اثرحفاظتی ترکیبی ویبریو پاراهمولیتیکوس غیرفعال و ویروس سندروم لکه سفید پرتوتابی شده بر میگو وانامی به دو روش تزریقی و حمامی

فرحناز معتمدی سده[1*]، رضا روشن[1]

[1] پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران

چکیده:

ویروس سندرم لکه سفید یکی از عوامل عفونت زای مهم میگو می باشد. در این تحقیق، از نمونه های میگو عفونی و جمع آوری شده از مزارع میگو استان بوشهر، ویروس سندروم لکه سفید جداسازی و در همولنف خرچنگ دراز تکثیر و از طریق آزمون PCR وجود ویروس تایید گردید. تیتراسیون ویروس در پست لاروهای میگو به روش کربر LD_{50}/ml ۱۰ ^۵،۴ محاسبه و غیرفعال سازی با بیم الکترون انجام شد. ارزش D_{10} و دز مطلوب پرتو الکترون برای غیرفعال سازی این ویروس به ترتیب ۱/۸۵ و ۱۳ کیلوگری بدست آمد. ویروس پرتوتابی شده با الکترون به عنوان واکسن-الکترون و باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده به عنوان محرک برای ایمن سازی میگو وانامی استفاده شدند. دز حفاظتی ۵۰٪ برای گروه های دریافت کننده واکسن الکترون ، واکسن الکترون همراه با باکتری ویبریو پرتوتابی شده و گروه دریافت کننده باکتری ویبریو پرتوتابی شده به تنهایی در روش تزریقی به ترتیب ۵/۶۲ ، ۶/۳۰ و ۲/۸۷ محاسبه شد. درصد بقا نسبی این سه گروه در روش تزریقی به ترتیب ۶۴٪ ، ۷۲٪ و ۲۲٪ و در روش حمامی به ترتیب ۷۵٪، ۸۵٪ و ۱۲،۵٪ محاسبه شد. با توجه به نتایج آزمون مواجهه دو گروه ۱و ۲ در مقابل ویروس زنده اثر حفاظتی خوبی نشان دادند. لذا نتیجه گیری می شود که باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده می تواند به عنوان یک محرک ایمنی اثر حفاظتی واکسن-الکترون را در میگوها تقویت نماید. همچنین هر دو روش تزریقی و حمامی برای واکسیناسیون میگوها بدون اختلاف معنی دار در درصد بقا نسبی مناسب می باشند.

کلید واژه ها: میگو، ویروس سندرم لکه سفید، بیم الکترون، ویبریو پاراهمولیتیکوس، واکسن

مقالات آماده انتشار

The combined protective effect of inactivated Vibrio Parahemolyticus and irradiated white spot syndrome virus on Litopenaeus vannamei by two routes of administration (injection and immersion)

Short Title: Protection against WSSV by Electron-Vaccine and Vibrio parahemolyticus

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is one of the important infectious agents of shrimp and other crustaceans. In this research, WSSV was isolated from infected shrimp samples which collected from Bushehr's farms, confirmed by PCR test and multiplied in Astacus leptodactylus crayfish hemolymph. Titration of WSSV was obtained in postlarvae by Karber method as $10^{5.4}$ LD50/mL and the virus was inactivated by the electron beam irradiation. The D_{10} value and optimum dose of electron beam were obtained at 1.85 and 13 kGy. Electron beam irradiated WSSV (EBI-WSSV) was used as an electron-vaccine to immunize L. vannamei. The gamma irradiated inactivated Vibrio Parahaemolyticus (GIVP) was used as an immune-stimulant. PD_{50} were calculated 5.62, 6.30 and 2.87 for the injected groups with EBI–WSSV vaccine, EBI-WSSV vaccine+ GIVP and GIVP alone, respectively. The relative percent survival (RPS) values were calculated 64%, 72% and 22% for the EBI-WSSV vaccine, EBI-WSSV+ GIVP and GIVP groups by injection route and 75%, 85% and 12.5% for these thee vaccine groups in immersion route, respectively. Significant difference in cumulative mortalities was observed between both vaccination groups (EBI-WSSV and EBI-WSSV+ GIVP), and the GIVP group ($P<0.05$). Therefore, two vaccine groups 1 and 2 induced protectivity responses in shrimp against WSSV infection and GIPV enhanced this response. The conclusion showed the irradiated Vibrio Parahaemolyticus can be used as an immune stimulator and can enhanced the protective effect of electron WSSV vaccine. The RPSs in the vaccinated groups by injection and immersion routes are without any significant differences.

Keywords: Shrimp, White Spot Syndrome, Electron Beam, Vibrio Parahaemolyticus, Vaccine

