J. of Nucl Sci. and Tech.
75, 2016, 72-79

مجله‌ی علوم و فنون هسته‌ای
۷۵، ۱۳۹۵، ۷۲-۷۹

ایمن‌سازی میگو در برابر ویروس عامل سندرم لکه‌ی سفید (WSSV) با آنتی‌ژن ویبریوپاراهمولیتیکوس تابش‌دهی شده

مرضیه حیدریه*[۱]، فرحناز معتمدی سده[۱]، مهدی سلطانی[۲]، محمد افشارنسب[۳]، سعید رجبی‌فر[۱]
۱. پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج ـ ایران
۲. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۹۹۶۳۱۱۱، تهران ـ ایران
۳. مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی، صندوق پستی: ۱۴۹-۱۴۹۶۵، تهران ـ ایران

چکیده: صنعت پرورش میگو در کشور به ویژه در مناطق جنوبی از اهمیت اقتصادی خاصی برخوردار است. اما این صنعت با مشکلات متعددی مانند شیوع بیماری‌های باکتریایی و ویروسی روبه‌رو است که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به خسارت ناشی از بروز بیماری‌های ویبریوزیس و سندرم لکه‌ی سفید در میگو اشاره نمود. بنابراین با توجه به ضرورتِ یافتن راه‌های پیش‌گیری از بروز این بیماری‌ها در مزارع پرورش میگو، در این پژوهش میزان ایمنی ایجاد شده توسط آنتی‌ژن پرتوی ویبریو (باکتری غیرفعال شده با پرتو گاما) در برابر ویروس زنده‌ی عامل سندرم لکه‌ی سفید در میگو مطالعه شد. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که باکتری ویبریو غیرفعال شده با پرتو گاما می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن پرتوی، باعث ایجاد پاسخ ایمنی در برابر ویروس زنده‌ی عامل سندرم لکه‌ی سفید در میگو شود به طوری که این موضوع منجر به کاهش قابل‌توجه در میزان تلفات میگوهای گروه ایمن‌سازی شده نسبت به گروه کنترل مثبت پس از انجام عملیات روبه‌روسازی با ویروس زنده‌ی سندرم لکه‌ی سفید شد ($P<0.05$). یافته‌های به دست آمده از این پژوهش می‌تواند زمینه‌ای مناسب برای انجام مطالعات تکمیلی برای ساخت واکسن ویبریو پرتوی و هم‌چنین مواد باکتریایی محرک سیستم ایمنی (ادجوانت باکتریایی- ویبریو) را در میگو فراهم سازد.

کلیدواژه‌ها: ویبریوپاراهمولیتیکوس، تابش‌دهی، میگو، ویروس سندرم لکه‌ی سفید، پاسخ ایمنی، آنتی‌ژن پرتوی

Immunization of Shrimp by Irradiated Vibrio Paraheamolyticus Against White Spot Syndrome Virus

M. Heidarieh*[1], F. Motamedi Sedeh[1], M. Soltani[2], M. Afsharnasab[3], S. Rajabifar[1]
1. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 31485-498, Karaj – Iran
2. Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 1419963111, Tehran – Iran
3. Iran Fisheries Research Institute, P.O.Box: 14965-149, Tehran – Iran

Abstract: Shrimp farming industry is of significant importance to the economy, particularly in the south area of Iran. However, this industry faces with various challenges such as viral and bacterial disaeses. The losses due to Vibriosis and *white spot syndrome* in shrimp are examples of the issues. Therefore, taking into account the control of the diseases outbreaks, this investigation was carried out to study the immunity of *Vibrio* radio-antigen (inactivated whole-cell bacteria by the gamma irradiation method) against the *white spot syndrome virus* (*WSSV)* in *Litopeaneus vannamei.* The results showed that the treatment with the *Vibrio* radio-antigen caused an immune response against live WSSV in shrimp via significant decreasing of mortality in the immunized shrimp groups, in comparison with the positive control group after challenge with the live *WSSV* ($P<0.05$). The results of this investigation are potentially useful for future studies in production of radio-vaccine and adjuvant of *Vibrio paraheamolyticus.*

Keywords: ***Vibrio paraheamolyticus, Irradiation, Shrimp, White spot syndrome virus, Immune responses, Radio-antigen***

*email: mheidarieh@nrcam.org

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۷/۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

۱. مقدمه

میگو یکی از مهم‌ترین محصولات شیلاتی در دنیا و هم‌چنین در ایران است. صنعت پرورش میگو به ویژه در مناطق جنوبی کشور از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردار است. این صنعت به دلیل فراهم آوردن پروتئین حیوانی سالم و از طرف دیگر به دلیل اشتغال‌زایی و ارزآوری، از اهمیت قابل توجهی در کشور برخوردار شده است. با این حال صنعت پرورش میگو با مشکلات متعددی از جمله بروز بیماری‌های مختلف باکتریایی و ویروسی روبه‌رو است که از جمله می‌توان به خسارت‌های قابل توجه ناشی از بروز بیماری باکتریایی ویبریوزیس و ویروسی سندرم لکه‌ی سفید در مزارع پرورش میگو به ویژه در شرایط تنش‌زا (افزایش شوری، کاهش و یا افزایش pH، ...) اشاره نمود [۱، ۲، ۳].

