



## اثر حفاظتی ترکیبی ویبریو پاره‌مولیتیکوس غیرفعال و ویروس سندروم لکه سفید پرتوتابی شده بر میگو وانامی به دو روش تزریقی و حمامی

فرحناز معتمدی سده\*، رضا روشن

پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، صندوق پستی: ۱۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج- ایران

\*Email: fmotamedi@aeoi.org.ir

مقاله‌ی پژوهشی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۱۰

### چکیده

ویروس سندرم لکه سفید یکی از عوامل عفونت‌زای مهم میگو می‌باشد. در این تحقیق، از نمونه‌های میگو عفونی و جمع‌آوری شده از مزارع میگو استان بوشهر، ویروس سندروم لکه سفید جداسازی و در همولف خرچنگ دراز تکثیر و از طریق آزمون PCR وجود ویروس تأیید گردید. تیتراسیون ویروس در پست لاروهای میگو به روش کربر  $LD_{50}/ml$   $10^{5.4}$  محاسبه و غیرفعال‌سازی با بیم الکترون انجام شد. ارزش  $D_{10}$  و دز مطلوب پرتو الکترون برای غیرفعال‌سازی این ویروس به ترتیب  $1.85$  و  $13$  کیلوگری به‌دست آمد. ویروس پرتوتابی شده با الکترون به عنوان واکسن- الکترون و باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده به عنوان محرک برای ایمن‌سازی میگو وانامی استفاده شدند. دز حفاظتی  $50$ ٪ برای گروه‌های دریافت‌کننده واکسن الکترون، واکسن الکترون همراه با باکتری ویبریو پرتوتابی شده و گروه دریافت‌کننده باکتری ویبریو پرتوتابی شده به تنهایی در روش تزریقی به ترتیب  $5.62$ ،  $6.30$  و  $2.87$  محاسبه شد. درصد بقا نسبی این سه گروه در روش تزریقی به ترتیب  $64$ ٪،  $72$ ٪ و  $22$ ٪ و در روش حمامی به ترتیب  $75$ ٪،  $85$ ٪ و  $12.5$ ٪ محاسبه شد. با توجه به نتایج آزمون مواجهه دو گروه  $1$  و  $2$  در مقابل ویروس زنده اثر حفاظتی خوبی نشان دادند. لذا نتیجه‌گیری می‌شود که باکتری ویبریو پاره‌مولیتیکوس پرتوتابی شده می‌تواند 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 معنی‌دار در درصد بقا نسبی مناسب می‌باشند.

**کلیدواژه‌ها:** میگو، ویروس سندرم لکه سفید، بیم الکترون، ویبریو پاره‌مولیتیکوس، واکسن

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

F. Motamedi Sedeh\*, R. Roshan

Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOL, P.O.Box: 31485-1498, Karaj - Iran

