



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

فرحناز معتمدی سده\*<sup>۱</sup>، محمد افشارنسب<sup>۲</sup>، مرضیه حیدریه<sup>۱</sup>

۱. پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج - ایران

۲. مؤسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی ایران، صندوق پستی: ۱۳۳-۱۵۷۴۵، تهران - 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 ۱۰ MeV و تیمار با فرمالین انجام شد. دز کشنده‌ی ۵۰٪ ویروس زنده و ویروس‌های پرتوتابی شده به روش کربر محاسبه، منحنی دز/ پایداری با استفاده از نرم‌افزار Origin6 ترسیم، و ارزش  $D_{10}$  محاسبه شد. تیتراسیون ویروس  $10^{5.4}$  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\*<sup>1</sup>, M. Afsharnasab<sup>2</sup>, M. Heidareih<sup>1</sup>

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<sub>50</sub>. WSSV was inactivated by the 10-MeV electron accelerator and formalin treatment. The LD<sub>50</sub> 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<sub>10</sub> Value factor was calculated according to the curve. In vivo titration of the live virus stock obtained was  $10^{5.4}$  LD<sub>50</sub>/ 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



## ۱. مقدمه

ویروس سندرم لکه سفید<sup>(۱)</sup> در تمام همولنف میگوی عفونی شده در حال گردش است. این ویرون یک نوکلئوکسید میله‌ای شکل به قطر ۶۵ تا ۷۰ nm و طول ۳۰۰ تا ۳۵۰ nm، و یک پوشش لیبیدی دارد [۳-۱]. این ویروس دارای ژنوم DNA دورشته‌ای بزرگ حدود ۲۹۰ کیلو جفت باز است [۴]. طبق گزارش لایتر در سال ۱۹۹۶، این ویروس در دمای ۵۰°C به مدت ۲۰ min و در دمای ۷۰°C به مدت ۱۰ min غیرفعال می‌شود. بسیاری از مواد شیمیایی مثل کلرید سدیم ۱۵٪ در دمای ۲۸°C به مدت ۲۴ h

باقی‌مانده ۰/۰۵ g/ml به مدت ۱۰ min در دمای اتاق، عوامل اکسیدکننده و نیز اثر 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 اکسپانسیو، و فقط پاسخ ایمنی ذاتی داشته باشند [۵]. هر چند که در مطالعات اخیر دیده شده است ماکروسیکلوپوس آلیدوس که از پاروپایان است سیستمی دفاعی دارد و باعث می‌شود این سخت‌پوست واکنش ایمنی کارآمدتری در برخورد با یک آنتی-ژن انگلی که قبلاً با آن برخورد داشته است نشان دهد. بنابراین شاید ایمنی خاطره<sup>(۲)</sup> وجود داشته باشد [۶]. بعدها مشخص شد که تحریک ایمنی و واکسیناسیون میگو با ویرو 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 می‌تواند توسط آب و غذای آلوده انجام شود [۱۰]. هدف اصلی از این مطالعه، مقایسه‌ی غیرفعال‌سازی ویروس سندرم 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-HCl ۲۰mM, NaCl ۴۰۰mM, pH ۷.۴)، به نسبت ۱ به ۵ هموزن، و سپس با دور ۱۷۰۰×g به مدت ۱۰ min در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. سوسپانسیون بالای آن جداسازی، و پس از چند بار عبور از کاغذ واتمن و فیلتر ۰/۴۵μm برای تزریق به خرچنگ استفاده شد. خرچنگ‌های دراز کرای فیش<sup>(۳)</sup> از رودخانه‌ی ارس در شمال غربی ایران جمع‌آوری، و به آزمایشگاه تحقیقات آبیان 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°C نگه‌داری شدند. بعد از ۴ تا ۵ روز، همولنف با ماده‌ی ضد انعقاد ترکیب و در فریزر ۷۰°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 گرادیانته سوکروز و اولتراسانتریفوژ بکمن مدل L2-65 B با دور ۱۱۲۴۰۰×g به مدت ۱ h در دمای ۴°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 ۱۵۳۲۰۰×g به مدت ۱ h در دمای ۴°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 مس 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].

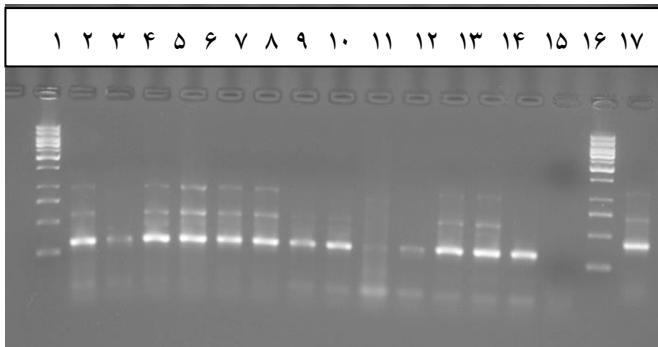
### ۴.۲ تیتراسیون ویروس در میگو ببری سبز<sup>(۴)</sup>



### 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 ۱۵ و 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٪ تیتراسیون ویروسی را کاهش می‌دهد) حدود  $2.07 \text{ kGy}$  و دز بهینه‌ی الکترون برای غیرفعال‌سازی کامل ویروس لکه سفید با تیترا  $10^{5.4}$  در میلی‌لیتر، حدود ۱۲ تا  $13 \text{ kGy}$  محاسبه شد. برای محاسبه‌ی دز بهینه از معادله خط در شکل ۲ استفاده شد، به این ترتیب که یک بار به جای لگاریتم تیتراسیون ویروسی عدد ۵، و بار دیگر عدد ۲ قرار داده، و دز پرتوتابی محاسبه شد. سپس اختلاف این دو دز پرتوتابی که برای کاهش تیتراسیون ویروسی به میزان سه سیکل لگاریتمی مناسب بود، محاسبه و بر ۳ تقسیم شد.

