در شرایط آزمایشگاهی در کشت اولیه ارگان لنفوئیدی میگو در برابر ویروس لکه سفید مؤثر است. (Yi و همکاران،۲۰۰۳).

۳-۱۰-۱- تداخل با ویروس‌های دیگر

پست لاروها و میگوهای جوان سفید غربی و میگوی آبی(*P. stylirostris*) آلوده به ویروس نکروز عفونی بافت خونساز وزیرجلدی در چالش با ویروس لکه سفید کاهش تلفات را نشان دادند (Bonnichon و همکاران، ۲۰۰۶). میگوهای بازمانده از شیوع بیماری لکه سفید به ویروس سندروم بدشکلی و کوتولگی نیز آلوده بودند. این محافظت می‌تواند ناشی از القاء ایمنی یا بلوک کردن اجزاء میزبان از قبیل گیرنده‌های سلولی مورد نیاز برای تکثیر ویروس لکه سفید باشد (Tang و همکاران، ۲۰۰۳).

۴-۱۰-۱- محرک‌های ایمنی

جیره غذایی حاوی ترکیبات میکروبی از قبیل بتا ۱و۳ گلوکان استخراج شده از قارچ *شیزوفیلوم کومونه*(*Schizophyllum commune*) (Chang و همکاران، ۱۹۹۹ و ۲۰۰۳) لیپوپلی‌ساکارید باکتری *پانتوا آگلومرانس*(*Pantoea agglomerans*) (Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰) سبب بهبود سیستم ایمنی و کاهش تلفات در میگوهای آلوده به ویروس لکه سفید شد. سازوکار این حفاظت را به فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی نسبت داده‌اند. بهترین نتایج زمانی حاصل می‌شود که محرک‌های ایمنی قبل از در معرض قرارگیری میگو با عامل بیماری‌زا به کار گرفته شوند. استفاده زیاد یا مداوم محرک های ایمنی ممکن است علاوه بر این‌که مفید نباشد حتی سبب اثرات منفی نیز شود (Horowitz و Horowitz، ۲۰۰۱).

۵-۱۰-۱- پپتیدهای ضدمیکروبی (Antimicrobial peptides (AMP))

گزاراشات معدودی فعالیت پپتیدهای ضدمیکروبی در برابر ویروس‌های مختلف را توصیف نموده‌اند. پپتیدهای ضدمیکروبی قسمتی از ایمنی ذاتی میگوها می‌باشند. در۲ مطالعه ویروس لکه سفید در شرایط آزمایشگاهی با

یک پپتید ضدمیکروبی صناعی به نام میتیلین(Mytilin) قبل از تلقیح به میگوی معمولی گرمخانه گذاری شد. تلفات این میگو در مقایسه با قبل از استفاده از پپتید میتیلین کمتر بود (Roch و همکاران، ۲۰۰۸).

۶-۱۰-۱- دمای آب

تلفات میگوها یا خرچنگ‌های مبتلا به ویروس لکه سفید در دمای آب بالاتر (۳۳-۳۲ درجه سانتی‌گراد) یا کمتر از (۱۵< درجه سانتی‌گراد) از دمای مطلوب کاملاً متوقف می‌شود. مکانیسم‌های پیشنهادی در این موارد عبارتند از کاهش تکثیر ویروس (Du و همکاران، ۲۰۰۶) کاهش بار ویروسی (Granja و همکاران، ۲۰۰۶) آپوپتوزیس (Granja و همکاران، ۲۰۰۳).

توجه به این نکته مهم است که روش‌های مواجهه با ویروس لکه سفید در پژوهش‌های ذکر شده متفاوت است. تلقیح ویروس با روش‌های تزریق داخل عضلانی، غوطه وری در سوسپانسیون ویروسی یا تغذیه با بافت آلوده به ویروس انجام شد. علاوه بر این میزان ویروس عفونی تلقیح شده به هر میگو نیز مشخص نبود. این اختلافات، مقایسه نتایج تحقیقات را غیر ممکن می‌سازد و نیاز به استاندارد سازی بیشتری احساس می‌شود.

۱۱-۱- جلبک *Gracilaria corticata*

جلبک‌های دریایی یکی از محصولات مهم تجاری در جهان هستند که قرنها است به دلیل داشتن کاروتنوئیدها، فیبرهای غذایی، پروتیین ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین ها و مواد معدنی در جیره غذایی مردم شرق آسیا استفاده شده است (Norzian و Ching، ۲۰۰۰). بر همین اساس و با توجه به کشف مواد بیولوژیک فعال جدیدتری در این جلبکها، اخیرا علاوه بر تغذیه به منظورهای متنوع دیگری نیز، این موجودات گرانبها به روشهای مختلفی در آبزی پروری مورد استفاده قرار گرفته اند.

از برخی جلبکهای پرسلولی مثل *Macrocystis pyirifera* (معروف به کلپ)، *Ascophyllum nodosum*، *Kappaphycus alvarezii*، *Sargassum spp.Gracilaria heteroclada* در غذای میگو استفاده شده است و عملکرد آنها در جیره مورد ارزیابی واقع شده است (Penaflorida و Golez، ۱۹۹۶)؛

در مطالعه ای (Da Silva و Barbosa، ۲۰۰۹) از پودر جلبک دو گونه جلبک دریایی در برزیل به عنوان منبع پروتیین در غذای میگوی میگوی وانامی استفاده کرده اند. قبل از آن هم از پودر جلبک *Laminaria digitata* به عنوان بخشی از جیره غذایی میگوی وانامی استفاده شده بود (He و Lawrence، ۱۹۹۳).

چندین جلبک دریایی پرسلولی همچنین در جیره غذایی برخی از ماهیان پرورشی مورد استفاده قرار گرفته و اثرات مختلف آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است (Nakagava و Montgomery، ۲۰۰۷).

در چندین تحقیق گزارش شده که پودر جلبکها می تواند به عنوان همبند در جیره غذایی آبزیان عمل کند (Briggs و Funge-Smith، ۱۹۹۶؛ Cruz-suarez و همکاران، ۲۰۰۸). اکثر نتایج نشان داده اند که استفاده از

جلبکهای دریایی در فرمول جیره آبزیان باعث بهبود کیفیت پلت شامل نگهداری آب، بهبود ظرفیت نگهداری آب و همچنین بهبود کیفیت پلت می گردد و از این طریق باعث بهبود تاثیر جیره می گردند برای مثال در مطالعه ای جایگزینی آرد سویا و آرد گندم توسط درصدهای مختلف (۰-۳۰٪) توسط پودر جلبک قرمز گراسیلاریا(*Gracillaria corticata*) بررسی شده، نتایج نشان داده که فاکتور ماندگاری در آب غذای تیمار حاوی تا ۱۰٪ پودر جلبک تفاوت معنی داری با گروه کنترل (غذای تجاری) طی ۱۲ ساعت نداشته است و جیره های بیش از ۱۵٪ به میزان ۸۸٪ آب در خود نگهداری کرده بود (Briggs و Funge-Smith، ۱۹۹۶). مطالعات دیگری نیز در این خصوص انجام شده است که اکثرا نتایج مناسبی داشته اند (Marinho-Soriano و همکاران، ۲۰۰۷). خواص بایندری (همبندی) جلبکها و همچنین ظرفیت بالای آنها در جذب آب را به خواص ژلاتینه شدن آنها و میزان آلژینات موجود در آنها ربط می دهند (Kuda و همکاران، ۱۹۹۷).

از جلبک قهوه ای *Cladosiphan okamuranus* یک پلی ساکارید سولفاته به نام فوکوئیدانfucoidan () استخراج شده (Itami و همکاران، ۲۰۰۲) که از آن در غذای میگوی ژاپنی به منظور بهبود سیستم ایمنی میگو در برابر WSSV استفاده شده است.

بر اساس یک گزارش دیگر استفاده خوراکی فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه ای *Sargassum polycystum* در غذای میگو های ۸-۵ گرمی و ۱۵-۱۲ گرمی می تواند سبب کاهش اثر WSSV بر میگوی ببری سیاه(*Penaeus monodon*) گردد (Chotigeat و همکاران، ۲۰۰۴). آنها همچنین مشاهده کردند که فوکوئیدان بر باکتری های *ویبریو هاروی* (*Vibrio harveyi*)، *استافیلوکوکوس ارئوس* (*Staphylococcus aureous*) و *اشریشیا کلی*(*E. coli*) نیز اثر بازدارندگی دارد.

در مطالعه ای از آلژینات سدیم جداسازی شده از جلبکهای دریایی به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم به منظور تحریک سیستم ایمنی میگوی وانامی در برابر عفونت حاصله بر اثر *Vibrio alginolyticus* استفاده شده است (Cheng و همکاران، ۲۰۰۵).

از عصاره اتانولی *Sargassum fusiforme* اضافه شده به غذای میگوی چینی (*F.chinensis*) نیز به منظور تحریک سیستم ایمنی و مقاومت میگوها در برابر بیماری ویبریوزیس استفاده شده است (Huang و همکاران، ۲۰۰۶).

در یک مطالعه در مکزیک دیده شده استفاده از عصاره آبی جلبک *M. Pyrifera* به صورت تزریقی روی افزایش تعداد هموسیتهای میگوی وانامی و تحریک سیستم ایمنی در برابر آلودگی باکتریایی *V.campbellii* موثر واقع شده است (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۴).

اخیراً چندین مطالعه در خصوص کشت توام جلبکهای دریایی با سایر آبزیان به منظورهای مختلف شامل تغذیه، بهبود کیفیت آب، پیشگیری و کنترل بیماریها و غیره انجام شده است (Porchas-Corenjo و همکاران، ۱۹۹۹؛Neori و همکاران، ۲۰۰۴؛ Lombardi و همکاران، ۲۰۰۶).

جلبک‌ها منبعی از ترکیبات مفید و فعال زیستی هستند و تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، 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 موردعلاقه صنایع دارویی تبدیل شوند. استفاده از جلبک‌ها به‌عنوان ماده افزودنی در جیره غذایی آبزیان باعث بهبود شاخص‌های رشد، کیفیت بیوشیمیایی لاشه و پاسخ‌های فیزیولوژیک نسبت به استرس و بیماری می‌شود (Jaime-Ceballos و همکاران، ۲۰۰۵). 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 (Mustafa وهمکاران، ۱۹۹۷).

گونه جلبک قرمز گرراسیلاریا با نام علمی *Gracilaria corticata* می‌باشد (شکل ۱-۱).

شکل ۱-۴: نمای ظاهری از جلبک *Gracilaria* corticata (برگرفته از www.algaebase.org)

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

در این تحقیق در خصوص کنترل و پیشگیری از بیماری لکه‌سفید میگو با استفاده از جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا، بررسی و مطالعه صورت گرفت . همچنین میزان بازماندگی و بقا میگوهای تغذیه‌شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا بررسی و مقایسه لازم صورت گرفته و فاکتورهای ایمنی THC، TPP، SOD، POD و PO در تیمارهای مختلف محاسبه و مقایسه شده بطوریکه مهم‌ترین اهداف تحقیق عبارت است از:

۱- تعیین میزان مقاومت میگو پاسفید تغذیه‌شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا در برابر ویروس بیماری لکه سفید

۲- مقایسه میزان بازماندگی میگوهای پاسفید تغذیه‌شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا و گروه شاهد

۳- مقایسه شاخص‌های سلامت (تعداد سلول‌های هموسیت کل خون و پروتئین کل پلاسما) در میگوهای پاسفید تغذیه‌شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا و گروه شاهد

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مکان و زمان آزمایش

این تحقیق به‌منظور بررسی فاکتورهای ایمنی(THS,TPP,PO,SOD,POD) میگوهای تغذیه شده با جلبک گراسیلاریا کورتاکا در مقایسه با میگوهای تغذیه شده بدون جلبک و مواجهه شده با ویروس لکه سفید در مرکز تکثیر میگوی بندر امام (ره) متعلق به اداره کل شیلات خوزستان و پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور انجام شد.

۲-۲-تهیه میگوهای پاسفید غربی (*L. vannamei*) مورد نیاز آزمایش و مرحله سازگاری

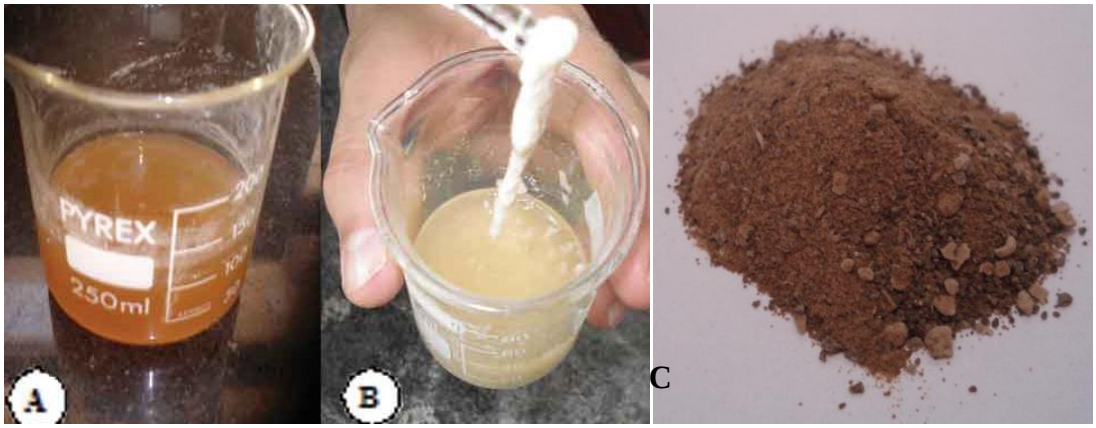
تعداد ۳۰۰ قطعه میگو با وزن متوسط۲ ± ۱۵گرم از یک استخر پرورش میگوی چوئبده آبادان در هنگام صید نهایی (مهر ماه) پس از بررسی از لحاظ سلامتی، عدم وجود نکروز روی سطح بدن و آنتن‌ها، بریدگی آنتن‌ها و...، انتخاب و به مرکز شهید کیانی(اداره کل شیلات خوزستان، چوئبده) انتقال یافت.پس از مهیا شدن شرایط در مرکز تکثیر بندر امام، به علت اختلاف پارامترهای دما و شوری بین مرکز شهیدکیانی (پرورش) و مرکز تکثیر بندر امام به‌مدت ۱۰روز عملیات آداپتاسیون انجام شد تا بدون شوک فراسنجه های زیستی میگو با شرایط محیط انجام پژوهش (بندر امام) یکسان شود.

۲-۳- تهیه جیره غذایی حاوی عصاره جلبک

جلبک موردنظر پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل و با آب جاری شسته شد. سپس بر روی یک سطح شیبدار که با نایلون پوشیده شده بود به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت تا کاملاً خشک شود (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).