Research Article

Received 25.8.2022, Accepted 31.12.2022

### Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is one of shrimp and other crustaceans' most significant infectious agents. This research isolated WSSV from infected shrimp samples collected from Bushehr's farms. It was confirmed by PCR and multiplied in *Astacus leptodactylus* crayfish hemolymph. Titration of WSSV was obtained in postlarvae by the Karber method as  $10^{5.4}$  LD<sub>50</sub>/mL and the virus were inactivated by the electron beam irradiation. The electron beams D<sub>10</sub> value and optimum dose was obtained at 1.85 and 13 kGy. Electron beam irradiated WSSV (EBI-WSSV) was used as an electron vaccine to immunize *L. vannamei*. Gamma-irradiated inactivated *Vibrio Parahaemolyticus* (GIVP) was used as an immune stimulant. PD<sub>50</sub> was 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 three vaccine groups in immersion route, respectively. A 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 productivity responses in shrimp against WSSV infection and GIVP enhanced this response. The conclusion showed the irradiated *Vibrio Parahaemolyticus* can be used as an immune stimulator and can enhance 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 گونه‌های آبی‌پروری در کشور و جهان محسوب می‌شود. مهم‌ترین بیماری که موجب خسارت در صنعت تکثیر و پرورش میگو می‌شود بیماری ویروسی سندرم لکه سفید می‌باشد. این ویروس متعلق به خانواده نیماویریده<sup>۱</sup> و جنس ویسپوویروس<sup>۲</sup> بوده، میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری ۷۰-۱۰۰ درصد طی ۲-۷ روز بعد از ظهور علائم کلینیکی در مزارع میگو گزارش شده است. اولین بار در سال ۱۹۹۲ سه نوع از این ویروس در تایلند، تایوان و چین شناسایی شد و در سال 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 می‌باشد. این ویروس در طیف وسیعی از خانواده سخت‌پوستان آبی به صورت عمودی و افقی انتقال یافته و با نتایج مرگ و میر متنوعی آنها را آلوده می‌کند [۱]. بخش عمده‌ای از گونه‌های جنس ویبریو به طور معمول در محیط‌های آبی در مناطق گرم یا معتدل یافت شده و از آب، رسوبات، پالانکتون‌ها، انواع ماهیان، میگو، سخت‌پوستان و هم‌چنین صدف‌ها جداسازی شده‌اند [۲، ۳]. از بین ۱۲ گونه ویبریویی که مولد بیماری غذا زاد در انسان هستند، گزارشات فراوانی اهمیت بالاتر گونه‌های ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس را نشان داده‌اند [۲، ۳]. ویبریو پاراهمولیتیکوس نیز باکتری گرم منفی، تخمیرکننده بی‌هوازی و نمک‌دوست است قدرت تحمل نمک بالا در این باکتری سبب شده است که جز فلور میکروبی خلیج‌ها و آب‌های شور باشد [۴، ۵]. ویبریوپاراهمولیتیکوس یکی از جانداران عامل بیماری ویبریوزیس در میگو و یکی از عوامل بیماری‌زای مشترک آبیان و انسان است، به طوری که در انسان ایجاد گاستروانتریت می‌نماید [۶]. براساس یک گزارش، مهم‌ترین گونه‌های عامل بیماری ویبریوزیس در میگوی ببری سیاه ویبریوآلجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس و انگوئیلاروم معرفی شده است [۷، ۸]. واکنش‌های مهم‌ترین راهبرد کنترل و پیشگیری است. در برابر بیماری‌های ویروسی استفاده از پرتوهای یونیزان یک روش بسیار قابل اعتماد در غیرفعال‌سازی ویروس‌ها است. امروزه برای تولید واکسن‌های غیرفعال به روش‌های هسته‌ای (پرتوهای یون‌ساز) بسیار مورد توجه می‌باشند. زیرا این روش، کم‌ترین اثر زیان‌آور را بر ویژگی‌های آنتی ژنسیستی و بیش‌ترین اثر ایمن‌سازی را بر ذرات آنتی‌ژنی ریزجانداران دارد [۹]. به طور کلی، غیرفعال‌سازی ریزجانداران

در واکسن‌های 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 آنتی‌ژن‌های سطحی ناشی از ایجاد پیوندهای متقاطع در ساختار پروتئین‌ها، سبب از بین رفتن و یا کاهش اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی 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 بولا 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 آنتی‌ژنی 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 پروتئین‌های ساختمانی آن که موجب حفظ توانایی ویروس در القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و تحریک پاسخ‌های آنتی‌بادی ضدویروس می‌شود با استفاده از پرتوتابی ویروس با پرتو گاما گزارش شده است [۹، ۱۲-۱۵]. علاوه بر اثر تخریبی مستقیم پرتو بر مولکول‌های تشکیل‌دهنده ژنوم ویروس، اثرات غیرمستقیم پرتوهای یون‌ساز باعث یون‌سازی در مولکول‌های 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 واکسن‌ها باعث مسمومیت‌زایی یا واکنش‌های آلرژیک شوند [۱۲-۱۵]. بیش‌تر باکتری‌های نمک‌دوست خانواده ویبریو در اکثر آبیان قدرت رشد مثبت داشته و به عنوان محرک سیستم ایمنی در سخت‌پوستان استفاده می‌شوند. در این تحقیق از باکتری ویبریو

1. Nimaviridea
2. Wispovirus



استریل (Tris-HCl ۲۰ mM and NaCl ۴۰۰ mM, pH=۷٫۴) رقیق شدند. سریال رقت شامل  $۱۰^{-۴}$  و  $۱۰^{-۳}$ ،  $۱۰^{-۲}$ ،  $۱۰^{-۱}$ ، ۱ از ویروس تهیه و به هر گروه ۱۰ میکرولیتر 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 نمونه‌های ویروسی شاهد و پرتوتابی شده در دزهای مختلف به عنوان تیتروسی ویروس محاسبه گردید [۲۵]. سپس با استفاده از نرم‌افزار Origin نمودار دز/ پاسخ برای تیتراهای ویروسی به دست آمده در نمونه‌های پرتوتابی شده با دزهای مختلف الکترون ترسیم شد و با کمک معادله خط عبوری از نمودار ارزش  $D_{۱۰}$  (دزی از پرتوگاما که قادر به کاهش یک سیکل لگاریتمی از جمعیت میکروارگانیسیم‌هاست) و دز مطلوب غیرفعال‌سازی کامل این ویروس محاسبه شد.