باکتری ویبریو، پاتوژن گرم منفی، بیش‌تر در مناطق ساحلی آرام با اکسیژن کم و غنی از مواد آلی ساکن بوده و به عنوان بخشی از فلور طبیعی انواع آبزیان از جمله میگوها به شمار می‌آید [۱، ۴]. ویبریوپاراهمولیتیکوس یکی از جانداران عامل بیماری ویبریوزیس در میگو و یکی از پاتوژن‌های مشترک آبزیان و انسان است، به طوری که در انسان ایجاد گاستروآنتریت می‌نماید [۱]. براساس یک گزارش، مهم‌ترین گونه‌های عامل بیماری ویبریوزیس در میگوی ببری سیاه ویبریوآلجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس و انگوئیلاروم معرفی شده است [۵، ۶]. سلطانی و همکاران نیز عامل اصلی بروز بیماری ویبریوزیس در میگوهای مزارع پرورشی بوشهر را ویبریوپاراهمولیتیکوس و هاروی جداسازی شده از همولنف و هپاتوپانکراس میگوها بیان کردند [۷]. از طرف دیگر سندرم لکه‌ی سفید نیز یکی از جدی‌ترین بیماری‌های ویروسی میگو با گسترش جهانی است [۸، ۹]. ویروس سندرم لکه‌ی سفید میگو، جزء خانواده‌ای به نام نیماویریده[۱] و جنس ویسپوویریده[۲] است [۱۰]. سندرم لکه‌ی سفید با نمایان شدن نشانه‌های بالینی (ایجاد لکه‌ی سفید بر کوتیکول میگو) پس از ۳ تا ۱۰ روز باعث مرگ و میر بسیار شدید، حدود ۷۰ تا ۱۰۰ درصدی، در مزارع پرورش میگو می‌شود [۱۱].

با وجود رشد سریع صنعت پرورش میگو در کشور، هنوز در زمینه‌ی روش‌های کنترلی و پیشگیری از بروز این نوع بیماری‌ها اقدامات خاصی انجام نشده است. بنابراین یافتن راه‌های پیشگیری با کارآیی بالا و مقرون به صرفه، کمک شایانی به اقتصاد این صنعت می‌نماید. امروزه برای تولید واکسن‌های غیرفعال به روش‌های هسته‌ای (پرتوهای یون‌ساز) بسیار توجه می‌شود. زیرا این روش، کم‌ترین اثر زیان‌آور را بر ویژگی‌های آنتی‌ژنسیتی و بیش‌ترین اثر ایمن‌سازی را بر ذرات آنتی‌ژنی ریزجانداران دارد. پرتوهای یون‌ساز مانند پرتو گاما، قدرت نفوذ زیاد و اثر کُشندگی شدیدی دارند [۱۲، ۱۳]. اولین مرحله در ساخت و تولید واکسن‌های پرتوی، تعیین دز مناسب برای غیرفعال‌سازی عامل بیماری‌زای موردنظر است. با توجه به ضرورتِ یافتن راه‌حل‌های پیشگیری از بروز بیماری ویبریوزیس در مزارع پرورش میگو، در این پژوهش تلاش شده است تأثیر آنتی‌ژن غیرفعال شده با دز مطلوب پرتو گاما بر القای پاسخ سیستم ایمنی میگو در برابر ویروس زنده‌ی عامل سندرم لکه‌ی سفید بررسی شود، تا زمینه‌ای مناسب برای انجام مطالعات آتی در خصوص استفاده از این آنتی‌ژن باکتریایی غیرفعال شده به عنوان یک محرک (آنتی‌ژن پرتوی) در القای پاسخ سیستم ایمنی میگو فراهم شود.