به‌منظور استخراج عصاره جلبک از روش اسیدی استفاده شد. ابتدا جلبک‌های خشک‌شده با استفاده از آسیاب برقی آسیاب شدند. هدف از این کار بالا بردن تأثیر اسیدکلریدریک بر روی دیواره سلول‌های جلبکی بود. سپس به ۲۰ گرم جلبک آسیاب شده ۲۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از سپری شدن زمان مذکور با استفاده از فیلتر مکشی با چشمه ۵۰۰ –۴۵۰ میکرون سوسپانسیون فوق فیلتر شد. به‌منظور خنثی‌سازی حالت اسیدی از سود(NaOH) ۰/۵ مولار استفاده شد. درنهایت با استفاده از سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سوسپانسیون سانتریفوژ شد و پس از جداسازی فاز رویی دو برابر حجم آن، الکل اتانول اضافه شد. پس از اضافه نمودن اتانول مواد معلق موجود در سوسپانسیون در ته ظرف به‌صورت زنجیره‌ای رسوب نمودند (شکل

۲-۱) که پس از جداسازی آن‌ها در درجه حرارت ۴۰-۳۰ درجه سانتی گرادخشک و آسیاب شدند (Shiroma و همکاران، ۲۰۰۸) و به میزان ۱۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذای میگوها افزوده شد.



شکل۲-۱- استخراج عصاره جلبک با استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال.
A: سوسپانسیون عصاره جلبک قبل از اضافه کردن الکل اتانول. B: عصاره جلبک بعد از اضافه نمودن الکل اتانول. C: عصاره پودر شده جلبک

۴-۲- بررسی و تغذیه میگوهای مورد آزمایش

بعد از مرحله آداپتاسیون میگوها، به منظور بررسی عدم وجود ویروس‌های (WSSV, TSV, MBV, HPV, YHV, BP, IHHNV, IMNV) و باکتری ویبریو نسبت به غربالگری میگوها با استفاده از PCR (کیت تجاری IQ2000 TM) اقدام شد. سپس میگوهای عاری از پاتوژن‌های فوق به ۲ گروه آزمایشی زیر تقسیم‌بندی شدند:

در گروه اول تعداد ۱۵۰ قطعه به مدت ۱۴ روز با غذای معمولی تغذیه شده و در گروه دوم تعداد ۱۵۰ قطعه با غذای حاوی جلبک به مدت ۱۴ روز تغذیه شدند.

برای انجام این آزمایش از ۲ تانک بتنی به ظرفیت ۱۰ تن (طول ۶۰۰ سانتیمتر و عرض ۱۷۰ سانتیمتر و ارتفاع ۱۰۰ سانتیمتر) استفاده گردید که جهت انجام آزمایش با ۳۰۰۰ لیتر آب، آبگیری شدند. هوادهی در هر یک از تانک‌های ۱۰ تنی با ۱۲ عدد سنگ هواده که در فواصل یکسان در سطح تانک قرار داده شده بودندئ صورت گرفت. آب ورودی پس از آبگیری و ذخیره شدن و عبور از استخر رسوب‌گیر و فیلتر شنی قبل از ورود به سالن با کلر به میزان ppm ۱۰ ضدعفونی شده و سپس وارد تانک ها می شد. تعویض آب روزانه تانک‌ها به میزان ۱۰ الی ۱۵درصد بود و پساب خروجی بعد از ضدعفونی با کلر و گذشت زمان یک هفته به خارج از مرکز تکثیر منتقل می شد. پارامترهای دما، pH و اکسیژن محلول آب روزانه در دو نوبت صبح و عصر و شوری آب یک‌بار در روز در نوبت صبح، به‌وسیله دستگاه مولتی پارامتر (مارک WTW) و با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری و ثبت گردید. دوره نوری در داخل سالن‌های پرورش از طریق استفاده از لامپ‌های فلورسنت به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید.

غذادهی روزانه سه وعده به میزان ۵ درصد وزن توده زنده در ساعت‌های ۸، ۱۴ و ۲۲ انجام شد. قبل از هر وعده غذایی باقی‌مانده غذای قبل توسط سیفون جمع‌آوری و میزان غذای خورده شده محاسبه می‌شد.
در پایان روز چهاردهم تغذیه میگوها هر گروه به ۶ گروه ۲۵ قطعه‌ای تقسیم شده و به ۱۲ تانک ۱۰۰۰ لیتری مجزا منتقل شدند.

۵-۲- تهیه و تعیین عیار ویروس لکه سفید

میگوهای منجمد که از خوزستان، سیستان و بلوچستان و بوشهر نمونه‌برداری شده بود و از نظر وجود ویروس لکه سفید نیز تائید شده بودند جهت تهیه استوک ویروس طبق روش زیر مورداستفاده قرار گرفت: (Afsharnasab و همکاران، ۲۰۰۹)

۱- ۲ عدد میگو منجمد آلوده به ویروس با آسیاب برقی (وزن تقریبی هر میگو ۱۰ گرم) آسیاب شد.
۲- میگوهای آسیاب شده به نسبت ۱ به ۵ در بافر TN در لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری (Nunc 15 ml Conical Tube) هموژن گردید.
۳- سوسپانسیون تولید شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C با دور ۱۷۰۰ g سانتریفیوژ گردید و سپس مایع رویی جداسازی شد (مرحله سانتریفوژ سه بار تکرار شد).
۴- مایع رویی از فیلترهای واتمن در طی چندین مرحله عبور داده شد و محلول‌های فیلتر شده در فریزر ۲۰ °C- نگهداری شدند.
۵- محلول فیلتر شده مرحله قبل از فیلترهای میلی‌پور ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد. این سوسپانسیون ذخیره حاوی ویروس، تا زمان استفاده در فریزر ۷۰ °C- ذخیره‌سازی گردید.

نکات زیر برای تکثیر بهتر ویروس در خرچنگ دراز آب شیرین الزامی می‌باشند:
بهتر است محلول میگو فیلتر شده همان روز بلافاصله به خرچنگ دراز آب شیرین تزریق گردد تا ویروس بهتر در بدن خرچنگ دراز آب شیرین تکثیر یابد. ۲. اگر بعد از تهیه میگو فیلتر شده خرچنگ دراز آب شیرین آماده برای تکثیر ویروس نبود می‌بایست این محلول را در فریزر ۷۰ °C- نگهداری نمود.

۱-۵-۲- تهیه خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus Leptodactylus*)

خرچنگ دراز آب شیرین گونه *Astacus Leptodactylus* از سخت‌پوستانی است که می‌تواند میزبان خوبی برای این ویروس باشد. محل زندگی این خرچنگ‌ها در ایران رودخانه ارس می‌باشد. چند نمونه از خرچنگ‌های زنده و تلف‌شده با استفاده از دستورالعمل کیت تجاری IQ 2000 مربوط به آزمون Nested –PCR جهت تشخیص آلودگی به ویروس لکه سفید آماده‌سازی و مورد آزمایش قرار گرفت و از عدم آلودگیآن‌ها اطمینان حاصل گردید.

پس از تهیه ذخیره ویروسی نمونه‌های ویروس در همان روز به‌صورت داخل عضلانی به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر در بند سوم یا چهارم سینه‌ای خرچنگ تزریق گردید. سپس برای رشد بهتر ویروس دمای تانک‌ها به حدود ۱۵ درجه سانتی‌گراد رسانیده شد. جهت نگهداری خرچنگ‌ها و جلوگیری از ایجاد آلودگی قارچی ناشی از خرچنگ‌های تلف‌شده هرچند وقت یک‌بار تمام آب نگهداری آن‌ها ضدعفونی گردید تا از عفونت‌های احتمالی جلوگیری شود. برای این کار، آنتی‌بیوتیک (آمفو تریپسین B) به آب محل نگهداری اضافه گردید.

پس از تزریق ذخیره ویروسی به خرچنگ‌ها، به مدت ۱۰ روز به‌طور روزانه کنترل و در روزهای سوم و پنجم و دهم نمونه‌هایی از بافت و همولنف خرچنگ‌ها نمونه گیری شد و از نظر وجود ویروس لکه سفید مورد آزمون Nested-PCR قرار گرفت (Afsharnasab و همکاران، ۲۰۰۹).

در مورد نمونه‌های بافت خرچنگ طبق دستورالعمل کیت تجاری (Nested-PCR (IQ2000 عمل گردید و استخراج DNA و آزمون انجام گردید. ولی در مورد همولنف خرچنگ‌ها از کیت تجاری استخراج DNA مربوط به شرکت Roche استفاده شد.

۲-۵-۲- لیوفیلیزاسیون ویروس لکه سفید میگو

۲۰ میکرولیتر از همولنف خرچنگ‌های آلوده به ویروس لکه سفید که از طریق آزمون Nested PCR مورد تأیید قرارگرفته بودند، پس از سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (مرحله سانتریفوژ ۳ بار تکرار شد) و جداسازی سوسپانسیون ویروسی، جهت تهیه ویروس لیوفیلیزه بکار رفت. محلول ۱۰٪ پودر شیرخشک بدون چربی (10% Skimmilk) به میزان ۱ به ۵ به سوسپانسیون ویروسی اضافه شد و در آمپول‌های مخصوص دستگاه لیوفیلیزه تقسیم و به‌صورت پودر خشک منجمد شده تحت خلاء (لیوفیلیزه شده) تبدیل گردید (Lightner and Redman, 2012).

۳-۵-۲- تعیین عیار ویروس

از روش تعیین Lethal Dose$_{50}$ (LD_{50}) طبق پروتکل (Van Hulten، ۲۰۰۰) استفاده گردید. سریال رقتی از ۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ از سوسپانسیون ویروسی (همولنف حاوی ویروس WSSV) در بافر استریل TN تهیه و سپس به هر میگو (۱۵ میگو بالغ یا پست لارو در هر رقت) مقدار ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های فوق با سرنگ g ۲۹ در ناحیه بند سوم یا چهارم به‌صورت داخل عضلانی تزریق گردید و روزانه دو بار از نظر تعداد تلفات شمارش صورت گرفت. لازم به ذکر است تعداد میگوهای که در روز اول پس از تزریق تلف شدند در شمارش تلفات برای محاسبه تیتر قرار نگرفتند. تلفات تا ۸ روز بعد از تزریق شمارش گردید. تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه گردید.

Karber Formula:
$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\ (Sp - 0.5)$
X^a is the last dilution index for which all n cultures are infected (p=1)
D is the log of the dilution factor (log 10 = 1)
P is virus dilution proportion of infected cultures
Sp is the summation of p between the last dilution for which all cultures are infected (p=1) and the first dilution for which all n cultures are unaffected (p=0). (Karber, 2002)

۲-۶- تیماربندی آزمایش مواجهه سازی

در پایان روز چهاردهم پس از تغذیه، میگوها طبق جدول ۲-۱ تیماربندی شده، در تیمارهای ۱ و۴با ویروس لکه سفید مورد مواجهه سازی قرار گرفتند و تیمار های ۲ و۳ میگوها با ویروس مواجه نشدند. علایم بالینی و تلفات تا ۱۰ روز بعد از مواجهه‌سازی ثبت و در روزهای ۱۸،۹،۳،۱ و ۲۵ پس از مواجهه سازی از همولنف میگوها نمونه گیری و برای آزمایش های بعدی نگهداری شد (Yongchun Huang et al., 2012).به‌منظور اطمینان از آلوده بودن تیمارهای مواجهه شده با ویروس طی روزهای ۱و۳ ۵و۱۰ بعد از مواجهه با ویروس نسبت به انجام آزمایش PCR برای نمونه اقدام شد.

جدول۲-۱- نحوه اجرای تیمارهای آزمایشی

تیمار	تغذیه	مواجهه با ویروس	تعداد
۱ (T1)	جیره حاوی عصاره جلبک	+	۳×۲۵
۲ (T2)	جیره حاوی عصاره جلبک	–	۳×۲۵
۳ (T3)	جیره معمولی (کنترل منفی)	–	۳×۲۵
۴ (T4)	جیره معمولی (کنترل مثبت)	+	۳×۲۵

۲-۷- روش و محلول‌های مورداستفاده در نمونه‌برداری

برای همولنف‌گیری، ابتدا سرنگ‌های انسولین با نیدل شماره ۲۵ به میزان ۰/۶ میلی لیتر از ماده ضد انعقاد پر شده سپس از طریق سینوس شکمی (بعد از پنجمین پای قدم زن) ۰/۴ میلی لیتر همولنف از میگو گرفته شد (Lightner and Redman, 2012). محلول ضد انعقاد Elsevier جهت جلوگیری از انعقاد همولنف میگوها با فرمول جدول ۲-۲ ساخته و در نمونه‌گیری مورداستفاده قرار گرفت.

جدول ۲-۲: فرمول ساخت ماده ضد انعقاد

فرمول	ماده ضد انعقاد			
۱ (20 cc)	Tris-HCl 10 mM = 0.03 g	Sucrose 250 mM = 1.72 g	Citrate sodium 100mM= 0.52 g	pH= 7.4
۲ (50 cc)	Trisodium citrate 30mM=0.441g	NaCl 0.34M =0.995 g	EDTA 10 mM=0.186 g	Glucose 0.115M 1.139 g

۲-۸- شمارش هموسیت ها (THC)

شمارش با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد. ۵۰ میکرولیتر از مخلوط همولنف- ماده ضد انعقاد با ۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فرمالین خنثی ۱۰ درصد (جدول ۲-۲) به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. سپس از این مخلوط، ۲۰ میکرولیتر نمونه در شیار H لام نئوبار زیر لامل تخلیه گردید. بعد از گذشت ۱ دقیقه هموسیت ها شمارش گردیدند.به منظور شمارش از ۲۵ خانه وسط ۵ خانه به‌صورت تصادفی شمارش‌شده، میانگین آن‌ها در عدد 10^4 و رقت ($\frac{1}{0.4} = 2.5$) همولنف موجود ضرب گردید (Kakoolaki و همکاران، ۲۰۱۰).

جدول ۲-۳ - فرمول ساخت فرمالین ۱۰٪

فرمول	فرمالین ۱۰٪		
۱۰۰۰ml	آب مقطر	فرمالین ۳۷ ٪	NaCl
	90 ml	10 ml	0.45 m= 58.5 g

۲-۹- روش استفاده از کیت تجاری Peroxidase Activity Assay Kit

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

۲-۹-۱- روش نورکلرومتریک

برای تولید سوبسترای آب اکسیژنه ۵ میلی لیتر آب با ۳۴۷ میلی لیتر Assay Buffer مخلوط گردید و ۱ میلی لیتر Assay با کل محلول کنترل مثبتHRP در ظرف حاوی خود محلول HPR، به‌خوبی مخلوط شد. سپس برای تولید آب اکسیژنه استاندارد، ۱۲۴ میکرولیتر از محلولAssay Buffer با ۱۰ میکرولیتر از سوبسترای آب اکسیژنه به‌خوبی مخلوط شد.

جهت انجام استاندارد، مقدار ۰(a)،۱۰(b)، ۲۰(c)، ۳۰(d)،۴۰(e) و۵۰(f) میکرولیتر از محلول استاندارد آب اکسیژنه در چاهک‌های آزمایش ریخته و سپس با کمک محلول Assay Buffer حجم چاهک‌ها به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. چاهک ۵۰ میکرولیتر نیاز به محلول ندارد ولی مابقی ۱۰ ،۴۰، ۳۰، ۲۰ و ۱۰ میکرولیتر به ترتیب برای چاهک های خالی، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ اضافه گردید. 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. بعدازاین، ۲ میکرولیتر از محلول .F.P.S در تمام چاهک‌های آزمایش ریخته شد و سپس مقدار ۲ میکرو لیتر سوبسترای آب اکسیژنه نیز به چاهک‌ها اضافه گردید و بعدازآن ۴۶ میکرولیتر از محلول Assay Buffer به چاهک‌ها اضافه شد.