## ۳.۲ آماده‌سازی باکتری و بیروپاراهمولیتیکوس و دزیمتری و پرتوتابی گاما باکتری

باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس<sup>۱</sup> با شناسه (ATCC: ۱۷۸۰۲) 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 ویال‌های ۵ میلی لیتری تقسیم شد. نمونه‌های 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 کیلوگری استفاده شدند. باکتری پرتوتابی شده و نشده برای تعیین عیار باکتری به روش تشکیل واحد کلونی در هر میلی‌لیتر (CFU) و سپس رسم نمودار دز/ پاسخ با استفاده از نرم‌افزار Origin<sup>۶/۱</sup> استفاده شد. دز مناسب غیرفعال‌سازی و ارزش  $D_{۱۰}$  با کمک این نمودار و معادله بهترین خط عبوری از نمودار دز/ پاسخ محاسبه شدند. این باکتری پرتوتابی شده به عنوان یک محرک ایمنی برای تحریک سیستم ایمنی استفاده شد [۲۶].

## ۴.۲ 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

پاراهمولیتیکوس که از عوامل بیماری‌زای میگو می‌باشد و به روش پرتوتابی گاما غیرفعال‌سازی شده است استفاده شده است. هدف از این تحقیق بررسی اثر پرتوی یون‌ساز الکترون بر کاهش خاصیت عفونت‌زایی 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 می‌باشد.

## ۲. مواد و روش کار

### ۲.۱ آماده‌سازی استوک ویروس سندروم لکه سفید

میگوهای مشکوک به بیماری سندرم لکه سفید از مزرعه پرورشی در استان بوشهر جمع‌آوری شد. برای تأیید عفونت ویروسی از روش nested PCR براساس راهنمای کیت تشخیصی تجاری (IQ2000 TM Taiwan) استفاده شد [۱۶، ۱۷]. سوسپانسیون ویروسی که 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 ویروس‌ها از همولف خرچنگ از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون استفاده شد. استوک ویروس سندرم لکه سفید تهیه شده در ایران را WSSV/IRN/۱/۲۰۱۰ نام‌گذاری شد [۱۸-۲۲].

### ۲.۲ دزیمتری، پرتوتابی الکترون ویروس و تیتراسیون نمونه‌های ویروس پرتوتابی شده و نشده

برای پرتوتابی الکترون در این پروژه از سیستم پرتودهنده الکترون در پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، مرکز یزد استفاده شد. این سیستم یک شتاب‌دهنده الکترون ساخت شرکت IBA مدل Rodotron TT۲۰۰ با انرژی ۱۰ Mev و جریان ۲ میلی‌آمپر بود. دزیمتری با استفاده از دزیمترهای FWT و CTA انجام شد. نمونه‌های همولف خرچنگ‌های آلوده به ویروس را پس از سانترفیوژ با دور  $(۵۰ \times g)$ ،  $۴^{\circ}C$  و ۱۰ دقیقه در ویال‌های ۳ میلی‌لیتری تقسیم و در فریزر  $-۷۰^{\circ}C$  نگهداری شدند. همولف خرچنگ‌ها را در شرایط انجماد همراه با یخ خشک برای پرتودهی به یزد فرستاده و با دزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ کیلوگری پرتوتابی شده و مجدداً جهت تأیید غیرفعال‌سازی بر روی میگو و تعیین دز کشنده ۵۰٪ ( $LD_{50}$ ) به فریزر  $-۷۰^{\circ}C$  منتقل گردید. تعداد ۴۵ گروه پست لارو میگو ۱ تا ۲ گرمی که هر گروه شامل ۱۲ پست لارو انتخاب شدند و هر نمونه از ویروس پرتوتابی شده و نشده در بافر TN



تیتراژ  $LD_{50}/50 \mu l$  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 واکنشی دریافت نکرده بود. در گروه‌های واکنش دیده شده و گروه کنترل مثبت به روش حمامی، مواجهه با ویروس زنده نیز با همان رقت ویروسی  $1/20$  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.

