J. of Nucl Sci. and Tech.
80, 2017, 89-94

مجله‌ی علوم و فنون هسته‌ای
۸۰، ۱۳۹۶، ۹۴-۸۹

مقایسه‌ی غیرفعال‌سازی ویروس سندرم لکه سفید میگو به روش پرتوتابی الکترون و تیمار با فرمالین

فرحناز معتمدی سده*[1]، محمد افشارنسب[2]، مرضیه حیدریه[1]
۱. پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج ـ ایران
۲. مؤسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی ایران، صندوق پستی: ۱۳۳-۱۵۷۴۵، تهران ـ ایران

چکیده: ویروس سندرم لکه سفید یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در صنعت پرورش میگو است. این ویروس نه تنها در میگو بلکه در سایر سخت‌پوستان وجود دارد. نمونه‌های میگوی عفونی از جنوب ایران جمع‌آوری، و از نظر وجود ویروس سندرم لکه سفید با استفاده از آزمون Nested PCR بررسی شدند. ویروس از میگوهای عفونی شده به روش سانتریفوژ و فیلتراسیون جداسازی، و در بدن خرچنگ دراز تکثیر داده شد. این ویروس از همولنف خرچنگ عفونی به روش شیب غلظت سوکروز و اولتراسانتریفوژ خالص‌سازی، و از راه مشاهده با میکروسکوپ الکترونی تأیید شد. تیتراسیون ویروس (دز کشنده‌ی ۵۰٪) در پست لاروهای یک گرمی میگو ببری سبز در دوره‌ی ۸ تا ۱۰ روزه انجام شد. غیرفعال‌سازی ویروس به روش پرتوتابی با استفاده از شتاب‌دهنده‌ی الکترون با انرژی ۱۰MeV و تیمار با فرمالین انجام شد. دز کشنده‌ی ۵۰٪ ویروس زنده و ویروس‌های پرتوتابی شده به روش کربر محاسبه، منحنی دز/ پایندگی با استفاده از نرم‌افزار Origin6 ترسیم، و ارزش $D_{۱۰}$ محاسبه شد. تیتر ویروس $۱۰^{۵/۴}$ دز کشنده‌ی ۵۰٪ در هر میلی‌لیتر، و دز بهینه‌ی الکترون برای غیرفعال‌سازی این ویروس ۱۳ kGy به دست آمد. این آنتی‌ژن ویروسی پرتوتابی شده می‌تواند در آینده برای ارزیابی سیستم ایمنی میگو استفاده شود.

کلیدواژه‌ها:* *ویروس سندرم لکه سفید، میگو، پرتوتابی الکترون، غیرفعال‌سازی، فرمالین، واکسن

Comparison of White Spot Syndrome Virus Inactivation by Electron Irradiation and Formalin Treatment

F. Motamedi-Sedeh*[1], M. Afsharnasab[2], M. Heidareih[1]
1. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 31485-498, Karaj – Iran
2. Fisheries Science Research Institute, P.O.Box: 15745-133, Tehran – Iran

Abstract: White spot syndrome virus is a major pathogen in cultured penaeid shrimp industries. The virus not only is present in shrimp but also occurs in marine crustaceans. The infected shrimp samples were collected from south of Iran and the infection was confirmed by Nested PCR. WSSV was isolated from the infected samples by centrifugation and filtration and multiplied in crayfish by intramuscular inoculation. WSSV was purified from the infected crayfish haemolymph by sucrose gradient and ultracentrifuge, and then confirmed under electron Microscopy. In vivo virus titration was made in *Penaeus semiculcatus* in a period of 8-10 days, and calculated as LD_{50}. WSSV was inactivated by the 10-MeV electron accelerator and formalin treatment. The LD_{50} of the live virus and the irradiated virus samples were calculated by the Karber method. The dose survival curve for the irradiated and non-irradiated virus samples was drawn by Origin 6.1 software and D_{10} Value factor was calculated according to the curve. In vivo titration of the live virus stock obtained was $10^{5.4}$ LD_{50}/ ml and the optimum dose of the electron beam for inactivation of WSSV was obtained as 13 kGy. The inactivated, irradiated WSSV antigen can be used for the evaluation of shrimp immune response in the near future.