در مرحله بعدی، ۵۰ میکرولیتر از سرم (نمونه همولنف) به هر چاهک اضافه گردید و بعد از ۳ دقیقه قرار گرفتن در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، درون دستگاه قرار داده شد.

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

آب‌اکسیژنه ۰/۸۸ مولار به مقدار ۵ میکرولیتر با ۳۴۷ میکرولیتر محلول بافر به‌خوبی مخلوط شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (قابلیت استفاده تا یک ماه).

HRP کنترل مثبت، در یک میلی‌لیتر از محلول بافر خیسانده و با پیپت خوب مخلوط شد. سپس به دو قسمت مساوی تقسیم‌شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا یک ماه نگهداری و مصرف شد.

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

محلول استاندارد آب‌اکسیژنه (روش رنگ‌سنجی): ۱۰ میکرولیتر از آب‌اکسیژنه 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 خانه قرار داده شد تا بلانک (Blank) ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و۵ nmol/well ساخته شود. سپس هر یک، با بافر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.

محلول استاندارد H_2O برای روش فلورومتریک: طبق روش ساخت محلول ۰/۱ میلی مول استاندارد در قسمت قبلی، آماده گردید. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از آن برداشته و با ۹۰۰ میکرولیتر بافر مخلوط شد تا محلول ۰/۰۱ میلی مول ساخته شود. سپس مقادیر ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد ۰/۰۱ میلی مول در پلت ۹۶ چاهک دار قرار داده شد تا بلانک (Blank) ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و۵۰۰ nmol/well ساخته شود. سپس هر یک، با بافر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.

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

۱-۱-۹-۲- آماده‌سازی نمونه

برای هر دو روش رنگ سنجی و فلورسنت نیاز به ۵۰ میکرولیتر از نمونه می‌باشد که در هر چاهک واکنشی ریخته شد. سپس ۱۰ میلی‌گرم یا (۱×۱۰^{۶} سلول)، به‌آرامی با ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر هموژنیزه مخلوط و با دور ۱۵۰۰ به ازای هر گرم، برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. (برای نمونه‌های ناشناس مقادیر متغیری از حجم نمونه باید آزمایش شود تا از استانداردسازی آن مطمئن گردد).

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

مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول اصلی واکنشی (Master reaction mix) (۴۶ میکرو لیتر محلول بافر+ ۲ میکرولیتر Fluorescent Peroxidase+ ۲ میکرولیتر H_2O_2 12.5Mm) در چاهک هر نمونه و کنترل مثبت ریخته شد و با کمک حرکت افقی و پیپت، به‌خوبی مخلوط شد. سپس پلت چاهک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۳ دقیقه اندازه‌گیری گردید. برای روش رنگ سنجی، میزان جذب در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و برای روش فلورومتریک به شرح زیر عمل گردید:

$FLU_{initial}\lambda ex=535/\lambda em=585$ nm

پلت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری (A_{570} or FLU) با فاصله ۲ تا ۳ دقیقه قرار داده شد (در این حالت پلت باید دور از نور باشد). اندازه‌گیری‌ها 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). اندازه‌گیری نهایی برای محاسبه آنزیم فعال، در مرحله ماقبل آخر یا final A570)or FULL final) خوانده شد.

تذکر: ضروری است اندازه‌گیری نهایی در آخر دامنه نمودار خطی از نمودار استاندارد باشد.

۲-۱-۹-۲-آماده‌سازی نمونه خون

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 لوله جدید منتقل و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نمونه نگهداری شد. سپس لایه خنثی از روی قسمت قرمزرنگ پلت برداشته شد و محلول اریتروسیت‌ها در ۵ حجم آب خیلی سرد دو بار تقطیرشده، محلول شد و به ازای هر گرم، ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، درون محفظه اریتروسیت پلت سانتریفیوژ گردید. قسمت بالای محلول در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای آنالیز آماده شود (پلاسما ممکن است ۳-۱۰ بار رقیق شود و سلول‌های قرمز لیز(Lysis) شده ممکن است تقریباً ۱۰ بار تا قبل از آزمایش و سنجش SOD رقیق گردد).

۳-۱-۹-۲-آماده‌سازی محلول‌ها و نگهداری آن

یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر با ۱۹ میلی‌لیتر محلول بافر مخلوط گردید (این محلول برای مدت ۲ ماه در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است).

محلول آنزیم به مدت ۵ ثانیه سانتریفیوژ و سپس با پیپت به‌خوبی مخلوط شد (این کار ضروری است چون آنزیم دارای دو بخش است که باید قبل از رقیق کردن به‌خوبی باهم مخلوط گردند). بعد از مخلوط در بخش آنزیم، ۱۵ میکرولیتر از آنزیم با ۲/۵ میلی‌لیتر از ۲ بافر رقیق‌شده مخلوط گردید (این محلول سنجش آنزیم تا مدت ۳ هفته در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد پایدار و ماندگار است).

۲-۱۰- اندازه‌گیری SOD

طبق دستورالعمل ساخت محلول اصلی واکنشی (Master reaction mix)، مقادیر موردنیاز از محلول‌های مختلف تهیه گردید (در صورت استفاده از محلول استانداردی غیراز محلول کیت، نمونه‌ها طبق آن آماده‌سازی شود). ۲۰ میکرو لیتر از محلول نمونه، در دو ظرف و شاهد ۲ ریخته شد و مقدار ۲۰ میکرو لیتر آب به هرکدام از شاهد ۱ و ۳ افزوده و به‌خوبی مخلوط شد. بعدازآن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از WST به هر یک از محلول‌ها افزوده و مخلوط شد. در مرحله بعد، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌شده بافر، به هر یک از شاهدهای ۲ و ۳ اضافه و مخلوط شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم به شاهد ۱ نمونه اضافه و کاملاً مخلوط گردید (ازآنجاکه سوپراکسید بلافاصله بعد از افزودن آنزیم آزاد می‌شود بهتراست از پیپت چند کاناله استفاده شود تا از تأخیر زمانی و غیر همزمانی واکنش‌ها جلوگیری شود). در آخر ظروف نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد، میکرو پلیت ها در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید و مقدار SOD فعال (بر اساس درصد بازماندگی) با کمک فرمول زیر محاسبه کنید:

$$\text{SOD Activity} = \frac{(\text{Ablank1}-\text{Ablank3})-(\text{Asample}-\text{Ablsnk2})}{(\text{Ablank1}-\text{Ablank3})}$$

۲-۱۱- اندازه گیری فنل اکسیداز PO

اندازه گیری فنل اکسیداز بر اساس پروتکل Huang و همکاران، ۲۰۱۲ انجام گردید. با استفاده از یک سرنگ ۲ میلی لیتری با سوزن ۲/۵ که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد بود با ۲۰۰ میکرولیتر همولنف میگو مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۸۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی به عنوان پلاسما در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر از پلاسما در یک کووت (Cuvette) اسپکتروفتومتر به عنوان نمونه مجهول و ۲۰ میکرولیتر ضد انعقاد به عنوان کنترل در یک کوت دیگر ریخته شد. به هر کوت ۸۸۰ میکرولیتر محلول L-DOPA اضافه و بعد از ۱ دقیقه و در طول موج ۴۹۰ نانومتر در هر ۱۰ ثانیه تا ۱۲۰ ثانیه قرائت شد و یک واحد آنزیم معادل جذب نور در ۰/۰۰۱ دقیقه بر ۱ میلی لیتر همولنف تعریف گردید.

۲-۱۲- اندازه گیری پروتئین پلاسمای کل TPP (mg/ml)

برای انجام آزمایش اندازه گیری پروتئین پلاسمای کل از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. دمای سانتریفیوژ ۴ درجه سانتی گراد بوده و از هر تیمار ۳ نمونه مخلوط ضد انعقاد و همولنف اخذ و

سانتریفیوژ گردید. پس ار سانتریفیوژ محلول رویی حذف شده و محلول حاصل پس از ۲۴ ساعت به صورت منجمد به آزمایشگاه ارسال گردید. در آزمایشگاه به روش آنالیز بیوشیمیایی توسط دستگاه Technicon Auto Analyser RA 1000 پروتئین پلاسما به روش Lowry سنجیده شد. در این آزمایش آلبومین سرم گاو(BSA) به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد (Bradford، ۱۹۷۶).

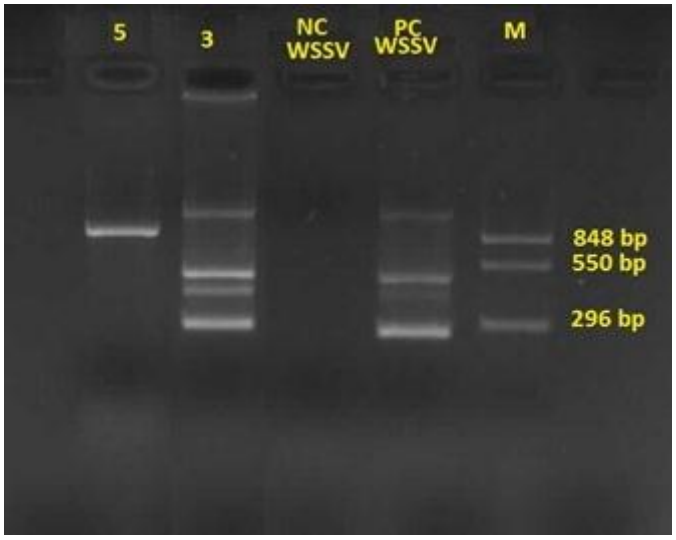
۱۳-۲-تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در ابتدا شرط نرمال بودن داده‌ها با آزمون آماری اسمیرنوف کولموگراف در SPSS (Kolmogorov–Smirnov test) 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 ($p \leq ۰/۰۵$) 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.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج PCR

نتایج حاصل از PCR پس از آزمایش مواجهه سازی نشان‌دهنده فرم حاد بیماری و وجود ویروس در نمونه‌های میگوی مواجهه شده با ویروس بود(شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱: نتایج PCR در نمونه‌های مختلف میگو

M – مارکر، NC WSSV–کنترل منفی کیت، PC WSSV–کنترل مثبت کیت، ۳- میگوهای تغذیه‌شده با گراسیلاریا کورتیکاتا، ۵-کنترل منفی نمونه‌ها

۳-۲- نتایج حاصل از تأثیر خوراکی جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا بر مقاومت میگوهای پاسفید

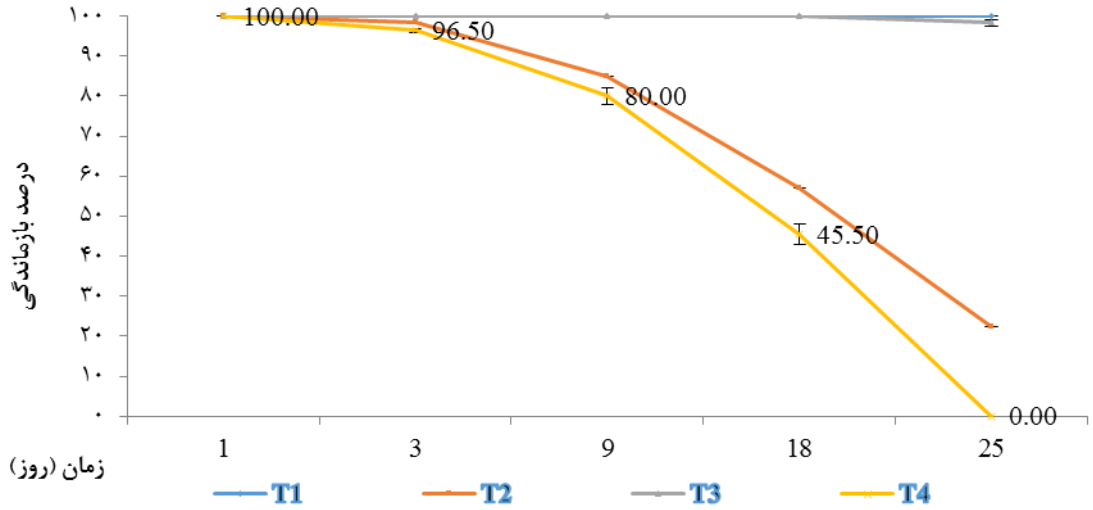
۳-۲-۱- میزان بقا در تیمارهای مختلف

بیشترین میزان بقاء در تیمارهای ۱ و ۳ به ترتیب به میزان ۰/۰۰ ±۱۰۰ و ۹۸/۳۳±۰/۸۸ و کمترین میزان بقا در تیمارهای ۲ و ۴ به میزان ۰/۵±۲۲/۵و ۰/۰۰±۰/۰۰ می‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که مصرف جلبک در میگوهای تیمار ۲ که در مواجهه با ویروس بوده در مقایسه با تیمار ۴ که جلبک مصرف نکرده‌اند ولی با ویروس مواجه شده به میزان ۲۲/۵ درصد بازماندگی از خود نشان داد. جلبک باعث ارتقا ایمنی میگو و افزایش بازماندگی شده است(جدول ۳-۱، نمودار ۳-۱).

جدول ۳-۱- نتایج حاصل از بررسی درصد بازماندگی میگوهای پاسفید

روز / تیمار	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
T1 (جلبک)	۱۰۰± ۰/۰۰a	۱۰۰± ۰/۰۰b	۱۰۰± ۰/۰۰c	۱۰۰± ۰/۰۰c	۱۰۰± ۰/۰۰a
T2 (جلبک/ویروس)	۱۰۰± ۰/۰۰a	۹۸/۵±۰/۵۰B	۸۵±۱b	۵۷±۱b	۲۲/۵±۰/۵۰b
T3 (شاهد)	±۱۰۰ ۰/۰۰a	۱۰۰±۰.۰۰b	۱۰۰± ۰/۰۰c	۱۰۰± ۰/۰۰c	۹۸/۳۳±۰/۸۸a
T4 (شاهد/ویروس)	۱۰۰± ۰/۰۰a	۹۶.۵±۰/۵۰ a	۸۰± ۲a	۴۵/۵±۲/۵a	۰/۰۰±۰/۰۰

(میانگین ±خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).



نمودار ۳-۱- مقایسه درصد بازماندگی در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس

۳-۲-۲- فاکتورهای ایمنی

افزایش فاکتورهای ایمنی در روزهای آزمایش از روز اول تا روز ۲۵ مشاهده و بیشترین میزان فاکتورهای ایمنی THC، TPP، SOD، POD و PO در تیمار T1 در روز ۲۵ آزمایش مشاهده شد. این وضعیت برای تیمار T2 نیز صادق بوده ولی میزان آن به نسبت تیمار T1 کمتر و با هم اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). برای تیمارهای T3 و T4 نیز افزایش معنی‌دار فاکتورهای ایمنی در روزهای آزمایش دیده شده و اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) وجود داشت و بیشترین میزان در روز ۲۵ مشاهده می‌شود(جدول ۳-۲).