#### ۷.۲ ارزیابی درصد بقا نسبی

با توجه به درصد تلفات بعد از آزمون مواجهه اول در هر گروه میگو واکنش دیده شده می‌توان درصد بقا نسبی را در هر گروه تعیین کرد.

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

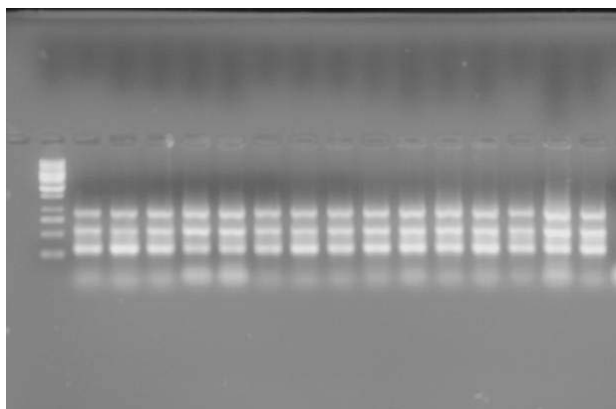
$$100 - \text{درصد تلفات نسبی} = \text{درصد بقای نسبی}$$

#### ۸.۲ آنالیز آماری

داده‌های در دزهای مختلف آزمایشی به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه در نرم‌افزار SPSS ۱۶ تحلیل و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح معنی‌دار  $p < 0.05$  استفاده شد. همچنین برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

#### ۳. نتایج

نتیجه آزمون PCR نمونه‌های میگو عفونی شده با ویروس لکه سفید در شکل ۱ مشاهده می‌شود.



شکل ۱. نتایج آزمون PCR نمونه‌های میگو عفونی شده با ویروس لکه سفید (از چپ به راست  $10000-250$  bp DNA ladder و تعداد ۱۵ نمونه میگو عفونی شده با ویروس لکه سفید).

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 ویبریو پاراهمولیتیکوس با تیتراژ  $10^9$  CFU/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  $3 \times 10^6$  CFU می‌باشد. در روش حمامی هم مطابق قبل از مخلوط باکتری ویبریو پرتوتایی شده و واکسن-الکترون به میزان ۴ میلی لیتر در هر ۴۰ لیتر آب اضافه گردید. در این‌جا باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس که به روش پرتوتایی گاما غیرفعال شده بود به عنوان یک محرک ایمنی مورد استفاده قرار گرفت.

#### ۵.۲ واکنش‌های گروه‌های میگو

پس از غیرفعال‌سازی ویروس با پرتوی الکترون واکسن‌های غیرفعال شده در حالت منجمد به پژوهشکده میگو بوشهر منتقل شدند. شش گروه میگو بالغ ۱۰ گرمی انتخاب شد هر گروه حاوی ۱۰-۱۲ عدد میگو بود. به گروه اول واکسن-الکترون که حاوی سوسپانسیون ویروس سندرم لکه سفید پرتوتایی شده به روش بیم الکترون بود به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. به گروه دوم واکسن-الکترون همراه با باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتایی شده و به گروه سوم فقط باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتایی 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 واکنش دیده شده به روش تزریقی تا دو هفته بعد از دومین تزریق نگاه‌داری و تلفات شمارش و جمع‌آوری 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 از گروه‌های حمامی دیده نشد. لذا غیرفعال‌سازی ویروس مجدداً نیز مورد تأیید قرار گرفت.

#### ۶.۲ آزمون مواجهه با ویروس زنده و ارزیابی اثر حفاظتی واکسن

در این آزمون ویروس فعال سندرم لکه سفید میگو با تیتراژ 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 واکنش‌یابی انجام شد. ویروس فعال با رقت  $1/20$  با