۱.مقدمه

میگو یکی از گونه های آبزی پروری درکشور و جهان محسوب می شود. مهمترین بیماری که موجب خسارت در صنعت تکثیر و پرورش میگو می شود بیماری ویروسی سندرم لکه سفید می‌باشد. این ویروس متعلق به خانواده نیماویریده[1] و جنس ویسپوویروس[2] بوده، میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری ۱۰۰- ۷۰ درصد طی ۷-۳ روز بعد از ظهور علائم کلینیکی در مزارع میگو گزارش شده است. اولین باردر سال ۱۹۹۲ سه نوع ازاین ویروس در تایلند، تایوان و چین شناسایی شد و درسال ۱۹۹۹ چهارمین نوع از این ویروس در آمریکا شناسایی شد. این ویروس دارای ژنوم DNA حلقوی بزرگی با اندازه ۲۹۲,۹ تا ۳۰۷,۲ کیلو باز می باشد. این ویروس درطیف وسیعی از خانواده سخت پوستان آبزی به صورت عمودی و افقی انتقال یافته و با نتایج مرگ و میر متنوعی‌آنها را آلوده می کند [۱]. بخش عمده ای از گونه های جنس ویبریو به طور معمول در محیط های آبی در مناطق گرم یا معتدل یافت شده و از آب، رسوبات، پالنکتون ها، انواع ماهیان، میگو، سخت پوستان و هم چنین صدف ها جداسازی شده اند [۲, ۳]. از بین ۱۲ گونه ویبریویی که مولد بیماری غذا زاد در انسان هستند، گزارشات فراوانی اهمیت بالاتر گونه های ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس را نشان داده اند [۲, ۳]. ویبریو پاراهمولیتیکوس نیز باکتری گرم منفی، تخمیر کننده ی بی هوازی و نمک دوست است قدرت تحمل نمک بالا در این باکتری سبب شده است که جز فلور میکروبی خلیج ها و آب های شور باشد [۴, ۵]. ویبریوپاراهمولیتیکوس یکی از جانداران عامل بیماری ویبریوزیس در میگو و یکی از عوامل بیماری زای مشترک آبزیان و انسان است، به طوری که در انسان ایجاد گاستروآنتریت می نماید [۶]. براساس یک گزارش، مهمترین گونه های عامل بیماری ویبریوزیس در میگوی ببری سیاه ویبریوآلجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس و انگوئیلاروم معرفی شده است [۷, ۸]. واکسیناسیون مهمترین راهبرد کنترل و پیشگیری است. در برابر بیماری های ویروسی استفاده از پرتوهای یونیزان یک روش بسیار قابل اعتماد در غیرفعال سازی ویروس ها است. امروزه برای تولید واکسنهای غیرفعال به روشهای هسته ای (پرتوهای یونساز) بسیار مورد توجه می باشند. زیرا این روش، کمترین اثر زیان آور را بر ویژگیهای آنتی ژنسیتی و بیشترین اثر ایمن سازی را بر ذرات آنتی ژنی ریزجانداران دارد [۹]. به طور کلی، غیرفعال‌سازی ریزجانداران در واکسن های غیرفعال با استفاده از مواد شیمیایی نظیر فرمالدئید، بتا پروپیولاکتون، آزیریدین‌ها و یا روش‌های فیزیکی همچون حرارت‌دهی، پرتوتابی با پرتو فرابنفش و یا پرتوهای یونساز مثل پرتو گاما و الکترون امکان‌پذیر است [۱۰]. غیرفعال‌سازی ریزجانداران به کمک مواد شیمیایی به ویژه فرمالین و بتا پروپیولاکتون ممکن است با تغییر آنتی ژن های سطحی ناشی از ایجاد پیوندهای متقاطع در ساختار پروتئین‌ها، سبب از بین رفتن و یا کاهش اپی‌توپ‌های آنتی ژنی مورد نیاز برای تحریک دستگاه ایمنی شود [۱۱].

پرتوتابی با پرتو گاما، به عنوان یکی از قدرتمندترین ابزارهای استریل کردن وسایل پزشکی، برای ایمن‌سازی بسیاری از محصولات زیستی به کار می‌رود. به علاوه، از پرتو گاما برای غیرفعال‌سازی عوامل بیماریزای بسیار خطرناک مثل ویروس *ابولا* نیز استفاده شده است [۱۱]. پرتوتابی گاما به عنوان یکی از روش‌های فیزیکی غیرفعال‌سازی ریزجانداران قدرت نفوذ خوبی داشته و در صورت استفاده با دز مناسب، ضمن تخریب اسیدهای نوکلئیک و از بین بردن قدرت تکثیر ریزجانداران، در مقایسه با مواد شیمیایی آسیب ساختاری کمتری در پروتئین‌های آنتی ژنی به وجود می‌آورد. به طور کلی، پرتوتابی کمترین تغییرات مولکولی را در پروتئین‌ها و ساختار ویروس ایجاد می‌کند. از بین رفتن توان عفونت‌زایی ویروس و عدم دناتوره شدن و عدم تغییر شکل فضایی پروتئین های ساختمانی آن که موجب حفظ توانایی ویروس در القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و تحریک پاسخ‌های آنتی بادی ضد

[1] Nimaviridea

[2] Wispovirus

مقالات آماده انتشار

ویروس می‌شود با استفاده از پرتوتابی ویروس با پرتو گاما گزارش شده است [۹, ۱۲-۱۵]. علاوه بر اثر تخریبی مستقیم پرتو بر مولکول های تشکیل دهنده ژنوم ویروس، اثرات غیرمستقیم پرتو های یونساز باعث یونسازی در مولکول های آب شده که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شد و به عنوان سازوکار دیگری در غیرفعال‌سازی ریزجانداران توسط پرتوهای یونساز ذکر شده است [۱۲-۱۵] از مزایای دیگر واکسن‌های پرتوتابی شده، عدم ایجاد باقیمانده در بدن میزبان است، در حالی که در استفاده از واکسن‌های غیرفعال با مواد شیمیایی از جمله فرمالین یا آزیریدین‌ها، این واکسن‌ها ممکن است حاوی باقیمانده‌هایی باشند که برای مصرف‌کنندگان این واکسن ها باعث مسمومیت‌زایی یا واکنش‌های آلرژیک شوند [۱۳-۱۵]. بیشتر باکتریهای نمک دوست خانواده ویبریو در اکثر آبزیان قدرت رشد مثبت داشته و به عنوان محرک سیستم ایمنی در سخت پوستان استفاده می شوند. در این تحقیق از باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس که از عوامل بیماری ازی میگو می باشد و به روش پرتوتابی گاما غیرفعال سازی شده است استفاده شده است. هدف از این تحقیق بررسی اثر پرتوی یونساز الکترون بر کاهش خاصیت عفونت زایی ویروس سندرم لکه سفید میگو و همچنین استفاده از باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده با پرتوگاما در تقویت اثر حفاظتی واکسن پرتوتابی شده بیماری ویروسی سندروم لکه سفید میگو به روش تزریقی و حمامی می باشد.