Keywords: ***White Spot Syndrome Virus, Electron Irradiation, Inactivation, Formalin, Vaccine***

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۳/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۱۸
*email: fmotamedi@nrcam.org

۱. مقدمه

ویروس سندرم لکه سفید[۱] در تمام همولنف میگوی عفونی شده در حال گردش است. این ویریون یک نوکلئوکپسید میله‌ای‌شکل به قطر ۶۵ تا nm ۷۰ و طول ۳۰۰ تا nm ۳۵۰، و یک پوشش لیپیدی دارد [۱-۳]. این ویروس دارای ژنوم DNA دورشته‌ای بزرگ حدود ۲۹۰ کیلو جفت باز است [۴]. طبق گزارش لایتنر در سال ۱۹۹۶، این ویروس در دمای $۵۰^{o}C$ به مدت min ۲۰، و در دمای $۷۰^{o}C$ به مدت min ۱۰ غیرفعال می‌شود. بسیاری از مواد شیمیایی مثل کلرید سدیم ۱۵٪ در دمای $۲۸^{o}C$ به مدت h ۲۴، اوزن باقی‌مانده g/ml ۰٫۰۵ به مدت min ۱۰ در دمای اتاق، عوامل اکسیدکننده و نیز اتر بر این ویروس مؤثرند. ایده‌ی واکسیناسیون میگو یا سایر سخت‌پوستان علیه این ویروس به نظر می‌رسید عملی نباشد، چون تصور می‌شد که این موجودات فاقد پاسخ ایمنی اکتسابی، و فقط پاسخ ایمنی ذاتی داشته باشند [۵]. هر چند که در مطالعات اخیر دیده شده است ماکروسیکلوپوس آلبیدوس که از پاروپایان است سیستمی دفاعی دارد و باعث می‌شود این سخت‌پوست واکنش ایمنی کارامدتری در برخورد با یک آنتی-ژن انگلی که قبلاً با آن برخورد داشته است نشان دهد. بنابراین شاید ایمنی خاطره[۲] وجود داشته باشد [۶]. بعدها مشخص شد که تحریک ایمنی و واکسیناسیون میگو با ویبریو غیرفعال شده تا حدودی باعث حفاظت در مقابل این ویروس می‌شود [۷]. بیماری سندرم لکه سفید یکی از بیماری‌های جهانی میگو است که در سایر سخت‌پوستانی مثل خرچنگ نعل اسبی و خرچنگ دراز نیز دیده می‌شود [۸، ۹]. در مزارع پرورشی میگو انتقال این ویروس می-تواند توسط آب و غذای آلوده انجام شود [۱۰]. هدف اصلی از این مطالعه، مقایسه‌ی غیرفعال‌سازی ویروس سندروم لکه سفید به روش پرتوتابی الکترون و تیمار با فرمالین به منظور تهیه‌ی آنتی-ژن اولیه برای تولید واکسن غیرفعال علیه این بیماری است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ نمونه‌گیری

نمونه‌های میگو آلوده به ویروس لکه سفید با علائم بیماری از مزارع پرورشی میگو جنوب، استان بوشهر جمع‌آوری، و به روش Nested RT-PCR با استفاده از کیت IQ 2000 از نظر وجود ویروس بیماری‌زا بررسی شدند [۱۱].