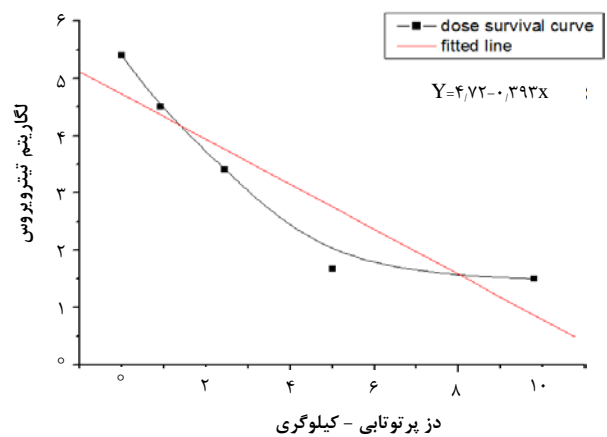


۲.۳ نتیجه غیرفعال سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس به روش لیوفیلیزه  
با توجه به نتایج (جدول ۱) بهترین دز غیرفعال سازی کامل باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس در حالت لیوفیلیزه ۸ کیلوگری به دست آمد.

۳.۳ نتیجه دز حفاظتی ۵۰٪ حاصل از آزمون مواجهه با ویروس غیرفعال شده با پرتوتابی الکترون  
با توجه به نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD<sub>۵۰</sub>) به دست آمده در مورد رادیو واکسن غیرفعال شده با پرتو الکترون می توان نتیجه گرفت که واکسن تهیه شده در مقابل ویروس فعال با تیتراژ  $LD_{۵۰}/۵۰ \mu l$  اثر حفاظتی خوبی دارند. نتایج آزمون مواجهه دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون به صورت دز حفاظتی ۵۰٪ (PD<sub>۵۰</sub>) برای رادیوواکسن الکترون، رادیوواکسن الکترون همراه با باکتری غیرفعال شده به روش پرتوتابی به ترتیب ۵/۶۲ و ۶/۳۰ محاسبه گردید. با توجه به نتایج دز حفاظتی ۵۰٪ (PD<sub>۵۰</sub>) به دست 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، بیش تر 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 و حمامی  
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 ( $P < 0.05$ ).

۱.۳ نتیجه تعیین دز بهینه الکترون جهت غیرفعال سازی کامل ویروس سندرم لکه سفید  
دز کشنده ۵۰ درصد (LD<sub>۵۰</sub>) استوک ویروسی زنده به روش کربر محاسبه شد [۲۵]، که حدود  $10^{5.4}$  در میلی لیتر به دست آمد، دز کشنده ۵۰ درصد نمونه های ویروسی پرتوتابی شده توسط الکترون به روش کربر نیز محاسبه گردید که نتایج آن کاهش تدریجی تیتراژ ویروسی با افزایش دز پرتوتابی الکترون را نشان می دهد [۲۷]. در شکل ۲ منحنی دز/ پاسخ نمونه های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون مشاهده می شود. مطابق با خط منطبق شده بر روی منحنی، تیتراژ ویروس همراه با افزایش دز پرتوتابی کم کم کاهش می یابد. هم چنین فاکتور D<sub>۱۰</sub> (دز پرتوتابی الکترون که ۹۰٪ تیتراژ ویروسی را کاهش می دهد)، حدود ۲/۰۷ کیلوگری محاسبه شد. دز بهینه الکترون برای غیرفعال سازی کامل ویروس لکه سفید با تیتراژ  $10^{5.4}$  در میلی لیتر ۱۳ کیلوگری به دست آمد [۲۷].



شکل ۲. منحنی دز/ پاسخ مربوط به کاهش تیتراژ ویروس سندرم لکه سفید با افزایش دز پرتوتابی الکترون.

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

میانگین $\pm$ انحراف معیار	تکرار	تکرار ۲	تکرار ۱	دز پرتوتابی (کیلوگری) / تکرار
$2.7 \times 10^{10} \pm 0.35 \times 10^{10}$	$2.5 \times 10^{10}$	$3.3 \times 10^{10}$	$2.3 \times 10^{10}$	۰
$1.1 \times 10^9 \pm 0.61 \times 10^9$	$0.7 \times 10^9$	$0.8 \times 10^9$	$1.8 \times 10^9$	۱
$1 \times 10^8 \pm 0.26 \times 10^8$	$0.7 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	۲
$8.5 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$	$9.5 \times 10^7$	$9 \times 10^7$	$7 \times 10^7$	۳
$6.3 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	$9 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$	۴
$5.7 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$.8 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	۵
$4.6 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$	$.6 \times 10^4$	$4.9 \times 10^4$	۶
$4.6 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$	$6.1 \times 10^2$	$3.8 \times 10^2$	$5.9 \times 10^2$	۷
$0 \times 10^1$	$0 \times 10^1$	$0 \times 10^1$	$0 \times 10^1$	۸