جدول ۳-۲- نتایج حاصل از بررسی تأثیر جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا بر مقاومت میگوهای پاسفید

فاکتورهای ایمنی / روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
تیمار ۱ (جلبک)					
هموسیت ($\times 10^5$cell/ml)	۲۵/۰۹±۰/۶۸ a	۲۶/۳۸± ۱/۲۵ a	۵۰/۳۸±۱/۲۱ b	۶۱/۵۴±۳/۹۷ b	۱۱۷/۷۱±۱۱/۹۷ c
پروتئین کل (mg/ml)	۳۸/۱۵± ۰/۱۵ a	۳۸/۸۰±۰/۷۲ a	۵۴/۶۰±۰/۸۱ b	۶۸/۰۳±۰/۶۷ c	۷۷/۴۵±۰/۸۵ d
آنزیم پروکسیداز ($nmol/min^{-1}ml^{-1}$)	۶/۰۵±۰/۰۲ a	۶/۱۲±۰/۰۳ a	۶/۲۲±۰/۰۲ b	۶/۴۰±۰/۰۱ c	۶/۷۹±۰/۰۴ d
سوپراکسیددیسموتاز ($Activity\ Uml^{-1}$)	۱۰۱۷/۴۵±۲/۸۰ a	۱۱۱۶/۶۷±۶۰/۰۹ a	۱۶۵۰/۰±۷۶/۳۸ b	۱۹۴۳/۳۳±۸۰/۹ c	۲۴۶۶/۶۷±۸۸/۱۹ d
آنزیم فنول اکسیداز ($U\ min^{-1}ml^{-1}$)	۴۰۵/۰۹±۱/۳۲ a	۴۰۹/۶۷±۱/۷۶ a	۴۵۶/۶۷±۰/۸۸ b	۵۰۴/۳۳±۲/۰۳ c	۵۹۷/۳۳±۲/۶۰ d
تیمار ۲ (جلبک/ ویروس)					
هموسیت ($\times 10^5$cell/ml)	۱۴/۰۰±۰/۰۷ a	۱۴/۲۰±۰/۳۳ a	۲۳/۶۶±۰/۵۲ b	۳۷/۰۸±۰/۶۵ c	۵۹/۱۱±۱/۴۴ d
پروتئین کل (mg/ml)	۳۳/۴۰±۰/۱۰ a	۳۳/۶۰±۰/۹۸ a	۵۱/۵۰±۱/۵۲ b	۶۳/۳۳±۰/۴۷ c	۷۲/۲۰±۱/۳۷ d
آنزیم پروکسیداز ($nmol/min^{-1}ml^{-1}$)	۵/۸۷±۰/۰۰ a	۵/۹۱±۰/۰۳ a	۵/۹۵±۰/۰۲ ab	۶/۰۶±۰/۰۱ b	۶/۲۹±۰/۰۸ c
سوپراکسیددیسموتاز ($Activity\ Uml^{-1}$)	۵۵۴/۶۱±۰/۵۳ a	۵۷۰/۰۰±۲۰/۸۲ a	۹۰۶/۶۷±۶۹/۸۴ b	۱۵۶۶/۶۷±۸۸/۱۹ c	۱۹۸۳/۳۳±۱۱۶/۶۷ d
آنزیم فنول اکسیداز ($U\ min^{-1}ml^{-1}$)	۲۴۷/۰۰±۲/۴۴ a	۲۵۲/۳۳±۱/۴۵ a	۲۹۱/۶۷±۰/۸۸ b	۳۳۴/۰۰±۳/۰۶ c	۳۶۹/۳۳±۱/۸۶ d

(میانگین ±خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).

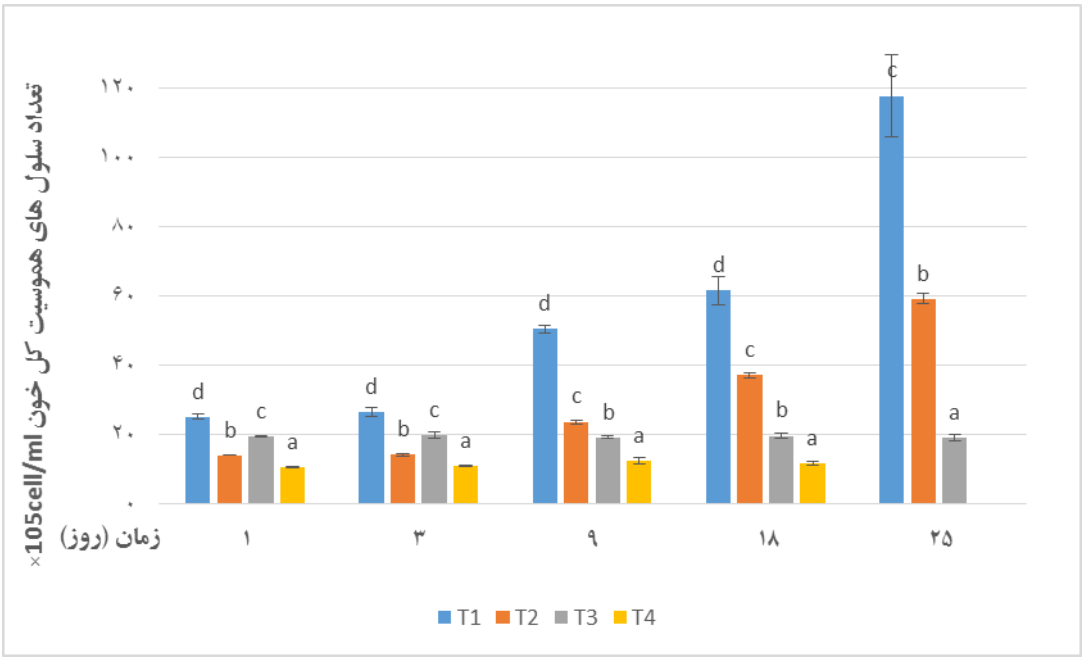
ادامه جدول ۳-۲ : نتایج حاصل از بررسی تأثیر جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا بر مقاومت میگوهای پاسفید

فاکتورهای ایمنی / روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
تیمار ۳ (شاهد)					
هموسیت ($\times 10^5$cell/ml)	۱۹/۵۳±۰/۱۳ a	۱۹/۷۹±۰/۹۷ a	۱۹/۱۷±۰/۳۲ a	۱۹/۶۲±۰/۵۸ a	۱۹/۰۰±۰/۸۶ a
پروتئین کل (mg/ml)	۳۳/۷۰±۰/۲۰ a	۳۳/۹۵±۲/۶۵ a	۳۴/۳۵±۰/۸۵ a	۳۳/۲۰±۱/۶۰ a	۳۶/۱۰±۲/۸۰ a
آنزیم پروکسیداز ($nmol/min^{-1}ml^{-1}$)	۵/۹۰±۰/۰۲ a	۵/۷۴±۰/۲۱ a	۵/۸۰±۰/۲۸ a	۵/۶۹±۰/۴۲ a	۵/۸۰±۰/۳۵ a
سوپراکسیددیسموتاز ($Activity\ Uml^{-1}$)	۵۰۳/۹۷±۲/۹۱ a	۵۱۰/۰۰±۳۲/۱۵ a	۴۹۵/۰۰±۱۵/۰۰ a	۴۹۹/۵۰±۲۱/۵۰ a	۴۹۶/۰۰±۵/۰۰ a
آنزیم فنول اکسیداز ($U\ min^{-1}ml^{-1}$)	۳۸۶/۵۵±۰/۷۹ a	۳۹۰/۰۰±۱/۷۳ a	۳۸۱/۳۳±۲۳/۹۲ a	۳۷۴/۰۰±۹/۶۴ a	۴۱۹/۳۳±۶۶/۲۳ a
تیمار ۴ (شاهد/ویروس)					
هموسیت ($\times 10^5$cell/ml)	۱۰/۶۰±۰/۱۹ a	۱۱/۰۰±۰/۱ a	۱۲/۵۰±۱/۰۰ a	۱۱/۵۵±۰/۵۵ a	
پروتئین کل (mg/ml)	۲۴/۵۵±۰/۱۵ a	۲۴/۲۵±۱/۲۵ a	۲۵/۵۵±۱/۳۵ a	۲۴/۴۵±۱/۵۵ a	
آنزیم پروکسیداز ($nmol/min^{-1}ml^{-1}$)	۵/۸۰±۰/۰۱ a	۵/۷۹±۰/۰۴ a	۵/۸۳±۰/۰۱ a	۵/۹۱±۰/۰۱ a	
سوپراکسیددیسموتاز ($Activity\ Uml^{-1}$)	۳۱۹/۵۴±۲/۰۹ a	۳۲۳/۳۳±۲۸/۴۸ a	۳۰۹/۵۰±۵/۵۰ a	۳۱۵/۰۰±۶/۰۰ a	
آنزیم فنول اکسیداز ($U\ min^{-1}ml^{-1}$)	۲۰۳/۸۱±۲/۶۵ a	۲۰۸/۰۰±۳/۷۹ a	۲۰۷/۰۰±۲/۸۹ A	۲۱۴/۰۰±۴/۰۰ a	

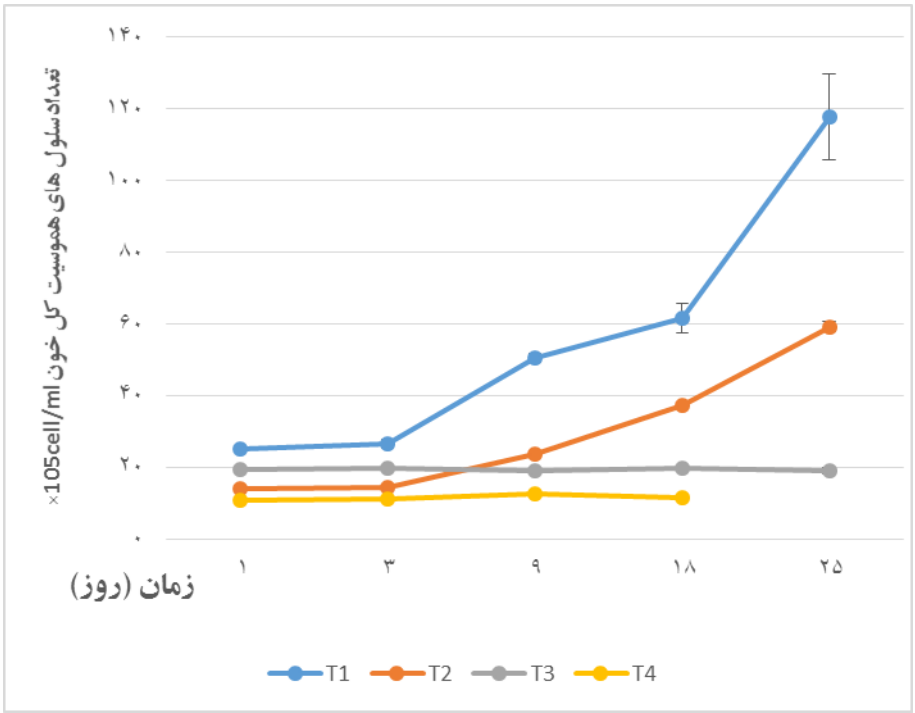
(میانگین ±خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).

۱-۲-۲-۳- میزان هموسیت کل (THC)

میزان هموسیت کل برای تیمارهای مختلف از روز اول آزمایش روند صعودی داشته و بیشترین میزان آن در تیمار T1 و در روز ۲۵ می‌باشد. میزان هموسیت کل در روزهای مختلف در بین تیمارها اختلاف معنی‌دار داشته (P<۰/۰۵) و کمترین میزان هموسیت کل در تیمار T4 مشاهده گردید. نتایج نشان می‌دهد که مصرف جلبک باعث افزایش میزان هموسیت کل در تیمارهای T1 و T2 در مقایسه با تیمارهای T3 و T4 شده و مواجهه با ویروس موجب کاهش میزان هموسیت کل در تیمارهای T2 و T4 شده است(نمودار۳-۲ و ۳-۳).



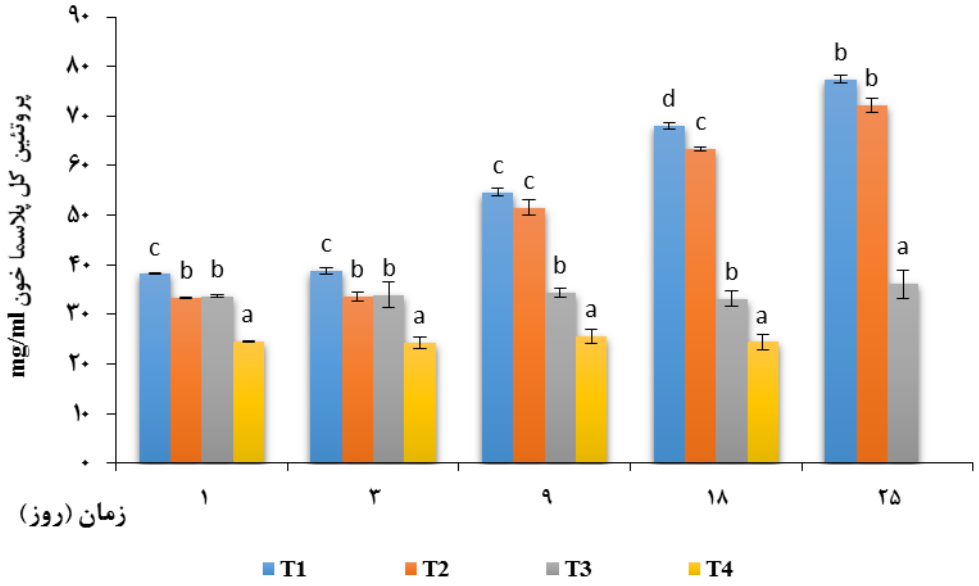
نمودار ۳-۲- مقایسه شاخص هموسیت کل در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس



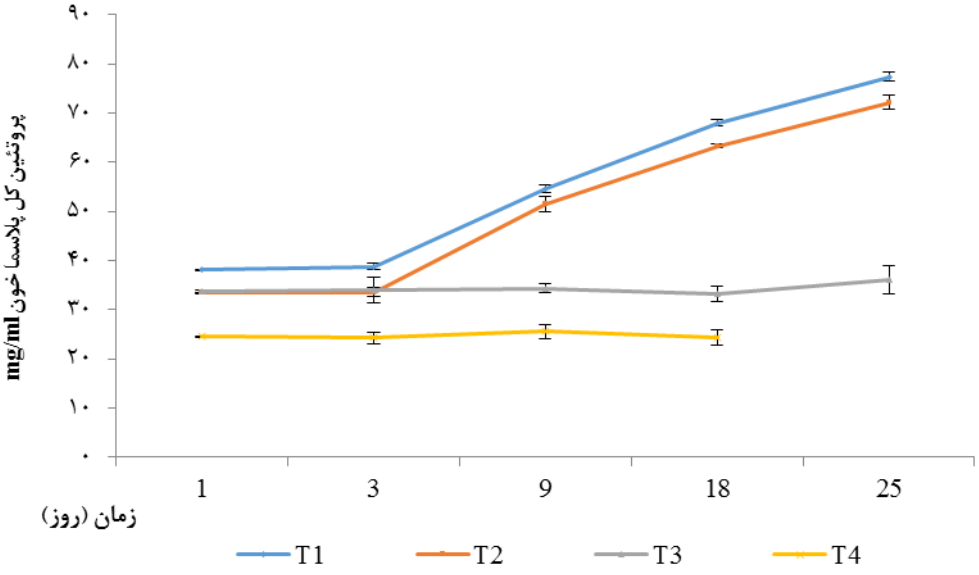
نمودار ۳-۳- مقایسه روند هموسیت کل در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس

۲-۲-۲-۳- میزان پروتئین کل (TPP)

پروتئین کل نیز در کلیه تیمارها روند افزایشی داشته و بیشترین میزان در تیمار ۱(T1) مشاهده شد (نمودار ۳-۴ و ۳-۵). کمترین میزان پروتئین کل در تیمار ۴ (T4) مشاهده شد که در کلیه تیمارها اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) دارند. نتایج نشان می‌دهد در تیمارهایی که در جیره غذایی آن‌ها جلبک وجود داشت افزایش میزان پروتئین کل دیده شد و مواجهه ویروس با میگوها باعث کاهش پروتئین کل در تیمارهای T2 و T4 گردیده است.