۲.موادوروش کار:

۲-۱آماده سازی استوک ویروس سندروم لکه سفید:

میگوهای مشکوک به بیماری سندرم لکه سفید از مزرعه‌پرورشی دراستان بوشهر جمع آوری شد. برای تأیید عفونت ویروسی از روش nested PCR براساس راهنمای کیت تشخیصی تجاری IQ2000 TM (Taiwan) استفاده شد [۱۶, ۱۷]. سوسپانسیون ویروسی‌که از بافت‌های میگوهای آلوده به ویروس جداسازی شدند پس از هموژنیزه کردن آن‌ها برای تکثیر به خرچنگ دراز آب شیرین *Astacus leptodactylus* استفاده شدند. برای جداسازی ویروس ها از همولف خرچنگ از فیلترهای ۰/۴۵میکرون استفاده شد. استوک ویروس سندرم لکه سفید تهیه شده درایران را WSSV/IRN/1/2010 نام گذاری شد[۱۸-۲۲].

۲-۲ دزیمتری، پرتوتابی الکترون ویروس و تیتراسیون نمونه های ویروس پرتوتابی شده و نشده:

برای‌پرتوتابی الکترون دراین پروژه از سیستم پروتودهنده الکترون در پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، مرکز یزد استفاده شد. این سیستم یک شتابدهنده الکترون ساخت شرکتIBA مدل Rodotron TT200 با انرژی 10-Mev و جریان ۲ میلی آمپر بود. دزیمتری با استفاده از دزیمتر های FWT و CTA انجام شد. نمونه های همولف خرچنگ های آلوده به ویروس را پس از سانترفیوژ با دور (۵۰۰×g ، ۴ °C و ۱۰ دقیقه) در ویال های ۳ میلی لیتری تقسیم و درفریزر ۷۰- نگه داری شدند. همولف خرچنگ ها را در شرایط انجماد همراه با یخ خشک برای پرتو دهی به یزد فرستاده و با دزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵و ۳۰ کیلوگری پرتوتابی شده و مجدداً جهت تأیید غیر فعال سازی بر روی میگو و تعیین دز کشنده ۵۰٪ (LD_{50}) به فریزر ۷۰- منتقل گردید. تعداد ۴۵ گروه پست لارو میگو ۱ تا ۲ گرمی که هر گروه شامل ۱۲پست لارو انتخاب شدند و هرنمونه از ویروس پرتوتابی شده و نشده در بافر TN استریل (Tris-HCl 20 mM and NaCl 400 mM , pH= 7.4) رقیق شدند. سریال رقت شامل 10^{-4}و10^{-3}، 10^{-2}، 10^{-1}، ۱ از ویروس تهیه و به هر گروه۱۰میکرو لیتر ویروس رقیق شده به صورت داخل عضلانی تزریق شد. یک گروه به عنوان شاهد که فقط بافر TN استریل به آنها تزریق شد در نظر گرفته شد [۲۳, ۲۴]. میزان تلفات پست لاروهای میگو تا یک هفته هر روز شمارش شد و به روش کربر دز کشنده ۵۰ درصد نمونه های ویروسی شاهد و پرتوتابی شده در دزهای مختلف به عنوان تیتر ویروس محاسبه گردید [۲۵]. سپس با استفاده از نرم افزار Origin نمودار دز/پاسخ برای تیترهای ویروسی بدست آمده در نمونه های پرتوتابی

مقالات آماده انتشار

شده با دزهای مختلف الکترون ترسیم شد و با کمک معادله خط عبوری از نمودار ارزش D_{10} (دزی از پرتوگاما که قادر به کاهش یک سیکل لگاریتمی ازجمعیت میکروارگانیسم هاست) و دز مطلوب غیرفعال سازی کامل این ویروس محاسبه شد.

۲- ۳ آماده سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس ودزیمتری و پرتوتابی گاما باکتری:

باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس[3] با شناسه (ATCC: 17802) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و در محیط کشت مایع تریپتیک سوی برات (TSB) که شامل سه درصد کلرید سدیم بود کشت داده و در ویال های ۵ میلی لیتری تقسیم شد. نمونه های باکتری لیوفیلیزه شده و سپس توسط گاما سل تحقیقاتی با چشمه کبالت-۶۰ (شرکت سازنده MDS Nordion از کشور کانادا با نرخ دز ۴/۸ گری بر ثانیه (Gy/sec) و اکتیویته ۲۰۴۶۹ کوری (Ci) پرتوتابی شدند. دزهای متفاوت از پرتو گاما شامل ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ کیلو گری استفاده شدند. باکتری پرتو تابی شده و نشده برای تعیین عیار باکتری به روش تشکیل واحد کلونی در هر میلی لیتر(CFU) و سپس رسم نمودار دز/پاسخ با استفاده از نرم افزار Origin6.1 استفاده شد. دز مناسب غیر فعال سازی و ارزش D_{10} با کمک این نمودار و معادله بهترین خط عبوری از نمودار دز/پاسخ محاسبه شدند. این باکتری پرتو تابی شده به عنوان یک محرک ایمنی برای تحریک سیستم ایمنی استفاده شد (۳۹).