۲. مواد و روش کار

۱.۲ تهیه و تکثیر باکتری

سویه‌ی ویبریوپاراهمولیتیکوس (شناسه ۱۷۸۰۲) به صورت انجماد خشک[۳] تهیه شد. برای تهیه‌ی سوسپانسیونی یکنواخت از باکتری انجماد خشک، آن را در محیط مایع TSB حاوی ۳٪ NaCl، حل کرده و از سوسپانسیون حاصل در محیط‌های آگار مغذی[۴] و محیط کشت انتخابی TCBS، کشت خطی داده و سپس در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شدند. پس از مشاهده‌ی کلنی‌های سبز رنگ بر روی محیط TCBS، بر طبق روش استاندارد جستجوی گونه‌های ویبریو ارائه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا، آزمایش‌های تأییدی انجام شد. پس از تأیید کشت خالص باکتری، انبوه باکتری در محیط استریل TSB حاوی ۳٪ NaCl، تولید شد. پس از مشاهده‌ی کدر شدگی در محیط کشت، گسترش و رنگ‌آمیزی گرم و اطمینان از خلوص کشت حاصل، تعداد سلول زنده‌ی باکتری در یک میلی‌لیتر از محیط مایع با استفاده از روش تهیه‌ی رقت و کلنی‌کانت تعیین شد. برای تهیه‌ی ویال‌های انجماد خشک

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری از سوسپانسیون تهیه شده، ابتدا به روش کشت سطحی در محیط آگار مغذی کشت و در دمای $37\ ^{\circ}C$ به مدت ۱۰ ساعت نگه‌داری شدند. سپس سلول‌ها جمع‌آوری و پس از افزودن به محیط استریل شیر پس‌چرخ[۵]، عملیات انجماد خشک انجام شد [۱، ۴].

۲.۲ تعیین دز مؤثر غیرفعال‌سازی باکتری

برای تعیین دز مطلوب غیرفعال‌سازی باکتری با پرتو گاما، ویال‌های حاوی باکتری انجماد خشک (ویال‌های شیشه‌ای فاقد اکسیژن در شرایط خلأ) و نیز ویال‌های حاوی سوسپانسیون کشت تازه‌ی باکتری استفاده شدند. به این ترتیب، سوسپانسیون تازه‌ی باکتری با کشت در محیط TSB حاوی ۳٪ NaCl تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه در $6000\times g$ و در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفوژ شد. در مرحله‌ی بعد، رسوب حاصل (بدون مایع روی آن) در محیط سترون TSB حاوی ۳٪ NaCl، حل و استفاده شد. عملیات پرتودهی با دزهای ۱، ۱٫۵، ۲، ۲٫۵، ۳، ۳٫۵ و ۴ kGy (سوسپانسیون تازه‌ی باکتری) و ۲، ۴، ۷ و ۸ kGy (باکتری انجماد خشک) در پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای با دستگاه گاماسل (PX-30-IssIedovapel) با نرخ دز ۰٫۲۲ Gy/s و چشمه‌ی کبالت-۶۰ انجام شد. سپس تمام ویال‌های انجماد خشک تابش‌دهی شده در محیط TSB حاوی ۳٪ NaCl، کشت داده و در دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۱۰ ساعت نگه‌داری شدند. برابری تأیید رشد و کدر شدگی در محیط‌های کشت داده شده، سوسپانسیون‌های تابش‌دهی شده روی محیط اختصاصی TCBS حاوی ۳٪ NaCl و محیط عمومی آگار مغذی، کشت داده شد و هم‌زمان با کشت، از هر کدام از سوسپانسیون‌های تابش‌دهی شده گسترش[۶]، تهیه شده و رنگ‌آمیزی گرم به عمل آمد. هم‌چنین بلافاصله بعد از کشت تازه‌ی سوسپانسیون باکتری‌های تابش‌دهی شده، رقت‌های مناسب تهیه و از هر رقت در محیط آگار مغذی با ۳ درصد NaCl کشت داده و محیط‌های موردنظر پس از کشت در دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۱۰ ساعت نگه‌داری و سپس تعداد کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) برای هر دز تابش‌دهی تعیین شد. تعیین دز غیرفعال‌سازی باکتری ویبریو با استفاده از پرتو گاما براساس روش ارائه شده توسط معتمدی و همکاران انجام گرفت [۱۷].