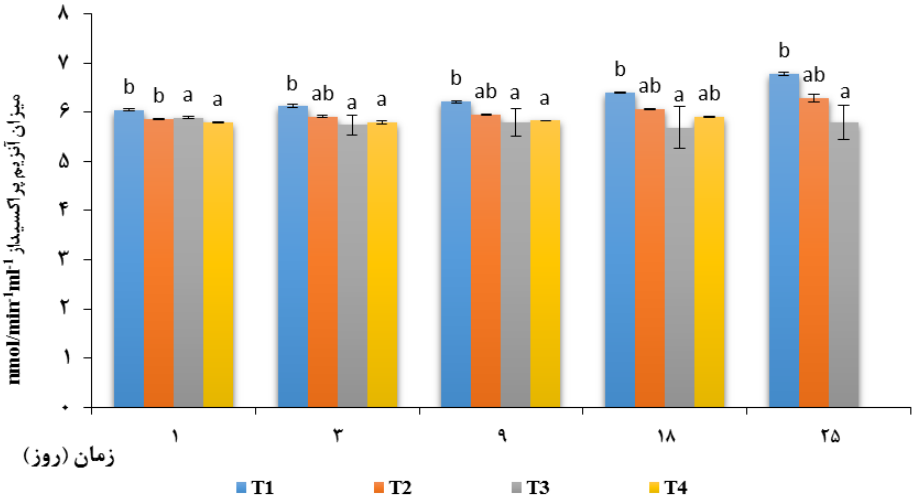
نمودار ۳-۴- مقایسه شاخص پروتئین کل در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس



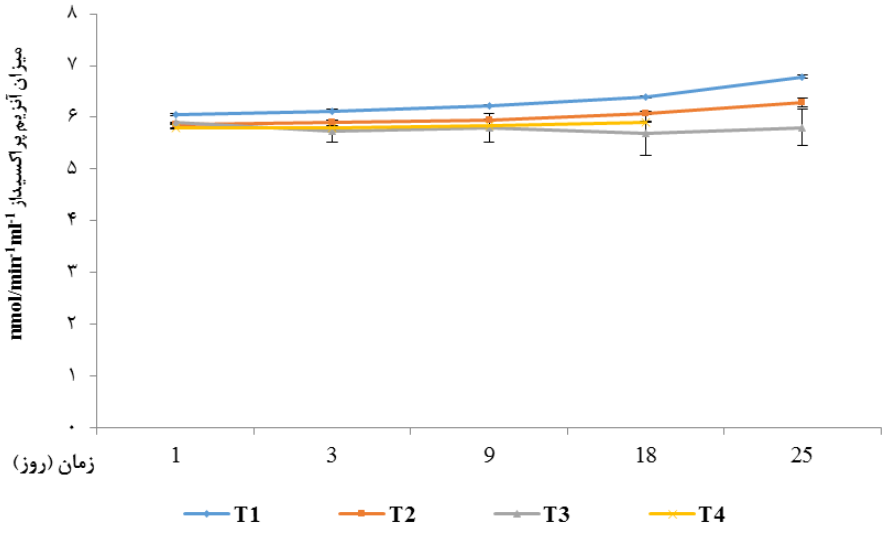
نمودار ۳-۵- مقایسه روند پروتئین کل در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس

۳-۲-۲-۳- میزان آنزیم پراکسیداز (POD)

آنزیم پراکسیداز در در تیمارها افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشته و بیشترین میزان در تیمار T1 و کمترین میزان در تیمار T4 می‌باشد. همچنین میزان این آنزیم در تیمار T4 طی روزهای ۱، ۳ و ۹ اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) ولی با روز ۱۸ اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵) و میزان آنزیم پراکسیدازافزایش نشان داد. مصرف جلبک باعث افزایش آنزیم شده ولی مواجهه ویروس با میگوها باعث کاهش میزان این آنزیم در مقایسه با تیمارهای T2 و T4 شده است(نمودار ۳-۶ و ۳-۷).



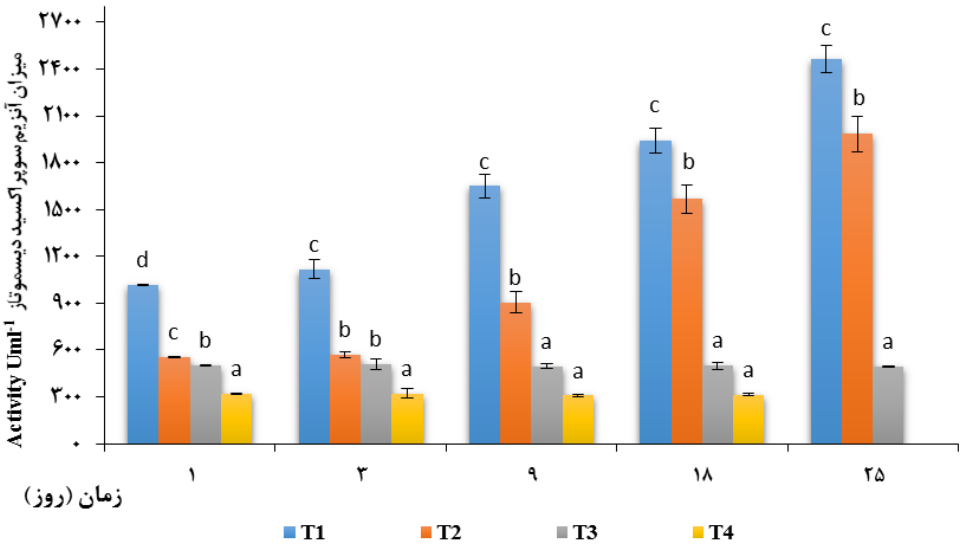
نمودار ۳-۶- مقایسه آنزیم پرواکسیداز در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس



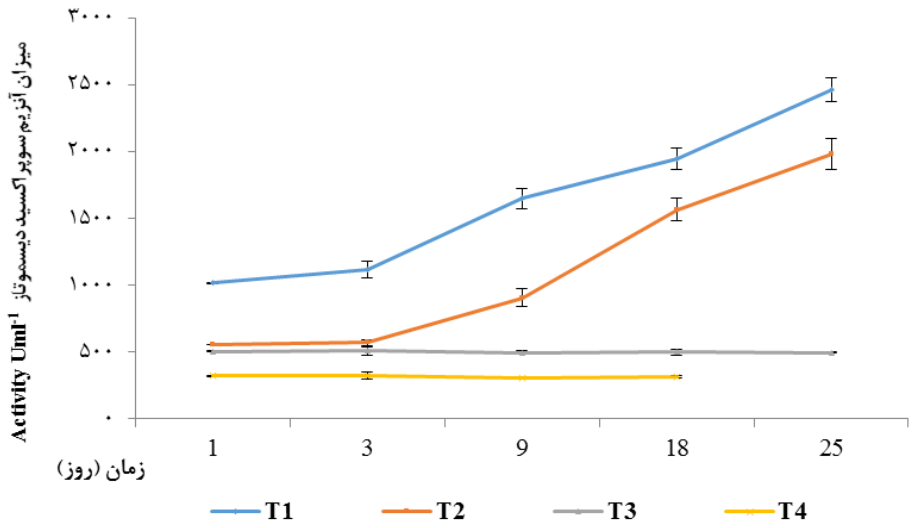
نمودار ۳-۷- مقایسه روند آنزیم پرواکسیداز در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس

۴-۲-۲-۳- میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

وضعیت این آنزیم و روند آن در آزمایش در نمودار ۳-۸ و ۳-۹ مشاهده می‌شود. میزان این آنزیم در تیمارهای T1 و T2 در مقایسه با تیمارهای T3 و T4 به‌شدت افزایش و اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). همچنین مقایسه تیمارهای T2 و T4 که با ویروس مواجهه شده با تیمارهای T1 و T3 که با ویروس مواجهه نشده‌اند نشان می‌دهد که مواجهه ویروس موجب کاهش این آنزیم در مقایسه با گروه‌های مشابه بدون مواجهه (T1 و T3) شده است.



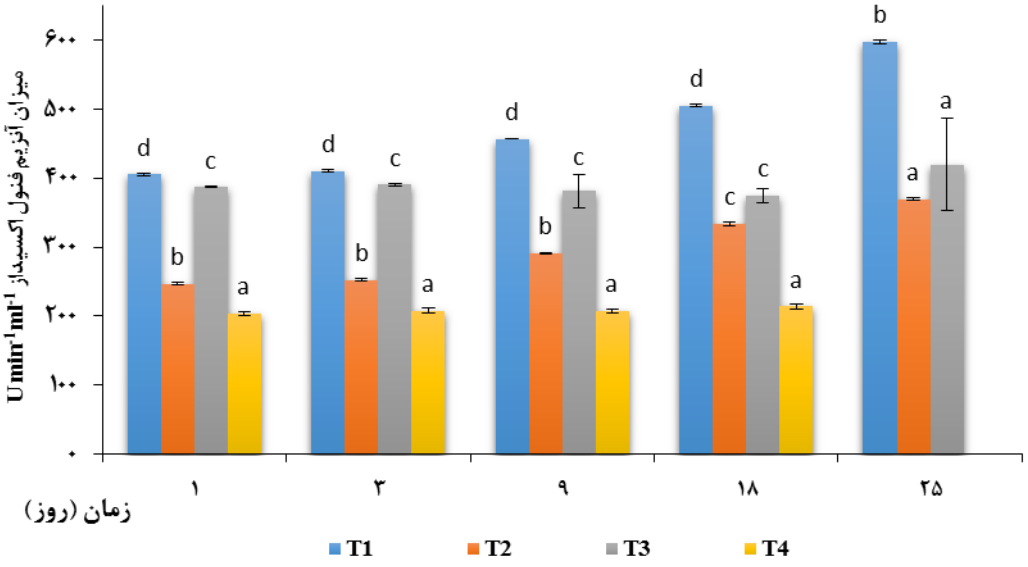
نمودار ۳-۸- مقایسه آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس



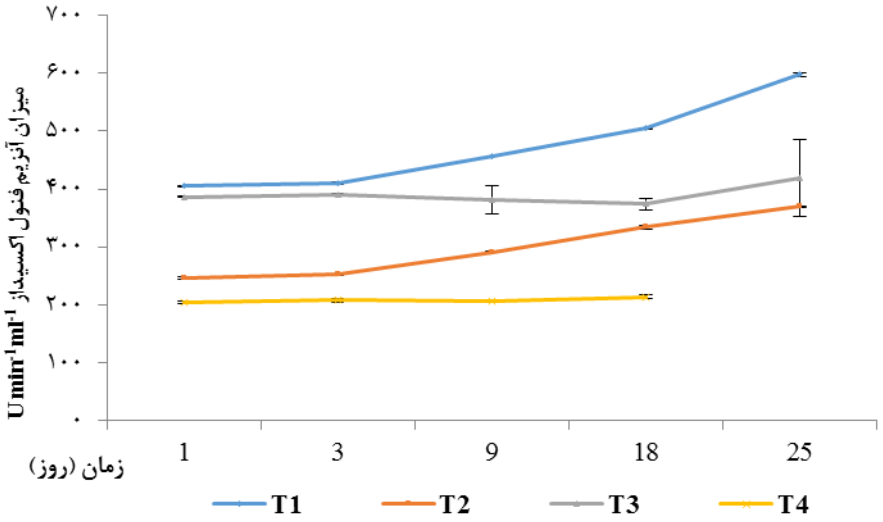
نمودار ۳-۹ - مقایسه روند آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس

۵-۲-۲-۳- میزان آنزیم فنول اکسیداز (PO)

میزان این آنزیم و روند افزایشی آن در نمودار ۳-۱۰ و ۳-۱۱ ارائه شده است. روند افزایشی آنزیم در تیمارهای T1 و T2 در مقایسه با تیمارهای T3 و T4 کاملاً معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در تیمار T4 میزان این آنزیم در میگوهای مواجهه شده با ویروس و بدون مصرف جلبک در تمام روزها تغییرات معنی‌دار نشان نمی‌دهند (P<۰/۰۵) و در روز ۲۵ کلیه میگوهای این تیمار از بین می‌روند.



نمودار ۳-۱۰- مقایسه آنزیم فنول اکسیداز در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس



نمودار ۳-۱۱: مقایسه روند آنزیم فنول اکسیداز در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس

۴- بحث و نتیجه گیری

موضوع بهداشت و بیماری‌های میگو یکی از مهم ترین چالش های درگیر با صنعت پرورش میگو می باشد که سالیانه بالغ بر ۲۲ درصد از میگوی تولیدی دنیا را از بین می برد و رقمی معادل ۶ میلیارد دلار به این صنعت خسارت وارد می نماید. در میان بیماری‌های ویروسی میگو بیماری لکه سفید خسارت زیادی به مزارع پرورشی وارد نموده و پرورش‌دهندگان از بابت این بیماری خسارت سنگینی متحمل شده‌اند. از سال ۱۹۹۲ که این بیماری بروز کرد موجب تلفات بسیار زیادی در مزارع پرورش میگو در سراسر جهان گردید. طی دو دهه، این بیماری به کلیه مناطق دنیا گسترش یافت و بالغ بر میلیاردها دلار خسارت به پرورش‌دهندگان میگو وارد نمود. هم‌اکنون جهت پیشگیری از این بیماری با اعمال شیوه‌های ایمنی زیستی از قبیل ضدعفونی کردن مزارع و آب، جلوگیری از ورود حاملین و ناقلین ویروس به مزارع پرورشی و ذخیره‌سازی استخرهای پرورشی با میگوها و پست لاروهای عاری از بیماری موجب کاهش خطرات ناشی از این بیماری شده‌اند. اعمال این شیوه‌ها در مزارع پرورشی موجب افزایش تولید نیز گردیده است (Valderrama و Anderson، ۲۰۱۱).