۲-۴ فرمولاسیون واکسن پرتوتابی شده ویروس سندرم لکه سفید میگو با بیم الکترون:

ویروس سندرم لکه سفید غیرفعال شده با پرتوی الکترون به عنوان واکسن-الکترون در نظر گرفته شد و در روش تزریقی به میزان ۶۰ میکرولیتر به هر میگو تزریق شد و در روش حمامی به میزان ۴ میلی لیتر در هر ۴۰ لیتر آب اضافه گردید. همچنین در گروه دیگری از میگوها باکتری ویبریرو پاراهمولیتیکوس با تیتر 10^9CFU/mL به صورت لیوفیلیزه و در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سالین (PBS) استریل حل شده و به نسبت ۱:۱ با واکسن-الکترون مخلوط و به میزان ۶۰ میکرو لیتر به هر میگو تزریق شد. میزان باکتری برای هر میگو 3×10^6 CFU می باشد. در روش حمامی هم مطابق قبل از مخلوط باکتری ویبریو پرتوتابی شده و واکسن-الکترون به میزان ۴ میلی لیتر در هر ۴۰ لیتر آب اضافه گردید. در اینجا باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس که به روش پرتوتابی گاما غیرفعال شده بود به عنوان یک محرک ایمنی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۵ واکسیناسیون گروه های میگو:

پس از غیرفعال سازی ویروس با پرتوی الکترون واکسنهای غیرفعال شده در حالت منجمد به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شدند. شش گروه میگو بالغ ده گرمی انتخاب شد هر گروه حاوی ۱۰-۱۲ عدد میگو بود. به گروه اول واکسن-الکترون که حاوی سوسپانسیون ویروس سندرم لکه سفید پرتوتابی شده به روش بیم الکترون بود به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. به گروه دوم واکسن-الکترون همراه با باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده و به گروه سوم فقط باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده به تنهایی و به صورت داخل عضلانی به عنوان محرک ایمنی تزریق گردیدند. میزان تزریق هر واکسن به هر میگو ۶۰ میکرولیتر و در دو دز به فاصله دو هفته در میان انجام شد. هر سه گروه میگوهای واکسینه شده به روش تزریقی تا دو هفته بعد از دومین تزریق نگهداری و تلفات شمارش و جمع آوری گردید.. همچنین سه گروه میگوها تحت تیمار با همین واکسنها ولی به روش حمامی قرار گرفتند. میزان تلقیح واکسن به روش حمامی ۴ میلی لیتر واکسن در هر ۴۰ لیتر آب بود. گروههای حمامی در طی مدت ۱۰ روز مورد بازرسی قرار گرفتن و هیچ تلفاتی در هیچ کدام

[3] *V. paraheomolyticus*

مقالات آماده انتشار

از گروههای حمامی دیده نشد. لذا غیرفعال سازی ویروس مجدداً نیز مورد تایید قرارگرفت.

۲-۶ آزمون مواجهه با ویروس زنده و ارزیابی اثر حفاظتی واکسن:

در این آزمون ویروس فعال سندرم لکه سفید میگو با تیتر مشخص LD_{50}/ml $10^{5/4}$ که در بدن خرچنگ دراز تکثیر یافته بود مورد استفاده قرار گرفت. مواجهه با ویروس زنده در دو هفته پس از واکسیناسیون انجام شد. ویروس فعال با رقت ۱/۲۰ با تیتر $LD_{50}/50\ \mu l$ $10^{3/4}$ در بافر TN استریل مخلوط شده و به صورت داخل عضلانی به هر میگو میزان ۵۰ میکرولیتر تزریق گردید. به گروه کنترل مثبت به همان میزان ویروس زنده تزریق شد البته این گروه هیچ واکسنی دریافت نکرده بود. در گروه های واکسینه شده و گروه کنترل مثبت به روش حمامی، مواجهه با ویروس زنده نیز با همان رقت ویروسی ۱/۲۰ ولی به میزان ۴ میلی لیتر به صورت حمامی انجام شد و تلفات تا دو هفته بعد از مواجهه بررسی شدند و درصد بقا در هر گروه محاسبه گردید.

۲-۷ ارزیابی درصد بقا نسبی:

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

$$\text{درصد تلفات نسبی} = \frac{\text{تلفات گروه تیمار شده}}{\text{تلفات گروه کنترل شده}} \times 100$$

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

۲-۸ آنالیز آماری:

داده های در دزهای مختلف آزمایشی به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه در نرم افزار SPSS16 تحلیل و برای مقایسه ی میانگین ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی دار $p<0.05$ استفاده شد. همچنین برای رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده شد.

۳.نتایج

نتیجه آزمون PCR نمونه های میگو عفونی شده با وروس لکه سفید در شکل ۱ مشاهده می شود.