۳.۲ ایمن‌سازی با باکتری غیرفعال شده توسط پرتو گاما در میگو

در ابتدا ۵۴ عدد میگو[۷] با میانگین وزنی ۵ تا ۶ g انتخاب و به ۳ گروه (هر گروه شامل ۶ عدد میگو) با ۳ تکرار تقسیم شدند. یکی از ۳ گروه به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد، که به میگوهای آن گروه فقط بافر استریل حاوی تریس کلریدسدیم در دو دز به فاصله‌ی دو هفته به صورت عضلانی در بند پنجم و ششم تزریق شد. در گروه دیگر، میزان ۲۰ µl از محلول حاوی 3×10^{6} باکتری غیرفعال شده با پرتو گاما (آنتی‌ژن پرتوی) در دو نوبت به فاصله‌ی دو هفته به صورت عضلانی در بند پنجم و ششم به میگوها تزریق شد (گروه آزمایش). لازم به ذکر است که باکتری ویبریو غیرفعال شده در حالت انجماد خشک دارای $7/5\times10^{9}$ باکتری در میلی‌لیتر بوده است که با رقیق‌سازی پودر انجماد خشک باکتری در ۵۰ ml بافر استریل حاوی تریس کلرید سدیم به رقت قابل تزریق باکتری به میگوهای مورد آزمایش یعنی 3×10^{6} باکتری در ۲۰ µl رسیده است. میگوهای گروه آخر نیز تحت هیچ‌گونه تیماری قرار نگرفتند، ولی در آزمون روبه‌رو شدن، با ویروس زنده‌ی بیماری‌زای میگو، تیمار شدند (گروه کنترل مثبت).

۴.۲ منبع ویروس زنده (میگوی آلوده به ویروس سندرم لکه‌ی سفید)

در این پژوهش، اثر فعال‌سازی سیستم ایمنی میگو با استفاده از آنتی‌ژن پرتوی ویبریو (باکتری غیرفعال شده به روش تابش‌دهی) در برابر یکی از عوامل بسیار مهم و بیماری‌زای میگو به نام ویروس عامل سندرم لکه‌ی سفید بررسی شد. منبع ویروسی عامل سندرم لکه‌ی سفید مورد استفاده در این پژوهش، میگوهای آلوده به ویروس جمع‌آوری شده از مزارع پرورش میگوی بوشهر بوده است. آلودگی میگوها پس از مشاهده‌ی نشانه‌های بالینی بیماری (وجود لکه‌های سفید با قطر متغیر ۰٫۵ تا ۲ mm بر روی کوتیکول میگوها) و با استفاده از انجام آزمون PCR (کیت تشخیصی IQ-2000) تأیید شدند. معتمدی و همکاران ویروس مورد نظر را از نمونه‌های آلوده جداسازی و برای تسهیل در انجام مطالعات آتی بر روی ویروس سندرم لکه‌ی سفید، ویروس را در بدن خرچنگ دراز آب شیرین تکثیر و در $-70^{\circ}C$ ذخیره کردند [۱۴].

Archive of SID
www.SID.ir

۵.۲ تعیین درصد بقای نسبی میگوهای ایمن‌سازی شده پس از روبه‌روسازی عملی با ویروس

۱۴ روز پس از تزریق دوم باکتری (آنتی‌ژن پرتوی)، به میگوهای هر سه گروه میزان ۲۰ µl ویروس زنده با تیتر LD_{50}/ml ۱۰۰ به صورت عضلانی تزریق شد (مرحله‌ی روبه‌روسازی عملی). در طی دو هفته، گروه‌ها از نظر درصد تلفات و درصد بقای نسبی میگوهای ایمن شده و نشده بررسی شدند. پس از ثبت تلفات در همه‌ی گروه‌ها، با استفاده از فرمول زیر درصد بقای نسبی (RPS%) در برابر سندرم لکه‌ی سفید در میگوها محاسبه شد.

$$\text{درصد تلفات نسبی} = \frac{\text{تلفات گروه تیمار شده}}{\text{تلفات گروه کنترل شده}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

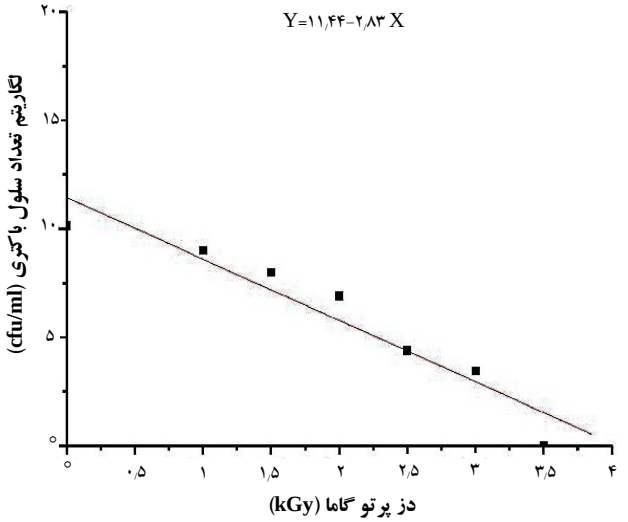
(۲) درصد تلفات نسبی - ۱۰۰ = درصد بقای نسبی (Relative Perecent Survival)