۲.۲ جداسازی ویروس سندرم لکه سفید و تکثیر آن در خرچنگ دراز

بافت نمونه‌های میگوی عفونی شده پس از خرد شدن در بافر (Tris – HCl۲۰mM, NaCl۴۰۰mM, pH۷٫۴)TN، به نسبت ۱ به ۵ هموژن، و سپس با دور g×۱۷۰۰ به مدت min ۱۰ در دمای $۴^{o}C$ سانتریفوژ شد. سوسپانسیون بالای آن جداسازی، و پس از چند بار عبور از کاغذ واتمن و فیلتر ۰٫۴۵μ برای تزریق به خرچنگ استفاده شد. خرچنگ‌های دراز کرای فیش[۳] از رودخانه‌ی ارس در شمال غربی ایران جمع‌آوری، و به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان در پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای کرج انتقال داده شدند. سوسپانسیون ویروسی به روش داخل عضلانی در بند سوم یا چهارم شکمی خرچنگ‌ها تزریق، و در دمای $۳۰^{o}C$ نگه-داری شدند. بعد از ۴ تا ۵ روز، همولنف با ماده‌ی ضد انعقاد ترکیب و در فریزر $-۷۰^{o}C$ به عنوان استوک ویروسی نگه‌داری شد [۱۲-۱۵].

۳.۲ خالص‌سازی ویروس WSSV و مطالعه با میکروسکوپ الکترونی

همولنف جمع‌آوری شده از خرچنگ‌های آلوده به ویروس برای خالص‌سازی ویروس با گرادیانت سوکروز و اولتراسانتریفوژ بکمن مدل L2-65 B با دور g×۱۱۲۴۰۰ به مدت h ۱ در دمای $۴^{o}C$ استفاده شدند. رسوب حاصل از مرحله‌ی اول اولتراسانتریفوژ بر روی لوله‌ی حاوی شیب غلظت سوکروز از ۱۵ تا ۴۵٪ به آرامی قرار داده، و سپس اولتراسانتریفوژ با دور g×۱۵۳۲۰۰ به مدت h ۱ در دمای $۴^{o}C$ انجام شد. باند ویروسی قابل مشاهده، جداسازی و جمع‌آوری شد [۱۶، ۱۷]. یک قطره از این ویروس خالص شده بر روی یک گرید از جنس مسِ پوشش داده شده با فیلم فورموار قرار داده، و با میکروسکوپ الکترونی ZEISS–EM-900, 80 KV به روش رنگ‌آمیزی منفی با فسفوتنگستیک اسید ۲٪ مشاهده شد [۱۸].

۴.۲ تیتراسیون ویروس در میگو ببری سبز[۴]

سریال رقت 10^{0} تا 10^{5} از استوک ویروسی همولنف خرچنگ‌ها به وسیله‌ی بافر فسفات استریل تهیه، و به بچه میگوهای با وزن ۱ تا ۲ g تزریق شد. از هر رقت، ۱۰ µl به صورت درون‌ماهیچه‌ای به یک گروه ۱۴ تایی بچه میگو و به یک گروه از بچه میگوها بافر به عنوان کنترل منفی فسفات استریل تزریق شد. تمام میگوهای گروه کنترل منفی زنده ماندند در حالی که در همه رقت-های مختلف، مرگ و میر ناشی از عفونت ویروسی اتفاق افتاد [۱۳، ۱۵، ۱۹]. میگوهای مرده از نظر وجود ویروس با کیت تجاری Nested PCR-IQ 2000 kit بررسی شدند.

۵.۲ پرتوتابی با استفاده از شتاب‌دهنده الکترون

پرتوتابی با استفاده از شتاب‌دهنده الکترونی با انرژی ۱۰MeV و جریان ۲ mA (IBA Company, Model Rodotron TT200) انجام شد. نمونه‌های ویروسی در حالت منجمد با دزهای ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ kGy الکترون (سه نمونه ویروسی برای هر دز پرتوتابی) پرتوتابی شدند.

۶.۲ ویروس لکه سفید غیرفعال شده با فرمالین

همولنف خرچنگ دراز عفونی شده به شکل سوسپانسیون ویروسی با فرمالین به میزان ۰٫۵٪ حجمی/ حجمی مخلوط و به مدت ۱۰min در دمای $25^{o}C$ نگه‌داری شد. با استفاده از سانتریفوژ ۳۰۰۰۰×g به مدت ۱ h در دمای $4^{o}C$، فرمالین اضافی از محیط خارج و رسوب حاصل در حداقل حجم بافر فسفات استریل حل، و به شکل واکسن غیرفعال فرمالینه استفاده شد [۱۳].