۳-۱- نتیجه تعیین دز بهینه الکترون جهت غیرفعال سازی کامل ویروس سندرم لکه سفید:

دز کشنده ۵۰ درصد (LD_{50}) استوک ویروسی زنده به روش کربر محاسبه شد، [۲۵] که حدود $10^{5/4}$ در میلی لیتر بدست آمد، دز کشنده ۵۰ درصد نمونه های ویروسی پرتوتابی شده توسط الکترون به روش کربر نیز محاسبه گردید که نتایج آن کاهش تدریجی تیتر ویروسی با افزایش دز پرتوتابی الکترون را نشان می دهد [۴۰]. در شکل۲ منحنی دز/ پاسخ نمونه های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون مشاهده می شود. مطابق با خط منطبق شده بر روی منحنی، تیتراسیون ویروس همراه با افزایش دز پرتوتابی کم کم کاهش می یابد. همچنین فاکتور D_{10} (دز پرتوتابی الکترون که ۹۰٪ تیتر ویروسی را کاهش می دهد.) حدود ۲/۰۷ کیلوگری محاسبه شد. دز بهینه الکترون برای غیرفعال سازی کامل ویروس لکه سفید با تیتر $10^{5/4}$ در میلی لیتر ۱۳ کیلوگری بدست آمد [۴۰].

۳-۲- نتیجه غیرفعال سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس به روش لیوفیلیزه:

با توجه به نتایج (جدول ۱) بهترین دز غیرفعال سازی کامل باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در حالت لیوفیلیزه ۸ کیلوگری بدست آمد.

۳-۳- نتیجه دز حفاظتی ۵۰٪ حاصل از آزمون مواجهه با ویروس غیر فعال شده با پرتوتابی الکترون :

با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو الکترون می توان

مقالات آماده انتشار

نتیجه گرفت که واکسن تهیه شده در مقابل ویروس فعال با تیتر $10^{2/4}$ LD_{50} / 50 µl اثر حفاظتی خوبی دارند. نتایج آزمون مواجهه دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون به صورت دز حفاظتی ۵۰ (PD_{50}) برای رادیوواکسن الکترون، رادیوواکسن الکترون همراه با باکتری غیرفعال شده به روش پرتوتابی به ترتیب ۵/۶۲ و ۶/۳۰ محاسبه گردید. با توجه نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD_{50}) بدست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو الکترون اثر حفاظتی این رادیو واکسن وقتی از باکتری ویبریو غیرفعال شده به عنوان یک محرک ایمنی همزمان با تزریق رادیو واکسن استفاده شده، بیشتر از وقتی است که رادیوواکسن بدون باکتری ویبریو مورد استفاده قرار گیرد.

۴-۳- تعیین درصد تلفات و درصد نسبی بقا در گروه-های میگو واکسینه شده به روش تزریقی وحمامی:

طبق نتایج جدول ۲ مقاومت علیه عفونت ویروس لکه سفید در میگو با استفاده از رادیوواکسن الکترون به تنهایی و رادیوواکسن الکترون همراه با باکتری ویبریو غیرفعال شده بعد از آزمون مواجهه اول به روش تزریقی و حمامی اختلاف معنی داری را با میزان بقای میگوهای گروه کنترل مثبت (کنترل ویروس) پس از انجام مواجهه با ویروس زنده نشان می دهد ($P<0.05$) .

۴.نتیجه وبحث

قابل توجه است که کاربرد مواد شیمیایی مختلف به منظور غیرفعال سازی باکتری ها بسیار متداول است [۲۶-۲۸]. اما از آنجایی که در استفاده از این مواد به جا ماندن باقیمانده در محصول نهایی و بعضاً مقاومت برخی عوامل بیماری زا در برابر ماده غیرفعال کننده وجود دارد و همچنین سمی بودن برخی از مواد شیمیایی غیرفعال کننده موجب شد که محققین به دنبال روش های مطمئن تری باشند. لذا امروزه توجه به کاربرد روش های هسته ای (پرتوهای یونساز) برای غیرفعال سازی ارگانیسم ها و در نهایت تولید رادیوواکسن های باکتریایی و ویروسی به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است. پرتوهای یونساز دارای انرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشندگی شدید می باشند. اما در هیچ شرایطی در محصول نهایی باقیمانده ای به جا نمی گذارند. همچنین امکان فرار ارگانیسم ها نیز در استفاده از این روش منفی می باشد [۲۹]. تنها اشکال استفاده از این روش اثر پرتوهای یون ساز از جمله پرتو گاما بر مولکول های آب موجود در محیط نگهدارنده ارگانیسم می باشد. اثر پرتو بر مولکول های آب موجب تولید رادیکال های آزاد می گردد که دارای اثرات مخربی بر آنتی ژن های واکسن می باشند[۳۰-۳۳]. بنابراین بهتر آن است که برای حفظ خاصیت آنتی ژنسیتی ارگانیسم را به صورت پودر لیوفیلیزه و یا منجمد به کار برد که با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه و مطالعه حیدری و همکاران (۲۰۱۶) می توان بیان داشت که دز غیرفعال سازی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در حالت لیوفیلیزه نسبت به کشت تازه باکتری افزایش یافته و حداقل دز غیرفعال سازی باکتری با غلظت $1/5\times10^{10}$ عدد باکتری در میلی لیتر با پرتو گاما در حالت لیوفیلیزه ۸ و به صورت کشت تازه ۴ کیلوگری می باشد [۳۹]. که با توجه به موارد فوق الذکر علیرغم مدت طولانی تر غیرفعال سازی باکتری، روش لیوفیلیزه بهتر از روش کشت تازه به منظور تهیه رادیوآنتی ژن باکتری می باشد. تهیه و تولید واکسن های غیرفعال از طریق تیمار باکتری ها و ویروس های بیماری زا با پرتوهای یون ساز گزارش شده است. پرتوهای ایکس و گاما با خواص الکترومغناطیسی، طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد، بدون ایجاد خواص رادیواکتیو به منظور غیرفعال سازی میکروارگانیسم ها استفاده می شوند. مطالعه ویروسهای حیوانی نشان داده که عفونت زائی ویروس ها ممکن است به طور انتخابی توسط پرتوتابی تخریب گردد ولی خواص آنتی ژنیک آنها می تواند دست نخورده باقی بماند [۳۴]. پرتوتابی ویروس ها با پرتوهای یون ساز توسط محققینی از جمله: پولارد[۳۵] ، گینوزا [۳۶]مطالعه شده است. اسمولکو و لمباردو در سال ۲۰۰۵ از روش پرتوتابی گاما برای غیرفعال سازی نسبی و کامل ویروس تب برفکی، راچر لوکمیا ویروس و هرپس سیمپلک ویروس استفاده نمودند [۳۰, ۳۷]. همچنین معتمدی و همکاران در مورد واکسن غیرفعال بیماری تب برفکی تایپ A87/IRN