۶.۲ آنالیز آماری

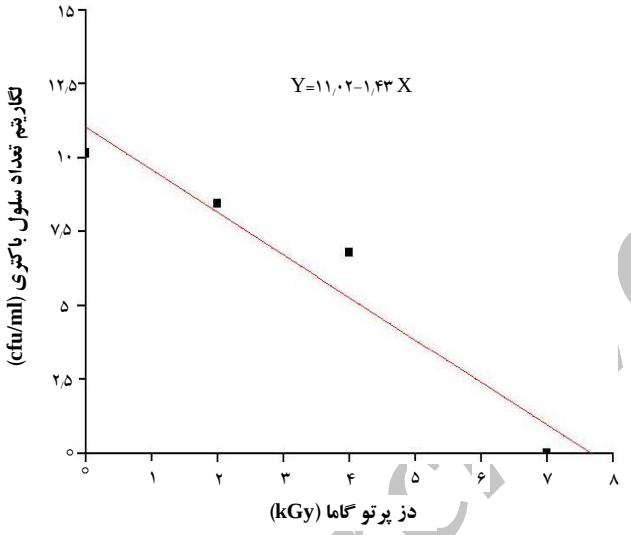
داده‌های در دزهای مختلف آزمایشی به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه[۸] در نرم‌افزار SPSS تحلیل و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار $P<۰/۰۵$ استفاده شد. هم‌چنین برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

۳. یافته‌ها

روند رشد باکتری در دو حالتِ کشت تازه و انجماد خشک در دزهای مختلف پرتو گاما در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج به دست آمده، میانگین رشدی سوسپانسیون کشت تازه‌ی باکتری تابش‌دهی شده با دزهای ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ kGy و میانگین رشد باکتری انجماد خشک تابش‌دهی شده با دزهای ۲، ۴، ۷ و ۸ kGy پرتو گاما، اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌ی کنترل با عیار $۱/۵\times۱۰^{۱۰}$ باکتری در یک میلی‌لیتر در سطح آماری $P<۰/۰۵$ نشان دادند. هم‌چنین به ترتیب ارزش $D_{۱۰}$، معادل ۰/۳ و ۰/۹۸ kGy برای کاهش یک چرخه‌ی لگاریتمی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس مورد اشاره به ترتیب به صورت سوسپانسیون کشت تازه و انجماد خشک با پرتو گاما محاسبه شد. براساس ارزش $D_{۱۰}$ دز مطلوب پرتو گامای مورد نیاز برای غیرفعال‌سازی کامل باکتری با عیار اولیه‌ی $۱/۵\times۱۰^{۱۰}$ باکتری در یک میلی‌لیتر به صورت کشت تازه در این بررسی برابر با ۳/۰۵ kGy و در حالت انجماد خشک ۹/۹۷ kGy محاسبه شد.



شکل ۱. رفتار رشد سوسپانسیون کشت تازه‌ی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس تابش‌دهی شده با دزهای مختلف پرتو گاما.



شکل ۲. رفتار رشد سوسپانسیون باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس انجماد خشک تابش‌دهی شده با دزهای مختلف پرتو گاما.

درصد بقای نسبی در گروه تیمار شده با آنتی‌ژن پرتوی (باکتری ویبریو غیرفعال شده با پرتو گاما) پس از انجام آزمون روبه‌روسازی عملی، اختلاف معنی‌داری را با میزان بقای میگوهای گروه کنترل مثبت پس از انجام روبه‌روسازی عملی با ویروس زنده نشان داد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱).

www.SID.ir

جدول ۱. درصد بقای نسبی در گروه‌های میگوهای مورد بررسی پس از روبه‌روسازی با ویروس زنده‌ی عامل سندرم لکه‌ی سفید میگو

گروه‌های واکسینه	تعداد کل/تعداد تلفات	درصد تلفات	درصد بقاء	درصد نسبی بقاء
میگوهای بدون هیچ‌گونه تیماری قبل از روبه‌رو شدن (شاهد مثبت)	۱۴/۱۸	۷۷/۷۷	۲۲/۲۲	۰
میگوهای تلقیح شده با باکتری غیرفعال ویبریو (گروه آزمایش)	۱۰/۱۸	۵۵/۵۵	۴۴/۴۴	۲۸/۵۷
میگوهای تیمار شده با بافر فسفات استریل بدون روبه‌رو شدن (گروه شاهد منفی)	۱/۱۸	۵/۵	۹۴/۵	۹۲/۹۲