#### ۳.۳ تیتراسیون ویروس لکه سفید غیرفعال شده با فرمالین

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،  $10 \mu\text{l}$  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 رقت‌های 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  $10 \text{ MeV}$  و جریان  $2 \text{ mA}$  (IBA Company, Model Rodotron TT200) انجام شد. نمونه‌های ویروسی در حالت منجمد با دزهای ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و  $30 \text{ kGy}$  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  $10 \text{ min}$  در دمای  $25^\circ\text{C}$  نگهداری شد. با استفاده از سانتریفوژ  $30000 \times g$  به مدت ۱ h در دمای  $4^\circ\text{C}$ ، 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)<sup>(۵)</sup>

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 تیتراسیون ویروس پرتوتابی شده به بچه میگوها به صورت درون‌عضلانی تزریق شد. سریال رقت  $10^0$  تا  $10^{-3}$  از نمونه‌ی ویروسی غیرفعال شده با فرمالین نیز تهیه، و برای تعیین تیتراسیون ویروس فرمالینه به بچه میگوها تزریق شد. سپس تلفات گروه‌های میگو در طی یک هفته بررسی، شمارش، و با استفاده از فرمول کربر تیتراسیون ویروس برحسب دز کشنده‌ی ۵۰٪ محاسبه شد.



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

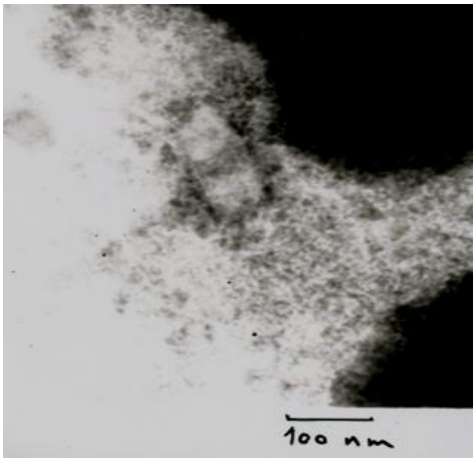
دز کشته‌ی ۵۰٪ نمونه‌ی ویروسی غیرفعال شده با فرمالین به روش کریر حدود  $10^{1/5}$  محاسبه شد.

### ۴.۳ تصویر ویروس لکه سفید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

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

۳۰	۲۵	۲۰	۱۰	۵	۳	۱	۰	دز پرتوتابی الکترون (کیلوگری)
$10^{1/5}$	$10^{1/5}$	$10^{1/5}$	$10^{1/5}$	$10^{1/67}$	$10^{3/4}$	$10^{4/5}$	$10^{5/4}$	دز کشته ۵۰ درصد در میلی لیتر

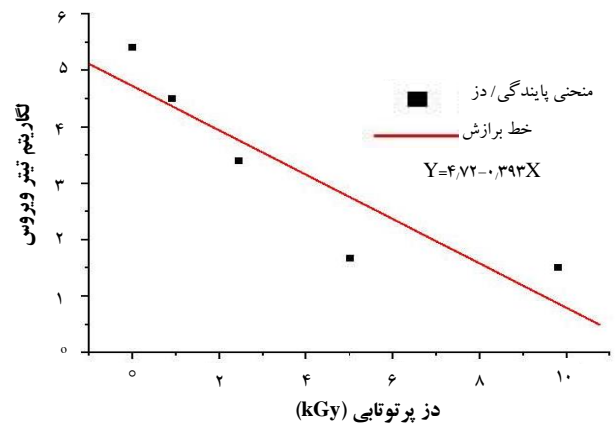
سال ۲۰۰۵ از روش پرتوتابیتی گاما برای غیرفعال‌سازی نسبی و کامل ویروس تب برفکی، راجر لوکمیا و هرپس سیمپلک استفاده کردند [۲۴، ۲۵]. هم‌چنین معتمدی و همکاران در مورد واکسن غیرفعال بیماری تب



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٪) غیرفعال، و به عنوان واکسن غیرفعال شده استفاده کردند. هم‌چنین ویروس سندرم لکه سفید غیرفعال شده با حرارت  $60^{\circ}\text{C}$  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  $D_{10}$  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



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 ۳۰۰ nm 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 آنتی‌ژنیکی آن‌ها می‌تواند دست نخورده باقی بماند [۲۱]. پژوهشگرانی چون پولارد [۲۲] و گینوزا [۲۳] پرتوتابی ویروس‌ها با پرتوهای یون‌ساز را مطالعه کرده‌اند. اسمولکو و لمباردو در



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*

بی‌ضرری مناسب، حدود ۱۲ تا ۱۳ kGy 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

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, *Virology* **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 indicus* larvae 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. Biotech.* **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 Syndrome Virus Envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp, *Virology* **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 Syndrome 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 Syndrome Virus using a WSSV subunit vaccine, *Fish. Shelf. 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 merguensis*, *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 Syndrome 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. Shafae, 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. Diagn. Labo. Immuno.* **4**(5) (1997) 504-508.