**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 ویبریو پاراهمولیتیکوس 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	

#### ۴. نتیجه و بحث

قابل توجه است که کاربرد مواد شیمیایی مختلف به منظور غیرفعال سازی باکتری‌ها بسیار متداول است [۲۸-۳۰]. اما از آنجایی که در استفاده از این مواد به جا ماندن باقی مانده در محصول نهایی و بعضاً مقاومت برخی عوامل بیماری‌زا در برابر ماده غیرفعال کننده وجود دارد و همچنین سمی بودن برخی از مواد شیمیایی غیرفعال کننده موجب شد که محققین به دنبال روش‌های مطمئن‌تری باشند. لذا امروزه توجه به کاربرد روش‌های هسته‌ای (پرتوهای یون‌ساز) برای غیرفعال سازی ارگانسیم‌ها و در نهایت تولید رادیوواکسن‌های باکتریایی و ویروسی به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است. پرتوهای یون‌ساز دارای انرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشندگی شدید می‌باشند. اما در هیچ شرایطی در محصول نهایی باقی مانده‌ای به جا نمی‌گذارند. همچنین امکان فرار ارگانسیم‌ها نیز در استفاده از این روش منفی می‌باشد [۳۱]. تنها اشکال استفاده از این روش اثر پرتوهای یون‌ساز از جمله پرتو گاما بر مولکول‌های آب موجود در محیط نگه‌دارنده ارگانسیم می‌باشد. اثر پرتو بر مولکول‌های آب موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد که دارای اثرات مخربی بر آنتی‌ژن‌های واکسن می‌باشند [۳۲-۳۵]. بنابراین بهتر آن است که برای حفظ خاصیت آنتی‌ژنیتی ارگانسیم 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) می‌توان 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  $10^{10} \times 1/5$  عدد باکتری در میلی لیتر با پرتو گاما در حالت لیوفیلیزه ۸ و به صورت کشت تازه ۴ کیلوگری می‌باشد [۲۶]. که با توجه به موارد فوق‌الذکر علی‌رغم مدت طولانی‌تر غیرفعال سازی باکتری، روش لیوفیلیزه بهتر از روش کشت تازه به منظور تهیه رادیوآنتی‌ژن باکتری می‌باشد. تهیه و تولید واکسن‌های غیرفعال از طریق تیمار باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا با پرتوهای یون‌ساز 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 میکروارگانسیم‌ها استفاده می‌شوند. مطالعه ویروس‌های حیوانی نشان داده که عفونت‌زایی ویروس‌ها ممکن است به طور انتخابی توسط پرتوتابی تخریب گردد ولی خواص آنتی‌ژنیک آن‌ها می‌تواند دست نخورده باقی بماند [۳۶]. پرتوتابی ویروس‌ها با پرتوهای یون‌ساز توسط محققینی از جمله: پولارد [۳۷]، گینوزا [۳۸] مطالعه شده است. اسمولکو و لمباردو در سال ۲۰۰۵ از روش پرتوتابی گاما برای غیرفعال سازی نسبی و کامل ویروس تب برفکی، راچر لوکمی و ویروس و هرپس سیمپلک ویروس استفاده نمودند [۳۲، ۳۹]. هم‌چنین معتمدی و همکاران در مورد واکسن غیرفعال بیماری تب برفکی تایپ A۸۷/IRN بدون تغییر خواص آنتی‌ژنیک آن به روش پرتوتابی گاما مطالعاتی انجام دادند [۲۴]. نامیکاشی و همکارانش ویروس لکه سفید میگو را توسط فرمالین (۰/۰۵٪) غیرفعال نموده و به عنوان واکسن غیرفعال شده استفاده کردند، هم‌چنین ویروس