از مهم‌ترین روش‌ها می‌توان به استفاده از میگوهای عاری از عوامل بیماری زای خاص (SPF)، استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی، اعمال روش‌های ایمنی زیستی و واکسیناسیون اشاره داشت. استفاده از واکسن پایدار و مؤثر در میگو به دلیل نداشتن سیستم ایمنی خاطره‌ای تاکنون به‌طور کامل موفقیت‌آمیز نبوده است و یکی از بهترین روش‌ها برای پیشگیری از بیماری لکه سفید استفاده از تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی میگو می-باشد(افشارنسب و همکاران، ۱۳۹۵). در بین محرک‌های سیستم ایمنی میگو می‌توان به استفاده از عصاره گیاهان دریایی و مخمرها اشاره داشت(افشارنسب و همکاران، ۱۳۹۵). در این تحقیق در خصوص تأثیرات استفاده از عصاره گیاه دریایی گراسیلاریا کورتیکاتا (*G.corticata*)، در پیشگیری از بیماری لکه سفید مطالعه صورت پذیرفت.

میگوهای تغذیه‌شده با عصاره جلبک در مقایسه با میگوهای تغذیه‌شده با غذای تجاری بدون عصاره در مواجهه با ویروس بیماری لکه سفید به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از بقا بیشتری برخوردار بودند (۲۲/۵±۰/۵b). بنابراین عصاره جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا دارای قدرت محافظت کنندگی در برابر ویروس لکه سفید می باشد.

خاصیت ضدویروسی جلبک‌ها را می‌توان به ترکیبات پلی‌ساکاریدی، تانن، فلاونید، فنل، برومونفل و کارتینوئیدها مرتبط دانست(Rajasekar و همکاران، ۲۰۱۲؛ Rodriguez و همکاران، ۲۰۱۰). از جمله جلبک‌های دارای خواص ضدویروسی علیه ویروس لکه‌سفید: *Momordica charantia*، *Lantana camara*، *Cynodon dactylon*، *Aegle marmelos*، *Phyllanthus amarus* می‌باشند، همچنین استفاده از جلبک گراسیلاریا تنیستیپیتات (*G. tenuistipitate*) برای محافظت در برابر ویروس لکه سفید در میگوی پاسفید موجب بقای بیشتر و افزایش فاکتورهای ایمنی می گردد (Lin و همکاران، ۲۰۱۱؛ Balasubramanian و هکاران، ۲۰۰۷).

مکانیسم‌های مختلفی ممکن است در خاصیت ضدویروسی جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا نقش داشته باشند. اول اینکه مهم‌ترین راه‌های ورود ویروس لکه سفید به میگو سلول‌های اپتلیال روده قدامی، آبشش، کوتیکول (Chang و همکاران، ۱۹۹۶) و روده میانی (Di Leonardo و همکاران، ۲۰۰۵) می‌باشد. به نظر می‌رسد که ترکیبات پلی-ساکارید موجود در جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا با ویروس لکه سفید رقابت نموده و در این رقابت ویروس نمی‌تواند وارد سلول‌های میگو گردد. دومین روش ممکن این است که گیرنده های سطح سلول‌های میگو ممکن است به‌وسیله ترکیبات موجود در جلبک گراسیلاریا پوشیده شده و اجازه ندهد که ویروس‌ها به سطح سلول‌های میگو بچسبند. ویروس لکه سفید از طریق اندوسیتوز و به‌واسطه واکنش‌های پروتئینی کلاترین وارد سلول‌های میگو می‌شود. بر اساس این مدل ویروس به گیرنده های سطح سلول‌ها متصل و سپس بر اساس شبکه اندوسیتوز با واسطه کلاترین (Clathrin dependent endocytosis) وارد سلول‌ها می‌شود (Verbruggen و همکاران، ۲۰۱۶).

اندوسیتوز با واسطه وزیکول‌های کوچکی (قطر تقریبی ۱nm) که توسط پروتئین سیتوپلاسمی کلاترین پوشیده شده‌اند، صورت می‌گیرد. مولکول‌هایی به این طریق می‌توانند وارد سلول شوند که برای آن‌ها در سطح سلول گیرنده وجود داشته باشد و از لحاظ شکل فضایی مکمل ماده ورودی به سلول باشند. درواقع برای هر ماده‌ای که از طریق اندوسیتوز با واسطه گیرنده وارد سلول می‌شود، یک نوع گیرنده روی سطح سلول وجود دارد. اولین گام برای ورود به سلول از طریق اتصال به همین گیرنده‌ها می‌باشد، بعد از اتصال گیرنده به لیگاند، در زیر گیرنده یک ساختار پروتئینی به نام کلاترین شکل می‌گیرد (Huang وهمکاران، ۲۰۰۸). تاکنون ۱۱ الگوی شناسایی گیرنده در میگو شناسایی شده است. یکی از این الگوهای شناسایی گیرنده(PRR) مهم سی‌لکتین است که با پروتئین VP28 (یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های مؤثر در ورود ویروس لکه‌سفید) باند می‌شود. سی‌لکتین دارای یک یا دو محل باند شدن در سطح سلول‌ها بوده و به کربوهیدرات‌ها نیز بسیار حساس می‌باشد. در صورت تغذیه میگو با جلبک گراسیلاریا کربوهیدرات‌ها به محل سی‌لکتین باند و مانع از چسبیدن VP28 ویروس لکه سفید شده و به این طریق مانع بیماری‌زایی ویروس می‌شوند (Wang و Wang ، ۲۰۱۳).

مطالعات صورت گرفته قبلی نیز تائید می‌کند که جلبک‌های حاوی کربوهیدرات و فوکوئیدان شامل جلبک قهوه‌ای *Sargassum polycystum* (Chotigeat و همکاران، ۲۰۰۴)، جلبک *Sargassum wightii* (Immanuel و همکاران، ۲۰۱۲) عصاره جلبک قرمز *Gracilaria tenuistipitata* (Sirirustananun وهمکاران، ۲۰۱۱) و جلبک *Gracilaria fisheri* (Rudtanatip و همکاران، ۲۰۱۴؛ Wongprasert و همکاران، ۲۰۱۴) می‌توانند موجب کاهش تلفات ویروس لکه سفید شده و به‌نظر می‌رسد مکانیسم عمل جلبک استفاده‌شده در این تحقیق شبیه سایر جلبک‌های خانواده گراسیلاریا می‌باشد.

سلول‌های لنفاوی کل و تغییرات آن‌ها یکی از شاخص‌های مهم در استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی در میگو می‌باشد (Wangو Chen ، ۲۰۰۶) همچنین میزان تولید سلول‌های لنفاوی میگو در برابر تغییرات محیطی و یا استرس تغییر می‌کند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸).

میزان THC میگوهای تغذیه شده با جلبک در مواجهه با ویروس کاهش یافت که این کاهش ممکن است ناشی از ۱) هجوم ویروس لکه‌سفید به بافت‌های سازنده سلول‌های لنفی و محدود کردن هماتوپویزیس و یا ۲) مهاجرت سلول‌های لنفاوی گرانولار، سمی گرانولارو هیالین سل به بافت‌هایی که مورد هجوم ویروس قرارگرفته به‌منظور دفاع از بافت‌های آسیب‌دیده و مقابله با ویروس باشد.

نتایج حاصله از تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات انجام‌شده توسط Balasubramanian و همکاران (۲۰۰۸)، Lin و همکاران (۲۰۱۱) و Wongprasert و همکاران (۲۰۱۴) همخوانی داشته به‌طوری‌که این محققان پیشنهاد داده‌اند سولفات گالاکتان و کربوهیدرات موجود در گراسیلاریا موجب تحریک سیستم ایمنی میگو و همچنین افزایش خاصیت ضدویروسی در مقابل ویروس لکه سفید می شود.

میزان پروتئین کل پلاسما (TPP) نیز شبیه همولنف کل (THC) یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده سلامتی میگوها می باشد (Yoganandhan و همکاران، ۲۰۰۳). در مطالعه حاضر میزان پروتئین کل پلاسما در تیمار ۱(T1)که از غذای حاوی جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا تغذیه نموده اند بالاتر از میگوهایی است که غذای مشابه مصرف ولی با ویروس لکه سفید مواجهه گردیده است (T2). این در حالی است که میگوهای تغذیه‌شده با غذای پلت بدون گراسیلاریا کورتیکاتا (T3) و میگوهای تغذیه‌شده با همین نوع غذا و مواجهه شده با ویروس لکه سفید (T4) ازنظر میزان پروتئین کل پلاسما کاملاً اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) و میزان آن‌ها با میزان پروتئین کل پلاسما در تیمار T1 و T2 نیز کاهش چشمگیری داشته و اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

افزایش میزان پروتئین کل پلاسما در تیمار T1 و T2 در مقایسه با T3 و T4 ممکن است ناشی از فعالیت بالای بافت‌های همولنف ساز در میگوهای تغذیه‌شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا باشد. بر اساس گزارش Chen و Cheng (۱۹۹۳)، تغییر در میزان پروتئین کل پلاسما به اندازه، سن، جنس، وضعیت تغذیه و شرایط محیطی بستگی دارد.

پروتئین کل پلاسما یکی از مهم‌ترین پارامترهای دفاعی در میگو می باشد، زیرا تعداد زیادی از الگوهای شناسایی گیرنده ها (PRR_S) شبیه متصل‌کننده‌های پروتئین گرم منفی، لیپوپلی‌ساکارید یا متصل‌کننده‌های پروتئینی بتا ۱ و ۳ گلوکان، پروتئین حاوی تیواستر، پروتئین مرتبط با فیبرینوژن که در همولنف و هپاتوپانکراس یافت می‌شوند مرتبط با میزان پروتئین کل پلاسما هستند (Wang و Wang ، ۲۰۱۳). به نظر می‌رسد افزایش میزان پروتئین کل پلاسما در همولنف ناشی از مصرف گراسیلاریا کورتیکاتا بوده که موجب افزایش میزان الگوهای شناسایی گیرنده در همولنف گردیده و این فاکتورها می‌توانند در محافظت میگوها در مقابل با بیماری لکه سفید موثر باشند.

فاکتور مؤثر دیگر آنزیم پراکسیداز (POD) موجود در پلاسما بوده که به‌شدت به مولکول‌های رادیکال آزاد اکسیژن[1] (ROS) ارتباط داشته و در زمان فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی در برابر هجوم ذرات خارجی می‌باشد (Le Moullac and Haffner، ۲۰۰۰). POD نقش بسیار مهمی در مسمومیت ناشی از اکسیژن و دفاع ایمنی در میگو دارد (Liu و همکاران، ۲۰۰۰).

ارگانل‌های پراکسیدزم حاوی رادیکال‌های آزاد اکسیژن،POD و کاتالاز بوده که می‌توانند موجب حفاظت سلول‌ها از تغییر مواد تغییردهنده سلول‌ها نظیر H_2O_2، آب غیر سمی و رادیکال‌های اکسیژن آزاد باشد (Wang و همکاران، ۲۰۱۲).

Yan و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرده‌اند که آنزیم پراکسیداز به‌طور مشخص در ارگانل‌های خاصی بنام پراکسیدزم موجود در کبد، قلب و آبشش قرار دارند. همچنین POD در لیپیدهای اطراف کبد نیز وجود دارند. این محققان نشان دادند که در میگوهای آلوده نیز میزان POD در کبد، قلب و آبشش وجود داشته ولی میزان آن در بافت‌های چربی اطراف کبد کاهش می‌یابد.

در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد میزان POD در سلول‌های اصلی این آنزیم با مصرف گراسیلاریا کورتیکاتا در تیمار T1 افزایش می‌یابد هم چنانکه Yan و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرده‌اند وقتی میگوها با مصرف جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا مواجهه شده‌اند میزان POD در همولنف افزایش یافته و سپس در مواجهه با ویروس لکه سفید میزان آن در همولنف کاهش می‌یابد. در تحقیق حاضر میزان POD در تیمار T1 برابر ۰/۰۲±۶/۰۵ در روز اول بوده و در روز ۲۵ به ۰/۰۴±۶/۷۹ افزایش می‌یابد ولی در تیمار T2 میزان آن در کلیه روزها در مقایسه با T1 کاهش می‌یابد. این نتایج با نتایج تحقیقات Yan و همکاران (۲۰۱۰) و Wang و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد.

یکی از آنزیم‌های مؤثر دیگر در واکنش‌های دفاعی میگوها آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) است که به‌طور وسیعی در بافت‌های هوازی و غیر هوازی پدید می‌آید. این آنزیم نیز در بررسی سلامتی میگوها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. میزان SOD در تحقیق حاضر Uml^{-1} ۸۸/۱۹ ± ۲۴۶۶/۶ در تیمار T1 که با جلبک تغذیه‌شده در روز اول محاسبه شد و در مقایسه با کلیه تیمارها میزان آن در هر روز افزایش نشان داده و به‌طور معنی‌داری با میزان آن در سایر گروه‌ها اختلاف دارد (P<۰/۰۵).

بر اساس گزارش Pacheco و همکاران (۲۰۱۱) میگوهای تغذیه‌شده با بتا ۱ و ۳ گلوکان، ویتامین E و بتاکاروتن افزایش معنی‌داری در میزان SOD در هپاتوپانکراس و عضلات بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت نشان دادند ولی در مواجهه با ویروس میزان آن کاهش یافت.

[1] Reactive oxygen species

نتایج تحقیق Pacheco و همکاران (۲۰۱۱) و Chang و همکاران (۲۰۰۳) با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی داشته و نشان می‌دهد که مصرف محرک‌های سیستم ایمنی موجب افزایش SOD در میگوی ببری سیاه شده و وقتی با پاتوژن‌هایی مثل ویروس لکه سفید مواجهه می‌گردند کاهش می‌یابد.

آنزیم دیگری که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت، آنزیم فنل‌اکسیداز (PO) می‌باشد. سیستم پروفنل-اکسیداز (proPO) یکی از اجزا سیستم دفاعی میگو می‌باشد. این سیستم بالاخص در شناسایی اجزا غیرخودی نقش بسیار اساسی دارد (Van de Braak، ۲۰۰۲).

آنزیم فنل‌اکسیداز (PO) از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در زمان فعال شدن سیستم proPO ایجاد گردیده و نقش اساسی در پروسه ملانیزه شدن ناشی از مواجهه با ذرات و یا پاتوژن‌های خارجی دارد (Hernhdez-Lopez و همکاران، ۱۹۹۶). این آنزیم توسط پلی‌ساکارید دیواره باکتری‌ها و بتا ۱ و ۳ گلوکان دیواره قارچ‌ها فعال می‌گردد (Smithو Soderhall ، ۱۹۸۳). همچنین عصاره تعداد زیادی از گیاهان داروئی نظیر *Cyanodon dactylon, Aegle marmelos, Tinospora cordifolia, Picrorhiza kurooa* و *Eclipta alba* برای مواجهه با ویروس لکه سفید مورد آزمایش قرار گرفته و همه آن‌ها سیستم proPO را فعال و موجب افزایش آنزیم PO گردیده‌اند (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۶).