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که به ترتیب دزهای ۴ و ۱۰ kGy پرتو گاما به عنوان کمینه دز مطلوب برای غیرفعال‌سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس با عیار $۱/۵\times۱۰^{۱۰}$ باکتری در هر میلی‌لیتر به صورت کشت تازه و انجماد خشک و سپس تولید آنتی‌ژن پرتوی سلول کامل غیرفعال شده، شناخته شده است. در پژوهش‌های گذشته از روش تابش‌دهی (پرتو گاما) با دز ۰/۵ kGy برای غیرفعال‌سازی باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس و ویبریوآلجینولیتیکوس برای استریل کردن ماده‌ی غذایی استفاده شده است [۱۵]. معتمدی‌سده و همکاران نیز دز مطلوب پرتو گاما برای کاهش آلودگی‌های میکروبی میگوی خام، به ویژه از بین بردن باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس، پس از گذشت یک سال نگه‌داری در دمای انجماد را ۲ kGy گزارش کردند [۱۶، ۱۷].

علت‌های متعددی برای تفسیر نتایج به دست آمده از این پژوهش قابل تصور است که تأثیر عوامل گوناگونی مانند وجود و یا عدم وجود اکسیژن، خشک و یا مرطوب بودن نمونه و غلظت و عیار باکتری از آن جمله هستند. اگر چه روش انجماد خشک یک روش مناسب برای نگه‌داری ریزجانداران با استفاده از انجماد و خشک کردن در خلأ است، اما در این روش به علت وجود شرایط خشکی و عدم وجود اکسیژن، مقاومت باکتری در برابر تابش‌دهی افزایش می‌یابد. به طور مثال انتروتوکسین باکتری ویبریوکلرا در حالت مایع با دز ۵۰ تا ۷۰ kGy، و در حالت خشک با دز ۱۵۰ تا ۲۰۰ kGy (پرتو گاما) کاملاً غیرفعال می‌شود [۳]. غیرفعال‌سازی اِنتروتوکسین باکتری ویبریوکلرا بیان‌کننده‌ی این واقعیت است که انتروتوکسین در حالت خشک (انجماد خشک) نسبت به حالت مایع از مقاومت بالاتری در برابر تابش‌دهی برخوردار بوده است [۳]. در این پژوهش نیز می‌توان یکی از علت‌های افزایش دز تابش‌دهی برای غیرفعال‌سازی باکتری ویبریو را خشک بودن باکتری در حالت انجماد خشک نسبت به کشت تازه ذکر نمود. اثر تابش‌دهی (پرتو گاما) را بر گوشت گوساله فرآوری و آلوده شده به سه گونه[۹] باکتری استافیلوکوکوس آرئوس، سالمونلا تیفوموریوم و اشرشیاکلای با عیار $۱۰^{۶}$ cfu/g نیز بررسی کردند. براساس گزارش ارائه شده، دز ۴/۵ kGy بدون نگه‌داری گوشت در دمای $۴\pm۱^{\circ}C$ سه گونه باکتری‌های مذکور را کاملاً از بین می‌برد [۱۸]. بنابراین می‌توان به این نکته اشاره کرد که سایر عوامل مانند عیار باکتری نیز در تعیین کمینه دز غیرفعال‌سازی تأثیر به سزایی دارد.

گرچه استفاده از مواد شیمیایی مختلف برای غیرفعال‌سازی جانداران بسیار متداول است اما به علت به جا ماندن باقی‌مانده‌ی ماده‌ی شیمیایی در محصول نهایی، وجود احتمال فرار برخی پاتوژن‌ها از ماده‌ی غیرفعال‌کننده و هم‌چنین سمی بودن برخی از آن‌ها، موجب شده است که پژوهش‌گران به دنبال روش‌های مطمئن‌تری باشند [۱۲، ۱۹]. بنابراین امروزه به استفاده از روش‌های هسته‌ای (پرتوهای یون‌ساز) برای غیرفعال‌سازی جانداران مختلف و سپس تولید واکسن‌های غیرفعال، بسیار توجه شده است. پرتوهای یون‌ساز قدرت نفوذ زیاد و اثر کُشندگی شدیدی دارند، اما هرگز در محصول نهایی، باقی‌مانده‌ای به جا نمی‌گذارند. هم‌چنین امکان فرار جانداران نیز با استفاده از این روش منتفی است [۷، ۱۲، ۱۳]. تنها مشکل استفاده از این روش، اثر پرتوهای یون‌ساز از جمله پرتو گاما بر مولکول‌های آب موجود در محیط نگه‌دارنده جاندار است، زیرا تابش‌دهی موجب تولید رادیکال‌های آزاد از مولکول‌های آب موجود در محیط می‌شود. بنابراین بهتر آن است که برای حفظ خاصیت آنتی‌ژنسیتی، جانداران را به صورت پودر انجماد خشک و یا منجمد به کار برد. با توجه به موارد اشاره شده و نتیجه‌ی حاصل از این پژوهش، با وجود مدت طولانی‌تر غیرفعال‌سازی باکتری انجماد خشک، می‌توان روش انجماد خشک را بهتر از روش کشت تازه در تهیه‌ی آنتی‌ژن پرتوی باکتری ویبریو گزارش کرد. هم‌چنین در این پژوهش برای اولین بار نشان داده شد که تزریق