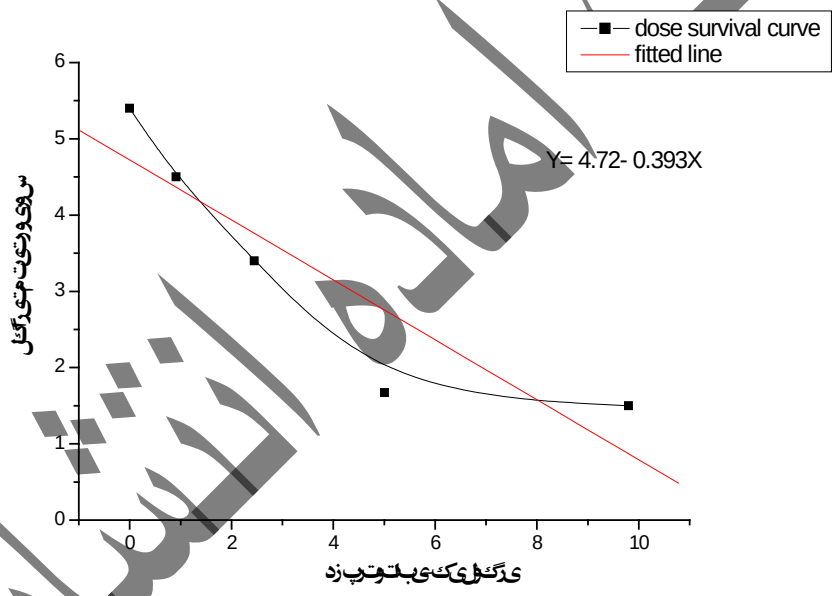
مقالات آماده انتشار

بدون تغییر خواص آنتی ژنیکی آن به روش پرتوتابی گاما مطالعاتی انجام دادند [۲۴]. نامیکاشی و همکارانش ویروس لکه سفید میگو را توسط فرمالین (۰/۵٪) غیرفعال نموده و به عنوان واکسن غیرفعال شده استفاده کردند، همچنین ویروس WSSV غیرفعال شده با حرارت C ° ۶۰ به مدت ۱۰ دقیقه را برای تهیه واکسن غیرفعال شده بکار بردند[۲۳]. پرس و همکارانش در سال ۱۹۹۷ سه مدل ویروسی متفاوت (پارووویروس خوکی، اینتروویروس خوکی و ویروس عامل اسهال گاوی) را توسط بیم الکترون پرتوتابی نمودند. آنها گزارش کردند که فاکتور D_{10} نمونه های ویروسی پرتوتابی شده در حالت مایع بین ۵۱ تا ۶۹ درصد ارزش آن در حالت منجمد می باشد، این بدین معنی است که دز بالاتر پرتو برای غیر فعال سازی همان مقدار ویروس وقتی در حالت منجمد باشد لازم است [۳۸]. واکسیناسیون گروههای میگو ۸-۱۰ گرمی با واکسنهای : ۱. ویروس سندروم لکه سفید میگو پرتوتابی شده با بیم الکترون به تنهایی ۲. ویروس سندروم لکه سفید میگو پرتوتابی شده با بیم الکترون همراه با باکتری ویبریو پرتوتابی شده ۳. باکتری ویبریو پرتوتابی شده به تنهایی (کنترا باکتری) ۴. گروه کنترل ویروس ۵. گروه کنترل باکتری پرتوتابی شده در دو دز به فاصله زمانی دو هفته یکبار به روش تزریقی و حمامی انجام شد. آزمون مواجهه میگوهای واکسینه شده با ویروس زنده در زمان دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون نشان داد دز حفاظتی ۵۰٪ همچنین درصد بقا نسبت به گروههای کنترل منفی موید اثر حفاظتی واکسن الکترون و باکتری ویبریو پرتوتابی شده و اثر ترکیبی حفاظتی این دو با هم بود. لذا نتیجه گیری می شود که باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده می تواند به عنوان یک محرک ایمنی اثر حفاظتی واکسن-الکترون را در میگوها تقویت نماید. همچنین درصد بقا نسبی در گروه های واکسینه شده به روش تزریقی و حمامی اختلاف معنی داری با هم ندارند لذا هر دو روش برای واکسیناسیون مناسب می باشند. ولی از آنجائیکه روش حمامی سهولت اجرا بیشتری دارد لذا روش حمامی در عمل امکان پذیرتر می باشد.