در تحقیق حاضر آنزیم PO در تیمار T1 به دلیل مصرف گراسیلاریا کورتیکاتا و ترکیب پلی‌ساکارید موجود در آن افزایش یافته، این در حالی است که در تیمار T2 میزان آن بدلیل مواجهه با ویروس لکه سفید کاهش یافته است و سیستم proPO در زمان مصرف گراسیلاریا تحریک شده و میزان آنزیم فنل اکسیداز افزایش یافته (T1) ولی زمانیکه میگوهای تغذیه‌شده با جلبک با ویروس ویروس لکه سفید مواجهه داده می‌شوند (T2) بخشی از آنزیم PO به مقابله با ویروس لکه سفید پرداخته و میزان آن کاهش می‌یابد.

نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیق صورت گرفته توسط Chen و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد که عصاره جلبک گراسیلاریا تنیستیپیتات (G. tenuistipitate) را در میگوی سفید غربی مورد استفاده قرار دادند و متوجه شدند برخی فاکتورهای ایمنی شبیه PO فعال ولی در مواجهه با استرس میزان آن کاهش می‌یابد.

در مطالعه حاضر میزان POD در زمان مصرف میگوها با جیره جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا از طریق تشکیل ROS و تولید DO، تولید بالائی از POD نموده ولی وقتی با ویروس مواجهه داده می‌شوند میزان POD کاهش می‌یابد. این نتایج با نتایج حاصل از Lin و همکاران (۲۰۱۱)، Wen-ying و همکاران (۲۰۰۷)، همخوانی دارد. Lin و همکاران (۲۰۱۱)، مشخص نمودند 1mg/ml بتا گلوکان موجب تحریک ۶ آنزیم شامل POD، SOD، ALP و PO گردید و پیشنهاد نمودند درجه حرارت آب در این فرآیند تأثیر مستقیمی دارد. همچنین Wen-ying و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند چهار فاکتور ایمنی شامل باکتریولیزین (LSZ) در بافت عضلانی، POD، اسید فسفاتاز (ACP) و آلکالین فسفاتاز (AKP) بعد از مصرف بتاگلوکان در همولنف میگو افزایش می‌یابد. این در حالی است که وقتی ویروس لکه سفید به میگوها مواجهه داده می‌شود آنزیم POD در همولنف میگوها کاهش می‌یابد.

این یافته‌ها با نتایج سایر محققین ازجمله Sun و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشته و گزارش نمودند عفونت ویروس لکه سفید به‌تنهایی و یا با باکتری موجب کاهش آنزیم POD در میگو می‌گردد. این کاهش آنزیم به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در بدن میگو است. همچنین یافته‌های این تحقیق با نتایج Yan و همکاران (۲۰۱۰) و Wang و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشته و بیان می‌دارند وقتی میگو با ویروس لکه سفید مواجهه داده می‌شود میزان POD در همولنف کاهش می‌یابد.

فنل‌اکسیداز (PO) نیز یکی از فاکتورهای ایمنی میگو بوده که با تغذیه گراسیلاریا کورتیکاتا در میگوهای کنترل افزایش یافته ولی وقتی با ویروس لکه سفید مواجهه داده می‌شود کاهش می‌یابد. آنزیم فنل‌اکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در جریان سیستم proPO تولید می‌گردد(Hernhdez-Lopez و همکاران، ۱۹۹۶). فعال شدن این آنزیم از طریق فعال‌شدن سیستم proPO و فعال شدن آنزیم سیستم proPO (PPA) انجام می‌گیرد (Huang و همکاران، ۲۰۱۰). فعال‌شدن این آنزیم توسط تعداد زیادی از تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی شامل پپتیدوگلیکان (Cerenius وSöderhäll ، ۲۰۰۴)، بتاگلوکان (Bai و همکاران، ۲۰۱۴) و لیپوپلی‌ساکارید (Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰؛ Lorenzo و همکاران، ۱۹۹۹) انجام می‌گیرد. در مطالعه حاضر نیز جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا موجب فعال‌کردن سیستم proPO شده و میزان PO در همولنف میگوها افزایش می‌یابد ولی بعداً در مواجهه با ویروس لکه سفید به‌طور معنی‌داری میزان آن کاهش می‌یابد این مکانیسم توسط Sutthangkul و همکاران(۲۰۱۵)، به این شکل توضیح داده می‌شود که بخشی از فعال‌سازی سیستم proPO در مواجهه با ویروس لکه سفید توسط آنزیم proPO-activating enzyme 2 (PmPPAE2) که باعث توقف فعالیت پروتئین ویروس لکه سفید453 می‌گردد کاهش می‌یابد. این یافته با نتایج حاصل از تحقیق Chen و همکاران (۲۰۱۴) که اعلام داشتند جلبک گراسیلاریا تنستیپیتا (*G. tenuistipitata*) در میگوی سفید غربی موجب افزایش آنزیم PO گردیده ولی در مواجهه با استرس میزان PO کاهش می یابد، مطابقت دارد.

پیشنهادها

با توجه به بازماندگی نسبتا بالای میگوهای تغذیه شده با جلبک، پیشنهاد می‌شود:

- افزایش توان ایمنی میگوها با استفاده از فراکشن های استخراج شده از جلبک ها مورد بررسی قرار گیرد.
- اثرات جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا در سنین مختلف میگوی وانامی در شرایط پرورش مورد مطالعه قرار گیرد.
- اثرات دیگر مواد محرک ایمنی در قالب جیره غذایی در میگوی وانامی مورد مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

از مدیر کل وقت شیلات و آبزیان استان خوزستان جناب آقای دکتر مغینمی به سبب حمایت در اجرای این پروژه قدردانی می گردد، همچنین از پرسنل و کارگران زحمتکش مجتمع شهید کیانی تشکر می گردد.

منابع

- افشارنسب، محمد و همکاران، ۱۳۹۵، ارزیابی تحمل پذیری میگو پا سفید غربی واکسینه با واکسن بیماری لکه سفید و تغذیه شده با مخمر ساکارومایسییس سروزیه و جلبک گراسیلاریا کورتاکا در مواجهه با ویروس بیماری لکه سفید، انتشارات مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۱۱۰ص.
- افشار نسب، م. ۱۳۸۶. بیماری ویروسی میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۰ ص.
- افشار نسب، محمد؛ سیدمرتضایی، سیدرضا؛ اسکندری، غلامرضا؛ کر، نیازمحمد؛ جرفی، الهام و لالویی، فرامرز (۱۳۸۵). گزارش نهایی بررسی و تعیین منبع بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی منطقه آبادان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۵ ص.
- افشارنسب، محمد؛ سیدمرتضایی، سیدرضا؛ آهنگرزاده، مینا؛ هوشمند، حسین؛ کر، نیازمحمد؛ جرفی، الهام؛ سبزعلیزاده، سارا و محسنی‌نژاد، لفته، (۱۳۸۸). بررسی وضعیت بهداشت و بیماری های مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور.،گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران.
- سالنامه آماری شیلات ایران ۱۳۸۷-۱۳۷۱ . میزان میگوی پرورشی در سال‌های ۱۳۸۱-۱۳۸۷ . انتشارات سازمان شیلات ایران ص۲۵.
- Afsharnasab, M., Mortezaei, R., Yegane, V., Kazemi, B., 2009. Gross sign, histopathology and polymerase chain reaction observations of white spot syndrome virus in shrimp specific pathogen free *Litopeneaus vannamei* in Iran. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 4, 297-305.
- Allison, R.W., Meinkoth, J.H., 2007. Hematology without the numbers: in-clinic blood film evaluation. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 37, 245-266.
- Arts J.A.J., Taverne-Thiele A.J., Savelkoul H.F.J. & Rombout J.H.W.M. (2007) Hemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 23, 164–170.
- Bai, N., Gu, M., Zhang, W., Xu, W. & Mai, K. 2014. Effects of β-glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. Aquaculture 426–427, 66–73.
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Rajesh Kumar, S. & Sahul Hameed, A. S. 2007. Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. Aquaculture 263, 15–19.
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J. & Sahul Hameed, A. S. 2008. Studies on the immunomodulatory effect of extract of Cyanodon dactylon in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). Fish & Shellfish Immunology, 25, 820-828.
- Barton, G.M., 2007. Viral recognition by toll-like receptors. Semin.Immunol. 19, 33-40.Berteau, O. and Mulloy, B., 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active towardthis class of polysaccharide. Glycobiology 13, 29-40.
- Berteau, O. and Mulloy, B., (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active towardthis class of polysaccharide. Glycobiology, 13, 29-40.
- Bonnichon, V., Lightner, D.V., Bonami, J-R., (2006). Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 72, 179-18.
- Briggs M.R.P. and Funge – Smith, S. J. (1996). The potential use of *Gracilaria sp.* meal diets for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture Research, 27:345-354.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews, 198, 116-126.
- Chang P.S.,Chen H.C. &Wang Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture 164, 233–242.

- Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., Lo, C. F., Kou, G. H. And Liao, I. C., (1999). Effect of dietary β-1, 3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) inpostlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 36: 163-168.
- Chang, C-F., Su, M-S., Chen, H-Y., Liao, I-C., (2003). Dietary β-1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of Penaeus monodon challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 15, 297-310
- Chang, P. S., Lo, C. F., Wang, Y. C. & Kou, G. H. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus WSBV target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Diseases of Aquatic Organisms, 7, 131-139.
- Chen, J. C. & Cheng, S. Y. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonieus* based on sex, size and moulting cycle. Comp Biochem Physiol, 106B, 293–296.
- Chen, Y. Y., Chen, J. C., Lin, Y. C., Kitikiew, S., Li, H. F., Bai, J. C., Tseng, K. C., Lin, B. W., Liu, P. C., Shi, Y. Z., Kuo, Y. H. & Chang, Y. H. 2014. Endogenous molecules induced by a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) elicit innate immunity in shrimp. PLoS One. , 17;9(12), e115232.
- Chen, Y. Y., Chen, J. C., Lin, Y. C., Yeh, S. T. & Huang, C. L. 2015. White Shrimp *Litopenaeus vannamei* That Have Received *Gracilaria tenuistipitata* Extract Show Early Recovery of Immune Parameters after Ammonia Stressing. Mar. Drugs 13(6), 3606-3624.
- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. & Phongdara, A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture 233, 23–30.
- Chou H.Y., Huang C.Y., Lo C.F. & Kou G.H. (1998). Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in Penaeus monodon and P. japonicus via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture 164, 263–276.
- Citarasu T, Sivaram V, Immanuel G, Rout N, Murugan V.,(2006). Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and Shellfish Immunology,21:372–84.
- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N. & Murugan, V. 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and Shellfish Immunology, 21, 372-384.
- Claydon K., Cullen B. & Owens L. (2004) OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in Cherax quadricarinatus. Diseases of Aquatic Organisms 62, 265–268.
- Cruz-Suarez, Tapia Salazar, M.; Nieto Lopez, M. and Rique, D. (2008). A Review of Effects of Macroalgae in Shrimp Feeds and Co-Culture. Programa of Maricultura, University of Mexico. 304-333pp.
- Di Leonardo V.A., Bonnichon V., Roch P., Parrinello N. & Bonami J.R. (2005) Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera Marsupenaeus and Palaemon. Journal of Fish Diseases 28, 565–569.
- Du, H., Li, W-F., Xu, Z-R., Kil, Z-S., (2006). Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*. Diseases in Aquatic Organisms, 71, 175-178.
- Durand S., Lightner D.V., Nunan L.M., Redman R.M., Mari J.& Bonami J.R. (1996) Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms 27, 59–66.
- Escobedo-Bonilla C.M., Wille M., Alday-Sanz V., Sorgeloos P.,Pensaert M.B. & Nauwynck H.J. (2007) Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF Litopenaeus vannamei. Diseases of Aquatic Organisms 74, 85–94.
- FAO (2006) Fishstat, Universal Software for Fishery Statistical Time Series, Version 2.3. FAO, Rome, Italy.
- Fegan, D.F., Clifford III, H.C., (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms.In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture. The world aquaculture society, BatonRouge, Louisiana, USA, 168-198 pp.
- Flegel TW.(1997). Major viral diseases of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology;13:433–42.
- Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragón, L., Salazar, M., (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) –infected *Litopenaeus vannamei*? Diseases in Aquatic Organisms, 54, 73-78.
- Granja, C.B., Vidal, O.M., Parra, G., Salazar, M.,(2006). Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Peaneus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 68, 175-180.

- He, N., Qin, Q., Xu, X., (2005). Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus resistant (Penaeus japonicus) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. Antiviral Research, 66, 39-45.
- Hernández-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G., Barron, B.L., (2002). Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. Antiviral Research, 56, 279-285.
- Hernhdez-Lopez, J., Golkxs-Galwin, T. & Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. , 113C(1), 61-66.
- Horowitz, A., and Horowitz, S., (2001). Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 199-218 pp.
- Huang, J., Yang, Y. & Wang, A. 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 28, 240–244.
- Huang, P. Y., Kang, S. T., Chen, W. Y., Hsu, T. C., Lo, C. F., Liu, K. F. & Chen, L. L. 2008. Identification of the small heat shock protein, HSP21, of shrimp *Penaeus monodon* and the gene expression of HSP21 is inactivated after white spot syndrome virus (WSSV) infection. Fish and Shellfish Immunology, 25, 250-257.
- Huang, X.; zhou, H, 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extract on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* . Fish & Shelfish Immunology. 20: 750-7.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S. & Palavesam, A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed Sargassum wightii on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish and Shellfish Immunology 32, 551–564.
- Inouye K, Miwa S, Oseko N, Nakano H, Kimura T, Momoyama K, et al.(1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathology;29:149–58.
- Inouye K., Yamano K., Ikeda N., Kimura T., Nakano H., Momoyama K., Kobayashi J. & Miyajima S. (1996) The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia. Fish Pathology 31, 39–45.
- Jaime Ceballos, B., Villareal, H., Garcia, T., Pérez Jar, L., Alfonso, E., 2005. Effect of Spirulina platensis meal as feed additive on growth, survival and development in *Litopenaeus schmitti* shimp larvae. Rev. Invest. Mar. 26(3), 235-241.
- Kakoolaki, S., Sharifpour, I., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Mirzargar, S., Rostami, M., 2010. Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp, *Fenneropenaeus indicus* in Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences 9, 219-232.
- Karunasagar I., Otta S.K. & Karunasagar I. (1997) Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. Aquaculture 153, 9–13.
- Kasornchandra J., Boonyaratpalin S. & Itami T. (1998) Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction.Aquaculture 164, 243–251.
- Kiatpathomchai W., Boonsaeng V., Tassanakajon A.,Wongteerasupaya C., Jitrapakdee S. & Panyim S. (2001)A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 47, 235–239.
- Kim C.S., Kosuke Z., Nam Y.K., Kim S.K. & Kim K.H. (2007) Protection of shrimp (Penaeus chinensis) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. Fish & Shellfish Immunology 23, 242–246.
- Kou G.H., Peng S.E., Chiu Y.L. & Lo C.F. (1998) Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: Advances in Shrimp Biotechnology (ed. by T.W. Flegel), pp. 267–271. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Kuda, T.; Tsunekawa, M.; Hishi, T. and Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of dried kayamo-nori, a brown alga Scytosiphon lomentaria (Scytosiphonales, Phaeophyceae). Food Chemistry, 89: 617-622.
- Kumar, S., Ahamed, V., Sarathi, M., Basha An. & Hameed, A. 2008. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). Fish and Shellfish Immunology. , 24(4), 467-478.
- Laxmilatha P, Laxminarayana A, 2004, Fine structure of the haemocytes of the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837), Crustaceana, 77,14.
- Le Moullac, G. & Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 191 121–131.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K., (2002). Early events in crustacean innate immunity. Fish and Shellfish Immunology, 12, 421-437.