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی‌ژن پرتوی باکتری ویبریو منجر به القای پاسخ ایمنی در برابر ویروس عامل سندرم لکه‌ی سفید در میگو می‌شود. استفاده از این آنتی‌ژن پرتوی به طور قابل‌ملاحظه‌ای منجر به کاهش تلفات در میگوهای تیمار شده در برابر ویروس سندرم لکه‌ی سفید نسبت به گروه کنترل مثبت پس از طی ۲۸ روز دوره‌ی ایمن‌سازی می‌شود.

تاکنون پژوهش‌های اندکی برای بررسی نقش ایمن‌زایی باکتری ویبریو غیرفعال شده در برابر ویروس سندرم لکه‌ی سفید انجام شده است [۱۶، ۲۰]. براساس گزارش‌های متعدد، میزان بقای نسبی واکسن‌های dsRNA و siRNA حاصل از ویروس سندرم لکه‌ی سفید در برابر بیماری لکه‌ی سفید ۳۵٪ [۲۱]، ۷۵٪ [۲۱]، ۳۰٪ [۲۲]، ۱۰٪ [۲۱] و ۲۱٪ [۲۳] بوده است. میزان حفاظتی واکسن‌های نوترکیب VP19 به روش تزریقی، ۳۳٪ پس از گذشت ۲ روز و ۵۷٪ پس از ۲۵ روز [۱۰]، VP28 (به روش تزریقی) ۴۴٪ پس از ۲ روز [۱۰]، VP28 به همراه VP19 (به روش تزریقی) ۳۳٪ پس از دو روز [۲۳]، VP26 (به روش تزریقی) ۵۷٪ بدون واکسیناسیون یادآور و با واکسیناسیون یادآور ۶۰٪ پس از گذشت ۳۰ روز [۱۶]، VP28 (به روش تزریقی) ۱۷٪ بدون یادآور و با یادآور ۹۵٪ پس از گذشت ۳۰ روز [۱۶]، میزان حفاظتی واکسن کشته (فرمالینه) در برابر ویروس سندرم لکه‌ی سفید به روش تزریقی ۵۰٪ پس از گذشت ۱۰ روز و ۵٪ پس از گذشت ۳۰ روز و میزان حفاظتی واکسن کشته (با حرارت) ۱۵٪ پس از گذشت ۱۰ روز و صفر درصد پس از ۳۰ روز گزارش شده است [۱۶]. با بررسی نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان بیان کرد که میزان بقای نسبی محاسبه شده پس از تلقیح آنتی‌ژن پرتوی باکتری ویبریو پس از گذشت ۲۸ روز از واکسیناسیون و روبه‌رو شدن با تیتر ویروسی ۱۰۰ LD_{50}/ml، حدود ۲۸٫۵۷٪ خواهد بود. سرانجام با توجه به نتایج این پژوهش و استفاده از پژوهش‌های گذشته، می‌توان این‌گونه ادعا کرد که سیستم ایمنی میگو نسبت به واکسیناسیون در برابر ویروس عامل سندرم لکه‌ی سفید پاسخ مثبت می‌دهد. هر چند برای ایمن‌سازی گسترده‌ی مزارع پرورش میگو از طریق این آنتی‌ژن پرتوی باکتریایی و یا سایر مواد محرک سیستم ایمنی، هم‌چنان آزمایش‌ها و بررسی‌های بیش‌تر و دقیق‌تری نیاز است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای و مؤسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی انجام شده است.

پی‌نوشت‌ها

1. Nimaviridea
2. Whispovirus
3. Lyophilize
4. Nutrient agar
5. Skim milk
6. Spread slide
7. Litopenaeus vannamei
8. One way ANOVA
9. Species

Archive of SID

www.SID.ir

مرجع‌ها

[1] A. Akhondzadeh Basti, H.A. Ebrahimzadeh Mousavi, A. Misaghi, M. Soltani, H. Esmaeili, The study of Vibrio SPP. In cultivated (Paeneus Indicus) and marine (Paeneus Semisulcatus) shrimp obtained from Boushehr a southern province of Iran, Journal of Veterinary Research, 62 (2007) 307-310.