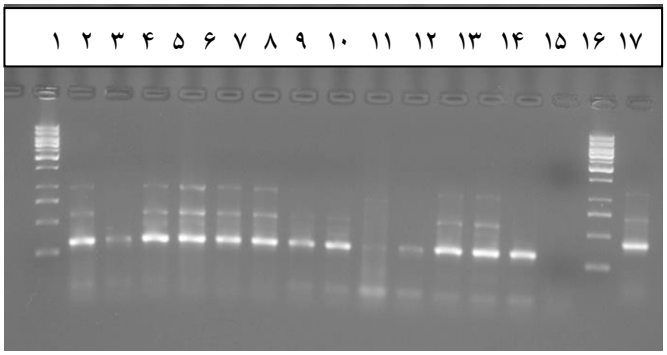
۷.۲ آزمون بی‌ضرری (آزمون سلامت[۵])

هر گروه میگوی ببری سبز حاوی ۱۰ عدد میگو با ویروس پرتوتابی شده با دز بهینه‌ی الکترون به روش حمامی تیمار شدند. هم‌چنین سریال رقت 10^{0} تا 10^{-3} از نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون در بافر TN تهیه، و به منظور تعیین تیتر ویروس پرتوتابی شده به بچه میگوها به صورت درون عضلانی تزریق شد. سریال رقت 10^{0} تا 10^{-3} از نمونه‌ی ویروسی غیرفعال شده با فرمالین نیز تهیه، و برای تعیین تیتر ویروس فرمالینه به بچه میگوها تزریق شد. سپس تلفات گروه‌های میگو در طی یک هفته بررسی، شمارش، و با استفاده از فرمول کربر تیتر ویروس برحسب دز کشنده‌ی ۵۰٪ محاسبه شد.

۳. نتایج

۱.۳ نمونه‌های میگوی عفونی شده

نمونه‌های میگوی عفونی شده از نظر وجود ویروس لکه سفید با استفاده از کیت تجاری IQ 2000 به روش Nested PCR تأیید شدند که نتایج واکنش PCR در شکل ۱ دیده می‌شود.



شکل ۱. نتیجه‌ی واکنش Nested RT-PCR نمونه‌های میگوی عفونی شده، ستون ۱۷ کنترل مثبت (۳۳۳، ۶۳۰ و ۸۴۸ جفت باز)، نمونه‌های مثبت ستون‌های: ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴، کنترل منفی در ستون ۱۵و ستون‌های ۱ و ۱۶ مارکر DNA.

۲.۳ تیتراسیون ویروس پرتوتابی شده و نشده

دز کشنده‌ی ۵۰٪ استوک ویروسی زنده به روش کربر حدود $10^{5/4}$ در میلی‌لیتر محاسبه شده است [۲۰]. دز کشنده‌ی ۵۰٪ از نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون به روش کربر محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۱ مشاهده می‌شود. هم‌چنین در شکل ۲ منحنی دز/ پایندگی نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون مشاهده می‌شود. مطابق با نتایج جدول ۱ و خط منطبق شده بر روی منحنی، تیتراسیون ویروس همراه با افزایش دز پرتوتابی کم‌کم کاهش می‌یابد. هم‌چنین ارزش D_{10} (دز پرتوتابی الکترون که ۹۰٪ تیتر ویروسی را کاهش می‌دهد) حدود ۲٫۰۷ kGy، و دز بهینه‌ی الکترون برای غیرفعال‌سازی کامل ویروس لکه سفید با تیتر $10^{5/4}$ در میلی‌لیتر، حدود ۱۲ تا ۱۳ kGy محاسبه شد. برای محاسبه‌ی دز بهینه از معادله خط در شکل ۲ استفاده شد، به این ترتیب که یک بار به جای لگاریتم تیتر ویروسی عدد ۵، و بار دیگر عدد ۲ قرار داده، و دز پرتوتابی محاسبه شد. سپس اختلاف این دو دز پرتوتابی که برای کاهش تیتر ویروسی به میزان سه سیکل لگاریتمی مناسب بود، محاسبه و بر ۳ تقسیم شد.