- Lightner D.V. (1996) A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Lightner D.V., Hasson K.W., White B.L. & Redman R.M. (1998) Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. Journal of Aquatic Animal Health 10, 271–281.
- Lightner, D.V. (2003). Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. In: Biosecurity in aquaculture production systems: Exclusion of pathogens and other undesirables (C.-S. Lee & P.J. O'Bryen, eds.). The World Aquaculture Society , Baton Rouge, LA, USA. pp. 81-116.
- Lightner, D.V., (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. Journal of the World Aquaculture Society, 36, 229-247.
- Lin, Y. C., Yeh, S. T., Li, C. C., Chen, L. L., Cheng, A. C. & 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, H., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2006. Antipolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish Pacifastacus leniusculus. J. Virol. 80, 10365-10371.
- Liu, Y., Jang, X. L., Lv, Q. & 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.
- Lo C.F., Leu J.H., Ho C.H., Chen C.H., Peng S.E., Chen Y.T., Chou C.M., Yeh P.Y., Huang C.J., Chou H.Y., Wang C.H. & Kou G.H. (1996b) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms 25, 133–141.
- Lo C.F., Leu J.H., Ho C.H., Chen C.H., Peng S.E., Chen Y.T., Chou C.M., Yeh P.Y., Huang C.J., Chou H.Y., Wang C.H. & Kou G.H. (1996a) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms 25, 133–141.
- Lorenzo, S., De Guarrini, S., Smith, V. J. & Ferrero, E. A. 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. Fish and Shellfish Immunology, 9, 31–50.
- Lotz, J.M. & Soto, M.A. (2002). Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in Litopenaeus vannamei. Diseases in Aquatic Organisms 50, 199–209.
- Luo, T., Li, F., Lei, K., Xu, X., 2007. Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp Peaneus monodon. Mol. Immunol. 44, 1516-1523.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. & Xu, X. (2003). PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. FEBS Letters 551, 53–57.
- Marinho-Soriano, E.; Camara M.R.; Cabral T.M. and Carneiro, M.A.A. (2007) . Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (Litopenaeus vannamei) farming. Aquaclture Research, 38:182 – 187.
- Mustafa, M.G., Umino, T., Nakagawa, H., 1997. Limited synergistic effect of dietary Spirulina on vitamin C nutrition of red sea bream *Pagrus major*. J Mar Biotechnol 5, 129-132.
- Nadala E.C.B. & Loh P.C. (1998) A comparative study of three different isolates of white spot virus. Diseases of Aquatic Organisms 33, 231–234.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., Muroga, K., 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture 229, 25-35.
- Otta S.K., Shubha G., Joseph B., Chakraborty A., Karunasagar I.& Karunasagar I. (1999) Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. Diseases of Aquatic Organisms 38, 67–70.
- Pacheco, R., Ascencio, F., Zarain, M., Gómez, G. & Campa, A. 2011. Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β-1.3 glucan vitamin E, and β-carotene and infected with white spot syndrome virus. Lat. Am. J. Aquat. Res., 39(3), 534-543.
- Pan, J., Kurosky, A., Xu, B., Chopra, A.K., Coppenhaver, D.H., Singh, I.P., Baron, S., (2000). Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. Antiviral Research, 48, 39-47.
- Penaflorida V. D. and Golez N. V. (1996). Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 143:393-401.

- Rajasekar, T., Deivasigamani, B., Kumaran, S., Sakthivel, M., Balamurugan, S., Jothi, E. G. & Priyadharshini, P. 2012. Antibacterial Activity of Cultivated Marine Seaweeds against Fish pathogenic bacteria Vibrio harvey. Asian Pac J Trop Biomed 1-5.

- Rameshthangam, P., Ramasamy, P., (2007). Antiviral activity of bis(2-methylheptyl)phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against White spot syndrome virus of *Penaeus monodon* Fabricus. Virus Research, 126, 38-44.
- Robalino, J., Bartlett, T.C., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., (2007). Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. Dev. Comp. Immunol. 31, 539-547.
- Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., Aumelas, A.,(2008). NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. Developmental and Comparative Immunology, 32, 227-238.
- Rodriguez-Bernaldo De Quiros, A., Lage-Yusty, M. & Lopez-Hernandez, J. 2010. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. Food Chem, 121, 634-638
- Rout, N., Kumar, S., Jaganmohan, S. & Murugan, V. (2007). DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. Vaccine 25, 2778–86.
- Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K., (2002). The lipopolysaccharide and β-1, 3 glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (Penaeus stylirostris). Journal of Virology, 76, 7140-7149.
- Rudtanatip, T., Asuvapongpatana, A., Withyachumnarnkul, B. & Wongprasert, K. 2014. Sulfated galactans isolated from the red seaweed Gracilaria fisheri target the envelope proteins of white spot syndrome virus and protect against viral infection in shrimp haemocytes. Journal of General Virology (2014) 95 1126–1134.
- Sanchez Campos, L.N.; Herrera, F.D.; Araujo, A.D.R.; Sanchez, R.A.G.; Partida, M.L.L.; Ruiz, M.D.A. and Navarro, A.F.L. (2014). *Litopenaeus vannamei* immunestimulated with *Macrocystis pyrifera* extract: improving the immune response against *Vibrio campbellii*. Journal of Coastal Life Medicine, 2(8): 617-624.
- Sahtout AH1, Hassan MD, Shariff M. 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Organ. 9;44 (2):155-9.
- Sahul-Hameed A.S., Anilkumar M., Raj M.L.S. & Jayaraman K. (1998) Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. Aquaculture 160, 31–45.
- Sanchez-Martinez J.G., Aguirre-Guzman, G., Mejia-Ruiz, H., 2007, White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. Aquaculture Research 38, 1339 – 1354.
- Schuur, A; M., (2003). Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. Aquaculture Engineering, 28, 3-20.
- Shiroma, R., KoniShi, T., Uechi, S., TaKo, M., 2008. Structural study of fucoidan from the brown seaweed Hizikia fusiformis. Food science and technology research 14, 176-182.
- Sirirustananun, N., Chen, J. C., Lin, Y. C., Yeh, S. T., Liou, C. H., Chen, L. L., Sim, S. S. & Chiew, S. 2011. Dietary administration of a Gracilaria tenuistipitata extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology . 31, 848–855.
- Smith, V. J. & Soderhall, K. 1983. B-1,3-glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. Biol Bull (Woods Hole) 164, 299–314.
- Smolko, E.E and Lombardo, J.H, 2005. Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 236, 249-253.
- Sun, C. B., Wang, G. & Chan, S. F. 2015. Effects of artificial infection of Litopenaeus *vannamei* by *Micrococcus lysodeikticus* and WSSV on the activity of immunity related enzymes. Fish and Shellfish Immunology 46, 778-786.
- Sutthangkul, J., Amparyup, P., Charoensapsri, W., Senapin, S., Phiwsaiya, K. & Tassanakajon, A. 2015. Suppression of shrimp melanization during white spot syndrome virus infection. Journal of Biological Chemistry, 290 6470-6481.
- Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G-I. Yokomizo, Y., (2000). Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of Pantoea agglomerans lipopolysaccharide (LPS). Fish and Shellfish Immunology, 10, 555-558.
- Tang, K.F.J., Durand, S.V., White, B.L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Lightner, D.V., (2003). Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. Aquaculture, 216, 19-29.

- Tsai J.M., Wang H.C., Leu J.H., Wang A.H.J., Zhuang Y., Walker P.J., Kou G.H. & Lo C.F. (2006) Identification of the nucleocapsid, tegument and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. Journal of Virology 80,3021–3029.
- Valderrama, D. & Anderson, J. L. 2011. Shrimp production review. Food and Resource Economics Department, University of Florida, USA. Santiago, Chile, November 6-9.
- Van De Braak, C. B. T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (Penaeus monodon). PhD thesis, Wageningen University, Wageningen Institute of Animal Sciences. PO Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands., Pp.168.
- Van Hulten, MC. W., M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou and J. M. Valk, 2000, Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions, J. Gen. Virol, 81, 307-316.
- Venegas C.A., Nonaka L., Mushiake K., Nishizawa T. & Muroga K. (2000) Quasi-immune response of Penaeus japonicus to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). Diseases of Aquatic Organisms 42, 83–89.
- Verbruggen, B., Bickley, L. K., Van Aerle, R., Bateman, K. S., Stentiford, G. D., Santos, E. M. & Tyler, C. R. 2016. Molecular Mechanisms of White Spot Syndrome Virus Infection and Perspectives on Treatments. Viruses 8, 23, 1-29.
- Wang C.H., Lo C.F., Leu J.H., Chou C.M., Yeh P.Y., Chou H.Y., Tung M.C., lotC.F., Su M.S. & Kou G.H. (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms 23, 239–242.
- Wang H.C., Wang H.C., Leu J.H., Kou G.H., Wang A.H.J. & Lo C.F. (2007) Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. Developmental and Comparative Immunology, 31, 672–686.
- Wang Q., White B.L., Redman R.M. & Lightner D.V. (1999b) Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. Aquaculture 170, 179–194.
- Wang Y.G., Hassan M.D., Shariff M., Zamri S.M. & Chen X. (1999a) Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured Penaeus monodon from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. Diseases of Aquatic Organisms 39, 1–11.
- Wang, D. L., Zuo, D., Wang, L. M., Sun, T., Wang, Q. & Zhao, Y. L. 2012. Effects of white spot syndrome virus infection on immuno-enzyme activities and ultrastructure in gills of *Cherax quadricarinatus*. Fish and Shellfish Immunology 32, 645-650.
- Wang, F. I. & Chen, J. C. 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to Photobacterium damselae subsp. damselae. Fish Shellfish Immunol, 20, 671-81.
- Wang, Q., Nunan, L.M. & Lightner, D.V. (2000). Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. Diseases in Aquatic Organisms 43, 175-181.
- Wang, X. W. & Wang, J. X. 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. Fish & Shellfish Immunology 34, 981-989.
- Wen-Ying, S., Hui-Jun, Y., Hui-Feng, K. E. & Lan, Q. I. 2007. Effect of β-glucan on Enzyme Activity of Immunity in Pacific White Leg Shrimp *Litopenaeus vannmei*. Fisheries Science, 2007-07.
- Witteveldt, J. Vlak, J.M. and van Hulten, M.C., (2006). Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. Diseases of Aquatic Organisms, 70:167-170.
- Witteveldt, J., Vermeesch, A.M., Langenhof, M., de Lang, A., Vlak, J.M., and van Hulten, M.C. 2005. Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. Arch. Virol. 150(6): 1121–1133.
- Witvrouw, M. and De Clercq, E., (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. General Pharmacology. 29, 497-511.
- Wongprasert, K., Rudtanatip, T. & Praiboon, J. 2014. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed Gracilaria fisheri and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. Fish & Shellfish Immunology, 36, 52-60.
- Wongteerasupaya C., Vickers J.E., Sriurairatana S., Nash G.L., Akarajamorn A., Boonsaeng V., Panyim S., Tassanakajon A.,Withyachumnarnkul B. & Flegel T.W. (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms 21, 69–77.

- Wu J.L., Nishioka T., Mori K., Nishizawa T., Muroga K., 2002, A time-course study on the resistance of Penaeus japonicus induced by artificial infection with white spot syndrome virus, Fish Shellfish Immunol, 13, 391–403.
- Wu, J. L. and K. Muroga., 2004. "Apoptosis does not play an important role in the resistance of 'immune'Penaeus japonicus against white spot syndrome virus." Journal of Fish Diseases 27(1): 15-21.
- Wu, J.L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K. & Muroga, K. (2001). Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in Penaeus japonicus by cannibalism and the waterborne route. Diseases in Aquatic Organisms 47, 129–135.
- Xu J., Han F. & Zhang X. (2007) Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. Antiviral Research 73, 126–131.
- Yan, X., Jie, A., Jing-Qiu, S., Ya-Dong, Y. & Jun-Qiang, Y. 2010. Cytochemical location of superoxide dismutase and peroxidase In different tissues of *Litopenaeus vannamei*. Acta Hydrobiologica Sinica, 34,2, 402-409.
- Yi, G., Qian, J., Wang, Z., Qi, Y., (2003). A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp. Journal of General Virology, 84, 2545-2553.
- Yoganandhan, K., S., S., Murugan, V., Narayanan, R. B. & Sahul Hameed, A. S. 2003b. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. Aquaculture 215, 21-29.
- Zhan W.B., Wang Y.H., Fryer J.L., Yu K.K., Fukuda H. & Meng Q.X. (1998) White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. Journal of Aquatic Animal Health 10, 405–410.
- Zhang X., Huang C., Tang X., Zhuang Y. & Hew C.L. (2004) Indentification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics 55, 229–235.

Abstract:

White spot disease (WSD) is one of the shrimp deadliest viral diseases that causes heavy losses on all shrimp of Penaeid family. Most invertebrates are lacking adaptive immune system and its defense is the innate immune system that is as cellular and humoral, but a like immune system against white spot virus in shrimp was been detected.

In this research, control and prevention of white spot disease in shrimp using algae *Gracilaria corticata*, investigated. About 300 *vannamei* shrimp were divided to 4 groups and fed by normal pellet and algae extract in 14 days. At the end of the fourteenth day half of the shrimp were challenged with acute white spot virus. After the fourteenth day in the days 0, 3, 9, 18 and 25 sampling were done from the hemolymph of survived shrimps and survival and immune factors were evaluated.

Based on results, in the challenge test, shrimps that fed with algae extract has a significant survival rate than shrimp fed with commercial diet. Increased the Immune Factors from day one to day 25 observed during the test. Greatest amount of Immune Factors THC, TPP, SOD, POD and PO in T1 group were observed in day 25 of tests. This situation was also true for group2 (T2), but its rate significantly was less than group 1(T1).

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Aquaculture Research Center- South of Iran

---

Project Title : Evaluation of the immunity factors (THC, TPP, PO, SOD, POD) of shrimp fed with the algae *Gracilaria corticata* compared to shrimp fed without algae and exposed to white spot virus
Approved Number: 14-74-12-9451-94001
Author: Hossein Houshmand
Project Researcher : Hossein Houshmand
Collaborator(s)*:* M. Ahangarzadeh, S. Reza S. Mortezaei, M. Afsharnasab, L. Mohseni nejad, M. Mohammadi doust, R. Banaderakhshan
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 : 2017

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 -Aquaculture Research Center- South of Iran

Project Title:

Evaluation of the immunity factors (THC, TPP, PO, SOD, POD) of shrimp fed with the algae *Gracilaria corticata* compared to shrimp fed without algae and exposed to white spot virus

Project Researcher :

Hossein Houshmand

Register NO.
51739