[2] T. Gumus, A.S. Demirci, H.M. Velioglu, S.D. Velioglu, I. Yilmaz, O. Sagdic, Application of gamma irradiation for inactivation of three pathogenic bacteria inoculated into meatballs, Radiation Physics and Chemistry, 77 (2008) 1093–1096.

[3] G.I. Nedugova, I.V. Rubtsov, I.I. Samoĭlenko, Effect of gamma radiation on the immunobiological and immunochemical properties of cholera exotoxin, I. Change in the biological activity of nonpurified cholera exotoxin as affected by ionizing radiation, Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii I Immunobiologii, 2 (1984) 47-51.

[4] M. Soltani, Sh. Koholaki, M. Kiasumi, Isolation and identification of dominant Vibrio species in farmed prawn of Iran, Journal of Veterinary Research, 55 (2000) 32-36.

[5] D. Chen, P.J. Hanna, Immunodetection of specific Vibrio bacteria attaching to tissues of the giant tiger prawn Penaeus monodon, Diseases of Aquatic Organisms, 20 (1994) 159–162.

[6] G. Nash, C. Nithimathachoke, C. Tungmadi, A. Arkariamoran, P. Prathanpipat, P. Ruamthaveesub, Vibrios and its control in pond rearedPenaeus monodon, Diseases in Asian Aquaculture Fish Health Section, (1992) 143–155.

[7] L. Ruangpan, T. Kitao, Vibrio bacteria isolated from black tiger shrimp, Penaeus monodon Fabricius, Journal of Fish diseases, 14 (1991) 383-388.

[8] G. Wang, M.D. Hassan, M. Shariff, S.M. Zamri, X. Chen, 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 (1999) 1-11.

[9] L.M. Tapay, E.C.B. Nadala Jr, P.C. Loh, A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus, Journal of Virological Methods, 82 (1999) 39-43.

[10] J. Witteveldt, C.C. Cifuentes, J.M. Vlak, M.C.W. Van Hulten, Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrome Virus by Oral Vaccination, Journal of Virology, 78 (2004) 2057–2061.

[11] D.V. Lightner, A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, (1996) 305.

[12] M.A. Mousavi-Shalmani, H. Ahari-Mostafavi, B. Naserian-Khiabani, M. Heidarieh, A. Majdabadi, Nuclear Agriculture from science to practical, Nuclear Science and Technology Research Institute, (2009).

[13] 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, Indian Journal of Microbiology, 48 (2008) 326–330.

[14] F. Motamedi Sedeh, M. Afsharnasab, M. Heidarieh, S.K. Shafaee, S. Rajabifar, A. Dashtiannasab, M.H. Razavi, Titrations of the Iranian White Spot Virus isolate on Crayfish Astacus leptodactylus and Penaeus semisulcatus, Iranian Journal of Fisheries Science, 11 (2012) 145-155.

[15] F.B. Abdallah, A. Bakhrouf, A. Ayed, H. Kallel, Alterations of Outer Membrane Proteins and Virulence Genes Expression in Gamma-Irradiated Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus, Foodborne Pathogens and Disease, 10 (2009) 1171-1176.

[16] 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, Aquaculture 229 (2004) 25-35.

Archive of SID

www.SID.ir

[17] F. Motamedi Sedeh, R. Afsharian, H. Zolfagarieh, M. Nikbakht, S.K. Shafaee, M. Ayazi. Gamma radiation effects on bacterial contamination and organoleptic characteristics of frozen Ponaeus momodon, J. of Nuclear Science and Technology, 52 (2010) 44-48.

[18] R. Gomez, M. Takano, J. Sinskey, Characteristics of Freeze-Dried Cells, Crybiology 19 (1973) 368-374.

[19] M.K. Sharifi-Yazdi, H. Darghahi, Inactivation of pathogenic bacteria using pulsed UV light and its application in water disinfecion and quality control, Acta Medica Iranica, 44 (5) (2006) 305-308.

[20] P. Deachamag, U. Intaraphad, A. Phongdara, W. Chotigeat, Expression of a Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp, Aquaculture 255 (2006) 165-172.

[21] J. Robalino, C.L. Browdy, S. Prior, A. Metz, P. Parnell, P. Gross, G.W Warr, Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate, Journal of Virology, 78 (2004) 10442-10448.

[22] M. Westenberg, B. Heinhuis, D. Zuidema, J. M. Vlak, SiRNA injection induces sequence-independent protection in Penaeus monodon against White Spot Syndrome Virus, Virus Research, 114 (2005) 133-139.

[23] J. Xu, F. Han, X. Zhang, Silencing shrimp White Spot Syndrome virus (WSSV) genes by siRNA, Antiviral Research, 73 (2006) 126-131.

Archive of SID

www.SID.ir