۳.۳ تیتراسیون ویروس لکه سفید غیرفعال شده با فرمالین

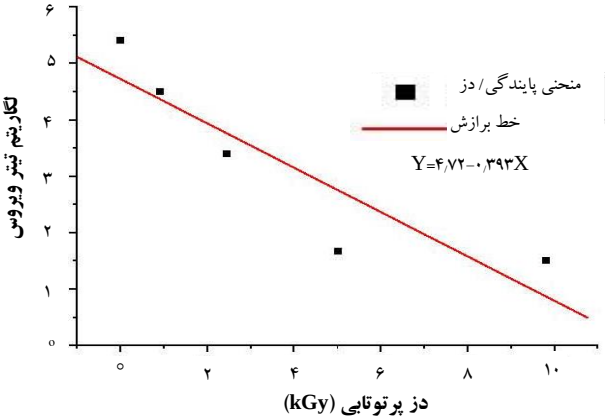
دز کشنده‌ی ۵۰٪ نمونه‌ی ویروسی غیرفعال شده با فرمالین به روش کربر حدود $۱۰^{۱/۵}$ محاسبه شد.

۴.۳ تصویر ویروس لکه سفید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

ویریون‌های ویروس لکه سفید به روش اولتراسانتریفیوژ از همولنف خرچنگ دراز جمع‌آوری، و به روش رنگ‌آمیزی منفی و با میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شدند.

جدول ۱. دز کشنده‌ی ۵۰٪ از نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون

دز پرتوتابی الکترون (کیلوگری)	۰	۱	۳	۵	۱۰	۲۰	۲۵	۳۰
دز کشنده ۵۰ درصد در میلی‌لیتر	$۱۰^{۵/۴}$	$۱۰^{۴/۵}$	$۱۰^{۳/۴}$	$۱۰^{۱/۶۷}$	$۱۰^{۱/۵}$	$۱۰^{۱/۵}$	$۱۰^{۱/۵}$	$۱۰^{۱/۵}$

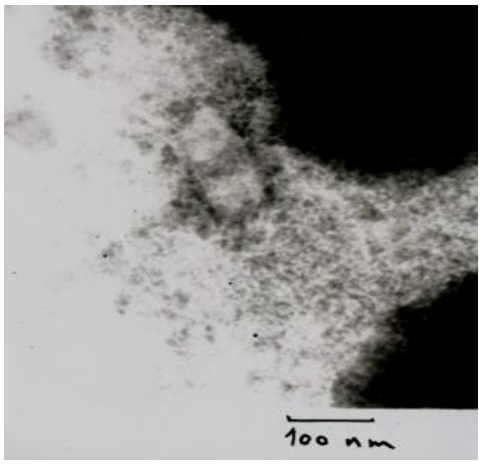


شکل ۲. منحنی دز/ پایندگی نمونه‌های ویروس لکه سفید پرتوتابی شده با الکترون.

شکل ۳، تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از ویروس لکه سفید میگو با بزرگ‌نمایی ۱۴۰۰۰۰ برابر، و دو پیکان داخل شکل ابتدا و انتهای یک ذره‌ی ویروس را نشان می‌دهند. در پایین شکل مقیاس ۱۰۰ نانومتر نشان داده شده است. با توجه به فاصله‌ی دو پیکان و مقیاس زیر شکل می‌توان طول ذره‌ی ویروسی را حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰nm بیان کرد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