مقالات آماده انتشار

جدول ۱. میانگین نتایج رشد باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده با دزهای مختلف در حالت لیوفیلیزه

دز پرتوتابی (کیلوگری)/ تکرار	تکرار ۱	تکرار۲	تکرار	میانگین ± انحراف معیار
۰	۲,۳× ۱۰ ۱۰	۳,۳× ۱۰ ۱۰	۲,۵× ۱۰ ۱۰	۲,۷× ۱۰ ۱۰± ۰,۳۵×۱۰۱۰
۱	۱,۸× ۱۰ ۹	۰,۸× ۱۰ ۹	۰,۷× ۱۰ ۹	۱,۱× ۱۰ ۹±۰,۶۱×۱۰۹
۲	۱,۲× ۱۰ ۸	۱,۱× ۱۰ ۸	۰,۷× ۱۰ ۸	۱× ۱۰ ۸±۰,۲۶×۱۰۸
۳	۷× ۱۰ ۷	۹× ۱۰ ۷	۹,۵× ۱۰ ۷	۸,۵× ۱۰ ۷±۱,۳×۱۰۷
۴	۵,۷× ۱۰ ۶	۹× ۱۰ ۶	۴,۱× ۱۰ ۶	۶,۳× ۱۰ ۶±۲,۵×۱۰۶
۵	۵,۲× ۱۰ ۵	.۸× ۱۰ ۵	۴,۱× ۱۰ ۵	۵,۷× ۱۰ ۵±۲×۱۰۵
۶	۴,۹× ۱۰ ۴	.۶×۱۰۴	۳,۱,۱× ۱۰ ۴	۴,۶× ۱۰ ۴±۲×۱۰۴
۷	۵,۹× ۱۰ ۲	۳,۸×۱۰۲	۶,۱,۱× ۱۰ ۲	۴,۶× ۱۰ ۲±۲×۱۰۲
۸	۰× ۱۰ ۱	۰× ۱۰ ۱	۰× ۱۰ ۱	۰× ۱۰ ۱



شکل۱. منحنی دز/پاسخ مربوط به کاهش تیتر ویروس سندرم لکه سفید با افزایش دز پرتوتابی الکترون

مقالات آماده انتشار

جدول ۲: مقایسه درصد بقا نسبی در گروه میگو ایمن شده با واکسن الکترون علیه ویروس سندرم لکه سفید و گروه میگو ایمن شده با واکسن الکترون همراه با باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده به روش تزریقی و حمامی در زمان دو هفته پس از مواجهه با ویروس زنده

ردیف	گروههای واکسن	روش واکسیناسیون	دز واکسن	تعداد کل/تعداد تلفات	درصد تلفات	درصد بقاء	درصد نسبی بقاء	P-Value
۱	واکسن-الکترون	تزریقی	۶۰ میکرولیتر	۳/۱۲	۲۵	۷۵	٪۶۷	<۰/۰۵
۲	مخلوط (واکسن الکترون+ویبریو)	تزریقی	۶۰ میکرولیتر	۲/۱۲	۱۷	۸۳	٪۷۸	<۰/۰۵
۳	کنترل ویروس پرتوتابی شده	تزریقی	۶۰ میکرولیتر	۹/۱۲	۷۵	۲۵	-	
۴	کنترل باکتری غیرفعال شده	تزریقی	۶۰ میکرولیتر	۷/۱۲	۵۸/۳۳	۴۱/۲۷	٪۲۲/۲۳	
۵	واکسن-الکترون	حمامی	۴ میلی لیتر در ۴۰ لیتر آب	۲/۱۰	۲۰	۸۰	٪۷۵	<۰/۰۵
۶	مخلوط (واکسن الکترون+ویبریو)	حمامی	۴ میلی لیتر در ۴۰ لیتر آب	۱/۱۰	۱۰	۹۰	٪۸۵/۷۱	<۰/۰۵
۷	کنترل ویروس پرتوتابی شده	حمامی	۴ میلی لیتر در ۴۰ لیتر آب	۸/۱۰	۸۰	۲۰		
۸	کنترل باکتری غیرفعال شده	حمامی	۴ میلی لیتر در ۴۰ لیتر آب	۷/۱۰	۷۰	۳۰	٪۱۲/۵	

مقالات آماده انتشار

References:

[1] Sánchez-Martínez, J.G., G. Aguirre- Guzmán, and H. Mejía- Ruíz, *White spot syndrome virus in cultured shrimp: a review.* Aquaculture research, 2007. **38**(13): p. 1339-1354.

[2] Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the United States.* Emerging infectious diseases, 1999. **5**(5): p. 607.

[3] Beuchat, L., *Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of Vibrio parahaemolyticus.* Applied Microbiology, 1974. **27**(6): p. 1075-1080.

[4] Pruzzo, C., et al., *Pathogenic Vibrio species in the marine and estuarine environment,* in *Oceans and health: pathogens in the marine environment.* 2005, Springer. p. 217-252.

[5] Wong, H.-C., et al., *Incidence of highly genetically diversified Vibrio parahaemolyticus in seafood imported from Asian countries.* International journal of food microbiology, 1999. **52**(3): p. 181-188.

[6] AKHOUNDZADEH, B.A., et al., *The study of Vibrio SPP. In cultivated (Paeneus Indicus) and marine (Paeneus Semisulcatus) shrimp obtained from Boushehr a southern province of Iran.* 2007.

[7] Chen, D. and P. Hanna, *Immunodetection of specific Vibrio bacteria attaching to tissues of the giant tiger prawn Penaeus monodon.* Diseases of aquatic organisms, 1994. **20**(2): p. 159-162.

[8] Nash, G., *Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand.* Diseases in Asian aquaculture, 1992: p. 143-155.