4. C. Pruzzo, et al., *Pathogenic Vibrio species in the marine and estuarine environment, in Oceans and health: pathogens in the marine environment*, Springer, 217-252 (2005).
5. H.-C. Wong, et al., *Incidence of highly genetically diversified Vibrio parahaemolyticus in seafood imported from Asian countries*, *International Journal of Food Microbiology*, **52(3)**, 181-188 (1999).
6. B.A. Akhoundzadeh, 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. D. Chen, P. Hanna, *Immunodetection of specific Vibrio bacteria attaching to tissues of the giant tiger prawn Penaeus monodon*, *Diseases of Aquatic Organisms*, **20(2)**, 159-162 (1994).
8. G. Nash, *Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand*, *Diseases in Asian Aquaculture*, 143-155 (1992).
9. M. Alsharifi, A. Müllbacher, *The [gamma]-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general*, *Immunology and Cell Biology*, **88(2)**, 103 (2010).
10. B. Raie Jadidi, H. Erfan-Niya, A. Ameghi, *Optimizing the process of inactivating influenza virus subtype H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> by formalin in the production of killed avian influenza vaccine*, *Archives of Razi Institute*, **72(1)**, 43-49 (2017).
11. M. Alsharifi, et al., *Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> avian influenza infections*, *PloS One*, **4(4)**, e5336 (2009).
12. A.J. Hume, et al., *Inactivation of RNA viruses by gamma irradiation: a study on mitigating factors*, *Viruses*, **8(7)**, 204 (2016).
13. S. Javan, et al., *Evaluation of immune responses and histopathological effects against gamma irradiated avian influenza (Sub type H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) vaccine on broiler chicken*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **63**, (2020).
14. F. Motamedi Sedeh, et al., *Improved Whole Gamma Irradiated Avian Influenza Subtype H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> Virus Vaccine Using Trehalose and Optimization of Vaccination Regime on Broiler Chicken*, *Frontiers in Veterinary Science*, 978 (2022).
15. F. Motamedi-Ssedeh, et al., *Carboxymethyl chitosan bounded iron oxide nanoparticles and gamma-irradiated avian influenza subtype H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> vaccine to development of immunity on mouse and chicken*, *Veterinary Medicine and Science*, **8(2)**, 626-634 (2022).
16. M. Afsharnasab, et al., *Incidence of white spot disease (WSD) in Penaeus indicus Farms in Bushehr province, Iran*, (2007).
17. M. Afsharnasab, et al., *Gross sign, histopathology and polymerase chain reaction observations of white spot syndrome virus in shrimp specific pathogen free Litopenaeus vannamei in Iran*, *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, **4(6)**, 297-305 (2009).

WSSV غیرفعال شده با حرارت °C ۶۰ به مدت ۱۰ دقیقه را برای تهیه واکسن غیرفعال شده به کار بردند [۲۳]. پرس و همکارانش در سال ۱۹۹۷ سه مدل ویروسی متفاوت (پاروویروس خوکی، اینتروویروس خوکی و ویروس عامل اسهال گاوی) را توسط بیم الکترون پرتوتابی نمودند. آن‌ها گزارش کردند که فاکتور D<sub>۱۰</sub> نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده در حالت مایع بین ۵۱ تا ۶۹ درصد ارزش آن در حالت منجمد می‌باشد، این بدین معنی است که دز بالاتر پرتو برای غیرفعال‌سازی همان مقدار ویروس وقتی در حالت منجمد باشد لازم است [۴۰].

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 مؤید اثر حفاظتی واکسن الکترون و باکتری ویبریو پرتوتابی شده و اثر ترکیبی حفاظتی این دو با هم بود. لذا نتیجه‌گیری می‌شود که باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس پرتوتابی شده می‌تواند به عنوان یک محرک ایمنی اثر حفاظتی واکسن- الکترون را در میگوها تقویت نماید. هم‌چنین درصد بقا نسبی در گروه‌های واکسینه شده به روش تزریقی و حمامی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند لذا هر دو روش برای واکسیناسیون مناسب می‌باشند. ولی از آنجایی که روش حمامی سهولت اجرا بیش‌تری دارد لذا روش حمامی در عمل امکان‌پذیرتر می‌باشد.

## مراجع

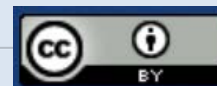
1. Sánchez-Martínez, J.G., G. Aguirre-Guzmán, H. Mejía-Ruíz, *White spot syndrome virus in cultured shrimp: a review*, *Aquaculture Research*, **38(13)**, 1339-1354 (2007).
2. P.S. Mead, et al., *Food-related illness and death in the United States*, *Emerging Infectious Diseases*, **5(5)**, 607 (1999).
3. L. Beuchat, *Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of Vibrio parahaemolyticus*, *Applied Microbiology*, **27(6)**, 1075-1080 (1974).