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 پرتوزایی در موادی که تحت تیمار قرار می‌دهند، برای پرتوتابی با هدف غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شوند. مطالعه‌ی ویروس‌های حیوانی نشان می‌دهند که عفونت‌زایی ویروس‌ها ممکن است به طور انتخابی با پرتوتابی تخریب شود، ولی خواص آنتی‌ژنیک آن‌ها می‌توانند دست نخورده باقی بمانند [۲۱]. پژوهشگرانی چون پولارد [۲۲] و گینوزا [۲۳] پرتوتابی ویروس‌ها با پرتوهای یون‌ساز را مطالعه کرده‌اند. اسمولکو و لمباردو در سال ۲۰۰۵ از روش پرتوتابی گاما برای غیرفعال‌سازی نسبی و کامل ویروس تب برفکی، راچر لوکمیا و هرپس سیمپلک استفاده کردند [۲۴، ۲۵]. هم‌چنین معتمدی و همکاران در مورد واکسن غیرفعال بیماری تب



شکل ۳. تصویر ویروس لکه سفید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی.

برفکی تایپ A87/IRN بدون تغییر خواص آنتی‌ژنیکی آن به روش پرتوتابی گاما مطالعاتی انجام دادند [۲۶]. نامیکاشی و همکارانش ویروس لکه سفید میگو را با فرمالین (۰٫۵٪) غیر فعال، و به عنوان واکسن غیرفعال شده استفاده کردند. هم‌چنین ویروس سندرم لکه سفید غیرفعال شده با حرارت $۶۰^{o}C$ به مدت ۱۰ min را برای تهیه‌ی واکسن غیرفعال شده به کار بردند [۱۰]. پرس و همکارانش در سال ۱۹۹۷ سه مدل ویروسی متفاوت (پاروویروس خوکی، اینتروویروس خوکی و ویروس عامل اسهال گاوی) را با باریکه‌ی الکترون پرتوتابی کردند. آن‌ها گزارش کردند که فاکتور ارزش $D_{۱۰}$ نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده در حالت مایع بین ۵۱ تا ۶۹٪ فاکتور ارزش آن در حالت منجمد است. این یعنی دز بالاتری از پرتو برای غیرفعال‌سازی همان مقدار ویروس وقتی در حالت منجمد باشد لازم است [۲۷].

در این پژوهش گستره‌ی دز بهینه برای غیرفعال‌سازی کامل ویروس لکه سفید میگو جداسازی شده از ایران با نتایج آزمون

بی‌ضرری مناسب، حدود ۱۲ تا kGy ۱۳ به دست آمد. هم‌چنین غیرفعال‌سازی ویروس با فرمالین نیز انجام شد، ولی فرمالین باعث ایجاد باقی‌مانده‌ی سمّی در محصول خواهد شد. اگر ویروس لکه سفید غیرفعال شده با پرتوتابی بدون تغییرات نامطلوب در خواص آنتی‌ژنیک باشد، می‌تواند باعث القاء ایمنی در میگو شود و شاید بتواند در آینده برای ایجاد مقاومت در میگوها در آزمون مواجهه با ویروس زنده استفاده شود.

پی‌نوشت‌ها

1. White Spot Syndrome Virus (WSSV)
2. Memory Immunity
3. Astacus Leptodactylus
4. Penaeus Semiculcatus
5. Safety Tes

مراجع

[1] MC.W. Van Hulten, J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. Klein Lankhorst, J.M. Vlak. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence, *Virol.* **286** (2001) 7-22.

[2] S. Durand, D.V. Lightner, R.M. Redman, J.R. Bonami, Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV), *Dis. Aquat. Org.* **29** (1997) 205-211.

[3] E.C. Nadala, L.M. Tapay, P.C. Loh. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic penaeid shrimp, *Dis. Aquat. Org.* **33** (1998) 221-229.

[4] F. Yang, W. Wang, R.Z. Chen, X. Xu, A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA, *J. Virol. Methods.* **67** (1997) 1-4.

[5] D.A. Kimbrell, B. Beutler, The evolution and genetics of innate immunity, *Nat. Rev. Gen.* **2** (2001) 256-267.

[6] J. Kurtz, K. Franz, Evidence for memory in invertebrate immunity, *Nat.* **425** (2003) 37–38.