[9] Alsharifi, M. and A. Müllbacher, *The [gamma]-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general.* Immunology and cell biology, 2010. **88**(2): p. .١٠٣

[10] Raie Jadidi, B., H. Erfan-Niya, and A. Ameghi, *Optimizing the process of inactivating influenza virus subtype H9N2 by formalin in the production of killed avian influenza vaccine.* Archives of Razi Institute, 2017. **72**(1): p. 43-49.

[11] Alsharifi, M., et al., *Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H5N1 avian influenza infections.* PloS one, 2009. **4**(4): p. e5336.

[12] Hume, A.J., et al., *Inactivation of RNA viruses by gamma irradiation: a study on mitigating factors.* Viruses, 2016. **8**(7 :(p. 204.

[13] Javan, S., et al., *Evaluation of immune responses and histopathological effects against gamma irradiated avian influenza (Sub type H9N2) vaccine on broiler chicken.* Brazilian Archives of Biology and Technology, 2020. **63**.

[14] Motamedi Sedeh, F., et al., *Improved Whole Gamma Irradiated Avian Influenza Subtype H9N2 Virus Vaccine Using Trehalose and Optimization of Vaccination Regime on Broiler Chicken.* Frontiers in Veterinary Science, 2022: p. 978.

[15] Motamedi-sedeh, F., et al., *Carboxymethyl chitosan bounded iron oxide nanoparticles and gamma-irradiated avian influenza subtype H9N2 vaccine to development of immunity on mouse and chicken.* Veterinary Medicine and Science, 2022. **8**(2): p. 626-634.

[16] Afsharnasab, M., et al., *Incidence of white spot disease (WSD) in Penaeus indicus Farms in Bushehr province, Iran.* 2007.

[17] Afsharnasab, M., et al., *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, 2009. **4**(6): p. 297-305.

[18] Du, H., et al., *Increased resistance to white spot syndrome virus in Procambarus clarkii by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus.* Aquaculture, 2006. **260**(1-4): p. 39-43.
[19] Heidareh, M., et al., *White spot syndrome virus inactivation study by using gamma irradiation.* Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014. **32**(5): p. 1024-1028.
[20] Motamedi Sedeh, F., et al., *Titration of the Iranian White Spot Virus isolate, on Crayfish Astacus leptodactylus and Penaeus semisulcatus.* Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2012. **11**(1): p. 145-155.
[21] van Hulten, M.C., et al., *White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp.* Virology, 2001. **285**(2): p. 228-233.
[22] Witteveldt, J., et al., *Protection of Penaeus monodon against white spot syndrome virus by oral vaccination.* Journal of virology, 2004. **78**(4): p. 2057-2061.
[23] Namikoshi, A., et al., *Vaccination trials with Penaeus japonicus to induce resistance to white spot syndrome virus.* Aquaculture, 2004. **229**(1-4): p. 25-35.
[24] Sedeh, F.M., et al., *Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig.* Indian journal of microbiology, 2008. **48**(3): p. 326-330.
[25] Karber, G., *Foot and Mouth Disease, Karber Formula for calculation of virus/antibody titres.* OIEA. Manual., Overview, 2002.
[26] Bahnemann, H., *Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production.* Archives of virology, 1975. **47**(1): p. 47-56.
[27] Bahnemann, H.G., *Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine.* Vaccine, 1990. **8**(4): p. 299-303.
[28] Brown, F., et al., *The use of acetylethyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines.* Epidemiology & Infection, 1963. **61**(3): p. 337-344.
[29] Grieb, T., et al., *Effective use of gamma irradiation for pathogen inactivation of monoclonal antibody preparations.* Biologicals, 2002. **30**(3): p. 207-216.
[30] Lombardo, J. and E. Smolko, *A biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 ci.* International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry, 1990. **35**(4-6): p. 585-589.
[31] Polley, J.R., *Factors influencing inactivation of infectivity and hemagglutinin of influenza virus by gamma radiation.* Canadian Journal of Microbiology, 1961. **7**(4): p. 535-541.
[32] Kaplan, C., *The antigenicity of γ-irradiated vaccinia virus.* Epidemiology & Infection, 1960. **58**(4): p. 391-398.
[33] Reitman, M. and H.R. Tribble Jr, *Inactivation of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus by γ-Radiation.* Applied Microbiology, 1967. **15**(6): p. 1456-1459.
[34] Reitman, M., H.R. Tribble Jr, and L. Green, *Gamma-irradiated Venezuelan equine encephalitis vaccines.* Applied Microbiology, 1970. **19**(5): p. 763-767.
[35] Pollard, E., *The action of ionizing radiation on viruses*, in *Advances in Virus Research*. 1954, Elsevier. p. 109-151.
[36] Ginoza, W., *Inactivation of viruses by ionizing radiation and by heat.* Methods in virology, 1968. **4**: p. 139-209.
[37] Smolko, E.E. and J.H. Lombardo, *Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation.* Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2005. **236**(1-4): p. 249-253.

[38] Preuss, T., et al., *Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum.* Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 1997. **4**(5): p. 504-508.

[39] Heidarieh. M, Motamedi-Sedeh. F, Soltani. M, Afsharnasab. M, Rajabifar. S. Immunization of Shrimp by Irradiated Vibrio Paraheamolyticus Against White Spot Syndrome Virus. J of Nucl Sci and Tech. 75, 2016, 72-79.

[40] Motamedi-Sedeh, F., Afsharnasab, M., Heidarieh, M., Tahami, S.M. Protection of Litopenaeus vannamei against white spot syndrome virus by electron-irradiated inactivated vaccine and prebiotic immunogen. Radiation Physics and Chemistry, 2017, 130: 421–425.

[41]

مقالات آماده انتشار