18. H. Du, et al., *Increased resistance to white spot syndrome virus in Procambarus clarkii by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus*, *Aquaculture*, **260(1-4)**, 39-43 (2006).
19. M. Heidareh, et al., *White spot syndrome virus inactivation study by using gamma irradiation*, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **32(5)**, 1024-1028 (2014).
20. F. Motamedi Sedeh, et al., *Titration of the Iranian White Spot Virus isolate, on Crayfish Astacus leptodactylus and Penaeus semisulcatus*, *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, **11(1)**, 145-155 (2012).
21. M.C. Van Hulst, et al., *White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp*, *Virology*, **285(2)**, 228-233 (2001).
22. J. Witteveldt, et al., *Protection of Penaeus monodon against white spot syndrome virus by oral vaccination*, *Journal of Virology*, **78(4)**, 2057-2061 (2004).
23. A. Namikoshi, et al., *Vaccination trials with Penaeus japonicus to induce resistance to white spot syndrome virus*, *Aquaculture*, **229(1-4)**, 25-35 (2004).
24. F.M. Sedeh, et al., *Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig*, *Indian Journal of Microbiology*, **48(3)**, 326-330 (2008).
25. G. Karber, *Foot and Mouth Disease, Karber Formula for calculation of virus/antibody titres, OIEA. Manual., Overview*, (2002).
26. M. Heidarieh, et al., *Immunization of Shrimp by Irradiated Vibrio Paraheamolyticus Against White Spot Syndrome Virus*, *J. of Nucl. Sci. and Tech.*, **75**, 72-79 (2016).
27. F. Motamedi-Sedeh, et al., *Protection of Litopenaeus vannamei against white spot syndrome virus by electron-irradiated inactivated vaccine and prebiotic immunogen*, *Radiation Physics and Chemistry*, **130**, 421-425 (2017).
28. H. Bahnemann, *Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production*, *Archives of Virology*, **47(1)**, 47-56 (1975).
29. H.G. Bahnemann, *Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine*, *Vaccine*, **8(4)**, 299-303 (1990).
30. F. Brown, et al., *The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines*, *Epidemiology & Infection*, **61(3)**, 337-344 (1963).
31. T. Grieb, et al., *Effective use of gamma irradiation for pathogen inactivation of monoclonal antibody preparations*, *Biologicals*, **30(3)**, 207-216 (2002).
32. J. Lombardo, 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*, **35(4-6)**, 585-589 (1990).
33. J.R. Polley, *Factors influencing inactivation of infectivity and hemagglutinin of influenza virus by gamma radiation*, *Canadian Journal of Microbiology*, **7(4)**, 535-541 (1961).
34. C. Kaplan, *The antigenicity of  $\gamma$ -irradiated vaccinia virus*, *Epidemiology & Infection*, **58(4)**, 391-398 (1960).
35. M. Reitman, H.R. Tribble Jr, *Inactivation of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus by  $\gamma$ -Radiation*, *Applied Microbiology*, **15(6)**, 1456-1459 (1967).
36. M. Reitman, H.R. Tribble Jr, L. Green, *Gamma-irradiated Venezuelan equine encephalitis vaccines*, *Applied Microbiology*, **19(5)**, 763-767 (1970).
37. E. Pollard, *The action of ionizing radiation on viruses*, in *Advances in Virus Research*, Elsevier, 109-151 (1954).
38. W. Ginoza, *Inactivation of viruses by ionizing radiation and by heat*, *Methods in Virology*, **4**, 139-209 (1968).
39. E.E. Smolko, 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*, **236(1-4)**, 249-253 (2005).
40. T. Preuss, et al., *Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum*, *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, **4(5)**, 504-508 (1997).

**COPYRIGHTS**

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.



استناد به این مقاله

فرحناز معتمدی سده، رضا روشن (۱۴۰۲)، اثر حفاظتی ترکیبی ویبریو پاراهمولیتیکوس غیرفعال و ویروس سندروم لکه سفید پرتوتایی شده بر میگو وانامی به دو روش تزریقی و حمامی، ۱۰۶، ۱۵۵-۱۶۲

DOI: 10.24200/nst.2022.1199.1780

Url: [https://jonsat.nstri.ir/article\\_1532.html](https://jonsat.nstri.ir/article_1532.html)