[7] A.O. Alabi,D.A. Jones, J.W. Latchford, The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of Penaeus indicuslarvae against Vibrio harveyi, *Aquacu.* **178** (1999) 1–11.

[8] H.H. Shih, Neutralization of White Spot Syndrome Virus by monoclonal antibodies against viral envelope protein, *Taiwa.* **49**(3) (2004) 159-165.

[9] T.W. Flegel, Major Viral Diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand, *World. J. Microb. Biotec.* **13** (1997) 433-442.

[10] A. Namikoshi, J.L. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T, Nishioka, M. Arimoto, K. Muroga, Vaccination trials with Penaeus japonicus to induce resistance to white spot syndrome virus, *Aquacu.* **229** (2004) 25-35.

[11] M. Afsharnasab, A. Dashtyannasab, V. Yeganeh, M. Soltani, Incidence of white spot disease (WSD) in Penaeus indicus farms in Bushehr Province, Iran, *Fishe. Scie.* **7**(1) (2007) 15-26.

[12] MC.W. Van Hulten, J. Witteveldt, M. Snippe, J.M. Valk, White Spot Syndrom Virus Envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp, *Voril.* **285** (2001) 228-233.

[13] H. Du, Z. Xu, X. Wu, W. Li, W. Dai, Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus, *Aquacu.* **260** (2006) 39-43.

[14] J. Witteveldt, C.C. Cifuentes, J.M. Valk, MC. W. Van Hulten, Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrom Virus by Oral vaccination, *J. Virol*. **78**(4) (2004) 2057-2061.

[15] J. Witteveldt, J.M. Valk, MC.W. Van Hulten, Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrom Virus using a WSSV subunit vaccine, *Fish. Shelfi. Immunol.* **16** (2004) 571-579.

[16] B.T. Poulos, C.R. Pantoja, D. Bradley-Dunlop, J. Aguilar, D.V. Lightner, Development and application of monoclonal antibodies for the detection of White spot syndrome virus of Penaeid shrimp, *Dis. Aquat. Org.* **47** (2001) 13-23.

[17] MC.W. Van Hulten, M.F. Tsai, C.A. Schipper, C.F. Lo, G.H. Kou, J.M. Valk, Analysis

of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions, *J. Gen. Virol.* **81** (2000) 307-316.

[18] Y.T. Wang, W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, J. Kwang, White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguiensis*, *Dis. Aquat. Org.* **52** (2002) 249-259.

[19] J. Witteveldt, C.C. Cifuentes, J.M. Valk, MC.W. Van Hulten, Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrom Virus by Oral vaccination, *J. Virol.* **78**(4) (2004) 2057-2061.

[20] Karber. FMD, Karber formula for calculation of virus/ antibody titres. OIE A Manual, Overview (2002).

[21] H.R. Morton Reitman, J.R. Tribble, L. Green, Gamma-Irradiated Venezuelan Equine Encephalitis Vaccines, *Appli. Microb.* **May** (1970) 763-767.

[22] E. Pollard, The action of ionizing radiation on viruses, *Advan. Virus. Res.* **2** (1955) 109-151.

[23] W. Ginoza, Inactivation viruses by ionizing radiation and heat. In Methods in virology, vol. IV, Chap. 4: 139-209, Academic Press, N.Y. (1968).

[24] E.E. Smolko, J.H. Lombardo, Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B **236** (2005) 249-253.

[25] J.H. Lombardo, E.E. Smolko, A Biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 Ci, *Radiat. Phys. Chem*. **35**(4-6) (1990) 585-589.

[26] F. Motamedi Sedeh, A. Khorasani, K. Shafaee, H. Fatolahi, K. Arbabi, Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig. *India. J. Microb.* **48**(3) (2008) 326-330.

[27] T. Preuss, S. Kamstrup, N.C. Kyvsgaard, P. Nansen, A. Miler, J.C. Lei, Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum, *Clin. Diagno. Labo. Immuno*. **4**(5) (1997) 504-508.